

## 各期慢性阻塞性肺疾病患者诱导痰细胞成分 与肺功能的关系

曾 勉, 刘凌云, 张式鸿, 谢灿茂, 王 辉, 黄晓梅  
(中山大学附属第一医院呼吸内科, 广东 广州 510080)

**摘 要:**【目的】比较不同时期慢性阻塞性肺病(COPD)患者诱导痰中细胞组成的变化,及其诱导痰中细胞成分尤其中性粒细胞百分比与气流受限的关系。【方法】对110例COPD患者[急性加重期COPD(AECOPD)患者(A<sub>1</sub>组)62例、稳定期COPD患者(B组)48例]及30例健康对照者(C组)进行肺功能测定及痰诱导、痰液处理后沉渣作细胞学分析。其中AECOPD组在治疗1周后(A<sub>2</sub>组)再次进行上述指标的测定。【结果】140例受试者中有21例因不能耐受痰诱导过程或痰标本不合格而退出研究,最终有119例受试者完成本研究(A<sub>1,2</sub>组48例,B组43例,C组28例)。A<sub>1</sub>组、A<sub>2</sub>组、B组、C组诱导痰中细胞总数(10<sup>6</sup>/mL)分别为(8.8±3.7)、(6.5±2.6)、(5.0±2.8)、(2.8±1.3),细胞分类中A<sub>1</sub>组、A<sub>2</sub>组、B组以中性粒细胞为主,分别为66%±15%、60%±10%、55%±11%,而在C组中则以巨噬细胞、中性粒细胞为主,分别为37%±10%、32%±8%;AECOPD患者(A<sub>1</sub>组、A<sub>2</sub>组)诱导痰中性粒细胞百分比与肺功能指标(FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>%pre、FVC、FEV<sub>1</sub>/FVC)呈负相关(r分别为-0.860、-0.682、-0.662、-0.300,P<0.001)稳定期组(B组)中性粒细胞与FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>%pre负相关(r分别为-0.346、-0.421,P<0.05),对照组中性粒细胞与肺功能无相关性(P>0.05)。【结论】AECOPD、缓解期、稳定期患者诱导痰细胞以中性粒细胞为主,健康者诱导痰细胞以巨噬细胞为主,气道局部中性粒细胞增多与各期COPD患者气流受限存在密切的关系。

关键词:阻塞性肺疾病;诱导痰;中性粒细胞

中图分类号:R563

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2007)04-0422-04

### Relationship between Lung Function and Induced Sputum Cell Characteristics in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Different Stages

ZENG Mian, LIU Ling-yun, ZHANG Shi-hong, XIE Can-mao, WANG Hui, HUANG Xiao-mei  
(Respiratory Department, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To compare the induced sputum characteristics of COPD (chronic obstructive pulmonary disease) patients in different stages with that of normal subjects, and examine the relationship between the airflow limitation and the induced sputum characteristics especially the number of sputum neutrophils of COPD patients.【Methods】Sputum induction and the lung function were performed in 110 COPD patients (62 acute exacerbation of COPD (AECOPD) (Group A<sub>1</sub>), 48 stable COPD patients (Group B), and 30 healthy volunteers (Group C). And the same measurements were repeated in the patients with AECOPD after a short-term (1 week) treatment. We called them catabatic AECOPD patients (group A<sub>2</sub>). Cell components of induced sputum of the 4 groups were analyzed.【Results】Of the 140 subjects enrolled, 119 finally finished the study (48 in group A<sub>1</sub>, 43 in group B, and 28 in group C). Total cell counts (10<sup>6</sup>/ml) in group A<sub>1</sub>, group A<sub>2</sub>, and group B were (8.8±3.7), (6.5±2.6), (5.0±2.8), and (2.8±1.3), respectively. The main cell differential (%) of group A<sub>1</sub>, group A<sub>2</sub>, and group B were neutrophils:66%±15%,60%±10%, and 55%±11%, respectively. While in group C, the main cell differentials (%) were macrophages and neutrophils, and their percentage were 37%±10% and 32%±8%, respectively. The percentage of neutrophils was negatively correlated with lung function (FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>%pre, FVC, FEV<sub>1</sub>/FVC) in the patients with AECOPD groups (group A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) (r=-0.860, -0.682, -0.662, and -0.300, respectively, P<0.001). And

