

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.017
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0086-05

血清 1, 25-(OH)₂D₃ 和 MMP-9 对哮喘患儿病情发生发展的影响

杨云¹, 焦德清², 周利³

(1. 四川省广元市第三人民医院 儿科, 四川 广元 628001; 2. 四川省广元市中心医院 儿科, 四川 广元 628000; 3. 四川省广元市第四人民医院 儿科, 四川 广元 628001)

摘要: 目的 探讨哮喘患儿血清 1, 25-二羟基维生素 D₃[1, 25-(OH)₂D₃] 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 水平对哮喘患儿病情发生发展的影响。**方法** 选取 2014 年 1 月-2016 年 3 月广元市第三人民医院收治的 62 例支气管哮喘患儿为研究对象, 归为观察组, 根据严重程度分为轻度组 ($n=17$) 和中重度组 ($n=45$), 并选取同期因呼吸道异物或先天畸形住院的 30 例患儿作为对照组。采用酶联免疫吸附法测定并比较不同组别患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平, 以及血清、支气管肺泡灌洗液 (BALF) 的 MMP-9 水平。根据血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平将所有哮喘患儿分为维生素 D (VD) 正常组 ($>30\mu\text{g/L}$, $n=9$)、VD 不足组 ($20\sim 30\mu\text{g/L}$, $n=15$) 及 VD 缺乏组 ($<20\mu\text{g/L}$, $n=38$), 比较 3 组的血清、BALF 的 MMP-9 水平。采用 Pearson 相关分析来探讨哮喘患儿血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与血清、BALF 的 MMP-9 水平的关系。**结果** ①观察组患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 观察组低于对照组。观察组血清及 BALF 的 MMP-9 水平与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 观察组高于对照组。②中重度组患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与轻度组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 中重度组低于轻度组。血清及 BALF 的 MMP-9 水平与轻度组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 中重度组高于轻度组。③VD 正常组的血清与 BALF 的 MMP-9 水平与另外两组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), VD 正常组低于另外两组。VD 不足组的血清与 BALF 的 MMP-9 水平与 VD 缺乏组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), VD 不足组低于 VD 缺乏组。Pearson 相关分析结果表明哮喘患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与血清 MMP-9 水平呈负相关, 与 BALF 的 MMP-9 水平呈负相关。**结论** 哮喘患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平下降, 而血清及 BALF 的 MMP-9 水平升高, 两者共同参与了患儿的呼吸道炎症反应和气道重塑过程, 提高 VD 水平可能有助于改善其病情。

关键词: 1, 25-二羟基维生素 D₃; 基质金属蛋白酶 9; 哮喘; 呼吸道重塑

中图分类号: R725.6

文献标识码: A

Effect of serum 1, 25-(OH)₂D₃ and MMP-9 on development of asthma in children

Yun Yang¹, De-qing Jiao², Li Zhou³

(1. Department of Pediatrics, the Third People's Hospital of Guangyuan, Guangyuan, Sichuan 628001, China; 2. Department of Pediatrics, Guangyuan Central Hospital, Guangyuan, Sichuan 628000, China; 3. Department of Pediatrics, the Fourth People's Hospital of Guangyuan, Guangyuan, Sichuan 628001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of serum 1,25-dihydroxy vitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃] and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) on the development of asthma in children. **Methods** Sixty-two children with asthma in the Third People's Hospital of Guangyuan from January 2014 to March 2016 were enrolled into the study as

