

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217( 2016) 05-0453-04

## 早期梅毒患者治疗前后血清 IL-27 和 IL-33 水平检测

章鹏飞<sup>1 2</sup> 季必华<sup>2</sup>

( 1.芜湖市第一人民医院 皮肤科,安徽 芜湖 241000; 2.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 皮肤科,安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 检测早期梅毒患者的血清 IL-27 及 IL-33 水平,观察梅毒患者在治疗前是否已存在 IL-27、IL-33 水平的变化及此变化是否影响其预后。方法: 选取早期梅毒患者的血清样本,根据治疗后的随访情况分为梅毒血清转阴组和非转阴组,采用双抗体夹心 ELISA 法分别检测两组治疗前后及正常对照组的 IL-27 和 IL-33 水平。结果: ①IL-27 水平在梅毒血清转阴组治疗前高于非转阴组治疗前( 27.31±6.19) ng/L vs.( 20.98±5.10) ng/L  $P<0.05$ ; IL-27 水平在非转阴组治疗后高于治疗前( 25.34±6.66) ng/L vs.( 20.98±5.10) ng/L  $P<0.05$ 。②IL-33 水平在梅毒血清转阴组治疗后低于治疗前( 4.41±1.33) ng/L vs.( 3.26±1.41) ng/L  $P<0.05$ 。结论: IL-27 可能有利于机体对梅毒螺旋体( *treponema pallidum*,TP) 的清除,而 IL-33 可能不利于机体对 TP 的清除。

**【关键词】**梅毒; IL-27; IL-33

**【中图分类号】**R 759.1 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.05.014

## Measurement of serum levels of IL-27 and IL-33 in early syphilis patients before and after therapy

ZHANG Pengfei, JI Bihua

Department of Dermatology, Wuhu No.1 People's Hospital, Wuhu 241000, China

**【Abstract】Objective:** To measure the serum levels of IL-27 and IL-33 in patients with early syphilis infection before and after treatment for estimating the association of level changes in the two proteins with prognosis.**Methods:** Serum samples were obtained in patients with early syphilis infection. Then the patients were allocated to group of serological conversion( negative) or persistence( remaining positive) based on the follow-up serology measurement. Double-antibody sandwich ELISA was performed to detect the serum levels of IL-27 and IL-33 in the two groups of patients.**Results:** ① Serological conversion group had higher serum IL-27 level than the persistence group before treatment ( 27.31±6.19) ng/L vs.( 20.98±5.10) ng/L  $P<0.05$ , and the level of IL-27 was increased in the persistence group after therapy ( 25.34±6.66) ng/L vs.( 20.98±5.10) ng/L  $P<0.05$ ; ② Serum IL-33 level was significantly decreased in serological conversion group after treatment compared to pre-treatment ( 4.41±1.33) ng/L vs.( 3.26±1.41) ng/L  $P<0.05$ .**Conclusion:** IL-27 may facilitate clearance of *Treponema pallidum*, yet IL-33 can not.

**【Key words】**syphilis; IL-27; IL-33

既往研究发现梅毒患者体内存在细胞免疫失衡, Fitzgerald 等<sup>[1]</sup>提出在梅毒病程发展中,存在 Th1 向 Th2 漂移的假说,认为 Th1/Th2 免疫失衡,可能是梅毒螺旋体能够逃避免疫监视得以继续增殖、梅毒进入潜伏阶段的原因。

IL-27 与 IL-33 分别作为 Th1 和 Th2 的调节因子<sup>[2-3]</sup>,已经被发现参与较多感染性疾病的免疫反应。在梅毒患者体内,二者是否也存在异常? 本研

究旨在探讨 IL-27、IL-33 分别作为 Th1、Th2 细胞的活化因子而在早期梅毒患者(病程小于 2 年<sup>[4]</sup>)清除体内梅毒螺旋体的免疫应答中的作用。

