

参考文献

[1] Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, et al. Evidence for wide extra-astrocytic distribution of S-100 β in human brain[J]. BMC Neurosci, 2007, 8: 2-7.

[2] 王淮燕. 血清 S-100 β 蛋白在新生儿缺氧缺血性脑病诊断中的价值[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(12): 533-534.

[3] 陶菲克, 徐祖森. 系统性红斑狼疮患者血清 S-100 β 蛋白检测及其临床意义[J]. 临床皮肤科杂志, 2004, 33(12): 541-542.

[4] Dasiva LG, Mottinc C, Souza DO, et al. Serum S-100 β but not NSE levels are increased in morbidly obese individuals affected by obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome[J]. Obes Surg, 2008, 18(8): 993-999.

[5] Kaca-Oryńska M, Tomasiuk R, Friedman A. Neuron-specific enolase and S-100 β protein as predictors of outcome in ischaemic stroke[J]. Neurol Neurochir Pol, 2010, 44(5): 459-463.

[6] Chiaretti A, Barone G, Riccardi R, et al. NGF, DCX and NSE upregulation correlates with severity and outcome of head trauma in children[J]. Neurology, 2009, 72(7): 609-616.

[7] Mattusch C, Diederich KW, Schmidt A, et al. Effect of Carotid Artery Stenting on the Release of S-100 β and Neuron-Specific Enolase[J]. Angiology, 2011, 62(5): 376-380.

(收稿日期: 2011-10-22)

• 临床研究 •

支气管哮喘患者诱导痰 EOS ECP 及血清 IL-13 水平检测及其意义

甘 明¹, 易运林¹, 李小玲², 廖永强¹ (江西省萍乡市人民医院: 1. 检验科; 2. 呼吸内科 337055)

【摘要】 目的 探讨哮喘患者急性期诱导痰液中嗜酸性粒细胞(EOS)、嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)及血清白细胞介素-13(IL-13)的水平变化及在哮喘发病机制中的作用。方法 选择 55 例支气管哮喘急性期患者和 20 例健康对照者的痰液, 行 EOS 计数并测定 ECP 水平。同时采用固相酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中 IL-13 的水平, 并对结果进行统计学处理。结果 支气管哮喘急性期患者诱导痰液中 EOS、ECP 分别与血清 IL-13 呈正相关, 且诱导痰液中 EOS、ECP 及血清 IL-13 的水平均明显高于健康对照组($P<0.05$)。结论 嗜酸性粒细胞是导致哮喘的主要炎性细胞, 而 IL-13 又是嗜酸性粒细胞激动剂并参与支气管哮喘发病的病理生理过程, 诱导痰液 EOS、ECP 和血清 IL-13 检测是哮喘诊断及病情转归的一个重要实验室指标。

【关键词】 支气管哮喘; 诱导痰液; 嗜酸性粒细胞; 嗜酸性细胞阳离子蛋白; 白细胞介素-13
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.05.035 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)05-0578-03

支气管哮喘(简称哮喘)是以气道高反应性和慢性气道炎症为特征的变态反应性疾病, 它由多种细胞(包括嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞、T 淋巴细胞)及结构细胞(如成纤维细胞、气道上皮细胞)和细胞因子参与。支气管哮喘是全球最常见的慢性病之一, 全球约有 1.6 亿患者, 其发病率呈上升趋势, 不同国家和不同地区间的哮喘流行病学差异极大, 各国患病率 1%~13% 不等, 我国的患病率约为 1%~4%。研究发现, 嗜酸性粒细胞(EOS)是参与产生哮喘气道炎症反应的重要细胞因子也是哮喘的主要效应细胞, 而嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)又是由嗜酸性粒细胞合成和释放的炎性介质和细胞因子, 在哮喘发病中起到重要作用。白细胞介素-13(IL-13)是由 Th2 细胞分泌的调节性细胞因子, 它可单独诱导并足够维持气道的高反应性, 并能直接作用于嗜酸性粒细胞, 促进其释放炎性介质和细胞因子参与哮喘过程。哮喘的病理生理学特点是由 Th2 细胞产生的细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 异常增加^[1-2], 它们与哮喘的关系越来越重要且日益受到关注。本文通过支气管哮喘患者急性期诱导痰中 EOS、ECP 及血清 IL-13 水平检测, 从炎症细胞与炎症介质方面探讨支气管哮喘可能的发病机制, 为临床治疗和病情监测提供新的方法及一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 5 月至 2011 年 3 月本院住院治疗的

