

· 临床论著 ·

稳定期慢性阻塞性肺疾病细菌定植与炎症细胞的关系

黄惠雪 王浩彦 李京明 徐秋芬 刘美清

【摘要】 目的:对稳定期慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者行痰定量细菌培养及痰细胞分类计数,以探讨下呼吸道细菌定植对气道炎症的影响。方法:选择近 1 个月无急性发作病史的稳定期 COPD 患者,通过痰诱导留取痰液,行痰定量细菌培养和痰细胞分类计数,比较下呼吸道细菌定植阳性组与阴性组的痰中炎症细胞水平。结果:33 例稳定期 COPD 患者接受痰诱导,其中 11 例(32.4%)存在下呼吸道细菌定植(A 组),22 例为阴性(B 组),A 组痰中的嗜酸性粒细胞和中性粒细胞均高于 B 组($P < 0.05$),2 组间的淋巴细胞和巨噬细胞水平差异无显著性($P > 0.05$)。结论:下呼吸道细菌定植可加重稳定期 COPD 患者的炎症反应,加重气流受限程度。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;细菌定植;炎症细胞

健康人的下呼吸道是无菌的,但研究发现一部分稳定期慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者存在下呼吸道细菌定植,而且定植的细菌量与痰中的白细胞介素-8(IL-8)、白三烯 B_4 (LTB_4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度水平存在正相关,提示细菌定植与气道炎症有关。大量研究表明,在 COPD 患者的气道、肺实质和肺血管中均存在着慢性炎症,中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等均参与了 COPD 的慢性炎症过程。痰液是宿主呼吸道被覆的黏液纤毛器和免疫系统与外界入侵的生物和非生物进行反应的产物,因此痰液中的炎症细胞能反映呼吸道的炎症反应。本研究通过比较下呼吸道细菌定植阳性组和阴性组患者的痰液炎症细胞水平,探讨下呼吸道细菌定植对气道炎症的影响。

资料与方法

选择 2003 年 1 月至 2006 年 1 月北京安贞医院呼吸科门诊及住院患者 33 例,行痰定量细菌培养及痰细胞分类计数。所有入选对象均符合以下标准:1. 年龄 < 80 岁;2. 符合 1997 年中华医学会呼吸系病学会组织制订的 COPD 诊治规范(草案)中关于 COPD 的定义,且第一秒呼气容积/用力呼气容积(FEV_1/FVC) $< 70\%$;3. 近 1 个月无急性发作病史。

排除标准:1. 合并支气管哮喘、支气管扩张症、肺血栓栓塞症及肺癌等其他呼吸系统疾病;2. 合并严重心脏疾病、肿瘤以及慢性消耗性疾病。

收集痰液:测定受试者的 FEV₁ 及 FVC,以确定气道受限的严重程度。嘱受试者清水漱口,雾化吸入 4% 高渗盐水进行痰诱导,最长达 10 min,留取痰液约 10 mL。痰诱导过程中若受试者出现喘憋情况则立即停止,吸入 β_2 受体激动剂(沙丁胺醇)^[1]。将咳出的痰液收集于无菌痰盒,显微镜下看痰液是否合格(多核白细胞应 > 25 个/低倍视野,鳞状上皮细胞应 < 10 个/低倍视野)。否则重新留取痰液。

痰定量细菌培养:获取痰液后在 1 h 内立即进行培养。首先在痰液中加入稀释的 Sputosol 液(英国 OXOID 公司),作用 20 min 使痰液均质化。Sputosol 液与痰液的比例为 1:1,此 1:1 悬液视为原液(定量计算时加以校正)。预先准备好 4 个无菌试管,每管含生理盐水 4.5 mL。吸取原液 0.5 mL 于第 I 稀释管内(10^{-1}),再从第 I 稀释管吸取 0.5 mL 于第 II 稀释管内(10^{-2}),依次稀释,直到第 I ~ IV 稀释管内痰液浓度依次为 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 。用 10 μ L 接种环取各个浓度(10^{-1} 至 10^{-4})分别密涂接种于血琼脂平皿、麦康凯琼脂平皿和巧克力琼脂平皿。置于 5% 二氧化碳培养箱中,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。24 h 后根据菌落形态特征,对细菌菌种做出初步判断,进行菌落计数,再按照常规做细菌鉴定。计算后最终确定痰中主要细菌的种类和数量(单位:CFU/mL)。

痰细胞分类计数:取上一步留余的痰液,量取痰

量,加 4 倍体积的 0.1% 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DDT)去黏液处理。反复摇匀震荡,使之成为均匀的混悬液。将混悬液放入离心机,以 3 000 rpm 离心 10 min,取离心后的沉淀涂片,自然晾干后行刘氏染色(LIU'S STAIN),即改良的瑞氏染色(Wright's staining),取快速染液 A 液(台湾东耀生物科技有限公司)约 0.8 mL 于痰推片上,覆盖整个推片,静置 3~5 s。取 B 液约 1.5 mL 于痰推片上,静置 30~60 s 后清水冲净。95% 酒精中脱色,清水冲净,自然晾干。油镜下于若干视野计数 100 个非鳞状上皮细胞,计数嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞所占比例^[2]。

