

矽肺病患者痰液的诱导方法

周效宝¹, 王瑞^{1*}, 孔令敏², 崔萍¹, 高衍新¹, 王坤¹

摘要: [目的] 通过优化痰液诱导和处理条件, 探讨适宜的痰液诱导和处理方法。[方法] 以不同浓度的高渗盐溶液、不同诱导时间对 40 例 I 期矽肺患者进行雾化痰液诱导; 用不同稀释倍数的 0.1% 二硫苏糖醇 (DTT) 及不同的水浴时间对痰液进行处理。[结果] 3%、4%、5% 浓度高渗盐水诱导成功率分别为 80.00%、82.50%、60.00%; 而 6% 浓度仅为 22.50%, 明显低于 3%、4%、5% 溶液 ($P < 0.01$); 4%、5% 之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3%、4% 之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3% 浓度高渗盐水诱导时间 25、30 min 的成功率分别为 77.50%、92.50%。痰液 37℃ 水浴 30、40、50 min 溶解状况明显优于 20 min, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 30 min、40 min、50 min 水浴差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 倍 DTT 与 2 倍体积 DTT 稀化对痰液溶解状况及痰液中 IL-6 和 TNF- α 水平均无明显影响 ($P > 0.05$)。[结论] 以 3%、4% 的高渗盐水雾化吸入 20、30 min 痰液诱导满意率较高且得到的痰液质量较佳, 经过水浴 30~40 min, 加入 2 倍或 4 倍 0.1% DTT 处理的稀化程度较好。

关键词: 痰液诱导; 痰液处理; 矽肺; 二硫苏糖醇

Study on Optimizing the Sputum Induction Processes in Patient with Silicosis ZHOU Xiao-Bao¹, WANG Rui^{1*}, KONG Ling-Min², CUI Ping¹, GAO Yan-Xin¹, WANG Kun¹ (1. Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Ji'nan, Shandong 250062, China; 2 The Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan, Shandong 250062, China). *Address correspondence to WANG Rui; E-mail: ykywangrui@yahoo.com.cn

Abstract: [Objective] To optimizing the solution concentration and procedures of pre-treatment in sputum analyses among patient with respiratory disease. [Methods] Results of sputum induction with various solution and treatment in 40 patients with silicosis were compared. [Results] Success result of sputum induction was obtained in rates of 80.00%, 82.50%, 60.00%, and 22.50% from inhalation of mist of 3%, 4%, 5%, and 6% hypertonic saline solution respectively. The differences between 4% and 5% to all others were statistically significant ($P < 0.05$). Rate of successful result for 25 to 30 min. induction were 77.50% and 92.50%, respectively. Better result in dissolution and no influence level in detecting IL-6 and TNF- α were obtained from 30-50 min 37℃ water bath than less than 20 min. in 2-4 fold dilution of 0.1% DTT ($P > 0.05$). [Conclusion] The optimized condition for sputum induction was find of spraying mist of 3%-4% hypertonic saline for 20-30 min. Better consequent pre-treatment was 37℃ water bath incubation in 2-4 folds dilution with 0.1% DTT solution for 30-40 min.

Key Words: sputum induction; pretreatment for the induced sputum; silicosis; dithiotheoritol (DTT)

痰液诱导 (sputum induction, SI) 是以高渗盐水雾化吸入诱导无痰或少痰的受检者产生足够的痰液, 以对呼吸道分泌物中的细胞及其它液相成分进行分析的一种检测方法。早在 1958 年 BICKERMAN 等^[1]就发明了痰液诱导技术, 并将此技术应用于肺癌诊断, 随后又被应用于肺部炎症的诊断。1992 年 PIN 等^[2]对此方法进行了改良并应用于哮喘病的研究, 随后在慢性阻塞性肺疾病、职业性肺病和其他疾病的诊断及鉴别诊断上的应用

