

嗜酸粒细胞性支气管炎和哮喘患者诱导痰微量元素的变化及意义

罗 炜¹, 王 慧², 陈如冲¹, 梁健鹏¹ (1. 广东省广州呼吸疾病研究所 510120; 2. 广州医学院第一附属医院检验科 510120)

【摘要】 目的 探讨嗜酸粒细胞性支气管炎(EB)和哮喘患者诱导痰微量元素水平的差异及其与气道炎性反应特征的关系。**方法** 检测 EB、咳嗽变异性哮喘(CVA)、支气管哮喘患者和健康对照组的诱导痰锌、铜、铁的水平并探讨其与痰炎性反应细胞比例的相关性。**结果** 哮喘组的诱导痰锌、铜浓度显著低于健康对照组、EB 和 CVA 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 铁浓度显著高于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 也高于 EB 和 CVA 组, 差异也有统计学意义($P < 0.01$); CVA 组的铜浓度亦显著低于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。诱导痰液中嗜酸性粒细胞的比例与锌和铜的水平存在一定的相关性。**结论** EB 和支气管哮喘患者的诱导痰液中微量元素锌、铜、铁水平存在的显著差异可能是二者病理生理特征差异的机制之一。

【关键词】 嗜酸粒细胞性支气管炎; 支气管哮喘; 咳嗽变异性哮喘; 诱导痰; 微量元素

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.10.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)10-1158-02

Change and meaning of sputum trace elements between patients of eosinophilic bronchitis and asthma LUO Wei¹, WANG Hui², CHEN Ru-chong¹, LIANG Jian-peng¹ (1. Department of Clinical Laboratory; 2. First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China)

【Abstract】 Objective To explore the the differences of trace elements level of induced sputum between patients of eosinophilic bronchitis and asthma, and the correlation with airway inflammation features. **Methods** The level of zinc, copper, and iron of induced sputum in all subjects including patients with EB, CVA, asthma and the control group, and the correlation of trace elements and the proportion of inflammatory cells was investigated. **Results** Compared with the other three groups, the asthma group had a significant lower level of zinc and copper in induced sputum ($P < 0.01$), and it had a much higher level of iron than the control group ($P < 0.05$). In addition, in CVA group, the level of copper was remarkably lower than than in control group ($P < 0.01$). There was a correlation between the proportion of eosinophils and the level of zinc and copper in induced sputum. **Conclusion** The significant differences in the level of zinc/copper and iron in induced sputum between asthma and eosinophilic bronchitis patients might be one of the mechanisms that contribute to the physiopathologic differences between the two diseases.

【Key words】 eosinophilic bronchitis; asthma; cough variant asthma; induced sputum; trace element

嗜酸粒细胞性支气管炎(EB)与支气管哮喘(简称哮喘)皆是以嗜酸性粒细胞(Eos)浸润为特征的气道炎性反应性疾病, 但前者缺乏喘息、气道高反应性等特征^[1], 造成这种差异的机制尚不清楚。多项研究显示, 微量元素的缺乏在哮喘、慢性阻塞性肺疾病和反复呼吸道感染等呼吸系统疾病的发生、发展中具有重要作用^[2-3]。本研究以健康人为对照, 观察 EB、咳嗽变异性哮喘(CVA)及典型哮喘(Asthma)患者的诱导痰液中锌、铜、铁等微量元素水平的变化及其与痰炎性反应细胞比例的关系, 初步探讨微量元素在 EB 和哮喘的病理生理差别中所扮演的角色。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2010~2011 年广州呼吸疾病研究所专科门诊因慢性咳嗽(持续时间超过 8 周, 胸肺影像学无明显相关病变证据)而就诊的患者, 参照我国的《咳嗽的诊断与治疗指南》进行病因诊断^[4]。诊断出 EB、CVA 和 Asthma 患者, 并以健康人作为对照。

1.1.1 EB 组 16 例患者男 9 例, 女 7 例, 平均年龄(34.8±12.3)岁。EB 诊断标准: (1)慢性咳嗽, 表现为刺激性干咳或伴少量黏液痰; (2)X 线片正常; (3)肺通气功能正常, 气道高反应性阴性, 呼气峰流速日间变异率正常; (4)痰细胞学检查嗜酸

