

· 论 著 ·

# 灭活卡介苗经皮接种治疗婴幼儿哮喘对 IgE ECP IFN- $\gamma$ IL-4 水平的影响

何学华<sup>1</sup>, 李云<sup>1</sup>, 杨于嘉<sup>2</sup>, 易红玲<sup>1</sup>

(1. 湖南省人民医院儿科, 湖南 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

**【摘要】** 目的 为进一步探讨灭活卡介苗治疗婴幼儿哮喘的免疫学作用机制, 应用灭活卡介苗经皮接种, 观察患儿机体 IgE、嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)、IFN- $\gamma$ 、IL-4 的水平变化及改变程度。方法 将哮喘患儿随机分为常规治疗组(常规组)与灭活卡介苗治疗组(卡介苗组), 进行6个月的治疗后, 观察患儿在治疗前后的 IgE, ECP, IL-4, IFN- $\gamma$  的变化, 另设20例正常儿童作为对照组。结果 ①治疗前卡介苗组和常规组 IgE, ECP 与 IL-4 均高于对照组, IFN- $\gamma$  低于对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 卡介苗组与常规组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); ②卡介苗组治疗后 ECP 与 IL-4 低于治疗前, IFN- $\gamma$  较治疗前有升高, 其差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ), IL-4 和 IFN- $\gamma$  呈明显负相关, 且 IFN- $\gamma$  与 IL-4 的变化各自均有明显的线性关系。IgE 在治疗前后无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。常规组治疗前后 IgE, ECP 与 IL-4 水平差异无显著性, 但 IFN- $\gamma$  水平治疗后增加, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。结论 灭活卡介苗治疗能刺激婴幼儿哮喘患儿 IFN- $\gamma$  生成增多, 下调 IL-4 水平, 可能与干预治疗能诱导  $T_H1$  细胞的优势分化, 调节  $T_H1/T_H2$  平衡有关; 同时, 能降低 ECP 水平, 减轻气道慢性炎症反应; 但短期内对 IgE 水平未发现显著影响。

[中国当代儿科杂志, 2004, 6(3): 191-194]

**【关键词】** 卡介苗; 哮喘; IgE; ECP; IFN- $\gamma$ ; IL-4; 婴幼儿

**【中图分类号】** R562.2<sup>+</sup>5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2004)03-0191-04

## Effects of inactivated bacillus Calmette-Guerin inoculation on IgE, ECP, IFN- $\gamma$ and IL-4 levels in infants with asthma

Xue-Hua HE, Yun LI, Yu-Jia YANG, Hong-Ling YI. Department of Pediatrics, Hunan Province People's Hospital, Changsha 410005, China (Email: hexuehua@hotmail.com)

**Abstract: Objective** To study the changes of IFN- $\gamma$ , IL-4, ECP and IgE levels in children with asthma before and after inactivated bacillus Calmette-Guerin (BCG) inoculation. **Methods** Forty-five young children with asthma aging from 9 months to 3 years were involved in this study. Serum levels of IgE and ECP were determined with enzyme linked fluoroimmunoassay by Pharmacia CAP system. The concentrations of IFN- $\gamma$  and IL-4 from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were measured using ELISA before and after inactivated BCG inoculation. Forty infants with asthma who received the routine treatment and twenty healthy infants served as the controls. **Results** After inactivated BCG inoculation for 6 months, the IFN- $\gamma$  level increased significantly from  $16.4 \pm 7.1$  pg/L to  $241.6 \pm 111.3$  pg/L ( $P < 0.01$ ). The IL-4 and ECP levels decreased significantly from  $214.4 \pm 90.9$  pg/L and  $13.4 \pm 20.2$   $\mu$ g/L to  $46.1 \pm 21.5$  pg/L and  $5.5 \pm 6.5$   $\mu$ g/L respectively ( $P < 0.05$ ). The IL-4 level was significantly negatively correlated with the IFN- $\gamma$  level ( $r = 0.626$ ,  $P < 0.05$ ). There was no difference in the serum IgE level before and after BCG treatment. In patients who received the routine treatment, only IFN- $\gamma$  levels differed from that of before treatment ( $32.0 \pm 12.1$  pg/L vs  $17.6 \pm 7.2$  pg/L;  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Inactivated BCG treatment may increase IFN- $\gamma$  levels and decrease IL-4 levels, which is favorable to the regulation of T-cell balance. It also can decrease the ECP level and relieve chronic airway inflammation response, but it fails to respond to IgE level.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(3): 191-194]

