呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿血清糖皮质激素受体水平变化及意义

姚欢银　章杭湖　刘伟荣　李华浚　陈啸洪　马　兰

摘　要　目的　通过检测 RSV 毛细支气管炎患儿血清 GRα、GRβ 水平，探讨 GR 亚型表达对 RSV 毛细支气管炎严重程度的影响。**方法**　采用 ELISA 法测定和比较不同程度 RSV 毛细支气管炎组（轻度 42 例，重度 24 例）和对照组（48 例）患儿血清中 GRα、GRβ 水平变化，同时对 RSV 毛细支气管炎严重程度与 GRα/GRβ 比值之间进行相关性分析。**结果**　与对照组比较，轻度和重度 RSV 毛细支气管炎组血清 GRα、GRβ 水平均显著升高（$P<0.01$）；与轻度组比较，重度 RSV 毛细支气管炎组血清 GRα、GRβ 水平显著升高（$P<0.01$）；GRα/GRβ 比值在重度组显著低于轻度组和对照组（P 均 <0.01），后两组比较差异无统计学意义。通过相关分析发现，RSV 毛细支气管炎严重程度与 GRα/GRβ 比值之间呈显著负相关（$r=-0.588$，$t=5.816$，$P<0.05$）。**结论**　RSV 毛细支气管炎患儿表现为血清 GRα、GRβ 水平的高表达，在重度患儿中表现更为明显；GRα/GRβ 比值则在重度 RSV 毛细支气管炎中明显降低，而且 RSV 毛细支气管炎严重程度与 GRα/GRβ 比值之间呈显著负相关。

关键词　呼吸道合胞病毒　毛细支气管炎　糖皮质激素受体　儿童

中图分类号　R72　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.023

Clinical Significance and Changes of Glucocorticoid Receptor in Serum with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis.　*Yao Huanyin, Zhang Hanghu, Liu Weirong, et al. Department of Pediatrics, Shaoxing People's Hospital Zhejiang Province/Shaoxing Hospital Zhejiang University, Zhejiang 312000, China*

Abstract　Objective　To explore the role of GR expression on the severity of RSV of bronchiolitiss. **Methods**　The serum of GRα、GRβ levels were measured and compared using ELISA in 66 cases of RSV bronchiolitis (42 mild cases, 24 severe cases) and 48 cases of controls who were without recent infection waiting for surgery. At the same time, the correlation between the severity of RSV bronchiolitis and the ratio of GRα/GRβ was analyzed. **Results**　The serum of GRα、GRβ levels in mild and severe RSV bronchiolitis were significantly higher than the control group ($P<0.01$), while the severe group were significantly higher than the mild group ($P<0.01$), the ratio of GRα/GRβ in severe group was significantly lower than the mild group and control group ($P<0.01$), and there was no significant difference between the latter two groups ($P>0.05$). There is clearly a negative correlation between the severity of RSV bronchiolitis and the ratio of GRα/GRβ ($r=-0.588$, $t=5.816$, $P<0.05$). **Conclusion**　The levels of serum GRα, GRβ were increased in RSV bronchiolitis, especially in severe group. The ratio of GRα/GRβ was decreased in the severe group, while a negative correlation between the severity of RSV bronchiolitis and the ratio of GRα/GRβ.

Key words　Respiratory syncytial virus; Bronchiolitis; Glucocorticoid receptor; Children

毛细支气管炎是导致婴幼儿住院的常见原因，有超过 50% 住院的毛细支气管炎患儿将发展成为哮喘[1]。其中呼吸道合胞病毒（RSV）是引起毛细支气管炎最重要的病原体，也是引起 5 岁以下儿童哮喘发作的高危因素[2]。由于 RSV 毛细支气管炎的发病机制尚未完全明确，因此临床上缺乏有效的治疗手段，尤其对糖皮质激素（GC）的应用存在较大争议，大多数的研究认为临床应用 GC 并不能从中获益[3~6]。由于 GC 只有通过糖皮质激素受体（GR）才能发挥其生物学效应，因此研究 GR 亚型表达的异常才能深入了解 GC 抵抗的发生机制[7]。本研究通过对 RSV 毛细支气管炎患儿血清 GRα、GRβ 水平的检测，探讨 GR 亚型表达的漂移与重症 RSV 毛细支气管炎的关系，同时为揭示 RSV 毛细支气管炎患儿的 GC 抵抗机制提供研究方向。

