

外周血单个核细胞 TNF- α 基因表达与哮喘相关表型 *赵 明^{1,2} 纪 霞^{1,2,Δ} 王海燕² 贾少丹² 张伟毅³

(1 潍坊医学院 山东 潍坊 261000 2 青岛常见病重点实验室哮喘病实验室 青岛市市立医院 山东 青岛 266071 ;

3 Westmead Hospital, NSW 2145, Sydney Australia)

摘要 目的 探讨外周血单个核细胞(PBMC)TNF- α 基因 mRNA 表达与哮喘严重程度、临床病理及相关影响因素的关系。方法 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 67 例哮喘病人和 25 例健康对照 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达水平, 分析其与哮喘控制程度、血浆 TNF- α 浓度、嗜酸性粒细胞百分比(EOS%)、血浆总 IgE 浓度和哮喘相关影响因素的关系。结果 经方差分析和 SNK-q 检验, 哮喘未控制组 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达水平高于正常组($P < 0.01$)、控制组($P < 0.01$)和部分控制组($P < 0.05$)。相关分析显示哮喘病人 TNF- α mRNA 表达与血浆 TNF- α 浓度和 EOS%呈正相关, 相关系数分别为 $r = 0.584$ ($P < 0.01$)和 $r = 0.29$ ($P < 0.05$)。有吸烟史的哮喘病人 TNF- α mRNA 表达水平高于非吸烟病人($P < 0.05$)。结论 哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达水平与哮喘的控制程度呈负相关, 与血浆 TNF- α 浓度呈正相关, PBMC 中 TNF- α mRNA 表达水平与血浆 TNF- α 浓度可作为哮喘控制程度的参考指标。

关键词 哮喘; TNF- α mRNA; PBMC; 实时荧光定量 PCR; 表型

中图分类号 R562.25 R596.3 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)15-2920-05

The Expression Levels of TNF- α mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells with Asthma-related Phenotypes*ZHAO Ming^{1,2}, JI Xia^{1,2,Δ}, WANG Hai-yan², JIA Shao-dan², ZHANG Wei-yi³

(1Weifang medical college, Weifang 261000, China;

2 Asthma laboratory of Qingdao common ailment key laboratory, Qingdao 266071, China;

3Westmead Hospital, NSW 2145, Sydney Australia)

ABSTRACT Objective: To observe the association of TNF- α mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with asthma severity, clinicopathology and asthma-related influence factors. **Methods:** The relative expression levels of TNF- α mRNA in PBMC were detected by real time fluorescence quantitative PCR from 67 asthma patients with diverse severities and 25 healthy controls. The results were compared among groups and the correlation analysis were performed between the expression levels of TNF- α mRNA in PBMC with the levels of plasma TNF- α , the percentage of peripheral blood eosinophils (EOS%), the levels of total plasma IgE, and asthma-related influence factors. **Results:** The relative expression levels of TNF- α mRNA in PBMC in uncontrolled asthma patients were higher than that in healthy controls ($P < 0.01$), controlled asthma patients ($P < 0.01$), and partly controlled asthma patients ($P < 0.05$). Pearson product-moment correlation analysis showed that TNF- α mRNA expression in PBMC were correlated with plasma TNF- α and EOS% with $r = 0.584$ ($P < 0.01$) and $r = 0.29$ ($P < 0.05$) respectively. The relative expression levels of TNF- α mRNA in patients with positive smoking history were higher than those in patients with no smoking history. **Conclusion:** The relative expression levels of TNF- α mRNA in PBMC were negatively correlated to the levels of asthma control, and were positively correlated to plasma TNF- α . Both the expression levels of TNF- α mRNA in PBMC and plasma TNF- α could be potential makers for management of asthma.

Key words: Asthma; TNF- α mRNA; PBMC; Real time quantitative PCR; Phenotype

Chinese Library Classification(CLC): R562.25, R596.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)15-2920-05

前言

哮喘是一种由多种炎性细胞和细胞因子参与的、以可逆性气道阻塞和气流受限为特征、可反复发作的慢性气道炎症性疾病。气道阻塞和气流受限增高 (airway hyperresponsiveness, AHR) 为主要临床特点的气道炎症性疾病, 受遗传因素的影响。

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种主要由巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子, 参与正常炎症反应和免疫反应, 与哮喘及多种炎症性疾病的发病密切相关, 气道局部(肺泡灌洗液、诱发痰、支气管粘膜活检组织) TNF- α 基因表达增高可能是导致哮喘加重和 AHR 的重要因素^[1-3]。某些

