DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.03.10

· 临床实验研究 ·

可溶性微纤维相关蛋白 4、白三烯 D4 及干扰素 γ 对儿童哮喘筛查及病情评估价值比较

施芬,罗汉清(武汉市中心医院新洲院区 & 武汉市新洲区人民医院儿科,武汉 430400)

摘要:目的　比较可溶性微纤维相关蛋白 4(sMFAP4)、白三烯 D4(LTD4)及干扰素 γ(IFN-γ)对儿童哮喘筛查及病情评估的价值。**方法**　选取 2019 年 1 月至 12 月于武汉市新洲区人民医院儿科收治的 100 例哮喘患儿作为哮喘组(包括哮喘急性发作期 50 例,临床缓解期 50 例),另收集 50 例年龄和性别相匹配的体检健康儿童作为健康人对照组。采用 ELISA 法检测 2 组血清 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 的浓度。ROC 曲线评估血清 sMFAP4、LTD4、IFN-γ 及联合检测对儿童哮喘筛查及病情评估价值。**结果**　哮喘组患儿急性发作期血清 sMFAP4 浓度显著高于健康人对照组(3.85±0.83 vs 1.53±0.38 ng/mL, t=9.34, P<0.01)和临床缓解期患儿(3.85±0.83 vs 2.49±0.76 ng/mL, t=10.68, P<0.01)。哮喘组患儿急性发作期血清的 LTD4 浓度显著高于健康人对照组(16.89±4.03 ng/mL vs 5.49±3.53 ng/mL, t=8.96, P<0.01)和临床缓解期患儿(16.89±4.03 vs 11.89±3.92, t=12.13, P<0.01)。哮喘组患儿急性发作期血清 IFN-γ 浓度明显低于健康人对照组(46.26±14.77 vs 80.55±16.88 ng/mL, t=9.96, P<0.01)和临床缓解期患儿(46.26±14.77 vs 71.25±10.95 ng/mL, t=13.76, P<0.01)。血清 sMFAP4 筛查儿童哮喘症的 ROC 曲线下面积(AUC^{ROC})为 0.85,当 cut-off 值为 2.06 ng/mL 时,敏感性为 82.90%,特异性为 87.80%;血清 IFN-γ 筛查儿童哮喘症的 AUC^{ROC} 为 0.72,当 cut-off 值为 60.34 ng/mL 时,95%*CI* 为 0.66~0.84,敏感性为 74.50%,特异性为 84.90%;血清 LTD4 筛查儿童哮喘症的 AUC^{ROC} 为 0.78,当 cut-off 值为 9.06 ng/mL 时,95%*CI* 为 0.73~0.84,敏感性为 78.10%,特异性为 89.70%;sMFAP4、IFN-γ、LTD4 三者联合筛查儿童哮喘症的 AUC^{ROC} 为 0.94,95%*CI* 为 0.84~0.94,敏感性为 90.50%,特异性为 93.90%。血清 sMFAP4 区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC} 为 0.83,当 cut-off 值为 2.67 ng/mL 时,敏感性为 84.50%,特异性为 83.90%;血清 IFN-γ 区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC} 为 0.70,当 cut-off 值为 80.44 ng/mL 时,95%*CI* 为 0.64~0.72,敏感性为 60.90%,特异性为 75.80%;血清 LTD4 区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC} 为 0.74,当 cut-off 值为 13.67 ng/mL 时,95%*CI* 为 0.68~0.75,敏感性为 69.90%,特异性为 79.80%;联合检测 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 三者区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC} 为 0.90,95%*CI* 为 0.84~0.95,敏感性为 89.90%,特异性为 91.80%。**结论**　sMFAP4 对儿童哮喘具有较好的筛查及鉴别急性发作期和临床缓解期效能,联合检测的筛查效能更优。

