

论著 · 临床研究

肿瘤坏死因子-α 干预对热性惊厥患儿外周血单个核细胞 ICAM-1 和 LFA-1 表达的影响

孙丹¹ 刘智胜¹ 姚辉² 康世秀² 何彩英¹ 胡家胜¹ 吴革菲¹ 王芳琳¹

(1. 武汉市儿童医院神经内科,湖北 武汉 430016; 2. 武汉市儿童医院中心实验室,湖北 武汉 430016)

[摘要] 目的 探讨肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对热性惊厥(FS)患儿外周血单个核细胞(PBMC)细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及配体淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)表达的影响。**方法** 16例FS患儿随机分为FS对照组和TNF-α干预组。TNF-α干预组采用1.0 ng/mL的TNF-α进行干预。对照组16例,为年龄和性别相匹配的同期体检健康儿童。进行外周血PBMC培养。流式细胞仪检测PBMC表面ICAM-1和LFA-1的表达。**结果** FS对照组在体外培养的PBMC表面ICAM-1和LFA-1表达水平分别为(20±9)%和(43±16)%,明显高于正常对照组[(14±7)%,(30±16)%]($P<0.05$);TNF-α干预组的PBMC表面ICAM-1表达水平[(27±11)%]明显高于FS对照组($P<0.05$),LFA-1表达[(52±21)%]较FS对照组有增高趋势,但差异无统计学意义。**结论** 炎症介质TNF-α刺激可使FS患儿的LFA-1和ICAM-1表达上调。 [中国当代儿科杂志,2011,13(4):285-287]

[关键词] 肿瘤坏死因子-α;热性惊厥;ICAM-1;LFA-1;外周血单个核细胞;儿童
[中图分类号] R729 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0285-03

Effects of TNF-α on ICAM-1 and LFA-1 expression in peripheral blood mononuclear cells of children with febrile seizures

SUN Dan, LIU Zhi-Sheng, YAO Hui, KANG Shi-Xiu, HE Cai-Ying, HU Jia-Sheng, WU Ge-Fei, WANG Fang-Lin.
Department of Neurology, Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, China (Liu Z-S, Email: liuzsc@126.com)

Abstract: Objective To study the effects of TNF-α on ICAM-1 and LFA-1 expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of children with febrile seizures (FS). **Methods** Sixteen children with FS and 16 age- and gender-matched healthy children were enrolled. The samples of PBMC from FS children were randomized into two groups with or without TNF-α treatment (TNF-α concentration 1.0 ng/mL). PBMC were purified and cultured with a conventional method *in vitro*. The expression of ICAM-1 and LFA-1 in PBMC was determined by flow cytometry (FCM). **Results** ICAM-1 [(20±9)% vs (14±7)%] and LFA-1 [(43±16)% vs (30±16)%] expression in PBMC in the untreated FS group was significantly higher than that in the normal control group ($P<0.05$). Compared with the untreated FS group, the treatment with TNF-α remarkably increased the ICAM-1 expression [(27±11)%] ($P<0.05$). PBMC LFA-1 expression [(52±21)%] in the TNF-α-treated group was higher than that in the untreated FS group, although there were no statistical differences between the two groups. **Conclusions** TNF-α treatment may increase LFA-1 and ICAM-1 expression in PBMC of children with FS. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):285-287]

Key words: TNF-α; Febrile seizure; ICAM-1; LFA-1; Peripheral blood mononuclear cell; Child

热性惊厥(febrile seizures, FS)是小儿时期常见的惊厥性疾病之一,为颅外感染性疾病初期的发热过程中出现的惊厥发作。在各类小儿惊厥中,FS约占30%^[1],其患病率为2%~5%,呈明显的年龄依赖性,多发生于3个月至6岁的儿童,发病高峰为6个月至3岁^[2]。FS的发病机制尚不明确,可能是免疫炎症过程、细胞因子激活及遗传因素相互作用

的结果^[3]。为了探讨细胞黏附分子对FS患儿的神经免疫调节作用,本研究通过体外刺激因子作用于外周血单个核细胞(PBMC),探讨肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对FS患儿PBMC细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及配体淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)表达和分泌的影响。

[收稿日期]2010-05-09;[修回日期]2010-08-06
[基金项目]武汉市科技局武汉青年科技晨光计划资助项目(编号20015005050)。
[作者简介]孙丹,女,硕士,主治医师。
[通信作者]刘智胜,主任医师。

