

· 临床研究 ·

哮喘患儿淋巴细胞 CD40/CD40L 信号分子的表达

刘筱萍¹, 胡晓艳¹, 曾宾¹, 钱卫疆¹, 王新根²

(1. 北京大学深圳医院儿科 广东 深圳 518036; 2. 深圳市人民医院中心实验室 广东 深圳 518020)

[摘要] 目的 CD40/CD40L 是免疫应答中的一对协同刺激分子,它们在哮喘的发病中可能起到至关重要的作用,该文旨在探讨 CD40/CD40L 的表达与儿童哮喘的发病关系。**方法** 随机选择哮喘急性发作患儿 32 例,对照组 20 例。用流式细胞仪检测其外周血 T、B 淋巴细胞表达分化抗原 CD40 及其配体 CD40L 的百分率,并比较哮喘组与对照组之间的差异性。**结果** 哮喘组 B 淋巴细胞 CD40 的表达率较对照组明显增高 (17.05 ± 4.88 vs 13.89 ± 3.67 , $P < 0.05$);哮喘组 CD4⁺T 淋巴细胞 CD40L 的表达率较对照组明显增高 (8.04 ± 3.53 vs 5.58 ± 3.00 , $P < 0.05$)。**结论** 哮喘急性发作患儿存在的相关免疫细胞 CD40/CD40L 的异常表达,可能是其免疫失衡发病因素之一。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(3): 225 - 227]

[关键词] 哮喘; 淋巴细胞; CD40/CD40 配体; 流式细胞仪; 儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2005)03 - 0225 - 03

Expression of CD40 and CD40 ligand in lymphocytes of children with asthma

Xiao-Ping LIU, Xiao-Yan HU, Bin ZENG, Wei -Jiang QIAN, Xin-gen WANG. Department of Pediatrics, Shenzhen Hospital, Beijing University, Shenzhen, Guangdong 518036, China (Email: liuxiaoping0121@sina.com)

Abstract: Objective CD40 and CD40 ligand (CD40L) are a pair of co-stimulatory molecules in immunoreaction, and might play an important role in the development of asthma. This study aimed to explore the relationship between the expression of CD40 and CD40L and the development of asthma in children. **Methods** Thirty-two children with acute asthma were selected randomly and 20 age-matched healthy children were enrolled as controls. Flow cytometry was used to detect the expression of CD40 and CD40L in T and B lymphocytes in peripheral blood. **Results** The expression level of CD40 in B cells of asthmatic patients was significantly higher than that of controls (17.05 ± 4.88 vs 13.89 ± 3.67 , $P < 0.05$). CD4⁺T cells of asthmatic patients expressed a higher level of CD40L compared with controls (8.04 ± 3.53 vs 5.58 ± 3.00 , $P < 0.05$). **Conclusions** Expression of CD40 and CD40L were increased in relevant immune cells of children with acute asthma, which may contribute to the immune pathogenesis of asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(3): 225 - 227]

Key words: Asthma; Lymphocytes; CD40/CD40 ligand; Flow cytometry; Child

免疫反应在哮喘气道炎症的发生发展过程中起着极其重要的作用。在免疫反应中 T 细胞的活化需要来自抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 的双重信号分子:一是 APC 上的主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 识别和处理抗原并将抗原多肽递呈至 APC 细胞表面,形成 MHC-Ag 复合体,后者与 T 细胞上的 TCR/CD3 结合,传递给 T 细胞初始激活信号;二是需要 APC 和 T 细胞表面的粘附分子相互作用提供的协同刺激信号。目前已知的协同刺激分子有 CD40/CD40L 和 B7(1-2)/CD28 等,已有实验观察缺乏 B7-1 和/或 B7-2 的小鼠表现有:血清 IgE 不升高、气道中缺乏嗜酸粒细胞、不产生气道高反应性^[1]。另有报道

发现哮喘患者的肺泡巨噬细胞 CD86 (B7-2) 的表达率明显高于正常对照组,由此表明 B7-1 和 B7-2 可能在哮喘发病中起重要作用^[2,3]。CD40/CD40L 是另一对重要的协同刺激分子,其在免疫反应中的地位至关重要,但它们在哮喘中的作用如何鲜见报道。本文通过流式细胞仪检测支气管哮喘急性发作患儿外周血淋巴细胞上 CD40/CD40L 的表达水平,初步了解 CD40/CD40L 与哮喘的发病关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选取我院 2002 年 2 月至 2004 年 10 月期间,根

[收稿日期] 2005 - 01 - 08; [修回日期] 2005 - 02 - 14

[作者简介] 刘筱萍 (1959 -) 女, 博士, 副主任医师。主攻方向: 儿科血液和呼吸系统疾病。

据儿童哮喘防治常规中的诊断标准^[4]确诊为哮喘急性发作的患儿32例,男17例,女15例,年龄1~12岁,平均年龄6.5岁,所有患儿均为非感染因素诱发。采集标本前两周未使用过激素和免疫调节剂。正常对照20例,均为门诊体检的健康儿童,男11例,女9例,年龄4~10岁,平均年龄5岁,近时无感染,无过敏性疾患。

