

## 慢性阻塞性肺病患者血清细胞因子与肺功能相关性研究\*

刘笑然<sup>1</sup>, 丁春华<sup>2</sup>, 叶琳<sup>3</sup>, 谭家庆<sup>2</sup>

**摘要:**目的 通过观察稳定期不同级别慢性阻塞性肺病患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-8、GM-CSF 水平与 FVC、FEV<sub>1</sub> 和 FEV<sub>1</sub>/FVC 关系,探讨血清 TNF- $\alpha$ 、IL-8、GM-CSF 水平的变化对 FVC、FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>/FVC 的影响及其机制。方法 在呼吸科门诊筛查的 COPD 患者中选取 56 例分为 1 组、2 组和 3 组,分别检测 FVC、FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>/FVC;用 ELISA 方法测定患者血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-8、GM-CSF 水平;另从患病 1、2、3 组中抽出 10 名患者为治疗 1<sub>T</sub>、2<sub>T</sub>、3<sub>T</sub> 组;对选定的治疗组患者口服百令胶囊 30d 后,检测相同指标。结果 TNF- $\alpha$ 、IL-8、GM-CSF 水平在不同级别中存在差异 ( $P < 0.05$ ),与 FEV<sub>1</sub>、FVC 存在着明显的负相关 ( $P < 0.05$ )。结论 COPD 细胞因子的持续升高是引起肺组织慢性损伤、功能降低的重要原因。

**关键词:**慢性阻塞性肺病;呼吸功能试验;用力肺活量;第一秒钟用力呼气容积;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;白介素-8;粒-巨细胞集落刺激因子

中图分类号:R563.5 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2007)9-1546-02

**Correlation of serum cytokines level and pulmonary function in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** LIU Xiao-ran, DING Chun-hua, YE Lin, et al. (Department of Physiology of Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan, P. R. China)

**Abstract:** **Objective** To to explore the change of serum TNF- $\alpha$ , IL-8, GM-CSF level in different grade and their effect on FEV<sub>1</sub>, FVC, FEV<sub>1</sub>/FVC of COPD patients in stable stage by observing the levels of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin-8 (IL-8), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in the serum of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients in different stable grade, and their lung function, including forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume one second (FEV<sub>1</sub>), FEV<sub>1</sub>/FVC, as well as the relationship between these factors and lung function after treated. **Methods** A total of 56 COPD patients from the respiratory clinic, were divided into Group 1, Group 2 and Group 3 based on GOLD grading standard. The levels of FVC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC were determined. Ten patients were randomly chosen from the three groups served as Treatment Group 1, 2 and 3, the levels of FEV<sub>1</sub>, FVC, FEV<sub>1</sub>/FVC were determined, while the levels of TNF- $\alpha$ , IL-8, and GM-CSF in serum were determined 30 days after orally administration of Bailing capsule. **Results** The levels of FEV<sub>1</sub>, FVC, FEV<sub>1</sub>/FVC are significantly different in various grades ( $P < 0.05$ ). The levels of TNF- $\alpha$ , IL-8, and GM-CSF were negatively correlated with that of FEV<sub>1</sub> and FVC. **Conclusion** The continuous increase of COPD cytokine is an important cause resulting in the chronic lesions in pulmonary tissues and the lower of pulmonary function.

**Key words:** Chronic obstructive pulmonary disease; Respiratory function; Forced vital capacity (FVC); Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ); Interleukin-8 (IL-8); Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)

慢性阻塞性肺疾病 (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种气流受限不完全可逆、呈进行性发展的疾病,与肺部对有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关<sup>[1]</sup>。大量研究表明,针对氧化应激所激发的细胞因子在 COPD 的发病机理中起着重要作用<sup>[2,3]</sup>,目前应用细胞因子拮抗剂治疗 COPD 是一条新的途径,目的是改善或缓解肺功能的减退,但究竟哪种细胞因子对患者的肺功能影响较明显尚无定论。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-8 (IL-8) 及粒-巨细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 是近年来发现与 COPD 的发生、发展有密切相关的细胞因子, TNF- $\alpha$  增高患者的体重明显减轻,病人体质下降反复感染,但是与肺功能降低存在确切的相关性少有报道, IL-8 和 GM-CSF 是否影响肺功能尚无报道,对此我们设

计了本实验,旨在观察这些因子与肺功能的相关性,为临床改善 COPD 患者肺功能提供有效的手段。

### 1 资料与方法

1.1 研究对象 从 2003 ~ 2004 年呼吸科门诊筛选稳定期 COPD 患者 56 例,女性 27 例,男性 29 例,平均年龄 (64.0  $\pm$  6.7) 岁。COPD 的诊断依据 2001 年 4 月美国国立心、肺、血液研究所 (NHLBI) 和世界卫生组织 (WHO) 共同制定的《慢性阻塞性肺疾病全球倡议》(Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD) 及 2002 年中华医学会呼吸病学分会制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》(简称《指南》),结合相应病史,危险因素接触史,体征,应用支气管扩张剂后的肺功能指标等综合分析诊断。按照《指南》提供的临床严重程度分级标准将 COPD 患

