文章编号:1000-5404(2010)21-2329-04

论著

PDGF、foxp3和MMP-9与哮喘气道重塑的关系研究

杜建新[1],蒋悍东[1],杜春华[1],成 炜[1],王丽娜[1],郭成浩[2] (266001 山东 青岛,青岛大学医学院附属医院呼吸内科[1];250012 济南,山东大学医学院病理学与病理生理学研究所[2])

【摘要】 目的 探讨PDGF、foxp3和MMP-9与哮喘气道重塑的关系。方法 采用双抗体夹心ELISA法检测40例哮喘患者治疗前后及30例健康查体者血清PDGF、foxp3和MMP-9,高分辨率CT(high resolution computed tomography,HRCT)行胸部检测。结果 哮喘组血清中PDGF和MMP-9水平比健康对照组明显升高($P<0.05$),而foxp3明显降低($P<0.01$)。与治疗前相比哮喘组PDGF($P<0.05$)和MMP-9水平明显降低($P<0.01$),但仍高于对照组;foxp3与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。HRCT结果显示,与对照组相比,哮喘组小支气管内径狭窄;小支气管内面积明显变小($P<0.05$);小支气管外径无明显差异。治疗后小支气管管腔有明显扩张,面积明显增加($P<0.01$);治疗前后小支气管对比外径无明显变化。结论 哮喘患者有PDGF-foxp3和MMP-9的环路存在,综合治疗可以逆转气道重塑。

【关键词】 哮喘;调节性T细胞;血小板衍生生长因子;foxp3;MMP-9
【中图法分类号】 R322.33;R392.3;R562.25 【文献标志码】 A

Relation between platelet-derived growth factor, foxp3, MMP-9 and airway remodeling due to asthma

Du Jianxin[1], Jiang Handong[1], Du Chunhua[1], Cheng Wei[1], Wang Lina[1], Guo Chenghao[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong Province, 266001; [2]Institute of Pathology and Pathophysiology, Medical College, Shandong University, Jinan, Shandong Province, 250012, China)

【Abstract】 Objective To study the relation between platelet-derived growth factor (PDGF), foxp3, MMP-9 and airway remodeling due to asthma. Methods Serum PDGF, foxp3 and MMP-9 levels were measured in 40 patients with bronchial asthma (BA) and in 30 healthy controls before and after treatment by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Chest was detected by high resolution computed tomography (HRCT). Results The serum PDGF and MMP-9 levels were significantly higher while the serum foxp3 level was significantly lower in asthma patients than in healthy controls ($P<0.05$). Although the serum PDGF and MMP-9 levels were significantly decreased in asthma patients after treatment, they were still higher than those in healthy controls ($P<0.05$). HRCT showed that the inner diameter and area of bronchus were significantly smaller in asthma patients than in healthy controls ($P<0.05$) with no significant difference in outer diameter of bronchus. The inner diameter of bronchus was remarkably dilated with its area notably increased with no significant difference in its outer diameter after treatment ($P<0.01$). Conclusion There is a ring of PDGF, foxp3 and MMP-9 in asthma patients. Combined treatment can reverse the airway remodeling due to asthma.

【Key words】 asthma; regulatory T cell; platelet-derived growth factor; foxp3; MMP-9

Supported by the Project of Qingdao Bureau of Science and Technology (06-2-2-3-nsh-5). Corresponding author: Guo Chenghao, E-mail: chenghaoguo@sdu.edu.cn

支气管哮喘患者表现出的不可逆性气流阻塞和持续性气道高反应性,与气道重塑有关,包括气道平滑肌细胞的增生肥大、基底膜增厚、血管生产、黏膜化生等,被认定为除气道慢性炎症外哮喘的又一重要特征[1]。哮喘气道重塑的特征性改变包括发生在疾病早期的网状基底膜增厚、构成气流阻塞的重要原因组织间隙基质沉积、代表结构和(或)功能的改变的气道血管生成/血管重构[2,3]、气道平滑肌增生、肥大及黏液腺增生和黏液性化生等病理改变。本研究我们将哮喘的支气管组