[收稿日期] 2003-11-30; [修回日期] 2004-03-10

[基金项目] 湖南省科委基金资助(1013-18)。

[作者简介] 何学华(1969-),男,硕士,主治医师。主攻方向:小儿呼吸系统疾病。

[通讯作者] 李云,湖南省长沙市解放西路61号湖南省人民医院儿科,邮编:410005。

**Key words:** Bacillus Calmette-Guerin; Asthma; IgE; ECP; IFN- $\gamma$ ; IL-4; Infant

支气管哮喘是由多种细胞特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞和 T 淋巴细胞参与的慢性气道炎症。目前认为辅助 T 细胞( $T_H1/T_H2$ )失衡是哮喘发病的一个重要环节或始动环节<sup>[1,2]</sup>,而在婴幼儿哮喘的治疗中,卡介苗及其衍生物能在一定程度上刺激机体的免疫系统,对恢复哮喘患儿的  $T_H1/T_H2$  平衡有一定的作用<sup>[3]</sup>。本文应用灭活卡介苗经皮接种治疗婴幼儿哮喘,观察机体治疗前后的 IgE, ECP, IL-4, IFN- $\gamma$  的变化,从而探讨其作用机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选择我科 2001 年 7 月至 2003 年 3 月住院及哮喘门诊病例共 85 例,按哮喘诊断标准<sup>[4]</sup>以年龄 < 3 岁,喘息发作  $\geq 3$  次,发作时双肺闻及呼气相哮鸣音,呼气相延长,除外其它引起喘息的疾病为依据,均为第 1 次确诊。均在出生时接种过卡介苗,并在治疗前进行 PPD 检测;年龄 9 月至 3 岁。随机分为灭活卡介苗治疗组(卡介苗组)45 例和常规治疗组(常规组)40 例,两组性别、年龄、PPD 皮试结果、哮喘发作的病程与程度间的比较差异均无显著性,抽血前 2 月内未应用激素治疗。卡介苗组 45 例,应用灭活卡介苗接种与常规治疗,常规治疗是指缓解期应用酮替芬治疗并酌情应用舒喘灵,不予应用糖皮质激素;其中男 26 例、女 19 例,年龄  $2.01 \pm 0.76$  岁,合并过敏性鼻炎 12 例,湿疹 10 例。常规组 40 例,仅予应用常规治疗。其中男 22 例,女 18 例,年龄  $2.08 \pm 0.77$  岁,合并过敏性鼻炎 9 例,湿疹 9 例。

对照组 20 例,男 11 例,女 9 例,年龄 11 月至 3 岁,平均  $2.03 \pm 0.59$  岁。排外个人和/或家族特异性疾病(包括特应性皮炎、过敏性鼻炎、哮喘)病史。近 1 月无呼吸道感染史。

### 1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞分离与培养 在治疗前和治疗 6 个月后对观察对象采集标本,在清晨空腹抽取静脉血 2 ml,注入无菌标本瓶中,肝素 125 U/ml 抗凝,2 h 内在无菌室进行淋巴细胞分离,加 RPMI-1640 培养液并调浓度至  $1 \times 10^6$ /ml,加入植物凝集素 PHA 液终浓度 100  $\mu$ g/ml,加入 24 孔培养板,每孔 1 ml 每个标本均用两孔培养。将 24 孔培养板置入 5%  $CO_2$ 、37 $^{\circ}C$  恒温培养箱中培养 48 h 后,取培养上

清液储存在 -70 $^{\circ}C$  冰箱中,分次作细胞因子测定;应用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子,试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供人 IL-4、IFN- $\gamma$  试剂盒,按说明书操作。

1.2.2 血清总 IgE、ECP 的测定 在治疗前和治疗 6 个月后对观察对象取外周血 2 ml 放入普通洁净玻璃管中,在 20 $^{\circ}C$  ~ 25 $^{\circ}C$  室温下静置 60 min,2 000 r/min,离心 10 min,取血清放入 -70 $^{\circ}C$  冰箱冻存备测。应用法玛西亚公司的 UniCAP 仪及 IgE、ECP 诊断试剂盒,按说明书操作。

