



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.12.008

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.12.008

· 论著 ·

吸烟的慢性阻塞性肺疾病患者痰液中蛋白激酶 R 样内质网激酶、真核翻译起始因子 2 α 水平与疾病严重程度及肺功能的关系

穆迪 王金亮 葛须鑫

[摘要] **目的** 探讨吸烟的慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者痰液中蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α)水平与疾病严重程度及肺功能的关系。**方法** 纳入 COPD 患者 107 例,根据是否吸烟分为吸烟组 63 例和非吸烟组 44 例,再根据疾病状态将两组患者分别分为急性发作期组和稳定期组。采用酶联免疫吸附试验检测两组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平并进行比较。根据肺功能检查中的第 1 秒用力呼气容积(FEV₁)占预测值的百分比(FEV₁% pred)进行慢性阻塞性肺疾病全球倡议(GOLD)分级。采用 Pearson 相关分析评估吸烟组患者痰液中 PERK、eIF2 α 与 FEV₁% pred、FEV₁/用力肺活量(FVC)的相关性。**结果** 吸烟组患者痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平均高于非吸烟组($P < 0.05$)。吸烟组中,急性发作期组患者痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平均高于稳定期组($P < 0.05$);非吸烟组中,急性发作期组和稳定期组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。吸烟组患者随着 GOLD 分级的增加,痰液中 PERK、eIF2 α 水平逐渐升高($P < 0.05$)。Pearson 相关分析结果显示,吸烟组患者痰液中 PERK 水平与 eIF2 α 水平呈正相关($r = 0.386, P = 0.002$),痰液中 PERK 水平与 FEV₁% pred 呈负相关($r = -0.638, P < 0.001$),但与 FEV₁/FVC 无相关性($r = 0.095, P = 0.469$);痰液中 eIF2 α 水平与 FEV₁% pred 呈负相关($r = -0.445, P < 0.001$),但与 FEV₁/FVC 无相关性($r = 0.045, P = 0.717$)。**结论** 吸烟的 COPD 患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平与疾病严重程度呈正相关,与 FEV₁% pred 呈负相关性,对临床诊疗有一定的参考价值。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 吸烟; 内质网应激; 蛋白激酶 R 样内质网激酶; 真核翻译起始因子 2 α

Relationship among levels of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and eukaryotic factor 2 α in sputum with disease severity and lung function in chronic obstructive pulmonary disease patients with smoking Mu Di, Wang Jinliang, Ge Xuxin. Department of Respiratory Medicine, Zhengzhou Seventh People's Hospital, Zhengzhou 450006, China

[Abstract] **Objective** To explore relationship among levels of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and eukaryotic factor 2 α (eIF2 α) in sputum with disease severity and lung function in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients with smoking. **Methods** According to smoking or not, 107 COPD patients were divided into smoking group (63 cases) and no smoking group (44 cases), and then patients in above two groups were divided into acute exacerbation period group and stable period group according to disease state respectively. Levels of PERK and eIF2 α in sputum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay and compared between two groups. COPD global initiative (GOLD) classification was conducted according to percentage of forced expiratory volume in the first second (FEV₁) to the predicted value (FEV₁% pred) in lung function test. Correlations among levels of PERK, eIF2 α in sputum and FEV₁% pred, FEV₁/forced vital capacity (FVC) were evaluated by Pearson correlation analysis. **Results** Levels of PERK and eIF2 α in sputum in smoking group were higher than those in no smoking group ($P < 0.05$). In smoking group, levels of PERK and eIF2 α in sputum in acute exacerbation period group were higher than those in stable period group ($P < 0.05$), while in no smoking group, levels of PERK and eIF2 α in sputum were not significantly different between acute exacerbation period group and stable period group ($P > 0.05$). In patients of smoking group, with the increase of GOLD classification, levels of PERK and eIF2 α in sputum gradually increased ($P < 0.05$). Pearson correlation

analysis showed that, in smoking group, levels of PERK in sputum was positively related with eIF2 α ($r=0.386, P=0.002$), levels of PERK in sputum was negatively related with FEV₁% pred ($r=-0.638, P<0.001$), while was not significantly related with FEV₁/FVC ($r=0.095, P=0.469$). Levels of eIF2 α in sputum was negatively related with FEV₁% pred ($r=-0.445, P<0.001$), while was not significantly related with FEV₁/FVC ($r=0.045, P=0.717$). **Conclusion** Levels of PERK and eIF2 α in sputum are positively related with disease severity and negatively related with FEV₁% pred in COPD patients with smoking, which would be for clinical diagnosis and treatment of them.

