

论著·临床研究

慢性阻塞性肺疾病患者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 的水平及意义研究*

罗燕青, 张作清, 张昌红
(北京市石景山医院呼吸内科, 北京 100043)

摘要:目的 探究慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者血清及肺泡灌洗液中结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的水平及意义。方法 选择 2016 年 3 月至 2017 年 3 月于该院就诊的 COPD 患者 65 例作为研究对象,按照疾病严重程度分为急性加重期组(32 例)和稳定期组(33 例);另选择 35 例体检健康者作为对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法分别检测各组受试者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 水平,同时测定 COPD 患者用力肺活量(FVC)、第一秒用力呼气容积(FEV1)及 FEV1/FVC 等肺功能指标,分析血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 及其与肺功能的关系。结果 急性加重期组 COPD 患者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 水平明显高于稳定期组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);稳定期组血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。肺功能结果显示,急性加重期组肺功能指标 FVC、FEV1、FEV1/FVC 值较稳定期组、对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);稳定期 FEV1、FEV1/FVC 值较对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。急性加重期组血清 CTGF 与肺泡灌洗液 CTGF 表达水平呈正相关,血清 TGF- β 1 与肺泡灌洗液 TGF- β 1 的表达水平亦呈正相关;血清中 CTGF、TGF- β 1 水平呈正相关,肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 水平亦呈正相关;血清中 CTGF、TGF- β 1 水平分别与 FVC、FEV1、FEV1/FVC 呈负相关,肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 水平亦分别与 FVC、FEV1、FEV1/FVC 呈负相关。结论 CTGF、TGF- β 1 表达水平与 COPD 的发生发展密切相关,可作为监测 COPD 病情的指标。

关键词:慢性阻塞性肺疾病; 结缔组织生长因子; 转化生长因子 β 1; 肺功能指标

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.005

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2018)08-0913-05

文献标识码:A

CTGF and TGF- β 1 detection levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic obstructive pulmonary disease and significance*

LUO Yanqing, ZHANG Zuqing, ZHANG Changhong

(Department of Respiratory Medicine, Beijing Shisingshan Hospital, Beijing 100043, China)

Abstract: Objective To explore connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) detection levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and significance. **Methods** Totally 65 patients with COPD treated in the hospital from March 2016 to March 2017 were selected as the subjects, the patients were divided into acute exacerbation group (32 cases) and stable phase group (33 cases) according to the severity of the disease. Another 35 cases of physical examination in the hospital were selected as the control group. Serum and bronchoalveolar lavage fluid CTGF and TGF- β 1 levels were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, and lung function index, such as forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume (FEV1), and FEV1/FVC of patients with COPD were detected, and the relationship was analyzed of CTGF and TGF- β 1 in serum and bronchoalveolar lavage fluid and lung function. **Results** CTGF and TGF- β 1 levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid in acute exacerbation group were significantly higher than those in stable group and control group ($P<0.05$). CTGF and TGF- β 1 levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of the stable group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). Lung function results showed that lung function index FVC, FEV1 and FEV1/FVC value in acute exacerbation group decreased significantly

* 基金项目:北京市科学技术委员会科研计划项目(D151100004913021)。

作者简介:罗燕青,女,主治医师,主要从事阻塞性肺疾病的临床和基础方向研究。

本文引用格式:罗燕青,张作清,张昌红.慢性阻塞性肺疾病患者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 的水平及意义研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(8):913-916.

when compared with those in stable group and the control group ($P < 0.05$). FEV1 and FEV1/FVC in the stable group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). CTGF expression level was positively correlated in serum and bronchoalveolar lavage fluid of acute exacerbation group, and TGF- β 1 was also positively correlated. Serum CTGF and TGF- β 1 levels were positively correlated, and CTGF and TGF- β 1 in alveolar lavage fluid were also positively correlated. Serum CTGF and TGF- β 1 levels were negatively correlated with FVC, FEV1, FEV1/FVC, and CTGF and TGF- β 1 in alveolar lavage fluid were negatively correlated with FVC, FEV1 and FEV1/FVC respectively. **Conclusion** The high expression of CTGF and TGF- β 1 is closely related to the occurrence and development of COPD, and it can be used as an index for monitoring the condition of COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; CTGF; TGF- β 1; lung function index