统计学处理:采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计处理,组间分析采用两独立 *t* 样本检验,数据采用均数 ± 标准差表示。

结 果

33 例受试者行痰定量细菌培养及痰细胞分类计数,其中 11 例痰细菌 $\geq 10^7$ CFU/mL,归为阳性组(A 组),22 例为阴性(B 组)。A 组中,男性 9 例,女性 2 例,平均年龄(62.8 ± 5.8)岁,平均 FEV₁(1.6 ± 0.7) L, FEV₁/预计值平均(70.0 ± 28.4)%, FEV₁/FVC 平均(50.6 ± 13.7)%,其中 6 例有吸烟史。B 组中,男性 21 例,女性 1 例,平均年龄(65.3 ± 10.6)岁,平均 FEV₁(1.5 ± 0.7) L, FEV₁/预计值平均(61.9 ± 24.8)%, FEV₁/FVC 平均(44.6 ± 13.1)%,其中 18 例有吸烟史。

表 1 33 例稳定期 COPD 患者痰细胞分类计数结果($\bar{x} \pm s$)

项目	A 组	B 组	<i>P</i> 值
嗜酸粒细胞(%)	1.73 ± 1.00	0.41 ± 0.59	0.001
中性粒细胞(%)	83.64 ± 2.69	74.77 ± 6.29	0.000
淋巴细胞(%)	4.91 ± 1.70	6.45 ± 2.82	0.106
巨噬细胞(%)	9.45 ± 2.02	10.23 ± 1.85	0.281

在所有入选对象中,存在下呼吸道细菌定植的共 11 例,占总数的 32.4%,其中卡它莫拉菌和金黄色葡萄球菌各 3 例(各 3/11,各占 27.2%)、流感嗜血杆菌 2 例(2/11,占 18.2%),肺炎链球菌、肺炎克雷伯杆菌和中间链球菌各 1 例(各 1/11,各占 9.1%)。A 组的嗜酸性粒细胞为(1.73 ± 1.00)%, B 组为(0.41 ± 0.59)%,两组间差异有显著性($P < 0.05$)。A 组的中性粒细胞为(83.64 ± 2.69)%, B 组为(74.77 ± 6.29)%,2 组间差异有显著性($P < 0.05$)。A 组淋巴细胞为(4.91 ± 1.70)%, B 组为(6.45 ± 2.82)%,2 组间差异无显著性($P > 0.05$)。A 组的

巨噬细胞为(9.45 ± 2.02)%, B 组为(10.23 ± 1.85)%,两组间差异无显著性($P > 0.05$)。

讨 论

痰诱导简单易行,是研究气道炎症的重要方法之一。高渗盐水(<5%)诱导痰的机制与其高渗透压、促使气道内水份外渗、刺激咳嗽反射、促进腺体分泌有关。高渗盐水本身对气道是否有炎症刺激与其浓度有关,浓度不超过 7% 的高渗盐水对健康受试者或气道高反应者均不引起气道炎症。将高渗盐水经支气管镜直接滴入气道,并未发现细胞计数有任何改变^[3],提示痰液经诱导后不会影响炎症细胞。咳痰标本遭受上呼吸道寄生菌的污染,分离的细菌不能真实反映下呼吸道定植或感染的致病菌。痰的定量细菌培养,可提高下呼吸道感染病原学诊断的精确性,其理论基础是感染性下呼吸道分泌物中致病菌的浓度高于污染菌。一般认为,诱导痰中的细菌量 $\geq 10^7$ CFU/mL 时为致病菌。

COPD 具有气流受限的特征,其稳定期下呼吸道细菌定植的临床意义尚不十分清楚。本研究通过对稳定期 COPD 患者行痰定量细菌培养及痰细胞分类计数,发现下呼吸道细菌定植组的嗜酸性粒细胞和中性粒细胞均高于非定植组($P < 0.05$)。国外研究^[4]发现,COPD 患者下呼吸道定植的细菌抗原可引起气道过敏反应,加重嗜酸性粒细胞炎症反应及气道高反应性。支气管舒缓试验阳性的 COPD 患者痰液嗜酸性粒细胞较高^[5]。嗜酸性粒细胞可释放多种活性物质参与变态性炎症的调节,如 LTB₄、LTC₄ 和血小板激活因子。其表面具有大量低亲和力 IgE 受体,在变应性炎症的维持和发展中起重要作用。嗜酸性粒细胞被激活后,会合成多种上皮毒性物质,如嗜酸性粒细胞阳离子蛋白、主要碱性蛋白、嗜酸性粒细胞过氧化物(EPO)和嗜酸性粒细胞衍生的神经毒素,其中以 ECP 毒性最强,这些物质对呼吸道上皮和鼻黏膜上皮均有较强的损伤作用。本试验提示下呼吸道细菌定植使气道嗜酸性粒细胞增加,加重气道炎症,增加气道高反应性,加重气道损伤,加重气道受限程度。

