

川崎病患儿急性期外周血 Th9 细胞与 细胞因子 IL-9 的变化及临床意义

孙瑞丽 朱淑霞 张燕燕 武艺飞 王行健

(滨州医学院附属医院儿科, 山东 滨州 256600)

[摘要] **目的** 探讨辅助性 T 细胞 9 (Th9) 及其细胞因子白细胞介素-9 (IL-9) 在川崎病 (KD) 患儿急性期外周血的表达及临床意义。**方法** 选取 2014 年 4 月至 2015 年 7 月 45 例急性期川崎病患儿进行研究, 并且对其进行恢复期随访; 另取健康体检儿童 45 例作为对照组。采用流式细胞术检测外周血 Th9 水平及酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清 IL-9 水平。**结果** KD 患儿急性期 Th9 及 IL-9 水平明显高于恢复期和对对照组 ($P<0.05$); 而恢复期患儿与对照组的 Th9、IL-9 水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。急性期的 Th9 与 CRP、PCT、ESR、PLT 及球蛋白水平呈正相关 ($r=0.324、0.402、0.382、0.467、0.386$, 均 $P<0.05$), 与血清白蛋白呈负相关 ($r=-0.306$; $P<0.05$); IL-9 水平与 CRP、PCT、ESR、PLT、球蛋白水平呈正相关 ($r=0.365、0.456、0.403、0.423、0.453$, 均 $P<0.05$), 与血清白蛋白呈负相关 ($r=-0.343$; $P<0.05$)。**结论** KD 患儿急性期外周血 Th9 细胞及其细胞因子 IL-9 水平明显升高, 恢复期降至正常; 且 Th9 表达及 IL-9 水平与急性期指标密切相关。推测 Th9 细胞与 IL-9 在 KD 的发病及转归过程起重要作用。**[中国当代儿科杂志, 2016, 18(8): 721-725]**

[关键词] 川崎病; 辅助性 T 细胞 9; 白细胞介素-9; 儿童

Changes in peripheral blood T helper 9 cells and interleukin-9 in children in the acute stage of Kawasaki disease

SUN Rui-Li, ZHU Shu-Xia, ZHANG Yan-Yan, WU Yi-Fei, WANG Xing-Jian. Department of Pediatrics, Binzhou Medical College, Binzhou, Shandong 256600, China (Zhu S-X, Email: zhuxs@163.com)

Abstract: Objective To investigate the changes in the expression levels of peripheral blood T helper 9 (Th9) cells and cytokine interleukin-9 (IL-9) in children in the acute stage of Kawasaki disease (KD) and their clinical significance. **Methods** A total of 45 children in the acute stage of KD who were treated from April 2014 to July 2015 were enrolled, and the children were followed up in the recovery stage. Another 45 healthy children who underwent physical examination were enrolled as the control group. Flow cytometry was used to measure the percentage of peripheral blood Th9 cells, and ELISA was used to measure the serum level of IL-9. **Results** The children in the acute stage of KD showed a significantly higher percentage of Th9 cells and a significantly higher serum level of IL-9 compared with those in the recovery stage and the control group ($P<0.05$). The percentage of Th9 cells and serum level of IL-9 showed no significant differences between the children in the recovery stage and those in the control group ($P>0.05$). In the acute stage, the percentage of Th9 cells was positively correlated with the levels of IL-9, C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), erythrocyte sedimentation rate (ESR), platelet count (PLT), and globulin ($r=0.624, 0.324, 0.402, 0.382, 0.467$, and 0.386 respectively, all $P<0.05$), but negatively correlated with serum albumin ($r=-0.306$, $P<0.05$). The serum level of IL-9 was positively correlated with the levels of CRP, PCT, ESR, PLT, and globulin ($r=0.365, 0.456, 0.403, 0.423$, and 0.453 respectively, all $P<0.05$), but negatively correlated with serum albumin ($r=-0.343$, $P<0.05$). **Conclusions** The children in the acute stage of KD show significant increases in the percentage of peripheral Th9 cells and serum cytokine IL-9 level, which return to normal in the recovery stage. In the acute stage of KD, the expression levels of Th9 and IL-9 are closely correlated with laboratory markers. The results suggest that Th9 cells and IL-9 play important roles in the pathogenesis and outcome of KD. **[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(8): 721-725]**

