

论著 · 临床研究

哮喘儿童细胞因子信号转导抑制因子 mRNA 表达与 Th1/Th2 的关系

惠郁¹ 谢娟娟¹ 李羚¹ 项红霞¹ 穆会君² 殷莹² 张晓娟¹

(南京医科大学附属无锡市儿童医院 1. 呼吸科; 2. 中心实验室, 江苏 无锡 214023)

[摘要] **目的** 细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)对 JAK-STAT 途径的细胞因子如白介素、干扰素等的调节起重要作用, 目前 SOCS 与哮喘的关系仍在研究中。本研究观察 SOCS1 和 SOCS3 mRNA 在哮喘儿童外周血单个核细胞(PBMC)中的表达水平与 CD4⁺ T 细胞 IFN- γ /IL-4 平衡及特异性 IgE(sIgE)的关系。**方法** 采集 44 例 4 ~ 14 岁过敏性哮喘患儿及 30 例健康儿童 PBMC, 分别用流式细胞仪分析 CD4⁺ T 细胞 IFN- γ /IL-4 比值, 另提取总 RNA, 采用 SYBR Green I 逆转录荧光定量 PCR 的方法检测每组 SOCS1 和 SOCS3 mRNA 的表达。**结果** 哮喘组患儿外周血 IFN- γ 阳性的 CD4⁺ T 细胞百分比[(15.7 $\pm$ 2.0)%]及 IFN- γ /IL-4 比值(3.4 $\pm$ 1.5)均低于对照组[分别为(19.1 $\pm$ 2.7)%、4.8 $\pm$ 2.9]; 而 SOCS1 mRNA(Δ Ct 值 11.1 $\pm$ 1.9)表达显著高于对照组(Δ Ct 值 12.6 $\pm$ 2.8)。两组儿童 SOCS1 mRNA 表达均与外周血分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比呈负相关($P < 0.05$)。SOCS1 和 SOCS3 与 sIgE 均无相关性。**结论** SOCS1 mRNA 在哮喘组患儿外周血中高表达, 并与 Th2 占优势的免疫失衡有关。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(10): 755 - 758]

[关键词] 哮喘; 细胞因子信号转导抑制因子; Th1/Th2; 儿童

[中图分类号] R562.2⁺5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2012)10 - 0755 - 04

Association between suppressors of cytokine signaling mRNA expression and Th1/Th2 balance in children with asthma

HUI Yu, XIE Juan-Juan, LI Ling, XIANG Hong-Xia, MU Hui-Jun, YIN Ying, ZHANG Xiao-Juan. Department of Respiration, Wuxi Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214023, China (Xie J-J, Email: xie_1954@163.com)

Abstract: Objective Suppressors of cytokine signaling (SOCS) have been shown to play an important role in regulating cytokines, such as intracellular interferon (IFN) and interleukin (IL), in the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. At present, the association between SOCS and asthma is still under study. The aim of this study is to explore the relationship of SOCS-1 and SOCS-3 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with the intracellular IFN- γ /IL-4 ratio in CD4⁺ T cells and specific IgE (sIgE) level in children with asthma. **Methods** BMCs were collected from 44 children with allergic asthma (4-14 years) and 30 healthy children. The intracellular IFN- γ /IL-4 ratio in CD4⁺ T cells was measured by flow cytometry. Total RNAs were extracted from the PBMCs and SOCS-1 and SOCS-3 mRNA expression was measured by SYBR Green I quantitative RT-PCR. **Results** Compared with the healthy children, children with allergic asthma showed a lower level of intracellular IFN- γ in peripheral blood [(15.7 $\pm$ 2.0)% vs (19.1 $\pm$ 2.7)%] and IFN- γ /IL-4 ratio (3.4 $\pm$ 1.5 vs 4.8 $\pm$ 2.9) and higher SOCS-1 mRNA expression (Δ Ct, 11.1 $\pm$ 1.9 vs 12.6 $\pm$ 2.8). There was a negative relationship between SOCS-1 mRNA expression and the percentage of IFN- γ -producing CD4⁺ T cells in peripheral blood in both asthmatic and healthy children ($P < 0.05$). No correlation was found between SOCS-1 and SOCS-3 expression and sIgE level. **Conclusions** Children with allergic asthma have elevated levels of SOCS-1 mRNA in PBMCs, which is associated with Th2-skewed immune response.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(10): 755 - 758]

