DOI:10.16016/j.1000-5404.201510095

哮喘患者治疗前后血循环中嗜酸性粒细胞微粒的变化

蒋 鲜,曹富丽,但小苹,杨再兴,熊 玮 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 初步探讨哮喘患者治疗前后血循环中嗜酸性粒细胞微粒的变化,分析其数目变化与治疗疗效之间可能的关系。**方法** 按照入组标准纳入研究对象共57例,其中哮喘患者32例,健康志愿者25例,采集外周静脉血,将所采集的样本进行离心处理后,用相应抗体标记,应用流式细胞仪检测每100 μL外周血上清液中嗜酸性粒细胞微粒的数目。哮喘组在正规抗哮喘治疗(以吸入型糖皮质激素+长效β2受体激动剂为主)3个月后再次抽取相同体积的静脉血,检测血嗜酸性粒细胞微粒数目。**结果** 哮喘组治疗前循环中嗜酸性粒细胞微粒数目显著高于健康对照组和治疗后($F=5.532$ $P=0.038$;$Z=-4.937$,$P=0.01$),哮喘组治疗后与对照组间微粒数目差异无统计学意义($F=3.118$,$P=0.102$)。对哮喘组进行亚组分析,微粒数目在哮喘过敏组和非过敏组间差异无统计学意义($t=0.421$,$P=0.677$;$t=0.006$,$P=0.952$),在哮喘治疗后良好控制组与未控制组间差异有统计学意义($t=-2.086$,$P=0.046$),Δ微粒与ΔFEV1、ΔFEV1%、ΔEos count、ΔFeNO、ΔACT呈线性相关($r=-0.558$,$P=0.01$;$r=-0.453$,$P=0.005$;$r=0.625$,$P=0.01$;$r=0.313$,$P=0.041$;$r=-0.399$,$P=0.012$)。**结论** 哮喘患者血循环中嗜酸性粒细胞微粒数目增多,治疗后微粒数目减少,动态监测血循环中嗜酸性粒细胞微粒有助于哮喘控制评估。

[关键词] 哮喘;嗜酸性粒细胞;微粒
[中图法分类号] R329.24; R446.11; R562.25 [文献标志码] A

Alteration of circulating eosinophila microparticles in asthmatic patients before and after treatment

Jiang Xian, Cao Fuli, Dan Xiaoping, Yang Zaixing, Xiong Wei (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes of circulating eosinophila microparticles in the patients with asthma, and investigate the relationship of the changes with treatment efficacy. **Methods** Fifty-seven outpatients of our department from April to September 2015 who met the inclusion criteria were enrolled in this study. They were 32 patients of the asthma group and 25 of the normal control group. Their peripheral venous blood samples were collected, centrifuged and then marked with corresponding antibodies. Then the numbers of eosinophila microparticles in every 100 μL supernate was determined by flow cytometry. After 3 months of regular anti-asthmatic treatment (inhaled corticosteroids + long-acting beta 2 agonists), the equivalent volume of venous blood was harvested from the subjects of asthma group and then extracted for the detection of the numbers of eosinophila microparticles. **Results** The circulating level of eosinophila microparticles was significantly higher in the asthma group before treatment than that in control group and the asthma group after treatment ($F=5.532$, $P=0.038$; $Z=-4.937$, $P<0.01$), and there was no statistical difference between the asthma group after treatment and the control group ($F=3.118$, $P=0.102$). The number of microparticles has no significant difference between the allergic asthma subgroup and the non-allergic asthma subgroup ($t=0.421$, $P=0.677$; $t=0.006$, $P=0.952$), but statistical difference was seen in the number between the well-controlled asthma group and un-controlled group after treatment ($t=-2.086$, $P=0.046$), and Δ eosinophila microparticles represented linear correlations with the changes of forced expiratory volume in 1 second (FEV1), the percentage of FEV1 (FEV1%), eosinophil count (ΔEos count), faction exhaled nitric oxide (FeNO) and athma control test (ACT) ($r=-0.558$, $P<0.01$; $r=-0.453$, $P=0.005$; $r=0.625$, $P<0.01$; $r=0.313$,

[通信作者] 熊 玮,E-mail:xiongwei64@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151230.1141.017.html (2015-12-30)

$P=0.041$; $r=-0.399$, $P=0.012$). **Conclusion** The number of circulating eosinophila microparticles is increased in asthma patients, and decreased after treatment. So, dynamical monitoring its level may contribute to the assessment of asthma control.

