

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.09.029  
文章编号: 1005- 8982 (2017) 09- 0133- 04

## 呼出气冷凝液中 LTB<sub>4</sub> 和 CCL11 水平与 儿童哮喘分期的研究

李莉<sup>1</sup>, 丁俊丽<sup>2</sup>, 荣杰鑫<sup>1</sup>, 李远波<sup>1</sup>, 王亚亭<sup>2</sup>  
(1. 安徽医科大学 研究生院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽医科大学  
第一附属医院 儿科, 安徽 合肥 230031)

**摘要:目的** 探索呼出气冷凝液 (EBC) 中白三烯 B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 和嗜酸性粒细胞趋化因子 (CCL11) 2 种标记物对儿童哮喘病情的评估作用。**方法** 收集 64 例哮喘患儿。其中, 急性发作期 33 例, 慢性持续期 18 例, 缓解期 13 例, 选同时期 8 例健康儿童作对照组。采用 R- Tube 收集每个实验对象的 EBC, 酶联免疫吸附法检测每个标本中 LTB<sub>4</sub> 和 CCL11。**结果** ① EBC 中 LTB<sub>4</sub> 水平从高到低依次为发作组 (70.89± 8.31) pg/ml、持续组 (35.27± 6.61) pg/ml、缓解组 (24.58± 4.90) pg/ml、对照组 (15.53± 3.24) pg/ml, 各组间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ② EBC 中 CCL11 水平最高为哮喘发作组 (3.38± 0.65) pg/ml, 其次为持续组 (2.46± 0.52) pg/ml、缓解组 (0.90± 0.36) pg/ml 和对照组 (0.71± 0.26) pg/ml, 缓解组与对照组比较, 差异无统计学意义。**结论** EBC 中 LTB<sub>4</sub>, CCL11 水平能反映哮喘气道炎症及其控制情况, 对哮喘患儿病情的评估有一定价值。

**关键词:** 儿童; 支气管哮喘; 呼出气冷凝液; 白三烯 B<sub>4</sub>; 嗜酸性粒细胞趋化因子  
**中图分类号:** R725.6; R562.25 **文献标识码:** A

### Role of LTB<sub>4</sub> and CCL11 levels of exhaled breath condensate in assessment of asthma in children

Li Li<sup>1</sup>, Jun-li Ding<sup>2</sup>, Jie-xin Rong<sup>1</sup>, Yuan-bo Li<sup>1</sup>, Ya-ting Wang<sup>2</sup>  
(1. Graduate School, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230031, China; 2. Department  
of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,  
Hefei, Anhui 230031, China)

**Abstract: Objective** To investigate effect of leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and eotaxin (CCL11) in exhaled breath condensate (EBC) on the evaluation of asthma in children. **Methods** Sixty-four children with asthma were enrolled, including 33 with acute asthma exacerbation, 18 with chronic asthma and 13 with asthma remission; and 8 healthy children were enrolled as controls. The EBC of each subject was collected using R- Tube. LTB<sub>4</sub> and CCL11 were detected by ELISA in each sample. **Results** The LTB<sub>4</sub> levels of EBC in the order from high to low were the acute asthma exacerbation group [(70.89 ± 8.31) pg/ml], the chronic asthma group [(35.27 ± 6.61) pg/ml], the asthma remission group [(24.58 ± 4.90) pg/ml], and the control group [(15.53 ± 3.24) pg/ml]; there were significant differences among the groups ( $P < 0.05$ ). The CCL11 level of EBC was the highest in the acute asthma exacerbation group [(3.38 ± 0.65) pg/ml], followed by the chronic asthma group [(2.46 ± 0.52) pg/ml], the asthma remission group [(0.90 ± 0.36) pg/ml], and the control group [(0.71 ± 0.26) pg/ml]; there was no significant difference between the asthma remission group and the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The levels of LTB<sub>4</sub> and CCL11 in EBC can reflect the status of airway inflammation in asthma and its control. They are valuable in assessment of the condition of children with asthma.

