

## · 基础论著 ·

# 中性粒细胞和单核细胞在脓毒症相关急性肺损伤聚集和来源差异的研究

邢智辰 王金宏 侯晓彤

**【摘要】目的** 在脓毒症模型的基础上, 研究中性粒细胞与单核细胞在肺组织中聚集和来源的差异, 探讨肺损伤的发生机制。**方法** 按照 10 mg/kg 的剂量, 给予大鼠腹腔注射细菌脂多糖建立全身脓毒症模型, 通过流式细胞术检测模型鼠 24 h 内骨髓、脾脏、外周血、肺脏和肺泡灌洗液中中性粒细胞和单核细胞的动态变化。**结果** 本研究通过动态观察发现与正常大鼠相比, 脓毒症鼠肺脏中中性粒细胞和单核细胞数量增加, 并且中性粒细胞聚集早于单核细胞, 骨髓中两种细胞数量明显减少, 然而脾脏仅有单核细胞减少。**结论** 中性粒细胞在脓毒症相关肺损伤中发生聚集早于单核细胞, 骨髓在脓毒症中作为中性粒细胞和单核细胞的来源, 而脾脏仅作为单核细胞的来源。

**【关键词】** 中性粒细胞; 单核细胞; 脓毒症; 急性肺损伤; 脾脏

**Accumulation and different sources between neutrophils and monocytes in sepsis-related acute lung injury** XING Zhichen, WANG Jinhong, HOU Xiaotong. Beijing Institution of Heart Lung and Blood Vessel Disease, Department of Extracorporeal Circulation Center for Cardiac Intensive Care, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China  
Corresponding author: HOU Xiaotong, Email: xt.hou@ccmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of neutrophils and monocytes in lung injury and explore the mechanism of sepsis related lung injury. **Methods** The sepsis rat model was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide of 10 mg/kg dosage. The dynamic changes of bone marrow, spleen, peripheral blood, lung and bronchoalveolar lavage fluid of model rat were detected by flow cytometry combined with absolute cell count in 24 hours. **Results** Compared with normal rat, the number of neutrophils and monocytes increased significantly in lung in sepsis model, and the increase of neutrophils was earlier than monocytes. Both two kinds of cells significantly reduced in bone marrow, whereas only monocytes were reduced in spleen. **Conclusions** Neutrophils appeared earlier than monocytes in sepsis related lung injury, and bone marrow was the source of neutrophils and monocytes, but spleen was only the source of monocytes in sepsis.

**【Key words】** Neutrophils; Monocytes; Sepsis; Acute lung injury; Spleen

急性肺损伤及其更严重病情急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 是急性系统性炎症反应在肺脏引起的反应<sup>[1]</sup>。急性肺损伤的病因包括多种直接因素或间接因素, 其中脓毒症是间接因素中最常见也是病死率最高的病因。脓症患者中有约 40% 会发生急性肺损伤, 其中有 2% ~ 3% 会进展为 ARDS, 如果急性肺损伤得不到有效控制而发展为 ARDS, 其病死率高达 40% ~ 60%, 其中多数患者死于炎症反应引起的多

器官功能衰竭<sup>[2-3]</sup>。脓毒症, 比如腹腔或静脉给予细菌脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 引发的急性肺损伤其分子机制尚不完全清楚。

腹腔注射 LPS 可以激活固有免疫系统, 导致全身脓毒症的发生, 继而引起机体各器官的损伤。文献报道, 激活的中性粒细胞在肺脏中聚集是脓毒症造成肺损伤的一个重要因素。而单核细胞具有分泌多种细胞因子等生物活性物质, 参与抗原提呈的功能, 在急性肺损伤炎症早期发挥重要的免疫调节作用<sup>[4-5]</sup>。本研究建立腹腔注射 LPS 引起的大鼠全身脓毒症模型, 通过动态观察中性粒细胞与单核细胞向肺脏的聚集的过程, 探索肺损伤的发生机制。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.001

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81270327)