收稿日期:2006-11-15

基金项目:广东省自然科学基金项目(04009385);广东省卫生厅基金项目(A2004188)

作者简介:曾勉(1962-),女,广东兴宁人,医学硕士,主任医师,E-mail:zeng\_mian@21cn.com

the percentage of neutrophils in group B was also negatively correlated with FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>%pre (r was -0.346 and -0.421, respectively, P<0.05), while there was no relationship between neutrophils and lung function in group C (P>0.05). 【Conclusions】 The main cell differential in induced sputum was neutrophils in the patients with acute exacerbation COPD, catabatic AECOPD and stable COPD, while in healthy volunteers were macrophages. The increased number of neutrophils in the local airway was closely related to the airflow limitation in COPD patients.

Key words: obstructive; pulmonary disease; induced sputum; neutrophils

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):422-425]

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以不完全可逆的气流受限为特征的疾病, 与肺部对有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关<sup>[1]</sup>。由不同炎性细胞、炎症介质和细胞因子介导的慢性气道炎症, 会进一步引发气道阻塞和气道重构, 对 COPD 发生发展起着重要作用。已证实诱导痰法是一种非侵入性、安全、简便易行直接测定气道炎症的方法, 已广泛用于哮喘的临床研究及诊治中。近年来, 诱导痰技术在 COPD 气道局部炎症机制研究中的应用越来越受重视, 其安全性和有效性也得到证实<sup>[2,3]</sup>。但目前较多关注的是诱导痰中炎症因子、炎症介质在 COPD 中的作用, 而诱导痰中细胞成分的变化及其与各期 COPD 气流受限的关系研究报道较少, 尤其 COPD 急性加重期诱导痰细胞学分析未见报道。我们通过观察 COPD 急性加重期、缓解期和稳定期患者及健康对照组诱导痰中的细胞总数及细胞分类的变化, 及其与肺功能的关系, 来阐明气道局部炎症细胞在 COPD 中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

收集 2004 年 10 月至 2006 年 03 月中山大学附属第一医院呼吸科门诊及住院的 110 例 COPD 患者及 30 例健康对照组 (C 组)。COPD 患者中急性加重期患者 (A<sub>1</sub> 组) 62 例, COPD 稳定期患者 (B 组) 48 例。缓解组 (A<sub>2</sub> 组) 指上述 AECOPD 组病人经正规治疗 1 周后临床症状缓解者。稳定期组 (B 组) 病人指患者咳嗽、咳痰、气促等症状稳定或症状轻微持续 2 个月以上者, 2 周内无呼吸道感染, 未使用全身激素及抗生素。健康对照组 (C 组) 选择年龄匹配 (年龄 ±2), 非呼吸系统疾病的健康人群。纳入标准: 所有 COPD 患者均符合 COPD 全球倡议 (GOLD)<sup>[1,4]</sup> 的诊断标准 (支气管舒张试验后 FEV<sub>1</sub> < 80% 预计值, FEV<sub>1</sub>/FVC < 70%)。AECOPD

患者均符合 ATS/ERS 的 AECOPD 诊断标准<sup>[2,4]</sup>。排除标准: 除外哮喘、支气管扩张、肿瘤、结缔组织病、糖尿病、甲状腺功能亢进等疾病。合并高血压病、严重左、右心功能衰竭 (心功能 II 级) 者不纳入研究范围。凡符合入选标准的患者告知本研究的目的及试验方法, 签署知情同意书。