**Keywords:** children; asthma; exhaled breath condensate; leukotriene B<sub>4</sub>; eotaxin

收稿日期: 2016- 11- 01

[通信作者] 王亚亭, E- mail: wangyating1348@126.com; Tel: 13856946681

哮喘是由多种细胞及多种细胞组分共同参与的气道慢性炎症。白三烯 B<sub>4</sub> leukotriene B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) 是目前已知最强的中性粒细胞趋化因子和活化因子之一<sup>[1]</sup>。嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin, CCL11) 对嗜酸性粒细胞的趋化具有高度特异性, 且对于抗原诱导的嗜酸性粒细胞在肺部组织的募集机制中起主要作用<sup>[2]</sup>。

近些年来新兴的呼出气冷凝液 (exhaled breath condensate, EBC) 检测, 与传统气道评价方法相比具有操作方便、无创、无不适、可多次重复等优点。本研究旨通过检测所有受试者 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 和 CCL11 的水平, 分析这 2 种标志物与哮喘分期是否相关。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 2 月 - 2016 年 6 月因哮喘就诊于安徽医科大学第一附属医院门诊的 64 例患儿, 纳入患儿符合<sup>[3]</sup>哮喘诊断标准。根据患儿临床表现分为 3 组: 急性发作期 (发作组) 33 例, 男性 21 例, 女性 12 例, 年龄 (6.90±2.78) 岁; 慢性持续期 (持续组) 18 例, 男性 14 例, 女性 4 例, 年龄 (6.85±2.80) 岁; 缓解期 (缓解组) 13 例, 男性 10 例, 女性 3 例, 年龄 (9.91±3.92) 岁。收集同期在门诊体检的健康儿童 8 例作为对照组, 男性 4 例, 女性 4 例, 年龄 (8.05±3.15) 岁。所有受试对象无其他慢性心肺疾患、实验前 1 周内无呼吸道感染、未口服或吸入糖皮质激素、未使用抗白三烯药物。各组年龄、性别比较, 差异无统计学意义。实验均通过受试者家属的知情同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 EBC 标本收集** EBC 标本的收集使用美国 Respiratory Research 公司生产的 R- Tube 管。收集前, 将铝制的冷却套筒装在 1 个真空包装袋中, 包装好置入 -86℃ 冰箱冷冻保存, 使之充分冷却。使用时将绝缘保护套套在冷却好的冷凝套筒外面, 再将 R- Tube 采集管套入冷凝套筒里面。然后用鼻夹夹住患者鼻子, 嘱其通过 R- Tube 上的口含器平静呼吸。持续 5~10 min。吸气时管中单向阀门关闭, 空气不能进入采集管。呼气时单向阀门打开, 引导呼出的气流进入采集管, 穿过冷凝套筒, 收集 EBC。将收集到的 EBC 标记后置入 -86℃ 冰箱冷冻保存备检。

**1.2.2 标本检测** 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 对 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 和 CCL11 进行检测。2 种 ELISA 试剂盒均采购

于英国的 Abcam 公司 (LTB<sub>4</sub> 的敏感性为 5.63 pg/ml, 检测范围 11.7~3 000.0 pg/ml; CCL11 的敏感性为 0.41 pg/ml, 检测范围 0.41~300.00 pg/ml)。检测过程严格按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用方差分析, 两两比较用 SNK-*q* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 水平与哮喘分期的关系

发作组 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 的为 (70.89±8.31) pg/ml, 持续组为 (35.27±6.61) pg/ml, 缓解组为 (24.58±4.90) pg/ml, 对照组为 (15.53±3.24) pg/ml, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=244.570, P=0.000$ )。

### 2.2 EBC 中 CCL11 水平与哮喘分期的关系

发作组 EBC 中 CCL11 的为 (3.38±0.65) pg/ml, 持续组为 (2.46±0.52) pg/ml, 缓解组为 (0.90±0.36) pg/ml, 对照组为 (0.71±0.26) pg/ml, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=89.748, P=0.000$ )。

