论著

文章编号:1000-5404(2011)14-1526-04

支气管哮喘患者外周血、痰液中IL-33的含量及其相关性分析

麻晓燕,罗雅玲,赖文岩,邵金莲,蓝海兵,梁振宇 (510515 广州,南方医科大学附属南方医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 检测支气管哮喘患者外周血和痰液中IL-33的含量,探讨其含量与患者症状、肺功能、血液和痰液中嗜酸性粒细胞数的关系。**方法** ELISA法检测80例支气管哮喘患者及20例正常对照者外周血中IL-33的含量,对哮喘患者行24 h症状评分和肺功能测试,依据FEV_1将支气管哮喘患者分为3组:$FEV_1 \geqslant 80\%$为轻度哮喘组,$60\% \leqslant FEV_1 < 80\%$为中度哮喘组,$FEV_1 < 60\%$为重度哮喘组,并记录哮喘患者外周血中嗜酸性粒细胞数。ELISA法检测18例哮喘患者和8例正常对照者痰液中IL-33的含量,显微镜下计数其痰液中的嗜酸性粒细胞数。**结果** 外周血IL-33水平在正常对照组和轻度哮喘组之间无明显差异[(26.62±3.04) pg/ml *vs* (30.26±5.23) pg/ml, $P>0.05$],但中、重度哮喘组的IL-33的水平要明显高正常对照组[(41.36±11.82) pg/ml *vs* (26.62±3.04) pg/ml, (84.10±20.17) pg/ml *vs* (26.62±3.04) pg/ml, $P<0.05$],且与患者夜间症状评分呈正相关($r=0.317$, $P<0.05$),而与白天症状评分和外周血嗜酸性粒细胞数无明显相关($r=0.173$, $P>0.05$, $r=0.082$, $P>0.05$),与患者FEV_1和PEF均呈明显的负相关($r=-0.638$, $P<0.05$; $r=-0.552$, $P<0.05$)。支气管哮喘患者诱导痰中IL-33的含量与痰液中嗜酸性粒细胞数目呈正相关($r=0.693$, $P<0.05$)。**结论** 血液中的IL-33可作为一种评价哮喘患者肺功能下降程度的指标,是哮喘患者病情恶化的促进因子。IL-33水平增高可能是诱导哮喘患者气道嗜酸性粒细胞浸润的原因之一。

[关键词] 支气管哮喘;IL-33;外周血;痰;嗜酸性粒细胞

[中图法分类号] R562.25;R446.62 [文献标志码] A

IL-33 levels in peripheral blood plasma and sputum of patients with bronchial asthma and their correlation with symptoms of patients, pulmonary function, and eosinophil numbers

Ma Xiaoyan, Luo Yaling, Lai Wenyan, Shao Jinlian, Lan Haibing, Liang Zhenyu (Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To measure the IL-33 levels in the peripheral blood plasma and sputum of the patients with bronchial asthma, and to analyze their correlation with the symptoms of the patients, the pulmonary function and the eosinophil numbers in the peripheral blood and sputum. **Methods** Eighty patients with bronchial patients and twenty normal control subjects were enrolled in the study. The IL-33 levels in the peripheral blood plasma of the patients and normal control subjects were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The daytime and nighttime symptom scores of the patients were recorded, and the pulmonary function was tested. The patients were divided into a mild asthma group ($FEV_1 \geqslant 80\%$), a moderate asthma group ($60\% \leqslant FEV_1 < 80\%$) and a severe asthma group ($FEV_1 < 60\%$) according to their pulmonary function. The eosinophil numbers in the peripheral blood of the patients were recorded. Eighteen patients and eight normal control subjects were also subjected to ELISA to measure the IL-33 levels in the sputum. Their eosinophil numbers in the sputum were counted under a microscope. **Results** There was no significant difference of the IL-33 levels in the peripheral blood plasma between the control group and the mild asthma group (26.62±3.04 pg/ml *vs* 30.26±5.23 pg/ml, $P>0.05$). The IL-33 levels in the peripheral blood plasma of the moderate and severe asthma groups were significantly higher than those in the control group (41.36±11.82 pg/ml *vs*