* 基金项目: 山东省卫生科技发展计划项目, 青岛市科技计划基础科研项目(11-2-4-7-(2)-jch);

青岛市市南区科技发展计划项目(12009-4-31-GG)

作者简介: 赵明(1974-) 男, 硕士研究生, 主治医师 E-mail: zhaomingqh@163.com

Δ通讯作者: 纪霞 E-mail: jixia60@hotmail.com

(收稿日期: 2011-10-25 接受日期: 2011-11-20)

前瞻性研究显示,以 TNF- α 为靶点的抗炎治疗可使部分重症哮喘的肺功能及生活质量得到明显改善^[45],而后期的研究显示,这一治疗措施可能给患者带来巨大的风险^[67]。因而,如何根据哮喘相关表型的变化选择获益人群成为了目前研究的重点。Berry 等认为外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 TNF- α 轴(膜结合 TNF- α 、TNF 受体 1 和 TNF- α 转换酶)表达增高与哮喘的严重程度密切相关,是抗 TNF- α 治疗获益的重要参考指标^[9]。类似研究在国内尚未见报道。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术,对不同控制程度哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达进行定量分析,探讨其与哮喘临床病理间的关系,为哮喘的诊治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择 2008 年 12 月-2011 年 6 月在青岛市立医院门诊就诊或住院的成人哮喘 67 例,年龄 20-75 岁,其中女性 36 例,男性 31 人,依据 2008 年中华医学会支气管哮喘防治指南^[10]哮喘控制程度的分级标准分为控制组($n=23$)、部分控制组($n=23$)和未控制组($n=21$)。具体分级标准:①控制组,满足如下所有条件:白天无症状或白天症状 ≤ 2 次/周,夜间无症状或憋醒,无活动受限,不需缓解药物治疗或缓解药物治疗 ≤ 2 次/周,FEV₁ $\geq 80\%$ 预计值,无急性加重;②部分控制组,是指出现以下任何一项:白天症状 >2 次/周,夜间症状或憋醒次数 ≥ 1 次/周,活动受限 ≥ 1 次/周,需缓解药物治疗 >2 次/周,FEV₁ $<80\%$ 预计值,急性加重 ≥ 2 次/年;③未控制组,是指任意一周内出现部分控制指标 ≥ 3 项或发生 1 次急性加重。所有哮喘病人均排除其他心、肺、肝、肾、糖尿病、免疫系统疾病、炎性肠病及 HLA 相关疾病,1 月内无口服或静脉应用糖皮质激素史。对照组 25 人,为健康志愿者,其中女性 13 人,男性 12 人,年龄 21-65 岁,均无哮喘家族史及典型过敏史。所有参加本研究者均获知情同意,本研究获青岛市市立医院伦理委员会通过,符合 2008 年修正版《赫尔辛基宣言》。

1.2 方法

1.2.1 标本收集和资料收集 受试对象采集空腹外周静脉血 10 ml,EDTA-K2 抗凝,测定单个核细胞中 TNF- α mRNA 的表达

水平、血浆 TNF- α 浓度、外周血嗜酸性粒细胞百分比(Percentage of peripheral blood eosinophils, EOS%) 和血浆总 IgE 浓度。记录测定结果并将病人的性别、年龄、哮喘家族史、过敏史、吸烟史、起病时间、夜间哮喘发作等临床病理资料一并录入 SPSS17.0 统计软件。

1.2.2 外周血单个核细胞 RNA 提取 6 mL EDTA-K2 抗凝血加 PBS 缓冲液 10 mL 充分混匀,取淋巴细胞分离液 10 mL 加入容积为 50 mL Rnase-free 离心管中,将 PBS 混匀的血液匀浆沿管壁缓慢加入淋巴细胞分离液中,以 1800 r/min 水平离心 30 分钟,吸取淋巴细胞层约 5-6 mL 置于 20 mL 的离心管中,加等量的 PBS 混匀后 3000 r/min 离心 10 分钟,弃去上清液,留细胞沉淀,应用美国 Promega 公司 RNA 提取试剂盒,严格按照说明书提取外周血单核细胞总 RNA。

