

·论著·

卡介菌多糖核酸对毛细支气管炎喘息 反复发作的预防作用

李志辉,辛淑君,黄婷,叶庆标,王影齐,陈冬梅

(深圳市罗湖区妇幼保健院儿科,广东 深圳 518019)

[摘要] 目的 探讨卡介菌多糖核酸(BCG-PSN)对毛细支气管炎患儿喘息反复发作的预防作用及机制。方法 40例毛细支气管炎患儿随机分为干预组和未干预组,并取20例健康体检者作正常对照。干预组(19例)在毛细支气管炎愈后3个月给予BCG-PSN注射液1 ml(含卡介菌多糖0.35 mg,核酸不低于30 µg)肌注,每周2次,共24次,而未干预组(21例)在毛细支气管炎愈后未予以干预作空白对照。于干预前及干预后1年用ELISA法测定3组外周血单个核细胞培养上清中IFN-γ、IL-4及血清IgE含量;并随访1年,观察喘息发作情况。结果 与正常对照组比较,两组毛细支气管炎患儿干预前IFN-γ水平和IFN-γ/IL-4降低,而IL-4、IgE水平增高($P < 0.01$)。BCG-PSN干预1年后,干预组IFN-γ水平 $[(986.95 \pm 363.20) \text{ ng/L}]$ 和IFN-γ/IL-4 (16.03 ± 7.11) 较干预前 $[(768.43 \pm 288.07) \text{ ng/L}, 9.11 \pm 4.27]$ 升高,而IL-4 $[(59.73 \pm 16.04) \text{ ng/L}]$ 、IgE $[(48.05 \pm 19.57) \text{ kU/L}]$ 水平较干预前降低 $[(81.66 \pm 21.92) \text{ ng/L}, (155.35 \pm 76.25) \text{ kU/L}]$ ($P < 0.01$),且IFN-γ水平与正常对照组差异无显著性($P > 0.05$);干预组患儿1年内有两次和/或以上喘息发作者(15.8%)较未干预组婴儿(52.4%)少($P < 0.05$)。结论 BCG-PSN具有预防毛细支气管炎反复喘息的作用,其机制可能与BCG-PSN能提高IFN-γ产生,抑制IL-4分泌,提高IFN-γ/IL-4,减少IgE生成有关。
[中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 328-330]

[关键词] 毛细支气管炎;卡介菌多糖核酸;白细胞介素-4;γ干扰素;儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)04-0328-03

BCG Polysaccharide Nucleic Acid in Prevention of Post-Bronchiolitis Wheezing

Zhi-Hui LI, Shu-Jun XIN, Ting HUANG, Qing-Biao YE, Ying-Qi WANG, Dong-Mei CHEN. Department of Pediatrics, Luohu District Maternity and Children Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518019, China (E-mail: zhihuilee212@hotmail.com)

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of early intervention by polysaccharide nucleic acid fraction of BCG (BCG-PSN) for prevention of post-bronchiolitis wheezing. **Methods** Forty infants with bronchiolitis were randomly assigned into 2 groups: intervention group ($n = 19$) and non-intervention group ($n = 21$). Three months after recovering from bronchiolitis, the infants in the intervention group were given BCG-PSN injection 1 ml I. M twice a week, 24 times in all. The infants in the nonintervention group did not receive any intervention. Twenty healthy children were used as the normal controls. The levels of IFN-γ and IL-4 in the supernatant of cultured peripheral blood mononuclear cells, and serum IgE level were measured using ELISA before intervention and one year after intervention. One-year following-up was done to observe the frequency of the wheezing episodes. **Results** The IFN-γ level and IFN-γ/IL-4 ratio were significantly lower, and the levels of IL-4 and IgE were significantly higher in both intervention group and non-intervention group before intervention than those in the normal controls ($P < 0.01$). After one year of BCG-PSN intervention, the IFN-γ level $[(986.95 \pm 363.20) \text{ ng/L}]$ and IFN-γ/IL-4 ratio (16.03 ± 7.11) were significantly higher than those of before intervention $[(768.43 \pm 288.07) \text{ ng/L}$ and (9.11 ± 4.27) respectively]; the levels of IL-4 $[(59.73 \pm 16.04) \text{ ng/L}]$ and IgE $[(48.05 \pm 19.57) \text{ kU/L}]$ decreased significantly compared with those of the pre-intervention $[(81.66 \pm 21.92) \text{ ng/L}$ and $(155.35 \pm 76.25) \text{ kU/L}$, respectively] ($P < 0.01$) and the IFN-γ level was