Key words: Kawasaki disease; T helper 9 cell; Interleukin-9; Child

[收稿日期] 2016-02-26; **[接受日期]** 2016-05-26

[作者简介] 孙瑞丽, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 朱淑霞, 女, 副主任医师。

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 又称皮肤粘膜淋巴结综合征, 是一种好发于5岁以下儿童的急性发热出疹性疾病, 常伴有冠状动脉损害^[1]。其发病机制尚不清楚, 目前考虑该病与免疫紊乱引起的炎症因子及趋化因子异常增高有关。研究发现, 辅助性T细胞 (T helper cells, Th) 在KD的发病中起着重要作用, Th9是近年来发现的一种新型辅助性T细胞亚群, 特征性分泌白介素-9 (IL-9), 在多种自身免疫性疾病、过敏性疾病及感染性疾病中发挥重要作用, 主要机制是促使炎症细胞活化, 分泌相关炎症因子及趋化因子, 并产生级联反应从而导致炎症损伤。那么, KD作为一种自身免疫紊乱导致的血管炎性疾病, Th9细胞及IL-9是否在该病的发生发展及转归中发挥作用, 目前尚未见报道。本研究通过检测KD患儿急性期外周血Th9细胞及IL-9的表达, 探讨两者在KD发病过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年4月至2015年7月于滨州医学院附属医院儿科初诊且处于急性期 (病程7d内) 的45例KD患儿, 年龄3个月至5岁, 平均年龄为 1.7 ± 0.8 岁, 其中男性25例、女性20例; 并对39例患儿进行了恢复期 (病程21~60d) 随访。所有患儿急性期均有发热, 皮疹40例, 颈部非化脓性淋巴结肿大30例, 眼结合膜充血32例, 草莓舌35例, 手足硬性水肿20例。同期健康体检儿童45例作为对照组, 年龄5个月至6岁, 平均年龄 2.0 ± 0.9 岁, 其中男性22例、女性23例。KD组与对照组性别、年龄比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.401$ 、 $t=0.824$, $P>0.05$)。并收集患者入院时的C反应蛋白 (CRP)、降钙素原 (PCT)、血沉 (ESR)、血小板 (PLT)、球蛋白、血浆白蛋白。本研究获得患儿监护人知情同意及医院伦理委员会批准。

1.2 纳入标准

川崎病诊断及分期符合川崎病诊断指南第5次修订版标准^[2-3]。入院前均未予免疫球蛋白及阿司匹林等任何治疗, 入院前2周内未使用过免疫抑制剂及激素类药物; 排除其他感染性、过敏性

及自身免疫性疾病。

1.3 流式细胞术检测外周血Th9表达

KD组在急性期 (病程7d内, 接受阿司匹林及大剂量丙种球蛋白治疗之前)、恢复期 (病程21~60d) 以及健康对照组分别清晨空腹采集静脉血4mL, 置于促凝管, 2mL血离心后取血清冻存于-80℃冰箱待测IL-9; 另外2mL血经Ficoll密度梯度离心法分离单个核细胞 (PBMC), 显微镜下计数, 用含10%胎牛血清的1640培养基调整细胞密度为 5×10^6 /mL, 依次加入佛波酯、离子霉素、莫能菌素刺激, 终浓度分别为50 ng/mL, 1 μ g/mL, 1 μ g/mL。于37℃、5% CO₂培养箱中培养6h, PBS洗涤2次, 每 1×10^6 /mL细胞中分别加入别藻蓝蛋白 (APC) - 抗人CD3抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) - 抗人CD8抗体各5 μ L进行荧光标记抗体表面染色, 再4℃避光孵育30 min。然后进行细胞固定、破膜、细胞内染色, 每 1×10^6 /mL细胞和阴性对照管均加入抗IL-9-藻红蛋白5 μ L、同样荧光标记的非特异性同型抗体IgG 5 μ L。4℃避光孵育25 min, 再次用PBS洗涤2次, 固定, 等待检测。CD3⁺CD8⁻IL-9⁺T细胞即为外周血Th9细胞。

1.4 ELISA法检测细胞因子IL-9

将冻存于-80℃的血清常温下放置30 min, 运用ELISA试剂盒 (美国Rapid BioLab公司) 检测IL-9, 操作按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析