1.2.3 灭活卡介苗经皮接种方法 对卡介苗组缓解期的哮喘患儿,选上臂外侧三角肌处用 75% 酒精消毒,点滴 0.1~0.125 ml 灭活卡介苗液,再用三棱针划两条与上臂长轴垂直的平行线,长约 1.5 cm,间隔约 0.5 cm,深度以划破表皮为度,使灭活卡介苗液均匀涂于划痕处。每周 1 次,左右上臂交替治疗,反复治疗 6 个月。

1.2.4 随访 随访 6 个月,记录病情变化,并由专人负责两组患儿的急性发作期的治疗。

### 1.3 统计学分析处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。对成组设计的两样本均数的比较,方差齐次性检验应用  $F$  检验,根据样本的方差齐次性检验的  $F$  值,分别应用成组  $t$  检验或  $t'$  检验。对前后配对的两样本资料的比较,应用配对  $t$  检验。非正态分布资料采用秩和检验。以  $P < 0.05$  作为显著性检验的标准。

## 2 结果

### 2.1 卡介苗组治疗前与常规组、对照组 IgE, ECP, IFN- $\gamma$ , IL-4 比较

治疗前卡介苗组 IgE, ECP, IL-4 高于对照组, IFN- $\gamma$  低于对照组,其差异均有显著性 ( $P < 0.05$ );卡介苗组的 IgE, ECP, IFN- $\gamma$  与 IL-4 与常规组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。常规组 IgE, ECP 与 IL-4 亦高于对照组, IFN- $\gamma$  低于对照组,其差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 常规组、卡介苗组治疗前、后 IgE, ECP, IFN- $\gamma$ , IL-4 的变化

卡介苗组治疗后 ECP, IL-4 低于治疗前, IFN- $\gamma$  较治疗前有所升高,其差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), IgE 在治疗前后比较的差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

常规组治疗前后 IgE, ECP, IL-4 差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); 但 IFN- $\gamma$  的差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

### 2.3 卡介苗组治疗前、后的直线相关分析

卡介苗组治疗前 IgE 与 IL-4 呈正相关 ( $r = 0.653, P < 0.05$ ), IgE 与 IFN- $\gamma$  呈负相关 ( $r = -0.311, P < 0.05$ ); IL-4 和 IFN- $\gamma$  呈明显负相关

( $r = -0.626, P < 0.05$ )。

卡介苗组治疗后 IgE 与 IFN- $\gamma$  呈负相关 ( $r = -0.433, P < 0.05$ ), IL-4 和 IFN- $\gamma$  呈负相关 ( $r = -0.422, P < 0.05$ ); IgE 与 IL-4 无相关性。

卡介苗组治疗前、后 IFN- $\gamma$  的相关系数为 0.397, 而 IL-4 前后的相关系数为 0.560, 提示 IFN- $\gamma$  上升与 IL-4 下降分别具有明显的线性关系。

表 1 对照组、常规组、卡介苗组治疗前 IgE, ECP, IFN- $\gamma$ , IL-4 的比较

Table 1 Levels of IgE, ECP, IFN- $\gamma$  and IL-4 before treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

例数	IgE (ku/L)	ECP ( $\mu$ g/L)	IFN- $\gamma$ (pg/L)	IL-4 (pg/L)	
对照组	20	21.9 $\pm$ 18.8	2.7 $\pm$ 1.2	46.7 $\pm$ 24.9	147.0 $\pm$ 48.0
常规组	40	313.4 $\pm$ 353.6	6.9 $\pm$ 8.7	17.6 $\pm$ 7.2	207.4 $\pm$ 80.3
卡介苗组	45	244.3 $\pm$ 349.1	13.4 $\pm$ 20.2	16.4 $\pm$ 7.1	214.4 $\pm$ 90.9

