

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01270

不同临床控制水平哮喘患者尿液中水通道蛋白2含量变化及与炎症介质的相关性

张 建¹, 李凤森^{1*}, 王 晶², Bilal Hasan²

1. 新疆医科大学, 新疆医科大学附属中医医院呼吸科, 乌鲁木齐 830000

2. 新疆医科大学附属中医医院呼吸生理病理实验室, 乌鲁木齐 830000

[摘要] **目的** 比较哮喘患者与健康受试者尿液中水通道蛋白2(aquaporin 2, AQP2)的含量,探讨哮喘不同临床控制水平AQP2含量的差异及与炎症介质的相关性。**方法** 检测60例哮喘患者及21例健康受试者(正常对照组)尿液中AQP2含量;CBA技术检测血浆白介素(IL)-4、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 及干扰素(IFN)- γ 水平。**结果** 哮喘未控制组(ACT在19分以下)及部分控制组(ACT 20~24分)患者尿液AQP2水平均较正常对照组增高($P<0.01$),且未控制组增高明显,达(174.28 \pm 40.81) pg/mL;血浆IL-4含量在哮喘未控制组最高(1.10 \pm 0.25) pg/mL,与正常对照组及哮喘部分控制组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);血浆IL-6含量在哮喘未控制组最高,但与正常对照组及哮喘部分控制组比较,差异无统计学意义($P=0.058$);TNF- α 含量哮喘组高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。尿液AQP2与血浆IL-4、IL-6均有相关性($P=0.049, P=0.010$),IL-4与IFN- γ 相关($P=0.019$),IL-6与TNF- α 有相关性($P=0.010$);IL-10与IFN- γ 相关($P=0.005$)。**结论** 哮喘患者尿液AQP2水平增高,且与血浆炎症介质IL-4、IL-6相关,尿液AQP2在支气管哮喘发病机制中的作用值得进一步研究。

[关键词] 哮喘;水通道蛋白2;白介素4;白介素6;肿瘤坏死因子;干扰素 γ

[中图分类号] R 562.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)11-1270-05

Urine AQP2 change in patients with asthma controlled to different clinical levels and its relationship with inflammatory factors

ZHANG Jian¹, LI Feng-sen^{1*}, WANG Jing², Bilal Hasan²

1. Xinjiang Medical University, Department of Respiratory, The Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang, China

2. The Respiratory Physiology and Pathology Laboratory, The Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang, China

[Abstract] **Objective** To compare the urine aquaporin 2 (AQP2) levels between asthmatic patients and healthy participants, explore the AQP2 levels in patients with asthma of different clinical control levels and its relationship with inflammatory factors. **Methods** Urine AQP2 levels were examined by ELISA in 60 patients with asthma and 21 healthy participants; plasma interleukin (IL) -4, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ levels were determined by CBA method. **Results** The levels of urine AQP2 in clinical uncontrolled asthma group (ACT below 19) and partially controlled asthma group (ACT 20~24) were significantly higher than that in the healthy control group ($P<0.01$), and the level in the uncontrolled group was (174.28 \pm 40.81) pg/mL. The plasma IL-4 level in uncontrolled group was (1.10 \pm 0.25) pg/mL, which was significantly higher than those in the other two groups ($P<0.01$). The plasma IL-6 level in uncontrolled asthma group was the highest but showing no significant difference when compared with the other two groups ($P=0.058$). The TNF- α level in asthma patients was significantly higher than that in healthy controls ($P<0.05$). Urine AQP2 was found significantly correlated with plasma IL-4 and IL-6 levels ($P=0.049, P=0.010$); plasma IL-4 level was significantly correlated with IFN- γ level ($P=0.019$); IL-6 was significantly correlated with TNF- α level ($P=0.010$); and IL-10 was significantly correlated with

[收稿日期] 2015-04-07 **[接受日期]** 2015-08-30

[基金项目] 自治区科技创新团队培养建设项目(2014751005). Supported by The Training Project for Scientific and Technological Innovation Team of Xinjiang Autonomous Region(2014751005).

[作者简介] 张 建, 博士生, 副主任医师. E-mail: zhangj1216@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0991-5802165, E-mail: fengsen602@163.com

IFN- γ level($P=0.005$). **Conclusion** Urine AQP2 level of asthma patients is increased, and it is significantly correlated with plasma levels of inflammatory factors IL-4 and IL-6. The role of AQP2 in the pathogenesis of bronchial asthma is worth further studying.