也得到了认可。近年来, 痰液诱导技术的应用范围逐步扩大。但是, 目前痰液诱导及其处理过程尚无统一的标准方法, 痰液诱导和处理步骤的差异会对分析结果造成影响, 本研究拟通过痰液诱导盐水浓度、诱导时间、水浴保温时间及不同体积黏液溶解剂等处理条件的优化, 探讨最佳的痰液诱导和处理方法。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2009 年 1 月至 2009 年 3 月间山东省职业病医院和山东中医药大学第二附属医院的 I 期矽肺住院病人 40 例为研究对象 (经知情同意后, 每人都接受不同浓度盐溶液痰液诱导实验, 两次诱导间隔时间至少为 2 d), 均为男性, 年龄 47~68 岁, 平均年龄 53 岁; 除患有矽肺外无其他呼吸系统及肝、肾疾病史。

1.2 痰液诱导方法

不同浓度高渗盐溶液诱导: 先后分别将不同浓度 (3%、

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30872094); 山东省科技攻关项目 (编号: 2008GG30002036)

[作者简介] 周效宝 (1983-), 男, 硕士生; 研究方向: 职业卫生学; E-mail: wfzhouxiaobao@163.com

[*通信作者] 王瑞研究员; E-mail: ykywangrui@yahoo.com.cn

[作者单位] 1. 山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062; 2. 山东中医药大学第二附属医院, 山东 济南 250062

4%、5%、6%)的高渗盐溶液装入超声雾化器,打开调节喷雾量,40例受试者用口深吸气使喷雾尽可能被吸入肺深部;受试者无严重呼吸困难、憋气,诱导结束能收集到2 mL以上痰液者为诱导成功,否则诱导失败。

同一浓度高渗盐溶液不同时间诱导:取某浓度高渗盐溶液对40例受试者逐一诱导,雾化量1 mL/min,诱导5 min后鼓励受试者咳嗽,若所得痰液合格即终止诱导;若受试者无痰或痰液质量不符合既定标准,应继续诱导5 min后,再次鼓励其咳嗽。重复上述操作,诱导时间上限定为30 min,每次咳嗽前均应漱口。合格痰要求同时具备以下条件:无色透明或略呈灰白色团状,无泡沫或少量泡沫;收集量大于2 mL,有痰栓;鳞状上皮细胞比例<20%。

1.3 痰液处理方法的优化

将1 mL或0.5 mL无唾液成份的痰液放入软管中,加入2倍或4倍体积0.1%的二巯苏糖醇(dithiotheoritol, DTT)用以溶解痰液中的黏液,置37℃水浴锅中分别保温不同时间(20、30、40、50 min),肉眼观察溶解情况,混合液均匀、透明、无明显团状粘稠成分者即为完全溶解,反之为不完全溶解;加入同体积的磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)振荡5 min后过滤,滤液以1 100 r/min(离心半径为200 mm),离心10 min后取上清液,-80℃冷存,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定其中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平。

1.4 数据统计方法

采用SPSS 11.5数据统计软件对资料进行统计处理。各组研究对象资料符合正态分布的用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,配对资料组间比较采用配对 t 检验;各组间率的比较采用卡方检验及Fisher确切检验法($\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 不同高渗盐水溶液浓度诱导效果

40名受试者6%浓度高渗盐溶液仅诱导成功9例,成功率仅22.5%,而3%、4%浓度高渗盐溶液诱导成功例数分别为32例和33例,成功率分别为80.00%和82.50%,5%浓度高渗盐溶液成功率为60.00%,见表1。经两两配对卡方检验,3%、4%两种浓度高渗盐溶液的诱导成功率差异无统计学意义($\chi^2=0.082$, $P>0.05$);5%高渗盐溶液诱导成功率较4%的低,差异有统计学意义($\chi^2=4.943$, $P<0.05$),但与3%相比,无统计学意义($\chi^2=3.809$, $P>0.05$);6%高渗盐溶液诱导成功率与3%、4%、5%浓度相比均明显减少(χ^2 值分别为26.467、28.872和11.605),差异有统计学意义(P 均 <0.01)。