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770936)

[通信作者] 罗雅玲, E-mail: luoyaling513@yahoo.com.cn

26.62 ± 3.04 pg/ml, 84.10 ± 20.17 pg/ml *vs* 26.62 ± 3.04 pg/ml, $P < 0.05$). The IL-33 levels in the peripheral blood plasma were positively correlated with the nighttime symptom scores ($r = 0.317$, $P < 0.05$), but not significantly correlated with the daytime symptom scores and the eosinophil numbers in the peripheral blood ($r = 0.173$, $P > 0.05$; $r = 0.082$, $P > 0.05$). The IL-33 levels in the peripheral blood plasma were significantly and negatively correlated with FEV_1 and expiratory peak flow (PEF) ($r = -0.638$, $P < 0.05$; $r = -0.552$, $P < 0.05$). The IL-33 levels in the sputum were positively correlated with the eosinophil numbers in sputum. **Conclusion** IL-33 in the peripheral blood plasma can be an indicator of the pulmonary function decline of the patients with bronchial asthma, and is a promoting factor in the deterioration of asthma. The IL-33 level increase may be a cause of airway eosinophil infiltration.

[**Key words**] bronchial asthma; IL-33; peripheral blood; sputum; eosinophilic granulocyte

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30770936). Corresponding author: LuoYaling, E-mail: luoyaling513@yahoo.com.cn

支气管哮喘是一种多种细胞和因子共同参与的气道炎症性疾病,在研究哮喘的发病过程中,众多学者对白介素家族表现出浓厚兴趣,白介素-33(interleukin-33,IL-33)是近年来发现的白细胞介素新成员,隶属于IL-1家族。研究表明其在自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎)、过敏反应性疾病(如哮喘)、心血管疾病(如心衰)、神经退化性疾病(如阿尔茨海默病)等疾病中作为一种炎症因子发挥作用[1]。IL-33可以通过细胞表面的模型受体ST2[2]及其相关信号转导蛋白Acp复合物[3],将活化信号传到细胞内,激活NF-κB和MAPK等[4],调节Th2细胞,诱导效应因子的表达[5],发挥免疫调节的功能。研究发现小鼠腹腔注射IL-33后发生脾脏肿大,血液嗜酸性粒细胞、单核细胞、浆细胞增加,IgE、IgA、IL-5及IL-13也升高[6]。也有研究证明,体内过多的IL-33可导致IL-33转基因小鼠发生肺部炎症,这些小鼠处死后气道病理发现有大量的嗜酸性粒细胞和单核细胞浸润,组织免疫印迹证实了大量IL-33的表达[7]。此外,IL-33的受体ST2被证明在嗜酸性粒细胞上有表达,IL-33是嗜酸性粒细胞表面受体ST2的强大刺激因子[8]。国外有学者研究结果显示IL-33在不同严重程度哮喘患者血中的表达程度和血液中的IgE成正相关[9]。但IL-33水平与患者第1秒用力呼气量(FEV_1)、呼气流量峰值(PEF)、临床症状、血液和痰液中嗜酸性粒细胞的关系如何,尚不清楚。本课题基于此进行了研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 主要试剂与仪器

IL-33 ELISA试剂盒(Biolegend公司,英国),肺功能仪(SN731963型,耶格公司,德国),血细胞分析仪(KX-21型,Sysmex公司,德国)。

1.2 对象

哮喘患者收集自2010年3-12月本科门诊初诊哮喘患者及正常志愿者共100例。其中哮喘患者80例,男性45例,女性35例,年龄16~72(40.6 ± 12.5)岁。所有病例符合中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的哮喘防治指南中规定的诊断标准[10]。排除具有咳嗽、喘息症状的疾病,如声带功能障碍、癔症、睡眠呼吸暂停、胃食管返流等,以及继发性哮喘,如阿司匹林哮喘、支气管肺曲霉病等。所有患者无溃疡性结肠炎、肾脏疾病、心血管疾病、类风湿性关节炎等疾病,X线胸片检查结果无异常。正常对照组20例,男性10例,女性10例,年龄24~72(38.9 ± 16.8)岁。哮喘组与正常对照组在性别、年龄、病程方面无统计学差异($P > 0.05$)。