注:常规组、卡介苗组与对照组各项指标比较均  $P < 0.05$

表 2 两组治疗前后 IgE, ECP, IFN- $\gamma$ , IL-4 的比较

Table 2 Levels of IgE, ECP, IFN- $\gamma$  and IL-4 before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	治疗前				治疗后			
	IgE (ku/L)	ECP ( $\mu$ g/L)	IFN- $\gamma$ (pg/L)	IL-4 (pg/L)	IgE (ku/L)	ECP ( $\mu$ g/L)	IFN- $\gamma$ (pg/L)	IL-4 (pg/L)
常规组(40)	313.4 $\pm$ 353.6	6.9 $\pm$ 8.7	17.6 $\pm$ 7.2	207.4 $\pm$ 80.3	234.2 $\pm$ 198.7	7.1 $\pm$ 6.9	32.0 $\pm$ 12.1 <sup>b</sup>	191.5 $\pm$ 67.5
卡介苗组(45)	244.2 $\pm$ 349.1	13.4 $\pm$ 20.2	16.4 $\pm$ 7.1	214.4 $\pm$ 90.9	244.3 $\pm$ 222.9	5.5 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	241.6 $\pm$ 111.3 <sup>b</sup>	46.1 $\pm$ 21.5 <sup>b</sup>

注: a 与治疗前比较  $P < 0.05$ ; b 与治疗前比较  $P < 0.01$

### 3 讨论

卡介苗作为结核杆菌的减毒活疫苗,能诱导机体产生  $T_H1$  免疫反应<sup>[5]</sup>,新生儿出生后的第一次接种和以后的复种卡介苗已证实能影响辅助 T 细胞 ( $T_H1/T_H2$ )分化<sup>[6-8]</sup>。经皮接种卡介苗或灭活卡介苗可能主要是通过其成分影响婴幼儿树突细胞 (dendritic cell, DC) 的发育及诱导其向  $DC_1$  分化<sup>[9]</sup>;促进 DC 的协同刺激分子的表达及细胞因子 (IL-12, IL-18 等) 的分泌等来调节 T 细胞免疫向  $T_H1$  型细胞免疫反应极化,  $T_H1$  型细胞因子如 IFN- $\gamma$ , IL-12 等增多,从而抑制  $T_H2$  型细胞因子如 IL-4, IL-5 的产生,并阻断 IgE 的合成,抑制嗜酸性粒细胞的增殖与活化,抑制气道高反应性形成<sup>[10]</sup>。

本研究发现,治疗前卡介苗组与常规组 IFN- $\gamma$ , IL-4, IgE, ECP 差异无显著性意义;而卡介苗组 IFN- $\gamma$  较对照组低, IL-4, IgE 和 ECP 较对照组升高, IgE 与 IL-4 呈正相关。哮喘患儿  $T_H1$  型细胞因子 IFN- $\gamma$  水平降低,  $T_H2$  型细胞因子 IL-4 增高, IgE

和 ECP 增多,提示婴幼儿哮喘存在  $T_H1/T_H2$  失衡,由于 IL-4 水平增高,促使 IgE 的合成增加,嗜酸性细胞 (EOS) 活化释放 ECP 增多,气道反应性增高,气道炎性病加重,导致哮喘发生。有研究表明 IgE 和 ECP 亦可以监测哮喘患儿的病情变化<sup>[11]</sup>。

经过干预治疗后,卡介苗组患儿 IFN- $\gamma$  水平升高, IL-4 水平下降,两者的前后变化均有线性关系,且 IFN- $\gamma$  与 IL-4 之间存在负相关,提示灭活卡介苗接种能影响机体 IFN- $\gamma$ , IL-4 水平,可能的机制是通过灭活卡介苗成分的反复刺激来调节 T 细胞免疫向  $T_H1$  型细胞免疫反应分化,分泌  $T_H1$  型细胞因子如 IFN- $\gamma$  增多,并抑制  $T_H2$  型细胞免疫及其细胞因子 (IL-4 等) 生成,从而调节  $T_H1/T_H2$  的平衡。

ECP 是 EOS 活化的毒性蛋白之一,它的毒性最强,是反映 EOS 活化程度的特异性指标,它能直接损伤气道上皮,引起气道上皮损伤、脱落,暴露传入神经末梢,直接参与气道高反应性的形成,导致和/或加重哮喘的发作<sup>[12]</sup>。本研究提示婴幼儿哮喘患儿的 ECP 在治疗前有明显增高,反映了 ECP 参与气道炎症形成与哮喘的发生;卡介苗组在干预治疗后有显著下降,提示干预治疗能在一定程度上减轻

