

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.010

哮喘患者血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 表达变化及与气道炎症、重塑的关系探讨

刘永生, 周发春

(重庆医科大学附属第一医院急诊科, 重庆 400016)

【摘要】目的: 本研究从细胞因子角度出发探讨白介素-13(Interleukin-13, IL-13)、转化生长因子- β 1(Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)血清浓度是否在哮喘患者的气道慢性炎症及重塑的发病机制中起着调控作用及其可能途径。方法: 选择哮喘急性发作期患者 36 例(中重度发作 20 例、轻度发作 16 例)、缓解期 36 例、健康体检者 36 例。取肘静脉血, 用 ELISA 方法测定血清中 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平; 所有入试者均作肺功能检查, 并对结果进行统计学分析。结果: 血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 的表达量在哮喘患者中存在显著的正相关性; 同时三者血清浓度越高, 肺功能检查指标第 1 s 用力呼气容积(Forced expiratory volume in the 1st s, FEV1)、第 1 s 用力呼气容积占用力肺活量的比值(Ratio of forced expiratory volume in 1 s to forced vital capacity, FEV1/FVC%)越小, 提示哮喘的病情程度越重, 血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 的表达量与 FEV1、FEV1/FVC%呈负相关性。结论: IL-13、TGF- β 1、VEGF 网络失衡是哮喘发病的主要机制之一, 三者哮喘发病中相互影响, 相互促进, 共同参与哮喘的气道炎症与重塑的过程; 联合检测血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平对判断哮喘患者病情严重程度及预后、辅助诊断及治疗具有重要价值。

【关键词】哮喘; 白介素-13; 转化生长因子- β 1; 血管内皮生长因子; 相关性

【中国图书分类法分类号】R562.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-01

Changes in expressions of serum IL-13, TGF- β 1, VEGF and their relationship with airway inflammation and remodeling in patients with asthma

LIU Yongsheng, ZHOU Fachun

(Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To discuss whether serum interleukin-13(IL-13), transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), vascular endothelial growth factor(VEGF) play a regulatory role in the pathogenesis of chronic air way inflammation and remodeling and to explore its possible way from the perspectives of cytokine. **Methods:** Totally 36 cases of acute asthma at onset stage(20 cases of moderate to severe attack and 16 cases of mild attack), 36 cases in remission and 36 healthy cases were enrolled. The venous blood was extracted at the elbow. ELISA was used to determine serum IL-13, TGF- β 1 and VEGF level; lung function testing was performed on all patients and the results were statistically analyzed. **Results:** The expressions of serum IL-13, TGF- β 1 and VEGF were positively correlated in patients with asthma. At the same time, the higher the serum concentrations of the above three indicators, the lower the forced expiratory volume in the 1st s(FEV1) and the ratio of FEV1 to forced vital capacity(FEV1/FVC%), indicating that asthma becoming more and more serious. The expressions of serum IL-13, TGF- β 1 and VEGF were negatively correlated with FEV1 and FEV1/FVC%. **Conclusions:** The network imbalance of IL-13, TGF- β 1 and VEGF is one of the main mechanisms for asthma onset. Mutual influence and promotion are found among the three indicators in chronic air way inflammation and remodeling. United detection of serum IL-13, TGF- β 1 and VEGF is of great importance in judging disease severity and providing prognosis, auxiliary diagnosis and treatment for patients with asthma.

