

慢性阻塞性肺疾病患者和肽素、高迁移率族蛋白 1 水平变化及其临床意义

黄馨凉,白 跳,崔莹雪,邵亚婷*

(西安市第九医院老年病一科,陕西西安 710054)

摘要: **目的** 探讨慢性阻塞性肺疾病患者(COPD)中和肽素(Copeptin)、高迁移率族蛋白 1(HMGB1)水平变化及其临床意义。**方法** 72 例 COPD 患者,按病情分为轻度组($n=15$)、中度组($n=28$)、重度组($n=29$)。分析各组患者 Copeptin、HMGB1 水平变化。**结果** 随着病情由轻到重,患者血清 Copeptin、HMGB1、白介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平和肺组织 HMGB1 mRNA 及其蛋白水平依次均显著升高。重度组患者住院天数均长于轻度、中度组。急性加重期患者血清 Copeptin 水平与住院天数呈正相关。**结论** COPD 患者的严重程度和 Copeptin 及 HMGB1 表达水平呈正相关, Copeptin 及 HMGB1 表达水平均可作为临床上评价 COPD 的严重程度的生物学指标。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 和肽素; 高迁移率族蛋白 1; 白介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号:R563 文献标识码:A

Clinical significance of Copeptin and HMGB1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease

HUANG Xinliang, BAI Tiao, CUI Yingxue, et al

(Department of Geriatrics, Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical significance of Copeptin and HMGB1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** 72 patients with COPD in our hospital were analyzed, and divided into mild group ($n=15$), moderate group ($n=28$), severe group ($n=29$) according to COPD comprehensive evaluation by the disease from mild to severe. The levels of Copeptin and HMGB1 and the clinical significance of them in patients with COPD were evaluated. **Results** The levels of serum Copeptin, HMGB1, IL-1 β , TNF- α , tissue HMGB1 mRNA and protein were elevated with degree of COPD. Hospitalization days in severe group were statistically significantly longer than those of mild, moderate groups. The Copeptin levels and hospitalization days among patients with acute exacerbation had positive correlation. **Conclusion** The severity of COPD was positively related to the levels of Copeptin and HMGB1. Therefore, which can be used as a biological indicator to evaluate the severity of COPD in clinic.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; copeptin; HMGB1; IL-1 β ; TNF- α

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是临床呼吸道重症疾病之一。持续存在的气流受限是 COPD 的只要特点,并且与气道慢性炎症反应的增高密切相关。目前大量研究表明, C 反应蛋白、降钙素原、血管升压素是 COPD 的非特

异性生物学标志物,即在 COPD 急性加重期时,上述生物学指标水平均明显升高,与疾病严重程度呈正相关^[1-2]。和肽素(Copeptin)由 39 个氨基酸组成一种急性期时相蛋白,是精氨酸加压素(AVP)原的部分肽段,可由神经垂体分泌。正常人体中 AVP 含量极低,当机体出现感染、低血压等症状后可促使下丘脑分泌 AVP 增加。研究发现,大多心脑血管病患者血液中的 AVP 水平均明显升高,且和疾病程度呈正