所有数据均采用SPSS 22.0软件进行分析处理, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 组间均数比较采用 t 检验; 相关性分析采用Spearman相关性分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组儿童外周血Th9细胞比例比较

KD急性期Th9的表达 [$(0.62 \pm 0.11)\%$] 高于恢复期 [$(0.31 \pm 0.14)\%$] 及对照组 [$(0.25 \pm 0.08)\%$], 差异具有统计学意义 ($t=9.436$ 、 10.625 , $P<0.05$); 患儿恢复期Th9细胞水平与对照组比较, 差异无统计学意义 ($t=1.083$, $P>0.05$)。各组患儿的Th9流式细胞检测见图1~3。

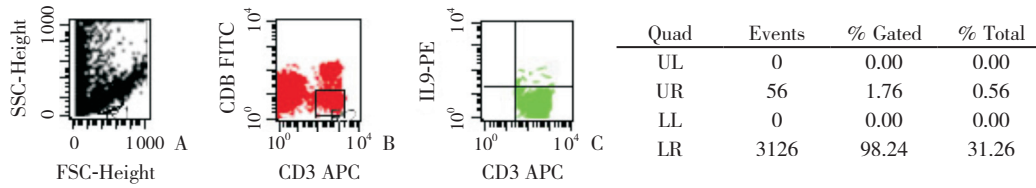


图1 流式细胞术检测KD患者急性期Th9细胞 A: FSC-SSC设门淋巴细胞群; B: 设门CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞群; C: CD3⁺CD8⁺IL-9⁺T (Th9) 细胞亚群。UR示Th9细胞亚群所占百分比。

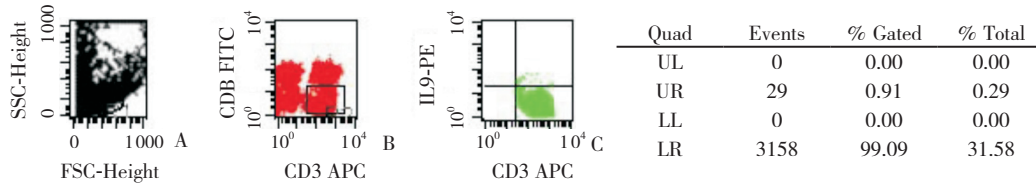


图2 流式细胞术检测KD患者恢复期Th9细胞 A: FSC-SSC设门淋巴细胞群; B: 设门CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞群; C: CD3⁺CD8⁺IL-9⁺T (Th9) 细胞亚群。UR示Th9细胞亚群所占百分比。

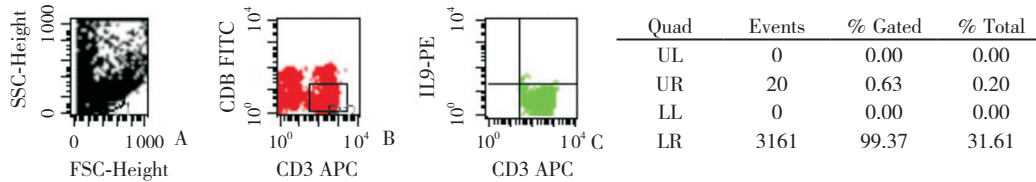


图3 流式细胞术检测正常对照组Th9细胞 A: FSC-SSC设门淋巴细胞群; B: 设门CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞群; C: CD3⁺CD8⁺IL-9⁺T (Th9) 细胞亚群。UR示Th9细胞亚群所占百分比。

2.2 两组儿童外周血IL-9水平比较

KD患儿急性期IL-9水平高于恢复期及对照组 (81 ± 21 pg/mL, 42 ± 13 pg/mL, 36 ± 12 pg/mL), 差异具有统计学意义 ($t=8.647, 9.064, P<0.05$); 恢复期患儿与对照组比较, 差异无统计学意义 ($t=1.474, P>0.05$)。

2.3 KD患者急性期外周血Th9与各临床指标的关联性

KD患儿急性期Th9的表达水平与CRP、PCT、ESR、PLT、球蛋白水平呈正相关, 具有统计学意义 ($P<0.05$); 而与白蛋白水平呈负相关, 具有统计学意义 ($P<0.05$)。见表1。