### 1 资料与方法

1.1 临床资料 病例来源于 2012 年 6 月~2013 年 8 月在弋矶山医院皮肤性病科门诊就诊者,选取符合诊断及入选标准的初诊未治疗早期梅毒患者共

收稿日期: 2015-12-15

作者简介: 章鹏飞(1987-)男,住院医师,硕士(电话)13956204533(电子信箱)cleanspy@163.com;

季必华,男,主任医师,硕士生导师(电子信箱)jibihua@aliyun.com,通信作者。

124 例 ,以血清快速血浆反应素环状卡片试验( rapid plasma reagent circle card test ,RPR) 检测其滴度 ,并预留作为 IL-27、IL-33 检测的治疗前血清样本。患者经苄星青霉素 G 驱梅治疗结束后的第 6 个月 ,在入组的 124 例中共收集到 RPR 转阴者 22 例 ,RPR 未下降 4 倍滴度者 19 例 ,从中分别选取 18 例 ,作为转阴组及非转阴组 ,并再次留取其血清作为 IL-27、IL-33 治疗后的检测样本。所有患者否认既往有驱梅治疗史 ,排除合并 HIV 感染、自身免疫性疾病及近 3 个月内使用糖皮质激素或免疫抑制剂者。同时选取健康志愿者 18 例为正常对照组 ,所有研究对象均签署知情同意书。具体分组如下: ①梅毒血清转阴组共 18 例( 男 9 例 ,女 9 例) ,年龄 20~49 岁 ,平均( 35.97±5.18) 岁 ,正规驱梅治疗 6 个月后复查血清 RPR 试验转阴者; ②梅毒血清非转阴组共 18 例( 男 8 例 ,女 10 例) ,年龄 22~53 岁 ,平均( 38.24±5.74) 岁 ,正规驱梅治疗 6 个月后 ,复查血清 RPR 试验未下降 4 倍滴度者; ③正常对照组共 18 例( 男 9 例 ,女 9 例) ,年龄 20~50 岁 ,平均( 36.41±7.36) 岁。3 组间性别(  $\chi^2=0.148$  , $P=0.929$ ) 和年龄(  $F=0.362$  , $P=0.798$ ) ,差异无统计学意义。

1.2 方法 所有入选的早期梅毒患者治疗前、治疗后及正常对照组人群均抽取外周静脉血 5 mL ,于室温下静置 10~20 min 后放入离心机分离血清( 2500

~3000 r/min ,离心 15 min) ,取其中部分血清立即做 RPR 和 TPPA 试验 ,同时进行 HIV 抗体的检测。另取 1 mL 血清于冻存管分装 ,并标注编号、姓名、采集日期等放置于-70℃ 冰箱冻存待测。用双抗体夹心 ELISA 法集中检测血清 IL-27 及 IL-33 水平 ,试剂盒均购自上海源叶生物技术有限公司 ,操作按试剂盒说明书的步骤进行。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 18.0 统计软件 ,数值变量资料采用均数±标准差(  $\bar{x}\pm s$ ) 表示 ,多组数据比较采用方差分析 ,多个样本均数的两两比较采用  $q$  检验; 治疗前后比较采用配对  $t$  检验。多个率的比较采用卡方检验。

## 2 结果

2.1 各组 IL-27 表达量 治疗前 ,梅毒血清转阴组、梅毒非转阴组的血清 IL-27 水平均高于正常对照组(  $F=47.79$  , $P<0.05$ ) ,且梅毒血清转阴组高于非转阴组(  $P<0.05$ ) 。治疗后 ,梅毒血清转阴组、梅毒非转阴组的血清 IL-27 水平仍高于正常对照组(  $F=37.42$  , $P<0.05$ ) ,但梅毒血清转阴组与非转阴组差异无统计学意义(  $P>0.05$ ) 。IL-27 水平在梅毒血清转阴组治疗前后差异无统计学意义(  $P>0.05$ ) ;在非转阴组治疗前后差异有统计学意义(  $P<0.05$ ) 。见表 1。