【基金项目】 青岛市科技局项目(06-2-2-3-nsh-5)
【通信作者】 郭成浩,E-mail:chenghaoguo@sdu.edu.cn

织重构分解成细胞因子启动阶段、免疫细胞失衡阶段、间质细胞重构阶段3个过程，采用多学科检测手段，观察患者经系统治疗后，血清中血小板源生长因子(platelet-derived growth factor，PDGF)、foxp3和MMP-9水平及高分辨率CT(high resolution computed tomography，HRCT)的影像学改变，以探讨其相互联系。

1 资料与方法

1.1 患者诊断及入组标准

支气管哮喘诊断标准(2003年，支气管哮喘防治指南)[4]：①反复发作喘息、气急、胸闷或咳嗽，多与接触变应原、冷空气、物理、化学性刺激、病毒性上呼吸道感染、运动等有关。②发作时在双肺可闻及散在或弥漫性、以呼气相为主的哮鸣音，呼气相延长。③上述症状可经治疗缓解或自行缓解。④除外其他疾病所引起的喘息、气急、胸闷、和咳嗽。⑤临床表现不典型者(如无明显喘息或体征)应至少具备以下1项试验阳性：支气管激发试验或运动试验阳性；支气管舒张试验阳性[1 s用力呼气容积(FEV1)增加12%以上，且FEV1增加绝对值>200 ml]；最大呼气流量(PEF)日内变异率或昼夜波动率≥20%。符合①、④条或④、⑤条者，可以诊断为支气管哮喘。

1.2 试验分组

哮喘组：收集青岛大学附属医院呼吸内科2006年9月至2008年11月门诊就诊的哮喘患者(慢性持续期)共40例。其中男性18例，女性22例；年龄33～68岁(平均48.5岁)。均符合哮喘的慢性持续期诊断标准。其中有哮喘家族史5例，季节性哮喘发作3例，皮肤过敏原试验阳性15例。近2周未服用激素及抗组胺药物。HRCT检查有异常者入组。上述患者全部选用激素联合肾上腺素受体激动剂(沙美特罗替卡松粉吸入剂，英国葛兰素生产)吸入治疗6个月，联合使用免疫调节剂乌体林斯(草分枝杆菌，中德合资成都金星健康药业有限公司生产)，1.72 μg肌肉注射，每周1次，共24周。

对照组：以在青岛大学附属医院查体中心的正常健康查体者30例作为健康对照组。其中男性14例，女性16例；年龄29～62岁(平均46.5岁)。均无湿疹、过敏性鼻炎及其他过敏疾病史。1个月内无上呼吸道感染，亦无抗组胺药及肾上腺皮质激素用药史。胸片无异常发现。各组患者试验前后留取血清待测。

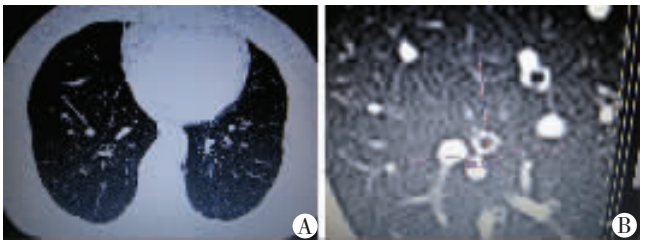
1.3 实验方法

1.3.1 标本处理　全血标本于1 000×g离心20 min，取上清检测。

1.3.2 标本检测　Foxp3、PDGF和MMP-9检测试剂为武汉中美科技有限公司提供。操作步骤严格按药盒所附说明书进行操作。30 min内用酶标仪在450 nm处测光密度值并得到相应光密度值对应的浓度(pg/L)。

1.3.3 HRCT观察小支气管气道面积和管壁厚度变化

HRCT条件：层厚2 mm，以气管隆突为解剖标志向下100 mm层面为对比层面，测定每位患者该层面上所有直径2～4 mm小支气管外径、内径，测量时将图像放大2倍后精确测定。首先用角度仪划一条圆外切线。从切点引垂线，找出直径进行内外径测量(图1)。



A：肺HRCT放大前；B：肺HRCT放大后

图1 HRCT观察小支气管气道面积和管壁厚度变化

1.4 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用完全随机设计多样本比较的秩和检验(H检验)，并进行各组间的两两比较，各指标间的相关性用Spearman's相关分析。采用SPSS 13.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 哮喘患者的PDGF、foxp3和MMP-9水平比较