相关。然而, AVP 的生物活性不稳定, 难以测定, 而 Copeptin 在体内表现比 AVP 更加稳定, 无酶切位点和受体, 在体内很少降解, 可直接测定来反映 AVP 水平, 因此, 和肽素可作为一种新型的生物学标志物来诊断 COPD^[3-4]。近年有研究报道, 高迁移率族蛋白 1 (High mobility group box-1 protein, HMGB1) 在 COPD 的发病机制中起着重要作用^[5]。HMGB1 作为内毒素血症和脓毒症的晚期炎症介质, 参与多种生理学进程, 当其被释放到细胞外后, 可作为细胞因子参与氧化应激调节、介导炎症反应, 导致炎症反应进一步扩大。因此, HMGB1 可作为致炎细胞因子网络中的中心环节, 同时具有级联放大以及调节其他炎症因子分泌的功能, 有研究亦提示 HMGB1 可能参与了 COPD 的发生和发展的过程^[6]。本研究旨在探讨 COPD 严重程度与 Copeptin、HMGB1 在 COPD 发病过程中的水平变化情况, 揭示 HMGB1 在 COPD 发病机制中的作用及临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2015 年 1 月~2016 年 10 月于我院就诊的 72 例 COPD 患者作为研究对象。纳入标准: 参照 2007 年《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》中的诊断标准进行确诊为 COPD 患者。排除标准: 合并慢性感染性疾病、心肺功能障碍、恶性肿瘤者或者其他重大疾病患者; 合并心理疾病、精神疾病患者。根据 COPD 综合评估按病情由轻至重分为三组: 轻度组 ($n=15$)、中度组 ($n=28$)、重度组 ($n=29$)。轻度组 15 例, 年龄 19~53 (41.8 ± 3.5) 岁; 病程 1.5~13 (5.8 ± 1.8) 年。中度组 28 例, 年龄 20~53 (41.8 ± 3.5) 岁; 病程 1.5~14 (5.8 ± 1.8) 年。重度组 29 例, 年龄 19~54 (41.8 ± 3.5) 岁; 病程 1.6~13 (5.8 ± 1.8) 年。各组年龄、病程比较无明显差异, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 资料具有可比性。本研究获得医院伦理委员会批准, 所有患者自愿签署知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪 (型号: ABI 7300, 上海普迪生物技术有限公司); EL204 梅特勒电子天平 (型号: EL204, 厂家: 郑州南北仪器设备有限公司); 高迁移率族蛋白 1 (High mobility group protein 1, HMGB1) 和 GAPDH (内参) 一抗均购自 Cell Signaling Technology 公司; 二抗购自碧云天公司。

1.3 ELISA 法检测指标 采用 ELISA 试剂盒检

测血清 Copeptin、HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 水平, 所有试剂盒均购自南京建成生物研究所。按照试剂盒操作严格进行测定。

1.4 荧光定量 PCR 采用 Trizol 方法提取肺组织总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度后, 取 2 μ g 进行逆转录, 生成 cDNA。采用 SYBR green 染料法进行定量检测, 利用 Q-PCR 仪设置 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 扩增 40 个循环, 每个循环记录一次 CT 值, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 HMGB1 及 GAPDH 的 mRNA 表达情况。HMGB1 及 GAPDH (内参) 引物信息如下:

HMGB1: 上游引物 (5'-3') CATGGAT-CAGAACTCAGCAAAGTC

下游引物 (5'-3') CATGCCATGCCT-TGTCTTTGCCTGC

GAPDH: 上游引物 (5'-3') CCTAGTTCGTCAT-GGGTGTGAACCA

下游引物 (5'-3') GCCAGTAGAG-GCAGGGATGATGTTTC

1.5 蛋白印迹 (Western blot) 常规方法提取组织总蛋白, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 方法测定蛋白质含量后, 进行凝胶电泳, 每孔上样 20 μ g, 电转至聚偏氟乙烯薄膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上后, 3% 的脱脂奶封闭 2 h, 分布孵育 HMGB1 和 GAPDH 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜, 接着进行 TBST 洗膜, 最后孵育二抗并进行显影。采用 Quantityone 软件对条带亮度进行分析。

1.6 统计学方法 实验数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用单因素方差分析多组间计量资料的比较。采用卡方 (χ^2) 检验分析计数资料的比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者急性加重期与缓解期血清 Copeptin 水平 与轻度组比较, 中度、重度组患者急性加重期和缓解期的血清和肽素水平均升高, 差异有统计学意义 (P 均 <0.05); 与中度组比较, 重度组患者急性加重期和缓解期的血清 Copeptin 水平均升高, 差异有统计学意义 (P 均 <0.05); 与缓解期比较, 中度、重度组患者急性加重期血清 Copeptin 水平均升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。具体见表 1。

表 1 急性加重期与缓解期血清 Copeptin 水平 (pmol /L)

组别	n	急性加重期	缓解期
轻度组	15	5.18±1.32	4.18±1.02
中度组	28	9.28±1.35 ^{ac}	6.28±1.32 ^a
重度组	29	11.88±1.36 ^{abc}	8.18±1.02 ^{ab}

与轻度组比较,a; $P<0.05$;与中度组比较,b; $P<0.05$;与缓解期比较,c; $P<0.05$

2.2 比较各组患者住院天数情况 重度组患者住院天数均长于轻度、中度组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05),具体见表 2。