[收稿日期] 2002-12-26; **[修回日期]** 2003-04-30

[基金项目] 深圳市卫生科技计划项目(No. 200204165)

[作者简介] 李志辉(1966-),男,硕士,主治医师,科主任。主攻方向:小儿呼吸急救。

[通讯作者] 李志辉,广东省深圳市罗湖区妇幼保健院儿科,邮编:518019。

not significantly different from the normal controls ($P > 0.05$). In one year of BCG-PSN intervention, 3 cases (15.8%) had two or more times wheezing episodes in the intervention group, less than that in the nonintervention group [11 cases (52.4%)] ($P < 0.05$). **Conclusions** Early intervention with BCG-PSN in post-bronchiolitis children may be useful in preventing the infants from recurrent wheezing episodes later. The possible explanation is that BCG-PSN can increase IFN- γ secretion, inhibit IL-4 activity, increase IFN- γ /IL-4 ratio and decrease IgE production.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(4): 328-330]

Key words: Bronchiolitis; Polysaccharide nucleic acid fraction of BCG; IL-4; IFN- γ ; Child

毛细支气管炎是婴儿常见的下呼吸道感染性疾病,约1/3的患儿日后可能发展为哮喘。有资料表明毛细支气管炎愈后反复喘息的发病机理与Th1/Th2功能失衡,即Th2的功能亢进以及遗传性特异性体质有关^[1]。目前尚无特效治疗和预防毛细支气管炎日后发生哮喘的可靠手段。本文探讨卡介菌多糖核酸(BCG-PSN)对预防毛细支气管炎喘息反复发作的疗效及机制。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择2000年11月~2001年3月急性期毛细支气管炎住院患儿40例,符合七年制临床医学系全国统编教材《儿科学》的诊断标准^[2]。男23例,女17例;年龄3月~1岁,平均7月;有25例特应症阳性(伴湿疹、哮喘、过敏性鼻炎等过敏征候群个人和/或家族史者)。将病人按入院顺序随机分成干预组(19例)和未干预组(21例),两组患儿年龄、性别、病情、特应症阳性例数等差异无显著性。干预组于毛细支气管炎治愈后3个月开始予以湖南九芝堂股份有限公司生产的斯奇康(BCG-PSN)注射液1 ml(含卡介菌多糖0.35 mg,核酸不低于30 μ g)肌注,每周2次,疗程3个月,共计24次;而未干预组于毛细支气管炎愈后未予以任何免疫干预。两组观察对象在干预及观察期间按时进行预防接种。

选择20例健康体检者作正常对照组,男11例,女9例,年龄6~15月,平均10月,均排除个人和/或家族特应症史。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 干预组和未干预组于毛细支气管炎愈后3月及干预后1年清晨空腹抽静脉血4 ml,其中1 ml收集血清贮存于-20 $^{\circ}$ C备测IgE;3 ml肝素抗凝,静置10~20 min,取1 ml血浆于-20 $^{\circ}$ C冻存备用分离外周血单个核细胞(PBMC)。正常对照组标本采集同前。

1.2.2 PBMC培养上清液制备^[3] 取血浆1 ml,用

淋巴细胞分离液密度梯度离心20 min(2 000 r/min),吸取单个核细胞层,用0.01 mol/L PBS洗2次,用RPMI 1640(Gibco-USA)+10%灭活小牛血清重悬细胞并调细胞浓度为 1×10^6 /ml。取3 ml细胞浓度为 1×10^6 /ml的重悬PBMC,加入PHA(终浓度100 μ g/ml),置37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养72 h后,离心,收集培养上清1 ml于-20 $^{\circ}$ C冻存备测。

