

支气管哮喘患儿外周血 NF- κ B 及血清 SAA 表达与肺功能相关性分析

夏利¹, 贾钦尧², 朱书瑶¹, 石境懿¹, 刘德松¹

[摘要] 目的:探讨支气管哮喘患儿外周血核因子(NF)- κ B及血清淀粉样蛋白(serum amyloid A, SAA)表达与肺功能相关性。方法:92例哮喘患儿为哮喘组,同期正常体检的30名健康儿童作为对照组。分别采用蛋白免疫印迹法及酶联免疫吸附法测定外周血NF- κ B及血清SAA表达,并对外周血NF- κ B及血清SAA表达与肺功能相关性进行探讨。结果:哮喘组患儿外周血NF- κ B及血清SAA表达明显高于对照组($P < 0.01$);但哮喘组患儿最大呼气峰流速占预计值百分比、第1秒用力呼气容积占预计值百分比及第1秒用力呼气容积与用力肺活量比均明显低于对照组($P < 0.01$);在哮喘组中,患儿外周血NF- κ B及血清SAA表达与其上述肺功能指标呈明显负相关关系($P < 0.01$)。结论:NF- κ B及SAA通过参与气道重塑及炎症反应,在支气管哮喘发病过程中起一定作用。

[关键词] 支气管哮喘;核因子- κ B;血清淀粉样蛋白;肺功能

[中图分类号] R 725.6

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.06.021

Expression NF- κ B and serum amyloid A, and its correlation with lung function in children with asthma

XIA Li¹, JIA Qin-yao², ZHU Shu-yao¹, SHI Jing-yi¹, LIU De-song¹

(1. Department of Neonatology, Sichuan Maternity and Child Care, Chengdu Sichuan 610032;

2. Department of Respiratory Medicine, The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between the levels of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and serum amyloid A (SAA), and lung function in children with asthma. **Methods:** Ninety-two children with bronchial asthma and 30 healthy children were divided into the asthma group and control group, respectively. The levels of NF- κ B and SAA in two groups were detected using the protein immunoblotting and enzyme linked immunosorbent assay, respectively. The correlation between the levels of NF- κ B and SAA, and lung function was investigated. **Results:** The levels of NF- κ B and SAA in asthma group were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$), but the percentage of peak expiratory flow velocity to predicted value (PEF%), percentage of the 1st second force expiratory to predicted value (FEV1%) and FEV1/FVC in asthma group were significantly lower than those in control group ($P < 0.01$). The levels of NF- κ B and SAA in the asthma group were significantly negatively correlated with lung function indexes (PEF%, FEV1%, and FEV1/FVC) ($P < 0.01$). **Conclusions:** NF- κ B and SAA can play certain roles in the attack process of bronchial asthma by participating in the airway reconstruction and inflammatory reaction.

[Key words] asthma; nuclear factor- κ B; serum amyloid A; lung function

哮喘是一种由多种细胞或细胞组分的哮喘易感基因参与引发的气道慢性炎症疾病,以病人反复发作的气促、喘息、胸闷、咳嗽等为临床主要症状^[1]。因哮喘发病过程涉及多形核中性白细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞等多种炎性细胞及细胞因子,其发病机制尚并不明确。多数学者^[2-3]认为哮喘发病机制与气道细胞免疫介导的炎症反应有

关:当患儿哮喘发作时,其体内某些细胞因子水平表达异常,扰乱机体免疫调节功能,导致机体免疫损伤,进而引发支气管平滑肌增殖或气道重塑。核因子(NF)- κ B是一种具有多项调节作用的转录因子家族,与机体细胞分化、增生、黏附、免疫、凋亡及炎症反应关系密切,其诱导的白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等多种因子在哮喘的发生发展中起关键作用^[4]。血清淀粉样蛋白(serum amyloid A, SAA)是组织淀粉样蛋白A的前体物质,有关报道^[5]显示其在人体内浓度的高低与哮喘发病具有一定关联。目前有关NF- κ B及SAA与哮喘发病机制相关性评价甚少。本研究通过检测哮喘患儿外周血NF- κ B及血清SAA表达,观

