

[文章编号] 1671-587X(2025)01-0191-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250123

自分泌运动因子和溶血磷脂酸受体3在慢性阻塞性肺疾病患者血清及肺组织中的表达及其意义

蒋佩芬¹, 张政¹, 黄钟², 卢献灵¹

(1. 石河子大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学第一附属医院急诊医学中心, 新疆 石河子 832000)

[摘要] **目的:** 探讨自分泌运动因子(ATX)和溶血磷脂酸受体3(LPA3)在慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者血清及肺组织中的表达情况, 阐明ATX和LPA3在COPD发生发展过程中的作用。**方法:** 收集40例COPD患者纳入急性加重期组(AECOPD组), 经治疗后处于稳定期者纳入COPD稳定期组, 共计40例, 并收集40名健康体检者纳入对照组, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组研究对象血清中ATX水平。另收集80例行肺叶切除术的患者, 分为COPD吸烟组(CS组, $n=20$)、COPD不吸烟组(CNS组, $n=20$)、非COPD吸烟组(HS组, $n=20$)和非COPD不吸烟组(HNS组, $n=20$), 收集各组研究对象的一般资料, HE染色观察各组患者肺组织的病理形态表现, 免疫组织化学染色法检测各组患者肺组织中ATX和LPA3蛋白表达水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组患者肺组织中ATX和LPA3 mRNA表达水平, Pearson相关分析符合正态分布的连续变量的相关性, Spearman相关分析评估其他变量间的相关性。**结果:** 与对照组比较, COPD稳定期组研究对象第1秒用力呼气容积占预计值百分比($FEV1\%pred$)和第1秒用力呼气容积占用力肺活量百分比($FEV1/FVC$)均明显降低($P<0.05$)。与COPD稳定期组和对照组比较, AECOPD组患者血清中ATX水平升高($P<0.05$); 与对照组比较, COPD稳定期组患者血清中ATX水平升高($P<0.05$)。AECOPD组患者血清中ATX水平与COPD评估测试量表(CAT)评分呈正相关关系($r=0.581$, $P<0.001$), 与吸烟史、白细胞计数(WBC)、中性粒细胞百分比(NEUT%)、中性粒细胞与淋巴细胞比值(NLR)和体质量指数(BMI)无相关性($P>0.05$); COPD稳定期组患者血清中ATX水平与WBC和CAT评分均呈正相关关系($r=0.384$, $P=0.014$; $r=0.463$, $P=0.003$), 与 $FEV1\%pred$ 和 $FEV1/FVC$ 均呈负相关关系($r=-0.393$, $P=0.012$; $r=-0.353$, $P=0.025$); 与CS组和CNS组比较, HS组和HNS组患者 $FEV1\%pred$ 及 $FEV1/FVC$ 均升高($P<0.05$); 免疫组织化学染色, 与CS组比较, HS组和HNS组患者肺组织中ATX及LPA3蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与CNS组比较, HS组和HNS组患者肺组织中ATX及LPA3蛋白表达水平降低($P<0.05$)。RT-qPCR法, 与CS组比较, HS组和HNS组患者肺组织中ATX及LPA3 mRNA表达水平降低($P<0.05$); 与CNS组比较, HS组和HNS组患者肺组织中ATX及LPA3 mRNA表达水平降低($P<0.05$)。相关性分析, COPD患者肺组织中ATX蛋白表达水平与LPA3蛋白表达水平呈正相关关系($r=0.723$, $P<0.001$)。**结论:** COPD患者肺组织中ATX和LPA3 mRNA及蛋白表达水平均升高, AECOPD组和COPD稳定期组患者血清ATX水平均升高, 二者可能参与COPD的炎症反应, 促进COPD的发生发展。

[收稿日期] 2024-02-10

[录用日期] 2024-04-07

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技局兵团指导性科技计划项目(2022ZD039); 石河子大学自主资助支持校级科研立项项目(ZZZC201715A)

[作者简介] 蒋佩芬(1996-), 女, 湖南省怀化市人, 在读硕士研究生, 主要从事呼吸内科学基础和临床方面的研究。

[通信作者] 卢献灵, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: luxianlingmary@163.com);

黄钟, 副教授(E-mail: 10082404@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 自分泌运动因子; 溶血磷脂酸; 受体; 吸烟
[中图分类号] R563.9 [文献标志码] A

Expressions of autotaxin and lysophosphatidic acid receptor 3 in serum and lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease and their significances

JIANG Peiqin¹, ZHANG Zheng¹, HUANG Zhong², LU Xianling¹

(1. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Emergency Medical Center, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expressions of autotaxin (ATX) and lysophosphatidic acid receptor 3 (LPA3) in serum and lung tissue of the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, and to clarify the role of ATX and LPA3 in the occurrence and development of COPD. **Methods:** A total of 40 COPD patients were collected and brought into acute exacerbation of COPD group (AECOPD group); after treatment, those stabilized patients were included in COPD stable group ($n=40$); additionally, 40 healthy individuals were recruited as control group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the ATX levels in the serum of the subjects in various groups. Another 80 patients who underwent lobectomy were divided into COPD smoking group (CS group, $n=20$), COPD non-smoking group (CNS group, $n=20$), non-COPD smoking group (HS group, $n=20$), and non-COPD non-smoking group (HNS group, $n=20$). The general informations of the subjects in various groups were collected. HE staining was used to observe the pathomorphology of lung tissue of the patients in various groups; immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of ATX and LPA3 proteins in lung tissue of the patients in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of ATX and LPA3 mRNA in lung tissue of the patients in various groups; Pearson correlation analysis was used to evaluate the correlations of continuous variables with normal distribution, and Spearman correlation analysis was used to evaluate the correlations of other variables. **Results:** Compared with control group, the percentage of forced expiratory volume in the first second to predicted value (FEV1%pred) and the percentage of forced expiratory volume in the first second to forced vital capacity (FEV1/FVC) of the patients in COPD stable group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with COPD stable group and control group, the level of ATX in serum of the patients in AECOPD group was increased ($P<0.05$); compared with control group, the level of ATX in serum of the patients in COPD stable group was increased ($P<0.05$). The serum ATX level of the patients in AECOPD group was positively correlated with COPD Assessment Test (CAT) scores ($r=0.581$, $P<0.001$) and showed no correlations with smoking history, white blood cells (WBC), percentage of neutrophils (NEUT%), neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), and body mass index (BMI) ($P>0.05$). The serum ATX level of the patients in COPD stable group was positively correlated with WBC and CAT score ($r=0.384$, $P=0.014$; $r=0.463$, $P=0.003$) and negatively correlated with FEV1%pred and FEV1/FVC ($r=-0.393$, $P=0.012$; $r=-0.353$, $P=0.025$). Compared with CS group and CNS group, the FEV1%pred and FEV1/FVC of the patients in HS group and HNS group were increased ($P<0.05$). The immunohistochemical staining results showed that compared with CS group, the expression levels of ATX and LPA3 proteins in lung tissue of the patients in HS group and HNS group were decreased ($P<0.05$). Compared with CNS group, the expression levels of ATX and LPA3 proteins in lung tissue of