表 1 早期梅毒患者及正常对照者外周血 IL-27 表达水平(  $\bar{x}\pm s$  ,ng/L)

| 组别   | n  | 治疗前        | 治疗后        | $\bar{d}\pm s_d$ | 配对 $t$ 值 | P 值   |
|------|----|------------|------------|------------------|----------|-------|
| 转阴组  | 18 | 27.31±6.19 | 28.82±8.13 | 1.52±8.36        | 0.771    | >0.05 |
| 非转阴组 | 18 | 20.98±5.10 | 25.34±6.66 | 4.36±8.45        | 2.189    | <0.05 |

注: 正常对照组 IL-27=( 12.14±1.13) ng/L , $F=47.79$  , $P<0.05$ 。

2.2 各组 IL-33 表达量 治疗前 ,梅毒血清转阴组、梅毒非转阴组的血清 IL-33 水平均高于正常对照组(  $F=46.66$  , $P<0.05$ ) ,但梅毒血清转阴组与非转阴组差异无统计学意义(  $P>0.05$ ) 。治疗后 ,梅毒血清转阴组、梅毒非转阴组的血清 IL-33 水平仍高于正常

对照组(  $F=21.57$  , $P<0.05$ ) ,但梅毒血清转阴组与非转阴组差异无统计学意义(  $P>0.05$ ) 。IL-33 水平在梅毒血清转阴组治疗前后差异有统计学意义(  $P<0.05$ ) ;在非转阴组治疗前后差异无统计学意义(  $P>0.05$ ) 。见表 2。

表 2 早期梅毒患者及正常对照者外周血 IL-33 表达水平(  $\bar{x}\pm s$  ,ng/L)

| 组别   | n  | 治疗前       | 治疗后       | $\bar{d}\pm s_d$ | 配对 $t$ 值 | P 值   |
|------|----|-----------|-----------|------------------|----------|-------|
| 转阴组  | 18 | 4.41±1.33 | 3.26±1.41 | 1.15±1.06        | 4.603    | <0.05 |
| 非转阴组 | 18 | 4.37±1.29 | 3.97±1.56 | 0.40±1.97        | 0.861    | >0.05 |

注: 正常对照组 IL-33=( 1.38±0.25) ng/L , $F=46.66$  , $P<0.05$ 。

## 3 讨论

IL-27 是 2002 年发现并命名的 IL-12 家族细胞

因子<sup>[5]</sup>。IL-27 主要由巨噬细胞和树突状细胞产生 ,是一种由 EB13 和 p28 组成的异二聚体 ,EB13 与 IL-

IL-12 的 p40 亚基同源 ,p28 则与 IL-12 的 p35 亚基相关<sup>[6]</sup>。IL-27 可诱导巨噬细胞产生 IL-12 ,促进 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖 ,也能够激活 STAT1 途径 ,诱导 T-bet 活化 ,从而诱导初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th1 分化 ,并促进 IFN- $\gamma$  的产生<sup>[7-9]</sup>。由此可见 ,IL-27 属于 Th1 系列细胞因子之一。

本实验中转阴组 IL-27 水平在治疗前明显高于非转阴组治疗前 ,说明转阴组的患者在治疗前 ,其血清 IL-27 即已处于高水平状态 ,提示对于早期梅毒患者 ,高水平的 IL-27 驱动的 Th1 反应可能有利于对 TP 的清除。

作为 Th1 细胞的代表性因子 ,IL-2、IFN- $\gamma$  与梅毒的关系已多有报道。有学者检测梅毒患者外周血 IL-2 水平 ,发现血清 IL-2 水平在早期梅毒患者治疗后 RPR 转阴组最高 ,未治疗组次之 ,而治疗后 RPR 非转阴组最低 ,表明 IL-2 水平与 RPR 的转阴具有正相关性 ,提示 IL-2 有利于机体对 TP 的清除<sup>[10]</sup>。师金川等<sup>[11]</sup>采用 ELISA 分别检测梅毒患者血清复发组、RPR 转阴组和正常人群血清 IFN- $\gamma$  的含量 ,发现血清复发组 IFN- $\gamma$  水平明显低于正常对照组及 RPR 转阴组 ,提示若 IFN- $\gamma$  参与的 Th1 反应减弱 ,则不利于 TP 的清除。以上均提示 Th1 型反应有利于梅毒螺旋体的清除;而 IL-27 对 Th1 型细胞因子的促进作用 ,可能是其有利于清除 TP 的原因。