1.2.3 RNA 质量检测 提取后的 RNA 应用微量核酸蛋白测定仪(Nanovue, GE, USA)进行定性、定量分析,OD280/OD260 在 1.8-2.1 之间为初步合格,进而通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行电泳和凝胶成像,自动计算 RNA 完整性(RIN 值),RIN 值 ≥ 7.8 示完整性较好,可用于下游实时定量 PCR 扩增,合格标本置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.4 cDNA 第一链合成 使用 Quantscript RT cDNA 第一链合成试剂盒(TIANGEN, 中国),反应总体积为 20 μ L,包括:总 RNA 2 μ L(≥ 100 ng),10 $\times$ RT mix 2 μ L,2.5 mM dNTP 2 μ L, Oligo-dT15 引物 2 μ L, Reverse Transcriptase 1 μ L,以灭菌双蒸水补足至 20 μ L,37 °C 孵育 60 分钟。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 每个样品目的基因检测取 3 个重复,以 β -actin 作为内参基因,SYBR Green 染色,根据 NCBI GenBank 中 TNF- α mRNA 和 β -actin mRNA 序列,利用 Premier 5.0 软件设 PCR 引物,由上海金瑞斯公司合成(表 1)。PCR 反应体系总体积 20 μ L,包括:2.5 $\times$ Realmastermix 9 μ L(TIANGEN, 中国),上下游引物(10 μ M)各 0.5 μ L,cDNA 模板 2 μ L,以灭菌双蒸水补足至 20 μ L。PCR 反应条件:95 °C 预变性 2 分钟,随后按 95 °C 变性 20 秒,60 °C 退火 30 秒,68 °C 延伸 40 秒,共循环 35 次。以上反应在 eppendorf Mastercycler ep realplex 实时荧光定量 PCR 仪(德国)完成。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in real-time fluorescent quantitative PCR

Primers	Primers sequence	Amplification product
TNF- α (F)	5'- TACCGGCATTATTGGAGTGA -3'	98 bp
TNF- α (R)	5'- GTGTTCTGTT TCTCCTGGCA -3'	
β -actin (F)	5'- GGCATCCACGAACTACCTT -3'	136 bp
β -actin (R)	5'- TGATCTCCTTCTGCATCCTG -3'	

1.2.6 血浆总 IgE 浓度和外周血嗜酸性粒细胞计数百分比(EOS%) 血浆总 IgE 浓度采用放射比浊法进行检测,经对数(log10) 转换成正态资料,EOS%采用全自动血细胞分析仪 COULTER LH 750(Beckman, USA)进行检测。

1.2.7 血浆 TNF- α 浓度测定 使用美国 BIO-RAD 伯乐酶标仪,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 TNF- α 浓度,TNF- α 试剂盒购自 R&D Systems Inc(USA),严格按照说明书进行操作。

1.3 统计学分析

使用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 正态分布或对数转换后成正态分布的连续性计量变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本组间均数比较采用 Student-t 检验; 多样本均数比较采用方差分析 (F 检验), 两两比较采用 SNK 法检验; 采用 Pearson 线性相关分析比较正态变量间相关性, 计算相关系数 r , $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 PBMC 中 TNF- α mRNA 相对表达水平

本次实验重复样品目的基因的扩增曲线重叠性较好, 溶解曲线呈单峰, 表示引物设计合理, 无引物二聚体及非特异性扩增 (图 1)。PCR 数据分析根据文献资料所述^[9] 取 3 个重复样品的平均 CT 值作为此样品待测基因的 CT 值, 各组中 TNF- α

mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta CT}$ 表示, $\Delta CT = (CT_{TNF-\alpha} - CT_{\beta-actin})$; 以对照组作为基线, 采用下列公式计算各哮喘组 TNF- α mRNA 表达差异倍数 $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta CT}$, 其中 $\Delta\Delta CT = (CT_{TNF-\alpha} - CT_{\beta-actin})_{哮喘组} - (CT_{TNF-\alpha} - CT_{\beta-actin})_{对照组}$ 。通过计算, 哮喘控制组、哮喘部分控制组和哮喘未控制组 TNF- α mRNA 表达量分别为 0.29 ± 0.16 、 0.50 ± 0.14 和 0.59 ± 0.20 , fold change 分别为 1.11、1.92 和 2.29, 方差分析显示各哮喘组和正常对照组间 TNF- α mRNA 表达差异有统计学意义 ($F = 19.78$, $df = 91$, $P < 0.01$), 进一步 SNK-q 检验示部分控制组和未控制组 TNF- α mRNA 表达均高于正常组和控制组 ($P < 0.01$), 未控制组高于部分控制组 ($P < 0.05$) (表 2)。

