

哮喘儿童支气管肺泡灌洗液中几丁质酶和真菌特异性抗体的检测水平及意义

韩小胜, 黄 会, 魏小斌

(海南省海口市人民医院检验科 570208)

[摘要] **目的** 探究哮喘患儿支气管肺泡灌洗液(BALF)中几丁质酶(AMcase)和真菌特异性抗体的表达及意义。**方法** 收集 2015 年 7 月至 2016 年 11 月该院收治的 96 例支气管哮喘患儿作为研究对象,分为轻度组(54 例)、中度组(26 例)、重度组(16 例),另选取 30 例支气管异物患儿作为对照组,收集 BALF,对细胞进行计数、分类;酶联免疫法测定 BALF 上清液中特异性免疫球蛋白 E(IgE)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 G(IgG)含量;反转录 PCR 检测 BALF 中 AMcase mRNA 表达;Western blot 检测 BALF 中 AMcase 蛋白表达。**结果** 哮喘患儿中性粒细胞比例、巨噬细胞比例、嗜酸性粒细胞比例升高,淋巴细胞比例降低,青霉菌、曲霉菌、链格孢、白色念珠菌中特异性 IgE 升高,IgA、IgG 降低,BALF 上清液 AMcase 升高,均与患儿病情程度有关($P < 0.05$)。**结论** BALF 中 AMcase、真菌特异性 IgE、IgA、IgG 水平与患儿哮喘病情严重程度相关,可能参与哮喘病理过程。

[关键词] 支气管肺泡灌洗液;哮喘;酸性哺乳动物几丁质酶;真菌特异性抗体

[中图法分类号] R765.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)01-0094-04

Detections and significances of chitinase and fungal specific antibodies in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic children

HAN Xiaosheng, HUANG Hui, WEI Xiaobin

(Department of Clinical Laboratory, Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expressions and significances of chitinase and fungal specific antibodies in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from asthmatic children. **Methods** Asthmatic children were divided into the mild group (54 cases), the moderate group (26 cases), the severe group (16 cases). 30 bronchial foreign-matter were involved as a control group. The BALF was collected, and the cells were counted and classified. The contents of specific immunoglobulin E (IgE), immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin G (IgG) in BALF were determined by ELISA. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of AMcase in BALF. **Results** The proportion of neutrophils, macrophage and eosinophil increased, and the proportion of lymphocytes decreased in children with asthma. The specific IgE in penicillium, aspergillus, chromophore and candida albicans increased. IgA, IgG decreased and AMcase in BALF increased which were related to the condition degree ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of AMcase, fungal specific IgE, IgA and IgG in BALF were correlated with the severity of asthma which may be involved in the pathological process.

[Key words] bronchoalveolar lavage fluid; asthma; acid mammalian chitinase; fungal specific antibody

儿童哮喘近年来发病率逐渐上升,严重影响其生长发育及身心健康^[1]。目前较多文献报道哮喘的发病与外界环境中的过敏原如尘螨、真菌等密切相关^[2],此外酸性哺乳动物几丁质酶(acid mammals chitinase, AMcase)引发的炎症反应与哮喘的发生也有关系^[3-4],但目前真菌特异抗体及 AMcase 是否参与哮喘疾病发展的报道不多。本研究通过收集本院哮喘患儿支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),对其中 AMcase 和真菌特异性抗体进行检测,探究 AMcase、真菌特异性抗体与哮喘严重程度的关系,为治疗儿童型哮喘提供一定的参考,现报

道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 7 月至 2016 年 11 月本院收治的 96 例支气管哮喘患儿作为研究对象,其中男 57 例,女 39 例,年龄 2~12 岁,平均(5.84±2.57)岁,符合儿科哮喘防治协会规定的哮喘诊断标准,根据全球哮喘防治策略(GINA)分级标准^[5]将患儿分为轻度组(54 例)、中度组(26 例)、重度组(16 例),另选取同期经纤维支气管镜为支气管异物儿童 30 例作为对照组,其中男 18 例,女 12 例,年龄 1~11 岁,平均(5.65±2.38)岁,两组性别、年龄比较,差异无统计学