\* 作者单位:1. 海南医学院病理生理教研室,海南 海口 571101; 2. 河北医科大学病理生理教研室,河北 石家庄 050017; 3. 海南现代女子医院,海南 海口 570206。

作者简介:刘笑然(1970~),男,河北唐山人,海南医学院病理生理教研室,硕士研究生,E-mail: liuxiaorao3192@163.com

通讯作者:丁春华,河北医科大学病理生理教研室,教授,E-mail: dch54@sina.com

者分为 1(n=17 例)、2(n=20 例)、3(n=19 例)组。并从患病 1、2、3 组中各随机抽出 10 例患者为治疗 1<sub>T</sub>、2<sub>T</sub>、3<sub>T</sub> 组。

1.2 方法

1.2.1 肺功能检测 于晨 8~10 时清醒状态吸支气管扩张剂(喘乐宁 200μg)后应用肺功能仪反复三次测肺功能,取最高值,记录 FEV1、FVC 和 FEV1/FVC 等指标。

1.2.2 细胞因子检测 于晨 8~10 时抽取静脉血 10ml,室温状态下静置 1h,放在低温离心机中,以 3 000r/min 10min,取血清采用双抗夹心 ELISA 法测 TNF-、IL-8 和 GM-CSF 水平。

1.2.3 治疗后检测 治疗组随后每一组患者均给予口服百令

胶囊(冬虫夏草),每天 3 次,每次 5 粒,共 30d。停药后观察肺功能 FEV1、FVC、FEV1/FVC 及细胞因子 TNF-、IL-8 和 GM-CSF 的变化。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析与统计学图表的绘制,于各数据进行描述性分析、正态性检验与方差齐性分析。

2 结果

2.1 肺功能及细胞因子治疗前检测结果(见表 1) 3 种因子在 COPD 稳定期的不同级别有明显差异(P<0.05),与 FEV1、FVC 和 FEV1/FVC 呈负相关性(见表 2,3)。

表 1 慢性阻塞性肺病患者不同组血清中的细胞因子水平及 FVC、FEV1 和 FEV1/FVC 的值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The level of cytokines, including TNF-, IL-8, GM-CSF(pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Groups	TNF-	IL-8	GM-CSF	FVC(L)	FEV1(L/S)	FVEI/FVC
1	18.36 ±7.79	70.31 ±2.29	91.07 ±17.38	2.40 ±0.49	1.99 ±0.39	0.690 ±0.134
2	22.56 ±8.78	84.49 ±5.61	106.7 ±11.98	1.91 ±0.41	1.53 ±0.55	0.512 ±0.171
3	28.46 ±9.47	100.37 ±4.90	146 ±18.85	1.72 ±0.47	1.45 ±0.44	0.413 ±0.172
F	6.037	3.582	8.0038	8.161	5.901	9.089
P	0.007	0.042	0.002	0.002	0.007	0.001

表 2 细胞因子与肺功能的关系

Table 2 The correlation between cytokines and lung fuction

项目	FVC	FEV1	TNF-	IL-8	GM-CSF
FVC	1	0.771**	-0.465**	-0.365**	-0.286*
FEV1	0.771**	1	-0.476**	-0.358**	-0.288*
TNF-	-0.465**	-0.476**	1	0.202	0.167
IL-8	-0.365**	-0.358**	0.202	1	0.292*
GM-CSF	-0.286*	-0.288*	0.167	0.292*	1

\*\*P < 0.01; \*P < 0.05。

3 讨论

本实验研究发现,稳定期 COPD 患者血清 TNF-、IL-8 和 GM-CSF 随级别(GOLD 分级)增高增多,其中 TNF- 可能是决定 COPD 患者肺功能的主要因子,它在细胞因子网络中起关

键作用<sup>[4]</sup>,TNF- 主要由单核巨噬细胞系统产生,感染等因素可刺激其表达释放增加,在循环中较早出现并迅速达到高峰<sup>[5]</sup>。TNF- 能诱导肺内皮细胞活化、白细胞迁移、粒细胞脱颗粒和毛细血管渗漏,并且能在短时间水平急剧升高引起全身炎症反应综合征(SIRS)<sup>[6]</sup>,同时 TNF- 诱导单核巨噬细胞产生 IL-8<sup>[7]</sup>,而后者的主要功能是趋化和激活中性粒细胞,使之释放大量活性氧自由基、蛋白水解酶、脂类介质及细胞因子,这些因子共同引起严重肺损伤,导致肺功能下降<sup>[8]</sup>。另外,TNF- 能诱导血管内皮细胞表达粘附分子并诱导气道上皮细胞和中性粒细胞合成 IL-8,还可增强中性粒细胞的细胞外蛋白分解作用,促进炎症反应、血管生成和组织纤维增生,造成气道重塑狭窄,使 FVC、FEV1 降低,这与本实验中 COPD 肺功能降低和 TNF- 升高呈显著负相关相一致。