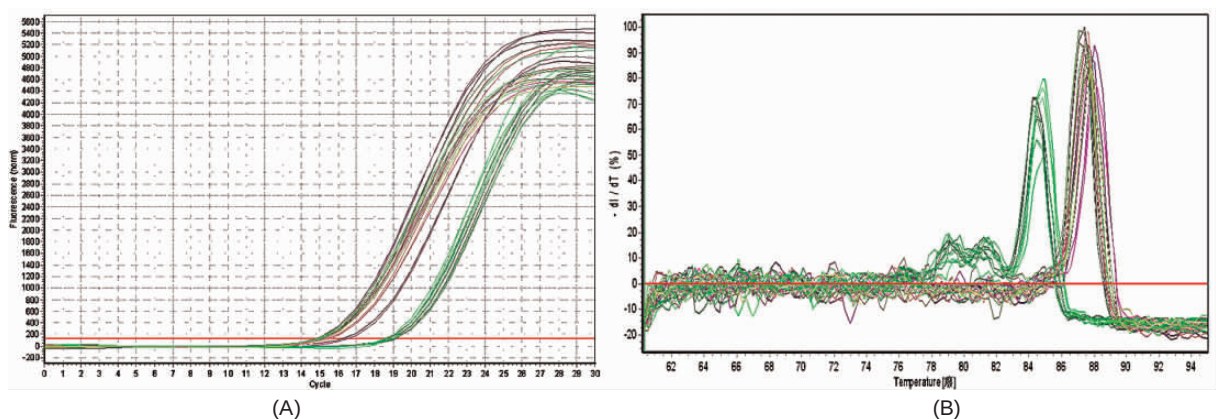


图 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线(A)及溶解曲线(B)

Fig.1 The amplification curve(A) and melting curve(B) of real time fluorescence quantitative PCR.

表 2 哮喘组和对照组 PBMC 中 TNF- α mRNA、血浆 TNF- α 、EOS%和血浆总 IgE 比较

Table 2 The comparison of the levels of TNF- α mRNA in PBMC, plasma TNF- α concentration, peripheral blood eosinophil percentage (EOS%) and total plasma IgE in asthma and control groups

Variables	Normal group	Controlled group	Partly controlled group	Uncontrolled group
Cases(F/M)	25(14/11)	21(11/10)	23(13/10)	23(12/11)
TNF- α mRNA ($2^{-\Delta CT}$)	0.26 ± 0.10	0.29 ± 0.11	$0.50 \pm 0.14 \blacktriangle \star$	$0.59 \pm 0.20 \blacktriangle \star$
Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	1.00	1.11	1.92	2.29
Plasma TNF- α (ng/ml)	7.85 ± 2.52	8.15 ± 3.06	$17.90 \pm 6.78 \blacktriangle \star$	$53.10 \pm 16.95 \blacktriangle \star$
EOS%	2.41 ± 0.94	$3.80 \pm 1.15 \blacktriangle$	$5.31 \pm 0.98 \blacktriangle \star$	$5.20 \pm 1.88 \blacktriangle \star$
Log plasma IgE	1.49 ± 0.27	$2.40 \pm 0.18 \blacktriangle$	$2.43 \pm 0.23 \blacktriangle$	$2.52 \pm 0.16 \blacktriangle$

注: EOS%: 外周血嗜酸性粒细胞百分比。 $F = 19.78 \sim 77.58$, $df = 91$, $P < 0.01$, 进一步 SNK-q 检验, 与对照组相比, $\blacktriangle P < 0.01$; 与控制组相比, $\star P < 0.01$; 与部分控制组相比, $\blacktriangledown P < 0.05$ 。

Note: EOS%: peripheral blood eosinophil percentage. $F = 19.78 \sim 77.58$, $df = 91$, $\star P < 0.01$; further SNK-q tests, $\blacktriangle P < 0.01$ vs Normal group; $\star P < 0.01$ vs Controlled group; $\blacktriangledown P < 0.05$ vs Partly controlled group.