1.2.3 测定指标及方法 ELISA法检测血清IgE, PBMC培养上清液的IL-4和IFN- γ (ELISA试剂盒购于深圳晶美有限公司)。均严格按试剂盒操作说明书进行。

1.2.4 临床观察内容 干预后随访1年,观察喘息发作情况,以喘息发作的次数及喘息持续时间作为判定临床效果的标准。

1.3 统计学处理

数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组资料比较采用方差分析,两两比较用 q 检验;干预前后比较用配对 t 检验;两组喘息时间比较用 t 检验。计数资料比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 PBMC培养上清液IFN- γ , IL-4与血清IgE测定结果

与正常对照组比较,两组毛细支气管炎婴儿干预前PBMC培养上清液中IFN- γ 水平和IFN- γ /IL-4降低,而PBMC培养上清液中IL-4及血清IgE水平增高($P < 0.01$);干预前两组间上述指标比较差异无显著性($P > 0.05$)。与干预前及同时间点的未干预组比较,BCG-PSN干预1年后IFN- γ 水平和IFN- γ /IL-4升高,而IL-4和IgE水平降低($P < 0.01$);但IFN- γ /IL-4仍低于正常对照组,IL-4和IgE水平高于正常对照组($P < 0.05$),IFN- γ 水平与正常对照组无差别($P > 0.05$);未干预组治愈后1年零3个月时IFN- γ 水平和IFN- γ /IL-4较治愈后3个月时降低,IL-4和IgE水平较治愈后3个月时升高($P < 0.01$)。见表1。

表 1 两组干预前后 PBMC 培养上清液 IFN- γ 、IL-4、IFN- γ /IL-4 与血清 IgE 比较

Table 1 Comparison of the levels of IFN- γ , IL-4, IFN- γ /IL-4 in the supernatant of cultured PBMC and serum IgE in two groups before and after intervention

组别		n	IFN- γ (ng/L)	IL-4 (ng/L)	IFN- γ /IL-4	IgE (kU/L)
正常对照组		20	1171.94 $\pm$ 439.29	49.10 $\pm$ 13.18	23.11 $\pm$ 12.62	24.64 $\pm$ 12.02
未干预组	干预前	21	843.79 $\pm$ 316.28 ^a	75.61 $\pm$ 20.29 ^a	10.80 $\pm$ 4.52 ^a	153.23 $\pm$ 67.12 ^a
	干预后	21	726.60 $\pm$ 272.37 ^d	94.23 $\pm$ 18.06 ^d	7.45 $\pm$ 3.65 ^d	235.56 $\pm$ 108.83 ^d
干预组	干预前	19	768.43 $\pm$ 288.07 ^a	81.66 $\pm$ 21.92 ^a	9.11 $\pm$ 4.27 ^a	155.35 $\pm$ 76.25 ^a
	干预后	19	986.95 $\pm$ 363.20 ^{c,d}	59.73 $\pm$ 16.04 ^{b,c,d}	16.03 $\pm$ 7.11 ^{b,c,d}	48.05 $\pm$ 19.57 ^{b,c,d}

注: a 与正常对照组比较 $P < 0.01$; b 与正常对照组比较 $P < 0.05$; c 与未干预组干预前比较 $P < 0.01$; d 与同组干预前比较 $P < 0.01$

2.2 干预后随访结果

干预组斯奇康干预 1 年内喘息发作 ≥ 2 次者低于未干预组 ($P < 0.05$)。见表 2。同时,喘息平均持续天数 [(2.35 $\pm$ 1.60) d]较未干预组 [(4.52 $\pm$ 2.63) d]短 ($P < 0.05$)。

表 2 干预后随访 1 年结果

Table 2 Finding of following-up for one year after intervention

组别	n	无发作	发作 1 次	发作 ≥ 2 次
未干预组	21	9(42.9)	1(4.8)	11(52.4)
干预组	19	13(68.4)	3(15.8)	3(15.8) ^a