[Key words] asthma; aquaporin 2; interleukin-4; interleukin-6; tumor necrosis factor- α ; interferon- γ

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(11):1270-1274]

支气管哮喘(asthma, 简称哮喘)发病机制十分复杂,可能是多种机制共同作用的结果。已有研究表明,实验性哮喘豚鼠尿中水通道蛋白 2(aquaporin 2, AQP2)含量增加^[1-2],提示 AQP2 参与的水液代谢可能为哮喘的发病机制之一,本课题组前期研究发现哮喘急性发作期尿液 AQP2 增高^[3],提示 AQP2 可能参与了哮喘的发病过程。为进一步探讨不同临床控制水平哮喘患者尿液 AQP2 的差异性,本研究采用 ELISA 方法检测尿液中 AQP2 的含量,探讨不同临床控制水平的哮喘患者以及健康受试者之间的差异性及与炎症因子的相关性。本研究为前瞻性调查研究,研究方案符合人体试验伦理学标准,并得到新疆医科大学附属中医医院伦理委员会的批准,受试者在受试前签署知情同意书。

1 资料和方法

1.1 一般资料 支气管哮喘患者均来自 2012 年 3 月至 2013 年 7 月间新疆医科大学附属中医医院呼吸内科门诊及住院患者,诊断标准参照中华医学会呼吸病学分会支气管哮喘学组 2008 年支气管哮喘防治指

南^[4]。按照哮喘控制测试(asthma control test, ACT)进行控制水平的分级:通过回答有关哮喘症状和生活质量的 5 个问题的评分进行综合判定,25 分为控制、20~24 分为部分控制、19 分以下为未控制。纳入标准:(1)年龄 ≥ 18 周岁且 ≤ 68 周岁;(2)符合支气管哮喘诊断标准;(3)同意参与本试验且资料完整者。排除标准:(1)妊娠期或哺乳期妇女,女性经期;(2)合并有其他引起呼吸困难等疾病的疾病,如气胸、纵隔气肿、慢性阻塞性肺病、肺结核、慢性肺源性心脏病、慢性呼吸衰竭等;(3)近期有手术外伤者,合并其他急性感染性疾病者等;(4)合并冠心病、心功能不全、糖尿病、高血压病、肝肾疾病及造血系统等严重原发性疾病、风湿免疫结缔组织疾病、精神病患者。最终纳入符合条件者 60 例,均为非吸烟者,年龄 23~68 岁,平均年龄(44.79 \pm 9.85)岁,男性 18 例,女性 42 例,其中未控制组 36 例、部分控制组 24 例。另选取 21 名无呼吸系统疾病的健康人作为正常对照组,年龄 23~65 岁,平均年龄(45.29 \pm 8.97)岁,无哮喘和其他过敏性疾病及家族史,均为新疆医科大学附属中医医院体检中心体检正常者,均不吸烟。各组的其他临床资料见表 1。

表 1 哮喘患者(部分控制及未控制组)与健康受试者的临床特征比较

特征	正常对照组 $n=21$	未控制组 $n=36$	部分控制组 $n=24$	P 值
年龄(岁), $\bar{x}\pm s$	42.20 \pm 10.65	44.94 \pm 9.79	41.91 \pm 11.24	0.781
性别 n				0.161
男	7	11	7	
女	14	25	17	
BMI($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$), $\bar{x}\pm s$	25.70 \pm 4.20	24.43 \pm 5.14	21.54 \pm 4.50	0.377
过敏性疾病 n				<0.001
是	0	25	11	
否	21	11	13	
ICS 使用 n				<0.001
是	0	12	14	
否	21	24	10	
预测的 FEV1% $\bar{x}\pm s$	93.64 \pm 12.37	72.67 \pm 22.84	84.51 \pm 6.57	0.142
预测的 FVC% $\bar{x}\pm s$	100.07 \pm 8.56	92.50 \pm 23.37	91.25 \pm 5.40	0.604
FEV1/FVC% $\bar{x}\pm s$	82.80 \pm 8.76	62.22 \pm 15.24	80.47 \pm 7.88	0.024
按哮喘控制测试分级(分), $\bar{x}\pm s$	—	16.41 \pm 2.98	21.64 \pm 1.29	<0.001