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种常见的慢性呼吸系统炎症性疾病,其病理特征为不完全可逆的气流受限,致残、致死率极高,据 WHO 预测,COPD 在 2020 年将上升为全球第 3 大死因^[1]。目前中国 COPD 患者约有 0.45 亿,此病已成为中国农村地区第一大死因、城市地区第四大死因^[2]。有关研究认为,COPD 气流受限不可逆的主要原因是炎症、氧化损伤等造成的气道重塑、纤维化和狭窄,其中转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是一种高效的成纤维细胞趋化因子,可促进成纤维细胞产生结缔组织蛋白,同时在肺纤维化的过程中起着重要的作用,是导致纤维化的关键性的细胞因子^[3]。结缔组织生长因子(CTGF)属即刻早期基因,可有效促进成纤维细胞分裂、合成胞外基质,是 TGF- β 1 的下游因子^[4]。研究表明,CTGF、TGF- β 1 在大鼠肺组织中的蛋白表达量明显高于正常大鼠^[5-6];同时通过阻断 CTGF、TGF- β 1 的表达或抑制其生物活性均能够有效达到治疗肺纤维化的作用,因此,CTGF、TGF- β 1 过度表达与 COPD 的发生发展过程密切相关。故本研究就 COPD 患者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 的表达水平,以及二者与肺功能的关系进行探究,旨在为临床 COPD 的诊治提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 3 月至 2017 年 3 月于本院接受治疗的 COPD 患者 65 例,其中男性 48 例,女性 17 例,年龄 55~85 岁,平均(67.28 $\pm$ 7.03)岁;肺功能 II 级 37 例,肺功能 III 级 28 例;病程 4~32 年;有吸烟史者 45 例,无吸烟史者 20 例。所有患者诊断标准依据《慢性阻塞性肺疾病防治全球倡议 2017》^[7]。并根据诊断标准中关于疾病严重程度分级情况分为急性加重期组(32 例)和稳定期组(33 例);另选择 35 例身体健康者作为对照组,其中男性 29 例,女性 6 例,年龄 58~82 岁,平均(66.32 $\pm$ 5.94)岁。3 组受试者的性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述研究对象均未接受过糖皮质激素、免疫抑制剂治疗,均排除支气管扩张、支气管哮喘及糖尿病,合并肝肾功能、造血系统等疾病者,同时排除经证实由于肿瘤、结核或真菌感染等因素所致慢性喘

息者。所有受试者均签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有受检者均采用纤维支气管镜获取肺泡灌洗液,所选受试者均无纤维支气管镜检查禁忌证。早上 8:00 空腹采集。将纤维支气管镜插入肺段或肺亚段支气管,使镜顶端紧贴支气管开口,从活检孔向硅胶管中快速注入 37 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌生理盐水 20 mL,立即负压吸回灌洗液,回收率超过 40%,重复注入 5~6 次,总量 100~120 mL。将肺泡灌洗液立刻用双层纱布过滤,离心后取上清于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。同时抽取 2 mL 肘静脉血液,离心后取血清于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2.2 肺功能检测 在样品采集同一时间,采用肺功能仪(上海圣寿医疗器械有限公司)测定肺功能,记录用力肺活量(FVC)、第一秒用力呼气容积(FEV1)及 FEV1/FVC。重复测量 3 次,取平均值。

1.2.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 用 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)测定患者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 蛋白表达水平。向反应板各孔加入待测样品 100 μL ,混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h;反应板洗涤、吸干后,加入一抗稀释液 100 μL ,混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 1.0 h;反应板洗涤、吸干后,加入酶标抗体稀释液 100 μL ,混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 h;反应板洗涤、吸干后,加入终止液 100 μL 并混匀;于 0.5 h 内用酶标仪(北京伯辉生物科技有限公司)测定 450 nm 处吸光度。