作者单位: 100029 北京, 北京市心肺血管疾病研究所 - 首都医科大学附属北京安贞医院心脏危重症中心, 体外循环机械循环辅助科

通讯作者: 侯晓彤, Email: xt.hou@ccmu.edu.cn

## 材料与方法

### 一、动物模型

取 SPF 级雄性 S-D 大鼠 30 只, 6~8 周, 体重 350~400 g, 实验动物由维通利华实验动物技术有限公司提供[动物许可证 SCXK(京)2012-0001]。术前 12 h 禁食, 6 h 禁饮。

随机将大鼠分为实验组和假手术组, 实验组大鼠按照 10 mg/kg 剂量腹腔注射细菌脂多糖(LPS), 复制 LPS 导致的全身脓毒症模型, 假手术组用生理盐水代替 LPS。两组分别于注射前, 注射后 3、6、12 和 24 h 处死 3 只大鼠, 并取材。

### 二、标本收集与处理

1. 获取大鼠肺泡灌洗液: 大鼠处死后颈部正中切开, 分离气管置入插管, 扎紧后用 2 ml 注射器每次抽取 2 ml PBS 反复抽吸 3~5 次后回收, 共收集 4 ml, 收集后进行离心, 离心出的细胞重悬后用于流式细胞学检测。

2. 制备大鼠骨髓、脾脏及肺脏单细胞悬液: 取大鼠右侧股骨, 脾脏及左叶肺脏。股骨用 2 ml 注射器抽取 PBS 反复吹打至骨髓腔变白, 脾脏及肺脏用磨砂面玻璃研磨, 至完全磨碎。后用 400 目尼龙网过滤掉组织残渣, 离心后用 PBS 重悬, 获得各组织单细胞悬液。

3. 细胞计数板计数: 采用细胞计数板计数法, 计算各个组织悬液中有核细胞数量。将获得的单细胞悬液定容到 1 ml PBS 中, 从中取 10  $\mu$ l 适度稀释, 再从稀释好的单细胞悬液中取 10  $\mu$ l 加入细胞计数板计数区, 以计数区每个象限 50~100 个细胞为宜。计算得出各组织悬液中的有核细胞总数。

4. 流式细胞学染色流程: 单克隆荧光抗体购自美国 Biolegend 公司和 ABD serotec 公司, 使用抗体有抗 -CD172a FITC、抗 -CD45 PerCP-Cy5.5、抗 -CD11b/c APC。取 200  $\mu$ l 制备好的单细胞悬液, 加入对应的荧光抗体组合, 混匀, 4  $^{\circ}$ C, 避光孵育 15 min; 加入 2 ml 红细胞裂解液, 裂解 5 min, 离心弃上清; 加入 2 ml PBS 漂洗, 离心后加入 200  $\mu$ l PBS 重悬, 等待上机检测; 数据收集使用 BD FACSCalibur 流式细胞仪获取, 使用 Flowjo 软件进行数据分析。

### 三、统计学处理

应用 SPSS 13.0 进行统计分析, 研究中呈正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用独立样本  $t$  检验比较模型组和对照组的差异, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