1.3 24 h症状评分

所有入选患者填写24 h症状评分表。24 h症状评分[11]包括白天症状评分和夜间症状评分。白天症状评分包括胸闷、呼吸困难、喘鸣、咳嗽和痰量,每一项目又分为0~3分4个级别(无症状=0、轻度=1、中度=2、重度=3)。夜间症状评分包括早醒或憋醒的次数(无=0、1次=1、2次=2、3次或以上=3)。

1.4 外周血标本采集及处理

经受试者同意,在行肺功能检查前肘静脉采集6 ml静脉血分装于两个EDTA抗凝管中,一管送血常规检查,另一管在室温下放置1 h后1 500 r/min离心10 min,吸取上清分装后置于-80 ℃保存。记录血细胞分析仪检测的细胞分类计数结果。

1.5 肺功能测定

所有患者进行肺功能测定,根据FEV_1和第1秒用力呼气量占用力肺活量比值(FEV_1/FVC)的情况,对FEV_1>70%的患者进行支气管激发试验,连续吸入乙酰胆碱后FEV_1下降≥20%为激发试验阳性。对FEV_1≤70%的患者进行支气管舒张试验,吸入沙丁胺醇气雾剂10 min后FEV_1≥12%,且绝对值≥200 ml为舒张试验阳性。据FEV_1将入选患者分为3组:FEV_1≥80%为轻度哮喘组,60%≤FEV_1<80%为中度哮喘组,FEV_1<60%为重度哮喘组。

表1 患者的一般临床资料

组别	n	年龄（岁）	性别（男/女）	病程（年）	家族史（例）	吸烟史			FEV_1（%）	PEF（%）	白天症状评分	夜间症状评分
						非吸烟者	已戒烟者	现时吸烟者				
轻度哮喘组	26	39±10	14/12	1.99±1.65	3	24	2	0	92.94±7.8	85.79±12.9	5.2±3.3	0.5±0.6
中度哮喘组	27	39±13	14/13	2.02±2.87	3	24	3	0	69.99±5.2	70.91±13.5	6.2±2.4	0.9±1.0
重度哮喘组	27	43±14	17/10	6.28±2.71	8	26	1	0	38.42±10.4	36.15±10.7	6.9±3.2	1.3±1.1

1.6 诱导痰及痰细胞计数

筛取18例入组的哮喘患者，行诱导痰检查。雾化前清水漱口、擤鼻。3%高渗盐水超声雾化吸入15 min，用力咳痰至培养皿。诱导痰标本在2 h内处理。痰液称量，加入4倍体积0.1%的DTT充分混合，于37 ℃水浴中振荡20 min，过滤。将过滤后的细胞混悬液以2 000 r/min的速度离心5 min。上清放于-80 ℃冰箱保存待测。在离心沉渣中加入PBS缓冲液，使其等于离心前体积。计数200个非鳞状上皮细胞。沉渣涂片，苏木精-伊红（HE）染色，细胞分类计数，显微镜下计数痰液中嗜酸性粒细胞总数。

1.7 血浆和诱导痰中IL-33的测定

采用酶联免疫吸附法（ELISA），严格按照试剂盒说明书操作。

1.8 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件，两个独立样本比较行t检验，多个样本比较行多向方差分析，多个样本两两比较行q检验，相关关系行Pearson相关性分析。

2 结果

2.1 入组患者的一般资料

所有入选患者为从未吸烟者和非现时吸烟者（戒烟5年以上）。分析患者的一般资料可以看出，重度哮喘患者的病程更长，年龄偏大，症状更重，肺功能更差，家族中患哮喘可能性更大。见表1。

