

# 抵抗素在哮喘儿童血清表达差异及其对肥大细胞 TNF- $\alpha$ 分泌的影响

徐红,周瑶,刘峰,赵德育,雷其洪\*

(南京医科大学附属南京儿童医院呼吸科,江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的:观察抵抗素(resistin)在哮喘儿童血清中的表达差异,检测其对肥大细胞肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )分泌的影响。方法:收集同期健康体检儿童(对照组)、哮喘急性发作期(急性发作组)和缓解期(缓解组)患儿血清,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测其血清中抵抗素的水平。细胞实验分为对照组、抵抗素组、脂多糖(LPS)组和抵抗素+LPS组,分别用抵抗素、LPS及二者共同干预小鼠肥大细胞株(P815)后收集上清,上清用ELISA检测TNF- $\alpha$ 的水平。结果:哮喘急性发作组血清抵抗素水平显著高于对照组( $P < 0.01$ ),缓解组血清抵抗素水平较急性发作组下降( $P < 0.01$ ),但仍高于对照组( $P < 0.05$ )。在细胞水平的研究发现,对照组、抵抗素组、LPS组、抵抗素+LPS组P815培养上清的TNF- $\alpha$ 分泌依次升高,且每两组比较差异均有统计学差异( $P < 0.01$ )。结论:哮喘儿童血清抵抗素水平能反映哮喘气道炎症活动情况及严重程度。抵抗素可刺激肥大细胞分泌TNF- $\alpha$ ,可能在哮喘的发生中起促进作用。

**[关键词]** 抵抗素;哮喘;儿童;肥大细胞;肿瘤坏死因子- $\alpha$

**[中图分类号]** R725.6

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2015)02-222-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150218

支气管哮喘是儿童时期最常见的慢性呼吸道疾病,是由多种细胞,如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞及其组分参与的气道慢性炎症性疾病。近年来哮喘患病率呈显著上升趋势,1990年中国儿童支气管哮喘的患病率为0.91%,2000年上升为1.5%<sup>[1]</sup>,而最近第3次调查显示我国城市儿童哮喘患病率为2.72%<sup>[2]</sup>。支气管哮喘给社会和家庭带来了巨大的经济负担,严重影响了患儿的身心健康。然而哮喘的发生、发展机制尚不完全明确,因此需要进一步研究支气管哮喘的发病机制。

抵抗素于2001年被发现,属于抵抗素样分子(RELM)家族,富含半胱氨酸的分泌蛋白,它与肥胖、胰岛素抵抗、2型糖尿病等多种代谢性疾病相关<sup>[3]</sup>。近年来抵抗素被发现与炎症的调节显著相关<sup>[4-5]</sup>。抵抗素参与一系列炎症性疾病的发病过程中,如骨关节炎,慢性肾脏疾病、过敏性鼻炎及脓毒症等<sup>[6-9]</sup>。但抵抗素在支气管哮喘患儿血清中的表达及其对哮喘的发病机制知之甚少。肥大细胞在哮喘的发病机制中起核心作用,既参与急性过敏反应又参与慢性过敏反应。因此本研究将验证抵抗素在哮喘患儿血清中的表

达水平以及其对P815分泌功能的影响。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

随机选择40例2013年8月~12月在本院儿科哮喘专科门诊就诊的患儿,均符合2008年《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》的诊断标准<sup>[10]</sup>。根据其病史及临床表现分为两组:哮喘急性发作期组20例(男12例,女8例),年龄3~11岁,平均5.95岁;哮喘缓解期组20例(男11例,女9例),年龄4~12岁,平均6.1岁;对照组为本院同期健康体检儿童20例(男8例,女12例),年龄3~12岁,平均6.35岁,均无变态反应性疾病史,近期(1个月内)无全身感染性疾病,未使用抗生素等。各组间儿童年龄及性别方面均无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

### 1.1.2 试剂

P815(中国科学院上海生命科学研究院)。DMEM、青链霉素和胎牛血清(南京维森特生物技术有限公司)。小鼠抵抗素(Peprtech公司,美国),脂多糖(LPS)(Sigma公司,美国),人抵抗素ELISA试剂盒、小鼠TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(R&D公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本的采集