但本实验中 ,非转阴组的 IL-27 水平在治疗后明显升高 ,而梅毒患者血清试验仍未转阴。IL-27 对 IL-10(Th2 型细胞因子)生成的促进作用 ,可能有助于解释这个现象。Anderson 等<sup>[12]</sup>以利什曼原虫感染小鼠 ,检测皮损及淋巴结中的白介素及 CD4<sup>+</sup> T 细胞数 ,发现 IL-27 及 IL-10、IFN- $\gamma$  水平在感染后均增高 ,再感染 IL-27 受体缺陷(WSX-1<sup>-/-</sup>)的小鼠 ,发现 IL-10 水平逐渐下降 ,证明 IL-27 对 IL-10 生成的促进作用。IL-27 对 IL-10 的促进作用是否影响对 TP 的清除 ,仍需进一步探讨。

IL-33 是 2005 年由 Schmitz 等<sup>[13]</sup>鉴定发现的 IL-1 家族成员 ,主要由上皮细胞、呼吸道平滑肌细胞、内皮细胞和脂肪细胞产生 ,可促进 IL-4、IL-5 以及 IL-13 等 Th2 型细胞因子产生 ,在多种炎症过程中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。因此 IL-33 属于 Th2 系列细胞因子之一。本研究中 ,梅毒血清转阴组的 IL-33 水平在治疗后降低 ,而非转阴组的 IL-33 水平在治疗后未明显降低 ,提示 IL-33 不利于机体清除 TP ,这可能与它能够促进 Th2 反应有关。

有学者<sup>[15]</sup>发现 ,梅毒血清固定患者血清中 Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-10 明显高于梅毒血清转阴组 ,

提示在梅毒患者体内的 Th2 型反应不利于梅毒螺旋体清除。最近 Sattler 等<sup>[16]</sup>发现在炎症性肠病模型的小鼠体内 ,IL-33 能促进 IL-10 分泌。有学者<sup>[17]</sup>用流式细胞仪检测梅毒血清固定患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> 细胞比例 ,再用实时 PCR 技术检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 细胞的 IL-10 mRNA 相对表达量。结果显示梅毒血清固定患者组外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> 细胞比例及 IL-10 mRNA 表达水平均比健康对照组明显增高 ,认为 IL-10 参与 Th2 型免疫反应 ,造成梅毒患者外周血 RPR 滴度不转阴。IL-33 导致患者体内 TP 难以清除 ,是否是因为对 IL-4、IL-10 等 Th2 型细胞因子的促进作用 ,亦需进一步论证。

IL-33 对梅毒感染的免疫反应的影响 ,可能还存在于 Th1/Th2 平衡的变化中 ,Leader<sup>[18]</sup>将芝加哥株梅毒螺旋体感染兔睾丸 ,实时反转录 PCR 定量检测外周血的 mRNA 水平 ,发现在感染后第 11 天 ,IFN- $\gamma$  的 mRNA 水平达到最高峰 ,而 IL-4 的水平仅为微量 ,提示在病程早期 ,机体抵抗梅毒螺旋体的免疫应答以 Th1 型为主 ,而随着梅毒病程的进展 ,IL-10 的 mRNA 水平在感染后第 18 天达到最高峰 ,提示病程后期阶段转为以 Th2 为主的免疫应答。王瑞等<sup>[19]</sup>也证实了此观点 ,以 ELISA 法检测早期梅毒患者的血清 IFN- $\gamma$  水平 ,结果 I 期、II 期组的 IFN- $\gamma$  水平均显著高于正常组 ,且 I 期梅毒组高于 II 期梅毒组 , $(231 \pm 19.7) \text{ ng/L vs. } (199.0 \pm 16.5) \text{ ng/L}$  , $P < 0.05$ 。IFN- $\gamma$  在早期梅毒患者血清中呈高表达 ,且随着患者梅毒分期进展而降低 ,其免疫应答由 Th1 优势型转为 Th2 优势型。