支气管哮喘急性期患者 55 例, 诊断均符合中华医学会制定的哮喘诊断标准^[3]。其中男 32 例, 女 23 例, 年龄 21~81 岁, 平均(40.5 $\pm$ 14)岁。健康对照组 20 例, 男 10 例, 女 10 例, 年龄 18~75 岁, 平均(30.4 $\pm$ 12)岁, 既往无哮喘病史及过敏性疾病史, 近 2 个月内无急性呼吸道疾病, 体格检查正常。

1.2 方法

1.2.1 痰液诱导 采用本实验室建立的方法^[4], 雾化前, 患者或受试者用清水漱口, 以减少唾液的污染。超声雾化吸入 3% 高渗盐水 15 min 后, 用力咳痰至培养皿中。若患者或受试者无痰或痰量不足, 则换用 4% 高渗盐水继续雾化吸入 7 min, 无痰或痰量不足时, 换用 5% 高渗盐水继续雾化吸入, 7 min 后终止诱导程序。注意观察患者或受试者在雾化过程中一旦发现有明显的胸闷、呼吸困难等不适症状时用立即停止操作程序。弃去唾液后, 用玻璃吸管小心吸取乳黄色或白色团状痰栓。

1.2.2 痰液分析 样本痰液分析均在 2 h 内完成, 取痰栓于离心管中, 加入 4 倍体积的 0.1% 的二硫代苏糖醇(DTT)充分混合, 将痰液置 37℃ 水浴 10 min, 用 200 目尼龙网滤掉黏液和碎片, 以 1 000 r/min 离心 10 min。离心后收集上清液冻存于 -70℃ 冰箱, 用作检测 ECP。取沉淀物涂片, 干燥后用苏木素-伊红染色, 每个样本计数 500 个细胞(除鳞状上皮细胞外)进行分类。

1.2.3 血液分析 清晨空腹抽取患者及对照组静脉血 3 mL,

3 000 r/min 离心 10 min,收集上层血清,无菌分装后置-4 ℃ 冰箱备用。

1.2.4 IL-13、ECP 的检测 采用 ELISA 法测定 IL-13,试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司,酶联免疫分析仪为奥地利安托斯公司提供的 anthos 2010 型分析仪。采用荧光酶联免疫法测定 ECP,且严格按说明书步骤进行操作。

1.3 统计学方法 检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较经方差齐性分析后采用 t 或 t' 检验,均数间的关系采用直线相

关分析法;计数资料采用 χ^2 检验。

2 结 果

支气管哮喘患者诱导痰液中 EOS、ECP 浓度及血清中 IL-13 水平间见表 1。由表 1 可见哮喘急性发作期诱导痰液中 EOS、ECP 及血清 IL-13 与健康对照组相比较差异有统计学意义($P<0.05$),哮喘组 EOS 与血清中 IL-13 呈正相关($r=0.702, P<0.05$),ECP 浓度及血清中 IL-13 呈正相关($r=0.812, P<0.05$),男、女之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 哮喘组与健康对照组诱导痰液 EOS 计数、ECP 及血清 IL-13 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	中性粒细胞(%)	巨噬细胞(%)	淋巴细胞(%)	嗜酸性粒细胞(%)	ECP($\mu\text{g/L}$)	IL-13(ng/L)
哮喘组($n=55$)	0.338 $\pm$ 0.075	0.298 $\pm$ 0.084	0.078 $\pm$ 0.031	0.145 $\pm$ 0.085 *	362 $\pm$ 198 * *	9.72 $\pm$ 3.59 * * *
健康对照组($n=20$)	0.213 $\pm$ 0.079	0.687 $\pm$ 0.175	0.018 $\pm$ 0.005	0.013 $\pm$ 0.007	46 $\pm$ 22	4.56 $\pm$ 1.73

