

论著·临床研究

咳嗽变异性哮喘患儿诱导痰神经生长因子 和白细胞介素-4水平检测

李红子 金正勇 元熙哲 金春姬

(延边大学附属医院儿科,吉林 延边 133000)

[摘要] 目的 检测咳嗽变异性哮喘(CVA)患儿诱导痰中神经生长因子(NGF)和白细胞介素-4(IL-4)的表达,探讨NGF和IL-4在小儿CVA中的作用。方法 34例CVA患儿纳入研究,20例健康儿童作为正常对照。对受试者进行痰诱导,苏木精-伊红染色计数诱导痰中嗜酸性粒细胞的百分比。酶联免疫吸附双抗体夹心法检测诱导痰液上清中NGF和IL-4的表达。荧光定量PCR检测诱导痰液沉淀细胞中NGF和IL-4 mRNA的表达。结果 CVA组患儿诱导痰中嗜酸性粒细胞百分数为 $(13.4 \pm 3.6)\%$,显著高于对照组的 $(2.6 \pm 1.7)\%$ ($P < 0.01$)。CVA组患儿诱导痰上清中NGF和IL-4的表达水平及诱导痰沉淀细胞中NGF和IL-4 mRNA的表达水平均显著高于对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。诱导痰上清中NGF和IL-4的表达水平及诱导痰中NGF和IL-4 mRNA的表达水平与嗜酸性粒细胞计数均呈正相关(均 $P < 0.05$)。CVA患儿治疗后诱导痰上清中NGF和IL-4的表达水平及诱导痰中NGF和IL-4 mRNA的表达水平均出现了显著的减低(均 $P < 0.05$)。结论 嗜酸性粒细胞的浸润和炎性介质NGF、IL-4的升高参与了小儿CVA的发生发展过程,在小儿CVA的诊断和治疗中具有一定的价值。

[中国当代儿科杂志,2012,14(12):924-927]

[关键词] 咳嗽变异性哮喘;神经生长因子;白细胞介素-4;儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)12-0924-04

Levels of nerve growth factor and interleukin-4 in the induced sputum of children with cough variant asthma

LI Hong-Zi, JIN Zheng-Yong, YUAN Xi-Zhe, JIN Chun-Ji. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanbian, Jilin 133000, China (Jin Z-Y, Email: lihongzi1972@hotmail.com)

Abstract: Objective To examine the levels of nerve growth factor (NGF) and interleukin-4 (IL-4) in the induced sputum of children with cough variant asthma (CVA), with the aim of studying the roles of NGF and IL-4 in childhood CVA. **Methods** Thirty-four children with CVA were enrolled in this study. Twenty healthy children were used as a normal control group. The induced sputum was separated into supernatant and cells. Hematoxylin and eosin staining was used to count differential cells. The expression of NGF and IL-4 in supernatant was measured using ELISA. The mRNA expression of NGF and IL-4 in cells was determined by Real-time PCR analysis. **Results** The percentage of eosinophils in the CVA group was significantly higher than in the control group [$(13.4 \pm 3.6)\%$ vs $(2.6 \pm 1.7)\%$; $P < 0.01$]. The expression of NGF and IL-4 protein and mRNA in induced sputum was significantly higher in the CVA group than in the control group ($P < 0.05$). The expression of NGF and IL-4 protein and mRNA was positively correlated with the percentage of eosinophils ($P < 0.01$). The expression of NGF and IL-4 protein and mRNA in induced sputum was significantly reduced in the CVA group after treatment ($P < 0.05$). **Conclusions** Eosinophils infiltration and increased expression of NGF and IL-4 play key roles in the development of childhood CVA, suggesting that they may be useful in the diagnosis and treatment of childhood CVA. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(12):924-927]

Key words: Cough variant asthma; Nerve growth factor; Interleukin-4; Child

咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)是儿童慢性咳嗽的主要原因,CVA主要的临床特点是长期迁延的慢性咳嗽,不伴有喘鸣或者呼吸困难,