表1 四种不同浓度高渗盐溶液诱导成功率($n=40$)

Table 1 Success rates among 4 different concentration saline solution

高渗盐溶液浓度(%) Concentration of saline	成功例数 Success case	成功率(%) Rate of success
3	32	80.00
4	33	82.50
5	24	60.00
6	9	22.50

2.2 不同诱导时间对痰液诱导成功率的影响

为研究不同诱导时间对痰液诱导成功率的影响,本实验用3%的高渗盐溶液对40名受试者逐一诱导,雾化量为1 mL/min。结果显示,40例受试者诱导成功37例,成功率达92.50%,85.00%的受试者在吸入高渗盐水20至30 min内诱导成功;经痰液性状观察及涂片细胞分析,37例所得合格痰液28份,合格率为75.68%,且全部合格痰液均在吸入3%浓度高渗盐溶液20至30 min内得到,见表2。

表2 不同时间痰液诱导成功率与合格率比较($n=40$)

Table 2 Comparison of success rate with satisfactory rate in groups with different induction time

诱导时间(min) Induction time	成功(Success)		合格(Satisfactory)	
	例数(n) Case	率(%) Rate	例数(n) Case	率(%) Rate
5	0	0.00	0	0.00
10	1	2.50	0	0.00
15	2	5.00	0	0.00
20	11	27.50	8	72.73
25	17	42.50	15	88.23
30	6	15.00	5	83.33
合计(Total)	37	92.50	28	75.68

2.3 不同水浴时间痰液溶解程度

将“2.2”中诱导合格痰液28份,随机分为4组,每组7份,从每份中取1 mL痰样加4 mL 0.1% DTT 37℃水浴不同时间,水浴保温后轻轻震荡,其溶解情况见表3。结果显示水浴保温时间长,痰液溶解状况好,30、40、50 min组水浴组痰液完全溶解率明显高于20 min组,差异有统计学意义($P<0.05$);30 min与40、50 min水浴时间的结果两两比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),40、50 min水浴时间组痰液全部溶解。

表3 不同水浴时间痰液溶解情况($n=7$)

Table 3 The dissolution of sputum in different incubation groups

水浴时间(min) Incubation time	完全溶解份数 Dissolved case	溶解率(%) Rate of dissolve
20	2	28.57
30	6	85.71 ^a
40	7	100.00 ^a
50	7	100.00 ^a

[注] 四组采用Fisher确切概率检验,^a:表示与20 min组比较, $P<0.05$ (^a: Compare with group received 20 min treatment $P<0.05$ in Fisher's exact probability test)。

2.4 不同体积DTT对痰液溶解度及IL-6、TNF- α 水平的影响

“2.2”中诱导合格痰28份,每份分为2份,分别加入2倍和4倍体积0.1% DTT,37℃水浴保温40 min后轻轻震荡,其溶解率分别为96.43%和100%,经卡方检验差异无统计学意义($P>0.05$)。

每份痰样加入与DTT等体积的PBS缓冲液,离心后取上清液,测定痰中IL-6和TNF- α 含量,结果见表4。结果显示两种体积DTT对痰液IL-6和TNF- α 水平无明显影响,差异无统计学意义(t 值分别为0.423和0.523, P 值均 >0.05)。

表 4 两组痰液中 IL-6 和 TNF-α 浓度水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=28$)
Table 4 Comparison of the level of TNF-α and IL-6 in sputum sample dissolved with different concentration of dithiotheoritol

组别 Group	TNF-α(nmol/L)	IL-6(nmol/L)
2 倍体积 0.1% DTT 组 Incubate with 2 fold DTT	10.12 ± 3.56	115.31 ± 30.80
4 倍体积 0.1% DTT 组 Incubate with 4 fold DTT	9.67 ± 2.84	117.00 ± 10.50