治疗前哮喘组血清中PDGF和MMP-9水平明显高于健康对照组(PDGF：$P<0.05$，MMP-9：$P<0.01$)，而foxp3明显降低($P<0.01$)。哮喘组治疗后PDGF和MMP-9水平与治疗前相比明显降低，但仍高于对照组；foxp3明显低于对照组(表1)。

表1 哮喘组治疗前后与对照组血清PDGF、foxp3和MMP-9水平的比较(pg/L，$\bar{x}\pm s$)

组别	n	PDGF	foxp3	MMP-9
哮喘组				
治疗前	40	14.32±1.63	0.59±0.27	597.32±69.23
治疗后	40	12.51±1.24[b]	0.76±0.37[a]	120.13±20.27[ac]
对照组	30	12.08±1.36[b]	1.37±0.46[c]	67.78±12.37[c]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与哮喘组治疗前比较

2.2 PDGF、foxp3和MMP-9三指标间相关性分析

用Spearman's相关分析显示，PDGF与MMP-9两指标呈正相关性($r=0.910$，$P<0.01$)；foxp3与PDGF及MMP-9两指标呈负相关性($r=-0.805$，$P<0.01$；$r=-0.876$，$P<0.01$)。

2.3 HRCT观察哮喘患者支气管气道壁面积和厚度

与对照组相比，哮喘组小支气管内径狭窄；小支气管内面积较对照组明显变小($P<0.01$)；小支气管外径与对照组比较无明显差异。治疗后小支气管管腔有明显扩张，面积明显增加($P<0.05$)；治疗前后小支气管对比外径无明显变化(表2)。

表2 哮喘组治疗前后与对照组肺小支气管HRCT结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	外径(mm)	内径(mm)	面积(cm^2)
哮喘组				
治疗前	40	2.79±0.18	2.12±0.46	0.0090±0.0012[b]
治疗后	40	2.87±0.21	2.16±0.37	0.0110±0.0018[ac]
对照组	30	2.93±0.16	2.2 ±0.47	0.0190±0.0017

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与哮喘组治疗前比较

3 讨论

支气管哮喘(哮喘)是由嗜酸粒细胞、肥大细胞和T细胞等多种炎性细胞参与的气道慢性炎症性疾病,并伴有气道高反应性、可逆性气流受限及黏液高分泌。还可出现气道重塑,表现为气道壁增厚,气道平滑肌增生、肥厚,基底膜增厚,血管生成,黏膜化生等。许多哮喘患者都有残余的气流阻塞的表现,甚至出现在无症状患者中,提示气道重塑导致不可逆的气流阻塞和持续AHR,可能是难治性哮喘病理学基础[1,5]。气道重塑的特异改变包括发生在疾病早期的网状基底膜增厚、组织间隙基质沉积、气道血管生成/血管重构、气道平滑肌增生、肥大及黏液腺增生和黏液性化生等病理改变。哮喘气道重塑发生机制复杂,目前认为与上皮间质的相互作用导致胶原增多这一中心环节有关。

本研究发现哮喘组和正常对照组比较,血清中PDGF水平比健康对照组明显升高。治疗后PDGF与治疗前相比明显降低,但仍高于对照组。PDGF是哮喘中的重要因子,研究表明重症哮喘患者支气管活检组织表达血小板源生长因子B(PDGFB) mRNA显著高于轻症哮喘患者及健康对照组,且表达PDGF mRNA的细胞大部分是嗜酸粒细胞[6]。Obata等[7]发现PDGF作为刺激物可直接促进NF-κB的表达和活性增强,说明PDGF对NF-κB有诱导作用,且以PDGF-B诱导效应最强。有研究在鼠哮喘模型中采用PDGF-BB中和抗体可显著抑制气道壁增厚和乙酰胆碱激发的持续性气道高反应性,但不能抑制炎性反应,提示PDGF-B参与哮喘气道重塑[8]。研究发现,PDGF能刺激支气管中间型肌成纤维细胞产生FK506结合蛋白(该蛋白参与平滑肌的分化)、机动相关蛋白3(参与细胞骨架的重构)及热休克蛋白等,据此认为PDGF及其信号转导途径在哮喘气道平滑肌重塑及纤维化的过程中起到重要作用[9-11]。