【Key words】asthma; interleukin-13; transforming growth factor- β 1; vascular endothelial growth factor; correlation

作者介绍: 刘永生(1970-), 男, 副主任医师, 硕士,

研究方向: 急、重症医学。

通信作者: 周发春, 男, 主任医师, Email: zfc88@126.com。

支气管哮喘是严重危害人类健康的一种慢性呼吸道疾病,其发病机制目前仍不明确,更多研究表明细胞因子网络失衡在哮喘的发病中可能起着重要的作用^[1]。气道炎症与气道重塑是哮喘最常见的病理改变^[2],其过程由大量的细胞因子介导,最主要的细胞因子是炎症因子和生长因子,以白介素-13 (Interleukin-13, IL-13)、转化生长因子- β 1 (Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 为代表。本研究旨在分析 IL-13、TGF- β 1、VEGF 在支气管哮喘患者血清中的动态变化及三者之间的相关性,并探讨其与气道炎症、气道重塑的关系,研究哮喘的可能发病机制,为支气管哮喘的病情判断和治疗提供帮助。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

血清细胞因子测定用美国伯乐公司生产的酶联免疫分析仪,试剂盒购于上海森雄公司;肺功能测定应用日本佳能公司生产的 AS-505 型肺功能仪。

1.2 一般资料

收集本院 2010 年 2 月至 2011 年 6 月门诊、急诊或住院患者 72 例,正常对照组 36 例 (C 组)、支气管哮喘急性发作者 36 例 (A 组)、支气管哮喘临床缓解者 36 例 (B 组)。C 组:36 例,男 23 例,女 13 例,年龄 24~60 岁,平均年龄 (35.1 $\pm$ 9.2) 岁,其中吸烟 20 例;A 组:男 26 例,女 10 例,年龄 18~55 岁,平均年龄 (36.7 $\pm$ 7.8) 岁,均符合 2007 年中华医学会制定的《哮喘诊治指南》诊断标准^[3]。其中轻度发作 20 例 (A1 组),中、重度发作 16 例 (A2 组);B 组:其中男 20 例,女 16 例,年龄 17~56 岁,平均年龄 (35.7 $\pm$ 8.2) 岁,均按照 2008 版全球哮喘防治倡议 (Global initiative for asthma of 2008, 2008 GINA) 方案联合治疗后,喘累、气促等症状明显缓解,肺功能恢复到急性发作前水平,并持续 4 周以上 (参照 2007 年《哮喘诊治指南》中对于支气管哮喘临床缓解期的定义)。

C 组与 A、B 组基线水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。C 组排除标准:慢性阻塞性肺疾病 (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、冠心病、高血压等心血管系统疾病;急慢性肝肾疾病;精神系统疾病和其他系统感染性疾病。A、B 组排除标准:呼吸道其它疾病;冠心病、高血压等心血管疾病;急慢性肝肾疾病;神经系统疾病、皮肤病、糖尿病;神经精神系统疾病和其他系统感染性疾病。

所有对象行肺功能检查,测定第 1 s 用力呼气容积 (Forced expiratory volume in the 1st s, FEV1)、用力肺活量 (Forced vital capacity, FVC),计算第 1 s 用力呼气容积占用力肺活量的

比值 (Ratio of forced expiratory volume in the 1st s to forced vital capacity, FEV1/FVC%)。于清晨空腹安静状态下采集血浆冻存待测。

1.3 研究方法

1.3.1 标本采集 抽取受试者清晨空腹肘静脉血 4 ml,以 3 500 r/min $\times$ 10 min 离心,15 min 后提取血浆冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中统一待测,注意溶血的标本应去除。

1.3.2 检测方法 采用 ELISA 法,具体操作严格按说明书步骤进行。所用试剂均购于上海森雄公司,采用美国伯乐酶联免疫分析仪。具体方法:将抗人 IL-13、TGF- β 1、VEGF 单抗包被在酶标板上,标准品和样品中的 IL-13、TGF- β 1、VEGF 与单抗结合;加入生物素化的抗人 IL-13、TGF- β 1、VEGF 抗体,形成免疫复合物,连接在酶标板上,在 450 nm 处测定吸光度 (Absorbance, A) 值,IL-13、TGF- β 1、VEGF 浓度与 A 值呈正比,通过拟和双对数直线回归方程式,根据测到的标本 A 值在曲线上找到相应的 IL-13、TGF- β 1、VEGF 的浓度值,敏感度:1.0 pg/ml。