observation group, and divided into the mild group ($n = 17$) and moderate to severe group ($n = 45$). Thirty children with tracheal foreign body or abnormal airway were selected as control group. The level of 1,25-(OH)₂D₃ in the serum and the levels of MMP-9 in the serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and compared among these groups. According to the serum 1,25-(OH)₂D₃ levels, all children with asthma were divided into normal vitamin D (VD) group ($> 30 \mu\text{g/L}$, $n = 9$), insufficient VD group ($20-30 \mu\text{g/L}$, $n = 15$) and deficient VD group ($< 20 \mu\text{g/L}$, $n = 38$), and the levels of MMP-9 in serum and BALF were compared between the three groups. Pearson correlation analysis was used to investigate the relationships of serum 1,25-(OH)₂D₃ level with serum and BALF MMP-9 levels in children with asthma. **Results** Serum 1,25-(OH)₂D₃ level in the observation group was significantly lower than that in the control group, while serum and BALF MMP-9 levels were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). Serum 1,25-(OH)₂D₃ level in the moderate to severe group was significantly lower than that in the mild group, while serum and BALF MMP-9 levels were significantly higher than those in the mild group ($P < 0.05$). Serum and BALF MMP-9 levels in the normal VD group were significantly lower than those in the other two groups, and serum and BALF MMP-9 levels in the insufficient VD group were significantly lower than those in the deficient VD group ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis result showed that serum 1,25-(OH)₂D₃ level of children with asthma was negatively correlated with MMP-9 levels in the serum and BALF ($P < 0.05$). **Conclusions** Serum 1,25-(OH)₂D₃ level of children with asthma is significantly decreased while serum and BALF MMP-9 levels significantly increase, so they are both involved in airway inflammation and remodeling in children with asthma, and increasing VD level may help to improve the condition of the children.

Keywords: 1,25-dihydroxy vitamin D₃; matrix metalloproteinase-9; asthma; airway remodeling

哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病,多个细胞及细胞组分参与其中,常表现为反复发作的喘息、胸闷、气急或咳嗽等症状,气道炎症及呼吸道重塑是哮喘主要的病理生理机制。维生素D(Vitamin D, VD)是一种固醇类衍生物,1,25-二羟基维生素D₃[1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25-(OH)₂D₃]是其生物作用形式,可与受体结合发挥生物学效应,1,25-(OH)₂D₃除了可调节体内的钙磷平衡,还能起到影响呼吸道重塑、免疫调节、抗炎等多个功能,参与到哮喘的发病中。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)属于蛋白水解酶家族,主要调节体内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的代谢,可降解大部分ECM,在该家族中,MMP-9是降解ECM的最主要的成员,而呼吸道重塑过程属于ECM的重塑,故MMP-9在气道重塑中同样起到了重要作用。本研究分析哮喘患儿的血清1,25-(OH)₂D₃及血清、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中MMP-9的水平,旨在探讨两者在哮喘的发病中的作用与意义。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年1月-2016年3月期间广元市第三人民医院收治的62例支气管哮喘患儿为研究对象。

纳入标准:①符合2008年中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的儿童支气管哮喘的诊断标准^[1];②处于缓解期,近1个月内未出现哮喘发作;③能配合完成纤支镜检查及支气管肺泡灌洗术。排除标准:①近3个月服用钙剂或维生素D片;②合并严重的肝、肾、心功能不全或甲状腺疾病或骨质疏松;③近1个月内服用免疫调节剂或糖皮质激素。对所有哮喘患儿按照相关指南^[1]进行严重程度分级,分为轻度组($n = 17$)和中重度组($n = 45$)。并选取同期因呼吸道异物或先天畸形住院的30例患儿作为对照组,均无免疫系统疾病或过敏性疾病或肝肾功能不全,近1个月均未出现感染。观察组患儿男41例,女21例,平均年龄(5.52 ± 3.12)岁,平均体重(14.25 ± 8.31)kg;对照组患儿男23例,女7例,平均年龄(4.83 ± 3.29)岁,平均体重(12.93 ± 8.51)kg。两组的性别、年龄、体质质量等基线资料比较,差异无统计学意义。所有患儿及其家属均自愿参加本研究,已签署知情同意书,本研究已通过该院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 血清与BALF的采集 所有患儿均采集5 ml 静脉血,静置2 h后离心($2000 \text{ r/min} \times 15 \text{ min}$),留取血清, -80°C 待测。观察组患儿在进行纤支镜检查后行右侧肺叶的支气管肺泡灌洗术,对照组患儿仅进行右肺中叶或非异物侧肺叶的支气管肺泡灌洗术,具体

