

论著·临床研究

5岁以下喘息儿童鼻咽分泌物嗜酸性粒细胞和IL-17测定的临床意义

王秀芳 杨金玲 乔俊英 张艳丽

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨5岁以下喘息儿童鼻咽分泌物中嗜酸性粒细胞(EOS)计数和白介素-17(IL-17)水平在喘息评估中的临床意义。方法 53例5岁以下反复喘息患儿,分为有特应性体质的喘息I组27例,非特应性体质的喘息II组26例;非感染性疾病术前患儿20例作为对照组,分别收集鼻咽分泌物并处理后,显微镜下计数各组鼻咽分泌物中细胞数,用ELISA方法检测上清液中IL-17水平。结果 喘息I组鼻咽分泌物中EOS计数明显高于喘息II组和对照组($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);喘息II组鼻咽分泌物中EOS计数和对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);喘息I组和喘息II组患儿鼻咽分泌物中IL-17表达均高于对照组($P < 0.01$),其中喘息I组IL-17水平高于喘息II组,差异有统计学意义(1474 ± 974 pg/mL vs 788 ± 132 pg/mL; $P < 0.05$);喘息I组IL-17水平和EOS呈正相关($r = 0.62$, $P < 0.05$)。结论 检测鼻咽分泌物中EOS和IL-17可以作为识别5岁以下有发展为哮喘倾向的喘息儿童的指标,并给予早期临床干预和治疗。 [中国当代儿科杂志,2010,12(2):113-116]

[关键词] 喘息;鼻咽分泌物;白介素-17;嗜酸性粒细胞;儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)02-0113-04

Measurement of eosinophils and interleukin-17 in nasopharyngeal secretions of children under 5 years old with wheezing

WANG Xiu-Fang, YANG Jin-Ling, QIAO Jun-Ying, ZHANG Yan-Li. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: wxf456@126.com)

Abstract: Objective To study the value of eosinophils (EOS) and interleukin-17 (IL-17) in nasopharyngeal secretions in the evaluation of progress of wheezing in children under 5 years old. **Methods** Fifty-three children under five years old who had recurrent wheezing were classified into two groups; wheezing group I with atopic body ($n = 27$) and wheezing group II without atopic body ($n = 26$). Twenty pre-surgical children with non-infectious disease were used as the control group. Nasopharyngeal secretions were collected. Inflammatory cells in nasopharyngeal secretions were counted under the microscope. IL-17 levels in supernatants were measured using ELISA. **Results** EOS counts in nasopharyngeal secretions in wheezing group I were significantly higher than those in wheezing group II and the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). There were no significant differences in EOS counts between wheezing II and the control groups. The IL-17 levels in both wheezing groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$), and the wheezing group I had increased IL-17 levels than wheezing group II (1474 ± 974 pg/mL vs 788 ± 132 pg/mL; $P < 0.05$). The IL-17 level was positively correlated with the EOS counts in wheezing group I ($r = 0.62$, $P < 0.05$). **Conclusions** EOS counts and IL-17 levels in nasopharyngeal secretions may be used as indices for identifying the tendency to develop asthma in children under 5 years old with wheezing. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(2):113-116]

Key words: Wheezing; Nasopharyngeal secretion; Interleukin-17; Eosinophil; Child

喘息在学龄前儿童是常见的临床表现,非哮喘的学龄前儿童也会发生反复喘息。中国儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2008年修订)中按照喘息的原因和转归将5岁以下儿童喘息分为3种临床表型,即①早期一过性喘息;②早期起病的持续性喘息

(指3岁前起病);③迟发性喘息/哮喘^[1]。80%以上的哮喘起始于3岁前,具有肺功能损害的持续性哮喘患者,其肺功能损害往往开始于学龄前期,因此从喘息的学龄前儿童中把可能发展为持续性哮喘的患儿识别出来进行有效早期干预是必要的。但是目

[收稿日期]2009-07-29;[修回日期]2009-10-23
[作者简介]王秀芳,女,大学本科,主任医师。

前尚无特异性的检测方法和指标可用于对学龄前喘息儿童做出哮喘的确定诊断,对5岁以下喘息儿童的评估多采用哮喘预测指数^[1],如哮喘预测指数阳性,建议按哮喘规范治疗。本研究通过检测5岁以下喘息患儿鼻咽分泌物中的嗜酸细胞计数(EOS)和白介素-17(IL-17),探讨区分儿童喘息临床表型的检测手段,并为儿童哮喘早期干预治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