3 讨论

高渗性盐溶液是一种支气管收缩刺激物，它通过激活肥大细胞和释放感觉神经肽而起作用。文献报道^[3]，浓度 > 10% 的高渗盐溶液可引起一些患者的支气管痉挛，RODWELL 等^[4]研究表明雾化吸入 10% 的高渗盐溶液可使受试者第一秒时间肺活量 (FEV₁) 明显降低。目前所应用的高渗性盐溶液的浓度主要有 3%、4%、5%、6%，决定浓度的关键是研究对象的病变程度及性质，以往报道大多用于哮喘患者，而本研究将痰液诱导技术应用于矽肺患者。本次研究结果显示：3%、4% 高渗盐溶液痰液诱导效果较好，而 5% 和 6% 浓度高渗盐溶液诱导成功率较低，诱导过程中病人出现咽痛、咽干、恶心、头痛、头晕等不适反应的发生率可达 70%，这是导致诱导失败的主要原因，可能与高渗盐水对咽喉部的刺激作用有关。考虑到矽肺患者年龄、体质等方面原因，本研究结果显示更宜采用雾化吸入 3% 浓度高渗溶液进行痰液诱导。

目前，痰液诱导的持续时间还未有统一标准，但痰液诱导持续的时间对痰液质量有影响是公认的。有报道^[5]，高渗性盐溶液吸入的持续时间可以改变诱导痰中的各类细胞所占的比例，经短时间诱导的痰中中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的比例较高，而经长时间诱导的痰中肺泡巨噬细胞和淋巴细胞较多且与支气管肺泡灌洗产生的灌洗液质量相似。本研究中，在探讨不同浓度诱导效果过程中发现患者除恶心外，其他不适反应多在雾化量大和诱导时间长时出现，提示雾化量和诱导时间是影响诱导效果的主要因素，这点和 KELLY 等^[6]报道一致。本实验结果显示：3% 高渗盐溶液痰液诱导持续时间为 20、25、30 min 时的成功率较高且得到的痰液质量较好。

诱导痰液处理是痰液诱导分析技术的重要部分，痰液稀释和水浴保温是处理过程中最重要的环节。DTT 是最重要的黏液溶解剂，已有研究证实，DTT 具有很高的氧化还原活性，基本不影响标本中的细胞形态和微生物群^[7]，并且能够显著提高总细胞计数和细胞涂片的质量^[8-9]。但是应用 DTT 进行痰的均质化，可能会影响某些可溶性物质的测定结果。有研究发现，DTT 可以改变诱导痰中某些炎症因子的浓度，如髓过氧化物酶、嗜酸性粒细胞过氧化物酶等^[8, 10]，但目前尚无有效的替代溶解剂，多数报道仍采用不同体积 (如 2、4 mL) 的 DTT。不过本研究结果显示，4 倍体积与 2 倍体积 DTT 对痰液溶解率无明显影响 ($P > 0.05$)，4 倍体积溶解率为 100%；4 倍 DTT 较 2 倍稀释对痰液中 IL-6 和 TNF-α 水平也无明显影响。WOOLHOUSE 等^[11]研究也表明 DTT 不影响慢性支气管炎患者诱导痰 IL-8 的测定，本研究结果与之类似。

水浴保温时间是影响痰液处理效果的另一重要因素，37℃ 水浴利于痰液的溶解，时间过长容易造成待测物质的分解，而时间过短痰液得不到有效处理，难以满足实验的要求。本研究结果表明，30、40、50 min 水浴溶解状况明显优于 20 min，40、50 min 水浴组痰液溶解率均为 100.00%，30 min 组溶解率与 40、50 min 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究表明 30、40 min 水浴时间比较合理，能够达到实验的要求，至于 ≥ 50 min 水浴时间最终会不会影响痰液中待测物质的测定，尚待进一步研究。