表 2 各组患者住院天数

组别	n	住院天数
轻度组	15	10.18±1.32
中度组	28	12.28±1.35
重度组	29	17.88±1.36 ^{ab}

与轻度组比较,a; $P<0.05$;与中度组比较,b; $P<0.05$

2.3 血清 Copeptin 水平与住院天数的相关分析

急性加重期患者血清 Copeptin 水平与住院天数呈正相关($r=0.617,P<0.01$),具体见图 1。

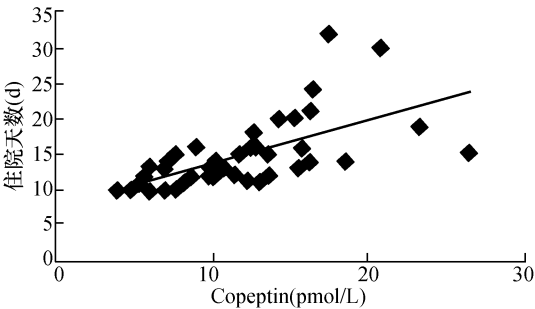


图 1

2.4 各组患者血清 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 水平

与轻度组比较,中度、重度组患者血清 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 水平均升高,差异有统计学意义(P 均 <0.05);与中度组比较,重度组患者血清 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 水平均升高,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。具体见表 3。

表 3 各组患者血清 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 水平

组别	n	HMGB1(μ g/L)	IL-1 β (ng/L)	TNF- α (ng/L)
轻度组	15	3.18±1.32	24.41±1.32	72.18±1.32
中度组	28	5.18±1.33 ^a	26.18±1.34 ^a	75.12±1.34 ^a
重度组	29	7.23±1.31 ^{ab}	28.23±1.31 ^{ab}	77.23±1.37 ^{ab}

与轻度组比较,a; $P<0.05$;与中度组比较,b; $P<0.05$

2.5 各组患者肺组织 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平

RT-PCR 和 Western blot 法检测各组患者肺组织 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平,与轻度组比较,中度、重度组患者肺组织 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平均升高,差异有统计学意义(P 均 <0.05);与中度组比较,重度组患者肺组织 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平均升高,差异有统计学意义(P 均 <0.05);具体见表 4 和图 2。

表 4 肺组织 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平变化

组别	轻度组	中度组	重度组
RT-PCR 灰度值比值	0.92±0.12	1.23±0.12 ^a	1.62±0.34 ^{ab}
Western blot 灰度值比值	0.95±0.12	1.33±0.12 ^a	1.68±0.37 ^{ab}

与轻度组比较,a; $P<0.05$;与中度组比较,b; $P<0.05$

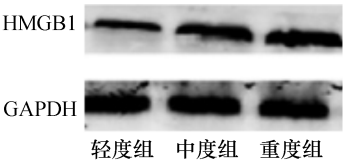


图 2 HMGB1 蛋白表达水平变化

3 讨 论

目前 COPD 患者急性加重期时不能完成肺功能全面检查,临床上关于 COPD 疾病严重程度的诊断主要是依靠患者呼吸困难、咳嗽、咳痰等临床症状的加重,故需要一个客观指标来评价 COPD 严重程度尤为重要。C 反应蛋白、降钙素原、血管升压素是 COPD 的非特异性生物学标志物。有研究^[7]对接受糖皮质激素治疗的急性加重期 COPD 患者血清 C 反应蛋白、Copeptin 两项生物标志物水平进行比较,结果显示,C 反应蛋白水平变化的波动和范围较大,C 反应蛋白水平不仅与 COPD 患者疾病的严重程度有关,且还易受到糖皮质激素等药物的影响,而 Copeptin 水平的变化与这些药物的使用无关,仅与 COPD 患者疾病的严重程度有关,故 Copeptin 在体内表现出更为稳定的生物活性,检测方法更为快捷简便,亦更能反应体内的炎症反应程度和疾病的严重程度。本研究结果表明,随着与 COPD 患者疾病严重程度增加,患者血清 Copeptin 水平亦随着升高,提示 COPD 患者的严重程度和 Copeptin 水平呈正相关。与缓解期比较,中度、重度组患者急性加重期血