咳嗽可以发生在白天也可以在晚上,夜晚的发病会影响小儿的睡眠和生长发育,在寒冷或者运动等刺激时可以诱发咳嗽的发作,有部分CVA患儿可最终

[收稿日期]2012-06-26;[修回日期]2012-07-25

[作者简介]李红子,女,硕士,副主任医师。

[通信作者]金正勇,主任医师。

发展为典型的支气管哮喘^[1-2]。CVA 发病率近年来有逐渐增加的趋势,但其发病机制目前仍不清楚,因此揭示 CVA 的发病机制以及对 CVA 的诊断和预防是一个急需解决的问题^[3]。气道的高反应性是 CVA 的主要特征,已有研究提示这种气道的高敏感性与一些炎性因子或者生长因子所致的气道炎症有关,例如神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)^[4]。NGF 和 IL-4 在典型支气管哮喘中的致炎作用已被大多数实验所证实,其在 CAV 中的研究报道不多。本研究通过检测小儿 CVA 患者诱导痰中 NGF 和 IL-4 的表达,旨在探讨 NGF 和 IL-4 在小儿 CVA 中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 6 月至 2011 年 6 月我院儿科门诊就诊的 CVA 患儿 34 例,其中男 19 例,女 15 例,年龄 3~11 岁(平均 7 ± 5 岁),病程 2~34 个月(平均 16 ± 8 个月)。所选患儿于试验前 12 h 内未用过糖皮质激素治疗。CVA 诊断符合儿童支气管哮喘防治常规(2004)诊断^[5]:无痰干咳持续 >4 周,夜间和/或清晨常见;无感染征象;长时间抗生素治疗无效;支气管激发试验阳性;呼气流量峰值每日变异率 $\geq 20\%$ (连续监测 1~2 周);抗哮喘药物诊断性治疗有效;排除其他引起慢性咳嗽的原因。34 例患儿应用糖皮质激素联合长效 β_2 受体激动剂吸入治疗 1 个月后,咳嗽症状明显好转。另取门诊体检健康儿童 20 例作为正常对照,其中男 12 例,女 8 例,年龄 4~12 岁(平均 8 ± 5 岁)。两组受试者在性别、年龄、身高、体重等方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有操作均符合我院伦理委员会的各项规定,患儿家属了解整个试验的过程并签署知情同意书。

1.2 痰液采集

参照彭秋凤等^[6]的报道进行痰液采集:吸入沙丁胺醇气雾剂(200 μg),超声雾化吸入 3% 的高渗盐水,流量 1 L/min,雾化 15~20 min,每隔 5 min 清水漱口后用力咳出痰液至消毒平皿,直至痰量达到 1 mL。痰液中加入 4 mL 二硫苏糖醇(0.1%)混匀痰液,离心 $1000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$,分离上清和沉淀用于后续试验。

1.3 痰液中嗜酸性粒细胞计数

取上述方法分离的痰液沉渣涂片,10% 甲醛固定,苏木精-伊红染色,光镜下进行嗜酸性粒细胞计数,鳞状上皮细胞/有核细胞 $< 20\%$ 为诱导痰液样本

合格。

1.4 痰液中 NGF 和 IL-4 表达水平的测定

取上述方法分离的痰液上清,NGF 和 IL-4 表达水平的测定采用酶联免疫吸附双抗体夹心法(ELISA),试剂盒购自美国 R&D 生物技术有限公司,严格按试剂盒说明操作,酶标仪 450 nm 波长处测定 OD 值。以 OD 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,然后对照标准曲线根据痰液上清的 OD 值计算 NGF 和 IL-4 的表达水平。

1.5 痰液中 NGF 和 IL-4 表达的荧光定量 PCR 检测

取上述方法分离的痰液沉淀,加入 1 mL Trizol(美国分子探针公司产品),按照说明书操作,提取沉淀中细胞的总 RNA。反转录试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,按照试剂盒说明书操作反转录出 cDNA 第一链。SYBR Green 荧光定量检测试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,按照说明书操作,使用 ABI7900 荧光定量 PCR 仪检测 NGF 和 IL-4 基因的表达。NGF 基因:上游引物 5'-TCAGTGAGGACAAACTATTGG-3',下游引物 5'-CTCTTCAGCAAAGCAGACTTC-3';IL-4 基因:上游引物 5'-GCTGACATTATTATCGGACAC-3',下游引物 5'-AGCCTCAAGTTGTTCTCTGT-3';内参照 GAPDH 基因:上游引物 5'-GGATTTGGTCGTATTGGG-3',下游引物 5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3',引物由广东英俊基因公司合成,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环。Ct 值说明基因扩增达到阈值的循环数,故 Ct 值越小说明该基因的表达就越多,根据内参的 Ct 值可以计算出 ΔCt 值, ΔCt 值 = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值, ΔCt 值可以间接反映目的基因的相对表达水平, ΔCt 值越小说明该基因的表达越多,基因的表达量用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 值表示。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 12.0 统计软件处理数据,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 t 检验,治疗前后均数的比较采用配对 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,相关关系分析用 Pearson 相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组诱导痰中嗜酸性粒细胞计数的比较