Key words: Asthma; Suppressors of cytokine signaling; Th1/Th2; Child

[收稿日期]2012-04-01; [修回日期]2012-05-09
[基金项目]南京医科大学面上项目(编号:2010 NJMU094)
[作者简介]惠郁,女,硕士,主治医师。
[通信作者]谢娟娟,主任医师。

支气管哮喘是多种因素作用下 Th2 占优势的 IgE 介导的免疫失衡^[1-2]。Th2 细胞来源的 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子介导嗜酸性细胞、淋巴细胞、巨噬细胞的浸润和活化,对于哮喘慢性气道炎症的启动及维持起重要作用。上述这些细胞因子是通过与细胞表面受体结合,激活信号转导通路 JAK-STAT (Janus 激酶-信号转导子和转录活化家族)等信号途径而发挥作用的。近年研究发现的细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)家族蛋白是 I、II 型细胞因子信号转导途径的负反馈调节蛋白^[3]。体外实验发现 SOCS1 在 Th1 细胞表达是在 Th2 细胞中的 5 倍,而 Th2 细胞中 SOCS3 的表达是 Th1 细胞中的 23 倍^[4]。提示 SOCS1 和 SOCS3 参与调解 Th1/Th2 分化,可能与免疫紊乱等过敏性疾病如哮喘有关,但体外实验及动物模型是否适用于人体,有待进一步证实。本实验通过观察哮喘儿童 SOCS1 和 SOCS3 mRNA 表达水平与外周血 CD4⁺T 细胞 IFN- γ /IL-4 平衡及特异性 IgE(sIgE)水平的关系,探讨哮喘儿童体内 SOCS1 和 SOCS3 与 Th1/Th2 平衡的关系及与特异性体质的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2011 年 2~9 月在我院哮喘专科门诊就诊的 44 例过敏性哮喘患儿,伴或不伴有过敏性鼻炎作为哮喘组,年龄 4~14 岁(男 21 例,女 23 例)。30 例无过敏性疾病史的健康儿童作为对照组,年龄 4~14 岁,其中男 16 例,女 14 例。两组儿童的年龄、性别、身高差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。两组儿童的监护人均被告知有关研究信息,并签署知情同意书。

哮喘组入选标准:(1)过敏性哮喘患儿,伴或不伴有过敏性鼻炎,均符合轻中度哮喘支气管哮喘的诊断标准^[5],变应性鼻炎的诊断参考文献^[6];(2)皮肤点刺试验结果粉尘螨、户尘螨阳性;(3)无其他心血管系统疾病、自身免疫系统疾病等基础疾病。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 抽取外周血 6~8 mL,分别置于肝素钠、EDTA-K2 抗凝管及血清管中,用于测定外周血分泌 IFN- γ 或 IL-4 的 CD4⁺T 细胞的百分数、SOCS1 和 SOCS3 mRNA 表达及 sIgE。

1.2.2 外周血单个核细胞内细胞因子测定 肝素钠抗凝外周血与刺激剂混合,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 4~6 h 后,进行细胞表面抗原染色,加

入破膜剂,进行细胞内细胞因子染色,以流式细胞仪收获细胞,分别得到分泌 IFN- γ 或 IL-4 的 CD4⁺T 细胞百分数。主要试剂均由 BD 公司提供,包括 CD8 PERCP-CY5.5,CD3 APC,IFN- γ FITC/IL-4 PE 以及大鼠 IgG1 同型对照单克隆抗体;刺激剂有佛波醇酯(PMA)、莫能菌素(monensin)、离子霉素(ionomycin)。