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$; * * $P<0.05$; * * * $P<0.05$ 。

3 讨 论

支气管哮喘是由遗传和环境因素共同作用的多基因遗传病,表现为以气道高反应性为特征的慢性炎症性疾病,且炎症形成主要与嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞和肥大细胞及分泌的炎性介质或细胞因子有密切关系。

近年来对哮喘患者气道高反应性的研究证实气道慢性变态性炎症中,气道内嗜酸粒细胞明显升高,其释放的多种蛋白和氧自由基是引起气道高反应的主要因素,二者可促进组胺分泌,诱发或导致哮喘发作^[5]。ECP 是由嗜酸粒细胞释放的主要毒性蛋白颗粒之一,有资料显示,在这些颗粒蛋白中 ECP 的毒性作用最强^[6],被认为是嗜酸性粒细胞激活的标志,ECP 的检测可直接反映气道内嗜酸性粒细胞的活化程度。

目前,认为慢性气道炎症是哮喘的重要特征,主要表现为嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞等的浸润。气道炎症的观察可直接反映哮喘的严重程度和治疗效果^[7]。在轻度、中度、重度哮喘患者之间嗜酸性粒细胞数量和 ECP 质量浓度存在明显差异^[8],提示哮喘患者诱导痰中嗜酸性粒细胞数量和 ECP 质量浓度直接反映哮喘气道阻塞程度,因而可反映哮喘病情的严重程度。本文通过诱导痰中嗜酸性粒细胞数量和 ECP 质量浓度的检测的方法与肺活检或支气管肺泡灌洗等方法观察哮喘患者气道炎症相比,诱导痰可重复操作,方法简单安全,是一种无创伤检查方法^[9]。由于患者更易接受且不受病情限制,可用于临床动态观察哮喘患者病情变化,指导抗炎治疗。

哮喘是由多种细胞及炎症因子的气道慢性炎症性疾病,存在活跃的损伤和修复机制。嗜酸性粒细胞及中性粒细胞均参与了哮喘患者的气道炎症反应^[10]。嗜酸性粒细胞是哮喘的主要效应细胞,而 IL-13 又是参与支气管哮喘发作的重要炎症因子。有研究表明,IL-13 是一种嗜酸性粒细胞化学激动剂,它可以释放一种信号 Eotaxin,促使嗜酸性粒细胞向炎症区浸润,在哮喘患者过敏反应早期阶段激活血中嗜酸性粒细胞^[11],故血清 IL-13 水平升高同时可能导致 ECP 水平升高。本文通过研究发现支气管哮喘急性期患者诱导痰液中 EOS、ECP 分别与血清白细胞介素-13 呈正相关。痰液中 EOS、ECP 增高的同时血清 IL-13 水平也相应增高,而且支气管哮喘组与健康对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