the patients in HS group and HNS group were decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with CS group, the expression levels of ATX and LPA3 mRNAs in lung tissue of the patients in HS group and HNS group were decreased ($P < 0.05$); compared with CNS group, the expression levels of ATX and LPA3 mRNAs in lung tissue of the patients in HS group and HNS group were decreased ($P < 0.05$). The correlation analysis results showed that the expression level of ATX protein in lung tissue of the COPD patients was positively correlated with the expression level of LPA3 protein ($r = 0.723$, $P < 0.001$). **Conclusion:** The expression levels of ATX and LPA3 mRNA and proteins in lung tissue of the COPD patients are increased. The serum ATX levels in both AECOPD group and COPD stable group are increased, suggesting that these factors may be involved in the inflammatory response of COPD, promoting its occurrence and development.

KEYWORDS Chronic obstructive pulmonary disease; Autotaxin motility factor; Lysophosphatidic acid; Receptor; Smoking

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的发病机制包括炎症机制、氧化应激和蛋白酶-抗蛋白酶失衡等, 其中以炎症机制为核心, 但具体机制尚不明确^[1]。自分泌运动因子 (autotaxin, ATX) 是一种分泌型糖蛋白, 属于外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ENPP) 家族, 也被称为 ENPP2^[2], 其介导溶血磷脂转化为溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA), 进而参与血管形成、纤维化和淋巴细胞归巢等过程^[3]。研究^[4]显示: ATX/LPA 信号通路与哮喘和急性肺损伤等肺部炎症性疾病有关, 可发挥促炎作用, 且可能与 COPD 存在关联, 但其对 COPD 的作用及其机制尚不明确。LPA 通过与不同的 LPA 受体结合发挥作用, 目前认为 LPA 受体至少有 6 种, 分别命名为 LPA1、LPA2、LPA3、LPA4、LPA5 和 LPA6, 其中 LPA3 参与细胞增殖和迁移及炎症反应等, 如 LPA3 可使类风湿性关节炎患者体内的白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-8 和 IL-16 等增多, 促进前列腺素 E2 的合成^[5]。研究^[6]显示: 通过特异性小干扰 RNA 下调 LPA3 能减少 LPA 诱导的支气管上皮细胞中 IL-8 的分泌, 且 LPA3 特异性激动剂能增加支气管上皮细胞中 IL-8 的分泌。本课题组前期研究^[7]显示: COPD 患者血浆中的中性粒细胞胞外诱捕网和 IL-8 等水平均升高, 其中 IL-8 参与炎症反应, 且与 COPD 的疾病严重程度呈正相关关系。上述研究结果表明 ATX、LPA 和 IL-8 与 COPD 存在关联, 且 LPA3 参与 LPA 诱导的 IL-8 的分泌, LPA3 可能与 COPD 存在关联。本研究通过检测在不同严重程度的 COPD 患者和健康人群之间血清中 ATX 表达水平,

并比较 COPD 患者与肺功能正常患者肺组织中 ATX 和 LPA3 mRNA 及蛋白表达水平, 探讨 ATX 和 LPA3 水平与 COPD 的相关性及其在 COPD 发生发展中的作用和其临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象选择及分组 收集 2023 年 3 月—2023 年 8 月于本院呼吸与危重症医学科住院的 40 例 COPD 患者, 纳入急性加重期组 (AECOPD 组); 该组患者经 10~14 d 治疗和完善相关检查后病情明显减轻, 进入稳定期后全部纳入 COPD 稳定期组, 共 40 例; 同期随机选择 40 名在性别构成和年龄分布与病例组匹配的健康体检者作为对照组。纳入标准: ① COPD 及其急性加重期和稳定期的诊断标准依据 2021 年中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2021 年修订版)》^[8]; ② 对照组研究对象的肝功能及肺功能检查等均未见明显异常。排除标准: ① 患有支气管哮喘和活动性肺结核等呼吸系统疾病; ② 患有严重心脏、肝脏和肾脏疾病及肿瘤疾病等; ③ 1 个月内使用过全身糖皮质激素; ④ 不能配合者。

收集 2021 年 10 月—2023 年 8 月于本院胸外科因肺部结节或肿瘤行肺叶切除术患者的肺组织标本, 并依据是否有吸烟行为以及术前肺功能检查结果将其分为 4 组: COPD 吸烟组 (CS 组, $n = 20$)、COPD 不吸烟组 (CNS 组, $n = 20$)、非 COPD 吸烟组 (HS 组, $n = 20$) 和非 COPD 不吸烟组 (HNS 组, $n = 20$)。纳入标准: ① CS 组和 CNS 组的研究对象符合上述 COPD 诊断标准; ② HS 组和 HNS 组的研究对象不符合上述 COPD 诊断标准。排除标准: ① 患有支气管哮喘和活动性肺结核等呼吸系统疾病者;

②患有严重心脏、肝脏和肾脏疾病及自身免疫系统疾病者等；③术前1个月内使用过全身糖皮质激素者；④有放疗或化疗史者；⑤不能配合者。该研究已获得研究对象知情同意，并通过石河子大学第一附属医院医学伦理委员会批准（伦理审批号：KJX-2021-070-01；KJX-2022-005-01）。

