

论著·临床研究

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

康妍萌¹ 丁明杰¹ 韩玉玲¹ 王世富² 马香¹ 李华¹

(山东大学齐鲁儿童医院 1. 呼吸科; 2. 检验科, 山东 济南 250022)

[摘要] 目的 检测重症肺炎支原体肺炎(MPP)患儿肺泡灌洗液(BALF)和血清中干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4),研究Th1/Th2细胞免疫应答的状况及意义,并评价BALF中细胞因子检测在MPP诊治中的临床价值。**方法** 采用双抗体夹心ELISA检测25例重症MPP患儿BALF和血清中IL-4及IFN- γ 的浓度,并设支气管异物组(25例)和MPP轻症组(25例)作为对照。**结果** 重症MPP患儿BALF中IL-4和IFN- γ 水平及IL-4/IFN- γ 比值明显高于支气管异物对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。重症MPP患儿血清中IL-4水平及IL-4/IFN- γ 比值明显高于支气管异物组和MPP轻症组,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。重症MPP患儿BALF中IL-4水平及IL-4/IFN- γ 比值高于血清标本,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 重症MPP患儿存在Th1/Th2失衡,以Th2反应占优势;BALF中细胞因子的检测较之血清更为敏感,在MPP诊治中具有较高价值。

[中国当代儿科杂志,2011,13(3):188-190]

[关键词] 重症肺炎支原体肺炎;肺泡灌洗液;Th1/Th2;儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0188-03

Th1/Th2 immune response in bronchoalveolar lavage fluid in children with severe *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*

KANG Yan-Meng, DING Ming-Jie, HAN Yu-Ling, WANG Shi-Fu, MA Xiang, LI Hua. Department of Respiratory Medicine, Qilu Children's Hospital, Shandong University, Jinan 250022, China (Ding M-J, Email: dingmingjie@163.com)

Abstract: Objective To study the status of Th1/Th2 immune response and the value of the detection of cytokines in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) by examining the levels of IFN- γ and IL-4 in BALF and serum in children with severe *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* (MPP). **Methods** The levels of IFN- γ and IL-4 in BALF and serum were measured using ELISA in 25 children with severe MPP, 25 children with mild MPP and 25 children with foreign body in bronchus. **Results** The levels of IL-4 and IFN- γ and the IL-4/IFN- γ ratio in BALF in children with severe MPP were significantly higher than those in children with foreign body in bronchus ($P < 0.01$ or < 0.05). The serum levels of IL-4 and the IL-4/IFN- γ ratio in children with severe MPP were significantly higher than those in children with foreign body in bronchus ($P < 0.01$) or with mild MPP ($P < 0.05$). The levels of IL-4 and the IL-4/IFN- γ ratio in BALF were significantly higher than in serum ($P < 0.05$). **Conclusions** The data suggest that the imbalance of Th1/Th2 exists in children with severe MPP and it seems to represent a predominant Th2-like cytokine response. The detection of cytokines in BALF appears to be more sensitive than in serum and may be of value in the diagnosis and therapy of MPP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):188-190]

Key words: Severe *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*; Bronchoalveolar lavage fluid; Th1/Th2; Child

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)感染作为小儿下呼吸道感染的一个不可忽视的问题,已受到临床越来越多的重视。MP感染可引起重症肺炎,如坏死性肺炎,肺大叶实变,中至大量胸腔积液,合并闭塞性支气管炎等表现^[1]。目前认为,MP感染除了对机体细胞直接产生损害外,其所引起的免疫反应在肺炎支原体肺炎(MPP)的发生、发展过程中起重要作用。本研究通过检测重症MPP患儿支气管肺泡灌洗液(BALF)中的干扰素- γ (IFN- γ)及白细胞介素-4(IL-4),研究Th1/Th2细胞免疫应答的状

况及其临床意义,以期MPP的诊治提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

观察组(重症MPP组):2008年1~12月我院住院治疗的重症MPP患儿25例,年龄2~14岁,平均6.05岁,男14例,女11例。均符合《诸福堂实用儿科学》MPP的诊断标准^[2]并符合以下1条或以

