

哮喘患儿外周血 T 淋巴细胞上前列腺素 D2 受体改变研究

应延凤¹, 胡野¹, 单小云², 杜娟³, 屠平光¹

(1. 金华职业技术学院医学院, 浙江 金华 321007; 2. 金华市中心医院, 浙江 金华 321000;
3. 永康市第一人民医院, 浙江 永康 321300)

[摘 要] 目的 哮喘的慢性气道炎症与 Th2 的极化有关,炎症介质前列腺素 D2(PGD2)可通过 T 淋巴细胞上前列腺素 D2 受体(DP1/CRTH2)调控其极化和分泌功能,而且 CRTH2 是 Th2 细胞的特征性受体,研究不同哮喘病期 T 淋巴细胞上受体改变,对了解哮喘患儿中 Th2 极化状态和哮喘发病机制有重要意义。方法 正常对照组 35 例,哮喘急性发作期组 42 例和临床缓解期组 30 例。用酶联免疫吸附法测定外周血 IL-4,IL-5 和 IFN- γ ,用放射配体结合分析法测定外周血 T 细胞上 DP1/CRTH2 结合容量。结果 哮喘急性发作期和临床缓解期组 T 淋巴细胞上总结合和 CRTH2 受体结合容量比正常对照组显著增加($P<0.01$);DP1 差异无显著性。哮喘急性发作期和临床缓解期组 Th2 细胞因子 IL-4、IL-5 比正常对照组显著增加($P<0.01$);Th1 细胞因子 IFN- γ 比正常对照组显著减少($P<0.01$)。结论 支气管哮喘病人临床缓解期和急性发作期外周血 T 淋巴细胞上 CRTH2 受体表达增加,外周血中 Th2 细胞因子分泌增加, Th1 细胞因子分泌减少,提示在哮喘病人中存在 Th2 的极化状态,应用 CRTH2 拮抗剂可能是以后哮喘治疗的一个新靶点。 [中国当代儿科杂志,2009,11(3):199-202]

[关键词] 哮喘;淋巴细胞;CRTH2;儿童

[中图分类号] R562.2⁺5 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)03-0199-04

Changes of prostaglandin D2 receptor on T cells in peripheral blood of children with asthma

YING Yan-Feng, HU Ye, SHAN Xiao-Yun, DU Juan, TU Ping-Guang. Jinhua College of Professional and Technology, Jinhua, Zhejiang 321007, China (Email: yingyanfeng999@sina.com)

Abstract: Objective Chronic airway inflammation is associated with the polarization of TH2 cells in asthma. Prostaglandin D2 (PGD2) plays an important role in the polarization of TH2 cells. This study aimed to investigate the changes of PGD2 receptors (DP1/CRTH2) on T lymphocytes and their significance in asthma. **Methods** Seventy-two children with asthma were assigned to two groups: acute attack ($n=42$) and remission ($n=30$). Thirty-five healthy children were used as the control group. Plasma levels of TH2 cytokines IL-4 and IL-5, and TH1 cytokine INF- γ were detected using ELISA. Radiological binding assay (RBA) was used to measure the contents of DP1/CRTH2 receptors on T cells in peripheral blood (PPB). **Results** The total combining contents of DP and CRTH2 on T cells in PPB in the acute attack and the remission groups were significantly higher than those in the control group ($P<0.01$). There was no significant difference in the DP1 content among the three groups. Serum levels of IL-4 and IL-5 significantly increased ($P<0.01$), in contrast, serum levels of TH1 cytokine IFN- γ were significantly reduced in the acute attack and the remission groups compared with those in the control group ($P<0.01$). **Conclusions** The total combining contents of DP and CRTH2 on T cells increased, serum levels of TH2 cytokines also increased, but serum levels of TH1 cytokine decreased significantly in the acute attack and the remission phases in children with asthma. This showed that a polarization of TH2 cells occurred in children with asthma and suggested that CRTH2 antagonism may be a new target for the treatment of asthma. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (3):199-202]