资料与方法

1. 一般资料：选择 2014 年 11 月 ~ 2016 年 10 月在笔者医院住院的 RSV 毛细支气管炎和肺炎患儿为

基金项目：浙江省医药卫生一般研究计划项目（A 类）（2015KYA219）

作者单位：312000　绍兴市人民医院、浙江大学绍兴医院儿内科
通讯作者：陈啸洪，主任医师，电子信箱：sxchenxh@sina.com

研究对象。RSV 毛细支气管炎入选标准:①经 ELISA 法检测(试剂盒购自美国雅培公司)血清中 RSV - IgM 阳性;②毛细支气管炎诊断符合《中华儿科杂志》诊断标准[8];③首次发病,病程在 5 天内;④无基础心肺疾病及免疫缺陷或血液系统疾病史。符合标准的病例共 66 例,其中男性 38 例,女性 28 例,患儿年龄 3 ~ 14 个月,平均年龄 5.8 ± 2.1 个月。RSV 毛细支气管炎严重程度的诊断参照 Larranaga 等[9]的评分标准:7 ~ 14 分为重度组,共 24 例;0 ~ 6 分为轻度组,共 42 例。另选取同期住院的斜疝、隐睾等非感染性小儿外科术前患儿 48 例作为对照组,其中男性 32 例,女性 16 例,年龄 5 ~ 15 个月,平均年龄 8.4 ± 3.8 个月。所有研究对象均无特应性及过敏性疾病家族史,1 个月内无类固醇激素或其他免疫抑制剂应用史,近 2 周内无呼吸道感染病史。本研究取得入选研究对象监护人的知情同意并获笔者医院医学伦理委员会的批准同意。

2. 方法:所有患儿均于入院当日抽取静脉血 3ml,对照组为清晨 8 点抽取静脉血,静置 1h,1500r/min 离心,提取血清后置 -70℃ 冰箱保存待检。采用 ELISA 法检测血清中 GRα、GRβ 水平,GRα 试剂盒(货号 GD - S0740)和 GRβ 试剂盒(货号 GD - S0739)购自上海古朵生物科技有限公司。

3. 血清 GRα、GRβ 水平测定:①微滴定孔中加 100μl 样品;②室温孵育 30min;③以 washing buffer 洗板 5 次;④加入 50μl 酶标偶合液;⑤室温孵育 30min;⑥以 washing buffer 洗板 5 次;⑦加入 50μl 底物 A 和 50μl 底物 B;⑧室温避光孵育 15min;⑨加反应终止液 50μl;⑩酶标仪读取 450nm 波长吸光度;⑪制定标准曲线,标本读数。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两样本均数之间的比较采用 q 检验,相关性研究采用直线相关分析法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 疾病严重程度对 RSV 毛细支气管炎患儿血清 GRα、GRβ 水平的影响:与对照组比较,轻度和重度 RSV 毛细支气管炎组血清 GRα、GRβ 水平均显著升高($P < 0.01$);与轻度组比较,重度 RSV 毛细支气管炎组血清 GRα、GRβ 水平显著升高($P < 0.01$);GRα/GRβ 比值在重度组显著低于轻度组和对照组(P 均 < 0.01),后两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 不同程度 RSV 毛细支气管炎血清 GRα、GRβ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	n	GRα	GRβ	GRα/GRβ
对照组	48	10.77 ± 3.01	7.75 ± 1.83	1.41 ± 0.32
RSV 毛细支气管炎组				
轻度组	42	16.31 ± 4.26	13.48 ± 3.81	1.27 ± 0.44
重度组	24	18.96 ± 4.30	21.71 ± 6.21	0.88 ± 0.11
F		44.567	144.575	19.163
P		< 0.01	< 0.01	< 0.01