[收稿日期]2010-05-31;[修回日期]2010-09-16

[作者简介]康妍萌,女,博士研究生,医师。

[通信作者]丁明杰,主任医师。

上^[1]:①坏死性肺炎改变;②肺大叶实变伴中至大量胸腔积液;③影响呼吸功能或合并其他系统功能障碍;④合并闭塞性支气管炎;⑤合并全身炎症反应综合征;⑥起病急、症状重、肺大叶实变,对单一大环内酯类抗生素治疗反应不佳。以支气管异物和MPP轻症患儿作为对照组。①支气管异物组:同期我院收治的确诊为支气管异物患儿25例,年龄2~11岁,平均5.68岁,男18例,女7例。病程在2d以内,无发热,外周血白细胞计数及C反应蛋白均正常,并排除过敏性疾病及免疫相关性疾病。②MPP轻症组:轻症组25例均符合《诸福棠实用儿科学》MPP诊断标准^[2]且可排除重症病例。年龄2~14岁,平均6.25岁,男13例,女12例。重症MPP组与支气管异物组及轻症MPP组年龄比较差异无统计学意义。所有患儿均未使用过肾上腺皮质激素及人血免疫球蛋白、胸腺肽等免疫抑制剂和免疫调节剂。

1.2 研究方法

1.2.1 标本的采集 ①BALF的采集:重症MPP组及支气管异物组患儿行电子支气管镜检查(治疗)。支气管肺泡灌洗按照中华医学会呼吸病学分会支气管肺泡灌洗液细胞学检测技术规范(草案)^[3]中操作方法进行。用37℃灭菌生理盐水10~15 mL分3次灌洗患侧支气管肺段(观察组)或一侧支气管(对照组),收集肺泡灌洗液5 mL,将回收的灌洗液立即用双层无菌纱布过滤除去黏液,后装入塑料离心管内,在4℃下以1200 r/min离心10 min,取上清液-70℃储存,用作可溶性成分的检测。②血样的采集:所有病例均于入院第2天清晨采取空腹静脉血2 mL,以2500 r/min的速度离心5 min取血清,置-30℃保存待测。

1.2.2 IL-4及IFN-γ的测定 采用双抗体夹心ELISA方法检测患儿BALF和血清中IL-4及IFN-γ的浓度。人细胞因子ELISA试剂盒由美国ADL公司生产,具体步骤严格按试剂盒中的说明书进行。根据吸光度(A)值及标准曲线方程算出IL-4和IFN-γ的含量。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件包进行统计学分析。实验结果采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数的比较采用方差分析(两两比较采用t检验),用直线相关分析计算相关系数,判定各测定值之间的相关程度, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重症MPP组和支气管异物组BALF中IL-4及IFN-γ浓度比较

重症MPP患儿BALF中IL-4和IFN-γ浓度及

IL-4/IFN-γ比值明显高于支气管异物组,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。见表1。

表1 两组BALF中IL-4及IFN-γ浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-4 (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-4/IFN-γ
气管异物组	25	3.4 ± 1.5	7.6 ± 4.0	0.51 ± 0.23
重症MPP组	25	8.2 ± 3.4	10.2 ± 3.1	0.85 ± 0.42
t值		6.60	2.63	3.49
P值		<0.01	<0.05	<0.01

2.2 3组血清中IL-4及IFN-γ浓度比较

重症MPP患儿血清中IL-4浓度及IL-4/IFN-γ比值明显高于支气管异物组和轻症MPP组,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05);重症MPP血清中IFN-γ水平与支气管异物组和轻症MPP组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);轻症MPP组IL-4水平高于支气管异物组,差异有统计学意义($P < 0.05$),两组IFN-γ水平及IL-4/IFN-γ比值比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 各组血清中IL-4及IFN-γ浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-4 (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-4 /IFN-γ
支气管异物	25	3.0 ± 1.6	8.3 ± 4.2	0.49 ± 0.25
轻症MPP	25	4.4 ± 2.1 ^d	9.7 ± 4.1	0.47 ± 0.20
重症MPP	25	6.1 ± 3.2 ^{a,b}	10.8 ± 4.5	0.73 ± 0.36 ^{a,c}
F值		10.20	2.07	6.76
P值		<0.01	>0.05	<0.01

a:与支气管异物组比较, $P < 0.01$; b:与轻症MPP组比较, $P < 0.05$; c:与轻症MPP组比较, $P < 0.01$; d:与支气管异物组比较, $P < 0.05$