1.2.3 SOCS1 和 SOCS3 mRNA 测定 EDTA-K2 抗凝外周血,按照常规淋巴细胞分层液密度梯度离心法分离 PBMC,(5~10)×10⁶单个核细胞加 Trizol 1 mL,混匀后按说明书提取总 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 含量。利用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测转录因子 SOCS1 和 SOCS3 mRNA 表达水平,按试剂盒说明书进行操作。将 mRNA 逆转录为 cDNA,用荧光 PCR 试剂配好体系,在 Lightcycler PCR 仪上做荧光 PCR。GAPDH 作为内参照,引物见表 1。SOCS1 和 SOCS3 mRNA 表达水平用 SOCS1 和 SOCS3 Δ Ct 值表示(Δ Ct 值与目的基因 mRNA 的表达呈负相关)。 Δ Ct 值为目的基因 Ct 值与 GAPDH Ct 值之差。

表 1 SOCS1 和 SOCS3 引物及内参照

引物序列		
SOCS1	正义链	5'-AGACCCCTTCTCACCTCTTG-3'
	反义链	5'-CTGCACAGCAGAAAAATAAAGC-3'
SOCS3	正义链	5'-TCCCCCAGAAAGAGCCTATTAC-3'
	反义链	5'-TCCGACAGAGATGCTGAAGAGTG-3'
GAPDH	正义链	5'-CAACTTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3'
	反义链	5'-AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC-3'

SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应条件:(1)逆转录反应条件(10 μ L 反应体系):37℃ 60 min,95℃ 5 min;(2)荧光 PCR 反应条件(20 μ L 反应体系):预变性 95℃ 10 s,1 个循环;PCR 反应 95℃ 15 min,94℃ 变性 5 s,58℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,40 个循环;72℃ 时采集荧光信号,94℃ 0 s,65℃ 15 s,94℃ 0 s,0.1℃/s 做熔解曲线分析。

主要试剂:Trizol 总 RNA 提取液(罗氏公司),逆转录酶 MMLV(Promega 公司),hotstar TaqDNA 聚合酶(QIAGEN 公司),dNTP 和随机引物(上海生物工程有限公司),20×SYBR Green I 染料(上海开放生物科技发展有限公司)。

1.2.4 外周血 sIgE 的测定 采用法玛西亚公司 CAP UinCAP100 全自动变应原体外检测仪进行检测。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。正态分

布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用非参数检验的 Wilcoxon 检验; 相关分析采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光 PCR 定量结果

哮喘组 SOCS1 Δ Ct 值低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组 SOCS3 Δ Ct 值比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。哮喘组 SOCS1 和 SOCS3 Δ Ct 值与外周血 sIgE 均无相关性 ($P > 0.05$)。

表 2 SOCS1 和 SOCS3 的 PCR 荧光定量结果 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	SOCS1 Δ Ct	SOCS3 Δ Ct
对照组	12.6 ± 2.8	3.3 ± 1.0
哮喘组	11.1 ± 1.9	3.8 ± 2.0
Z 值	-2.147	-0.018
P 值	0.032	0.914

2.2 外周血 CD4⁺ T 细胞 IFN- γ /IL-4 比值

哮喘组分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比及 IFN- γ /IL-4 比值均低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。且 IFN- γ 阳性 CD4⁺ T 细胞百分比及 IFN- γ /IL-4 比值与外周血 sIgE 无相关性 ($P > 0.05$)。

表 3 两组分泌 IFN- γ 与 IL-4 的 CD4 ⁺ T 细胞百分比的比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	IFN- γ (%)	IL-4 (%)	IFN- γ /IL-4
对照组	19.1 ± 2.7	4.7 ± 1.4	4.8 ± 2.9
哮喘组	15.7 ± 2.0	4.9 ± 1.4	3.4 ± 1.5
Z 值	-5.559	-0.131	-3.256
P 值	<0.001	0.896	0.001

2.3 两组患儿 SOCS 荧光定量结果与 CD4⁺ T 细胞相关性分析

两组儿童 SOCS1 Δ Ct 值与外周血分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比均呈正相关 (哮喘组 $r = 0.893, P < 0.05$; 对照组 $r = 0.889, P < 0.05$); 而两组 SOCS3 Δ Ct 值与外周血分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞及分泌 IL-4 的 CD4⁺ T 细胞百分比均无相关性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究结果显示, 哮喘组患儿外周血 IFN- γ 阳