1.3 统计学处理 本研究利用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验;计数资料用百分率(%)描述,用 χ^2 检验;相关性采用 Pearson 分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺功能指标比较 急性加重期组肺功能指标 FVC、FEV1、FEV1/FVC 值较对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);COPD 患者稳定期 FEV1、FEV1/FVC 值较急性加重期明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),但仍明显低于对照组,差异有统计

意义($P<0.05$),结果见表 1。

表 1 各组肺功能指标($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	FEV1(l/s)	FVC(L)	FEV1/FVC
急性加重期组	32	1.56±0.25* [#]	2.72±0.12*	0.57±0.12* [#]
稳定期组	33	1.82±0.44*	2.80±0.11	0.65±0.13*
对照组	33	1.99±0.37	2.83±0.09	0.71±0.13
<i>F</i>		7.617	5.314	6.565
<i>P</i>		0.000	0.012	0.000

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与稳定期组比较,[#] $P<0.05$

2.2 血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1 水平 急性加重期患者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1

表 2 血清及肺泡灌洗液 CTGF、TGF-β1 水平($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	<i>n</i>	CTGF		TGF-β1	
		血清	肺泡灌洗液	血清	肺泡灌洗液
急性加重期组	32	153.41±19.34* [#]	74.82±10.69* [#]	12.26±1.23* [#]	6.11±1.06* [#]
稳定期组	33	92.26±17.88*	46.74±9.85*	8.37±1.59*	4.34±0.88*
对照组	33	75.24±24.58	32.55±9.57	6.95±1.46	3.28±0.74
<i>F</i>		83.250	98.099	78.216	53.814
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与稳定期组比较,[#] $P<0.05$

表 3 急性加重期患者血清及肺泡灌洗液 CTGF、TGF-β1 水平的关系(*r*)

项目	血清 CTGF	灌洗液 CTGF	血清 TGF-β1	灌洗液 TGF-β1
血清 CTGF		0.789*	0.359*	
灌洗液 CTGF	0.789*		0.367*	
血清 TGF-β1	0.359*		0.724*	
灌洗液 TGF-β1		0.367*	0.724*	

注:* $P<0.05$

2.4 血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1 水平与肺功能的关系 急性加重期患者 COPD 患者血清、肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1 表达水平与 FVC、FEV1 及 FEV1/FVC 肺功能指标均呈明显负相关($P<0.05$),见表 4。

表 4 血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1 水平与肺功能的关系(*r*)

项目	血清 CTGF	灌洗液 CTGF	血清 TGF-β1	灌洗液 TGF-β1
FVC(L)	-0.312*	-0.332*	-0.386*	-0.657*
FEV1(l/s)	-0.452*	-0.438*	-0.418*	-0.403*
FEV1/FVC	-0.347*	-0.329*	-0.406*	-0.378*

注:* $P<0.05$

3 讨 论

COPD 是一种气流受限呈进行性发展的慢性支

蛋白表达水平均明显高于稳定期组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);稳定期组血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1 蛋白表达水平仍明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),结果见表 2。

2.3 血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1 水平的关系 急性加重期患者 COPD 患者血清 CTGF 与肺泡灌洗液 CTGF 表达水平呈正相关,血清 TGF-β1 与肺泡灌洗液 TGF-β1 表达水平亦呈正相关关系;血清中 CTGF、TGF-β1 表达水平呈正相关关系,肺泡灌洗液中 CTGF、TGF-β1 表达水平亦呈正相关关系,结果见表 3。