目前通过对气道炎症疾病的大量研究显示，与传统的支气管黏膜活检和支气管肺泡灌洗比较，痰液分析具有简便、安全、可靠、无创伤、实用、重复性好和患者易于接受等优点。检测痰液中的细胞及生化成分，并分析其与不同性质的气道炎症和同一炎症的不同发展阶段的关系，对于这些疾病的发生机制、诊断和鉴别诊断及病情的监测，都具有相当的实用价值。本研究通过痰液诱导盐水浓度、诱导时间、水浴保温时间及不同体积黏液溶解剂等处理条件的优化，认为以 3%、4% 的高渗盐水雾化吸入 20、30 min 痰液诱导成功率较高，且得到的痰液质量较好，经过水浴 30~40 min，加入 2 倍、4 倍 0.1% DTT 处理的稀化程度较好，上述参数可为今后的痰液诱导和处理建立适用的参数标准及进行痰液诱导和处理提供借鉴。

参考文献:

[1] BICKERMAN HA, SPROUL EE, BARACH AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer[J]. Dis Chest, 1958, 33(4): 347-362.

[2] PIN I, GIBSON PG, KOLENDOWICZ R, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma[J]. Thorax, 1992, 47(1): 25-29.

[3] AITKEN ML, GREENE KE, TONELLI MR, et al. Analysis of sequential aliquots of hypertonic saline solution-induced sputum from clinically stable patients with cystic fibrosis[J]. Chest, 2003, 123(3): 792-799.

[4] RODWELL LT, ANDERSON SD. Airway responsiveness to hyperosmolar saline challenge in cystic fibrosis: a pilot study[J]. Pediatr Pulmonol, 1996, 21(5): 282-289.

[5] FAHY JV, WONG H, LIU J, et al. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(1): 53-58.

[6] KELLY MG, BROWN V, MARTIN SL, et al. Comparison of sputum induction using high-output and low-output ultrasonic nebulizers in normal subjects and patients with COPD[J]. Chest, 2002, 122(3): 955-959.

[7] CHELAND WW. Dithiotheoritol, a new protective reagent for SH groups[J]. Biochemistry, 1964, 3: 480-482.

[8] EFTHIMIADIS A, PIZZICHINI MM, PIZZICHINI E, et al. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammatory: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline[J]. Eur Respir J, 1997, 10(6): 1336-1340.

- [9] LOUIS R, SHUTE J, GOLDRING K, et al. The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum[J]. Eur Respir J, 1999, 13(3): 660-667.
- [10] GREBSKI E, PETERSON C, MEDICI T C. Effect of physical and chemical methods of homogenization on inflammatory mediators in sputum of asthma patients[J]. Chest, 2001, 119(5): 1521-1525.

- [11] WOOLHOUSE IS, BAYLEY DL, STOCKLEY RA. Effect of sputum processing with dithiothreitol on the detection of inflammatory mediators in chronic bronchitis and bronchiectasis[J]. Thorax, 2002, 57(8): 667-671.

(收稿日期: 2009-10-16)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 郭薇薇; 校对: 洪琪)

(上接第 448 页)

3 疾病预防控制机构在手外伤预防控制中的作用

疾病预防控制机构是实施政府卫生防病职能的公共卫生核心专业机构,在手外伤的防控中,主要负责制定手外伤的预防控制计划,组织实施预防控制工作;主要包括手外伤的监测、危险因素的确 定、整体控制方案的确定以及干预活动的组织实施及评估等工作。

开展手外伤监测的目的是分析手外伤发生的严重性、危害性、趋势、社会代价及防治成效。主要包括手外伤的发生、转轨、危险因素、高危人群等方面的监测,监测方法包括医院、社区、环境、特定人群及危险因素监测等。

通过监测可以确定不同类型、地区、人群手外伤的危险因素各不相同,能够帮助专业人员客观分析各种危害因素与手外伤发生的关联性,确定危险因素、暴露水平与手外伤发生的相关性,为区域手外伤防控方案的制定提供相关信息。