关键词:可溶性微纤维相关蛋白 4;白三烯 D4;干扰素 γ;儿童哮喘;鉴别;筛查

中图分类号:R446;R725.6　　**文献标志码:**A

儿童哮喘诊断和病情严重程度的判断主要依据临床症状和肺功能,在诊断和治疗上缺乏特异性标志物。炎症和免疫反应、细胞和细胞外基质间的相互作用与支气管哮喘进展关系密切,检测相关标志物不仅辅助哮喘的诊断,而且可深入探讨哮喘发作时的炎症细胞和细胞因子的调控机制[1]。白三烯 D4(LTD4)和干扰素 γ(IFN-γ)是临床上对哮喘发作及严重程度评估常用的诊断标志物[2],但二者的特异性及敏感性不高。寻找更特异的儿童哮喘诊断标志物对提高儿童哮喘诊治水平具有重要的意义。微纤维相关蛋白 4(microfibrillar-associated protein 4, MFAP4)是一种属于纤维蛋白原相关蛋白超家族的细胞外基质蛋白,在先天免疫和内皮细胞功能的发挥过程中起重要的作用[3]。研究显示,MFAP4 可调节支气管平滑肌细胞增殖并促进气道嗜酸性粒细胞增多,气道高反应性和肺重塑并促进过敏性哮喘的发生[4]。可溶性微纤维相关蛋白 4(soluble microfibrillar-associated protein 4, sMFAP4)是一种分泌蛋白质,以可溶性形式存在于外周循环中[5]。本研究通过检测哮喘患儿和健康儿童中 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 的表达水平,旨在分析其对儿童哮喘筛查及病情评估的价值。

1　材料和方法

1.1　一般资料　纳入武汉市新洲区人民医院儿科 2019 年 1 月至 12 月收治的哮喘患儿 100 例为哮喘组,其中包括哮喘发作期患儿 50 例,其中男 30 例,女 20 例,年龄(8.9±2.7)岁。诊断均依据中华医学

作者简介:施芬,1978 年生,女,主治医师,研究方向为儿科常见疾病的诊治。

通信作者:罗汉清,副主任医师,E-mail: 289984147@qq.com。

会儿科学分会呼吸学组修订《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》标准诊断[6]。儿童哮喘严重程度标准依据“全球哮喘防治创议”(GINA 方案)进行[7]。50 例急性发作期患儿中,哮喘轻度发作 21 例,中度发作 24 例,重度发作 5 例,以及哮喘缓解期患儿 50 例。纳入标准:(1)年龄 4~12 岁;(2)首次哮喘发作;(3)支气管哮喘发作诊断明确,患儿存在急性发作期和临床缓解期的临床资料;(4)入选儿童在 72 h 内未使用糖皮质激素、β2 受体激动剂、抗胆碱能类、抗组胺、白三烯拮抗剂及茶碱类药物。排除标准:(1)不符合上述纳入标准;(2)患者临床资料和随访资料不全的患者;(3)患者家属拒绝参与研究者。选择同期年龄和性别相匹配的体检健康儿童 50 例为健康人对照组,其中男 29 例,女 21 例,年龄(8.8±2.3)岁。哮喘组患儿与健康人对照组儿童年龄和性别比较,差异无统计学意义(χ^2 分别为 14.36,18.36,P 均>0.05)。所有患儿发作后均收入院经规则联合吸入糖皮质激素(inhaled corticosteroids,ICS)/长效 β2 受体激动剂(long-acting beta2 agonists,LABA)治疗后哮喘缓解。本研究经武汉市新洲区人民医院医学伦理委员会批准(No.WHXZ-P-20190112),各研究对象均签署知情同意书。

1.2　主要仪器及试剂　sMFAP4、白三烯 D4(LTD4)和干扰素 γ(IFN-γ)酶联免疫试剂盒(武汉优尔生科技股份公司),Stat Fax-2100 型酶联仪(美国 Awareness 公司),TGL-16M 台式高速离心机(济南博科公司),乙二胺四乙酸二钾抗凝管(沈阳宝康生物公司)。

1.3　方法

1.3.1　血液样本收集　于哮喘患儿急性发病入院时,临床缓解期于随访期间,采集患儿空腹静脉血样本,健康人对照组儿童在体检当日清晨采集外周血 5 mL,4 ℃、1 500×g 离心 10 min,取上清液,采用乙二胺四乙酸二钾抗凝管收集,置于−80 ℃冻存待测。

1.3.2　ELISA 法测定血清 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 浓度　按照人 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ ELISA 试剂盒说明书检测哮喘组和健康人对照组血清中 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 浓度。采用 Stat Fax-2100 型酶联仪在 450 nm 波长处依次测量各孔的吸光度($A_{450\ nm}$值),并计算 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 浓度。参考范围:LTD4:2 ~ 10 ng/mL,sMFAP4:1~2 ng/mL,IFN-γ:70~120 ng/mL。