Key words: Asthma; Lymphocyte; CRTH2; Child

哮喘是一种气道的慢性变态反应性疾病,与 T 细胞的 Th2 极化有关,而诸多炎症介质中可影响 T 细胞向 Th2 分化,其中主要来源于肥大细胞的活化前列腺素 D2(PGD2)有重要作用。PGD2 通过淋巴细胞膜上(DP1/CRTH2)双向受体调控其功能,DP 为 PGD2 受体(前列腺素 D2 受体),是一个异质性

[收稿日期]2008-06-10;[修回日期]2008-08-05
[基金项目]金华市科技局立项课题(编号:2004-1-361,2004-2-323)。
[作者简介]应延凤,男,硕士,副教授,副主任医师。主攻方向:小儿哮喘免疫与临床。

三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白复合体,与前列腺素(PG)有特异性,CRTH2受体是前列腺素相关的七跨膜受体,主要表达在人的Th2、Tc2型淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞上,PGD2与淋巴细胞上DP1结合,使胞内c-AMP水平增高,发挥多样的生理学功能,而与CRTH2受体结合后能降低胞内c-AMP水平,和激活胞内Ca²⁺运动,对Th2、Tc2型淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞上用Gαi依赖性方式进行化学趋化作用^[1~3],微血管渗透性增高、嗜酸性粒细胞浸润和杯细胞脱落,产生哮喘样反应。本研究试从不同病期哮喘患儿T淋巴细胞上DP1/CRTH2受体改变,探讨其在哮喘发病机制中地位和作用。

1 对象和方法

1.1 病例选择

2007年1~12月门诊就诊及住院的72例哮喘儿童均符合儿童哮喘诊断标准^[4],分急性发作期组和临床缓解期组,排除下列情况:有各种并发症、结核等其他感染。正常对照组为经本院体检健康的同年龄、无哮喘病史、无家族史及个人过敏史者,共35例。研究前征得家属的同意。

1.2 研究方法

随机选取符合选择条件病人,抽取外周血3 mL,采血前2周未用糖皮质激素,采血前12 h停用β-受体激动剂、茶碱类药物等。分别抽取清晨空腹静脉血3 mL,分离血浆,置-20℃冻存待测。血浆白细胞介素-4(IL-4),IL-5和INF-γ检测,均采用酶联免疫试剂盒,应用双抗体夹心ABC-ELISA(酶联免疫吸附法),检测步骤按照试剂盒说明书进行。试剂盒由深圳晶美生物有限公司提供。

1.3 外周血T淋巴细胞的分离

无菌采集患儿及正常健康儿童外周静脉血3 mL,肝素抗凝,以淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,采用溶血法溶解红细胞,经T细胞分离富聚柱(易莱锦生物公司)得纯化的T淋巴细胞,用20%的小牛血清RPMI 1640培养液调整细胞浓度为2×10⁶。S-AP/P免疫组化法检测其纯度>98%,台盼蓝染色检查其活性>95%。

1.4 T淋巴细胞上受体测定

用放射配体法测定。参照文献^[5~7],细胞用50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5洗涤1次,后混悬于50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5,包括5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, and 0.1 M NaCl。用双管,10⁶细胞/管

与12 nM的³H-PGD2(171.0Ci/mmol; PerkinElmer Life Science Products, Boston, MA),同时加上未标志激动剂(10⁻⁴ M) PGD2(Cayman产品)和竞争性配体BAYu3405(Cayman产品)和BWA868C(Cayman产品),用Tris-HCl buffer缓冲液补充到60 μL,³H-PGD2(5 nM,终浓度),室温下培育120 min后,每孔加入冷缓冲液终止反应,后抽滤到Whatman G/F B滤膜,用缓冲液冲洗2次,烘干,浸泡于闪烁液(Pico-Flour TM30),用液体闪烁计数器(SN683)测定,特异性结合为总结合和非特异性结合之差,DP1结合为特异性结合与CRTH2竞争性配体BAYu3405结合之差,CRTH2为特异性结合与DP1竞争性配体BWA868C结合之差。结合位点数用fmol/10⁶表示。

1.5 统计学方法

用SPSS 11.5统计软件进行各项指标统计,进行方差分析分析T淋巴细胞上受体结合容量在各哮喘病期改变。

2 结果

2.1 一般资料

共调查病例72例,平均年龄5.6±3.4岁。其中急性发作期组42例,平均年龄5.1±2.9岁,开始发病时间3.2±1.7岁,临床缓解期组30例,平均年龄5.9±3.2岁,开始发病时间2.8±1.9岁,正常对照组35例,平均年龄5.6±3.7岁。三组年龄、性别等构成差异无显著性。