[**Key words**] asthma; eosinophils; microparticles

Corresponding author: Xiong Wei, E-mail:xiongwei64@126.com

支气管哮喘(bronchial athma,简称哮喘)是以慢性气道炎症为主要特征的常见病、多发病,有多种细胞参与其炎症过程,而其中嗜酸性粒细胞被认为是导致支气管黏膜损伤和功能障碍的重要炎症细胞[1]。微粒(microparticles,MPs)是细胞受到刺激活化或凋亡时从浆膜上脱落形成的直径为100 nm至2 μm的小囊泡颗粒,含有丰富的膜表面受体和生物活性物质,具有促炎、促凝、调节免疫等生物学功能,参与了慢性气道炎症的发生、发展。在多种疾病中检测到微粒数目的改变,对疾病的分期、严重程度及预后起着指示作用,如类风湿关节炎、多发性硬化、急性呼吸窘迫综合征等[2-4]。因此,本课题拟初步探讨哮喘患者血循环中嗜酸性粒细胞微粒的变化情况,并分析其数目变化与治疗疗效之间可能的关系,以期为临床工作中哮喘的控制、评估提供一个新的实验室检测指标。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集西南医院2015年4-9月的门诊哮喘患者,共32例。健康对照25例来源于西南医院献血中心。纳入人群:健康对照者和按照哮喘诊断标准(全球哮喘防治创议2014版,GINA 2014[5])经专科医师初诊为哮喘的患者。纳入标准:年龄18~60岁,不吸烟或停止吸烟2个月以上[6],非孕妇,无明显心肝肾疾病,无肿瘤病史,无自身免疫疾病及其他变态反应性疾病史。排除标准[7]:晕血、晕针;近期受过外伤有大出血史;使用激素、免疫抑制剂、免疫调节剂或细胞毒性药物;不能表达主观不适症状;高血压、糖尿病、冠心病患者;先天性或后天性免疫缺陷患者;有精神、心理疾病患者;慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、肺结核患者。本研究已通过西南医院伦理委员会审查批准,参与者均签署了知情同意书。

2组研究对象除年龄存在差异性外,性别、体质指数、收缩压、舒张压差异无统计学意义($P>0.05$,表1),具有可比性。

表1 2组研究对象基本特征

组别	n	年龄(岁)	性别(男/女)	BMI(kg/m^2)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
对照组	25	32.64±9.42	15/10	24.43±2.74	121.12±8.49	78.24±8.57
哮喘组	32	41.18±9.44	14/18	23.47±3.74	117.50±8.90	74.53±7.39
P值		0.001	0.289	0.286	0.126	0.085

1.2 主要试剂、仪器

荧光素标记的抗人抗体包括藻红蛋白(PE)标记的CDw125抗体及同型抗体、藻蓝蛋白(APC)标记的Annexin V,均由BD Biosciences公司提供。流式细胞仪BD FACS Calibur由西南医院病理科提供。

1.3 方法

2组研究对象均采集外周静脉血,完善基本信息(性别、年龄),测量身高、体质量、血压,询问吸烟情况、既往史。同时哮喘组还需完成哮喘控制测试量表(athma control test,ACT)、肺功能[第1秒用力呼气量(FEV1)、第1秒用力呼气量占预计值的百分比(FEV1%)]、呼出气一氧化氮(faction exhaled nitric oxide,FeNO)测定、血常规[嗜酸性粒细胞计数(Eos count)]、皮肤过敏原测试等检查,在正规抗哮喘治疗(以吸入型糖皮质激素+长效β_2受体激动剂为主)3个月后再次抽取相同体积的静脉血,并复查上述指标,各指标前后变化率(Δ)=(治疗前值-治疗后值)/治疗前值×100%。按照皮肤过敏原测试是否阳性或既往有无过敏史,将哮喘组分为过敏组和非过敏组2个亚组。