1.2 试剂和仪器

CD4, CD8, CD19-FITC, CD3-PE/Cy5, 阴性对照小鼠抗 IgG1-FITC 和 IgG1-PE 购自 Biolegend 公司。抗人 CD40- PE, CD40L-PE 由 Ancell 公司提供。流式细胞仪, ALTRA 型, 贝克曼库尔特公司产品。

1.3 实验方法

采集 EDTA 抗凝外周血 2 mL, 于 6 h 内送检, 密度梯度离心法分离单个核细胞, PBS 洗涤, 将浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 单个核细胞悬液以 100 μL 加入试验管和阴性对照管中, 试验管按不同组合加入荧光标记的单克隆抗体: CD4-FITC + CD3-PE/Cy5 + CD40-PE; CD4-FITC + CD3-PE/Cy5 + CD40L-PE; CD8-FITC + CD3-PE/Cy5 + CD40-PE; CD8-FITC + CD3-PE/Cy5 + CD40L-PE; CD19-FITC + CD40-PE; CD19-FITC + CD40L-PE。阴性对照管加入 IgG1-FITC 和 IgG1-PE, 用流式细胞仪分别进行 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 细胞上 CD40/CD40L 表达率检测, 所有标本由专一技术人员操作, 操作人员在实验前未知诊断。

1.4 血清总 IgE 水平测定

采用 ELISA 法测定。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。IgE 与 CD40, CD40L 分子的关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 哮喘患儿 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 细胞 CD40 的表达率

哮喘组 CD19⁺ 细胞上 CD40 的表达率为 17.05 ± 4.88 , 对照组为 13.89 ± 3.67 , 两组差异有显著性 ($P < 0.05$)。哮喘组 CD4⁺ 细胞上 CD40 的表达率为 4.66 ± 2.51 , 对照组为 5.87 ± 2.08 , 两组差异无显著性 ($P > 0.05$)。哮喘组 CD8⁺ 细胞上 CD40 的表达率为 6.92 ± 2.42 , 对照组为 5.64 ± 2.22 , 两组差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 T, B 淋巴细胞上 CD40 表达率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	T 淋巴细胞		B 淋巴细胞
		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺
对照组	20	5.87 ± 2.08	5.64 ± 2.22	13.89 ± 3.67
哮喘组	32	4.66 ± 2.51	6.92 ± 2.42	17.05 ± 4.88
<i>t</i>		1.81	1.93	2.46
<i>P</i>		>0.05	>0.05	<0.05

2.2 哮喘患儿 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 细胞 CD40L 的表达率

哮喘组 CD4⁺ 细胞上 CD40L 的表达率为 8.04 ± 3.53 , 对照组为 5.58 ± 3.00 , 两组差异有显著性 ($P < 0.05$)。哮喘组 CD8⁺ 细胞上 CD40L 的表达率为 2.37 ± 1.77 , 对照组为 3.38 ± 1.84 , 两组差异无显著性 ($P > 0.05$)。哮喘组 CD19⁺ 细胞上 CD40L 的表达率为 1.78 ± 1.04 , 对照组为 1.22 ± 1.46 , 两组差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 T, B 淋巴细胞上 CD40L 表达率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	T 淋巴细胞		B 淋巴细胞
		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺
对照组	20	5.58 ± 3.00	3.38 ± 1.84	1.22 ± 1.46
哮喘组	32	8.04 ± 3.53	2.37 ± 1.77	1.78 ± 1.04
<i>t</i>		2.60	1.98	1.65
<i>P</i>		<0.05	>0.05	>0.05

2.3 相关性分析

哮喘组中 CD19⁺ 细胞上 CD40 的表达率和 CD4⁺ 细胞上 CD40L 的表达率与血清总 IgE 水平具有显著的正相关 (均 $P < 0.05$)。见表 3。

表 3 血清总 IgE 与 T, B 细胞 CD40/CD40L 分子表达率的相关系数

组别	<i>n</i>	CD40			CD40L		
		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺
对照组	10	0.45	0.31	-0.12	0.27	0.15	-0.37
哮喘组	15	0.34	0.32	0.61 ^a	0.56 ^a	-0.22	0.39

^a $P < 0.05$

3 讨论

CD40 是分子量为 50KD 的细胞表面受体, 分布十分广泛, 主要表达在 B 细胞表面, 单核细胞、树突状细胞、成纤维细胞、胸腺上皮细胞和造血前体细胞也有不同程度的表达。CD40L 是分子量为 39KD 的细胞膜蛋白, 主要由活化的 T 细胞表达, 其中 CD4⁺ T 细胞明显高于 CD8⁺ T 细胞, 外周血嗜碱性粒细