1.2 标本收集 血清标本收集：采集健康体检者、COPD急性加重期及其进入COPD稳定期后的患者清晨空腹肘静脉血5 mL，3 000 r·min⁻¹离心5 min后取上层血清置于EP管中，-80℃保存。肺组织标本收集：对距肺部结节或肿瘤病灶边缘5 cm以上的肺部组织进行取材，大小约为1.0 cm×1.0 cm×0.3 cm，将其置于4%多聚甲醛中固定24 h，然后进行石蜡包埋和切片。

1.3 一般资料 收集研究对象的临床资料，包括性别、年龄、吸烟史、白细胞计数（white blood cells, WBC）、中性粒细胞百分比（percentage of neutrophils, NEUT%）、COPD评估测试量表（COPD Assessment Test, CAT）评分、中性粒细胞与淋巴细胞比值（neutrophil to lymphocyte ratio, NLR）、体质指数（body mass index, BMI）、吸烟指数（smoking index, SI；SI=每日吸烟支数×吸烟年数）、第1秒用力呼气容积占用力肺活量百分比（percentage of forced expiratory volume in first second to forced vital capacity, FEV1/FVC）和第1秒用力呼气容积占预计值百分比（percentage of forced expiratory volume in first second to predicted value, FEV1%pred）。

1.4 主要试剂和仪器 ATX检测试剂盒（武汉华美生物工程有限公司），抗ATX抗体（货号：ab77104）和抗LPA3抗体（货号：ab137497）（英国Abcam公司），K1622反转录试剂盒（美国Thermo Fisher公司），荧光定量试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司），实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR）引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，山羊血清及酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物（北京中杉金桥生物技术有限公司）。酶标仪（型号：Multiskan FC，美国Thermo Fisher公司），光学显微镜（型号：UB200i，重庆光电仪器有限公司）。

1.5 酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）检测各组研究对象血清中ATX水平 按照ATX检测试剂盒说明书进

行实验，采用酶标仪于波长450 nm处检测各孔吸光度（A）值，利用标准品浓度及A值计算出标准曲线的回归方程，再利用该回归方程计算各组研究对象血清中ATX水平（单位：μg·L⁻¹）。

1.6 HE染色观察各组患者肺组织病理形态表现

切片经HE染色后在显微镜下观察各组患者肺组织病理形态并随机选择3个视野进行测量：①肺泡平均内衬间隔（mean linear intercept, MLI）^[9]。在视野正中心划十字交叉线，检测该交叉线的总长度（length, L），并记录通过该交叉线的肺泡间隔数（alveolar septal number, ASN），MLI=L/ASN，MLI可反映肺泡平均直径。②平均肺泡数（mean alveolar number, MAN）^[9]。计数每个视野内总肺泡数（alveolar number, AN），并测出各个视野的面积（square area, SA），MAN=AN/SA，MAN可反映肺泡密度变化。③改良式Bosken评分^[10]。Bosken评分可反映气道炎症情况。

1.7 免疫组织化学染色法检测各组患者肺组织中ATX和LPA3蛋白表达水平

石蜡切片经二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化，高压热修复，抑制内源性过氧化物酶，山羊血清封闭后，滴加一抗：抗ATX抗体（1：200）和抗LPA3抗体（1：50），4℃孵育过夜。磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline, PBS）洗涤后加入二抗，37℃孵育30 min，DAB显色，苏木素复染，酸酒精分化，乙醇和二甲苯脱水透明，中性树脂胶封片。显微镜下观察肺组织染色情况，以细胞膜和细胞浆有黄色或棕色颗粒着色为阳性。选择5个高倍视野（×400），记录每个视野的着色强度，其中无着色计0分，浅黄色计1分，棕黄色计2分，棕褐色计3分；记录每个视野的阳性细胞百分率，其中<5%计0分，5%~25%计1分，26%~50%计2分，51%~75%计3分，76%~100%计4分。2项计分相乘为总分，5个总分取均值作为最终结果，且上述评分由2位资深病理医生进行。

1.8 RT-qPCR法检测各组患者肺组织ATX和LPA3 mRNA表达水平

取上述石蜡标本进行切片，厚度为5 μm，每15~20片放入1个EP管中，经二甲苯、无水乙醇、裂解液和蛋白酶K处理后，采用TRIzol试剂提取总RNA。利用K1622逆转录试剂盒进行逆转录，再利用荧光定量试剂盒进行RT-qPCR反应：95℃、10 min；95℃、15 s；60℃、1 min；40个循环。引物序列：ATX上游引

物, 5'-GCTATCAGACTCCCCCTGGA-3', 下游引物, 5'-CACAGCGACAATCAGGAGGT-3'; LPA3 上游引物, 5'-GTACCTGCGGATCTACGTGTA-3', 下游引物, 5'-CACAAACGCCCTAAGACA-GT-3'; β -actin 上游引物, 5'-AACCGCGAGAAG-ATGACCCAG-3', 下游引物, 5'-GGATAGCAC-AGCCTGGATAGCAA-3'。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组患者肺组织中 ATX 和 LPA3 mRNA 相对表达水平。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析。各组研究对象的 CAT 评分、BMI、FEV1%pred、FEV1/FVC、SI、Bosken 评分、MLI、MAN 和血清 ATX 水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验; 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD- t 检验; 各组研究对象 MAN (方差不齐) 比较采用单因素方差分析 (Welch 检验), 组间两两比较采用 Tamhane' T2 法。各组患者肺组织 ATX 和 LPA3 mRNA 及蛋白表达水平不全符合正态分布, 以中位数 (四分位数) [$M (P_{25}, P_{75})$] 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 组间两两比较采用

Bonferroni 法。各组研究对象的性别和血清样本的吸烟史为计数资料, 以频数和百分率 ($n/\%$) 表示, 各组间率的比较采用 χ^2 检验。AECOPD 组患者血清 ATX 水平与 CAT 评分、WBC、NEUT% 和 BMI 的相关性, COPD 稳定期组患者血清 ATX 水平与 CAT 评分、NEUT%、BMI、FEV1%pred 和 FEV1/FVC 的相关性, COPD 组 (CS 组和 CNS 组) 患者肺组织 ATX 蛋白表达水平与 FEV1%pred、Bosken 评分及 MLI 和 MAN 的相关性评估均采用 Pearson 相关分析; 其他数据的相关性采用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组研究对象临床资料 与对照组比较, COPD 稳定期组患者 FEV1%pred 和 FEV1/FVC 均明显降低 ($P < 0.05$), 年龄、性别、吸烟史和 BMI 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组研究对象血清中 ATX 水平 与对照组 ($651.17 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 86.97 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 COPD 稳定期组 ($732.58 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 82.84 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 比较, AECOPD 组患者血清中 ATX 水平 ($828.29 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 102.93 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, COPD 稳定期组患者血清中 ATX 水平升高 ($P < 0.05$)。