2.2 血浆 TNF- α 、EOS%和血浆总 IgE 比较

方差分析显示各哮喘组和正常对照组间血浆 TNF- α 浓度、EOS%和血浆总 IgE 亦存在显著差异 ($F = 23.46 \sim 77.58$, $df = 91$, $P < 0.01$)。进一步 SNK-q 检验示: 部分控制组和未控制组血浆 TNF- α 浓度高于正常组和控制组 ($P < 0.01$), 未控制组高于部分控制组 ($P < 0.05$); 各哮喘组 EOS%和血浆总 IgE 均高

于正常对照组, 部分控制组和未控制组血浆 EOS%高于控制组 ($P < 0.01$), 各哮喘组间血浆总 IgE 无明显差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.3 哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达与血浆 TNF- α 浓度、EOS%和血浆总 IgE 的关系

Pearson 积矩相关分析显示: 哮喘病人 PBMC 中 TNF- α

mRNA 表达与血浆 TNF- α 浓度和 EOS%呈正相关, 相关系数分别为 $r = 0.584$ ($r^2 = 0.342$, $P < 0.01$) 和 $r = 0.29$ ($r^2 = 0.09$, $P <$

0.05) ,与血浆总 IgE 无明显相关($r = 0.01$, $P = 0.93$)(图 2)。

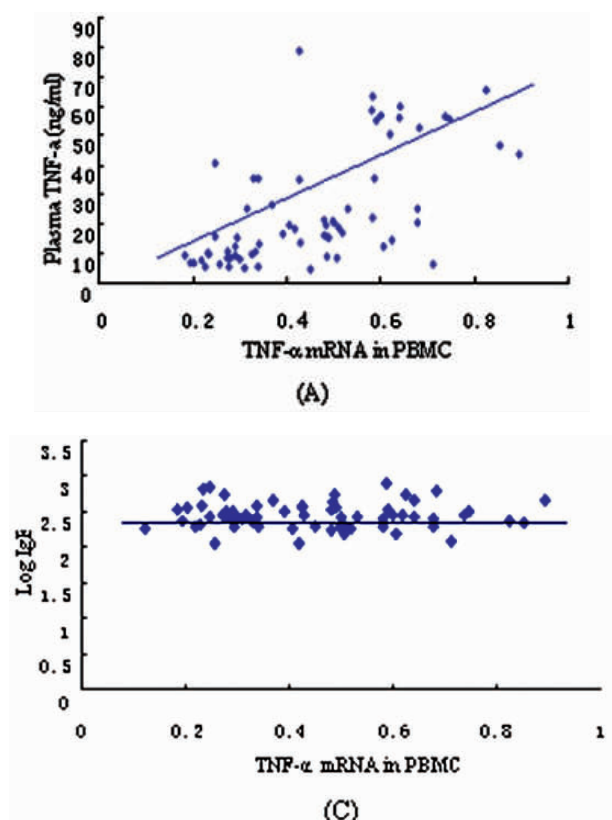


图 2 哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达与血浆 TNF- α 浓度、EOS%和血浆总 IgE 的相关性

Fig.2 The correlation of the levels of TNF- α mRNA in PBMC with plasma TNF- α concentration, peripheral blood eosinophil percentage (EOS%), and total plasma IgE in asthma patients with $r = 0.584$ ($P < 0.01$), $r = 0.29$ ($P < 0.05$), and $r = 0.01$ ($P = 0.93$)

2.4 哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达与哮喘相关影响因素的关系

本次研究结果显示有吸烟史(≥ 1 年)的哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达高于无吸烟史的哮喘病人, fold change = 1.30, 差异有统计学意义($t = 2.236$, $P < 0.05$)。女性病人、有哮喘家族史、成年发病(≥ 16 岁)及有夜间发作的哮喘病人 TNF- α mRNA 表达高于相应的对照组, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)(表 3)。

3 讨论

哮喘是一种多基因遗传性疾病, 发病机制极为复杂, 迄今尚未完全阐明。以吸入糖皮质激素(ICS)和白三烯(LT)拮抗剂为基础的各种抗炎治疗在哮喘的防治过程中发挥了重要的作用^[10]。鉴于 TNF- α 是一种与哮喘密切相关的细胞因子并与哮喘的某些表型相关, 因此, 以 TNF- α 为靶点的抗炎治疗曾一度引起人们的兴趣^[11]。Howarth 和 Berry 等研究发现, 应用可溶性 TNF- α 受体 (sTNF- α R) etanercept 可降低哮喘病人 AHR, 减少哮喘急性发作次数, 改善肺功能和生活质量^[14]。Morjaria 和 Wenzel 等的研究则显示 TNF- α 单克隆抗体治疗哮喘不仅无