1.4 标本的采集、处理

2组于上午09:00-11:00采集外周静脉血3 mL,放入冰盒,2 h内处理。将血液标本在4 ℃条件下2 500×g离心15 min,取上清液,-70 ℃冻存以备用。

1.5 流式细胞仪检测外周血中嗜酸性粒细胞微粒的数目

参考文献[8]方法。将冻存标本在冰盒内解冻,然后4 ℃、13 000×g离心2 min,连续2次,取上清液。取100 μL上清液加入经2 μm滤过膜过滤的磷酸盐缓冲液100 μL于EP管中稀释,每个标本各取5管,在避光条件下分别加入大小为1.34 μm的标准微球、CDw125抗体同型对照、CDw125抗体、Annexin V、CDw125抗体+Annexin V,室温下孵育20 min,随后上机检测。

1.6 疗效判定

①良好控制:ACT评分≥20,肺功能FEV1≥正常预计值的80%;②未控制:不能同时满足上述两个条件[9]。按照哮喘控制水平,将哮喘组分为良好控制组与未控制组。

1.7 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两两比较采用两样本t检验,对不符合参数检验条

件的采用 Mann-Whitney 或 Wilcoxon 非参数秩和检验,通过协方差分析对年龄进行校正,无序分类计数资料采用 χ^2 检验,采用 Pearson 相关分析 Δ 微粒与 ΔFEV1、ΔFEV1%、ΔEos count、ΔFeNO、ΔACT 的相关性。

2 结果

2.1 2 组研究对象嗜酸性粒细胞微粒数目

流式细胞仪检测发现:对照组嗜酸性粒细胞微粒数目为(33.24±21.23)/100 μL,哮喘组治疗前嗜酸性粒细胞微粒数目为(136.81±150.08)/100 μL,哮喘组治疗后微粒数目为(50.65±33.09)/100 μL。在总微粒数基本相同的情况下[(6 000~10 000)/100 μL],哮喘组治疗前、后血嗜酸性粒细胞微粒数目均高于对照组($Z=-4.174$,$P<0.01$;$t=2.287$,$P=0.026$)。校正年龄因素后,哮喘组治疗前嗜酸性粒细胞微粒数目与健康对照组之间差异仍具有统计学意义($F=5.532$,$P=0.038$),而治疗后与健康对照组之间差异不明显($F=3.118$,$P=0.102$)。

2.2 哮喘治疗前后嗜酸性粒细胞微粒数目的变化

哮喘治疗前循环中嗜酸性粒细胞微粒数目高于治疗后($Z=-4.937$,$P<0.01$)。良好控制组与未控制组治疗前微粒数目无明显差异($Z=-0.227$,$P=0.821$),治疗后哮喘良好控制组微粒数目低于未控制组($t=-2.086$,$P=0.046$,表2)。

表2 哮喘治疗前后良好控制组与未控制组嗜酸性粒细胞微粒数目(/100 μL,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后	变化值
良好控制组	17	119.05±112.41	39.76±20.83	79.29±95.23
未控制组	15	156.93±186.06	63.00±40.29	93.93±151.07
Z 或 t 值		-0.227	-2.086	-1.152
P 值		0.821	0.046	0.249

2.3 过敏反应对血循环中嗜酸性粒细胞微粒数目的影响

过敏组和非过敏组治疗前后微粒含量无明显差异($t=0.421$,$P=0.677$,$t=0.006$ $P=0.952$,表3)。过敏组哮喘良好控制率[9(64.3%)]略高于非过敏组[8(44.4%)],过敏组未控制率[5(35.7%)]低于非过敏组[10(55.6%)],但差异不具有统计学意义($\chi^2=1.245$,$P=0.225$)。

表3 哮喘治疗前后过敏组和非过敏组嗜酸性粒细胞微粒数目(/100 μL,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后	变化值
过敏组	14	149.64±154.10	50.50±31.30	99.14±127.82
非过敏组	18	126.83±150.58	49.77±35.16	77.05±120.31
Z 或 t 值		0.421	0.006	0.501
P 值		0.677	0.952	0.620