喘息组53例患儿来自2008年9月至2009年4月本院儿科呼吸专业门诊,为急性发作期,肺部听诊可闻及哮鸣音,其中男30例,女23例;年龄4个月至4岁10个月,平均年龄1岁8个月。喘息次数 ≥ 2 次/半年或 ≥ 3 次/1年,均排除先天性疾病引起的喘息。通过采集病史,根据有无湿疹、皮炎等过敏性疾病史及哮喘家族史,又将喘息组分为特应体质组(喘息I组)和非特应体质(喘息II组)。喘息I组27例,男16例,女11例;喘息II组26例,男14例,女12例,所有患儿2周内均无全身或局部哮喘药物治疗史。对照组为同期本院外科疝气、肾结石等非感染性疾病术前患儿中随机抽取的20例,男11例,女9例,6个月至4岁6个月,平均1岁9个月;排除特应质高危因素,最近2周内无感染性疾病史,无全身或局部激素使用史,无其他免疫调节剂使用史。所有入组儿童均为足月出生,年龄、性别差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究获得法定监护人的知情认可。

1.2 方法

1.2.1 鼻咽分泌物的收集、处理 无菌吸痰管从患儿的单个鼻孔进入5~6cm达鼻咽部,通过负压吸引取得鼻咽分泌物1mL,加入4倍体积的0.1%二硫苏糖醇溶液混匀后37℃孵育15min,离心后收集上清液冻存于-70℃冰箱,用于检测IL-17。细胞沉渣涂片,瑞氏染色后,在油镜高倍镜下计数300个

除上皮细胞以外的有核细胞,计算EOS、中性粒细胞占有核细胞(鳞状上皮细胞除外)的百分数。标本涂片鳞状上皮细胞 $< 20\%$ 为合格鼻咽分泌物。

1.2.2 鼻咽分泌物中IL-17测定 采用双抗体夹心酶免疫吸附实验(SELISA)法,试剂盒由深圳达科为有限公司提供,灵敏度31.25pg/mL,采用酶标仪以450nm波长。主要仪器为芬兰Thermo公司生产的酶标仪和洗板机;数字显示隔水式电热恒温培养箱为上海跃进医疗器械厂生产。操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件进行统计分析。结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,IL-17与炎性细胞相关性分析用Pearson直线相关系数分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽分泌物IL-17的表达

喘息组患儿鼻咽分泌物IL-17表达增加,喘息I组和喘息II组均高于对照组($P < 0.01$),其中喘息I组IL-17水平高于喘息II组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 鼻咽分泌物中炎性细胞数量

喘息I组鼻咽分泌物中EOS计数明显高于喘息II组和对照组($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),而喘息II组EOS计数和对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);喘息I组和喘息II组中性粒细胞计数明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

2.3 相关性分析

喘息I组鼻咽分泌物中IL-17水平和EOS呈正相关($r = 0.62$, $P < 0.05$),喘息I和II组鼻咽分泌物中IL-17水平与中性粒细胞计数呈正相关(r 值分别为0.56、0.66, $P < 0.05$),与其他细胞计数无相关性。

表1 鼻咽分泌物IL-17水平和炎性细胞数量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-17 (pg/mL)	EOS (%)	巨噬细胞 (%)	淋巴细胞 (%)	中性粒细胞 (%)
对照组	20	36 \pm 5	0	87 \pm 8	7 \pm 6	6 \pm 4
喘息I组	27	1 474 \pm 974 ^{a,b}	15 \pm 10 ^{a,b}	46 \pm 15	15 \pm 7	24 \pm 7 ^a
喘息II组	26	788 \pm 132 ^a	1 \pm 1	47 \pm 14	19 \pm 12	33 \pm 12 ^a
F值		4.630	21.681	2.972	10.384	27.746
P值		< 0.05	< 0.01	> 0.05	< 0.05	< 0.01

a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与喘息II组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

