

重症肺炎患者 BALF 中细胞因子及 α -SMA 水平与疾病严重程度的研究

李智鑫 严一核 孙雪东 吕 铁 金烈洲

摘 要 **目的** 探讨重症肺炎患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞因子水平及 α -SMA 水平反映疾病严重程度及肺纤维化程度的意义。**方法** 将笔者医院重症监护室收治的 45 例重症肺炎患者分为非 ALI/ARDS 组、ALI 组及 ARDS 组,检测 3 组患者入科后支气管肺泡灌洗液的 HGF、KGF 及其他炎性因子水平,评价上述指标反映重症肺炎患者病情严重程度的意义,同时检测 3 组患者肺泡灌洗液中 α -SMA 水平,评价 3 组患者肺纤维化的程度。**结果** 3 组患者 BALF 中的细胞因子 HGF、KGF、IL-6、IL-8 及 MCP-1 水平呈现 ARDS 组 > ALI 组 > 非 ALI/ARDS 组($P < 0.05$);3 组患者 BALF 中 α -SMA 水平呈现 ARDS 组 > ALI 组 > 非 ALI/ARDS($P < 0.05$)。**结论** 对于初入科的重症肺炎患者,细胞因子 HGF、KGF、IL-6、IL-8 及 MCP-1 水平越高,其病情相对越重,灌洗液中 α -SMA 水平可以反映肺纤维化程度,其水平越高,肺组织修复能力越差,对患者的预后有一定提示作用。

关键词 肺泡灌洗液 重症肺炎 炎性因子 肺纤维化

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.015

Study on Cytokines and α -SMA Levels and Severity of Disease in BALF Patients with Severe Pneumonia. Li Zhixin, Yan Yihe, Sun Xue-dong, et al. Intensive Care Unit, Shaoxing People's Hospital, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To investigate the levels of cytokines and α -SMA in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe pneumonia reflected the severity of the disease and the degree of pulmonary fibrosis. **Methods** Forty five patients with severe pneumonia were divided into non-ALI/ARDS group, ALI group and ARDS group, levels of HGF, KGF and other inflammatory factors in bronchoalveolar lavage fluid were measured, evaluate the significance of the above indicators to reflecting the severity of severe pneumonia in patients with severe disease, Simultaneous detection of three groups of patients with alveolar lavage fluid α -SMA levels, and evaluate the degree of the three groups of patients with pulmonary fibrosis. **Results** The levels of cytokines EGF, KGF, IL-6, IL-8 and MCP-1 in BALF were significantly higher in ARDS group > ALI group than in ALI / ARDS group ($P < 0.05$), the levels of α -SMA in BALF group were ARDS > ALI > non-ALI / ARDS ($P < 0.05$). **Conclusion** In this study, for newly diagnosed patients with severe pneumonia, the higher the levels of cytokines EGF, KGF, IL-6, IL-8 and MCP-1, the more severe the disease, the level of α -SMA in the lavage fluid can reflect the degree of pulmonary fibrosis, the level higher, the lung tissue repair capacity worse, there are clues for prognosis.

Key words Alveolar lavage fluid; Severe pneumonia; Inflammatory factors; Pulmonary fibrosis

肺炎是严重危害人类健康的一种疾病,占感染性疾病中病死率之首,在人类总病死率中排第 5~6 位^[1,2]。重症肺炎是 ICU 最常见疾病之一,除炎性因子作用于肺泡膜直接损伤外,更重要的是多种炎性细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、血小板等)及其释放的炎性介质和细胞因子间接介导的炎性反应,进一步导致肺泡弥漫性受损,血管内皮细胞和肺泡上皮细胞的广泛性破坏^[3]。肺泡上皮细胞的修复需要 II 型肺泡上