1.4　统计学分析　数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件进行,对数据进行正态性和方差齐性分析,符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料用两独立样本 t 检验,两组间比较采用配对 t 检验,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验或 LSD-t 检验,率的比较用χ^2 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。通过 ROC 曲线评估血清 MFAP4、LTD4 和 IFN-γ 对儿童哮喘症筛查价值。

2　结果

2.1　各组血清 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 浓度比较　哮喘患儿急性发作期血清 sMFAP4 浓度及 LTD4 浓度显著高于健康人对照组和哮喘缓解期患儿(P<0.05),但哮喘患儿急性发作期血清 IFN-γ 浓度显著低于健康人对照组和缓解期患儿(P=0.001)。见表 1。

表 1　各组血清 sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 浓度比较(ng/mL)

组别	n	sMFAP4	LTD4	IFN-γ
健康人对照组	50	1.53±0.38#	5.49±3.53#	80.55±16.88#
哮喘急性发作期	50	3.85±0.83	16.89±4.03	46.26±14.77
哮喘缓解期	50	2.49±0.76#*	11.89±3.92#*	71.25±10.95#*
F 值		24.56	37.09	34.33
P 值		0.001	0.001	0.001

注:#,与哮喘急性发作期比较,P<0.05;*,与健康人对照组比较,P<0.05。

2.2　各指标对儿童哮喘的筛查效能比较　以儿童哮喘诊断标准为金标准,选取哮喘患儿为实验组,健康儿童为对照组,将实验组和对照组 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 浓度纳入 ROC 曲线分析,评估 sMFAP4、IFN-γ 及 LTD4 及联合检测筛查儿童哮喘的效能。ROC 曲线分析结果表明,血清 sMFAP4 浓度筛查儿童哮喘症的 ROC 曲线下面积(area under-curve,AUC^{ROC})显著高于 IFN-γ 及 LTD4,而联合检测 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 筛查儿童哮喘症的 AUC^{ROC}亦显著高于单项指标。见表 2、图 1。

表 2　血清 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 对儿童哮喘症的筛查价值比较

指标	cut-off 值	AUC^{ROC}	95%CI	敏感性(%)	特异性(%)
sMFAP4	2.06 ng/mL	0.85	0.75~0.92	82.90	87.80
IFN-γ	60.34 ng/mL	0.72	0.66~0.84	74.50	84.90
LTD4	9.06 ng/mL	0.78	0.73~0.84	78.10	89.70
联合检测	–	0.94	0.84~0.94	90.50	93.90

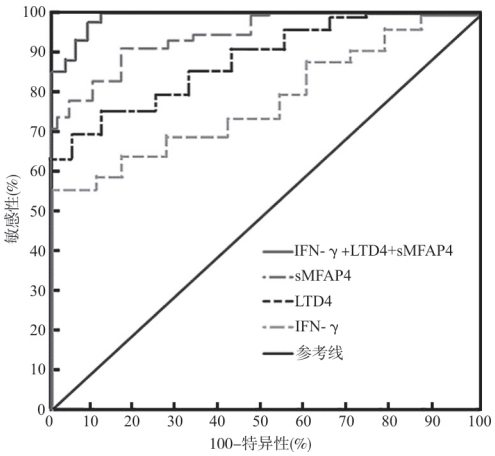

图 1　血清 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 对儿童哮喘症筛查价值的 ROC 曲线

2.3　各指标区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的效能比较　以儿童哮喘急性发作期诊断标准为金标准，选取哮喘急性发作期儿童为实验组，以哮喘临床缓解期患儿为对照组，将实验组和对照组 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 浓度纳入 ROC 曲线分析，评估 sMFAP4、IFN-γ 及 LTD4 及联合检测区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的效能。血清 sMFAP4 区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC} 高于 IFN-γ、LTD4，联合检测 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC} 高于单项指标。见表 3、图 2。

表 3　血清 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 筛查儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的效能比较