人们逐渐发现调节性T淋巴细胞可能在哮喘中发挥不可忽视的重要作用。$CD4^+CD25^+$ T调节细胞($CD4^+CD25^+$ Treg)是1995年由Sakaguchi等[12]首次报道的具有调节作用的专职抑制细胞,具有免疫无能性和免疫抑制性两大特征。该细胞主要表达Foxp3(forkhead/winged helix transcription factor)等因子,Foxp3位于人染色体Xp 11.23,高度保守,均通过其Forkhead结构域与DNA特定位点结合调节目的基因的活化和表达,其在哮喘的研究已得到证实[13]。本研究发现哮喘患者血清中foxp3水平比健康对照组明显降低。治疗后foxp3水平与治疗前相比明显升高,但仍低于于对照组,说明其参与哮喘的发生。有学者利用用流式细胞术检测外周血单个核细胞(PBMC)CD4、CD25表面标志方法,观察20例哮喘患儿及相同数量同龄对照组,发现哮喘患儿$CD4^+CD25^+$ Tr细胞明显降低可能参与哮喘发病,Foxp3及SOCS1表达降低可能是导致$CD4^+CD25^+$ Tr细胞发育障碍的重要因素[14],而乌体林斯(草分枝杆菌)能刺激T细胞释放多种细胞因子,增强T细胞活性。

气道重塑最主要的是影响胶原代谢的MMP代谢,所有的MMPs中,MMP-9和哮喘关系最大。本研究发现哮喘组血清中MMP-9水平比健康对照组明显升高,治疗组MMP-9水平明显降低,但仍高于对照组。MMP-9主要降解细胞外基质中的Ⅳ型胶原和Ⅴ型胶原与其特异性抑制因子金属蛋白酶组织抑制剂1保持平衡状态,当疾病打破这种平衡后,导致细胞外基质在气道壁沉积增多,引起气道重塑。由于MMP-9基因启动子的561~550区域存在NF-κB的结合位点。当NF-κB活化后,促进MMP-9转录,进而引起MMP-9表达的增加。糖皮质激素是治疗哮喘的有效药物,其部分机制就是抑制NF-κB的活化,导致NF-κB与MMP-9基因结合减少,引起MMP-9表达下降,进而能抑制气道重塑[15]。此外,MMP-9可通过诱导ICAM-1和血管细胞黏附分子1的表达,参与中性粒细胞、淋巴细胞以及嗜酸性粒细胞的迁移和渗出,后者可进一步产生多种细胞因子参与哮喘气道重塑。

近年来,HRCT因在肺部疾病的广泛应用,被提倡用来评价支气管哮喘和COPD的气道重塑。但由于没有具体的规范,所以选定的标准也不一致[16,17]。本研究对支气管哮喘患者和正常对照组的支气管壁厚度进行了对比分析,初步探讨支气管哮喘患者治疗前后气道重塑的差异,与对照组相比,哮喘组小支气管内径狭窄;小支气管内面积较对照组明显变小;小支气管外径无显著差异。治疗后小支气管管腔有明显扩张,面积明显增加;治疗前后小支气管对比外径无变化。均表明气道重塑是向心性的,向心性狭窄导致气流受限;持续吸入糖皮质激素、β2受体激动剂、肌注乌体林斯有逆转重构作用。同时临床检测PDGF、foxp3和MMP-9水平,有助于哮喘气道重塑的进程观察。

参考文献:

[1] Jeffery P K. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(10 Pt 2): S28-S38.
[2] Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects[J]. Thorax, 2001, 56(12): 902-906.