清 Copeptin 水平均升高,可能是由于在急性加重期,患者下呼吸道感染产生的炎症因子,细胞因子的刺激所致。重度组患者住院天数均长于轻度、中度组,急性加重期患者血清 Copeptin 水平与住院天数呈正相关($r=0.618, P<0.05$),提示 Copeptin 水平升高可引起住院时间延长,提示疾病的预后不理想。综上所述可知,COPD 患者的严重程度和 Copeptin 水平呈正相关,Copeptin 有望成为评价 COPD 的严重程度的生物学指标。

目前关于 COPD 的确切发病机制有多种假说,如蛋白酶和抗蛋白酶假说,免疫失衡假说,感染假说,氧化损伤假说及炎症假说等^[8]。其中,炎症假说在 COPD 发生发展的机制一直备受学术研究者的重视。HMGB1 由 Johns 在 20 世纪 60 年代发现的一种急性期时相蛋白,因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有很高的迁移率而得此名,随着 HMGB1 的发现,越来越多的学者对 HMGB1 进行研究^[9-11],结果表明, HMGB1 在炎症反应的网络系统中可能作为一个中心环节,不仅自身的分泌有级联放大效应,而且还可以促进 IL-1 β 、TNF- α 等其他炎症因子的分泌。有报道^[11] HMGB1 在自身免疫性疾病等炎症性疾病的发病机制中起着非常重要的作用。本研究结果表明,随着与 COPD 患者疾病严重程度增加,患者血清和肺组织中 HMGB1 基因和蛋白表达水平亦随着升高,提示 COPD 患者的严重程度和 HMGB1 表达水平呈正相关。同时,随着患者血清中 HMGB1 基因和蛋白表达水平升高,血清炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平亦随着升高,提示 HMGB1 有可能作为炎症因子在 COPD 发生发展中起重要作用。

综上所述,COPD 患者的严重程度和 Copeptin 及 HMGB1 水平呈正相关,因此均可作为临床上评价 COPD 的严重程度的生物学指标。

参考文献:

- [1] 吴桦,曹宁家,尚立群,等.慢性阻塞性肺疾病患者 C-反应蛋白与降钙素原水平的变化与意义[J].现代检验

医学杂志,2013,28(5):39-41.

- [2] 王道峰,伏俊,朱晓兰,等.COPD 急性加重期治疗前后超敏 C 反应蛋白、降钙素原、D-二聚体水平变化的研究[J].实用临床医药杂志,2015,19(21):189-190.
- [3] 刘志文.血清合肽素、降钙素原对慢性阻塞性肺疾病急性加重患者临床风险预测的价值研究[J].医药与保健,2017,25(2):105-106.
- [4] 张琴琴,许德凤,刘锦铭,等.和肽素对 AECOPD 患者的病情严重程度及生活质量评估的价值[J].国际呼吸杂志,2015,35(1):25-29.
- [5] Gangemi S, Casciaro M, Trapani G, et al. Association between HMGB1 and COPD: A Systematic Review [J]. Mediat Inflamm, 2015(8):1-8.
- [6] 李成龙,许浦生,萧鲲,等.HMGB1 在慢性阻塞性肺疾病的研究进展[J].国际呼吸杂志,2015,35(7):542-545.
- [7] 刘本洪,周宁,孙明祥,等.糖皮质激素吸入治疗对 COPD 急性加重期患者血清和痰液中细胞因子的影响[J].实用临床医药杂志,2016,20(11):32-34.
- [8] 朱明光,常雅萍.高迁移率族蛋白 B1 的致炎细胞因子作用研究进展[J].国际免疫学杂志,2011,29(4):257-260.
- [9] Sethi S. Pathogenesis and treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2015, 26(2):192-203.
- [10] Karnak D, Beng-sun S, Beder S, et al. Chlamydia pneumoniae infection and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. Respir Med, 2011, 95(10):811-816.
- [11] Bircan A, Gokirmak M, Kilic O, et al. C-reactive protein levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease: role of infection [J]. Med Princ Pract, 2012, 17(3):202-208.
- [12] Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, et al. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 173(1):71-78.

(本文编辑:秦旭平)