1.3.3 结果计算 选取所有 A 值都应减除空白值后再行计算,以标准品浓度为横坐标, A 值为纵坐标,于坐标纸上作图,画出标准曲线,根据样品 A 值在该曲线图上查出相应样品含量,有稀释的样品将所得结果再乘上稀释倍数即可。

1.3.4 肺功能测定 所有对象均作肺功能检查,哮喘患者在发作期及缓解期分别作肺功能测定,用佳能 AS-505 型肺功能仪,测定 FVC、FEV1、FEV1/FVC%。

1.4 统计学处理

用 SPSS 19.0 软件进行统计处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示;两组间比较采用两样本 t 检验;3 组样本均数比较采用方差分析;两者之间相关性采用直线相关分析; $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组 IL-13、VEGF、TGF- β 1、肺功能测定及比较

哮喘患者血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平急性发作期明显高于缓解期,缓解期明显高于健康体检者;肺功能 (FEV1、FEV1/FVC%) 急性发作期明显低于缓解期;缓解期明显低于健康体检者。 P 均 <0.01 ,结果见表 1。

2.2 病情严重程度对 IL-13、VEGF、TGF- β 1 及肺功能的影响

中、重度哮喘患者发作期血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平显著高于轻度哮喘患者,肺功能 (FEV1、FEV1/FVC%) 中、重度组明显低于轻度组。 $P<0.01$,见表 2。

2.3 发作期血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 之间及与肺功能 FEV1、FEV1/FVC% 相关性

哮喘患者发作期、缓解期血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 3 者水平互呈正相关 (r 分别为 0.771、0.661、0.615; P 均 <0.01)、 (r 分别为 0.652、0.731、0.623, P 均 <0.01)。哮喘患者急性发作

表 1 不同组 IL-13、VEGF、TGF- β 1、肺功能测定及比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)Tab.1 Measurement and comparison of IL-13, VEGF, TGF- β 1 and pulmonary function detection among different groups ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	例数 (n)	IL-13	VEGF	TGF- β 1	FEV1	FEV1/FVC%
A组	36	68.53 $\pm$ 13.11	421.95 $\pm$ 125.33	730.81 $\pm$ 129.65	50.84 $\pm$ 5.43	65.98 $\pm$ 4.65
B组	36	40.41 $\pm$ 8.19 [*]	214.09 $\pm$ 98.79 [*]	476.07 $\pm$ 76.83 [*]	86.68 $\pm$ 6.19 [*]	75.15 $\pm$ 4.17 [*]
C组	36	22.28 $\pm$ 2.33 [▲]	99.88 $\pm$ 34.75 [▲]	321.03 $\pm$ 51.31 [▲]	92.99 $\pm$ 3.62 [▲]	84.56 $\pm$ 4.12 [▲]

注:与对照组比较, ▲, $P < 0.01$; 与发作期比较, ★, $P < 0.01$

表 2 病情严重程度对 IL-13、VEGF、TGF- β 1 及肺功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)Tab.2 Influence of pathogenetic severity on IL-13, VEGF, TGF- β 1 and pulmonary function ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	例数 (n)	IL-13	VEGF	TGF- β	FEV1	FEV1/FVC%
A2组	16	78.81 $\pm$ 10.79	532.51 $\pm$ 102.18	824.03 $\pm$ 110.29	45.96 $\pm$ 2.92	61.67 $\pm$ 2.95
A1组	20	60.38 $\pm$ 7.66	333.51 $\pm$ 46.59	656.23 $\pm$ 90.49	54.75 $\pm$ 3.95	69.43 $\pm$ 2.18
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
t 值		7.18	9.14	5.56	-31.67	-19.53

期血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平与 FEV1 呈显著负相关(r 分别为-0.912、-0.896、-0.930, P 均 <0.01), 哮喘患者急性发作期血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平与 FEV1/FVC%呈显著负相关(r 分别为-0.936、-0.911、-0.978, P 均 <0.01)。见表 3。

