

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.12.005

论著·临床研究

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞与 IL-33 在儿童哮喘发病机制中的作用

潘珍珍 李玲 郭赞 贺建

(南京医科大学附属无锡市儿童医院呼吸内科, 江苏 无锡 214000)

[摘要] **目的** 探讨 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 与 IL-33 在儿童哮喘发病中的作用。**方法** 采用流式细胞仪检测 45 例哮喘患儿 (哮喘组)、50 例呼吸道合胞病毒感染喘息患儿 (喘息组) 及 40 例健康儿童 (对照组) 外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞百分比, 采用 ELISA 法检测各组外周血血清 IFN- γ 、IL-4、IL-5 及 IL-33 浓度, 进行比较分析。**结果** 哮喘组患儿体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平较喘息组及对照组均降低 ($P<0.05$), 哮喘组患儿体内 IL-33 水平较喘息组及对照组均升高 ($P<0.05$), 哮喘组患儿体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-33 呈负相关 ($r=-0.156$, $P<0.01$)。**结论** 在哮喘患儿发病机制中, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-33 可能存在相互作用。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(12): 1211-1214]

[关键词] CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞; IL-33; 哮喘; 儿童

Roles of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and IL-33 in the pathogenesis of asthma in children

PAN Zhen-Zhen, LI Ling, GUO Yun, HE Jian. Department of Respiratory, Wuxi Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214023, China (Li L, Email: sy3334@sina.com)

Abstract: Objective To study the roles of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) and IL-33 in the pathogenesis of asthma in children. **Methods** Flow cytometry was used to detect peripheral blood CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg proportion in CD4⁺T lymphocytes in 45 children with asthma, 50 children with wheezing caused by respiratory syncytial virus infection and 40 healthy children. Serum levels of IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-33 were measured using ELISA. **Results** The level of peripheral blood CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg in the asthma group was significantly lower than in the wheezing and control groups ($P<0.05$). In contrast, serum levels of IL-33 in the asthma group was significantly higher than in the wheezing and control groups ($P<0.05$). Peripheral blood CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg level was negatively correlated with serum IL-33 level in the asthma group ($r=-0.156$, $P<0.01$). **Conclusions** CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg may interact with IL-33 in the pathogenesis of childhood asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(12): 1211-1214]

Key words: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell; IL-33; Asthma; Child

支气管哮喘 (简称哮喘) 是淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞等多种炎性细胞及细胞因子参与的一种慢性呼吸道炎症, 目前发病机制尚不完全清楚。随着人们对 T 淋巴细胞及其相关细胞因子研究的不断深入及炎症因子诱导 T 细胞分化机制的进一步阐明, 调控气道 T 淋巴细胞失衡及相关炎症因子表达将是哮喘防治的一个重要方向。

有研究发现, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 能够抑制免疫, 在维持 Th1/Th2 平衡中具有重要作用; 而 IL-33 是能够增加 Th2 分泌的细胞因子, 在诱导哮喘发病中的作用亦不可或缺^[1-2]。目前关于 Treg 与儿童支气管哮喘之间关系的研究刚刚起步, IL-33 在哮喘方面的研究亦较少, 关于两者是如何相互作用的将是我们进一步研究的内容之一。故

[收稿日期] 2014-04-14; [接受日期] 2014-07-17

[作者简介] 潘珍珍, 女, 硕士研究生, 住院医师。

[通信作者] 李玲, 女, 副主任医师。

本研究拟对 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 及 IL-33 在控制哮喘免疫应答中的调节机制进行探索,以期找到控制哮喘的新途径。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年10月至2011年3月在我院呼吸内科门诊就诊的哮喘急性发作期患儿45例和因呼吸道合胞病毒(RSV)感染致喘息的患儿50例为研究对象。哮喘组男25例,女20例,年龄范围1~12岁,中位年龄4.1岁,未予激素及其他治疗,近期无RSV感染(血清RSV-IgM阴性);喘息组男24例,女26例,年龄范围1~11岁,中位年龄4.2岁,均为首次发病,所有患儿明确为RSV近期感染(血清RSV-IgM阳性,RSV-IgG阴性),且均未合并腺病毒、巨细胞病毒及肺炎支原体的近期感染。以上两组患儿均为足月适龄儿,无产伤及窒息史,排除先天性心脏病、心肺发育不全及免疫缺陷等其他疾病,诊断标准参照《诸福棠实用儿科学》(第7版)。另选取同期在我院儿童保健科门诊行健康体检的儿童40例作为健康对照组,其中男20例,女20例,年龄范围3~10岁,中位年龄4.0岁,该组儿童近两周内无呼吸道感染病史及服药史,无过敏性疾病及其他慢性病史,家族内无过敏及哮喘史。