[3] Walsh D A, Pearson C I. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases[J]. Arthritis Res, 2001, 3(3): 147-153.
[4] 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)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(3): 132-138.
[5] 叶新民, 钟南山. 基质金属蛋白酶与支气管哮喘气道重塑[J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(11): 672-676.
[6] Malmastrom J, Tufvesson E, Lofdahl C G, *et al*. Activation of platelet-derived growth factor pathway in human asthmatic pulmonary-derived mesenchymal cells[J]. Electrophoresis, 2003, 24(1/2): 276-285.
[7] Obata H, Biro S, Arima N, *et al*. NF-kappa B is induced in the nuclei of cultured rat aortic smooth muscle cells by stimulation of various growth factors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224(1): 27-32.
[8] Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? [J]. Cell, 1997, 91(3): 299-302.
[9] Chetta A, Zanini A, Foresi A, *et al*. Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(5): 751-757.
[10] Wang X T, Uu P Y, Tang J B. PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-KappaB gene in signal pathways in ischemic flaps[J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(1): 129-137.
[11] 苏新明, 康健. 血小板源生长因子B及其受体β与支气管哮喘血管再生与重塑[J]. 中华哮喘杂志: 电子版, 2009, 3(3): 164-169.
[12] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al*. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
[13] Seroogy C M, Gern J E. The role of T regulatory cells in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116(5): 996-999.
[14] 祖莹, 李成荣, 郑跃杰, 等. CD4+CD25+调节性T细胞在儿童哮喘发病机制中的作用初探[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(1): 35-38.
[15] 吴斌, 戴元荣. 核因子-κB与哮喘气道重塑的研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(12): 885-887.
[16] 辛小燕, 贺文, 谭春婷. HRCT测量支气管哮喘的气道壁厚度与其病情严重度及肺功能的相关性研究[J]. 中国医学影像技术, 2006, 22(11): 1665-1667.
[17] 辛小燕, 贺文, 谭春婷. HRCT定量评价哮喘和COPD患者气道壁厚度差异的研究[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24(7): 1029-1032.

(收稿: 2010-07-14 修回: 2010-09-02)
(编辑 张 维)

(上接2317页)

2 讨论

DRD又称为伴有明显昼间波动的遗传性进行性肌张力障碍,1976年由日本Segawa等[1]首次报道。该病多为常染色体显性遗传,少数为常染色体隐性遗传,罕见散发。多由于GCH1基因异常影响四氢生物喋呤的合成,导致酪氨酸羟化酶活性下降,造成纹状体内多巴胺合成不足,出现肌张力障碍,帕金森综合征表现[2]。DRD患病率约为0.5/100万[3],发病年龄多在1~12岁,少数成年期发病。临床表现多样化,且与年龄密切相关[4]。综合其临床表现,有以下特点:①多于婴儿期或儿童期起病,女性多见。②早期以足部肌张力障碍起病。③症状有晨轻暮重的波动特点[5],此现象随年龄增长可消失。④20年内病情进展明显,之后相对稳定。⑤左旋多巴制剂治疗后症状迅速缓解并持续有效。诊断DRD主要根据病史、症状及体征,尤其是对小剂量多巴制剂具有显着疗效是临床诊断的要点[6]。用量一般为(62.5~187.5 mg/d)[7],起效时间多≤7 d[3],不会出现开关现象、药效减低等不良反应。该病应注意与遗传性痉挛性截瘫、脑性瘫痪、少年型帕金森病、肝豆状核变性、强直性肌营养不良、先天性肌强直等鉴别[7]。早期识别,早期接受治疗,患者可保持完全正常的生活质量,并可避免一定程度的残疾。本病例起病年龄、晨轻暮重的症状波动以及病情的年龄进展均与文献报道完全一致[7];但治疗上左旋多巴剂量达400 mg/d,并联合了安坦,10 d后方逐渐起效,在起效时间及药物剂量上均大于文献报道,可能与患者病程长,成年才接受治疗有关。但患者病程长达23年,目前仅残留双足内翻畸形、行走姿势异常,生活完全恢复了自理。证明对延迟至成年才就诊者,左旋多巴制剂联合安坦治疗效果依然显着。因而正确识别本病至关重要。

参考文献:

[1] Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, *et al*. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation[J]. Adv Neurol, 1976, 14: 215-233.
[2] Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, *et al*. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene[J]. Nat Genet, 1994, 8(3): 236-242.
[3] 宋军, 张华, 多巴反应性肌张力障碍的研究[J]. 医学综述, 2008, 14(7): 1066-1067.
[4] 王钰, 陈蕾, 张本恕. 多巴反应性肌张力障碍32例临床分析[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(1): 40-42.
[5] Nygaard T G. Dopa-responsive dystonia. Delineation of the clinical syndrome and clues to pathogenesis[J]. Adv Neurol, 1993, 60: 577-585.
[6] 袁学谦, 杨杰, 唐铁钰, 等. 多巴反应性肌张力障碍15例临床分析[J]. 中华神经医学杂志, 2005, 4(5): 491-492.
[7] 万新华, 汤晓芙, 李力波. 多巴反应性肌张力障碍的临床特点[J]. 临床神经病学杂志, 2005, 18(1): 51-53.

(收稿: 2010-08-09 修回: 2010-09-17)
(编辑 王 红)