表 1 对照组和 COPD 稳定期组研究对象临床资料

Tab. 1 Clinical data of subjects in control group and COPD stable group

($n=40$)

Group	Age ($\bar{x} \pm s$, year)	BMI ($\bar{x} \pm s$, $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	FEV1%pred ($\bar{x} \pm s$, $\eta/\%$)	FEV1/FVC ($\bar{x} \pm s$, $\eta/\%$)	Percentage of male [$n(\eta/\%)$]	Percentage of smoking [$n(\eta/\%)$]
Control	69.70 \pm 7.40	24.18 \pm 2.30	97.10 \pm 6.82	78.05 \pm 3.56	19(47.5)	13(32.5)
COPD stable	69.85 \pm 7.32	24.91 \pm 2.38	48.88 \pm 6.55	51.08 \pm 7.47	23(57.5)	18(45.0)
t/χ^2	0.091	1.389	-32.251	-20.624	0.802	1.317
P	0.928	0.169	<0.001	<0.001	0.370	0.251

2.3 COPD 患者血清中 ATX 水平与临床指标的相关性 AECOPD 组患者血清中 ATX 水平与 CAT 评分呈正相关关系 ($r=0.581$, $P < 0.001$), 与吸烟史、WBC、NEUT%、NLR 和 BMI 无相关性 ($P > 0.05$); COPD 稳定期组患者血清中 ATX 水平与 WBC 和 CAT 评分均呈正相关关系 ($r=0.384$, $P=0.014$; $r=0.463$, $P=0.003$), 与 FEV1%pred 和 FEV1/FVC 均呈负相关关系 ($r=-0.393$, $P=0.012$; $r=-0.353$, $P=0.025$), 与吸烟史、NEUT%、NLR 和 BMI 无相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 各组患者临床资料 各组患者年龄、性别和 BMI 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 CS 组比较, HS 组患者 SI 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 各组患者 FEV1%pred 和 FEV1/FVC 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 CS 组和 CNS 组比较, HS 组和 HNS 组患者 FEV1%pred 和 FEV1/FVC 均升高 ($P < 0.05$), CS 组与 CNS 组、HS 组与 HNS 组患者的 FEV1%pred 和 FEV1/FVC 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.5 各组患者肺组织病理形态表现 HNS 组患者气道和肺泡结构基本正常, 未见明显炎症细胞浸润

表2 AECOPD组和COPD稳定期组患者血清中ATX水平与临床指标的相关性

Tab. 2 Correlations between serum ATX levels and clinical indicators of patients in AECOPD group and COPD stable group

Index	AECOPD group		COPD stable group	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Smoking	0.052	0.749	0.107	0.512
WBC	0.110	0.499	0.384	0.014
NEUT%	0.074	0.650	0.054	0.738
NLR	0.046	0.776	-0.020	0.902
BMI	0.043	0.791	0.245	0.127
CAT	0.581	<0.001	0.463	0.003
FEV1%pred	—	—	-0.393	0.012
FEV1/FVC	—	—	-0.353	0.025

“—”: No data.

及管腔堵塞; HS组患者气道及肺泡结构基本正常, 可见烟尘颗粒沉积, 少量巨噬细胞等炎症细胞浸润, 未见明显管腔堵塞及血管变化; CNS组患者可见部分气道平滑肌增生, 管壁增厚, 支气管上皮细胞

脱落, 纤毛倒伏, 肺泡壁结构破坏, 部分肺泡融合形成肺大疱, 小气道周围及肺泡区域可见炎症细胞浸润; CS组患者可见明显气道平滑肌增生, 杯状细胞增生, 更多支气管上皮细胞脱落及肺泡壁结构破坏, 肺大疱形成, 小气道周围及肺泡区域可见明显炎症细胞浸润, 甚至血管内膜增厚, 小气道阻塞。见图1。与CS组比较, CNS组、HS组和HNS组患者肺组织Bosken评分均明显降低 ($P < 0.01$); HS组和HNS组患者肺组织MLI均明显降低 ($P < 0.01$); MAN均明显升高 ($P < 0.01$)。与CNS组比较, HS组和HNS组患者肺组织Bosken评分和MLI均明显降低 ($P < 0.01$), MAN均明显升高 ($P < 0.01$)。与HS组比较, HNS组患者肺组织Bosken评分明显降低 ($P < 0.01$)。见表4。

2.6 各组患者肺组织中ATX mRNA和蛋白表达水平 ATX蛋白主要表达于CS组和CNS组患者肺组织细支气管上皮细胞及巨噬细胞等炎症细胞的细胞浆和细胞膜中。见图2。与CS组比较, HS组和HNS组患者肺组织中ATX mRNA及蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$)。与CNS组比较, HS组和

表3 各组患者临床资料

Tab. 3 Clinical data of patients in various groups

($n=20$)

Group	Age ($\bar{x} \pm s$, year)	BMI ($\bar{x} \pm s$, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	SI ($\bar{x} \pm s$)	FEV1%pred ($\bar{x} \pm s$, $\eta/\%$)	FEV1/FVC ($\bar{x} \pm s$, $\eta/\%$)	Percentage of male [$n(\eta/\%)$]
CS	64.10 \pm 9.88	24.43 \pm 1.59	620.00 \pm 311.47	77.65 \pm 7.58	62.85 \pm 4.11	14(70.0)
CNS	64.20 \pm 7.27	23.59 \pm 1.71	—	77.45 \pm 8.09	63.25 \pm 4.23	11(55.0)
HS	63.50 \pm 8.63	24.74 \pm 2.02	608.00 \pm 334.81	95.60 \pm 9.13 ^{*Δ}	76.70 \pm 3.92 ^{*Δ}	14(70.0)
HNS	62.45 \pm 8.68	24.52 \pm 2.04	—	100.40 \pm 11.86 ^{*Δ}	78.90 \pm 4.96 ^{*Δ}	10(50.0)
F/χ^2	0.172	1.501	0.014	33.025	78.503	2.686
<i>P</i>	0.915	0.221	0.907	<0.001	<0.001	0.443

* $P < 0.05$ compared with CS group; $\Delta P < 0.05$ compared with CNS group. “—”: No data.