2.3 重症MPP患儿BALF和血清中IL-4及IFN-γ浓度比较

重症MPP患儿BALF中IL-4水平及IL-4/IFN-γ比值高于血清标本,差异有统计学意义($P < 0.05$)。BALF与血清中IFN-γ的浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 重症MPP患儿BALF和血清中IL-4及IFN-γ浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

	例数	IL-4 (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-4 /IFN-γ
血清	25	6.1 ± 3.2	10.8 ± 4.5	0.73 ± 0.36
BALF	25	8.2 ± 3.4	10.2 ± 3.1	0.85 ± 0.42
t值		2.15	0.56	2.04
P值		<0.05	>0.05	<0.05

2.4 重症MPP患儿BALF和血清中各检测指标的相关性分析

BALF与血清中IL-4和IL-4/IFN-γ检测结果呈正相关, r 分别为0.57、0.72 ($P < 0.01$);BALF与血清中的IFN-γ无明显相关性($r = 0.38, P > 0.05$)。

3 讨论

目前认为免疫学发病机制在MPP中起着重要

作用,并以适应性免疫为主导。适应性免疫反应的扰乱即表现为免疫失衡,可能与疾病严重程度和肺外症状相关^[4]。

IL-4 和 IFN- γ 是多效的细胞因子,在细胞的固有免疫和适应性免疫方面具有强大的调节功能。IFN- γ 能促进 Th0 细胞向 Th1 的转化,Th1 细胞在抗胞内病原体(病毒、细菌及寄生虫等)感染中发挥重要作用。研究认为 IFN- γ 可活化单核细胞和巨噬细胞以清除 MP,并促进细胞毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞发挥抗感染作用^[5],提示 IFN- γ 对控制炎症损害的固有及适应性免疫应答有益,在 MP 感染时起保护效应。研究发现在感染 MP 的 BALB/c 和 C57BL/6 的小鼠模型肺组织中 IFN- γ 高表达^[6-7]。国内刘晓红等^[8]研究有不同的结论:经 3 d 滴鼻感染 MP 菌液,BALB/c 小鼠出现明显的肺炎及不同程度 INF- γ 的降低。而在对人感染 MP 的研究中发现大多数病人的淋巴细胞在恢复期较急性期产生更多的 IFN- γ ^[9],急性 MP 感染抑制 IFN- γ 表达^[10]。IL-4 主要由活化的 Th2 细胞和肥大细胞产生,主要介导体液免疫,促进 B 细胞和嗜酸性粒细胞的活化和分化,产生 IgG 和 IgE,并参与 Th1 和 Th2 亚群之间的相互作用。Koh 等^[11]研究发现 MP 患者 BALF 中 IL-4 水平较肺炎链球菌组和对照组患者明显升高,提示 Th2 型细胞因子占优势及 IgE 分泌增多的趋势。临床上通过测定细胞因子变化,将 IFN- γ 活性作为 Th1 功能指标,IL-4 活性作为 Th2 功能指标,可间接反映 Th1/Th2 变化。

本研究显示重症 MPP 患儿存在 Th1/Th2 失衡,BALF 和血清中 IL-4 水平及 IL-4/IFN- γ 比值较支气管异物组明显增高,提示 Th2 反应占优势。重症 MPP 患儿 BALF 中 IFN- γ 水平亦高于支气管异物组,可能与重症病例相对于非 MPP 病例整体上有较强烈的免疫应答有关。Koh 等^[11]在 14 例 MPP 患儿 BALF 中发现 IL-4 水平和 IL-4/IFN- γ 比值显著增高,而肺炎链球菌肺炎组和正常对照组无显著差异,本研究结果与 Koh 等^[11]的研究相似。韩晓华等^[12]认为在重症 MPP 患儿诱导痰中 IL-4 含量及 IL-4/IFN- γ 比值高于轻症 MPP 组,病情越重,增高越明显,提示 MPP 患儿存在 Th1/Th2 失衡,Th2 反应占优势。Woolard 等^[13]研究发现敲除 IFN- γ 的小鼠感染 MP 后发生严重肺损伤,进一步表明机体从 Th1/Th2 免疫应答平衡发展为 Th2 应答优势而导致肺损害加重。