胞、嗜酸性粒细胞、B细胞、NK细胞和单核细胞表面也有少量表达^[5]。表达于T细胞表面的CD40L通过CD40对B细胞介导的免疫反应发挥重要作用^[6]。CD40/CD40L是一对除B7/CD28之外的另一协同刺激信号传导途径。在免疫反应的起始阶段,T细胞激活需要两个信号:MHC-抗原肽信号和协同刺激信号,如缺乏协同刺激分子提供的协同刺激信号,T细胞便不能活化,而处于无能状态^[7,8]。CD40/CD40L途径,可能比B7/CD28途径更为重要,它的存在可以上调B7-1/B7-2在APC的表达^[9,10]。

有研究显示,哮喘病人的血清中TH2类细胞产生的细胞因子异常升高,并且在哮喘病人的唾液和气道粘膜下可检测到高表达的IL-13^[11,12]。也有报道称抗原激发前将TH2淋巴细胞转入动物模型,可引起肺嗜酸粒细胞增多、粘液高分泌和支气管高反应性^[13]。诸如这些均表明哮喘可能是一种以TH2类细胞活性增高的免疫反应性疾病,既然存在免疫反应,首先必须有CD40/CD40L协同刺激分子的参与,激活TH细胞,才会最终导致其中的TH2类细胞产生一系列的细胞因子,如IL-4、IL-5、IL-13等,促进IgE产生,形成慢性气道炎症。

本实验结果显示,急性发作哮喘患儿的B细胞表面CD40表达率明显高于对照组,同时其CD4⁺T细胞表面CD40L表达率亦比对照组高,提示CD40/CD40L这一对协同刺激分子分别在急性发作哮喘患儿的抗原提呈细胞和辅助性T细胞上均有过高表达,可能由此而促成一系列失衡的免疫反应。另外,我们将部分哮喘病人的CD19⁺细胞上CD40的表达率和CD4⁺细胞上CD40L的表达率分别与血清总IgE水平作相关性分析显示呈显著的正相关。本研究结果初步表明了CD40/CD40L可能在哮喘的免疫发病中起到一定的重要作用。

另外本组同时观察到哮喘患儿CD4⁺、CD8⁺T细胞表面的CD40表达率与对照组比较差异无显著性;哮喘患儿CD8⁺T细胞、B细胞表面的CD40L表达率与对照组比较差异无显著性,这些结果可能从侧面帮助证明在哮喘急性发作中,只有抗原提呈细胞与辅助性T细胞间CD40/CD40L这一对协同刺激分子的表达增高并相互作用,才有可能对哮喘的免疫发病起到关键的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Mark DA, Donovan CE, De Sanctis GT, He HZ, Cernadas M, Kobzik L, et al. B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) have complementary roles in mediating allergic pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22(3): 265-271.
- [2] 钟定,董临江,梁庆祥,张小蔓,黄霖,徐效峰,等. 哮喘和慢性阻塞性肺病患者肺灌洗液Th亚群及B7分子的差异[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(7): 421-424.
- [3] Agea E, Forenza N, Piattoni S, Russano A, Monaco A, Flenghi L, et al. Expression of B7 co-stimulatory molecules and CD1a antigen by alveolar macrophages in allergic bronchial asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28(11): 1359-1367.
- [4] 中华医学会儿科学分会呼吸组,中华医学会《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘防治常规(试行)[J]. *中华儿科杂志*, 2004, 42(2): 100-106.
- [5] Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, et al. The CD40 antigen and its ligand [J]. *Ann Rev Immunol*, 1994, 12: 881-922.
- [6] Liang L, Porter EM, Sha WC. Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(1): 97-108.
- [7] Van Gool SW, Vermeiren J, Rafiq K, Lorr K, de Boer M, Ceupens JL. Blocking CD40 - CD154 and CD80/CD86 - CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(8): 2367-2375.
- [8] Taylor PA, Friedman TM, Korngold R, Noelle RJ, Blazar BR. Tolerance induction of alloreactive T cells via ex vivo blockade of the CD40/CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell [J]. *Blood*, 2002, 99(12): 4601-4609.
- [9] Grewal IS, Flavell RA. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4⁺ T-cell responses [J]. *Immunol Today*, 1996, 17(9): 410-414.
- [10] Nagafuchi H, Shimoyama Y, Kashiwakura J, Takeno M, Sakane T, Suzuki N. Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2003, 21(1): 71-77.
- [11] Bastida Segura DL, Lopez Velasquez B, Castrejon Vazquez MI, Galicia Tapia J, Cano Altamirano S, Miranda Feria AJ. Allergic asthma and interleukins 2, 4, 5, 6 and 12 and gamma interferon levels [J]. *Rev Alerg Mex*, 2004, 51(3): 107-115.
- [12] Berry MA, Parker D, Neale N, Woodman L, Morgan A, Monk P, et al. Sputum and bronchial submucosal IL-13 expression in asthma and eosinophilic bronchitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(5): 1106-1109.
- [13] Cohn L, Tepper JS, Bottomly K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1 cells [J]. *J Immunol*, 1998, 161(8): 3813-3816.

(本文编辑:王霞)