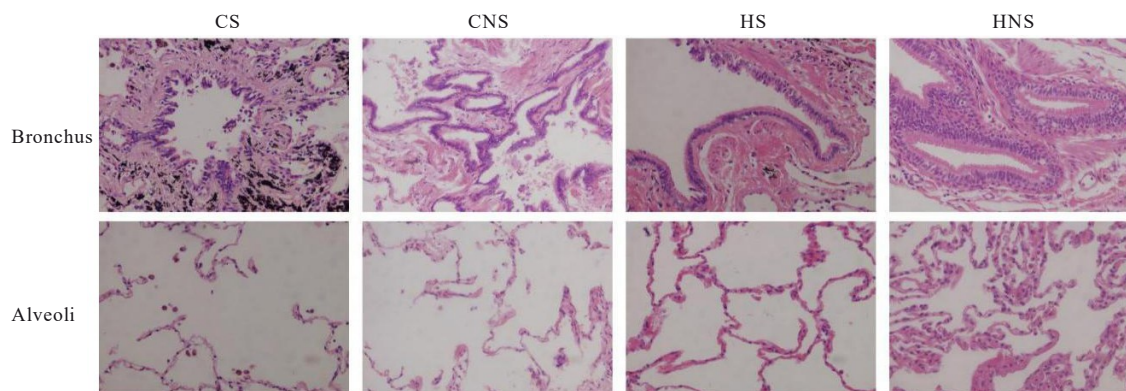


图1 各组患者肺组织病理形态表现(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Pathomorphology of lung tissue of patients in various groups (HE, $\times 200$)

表4 各组患者肺组织 Bosken 评分、MLI 和 MAN

Tab. 4 Bosken scores, MLI, and MAN of lung tissue of patients in various groups (n=20, $\bar{x} \pm s$)

Group	Bosken score	MLI(l/mm)	MAN(mm ⁻²)
CS	17.75±1.65	0.20±0.40	31.81±4.92
CNS	14.35±1.63*	0.18±0.03	33.97±3.55
HS	6.15±1.23* [△]	0.12±0.04* [△]	53.47±12.64* [△]
HNS	2.60±1.10* ^{△#}	0.11±0.03* [△]	56.14±11.96* [△]
F	489.311	40.068	37.022
P	<0.001	<0.001	<0.001

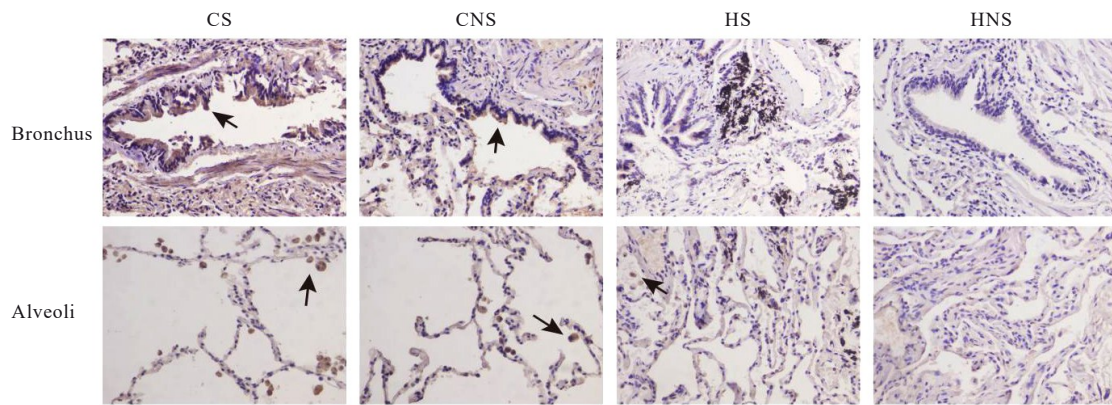
*P<0.01 compared with CS group; [△]P<0.01 compared with CNS group; [#]P<0.01 compared with HS group.

HNS 组患者肺组织中 ATX mRNA 及蛋白表达水平均降低 (P<0.05)。CS 组与 CNS 组、HS 组与 HNS 组患者肺组织中 ATX mRNA 和蛋白表达水平

比较差异均无统计学意义 (P>0.05)。见图 3。

2.7 各组患者肺组织中 LPA3 mRNA 和蛋白表达水平 LPA3 蛋白主要表达于 CS 组和 CNS 组患者肺组织的细支气管上皮细胞及巨噬细胞等炎症细胞的细胞浆和细胞膜中。见图 4。与 CS 组比较, HS 组和 HNS 组患者肺组织中 LPA3 mRNA 及蛋白表达水平均降低 (P<0.05)。与 CNS 组比较, HS 组和 HNS 组患者肺组织中 LPA3 mRNA 及蛋白表达水平均降低 (P<0.05)。CS 组与 CNS 组、HS 组与 HNS 组患者肺组织中 LPA3 mRNA 和蛋白表达水平比较差异均无统计学意义 (P>0.05)。见图 5。

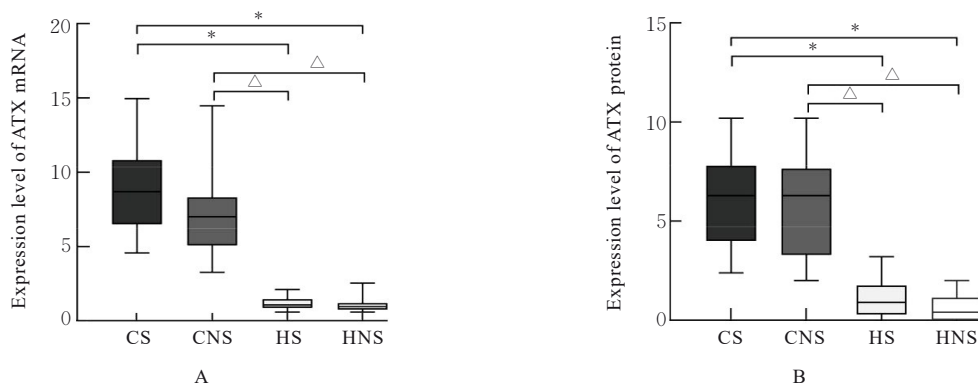
2.8 COPD 患者肺组织中 ATX 和 LPA3 蛋白表达水平与其他指标的相关性 COPD 患者肺组织中 ATX 蛋白表达水平与 FEV1%pred、FEV1/FVC



Black arrows indicated positive expression.