2. RSV 毛细支气管炎严重程度与 GRα/GRβ 比值之间的关系:直线相关分析发现,RSV 毛细支气管炎严重程度与 GRα/GRβ 比值之间呈显著负相关($r = -0.588$, $t = 5.816$, $P < 0.05$)。

讨 论

RSV 毛细支气管炎是婴幼儿时期最常见的毛细支气管炎类型,主要病理改变是毛细支气管的黏膜水肿、黏液分泌增加、上皮细胞脱落后管腔堵塞,在临床上表现为气急、喘息、低氧血症等症状,严重者可以出现呼吸衰竭。虽然目前的研究表明[10,11],RSV 毛细支气管炎的发病过程与多种细胞炎性因子的参与和免疫应答反应有关,而且 RSV 感染后可导致哮喘发病的易感性增高,但其具体的发病机制尚未完全阐明,因此在治疗上尤其是对 GC 的应用存在分歧[12]。国内的很多研究认为,GC 可以有效改善毛细支气管炎患儿的临床症状,缩短住院时间,预防其反复喘息[13~15]。国外的研究却认为,应用 GC 并不能改善 RSV 毛细支气管炎的临床症状和自然病程,在 RSV 毛细支气管炎中存在着 GC 抵抗现象,具体机制目前尚不明确[16]。GC 主要通过与细胞质内的 GR 结合发挥作用,目前发现的 GR 包括 GRα 和 GRβ 两类亚型,研究表明,GRβ 可能是一种潜在的内源性 GC 效应的拮抗因子,GRβ 的表达增高可降低机体对 GC 的反应性,使机体出现内源性的 GC 抵抗现象,因此,笔者推测在 RSV 毛细支气管炎患儿中是否也存在着 GRβ 的高表达,导致 GC 治疗 RSV 毛细支气管炎疗效不佳,

从而成为疾病发生、发展的一个重要诱因[17]。

本研究发现，与对照组比较，轻度和重度 RSV 毛细支气管炎组血清中 GRα、GRβ 水平均明显升高（F 分别为 44.57、144.58，P 均 <0.01），而与轻度组比较，则重度 RSV 毛细支气管炎组血清 GRα、GRβ 水平升高更为显著（P 均 <0.01），说明在 RSV 毛细支气管炎患儿中存在着 GR 水平的表达增强，而在重度患儿中更为明显，这与文献报道一致[18]。GRβ 是 GRα 的内源性的拮抗因子，由于疾病引起的 GRα/GRβ 比例失衡将导致 GC 敏感或 GC 抵抗的发生，即 GRα/GRβ 比值增大表现为 GC 敏感，GRα/GRβ 比值减小将出现 GC 抵抗，因此，观察两者表达比例的变化能更真实的反映 GC 抵抗现象的发生[19]。笔者发现，重度 RSV 毛细支气管炎组 GRα/GRβ 比值较对照组和轻度组明显降低，而后两者比较差异无统计学意义，说明在重度 RSV 毛细支气管炎患儿中相对于 GRα 的表达，存在着 GRβ 的过度表达，从而导致这部分患儿对内源性 GC 的不敏感或抵抗，进而在临床上表现为更为严重的症状，这也可以部分揭示 RSV 毛细支气管炎中 GC 抵抗的发生机制。

同时，笔者对 RSV 毛细支气管炎严重程度与 GRα/GRβ 比值之间进行相关性分析，笔者发现，随着 RSV 毛细支气管炎症状加重，GRα/GRβ 比值越低，两者之间呈显著负相关（$t=5.816$，$P<0.05$），说明在 RSV 毛细支气管炎的发展过程中，GRα 与 GRβ 之间的平衡失调是导致疾病严重程度的一个重要原因，因此，笔者认为血清 GRα/GRβ 比值可以作为预测 RSV 毛细支气管炎严重程度的一个有效的标志物。