1.2 标本的采集

采集各组儿童的肝素锂抗凝外周血2 mL,提取外周血单核细胞(PBMC),一半用于流式细胞仪检测,另一半用于RT-PCR检测。另采集分离胶促凝外周血2 mL,室温静置30 min后,1700 r/min离心5 min,取上清于0.5 mL离心管中,储存于-70℃冰箱中待用。

1.3 流式细胞仪检测

用200 μL PBS重悬并调节PBMC浓度为 1×10^7 /mL。取100 μL细胞悬液,加入20 μL CD4-FITC和20 μL CD25-APC单克隆抗体(BD Pharmingen公司,美国),避光反应20 min;加入2 mL PBS,250 g离心10 min,弃上清;加2 mL固定液(BD Pharmingen公司),避光反应10 min;500 g离心5 min,弃上清;加入2 mL PBS,500 g离心5 min,弃上清;加0.5 mL破膜剂(BD

Pharmingen公司),避光反应30 min;加入2 mL PBS,500 g离心5 min,弃上清;重复洗涤1次;加20 μL Foxp3-PE(BD Pharmingen公司),避光反应30 min;加入2 mL PBS,500 g离心5 min,弃上清;加入适量PBS后上流式细胞仪检测。

1.4 RT-PCR检测

取 3×10^6 PBMC细胞,根据说明书用TRIzol提取总RNA,定量后取1 μg RNA,DNA酶I处理后逆转录,取cDNA产物4 μL进行PCR。扩增引物由上海生工生物科技有限公司设计合成,目的基因Foxp3上游引物:5'-CAGCACATTCCCAG-AGTTCCTC-3',下游引物:5'-GCGTGTGAACCAGTG-GTAGATC-3',片段长度154 bp;内参基因β-actin上游引物:5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCTC-3',下游引物:5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3',片段长度106 bp。PCR反应体系(25 μL):PCR buffer 2.5 μL,dNTP 2.0 μL,Mg²⁺ 1.5 μL,cDNA 1 μL,上下游引物各0.5 μL,Taq酶0.2 μL,加灭菌水至25 μL。PCR反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,68℃退火30 s,72℃延伸60 s,共40个循环;72℃再延伸10 min。PCR产物于2%琼脂糖凝胶上进行电泳,结果以目的基因Foxp3与内参基因β-actin的吸光度值比表示。

1.5 ELISA检测

采用ELISA法检测各组血清IFN-γ、IL-4、IL-5和IL-33水平,试剂盒均购自Bender MedSystems公司(奥地利)。所有步骤严格按照说明书执行。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析;采用Pearson相关系数法进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组T淋巴细胞亚群比例比较

哮喘组CD4⁺、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞百分比均低于喘息组及对照组($P < 0.05$);喘息组CD4⁺细胞百分比高于对照组,而CD4⁺CD25⁺和CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞百分比均

低于对照组 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组 T 淋巴细胞亚群比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg
对照组	40	29.5 ± 6.9	7.1 ± 1.9	4.3 ± 1.7
喘息组	50	34.2 ± 9.0 ^a	5.3 ± 3.0 ^a	1.9 ± 0.7 ^a
哮喘组	45	28.5 ± 8.1 ^{a,b}	3.9 ± 1.7 ^{a,b}	0.8 ± 0.6 ^{a,b}
F 值		5.791	11.102	122.522
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与喘息组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组外周血细胞因子浓度比较

各组外周血 IFN- γ 和 IL-4 浓度比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；哮喘组 IL-33 和 IL-5 水平均高于喘息组和对照组 ($P<0.05$)，但喘息组和对照组间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组外周血细胞因子浓度比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	例数	IFN- γ	IL-4	IL-33	IL-5
对照组	40	29 ± 19	25 ± 16	102 ± 22	73 ± 24
喘息组	50	22 ± 22	51 ± 38	67 ± 10	90 ± 54
哮喘组	45	26 ± 14	41 ± 25	423 ± 89 ^{a,b}	152 ± 67 ^{a,b}
F 值		1.435	1.469	13.696	4.807
P 值		>0.05	>0.05	<0.01	<0.05

