

诱导痰 Galectin-3BP 及相关炎症因子水平检测在中性粒细胞型哮喘诊断中的价值

刘敏, 李承红, 刘双, 王小江, 钟金男, 石奕

(江汉大学附属医院武汉市第六医院呼吸内科, 武汉 430015)

摘要:目的 探讨诱导痰半乳糖凝集素-3结合蛋白(Galectin-3BP)及相关炎症因子水平检测在中性粒细胞型哮喘诊断中的价值。方法 选择2018年10月~2019年6月江汉大学附属医院呼吸与危重症医学科收治的65例哮喘患者为研究对象,其中中性粒细胞型哮喘组(NA)27例,嗜酸粒细胞型哮喘组(EA)38例,ELISA法检测两组患者诱导痰Galectin-3BP的表达水平,并分析Galectin-3BP与诱导痰炎症细胞及炎症因子的相关性。结果 NA组诱导痰Galectin-3BP水平与EA组比较(102.86 ± 24.08 ng/ml vs 64.02 ± 18.93 ng/ml),差异有统计学意义($t=47.314$, $P<0.05$)。直线相关分析显示诱导痰Galectin-3BP与IL-1 β , IL-6和IL-8均呈正相关($r=0.670, 0.632$ 和 0.651 ,均 $P<0.001$),与诱导痰中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞数均呈正相关($r=0.475, 0.461$ 和 0.454 ,均 $P<0.05$),与嗜酸性粒细胞数无明显相关性($r=-0.219$, $P>0.05$)。结论 诱导痰Galectin-3BP在NA患者中高表达,且与中性粒细胞相关炎症因子呈正相关,可作为NA的生物标志物。

关键词: 诱导痰; 半乳糖凝集素-3结合蛋白; 中性粒细胞型哮喘

中图分类号: R562.25; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)06-056-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.014

Value of Induced Sputum Galectin-3BP and Related Inflammatory Factors in the Diagnosis of Neutrophil Asthma

LIU Min, LI Cheng-hong, LIU Shuang, WANG Xiao-jiang, ZHONG Jin-nan, SHI Yi

(Department of Respiratory Medicine, Wuhan No.6 Hospital, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan 430015, China)

Abstract: **Objective** To investigate the value of induced sputum galectin-3BP and related inflammatory factors in the diagnosis of neutrophil asthma. **Methods** 65 cases of patients with asthma from Respiratory Medicine of Wuhan No.6 Hospital Affiliated to Jiangnan University from October 2018 to June 2019 were selected, including 27 neutrophilic cases and 36 eosinophilic cases. The concentrations of Galectin-3BP and inflammatory cytokines in sputum were measured by ELISA. The correlations among Galectin-3BP and airway inflammation were analyzed. **Results** Sputum Galectin-3BP was increased in NA compared with EA (102.86 ± 24.08 ng/ml vs 64.02 ± 18.93 ng/ml), the differences were statistically significant ($t=47.314$, $P<0.05$). Galectin-3BP was significantly positively associated with IL-1 β , IL-6 and IL-8 ($r=0.670, 0.632, 0.651$, all $P<0.001$), and positively associated with neutrophils, macrophages and lymphocytes ($r=0.475, 0.461, 0.454$, all $P<0.05$), while there was no significant correlation with eosinophil number ($r=-0.219$, $P>0.05$). **Conclusion** Induced sputum Galectin-3BP was highly expressed in NA patients, which is positively correlated to neutrophil-associated inflammatory factors and can be used as a biomarker for NA.

