

论著 · 临床研究

难治性肺炎支原体肺炎患儿支气管肺泡灌洗液中 IL-4 及 INF- γ 水平的研究

黄寒 钟礼立 彭力 厉娟 林琳

(湖南省人民医院儿科, 湖南 长沙 410005)

[摘要] **目的** 检测难治性肺炎支原体肺炎(RMPP)患儿支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IL-4、INF- γ 水平,探讨 RMPP 患儿病变局部 Th1、Th2 型细胞因子水平的变化及其意义。**方法** 选择 RMPP 患儿(42 例)为研究对象。根据是否有湿疹、过敏性鼻炎、荨麻疹及相关过敏性疾病家族史等将 42 例 RMPP 患儿分为特应性组(11 例)和非特应性组(31 例)。以同期因支气管异物住院、异物取出 4 周后纤维支气管镜复查的患儿为对照组(12 例)。对 RMPP 患儿及对照患儿 BALF 中细胞学成分进行分析,并采用 ELISA 方法检测 BALF 中 IL-4、INF- γ 水平。**结果** 与对照组比较, RMPP 组患儿 BALF 中细胞总数上升($P < 0.05$),其中以中性粒细胞上升为主($P < 0.01$);RMPP 组患儿 BALF 中 INF- γ 、IL-4 均显著升高($P < 0.05$)。与对照组比较,特应性组 BALF 中 INF- γ 、IL-4 均显著升高($P < 0.05$),非特应性组 INF- γ 显著升高($P < 0.05$)。各组间 INF- γ /IL-4 比值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** RMPP 患儿 BALF 细胞数显著增加,尤以中性粒细胞为甚。RMPP 患儿 BALF 中 INF- γ 、IL-4 水平明显升高,但 INF- γ /IL-4 比值无变化,提示 RMPP 患儿病变局部炎症反应明显,但尚不能证实 RMPP 患儿存在 Th2 占主导的炎症反应。

[中国当代儿科杂志,2012,14(8):581-584]

[关键词] 难治性肺炎支原体肺炎;支气管肺泡灌洗液;白细胞介素;干扰素;儿童
[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)08-0581-04

Levels of interleukin-4 and interferon-gamma in the bronchoalveolar lavage fluid of children with refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia

HUANG Han, ZHONG Li-Li, PENG Li, LI Juan, LIN Lin. Department of Pediatrics, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China (Zhong L-L, Email: hnzll000@gmail.com)

Abstract: Objective To measure levels of interleukin-4 (IL-4) and interferon-gamma (INF- γ) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of children with refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia (RMPP), and to investigate changes in local Th1-Th2-type cytokine levels in children with RMPP and their significance. **Methods** A total of 42 children with RMPP were divided into atopic ($n = 11$) and non-atopic groups ($n = 31$) according to whether they had eczema, allergic rhinitis, urticaria, and family history of allergic disease. The study also included a control group of 12 children with bronchial foreign bodies who underwent foreign body removal and were re-examined by fiberoptic bronchoscopy four weeks later. The different cells in BALF from all children were analyzed, and the levels of IL-4 and INF- γ in BALF were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the control group, the total number of cells in BALF from children with RMPP increased significantly ($P < 0.05$), the increase mainly accounted for by neutrophils ($P < 0.01$), and levels of IL-4 and INF- γ in BALF from children with RMPP increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group, levels of IL-4 and INF- γ in BALF in the atopic group increased significantly ($P < 0.05$). The level of INF- γ in BALF in the non-atopic group also increased significantly ($P < 0.05$). There were no significant differences in INF- γ /IL-4 ratio among all groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Significant increase in cell numbers, especially neutrophils, as well as IL-4 and INF- γ levels, can be seen in BALF from children with RMPP, but there is no change to the INF- γ /IL-4 ratio. This indicates a significant local inflammatory response in children with RMPP, but there is no evidence of Th2-dominated inflammatory response. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(8):581-584]

Key words: Refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia; Bronchoalveolar lavage fluid; Interleukin; Interferon; Child