## 3 讨论

哮喘是以气道炎症为特征的异质性疾病, 具有喘息、气促、胸闷和咳嗽的呼吸道症状, 伴可变的呼气气流受限。大多数患儿临床症状较轻。医生根据典型症状易于诊断和治疗。然而对于不典型哮喘, 或哮喘发病的早期诊断困难, 治疗时难以根据哮喘的临床或炎症表型设计个性化的治疗方案, 且有时一些合并症会影响哮喘的诊断及治疗。目前, 治疗方案的制定主要依据临床表现及症状和肺功能。该方法并非对哮喘患儿均有效。最近研究表明, 不同表型的哮喘即使临床症状相似, 对应的下呼吸道炎症的表现也是不尽相同的<sup>[4-5]</sup>。以往学者多通过肺活检或肺泡灌洗液检测来了解哮喘气道的炎症, 然后根据检测结果, 针对不同的发病机制及不同哮喘表型制定相应的治疗方案, 被验证是有效的<sup>[6-9]</sup>。但上述方法因为会对患者造成创伤或带来不适, 不能用于儿童哮喘的日常监测。科学家们开始寻找无创的检测方法分析炎症标志物, 定义炎症表型, 如诱导痰、尿液和呼出气冷凝液的检测。诱导痰检测结果易受口腔影响, 可引起气道痉挛, 造成危险, 且儿童呼吸道粘膜鲜嫩, 不易短期内重复操作。尿液中含有的哮喘标记物有限, 且标志物对哮喘炎症的真实反映有

待进一步证实。近年来新兴的 EBC 的检测具有无创、安全及可重复性好, EBC 直接来自于呼吸道, 结果可靠, 且检测操作并不会影响到疾病过程等优点, 被国内外越来越多学者重视。

传统认为, 痰嗜酸性粒细胞增多是哮喘气道炎症的特征之一, 但近年发现部分患者未升高, 而是以中性粒细胞浸润为主的气道炎症, 甚至在哮喘恶化和持续期, 升高的也是中性粒细胞<sup>[9]</sup>。LTB<sub>4</sub> 是已知活性最强的中性粒细胞趋化因子和化学动力物质, 是参与哮喘气道炎症的重要炎症介质。LTB<sub>4</sub> 主要来源于活化的巨噬细胞、中性粒细胞、血小和肥大细胞, 呼吸道上皮细胞在炎症反应中亦可生成少量的 LTB<sub>4</sub>。LTB<sub>4</sub> 有 2 种 G 蛋白偶联受体, 分别是高亲和力人白三烯 B<sub>4</sub> 受体 1 和低亲和力人白三烯 B<sub>4</sub> 受体 2。有研究表明, LTB<sub>4</sub> 是通过人白三烯 B<sub>4</sub> 受体 1 引起的哮喘<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, 发作组哮喘患儿 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 水平高于其他组, 支持 LTB<sub>4</sub> 参与哮喘发病的说法, 并可成功将急性发作期与其他各期区分。持续组患儿 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 水平低于发作组, 高于缓解组, 说明哮喘急性发作后气道内 LTB<sub>4</sub> 水平有所恢复, 但恢复缓慢, 需要一定的过程。缓解组患儿 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 水平高于对照组, 说明即使经典的吸入激素治疗哮喘使临床症状缓解, 气道内炎症仍在持续。如果有药物可降低气道内 LTB<sub>4</sub> 的水平, 将会是很好的哮喘治疗药物。最近就有研究报道, 齐留通可抑制 5-脂氧化酶而抑制 LTA<sub>4</sub> 的合成, 进而抑制体内的半胱氨酰白三烯及 LTB<sub>4</sub> 的合成, 在哮喘治疗中发挥积极作用<sup>[11]</sup>。这为哮喘的治疗提供新的思路。

嗜酸性粒细胞是体内参与哮喘及其他过敏性疾病的主要效应细胞。在支气管哮喘的发生过程中, 嗜酸性粒细胞可从外周血中趋化至肺部, 随后进一步释放炎症介质如花生四烯酸代谢物、氧自由基、细胞因子/趋化因子及细胞毒性颗粒蛋白等物质。CCL11 在抗原诱导的嗜酸性粒细胞在肺部组织的募集中起主要作用。且 CCL11 对嗜酸性粒细胞的趋化具有高度特异性, 只能特异性地与嗜酸性粒细胞上大量存在的 CCR3 受体结合, 且有高度亲和性。王涛等<sup>[12]</sup>研究证实, CCL11 与受体 CCR3 的结合引发的炎症在哮喘病理生理机制中的发挥重要作用。ZIETKOWSKI 等<sup>[13]</sup>将患儿 EBC 中 CCL11 的检测与运动激发试验相结合。发现 CCL11 可通过对嗜酸性粒细胞在肺部的迁移和提高嗜酸性粒细胞的活性