1 资料与方法

1.1 研究对象

FS组为2004年11月至2006年12月在我院神经内科就诊的FS患儿16例。其诊断均具备以下条件^[4]:①首发年龄多在3个月至6岁;②惊厥发作时伴有发热,发作时体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$;③既往没有无热惊厥病史;④除外颅内感染和其他确切病因(如器质性、代谢性异常等)所致的惊厥。其中男9例,女7例,年龄11个月至6岁2个月,平均 2.3 ± 1.3 岁;病程6h至4d,平均 27 ± 19 h;强直-阵挛性发作10例,强直性发作6例。FS组血清标本分为FS对照组和TNF- α 干预组,FS对照组的样本中不加TNF- α ,TNF- α 干预组的样本中加入TNF- α 进行干预,浓度为1.0 ng/mL。

正常对照组16例,为同期在我院儿童保健门诊体检的健康儿童,且近2周内无呼吸道或消化道感染,无其他急、慢性疾病,无过敏性及与免疫密切相关的疾病。其中男8例,女8例,年龄1~6岁,平均 2.4 ± 1.4 岁。对照组与FS组间的性别、年龄差异均无统计学意义。

1.2 方法

无菌条件下取肝素抗凝血3~4 mL,加入Hank's液中制成细胞悬液,并加于淋巴细胞分离液上,用水平离心机以2000 r/min离心20 min,吸去最上层血浆,收集血浆层与淋巴细胞分离液之间的PBMC,尽量全部吸出PBMC。将分离的PBMC注入培养瓶,使用美国Forma Scientific公司的310型CO₂培养箱培养12 h和24 h(37℃,5% CO₂)。台盼蓝拒染试验检测活细胞数>90%,调整细胞数至 $1 \times 10^6/\text{mL}$,每组设平行样本12个,各组均在6孔培养板上培养24 h。

细胞因子的检测:培养12 h后,取100 μL 培养液,采用流式细胞仪检测不同组别PBMC表面ICAM-1和LFA-1的表达;培养24 h后,收集培养的PBMC培养上清,采用ELISA法检测ICAM-1和LFA-1蛋白的浓度。

1.3 统计学分析

统计学分析采用SPSS 11.5统计软件,各组数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组样本均数比较采用方差分析检验,组间两两比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 对PBMC ICAM-1和LFA-1表达水平的影响

流式细胞仪检测显示TNF- α 干预组和FS对照组ICAM-1表达水平均明显高于正常对照组($P < 0.05$);TNF- α 干预组的ICAM-1表达高于FS对照组($P < 0.05$)。TNF- α 干预组和FS对照组LFA-1表达水平均明显高于正常对照组($P < 0.05$);TNF- α 干预组的LFA-1表达水平与FS对照组相比有上调趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 流式细胞仪检测TNF- α 对ICAM-1和LFA-1表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	ICAM-1	LFA-1
正常对照组	16	14 $\pm$ 7	30 $\pm$ 16
FS对照组	16	20 $\pm$ 9 ^a	43 $\pm$ 16 ^a
TNF- α 干预组	16	27 $\pm$ 11 ^{a,b}	52 $\pm$ 21 ^a
F值		8.023	5.943
P值		<0.01	<0.01

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与FS对照组比较, $P < 0.05$

2.2 TNF- α 对ICAM-1/LFA-1分泌水平的影响

ELISA法检测显示TNF- α 干预组和FS对照组ICAM-1和LFA-1分泌水平均明显高于正常对照组($P < 0.05$);TNF- α 干预组的ICAM-1和LFA-1分泌水平与FS对照组相比有上调趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 ELISA法检测TNF- α 对ICAM-1和LFA-1分泌水平的影响 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

组别	例数	ICAM-1	LFA-1
正常对照组	16	4.2 $\pm$ 2.4	2.8 $\pm$ 1.4
FS对照组	16	6.7 $\pm$ 3.9 ^a	4.8 $\pm$ 3.0 ^a
TNF- α 干预组	16	7.3 $\pm$ 3.2 ^a	5.4 $\pm$ 3.4 ^a
F值		4.01	4.17
P值		<0.05	<0.05

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

TNF- α 是一种具有广泛生物学功能的多肽类细胞因子,主要由单核巨噬细胞产生,具有广泛的生物学活性,在机体的细胞功能调节、免疫和炎症反应等过程中起重要作用。TNF- α 能上调ICAM-1、血管细