性 CD4⁺ T 细胞百分比及 IFN- γ /IL-4 均低于对照组, 提示哮喘组患儿外周血存在 Th1/Th2 比例失衡, Th2 细胞占优势。本研究结果还显示, 哮喘组 SOCS1 Δ Ct 值低于对照组, 且哮喘组及对照组儿童 SOCS1 Δ Ct 值与外周血分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞均呈正相关。由于 SOCS Δ Ct 值与 SOCS mRNA 表达为负相关, 即 SOCS Δ Ct 值越低, SOCS mRNA 表达越高。因此, 本研究 SOCS1 mRNA 在哮喘组患儿外周血中高表达, 且在哮喘组及对照组中 SOCS1 mRNA 高表达的儿童分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞比例均降低, 提示 SOCS1 与 Th2 占优势的免疫失衡有关。Daegelman 等^[7]通过分析 324 例 6 岁健康儿童发现, 高表达 SOCS1 mRNA 的儿童外周血中分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比比较低, 而分泌 IL-4 的 CD4⁺ T 细胞则不受影响, 本研究结果与之一致。SOCS1 可抑制 STAT6 的磷酸化, 阻止 IL-4 的信号转导, SOCS1 也可使 STAT1 去磷酸化, 抑制干扰素的信号转导^[4]。SOCS 1^{+/+} CD4⁺ T 细胞同时具有向 Th1 及 Th2 细胞分化的潜能^[3], 但有学者发现, SOCS1^{-/-} T 细胞分泌 IFN- γ 增多, 提示 SOCS1 可能主要抑制 IFN- γ 的信号转导途径^[8,9], 本研究结果与之一致。但在卵清蛋白诱导的气道过敏模型中, 抗原可引起局部的 SOCS1 表达增加, SOCS1 的高表达可减轻抗原引起的气道炎症; 哮喘患者的平滑肌细胞中, IL-13 刺激引起 SOCS1 上调机制受损^[10]。本研究结果与之不符, 考虑本研究采用外周血为标本, 不能反映气道局部炎症因子及 SOCS 表达水平变化。

本研究中, 哮喘组与对照组 SOCS3 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义, 且与 IFN- γ /IL-4 比值无相关性, 也未发现 SOCS3 mRNA 与 sIgE 有相关性。Seki 等^[11]研究发现成人哮喘患者外周血中高表达 SOCS3 mRNA, 并与哮喘的严重程度及 IgE 相关。李付广等^[12]研究发现, 过敏性哮喘儿童, 随着特异性免疫治疗的进行, SOCS3 mRNA 逐渐降低。本研究结果与之不符, 可能与本研究样本量较小及检测方法与之不同有关。

本研究证实哮喘患儿外周血存在以 Th2 细胞占优势的 Th1/Th2 比例失衡; 且 SOCS1 mRNA 在哮喘患儿外周血中高表达, 可能参与调节 Th2 占优势的免疫失衡。总之, SOCS1 和 SOCS3 在细胞因子网络中发挥调控信号转的作用比较复杂, 需要进行更大样本的临床研究。

[参 考 文 献]

[1] 阳艳丽, 潘玉琴, 何帮顺, 钟天鹰. 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): 482-486.

[2] 董蔚,盛军,浦燕艳,石学耕,史桂英. 哮喘患儿细胞内 IL-4 IFN- γ 和血清 IgE 测定及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(2): 81-82.

[3] Knisz J, Rothman PB. Suppressor of cytokine signaling in allergic Inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(3): 739-745.

[4] Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells; implications for Th cell lineage commitment and maintenance[J]. J Immunol [J]. 2002, 168(7): 3181-3187.

[5] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,中华医学会《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘防治常规(试行)[J]. 中华儿科杂志,2004,42(2): 100-106.