人 IL-13 主要由辅助 T 细胞(Th2)产生,肥大细胞、嗜碱性粒细胞也能产生,其相对分子质量为 12,以非糖基化蛋白形

式产生,其基因位于第 5 号染色体上,与 IL-4 基因紧密相连,IL-13 的氨基酸序列与 IL-4 有 20%~25%同源性,在功能上也有相似之处,IL-13 通过多种作用机制参与呼吸道重塑的病理生理过程。支气管哮喘的病理生理特点是 CD4⁺ T 细胞产生 2 类细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 的异常增多^[1-2]。研究证实,哮喘患者急性发作期 PBMC 中 IL-13 mRNA 表达增多^[12]。在哮喘炎症早期 Th0、Th1、Th2 细胞均可合成 IL-13,当抗原刺激细胞后,T 细胞开始释放 IL-13 的时间早于 IL-4,分泌持续时间也长于 IL-4,但由于 IL-13 不能促进 T 细胞增殖、生长与激活,故在整个免疫反应中 IL-13 较 IL-4 作用强度似乎相对较弱。小剂量抗原激活,哮喘患者肺泡洗液中即可发现 IL-13mRNA 表达^[13]。IL-13 可通过以下途径起作用:(1)调节血管黏附分子合成,从而促进嗜酸性粒细胞浸润;(2)诱导 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,支持 Th2 细胞因子(IL-4、IL-5、IL-6)的表达,并抑制 Th1 细胞 IL-12、IFN- γ 的产生^[14];(3)促进 B 淋巴细胞由产生 IgG、IgM 向产生 IgE 转换,提高 IgE 水平;(4)促进嗜酸性粒细胞聚集;(5)刺激成纤维细胞增殖,参与气道重建。本文研究提示,哮喘发作时血清 IL-13 明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明哮喘发作期 IL-13 合成、释放增加,由此推断 IL-13 对哮喘气道非特异性炎症和局部免疫反应起重要作用。

支气管哮喘的发生、发展主要是由 Th1/Th2 之间的平衡被打破,且 Th2 细胞占优势。通过本文的研究,作者认为哮喘是一个复杂的炎症性疾病,细胞因子的调节反应是一个错综复杂的过程,但因细胞因子作用的网络性,细胞因子在体内存在的微量性,许多问题尚不清楚,如果能够充分了解细胞因子在哮喘发病机制中的作用将对防治哮喘有重要意义。

参考文献

[1] Moverare R, Elfman L, Stalenheim G, et al. Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients[J]. Allergy, 2000, 55(2): 171-176.

[2] Wills-karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13: central mediatr of allergic asthma[J]. Science, 1998, 282(5397): 2258-2261.

[3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核与呼吸杂志, 2008, 31(3): 817-822.

- [4] 罗炜,赖克方,陈如冲,等.嗜酸粒细胞性支气管炎患者气道炎症细胞及介质特征的探讨[J].中华结核和呼吸杂志,2005,28(5):626-629.
- [5] 张静波,姚光弼.嗜酸粒细胞阳离子蛋白在支气管哮喘中的意义[J].国外医学:内科学分册,1999,26(9):388-390.
- [6] 陈强,朱绿绮,刘建梅,等.哮喘儿童嗜酸细胞阳离子蛋白、肿瘤坏死因子- α 、最大呼气流速测定及其临床意义[J].实用儿科杂志,2000,15(6):320-321.
- [7] Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161: 64-67.
- [8] 胡苏萍,杨炯,聂汉祥,等.诱导痰炎性标志物检测在判定哮喘严重程度和鉴别诊断中的应用[J].中国实用内科杂志,2006,26(7):513-515.
- [9] Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: Reproducibility and validity of cell fluid phase measurements [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154: 808-817.
- [10] Baines KJ, Simpson JL, Bowden NA, et al. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes [J]. Eur Respir J, 2010, 35 (3): 522-531.
- [11] Palframan RT, Collins PO, Williams TJ, et al. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow [J]. Blood, 1998, 91: 2240-2248.
- [12] 腾懿群,姚佐朝,石桂枝,等.白细胞介素类 mRNA 在儿童哮喘中异常表达的检测意义[J].中华检验医学,2002, 25(3):284.
- [13] Prieto J, Lensmar C, Roquet A. Increased interleukin 13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low-dose allergen provocations[J]. Res Med, 2000, 94(8): 806-814.
- [14] de-Waal-Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, et al. Effect of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10[J]. J Immunol, 1993, 151(11): 6370-6381.