指标	cut-off 值	AUC^{ROC}	95%*CI*	敏感性（%）	特异性（%）
sMFAP4	2.67 ng/mL	0.83	0.76~0.89	84.50	83.90
IFN-γ	80.44 ng/mL	0.70	0.64~0.72	60.90	75.80
LTD4	13.67 ng/mL	0.74	0.68~0.75	69.90	79.80
联合检测	–	0.90	0.84~0.95	89.90	91.80

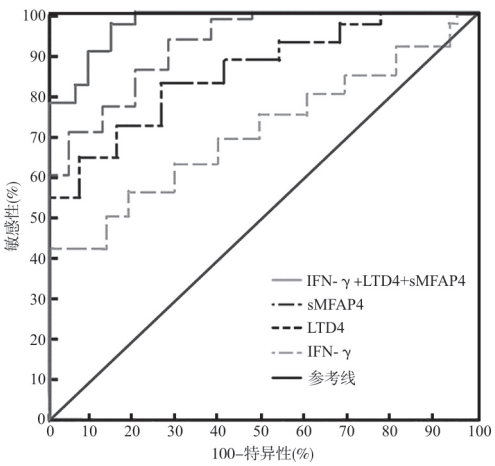

图 2　血清 sMFAP4、IFN-γ、LTD4 区分儿童哮喘急性发作期和临床缓解期的 ROC 曲线

3　讨论

哮喘发作和严重程度常用的临床诊断标志物包括 LTD4 和 IFN-γ 等[2]。LTD4 是哮喘发病过程中的炎症介质，在哮喘发病中促进炎性反应细胞聚集，并促进气道高反应性。本研究结果发现，哮喘急性发作期患儿 LTD4 浓度高于哮喘缓解期患儿及健康人对照组，这与刘芳君等[8]研究结果相一致。

在哮喘发病过程中，T 细胞激活和细胞免疫发挥关键作用，T_H1/T_H2 细胞平衡紊乱是哮喘发病机制之一[9]。哮喘发作时，T_H2 型细胞因子过度分泌，T_H1 细胞分化减少，继而由 T_H1 细胞分泌的 IFN-γ 浓度显著降低，故而 IFN-γ 浓度在哮喘患者中下降明显[10]。本研究亦发现哮喘急性发作期 IFN-γ 浓度显著低于哮喘缓解期及健康人对照组。

MFAP4 是种细胞外基质蛋白，属于纤维蛋白原相关蛋白超家族，在富含弹性蛋白的组织（如心脏和肺）中呈高表达[3,11-12]，*MFAP4* 基因定位于 12q15 上，以膜蛋白和可溶性（sMFAP4）形式存在于机体[12]。另有研究发现，急性心肌梗死患者循环中 sMFAP4 显著增加[5]；且 MFAP4 是肝脏和肺纤维化的潜在标志物[13]。sMFAP4 在支气管哮喘发病及进展中扮演着重要的角色。sMFAP4 可促进支气管平滑肌细胞增殖及嗜酸性粒细胞趋化因子分泌，进而促进气道嗜酸性粒细胞增多、气道高反应性及肺重构，诱导过敏性哮喘的发生[13]。Pilecki 等[14]发现，在卵清蛋白诱导的小鼠过敏性哮喘动物模型中，sMFAP4 在支气管平滑肌细胞中表达增加，并与 α1β3 整合素受体结合，促进支气管平滑肌细胞增殖和迁移。Johansson 等[15]报道慢性阻塞性肺病患者血清 sMFAP4 浓度与慢阻肺病情严重程度及急性发作呈正相关。本研究发现，哮喘患儿血清中 sMFAP4 浓度高于健康人对照组，同时哮喘急性发作期水平高于临床缓解期，提示 MFAP4 参与哮喘发病过程，其表达变化可通过检测外周循环中 sMFAP4 变化水平而反映出来。本研究结果与文献[16]报道基本一致，其研究证实在成人哮喘患者中，轻度和重度哮喘患者血清 sMFAP4 浓度高于健康对照者，其表达水平改变与患者是否接受 β2 受体激动剂治疗无关。

血清中 sMFAP4 浓度具有良好的筛查儿童哮喘及区分急性发作期和临床缓解期的临床效能，血清 sMFAP4 浓度筛查儿童哮喘及区分急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC}、敏感性及特异性均高于

