

· 论 著 ·

诱导排痰检查对阻塞性气道疾病中的应用分析

陈华萍, 吴 颖, 万 敏, 张 巧, 马千里, 王关嵩, 王长征[△]

(第三军医大学新桥医院呼吸内科, 重庆 400037)

摘 要:目的 探索诱导排痰检查在阻塞性气道疾病中的临床意义。方法 选择慢性咳嗽患者 65 例, 其中男 20 例, 女 45 例, 平均年龄(47±15)岁;哮喘患者 80 例, 男 29 例, 女 51 例, 平均年龄(48±14)岁;慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者 68 例, 男 46 例, 女 22 例, 平均年龄(66±10)岁。进行诱导痰细胞学检查。结果 20.00%(13/65)的慢性咳嗽患者诱导痰中嗜酸性细胞(EOS)百分比大于 3%, 提示考虑嗜酸性细胞性支气管炎的可能;哮喘组中 EOS 和中性粒细胞(NEU)的平均百分比分别为(4.62±3.51)%和(42.59±23.90)%, 其中 83.7%(67/80)的患者, EOS>1%, 25.0%(20/80)的患者 NEU>61%;COPD 患者 EOS 和 NEU 的平均百分比分别为(0.80±0.80)%和(54.43±21.51)%, 其中 29.4%(24/68)EOS>1%, 55.8%(38/68)NEU>61%, 在哮喘组和 COPD 组间 EOS 和 NEU 比例比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 诱导排痰细胞学检查可对慢性咳嗽的鉴别诊断和判断哮喘、COPD 气道炎症具有重要的指导意义。

关键词:肺疾病, 慢性阻塞性;诱导排痰细胞学检查;慢性咳嗽;哮喘

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)01-0014-02

The clinical significance and application of cytological examination of induced sputum in chronic airway disease

Chen Huaping, Wu Ying, Wan Min, Zhang Qiao, Ma Qianli, Wang Guansong, Wang Changzheng[△]

(Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the clinical value of cytological examination of induced sputum in chronic airway disease. **Methods** Sixty five cases (age:47±15 yr) with chronic cough were enrolled, including 20 males and 45 females. Eighty cases (age:48±14 yr) with asthma were enrolled, including 29 males and 51 females. Sixty eight cases (age:66±10 yr) with COPD were enrolled, including 46 males and 22 females. **Results** The percentage of those patients whose EOS above 3% was 20% (13/65) in patients with chronic cough. These patients were considered to be suffered from eosinophilic bronchitis. The means of EOS and NEU percentages in asthma patients were (4.62±3.51)% and (42.59±23.90)%. Among these cases, the percentage of those patients whose EOS above 1% was 83.7% (67/80) and NEU was over 61% was 25.0% (20/80) in patients with asthma. The EOS and NEU percentages mean in COPD patients were (0.80±0.8)% and (54.43±21.51)%. The percentage of those patients whose EOS above 1% was 29.4% (24/68) and NEU above 61% was 55.8% (38/68) in patients with asthma. For EOS and NEU percentages, there was markedly difference between asthma group and COPD group ($P<0.01$). **Conclusion** The cytological examination in induced sputum may be meaningful for differential diagnosis of chronic cough and treatment of asthma and COPD.

Key words: pulmonary disease, chronic obstructive; induced sputum cytological examination; chronic cough; asthma

诱导排痰细胞学检查作为一种无创性检查方法,越来越多的用于临床,诊断或监测一些慢性呼吸道疾病,如哮喘、嗜酸性粒细胞性支气管炎(EB)和明显阻塞性肺疾病(COPD)等。EB是慢性咳嗽常见病因之一,其诊断的主要方法即为诱导排痰细胞学检查。诱导排痰中嗜酸性粒细胞增多是诊断 EB 关键线索。哮喘是一种以嗜酸性粒细胞性炎症为主的慢性气道疾病。诱导排痰嗜酸性粒细胞数量检测作为一种无创性炎症标志物,可以在一定程度上反映哮喘气道炎症程度及疗效判断,甚至预计哮喘急性加重^[1]。所以,诱导排痰检查对哮喘的治疗和长期管理有重要指导意义。近年还发现所谓的“中性粒细胞性哮喘”^[2],诱导排痰是其最简便可靠的监测方法。COPD 也是一种慢性气道炎症性疾病,但 COPD 和哮喘气道炎症的细胞类型有所不同,以中性粒细胞炎症为主。但诱导排痰检查在 COPD 应用中的临床意义仍未被充分评价。本文检查了哮喘、EB 和 COPD 诱导排痰炎症细胞类型,进行了初步比较研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 10 月至 2010 年 10 月本院门诊和住院治疗的慢性咳嗽患者 65 例,其中男 20 例(30.8%),女