进而增强和延长运动激发试验的效果。本研究发作组 EBC 中 CCL11 水平最高, 更验证在受到刺激后, 哮喘患儿气道内 CCL11 的生成增加促进哮喘急性发作, 与 ZIETK-OWSKI 等的研究相似。在 ZIETKOWSKI 等<sup>[14]</sup>的研究中经吸入激素治疗后的缓解的哮喘患儿 EBC 中 CCL11 高于对照组。本研究中缓解组与对照组比较, 差异无统计学意义。原因有待进一步探究。有研究报道, 经奥马珠单抗(抗免疫球蛋白 E 单克隆抗体)治疗 16 周后, 哮喘患儿 EBC 中 CCL11 水平下降, 与呼出气 NO, 血清嗜酸性粒细胞阳离子蛋白, 外周血中嗜酸性粒细胞计数的下降相关<sup>[15]</sup>。这为哮喘的治疗提供可能的新的思路。

综上所述, 通过对 EBC 中 LTB<sub>4</sub> 和 CCL11 的检测, 验证 2 种炎症介质在哮喘发病机制中的重要作用。EBC 中 LTB<sub>4</sub> 的检测哮喘患儿的各个分期的结果差异有统计学意义, EBC 中 CCL11 的检测除缓解期, 在急性发作期和慢性持续期比较, 差异有统计学意义。这种检测方法对儿童哮喘的诊断及日常控制的监测有潜在的应用价值, 但儿童哮喘的各个分期时 EBC 中 2 种物质的具体取值范围还需要更多的研究确定, 所以离临床的实际应用还有一定的距离。同时本实验的研究结果也为儿童哮喘的临床治疗提供可能的创新治疗方法。

#### 参 考 文 献:

- [1] RAO N L, RILEY J P, BANIE H, et al. Leukotriene a(4) hydrolyase inhibition attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(9): 899-907.
- [2] IM G J, HWANG C S, JUNG H H, et al. Quantitative expression levels of regulated on activation, normal T cell expressed and secreted and eotaxin transcripts in toluene diisocyanate-induced allergic rats[J]. *Acta Otolaryngol*, 2005, 125(4): 370-377.
- [3] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《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.
- [4] HALDAR P, PAVORD I D, SHAW D E, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes[J]. *Respir Crit Care Med*, 2008, 178: 218-224.
- [5] MOORE W C, MEYERS D A, WENZEL S E, et al. Severe asthma research program: identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program[J]. *Respir Crit Care Med*, 2010, 181: 315-323.
- [6] HALDAR P, BRIGHTLING C E, HARGADON B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma[J]. *The New England and Journal of Medicine*, 2009, 360: 973-984.

- [7] CORREN J, LEMANSKE R F, HANANIA N A, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma[J]. *The New England and Journal of Medicine*, 2011, 365: 1088-1098.
- [8] WENZEL S E, FORD L, PEARLMAN D, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels[J]. *The New England and Journal of Medicine*, 2013, 368: 2455-2466.
- [9] DAVIES A R, HANCOX R J. Induced sputum in asthma: diagnostic and therapeutic implications[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19(1): 60-65.
- [10] YOKOMIZO T. Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2[J]. *Biochem*, 2015, 157(2): 65-71.
- [11] MORINA N, BO?ARI G, ILJAZI A, et al. Maximum time of the effect of antileukotriene-zileuton in treatment of patients with bronchial[J]. *Acta Inform Med*, 2016, 24(1): 16-19.
- [12] 王涛, 张建勇, 王秀丹, 等. CCR3 在哮喘小鼠气道组织 Muc5ac 表达中的作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(8): 1019-1023.
- [13] ZIETKOWSKI Z, SKIEPKO R, TOMASIAK-LOZOWSKA M M, et al. Eotaxin in exhaled breath condensate of allergic asthma patients with exercise-induced bronchoconstriction[J]. *Respiration*, 2011, 82: 169-176.
- [14] ZIETKOWSKI Z, TOMASIAK-LOZOWSKA M M, SKIEPKO R, et al. Eotaxin-1 in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients[J]. *Respiratory Research*, 2010, 11: 1101-1110.
- [15] ZIETKOWSKI Z, SKIEPKO R, TOMASIAK-LOZOWSKA M M, et al. Airway inflammation and eotaxin in exhaled breath condensate of patients with severe persistent allergic asthma during omalizumab therapy[J]. *Advances in Medical Sciences*, 2011, 56: 318-322.

(李科 编辑)