2.4 嗜酸性粒细胞微粒变化与其他临床指标变化的相关性

哮喘组患者治疗后 FEV1、FEV1%、ACT 评分高于治疗前,血嗜酸性粒细胞计数、FeNO 低于治疗前($P=0.01$)。进一步分析治疗前后循环中嗜酸性粒细胞微粒数目变化与 FEV1、FEV1%、血嗜酸性粒细胞计数、FeNO、ACT 评分变化的相关性,发现 Δ 微粒与 ΔFEV1、ΔFEV1%、ΔEos count、ΔFeNO、ΔACT 呈线性相关($r=-0.558$,$P=0.01$;$r=-0.453$,$P=0.005$;$r=0.625$,$P=0.01$;$r=0.313$ $P=0.041$;$r=-0.399$,$P=0.012$,表4)。

表4 哮喘组患者治疗前后相关临床数据($\bar{x}\pm s$)

组别	FEV1(L)	FEV1%	Eos count(×10⁹/L)	FeNO(ppb)	ACT 评分
治疗前	2.45±0.80	(70.10±9.09)%	0.26±0.25	56.23±34.14	16.28±2.34
治疗后	2.99±0.61[a]	(78.74±5.59)%[a]	0.13±0.09[a]	31.05±11.19[a]	20.56±1.21[a]
Δ(%)	-29.31±21.60	-13.59±12.40	40.12±20.13	38.37±16.87	-28.78±18.38

a:$P=0.01$,与治疗前比较

3 讨论

微粒作为细胞间的信号载体,广泛存在于细胞外液中,如血液、关节液,它们不仅携带来源细胞的生物信息,同时受细胞外环境的调控。生理情况下,微粒产生与消亡处于动态平衡当中[10],当平衡被打破,将导致循环中微粒大量生成,增多的微粒可以通过膜融合、巨胞饮、受体介导胞吞等方式与靶细胞相互作用[11],刺激靶细胞产生更多的细胞因子、炎症介质等,引发各种生物学反应,机体内环境的相对稳定遭到破坏,从而促进疾病的发生。因此,通过对微粒的检测、分析,可以优化疾病的诊断与治疗。

哮喘是包括多种炎症表型的异质性疾病,而其中嗜酸性粒细胞性哮喘是经典表型,约占 70%~80%,气道内、血循环中嗜酸性粒细胞增多是其重要特征,它通过与其他免疫细胞相互作用参与哮喘的整个病理生理过程[12]。目前认为导致体内嗜酸性粒细胞增多最重要的原因是 Th2 细胞过度活化,活化的 Th2 细胞可以分泌 IL-5,而 IL-5 在嗜酸性粒细胞增殖、聚集、活化、抗凋亡过程中起了关键作用[13]。活化后的嗜酸性粒细胞不仅能释放嗜酸性阳离子蛋白、白三烯等炎症介质造成气道上皮损伤,同时可以释放与其具有相似活性和表面蛋白的微粒,微粒可促进细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8 和 ICAM-1 的合成增加[14],吸引更多的炎症细胞并激活微粒本身,促进炎症反应的级联放大,进而形成持续的慢性炎症刺激。本研究通过 PE 标记的

CDw125 抗体、APC 标记的 Annexin V 对微粒表面的 IL-5 受体 α 链、磷脂酰丝氨酸进行识别,分选出来源于嗜酸性粒细胞的微粒(CDw125$^+$/Annexin V$^+$),并发现其在哮喘患者血循环中是增多的,并与血嗜酸性粒细胞计数、FeNO 水平呈正相关,表明微粒可能参与了疾病的进程,并在一定程度上反映机体内的嗜酸性炎症,这对哮喘的治疗可能起到指示作用。