[收稿日期] 2017-07-09 [修回日期] 2018-05-09

[作者单位] 1. 四川省妇幼保健院 新生儿科, 四川 成都 610000; 2 川北医学院附属医院 呼吸内科, 川北医学院 药物研究所, 四川 南充 637000

[作者简介] 夏利(1984-),女,硕士,主治医师。

[作者简介] 贾钦尧,硕士,主治医师。E-mail:jiaqinyao@qq.com

察其与患儿肺功能的相互关系,探讨 NF- κ B 与 SAA 等因子在哮喘中作用机制,为哮喘的临床诊断、评估及治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入标准:(1)经胸部 X 线、肺功能以及 CT 检查后符合中华医学会制定的诊断标准^[6]中急性哮喘标准;(2)过敏原检查以及支气管舒张实验检查辅助诊断;(3)患儿家属均对本研究知情,且自愿签署知情同意书。排除标准:(1)先天性心脏病者;(2)有严重肺部疾病者;(3)肝功能不全(乙型肝炎病史,血清丙氨酸氨基转移酶 > 120 IU/L);(4)肾功能不全者(血清肌酐 > 220 μ mol/L);(5)严重血液系统疾病者;(6)接受其他可能影响本研究效应指标者;(7)拒绝参与本实验者。

根据纳入标准,选取 2014 年 1 月至 2016 年 9 月我院收治的哮喘患儿 92 例,其中男 52 例,女 40 例;年龄 4 ~ 10 岁;身高(121.68 ± 3.01)cm;体质量(24.01 ± 3.91)kg。并选取同期于本院进行健康体检的儿童 30 名作为对照组,其中男 17 名,女 13 名;年龄 5 ~ 11 岁;身高(119.75 ± 2.40)cm;体质量(22.38 ± 1.91)kg。2 组患儿的性别、年龄、身高、体质量均具有可比性。本研究获得我院伦理委员会批准。

1.2 评价标准与观测指标 (1)肺功能检测^[7]:采用常规通气肺功能进行检查,先由接受正规培训的技术人员对检测仪器进行调试校准,并记录患儿体质量与身高。叮嘱患儿保持直立或坐直,头部保持自然水平,口唇包紧口器,鼻子夹上鼻夹,进行检测。测定次数由患儿完成情况而定,并取最佳值为记录参数,记录并计算患儿最大呼气峰流速占预计值百分比(peak expiratory flow/predictor ratio, PEF%)、第 1 秒用力呼气容积占预计值百分比(forced expiratory volume in one second/predictor ratio, FEV1%)及第 1 秒用力呼气容积与用力肺活量比(FEV1/FVC)水平。所有指标均至少测量 3 次,取最佳值为测定结果。(2)外周血 NF- κ B 水平及血清 SAA 水平检测:于患儿晨醒 10 min 取 4 ~ 5 mL 静脉血,将采集后的血液等量平均分别置于无菌抗凝离心管中,其中一管于 4 $^{\circ}$ C, 3 000 r/min(离心机转头半径是 13.5 cm),离心 10 min 后,取上清液置 -20 ~ -70 $^{\circ}$ C 冰箱内保存待测。另一管于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存待测。

采用蛋白免疫印迹法测定 NF- κ B 水平:将于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存的外周血离心取细胞悬液,活细胞计数后于 5 000 g 4 $^{\circ}$ C 下离心 3 min,取沉淀物用冰 PBS 洗 2 次,按全细胞蛋白提取试剂盒说明操作。以 10% SDS-PAGE 电泳,60 V 恒压 1 h,120 V 恒压 1.5 h,电转至 PVDF 膜;再以 5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h,将 PVDF 膜于室温封闭缓冲液中封闭 1 h,分别加入 NF- κ B p65 mouse monoclonal IgG 和鼠抗人 β -actin 多抗,室温孵育 2 h;洗膜 30 min 后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,恒温 1 h 后洗膜;将化学发光试剂盒中发光液按 1:1 比例配制均匀后,涂在 PVDF 膜上反应 1 min。在暗室内将 X 光片置于 PVDF 膜上曝光 1 min 后放入暗盒。冲洗 X 光片并进行图像扫描分析。结果以目标蛋白条带即 NF- κ B p65 带与 β -actin 条带灰度值比值表示,每组实验重复 3 次求均值。