Keywords: induced sputum; galectin-3BP; neutrophilic asthma

支气管哮喘(以下简称哮喘)是多种炎性细胞和炎性介质参与的慢性气道炎症性疾病。哮喘的异质性决定哮喘个体间存在不同的气道炎症表型。目前嗜酸粒细胞型哮喘(eosinophilic asthma, EA)得到了广泛的研究。近来研究表明高达50%的哮喘患者为中性粒细胞型哮喘(neutrophilic asthma, NA),对激素治疗反应差^[1]。半乳糖凝集素-3结合蛋白(galectin-3BP)参与调节细胞黏附、凋亡、

炎性反应、肿瘤转移等许多生理病理过程^[2]。近年来有证据显示Galectin-3BP在哮喘的发病机制中发挥重要作用,但在NA中的作用尚未见报道^[3]。诱导痰较外周血能更好地反映气道炎症的本质,本研究拟通过观察NA患者诱导痰Galectin-3BP及相关炎症因子表达水平,探讨其在NA诊断中的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2018年10月~2019年6月

作者简介:刘敏(1986-),女,博士在读,主治医师,研究方向:慢性气道炎症性疾病, E-mail: 714882770@qq.com。

通讯作者:李承红, E-mail: 15827636399@163.com。

江汉大学附属医院呼吸与危重症医学科收治的65例哮喘患者为研究对象。据诱导痰嗜酸粒细胞和中性粒细胞的百分比予以分组,分为EA组(嗜酸粒细胞 $\geq 3\%$ 且中性粒细胞 $< 61\%$)和NA组(中性粒细胞 $\geq 61\%$ 且嗜酸粒细胞 $< 3\%$)^[5]。EA组38例,男性16例,女性22例,平均年龄 41.41 ± 9.26 岁。NA组27例,男性11例,女性16例,平均年龄 43.38 ± 11.53 岁。哮喘诊断符合我国支气管哮喘防治指南哮喘的诊断标准^[4]。排除标准:①哮喘急性加重期,近4周曾全身使用糖皮质激素或吸入糖皮质激素,3天内使用抗过敏药、茶碱等药物者;②合并慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、肺炎、肺结核等其它呼吸系统疾病者;③并发淋巴瘤、白血病、恶性肿瘤、嗜酸粒细胞增高症等疾病者;④并发严重心血管疾病及肝肾功能不全者;⑤患有精神疾病、妊娠及哺乳期妇女;⑥未能完成诱导痰检查或诱导痰标本不合格者。所有受试者均获得知情同意。

1.2 试剂和方法

1.2.1 痰液的采集、处理:痰液的采集、质控参照中华医学会呼吸病学分会哮喘学组咳嗽的诊断与治疗指南(2015)中高渗盐水雾化诱导痰炎症细胞检测方法^[6]。将收集的痰标本用0.1g/dl二硫苏糖醇(DTT)溶液裂解后过滤、离心,重悬沉淀细胞,细胞悬液予以瑞氏染色,光镜下分类计数400个有核细胞,分别计算嗜酸粒细胞(EOS)、中性粒细胞(PMN)、巨噬细胞(M ϕ)和淋巴细胞(LYM)

表1 两组患者诱导痰 Galect-3BP, 炎症因子及炎症细胞的比较 [$\bar{x} \pm s$, M(P₂₅~P₇₅)]

指标	NA(n=27)	EA(n=38)	t/Z值	P
Galect-3BP (ng/ml)	102.86 \pm 24.08	64.02 \pm 18.93	47.314	0.006
IL-1 β (ng/ml)	998.03 \pm 30.67	97.84 \pm 20.59	87.261	<0.001
IL-6 (ng/ml)	958.82 \pm 38.08	506.09 \pm 32.41	34.210	0.017
IL-8 (ng/ml)	75.92 \pm 14.37	11.46 \pm 8.02	52.305	0.003
EOS (%)	0.38(0.14~0.53)	4.68(3.12~12.83)	82.904	<0.001
PMN (%)	81.52(70.03~93.84)	24.86(14.35~36.79)	94.035	<0.001
M ϕ (%)	52.14(38.01~74.52)	25.06(6.58~29.37)	38.603	0.014
LYM (%)	0.37(0.24~1.33)	0.52(0.22~1.68)	9.016	0.068