方法为：通过支气管镜吸引孔注入无菌盐水（9 g/L、37℃），灌注 2 次，若体重 ≥ 20 kg，则每次灌注量为 10 ml；若体重 < 20 kg，则每次灌注量为 5 ml，灌注后均立即以 100 ~ 150 mmHg 进行负压吸引。

1.2.2 血清与 BALF 的检测 将第 1 次 BALF 进行病原学检查，第 2 次 BALF 进行离心（1 500 r/min \times 10 min、4℃），取上清液置于 -80℃ 保存待测。采用酶联免疫吸附法测定所有患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平，以及血清、BALF 的 MMP-9 水平。并根据血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平将所有哮喘患儿分为 VD 正常组（ $>30 \mu\text{g/L}$ ， $n=9$ ）、VD 不足组（20 ~ 30 $\mu\text{g/L}$ ， $n=15$ ）及 VD 缺乏组（ $<20 \mu\text{g/L}$ ， $n=38$ ）。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析，计数资料采用 χ^2 检验。计量资料首先进行正态性检验，若呈正态分布，则以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组比较用 t 检验，多组比较用方差分析，然后用 SNK q 检验进行两两比较，否则以中位数及四分位数间距表示，用非参数检验。采用 Pearson 相关分析来探讨哮喘患儿血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与血清、BALF 的 MMP-9 水平的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组与对照组患儿的血清及 BALF 的检测结果比较

观察组患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，观察组低于对照组。观察组血清及 BALF 的 MMP-9 水平与对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，观察组高于对照组。见表 1。

2.2 不同严重程度哮喘患儿血清及 BALF 的检测结果比较

中重度组患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与轻度组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，中重度组低于轻度组。血清及 BALF 的 MMP-9 水平与轻度组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，中重度组高于轻度组。见表 2。

2.3 不同血清 VD 水平患者的血清与 BALF 的 MMP-9 水平比较

如表 3 所示，VD 正常组的血清与 BALF 的 MMP-9 水平与另外两组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，VD 正常组低于另外两组，VD 不足组的血

表 1 观察组与对照组患儿的血清及 BALF 的检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清 1, 25-(OH) ₂ D ₃ 水平	血清 MMP-9 水平	BALF 的 MMP-9 水平
观察组 ($n=62$)	20.13 \pm 6.57	138.63 \pm 25.79	8.29 \pm 1.67
对照组 ($n=30$)	40.16 \pm 6.92	58.06 \pm 11.27	5.58 \pm 0.92
t 值	13.473	16.337	8.285
P 值	0.000	0.000	0.000

表 2 中重度组与轻度组的哮喘患儿血清及 BALF 的检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清 1, 25-(OH) ₂ D ₃ 水平	血清 MMP-9 水平	BALF 的 MMP-9 水平
轻度组 ($n=17$)	27.16 \pm 4.13	101.66 \pm 16.89	9.56 \pm 0.85
中重度组 ($n=45$)	17.47 \pm 5.06	152.60 \pm 20.30	7.81 \pm 1.17
t 值	7.045	9.199	5.619
P 值	0.000	0.000	0.000

表 3 不同血清 VD 水平患者的血清与 BALF 的 MMP-9 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清 MMP-9 水平	BALF 的 MMP-9 水平
VD 正常组 ($n=9$)	101.15 \pm 8.50	5.87 \pm 1.09
VD 不足组 ($n=15$)	125.37 \pm 15.87 ¹⁾	7.66 \pm 1.01 ¹⁾
VD 缺乏组 ($n=38$)	152.74 \pm 20.69 ¹⁾²⁾	9.11 \pm 1.25 ¹⁾²⁾
F 值	45.893	40.269
P 值	0.000	0.000

