

嗜酸粒细胞性支气管炎与咳嗽变异性哮喘患者的气道炎症特征

刘波¹⁾, 郝金钢²⁾, 黄芩³⁾

(1) 北京朝阳医院, 北京 100700; 2) 昆明医科大学第二附属医院放射科, 云南昆明 650101; 3) 昆明医科大学, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 研究嗜酸粒细胞性支气管炎以及咳嗽变异性哮喘患者气道炎症性细胞因子以及炎性介质的特性, 明确二者的不同气道炎症特性的潜在机理. **方法** EB组16例患者, CVA组16例患者、哮喘组15例患者以及对照组15名正常体检者, 检测这4组人员诱导痰中的嗜酸粒细胞即EOS比例; 流式检测IL-5和 γ -IFN刺激的EOS表面CD69蛋白的表达; ELISA法检测各组患者诱导痰上清液中PGE2、LTC4的蛋白表达量. **结果** EB组、CVA组、哮喘组患者诱导痰中EOS表面CD69蛋白的表达量差异不具统计学意义, 与对照组相比具有统计学意义($P < 0.05$). EB组与对照组、CVA组、哮喘组患者诱导痰中PGE2浓度比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 与对照组相比, CVA组患者、EB患者以及哮喘组患者的诱导痰中LTC4浓度显著增高($P < 0.05$), EB组患者的LTC4的蛋白表达量和CVA组患者以及哮喘组患者差异有统计学意义($P < 0.05$). **结论** EB组患者的诱导痰中PGE2的表达水平增高, CVA组患者的LTC4/PGE2比值与EB组患者相比也是明显升高, 推测这2个因素是EB缺乏气道反应性的潜在炎症基础.

[关键词] 嗜酸粒细胞性支气管炎; 咳嗽变异性哮喘; 气道炎症

[中图分类号] R562.2*5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2012)05-0098-03

The Characteristics of Airway Inflammation in Eosinophilic Bronchitis and Cough Variant Asthma

LIU Bo¹⁾, HAO Jin-gang¹⁾, HUANG Qin³⁾

(1) Beijing Chaoyan Hospital, Beijing 100700; 2) Dept. of Radiotherapy, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 3) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To study the characteristics of inflammatory cytokines in eosinophilic bronchitis and cough variant asthma. **Methods** EB group of 16 patients, CVA group of 16 patients, 15 cases of asthma patients and normal control group of 15 healthy subjects, the percentage of EOS was detected by flow cytometry. EOS surface CD69 protein expression stimulated by IL-5 and γ -IFN was detected by flow cytometry. PGE2, LTC4 protein expression in induced sputum supernatant of patients was detected by ELISA. **Results** EOS surface expression of CD69 protein in induced sputum in EB group, CVA group and asthma group had no statistically significant difference, but there was a statistically significant difference in comparison with control group ($P < 0.05$). Compared with PGE2 concentration of control group, there was statistically significant differences among EB group, CVA group, and asthma patients. Compared with control group, the concentration of LTC4 in CVA patients, EB patients and asthma patients was significantly higher ($P < 0.05$). The protein expression of LTC4 in EB patients was higher than CVA patients and asthmatic patients ($P < 0.05$). The ratio of LTC4/PGE2 in CVA patients and asthmatic patients was higher than EB group ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression levels of PGE2 increase in sputum of patients in EB group. Compared with the EB group, LTC4 / PGE2 ratio in CVA group

[基金项目] 云南省应用基础研究计划基金资助项目 (2008CD019)

[作者简介] 刘波 (1975~), 男, 吉林白城市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事急危重症临床工作.

is significantly higher.

[Key words] Eosinophilic bronchitis; Cough variant asthma; Airway inflammation

嗜酸粒细胞性支气管炎 (eosinophilic bronchitis, EB) 以及咳嗽变异性哮喘的相关临床特征是由于嗜酸粒细胞 (EOS) 的浸润导致的气道炎症性病变, EB 和哮喘在基底膜厚度特征以及细胞成分上不具明显的差异, 都能够引起 Th2 型黏膜炎症^[1-3]. 本研究对 EB 组患者以及 CVA 组患者中诱导痰内细胞的分类特征以及诱导痰上清液中的前列腺素 E2 (PGE2) 与白三烯 C4 (LTC4) 的炎性介质表达量进行分析, 从而研究 EB 以及 CVA 的气道炎症特性, 进而明确两者不同的气道炎症特性机理.