表 1 各组患儿临床指标比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	中性粒细胞	巨噬细胞	淋巴细胞	嗜酸性粒细胞
对照组	30	4.29±2.16	43.12±13.64	18.82±4.64	0.54±0.46
轻度组	54	17.49±8.68 ^a	54.09±18.47 ^a	15.64±3.12 ^a	0.86±0.52 ^a
中度组	26	22.53±13.67 ^{ab}	63.28±21.46 ^{ab}	13.28±2.76 ^{ab}	1.12±1.08 ^{ab}
重度组	16	32.64±17.41 ^{abc}	77.38±25.67 ^{abc}	11.74±3.24 ^{abc}	1.17±0.96 ^{abc}
F		29.116	13.882	20.358	13.985
P		0.000	0.000	0.040	0.049

^a: P<0.05, 与对照组比较; ^b: P<0.05, 与轻度组比较; ^c: P<0.05, 与中度组比较

意义(P>0.05), 具有可比性。纳入标准: (1) 入选患儿均符合儿科哮喘防治协会规定的哮喘诊断标准^[6]; (2) 年龄小于或等于 12 岁; (3) 患儿家属知情同意。排除标准: (1) 个人或家族具有哮喘病史; (2) 喉软化及支气管狭窄等先天因素导致; (3) 心、肝、血液等系统慢性病症; (4) 合并慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、呼吸衰竭等肺部疾病者; (5) 不能配合完成检测者。

1.2 方法

1.2.1 BALF 收集 所有哮喘患儿取左肺舌叶病变部位支气管肺段灌洗, 对照组取病灶对侧肺段灌洗, 采用 37 °C 消毒生理盐水灌洗, 使用量为 150 mL, 浓度为 0.5 mL/kg, 使用回收率超过 60%, 过滤 BALF 离心后保留上清液放置 -20 °C 中保存, 下层细胞采用血细胞计数器测定细胞总数, 选取 200 个细胞进行细胞分类统计。

1.2.2 酶联免疫法测定 BALF 上清液中免疫球蛋白 E(IgE)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 G(IgG) 含量 参照相关文献结合本地空气中较多真菌类型, 对 BALF 上清液进行真菌特异性抗体水平测定, IgE 酶联免疫试剂盒购于美国 R&D 公司, IgA、IgG 酶联免疫试剂盒购于美国 RayBiotech 公司, 参照试剂盒进行操作。

1.2.3 反转录 PCR 测定 BALF 上清液中 AMcase mRNA 表达 采用 RNA 提取试剂盒(Takara 公司) 提取 BALF 上清液中 RNA 进行提取, 反转录为 cDNA。反应体系: 10×cDNA 模板 1.0 μL, 上下游引物各 0.5 μL, H₂O 8.0 μL, 2×SYBR Mix 10.0 μL。按照反应程序 95 °C 3 min, 94 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 2 min, 30 个循环, 72 °C 10 min。利用 CFX manager 3.0 软件进行 Cq 值分析, 按照 2^{-ΔΔCq} 算法进行定量表达分析。

1.2.4 Western blot 检测 BALF 中 AMcase 表达 在 BALF 上清液中加入蛋白裂解液在冰上进行 30 min 裂解反应, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳结束后在聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上行转膜反应, TBST 溶液清洗后, 加入 5% 脱脂牛奶封闭后, 加入 AMcase 一抗稀释液(美国 R&D 公司), 4 °C 振荡过夜, 加入二抗稀释液(美国 R&D 公司), 室温下孵育 2 h, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗后用凝胶成

像仪对蛋白表达结果进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 计数资料以百分率表示, 比较采用 χ^2 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