2.2 白细胞介素检测结果

急性发作期组和临床缓解期组血浆IL-4和IL-5显著高于对照组,而血浆INF-γ显著低于对照组(表1)。

表1 各组白细胞介素检测结果

(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	IL-4	IL-5	INF-γ
对照组	35	7.21 ± 1.14	19.34 ± 5.37	9.71 ± 1.35
急性发作期组	42	11.74 ± 3.45 ^a	33.21 ± 8.78 ^a	6.45 ± 2.07 ^a
临床缓解期组	30	10.81 ± 0.83 ^a	30.01 ± 6.86 ^a	7.34 ± 2.48 ^a

a: 与对照组比较, P<0.01

2.3 三组T淋巴细胞上受体测定结果

急性发作期组和临床缓解期组DP总结合显著高于对照组,急性发作期组中CRTH2显著高于对照组。

表 2 各组 DP 受体和亚型结合比较 (fmol/10⁶ 细胞, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	DP 总结合	DP1	CRTH2
对照组	22	397.47 ± 62.53	216.24 ± 56.53	134.66 ± 51.95
急性发作期组	33	486.15 ± 70.18 ^b	207.13 ± 39.79	333.74 ± 58.22 ^b
临床缓解期组	28	450.89 ± 77.48 ^a	188.98 ± 42.75	306.54 ± 59.10

与对照组比较 a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

3 讨论

已有研究表明在哮喘患者尿液^[8]、肺泡灌洗液^[9]及诱导痰^[10]中 PGD2 及其代谢产物增高, PGD2 作为一个重要的炎症介质, 主要来源于肥大细胞的活化, 尚有少量来源于血小板、活化的巨噬细胞、树突细胞、Th2 淋巴细胞亚群, 由 C₂₀ 不饱和脂肪酸经环氧化酶降解而成。在体内可作为强力的支气管收缩剂, 比组胺强 10.2 倍, 比 PGF_{2α} 强 3.5 倍^[11], 还可通过与淋巴细胞膜上 DP1/CRTH2 受体结合调节免疫细胞功能, 所以相关细胞上受体结合能力与其功能有密切关联。

用纯化 T 细胞测定表面受体, 发现哮喘急性发作期和临床缓解期病人 T 淋巴细胞上 DP 总结合显著增加, 其特征性受体分子 CRTH2 受体结合容量比对照组和临床缓解期组显著增加, 但 DP1 受体表达无明显增加, 同时细胞因子分析也表现为 Th2 型细胞因子表达增加, 说明这些 T 淋巴细胞在哮喘情况下出现了向 Th2 极化分化状态。

CRTH2 受体是检测正常人和疾病者外周循环中 Th2、Tc2 型淋巴细胞最可靠的标志, CD4⁺ T 淋巴细胞可以分为 Th1、Th2 和 Th0 细胞。Th1/Th2 细胞间的平衡与哮喘发病机制有关, Th1 亚群促进细胞免疫, 可分泌 IFN-γ 等细胞因子; Th2 亚群主要分泌 IL-4、IL-5、IL-10 等细胞因子而促进体液免疫反应。CRTH2 是一种新的 G 蛋白偶联受体, 与 C5a 受体和 FMLP 受体高度同源^[6,12], IL-4 能够上调其表达, 而 IFN-γ 则下调其表达^[13]。

CRTH2 同时也是 PGD2 的一种受体, 参与白细胞的迁移, 可能与炎症反应有关。尽管不是所有的 CRTH2⁺ T 细胞产生 Th2 型的细胞因子, 然而 CRTH2⁺ T 细胞仅包括 Th2 或 Tc2 细胞, 而不包括 Th0 或 Tc0 细胞, 亦不包括 Th1 或 Tc1 细胞。Tsuda 等^[14]的实验也表明 CRTH2 表达于 Th2 和 Tc2 表面, 而不表达于 Th1 和 Tc1 表面。所以 CRTH2 表达的增加, 提示体内 Th2 的极化状态。而这状态出现, 可导致 Th2 因子分泌增多, 反过来导致进一步的 CRTH2 表达增加, 成为一个恶性循环, 激发哮喘