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与喘息组比较, $P<0.05$ 。

2.3 相关性分析

哮喘组患儿体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-4、IL-5 水平呈负相关 (分别 $r=-0.325$ 、 -0.287 , 均 $P<0.01$)，IL-33 水平与 IL-4、IL-5 呈正相关 (分别 $r=0.214$ 、 0.158 , 均 $P<0.01$)，CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-33 呈负相关 ($r=-0.156$, $P<0.01$)。

喘息组患儿体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-4、IL-5 水平呈负相关 (分别 $r=-0.205$ 、 -0.160 , 均 $P<0.05$)，IL-33 水平与 IL-4、IL-5 无明显相关性 (P 均 >0.05)，CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-33 亦无明显相关性 ($P>0.05$)。

3 讨论

支气管哮喘在儿童中的发病率日趋增高，

70%~80% 的儿童哮喘发病于 5 岁以前，约 20% 的患儿有家族史、特应性体质。随着对过敏性疾病和 T 细胞研究的深入，单纯的 Th1/Th2 平衡并不足以解释过敏性哮喘的发病^[3]，尚应考虑 Treg 与 Th1/Th2 失衡的关系。

Treg 是一类调节或抑制其它免疫细胞功能的细胞，在支气管哮喘中的重要作用得到逐渐认识，在多种免疫性疾病中发挥重要作用。Foxp3 作为一种特殊的转录因子特异地高表达于 CD4⁺CD25⁺Treg 上，可反映 CD4⁺CD25⁺Treg 活性水平^[4]。在本研究中，哮喘组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例较对照组及喘息组低，喘息组较对照组稍低，由此可以说明哮喘的发作机制可能与 Treg 含量降低有关。而哮喘组患儿体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-4、IL-5 水平呈负相关，由此可见，Treg 作为具有调节功能的 T 细胞，有降低 Th2 型细胞因子的作用。可以推测，Treg 表达降低将引起 Th1 型细胞因子分泌减少，Th2 型细胞因子分泌增多，导致 Th1/Th2 比例失衡，诱发哮喘。RSV 感染引起的喘息患儿体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-4、IL-5 水平亦呈负相关，且 Treg 表达降低，但不如哮喘组明显，说明病毒感染诱发的喘息在发病方面与哮喘具有共同机制。

另哮喘的发病和诸多免疫细胞、众多细胞因子、多种生物介质以及遗传因素有关^[5]。IL-33 是近年来受到广泛重视的具有多种生物学功能的细胞因子，为 IL-1 家族新成员，能调节 Th2 的分化与功能^[6]。IL-33 的受体 ST2 选择性地 Th2 细胞上表达，而在 Th1 上不表达。IL-33 能通过主动募集 Th2 细胞到炎症位点，而使 IL-33 在维持慢性炎症中起关键的作用^[7]。在体外实验中发现，重组人 IL-33 与 Th2 细胞孵育能增加 Th2 细胞产生 IL-4 和 IL-5，而与 Th1 细胞孵育能降低 Th1 细胞产生 IFN- γ 的水平^[8]。本研究结果得知，哮喘组 IL-33 浓度明显高于对照组，哮喘组患儿体内 IL-33 水平与 IL-4、IL-5 呈正相关，由此可知，哮喘发病可能亦与 IL-33 水平增高有关，IL-33 引起 Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-5 分泌增多，引起哮喘发病。RSV 感染引起的喘息患儿中 IL-33 水平较对照组并无明显改变，且相关性分析显示 IL-33 与 IL-4、IL-5 无明显相关性，提示病毒感染引起的喘息中 IL-33 作用较小，或者 IL-33 作用被中和。

由此引出本文的猜测, IL-33 与 Treg 之间是否有相互作用而诱导哮喘的发病?