2.2 诱导痰 Galectin-3BP 与炎症因子及炎症细胞的相关性分析 诱导痰 Galectin-3BP 与 IL-1 β , IL-6, IL-8 呈正相关($r=0.670, P<0.001; r=0.632, P<0.001; r=0.651, P<0.001$),与 PMN, M ϕ , LYM 呈正相关($r=0.475, P=0.018; r=0.461, P=0.026; r=0.454, P=0.031$),与 EOS 无明显相关性($r=-0.219, P=0.069$)。

3 讨论

NA 是按哮喘气道炎症表型分类的一种哮喘亚型,目前将诱导痰中性粒细胞计数持续(至少有2

百分比。留取上清液于 -80°C 冰箱用于炎症因子的检测。

1.2.2 诱导痰 Galectin-3BP 与 IL-1 β , IL-6 和 IL-8 水平测定:采用 ELISA 法检测诱导痰上清液中 Galectin-3BP, IL-1 β , IL-6 和 IL-8 水平。Galectin-3BP 试剂盒购自美国 ebioscience 公司, IL-1 β , IL-6 和 IL-8 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司,操作过程严格按照相关试剂盒说明书。

1.3 统计学分析 用 SPSS 18.0 软件进行统计处理,正态分布的计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本的 t 检验。计数资料采用 $n(\%)$ 表示,率的比较采用 χ^2 检验。非正态分布计量资料以中位数(四分位数间距)[M(P₂₅~P₇₅)]表示,两组间比较采用 wilcoxon 秩和检验。相关性用 Pearson 进行相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组哮喘患者诱导痰 Galectin-3BP, 炎症因子及炎症细胞的比较 见表1。与 EA 组相比,NA 组诱导痰 Galectin-3BP 明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);NA 组诱导痰 IL-1 β , IL-6, IL-8 明显高于 EA 组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$);NA 组诱导痰 PMN, M ϕ 计数明显高于 EA 组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$);两组患者 LYM 计数差异无统计学意义($P>0.05$)。

次)占非鳞状细胞总数的61%~76%,或绝对计数大于 $5.0 \times 10^6/\text{ml}$ 的哮喘定义为NA^[7]。NA患者存在更明显的气流受限及气道重塑,在临床上往往是重症哮喘、难治性哮喘,与激素抵抗密切相关,近年来已成为学术界关注的焦点^[8-9]。Galectin-3BP 又称为 Mac-2 结合蛋白(M2BP)或90K糖蛋白,是一种细胞外基质分泌的糖基化蛋白,属于巨噬细胞清道夫受体(scavenger receptor, SR)富含半胱氨酸超家族之一,最早在人乳腺癌细胞培养液中发

现。Galectin-3BP可促进肿瘤的发生、发展、分化及转移,为肿瘤预后的生物标志物之一^[2]。近年来, Galectin-3BP在病毒感染、纤维化、静脉血栓形成、自身免疫性肝病、慢性胰腺炎、支气管哮喘等炎症和炎症相关性疾病中的作用逐渐被揭示^[10-13]。

KALAYCI等^[3]研究发现哮喘患者外周血和肺泡灌洗液(BALF)中Galectin-3BP明显高于健康对照组,且与外周血嗜酸性粒细胞数呈负相关,进一步将Galectin-3BP与外周血单个核细胞(PBMC)共培养,发现Galectin-3BP可以诱导PBMC分泌IL-6,抑制IL-4, IL-5, IL-13等Th2相关炎症因子的转录。本研究结果显示与EA组相比,NA组诱导痰Galectin-3BP显著升高,且与PMN计数及IL-1 β , IL-6, IL-8水平均呈正相关。而IL-1 β , IL-6和IL-8具有募集、活化中性粒细胞,促进中性粒细胞与炎症部位结合的生物学功能。以上研究结果提示Galectin-3BP促进中性粒细胞性气道炎症,抑制Th2介导的嗜酸性粒细胞性气道炎症。