气道炎症并使之持续。我们研究中急性发作期和临床缓解期组 Th2 细胞因子 IL-4、IL-5 比正常对照组显著增加和 Th1 细胞因子 IFN-γ 比正常对照组显著减少也表明病人有 Th2 的极化状态的存在, 而这现象出现可能与 T 淋巴细胞上 CRTH2 受体结合容量增加导致的 CRTH2 介导的反应增强, 也可能提示 CRTH2⁺ CD4⁺ 数量的增加有关, 这与 Karagiannidis 等^[15]表明哮喘病人中 CRTH2⁺ CD4⁺ 数量增加, 在高原气候下哮喘症状的缓解与 CRTH2⁺ CD4⁺ 数量减少有关相符。

Iwasaki 等^[3]对特应性皮炎的外周血循环 Th2 细胞表面 CRTH2 分析表明, CRTH2⁺ CD4⁺ 细胞只占 CD4⁺ 组群中一部份, 有更纯化的 Th2 表型, CRTH2⁺ CD4⁺ 细胞在皮下淋巴细胞相关抗原阳性特应性皮炎病人中显著增高, 对 PGD2 和 Th2 型吸引化学因子有很强的趋化作用。CRTH2 受体也广泛表达在外周血中性粒细胞上, Takeshita 等^[16]通过 Th2 依赖性小鼠动物模型中发现用 CRTH2 受体拮抗剂可消除特应性皮炎的病理改变, 认为 CRTH2 受体在特应性皮炎的瀑布式炎症反应中起连接作用, 在过敏性炎症的激发和维持上有关键性作用。

在本研究中, 急性发作期与临床缓解期组的 DP 总结合与 CRTH2 受体结合容量和白细胞介素水平并无显著性差异, 说明临床缓解期只是症状上的改善, 体内的免疫紊乱情况依然存在, IL-4、IFN-γ 在临床缓解期和急性发作期中水平与国内研究相符^[17~19], 所以, 哮喘临床缓解期的治疗是十分必要的。

哮喘病人中 CRTH2 表达增加可能与遗传特性有关, 现已认为与哮喘发病机制与 DP 基因多态性有关, 人 DP 基因定位于 14q22.1, Oguma 等^[20]对美国 598 例哮喘患者和 220 例健康对照者研究 DP 基因多态性在哮喘易感性的作用后发现, 不论美国白人还是黑人, 只要携带单拷贝低转录效应的单倍型, 其患哮喘的危险性低于未携带者。这与影响 PTGDR (前列腺素受体基因, prostanoid DP receptor gene) 转录有关, 启动子三个单核苷酸多态性与不同转录因子的亲和力改变了 DP 基因的基础转录效应, 这与低转录效应的单倍型可使细胞表面 DP 受体表达减少, 降低了 PGD2 导致的 DP 介导的病理生理反应。定位于 14q 的 CRTH2 基因与哮喘病人病情严重度和气道高反应性有密切关系^[21], 哮喘病人中 T 细胞表面 CRTH2 表达的增高, 是否与基因多态性有关尚的待于进一步研究。

哮喘病人急性发作期和临床缓解期外周血 T

淋巴细胞上 CRTH2 受体表达增加,在哮喘病人中存在 Th2 的极化状态,外周血中 Th2 细胞因子分泌增加可能与 CRTH2 表达增加有关,应用 CRTH2 拮抗剂可能是以后哮喘治疗的一个新靶点。

[参 考 文 献]

[1] Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2[J]. J Exp Med, 2001, 193(2):255-261.

[2] Nagata K, Tanaka K, Ogawa K, Kenmotsu K, Imai T, Yoshie O, et al. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cell in vivo[J]. J Immunol, 1999, 162(3):1278-1286.

[3] Iwasaki M, Nagata K, Takano S, Takahashi K, Ishii N, Ikezawa Z, et al. Association of a new-type prostaglandin D2 receptor CRTH2 with circulating T helper 2 cells in patients with atopic dermatitis [J]. J Invest Dermatol, 2002, 119(3): 609-616.