[收稿日期]2012-03-15;[修回日期]2012-05-03
[作者简介]黄寒,女,硕士研究生,主治医师。
[通信作者]钟礼立,主任医师。

大量的临床研究认为,肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)感染对哮喘的产生、加重及慢性化起到了十分重要的作用^[1-2]。目前关于 MP 感染与哮喘的相关研究中,对 MP 感染后机体 Th1 和 Th2 型细胞因子变化的研究较多,结果均提示 MP 感染后存在 IL-5(Th2 型细胞因子)分泌增多,但对于 IL-4(Th2 型细胞因子)及 INF- γ (Th1 型细胞因子)水平的变化存在多种不同的结论^[3-4],目前大部分研究是对血清或上气道分泌物、诱导痰等的检测,鲜有对直接来自下气道病变部位标本的研究。而且病情轻重程度不同,也影响细胞因子的分泌水平。鉴于此,本研究选择 2008 年 9 月至 2010 年 3 月在我院儿科医学中心住院的难治性肺炎支原体肺炎(refractory *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*, RMPP)患儿为研究对象,检测其肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluids, BALF)中细胞学成分及 IL-4、INF- γ 的水平并进行分析,探讨重症 MP 感染后呼吸道中 Th1/Th2 型细胞因子水平的变化及意义。

1. 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2008 年 9 月至 2010 年 3 月在我院儿科医学中心住院的 RMPP 患儿 42 例,其中男 24 例,女 18 例;年龄最小 8 个月,最大 13 岁 1 个月,平均年龄 5.5 ± 2.8 岁;病程 2~32 d(中位数 10 d)。根据是否有湿疹、过敏性鼻炎、荨麻疹及相关过敏性疾病家族史等分为特应性组(11 例)和非特应性组(31 例)。同期在我院住院、支气管异物取出 4 周后复查且双份血清确诊无 MP 感染的 12 例患儿为对照组。其中男 7 例,女 5 例;年龄 4 岁 1 个月至 9 岁,平均年龄 6.1 ± 3.2 岁。对照儿童支气管异物取出后近 1 个月均无呼吸道症状,肺部体检正常,胸片正常。两组在年龄构成、性别以及病程之间差异无统计学意义(表 1~2)。

表 1 RMPP 组与对照组患儿一般资料比较					
组别	例数	年龄(岁)			性别(例) (男/女)
		0~	4~	7~14	
对照组	12	2	6	4	7/5
RMPP 组	42	9	21	12	24/18
χ^2 值		0.175			0.133
P 值		0.916			0.715

1.2 入选标准

- (1)符合实用儿科学第七版肺炎诊断标准^[5];
- (2)起病 4 周内双份血清 MP 抗体的滴度有 4 倍以

上升高^[6];(3)行纤维支气管镜检查并留有灌洗液标本;(4)符合以下诊断标准^[7]3 项中任意一条为 RMPP:①经规范的大环内酯类抗生素治疗,仍持续高热超过 10 d 以上,剧烈咳嗽影响睡眠;②影像学表现为双侧或单侧大叶高密度肺实变,合并中、大量胸腔积液,甚至出现坏死性肺炎表现,或表现为双侧弥漫性间质性肺浸润;③合并肝脏、心肌等肺外脏器损害,可发生肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。本研究获得患儿家长的知情同意。

表 2 RMPP 组内亚组患儿一般资料比较						
组别	例数	年龄(岁)			性别(例) (男/女)	病程(d) (中位数)
		0~	4~	7~14		
特应性组	11	3	5	3	6/5	5~32(10)
非特应性组	31	6	16	9	16/15	2~28(10)
$U(\chi^2)$ 值		(3.080)			(0.028)	60.6
P 值		0.857			0.867	0.499