气管炎或肺气肿,与肺部吸入烟雾等有害物引起的炎症反应有关,病情变化缓慢,肺功能下降难以察觉,大部分患者只在急性加重期才入院接受正规治疗,明确诊断时患者肺功能常已经明显下降,甚至已经进入终末期。COPD 的发生与吸烟、空气污染、粉尘吸入、呼吸道感染等外因以及个体遗传因素、怀孕期、婴幼儿期等内因有关^[8-9]。尽管世界各国对 COPD 格外重视,研究投入不断增加,但 COPD 的患病率却逐年上升,由此造成的经济负担越来越重^[10]。研究发现,COPD 后期肺泡成纤维细胞等明显增多,肺间质纤维化逐渐代替肺气肿的固有变化,加剧肺功能的恶化^[11]。生物体常通过间质细胞增殖或者表型变化来应对炎症损伤刺激,肺部炎症反复发作,刺激上皮细胞产生促纤维因子,与异常沉积在肺损伤部位的基质相互作用,导致肺间质细胞不断增殖,最终导致肺部纤维化^[12-13]。研究发现,支气管肺泡灌洗液中细胞因子如 CTGF、TGF-β1 等水平与肺纤维化进展有关^[14-15]。

CTGF 属于 CCN 家族,富含半胱氨酸,存在于肺、肝、胰、肾和结缔组织等多种组织器官中,在某些条件下,软骨细胞、平滑肌细胞、部分肿瘤细胞、内皮细胞、成纤维细胞等均可合成分泌 CTGF^[16]。研究证实,CTGF 具有促进成纤维细胞增殖的活性。TGF-β 是 CTGF 最主要的上游调节因子,机械应力、高糖、血管扩张素等因素均能通过诱导 TGF-β 表达而间接上调 CTGF^[17]。TGF-β 诱导 CTGF 表达依赖于

Smad3、Smad4 的活化, TGF- β 一旦被激活, 能立刻和 I 型 TGF- β 受体激酶互相作用, 导致其 C 端磷酸化, 磷酸化 TGF- β 受体激酶可与 Smad 结合, 并向核内转移, 进而激活目标基因的表达, 如在成纤维细胞中可诱导 CTGF 表达。CTGF 和 TGF- β 的众多生物学功能类似, 能促进成纤维细胞分裂增殖、细胞外基质产生、肉芽组织形成^[18-19]。COPD 常伴有不同程度肺间质纤维化, 大量研究证实 CTGF、TGF- β 1 在 COPD 患者体内高度表达, 它们不仅在支气管、细支气管和肺泡中高表达, 在肥大细胞、巨噬细胞中表达也增加, 且 CTGF 与 TGF- β 1 表达水平呈正相关关系, CTGF、TGF- β 1 在 COPD 病理变化中有趋化炎症细胞的功能^[19]。此外, 对于慢性支气管炎大鼠 TGF- β 1 蛋白表达增加和成纤维细胞量增多、基底膜增厚程度密切相关^[20]。TGF- β 1 水平和 COPD 患者的吸烟指数、小气道凹陷程度呈正相关^[21-22]。因此, TGF- β 1 参与了 COPD 患者肺纤维化进程, 而 CTGF 作为 TGF- β 1 的效应因子, 在 COPD 病情发展中也发挥关键作用, 造成细胞外基质增加、气道重塑, 结果发生肺部纤维化。同时还有学者实验研究显示, CTGF 是一种有效的血管生成因子, 其可传导 TGF- β 1 促进肺纤维化的信号, 促进成纤维细胞增殖及细胞外基质的产生促进肺纤维化的发生, 其认为二者均参与 COPD 气道重构及肺血管重构和肺纤维化的发生发展^[23]。本研究发现, COPD 患者在急性加重期组血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 表达水平较稳定期组、对照组明显升高; COPD 稳定期组患者血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 蛋白表达水平明显高于对照组, 同时 COPD 患者在急性加重期组 TGF- β 1、CTGF 在血清、肺泡灌洗液中表达水平呈正相关。上述结果说明, 血清及肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 均有表达, 且表达水平均随着疾病严重程度的增加而增加, 推测可能由于 COPD 的发生导致中性粒细胞、平滑肌细胞激活而释放弹性蛋白酶, 降解糖蛋白, 最终导致有活性 CTGF、TGF- β 1 的增加。本研究结果也显示, COPD 患者血清、肺泡灌洗液中 CTGF 与 TGF- β 1 表达也呈正相关关系, 此结果进一步表明, 二者均参与 COPD 的发生发展, 但是二者之间对 COPD 的影响具体机制还有待进一步深入分析。