目前哮喘的治疗是以吸入型糖皮质激素为基础的分级治疗,激素通过抑制 Th2 细胞的活化,降低 IL-5 等炎症介质的表达,减少嗜酸性粒细胞的活化,达到控制气道炎症的目的。Druilhe 等[15]证实激素可引起嗜酸性粒细胞凋亡,巨噬细胞通过吞噬凋亡细胞,清除组织炎症。研究认为由过敏引起的气道炎症患者中,外周血嗜酸性粒细胞增多,且具有更强的趋化性和自发产生活性氧的能力[1],与本研究中微粒变化具有一致性:过敏组较未过敏组微粒数目更多,对激素疗效更好,哮喘良好控制率更高,但可能由于样本例数偏少,未能体现统计学意义。大部分哮喘患者经吸入激素治疗后,机体内嗜酸性粒细胞数目较少,症状评分、肺功能改善[16],我们对哮喘患者治疗前后血循环中嗜酸性粒细胞微粒进行检测,发现治疗前患者血循环中微粒数目明显高于治疗后,且治疗后哮喘良好控制组微粒数目低于未控制组,与血嗜酸性粒细胞变化、症状评分、肺功能改善具有一致性,表明嗜酸性粒细胞微粒可以作为哮喘疗效的一种标志进行检测。

本研究发现哮喘患者血循环中嗜酸性粒细胞微粒数目是增多的,经正规治疗微粒数目减少,其减少程度与哮喘控制程度有关,并且该变化与 FEV1、FEV1%、血嗜酸性粒细胞计数、FeNO、ACT 等哮喘评估指标变化呈线性相关。研究结果提示:对血循环中嗜酸性粒细胞微粒进行动态监测有助于哮喘控制评估,但其正常值范围仍需大样本的临床研究进一步确定。

参考文献:

[1] Lavinskiene S, Malakauskas K, Jeroch J, *et al*. Functional activity of peripheral blood eosinophils in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients[J]. J Inflamm (Lond), 2015, 12: 25. DOI: 10.1186/s12950-015-0065-4

[2] Boilard E, Nigrovic P A, Larabee K, *et al*. Platelets amplify inflammation in arthritis *via* collagen-dependent microparticle production[J]. Science, 2010, 327(5965): 580 - 583.

[3] Saenz-Cuesta M, Irizar H, Castillo-Trivino T, *et al*. Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis[J]. Biomark Med, 2014, 8(5): 653 - 661. DOI: 10.2217/bmm.14.9

[4] Guervilly C, Lacroix R, Forel J M, *et al*. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care, 2011, 15(1): R31.

[5] Global Initiative for Athma (GINA). Global Strategy for Athma Manegement and Prevention (revised 2014)[R/OL]. http://www.ginathma.org.

[6] Gordon C, Gudi K, Krause A, *et al*. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(2): 224 - 232. DOI: 10.1164/rccm.201012-2061OC

[7] 但小苹, 邱倩, 杨再兴, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者支气管肺泡灌洗液中血小板及内皮细胞微粒变化的探讨[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(24): 2676 - 2680.

[8] Marques F K, Campos F M, Filho O A, *et al*. Circulating microparticles in severe preeclampsia[J]. Clin Chim Acta, 2012, 414: 253 - 258. DOI: 10.1016/j.cca.2012.09.023

[9] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组, 中华医学会全科医学分会. 中国支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(5): 331 - 336.

[10] Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, *et al*. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility [J]. Thorax, 2012, 67(12): 1067 - 1074. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2011-201395

[11] Burbano C, Rojas M, Vasquez G, *et al*. Microparticles That Form Immune Complexes as Modulatory Structures in Autoimmune Responses[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 267590.

[12] Bochner B S, Busse W W. Allergy and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(5): 953 - 959. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.02.032

[13] Garcia G, Taille C, Laveneziana P, *et al*. Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma[J]. Eur Respir Rev, 2013, 22(129): 251 - 257. DOI: 10.1183/09059180.00004013

[14] MacKenzie A, Wilson H L, Kiss-Toth E, *et al*. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding[J]. Immunity, 2001, 15(5): 825 - 835.

[15] Druilhe A, Letuve S, Pretolani M. Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action[J]. Apoptosis, 2003, 8(5): 481 - 495.

[16] Berry M, Morgan A, Shaw D E, *et al*. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma[J]. Thorax, 2007, 62(12): 1043 - 1049.

(**收稿**:2015-10-19;**修回**:2015-12-02)

(编辑 王 红)