本实验中数据的变化也体现了在早期梅毒患者体内 ,存在 Th1/Th2 平衡的变化 ,治疗前的 IL-27 水平在转阴组比非转阴组明显较高 ,转阴组 IL-27/IL-33 较高 ,提示转阴组的早期梅毒患者 ,机体抵抗 TP 的免疫反应以 Th1 型为主 ,而 IL-27 参与的 Th1 反应 ,在机体抵抗 TP 的免疫应答的早期即已占主要地位;并且转阴组治疗前后的 IL-27/IL-33 均高于非转阴组 ,提示 IL-27 有利于机体对 TP 的清除;非转阴组的 IL-33 水平在治疗后未明显下降 ,提示随着病程进展 ,非转阴组患者体内的 Th2 反应未能受到足够的抑制 ,不利于 TP 的清除。

综上所述 ,IL-27 及 IL-33 均可能参与 TP 感染过程中的免疫应答 ,IL-27 可能有利于机体对 TP 的清除 ,而 IL-33 可能不利于机体对 TP 的清除。鉴于本实验样本量较小 ,尚需扩大样本量、丰富检测方法等进一步证实。

【参考文献】

[1] FITZGERALD TJ.The Th1/Th2-like switch in syphilitic infection: is it detrimental[J]? *Infect Immun* ,1992 ,60: 3475-3479.

[2] HAZLETT LD ,MCCLELLAN SA ,BARRETT RP ,et al. IL-33 shifts macrophage polarization promoting resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis[J].*Invest Ophthalmol Vis Sci* ,2010 ,51( 3) : 1524-1532.

[3] SHIBATA S ,TADA Y ,KANDA N ,et al. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis [J].*J Invest Dermatol* ,2010 ,130( 4) : 1034-1039.

[4] 张学军.皮肤性病学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:222.

[5] PFLANZ S ,TIMANS JC ,CHEUNG J ,et al. IL-27 a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 Protein induces proliferation of native CD4+T cells[J].*Immunity* ,2002 ,16( 6) : 779-790.

[6] STUMHOFER JS ,TAIT ED ,QUINN WJ ,et al. A role for IL-27 p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling[J].*Nat Immunol* ,2010 ,11( 12) : 1119-1126.

[7] BROMBACHER F ,KASTELEIN RA ,ALBER G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses [J].*Trends Immunol* ,2003 ,24( 4) : 207-212.

[8] TAKEDA A ,HAMANO S ,YAMANAKA A ,et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment[J].*J Immunol* ,2003 ,170( 10) : 4886-4890.

[9] MAYER KD ,MOHRS K ,REILEY W ,et al. Cutting edge: T-bet and IL-27R are critical for in vivo IFN-gamma production by CD8 T cells during infection[J].*J Immunol* ,2008 ,180( 2) : 693-697.

[10] 傅琳玲,丁琦,方晶,等.不同感染状态下梅毒患者血清白介素2、10和12检测结果分析[J].*临床皮肤科杂志* ,2012 ,41( 6) :

351-353.

[11] 师金川,季必华,常小丽,等.梅毒血清复发患者脑脊液 IFN- $\gamma$  等指标检测结果分析[J].*中国艾滋病性病* ,2013 ,19( 3) : 195-197.

[12] ANDERSON CF ,STUMHOFER JS ,HUNTER CA ,et al. IL-27 Regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ Cells in Nonhealing Leishmania major Infection[J].*J Immunol* ,2009 ,183( 7) : 4619-4627.

[13] SCHMITZ J ,OWYANG A ,OLDHAM E ,et al. IL-33 ,an interleukin-1 like cyto-kine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines[J].*Immunity* ,2005 ,23( 5) : 479-490.

[14] DINARELLO CA. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor[J].*Immunity* ,2005 ,23( 5) : 461-462.

[15] 应作霖,党宏,季小杰,等.早期梅毒血清固定患者的白介素2、4、10和12的水平检测[J].*中国麻风皮肤病杂志* ,2011 ,27( 7) : 474-475.