图2 各组患者肺组织中 ATX 蛋白表达情况(免疫组织化学, ×200)

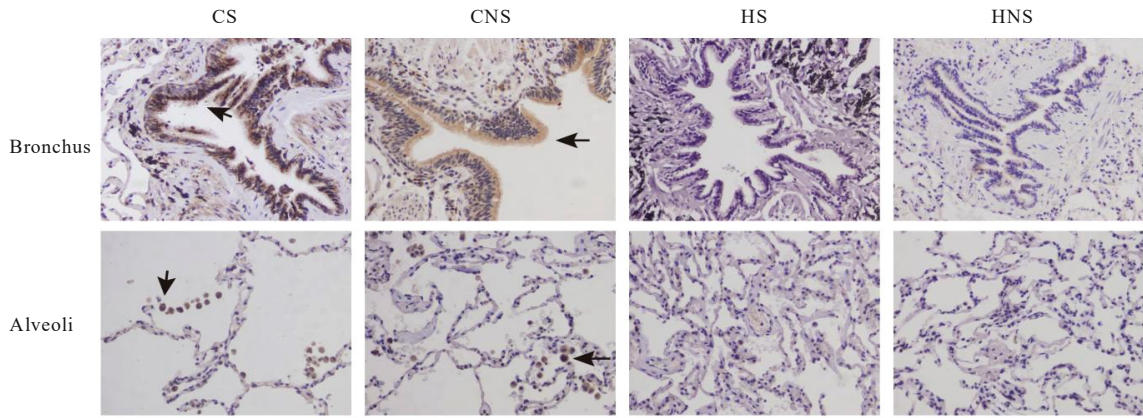
Fig. 2 Expressions of ATX protein in lung tissue of patients in various groups(Immunohistochemistry, ×200)



A: Expression level of ATX mRNA in lung tissue; B: Expression level of ATX protein in lung tissue. *P<0.05 compared with CS group; [△]P<0.05 compared with CNS group.

图3 各组患者肺组织中 ATX mRNA 和蛋白表达水平

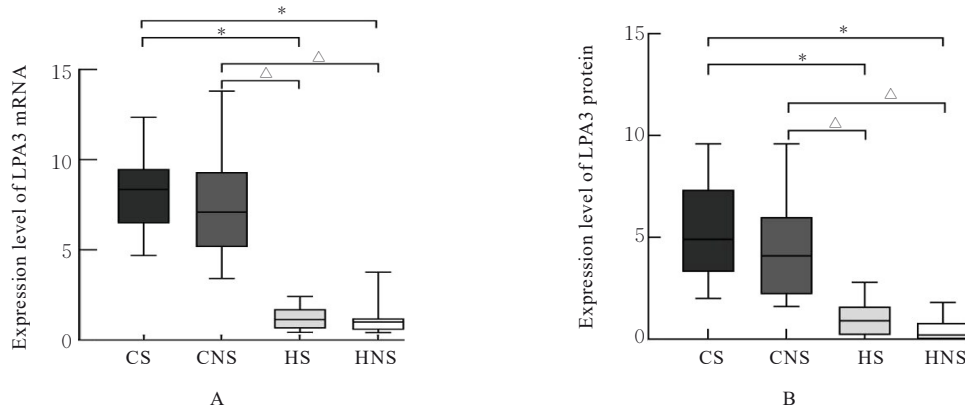
Fig. 3 Expression levels of ATX mRNA and protein in lung tissue of patients in various groups



Black arrows indicated positive expression.

图4 各组患者肺组织中LPA3蛋白表达情况(免疫组织化学, ×200)

Fig. 4 Expressions of LPA3 protein in lung tissue of patients in various groups (Immunohistochemistry, ×200)



A: Expression level of LPA3 mRNA in lung tissue; B: Expression level of LPA3 protein in lung tissue. * $P < 0.05$ compared with CS group; $\Delta P < 0.05$ compared with CNS group.

图5 各组患者肺组织中LPA3 mRNA和蛋白表达水平

Fig. 5 Expression levels of LPA3 mRNA and protein in lung tissue of patients in various groups

和MAN均呈负相关关系 ($P < 0.05$), 与Bosken评分和MLI呈正相关关系 ($P < 0.05$); LPA3蛋白表达水平与MAN呈负相关关系 ($P < 0.05$), 与Bosken评分和MLI呈正相关关系 ($P < 0.05$), 与FEV1%pred和FEV1/FVC无相关性 ($P > 0.05$); COPD患者肺组织中ATX蛋白表达水平与LPA3蛋白表达水平呈正相关关系 ($P < 0.05$)。见表5。

3 讨论

目前认为COPD的发病与炎症反应有关, 而巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等炎症细胞及上皮细胞和内皮细胞参与炎症反应, 可以释放IL-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等多种炎症介质, 加重炎症反应, 甚至导

表5 COPD患者肺组织中ATX和LPA3蛋白表达水平与其他指标的相关性

Tab. 5 Correlations between expression levels of ATX and LPA3 proteins and other indicators in lung tissue of COPD patients

Index	ATX		LPA3	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
FEV1%pred	-0.374	0.017	-0.286	0.074
FEV1/FVC	-0.370	0.019	-0.271	0.090
Bosken score	0.493	0.001	0.576	<0.001
MLI	0.375	0.017	0.378	0.016
MAN	-0.396	0.011	-0.395	0.012
LPA3	0.723	<0.001	—	—

“—”: No data.