喘息是导致5岁以下儿童就诊的常见症状,喘息是由于气道壁水肿、平滑肌收缩以及黏液栓所致小气道狭窄的最终结果。临床上对5岁以下反复喘息患儿存在诊断不足或过度治疗的情况,喘息患儿常常被笼统的诊断诊断为喘息性支气管炎、哮喘性支气管炎、复发性肺炎或复发性毛细支气管炎^[2]。如何早期识别那些有发展为变应性持续性哮喘倾向的喘息患儿至关重要,但凭临床症状很难区分。哮喘诊断的实验室金标准为支气管粘膜活检或支气管肺泡灌洗直接评估呼吸道炎症反应^[3],但因其为侵袭性检查,不适宜临床广泛应用。诱导痰分析是一种相对无创和安全的检查,被广泛用于哮喘气道炎症的研究,但诱导痰仅适用于5岁以上儿童^[4,5]。小于5岁的儿童尤其是婴幼儿获得合格痰液相对困难,故鲜有报道。鼻咽分泌物取材方法简单,且对患儿不造成任何痛苦,非常适于临床应用,以往多用于呼吸道病毒的检测,李素芬等^[6]发现鼻咽分泌物中EOS检查与诱导痰EOS计数一致,可用于间接监测气道的炎症变化,但鼻咽分泌物细胞学检查目前还没有在临床上广泛开展,尤其5岁以下喘息儿童鼻咽分泌物细胞学检查和炎性介质的测定的研究少有报道。

近年来报道T淋巴细胞因子IL-17在哮喘、慢性阻塞性肺病等呼吸道疾病中起一定作用,目前认为IL-17家族中至少存在6种细胞因子(IL-17A~F)。IL-17A主要由外周活化的CD4⁺记忆T淋巴细胞和CD45RO⁺受刺激后分泌。IL-17可以通过促进释放前炎性细胞因子来放大炎症反应,对中性粒细胞有强大的化学趋化作用,可以显著增加呼吸道内中性粒细胞聚集、活化;同时有研究发现IL-17可刺激人类呼吸道上皮细胞及平滑肌细胞产生并释放粒单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、IL-8等细胞因子间接作用于中性粒细胞,抑制其凋亡^[7]。这些作用发生在气道表面时,可促使黏液腺分泌大量黏液,增加气道的高反应性,在气道重塑的过程中发挥了重要的作用,与哮喘的发生发展有着密切的关系。

本研究根据Tuscon儿童研究中心制定的反复喘息婴幼儿发生哮喘的高危因素标准^[8],将喘息患儿分为具有特应质的喘息I组和无特应质的喘息II组。对53例喘息患儿进行鼻咽分泌物EOS计数和IL-17的测定,结果发现具有特应质喘息I组EOS计数和IL-17表达明显高于喘息II组和对照组。

EOS为主的炎症细胞浸润是变应性炎症的主要特征,EOS是哮喘气道炎症的中心细胞。Nagayama等^[9]对初次喘息、反复喘息及哮喘的儿童研究后提出,发生反复喘息患儿的痰液中嗜酸粒细胞聚集更为明显。Castro-Rodriguez等^[10]对237例4~14岁哮喘儿童进行研究,发现与非特应性体质的哮喘儿童比较,特应性体质的哮喘儿童有较高水平的鼻黏膜EOS计数;与本研究采用鼻咽分泌物的样本所得结果相似。本研究显示喘息患儿鼻咽分泌物中IL-17水平明显升高,以有特应质的喘息I组鼻咽分泌物中升高明显,且喘息I组IL-17与EOS也呈正相关性。Molet等^[11]通过免疫细胞化学检测发现哮喘患者痰及支气管肺泡灌洗液IL-17表达明显高于正常对照组;除了T细胞外,痰和支气管肺泡灌洗液中的EOS亦表达IL-17;在大鼠实验中发现IL-17A有助于驱动过敏免疫反应TH2细胞的激活、EOS的募集和血清IGE的生成。有特应质的喘息I组鼻咽分泌物中IL-17水平和EOS计数均明显高于喘息II组 and 对照组,推测具有特应质高危因素的喘息I组与哮喘存在相同或相似的免疫学发病机制。对该组患儿的治疗应强调早期干预,降低气道高反应性、控制炎症反应,预防持续性哮喘的形成。