细胞比例大于或等于 2.5%; (5)排除其他嗜酸性粒细胞增多性疾病; (6)口服或吸入糖皮质激素有效。

1.1.2 CVA 组 17 例患者中男 7 例, 女 10 例, 平均年龄(37.5±10.8)岁。CVA 诊断标准: (1)慢性咳嗽, 常伴有明显的夜间刺激性咳嗽; (2)支气管激发试验阳性, 或呼气峰流速日间变异率大于 20%, 或支气管舒张试验阳性; (3)支气管舒张剂治疗有效; (4)排除其他原因引起的慢性咳嗽。

1.1.3 典型哮喘组 19 例患者中男 9 例, 女 10 例, 平均年龄(39.5±10.6)岁。Asthma 诊断标准: 参照 2008 年中华医学会呼吸病学分会《支气管哮喘防治指南》^[5]。

1.1.4 健康对照组 健康成年志愿者 15 例, 其中男 8 例, 女 7 例, 平均年龄(32.9±14.1)岁, 均为非吸烟者。近 8 周无呼吸道感染病史。无血管紧张素转换酶抑制剂使用史。无呼吸、循环及消化系统等症状及病史, 血常规、胸部 X 线片及肺通气功能正常, 组胺激发试验阴性。

1.2 方法

1.2.1 诱导痰细胞分类检测 采用本实验室建立的方法^[6], 超声雾化器以浓度为 3% 的高渗盐水为受试者雾化 20 min; 雾化期间每隔 10 min 停止雾化, 让受试者清水漱口、擤鼻, 将唾液尽量吐干净后用力深咳, 咳出痰液至消毒平皿后继续雾化,

直至雾化完毕。取痰液中黏稠、密度大的部分进行称重,加入痰液重量 2 倍体积的 0.1%二硫苏糖醇;37℃水浴振荡 10 min,痰液混悬液用 300 目滤网过滤后,3 000 r/min 离心 10 min,上清液存放于-40℃冰箱内待检,细胞沉淀用生理盐水重悬后涂片,风干后 10%中性甲醛固定;苏木精-伊红(HE)染色后在光镜下分类 400 个非上皮细胞。

1.2.2 微量元素检测 锌、铜、铁测定均采用比色法,使用日立 7170 型自动生化分析仪检测。

1.3 统计学方法 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用最小显著差异法(LSD),如方差不齐时采用 Tamhane 法进行检验。统计分析采用 SPSS13.0 统计软件, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 微量元素结果 见表 1。Asthma 组的诱导痰液中锌、铜浓度显著低于健康对照组、EB 和 CVA 组,差异有统计学意义($P<0.01$);铁浓度显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),也高于 EB 组和 CVA 组,差异也有统计学意义($P<0.01$);CVA 组的铜浓度亦显著低于健康对照组组,差异有统计学意义($P<0.01$);EB 组的锌、铜、铁水平与健康对照组和 CVA 组差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 4 组痰液中锌、铜、铁含量比较(μmol/L)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	锌	铜	铁
健康对照组	15	32.9±14.1	2.01±0.79	4.39±2.08	51.0±17.2
EB 组	16	34.8±12.3	1.56±0.70	2.65±1.34	49.4±15.8
CVA 组	17	37.5±10.8	1.44±0.77	1.95±1.05 ^b	53.8±29.4
Asthma 组	19	39.5±10.6	0.57±0.22 ^{bc}	0.64±0.19 ^{bc}	62.2±11.7 ^{ac}

注:与健康对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 EB 组比较,^c $P<0.01$ 。

2.2 诱导痰炎性反应细胞比例结果 见表 2。各疾病组的 Eos 比例均显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);吞噬细胞(Mac)比例均显著低于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);哮喘组的 Eos 比例显著高于 EB 组,差异有统计学意义($P<0.05$);中性粒细胞(Neu)和淋巴细胞(Lym)比例各组差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 4 组诱导痰炎性反应细胞比例比较(%)

组别	<i>n</i>	Neu	Mac	Eos	Lym
健康对照组	15	35.4±16.8	63.3±17.8	0.3±0.5	1.0±1.3
EB 组	16	50.3±18.3	38.8±18.8 ^a	8.6±4.8 ^a	2.3±2.5
CVA 组	17	54.3±23.4	32.2±23.1 ^a	10.4±10.2 ^a	3.1±3.7
Asthma 组	19	55.1±27.6	18.7±16.3 ^a	24.4±20.1 ^{ab}	1.8±2.8

注:与健康对照组比较,^a $P<0.01$;与 EB 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 3 诱导痰锌、铜、铁含量与诱导痰炎性反应细胞相关性分析

组别	Neu	Mac	Eos	Lym
锌	-0.018	0.215	-0.323	0.027
铜	-0.246	0.513	-0.451	-0.323
铁	0.004	-0.147	0.235	-0.024