皮细胞(AEC II)的增殖和迁移,并且分化为 I 型肺泡上皮细胞(AEC I)^[3,4]。肺成纤维细胞(fibroblast)的迁移和增殖在肺泡受损的早期就发生了,对上皮细胞的修复和纤维化是必不可少的^[5],其分泌可溶性因子(如 HGF、KGF,直接参与肺泡上皮细胞的增殖和分化。肺组织肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)目前被认为是肺修复过程中的优势生长因子^[6,7]。而 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达于成纤维细胞灶,并随肺纤维化加重而表达增强,其染色指数与肺纤维化程度呈正相关^[8]。那么,它们在重症肺炎发生、发展过程中作用如何?笔者观察了重

基金项目:浙江省医药卫生一般研究计划项目(2016KYB308)

作者单位:312000 绍兴市人民医院重症医学科

通讯作者:严一核,电子信箱:47474811@qq.com

症肺炎患者支气管肺泡灌洗液中 HGF、KGF、 α -SMA 水平的变化并进行了探讨。

对象与方法

1. 研究对象:纳入标准:选择 2015 年 6 月~2016 年 12 月的 45 例重症肺炎患者为研究对象,其中男性 26 例,女性 19 例,年龄 41~86 岁,根据 2006 年中华医学会的《社区获得性肺炎诊断和治疗指南》的诊断标准入选,并需要机械通气的患者。重症肺炎诊断标准符合 2007 年美国胸科协会,感染协会制订的重症肺炎标准。(1)主要标准:①需有创的机械通气;②感染性休克。(2)次要标准:①多肺叶浸润;②呼吸频率 >30 次/分;③定向力障碍或意识障碍;④尿素氮 $\geq 20\text{mg/dl}$;⑤低体温 ($T < 36^\circ\text{C}$);⑥ $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$;⑦白细胞减少 ($< 4 \times 10^9/\text{L}$);⑧血小板计数减少 ($< 10 \times 10^9/\text{L}$);⑨低血压需液体复苏。入选患者符合 1 项主要标准或 3 项次要标准。并根据氧合指数 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$),把重症肺炎组细分为 ALI 组、ARDS 组。排除标准:排除有肺纤维化,免疫性疾病,长期使用激素的患者,HIV 感染的患者,晚期肿瘤患者,妊娠女性,年龄 < 18 岁分组:对所有机械通气的患者进行分组为 ALI 组 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$)、ARDS 组 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$)、非 ALI/ARDS 组。

2. 研究方法:(1)临床指标:观察记录入选患者的一般情况(如:基础疾病、性别、年龄),APCTCH II 评分,血气分析,氧合指数 ($\text{FiO}_2/\text{FiO}_2$),血气分析,ICU 住院时间,气管插管时间,28 天生存率等。(2)支气管肺泡灌洗和标本采集与保存:患者入科后即行纤维支气管镜检查,用纤维支气管镜行机械通气时的气道管理^[2],并进行支气管肺泡灌洗(BAL),采集 BALF 各组均选取右肺中叶或左肺舌叶作为灌洗部位以获取 BALF 细胞。按照 BAL 有关指针方案进行操作,用 150ml 无菌生理盐水分 3 次通过经纤支镜插

入的灌洗导管灌入支气管肺泡内,然后用注射器回吸收,回收液 $>40\%$ 为回收成功。把采集的 BALF 分成 3 部分:第 1 部分,用于细菌培养和药敏试验;第 2 部分,进行离心后检测细胞因子;第 3 部分,离心后加入抑酞酶储存于 -80°C 的冰箱。(3)BLAF 细胞因子的检测:对第 2 部分 BALF 进行离心后检测 ELISA 法检测 BALF 中的细胞因子 HGF、KGF、IL-6、IL-8 及 MCP-1,操作过程严格按试剂盒说明书进行,显微镜下计数中性粒细胞、巨噬细胞等。(4)肺成纤维细胞分离培养及细胞表型的检测:第 3 部分 BALF 液离心后加入抑酞酶储存于 -80°C 的冰箱,等收集到一定数量的标本后应用细胞培养技术培养,分离并用 RPMI 1640 + 10% FCS + 2mmol/L L-谷胱甘肽液培养。培养 7 天后分离梭形纤维细胞,对细胞进行第 2 次传代后形成梭形细胞集落,第 3 次传代后形成单层细胞,然后提取肺成纤维细胞蛋白,用 Western blot 法检测肺成纤维细胞分泌的 α -SMA 水平。