[4] 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)(2003 年修订)[J]. 中华儿科杂志,2004,42(2):100-107.

[5] Virgolini I, Li S, Sillaber C, Majdic O, Sinzinger H, Lechner K, et al. Characterization of prostaglandin (PG)-binding sites expressed on human basophils: Evidence for a prostaglandin E1, I2 and A D2 receptor[J]. J Bio Chemistry, 1992, 267(18):12700-12708.

[6] Uller L, Mathiesen JM, Alenmyr L, Korsgren M, Ulven T, Högberg T, et al. Antagonism of the prostaglandin D2 receptor CRTH2 attenuates asthma pathology in mouse eosinophilic airway inflammation[J]. Respir Res, 2007, 28, 8(1):16-26.

[7] Xue L, Gyles SL, Wetley FR, Gazi L, Townsend E, Hunter MG, et al. Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-Like molecule expressed on Th2 cells[J]. J Immunol, 2005, 175(10): 6531-6536.

[8] Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE, Holgate ST. The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D2 in normal and asthmatic man[J]. N Engl J Med, 1984, 311(4):209-213.

[9] O'Sullivan S, Roquet A, Dahlén B, Dahlen SE, Kumlin M. Urinary excretion of inflammatory mediators during allergen-induced early and late phase asthmatic reactions[J]. Clin Exp Allergy, 1998, 28(11):1332-1339.

[10] Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR, Roberts LJ 2nd, Gosset P, Workman R, et al. Release of prostaglandin D2 into human airways

during acute antigen challenge[J]. N Engl J Med, 1986, 315(13):800-804.

[11] Brightling CE, Ward R, Woltmann G, Bradding P, Sheller JR, Dworski R, et al. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(3):878-882.

[12] Abe H, Takeshita T, Nagata K, Arita T, Endo Y, Fujita T, et al. Molecular cloning, chromosome mapping and characterization of the mouse CRTH2 gene, a putative member of the leukocyte chemoattractant receptor family[J]. Gene, 1999, 227(1):71-77.

[13] De Fanis U, Mori F, Kurnat RJ, Lee WK, Bova M, Adkinson NF, et al. GATA3 up-regulation associated with surface expression of CD294/CRTH2: a unique feature of human Th cells [J]. Blood, 2007, 109(10):4343-4350.

[14] Tsuda H, Michimata T, Sakai M, Nagata K, Nakamura M, Saito S. A novel surface molecule of TH2-andTc2-type cells, CRTH2 expression on human peripheral and de-cidual CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the early stage of pregnancy[J]. Clin Exp Immunol, 2001, 123(1):105-111.

[15] Karagiannidis C, Hense G, Rueckert B, Mantel PY, Ichters B, Blaser K, et al. High-altitude climate therapy reduces local airway inflammation and modulates lymphocyte activation [J]. Scand J Immunol, 2006, 63(4):304-310.

[16] Takeshita K, Yamasaki T, Nagao K, Sugimoto H, Shichijo M, Gantner F, et al. CRTH2 is a prominent effector in contact hypersensitivity-induced neutrophil inflammation [J]. Int immunol, 2004, 16(7):947-959.

[17] 肖春香,殷小成,尹珊辉,匡艳华,王金兰. 哮喘患儿血清 IL-18, IL-4 和 INF- γ 水平测定的临床意义的研究[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2006, 20(4):240-241.

[18] 董蔚,盛军,浦燕艳,石学耕,史桂英. 哮喘患儿红细胞内 IL-4, INF- γ 和血清 IgE 测定及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(2):119-120.

[19] 何学华,李云,杨于嘉,易红玲. 灭活卡介苗经皮接种治疗婴幼儿哮喘对 IgE, ECP, INF- γ , IL-4 水平的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(3):191-194.

[20] Oguma T, Palmer LJ, Birben E, Sonna LA, Asano K, Lilly CM. Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma [J]. N Engl J Med, 2004, 351(17):1752-1763.

[21] Huang JL, Gao PS, Mathias RA, Yao TC, Chen LC, Kuo ML, et al. Sequence variants of the gene encoding chemoattractant receptor expressed on Th2 cells (CRTH2) are associated with asthma and differentially influence mRNA stability[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(21):2691-12697.

(本文编辑:吉耕中)