以上结论提示我们,在治疗 MPP 时,适当使用免疫调节剂,如 IFN- γ 、抗 IL-4 单抗等进行干预,可能为促进疾病恢复起到积极作用。

本研究发现重症 MPP 患儿 BALF 与血清中 IL-4 水平及 IL-4/IFN- γ 比值呈正相关,且 BALF 中浓度高于血清,提示 BALF 中细胞因子的检测更为敏感,更能反映局部免疫失衡的变化。重症 MPP 患儿

BALF 和血清中 IFN- γ 水平比较无明显差异,且两者无明显相关性,提示 IFN- γ 变化可能是一种全身行为,血清标本结果更易受到外界多种非致病因素的影响。因此,对 IFN- γ 水平的分析值得进一步探讨。既往的研究大多局限于对 MPP 患儿外周血中 T 淋巴细胞亚群的检测^[14],对 BALF 中细胞因子等的研究国内报道很少。BALF 由于直接来自下呼吸道,能直观地反映肺局部的生理及病理生理信息,因此,对重症 MPP 患儿 BALF 成分的检测,有助于理解疾病的发生机制、预测疾病的发展,并对今后的治疗提供新的手段和理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 赵顺英,马云,张桂芳,江载芳. 儿童重症肺炎支原体肺炎 11 例临床分析[J]. 中国实用儿科杂志,2003,18(7):414-416.
- [2] 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,2003:1204-1205.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会. 支气管肺泡灌洗液细胞学检测技术规范(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(7):390-391.
- [4] Lee KY. Pediatric respiratory infections by *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008, 6(4): 509-521.
- [5] Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. Cytokines in *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(2-3): 157-168.
- [6] Pietsch K, Ehlers S, Jacobs E. Cytokine gene expression in the lungs of BALB/c mice during primary and secondary intranasal infection with *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Microbiology, 1994, 140(Pt 8): 2043-2048.
- [7] Opitz O, Pietsch K, Ehlers S, Jacobs E. Cytokine gene expression in immune mice reinfected with *Mycoplasma pneumoniae*: the role of T cell subsets in aggravating the inflammatory response[J]. Immunobiology, 1996-1997, 196(5):575-587.
- [8] 刘晓红,辛德莉,侯安存,魏田力,叶慧初,李靖,等. 小鼠肺炎支原体肺炎模型的建立及干扰素- γ 的变化[J]. 中国人兽共患病杂志,2004, 20(4):284-287.
- [9] Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Osano M, Maehara N, Sasaki K, et al. Interferon production during the course of *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Pediatr Infect Dis J, 1992, 11(2):72-77.
- [10] Martin RJ, Chu HW, Honour JM, Harbeck RJ. Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in a murine model[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(5):577-582.
- [11] Koh YY, Park Y, Lee HJ, Kim CK. Levels of interleukin-2, interferon-gamma, 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.
- [12] 韩晓华,王俊,苏力,尚云晓,蔡栩栩. 肺炎支原体肺炎患儿诱导痰液 Th1/Th2 类细胞因子的动态变化[J]. 实用儿科临床杂志,2005,20(10):965-967.
- [13] Woolard MD, Hodge LM, Jones HP, Schoeb TR, Simecka JW. The upper and lower respiratory tracts differ in their requirement of IFN-gamma and IL-4 in controlling respiratory mycoplasma infection and disease[J]. J Immunol, 2004, 172(11): 6875-6883.
- [14] 郇银芳,于莹,陆志芳. IL-13 和 TNF- α 在肺炎支原体肺炎儿童血清中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(4): 275-277.

(本文编辑:俞 燕)