注: a 与干预组比较 $P < 0.05$

3 讨论

毛细支气管炎是婴幼儿期较常见的多由呼吸道合胞病毒(RSV)引起的下呼吸道感染性疾病,约 30 %发展成哮喘,近年有上升趋势^[4]。它发病时的喘息症状及遗传特应性体质与哮喘相似,愈后反复喘息的发病机理与 Th1/ Th2 功能失衡,即 Th2 的功能亢进有关^[1]。文献报道 1 岁以内患 RSV 毛细支气管炎的婴儿日后极易发生哮喘,认为生后第 1 年中发生的 RSV 毛细支气管炎是诱发哮喘的一个重要危险因素^[5],有人将毛细支气管炎后恢复缓慢,尤其具有特应性体质或哮喘家族史的婴儿称为高危哮喘儿^[6],毛细支气管炎可能是哮喘的早期表现,预防小儿哮喘应从婴幼儿开始。因此,如何改变毛细支气管炎患儿的 Th1/ Th2 功能紊乱以预防日后哮喘发作是人们关注的焦点。在毛细支气管炎愈后进行早期免疫干预,以诱导 Th1 功能分化,平衡 Th1 和 Th2 应答对防止其发展成哮喘是重要的一环。

BCG-PSN 是由 BCG 经热酚法提取的一种菌体脂多糖,去除了可能引起副作用的菌体蛋白质。研究表明,作为一种新型免疫调节剂,BCG-PSN 具有调节机体内的细胞免疫、体液免疫、刺激网状内皮系统,激活单核-巨噬细胞吞噬功能、增强自然杀伤细胞的活性、促进细胞毒 T 淋巴细胞的细胞毒作用,并诱导单核-巨噬细胞及 T 细胞产生 IL-2 和 IFN- γ 的作用,这些均有利于机体对病毒抗原及各种抗原抗体免疫复合物的有效清除,从而提高机体抗病能力;它还可以通过稳定肥大细胞、封闭 IgE 功能,达到抗过敏及平喘作用。该制剂在儿童哮喘的治疗中已取得一定疗效^[7]。本研究中,我们在毛细支气管炎治愈后 3 个月采用 BCG-PSN 干预 3 个月并随访 1 年,发现 BCG-PSN 干预后的婴儿 1 年内 PBMC 培养上清液 IFN- γ 水平和 IFN- γ /IL-4 较干预前升高,其中 IFN- γ 水平上升到接近正常对照组 ($P > 0.05$),PBMC 培养上清液 IL-4、血清 IgE 水平较干预前下降 ($P < 0.01$);喘息发作 ≥ 2 次者低于未干预组 ($P < 0.05$),喘息平均持续天数较未干预组短 ($P < 0.05$)。说明 BCG-PSN 具有预防毛细支气管炎患儿反复喘息的作用。BCG-PSN 可以明显提高 IFN- γ 产生,抑制 IL-4 分泌,以此提高 IFN- γ /IL-4,从而在一定程度上改善了 Th1/ Th2 失衡,使之向 Th1 型转化;稳定了肥大细胞,减少了 IgE 生成,这可能是 BCG-PSN 降低毛细支气管炎患儿反复喘息发生率的机制之一。

[参 考 文 献]

[1] 符州,杨锡强,王莉佳,等. 毛细支气管炎后反复喘息的免疫机理研究[J]. 临床儿科杂志,1999, 17(5): 279 - 280.
[2] 薛辛东,李永柏. 儿科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002, 219 - 221.

(下转第 342 页)

NO 对 AC 细胞活力的影响与其导致的细胞凋亡有关。

目前细胞凋亡的途径主要有 3 个:线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径。NO 导致凋亡的途径与 P53 的激活、JNK/ SPAK 与 P38 激酶的激活、神经酰胺产生、细胞色素 C 的释放、内质网途径^[11]等因素有关。近年来线粒体在神经系统凋亡中的作用也日益重视。胞浆内细胞色素 C 的表达是线粒体途径的一个主要步骤,本研究发现 AC 在炎症因子干预后胞浆内细胞色素 C 明显增多,而应用 L-NMMA 后,胞浆内细胞色素 C 的含量减少,并结合 Caspase-3 mRNA 原位杂交的实验结果,提示 NO 可使细胞色素 C 从线粒体释放入胞浆,导致 Caspase-3 mRNA 的表达增多及凋亡发生。本研究严格按照细胞色素 C 的提取方法进行^[12],并用正常细胞作为阴性对照组,Western Blot 显色结果提示阴性对照组几乎不表达细胞色素 C,说明本实验结果是可靠的。