2.2 各组血浆IL-33水平的比较

哮喘患者外周血IL-33含量显著高于20例正常对照组（$P<0.05$）。正常对照组和轻度哮喘组之间外周血IL-33含量相比无显著差异（$P>0.05$），而重度哮喘组外周血IL-33含量要明显高于正常对照组和轻中度哮喘组（$P<0.01$）。见表2。

表2 不同组别外周血IL-33比较（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	IL-33含量
正常对照组	20	26.62±3.04
哮喘组	80	52.31±27.01[a]
轻度	26	30.26±5.23
中度	27	41.36±11.82[ac]
重度	27	84.10±20.17[bde]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与轻度哮喘组比较；e：$P<0.01$，与中度哮喘组比较

2.3 患者各组FEV_1、PEF、24 h症状评分和外周血嗜酸性粒细胞数的比较

哮喘患者各组之间FEV_1和PEF均存在显著差异（$P<0.05$），各组之间白天症状评分和外周血嗜酸性粒细胞总数无显著差异（$P>0.05$），而不同哮喘患者之间夜间症状评分比较有显著差异（$P<0.05$），重度哮喘组的夜间症状评分要高于轻、中度哮喘组。见表3。

表3 各组哮喘患者FEV_1、PEF、24 h症状评分和外周血嗜酸性粒细胞数的比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	FEV_1（%）	PEF（%）	白天症状评分	夜间症状评分	嗜酸性粒细胞（$\times10^9$/L）
轻度哮喘组	26	92.94±7.85	85.79±12.95	5.2±3.3	0.5±0.6	0.30±0.17
中度哮喘组	27	69.99±5.24	70.91±13.53	6.2±2.4	0.9±1.0	0.38±0.29
重度哮喘组	27	38.42±10.44	36.15±10.65	6.9±3.2	1.3±1.1	0.39±0.23
F值		301.022	100.795	1.939	3.922	0.746
P值		0.000	0.000	0.152	0.024	0.478

2.4 患者外周血IL-33的含量与FEV_1、PEF、24 h症状评分和外周血嗜酸性粒细胞数的相关性分析

血浆中IL-33与FEV_1、PEF呈明显负相关（$r=-0.638$，$P<0.05$；$r=-0.552$，$P<0.05$）。血浆中IL-33与白天症状评分无明显相关（$r=0.173$，$P>0.05$），与夜间症状评分呈正相关（$r=0.317$，$P<0.05$）。血浆中IL-33与外周血嗜酸性粒细胞总数无明显相关（$r=0.082$，$P>0.05$）。

2.5 患者诱导痰中IL-33的水平及与痰液嗜酸性粒细胞数的关系

哮喘患者诱导痰中IL-33的水平要高于正常对照组[（23.18±3.11）pg/ml *vs*（12.01±2.54）pg/ml]，二者比较差异有统计学意义（$t=3.104$，$P<0.05$），且与痰液中嗜酸性粒细胞计数呈明显正相关（$r=0.693$，$P<0.05$）。

3 讨论

本研究通过对支气管哮喘患者血浆及痰液中IL-33的定量检测，发现支气管哮喘患者外周血中IL-33含量要高于正常对照组，不同哮喘患者外周血IL-33也有差异，重度哮喘组要高于轻、中度哮喘组，而正常对照组与轻度哮喘组之间比较无明显差异。这说明IL-33在支气管哮喘的进展过程中起到一定的作用，作用方式可能是通过其效应细胞的细胞膜上的受体ST2形成

信号转导通路,激活 NF-κB 和 MAPK 等途径,调节 Th2 细胞的分化,促进哮喘相关效应因子 IL-5、IL-13 等的释放,使气道炎症加重,气道阻力增高,肺活量明显受限,进而加剧哮喘患者肺功能的下降。IL-33 与 FEV_1 和 PEF 的相关性检验显示明显的负相关,与夜间症状评分呈正相关,但相关系数不高,而与白天症状评分无明显相关,原因可能是哮喘一般以夜间和清晨症状为重,此时间段副交感神经系统处于兴奋地位,血液中的组胺等使患者症状加重的因子增加,而肾上腺皮质激素水平在夜间明显降低,再加上夜间气道纤毛运动减弱,气道内黏液清除能力降低,使患者气道阻塞,气道痉挛,呼吸困难,症状加重,这说明 IL-33 可能参与到这些过程中,成为使哮喘患者疾病恶化的促进因子[12],其相关性的差异可能是因为肺功能检测客观反映了患者来诊时疾病状态,而 24 h 症状评分带有患者自身主观方面的因素。