[Key words] Chronic obstructive pulmonary disease; Smoking; Endoplasmic reticulum stress; Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; Eukaryotic translation initiation factor 2 α

目前,吸烟是诱发慢性阻塞性肺疾病(COPD)最主要的独立危险因素已得到普遍认可^[1-2]。香烟中的自由基和毒性物质可促使肺泡上皮细胞发生内质网应激诱导性凋亡^[3]。甘桂香等^[4]发现吸烟所致 COPD 模型大鼠,肺损伤组织中蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α)水平明显升高。虽然从动物实验角度分析,内质网应激很可能是诱发 COPD 炎症反应的重要机制,但尚缺乏人体试验证据。PERK-eIF2 α 信号通路是内质网应激反应中早期被激活的通路之一^[5],考虑到 COPD 患者肺组织标本来源有限,我们尝试通过检测痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平,分析其与疾病严重程度及肺功能的相关性,为指导临床诊断和个体化治疗提供理论依据。

对象与方法

1. 对象:2018 年 5 月~2019 年 5 月于我科就诊的 COPD 患者 107 例,其中男 78 例,女 29 例,年龄 34~82 岁,平均年龄(60.53 \pm 13.96)岁。根据吸烟情况,将患者分为吸烟组和非吸烟组。纳入标准:(1)吸入支气管舒张剂后第 1 秒用力呼气容积(FEV₁)/用力肺活量(FVC)<70%,符合《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2018 年修订版)》^[6]关于 COPD 的诊断标准,根据该指南中的分期标准将吸烟组和非吸烟组患者分别分为急性加重期组和稳定期组;(2)具备完整肺功能资料;(3)神志清楚,无精神障碍。排除标准:(1)近 3 个月内除肺组织外其他组织的急慢性感染;(2)支气管哮喘、肺间质纤维化、活动性肺结核病史;(3)近半年内接受手术治疗。根据是否吸烟(WHO 将吸烟定义为每天吸烟>1 支,且连续吸烟超过 1 年)将所有患者分为吸烟组 63 例和非吸烟组 44 例。本研究经我院伦理委员会审核批准(20180511),所有患者均签署知情同意书。

2. 方法

(1)诱导痰液检查:我院诱导痰液检查采取定时法。所有患者提前 1 天停用止咳药物,诱导前 10 min 吸入沙丁胺醇 400 μ g,超声雾化吸入 3% 的高渗盐水 15 min 后,深咳取痰液中的黏稠部分,置于无菌痰盒

中。若痰量不足,可继续递增高渗盐水浓度,超声雾化吸入 7 min,继续采集痰液样本。弃痰液中稀薄部分后于显微镜下观察,每低倍视野 WBC 计数>25 个且鳞状上皮细胞计数<10 个或鳞状上皮细胞计数/WBC 计数<1:2.5,则为合格痰标本,可用于 PERK 和 eIF2 α 的检测。

(2)痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平检测:于痰液标本中加入二硫苏糖醇混匀,采用 300 目尼龙网过滤后以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,采用人 PERK 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒和人 eIF2 α ELISA 试剂盒检测 PERK 和 eIF2 α 水平。PERK ELISA 试剂盒购于加拿大 PL Laboratories 公司(货号:PL0304700),eIF2 α ELISA 试剂盒购于美国 BIOHJSW 公司(货号:orb-EHJ127804)。