[16] SATTLER S ,GUANG-SHENG L ,XU D. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 ( BregIL-33) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut[J].*Journal of Autoimmunity* ,2014 ,50( 3) : 107-122.

[17] 张明海,赵建斌.血清固定梅毒患者外周血 CD4+CD25+Treg 细胞 IL-10 的表达[J].*中华皮肤科杂志* ,2013 ,46( 5) : 360-361.

[18] LEADER BT ,GODORNES C ,VANVOORHIS WC ,et al. CD4+lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis [J].*Infect Immun* ,2007 ,75: 3021-3026.

[19] 王瑞,曹鸿玮,郝晓红,等.血清干扰素  $\gamma$ 、白细胞介素 18 在早期梅毒的表达及临床意义[J].*中华医院感染学杂志* ,2013 ,23( 16) : 3830-3832.

(上接第452页)

在本组病例行 TBNA 检查中,与常规活检、刷检及支气管肺泡灌洗相比,常规检查联合 TBNA 检查使肺癌病理学诊断率从 27.59% 提高到 84.48% ,与文献报道一致<sup>[8]</sup>。且只要能耐受常规支气管检查者,均能耐受 TBNA 检查,只是稍延长了检查时间,且只要熟练掌握 TBNA 淋巴结 CT 及气管镜下定位点,在操作过程中联合使用突刺法、推进法及金属环贴近气道壁法进行 TBNA 操作,仅出现穿刺点少量出血,予以吸引后均能自行停止,无需特殊处理,穿刺后未见气胸、纵膈血肿、纵膈出血及纵膈感染等严重并发症,同时在穿刺操作中未出现气管镜的损坏,说明 TBNA 是一项安全性好的镜下检查技术,且 TBNA 操作在常规气管镜检查时即可完成,相较于 EBUS-TBNA 无需添加昂贵的设备,明显减少了患者的医疗费用,更有利于这项技术在基层医院的开展。

综上所述,TBNA 是诊断肺癌伴纵膈淋巴结转移的一种创伤小的非手术取材方法<sup>[9]</sup>,是一项安全、成熟、有效的技术,且相较于 EBUS-TBNA 具有检查费用低的优势,值得临床应用及推广。

【参考文献】

[1] 支修益,石远凯,于金明.中国原发性肺癌诊疗规范(2015年版)[J].*中华肿瘤杂志* ,2015 ,37( 1) : 67-78.

[2] WANG KP. Staging of bronchogenic carcinoma by bronchoscopy [J].*Chest* ,1994 ,106( 2) : 588-593.

[3] YANG X ,KO-PEN W. Transbronchial needle aspiration: where are we now [J]? *Journal of Thoracic Disease* ,2013 ,5( 5) : 678-682.

[4] 荣福.经支气管针吸活检需要超声引导吗[J]? *中华结核和呼吸杂志* ,2013 ,36( 1) : 8-10.

[5] 郭艳芳,刘晋洪,黄宝珍,等.深圳市宝安区 2006-2011 年恶性肿瘤发病趋势分析[J].*中华肿瘤防治杂志* ,2013 ,20( 9) : 650-655.

[6] PATEL NM ,ANNE P ,ALIYA H ,et al. Conventional transbronchial needle aspiration decreases the rate of surgical sampling of intrathoracic lymphadenopathy[J].*Chest* ,2007 ,131( 3) : 773-778.

[7] 马云,杨会珍,张苑,等.经支气管针吸活检术的过去、现在和未来[J].*中华结核和呼吸杂志* ,2014 ,37( 11) : 862-864.

[8] WHITE CS ,WEINER E A ,PATEL P ,et al. Transbronchial needle aspiration: guidance with CT fluoroscopy[J].*Seminars in Respiratory & Critical Care Medicine* ,2000 ,118( 6) : 1630-1638.

[9] KHOO K L ,CHUA G ,MUKHOPADHYAY A ,et al. Transbronchial needle aspiration: initial experience in routine diagnostic bronchoscopy[J].*Respiratory Medicine* ,2003 ,97( 11) : 1200-1204.