### 1.2 研究方法

根据 Pin 等的改良方法, 我们制定了痰诱导及痰液处理规范操作流程<sup>[2]</sup>。受试者在诱导前测定 FEV<sub>1</sub>, 然后吸入 200 μg 沙丁胺醇, 15 min 后测定 FEV<sub>1</sub> 作为基础值, 在室温下 CSW-1 型超声雾化器 (汕头光电研究所, 标准号 YY/T0109-93) 吸入 3% 高渗盐水 2 min 后, 用双氧水漱口, 深咳痰液入无菌容器中; 继续吸入 3% 高渗盐水, 间隔 3 min 测 FEV<sub>1</sub> 和连续监测脉搏血氧饱和度 (SpO<sub>2</sub>), 收集痰液至少 1 g 以上。取无唾液成分的痰液放入离心管中, 加入 4 倍体积的 0.1% DTT 孵育, 螺旋振荡 15 min, 3 500 r/min (r=15 cm), 离心 20 min。沉淀细胞用 Hank's 液悬浮, 在血细胞仪上计数细胞总数, 用台盼蓝 (Trypan) 排除法测定细胞是否存活及存活率, 细胞存活率 > 50% 为合格标本。调节细胞悬浮密度至 1 × 10<sup>6</sup>, 将 75 μL 悬浮液置于细胞离心机, 450 r/min (r=15 cm), 离心 6 min, 细胞沉渣涂片, 风干, 吉姆萨染色, 每张涂片计数 400 个非鳞状上皮细胞计算分类, 鳞状上皮细胞 < 20% 者为合格标本, 提示痰来源于下呼吸道, 并对细胞进行计数和分类。COPD 患者的舒张试验及所有受试者的肺功能使用肺功能仪 (Sensor Medics Ltd, USA) 进行测定。痰诱导过程中监测 FEV<sub>1</sub> 采用便携式肺功能仪 (Micro Medical 公司, 英国), SpO<sub>2</sub> 用便携式脉搏容积血氧饱和度仪 (Osaka 公司, 日本)。

### 1.3 统计学处理

各组数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 各组均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较用 SNK-q 检验, 方差不齐者采用秩和检验,

粒细胞数与肺功能的关系用 Spearman 相关分析; 所有数据的计算、统计分析用 SPSS 13.0 软件处理, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者一般情况和肺功能分级

入选的 110 例 COPD 患者均符合 COPD 中-重度标准。其中 AECOPD 患者 62 例, 稳定期患者 48 例, 健康对照组 30 例。

62 例 AECOPD 患者入院当天和治疗 1 周后(缓解期)分别进行痰诱导, 其中有 14 例患者不能耐受痰诱导过程或痰标本不合格而退出研究, 最终顺利完成痰诱导且痰标本合格患者有 48 例; 48 例稳定期组(C 组)退出研究 5 例, 顺利完成痰诱导且痰标本合格患者 43 例; 30 例对照组(C 组)纳入研究有 28 例, 2 例因痰标本不合格而退出。各组性别、年龄、FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub> 占预计值%和 FEV<sub>1</sub>/FVC 等数值详见表 1。

四组间性别、年龄无差异 ( $P > 0.05$ ); AECOPD 治疗前后肺功能的比较差异有统计学差异,  $P < 0.01$ , 治疗后, 肺功能明显改善。四组间 FEV<sub>1</sub> 和 FEV<sub>1</sub> 占预计值%的差异有统计学意义,  $P < 0.01$ , 稳定期肺功能好于缓解期, 缓解期好于加重期(表 1)。

表 1 四组受试者一般情况表

Table 1 Clinical characteristics of subjects in the four groups

	No.(M/F)	Age	FEV <sub>1</sub> (L) <sup>3</sup>	FEV <sub>1</sub> %pre <sup>2</sup>	FEV <sub>1</sub> /FVC%
AECOPD(A <sub>1</sub> )	48 (41/7)	72 ± 7	0.86 ± 0.27 <sup>1)</sup>	37 ± 7 <sup>1)</sup>	53 ± 10 <sup>1),3)</sup>
Catabatic(A <sub>2</sub> )	48 (41/7)	72 ± 7	1.09 ± 0.27	47 ± 7	59 ± 11
Stable(B)	43 (38/5)	71 ± 7	1.40 ± 0.37	53 ± 8	60 ± 9 <sup>3)</sup>
Control(C)	28 (23/5)	69 ± 9	2.13 ± 0.53	87 ± 13	78 ± 14
F or <sup>2</sup>	0.225	2.305	84.887	219.052	29.935
P	0.974	0.512	0.000	0.000	0.000

Chi-square test was performed for gender,  $\chi^2=0.225$ ,  $P = 0.974$ ; 1)Compared with group A<sub>2</sub>,  $P < 0.01$ ; 2)Compared between the four groups,  $P < 0.01$ ; 3)Compared with group C,  $P < 0.05$

### 2.2 各组诱导痰液的细胞分类情况

对照组诱导痰细胞分类中, 巨噬细胞占 (37.1 ± 9.8)%, 明显高于中性粒细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞、上皮细胞比例; 各期 COPD 中性粒细胞比例明显高于其他细胞比例, 随着病情的好转, 肺功能改善, 由加重期、缓解期、稳定期痰液中中性粒