(3)肺功能检查:参考《肺功能检查指南(第二部分)-肺量计检查》^[7],采用 VS229 型肺功能测试仪检测肺功能指标,包括 FEV₁、FVC、FEV₁/FVC。每次测试均重复 \geq 3 次,选用图形及数据最好的 1 次,以减少数据误差,提高准确性。根据 FEV₁占预测值的百分比(FEV₁% pred)进行慢性阻塞性肺疾病全球倡议(GOLD)分级。GOLD 1 级:FEV₁% pred \geq 80%,疾病严重程度为轻度;GOLD 2 级:FEV₁% pred 50%~79%,疾病严重程度为中度;GOLD 3 级:FEV₁% pred 30%~49%,疾病严重程度为重度;GOLD 4 级:FEV₁% pred<30%,疾病严重程度为极重度。

(4)生活质量评估:采用慢性阻塞性肺疾病评分(CAT)评估患者生活质量。由我科医务人员负责发放问卷和统计结果,问卷由患者独立完成。

3. 统计学处理:应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析;计数资料以例数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组患者临床资料比较:吸烟组患者吸烟指数为(689.74 \pm 203.18)支/年。吸烟组和非吸烟组患者

表 1 两组患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别(男/女)	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	FEV ₁ /FVC(%)	FEV ₁ % pred(%)	CAT 评分(分)
吸烟组	63	49/14	62.81 ± 14.42	23.87 ± 1.76	58.71 ± 2.64	55.16 ± 18.79	19.32 ± 5.11
非吸烟组	44	29/15	59.43 ± 13.18	23.34 ± 1.69	59.43 ± 2.58	57.05 ± 15.83	18.64 ± 6.25
χ^2/t 值		1.847	1.235	1.558	1.401	0.545	0.618
<i>P</i> 值		0.174	0.219	0.122	0.164	0.587	0.538

性别、年龄、BMI、FEV₁/FVC、FEV₁% pred 及 CAT 评分比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2. 两组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较:吸烟组患者痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平均高于非吸烟组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PERK(ng/ml)	eIF2 α (ng/ml)
吸烟组	63	115.31 ± 31.30	29.53 ± 8.47
非吸烟组	44	63.42 ± 27.49	14.98 ± 6.37
<i>t</i> 值		8.863	9.643
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

3. 吸烟组和非吸烟组不同疾病状态患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较:吸烟组中,急性加重期组患者痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平均高于稳定期组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。非吸烟组中,急性加重期组和稳定期组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 吸烟组和非吸烟组不同疾病状态患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PERK(ng/ml)	eIF2 α (ng/ml)
吸烟组	急性加重期组	39 132.64 ± 25.73	34.78 ± 8.26
	稳定期组	24 103.69 ± 32.95 ^a	26.46 ± 6.95 ^a
非吸烟组	急性加重期组	26 68.54 ± 30.73	15.74 ± 5.89
	稳定期组	18 62.10 ± 28.49	14.13 ± 6.14

注:与同组中急性发作期组比较,^a $P < 0.05$

4. 吸烟组不同疾病严重程度患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较:吸烟组中,GOLD 1 级组、GOLD 2 级组、GOLD 3 级组及 GOLD 4 级组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),且随着 GOLD 分级的增加,痰液中 PERK、eIF2 α 水平逐渐升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

5. 吸烟组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平与肺功能的相关性:Pearson 相关分析结果显示,吸烟组患者痰液中 PERK 水平与 eIF2 α 水平呈正相关($r = 0.386$, $P = 0.002$),痰液中 PERK 水平与 FEV₁% pred 呈负相关($r = -0.638$, $P < 0.001$),但与 FEV₁/FVC 无相关性($r = -0.095$, $P = 0.469$);痰液中 eIF2 α 水平与 FEV₁% pred 呈负相关($r = -0.445$, $P < 0.001$),但与

FEV₁/FVC 无相关性($r = -0.045$, $P = 0.717$)。

表 4 吸烟组不同疾病严重程度患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PERK(ng/ml)	eIF2 α (ng/ml)
GOLD 1 级组	4	87.95 ± 23.09	23.72 ± 5.76
GOLD 2 级组	36	107.93 ± 22.15 ^a	27.40 ± 7.24 ^a
GOLD 3 级组	13	125.24 ± 25.53 ^{ab}	32.02 ± 9.60 ^{ab}
GOLD 4 级组	10	175.04 ± 26.10 ^{abc}	36.29 ± 7.70 ^{abc}
<i>F</i> 值		24.009	4.600
<i>P</i> 值		<0.001	0.006