表 3 发作期血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 之间及与肺功能 FEV1、FEV1/FVC%相关性Tab.3 Correlation between serum IL-13, TGF- β 1, VEGF and FEV1, FEV1/FVC% at onset stage

因子	IL-13	TGF- β 1	VEGF
IL-13	-	0.771	0.661
TGF- β 1	0.771	-	0.615
FEV1	-0.912	-0.896	0.020
FEV1/FVC%	-0.936	-0.911	-0.978

“-”:未检测

3 讨 论

支气管哮喘是呼吸道最常见的疾患之一,其发病机制尚不明确,研究表明细胞因子网络失衡在哮喘的发病中起着重要的作用。气道炎症与气道重塑是哮喘最常见的病理改变,现在国内外大量研究证实,炎症与生长因子同时既参与气道的炎症反应,也参与气道重塑过程;气道炎症与气道重塑同时发生,无明显先后之分。目前认为,IL-13、TGF- β 1、VEGF 3 者之间的失衡可能是哮喘发病的主要机制之一。

3.1 IL-13 在哮喘发病机制中的研究

IL-13 是一种重要的由活化的 Th2 细胞分泌的多效能细胞因子,在与哮喘有关的炎症因子中,IL-13 占有首要地位,它可以单独介导引起哮喘,是哮喘炎症过程中起主导作用的因子^[4],其与气道的炎

症反应和免疫调节有关,许多研究也证实 IL-13 与支气管哮喘关系密切。Kumar 等^[5]通过实验证明 IL-13 能直接刺激成纤维细胞活化、增殖直接参与气道重塑,同时 IL-13 可诱导支气管平滑肌细胞分泌 VEGF^[6],还能通过刺激转化生长因子产生 TGF- β 1^[7],间接参与呼吸道重塑过程。

3.2 TGF- β 1 在哮喘发病机制中的研究

TGF- β 1 是一种公认的具有强烈致纤维化作用的细胞因子,能刺激气道平滑肌细胞分裂与增殖,导致平滑肌增生和肥大,在气道重塑中起着关键性的作用^[8];另一方面,它能延长 TH2 细胞的存活期而使 IL-13 生成增加^[9],故引起促炎症因子 IL-13 等在血清中的水平上升而参与气道炎症反应。

3.3 VEGF 在哮喘发病机制中的研究

VEGF 通过引起血管通透性增加而促进血浆蛋白如白蛋白和纤维素的渗出,从而导致上皮下组织的纤维化和基底膜的肥厚,引起气道壁的增厚、黏膜的水肿,最终导致气道的管腔的缩小^[10];亦有研究发现,它能促进 TH2 细胞活化生成 IL-13 和 TGF- β 1 生成^[11]。

3.4 本实验结果

本次研究结果显示:哮喘患者血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平具有显著的正相关性;并与肺功能客观评价指标 FEV1、FEV1/FVC%存在负相关。前者与其他研究相一致,证实 3 个因子在气道的炎症与重塑过程中,相互刺激相互影响,相互促进,起到相辅相成的作用,一个因子的启动类似于打开了“炎症循环反应”的开关,并提示这可能是慢性炎症长期反复迁延的一个重要原因;而 3 个指标与肺功能显

著的负相关性,提示血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平越高,哮喘的病情程度越重,反之亦然,因此联合检测血清 IL-13、TGF- β 1、VEGF 表达水平对判断哮喘患者病情严重程度及预后、辅助诊断及治疗具有重要价值。该实验还发现 3 者在哮喘缓解期患者血清中仍有较高表达,为哮喘缓解期仍需治疗提供了理论依据。本次实验的局限之处在于未能动态监测 3 项指标血清水平与住院时间、治疗情况及预后的关系,笔者推测如果 3 个指标能够动态的下降,则提示预后较好。