BMI: 体质指数; ICS: 吸入糖皮质激素; FEV1: 1 s 用力呼气量; FVC: 用力肺活量

1.2 仪器和试剂 Andygene 公司人 AQP2 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒;美国 BD 公司流式液相多重蛋白定量技术试剂盒(CBA Human Th1/Th2/Th17 Kit)。

1.3 标本收集与处理 收集受试者清晨空腹禁饮时尿液,1 500×g 离心 20 min,仔细收集上清,于-80℃冰箱中保存,待测 AQP2 含量。抽取受试者清晨空腹禁饮时静脉血 3 mL,抗凝,1 500×g 离心 20 min,于-80℃冰箱中保存,待测血浆白介素(IL)-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、肿瘤坏死因子(TNF-α)、干扰素 γ(IFN-γ)的水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 AQP2 及炎症因子含量 表 2 可见,哮喘未控制组及部分控制组患者尿液中 AQP2 含量均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而未控制组较部分控制组增高,但差异无统计学意义。哮喘未控制组血浆中 IL-4 含量高于正常对照组及哮喘部分控制组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。哮喘未控制组血浆中 IL-6 的含量高于正常对照组及哮喘部分控制组,但差异无统计学意义($P = 0.058$)。哮喘未控制组及部分控制组患者血浆中 TNF-α 含量均高于正常

对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 哮喘患者(部分控制及未控制组)与正常对照组尿液 AQP2 及炎症因子含量

指标	$\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}), \bar{x} \pm s$		
	正常对照组 <i>n</i> =21	未控制组 <i>n</i> =36	部分控制组 <i>n</i> =24
AQP2	36.14±13.29	174.28±40.81**	146.55±64.60**
IL-2	1.94±0.29	2.00±0.31	1.62±0.58
IL-4	0.60±0.27	1.10±0.25**△△	0.62±0.26
IL-6	1.63±0.44	2.33±0.85	1.76±0.32
IL-10	0.61±0.21	0.77±0.32	0.69±0.15
IL-17	17.70±4.41	21.23±4.97	20.72±3.17
TNF-α	1.25±0.35	1.88±0.33*	1.87±0.51*
IFN-γ	2.03±0.56	2.04±0.60	2.37±0.70

AQP2:水通道蛋白 2;IL-2:白介素 2;IL-4:白介素 4;IL-6:白介素 6;IL-10:白介素 10;IL-17:白介素 17; TNF-α:肿瘤坏死因子 α; IFN-γ:干扰素 γ; * $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 与正常对照组比较;△△ $P < 0.01$ 与部分控制组比较

2.2 尿液 AQP2 与外周血炎症因子的相关性分析 结果显示(表 3),尿液 AQP2 与血浆 IL-4、IL-6 均有相关性($P = 0.049, P = 0.010$)。IL-4 与 IL-10、IFN-γ 也相关($P = 0.002, P = 0.019$),而与 IL-17 不相关。IL-6、IL-10 均与 TNF-α 有相关性($P = 0.001, P = 0.010$);IL-10 与 IFN-γ 相关($P = 0.005$)。

表 3 尿液 AQP2 与外周血炎症因子的相关系数

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF-α	IFN-γ	IL-17
AQP2	-0.191	0.275*	0.354*	0.010	0.172	-0.007	-0.060
IL-2		0.204	0.062	0.221	0.068	0.007	-0.207
IL-4			0.060	0.406**	0.110	0.317*	0.240
IL-6				0.052	0.683**	-0.120	0.099
IL-10					0.344*	0.370**	0.177
TNF-α						-0.017	0.083
IFN-γ							0.048

AQP2:水通道蛋白 2;IL-2:白介素 2;IL-4:白介素 4;IL-6:白介素 6;IL-10:白介素 10;IL-17:白介素 17; TNF-α:肿瘤坏死因子 α; IFN-γ:干扰素 γ. * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论

AQP2 基因是在 1993 年克隆确认的水通道蛋白(AQP)家族中的一种,AQP2 最早发现于肾脏集合管主细胞浆内,是肾小管重吸收水的主要通道蛋

白,在血管加压素的调控下以穿梭形式参与快速水分子转运机制,是生理条件下肾脏最主要的水通道,是维持调节体内水平衡的必需物质。AQP2 敲除后小鼠几乎不能存活,并表现为严重的尿崩症^[5]。有研究表明哮喘动物模型中肾脏 AQP2 基因 mRNA