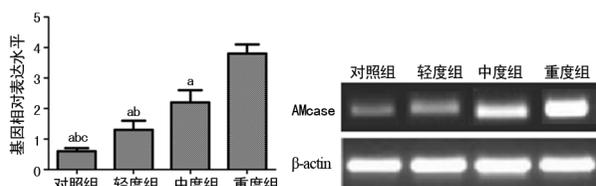
2.1 各组研究对象临床指标对比 不同程度哮喘患儿中性粒细胞比例、巨噬细胞比例、嗜酸性粒细胞比例均高于对照组, 淋巴细胞比例低于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表 1。

2.2 BALF 上清液中真菌感染及特异性 IgE、IgA、IgG 含量 哮喘患儿真菌感染主要为青霉菌、曲霉菌、链孢孢和白色念珠菌。不同程度哮喘患儿 BALF 上清液中特异性 IgE 水平均高于对照组, 特异性 IgA、IgG 均低于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表 2~5。

表 2 各组感染真菌情况(n)

组别	真菌类型			
	青霉菌	曲霉菌	链孢孢	白色念珠菌
对照组	1	1	1	1
轻度组	3	4	2	1
中度组	5	3	2	4
重度组	6	3	1	4
χ^2	0.653	1.318	1.225	1.404
P	0.884	0.725	0.747	0.705

2.3 反转录 PCR 法测定 BALF 上清液中 AMcase mRNA 表达 不同程度哮喘患儿 BALF 上清液 AMcase mRNA 表达水平均高于对照组, AMcase mRNA 表达水平逐渐升高, 差异有统计学意义(P<0.05), 见图 1。



^a: P<0.05, 与重度组比较; ^b: P<0.05, 与中度组比较; ^c: P<0.05, 与轻度组比较

图 1 BALF 上清液中 AMcase mRNA 表达情况

表 3 BALF 上清液中真菌特异性 IgE 水平($\bar{x}\pm s, KU/L$)

组别	n	真菌类型			
		青霉菌	曲霉菌	链格孢	白色念珠菌
对照组	30	0.05±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
轻度组	54	0.09±0.04	0.18±0.12 ^a	0.05±0.02 ^a	0.04±0.02 ^a
中度组	26	0.11±0.05 ^a	0.39±0.12 ^{ab}	0.08±0.07 ^a	0.09±0.06 ^{ab}
重度组	16	0.17±0.04 ^{abc}	1.41±0.64 ^{abc}	0.11±0.06 ^{ab}	0.12±0.08 ^{ab}
F		13.060	37.016	6.180	39.310
P		0.000	0.000	0.000	0.000

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与轻度组比较; ^c: $P < 0.05$, 与中度组比较

表 4 BALF 上清液中真菌特异性 IgA 水平($\bar{x}\pm s, KU/L$)

组别	n	真菌类型			
		青霉菌	曲霉菌	链格孢	白色念珠菌
对照组	30	0.05±0.03	0.05±0.03	0.03±0.02	0.03±0.02
轻度组	54	0.02±0.01 ^a	0.03±0.02	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
中度组	26	0.02±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
重度组	16	0.01±0.01 ^{abc}	0.01±0.01 ^{abc}	0.00±0.00 ^{abc}	0.01±0.00 ^{ab}
F		10.196	8.322	10.857	5.393
P		0.000	0.000	0.000	0.000

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与轻度组比较; ^c: $P < 0.05$, 与中度组比较

表 5 BALF 上清液中真菌特异性 IgG 水平($\bar{x}\pm s, KU/L$)

组别	n	真菌类型			
		青霉菌	曲霉菌	链格孢	白色念珠菌
对照组	30	0.07±0.04	0.12±0.06	0.06±0.03	0.03±0.02
轻度组	54	0.06±0.03	0.08±0.06	0.04±0.03	0.02±0.01
中度组	26	0.04±0.02	0.05±0.03 ^a	0.02±0.01 ^b	0.01±0.00 ^{ab}
重度组	16	0.02±0.01 ^{abc}	0.02±0.01 ^{abc}	0.00±0.00 ^{abc}	0.00±0.00 ^{ab}
F		8.594	9.149	16.590	23.897
P		0.000	0.000	0.000	0.000