另外, 本研究中血清、肺泡灌洗液中 CTGF、TGF- β 1 表达水平分别与 FVC、FEV1、FEV1/FVC 呈负相关, 此结果表明 TGF- β 1 参与了 COPD 气道炎症与重塑, 考虑可能是由于负载的细胞因子网络调控, 导致纤维增生反应, 从而导致肺纤维化的发生, 最终导致肺泡损伤, 进一步证实了 CTGF、TGF- β 1 在 COPD 患者病情进展过程中发挥了重要作用, 均可作为 COPD 病情的监测指标。另外本研究结果还显示, 血清和肺泡灌洗液中 CTGF 与 TGF- β 1 水平呈现正相关。

综上所述, CTGF、TGF- β 1 水平异常升高与 COPD 患者肺功能指标密切相关, 同时二者在反映 COPD 疾病的发生发展中也具有重要的意义, 但是由于 COPD 发生发展的相关因素很多、相关机制复杂, 具体发病机理还需扩大样本继续深入探究。

参考文献

- [1] 李鸿茹, 林丹, 陈愉生, 等. 哮喘 COPD 重叠综合征与单纯慢性阻塞性肺疾病的病例对照研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2015, 14(4): 332-336.
- [2] 黄振杰, 曾彤华, 欧盛敬. COPD 患者调节性 T 细胞核转录因子 Foxp3 的表达及单核苷酸多态性的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(2): 351-353.
- [3] 谭博, 杜永成, 张爱珍, 等. 发掘慢性阻塞性肺疾病临床终点预测性替代指标纵向研究成果及意义[J]. 中国实用内科杂志, 2016, 36(8): 698-700.
- [4] BAARSMA H A, SPANJER A I, HAITSM A G, et al. Activation of WNT/ β -catenin signaling in pulmonary fibroblasts by TGF- β 1 is increased in chronic obstructive pulmonary disease[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25450.
- [5] ZHOU S J, LI M, ZENG D X, et al. Expression variations of connective tissue growth factor in pulmonary arteries from smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease[J]. Sci Rep, 2015, 24(5): 8564.
- [6] 贺小玉, 田应选. TGF- β 1、CTGF 对判断慢性阻塞性肺疾病合并纤维化的临床意义[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(3): 120-122.
- [7] HURD S, PAUWELS R. Global Initiative for chronic obstructive lung diseases (GOLD)[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2002, 15(4): 353-355.
- [8] 陈嵩, 任涛, 万健, 等. COPD 患者血清炎性指标、血浆及尿液游离氨基酸的变化研究[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(3): 22-24.
- [9] 童佳兵, 杨程, 王婕琼, 等. COPD 稳定期患者中西医结合肺康复研究思考[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(8): 1164-1166.
- [10] 张晓雷, 王辰. 重视慢性阻塞性肺疾病的筛查与管理[J]. 中华健康管理学杂志, 2015, 11(4): 250-253.
- [11] OTANI H, TANAKA T, MURATA K, et al. Smoking-related interstitial fibrosis combined with pulmonary emphysema: computed tomography-pathologic correlative study using lobectomy specimens[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016, 11(1): 1521-1532.
- [12] 金焯, 戴莉莉, 陈晓红, 等. 白三烯受体拮抗剂治疗 COPD 继发肺间质纤维化的临床疗效观察[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(6): 1001-1003.
- [13] GUTIERREZ M, GOMEZ-QUIROZ L E, CLAVIJO-CORNEJO D, et al. Ultrasound in the interstitial pulmonary fibrosis. Can it facilitate a best routine assessment in rheumatic disorders? [J]. Clin Rheumatol, 2016, 35(10): 2387-2395.
- [14] 蒋鲲, 陈和斌, 王莹, 等. IL-17 和 TGF- β 1 在支气管哮喘患儿血清及支气管肺泡灌洗液中的变化(下转第 921 页)