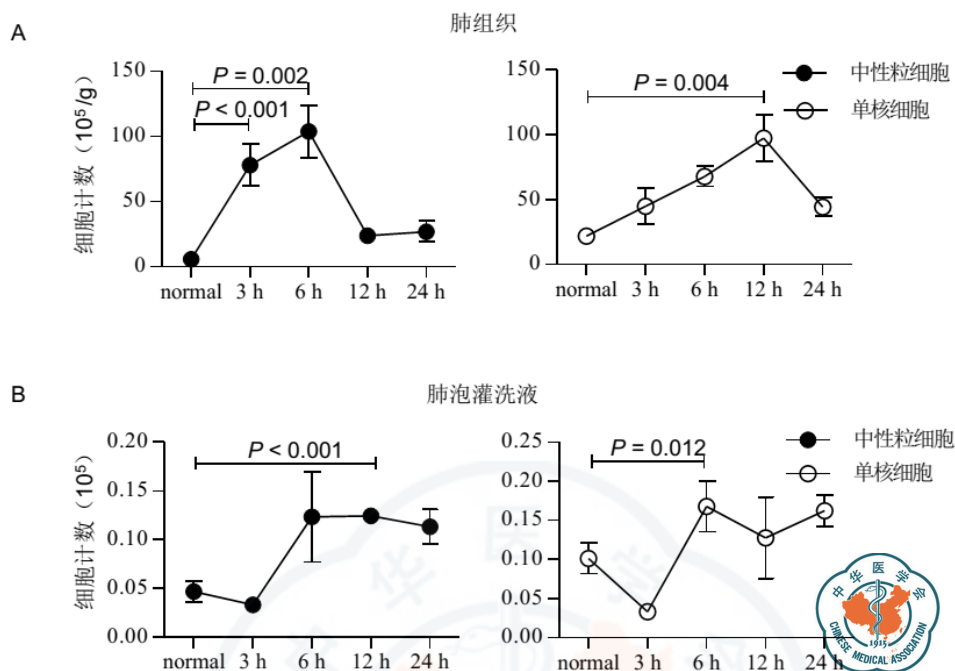
一、脓毒症相关肺损伤早期中性粒细胞向肺脏中的聚集早于单核细胞

本研究利用流式细胞学检测结合细胞绝对计数的方法, 对脓毒症大鼠肺组织与肺泡灌洗液单核和粒细胞进行了动态观察, 结果发现单核细胞与中性粒细胞的数量在注射 LPS 后 24 h 内发生明显变化。与正常组相比, 单核细胞和中性粒细胞在肺组织中均出现了明显的聚集, 但是二者在肺组织聚集的时间有所差异。肺组织中性粒细胞在注射 LPS 后 3 h 出现显著升高 ( $t = -7.769$ ,  $P < 0.001$ ), 6 h 达到高峰 ( $t = -5.815$ ,  $P = 0.002$ ), 到注射 LPS 后 12 h 逐步恢复到接近正常水平, 而单核细胞在肺组织中的聚集呈相对缓慢增加, 到注射 LPS 后 12 h 达到高峰 ( $t = -4.975$ ,  $P = 0.004$ ), 高峰时单核细胞数量是正常时的 4~5 倍 (图 1A)。

两种白细胞的这种差异性可能与其在肺损伤中发挥的功能不同相关。本研究进一步分析肺泡灌洗液的结果发现中性粒细胞和单核细胞数量均在注射 LPS 后 3 h 开始增加, 到 6 h 以后达到高峰此后维持高水平 ( $t = 9.572$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 3.865$ ,  $P = 0.012$ ) (图 1B)。结果发现, 肺泡灌洗液中增加的单核细胞及中性粒细胞相比于正常所增加的幅度要远远小于肺组织中的变化, 这可能因为该注射剂量下 LPS 引起的全身脓毒症造成的肺损伤并不足以完全破坏肺泡基底层, 导致大量的炎症细胞浸润到肺泡腔中。