(收稿日期:2011-09-10)

• 临床研究 •

1 284 例肺炎支原体快速鉴定培养及耐药性分析

高 平(四川省内江市第一人民医院检验科 641000)

【摘要】 目的 探讨肺炎支原体(MP)快速鉴定培养和药敏试验对儿童肺炎感染早期的鉴别诊断及耐药特征,为临床合理使用抗生素提供依据。**方法** 采用 MP 快速鉴定培养药敏试剂盒对 1 284 例急性呼吸道感染的患儿咽拭子标本进行 MP 快速鉴定培养与药敏试验。**结果** 1 284 例咽拭子标本 MP 培养阳性 294 例,阳性率 22.90%;其中男性患儿阳性率 22.26%,女性患儿阳性率 23.33%,男、女比较差异无统计学意义($P>0.05$)。一年中,10~12 月阳性率最高(27.97%),其次为 1~3 月(25.83%);MP 对阿奇霉素、左氧氟沙星、加替沙星和司帕沙星的敏感率高;对罗红霉素的耐药率最高。**结论** MP 快速鉴定培养药敏试剂盒检测肺炎支原体感染具有检出率高、操作简便快速等优点,可作为一般实验室诊断 MP 感染的首选试验,为临床尽快诊断肺炎支原体感染和指导临床用药具有重要的意义。

【关键词】 肺炎支原体; 快速培养鉴定; 药敏试验; 儿童
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.05.036 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)05-0580-02

肺炎支原体(Mycoplasma Pneumoniae,MP)是导致儿童急性呼吸道感染的常见病原体之一,多见于婴幼儿及青少年,一年四季均可发病。近年来 MP 感染的发病率呈逐年上升趋势,且耐药性在不断上升,患者临床表现很难与病毒性和细菌性呼吸道感染相鉴别,易造成临床误诊和漏诊^[1-2]。因此,快速准确的诊断和选择用药在临床上显得尤为重要。现就本院的肺炎支原体培养及耐药性分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 8 月至 2011 年 7 月在本院儿科门诊及住院的急性呼吸道感染患儿咽拭子标本 1 284 例,其中男 521 例,女 763 例。年龄分布 0~8 岁。

1.2 方法

1.2.1 检测原理 肺炎支原体鉴定培养基是一种肺炎支原体快速培养基。其原理为肺炎支原体利用培养基中快速生长因子进行增殖,分解糖类,产生氢离子使培养基的 pH 值降低,使培养基中的指示剂由原来的红色转变成淡黄色。药敏板中有

9 种抗生素,利用 9 种抗生素的高低浓度在体外对微生物生长的抑制作用,对微生物作耐药性分析。肺炎支原体快速鉴定培养药敏试剂盒由陕西百盛园生物科技信息有限公司提供。

1.2.2 操作步骤 (1)取一支分装的干粉培养基,在无菌条件下打开盖子,加入 1.5 mL 超纯水,完全溶解后,先在药敏板阴性孔中加入 50 μ L 培养液后按如下步骤进行操作;(2)采集标本后,将棉拭子立即置于培养瓶内,搅动数次,提取棉拭子,对着瓶壁尽量挤出其中液体,取出棉拭子弃之,用加样器吹打数次或用振荡器混匀后,吸取 50 μ L 加入各药敏板孔中,丢弃培养瓶;(3)药敏板置 35~37 $^{\circ}$ C 孵箱培养,24 h 后观察结果。

1.2.3 结果判断 (1)C+孔培养基变成黄色,为阳性(+);C+孔培养基不变色(红色),为阴性(-)。(2)C-孔阴性(-),C+孔阳性(+)试验有效,判断余下各孔结果。(3)C-孔阳性(+),表示污染,试验无效。(4)C-孔阴性(-),C+孔阴性(-)表明无肺炎支原体生长,余下孔不判断结果。(5)药敏结果判定:A 孔(-)B 孔(-)敏感;A 孔(-)B 孔(+)中敏;A 孔