表1 KD急性期Th9细胞表达水平与各临床指标的关联性

临床指标	CRP	PCT	白蛋白	ESR	PLT	球蛋白
<i>r</i> 值	0.324	0.402	-0.306	0.382	0.467	0.386
<i>P</i> 值	0.031	0.028	0.043	0.036	0.031	0.027

2.4 KD患者急性期外周血IL-9与各临床指标的关联性

KD患儿急性期IL-9的表达水平与CRP、

PCT、ESR、PLT、球蛋白水平呈正相关, 与白蛋白水平呈负相关, 具有统计学意义 ($P<0.05$), 见表2。

表2 KD急性期IL-9与各临床指标的关联性

临床指标	CRP	PCT	白蛋白	ESR	PLT	球蛋白
<i>r</i> 值	0.365	0.456	-0.343	0.403	0.423	0.453
<i>P</i> 值	0.028	0.003	0.032	0.026	0.029	0.005

3 讨论

川崎病(KD)是一种自身免疫性血管炎性疾病,主要影响中小动脉,尤其是冠状动脉,25%可能发展为冠状动脉瘤、冠脉狭窄或血栓形成,甚至猝死^[4]。目前,KD的发病机制尚不明确,大多数学者认为与免疫系统高度活化导致的异常自主反应有关。近年来,辅助性T细胞与KD发病关系的研究越来越多,被认为在KD的发病中起着重要作用。

CD4⁺T细胞是导致自身免疫性疾病的主要淋巴细胞。Th9细胞是新近发现的不同于Th1, Th2, Th17及调节性T细胞(T regulatory cell, Treg)的新型CD4⁺T细胞亚群,在细胞因子TGF- β 和IL-4联合诱导下分化,分泌特异性细胞因子IL-9。IL-9与其受体结合形成异二聚体,通过介导JAK/STAT等信号通路,作用于肥大细胞,启动一系列炎症反应,发挥其生物学作用^[5]。多项研究发现,Th9细胞在多种自身免疫性疾病、过敏性疾病及感染性疾病中发挥重要作用。例如:系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者的血清IL-9水平高于健康对照组,提示IL-9参与SLE的发病过程^[6]。Ciccia等^[7]研究报道,类风湿关节炎患者关节滑液中Th9细胞明显增高,相关细胞因子IL-9、IL-4、TGF- β 及特异性转录因子PU.1均增高。Li等^[8]研究发现,使用抗IL-9单克隆抗体中和IL-9或者IL-9受体缺陷均能减轻小鼠自身免疫性脑脊髓炎的严重程度,可能与IL-9可诱导星形胶质细胞分泌其他炎症因子及趋化因子,募集Th17细胞及IL-6在中枢神经系统聚集,从而产生炎症损伤有关。另外,Yao等^[9]在实验性自身免疫性肌无力小鼠模型中证实,Th9细胞增多伴随IL-9上调;用IL-9抗体阻断IL-9通路可降低血清抗乙酰胆碱受体IgG水平,减轻小鼠的病理症状;中和IL-9,可增加辅助性T细胞向Treg细胞的转化,发挥治疗作用。然而目前,Th9细胞及细胞因子IL-9在KD发病机制中的作用国内外尚无报道。本研究通过检测Th9细胞及IL-9在KD患儿外周血中的表达情况,探讨其在儿童KD发病中可能的作用。

本研究发现,KD患儿急性期外周血Th9细胞及其细胞因子IL-9水平明显高于恢复期及对照组

患儿,而恢复期患儿与对照组之间差异无显著性,提示Th9细胞及其细胞因子IL-9可能参与KD的发生发展。同时,有研究证实Th9细胞与Th17细胞功能极其相似,参与多种自身免疫性疾病^[10]。Rasouli等^[11]发现KD患儿急性期血清Th17, IL-17, IL-22, IL-23均增高,静脉免疫球蛋白及阿司匹林治疗后Th17细胞及相关细胞因子均下调。因此,我们推测针对KD急性期增高的Th9及IL-9进行干预,可能为KD的治疗提供新的思路。