分别留取健康体检儿童、哮喘急性发作期及缓解期儿童静脉血2ml,室温静置0.5h,以3000 r/min

**[基金项目]** 南京市儿童医院科技项目(E7YY2013029);南京市医学科技发展项目(201108012)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: leiqihong@hotmail.com

离心 15 min 留取血清, 放 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

### 1.2.2 肥大细胞的培养与干预

P815 在含 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。调整细胞密度至 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/ml, 接种于 6 孔板中, 第 2 天用无血清的培养基饥饿 6 h 后分为对照组、抵抗素组、LPS 组和抵抗素+LPS 组, 分别予 100 ng/ml 抵抗素(浓度参考文献[5]), 1  $\mu$ g/ml LPS 及抵抗素、LPS 共干预 P815, 于 16 h 收集上清, 1 500 r/min 离心 10 min 后, 放 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### 1.2.3 ELISA 法检测抵抗素及 TNF- $\alpha$

用人抵抗素 ELISA 试剂盒检测 3 组儿童血清抵抗素水平, 小鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒检测 P815 培养的上清液, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.3 统计学方法

所得数据均采用 SPSS20.0 软件进行统计学处理。实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 若存在差异, 则进一步两两比较行  $q$  检验, 以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 3 组儿童血清抵抗素水平比较

哮喘急性发作组血清抵抗素水平显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 缓解组血清抵抗素水平较急性发作组下降 ( $P < 0.01$ ), 但仍高于对照组 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1 3 组儿童血清抵抗素水平的比较

Table 1 The levels of children's serum resistin in three groups (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	抵抗素
对照组	20	5.27 $\pm$ 2.28
缓解组	20	8.45 $\pm$ 3.67*
急性发作组	20	12.92 $\pm$ 5.29*** $\Delta$

与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与缓解组比较,  $\Delta P < 0.01$ 。

### 2.2 抵抗素对 P815 细胞 TNF- $\alpha$ 分泌的影响

在细胞水平的研究发现, 对照组、抵抗素组、LPS 组、抵抗素+LPS 组 P815 培养上清的 TNF- $\alpha$  分泌依次升高, 且每两组比较差异均有统计学差异 ( $P < 0.01$ , 表 2)。

## 3 讨 论

支气管哮喘的病因十分复杂, 发病机制至今尚不十分清楚。目前认为哮喘的本质是多种细胞和细胞组分参与的慢性气道炎症。随着脂肪组织被作为一种内分泌腺观点的提出, 其分泌的激素样物质倍

表 2 4 组 TNF- $\alpha$  水平的比较

Table 2 The levels of TNF- $\alpha$  in four groups (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	TNF- $\alpha$
对照组	6	65.28 $\pm$ 3.57
抵抗素组	6	84.30 $\pm$ 3.00*
LPS 组	6	104.55 $\pm$ 4.12**
抵抗素+LPS 组	6	118.42 $\pm$ 3.56** $\Delta$

与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与抵抗素组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较,  $\Delta P < 0.01$ 。

受关注。抵抗素是 Steppan 等<sup>[3]</sup>在研究抗糖尿病新药噻唑烷二酮的作用机制时发现的一种脂源性激素。近年来许多研究表明抵抗素与炎症因子呈正相关, 如白细胞介素(IL-6)、TNF- $\alpha$ 、C 反应蛋白<sup>[6-7]</sup>。Kaser 等<sup>[11]</sup>研究显示 TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及外源性等炎性细胞因子均能明显增加抵抗素的表达<sup>[11]</sup>。同时, 抵抗素本身也具有炎症因子的性质, 它通过增加转录因子 NF- $\kappa$ B 导致胰腺腺泡细胞表达 TNF- $\alpha$  和 IL-6 升高<sup>[12]</sup>。Jamaluddin 等<sup>[13]</sup>研究发现抵抗素可通过氧化应激和激活 p38MAPK 通路使内皮细胞通透性增高导致血管炎性损伤。最新研究发现抵抗素与腺苷酸环化酶相关蛋白 1 受体结合导致炎症反应<sup>[14]</sup>。然而抵抗素在哮喘中促炎的分子机制目前仍不清楚。