CVA 组患儿诱导痰中嗜酸性粒细胞百分数为 $(13.4 \pm 3.6)\%$,对照组为 $(2.6 \pm 1.7)\%$,两组比较差异有统计学意义($t = 8.74, P < 0.01$)。

2.2 两组诱导痰上清中 NGF 和 IL-4 蛋白表达水平的比较

CVA 组患儿诱导痰上清中 NGF 和 IL-4 的表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义(分别 $t = 2.69, P < 0.05; t = 6.24, P < 0.01$),见表 1。

表 1 CVA 组和对照组诱导痰上清中 NGF 和 IL-4 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	例数	NGF	IL-4
对照组	20	5.4 ± 1.0	154 ± 21
CVA 组	34	9.0 ± 2.6 ^a	266 ± 44 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

2.3 两组诱导痰沉淀细胞中 NGF 和 IL-4 基因表达水平的比较

CVA 组患儿诱导痰沉淀细胞中 NGF 和 IL-4 mRNA 的表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义(分别 $t = 5.12, P < 0.01; t = 6.03, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 CVA 组和对照组诱导痰沉淀细胞中 NGF 和 IL-4 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NGF mRNA	IL-4 mRNA
对照组	20	0.241 ± 0.013	0.167 ± 0.014
CVA 组	34	0.568 ± 0.029 ^a	0.665 ± 0.031 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

2.4 诱导痰中嗜酸性粒细胞计数与 NGF 和 IL-4 表达水平的相关性

诱导痰上清中 NGF 和 IL-4 的表达水平与嗜酸性粒细胞计数呈正相关,其 r 值分别为 0.321 和 0.362(均 $P < 0.01$)。诱导痰沉淀细胞中 NGF 和 IL-4 mRNA 的表达水平与嗜酸性粒细胞计数也呈正相关,其 r 值分别为 0.436 和 0.502(均 $P < 0.01$)。

2.5 治疗前后 NGF 和 IL-4 表达水平的变化

CVA 组患儿糖皮质激素联合长效 β_2 受体激动剂吸入治疗 1 个月后,NGF 和 IL-4 蛋白表达水平显著降低(分别 $t = 2.37, P < 0.05; t = 2.37, P < 0.05$);NGF 和 IL-4 mRNA 也显著降低(分别 $t = 4.66, P < 0.01; t = 5.82, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 治疗前后 NGF 和 IL-4 表达水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NGF		IL-4	
		蛋白 (pg/mL)	mRNA	蛋白 (pg/mL)	mRNA
治疗前	34	9.0 ± 2.6	0.568 ± 0.029	266 ± 44	0.665 ± 0.031
治疗后	34	6.0 ± 1.3 ^a	0.354 ± 0.016 ^b	203 ± 35 ^a	0.367 ± 0.015 ^b

a: 与治疗前比较, $P < 0.05$; b: 与治疗前比较, $P < 0.01$

3 讨论

CVA 以慢性咳嗽为唯一的临床表现,占了儿童慢性咳嗽的 50% 以上,临床上极易误诊或漏诊,有报道称其误诊率高达 30% 以上^[7]。哮喘的本质就是多种炎性细胞或因子参与的慢性气道炎症性疾病,气道的炎性浸润细胞或者细胞因子的变化可以通过气道分泌物来检测,可见无创的诱导痰技术是一种安全有效、简便易行的检验方法,为呼吸道疾病的研究提供了方便^[8]。本研究使用诱导痰技术发现 CVA 患儿诱导痰中嗜酸性粒细胞的百分比显著高于对照儿童,说明诱导痰中嗜酸性粒细胞的升高可以作为 CVA 诊断的一个条件。