45 例(69.2%);年龄 38~65 岁,平均(47±15)岁。哮喘患者 80 例,其中男 29 例(36.3%),女 51 例(63.7%);年龄 35~63 岁,平均(48±14)岁。COPD 患者 68 例,其中男 46 例(67.6%),女 22 例(32.4%);年龄 55~78 岁,平均(66±10)岁。慢性咳嗽患者入选标准为:咳嗽大于或等于 8 周,X 线胸片和 CT 检查正常;哮喘患者入选标准符合中华医学会呼吸系病学会 2008 年制定的《支气管哮喘患者防治指南》标准^[3];COPD 患者入选标准符合 2002 年修订的《慢性阻塞性肺病诊治规范》^[4]。

1.2 方法 诱导排痰检测,参照中华医学会呼吸病学分会推荐的方法进行^[5],入选患者给予超声雾化吸入 3% 高渗盐水,2~5 min 后,深咳痰液,收集痰液。取无唾液成分的痰液放入离心管中,加入 4 倍体积的 0.1% DTT 37℃ 孵育 30 min,期间摇晃几次,2 000 r/min 离心 10 min。留少许上清液重悬细胞涂片,37℃ 烘干后用甲醇固定 10 min,瑞氏-吉姆萨混合染色 10 min,光镜下进行 400 个非鳞状细胞分类计数,包括嗜酸性粒细胞(EOS)、中性粒细胞(NEU)、单核-巨噬细胞(MON)、淋巴细胞(LYM)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件对各组实验数据

[△] 通讯作者, Tel: (023) 68774303; E-mail: czwang@netease.com。

进行统计学处理,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间的差异采用 t 检验,百分比数据进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢性咳嗽患者的诱导排痰细胞学分类 慢性咳嗽患者诱导排痰嗜酸性粒细胞 EOS $> 3\%$ 是诊断 EB 的主要条件^[6]。本组患者中 20.0%(13/65)的 EOS 比例大于 3%,以 EOS $> 3\%$ 为折点,将本组患者分为两组进行细胞分类比较,结果显示两组之间除 EOS 比较差异有统计学意义($P < 0.01$)外,其他类型炎性细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 慢性咳嗽诱导排痰炎症细胞分类比较(%)

组别	<i>n</i>	EOS	NEU	LYM	MON
EOS $\leq 3\%$	52	0.83 $\pm$ 0.78	50.91 $\pm$ 18.17	3.81 $\pm$ 3.19	44.27 $\pm$ 17.58
EOS $> 3\%$	13	6.13 $\pm$ 6.23*	47.01 $\pm$ 14.66	3.84 $\pm$ 4.17	42.90 $\pm$ 15.79

*: $P < 0.01$,与 EOS $\leq 3\%$ 组比较。

2.2 哮喘组和 COPD 组诱导排痰细胞学分类比较 在哮喘和 COPD 患者均以 EOS $> 1\%$ 定义为 EOS 增高^[7],其中哮喘组 EOS 比例大于 1% 占 83.7%(67/80),COPD 组 EOS $> 1\%$ 占 29.4%(24/68)。将诱导排痰中以 NEU $> 61\%$ 定义为 NEU 增多^[8],在哮喘组 25.0%(20/80)的患者 NEU $> 61\%$,COPD 组 55.8%(38/68)的患者 NEU $> 61\%$ 。两组细胞分类比较表明哮喘组 EOS 明显高于 COPD 组,而 COPD 组 NEU 明显高于哮喘组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 2 哮喘和 COPD 组诱导排痰炎症细胞分类比例(%)

组别	<i>n</i>	EOS	NEU	LYM	MON
哮喘组	80	4.62 $\pm$ 3.51	42.59 $\pm$ 23.90	5.41 $\pm$ 6.91	46.73 $\pm$ 22.48
COPD 组	68	0.80 $\pm$ 0.88 [#]	54.43 $\pm$ 21.51 [#]	8.74 $\pm$ 18.91	36.02 $\pm$ 19.96

[#]: $P < 0.001$,与哮喘组比较。

3 讨 论

诱导排痰技术作为一种有效、无创、安全简便易行的直接监测呼吸道炎症检查方法,广泛应用于临床。本组实验中成功率高达 95%,仅有几例患者因年龄过高导致该操作无法进行。EB 是慢性咳嗽中较为常见的一种,以刺激性干咳或伴少许黏痰为主要症状,肺通气功能正常、无气道高反应性,痰诱导 EOS $\geq 3\%$,糖皮质激素治疗有效,排除其他嗜酸性粒细胞增多性疾病即可诊断 EB。国内报道 EB 在慢性咳嗽的病因中占 4.9%~15.1%^[9-10]。在本文中亦有 20% 慢性咳嗽患者 EOS $\geq 3\%$ 。但本文中慢性咳嗽患者大多是选择性病例,即经过支气管激发试验检查,排除慢性咳嗽病因后,才进行的诱导排痰检查,所以,不能说明 EB 有如此高的比例。慢性咳嗽患者诱导排痰中 EOS 增多,还应注意与咳嗽变异性哮喘(CVA)鉴别,鉴别方法即进行支气管激发试验,阳性应排除 EB,可考虑为 CVA。