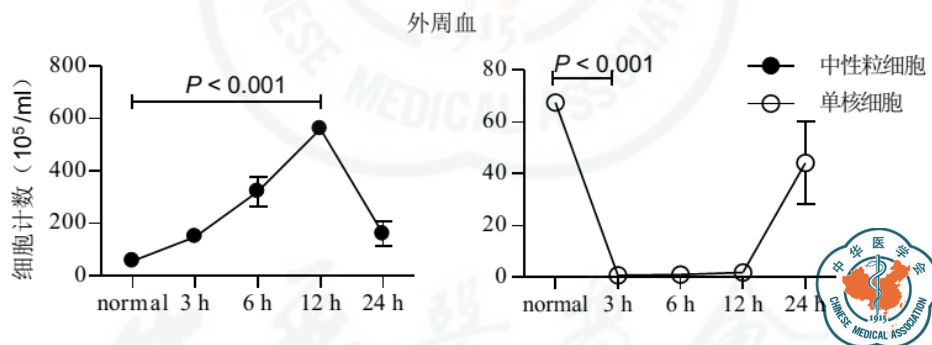
二、骨髓与脾脏在单核细胞与中性粒细胞的释放过程中发挥不同作用

全身脓毒症引起肺损伤的过程中, 外周血是感染部位与外周组织器官的中转站, 在组织损伤中发挥了重要作用。本研究结果发现, 外周中单核细胞在注射 LPS 后 3 h 即出现显著减少 ( $t = 65.756$ ,  $P < 0.001$ ), 剩余的单核细胞数量不足正常时的 10%, 至注射 LPS 后 12 h 单核细胞一直维持低水平。此后开始逐渐恢复, 至注射 LPS 后 24 h, 大鼠外周血中单核细胞数达到注射前水平的约 60%。与此不同的是, 外周血中性粒细胞在注射 LPS 后逐步增加, 在 12 h 达到高峰 ( $t = -35.051$ ,  $P < 0.001$ ), 增高幅度可达到正常水平的 10 倍, 此后至注射 LPS 后 24 h 逐渐恢复至正常水平 (图 2)。外周血中单核细胞和中性粒细胞的变化源于由脓毒症导致的白细胞向组织中迁移同时伴随造血器官对外周血的补充两方面因素。



注：在不同组织（外周血、肺泡灌洗液及肺组织）中的中性粒细胞与单核细胞细胞计数结果在腹腔注射 LPS 后不同时间点（注射前、注射后 3、6、12、24 h）的动态变化

图 1 单核细胞和中性粒细胞在肺脏中聚集存在时间差异



注：外周血中的中性粒细胞与单核细胞细胞计数结果在腹腔注射 LPS 后不同时间点（注射前、注射后 3、6、12、24 h）的动态变化

图 2 外周血中性粒细胞和单核细胞的变化

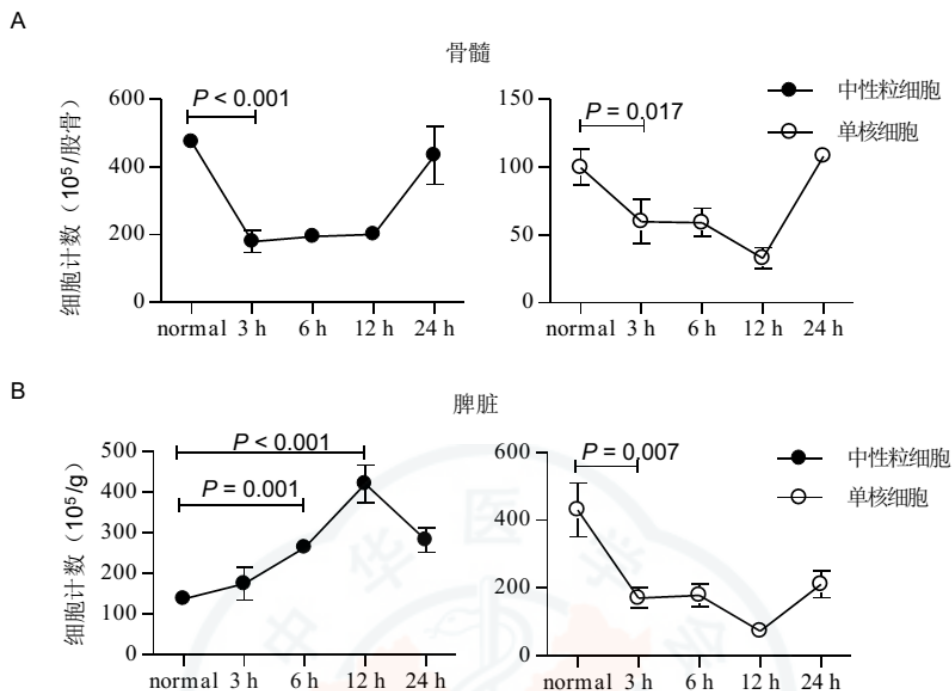
骨髓和脾脏是外周血白细胞更新和补充的主要来源，并且在炎症或感染情况下，骨髓和脾脏会通过应急造血的方式在紧急情况下机体代偿产生所需白细胞，以便应对炎症或感染，是在危重情况下机体自我保护的一种方式<sup>[6]</sup>。通过对骨髓和脾脏的观察，本研究发现骨髓和脾脏中单核细胞数都有显著下降，注射 LPS 后 3 h，细胞计数减少超过 50%（ $t = 3.259$ ,  $P = 0.017$ ;  $t = 4.371$ ,  $P = 0.007$ ），此后速度减缓，到注射 LPS 后 12 h 达到最低点，注射 LPS 后 24 h 逐渐恢复至正常水平（图 3A~3B）。而粒细