采用酶联免疫吸附法检测血清 SAA 水平,按操作说明书进行检测。首先将标准品 100 μ L 加入预先设定的标准品孔中,将 10 个孔按顺序依次稀释,稀释系数为 0.5。将预先稀释好的样品待测液 50 μ L 加入样品孔,空白孔中不加任何样品液。待孔中液体全部加入后于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,用预先配好的洗涤液清洗弃去液体的酶标板,清洗 5 次,每次 30 s,晾干。除空白孔外,各孔加入 50 μ L 酶标试剂,继续温育及洗涤。所有孔加入显色剂,37 $^{\circ}$ C 下避光缓慢摇匀,显色 30 min 后用 100 μ L 终止液终止反应。在酶标仪上读取数据,其中空白孔数值作为调零参照,扫描波长为 450 nm。以标准品吸收值对应其浓度绘制标准曲线,将待测样品吸收值带入计算其实际浓度。

1.3 统计学方法 采用 t (或 t') 检验和相关分析。

2 结果

2.1 2 组 NF- κ B 和 SAA 水平比较 哮喘组外周血 NF- κ B 及血清 SAA 水平均显著高于对照组($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 2 组的相关血液指标比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	NF- κ B	SAA/(mg/L)
对照组	30	1.42 \pm 0.31	10.26 \pm 2.35
哮喘组	92	2.66 \pm 0.78	46.21 \pm 2.41
<i>t</i>	—	12.52 ^Δ	71.38
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01

Δ 示 t' 值

2.2 2 组肺功能指标比较 哮喘组患儿肺功能指标 FEV1%、FEV1/FVC 及 PEF% 均明显低于对照组 ($P < 0.01$) (见表 2)。

表 2 2 组肺功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	FEV1%	FEV1/FVC	PEF%
哮喘组	92	65.22 ± 3.25	73.88 ± 12.75	58.65 ± 3.52
对照组	30	93.45 ± 10.15	94.21 ± 6.41	87.47 ± 14.61
t'	—	14.99	11.48	10.70
P	—	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 哮喘患儿血液指标与肺功能相关性分析 研究发现,哮喘组患儿外周血 NF- κ B 和肺功能指标 FEV1%、FEV1/FVC 及 PEF% 均呈显著负相关关系 ($r = -0.845$ 、 -0.904 和 -0.833 , $P < 0.01$)。血清 SAA 水平与肺功能指标 FEV1%、FEV1/FVC、PEF% 呈显著负相关关系 ($r = -0.773$ 、 -0.768 和 -0.789 , $P < 0.01$)。

3 讨论

支气管哮喘的成因有很多,主要包括遗传因素、变应原因素以及促发因素三类,其中由于变应原因素引起的哮喘较为常见,如尘螨、花粉、草粉、某些染料、面粉、谷物、食物以及非皮质激素类抗炎药物等。此外,由于空气污染、妊娠、气候转变以及剧烈运动等促发因素亦可诱发哮喘发作。哮喘病人主要表现为气道重塑、发作性胸闷、咳嗽以及哮喘声呼吸苦难等,严重时病人出现发绀、呼吸苦难甚至窒息等^[8-10]。由于哮喘发病过程是由多种细胞及细胞因子综合参与的复杂炎症反应过程,尚未明确阐明其发病机制。多数学者^[11]倾向认为气道重塑及炎症反应是哮喘病人肺功能降低的主要原因。

NF- κ B/Rel 蛋白家族具有广泛的生物活性,能够影响细胞的组织分化、增殖、形态形成及形态重塑、免疫应答、细胞的迁移与凋亡等。NF- κ B 作为其中一员,参与多种免疫应答及炎症反应。本次研究结果显示,NF- κ B 在哮喘组患儿体内表达明显高于对照组,提示 NF- κ B 参与哮喘发病过程。有关研究^[12]显示,NF- κ B p65 为肺巨噬细胞合成各种炎症介质的主要调控因子之一,当外界刺激激发线粒体内活性氧释放时,细胞质中 NF- κ B 氧化后进入细胞核启动 IL-3、IL-4、IL-6 及 IL-8 等多种细胞因子,激发上述炎症因子的释放,参与炎症反应过程。此外,有学者^[13]认为 NF- κ B 表达的高低与气道氧化应激反应及气道重塑关系密切,当小鼠气道炎症细胞中