炎症因子导致星形胶质细胞分泌 NO,而自分泌的 NO 可导致细胞凋亡。但抑制 NO 并不能完全抑制细胞活力下降与凋亡,说明炎症因子导致 AC 损害的机制复杂,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 俞燕,杨于嘉. 黄芩甙、地塞米松对大鼠感染性脑水肿细胞因子的影响 [J]. 湖南医科大学学报,2000, 25(6): 519 - 521.
[2] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Adipose tissue as a source of inflammatory cytokines in health and disease: Focus on end-stage renal disease [J]. Kidney Int Suppl, 2003, 84: 65 - 68.

[3] Wright K, Kolios G, Westwick J, et al. Cytokine-induced apoptosis in epithelial HT-29 cells is independent of nitric oxide formation. Evidence for an interleukin-13-driven phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival mechanism [J]. J Biol Chem, 1999, 274(24): 17193 - 17201.
[4] Smith SC, Guilbert LJ, Yui J, et al. The role of reactive nitrogen/oxygen intermediates in cytokine-induced trophoblast apoptosis [J]. Placenta, 1999, 20(4): 309 - 315.
[5] Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, et al. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitric [J]. Circ Res, 1999, 85(9): 829 - 840.
[6] Leist M, Gantner F, Kunstle G, et al. Cytokine-mediated hepatic apoptosis [J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1998, 133: 109 - 155.
[7] Murakami K, Nakamura Y, Yoneda Y. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes [J]. Neuroscience, 2003, 117(1): 37 - 42.
[8] Perner A, Andresen L, Normark M, et al. Expression of nitric oxide synthases and effects of L-arginine and L-NMMA on nitric oxide production and fluid transport in collagenous colitis [J]. Gut, 2001, 49(3): 387 - 394.
[9] Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, et al. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons [J]. J Cell Biol, 2000, 150(2): 335 - 347.
[10] Suk K, Lee J, Hur J, et al. Activation-induced cell death of rat astrocytes [J]. Brain Res, 2001, 900(2): 342 - 347.
[11] Ansky V, Ratter F, Lampel S, et al. Inhibition of nitric-oxide-mediated apoptosis in Jukat leukemia cells despite cytochrome c release [J]. Exp Cell Res, 2001, 265(2): 274 - 282.
[12] Rheaume E. The large subunit of replication factor C is a substrate for Caspase-3 in vitro and is cleaved by a Caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis [J]. EMBO J, 1997, 16(21): 6346 - 6353.

(本文编辑:俞燕)

(上接第 330 页)

[3] 皮光环,杨锡强,魏钰书,等. 静脉注射免疫球蛋白对川崎病患者 TH1/ TH2 的影响 [J]. 中华儿科杂志,2002, 40(2): 75 - 77.
[4] Martin Mateos MA. Respiratory syncytial virus infection and asthma [J]. Allergol Immunopathol,2001, 29(3): 140 - 146.
[5] 杨锡强. 小儿哮喘的免疫学发病机制及其对策 [J]. 中国当代儿科杂志,2001, 3(5): 487 - 490.

[6] 狄亚珍,夏萍,陈伟君,等. 高危哮喘儿血清中 IL-4、IFN-γ 及总 IgE 的测定及其临床意义 [J]. 临床儿科杂志,2000, 18(4): 222 - 223.
[7] 马煜,陈育智,吴谨准,等. 应用卡介菌多糖核酸注射液治疗儿童哮喘的研究 [J]. 临床儿科杂志,2002, 20(4): 224 - 226.

(本文编辑:俞燕)