诱导排痰 EOS 是哮喘气道炎症的重要生物学标志物之一, Little 等^[11]认为利用诱导排痰 EOS 评价 ICS 治疗哮喘疗效优于一氧化氮合酶(NOS)和外周血嗜酸性粒细胞颗粒蛋白(ECP)。本文中超过 80% 哮喘患者存在 EOS 增多。通常哮喘患者对激素的治疗反应良好,经激素治疗后体内 EOS 可显著减少,甚至完全消失。诱导排痰 EOS 检测可以监测气道炎症,对哮喘的治疗有重要的指导意义。但本文没有进一步观察诱导排痰 EOS 数量对吸入激素的治疗反应。如果经适当剂量的吸入激素治疗,哮喘患者仍然存在诱导排痰 EOS 增多,提示这

部分患者可能为“激素抵抗性哮喘”。本文收集的哮喘患者中近 20% 的患者存在诱导排痰中 NEU 增多,提示可能为中性粒细胞哮喘。中性粒细胞哮喘多见于重症哮喘,但是哮喘 NEU 增多的机制并未阐明。Wenzel^[12]认为可能与吸烟、肥胖、病毒感染以及大剂量激素治疗等有关。

本文也证实了 COPD 患者诱导排痰中均以 NEU 为主,说明了 NEU 在 COPD 气道炎症中起十分重要的作用。但本文报道的 NEU 所占比例平均为 58%,与国外报道 NEU 在诱导排痰中占 70% 以上有差异^[13],这可能与本研究收集资料时患者治疗状况不一致有关。同时,本文还发现 29.4% COPD 患者存在 EOS 增多($> 1\%$),这在 Gorska 等^[14]的研究中也有同样的报道。资料显示这类患者对激素治疗反应性较好,且可以降低 COPD 急性加重的发生^[15]。故诱导排痰 EOS 检测对 COPD 的治疗也有重要的指导意义。鉴于哮喘中一部分患者以诱导排痰 NEU 升高为主,而一部分 COPD 患者诱导排痰中出现了 EOS 增加,两类病种炎症细胞成分一致,于是有人提出哮喘和 COPD 炎症都可归结为一种慢性非特异性肺疾病(CNSLD)的概念,但其具体发生机制还待进一步研究^[16]。

参考文献:

[1] Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2002, 360(14): 1715-1717.

[2] Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(6): 1001-1004.

[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(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): 177-179.

[4] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(3): 453-456.

[5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(3): 407-409.

[6] Bacci E, Cianchetti S, Bartoli M, et al. Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients[J]. CHEST, 2006, 129(4): 565-567.

[7] Christopher E, Brightling. Clinical Applications of Induced sputum[J]. CHEST, 2006, 129(11): 1344-1346.

[8] Jodie LS, Rodney S, Michael JB, et al. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum[J]. Respirology, 2006, 11(1): 54-56.

[9] 马洪明, 朱礼星, 赖克方, 等. 不明原因慢性咳嗽的诊断探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(5): 675-677.

[10] 刘国梁, 林江涛. 不明原因慢性咳嗽的病因构成和临床特征分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(3): 422-424.

[11] Little SA, Chalmers GW, MacLeod KJ, et al. Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma[J]. Thorax, 2000, 55(2): 232-234.

[12] Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes[J]. Lancet, 2006, 368(7): 804-806. (下转第 18 页)

体 pCDNA3 上,经酶切鉴定及测序鉴定,证实 pCDNA3-FLAG-HPIP 质粒构建成功。然后再把构建好的质粒转染到 293T 细胞,FLAG 抗体进行蛋白质印迹检测,证实这个质粒可以在哺乳动物细胞中表达,可进行进一步的功能研究。功能研究以含有雌激素应答元件(estrogen response element,ERE)调控的荧光素酶为报告基因(ERE-luc),HPIP 和 ER 的表达质粒共转染至 293T 细胞,通过检测荧光素酶活性,反映 HPIP 对 ER 转录活性的影响。结果表明,HPIP 能降低 ER 的转录活性,而且这种抑制作用在激素存在时更显著,但是雌激素受体抑制剂存在时,HPIP 反而增强 ER 的转录活性;HPIP 通过与 ER 相互作用而改变 ER 的转录活性,是 ER 信号途径中的新型调节因子,而雌激素受体抑制剂对转录活性不仅不降低,反而增加。