NF- κ B 的表达受到抑制后,其气道氧化应激反应、气道重塑及气道炎症反应明显减轻。此外,研究中还发现,哮喘组患儿体内 NF- κ B 表达水平与其肺功能呈负相关关系。这可能与 NF- κ B 参与气道重塑,影响患儿气道平滑肌细胞、纤维细胞及上皮细胞的增生过程有关。宋珊等^[14]研究显示,体内 NF- κ B 表达水平与慢性肺栓塞病人肺部气流受限呈负相关性,其体内水平随着 FEV1% 降低而升高。

SAA 为一类多基因编码的多形态蛋白,主要存在于血清高密度脂蛋白中,多作为疾病急性期蛋白。近年来研究发现^[15],SAA 在前列腺癌、乳腺癌、肝癌、肺癌等多种肿瘤病人体内表达偏高,提示 SAA 蛋白参与细胞黏附、浸润及迁移等过程。本次研究结果显示,在哮喘组患儿血清 SAA 表达明显高于对照组,且其表达水平与哮喘患儿肺功能呈负相关关系。这可能由于 SAA 能够通过 TLR4 介导的 NF- κ B 信号转导通路参与炎症反应过程^[5]。据报道^[16],在正常情况下,机体 SAA 仅微量存在与血浆中,而当机体受到外伤、炎症等刺激时,SAA 表达明显升高。SAA 与体内 NF- α 、IL-6 等炎症因子表达水平呈正相关性,能通过调节细胞因子网络,加速粒细胞及巨噬细胞向炎症区域募集及活化,故 SAA 表达水平能够反应体内炎症反应状态。

综上,支气管哮喘患儿体内 NF- κ B 及 SAA 呈现高表达,且与患儿肺功能呈负相关关系,因而 NF- κ B 及 SAA 可能主要通过影响体内炎症因子反应,干扰气道重塑发挥引发哮喘的炎症反应的作用。

[参 考 文 献]

- [1] RAJESH MC. Anaesthesia for children with bronchial asthma and respiratory infections [J]. Indian J Anaesth, 2015, 59(9):584.
- [2] LAMBRECHT BN, HAMMAD H. The immunology of asthma [J]. Nat Immunol, 2015, 16(1):45.
- [3] LEATHERMAN J. Mechanical ventilation for severe asthma [J]. Chest, 2015, 147(6):1671.
- [4] 郭子君, 齐晓丹. SIRT-1 和 NF- κ B 在小细胞肺癌中的表达及其意义 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(11):152.
- [5] YE RD, SUN L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation [J]. J Leukoc Biol, 2015, 98(6):923.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘防治常规(试行) [J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2):100.
- [7] 安淑华, 李金英, 赵清娟, 等. 常规肺通气功能检测在儿童支气管哮喘诊疗中的作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2011, 26(4):257.
- [8] ANSARIN K, ATTARAN D, JAMAATI H, et al. Approach to patients with severe asthma: a consensus statement from the respiratory care experts' input forum (RC-EIF), Iran [J]. Tanaffos, 2015, 14(2):73.

综上所述,老年原发性高血压病人 BPV 增大与 LA 的发生密切相关,在积极控制血压的同时,还应注意维持血压的平稳性,或为防治 LA 的有效措施。

[参 考 文 献]