胞只在骨髓中发现有显著下降（ $t = 14.386$ ,  $P < 0.001$ ），在脾脏中呈缓慢增加的趋势（ $t = -6.301$ ,  $P = 0.001$ ）（图 3A~3B），提示脾脏功能主要是为机体提供单核细胞，而骨髓可以补充单核细胞和中性粒细胞。

## 讨 论

细菌脂多糖是革兰阴性杆菌细胞壁的主要组分之一，对人体的免疫反应极其重要，在人体对抗细





注: 在不同组织(骨髓与脾脏)中的中性粒细胞与单核细胞细胞计数结果在腹腔注射 LPS 后不同时间点(注射前、注射后 3、6、12、24 h)的动态变化

图 3 骨髓单核细胞和中性粒细胞都减少而脾脏仅单核细胞降低

菌感染时, LPS 可以被机体 TLR-4 识别引起机体的免疫反应, 具有强大的激活固有免疫的能力。腹腔或静脉给予 LPS 会引起全身性的脓毒症, 严重时表现为多器官功能衰竭, 其中肺脏因其独特的解剖生理结构成为主要损伤器官之一, 其原因与以下因素有关: ①肺脏起到静脉循环滤器的作用, 全身循环血液产生的生物活性物质和活化的炎症细胞都会通过肺循环。②肺部的微血管直径要小于全身微血管平均值, 导致这些物质更易在肺脏聚集<sup>[7]</sup>。腹腔注射 LPS 引起的急性肺损伤属于全身炎症反应引起的间接肺功能损伤, 是炎症激活导致的组织损伤在肺脏的反应, 与实际临床中严重外伤, 消化道手术感染, 心肺旁路术等相关肺损伤类似, 是研究全身感染引起肺损伤的理想参照<sup>[8]</sup>。

中性粒细胞的激活与在肺脏中的聚集被认为在肺组织损伤中起到重要的作用, 在炎症反应早期组织局部的巨噬细胞会分泌释放 IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等促炎性细胞因子, 导致中性粒细胞被激活, 结合血管内皮黏附分子的作用, 介导中性粒细胞向损伤部位的聚集。聚集的中性粒细胞对肺脏微血管网造成阻塞作用, 破坏微循环, 还会释放蛋白水解酶和氧化产物进入到肺组织中, 包括基质金属蛋白酶,

中性粒细胞弹性蛋白酶和氧自由基等。引起内皮系统的损伤, 介导炎症导致的血管舒张, 增加血管的通透性, 引起肺水肿<sup>[9]</sup>。血液中的单核细胞会向组织中迁移, 并继续分化成熟, 形成定居型巨噬细胞, 来清除衰老的宿主细胞和分子并在炎症早期发挥抵抗炎症入侵的作用。另外, 脓毒症相关急性肺损伤时肺脏中巨噬细胞数量明显增加, 这部分巨噬细胞属于募集型巨噬细胞。其是由炎症型的单核细胞亚群在趋化因子诱导下被募集到损伤组织并进一步分化形成。募集型巨噬细胞产生各种促炎与抗炎介质, 调节肺脏局部的炎症反应<sup>[10-11]</sup>。