益, 可能会给病人带来致命的感染, 甚至诱发恶变^[6,7]。Brightling 在总结了一系列的研究结果后认为, 抗 TNF- α 治疗可能只对部分特定表型的哮喘病人有益, 如何从错综复杂的哮喘临床病理变化中筛查获益人群仍是一项巨大的挑战^[11]。

TNF- α 是人体固有免疫系统重要的细胞因子之一, 细胞来源极为广泛, 主要由活化的巨噬细胞、单核细胞和 T 淋巴细胞产生, 亦可由 B 淋巴细胞、肥大细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞和表皮细胞等产生, 其相对分子质量为 17000, 由 157 个氨基酸组成, 以二聚体、三聚体和五聚体的形式存在于细胞外液中, 三聚体是成熟型 TNF- α 的活性形式。选择 PBMC 作为模型, 一方面 PBMC 主要由单核巨噬细胞和淋巴细胞组成, 是体内 TNF- α 的重要来源; 另一方面, PBMC 是全身免疫系统的重要组成部分, 其数量增加或活性增强是系统性炎症激活的重要标志, 可能是哮喘病人全身炎症反应的一种表现。

本研究结果显示: 未控制组和部分控制组的哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 水平及血浆 TNF- α 浓度均明显高于正常对照组和控制组 ($P < 0.01$), 未控制组高于部分控制组 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 控制组与正常对照组比较, PBMC 中 TNF- α mRNA 表达及血浆 TNF- α 浓度均无显著差异 ($P > 0.05$)。表明 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达及血浆 TNF- α 浓度均与哮喘的控制程度密切相关, 可作为哮喘控制程度的参考指标。二元相关分析显示哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达与血浆 TNF- α 浓度有较强的相关性 ($r = 0.584$, $P < 0.01$), 与 EOS%弱相关 ($r = 0.29$, $P < 0.05$), 与血浆总 IgE 无明显相关 ($r = 0.013$, $P = 0.93$)。前期研究显示, 血浆 TNF- α 浓度与哮喘的严重程度密切相关, 但导致其升高的因素尚未完全明了^[9], 气道局部 TNF- α 表达增加可能是血浆 TNF- α 水平升高的重要因素, 而本研究结果表明 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达增加可能在一定程度上导致了血浆 TNF- α 水平的升高。如果把 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达增加看作是系统性炎症激活的标志, 我们的结果支持哮喘是一种以气道粘膜炎症为主要表现的系统性炎症性疾病, 与近年来对哮喘的认识相一致^[12]。

EOS%与血浆 IgE 增高是哮喘病人重要特征, 反应了 型变态反应在哮喘发病过程中的重要作用^[13]。本研究显示各哮喘组 EOS%和血浆总 IgE 均明显高于正常对照组 ($F = 23.46 \sim$

表 3 哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 与哮喘相关影响因素的关系
Table 3 The relationship of the levels of TNF- α mRNA in PBMC with asthma-related influence factors

Variables	N(cases)	TNF- α mRNA($2^{-\Delta\Delta CT}$)	t value	P value
Gender				
F	36	0.45 $\pm$ 0.20	-0.335	0.74
M	31	0.43 $\pm$ 0.19		
Family history				
Yes	37	0.47 $\pm$ 0.21	1.205	0.234
No	30	0.41 $\pm$ 0.17		
Smoking($\geq$ 1year)				
Yes	24	0.49 $\pm$ 0.22	2.236	0.037
No	43	0.38 $\pm$ 0.18		
Allergy				
Yes	28	0.44 $\pm$ 0.18	0.044	0.965
No	39	0.44 $\pm$ 0.20		
Onset time($\geq$ 16years)				
Yes	42	0.44 $\pm$ 0.21	0.077	0.939
No	25	0.45 $\pm$ 0.17		
Attack at night				
Yes	26	0.45 $\pm$ 0.21	0.221	0.826
No	41	0.43 $\pm$ 0.18		

77.58, $df = 91$, $P < 0.01$) ,与文献报道一致 ,进一步 SNK-q 检验示 :各哮喘组间血浆总 IgE 无明显差异($P > 0.05$) ,部分控制组和未控制组 EOS%均高于控制组($P < 0.01$) ,而两组间 EOS%无差异($P > 0.05$)。二元相关分析显示哮喘病人 TNF- α mRNA 与 EOS%弱相关($r = 0.29$, $P < 0.05$) ,与血浆总 IgE 无明显相关($r = 0.013$, $P = 0.93$) 提示 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达对 型变态反应的影响可能并不明显。