3. 统计学方法:所有数据均采用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析处理,计量资料呈正态分布时以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验及单因素方差分析分析数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 组患者一般情况比较:3 组患者年龄之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),非 ALI/ARDS 组患者 APCTCH II 评分、气管插管时间还是 28 天死亡例数都明显小于 ALI 及 ARDS 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 ALI 组患者 APCTCH II 评分与 ARDS 组患者相比无明显差异 ($P > 0.05$),但气管插管时间及 28 天死亡例数明显少于 ARDS 组 ($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 3 组患者一般情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	APCTCH II 评分	气插管时间(min)	28 天死亡例数
非 ALI/ARDS 组	15	58.67 $\pm$ 10.47	16.73 $\pm$ 4.62	6.3 $\pm$ 2.6	0
ALI 组	15	58.32 $\pm$ 10.41	20.96 $\pm$ 5.18 *	9.8 $\pm$ 2.7 *	1
ARDS 组	15	59.05 $\pm$ 10.84	21.93 $\pm$ 5.22 *	13.5 $\pm$ 4.4 *	7

与 ALI/ARDS 组比较, * $P < 0.05$

2. 肺炎病原体分布情况:病原菌方面还是以 G^- 菌为主,其中肺炎克雷伯菌所占比例最高(14 例,构成比 31.1%),其次为大肠杆菌(11 例,构成比

24.4%), G^+ 菌主要为葡萄球菌属,分别为金葡萄菌(3 例,构成比 6.7%)及溶血葡萄球菌 2 例,构成比 4.4%)。详见表 2。

3.3 组患者 BALF 中的细胞因子 HGF、KGF、IL - 6、IL - 8 及 MCP - 1 水平的比较:3 组患者 BALF 中的细胞因子 HGF、KGF、IL - 6、IL - 8 及 MCP - 1 水平呈现 ARDS 组 > ALI 组 > 非 ALI/ARDS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与疾病发展的严重程度基本相符;但各项细胞因子水平(ALI 组 - 非 ALI/ARDS 组)明显低于(ARDS 组 - ALI 组),差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 3。

表 3 3 组患者 BALF 中的细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HGF(ng/ml)	KGF(pg/ml)	IL - 6(pg/ml)	MCP - 1(pg/ml)	IL - 8(pg/ml)
非 ALI/ARDS 组	15	62.36 ± 9.66	109.28 ± 28.62	271.34 ± 58.67	628.07 ± 158.67	246.53 ± 53.46
ALI 组	15	94.91 ± 14.82	187.86 ± 35.57	377.90 ± 84.18	831.43 ± 173.70	291.34 ± 58.84
ARDS 组	15	277.27 ± 51.32	594.80 ± 129.64	986.39 ± 219.81	1649.49 ± 321.35	563.91 ± 119.63

4.3 组患者 BALF 中肺成纤维细胞分泌的 α - SMA 水平的比较:3 组患者 BALF 中 α - SMA 水平呈现 ARDS 组 > ALI 组 > 非 ALI/ARDS,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 4。

表 4 3 组患者 BALF 中肺成纤维细胞分泌的 α - SMA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	α - SMA
非 ALI/ARDS 组	15	0.26 ± 0.06
ALI 组	15	0.61 ± 0.24
ARDS 组	15	1.17 ± 0.39