致气道结构重塑等改变^[11]。而TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和干扰素 (interferon, IFN) 等炎症相关因子可以促进ATX的表达及分泌^[12-13]。

ATX作为ENPP家族的一员, 具有溶血磷脂酶D活性, 参与LPA的生成。研究^[14]显示: 在类风湿性关节炎、哮喘和肺纤维化及其他与炎症相关的恶性肿瘤中, ATX/LPA信号通路被激活, 进而聚集炎症细胞, 产生细胞因子, 加重慢性炎症。但ATX/LPA是否参与COPD的炎症反应及具体机制尚不明确。研究^[15]显示: COPD患者使用ATX抑制剂GLPG1690治疗后, 可减少炎症细胞进入肺部。研究^[16]显示: 与健康对照组比较, COPD患者的LPA 14:0、16:0、16:1、18:0、18:1、18:2和20:4水平均升高。且本课题组前期研究^[17]显示: COPD患者血浆LPA水平升高, 参与COPD的发生发展。LPA具有诱导人支气管上皮细胞中IL-6等细胞因子的释放^[18], 促进巨噬细胞产生IL-1和活性氧等炎症介质, 加速巨噬细胞障碍以及炎症相关疾病进展^[19]。本研究结果显示: COPD患者血清ATX水平升高, 且病情越重ATX水平越高, 推测可能因为COPD患者体内存在炎症反应, 且病情越重炎症反应越强, 其炎症细胞和支气管上皮细胞等释放IL-6及TNF- α 等炎症介质, 而这些炎症介质促进ATX产生, 进而促进LPA生成, 增多LPA, 而LPA促进炎症介质释放, 进一步促进ATX产生。AECOPD组患者血清中ATX水平与CAT评分呈正相关关系, COPD稳定期组患者血清中ATX水平与CAT评分、WBC、FEV1%pred和FEV1/FVC具有相关关系, 且随着血清中ATX水平升高, CAT评分和WBC升高, 肺功能下降, 而CAT评分值越高, 疾病越严重, WBC增多常见于感染, 提示ATX可能参与COPD患者的慢性炎症反应, 且与COPD患者肺功能下降及疾病严重程度相关。

本文作者进一步对COPD患者肺组织中的ATX mRNA和蛋白表达水平进行研究, 结果显示: COPD患者肺组织中ATX mRNA和蛋白表达水平均明显高于对照组, 且免疫组织化学检测结果显示: 阳性细胞主要为细支气管上皮细胞和巨噬细胞等炎症细胞, 这与COPD患者血清中ATX水平明显高于对照组结果一致。研究^[20]显示: TNF- α 、LPS和IFN- γ 可诱导M1型巨噬细胞活化, 分泌

IL-1、IL-6和TNF- α 等促炎因子, 发挥促炎作用。提示细支气管上皮细胞和巨噬细胞等炎症细胞释放炎症介质, 一方面可促进M1型巨噬细胞活化, 释放更多炎症介质, 促进ATX产生; 另一方面, 直接促进ATX的产生, 增多LPA, 进而促进炎症介质释放, 促进炎症反应, 再次提示ATX与COPD存在关联, 且可能通过ATX/LPA信号通路发挥促炎作用。研究^[21]显示: 在特发性肺纤维化/普通间质性肺炎和非特异性间质性肺炎患者的肺组织中ATX蛋白表达水平较对照组更高, 且在特发性肺纤维化/普通间质性肺炎患者肺组织的肺泡上皮细胞和肺泡巨噬细胞中表达。ATX主要在病毒性肺炎患者肺组织的巨噬细胞和间质细胞中表达^[22], 这与本研究结果一致。COPD患者肺组织中ATX蛋白表达水平与FEV1%pred、FEV1/FVC和MAN均呈负相关关系, 与Bosken评分和MLI呈正相关关系, 其中Bosken评分可以反映气道炎症情况, MLI和MAN可以反映肺泡情况, 包括有无肺气肿及严重程度, 故本研究结果提示ATX可能影响COPD气道炎症反应, 且与COPD患者的肺功能降低和肺气肿等肺泡变化有关, 这与COPD患者血清中ATX水平相关性分析的结果一致。

本研究结果显示: CS组与CNS组、HS组和HNS组的ATX mRNA及蛋白表达水平比较差异无统计学意义, 提示吸烟对肺组织的ATX mRNA和蛋白表达的影响较小。吸烟是COPD的主要危险因素, 可诱导并加重气道炎症反应和氧化应激等, 且在戒烟后该慢性炎症仍持续存在^[23]。本研究结果显示: COPD患者肺组织的Bosken评分明显高于对照组, CS组患者Bosken评分明显高于CNS组, HS组患者Bosken评分明显高于HNS组, 各组患者的年龄、性别和BMI比较差异无统计学意义, 故推测吸烟能诱导炎症反应, 导致CS组患者Bosken评分高于CNS组, HS组患者Bosken评分高于HNS组。当炎症反应达到一定程度后引起气道结构重塑等改变, 发展成为COPD患者, 且ATX等因子参与COPD的炎症反应, 故COPD患者Bosken评分明显高于对照组。部分COPD患者存在肺气肿的病理改变, 导致COPD患者的MLI升高, MAN降低。CS组与CNS组、HS组与HNS组患者的MLI和MAN比较差异无统计学意义, 可能是因为肺大疱等肺泡结构变化与吸烟、空气污染、肺部感染和遗传等多种因素有关, 吸烟不

起决定性作用。

LPA与LPA3结合,释放CXC趋化因子受体2的配体和IL-6等炎症介质,进而介导白细胞招募,且TNF- α 可使LPA3 mRNA表达水平升高,炎症介质增多^[24]。在人支气管上皮细胞中,LPA可与LPA3结合进而诱导IL-8产生^[7]。二者结合还能促进白细胞与血管壁的黏附作用以及跨壁迁移,并刺激内皮细胞的增殖、迁移和新血管的形成^[25]。本研究结果显示:COPD患者肺组织中LPA3 mRNA和蛋白表达水平均高于对照组,且COPD患者肺组织的LPA3蛋白表达水平与ATX蛋白表达水平呈正相关关系。提示COPD患者肺组织中的炎症介质促进ATX和LPA3的产生,且ATX可能通过促进LPA生成,LPA与LPA3结合,进而发挥促进炎症反应的作用,导致出现气道结构重塑等改变。研究^[26]显示:在LPS处理的THP-1细胞中(THP-1细胞在LPS处理下可分化为巨噬细胞),ATX和LPA3 mRNA表达水平升高,且ATX、LPA和LPA3参与诱导炎症反应关键趋化因子配体8(C-C motif ligand 8, CCL8)的表达,参与炎症反应。这与本研究结果一致。CS组与CNS组、HS组与HNS组患者的LPA3 mRNA和蛋白表达水平比较,差异无统计学意义,提示吸烟对肺组织的LPA3 mRNA和蛋白表达水平的影响较小,与ATX结果一致,符合二者具有正相关关系。COPD患者肺组织中LPA3蛋白表达水平与MAN呈负相关关系,与Bosken评分和MLI呈正相关关系,提示LPA3可能参与COPD的炎症反应,且与COPD患者的肺气肿等肺泡变化有关。