哮喘表型受多种因素的影响 ,因此 ,我们探讨 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达与多种哮喘相关影响因素的关系 ,结果发现有吸烟史(≥ 1 年)的哮喘病人 TNF- α mRNA 的表达水平是非吸烟病人的 1.3 倍 ,差异有统计学意义($t = 2.236$, $P < 0.05$) ,而性别差异、哮喘家族史、起病时间、有无过敏症及有无夜间发作对 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达均无显著影响 ,提示吸烟可能是导致 PBMC 活化并引起 TNF- α mRNA 表达增加的重要危险因素。

随着对哮喘认识的不断深入 ,人们越来越认识到哮喘的发病过程及临床表型具有较大的异质性^[14] ,针对特定细胞因子和炎性介质的靶向治疗已成为近来哮喘研究的热点。由此 ,我们探讨哮喘病人 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达与哮喘相关表型的关系 ,以期为哮喘的诊治提供新的思路。本次研究结果显示 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达与哮喘控制程度及血浆 TNF- α 浓度均有良好的相关性 ,与吸烟史有密切联系 ,可做为哮喘控制程度的重要参考指标。但 PBMC 中 TNF- α mRNA 表达是否与气道局部 TNF- α 基因表达相一致 ,以及其与哮喘其他相关

表型(如肺通气功能、AHR、气道可逆性等)的关系还需要进一步研究 ,这对于选择获益人群具有更好的指导作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, et al. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD[J]. Am J Respir Crit Care Med,1997,155:542-548
- [2] Obase Y, Shimoda T, Mitsuta K, et al. Correlation between airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a young adult population: eosinophil, ECP, and cytokine levels in induced sputum [J]. Ann Allergy Asthma Immunol,2001,86:304-310
- [3] Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma[J]. Thorax,2002,57:774-778
- [4] Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, et al. Tumour necrosis factor(TNF alpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma[J]. Thorax,2005,60:1012-1018
- [5] Berry MA, Hargadon B, Shelley M, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor a in refractory asthma [J]. N Engl J Med,2006,354: 697-708
- [6] Morjaria JB, Chauhan AJ, Bobu KS, et al. Assessment of a soluble TNF alpha receptor fusion protein (etanercept) as a novel therapeutic agent for severe refractory asthma [J]. Proc Am Thorac Soc,2006,3: A16
- [7] Wenzel SE, Barnes PJ, Bleecker ER. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study of Tumor Necrosis Factor- α Blockade in Severe Persistent Asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med,2009,179: 549-558

(下转第 3000 页)