3 组间两两比较, P 均 < 0.05

讨 论

重症肺炎是 ICU 最常见的病种之一,除具有肺炎常见呼吸系统症状外,还有其他系统明显受累的表现,引起多脏器衰竭,可发生于社区获得性肺炎(CAP)、医院获得性肺炎(HAP),在 HAP 中以 ICU 内的呼吸机相关肺炎(VAP)和健康护理院相关性肺炎(HCAP)更为常见。重症肺炎病死率高,而且细菌耐药情况也越来越严重,甚至产生了超级细菌;对于病毒性肺炎,仍然无特效药物治疗。因其发生率高、病死率高、治疗费用高,对人类健康产生了严重威胁。本研究中 45 例重症肺炎患者有 8 例死亡,病死率高达 17.8%,而死亡组患者气管插管时间、机械通气时间及 ICU 住院时间都远远高于存活组,差异有统计学意义($P < 0.05$),对患者生命、财产造成严重损害。

前期研究发现,对于重症肺炎,支气管肺泡灌洗结合病灶局部注药明显改善其患者的预后;进一步从研究支气管肺泡灌洗液(BALF)的细胞因子分析出

表 2 病原体分布情况

病原菌	<i>n</i>	构成比(%)
肺炎克雷伯菌	14	31.1
大肠杆菌	11	24.4
铜绿假单胞菌	7	15.6
鲍曼不动杆菌	5	11.1
金黄色葡萄球菌	3	6.7
阴沟肠杆菌	3	6.7
溶血葡萄球菌	2	4.4
共计	45	100

发,发现 BALF 与血清中的炎性因子呈正相关,BALF 中的 PCT 能较血清提前预示肺部感染状况。肺成纤维细胞(fibroblast)的迁移和增殖及其分泌可溶性因子(如 HGF、KGF),直接参与肺泡上皮细胞的增殖和分化。HGF 是肺泡上皮细胞最强有力的促有丝分裂原,给予外源性 HGF 对 ALI 后的肺纤维化进程有强大的抑制作用,对已经发生的纤维化改变有一定的逆转作用,原理是通过促进支气管上皮和肺泡上皮的增生,抑制上皮细胞的凋亡;相反给予 HGF 抗体后可以加重肺组织损伤程度,抑制肺泡上皮细胞的增生,加剧肺泡结构的破坏,抑制增殖细胞核抗原的表达等^[9-11]。KGF 即 FGF - 7,主要表达于成纤维细胞,是成纤维细胞生长因子家族成员之一,通过旁分泌方式作用于上皮细胞,刺激上皮细胞增殖,对其他细胞无此作用。而 KGF 受体仅在上皮细胞表达,因此 KGF 是介导间质与上皮相互作用的一道桥梁。Galiacy 等^[12]研究发现 KGF 通过刺激上皮细胞的增殖,不仅对损伤的肺上皮细胞有修复作用,而且可以保护肺上皮细胞免受各种损伤。

Alpdogan 等^[13]研究发现,KGF 对放化疗后导致的胸腺上皮细胞的损害具有保护和修复作用。ARDS 时患者肺部炎性反应严重,大量炎性细胞因子被释放,可诱导 HGF、KGF 反应性生成增多,气血屏障的破坏导致肺间质中大量 KGF 和 HGF 透过肺泡上皮,使肺泡液中水平升高^[18]。本研究中,3 组患者 BALF 中的细胞因子 HGF、KGF、IL - 6、IL - 8 及 MCP - 1 水平呈现 ARDS 组 > ALI 组 > 非 ALI/ARDS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与疾病发展的严重程度基本相符,死亡组的细胞因子 HGF、KGF、IL - 6、IL - 8 及

MCP-1 水平也明显高于存活组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);但 ARDS 时,尽管肺组织局部 HGF、KGF 水平增高,但由于大量肺泡上皮细胞受损,HGF 和 KGF 受体严重不足,导致 HGF、KGF 的活性不能有效发挥。动物研究证实,HGF 和 KGF 治疗急性肺损伤时需要较大剂量 (5mg/kg),并且只有在肺损伤发生前 48 ~ 72h 使用才有效,故 ARDS 患者肺水肿液中 HGF、KGF 浓度达不到有效水平^[15,16]。