中性粒细胞可吞噬和降解细菌,构成炎症反应的主要防御环节,但中性粒细胞相对过多时,可释放毒性氧自由基,如超氧负离子(O₂⁻),过氧化氢(H₂O₂)以及羟自由基(OH⁺),加重局部组织损伤,并延长炎症过程。本研究显示,下呼吸道细菌定植的

(下转第 107 页)

偿性收缩加强,使逆向进入肺静脉血流增高,Pva 峰值增大,时限延长。我们的资料显示:随高血压病舒张功能的递减,PV 频谱 PVS 增高及 PVD 呈递减趋势,尤其是 S/D 比值;Pva 的增高和持续时间的延长,也能敏感地表达高血压病左心室舒张功能的改变;在 NLVH 组、LVH 组间 Pva 峰值、时间参数差异也有显著性 ($P < 0.01$),可作为评价高血压患者左心室舒张功能受损程度的指标。我们的结果表明,采用 DTI 检测二尖瓣环运动速度,能较全面地反映高血压病患者左心室松弛性和顺应性两方面的情况,较少受左心室前后负荷的影响,能客观真实地评价左心室舒张功能受损,特别是在二尖瓣口血流出现伪正常现象时具有鉴别意义,可检出传统多普勒法检测为假性正常的舒张功能异常,为评价左心室舒张功能提供新的技术手段。

参考文献

[1] Nishimura RA, Abel MD. Relation of pulmonary vein to

mitral flow velocities by transesophageal Doppler echocardiography: effect of different loading conditions. *Circulation*, 1990, 81:1488-1497.

[2] Klein AL, Stenart W J, Bartlett J, et al. Effects of mitral regurgitation on pulmonary venous flow and left atrial pressure: an intraoperative transophageal echocardiography study. *JACC*, 1992, 20:1345-1352.

[3] Appleton CP, Hatle LK, Popp RL. Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiography study. *J Am Coll Cardiol*, 1988, 12:426-440.

[4] Appleton CP, Hatle LK, Popp RL. Demonstration of restrictive ventricular by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol*, 1988, 11:757-768.

[5] 田新桥,钱蕴秋,周晓东,等.多普勒组织成像评价冠心病患者的左室整体舒张功能. *中国超声医学杂志*, 2000, 16:571-573.

(2006-09-04 收稿; 2006-10-16 修回)

(上接第 104 页)

患者痰内中性粒细胞偏高,提示下呼吸道细菌定植可加重气道炎症反应,损伤气道。研究发现^[6]稳定期 COPD 患者中细菌定植量高的,其急性发作次数也多,其机制可能为细菌定植导致气道慢性炎症反应。气道内白细胞过多时,释放出过多的白细胞弹性蛋白酶可使肺内抗蛋白酶系统失衡,使肺组织易被蛋白酶破坏,导致肺气肿。本研究表明,COPD 患者下呼吸道细菌定植可增加气道白细胞浓度,白细胞过多可使肺组织易被蛋白酶破坏,提示下呼吸道细菌定植可加重 COPD 患者的肺组织破坏。

本研究证实了稳定期 COPD 患者下呼吸道细菌定植与气道炎症细胞的关系,提示下呼吸道细菌定植可加重气道炎症,为 COPD 患者稳定期及急性发作期的治疗提供参考依据。在稳定期 COPD 患者细菌定植的治疗问题上尚有争议,动物实验表明,补充维生素 E 可减少吸烟组小鼠的细菌定植量,使用 N-乙酰半胱氨酸可以减少 COPD 患者的细菌定植量^[7],但如何根除下呼吸道的细菌定植及是否采用抗生素还需进一步的研究。

参考文献

[1] 王曾礼. 诱导痰在评估气道炎症中的作用. *中华结核和呼吸杂志*, 2000, 12:765-768.

[2] Giovanni B, Francesco S, Carmela I, et al. Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Crit Care Med*, 1999, 160:1486-1492.

[3] Popov TA, Pizzichichini MM, Pizzichichini E, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J*, 1995, 8:559-565.

[4] Sanjay S, Timothy F. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14: 336-363.

[5] Diahn-Wang Perng, Han-Yu Huang, Hua-Ming Chen, et al. Characteristics of airway inflammation and bronchodilator reversibility in COPD. *Chest*, 2004, 126: 375-381.

[6] Patel IS, Seemungal T, Wilks M, et al. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character and severity of COPD exacerbations. *Thorax*, 2002, 57: 759-764.

[7] Riise GC, Larsson S, Larsson P, et al. The intrabronchial microbial flora in chronic bronchitis patients; a target for N-acetylcysteine therapy? *Eur Respir J*, 1994, 7: 94-101.

(2006-10-16 收稿; 2006-12-05 修回)