- [5] Hebrok M, Kim SK, Jacques B, et al. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling [J]. *Development*, 2000,127(22): 4905-4907
- [6] Glaser M, Roskar Z, Skalicky M, et al. Cystic dystrophy of the duodenal wall in a heterotopic pancreas [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2002,114 (23-24):1013-1016
- [7] Heller RS, Tsugu H, Nabeshima K, et al. Intracranial ectopic pancreatic tissue[J]. *Islets*, 2010,2(2):65-71
- [8] 施勇, 钱岳, 陈吴兴. 异位胰腺的临床解剖与外科治疗[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2005, 11(2):161-162
Shi Yong, Qian Jin-yue, Cheng Wu-xing. Clinical anatomy and surgical treatment of ectopic pancreas [J]. *Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2005,11 (2): 161-162
- [9] Inoue Y, Hayashi M, Arisaka Y, et al. Adenocarcinoma arising in a heterotopic pancreas (Heinrich type III): a case report [J]. *Journal of Medical Case Reports*, 2010,4(2):39
- [10] 陈吴兴, 陈光平. 异位胰腺的解剖及临床. *解剖学杂志* [J]. 2006,29 (4):516-518
Chen Wu-xing, Chen Guang-ping. The anatomy and clinical of heterotopic pancreas. *Chinese Journal of Anatomy* [J]. 2006,29(4): 516-518
- [11] Gokhale UA, Nanda A, Pillai R, et al. Heterotopic Pancreas in the Stomach: A Case Report and a Brief Review of the Literature [J]. *J Pancreas (Online)*, 2010, 11(3):255-257
- [12] Khashab MA, Cummings OW, John MD. Ligation-assisted endoscopic mucosal resection of gastric heterotopic pancreas [J]. *World J Gastroenterol*, 2009,15(22):2805-2808
- [13] 王磊, 龚明辉. 胃异位胰腺癌变 1 例[J]. *罕见疾病杂志*, 2006,13(2): 50-51
Wang Lei, Gong Ming-hui. Carcinoma developing in gastric heterotopic pancreases: a case report [J]. *Journal of Rare & Uncommon Diseases*, 2006,13(2): 50-51
- [14] 徐冰, 蒋欣, 刘文英. 小儿回肠异位胰腺继发反复肠套叠一例[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006,27(11):572
Xu Bin, Jiang Xin, Liu Wen-ying. Ectopic pancreas in ileum caused recurrent ileal intussusceptions: a case report [J]. *Chin J Pediatr Surg*, 2006,27(11):572
- [15] 殷丽, 李庆峰, 侯玉贵. 回肠末端异位胰腺合并肠套叠 [J]. *临床医药实践*, 2008,17(8):710
Yin Li, Li Qing-feng, Hou Yu-gui. Heterotopic pancreases in distal ileum: a case report [J]. *Proceeding of Clinical Medicine J*, 2008,17 (8): 710
- [16] 刘嫻. 儿童异位胰腺 1 例[J]. *实用医学杂志*, 2010,26(6):1073
Liu Shan. Children with heterotopic pancreases: a case report [J]. *J Practical Medicine*, 2010,26(6):1073
- [17] Agale SV, Agale VG, Zode RR, et al. Heterotopic pancreas involving stomach and duodenum [J]. *J Assoc Physicians India*, 2009,57(9): 653-654
- [18] Kim JH, Lim JS, Lee YC, et al. Endosonographic features of gastric ectopic pancreases distinguishable from mesenchymal tumors [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008,23(8): e301-e307
- [19] 陈耀辉. 胃壁内迷走胰腺的 X 线征象 [J]. *实用医学影像杂志*, 2007, 8(5):301-302
Chen Yao-hui. X-ray findings of aberrant pancreas occurring in gastric wall [J]. *J Practical Medical Imaging*, 2007,8(5):301-302
- [20] 路利军, 李鹏, 雷小燕. 胃部异位胰腺 1 例 [J]. *中国临床医学影像杂志*, 2008,19(7):497
Lu Li-jun, Li Mei, Lei Xiao-yan. A case of gastric heterotopic pancreas [J]. *J China Clinic Medical Imaging*, 2008,19(7):497
- [21] 吴光耀, 田志雄, 黄雄. 消化道异位胰腺 CT 表现 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2007,28(4):535-538
Wu Guang-yao, Tian Zhi-xiong, Huang Xiong. CT findings about heterotopic pancreas in the alimentary tract [J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2007,28(4):535-538
- [22] Mouen AK, Oscar WC, John MD. Ligation-assisted endoscopic mucosal resection of gastric heterotopic pancreas [J]. *World J Gastroenterol*, 2009,15(22):2805-2808
- [23] Danitl JM. Endoscopy-assisted laparoscopic resection of gastric heterotopic pancreas [J]. *The American Surgeon*, 2008,74(9):829-831
- [24] Nobutsugu A, Hirohisa T, Osamu Y, et al. Endoscopic full-thickness resection with laparoscopic assistance as hybrid NOTES for gastric submucosal tumor [J]. *Surg Endosc*, 2009,23(1):1908-1913

(上接第 2924 页)

- [8] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008,31(3):177-185
Asthma Group, Chinese Medical Association of Respiratory Diseases. Chinese Guidelines for Asthma Prevention and Management (revised in 2008) [J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2008,31(3):177-185
- [9] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols*, 2008,3 (6):1101-1108
- [10] 王长军. 2009 年~2010 年度哮喘治疗的临床研究进展 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2011,10(1):1-2
Wang Chang-jun. The progress of clinical studies on the treatment of asthma between 2009 and 2010 [J]. *Chin J Respir Crit Care Med*, 2011,10(1):1-2
- [11] Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF- α : A novel therapeutic approach for asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008,121:5-10
- [12] Sutherland TJ, Cowan JO, Young S, Goulding A, Grant AM, Williamson A, Brassett K, Herbison GP, Taylor DR. The association between obesity and asthma: interactions between systemic and airway inflammation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008,178: 469-475
- [13] Rosenwasser LJ. Mechanisms of IgE Inflammation [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2011,11(2):178-183
- [14] McLeish S, Turner SW. Gene-environment interactions in asthma [J]. *Arch Dis Child*, 2007, 92:1032-1035