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取北京朝阳医院门诊于 2009 年 6 月至 2011 年 6 月期间接诊的患者. 所有患者都符合各组的诊断标准. 16 例 EB 组患者中, 9 例男性, 7 例女性, 平均年龄 41.3 岁. 16 例 CVA 组患者中 8 例男性, 8 例女性, 平均年龄 38.4 岁. 15 例哮喘组患者中 7 例男性, 8 例女性, 平均年龄 36.2 岁. 15 例健康对照组是北京朝阳医院体检者, 其中 10 例男性, 5 例女性, 平均年龄 35.8 岁.

1.2 主要试剂

rh γ -IFN、rhIL-5、CD69-FITC 抗体、抗 CD69-PE 抗体以及抗 CCR3-FITC 抗体等均购自美国 Sigma 公司; LTC4 以及 PGE2 ELISA 试剂盒购自美国 DGR 公司.

1.3 痰的诱导及其处理方法

每组患者雾化吸入 3%、4%、5% 的梯度高渗盐水, 同时收集患者咳出的痰液, 加入 4 倍体积的 0.1% 的 DTT, 随后进行 37 °C 水浴 15 min. 离心沉淀后, 吸取上清液冻存待检, 用 PBS 将沉淀重悬后进行细胞计数.

1.4 EOS 表面 CD69 表达量的检测

对患者诱导痰中的 EOS 进行提纯后, 以 1×10^6 个/mL 的浓度重悬于 DMEM 培养基中, 于 24 孔培养板内进行培养, 同时加入 50 ng/L 的 IL-5 和 20 μ g/L 的 γ -IFN 培养 18 h, 收集细胞于 4 °C 离心, 用 PBS 洗涤 1 次, 取 2×10^6 个细胞重悬于 100 μ L 含 1% BSA 的 PBS 中, 随后进行封闭, 以

及 CD69-FITC 抗体和 PI 的孵育, 最后进行流式检测, 并设未染色的 EOS 为阴性对照, 检测 PI 阴性的 EOS 与 CD69-FITC 的荧光强度. 其余各组痰细胞在封闭后用抗 CD69-PE 抗体以及抗 CCR3-FITC 抗体进行孵育, 流式检测 CCR3 阳性细胞的 CD69-PE 荧光强度.

1.5 炎性因子测定

对痰上清液中 LTC4 以及 PGE2 的量用 ELISA 法进行测定, 根据试剂盒说明书操作.

1.6 统计学处理

采用 SPSS 统计学软件进行分析统计, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析及 q 检验, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 EOS 表面 CD69 的表达量

EB 组患者、CVA 组患者以及哮喘组患者的诱导痰中 EOS 在细胞因子 IL-5 和 γ -IFN 的刺激下, 其表面 CD69 的表达量与对照组比较有统计学意义 ($P < 0.05$); 然而 3 组之间的比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1.

2.2 诱导痰中 LTC4 以及 PGE2 的蛋白表达水平

EB 组 PGE2 的蛋白表达与 CVA 组、哮喘组以及对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$). EB 组、CVA 组以及哮喘组中 LTC4 的蛋白表达与对照组比较有统计学意义 ($P < 0.05$); 且 EB 组与 CVA 组以及哮喘组的差异比较亦具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1.