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与轻度组比较; ^c: $P < 0.05$, 与中度组比较

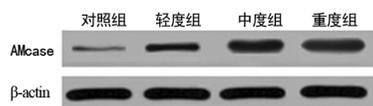


图 2 BALF 中 AMcase 蛋白的表达

表 6 BALF 中 AMcase 蛋白扫描灰度值($\bar{x}\pm s$)

组别	n	AMcase 蛋白
对照组	30	0.24±0.13
轻度组	54	0.52±0.31 ^a
中度组	26	0.82±0.47 ^{ab}
重度组	16	1.22±0.75 ^{abc}
F		24.221
P		0.000

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与轻度组比较; ^c: $P < 0.05$, 与中度组比较

2.4 Western blot 检测 BALF 中 AMcase 蛋白表达 与对照组比较, 不同程度哮喘患儿 BALF 中 AMcase 蛋白表达逐渐升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 2、表 6。

3 讨论

支气管哮喘临床特征主要表现为反复性喘息、胸闷、呼吸困难且在清晨或夜间症状加剧^[7]。过敏原广泛存在空气中并在哮喘的发病中起着关键性作用, 暴露在空气中的真菌孢子是哮喘患者重要的过敏原^[8]。此外 AMcase 是引发哮喘的重要介质, 尤其是病情严重的哮喘, 本研究通过检测不同程度哮喘患儿 BALF 中 AMcase 及真菌特异性抗体, 进而探究哮喘发病机理。

以往研究认为哮喘主要病理特征为嗜酸性粒细胞浸润^[9-10], 动物研究结果显示在小鼠 BALF 中嗜酸

性粒细胞高达 70%，而中性粒细胞比例较低^[11]。有研究发现在轻度、中度患者中以嗜酸性粒细胞浸润为主，而重度哮喘患者中性粒细胞比例明显增加，且与病情严重程度呈正相关^[12]。本研究结果显示哮喘患儿中，中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞比例随着病情程度的加重逐渐升高，淋巴细胞比例逐渐降低，表明中性粒细胞水平升高可能是导致哮喘的主要因素。

真菌在周围空气中较常见，如青霉菌、曲霉菌、草分支孢子菌等，进入气道后定植，刺激机体产生毒素及酶辅助炎症反应^[13]。国外研究显示草分支孢子菌致敏率的增加，患者哮喘加重^[14]。此外研究显示在 ICU 的哮喘患者中，草分支孢子菌、青霉菌等真菌致敏患者超过 50%，且与患者哮喘程度呈正相关^[15]。本研究结果显示青霉菌、曲霉菌、链格孢、白色念珠菌特异性抗体随着病情加重，IgE 水平逐渐升高，IgA、IgG 水平逐渐降低，与邹晖等^[16]研究相符，表明真菌特异性 IgE 与哮喘患儿病情有关，可能作为评估哮喘病情的指标。

AMcase 为哺乳动物体内几丁质酶，可通过影响辅助 T 细胞 2(Th2) 炎症因子的表达参与哮喘的发病^[17]。微生物研究证实 AMcase 能够水解真菌细胞壁的重要组成成分-几丁质，对于真菌具有较好的抗菌性^[19]。BIRBEN 等^[20]研究证实机体受到含有几丁质病原菌刺激会后机体内 AMcase 水平明显升高，进一步诱发 EOS 聚集反应，在哮喘等过敏性疾病中发挥重要作用。本研究结果显示随着哮喘病情程度的加重，BALF 中 AMcase 表达逐渐升高，表明在受到过敏原刺激后 AMcase 表达水平逐渐升高，进而导致疾病程度加重，可能作为哮喘病情的指标。