CRP、PCT、ESR、PLT、白蛋白、球蛋白是重要的判断炎症活动性的常用指标。有研究证实,CRP、ESR、WBC、PLT等指标与川崎病的炎症程度成正相关,急性期明显高于恢复期及健康对照组,被广泛用于KD急性期评估^[12-13]。2004年,美国心脏学会在制定KD诊断评估指南时,也将CRP、ESR、PLT等作为评价KD炎症程度的实验室指标和不完全川崎病的参考诊断^[14]。本实验对川崎病患者急性期外周血Th9细胞及血清IL-9与CRP、PCT、ESR、PLT、白蛋白、球蛋白进行相关性分析发现,KD患儿急性期Th9细胞及IL-9的表达水平与患者的CRP、PCT、ESR、PLT、球蛋白呈正相关、与白蛋白呈负相关,因此,推测Th9细胞及IL-9可能可作为反映KD患儿疾病活动性的新指标。

综上所述,KD患儿急性期外周血Th9细胞比例和IL-9水平均高于恢复期及健康对照组,且与CRP、PCT、ESR、PLT、球蛋白呈正相关,白蛋白水平呈负相关,提示Th9细胞可能通过分泌IL-9参与了KD的致病过程,并且与疾病的发生、发展及转归密切相关,推测其可在不典型川崎病的早期具有诊断价值,可能为自身免疫性疾病的治疗提供新思路。然而对Th9细胞与KD的具体机制及作用通路还需要大样本及更深入的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Kuo HC, Chang WC, Yang KD, et al. Kawasaki disease and subsequent risk of allergic diseases: a population-based matched cohort study[J]. BMC Pediatr, 2013, 13(1): 38.
- [2] Ayusawa M, Sonobe T, Uemura S, et al. Revision of diagnostic guidelines for Kawasaki disease (the 5th revised edition)[J]. Pediatr Int, 2005, 47(2): 232-234.
- [3] Patel RM, Shulman ST. Kawasaki disease: a comprehensive review of treatment options[J]. J Clin Pharm Ther, 2015, 40(6): 620-625.

- [4] Burns JC, Shike H, Gordon JB, et al. Sequelae of Kawasaki disease in adolescents and young adults[J]. J Am Coll Cardiol, 1996, 28(1): 253-257.
- [5] Wiener Z, Falus A, Toth S. IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice[J]. Cytokine, 2004, 26(3): 122-130.
- [6] Leng RX, Pan HF, Ye DQ, et al. Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. Am J Clin Exp Immunol, 2012, 1(1): 28-32.
- [7] Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, et al. Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(12): 2264-2272.
- [8] Li H, Nourbakhsh B, Cullimore M, et al. IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system[J]. Eur J Immunol, 2011, 41(8): 2197-2206.
- [9] Yao X, Kong Q, Xie X, et al. Neutralization of interleukin-9 ameliorates symptoms of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats by decreasing effector T cells and altering humoral responses[J]. Immunology, 2014, 143(3): 396-405.
- [10] Ruocco G, Rossi S, Motta C, et al. T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis[J]. Clin Sci, 2015, 129(4): 291-303.
- [11] Rasouli M, Heidari B, Kalani M, et al. Downregulation of Th17 cells and the related cytokines with treatment in Kawasaki disease[J]. Immunol Lett, 2014, 162(1): 269-275.
- [12] 李蕴言, 吴菱, 马田瑞, 等. 川崎病患儿血清白介素-17的变化[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(8): 741-743.
- [13] Tremoulet AH, Jain S, Chandrasekar D, et al. Evolution of laboratory values in patients with Kawasaki disease[J]. Pediatr Infect Dis J, 2011, 30(12): 1022-1026.
- [14] Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association[J]. Circulation, 2004, 110(17): 2747-2771.
- (本文编辑: 俞燕)

· 消息 ·

本刊关于实验动物样本数的规定

为了提高杂志的学术质量,《中国当代儿科杂志》决定从2016年8月起,对凡是在本刊刊出的动物实验研究论文中实验动物样本数做出如下规定,请广大作者注意并严格执行。对于未达到以下要求的动物实验性文章投稿,本刊则一律不再接收。

(1) 活体动物实验每组动物数不得少于8只;

(2) 对于细胞或分子水平检测方法,可适当放宽对样本数的要求,如:PCR法检测mRNA水平,每个单元组的样本数不得少于6例;Western blot法检测蛋白水平,每个单元组的样本数不得少于3例;

(3) 组织切片,要求每个样本组织的切片数不得少于3张,每张切片随机观察视野不得少于5个。

《中国当代儿科杂志》编辑部
2016年8月