注：1) 与 VD 正常组比较， $P < 0.05$ ；2) 与 VD 不足组比较， $P < 0.05$ 。

清与 BALF 的 MMP-9 水平与 VD 缺乏组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), VD 不足组低于 VD 缺乏组。

2.4 Pearson 相关分析结果

结果表明, 所有哮喘患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与血清 MMP-9 水平呈负相关 ($r = -0.752$, $P = 0.000$), 与 BALF 的 MMP-9 水平呈负相关 ($r = -0.698$, $P = 0.000$)。

3 讨论

以往多个研究提示, 血 VD 水平的缺乏与支气管哮喘、活动性肺结核^[2]、急性呼吸窘迫综合征^[3]、慢性阻塞性肺疾病^[4] 等多个呼吸系统疾病有关。本研究结果表明支气管哮喘患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平低于支气管畸形或异物者, 并且中重度哮喘患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平低于轻度者, 与国外以往研究^[5] 结果类似, 提示哮喘患儿容易出现 VD 缺乏或不足, 且哮喘严重程度与 VD 水平有关, 提高 VD 水平可能有助于缓解哮喘发作症状。GUPTA 等^[6] 研究表明绝大部分存在激素抵抗性的支气管哮喘患儿存在血清 VD 水平降低的表现, 且其水平与哮喘严重程度、第 1 秒用力呼气量呈正相关, 与呼出气一氧化氮量、激素使用量呈负相关。TIAN 等^[7] 研究表明对哮喘患儿补充 1, 25-(OH)₂D₃ 可减轻炎症反应、降低气道高反应性, 影响呼吸道重构过程, 从而有效缓解哮喘发作症状的严重程度, 故 1, 25-(OH)₂D₃ 可应用于临床。这可能与 1, 25-(OH)₂D₃ 对细胞因子的调节作用、血管重塑等有关。有动物研究^[8] 结果表明对哮喘大鼠模型给予 1, 25-(OH)₂D₃ 能降低血清 IgE 水平及 BALF 中嗜酸性粒细胞的数量, 促进白细胞介素 10 (IL-10)、转化生长因子 β (TGF- β) 的分泌, 抑制炎症反应。MOLINARI 等对人脐静脉内皮细胞进行体外研究, 发现 VD 不仅能与受体结合, 通过对蛋白激酶 B、细胞外信号调节激酶、p38 等信号通路引起内皮型一氧化氮合酶的活化, 引起血管重塑, 还可直接诱导内皮细胞一氧化氮的生成, 从而抑制血管平滑肌细胞的迁移与增殖, 维持内皮细胞的完整性。GE 等^[9] 研究表明与 VD 结合蛋白基因敲除的大鼠相比, 野生型大鼠更容易出现肺微血管渗液及出血, 提示 VD 可能通过与 VD 结合蛋白结合进而影响肺的微血管内皮细胞。