控制方案的制定是对某一地区伤害总体防治工作、一个地区某一特定人群或某一类型伤害控制的规划。针对手外伤的预防控制,疾病预防控制机构应提出在近期和(或)中期的防治工作目的、内容、方法与评价指标、经费预算和时间进度。控制方案应包括三级预防的具体措施,并注意措施的内涵明确和可操作性与可重复性。

最后在组织实施控制方案后,疾控机构应做好干预措施评估工作,评估指标应具体、量化、客观;应有对照人群或社区,注意其可比性,综合评价时要突出主要措施及其作用,单项措施评价要严格摒除其他非观察因素所带来的影响和偏倚;评价还应分即时和中长期效果,时间系列研究可有利于说明这个问题,社会代价和成本-效益分析常常可以收到相得益彰的结论。

手外伤的预防控制工作是一项社会系统工程,涉及卫生、安检、公安、交通、法律、教育、工程设计、宣传、社保等政府部门,一个部门不可能解决日益严重的伤害问题,各部门应各司其职,齐抓共管,协调管理,全社会共同参与,提高每个人自我防护意识和技能,采取综合控制干预措施,才能有效地预防和控制手外伤的发生。

参考文献:

- [1] 彭峰,陈琳,赵根明,等.手外伤所致经济损失的流行病学研究

[J].上海医学,2000,23(7): 404-407.

- [2] 王声涌.伤害流行病学[M].北京:人民卫生出版社,2003: 56.
- [3] 侯明钟.必须重视手外伤的流行病学调查研究[J].实用手外科杂志,2004,18(4): 195-197.
- [4] 彭峰,赵根明,顾玉东,等.医院急诊手外伤病例的描述性流行病学调查报告[J].中华手外科杂志,2000,16(2): 86-88.
- [5] HUNG L K, CHOI K Y, YIP K, et al. Recent changes in the pattern of hand injuries in Hong Kong: a regional hospital survey[J]. Hong Kong Med J, 1997, 3(2): 141-148.
- [6] 吴淑芬,温武金,林超,等.手外伤流行病学特征的回顾性研究[J].汕头大学医学院学报,2003,16(3): 180-182.
- [7] 秦允,刘小林,程钢,等.手外伤病因、发病学特点与社会学后果的前瞻性研究[J].中华手外科杂志,2000,16(2): 90-93.
- [8] KUJALA U M, TAIMELA S, ANTTI-POKIA I. Acute injuries in soccer, ice hockey, volleyball, basketball, judo, and karate: analysis of national registry data[J]. Br Med J, 1995, 311(7018): 1465-1468.
- [9] DIAS JJ, GARCIA-ELIAS M. Hand injury costs[J]. Injury, 2006, 37(11): 1071-1077.
- [10] 林洁.急性职业性手外伤的流行病学研究进展[J].中华劳动卫生职业病杂志,2005,23(6): 476-477.
- [11] CHOW C Y, LEE H, LAU J, et al. Transient risk factors for acute traumatic hand injuries: a case-crossover study in Hong Kong[J]. Occup Environ Med, 2007, 64(1): 47-52.
- [12] 潘榕,黎明强,秦景新,等.柳州市工作环境手外伤的干预措施探讨[J].职业与健康,2008,24(19): 1996-1998.
- [13] SOROCK G S, LOMBARDI D A, HAUSER R, et al. A case-crossover study of transient risk factors for occupational acute hand injury[J]. Occup Environ Med, 2004, 61(4): 305-311.
- [14] 李志义,郭祖鹏,黄红儿,等.我国伤害预防与控制的现状[J].中国慢性病预防与控制,2007,15(2): 181-182.
- [15] 刘琼蓉.健康教育在手外伤患者中的应用[J].当代护士,2006(4): 107-108.

(收稿日期: 2010-04-16)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)