总之，哮喘患儿 BALF 中 AMcase、真菌特异性抗体水平与病情严重程度相关，可作为评估哮喘病情的指标，为临床治疗哮喘提供一定的参考。本研究也存在一定的局限性，样本量较小，未对空气中其他过敏原进行检测使结论受到一定限制，后续应深入研究。

参考文献

- [1] 王强,徐春雨,徐东群,等.中国城市儿童哮喘危险因素分析[J].中华流行病学杂志,2014,35(3):237-241.
- [2] 邸沂遥,关继涛,阎锡新.生活环境中主要空气污染物浓度与哮喘患者肺功能、呼出气一氧化氮和血清 IgE 水平的关系[J].山东医药,2017,57(11):84-87.
- [3] 陈敏,钟雨,赖天文,等.几丁质酶基因 rs10494132T/C 多态性与支气管哮喘的相关性研究[J].广东医学院学报,2013,31(4):361-363.
- [4] AHANGARI FARIDA, SOOD A, MA B, et al. Chitinase 3-like-1 regulates both visceral fat accumulation and asthma-like Th2 inflammation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(7): 746-757.

- [5] HORAK F, DOBERER D, EBER E, et al. Diagnosis and management of asthma-statement on the 2015 GINA Guidelines [J]. Wien Klin Wochenschr, 2016, 128(15): 541-554.
- [6] 陈育智. 儿童支气管哮喘的诊断及治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [7] 李学良, 许朝霞, 王忆勤. 支气管哮喘发病机制的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(9): 1960-1963.
- [8] 乔雅楠, 张睢扬, 李波. 重症支气管哮喘与真菌研究进展 [J/OL]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2014, 7(2): 92-94.
- [9] 庞新举, 王秋萍, 程友, 等. 中重度持续性变应性鼻炎患者气道嗜酸性粒细胞数量的研究 [J]. 医学研究生学报, 2013, 26(4): 367-369.
- [10] IMAEDA H, YAMAOKA M, YONENO K, et al. Tu1116 e- eosinophilic infiltration in the upper gastrointestinal tract in patients with bronchial asthma [J]. Gastroenterology, 2015, 148(4): 791-797.
- [11] 史海广, 杨学敏, 成家军, 等. 白细胞介素-13 可溶性受体对支气管哮喘小鼠嗜酸粒细胞凋亡的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(1): 66-68.
- [12] 高瞻, 杨旭, 刘禹, 等. 中性粒细胞性哮喘与稳定期 COPD 患者诱导痰中性粒细胞炎症程度比较的研究 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(5): 408-412.
- [13] 张平骥, 夏国光, 戴丽, 等. 真菌感染致严重支气管哮喘 3 例报道 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(10): 2403-2405.
- [14] JARIWALA S, TOH J, SHUM M, et al. The association between asthma-related emergency department visits and pollen and mold spore concentrations in the Bronx, 2001-2008 [J]. J Asthma, 2014, 51(1): 79-83.
- [15] BLACK P N, UDY A A, BRODIE S M. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma [J]. Allergy, 2000, 55(5): 501-504.
- [16] 邹晖, 苏磊, 方秋红, 等. 真菌特异性 IgE 与支气管哮喘严重程度 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2013, 20(3): 133-136.
- [17] 黄乾生, 谢晓兰, 陈清西. 几丁质酶的结构特征与功能 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(z2): 232-235.
- [18] KANOKWAN L, PIYANAT M, SUNISA T, et al. Human acidic mammalian chitinase (AMCase); molecular cloning, protein expression, and production of monoclonal antibody; 15th International Congress of Immunology, 2013 [C]. Milan: Front Immunol, 2013.
- [19] 张宇, 贺丹, 周鑫, 等. 产几丁质酶真菌菌株的筛选及产酶抑菌活性的检测 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2010, 36(1): 67-70.
- [20] BIRBEN E, SACKESSEN C, KAZANI S, et al. The effects of an insertion in the 5' UTR of the AMCase on gene expression and pulmonary functions [J]. Respir Med, 2011, 105(8): 1160-1169.