胞黏附分子-1 (VCAM-1) 及 CD11/CD18 的表达, 增强白细胞与内皮细胞的黏附^[1]。研究证明 TNF- α 可使骨髓黏附细胞 (BMAC) 上 ICAM-1 的表达上调^[3]。在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中检测不到 ICAM-1 mRNA 时, 若用 TNF- α 刺激, 可使其很快增高, 2 h 后达最高水平并处于稳定状态^[5]。本研究发现: 未经 TNF- α 刺激的 FS 对照组其 PBMC ICAM-1 表达水平及分泌水平明显高于正常对照组; 若用 TNF- α 刺激, 可使 FS 患儿 PBMC ICAM-1 分泌和表达进一步上调。提示 TNF- α 可作为一种前炎症介质介导炎症反应, 刺激人 PBMC 使之分泌和表达 ICAM-1, 引起炎症病理损害, 能直接或间接引起脑组织损伤。而且 TNF- α 尚可作为内源性致热源, 发热本身可导致脑内, 特别是下丘脑及海马等脑区内的某些神经元兴奋, 形成异位放电从而导致 FS 的发生, 同时也可通过其致炎作用等导致神经细胞的病理过程。关于介导 TNF- α 诱导 ICAM-1 上调的分子机制, 有研究表明 NF- κ B 的特异性侧支序列是 TNF- α 诱导 ICAM-1 基因表达所必需的^[6]。近来研究表明蛋白激酶 C 可介导 TNF- α 诱导的 NF- κ B 与 ICAM-1 启动子结合, 从而引发 ICAM-1 基因转录^[7]。

LFA-1 存在于几乎所有外周血液白细胞中, 与 ICAM-1 以配体-受体形式结合, 从而增强了白细胞与血管内皮细胞之间的黏附性, 由此导致白细胞的浸润。本研究结果显示: 与正常对照组相比, FS 对照组 PBMC 的 LFA-1 表达和分泌水平均明显增高; 经 TNF- α 作用后, LFA-1 在 PBMC 表达和分泌水平的时程与 ICAM-1 的表达明显一致, 与 FS 对照组相比, 其统计学上虽不具有显著性差异, 但呈上调趋势, 原因可能与 TNF- α 干预浓度有关, 同时结合前期实验中已证实的 ICAM-1 和 LFA-1 可作为早期协同刺激分子引起免疫病理损伤^[8], 推测炎症反应促使体内单核巨噬细胞活化, 并产生 TNF- α 等多种细胞因子和炎症介质。这些细胞因子可能再通过“二

次反应学说”触动细胞因子反应网络, 触发 LFA-1/ICAM-1 介导的“瀑布样级联反应”, 使更多炎症细胞浸润、聚集、活化, 以释放更多细胞因子和炎症介质, 导致炎症不断扩散。

因此, 本研究推测 FS 患儿可迅速产生 TNF- α , 使 LFA-1 和 ICAM-1 表达快速上调, 早期在对热应激不适应基础上, 通过 PBMC 表面 LFA-1 和 ICAM-1 表达上调介导炎症免疫病理损害, 使机体呈过度兴奋状态, 导致惊厥的发生, 在 FS 的发病机制中起着重要作用。

[参 考 文 献]

[1] 沈晓明, 王卫平. 儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 400-402.

[2] Tsoyi K, Jang HJ. PTEN differentially regulates expressions of ICAM-1 and VCAM-1 through PI3K/AKT/GSK-3 β /GATA-6 signaling pathways in TNF- α -activated human endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(1): 115-121.

[3] Librizzi L, Regondi MC, Pastori C, Frigerio S, Frassoni C, de Cutis M. Expression of adhesion factors induced by epileptiform activity in the endothelium of the isolated guinea pig brain in vitro [J]. *Epilepsia*, 2007, 48(4): 743-751.

[4] Kumar B, Kalita J, Misra UK. Febrile seizure[J]. *J Indian Med Assoc*, 2010, 108(7): 441-442.

[5] Gaffuri B, Vigano P, Nozza A, Gornati G, DT Blasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 messenger ribonucleic acid and protein in human term placental cells and its modulation by pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha) [J]. *Biol Repord*, 1998, 58(4): 1003-1008.

[6] Petzold T, Orr AW, Hahn C. Focal adhesion Kinase modulates activation of NF-kappaB by flow in endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(4): C814-822.

[7] Rahman A, Anwar KN, Malik AB. Protein kinase C-zeta mediates TNF-alpha-induced ICAM-1 gene transcription in endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279(4): C906-C914.

[8] 刘智胜, 孙丹, 姚辉, 康世秀, 何彩英, 胡家胜, 等. 热性惊厥患儿血浆和外周血单个核细胞表面 ICAM-1/LFA-1 的表达水平 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2007, 22(11): 826-829.

(本文编辑: 俞 燕)