3 讨论

IL-5 可以使机体不同组织中嗜酸粒细胞显著性增多, 目前研究显示其在增进嗜酸粒细胞前体祖细胞的生长分化过程中发挥着重要作用. 其可使酸性粒细胞的存活时间延长, 主要可以抑制酸性粒细胞的凋亡, 同时 IL-5 具有激活花生四烯酸的代谢途径的作用, 导致机体释放大量引起气管发生痉挛的物质. EB 引起的慢性咳嗽与哮喘具有相似的病理生理进程, 2 者均有嗜酸粒细胞浸润以及 T 淋巴细胞表达的 Th2 型细胞因子与 IL-5 基因表达的增

表 1 4 组诱导痰中炎性介质检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The test results of inflammatory factors in patients in 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	IL-5 (ng/L)	IFN- γ (ng/L)	LTC4 (ng/L)	PGE2 (ng/L)
对照组	15	36 \pm 11	22 \pm 14	37 \pm 12	25 \pm 9 [△]
EB 组	16	137 \pm 34*	35 \pm 7	135 \pm 37*	841 \pm 72
CVA 组	16	145 \pm 32*	37 \pm 4	256 \pm 47* [△]	35 \pm 9 [△]
哮喘组	15	150 \pm 53* [△]	34 \pm 3	276 \pm 60* [△]	26 \pm 7 [△]

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 EB 组比较, [△] $P < 0.05$.

加, 但是其气道反应性具有差异性, 其机理至今还不明确^[4-6]. 本研究检测了 EOS 表面 CD69 的表达, 结果表明 EB 组、CVA 组以及哮喘组在 IL-5 以及 γ -IFN 刺激下, EOS 表面 CD69 的表达升高. 这表明 EB 患者以及哮喘患者之间具有类似的 EOS 激活状态.

PGE2 和 LTC4 的化学本质并不是蛋白质, 因此其也没有相应的编码基因. 因此要分析 PGE2 和 LTC4 的变化只能通过分析与其代谢密切相关的酶的水平来进行评价, 其中白三烯 C4 合成酶则能反应其变化情况. 目前研究显示 PGE2 在 EB 组的水平明显高于 CVA 组和哮喘组, 具有统计学意义. LTC4 的含量在 CVA 组和哮喘组明显高于 EB 组以及对照组, 同时 CVA 组以及哮喘组患者诱导痰中 LTC4/PGE2 比值高于 EB 组. PGE2 可以舒张气道平滑肌, 还具有抑制哮喘气道炎症等气道保护功能. LTC4 与哮喘发作的严重程度以及气道高反应性具有正相关性^[7-9]. EOS 与 PGE2 之间没有关系, 这一结果可能说明 LTC4 与 PGE2 的比例失衡是导致 EB 无气道高反应性的关键原因之一. 笔者的研究结果显示本研究证实了 EB 组患者高表达 PGE2, 而在 CVA 中未发现 PGE2 高表达, 表明了 EB 患者的诱导痰中 PGE2 升高是 EB 缺乏气道高反应性的潜在炎症基础.

[参考文献]

[1] GIBSON P G, FUJIMURA M, NIIMI A. Eosinophilic bro-

nchitis: clinical manifestations and implications for treatment [J]. Thorax, 2008, 57(2): 178 - 182.

- [2] BRIGHTLING C E, SYMON F A, BIRRING S S. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma [J]. Thorax, 2006, 58(6): 528 - 532.
- [3] BRIGHTLING C E, BRADDING P, SYMON F A, et al. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma [J]. N Engl J Med, 2007, 34(6): 1 699 - 1 705.
- [4] MAGNUSSEN H, HARGREAVE F E. Noninvasive monitoring of airway inflammation [J]. Eur Respir J, 2007, 16(6): 1 - 2.
- [5] FIREMAN E. Induced sputum and occupational diseases other than asthma [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2009, 9(2): 93 - 96.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 (支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177 - 185.
- [7] LIEBHART J, MEDRALA W, CLADYSZ U, et al. Production of leukotriene C4 by peripheral blood leukocytes stimulated with anti- ϵ antibody, PMA, and Fmlp does not correlate with irreversible airway obstruction in asthmatics [J]. J Investing Allergol Clin Immunol, 2007, 17(3): 1 - 5.
- [8] MCGARVEY L, HEANEY L, MACMAHON J, et al. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 161: 1 763 - 1 765.
- [9] GONLUGUR U, GONLUGUR T E. Eosinophilic bronchitis without asthma [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2008, 14(7): 1 - 5.

(2012 - 02 - 03 收稿)