- [1] WADIA RS, GHIYA SK, SINGH J, *et al.* Clinical correlates of leukoaraiosis; A study of 175 patients [J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2016, 19(4):478.
- [2] LIN Q, HUANG WQ, MA QL, *et al.* Incidence and risk factors of leukoaraiosis from 4683 hospitalized patients; A cross-sectional study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(39):e7682.
- [3] KOKUBO M, SHIMIZU A, MITSUI T, *et al.* Impact of night-time blood pressure on cerebral white matter hyperintensity in elderly hypertensive patients [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2015, 15 (Suppl 1):59.
- [4] 王晏雯, 刘小利, 王俊俊, 等. 长时血压变异性与脑白质疏松的相关性研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(2):142.
- [5] MEISSNER A. Hypertension and the Brain; A Risk Factor for More Than Heart Disease [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2016, 42(3/4):255.
- [6] BRICKMAN AM, REITZ C, LUCHSINGER JA, *et al.* Long-term blood pressure fluctuation and cerebrovascular disease in an elderly cohort [J]. *Arch Neurol*, 2010, 67(5):564.
- [7] BIRNS J, JAROSZ J, MARKUS HS, *et al.* Cerebrovascular reactivity and dynamic autoregulation in ischaemic subcortical white matter disease [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009, 80(10):1093.
- [8] AVET J, PICHOT V, BARTHELEMY JC, *et al.* Leukoaraiosis and ambulatory blood pressure load in a healthy elderly cohort study: the PROOF study [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 172(1):59.
- [9] LEUNG LY, BARTZ TM, RICE K, *et al.* Blood Pressure and Heart Rate Measures Associated With Increased Risk of Covert Brain Infarction and Worsening Leukoaraiosis in Older Adults [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(8):1579.
- [10] GUO X, PANTONI L, SIMONI M, *et al.* Blood pressure components and changes in relation to white matter lesions; a 32-year prospective population study [J]. *Hypertension*, 2009, 54(1):57.
- [11] GODIN O, TZOURIO C, MAILLARD P, *et al.* Antihypertensive treatment and change in blood pressure are associated with the progression of white matter lesion volumes; the Three-City (3C)-Dijon Magnetic Resonance Imaging Study [J]. *Circulation*, 2011, 123(3):266.
- [12] 田作军, 董亚贤, 刘磊, 等. 高血压性脑梗死病情进展与其血管基础及临床治疗的相关性 [J]. *广东医学*, 2012, 33(17):2563.
- [13] ROTHWEL L, PETER M, HOWARD, *et al.* Prognostic significance of visit-to-visit variability, maximum systolic blood pressure, and episodic hypertension [J]. *Lancet*, 2010, 375(9718):895.
- [14] 郝咏刚, 杨淑娜, 秦伟, 等. 血压变异性与缺血性脑白质高信号的相关性 [J]. *山东医药*, 2017, 57(17):77.
- (本文编辑 刘畅)
-
- (上接第 773 页)
- [9] FAINARDI V, PISI G, CHETTA A. Mepolizumab in the treatment of severe eosinophilic asthma [J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(1):27.
- [10] RODRIGO GJ, CASTRO-Rodríguez JA. Tiotropium for the treatment of adolescents with moderate to severe symptomatic asthma; a systematic review with meta-analysis [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2015, 115(3):211.
- [11] LANZA GM, JENKINS J, SCHMIEDER AH, *et al.* Anti-angiogenic nanotherapy inhibits airway remodeling and hyper-responsiveness of dust mite triggered asthma in the brown norway rat [J]. *Theranostics*, 2017, 7(2):377.
- [12] LI Z, ZHENG J, ZHANG N, *et al.* Berberine improves airway inflammation and inhibits NF-κB signaling pathway in an ovalbumin-induced rat model of asthma [J]. *J Asthma*, 2016, 53(10):999.
- [13] LI Z, ZHENG J, ZHANG N, *et al.* Berberine improves airway inflammation and inhibits NF-κB signaling pathway in an ovalbumin-induced rat model of asthma [J]. *J Asthma*, 2016, 53(10):999.
- [14] 宋珊, 陈绍平. 慢性阻塞性肺疾病患者外周血单个核细胞核因子-κB 水平及与气流受限的关系 [J]. *川北医学院学报*, 2010, 25(6):530.
- [15] 陈长强, 顾志冬, 樊绮诗. 血清淀粉样蛋白 A 在疾病应用中的研究进展 [J]. *检验医学*, 2012, 27(9):776.
- [16] KIM J, YANG J, PARK OJ, *et al.* Serum amyloid A inhibits osteoclast differentiation to maintain macrophage function [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(4):595.
- (本文编辑 刘璐)