1.3 方法

- 1.3.1 血清学 MP 抗体检查 采用明胶颗粒载体的间接凝集试验检测 MP 特异性抗体(日本富士 SERODIA -MYCOII 试剂盒)。动态采集血标本,以双份血清 MP 抗体 4 倍及以上增高确诊为 MP 感染。
- 1.3.2 纤维支气管镜检查 所有患儿均采用局部麻醉下纤维支气管镜检查。根据年龄大小和术中具体情况选择日本 Olympus 公司生产的 BF-3C40 或 BF-P60 型号纤维支气管镜进行镜检,先进入非病变部位,再进入病变部位。纤维支气管镜先端插入病变气道,嵌入管腔内(灌洗部位多选择病变严重肺段,病变范围比较广泛者则选右肺中叶,小婴儿选择右下叶),以 37℃生理盐水(体重小于 20 kg 者每次灌洗量 1 mL/kg,体重大于 20 kg 者每次灌洗量 20 mL)进行支气管肺泡灌洗 3 次。随即以负压 13.3~20 kPa(100~150 mm Hg)进行抽吸以获取灌洗液标本入灭菌痰液收集器。回收率 >40%,无大气道分泌物混入,红细胞 <20% 视为合格标本。第一管送培养、病原学检查;第二管送细胞学检查;第三管及时处理标本后置于 -80℃冰箱保存,以备 IL-4、INF- γ 检测。
- 1.3.3 细胞学成分分析 细胞活力以台盼蓝染色排除法评判;计细胞总数应用尿沉渣分析仪,结果以 $\times 10^6/\text{mL}$ 表示;分类计数细胞涂片的制备采用离心涂片法,以瑞士-姬姆萨染色法染色,每张涂片计数 200 个细胞,取两张涂片的平均值。取原液 0.5 mL 作 Giemsa、Gram 染色,以检查胞内微生物。
- 1.3.4 INF- γ 和 IL-4 的检测 第三管 BALF 全部分装于 1.5 mL 离心管中,12000 r/min 离心

5 min,留取上清液并保存于-80℃冰箱。ELISA 试剂盒(R&D 公司)检测 IL-4、INF-γ。对每份 BALF 标本同时检测蛋白(protein,Pr)含量;BALF 中 IL-4、INF-γ 检测值与 BALF 蛋白含量比值为最后实验结果,以排除 BALF 浓度因素影响,表示为 pg·mL⁻¹/Pr。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。组间构成比的比较采用χ² 检验;计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中正态分布资料采用 F 检验,各组间多重比较采用 LSD 法,偏态分布资料采用非参数秩和检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RMPP 组与对照组 BALF 细胞学成分分析

与对照组比较,RMPP 患儿 BALF 细胞总数、中性粒细胞、上皮细胞比例均有上升,差异有统计学意义(*P* < 0.05);其中以中性粒细胞升高为甚(*P*

<0.01);两组嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞比例差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 3。

2.2 IL-4 和 INF-γ 的检测结果

2.2.1 RMPP 与对照组 INF-γ 和 IL-4 含量的比较

RMPP 组 BALF 中 INF-γ 和 IL-4 含量较对照组均有显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);两组 INF-γ/IL-4 比值差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 4。

2.2.2 RMPP 特应性组、非特应性组及对照组 INF-γ 和 IL-4 含量的比较

3 组间 INF-γ 和 IL-4 含量的差异有统计学意义(*P* < 0.05)。与对照组比较,特应性组 BALF 中 INF-γ、IL-4 有显著升高(分别 *P* = 0.009,0.006);非特应性组 BALF 中 INF-γ 较对照组有显著升高(*P* = 0.040),IL-4 有升高但差异无统计学意义(*P* = 0.064)。与非特应性组比较,特应性组 BALF 中 INF-γ、IL-4 均升高,但差异无统计学意义(分别 *P* = 0.376,0.192)。各组间 INF-γ/IL-4 比值比较差异无统计学意义(*P* = 0.391)。见表 5。

表 3 RMPP 组与对照组中 BALF 细胞总数及分类计数的比较 (中位数及范围)

组别	例数	细胞总数(×10 ⁶ /mL)	巨噬细胞(%)	淋巴细胞(%)	中性粒细胞(%)	嗜酸性粒细胞(%)	上皮细胞(%)
对照组	12	0.5(0.4~1.1)	90.8(85.1~94.4)	4.1(3.1~5.7)	1.9(1.1~4.1)	0.3(0~0.9)	1.0(0.5~2.4)
RMPP 组	42	1.7(1.1~2.0)	86.2(79.1~90.1)	3.4(1.6~4.9)	12.1(1.6~17.8)	0.6(0~1.1)	2.7(1.0~4.2)
<i>U</i> 值		32.0	47.0	48.0	15.5	56.5	25.0
<i>P</i> 值		0.022	0.127	0.086	0.003	0.673	0.035

表 4 RMPP 组与对照组 BALF 中 INF-γ、IL-4 及 INF-γ/IL-4 比值结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	INF-γ	IL-4	INF-γ/IL-4
		(pg·mL ⁻¹ /Pr)	(pg·mL ⁻¹ /Pr)	
对照组	12	39±4	60±12	0.69±0.08
RMPP 组	42	95±42	138±59	0.70±0.09
<i>t</i> 值		-2.287	-2.258	-0.102
<i>P</i> 值		0.037	0.042	0.920