注:与 GOLD 1 级组比较,^a $P < 0.05$;与 GOLD 2 级组比较,^b $P < 0.05$;与 GOLD 3 级组比较,^c $P < 0.05$

讨 论

COPD 患者肺损伤的机制尚不明确^[8]。慢性炎症假说、蛋白酶-抗蛋白酶失衡假说、线粒体基质障碍等均存在争议。2015 年中国疾病预防控制中心慢病中心对全国范围开展的 COPD 流行病学调查研究结果显示,吸烟是 COPD 的主要致病因素,被动吸烟、粉尘接触、呼吸道疾病史等是引起 COPD 的重要高危因素^[9-10]。但对于吸烟的 COPD 患者,炎症机制并不能完全解释 COPD 病情进展。如在临床治疗中,与其他气道炎症疾病(如肺炎、哮喘等)不同的是,抗炎药物并不能完全阻止 COPD 进展^[11]。因此,从其他发病机制角度寻找生物学指标对于指导 COPD 的临床诊疗十分重要。

近些年,有学者从细胞和分子水平证实香烟烟雾中的氧化物质和有害物质可通过内质网应激机制诱导肺组织细胞凋亡,导致肺上皮组织屏障损伤,从而可能诱发 COPD^[12]。内质网是维持真核生物新陈代谢的重要细胞器,对氧化应激反应十分敏感,若细胞发生氧化-抗氧化失衡,内质网合成-折叠蛋白功能受损,未折叠蛋白或错误折叠蛋白大量聚集,从而导致内质网应激^[13]。而未折叠或错误折叠的蛋白与葡萄糖调节蛋白 78 结合,激活 PERK-eIF2 α 信号通路,反馈性缓解内质网应激状态^[14]。eIF2 α 是真核生物中具有高度保守结构的蛋白质,可与很多关键激酶结合,抑制下游相关基因转录和翻译,并促使多种新生多肽主动自内质网中释放,从而减轻内质网应激反应^[15]。而 PERK 是 eIF2 α 的上游激活分子,在内质网应激状态下,PERK 被激活,通过磷酸化 eIF2 α 抑制下游蛋白的翻

译,减少非折叠蛋白反应^[16]。且 PERK、eIF2 α 可被释放至细胞外,在循环血液和痰液样本中均可被检测到^[17]。在前期预实验中,我们采用 ELISA 检测,结果发现痰液中 PERK、eIF2 α 水平较外周血清高,可能与血液中存在大量蛋白酶,易降解 PERK、eIF2 α 有关,因此在本研究中我们选择痰液样本。本研究结果显示,吸烟组患者痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平均高于非吸烟组,表明内质网应激反应可能是吸烟引起 COPD 的主要机制之一。另外,我们在选取患者时,不仅包含急性发作期患者,还有部分患者处于稳定期,进一步分层分析结果显示,吸烟组中,急性发作期组患者痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平均高于稳定期组,而非吸烟组中,急性发作期组和稳定期组患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平比较差异均无统计学意义,推测在吸烟的 COPD 患者中,内质网应激可能是疾病进展的重要机制。本研究结果显示,吸烟组中,随着 GOLD 分级增加,COPD 患者痰液中 PERK、eIF2 α 水平逐渐升高,且痰液中 PERK、eIF2 α 水平与 FEV₁% pred 均呈负相关,进一步证实内质网应激反应可反映吸烟的 COPD 患者的疾病严重程度。

综上所述,香烟烟雾中的氧自由基或有害颗粒可能通过激活肺组织上皮细胞内质网应激促进肺组织细胞损伤/凋亡,进而促使并加重 COPD 的发生和发展。检测痰液中 PERK 和 eIF2 α 水平可能反映吸烟 COPD 患者的疾病状态,对于临床诊疗有一定的参考价值。

参 考 文 献

[1] Gülşen A. Bronchoscopic lung volume reduction: a 2018 review and update[J]. Turk Thorac J, 2018, 19(3): 141-149.