气道炎症反应,能在一定程度上改善患儿的病情,有利于婴幼儿哮喘的治疗。

有研究表明,哮喘患儿存在免疫球蛋白改变,血清 IgE 显著高于正常儿,推测其机制与  $T_H2$  型细胞功能亢进,分泌 IL-4 增多,刺激 B 细胞合成 IgE 增加有关<sup>[13]</sup>。结果提示婴幼儿哮喘患儿有 IgE 值增高,存在气道反应性改变,但应用经皮灭活卡介苗接种后,IgE 水平无显著改变,可能存在如下原因:①观察时间较短,而 IgE 下降需要较长时间;②IgE 的调节不仅仅与 IL-4 有关,还可能其他的因素参与调节;③卡介苗对 T 细胞的调节作用强而对 B 细胞的调节作用弱;④过敏因素反复存在,使得机体分泌特异性 IgE 增加。

观察常规组指标的变化,显示在观察前与卡介苗组比较差异无显著性,常规组自身前后比较也无显著性改变。提示婴幼儿哮喘患儿在自然状态下难以使病情缓解。但发现常规组有 IFN- $\gamma$  水平增高,其原因可能是:①随年龄的增长机体免疫系统发育趋于成熟;②机体在感染中建立的免疫反应使  $T_H1$  型细胞免疫增强。

本研究提示:经皮灭活卡介苗反复接种可能是通过灭活卡介苗这一原始的免疫刺激物,长时间、定期、反复刺激使患儿 IFN- $\gamma$  增多、IL-4 下降,可能有恢复  $T_H1/T_H2$  细胞失衡、增强细胞免疫功能的作用;同时,由于临床情况的改善,非特异性免疫功能增强,导致 ECP 下降,减轻气道慢性炎症反应;但短期内对 IgE 水平未发现显著影响。其临床疗效值得进一步探讨。

#### [参 考 文 献]

- [1] Romagnani S. T-cell responses in allergy and asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2001, 1(1): 73-78.
- [2] Smart JM, Kemp AS. Increased  $T_H1$  and  $T_H2$  allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease [J]. *Clin Exp Allergy*, 2002, 32(5): 796-802.
- [3] 商艳,胡振林,李强,刘忠令,孙树汉. 卡介苗及其衍生物与支气管哮喘的治疗 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26(3): 169-171.
- [4] 全国儿科哮喘防治协作组. 儿童哮喘防治常规(试行) [J]. *中华儿科杂志*, 1998, 36(12): 747-751.
- [5] Hopfenspirger MT, Parr SK, Hopp RJ, Taowley RG, Agrawal DK, et al. Mycobacterial antigens attenuate late allergic response, airway hyperresponsiveness, and bronchoalveolar lavage eosinophilia in a mouse model of bronchial asthma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1(8/9): 1743-1751.
- [6] Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM.  $T_H1$  inverse association between tuberculin responses and atopic disorder [J]. *Science*, 1997, 275(3): 77-79.
- [7] 高武红,李成荣,杨锡强,王莉佳,李欣,刘瑜. 结核菌素反应与哮喘患儿  $T_H$  细胞亚群的关系 [J]. *中国实用儿科杂志*, 1999, 14(10): 599-601.
- [8] Aaby P, Shahee SO, Heyes CB, Goudiaby A, Shiell A, Jensen H, et al. Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau [J]. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30(5): 644-650.
- [9] Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of  $T_H1$ - $T_H2$  development [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(3): 199-205.
- [10] 何学华. 树突细胞与卡介苗接种 [J]. *国外医学儿科学分册*, 2003, 30(3): 139-141.
- [11] 王金荣,冯益真,孙中厚,戴铁成,杨金芝. 哮喘患儿痰液 ECP、IgE、IL-5 和 sIL-2R 水平及其临床意义的研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 1999, 1(1): 9-11.
- [12] Lam S, LeRiche J, Philips D, Chan-Yeung M. Cellular and protein changes in bronchial lavage fluid after late asthmatic reaction in patients with red cedar asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1987, 80(1): 44-50.
- [13] 孔祥永,郭杰,栾斌,贾天明,郭铭玉. 支气管哮喘患儿 T 细胞亚群和免疫球蛋白变化 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2000, 2(2): 68-70.

(本文编辑:吉耕中)