3.5 研究展望

剑桥抗体技术中心最新发布,应用抗 IL-13 抗体单抗治疗重度持续哮喘已进入第 1 期临床试验阶段,初步结果表明它是安全有效的。可见 IL-13 有望成为难治性哮喘治疗的重要新靶点;McMillan 等^[12]进行行动物实验后认为可用抗 TGF- β 1 抗体治疗哮喘;VEGF 受体阻断剂 SU5614 和 SU1498 可以降低气道的高反应和血浆渗出,改善哮喘大鼠的症状和病理改变^[13],这为本实验的后续研究提供了一定的依据,本研究基于血清学蛋白表达水平上的临床研究,通过 3 个因子相互之间及其与哮喘患者肺功能的良好相关性,提示 IL-13、TGF- β 1、VEGF 在哮喘的炎症重塑发生机制中,或许存在一个共同通路或者受体,当抑制其活性后,就相当于关掉了哮喘发病机制的“开关”,这是笔者下一步拟进行的在信号通路甚至是基因学水平上的研究,希望通过从控制 IL-13、TGF- β 1、VEGF 水平明确地对气道炎症和重塑进行靶向治疗,在临床上控制哮喘患者的急性发作和改善预后。

参 考 文 献

- [1] 王立波,郭履伟.人类 TH 细胞亚群与支气管哮喘[J].国外医学免疫学分册,2009,18(1):21.
Wang L B,Guo L W.Human TH cell subset and bronchial asthma[J]. Immunology Fascicule Overseas Medicine,2009,18(1):21.
- [2] Elias J A,Zhu Z,Chupp G,et al.Airway remodeling in asthma[J]. Clin Invest,1999,104(8):1001-1006.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.哮喘诊治指南(2007 年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志,2007,30(1):8.
The Asthma Group of Respiratory Disease Branch of Chinese Medical Association.Guide for the diagnoses and therapeutics of Asthma[J].Chin J Tuberc Respir Dis,2007,30(1):8.
- [4] Van der Pouw Kraan T C, Van der Zee J S, Boeijs L C, et al. The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients[J]. Clin Exp Immunol,1998,111(1):129-135.
- [5] Kumar P K, Herbert C, Yang M, et al. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodeling in a mouse model of chronic asthma[J]. Clin Exp Allergy,2002,32(7):1104-1111.
- [6] Wen F Q, Liu X, Manda W, et al. TH2 Cytokine-enhanced and TGF- β -enhanced vascular endothelial growth factor production by cultured human airway smooth muscle cells is attenuated by IFN- γ and corticosteroids[J]. J Allergy clin immunol,2003,111(6):1307-1318.
- [7] Camoretti-Mercado B, Solway J. Transforming growth factor- β 1 and disorders of the lung[J]. Cell Biochem Biophys,2005,43(1):131-148.
- [8] Makinde T, Murphy R F, Agrawal D K. The regulatory role of TGF- β in airway remodeling in asthma[J]. Immunol Cell Biol,2007,85(5):348-356.
- [9] Olsson N, Piek E, Sundstrom M, et al. Transforming growth factor beta mediated mast cell migration depends on mitogenactivated protein kinase activity[J]. Cell Signal,2001,13(7):483-490.
- [10] Kazi A S, Lotfi S, Goncharova E A, et al. Vascular endothelial growth factor-induced secretion of fibronectin is ERK dependent[J]. Am J physiol lung cell Mol Physiol,2004,286(3):L539-545.
- [11] Luo X, Ding L, Xu J, et al. Gene expression profiling of leiomyoma and myometrial smooth muscle cells in response to transforming growth factor- β [J]. Endocrinology,2005,146(3):1097-1118.
- [12] McMillan S J, Xanthou G, Lloyd C M. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF- β antibody: effect on the Smad signaling pathway[J]. J Immunol,2005,174(9):5774-5780.
- [13] Lee Y C, Kwak Y G, Song C H. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma[J]. J Immunol,2002,168(7):3595-3600.

(责任编辑:关蕴良)