和蛋白的表达明显增加^[6]。但肾脏 AQP2 的检测具有创伤性,探索尿液 AQP2 蛋白的检测方法及其意义成为了当前 AQP2 的研究热点。近来研究发现,AQP2“穿梭”于集合管主细胞的胞质和小管侧细胞膜,部分 AQP2 蛋白可以从细胞膜脱落于小管腔而被尿液冲出^[7]。AQP2 是目前唯一可以在尿液中检测到的水通道蛋白,具有检测方便、无创、易于临床推广的特点。Wu 等^[8]研究发现,AQP5 可以调节 AQP2 的表达,上调 AQP5 可能通过影响 AQP2 膜定位导致多尿,提示 AQP2 与 AQP5 的关系密切。而近期多项研究表明 AQP5 与哮喘、肺水肿及黏液分泌有关^[9-11],因而 AQP2 在哮喘发病机制中的作用值得进一步研究。

从免疫病理学的角度来看,哮喘是一种全身变态反应性疾病,哮喘患者的 IL-4 占优势,Th 前体细胞向 Th2 方向分化,分泌 IL-4 等 Th2 类因子,介导变态反应,其中 IL-4 促进 B 淋巴细胞合成 IgE,Th2 类因子在哮喘患者气道高反应性、气道慢性炎症和气道重塑的形成中起着关键作用^[12]。Kelly-Welch 等^[13]研究发现,IL-4 表达在哮喘发病过程中明显增高,IL-4 通过其受体而发挥生物效应,Th 细胞在抗原诱导下分泌大量的 IL-4、IL-13 等细胞因子,继而引起与变态反应、哮喘以及自身免疫性疾病相关的一系列相似的反应。在调节 T 细胞增殖等方面,IL-4 同样具有重要的作用。Kelly-Welch 等^[13]研究表明,蛋白酪氨酸激酶转导及转录激活因子以及磷脂酰肌醇-3-激酶途径是生理情况下介导 IL-4 受体所诱导的 T 细胞增殖的途径。同时在哮喘的发病机制中 IL-6 水平的升高起着非常重要的作用。IL-6 在诱导 Th17 分化过程起着关键的作用,IL-6 通过促进 Th17 细胞可抑制 Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞的分化、增殖,维持效应性 T 淋巴细胞和调节性 T 淋巴细胞的平衡,在调节免疫和炎性反应中起重要的作用。吸入丙酸氟替卡松可通过降低血浆 IL-6 水平的机制增加哮喘患儿外周血中单个核细胞中 CD4⁺ Foxp3⁺ 调节 T 淋巴细胞的数量^[14]。吸入糖皮质激素的治疗作用与下调血清中的 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平有关。陈华佳等^[15]研究发现,与治疗前比较,吸入糖皮质激素治疗 3 个月后哮喘患儿血清中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 浓度下降;IL-6 与 Th17 细胞分化有关,共同参与了哮喘过敏性的气道

炎症^[16]。Matsumoto 等^[17]的研究发现,通过双链 RNA 的复制,一些呼吸道病毒可以抑制 Foxp3⁺ T cell/IL-10,从而诱导 IL-6 的表达增加并促进了哮喘的发展。IL-6 有可能在严重的病毒性感染中成为阻碍哮喘发展的作用靶点。

与之前的研究结果类似,本研究数据同样显示出血浆 IL-6 在未控制组表达增高,但各组间差异无统计学意义($P=0.058$);同时未控制组哮喘患者的血浆 TNF- α 明显增高,与正常对照组比较差异有统计学意义($P=0.010$);血浆 IL-4 也表现为未控制组较正常组及部分控制组增高,差异均有统计学意义($P<0.01$);未控制组哮喘患者处于病情不同程度发作的状态,血浆 IL-4、IL-6、TNF- α 细胞因子表达明显增强,而部分控制组患者的血浆 IL-4、IL-6、TNF- α 细胞因子表达较未控制组减弱但仍较对照组有不同程度的增高。哮喘组尿液中 AQP2 较对照组增高($P<0.01$),尤以未控制组增高明显,提示尿液 AQP2 参与了哮喘的发病过程。目前未见关于 AQP2 与 IL-4、IL-6 关系的报道,但已有研究表明 AQP2 与 TNF- α 相关的机体系统性炎症反应有关,李慧玉等^[18]研究甘遂醇提取物与注射生理盐水小鼠排尿的关系,组织切片发现 AQP2 表达下降的同时伴有 TNF- α 的表达增强。应用顺铂注射液患者经过罗格列酮预处理后可降低体内 TNF- α 水平,减轻系统性炎症反应的同时表现为 AQP2 表达恢复^[19]。本研究还发现,尿液 AQP2 与血浆 IL-4、IL-6 有相关性,IL-6 与 TNF- α 明显相关,提示 AQP2 在哮喘 IL-4、IL-6、TNF- α 相关系统性炎症反应网络中的作用,可能成为探讨哮喘发病机制新的研究方向。