患者外周血 IL-33 含量与外周血嗜酸性粒细胞数目无明显相关,但痰液中 IL-33 与痰液中嗜酸性粒细胞计数呈明显的正相关。痰液中的细胞及各种因子能直接反应气道炎症状况,所以诱导痰能客观反映气道炎症状态,而且与气道活检的病理改变基本一致,可借此深入研究呼吸系统疾病发病机制及治疗干预。本研究结果表明,痰液中的 IL-33 的含量与痰液中嗜酸性粒细胞计数呈明显的正相关,证明在哮喘发作时嗜酸性粒细胞确实参与了气道炎症的形成过程,已有研究证明 IL-33 可诱导嗜酸性粒细胞的聚集,所以 IL-33 在形成气道炎症的过程中发挥着作用,可能通过嗜酸性粒细胞表面和胞间的黏附分子 ICAM-1[13],促进信号转导,导致嗜酸性粒细胞活性增加,释放嗜酸性粒细胞相关炎性因子,通过一系列级联反应,促使气道高反应性的形成[14],使气道炎症的进一步加重。本研究也说明在呼吸系统炎症性疾病的诊断中,痰液中的细胞计数要比血液中的细胞计数在反应气道炎症方面更具优越性。

综上所述,本研究表明 IL-33 可能作为一种炎症因子参与哮喘的发展,使哮喘患者肺功能状况恶化,气道嗜酸性粒细胞聚集,进一步加重气道炎症。已有研究证明 IL-33 的抗体可以减低哮喘模型小鼠的气道高反应性和减少气道嗜酸性粒细胞的浸润[15],是否可以通过 IL-33 抗体来治疗哮喘,尤其是重度哮喘患者将是我们以后的研究热点。

参考文献:

[1] Liew F Y, Pitman N I, McInnes I B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(2): 103-110.

[2] Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, *et al*. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(36): 26369-26380.

[3] Palmer G, Lipsky B P, Smithgall M D, *et al*. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33[J]. Cytokine, 2008, 42(3): 358-364.

[4] Smith D E. The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33[J]. J Leukoc Biol, 2011, 89(3): 383-392.

[5] Komai-Koma M, Xu D, Li Y, *et al*. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells[J]. Eur J Immunol, 2007, 37(10): 2779-2786.

[6] 武燕, 柳晓金, 李明才. IL-33/ST2 信号转导系统及其与疾病关系的研究进展[J]. 现代免疫学, 2010, 30(2): 164-167.

[7] Xiang Z G, Chen W, Steven R, *et al*. Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice[J]. Immunol Lett, 2010, 131(2): 159-165.

[8] Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, *et al*. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation[J]. J Immunol, 2010, 185(6): 3472-3480.

[9] Silver M R, Margulis A, Wood N, *et al*. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation[J]. Inflamm Res, 2010, 59(3): 207-218.

[10] 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]. 中华哮喘杂志: 电子版, 2008, 2(1): 3-13.

[11] Nadif R, Siroux V, Oryszczyn M P, *et al*. Heterogeneity of asthma according to blood inflammatory patterns[J]. Thorax, 2009, 64(5): 374-380.

[12] Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, *et al*. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells[J]. J Immunol, 2009, 183(8): 5094-5103.

[13] Chow J Y, Wong C K, Cheung P F, *et al*. Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation[J]. Cell Mol Immunol, 2010, 7(1): 26-34.

[14] Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, *et al*. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system[J]. Int Immunol, 2008, 20(6): 791-800.

[15] Liu X, Li M, Wu Y, *et al*. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(1): 181-185.

(**收稿**:2011-01-16;**修回**:2011-03-13)

(编辑 汪勤俭)