NGF 不仅参与神经的再生和创伤的修复,还具有免疫功能调节、促进肿瘤发生生长等多种生物学功能。最近的研究显示,NGF 可以诱导人呼吸道平滑肌细胞的增殖和间质胶原的分泌,参与呼吸道的重塑,NGF 可以刺激速激肽的分泌,并上调靶细胞速激肽受体的表达,增加气道的高反应性,参与支气管哮喘的发病过程^[9-10]。本研究显示 CVA 组患儿诱导痰中 NGF 的表达水平显著高于对照儿童,同时患儿治疗后 NGF 的表达水平也出现了显著的减低,提示 NGF 可能参与了 CVA 的发病过程。IL-4 是由多种炎性细胞分泌的致炎因子,IL-4 可以通过 TLR 受体刺激炎性细胞释放过敏原特异性 IgE 参与支气管哮喘病变的发生、发展过程^[11]。本研究显示 IL-4 的表达水平在 CVA 组显著高于对照组,同时患儿治疗后 IL-4 的表达水平也相应的减低,说明 IL-4 也参与了 CVA 的气道慢性炎症病变过程。

有研究报道嗜酸性粒细胞可以产生 NGF 和 IL-4^[12],本研究显示 CVA 组患儿诱导痰中 NGF 和 IL-4 的表达水平与诱导痰中嗜酸性粒细胞的百分数呈正相关,从另一个侧面证实了气道嗜酸性粒细胞的浸润与 NGF 和 IL-4 高表达的相关关系。NGF 介导的是神经源性炎症,而 IL-4 介导的是免疫性炎症,本研究显示诱导痰中 NGF 和 IL-4 同时升高,说明两个炎症机制都参与了 CVA 的发生发展过程,但神经源性炎症与免疫性炎症之间的相互调控关系还有待进一步的研究。

综上所述,CVA 患儿诱导痰中会出现嗜酸性粒细胞和炎性介质 NGF、IL-4 升高,这 3 个指标的检测在小儿 CVA 的诊断和治疗中具有一定的价值。

[参 考 文 献]

[1] 苗青, 魏鹏草. 咳嗽变异性哮喘的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(10):1717-1718.

[2] Takemura M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoka H, et al. Atopic features of cough variant asthma and classic asthma with wheezing[J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(12): 1833-1839.

[3] Matsumoto H, Niimi A, Tabuena RP, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, et al. Airway wall thickening in patients with cough variant asthma and nonasthmatic chronic cough[J]. Chest, 2007, 131(4): 1042-1049.

[4] Curtis JL. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs [J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(2): 412-416

[5] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华医学会《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘防治常规[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2): 100-104.

[6] 彭秋风, 孔灵菲. 咳嗽变异性哮喘患者诱导痰中神经生长因子和白细胞介素4水平及气道炎症特征初探[J]. 中华内科杂志, 2011, 50(3): 221-224.

[7] 张晓燕, 刘春风, 焦富勇. 小儿慢性咳嗽的诊断探讨[J]. 中

国儿童保健杂志, 2005, 13(1): 47-49.

[8] Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoka H, et al. Features of cough variant asthma and classic asthma during methacholine-induced bronchoconstriction: a cross-sectional study[J]. Cough, 2009, 5: 3.

[9] Freund-Michel V, Bertrand C, Frossard N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation[J]. Cell Signal, 2006, 18(5): 621-627.

[10] El-Hashim AZ, Jaffal SM. Nerve growth factor enhances cough and airway obstruction via TrkA receptor- and TRPV1-dependent mechanisms[J]. Thorax, 2009, 64(9): 791-797.

[11] Meng L, He X, Zhu W, Yang X, Jiang C, Sun Q, et al. TLR3 and TLR7 modulate IgE production in antigen induced pulmonary inflammation via influencing IL-4 expression in immune organs [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17252.

[12] Nassenstein C, Braun A, Erpenbeck VJ, Lommatzsch M, Schmidt S, Krug N, et al. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma[J]. J Exp Med, 2003, 198(3): 455-467.

(本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

《中国当代儿科杂志》征订征稿启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊), 中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊, 北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊。同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重, 反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国外儿科研究、论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊, 每月15日出版, 向国内外公开发行。中国标准刊号: ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校, 各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位, 各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元, 全年144元。邮发代号: 国内 42-188; 国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统, 免收审稿费。审稿周期4~6周。欲浏览本刊或投稿, 请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

为更好地与读者、作者进行沟通互动, 我刊于2012年2月入驻国内著名医学媒体丁香园博客, 网址: <http://i.dxy.cn/cjcp>。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编: 410008

电话: 0731-84327402 传真: 0731-84327922 Email: ddek7402@163.com

网址: <http://www.cjcp.org>