综上所述，在 RSV 毛细支气管炎患儿中表现为 GRα、GRβ 水平表达增强，但在不同程度的毛细支气管炎患儿中两者之间存在着表达失衡，主要表现为随着症状加重，GRα/GRβ 比值降低，两者存在显著的负相关，因此这可以作为早期预测疾病严重度的一个重要标志物，也可以部分解释在 RSV 毛细支气管炎中存在 GC 抵抗的原因，同时为研究重症 RSV 毛细支气管炎的发生机制和 GC 的合理应用提供了一个新的方向。由于 GC 抵抗的发生机制非常复杂，而且本研究样本量较少，尚需临床开展大样本深入研究。

参考文献

1 Hasegawa K, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Infectious pathogens and bronchiolitis outcomes[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014, 12:817 - 828

2 张乐乐，苏苗赏，李昌崇，等. 儿童支气管哮喘急性发作临床特征及其年龄差异分析[J]. 医学研究杂志，2017，46(8)：91 - 95

3 Ochoa Sangrador C, González de Dios J. Overuse of bronchodilators and steroids in bronchiolitis of different severity: bronchiolitis - study of variability, appropriateness, and adequacy[J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2014, 42(4): 307 - 315

4 Tagarro A, Pérez L, Quintero VM, *et al*. Dexamethasone does not reduce length of hospitalization or recurrent wheezing 1 year after early bronchiolitis[J]. Minerva Pediatr, 2014, 66(2): 131 - 140

5 Plint Amy C, Grenon R, Klassen Terry P, *et al*. Bronchodilator and steroid use for the management of bronchiolitis in Canadian pediatric emergency departments[J]. CJEM, 2014, 16(0): 9 - 16

6 Ernst E. Treatment of acute viral bronchiolitis[J]. Open Microbiol J, 2011, 5(Suppl. 2): 159 - 164

7 D'Attilio L, Trini E, Bongiovanni B, *et al*. Mrna expression of alpha and beta isoforms of glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear cells of patients with tuberculosis and its relation with components of the immunoendocrine response[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25: 461 - 467

8 《中华儿科杂志》编辑委员会，中医学会儿科学分会呼吸学组. 毛细支气管炎诊断、治疗与预防专家共识[J]. 中华儿科杂志，2015，53(3)：168 - 171

9 Larranaga CL, Ampuero SL, Luchsinger VF, *et al*. Impaired immune response in severe human lower tract respiratory infection by respiratory syncytial virus[J]. Pediatr Infect Dis J, 2009, 28(10): 867 - 873

10 栾大丽，马桐生，黄玉克. 毛细支气管炎的免疫学研究进展[J]. 职业与健康，2015，31(9)：1286 - 1289

11 邵勤，刁玉巧. TGF - β 和 IL - 10 在呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿外周血中的含量及表达意义[J]. 中国生化药物杂志，2014，34(9)：96 - 98

12 Da Dalt L, Bressan S, Martinolli F, *et al*. Treatment of bronchiolitis: state of the art[J]. Early Human Dev, 2013, 89(1): 31 - 36

13 曾科学. 糖皮质激素在毛细支气管炎治疗中的应用[J]. 实用中西医结合临床，2015，15(12)：30 - 31

14 徐大琴，张影菊. 丙酸氟替卡松预防婴幼儿毛细支气管炎后喘息的临床观察[J]. 临床肺科杂志，2016，21(11)：2036 - 2037，2043

15 王学珍. 布地奈德联合特布他林对小儿毛细支气管炎的治疗效果探究[J]. 中国医药指南，2017，15(20)：126 - 127

16 Fernandes RM, Hartling L. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children[J]. JAMA 2014, 311(1): 87 - 88

17 Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 131(3): 636 - 645

18 Diaz PV, Pinto RA, Mamani R, *et al*. Increased expression of the glucocorticoid receptor β in infants with RSV bronchiolitis[J]. Pediatrics, 2012, 130(4): 804 - 811

19 Lewis - Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGR beta) and glucocorticoid resistance[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1069: 1 - 9

（收稿日期：2017 - 12 - 04）
（修回日期：2017 - 12 - 22）