本研究还发现观察组患儿血清、BALF 的 MMP-9 水平均高于对照组, 且中重度组患儿的血清、BALF

的 MMP-9 水平高于轻度组, 提示 MMP-9 可能同样参与了哮喘的发生发展过程中。ECM 的沉积与降解失衡是哮喘气道结构异常重建的重要原因, 在这个过程中, MMP-9 发挥了重要作用, 其可降解多糖以外的大部分 ECM 成分。基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1) 是 MMP-9 的特异性抑制剂, 在生理情况下 TIMP-1 与 MMP-9 以 1 : 1 的比例结合, 从而抑制 MMP-9 的活性。朱艳等^[10] 研究表明哮喘患儿急性发作期血 MMP-9、TIMP-1 及 MMP-9/TIMP-1 的比例均高于稳定期哮喘患儿及健康者, 哮喘患儿的 MMP-9 表达强度大于 TIMP-1, 提示 MMP-9 与 TIMP-1 的失衡与呼吸道重塑有关, 参与了哮喘的发病。值得注意的是, 本研究发现哮喘患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平与血清、BALF 的 MMP-9 水平均呈负相关, VD 缺乏越严重, 患儿的 MMP-9 表达水平越高, 提示 VD 与 MMP-9 共同参与了哮喘的呼吸道重塑过程, 提高 VD 水平可能抑制其重塑。BRITT 等^[11] 对胎儿呼吸道平滑肌细胞加用 1, 25-(OH)₂D₃, 结果显示 1, 25-(OH)₂D₃ 可通过减少肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 来抑制 MMP-9 的表达和活性, 且 1, 25-(OH)₂D₃ 能通过减少 TGF- β 与 TNF- α 来抑制的 III 型胶原纤维的表达, 抑制呼吸道平滑肌细胞的增殖。LI 等^[12] 研究显示对大鼠给予 VD 缺乏的饮食并行卵巢切除术, 发现此类大鼠的关节软骨细胞分泌 MMP-9 与 MMP-33 的能力增强, 相反, 补充 1, 25-(OH)₂D₃ 则抑制 MMP-9 与 MMP-33 的表达。刘飒等^[13] 研究表明对支气管哮喘患者而言, 常规治疗+VD 治疗组的血清 IL-2、TNF- α 水平低于常规治疗组, 且哮喘控制测试 (ACT 评分) 显示完全控制及部分控制患者比例高于常规治疗组, 提示补充血清 VD 可降低气道反应性, 提高哮喘的疗效。

综上所述, 哮喘患儿的血清 1, 25-(OH)₂D₃ 水平下降, 而血清及 BALF 的 MMP-9 水平升高, 两者共同参与了患儿的呼吸道炎症反应和气道重塑过程, 提高 VD 水平可能有助于改善其病情。

参 考 文 献:

- [1] 中华医学会儿科学会呼吸学组《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南 [J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 745-753.
- [2] 韩骏锋, 吴琦. 血清维生素 D 水平与活动性肺结核患病的相关性 [J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(4): 312-315.

- [3] DANCER R C, PAREKH D, LAX S, et al. Vitamin D deficiency contributes directly to the acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. *Thorax*. 2015, 70(7): 617-624.
- [4] 张平, 罗红, 朱应群等. 维生素 D 缺乏在慢性阻塞性肺疾病患者中患病率及对患者生活质量的影响 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2012, 37(8): 802-806.
- [5] ISMAIL A M, ALY S S, FAYED H M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and CD4+CD25(+high) FoxP3+ Regulatory T cell as Predictors of Severity of Bronchial Asthma in Children[J]. *Egypt J Immunol*. 2015, 22(1): 9-18.
- [6] GUPTA A, SJOUKES A, RICHARDS D, et al. Relationship between serum vitamin D, disease severity, and airway remodeling in children with asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011, 184(12): 1342-1349.
- [7] TIAN W M, YANG Y G, SHANG Y X, et al. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the treatment of asthma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(12):1762-1769.
- [8] TAHER Y A, VAN ESCH B C, HOFMAN G A, et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta [J]. *J Immunol*, 2008, 180(8): 5211-5221.
- [9] GE L, TRUJILLO G, MILLER E J, et al. Circulating complexes of the vitamin D binding protein with G-actin induce lung inflammation by targeting endothelial cells [J]. *Immunobiology*, 2014, 219(3):198-207.
- [10] 朱艳. 哮喘患者血浆 IL-13、LTB-4、MMP-9、TIMP-1 变化及临床意义 [J]. *放射免疫学杂志*, 2010, 23(4): 429-431.
- [11] BRITTJR R D, FAKSH A, VOGEL E R, et al. Vitamin D attenuates cytokine-induced remodeling in human fetal airway smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(6): 1189-1198.
- [12] LI S, NIU G, WU Y, et al. Vitamin D prevents articular cartilage erosion by regulating collagen II turnover through TGF-β1 in ovariectomized rats[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(2): 345-353.
- [13] 刘飒, 戈艳蕾, 王红阳等. 维生素 D 治疗支气管哮喘患者临床疗效探讨 [J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(32): 80-82.

(张西倩 编辑)