在肺炎的发展过程中肺成纤维细胞除了分泌保护性生长因子外,它也进行自身的增殖,分化为肌成纤维细胞表达 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA),迁移到肺泡间隙的纤维渗出物中^[17]。如果这些间充质细胞在肺泡间质内持续的存在慢性肌纤维细胞的活化、细胞外基质 (如 collagen1) 的沉积,那么肺的正常修复机制就被破坏;反之,正常的肺泡结构可以被完全重构^[19]。本研究中,3 组患者 BALF 中 α -SMA 水平呈现 ARDS 组 > ALI 组 > 非 ALI/ARDS,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示肺炎病情越重,组织间隙存在慢性肌纤维细胞的活化、细胞外基质的沉积越重,肺组织自身修复也越差。

综上所述,在本研究中,对于初入科的重症肺炎患者,细胞因子 HGF、KGF、IL-6、IL-8 及 MCP-1 水平越高,其疾病程度相对越重,HGF、KGF 用于重症肺炎的治疗目前尚无文献支持,也有待进一步研究。而患者 BALF 中 α -SMA 水平可以反应肺纤维化程度,其水平越高,肺组织修复能力越差,对患者的预后有一定提示作用,但本研究有一定局限性,只能做粗略观察,细胞因子与疾病严重程度是否有确切的相关性需进一步研究证实。

参考文献

- Hiromichi A. Prostaglandin E_2 enhances interleukin-8 production via EP4 receptor in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. Am J Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(2): 266-273
- Lynn M. Epithelial repair mechanisms in the lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 298(6): 715-731
- Quesnel C. Alveolar fibroblasts in acute lung injury: biological behaviour and clinical relevance[J]. Eur Respir J, 2010, 35(6): 1312-1321
- Christophe C. Regulation of hepatocyte growth factor secretion by fibroblast in patients with acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(8): 334-343
- Pascale P. Alveolar fluid in acute respiratory distress syndrome promotes fibroblast migration: Role of platelet-derived growth factor pathway[J]. Crit Care Med, 2012, 40(2): 2041-2049
- Jae WL. Concise review: mesenchymal stem cell for acute lung injury: role of paracrine soluble factors[J]. Stem Cell J, 2011, 29(9): 913-919
- Christophe Q. Alveolar fibrocyte percentage is an independent predictor of poor outcome in patients with acute lung injury[J]. Crit Care Med J, 2012, 40(11): 21-28
- 陈茹雪, 胡立星, 徐作军. 肺泡上皮细胞在特发性肺纤维化发病机制中的作用[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(20): 1625-1627
- Hattori N, Mizuno S, Yoshida Y, et al. The plasminogen activation system reduces fibrosis in the lung by a hepatocyte growth factor-dependent mechanism[J]. Am Pathol, 2004, 164(3): 1091-1098
- Dohi M, Hasegawa T, Yamamoto K. Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in murine model of pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(6): 2302-2307
- 姚济华, 余维巍, 秦泰, 等. 肝细胞生长因子在急性肺损伤中的作用机制[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2007, 36(6): 783-786
- Galiacy S, Planus E, Lepetit H, et al. Keratinocyte growth factor promotes cell motility during alveolar epithelial repair in vitro[J]. Exp Cell Res, 2003, 283(2): 215-229
- Alpdogan O, Hubbard M, Smit Hom, et al. Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration[J]. Blood, 2006, 107(6): 2453-2460
- Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(4): 143-146
- Yaekashiwa M, Nakayama S, Ohnuma K, et al. Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally repress the fibrotic changes in murine lung injury by bleomycin. Morphologic study[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(6): 1937-1944
- Guo J, Yie S, Havilla M, et al. Intravenous keratinocyte growth factor protects against experimental pulmonary injury[J]. Am J Physiol, 1998, 275(41): L800-L805
- Jaume S. Pulmonary and systemic hepatocyte and keratinocyte growth factor in patients and with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Int J COPD, 2008, 3(18): 719-725
- Tracey L. Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299(22): 765-770

(收稿日期: 2017-06-29)

(修回日期: 2017-07-19)