表 5 特应性组、非特应性组及对照组 BALF 中 INF-γ、IL-4 及 INF-γ/IL-4 比值结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	INF-γ	IL-4	INF-γ/IL-4
		(pg·mL ⁻¹ /Pr)	(pg·mL ⁻¹ /Pr)	
对照组	12	39±4	60±12	0.69±0.08
特应性组	11	107±49 ^a	163±65 ^a	0.66±0.12
非特应性组	31	86±35 ^a	120±43	0.72±0.06
<i>F</i> 值		4.435	4.803	0.980
<i>P</i> 值		0.024	0.019	0.391

a:与对照组比较,*P* < 0.05

3 讨论

本研究发现与对照组相比,RMPP 患儿 BALF 细胞数显著增加,尤以中性粒细胞为甚,说明 MP 感染引起中性粒细胞在局部聚集、激活,在 RMPP 发生、发展中起一定作用。RMPP 患儿 BALF 中上皮细胞增多,可能与 MP 感染导致受累部位的气管壁及细支气管壁水肿、溃疡形成,严重者可导致气道上皮剥脱有关。另外,在一项儿童急性 MP 感染研究中发现 MP 感染后存在短期不明机制的免疫抑制现象^[8]。本研究中 RMPP 患儿 BALF 中淋巴细胞减少,是否可能与 MP 感染后存在短期不明机制的免

疫抑制现象有关,有待进一步研究。本研究中,BALF 中嗜酸性粒细胞百分比未见明显升高,与刘芳^[9]的研究结果相一致。BALF 中细胞分类的改变表明,RMPP 感染可导致感染部位淋巴细胞减少及中性粒细胞增加,从而导致局部的炎症反应。

辅助性 T 细胞(Th 细胞)的分化紊乱导致 Th1/Th2 型免疫应答失衡,Th2 型优势应答在哮喘的发生、发展过程中发挥了重要作用^[10]。INF-γ 主要由 Th1 细胞产生,调节感染后人体的细胞免疫;IL-4 主要由 Th2 细胞分泌,调节感染后人体的体液免疫反

应,它使免疫系统向 Th2 依赖的过敏反应方向发展,与过敏性疾病(如哮喘)有关^[11]。

MP 感染后机体可以产生和哮喘类似的细胞因子,这是目前认为 MP 感染和哮喘相关的主要原因之一。在对 MP 感染后 INF- γ 及 IL-4 的水平变化研究中,存在很多的不同意见。Koh 等^[12]研究发现,支原体肺炎组中 INF- γ 水平较对照组无改变,IL-4 和 IL-4/INF- γ 值较肺炎链球菌组和对组明显升高,故认为 MP 感染时 Th2 型细胞因子的分泌增加,存在 Th1/Th2 失衡的可能。我国潘薇等^[13]研究显示,支原体肺炎组患儿血清 INF- γ 、IL-4 水平均高于对照组。Choi 等^[14]发现,MP 感染患儿与其他无喘息的非 MP 感染患儿血清 INF- γ 、IL-4 水平无明显差异。还有研究者发现,MP 感染后 INF- γ 和 IL-4 均有不同程度的升高,其中 INF- γ 15 d 达高峰,而 IL-4 于感染后 38 d 达高峰,显示由 Th1 向 Th2 为主免疫反应的转变^[10]。