2.3 微量元素与炎性反应细胞比例的相关性 见表 3。诱导痰中铜的浓度与 Neu 存在显著相关性,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Mac、Eos、Lym 差异也有统计学意义($P<$

0.01)。诱导痰中锌的浓度与 Eos 细胞比例存在显著相关性,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

微量元素对于人体正常免疫功能的维持具有重要作用。反复感染或慢性炎性反应时不仅有免疫功能受损,而且伴有多种微量元素缺乏或失衡,其中铜、铁、锌是具有代表性的 3 种微量元素。铜通过由它构成的酶组成机体防御系统,增加细胞抗炎和抗氧化能力,增强机体免疫机能。铜缺乏时,白细胞功能减弱,使免疫系统产生补体以及细胞因子等的能力减弱,从而降低机体对病毒、过敏原等的抵抗力。铁在保持淋巴细胞数量和维持细胞及体液免疫功能稳定起着重要作用,同时铁浓度的变化还影响补体系统及多形核白细胞及吞噬细胞的吞噬杀菌功能。在微量元素中,锌对免疫功能影响最为明显,锌参与了体内 200 多种酶的组成,也是 DNA 和 RNA 核糖体稳定所必需的物质,是维持正常细胞功能和其他免疫功能的重要元素。缺锌既可使机体 T 细胞功能不全,亦令体液免疫功能受损而削弱机体防御能力。国内外学者在慢性阻塞性肺疾病、反复呼吸道感染、过敏性鼻炎和哮喘等疾病的研究中,先后发现这些患者的血清微量元素浓度呈现异常情况,提示微量元素缺乏或过量是上述呼吸系统疾病的发病机制之一。但上述研究亦存在研究结果南辕北辙的问题,同种元素水平在相同疾病中的结果,部分升高、部分降低、也有部分正常^[7-8]。出现这样的问题可能与不同研究的检测方法、研究对象的年龄存在差异等因素有关,但主要的问题可能与其检测的标本均为外周血有关,外周血中的微量元素水平反映的是患者全身性的情况,影响因素较多,不能准确反映局部的气道炎性反应情况。诱导痰作为评价气道炎性反应的标本,与外周血相比,具有准确、无创和适合动态监测等优点。本研究尝试采用诱导痰标本观察呼吸系统的微量元素的水平具有一定的参考意义。

EB 具有与哮喘相似的嗜酸性粒细胞气道炎性反应,但有着不同的临床表现和气道反应性,其机制尚不明确。作者的前期研究发现,与哮喘相比,EB 气道炎性反应的部位较局限以及炎性反应细胞的浸润程度较轻可能是机制之一^[9]。哮喘患者的微量元素缺乏已有相关报道^[10],其严重程度与气道的嗜酸性粒细胞的浸润程度相关。EB 患者的微量元素水平以及与哮喘是否存在差异则少见报道。

本研究结果显示,EB 组的痰液中锌、铜、铁浓度与健康对照组相比差异无统计学意义。Asthma 组的痰液中锌、铜浓度则显著低于健康对照组、EB 组和 CVA 组,差异有统计学意义($P<0.01$),该结果与 Asthma 组诱导痰 Eos 比例显著高于其他 3 组的情况相对应,显示二者之间存在着负相关的情况。该结果与国外研究相似,国外的动物实验发现锌的水平与哮喘的气道嗜酸性粒细胞多寡、气道反应性高低存在直接关系^[11]。EB 组和 CVA 组的痰 Eos 比例虽然也显著高于健康对照组,两组的锌浓度亦呈现出一定程度的下降,但差异无统计学意义。相比之下,CVA 组的铜浓度已出现显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$),由此说明除了锌以外,痰中的铜浓度亦是反映 Eos 气道炎性反应程度的一项敏感指标。除此之外,由于体内缺铜时可直接影响气道吞噬细胞的吞噬及杀菌能力,并削弱呼吸道纤毛上皮细胞消除病原及过敏颗粒的能力,因此痰液中铜的水平与痰 Mac 的比例应该也应存在一定的相关性,研究也证实了这一点。

国外研究显示,痰液中铁浓度通常与痰 Neu 的比例呈正相关,与 Eos 的比例则无显著相关性,因此痰(下转第 1162 页)