[参考文献]

- [1] 赵 娴,张晓虎. 哮喘状态(肺失肃降)下豚鼠水液代谢发生的变化及其机制 [J]. 陕西中医,2005,26:1115-1117.
- [2] 张小虎,陆 健,古继红,区永欣,赵 娴. 从哮喘豚鼠血浆 ADH 和尿 AQP-2 的改变探讨肺主宣降的实质 [J]. 中医药学报,2008,36:17-18.
- [3] 张 建,苏 军,王 晶,李凤森. 23 例支气管哮喘急性发作晨尿 AQP2 表达的变化 [J]. 临床肺科杂志,2013,18:973-974.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘组. 支气管哮喘防治指

- 南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31: 177-185.
- [5] Holmes R P. The role of renal water channels in health and disease[J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33(5-6): 547-552.
- [6] 王 哲, 太史春, 李淑玲, 赵金茹, 王德山. 实验性肺气虚对大鼠肾组织 AQP2 的表达影响[J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25: 1846-1848.
- [7] Wilson J L, Miranda C A, Knepper M A. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2 [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2013, 17: 751-764.
- [8] Wu H, Chen L, Zhang X, Zhou Q, Li J M, Berger S, et al. AQP5 is a new transcriptional target of Dot1a and a regulator of AQP2[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e53342.
- [9] Dong C, Wang G, Li B, Xiao K, Ma Z, Huang H, et al. Anti-asthmatic agents alleviate pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in the lungs of mice with OVA-induced asthma[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 181: 21-28.
- [10] Jin Y, Yu G, Peng P, Zhang Y, Xin X. Down-regulated expression of AQP5 on lung in rat DIC model induced by LPS and its effect on the development of pulmonary edema[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26: 661-665.
- [11] Ablimit A, Hasan B, Lu W, Qin W, Wushouer Q, Zhong N, et al. Changes in water channel aquaporin 1 and aquaporin 5 in the small airways and the alveoli in a rat asthma model[J]. *Micron*, 2013, 45: 68-73.
- [12] Bhakta N R, Woodruff P G. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again[J]. *Immunol Rev*, 2011, 242: 220-232.
- [13] Kelly-Welch A E, Hanson E M, Boothby M R, Keegan A D. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps[J]. *Science*, 2003, 300: 1527-1528.
- [14] 何 云, 刘恩梅, 杨锡强, 李 欣. 吸入糖皮质激素对哮喘儿童外周血 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞及 IL-2、IL-6 的影响及其机制研究[J]. *现代免疫学*, 2008, 28: 381-384.
- [15] 陈华佳, 胡 婷. 长期吸入糖皮质激素对支气管哮喘患儿血清中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平的影响[J]. *中南医学*, 2008, 4: 485-487.
- [16] Besnard A G, Togbe D, Couillin I, Tan Z, Zheng S G, Erard F, et al. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation[J]. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4: 3-10.
- [17] Matsumoto K, Asai Y, Fukuyama S, Kan-O K, Matsunaga Y, Noda N, et al. IL-6 induced by double-stranded RNA augments allergic inflammation via suppression of Foxp3⁺ T-cell/IL-10 axis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46: 740-747.
- [18] 李慧玉, 雷 帆, 王玉刚, 肖新月, 胡 珺, 程显隆, 等. 甘遂对水负荷小鼠排尿以及肾脏 AQP2, IL-1 β , TNF- α mRNA 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37: 606.
- [19] Lee S, Kim W, Moon S O, Sung M J, Kim D H, Kang K P, et al. Rosiglitazone ameliorates cisplatin-induced renal injury in mice [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21: 2096-2105.

[本文编辑] 魏学丽