综上所述,COPD患者血清中ATX水平升高,肺组织中ATX和LPA3蛋白表达水平升高,且ATX蛋白表达水平与LPA3蛋白表达水平存在正相关关系,均与COPD患者的炎症反应及肺气肿严重程度等有关,提示ATX和LPA3蛋白可能参与COPD患者的炎症反应,并与疾病严重程度相关。但其具体机制尚未明确,仍需进一步探索。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

蒋佩琴参与实验过程、实验数据分析和论文撰写,张政参与标本收集,黄钟和卢献灵参与论文整体设计、写作指导和审校。

[参考文献]

- [1] GUO P, LI R, PIAO T H, et al. Pathological mechanism and targeted drugs of COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2022, 17: 1565-1575.
- [2] ZHANG X T, LI M M, YIN N, et al. The expression regulation and biological function of autotaxin[J]. *Cells*, 2021, 10(4): 939.
- [3] KANO K, AOKI J, HLA T. Lysophospholipid mediators in health and disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 459-483.
- [4] ZHAO J, ZHAO Y T. Lysophospholipids in lung inflammatory diseases[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1303: 373-391.
- [5] SOLÍS K H, ROMERO-ÁVILA M T, GUZMÁN-SILVA A, et al. The LPA₃ receptor: regulation and activation of signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6704.
- [6] SAATIAN B, ZHAO Y T, HE D H, et al. Transcriptional regulation of lysophosphatidic acid-induced interleukin-8 expression and secretion by p38 MAPK and JNK in human bronchial epithelial cells[J]. *Biochem J*, 2006, 393(Pt 3): 657-668.
- [7] 范傲,黄钟,段宇清,等.慢性阻塞性肺疾病患者血浆中性粒细胞胞外诱捕网和白细胞介素-8及白细胞介素-33的表达水平及其临床意义[J].*中国呼吸与危重监护杂志*, 2022(2): 84-89.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组,中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021年修订版)[J].*中华结核和呼吸杂志*, 2021, 44(3): 170-205.
- [9] SHENG H Y, ZHANG Y J, SHI X Q, et al. Functional, ultrastructural, and transcriptomic changes in rat diaphragms with different durations of cigarette smoke exposure[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020, 15: 3135-3145.
- [10] ZHENG X R, ZHANG L Y, CHEN J, et al. Dendritic cells and Th17/Treg ratio play critical roles in pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2018, 108: 1141-1151.
- [11] 盛梅梅,罗专波.慢性阻塞性肺疾病发病机制的研究现状及进展[J].*现代医学与健康研究(电子版)*, 2023, 7(1): 38-41.
- [12] 张地,张俊杰. Autotaxin表达调控机制及其生物学功能[J].*中国科学:生命科学*, 2022, 52(8): 1148-1162.
- [13] BRINDLEY D N, TANG X Y, MENG G M, et al. Role of adipose tissue-derived autotaxin,

- lysophosphatidate signaling, and inflammation in the progression and treatment of breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5938.
- [14] BENESCH M G K, MACINTYRE I T K, MCMULLEN T P W, et al. Coming of age for autotaxin and lysophosphatidate signaling: clinical applications for preventing, detecting and targeting tumor-promoting inflammation [J]. *Cancers*, 2018, 10(3): 73.
- [15] BLANQUE R, DESROY N, DUPONT S, et al. Pharmacological profile and efficacy of GLPG1690, a novel ATX inhibitor for COPD treatment [C]//5.1 Airway Pharmacology and Treatment. European Respiratory Society, 2015: PA2129.
- [16] LI Q L, WONG W, CHAKRABARTI A, et al. Serum lysophosphatidic acid measurement by liquid chromatography-mass spectrometry in COPD patients [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, 32(8): 1987-1997.
- [17] 洪静雪, 黄 钟, 张 妤, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血浆溶血磷脂酸和可溶性ST2的表达水平及其临床意义 [J]. *西部医学*, 2024, 36(1): 57-62.
- [18] ZHAO Y T, NATARAJAN V. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors: role in airway inflammation and remodeling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(1): 86-92.
- [19] JIANG S F, YANG H L, LI M Q. Emerging roles of lysophosphatidic acid in macrophages and inflammatory diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12524.
- [20] 王 蕾, 王桐生, 王雅娟, 等. 巨噬细胞在慢性阻塞性肺疾病发展及治疗中的研究进展 [J]. *临床肺科杂志*, 2024, 29(2): 293-297.
- [21] OIKONOMOU N, MOURATIS M A, TZOUVELEKIS A, et al. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(5): 566-574.
- [22] NIKITOPOULOU I, FANIDIS D, NTATSOUKIS K, et al. Increased autotaxin levels in severe COVID-19, correlating with IL-6 levels, endothelial dysfunction biomarkers, and impaired functions of dendritic cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 10006.
- [23] HIKICHI M, MIZUMURA K, MARUOKA S, et al. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(Suppl 17): S2129-S2140.
- [24] ZHAO C Q, SARDELLA A, CHUN J, et al. TNF-alpha promotes LPA1- and LPA3-mediated recruitment of leukocytes *in vivo* through CXCR2 ligand chemokines [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(7): 1307-1318.
- [25] ZHAO Y, HASSE S, ZHAO C Q, et al. Targeting the autotaxin-Lysophosphatidic acid receptor axis in cardiovascular diseases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 74-81.
- [26] LI S, XIONG C Y, ZHANG J J. ATX and LPA receptor 3 are coordinately up-regulated in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells through PKR and SPK1-mediated pathways [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(6): 792-797.