本研究结果显示, 哮喘患儿血清抵抗素在急性发作期及缓解期较对照组升高, 且发作期高于缓解期, 差异具有统计学意义, 提示抵抗素能反映哮喘气道炎症活动情况及严重程度, 且存在于哮喘发展的全过程。但抵抗素在哮喘中的具体作用机制仍不清楚。肥大细胞激活后产生多种炎性介质, 如 TNF- $\alpha$  在哮喘的发病机制中起重要作用。TNF- $\alpha$  具有增强机体局部血管通透性的作用, 还能显著促进活性物质的大量释放, 从而导致支气管哮喘临床症状出现<sup>[15]</sup>。本研究结果还显示抵抗素能促进肥大细胞分泌 TNF- $\alpha$  增高, 抵抗素与 LPS 共干预组 TNF- $\alpha$  分泌量最高, 表明抵抗素可与 LPS 协同刺激 TNF- $\alpha$  分泌。从上述结果中看出抵抗素可刺激肥大细胞分泌 TNF- $\alpha$ , 可能在哮喘的发生中起促进作用。

综上所述, 哮喘儿童血清抵抗素水平能反映哮喘气道炎症活动情况及严重程度。抵抗素能刺激肥大细胞分泌 TNF- $\alpha$ , 可能在哮喘的发生中起促进作用。

### [参考文献]

[1] 全国儿科哮喘协作组. 2000 年与 1990 年儿童支气管哮喘患病率的调查比较[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(2): 112-116

- [2] 全国儿科哮喘协作组,中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J]. 中华儿科杂志,2013,51(10):729-735
- [3] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. Nature, 2001, 409(6818):307-312
- [4] Suragani M, Aadinarayana VD, Pinjari AB, et al. Human resistin, a proinflammatory cytokine, shows chaperone-like activity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(51):20467-20472
- [5] Pirvulescu M, Manduteanu I, Gan AM, et al. A novel pro-inflammatory mechanism of action of resistin in human endothelial cells: up-regulation of SOCS3 expression through STAT3 activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(2):321-326
- [6] Koskinen A, Vuolteenaho K, Moilanen T, et al. Resistin as a factor in osteoarthritis: synovial fluid resistin concentrations correlate positively with interleukin 6 and matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3[J]. Scand J Rheumatol, 2014, 43(3):249-253
- [7] Marouga A, Dalamaga M, Kastania AN, et al. Correlates of serum resistin in elderly, non-diabetic patients with chronic kidney disease[J]. Clin Lab, 2013, 59(9-10):1121-1128
- [8] Zicari AM, Occasi F, Marcelli AC, et al. Assessing the relationship between serum resistin and nasal obstruction in children with allergic rhinitis [J]. Am J Rhinol Allergy, 2013, 27(5):e127-e130
- [9] Vassiliadi DA, Tzanela M, Kotanidou A, et al. Serial changes in adiponectin and resistin in critically ill patients with sepsis: associations with sepsis phase, severity, and circulating cytokine levels[J]. J Crit Care, 2012, 27(4):400-409
- [10] 中华医学会儿科学会呼吸学组, 编辑委员会中华儿科杂志. 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
- [11] Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, et al. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines *in vitro* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(2):286-290
- [12] Jiang CY, Wang W, Tang JX, et al. The adipocytokine resistin stimulates the production of proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-6 in pancreatic acinar cells via NF-kappaB activation[J]. J Endocrinol Invest, 2013, 36(11):986-992
- [13] Jamaluddin MS, Yan S, Lu J, et al. Resistin increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells[J]. PLoS One, 2013, 8(12):e84576
- [14] Lee S, Lee H C, Kwon Y W, et al. Adenyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes [J]. Cell Metab, 2014, 19(3):484-497
- [15] Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(1):5-10, 11-12

[收稿日期] 2014-06-19

## 科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每3位分成1组,组间留空隙(约为一个汉字的1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如453 000 000可写成45 300万或4.53亿或4亿5 300万,但不能写成4亿5千3百万;三千元写成3 000元或0.3万元,但不能写成3千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如10%~20%, (2~6)×10<sup>3</sup>或2×10<sup>3</sup>~6×10<sup>3</sup>, 30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)