目前对于 IL-33 的研究较多的是类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎感染、心血管疾病、糖尿病、肿瘤等^[9]。在哮喘和过敏反应的动物实验和体外研究中证实, 减弱 IL-33 的分泌可以减轻疾病相关症状^[10]。关于哮喘患者外周血 IL-33 变化的临床研究不多, 麻晓燕等^[11]对哮喘患者外周血及痰液中 IL-33 分析后发现, 哮喘患者的 IL-33 显著升高, 与本研究结果相符。

本研究 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 IL-33 的相关性分析显示, 哮喘组 Treg 比例与 IL-33 呈负相关, 那么它们是如何相互作用的有待进一步研究。Ayyoub 等^[12]的研究结果表明, 较高浓度的 IL-1 可与 IL-2 协同, 诱导 Treg 细胞转化为 Th17 细胞, 并且下调 Treg 细胞的 Foxp3 表达和抑制功能, 由此我们猜测作为 IL-1 家族成员的 IL-33 可能通过影响 Treg 分化, 从而诱发哮喘。

综上所述, 哮喘发病与 Treg 表达降低有关, Treg 表达降低可引起 Th1 型细胞因子分泌减少, Th2 型细胞因子分泌增多, 导致 Th1/Th2 比例失衡, 诱发哮喘。RSV 感染诱发的喘息在 Treg 发病方面与哮喘具有共同机制。哮喘发病亦与 IL-33 水平增高有关, IL-33 引起 Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-5 分泌增多, 引起哮喘发病。病毒感染引起的喘息中 IL-33 作用较小, 或者 IL-33 作用被中和。哮喘患儿体内 Treg 比例与 IL-33 呈负相关, 说明二者在诱发哮喘方面确有相互关系, 猜测作为 IL-1 家族成员的 IL-33 可能通过影响 Treg 分化, 从而诱发哮喘。它们是如何相互作用的有待进一步研究。

志谢: 感谢无锡市人民医院检验科张健老师在收集标本中给予的帮助。感谢无锡市人民医院中心实验室穆会君老师、殷莹老师等在本实验中给予的悉心指导。感谢邢朝凤、潘姗姗学妹在实验过程中给予的帮助。

[参 考 文 献]

- [1] Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate nuclear factor-kappa B through toll-like receptors 1 and 2[J]. *Immunology*, 2007, 121(4): 473-483.
- [2] 阳艳丽, 潘玉琴, 何帮顺, 等. 哮喘患儿外周血调节性 T 细胞和 Th1/Th2 的变化及其与哮喘病情的关系 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(6): 482-485.
- [3] 康妍萌, 丁明杰, 韩玉玲, 等. 重症肺炎支原体肺炎患儿肺泡灌洗液中 Th1/Th2 细胞免疫应答状况的研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(3): 188-190.
- [4] Zhang M, Qian YY, Chai SJ, et al. Enhanced local Foxp3 expression in lung tissue attenuates airway inflammation in a mouse model of asthma[J]. *J Asthma*, 2014, 51(5): 451-458.
- [5] Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, et al. Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia model: a microbiologic, histologic, immunologic, and respiratory plethysmographic profile[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(6): 3869-3876.
- [6] Baba S, Kondo K, Kanaya K, et al. Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *Laryngoscope*, 2014, 124(4): E115-E122.
- [7] Stelmaszczyk-Emmel A, Zawadzka-Krajewska A, Szypowska A, et al. Frequency and activation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in peripheral blood from children with atopic allergy[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2013, 162(1): 16-24.
- [8] 魏明, 涂玲, 梁颖红, 等. 臭氧暴露对 CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺T 调节性淋巴细胞数量和 Foxp3 mRNA 表达的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2013, 31(9): 693-696.
- [9] Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, et al. Th2, allergy and group 2 innate lymphoid cells[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(6): 536-542.
- [10] Saglani S, Lui S, Ullmann N, et al. IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(3): 676-685.
- [11] 麻晓燕, 罗雅玲, 赖文岩. 支气管哮喘患者外周血、痰液中 IL-33 的含量及其相关性分析 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(14): 1526-1529.
- [12] Ayyoub M, Raffin C, Valmori D. Generation of Th17 from human naive CD4⁺ T cells preferentially occurs from FOXP3⁺ Tregs upon costimulation via CD28 or CD5[J]. *Blood*, 2012, 119(20): 4810-4812.

(本文编辑: 万静)