表 3 治疗后细胞因子及 FVC、FEV1 和 FEV1/FVC 的值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The changes of TNF-, GM-CSF, IL-8 after treated by bailing (unit pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Groups	TNF-	IL-8	GM-CSF	FVC(L)	FEV1(L/S)	FVEI/FVC
1 <sub>T</sub>	11.05 ±2.90	41.26 ±3.27	35.37 ±9.98	2.96 ±0.42	2.45 ±0.26	0.80 ±0.14
2 <sub>T</sub>	15.39 ±4.23	79.48 ±5.64	62.19 ±12.83	2.45 ±0.29	2.02 ±0.40	0.72 ±0.11
3 <sub>T</sub>	20.07 ±5.20	93.12 ±7.71	70.72 ±18.98	1.99 ±0.33	1.77 ±0.44	0.66 ±0.12
F	10.744	13.66	8.658	19.446	7.957	5.890
P	0.0001	0.0001	0.001	0.0001	0.002	0.006

本实验中 IL-8 水平随级别(COPD 的 GOLD 分级)的增加而升高,FEV1、FVC 则出现降低。这可能是由于 COPD 气道上皮 IL-8 的高表达导致使气道粘液分泌过多阻塞气道,引起 COPD 患者 FVC、FEV1 降低。另外,激活的中性粒细胞,产生氧自由基及花生四烯酸等系列炎性介质,氧自由基可灭活 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶,导致蛋白酶/抗蛋白酶平衡失调<sup>[9]</sup>,并促进蛋白酶介导肺基质降解造成气道、呼吸性支气管、肺泡管的慢性损伤,影响肺功能,使 FEV1、FVC 明显下降。

COPD 患者血清 GM-CSF 水平增高,也是造成 FEV1、FVC 下降的主要原因。可能是由于 GM-CSF 通过诱导氧自由基、脂质代谢产物、溶酶体等介质形成炎症介质逐级放大,诱导肺

组织细胞损害,进而使 COPD 患者的 FEV1、FVC 降低,而 TNF-、IL-8、GM-CSF 血清中的水平下降后,肺功能 FEV1、FVC 有明显改善(P<0.01)。

这 3 种细胞因子与 COPD 患者的肺功能有明显的负相关,如何阻断细胞网络因子之间相互诱导、相互作用以降低对肺组织细胞生物周期近期、远期的影响及改善 COPD 患者肺功能仍是下一步研究的重点。

参考文献:

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,8(25):453-460.

(下转第 1549 页)



球菌在两种培养基上均不生长;嗜水气单胞菌和铜绿假单胞菌在 HK 培养基上不生长,在 CHROMagar 培养基上生长且颜色与沙门菌相似(分别为紫色和浅紫红色);变形杆菌在 CHROMagar

培养基上不生长而在 HKM 培养基上的菌落为白色,可与沙门菌相区分;费氏柠檬酸杆菌和大肠杆菌在两种培养基上均为蓝绿色。

表 1 不同沙门菌种的菌株在显色培养基上的生长情况

测试菌株名称	CHROMagar 沙门氏菌显色培养基			HKM 沙门氏菌显色培养基		
	菌落颜色	菌落直径(mm)	菌落数(cfu/皿)	菌落颜色	菌落直径(mm)	菌落数(cfu/皿)
鼠伤寒沙门菌	蓝紫色	1.7	6.4 ×10 <sup>8</sup>	品红	2.15	7.9 ×10 <sup>8</sup>
肠炎沙门菌	浅紫色	1.77	7.4 ×10 <sup>8</sup>	品红	2.93	1.1 ×10 <sup>9</sup>
汤卜逊沙门菌	蓝紫色	1.56	1.1 ×10 <sup>9</sup>	品红	3.07	1.4 ×10 <sup>9</sup>
伤寒沙门菌	浅紫红色	1.97	7.3 ×10 <sup>8</sup>	品红	0.95	6.8 ×10 <sup>8</sup>