细胞计数依次下降, 但仍高于对照组,  $P < 0.05$ 。而淋巴细胞、嗜酸性细胞变化不大(表 2)。

表 2 对照组和各期 COPD 组诱导痰细胞分类比较

Table 2 Comparison of induced sputum cell counts in different groups (%)

	Total (10 <sup>6</sup> /ml)	Neutrophil	Lymphocyte	Eosinophil	Macrophage	Epicyte
Control(C)	2.8 ± 1.3 <sup>1)</sup>	32 ± 8 <sup>1)</sup>	19 ± 7 <sup>1)</sup>	2.5 ± 1.3	37 ± 10 <sup>1)</sup>	10 ± 5
AECOPD(A <sub>1</sub> )	8.8 ± 3.7	66 ± 15 <sup>2)</sup>	14 ± 8	1.7 ± 1.1	11 ± 7 <sup>2)</sup>	9 ± 8
Catabatic(A <sub>2</sub> )	6.5 ± 2.6	60 ± 10	12 ± 6	2.4 ± 2.1	17 ± 7	9 ± 6
Stable(B)	5.0 ± 2.8	55 ± 11	14 ± 7	2.2 ± 1.3	19 ± 7	10 ± 5
F	30.29	53.66	8.02	2.29	76.9	0.487
P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69

1)Compared with other Groups,  $P < 0.05$ ; 2)Compared with Group A<sub>2</sub> and Group B,  $P < 0.05$

### 2.3 诱导痰细胞成分与肺功能的相关性

各组诱导痰中性粒细胞比例与 FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>%pre、FVC、FEV<sub>1</sub>/FVC 的相关性见表 3。从表 3 可见 AECOPD (A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 组) 中性粒细胞与 FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>%pre、FVC、FEV<sub>1</sub>/FVC 皆呈显著负相关 ( $r$  分别为 -0.860、-0.682、-0.662、-0.300,  $P < 0.001$ ); COPD 稳定期组(B 组)中性粒细胞与 FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>%pre、FVC、FEV<sub>1</sub>/FVC 也呈负相关, 但相关性不如 AECOPD 组; 各组散点具线形趋势。对照组中性粒细胞比例与肺功能各指标无相关性,  $P > 0.05$ 。

表 3 各组诱导痰中性粒细胞比例与肺功能的关系

Table 3 Sputum neutrophil percent and lung function (r/P)

	FEV <sub>1</sub>	FEV <sub>1</sub> %pre	FVC	FEV <sub>1</sub> /FVC
Group A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub>	-0.860 / 0.0001	-0.682 / 0.0001	-0.662 / 0.0001	-0.300 / 0.003
Group B	-0.346 / 0.023	-0.421 / 0.005	-0.219 / 0.157	-0.270 / 0.080
Group C	-0.173 / 0.377	-0.081 / 0.682	-0.145 / 0.460	-0.092 / 0.640

## 3 讨论

COPD 是多种炎症细胞和炎症介质参与的气道炎症。通过诱导排痰法检测有关炎症细胞和介质指标, 阐明局部气道炎症与气流受限的关系, 已证实是一种非侵入性、简便可行的新方法<sup>[2]</sup>。诱导痰标本是否来自下气道、痰标本是否合格主要通过诱导痰的细胞学检查来判断, 目前常用的标准是<sup>[5]</sup>: 每低倍镜视野下痰标本的白细胞数  $> 25$  个、鳞状上皮细胞  $< 10$  个, 吉姆萨染色后每张涂片计

数 400 个细胞其中鳞状上皮细胞 < 20% 且细胞存活率 > 50% 为合格标本。本研究亦采取此标准为判断痰标本是否合格的标准。结果显示 9 例痰标本细胞存活率 < 50% 而退出研究。