[6] 中华医学会耳鼻咽喉科学分会,中华耳鼻咽喉科杂志编辑委员会,变应性鼻炎诊断及疗效评定标准[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998,33(3):134-135.

[7] Daegelmann C, Herberth G, Röder S, Herbarth O, Giese T, Krämer U, et al. Association between suppressors of cytokine signalling, T-helper type 1/T-helper type 2 balance and allergic sensitization in children[J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(3): 438-448.

[8] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(6): 454-465.

[9] Cassel SL, Rothman PB. Chapter 3: Role of SOCS in allergic and innate immune responses[J]. Adv Immunol, 2009, 103: 49-76.

[10] Fukuyama S, Nakano T, Matsumoto T, Oliver BG, Burgess JK, Moriwaki A, et al. Pulmonary suppressor of cytokine signaling-1 induced by IL-13 regulates allergic asthma phenotype[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(11): 992-998.

[11] Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, et al. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses[J]. Nat Med, 2003, 9(8): 1047-1054.

[12] 李广付,杨桂枝,阎冰,王芳,李玉琴. 细胞因子信号转导抑制因子 3 和 5 在儿童过敏性哮喘特异性免疫治疗中变化的研究[J]. 中国实用儿科杂志,2008,23(4):257-259.

(本文编辑:邓芳明)

· 消息 ·

“国际儿科肾脏病学会(中国)培训中心”招募学员通知

2010 年 4 月北京大学第一医院儿(肾)科联合香港玛嘉烈医院青少年部被国际儿科肾脏病学会(International Pediatric Nephrology Association, IPNA)正式批准为中国首家国际儿科肾脏病学会培训中心(IPNA Training Center);该中心主任为丁洁教授,副主任为赵孟准教授(香港)、肖慧捷主任医师、姚勇主任医师,主要专家还有钟旭辉、赖伟明(香港)、谢纪超(香港)等医师,中心秘书为钟旭辉副主任医师。我国拥有国际性儿科肾脏病培训中心可以避免在其他国家受训时的语言障碍,非常有利于我国儿肾医师队伍的培养和壮大。按照 IPNA 规定,学员在培训中心经过系统培训期满后,经中心评估、IPNA 审查后可以获得“IPNA Fellow”的称号,并享有 IPNA 给予的如下待遇:

(1)获得 IPNA 颁发的“IPNA Fellow”证书;(2)获得 IPNA 赠送的一部 Pediatric Nephrology 专著;(3)由 IPNA 资助(免会议注册费,提供交通费 and 食宿费)参加一次亚洲或国内学术会议、或继续医学教育(CME)课程。

IPNA(中国)中心将于 2013 年继续招收培训学员,预计招收 2-4 名学员,培训时间约 9 个月(其中 2 个月在香港玛嘉烈医院青少年部接受培训);IPNA 将资助学员在培训期间的食宿费用、学员所在地至北京及北京至香港的往返机票。

申请者条件:医学本科以上学历、有儿内科执业医师证书并有三年以上儿科临床工作经验、有一定英语基础的儿科医生。

申请程序:(1)申请者将个人简历(包括学历、职称、英语水平以及肾脏领域的医、教、研经历等)、所在单位(科室)负责人和一位正高级职称医师的书面推荐信寄往北京大学第一医院儿(肾)科,可在上述文件中表明申请目的,如本人或本单位的(儿肾)专业发展规划,希望通过参加培训达到的目标;(2)IPNA(中国)培训中心将对申请者材料进行审核;(3)获准学员的资料将被报送 IPNA 备案;(4)由 IPNA(中国)培训中心通知被批准学员具体事宜。

申请材料邮寄地址:北京市西城区西安门大街 1 号,北京大学第一医院儿科(信封外面标注“IPNA 培训中心”字样);邮编 100034;收件人钟旭辉医师。

申请截止日期为 2013 年 1 月 15 日。

联系人:钟旭辉医师;

联系电话:010-83572168;

Email: xuhui7876@yahoo. com. cn。

北京大学第一医院儿(肾)科
2012 年 8 月 15 日