本研究发现, 中性粒细胞在肺脏中的聚集高峰发生在注射 LPS 后 6 h 内, 显著早于单核细胞的 12 h, 并且至注射 LPS 后 12 h 肺脏中的中性粒细胞已经恢复较低水平, 提示中性粒细胞的聚集应当与单核细胞无关, 有文献提出早期的中性粒细胞浸润可能是由定居白细胞和内皮细胞产生的细胞因子梯度引起<sup>[12]</sup>, 这与本研究结论相符。脓毒症导致的组织损伤通常都包括早期中性粒细胞的黏附和继而单核细胞的持续聚集, 单核细胞的募集由组织局部的细胞产生的细胞因子引起而不受外源性的中性粒细胞影响, 但是早期中性粒细胞进入炎症部

位可以作为一个细胞因子来源,通过促进局部细胞MCP-1释放来调控单核细胞的募集过程,有调节和增强炎症反应的作用<sup>[13]</sup>。另有文献报道,患有粒细胞减少症的脓毒症患者,单核巨噬细胞低反应,肺局部呈现免疫抑制状态,也证明了早期中性粒细胞参与单核细胞的聚集过程<sup>[14]</sup>。

文献报道称,早期肺脏中募集细胞来源于肺血管边缘区和最早期的骨髓动员<sup>[12]</sup>,而本研究结果发现,脾脏和骨髓都参与了早期单核和中性粒细胞的募集过程并发挥了不同的作用,中性粒细胞只来源于骨髓,脾脏同外周血的结果相似粒细胞数量持续增加。与此不同的是,单核细胞来源于骨髓中的前体细胞,脾脏作为单核细胞储存和成熟的场所,两者共同参与了单核细胞向外周的释放,对于脾源性单核细胞的作用可能为肺损伤的研究提供一条新的干预途径。脓毒症相关急性肺损伤目前仍是导致脓毒症患者死亡的重要原因,随着免疫学、细胞生物学技术的进展及对脓毒症相关急性肺损伤的机制研究的深入,脓毒症相关性患者的预后将得到相应的改善。

#### 参 考 文 献

- 1 Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury[J]. *N Engl J Med*,2005,353(16):1685-1693.
- 2 Atabai K, Matthay MA. The pulmonary physician in critical care:5: acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology[J]. *Thorax*,2002,57(5):452-458.
- 3 Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS[J]. *Crit Care Med*,1996,24(7):1125-1128.
- 4 Steinmüller M, Srivastava M, Kuziel WA, et al. Endotoxin induced peritonitis elicits monocyte immigration into the lung: implications on alveolar space inflammatory responsiveness[J]. *Respir Res*,2006,7(1):30.
- 5 Mokart D, Kipnis E, Guerre-Berthelot P, et al. Monocyte deactivation in neutropenic acute respiratory distress syndrome patients treated with granulocyte colony-stimulating factor[J]. *Crit Care*,2008,12(1):R17.
- 6 Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis[J]. *Cytokine*,2008,42(3):277-288.
- 7 Ng CS, Wan S, Yim AP, et al. Pulmonary dysfunction after cardiac surgery[J]. *Chest*,2002,121(4):1269-1277.
- 8 Kabir K, Gelinas JP, Chen M, et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury[J]. *Shock*,2002,17(4):300-303.
- 9 Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, et al. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis[J]. *J Immunol*,2003,170(6):3273-3278.
- 10 Schneberger D, Aharonson-Raz K, Singh B, et al. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung[J]. *Cell Tissue Res*,2011,343(1):97-106.
- 11 Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. *Immunity*,2010,32(5):593-604.
- 12 Dhaliwal K, Scholefield E, Ferenbach D, et al. Monocytes control second-phase neutrophil emigration in established lipopolysaccharide-induced murine lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2012,186(6):514-524.
- 13 Henderson RB, Hobbs JA, Mathies M, et al. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration[J]. *Blood*,2003,102(1):328-335.
- 14 Mokart D, Kipnis E, Guerre-Berthelot P, et al. Monocyte deactivation in neutropenic acute respiratory distress syndrome patients treated with granulocyte colony-stimulating factor[J]. *Crit Care*,2008,12(1):R17.

(收稿日期: 2012-12-27)

(本文编辑: 孙荣华)

邢智辰, 王金宏, 侯晓彤. 中性粒细胞和单核细胞在脓毒症相关急性肺损伤聚集和来源差异的研究 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (3): 303-307.