Galectin-3BP可能通过下列机制参与哮喘中性粒细胞性气道炎症:①通过趋化因子和黏附分子诱导中性粒细胞的募集。研究表明Galectin-3BP可以诱导MCP-1等趋化因子和ICAM-1, VCAM-1, E-selectin等黏附分子的表达,从而介导炎症细胞向炎症部位的迁移^[14]。②通过激活单核巨噬细胞分泌大量炎症因子从而有效动员、募集和活化中性粒细胞,加重气道炎症。研究表明Galectin-3BP与人单核细胞系THP-1和单核细胞来源的巨噬细胞共培养,可以诱导细胞合成和分泌IL-6, IL-8, TNF- α 等炎症因子,且对炎症的调控呈现出时间和浓度依赖性^[14-15]。③通过活化T细胞介导获得性免疫反应参与哮喘气道炎症。POWELL等^[16]发现Galectin-3BP可以刺激PBMC诱导T细胞分泌IL-1, IL-6, GM-CSF和TNF- α 等炎症因子,但将Galectin-3BP单独与T细胞共培养则无法诱导T细胞产生炎症因子。因此Galectin-3BP可能通过作用于单核巨噬细胞或其它效应细胞产生效应分子作为共刺激信号激活T细胞参与气道炎症反应。目前Galectin-3BP在哮喘发病机制中的作用尚不完全清楚。Galectin-3BP广泛分布于人体体液和组织器官中,在巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞等多种气道炎症细胞中均有表达,其蛋白结构域的复杂性和配体的多样性可能介导多种不同的生物学效应,关于Galectin-3BP介导中性粒细胞性气道炎症的具体机制仍有待于进一步研究及证实。

综上所述,诱导痰Galectin-3BP及相关炎症因子水平检测有助于气道炎症表型的预测,可作

为NA的生物标志物,对哮喘的分型诊断、疗效观察、治疗方案调整和预后判断等具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] CHUNG Kianfan. Neutrophilic asthma: a distinct target for treatment [J]. *Lancet Respira Med*, 2016, 4(10):765-767.
- [2] NATARAJAMURTHY S H, SISTLA S, DHARMESH S M. Disruption of galectin-3 and galectin-3 binding protein (G3BP) interaction by dietary pectic polysaccharides (DPP) - Arrest of metastasis, inhibition of proliferation and induction of apoptosis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139(19):486-499.
- [3] KALAYCI O, BIRBEN E, TINARI N, et al. Role of 90K protein in asthma and TH2-type cytokine expression [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2004, 93(5):485-492.
- [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(2016版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(9):675-697. Asthma Study Group of Chinese Thoracic Society, Chinese Medical Association. Guidelines for the management and prevention of asthma(2016)[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2016, 39(9):675-697.
- [5] SIMPSON J L, SCOTT R, BOYLE M J, et al. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum [J]. *Respirology*, 2006, 11(1):54-61.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2015版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(5):323-354. Asthma Study Group of Chinese Thoracic Society, Chinese Medical Association. Guidelines for the diagnosis and treatment of cough(2015)[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2016, 39(5):323-354.
- [7] SCHLEICH F N, MANISE M, SELE J, et al. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation [J]. *BMC Pulm Med*, 2013, 13(1):11.
- [8] HASTIE A T, MOORE W C, MEYERS D A, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes, 2010, 125(5):1028-1036. e13.
- [9] MOORE W C, HASTIE A T, LI Xingnan, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(6):1557-1563. e5.
- [10] AYUMI I, YOSHIHIRO K, YUSUKE E, et al. Establishment of mouse Mac-2 binding protein enzyme-linked immunosorbent assay and its application for mouse chronic liver disease models [J]. *Hepatology Research*, 2017, 47(9):902-909.

(下转第128页)