LTD4 和 IFN-γ,显示出良好的临床筛查及评估病情严重程度的效能,有望成为儿童哮喘无创辅助诊断及病情判断标志物。笔者进一步分析发现,sMFAP4、LTD4 和 IFN-γ 三者联合应用筛查儿童哮喘及区分急性发作期和临床缓解期的 AUC^{ROC}、敏感性及特异性均高于单项指标检测,提示联合检测上述标志物可提高儿童哮喘的筛查及对儿童哮喘病情评估价值。本研究亦存在一定的不足之处,如未能分析 sMFAP4 与不同程度哮喘的急性发作存在何种程度的关系,以及未进一步明确 sMFAP4 与呼吸功能、白细胞及 IgE 的关系如何,值得进一步研究。

4　参考文献

[1] Nasreen S, Wilk P, Mullowney T, *et al*. Asthma exacerbation trajectories and their predictors in children with incident asthma[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2019, 123(3):293-300.e2.

[2] Zhao SM, Wang HS, Zhang C, *et al*. Repeated herbal acupoint sticking relieved the recurrence of allergic asthma by regulating the Th1/Th2 cell balance in the peripheral blood[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1879640.

[3] Pilecki B, Holm AT, Schlosser A, *et al*. Characterization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) as a tropoelastin- and fibrillin-binding protein involved in elastic fiber formation[J]. J Biol Chem, 2016, 291(3):1103-1114.

[4] Pilecki B, Schlosser A, Wulf-Johansson H, *et al*. Microfibrillar-associated protein 4 modulates airway smooth muscle cell phenotype in experimental asthma[J]. Thorax, 2015, 70(9):862-872.

[5] Wulf-Johansson H, Lock Johansson S, Schlosser A, *et al*. Localization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) in human tissues: clinical evaluation of serum MFAP4 and its association with various cardiovascular conditions[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82243.

[6] Sánchez-García S, Habernau Mena A, Quirce S. Biomarkers in inflammometry pediatric asthma: utility in daily clinical practice[J]. Eur Clin Respir J, 2017, 4(1):1356160.

[7] Al-Azzam N, Elsalem L. Leukotriene D_4 role in allergic asthma pathogenesis from cellular and therapeutic perspectives[J]. Life Sci, 2020, 260: 118452.

[8] 刘芳君, 龚财惠, 秦江蛟, 等. 白三烯 D4 支气管激发试验在儿童气道高反应性检测中的应用价值[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(6):793-798.

[9] Du YM, Zhuansun YX, Chen R, *et al*. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma[J]. Exp Cell Res, 2018, 363(1):114-120.

[10] Wardzyńska A, Pawełczyk M, Rywaniak J, *et al*. Circulating MicroRNAs and T-cell cytokine expression are associated with the characteristics of asthma exacerbation[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2020, 12(1):125-136.

[11] Schlosser A, Pilecki B, Hemstra LE, *et al*. MFAP4 promotes vascular smooth muscle migration, proliferation and accelerates neointima formation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(1): 122-133.

[12] Mölleken C, Ahrens M, Schlosser A, *et al*. Direct-acting antivirals-based therapy decreases hepatic fibrosis serum biomarker microfibrillar-associated protein 4 in hepatitis C patients[J]. Clin Mol Hepatol, 2019, 25(1):42-51.

[13] Mölleken C, Poschmann G, Bonella F, *et al*. MFAP4: a candidate biomarker for hepatic and pulmonary fibrosis? [J]. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2016, 33(1):41-50.

[14] Pilecki B, Schlosser A, Wulf-Johansson H, *et al*. Microfibrillar-associated protein 4 modulates airway smooth muscle cell phenotype in experimental asthma[J]. Thorax, 2015, 70(9):862-872.

[15] Johansson SL, Roberts NB, Schlosser A, *et al*. Microfibrillar-associated protein 4: a potential biomarker of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respir Med, 2014, 108(9):1336-1344.

[16] Hoffmann-Petersen B, Suffolk R, Petersen JJH, *et al*. Microfibrillar-associated protein 4 in serum is associated with asthma in Danish adolescents and young adults[J]. Immun Inflamm Dis, 2019, 7(3):150-159.

(收稿日期:2021-01-26)
(本文编辑:许晓蒙)