本研究结果显示 RMPP 组患儿 BALF 中 INF- γ 、IL-4 较对照组均有显著升高,INF- γ /IL-4 比值较对照组差异无统计学意义,提示在该组患儿中感染 MP 后机体的细胞免疫及体液免疫均有上升,但未能证实出现由 Th1 向 Th2 的极化偏向。特应性组 BALF 中 INF- γ 、IL-4 较对照组有显著升高;非特应性组 BALF 中 INF- γ 较对照组明显升高,但 IL-4 差异无统计学意义;各组间 INF- γ /IL-4 比值差异无统计学意义。虽然特应性组与非特应性组的比较中没得到有统计学意义的结果,但还是发现,与对照组比较,特应性组中 IL-4 的升高较非特应性组明显,特应性组中 INF- γ /IL-4 比值有所下降。因此,有必要进一步扩大样本量进行观察。本研究结果提示 RMPP 患儿 INF- γ 水平增高,与 Koh 等^[12]发现支原体肺炎组 INF- γ 水平较对照组无差异不同,其原因一方面可能是:目前有部分研究发现在 MP 感染重症病例中血清 INF- γ 水平明显高于轻症病例^[15],本研究选取的研究对象为 RMPP 患儿,而在 Koh 等的研究中并未对观察对象的病情进行限定;另一方面:两研究的病例样本量均不大,这可能使结论的可靠性下降。对于 INF- γ /IL-4 比值的分析,在 Chu 等^[16]进行的动物实验中,先暴露于 MP 感染或先暴露于过敏原的两组动物模型 BALF 中 INF- γ /IL-4 比值的水平不同,而且即使是同一组别中,在不同时段 INF- γ /IL-4 比值亦有不同。本研究中 BALF 标本的留取均在感染的急性期,而且病程上并不完全一致,况且因纤维支气管镜检测的限制,仅少数患儿有接受再次或多次灌洗治疗,因此不能动态观察 BALF

中 INF- γ /IL-4 比值的变化。以上因素均使本研究 INF- γ /IL-4 比值的结果可能存在局限性。

总之,本研究发现,RMPP 患儿 BALF 细胞数显著增加,尤以中性粒细胞为甚;INF- γ 、IL-4 水平明显升高,但 INF- γ /IL-4 比值无变化,提示 RMPP 患儿病变局部炎症反应明显,但尚不能证实 RMPP 患儿存在 Th2 占主导的炎症反应。

参 考 文 献

- [1] Ou CY, Tseng YF, Chiou YH, Nong BR, Huang YF, Hsieh KS. The role of *Mycoplasma pneumoniae* in acute exacerbation of asthma in children[J]. Acta Paediatr Taiwan, 2008, 49(1): 14-18.
- [2] Kraft M, Cassell GH, Henson JE, Watson H, Williamson J, Marmion BP, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the airways of adults with chronic asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(3): 998-1001.
- [3] Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. Future Microbiol, 2008, 3(6): 635-648.
- [4] Waites KB. New concepts of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children[J]. Pediatric Pulmonol, 2003, 36(4): 267-278.
- [5] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1180.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(试行)(下)[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(3): 225-226.
- [7] 曹兰芳. 儿童难治性肺炎支原体肺炎的诊治现状和进展[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(1): 94-97.
- [8] Stelmach I, Podsiadłowicz-Borzecka M, Grzelewski T, Majak P, Stelmach W, Jerzyńska J, et al. Humoral and cellular immunity in children with *Mycoplasma pneumoniae* infection: a 1-year prospective study[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(10): 1246-1250.
- [9] 刘芳. 肺炎支原体肺炎患儿支气管肺泡灌洗液 T 细胞活化状态的变化及意义[D]. 浙江大学医学院, 2009.
- [10] 吴淑慧, 孙武, 郭建国. 支气管哮喘与细胞免疫[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(15): 1193-1196.
- [11] 吴健, 徐军, 钟南山. BCG 与变应性哮喘 Th1/Th2 平衡[J]. 国外医学(呼吸系统分册), 2001, 21(3): 151-156.
- [12] Koh YY, Park Y, Lee HJ, Kim CK. Levels of interleukin-2, interferon- γ , and interleukin-4 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with *mycoplasma pneumoniae*: implication of tendency toward increased immunoglobulin E production[J]. Pediatrics, 2001, 107(3): E39.
- [13] 潘薇, 许忠, 郑百红. 肺炎支原体肺炎患儿急性期外周血 INF- γ 、IL-4 的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(5): 373-375.
- [14] Choi IS, Byeon JH, Yoo Y, Lee KC, Choung JT. Increased serum interleukin-5 and vascular endothelial growth factor in children with acute *mycoplasma pneumoniae* and wheeze[J]. Pediatr Pulmonol, 2009, 44(5): 423-428.
- [15] 左慧敏, 刘秀云, 江载芳. 白介素-8、白介素-10 及 γ -干扰素在肺炎支原体肺炎中的作用[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(4): 269-271.
- [16] Chu HW, Honour JM, Rawlinson CA, Harbeck RJ, Martin RJ. Effects of respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection on allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and lung inflammation in mice[J]. Infect Immun, 2003, 71(3): 1520-1526.

(本文编辑:邓芳明)