细胞免疫荧光化学分析 HPIP 的表达质粒转染至 MCF-7 细胞,荧光显微镜下观察,该蛋白定位于细胞质内,与目前资料报道的一致;HPIP 和不同 ER 结构域的表达质粒共转染至酵母细胞,结构域定位实验发现特异的与 ER β 的 AF2 结合,与 ER β 的 AF1/DBD 不结合,表明 HPIP 与 ER β 结构域结合具有特异性。由于 PBX 和 ER 分别位于两个不同的信号途径,PBX 调节胚胎期原始造血干细胞分化,ER 维持乳腺上皮细胞正常生长发育,二者之间可能的联络(cross-talk)具体通过什么机制有待于深入的探索。此外,据报道 PBX 在胚胎形成期与多种器官的形成有关,而 ER 在心血管系统和中枢神经系统中也存在表达,提示 PBX 与 ER 的相互作用在以上生命过程中也可能发挥重要作用。总之,尽管在一定程度上表明了 HPIP 可以影响 ER 的转录活性,在乳腺癌的发展过程中可能发挥重要的作用,但是还有许多问题尚未得到解决,需要更多或更深入的分子生物学研究来阐明。

参考文献:

- [1] Chen XN, Zhu H, Meng QY, et al. Estrogen receptor- α and - β regulate the human corticotropin-releasing hormone gene through similar pathways[J]. Brain Res, 2008, 5(1): 1-10.
- [2] Marik R, Allu M, Anchoori R, et al. Potent genistein derivatives as inhibitors of estrogen receptor α -positive breast cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 15(1): 10-13.
- [3] Saji S, Jensen EV, Nilsson S, et al. Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(3): 337-342.
- [4] Hahm ER, Lee J, Huang Y, et al. Withaferin a suppresses estrogen receptor- α expression in human breast cancer cells[J]. Mol Carcinog, 2011, 22(10): 1000-1002.
- [5] Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer[J]. N Engl J Med, 2006, 354(3): 270-282.
- [6] Flynn JM, Dimitrijevic SD, Younes M, et al. Role of wild-type estrogen receptor- β in mitochondrial cytoprotection of cultured normal male and female human lens epithelial cells[J]. Physiol Endocrinol Metab, 2008, 295(3): 637-647.
- [7] Palmieri C, Saji S, Sakaguchi H. The expression of oestrogen receptor (ER)- β and its variants, but not ER α , in adult human mammary fibroblasts[J]. Mol Endocrinol, 2004, 33(1): 35-50.
- [8] Wu X, Subramaniam M, Grygo SB, et al. Estrogen receptor- β sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(1): 27-29.
- [9] Mc Cormack O, Chung WY, Fitzpatrick P, et al. Progesterone receptor B (PRB) promoter hypermethylation in sporadic breast cancer: progesterone receptor B hypermethylation in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Tr, 2008, 111(1): 45-53.
- [10] Abramovich C, Shen WF, Pineault N, et al. Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA[J]. Biol Chem, 2002, 21(44): 6766-6771.
- [11] Abramovich C, Chavez EA, Lansdorp PM, et al. Functional characterization of multiple domains involved in the subcellular localization of the hematopoietic Pbx interacting protein (HPIP)[J]. Oncogene, 2002, 21(44): 6766-6771.
- [12] Abramovich C, Shen WF, Pineault N, et al. Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA[J]. Biol Chem, 2000, 275(3): 361-364.
- [13] DiMartino JF, Selleri L, Traver D, et al. The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver[J]. Blood, 2001, 98(4): 618-626.
- [14] Wang X, Yang Z, Zhang H, et al. The estrogen receptor-interacting protein HPIP increases estrogen-responsive gene expression through activation of MAPK and AKT[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 17(6): 1220-1228.
- [15] Siva R, Green RH, Brightling CE, et al. Modulation of eosinophilic inflammation in COPD[J]. Eur Respir J, 2005, 26(4): 441-445.
- [16] Postma DS, Boezen HM. Rationale for the dutch hypothesis. Allergy and airway hyperresponsiveness as genetic factors and their interaction with environment in the development of asthma and COPD[J]. Chest, 2004, 126(1): 96-98.

(收稿日期: 2011-06-18 修回日期: 2011-08-15)

(上接第 15 页)

- [13] Sozańska E, Barczyk A, Marta BM, et al. The usefulness of induced sputum examination in the diagnostic evaluation of selected chronic inflammatory diseases of the respiratory tract[J]. Pneumonol Alergol Pol, 2009, 77(2): 349-351.
- [14] Gorska K, Krenke R, Korczynski P, et al. Eosinophilic airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(2): 261-263.

(收稿日期: 2011-06-20 修回日期: 2011-08-15)