2.2 显色培养基的灵敏度 由表 1 可见,涂布相同浓度和剂量的 4 种沙门菌在两种显色培养基平板上,37 培养 24h 后,菌落总数和菌落直径结果均有差异。肠炎沙门菌在 HK 平板上的菌落数比在 CHROMagar 平板上约多 5 倍,汤卜逊沙门菌和伤寒沙门菌的结果较相近。伤寒沙门菌在 CHROMagar 培养基上菌落直径(1.97mm)远大于 HK 培养基(0.95mm),其他 3 种沙门菌在 HK 培养基上的菌落大于 CHROMagar 培养基上的。

2.3 实际样品检测 40 份实际样品检测出的阳性菌株经 VITEK32 的 GNI<sup>+</sup> 鉴定,结果详见表 2。

表 2 三种培养基检测 40 份样品中沙门菌结果比较

样品名称	份数	DHL 培养基检出数(%)	CHROMagar 检出数(%)	HK 培养基检出数(%)
熟食	20	16(80.0)	13(65.0)	17(85.0)
牛奶	10	9(90.0)	9(90.0)	9(90.0)
生鸡肉	10	9(90.0)	9(90.0)	9(90.0)
总计	40	34(85.0)	31(77.5)	35(87.5)

3 讨论

沙门菌广泛存在于自然界中,主要是通过食品(特别是动物性食品)传播、感染人体。国标法是目前国内绝大多数检测机构都在使用的方法,由于其检测周期长、程序复杂、所需试剂繁多等缺点,已远远不能满足现代检测要求。显色培养基法的原理是使用适当的荧光或显色底物,在细菌特异性酶作用下,产生荧光或显示一定颜色,用紫外灯观察细菌产生的荧光或直接观察菌落颜色,减少对菌株进行纯培养和生化鉴定步骤,可以把检测、计数和鉴定一次完成<sup>[3]</sup>,缩短检测周期。

HKM 和 CHROMagar 培养基上的沙门菌呈现品红或紫色的菌落与各自特异的酶底物和显色剂有关。两种培养基均能抑制金黄色葡萄球菌的生长,大肠杆菌、费氏柠檬酸杆菌、奇异变形杆菌等杂菌或被抑制或菌落颜色与沙门菌有明显差别。在 CHROMagar 培养基上,嗜水气单胞菌和铜绿假单胞菌与沙门菌菌落颜色无法区别,而 HK 显色培养基对这两种菌有良好的抑制作用。从 4 种沙门菌的涂布培养结果可见,伤寒沙门菌在 CHROMagar 培养基上的菌落较大,而 HK 培养基对某些沙门菌检测的灵敏度比 CHROMagar 培养基多数倍,菌落直径也明显较大。

在实际样品检测中,3 种培养基对牛奶、生鸡肉中沙门菌的检出率相同,而对熟食样品检出率差异较大,原因可能是熟食在生产加工的过程中添加的有机和无机成分种类多且复杂,影响了酶与底物的反应,同时熟食较牛奶和生鸡肉杂菌污染量大,使检测结果出现一定比例假阳性或假阴性,从而干扰目标菌的检测,降低显色培养基的敏感性和特异性。

综上所述,显色培养基在微生物检测中的应用,可大大提高测效率,满足应急需要。

参考文献:

[1] 余滨. 医学微生物学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1983,303~305.  
 [2] 吴清平,周艳红,蔡芷荷. 卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(1):124~126.  
 [3] 卢勉飞,吴清平,刘云林,等. 特异性酶反应在食源性致病菌检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(3):354~356.

收稿日期:2007-06-08;修回日期:2007-07-02

(上接第 1547 页)

[2] Mehmet K, Michiel V, Herman - Jan Pennings, et al. Tumor necrosis factor - +489G/A gene polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respiratory Research,2002,3(1):1~7.  
 [3] Wood .L. G , Gibson P. G, Garg .M. L. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma[J]. Eur Respir J, 2003, 21(1):177~186.  
 [4] Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, et al. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B [J]. Chest, 2003, 123(4):1240~1247.  
 [5] Chung A, Dai J, Tai H, et al. Tumor necrosis factor - alpha was central to acute cigarette smoke - induced inflammation and connective tissue breakdown[J]. Am J Respir Crit. Care Med, 2002,166(6):849~854.

[6] 张永,程德云,王慧,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠肺内白细胞介素 - 8 和肿瘤坏死因子 - 与气道炎症的关系研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2003,2(6):355~356.  
 [7] Thompson AB, Daughton D, Robbins RA, et al. Intraluminal airway inflammation in chronicbronchitis: characterization and correlation with clinical parameter[J]. Am Rev Respir Dis, 1989,140(7):1527~1537.  
 [8] Ill A, Bayley D, Stockley R. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronicbronchitis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999,160(3):893~898.  
 [9] Aman MJ, Stock dreher K, Thews A, et al. Regulation of stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor in vivo[J]. Ann Hematol, 1996,73(3):231~235.

收稿日期:2007-05-15