- lins in Mussel Antimicrobial Defense[J]. J Biol Chem, 2000, 275(17):12954-12962.
- [2] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, et al. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into plasma after bacterial challenge[J]. J Cell Sci, 1999, 112(23):4233-4242.
 - [3] Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, et al. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281(1):313-323.
 - [4] Seo JK, Crawford JM, Stone KL, et al. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(4):1998-2004.
 - [5] Mitta G, Hubert F, Dyrynda EA, et al. MytilinB and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis[J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(4):381-393.
 - [6] Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas* [J]. Immunol Rev, 2004, 198(1):149-168.
 - [7] 康翠洁, 王金星, 赵小凡, 等. 中国对虾抗菌肽成熟肽的 cDNA 克隆[J]. 山东大学学报:理学版, 2002, 37(6):552-556.
 - [8] 王徕城, 王金星, 王来元, 等. 家蝇防御素基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 动物学报, 2003, 49(3):408-413.
 - [9] Patrzykat A, Douglas SE. Gone gene fishing: how to catch novel marine [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21(8):362-369.
 - [10] Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(23):8998-9002.
 - [11] Xu Q, Wang G, Yuan H, et al. cDNA sequence and expression analysis of an antimicrobial peptide, theromacin, in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2010, 157(1):119-126.
 - [12] 李文楚, 郑学勤, 黄自然. 柞蚕抗菌肽 A 基因的克隆和表达[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(4):58-61.
 - [13] Kim SR, Hong MY, Park SW, et al. Characterization and cDNA cloning of a cecropin-like antimicrobial peptide, papiliocin, from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* [J]. Mol Cells, 2010, 29(4):419-423.
 - [14] 王洪振, 周晓馥, 宋朝霞, 等. 简并 PCR 技术及其在基因克隆中的应用[J]. 遗传, 2003, 25(2):201-204.
 - [15] 虞凤慧, 张丽芳, 李俊峰, 等. 中国林蛙皮肤抗菌肽基因的 cDNA 克隆及抗菌、抗癌和溶血活性的测定[J]. 生物工程学报, 2009, 25(1):101-108.

(收稿日期:2011-12-18)

(上接第 1159 页)

液铁浓度增高通常见于 Neu 气道炎症反应为主的囊性纤维化和支气管扩张等^[12]。本研究结果显示,虽然 Asthma 组的痰 Neu 比例较健康对照组高,但差异无统计学意义。而 Asthma 组的铁浓度则显著高于健康对照组和其他两种疾病组,由此提示铁不仅在 Neu 炎症反应,在 Eos 炎症反应中亦可能扮演了一定的角色。

本研究发现,EB 患者痰液中锌、铜、铁的含量处于正常范围,其水平与 Asthma 组差异有统计学意义,该差异与二者的 Eos 炎症反应程度存在一定的相关性。微量元素在 EB 与哮喘的病理生理差异中所起的具体作用需要更加深入的后续研究。

参考文献

- [1] Gibson PG, Denburg J, Dolovich J, et al. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma[J]. Lancet, 1989, 1(8651):1346-1348.
- [2] 王学彧, 朱宝玉. 慢性阻塞性肺疾病缓解期患者血清微量元素变化及意义[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(7):853-856.
- [3] 李琳琳. 儿童感染性疾病与微量元素关系的探讨[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(21):1850-1851.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2009)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(6):407-413.
- [5] 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、治疗及教育和管理方案)
- [6] 罗伟, 王慧, 陈如冲. 单一浓度法与梯度浓度法高渗盐水雾化诱导痰的成功率与安全性比较[J]. 广东医学, 2010, 31(24):3193-3195.
- [7] 程靖, 刘贤. 变应性鼻炎、哮喘与成人血微量元素的循证医学研究[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2004, 12(2):53-56.
- [8] Murgia C, Lang CJ, Truong-Tran AQ, et al. Zinc and its specific transporters as potential targets in airway disease [J]. Curr Drug Targets, 2006, 7(5):607-627.
- [9] 罗伟, 赖克方, 陈如冲, 等. 嗜酸性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(9):626.
- [10] Jayaram L, Chunilal S, Pickering S, et al. Sputum zinc concentration and clinical outcome in older asthmatics [J]. Respirology, 2011, 16(3):459-466.
- [11] Truong-Tran AQ, Ruffin RE, Foster PS, et al. Altered zinc homeostasis and caspase-3 activity in murine allergic airway inflammation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27(3):286-296.
- [12] Reid DW, Lam QT, Schneider H, et al. Airway iron and iron-regulatory cytokines in cystic fibrosis [J]. Eur Respir J, 2004, 24(2):286-291.

(收稿日期:2012-01-10)