- [2] 徐小峰,戴宏宇,夏春伟,等. 吸烟的稳定期慢性阻塞性肺疾病患者血清微小 RNA-34a 的表达及临床意义[J]. 临床内科杂志, 2019, 36(8): 539-542.
- [3] 冯双双,陈刘通,廖晨,等. 吸烟慢性阻塞性肺疾病患者肺组织中 OLA1 表达与氧化应激、内质网应激的相关性分析[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2018, 11(6): 654-658.
- [4] 甘桂香,胡瑞成,谭双香. 吸烟 COPD 模型大鼠肺组织内质网相关凋亡蛋白 CHOP 的表达[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(2): 314-320.
- [5] Zhang K, Wang M, Li Y, et al. The PERK-EIF2 α -ATF4 signaling branch regulates osteoblast differentiation and proliferation by PTH[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, 316(4): E590-E604.
- [6] Vogelmeier CF, Criner GJ, Martínez FJ, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary[J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53(3): 128-149.
- [7] 中华医学会呼吸病学分会. 肺功能检查指南(第二部分)-肺量计检查[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(7): 481-486.
- [8] 张小娥,张彩莲. 慢性阻塞性肺疾病流行病学及疾病经济负担研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2017, 26(6): 472-476.
- [9] 丁贤彬,毛德强,唐文革,等. 重庆市慢性阻塞性肺疾病患病率及影响因素[J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29(3): 57-61.
- [10] 李成龙,周玉民. 慢性阻塞性肺疾病的早期发现与早期干预[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(11): 725-728.
- [11] 李锋,周新. 慢性阻塞性肺疾病的发病机制研究进展[J]. 中国呼吸与危重症监护杂志, 2019, 18(1): 88-92.
- [12] Olloquequi J, Jaime S, Parra V, et al. Comparative analysis of COPD associated with tobacco smoking, biomass smoke exposure or both[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 13.
- [13] Lugea A, Gerloff A, Su HY, et al. The Combination of Alcohol and Cigarette Smoke Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Pancreatic Acinar Cells[J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1674-1686.
- [14] Cnop M, Toivonen S, Igoillo-Esteve M, et al. Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells[J]. Mol Metab, 2017, 6(9): 1024-1039.
- [15] Qiao Q, Sun C, Han C, et al. Endoplasmic reticulum stress pathway PERK-eIF2 α confers radioresistance in oropharyngeal carcinoma by activating NF- κ B[J]. Cancer Sci, 2017, 108(7): 1421-1431.
- [16] He B, Zhang W, Qiao J, et al. Melatonin protects against COPD by attenuating apoptosis and endoplasmic reticulum stress via upregulating SIRT1 expression in rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97(5): 386-391.
- [17] Atkins C, Liu Q, Minthorn E, et al. Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity[J]. Cancer Res, 2013, 73(6): 1993-2002.

(收稿日期:2020-01-02)

(本文编辑:周三凤)



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.12.009

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.12.009

· 论著摘要 ·

抗脂阿拉伯甘露聚糖抗体 IgG、结核感染 T 细胞斑点试验及腺苷脱氨酶对活动性肺结核的诊断价值

黄晨 罗丹霖

【关键词】 抗脂阿拉伯甘露聚糖抗体; 结核感染 T 细胞斑点试验; 腺苷脱氨酶; 活动性肺结核

结核病是一种由结核分枝杆菌感染所导致的慢性传染性疾病,其中以结核分枝杆菌侵犯肺部发生肺结核常见^[1]。肺结

核按病变程度可分为 3 个阶段:进展期、好转期、稳定期。进展期病灶存在活动性变化,痰菌阳性;好转期病灶活动性变化改善,痰菌转阴;稳定期病灶无活动性改变,痰菌阴性达半年以上,其中,进展期和好转期均属于活动性肺结核^[2]。结核分枝杆菌本身不产生毒素,其致病性可能与结核分枝杆菌在组织细