无特应质的喘息II组鼻咽分泌物中EOS计数和对照组比较差异无统计学意义,显示EOS未参与喘息的发作。呼吸道感染是诱发儿童反复喘息最常见致病因素,常见的病毒有呼吸道合胞病毒(RSV)、鼻病毒(RV)、副流感病毒(PIV)、流感病毒(IV)和后来发现的偏肺病毒(metapneumovirus)等,气道炎症以淋巴细胞或中性粒细胞为主^[12,13],气道没有明显的EOS聚集。有研究显示急性期RSV感染引起的毛细支气管炎患儿气道中有大量中性粒细胞聚集活化^[14]。本研究中喘息组中性粒细胞均增多,尤以无特应质的喘息II组明显,与文献报道相符。喘息II组IL-17水平低于喘息I组,差异有统计学意义,但明显高于对照组,说明IL-17也参与喘息II组的喘息发作机制。最新研究显示IL-17可通过调节中性粒细胞、不成熟树突状细胞、记忆性T细胞在气道的募集的方式来促进支气管上皮细胞对抗鼻病毒的侵入^[15]。

本研究结果提示鼻咽分泌物中EOS计数和IL-17水平的测定在5岁以下儿童喘息评估中有较大的临床意义,可以作为识别有发展为哮喘倾向儿童的指标,并给予其早期临床干预和治疗。鼻咽分泌物检测操作简便、无创,对被检查者影响小,适用于学龄前儿童,且能够反映下呼吸道炎症,值得在临床

进一步研究证实并推广应用。

[参 考 文 献]

[1] 中华医学会儿科学会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10):745-753.

[2] Amado MC, Portnoy JM. Diagnosing in asthma in young children [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006, 6(2):101-105.

[3] Moore WC, Peters SP. Severe asthma; an overview[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(3):487-494.

[4] Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children; induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate[J]. *Eur Respir J*, 2000, 16(5):1008-1015.

[5] Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children; feasibility, repeatability and relation of findings to asthma severity[J]. *Thorax*, 2000, 55(9):768-774.

[6] 李素芬,彭子军,刘传合. 哮喘儿童鼻咽分泌物嗜酸性粒细胞的变化及其临床意义[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(2):260-261.

[7] Hennes S, van Thoor E, Ge Q, Armour CL, Hughes JM, Ammit AJ. IL-17A act via p38 MAPK to increase stability of TNF-alpha-induced IL-8 mRNA in human ASM[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(6):L1283-1290.

[8] Murphy KR, Berger WE. The variability of asthma[J]. *Curr Med Res Opin*, 2005, 21(10):1519-1526.

[9] Nagayama Y, Tsubaki T, Toba T, Nakayama S, Kiyofumi O. Analysis of sputum taken from wheezy and asthmatic infants and children, with special reference to respiratory infections[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2001, 12(6):318-326.

[10] Castro-Rodriguez JA, Ramirez AM, Toche P, Pavon D, Perez MA, Girardi G, et al. Clinical, functional, and epidemiological differences between atopic and nonatopic asthmatic children from a tertiary care hospital in a developing country [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2007, 98(3):239-244.

[11] Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(3):430-438.

[12] Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Koike K, Fukushima K, Taniuchi S, et al. Neutrophils inflammation in childhood bronchial asthma[J]. *Thorax*, 2005, 60(8):704-707.

[13] Jarjour NN, Gern JE, Kelly EA, Swenson CA, Dick CR, Busse WW. The effect of an experimental rhinovirus 16 infection on bronchial lavage neutrophils[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105(6 Pt 1):1169-1177.

[14] 易阳,周国平,钟闻艳,钱金强,李春华,郭宁,等. 中性粒细胞、白介素-8和弹性蛋白酶在急性毛细支气管炎发病中的作用[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(2):148-151.

[15] Wiehler S, Proud D. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(2):L505-515.

(本 文 编 辑 : 黄 榕)

· 消 息 ·

新生儿颅脑超声诊断学习班通知

为提高对围产期脑损伤及其他中枢神经系统疾病的诊断水平,充分利用已有的医疗资源,推广颅脑超声检查诊断技术,北京大学第一医院儿科按计划于2010年3月下旬举办为期5天的新生儿颅脑超声学习班。本班属国家级教育项目,授课教师为本科及北京市著名专家教授。学习结束授予10学分。主要授课内容包括:中枢神经系统解剖;新生儿不同颅脑疾病超声诊断;新生儿颅脑疾病不同影像学检查方法比较与选择;超声见习。招收学员对象:儿科及新生儿专业医师,超声专业医师及技师。学费:950元。欲参加者请与我们联系:北京大学第一医院儿科(邮编100034)王红梅,周丛乐。电话:010-83573461或83573213; E-mail:xsxxb1122@126.com。如果需要,我们将寄去正式通知。

北京大学第一医院儿科