诱导痰的来源与自发排痰、支气管肺泡灌洗液、支气管活检的部位不同, 主要来源于外周气道至中央气道的分泌物, 反映了气道分泌物自然状态下的浓度, 具有更集中的细胞和生化物质成分, 尤适合气道炎症疾病如 COPD、哮喘的研究。健康人及不同呼吸道疾病其诱导痰细胞分类的比例存在明显的差异, 反映了不同疾病发病机制的差异。健康人群诱导痰中以巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞为主, 哮喘患者诱导痰中以嗜酸性粒细胞和巨噬细胞为主<sup>[6]</sup>, 而 COPD 患者诱导痰中则以中性粒细胞为主<sup>[7]</sup>。我们的研究中还发现 COPD 急性加重期、缓解期、稳定期诱导痰中均以中性粒细胞为主, 嗜酸性细胞变化不大, 健康对照组中则以巨噬细胞、中性粒细胞为主, 但中性粒细胞比例不如 COPD 高, 与 Balzano<sup>[8]</sup>及 O'Donnell<sup>[9]</sup>的结果基本类似。本研究发现各期 COPD 的中性粒细胞的百分比与 FEV<sub>1</sub>、FEV<sub>1</sub>%pre、FVC、FEV<sub>1</sub>/FVC 呈负相关, 以加重期组相关性更明显, 对照组中性粒细胞与肺功能无相关。本研究 COPD 加重期中性粒细胞明显增高, 经治疗症状缓解后, 诱导痰的中性粒细胞虽有明显下降, 但其数值仍高于对照组, 稳定期中性粒细胞数也明显高于对照组 (P < 0.05), 提示中性粒细胞不仅在 COPD 加重期对气道炎症及气流受限中起重要作用, 而且促使缓解期和稳定期气道炎症持续存在。COPD 气流受限增加主要在小支气管和细支气管, 中性粒细胞这些部位浸润, 释放炎症介质、多种蛋白酶, 从而诱导气道分泌细胞分泌粘液, 引起一系列炎症反应, 加重气流受限。同时痰液中中性粒细胞增加而嗜酸性细胞无增加也反映了部分患者对激素治疗的抵抗作用。但有报道<sup>[10]</sup>一些 COPD 加重期痰液中嗜酸性粒细胞增加, 吸入激素后痰中嗜酸性细胞比例和嗜酸细胞阳离子蛋白降低。因此, 定期检测 COPD 患者诱导痰中细胞分类, 嗜酸性细胞比例可估测药物的效果。

本研究进一步证实诱导排痰法的安全性和可行性, 共 110 例 COPD 患者进行了该项操作, 91 例患者安全渡过全过程并且痰标本合格。诱导痰液显示了各期 COPD 患者诱导痰中细胞组成的变

化, AECOPD 患者诱导痰中的中性粒细胞与肺功能明显相关, 从炎症细胞角度说明气道局部炎症在 COPD 气流受限中的作用, 为 COPD 的抗炎治疗尤其是抗中性粒细胞的治疗提供依据。

#### 参考文献:

- [1] FABBRI L M, HURD S S, GOLD SCIENTIFIC COMMITTEE. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of COPD 2003 update [J]. *Eur Resp J*, 2003, 22(1):1-2.
- [2] 曾勉, 吴健锋, 谢灿茂等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者规范化痰诱导安全性的初步研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28(4): 238-241.
- [3] SUTHERLAND E R, PAK J, Langmack E L, et al. Safety of sputum induction in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respir Med*, 2002, 96(7): 482-486.
- [4] CELLI B R, MACNEE W, ATS/ERS TASK FORCE. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper [J]. *Eur Respir J*, 2004, 23(6):932-946.
- [5] KIPS J C, INMAN M D, JAYARAM L, et al. The use of induced sputum in clinical trials [J]. *Eur Respir J*, 2002, 37(Suppl):47s-50s.
- [6] KRISUKENIENE A, SITKAUSKIENE B, MALAKAUSKAS K. Peculiarities of induced sputum inflammatory cell counts in allergic versus non-allergic asthma [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2005, 41(3):196-202.
- [7] DOMAGALA K J, MASKEY W M, KRASZEWSKA I. The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex-smokers with COPD [J]. *Chest*, 2003, 123(4):1054-1059.
- [8] BALZANO G, STEFANELLI F, IORIO C, et al. Eosinophilic Inflammation in Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Relationship with Neutrophils and Airway Function [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(5):1486-1492.
- [9] O'DONNELL R A, PEEBLES C, WARD J A, et al. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD [J]. *Thorax*, 2004, 59(7):837-842.
- [10] SAETTA M, DI STENFANO A, MAESTRELLI P, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 150(6):1646-1652.

(编辑 孙慧兰)