

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.12.020

论著·临床研究

反复喘息婴幼儿外周骨髓系抑制细胞检测及意义

王秀芳 韩影 张艳丽 宋丽 许春娜

(郑州大学第三附属医院儿内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨外周骨髓系抑制细胞(MDSCs)占单个核细胞比例在婴幼儿反复喘息发生、发展中的意义。**方法** 随机选取急性发作期的反复喘息婴幼儿31例作为喘息组,选取同年龄支气管肺炎患儿27例作为肺炎组;另选取同期在我院外科住院的患疝气、肾结石等非感染、非肿瘤性疾病术前患儿27例作为对照组。采用流式细胞术检测各组患儿外周血MDSCs占单个核细胞比例(MDSCs%)。**结果** 3组患儿外周血中MDSCs%差异有统计学意义($P<0.05$),其中喘息组MDSCs%高于肺炎组和对照组(均 $P<0.05$)。**结论** 反复喘息婴幼儿外周血中MDSCs高表达,可能在婴幼儿喘息反复发生、发展中起重要作用。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(12): 1116-1118]

[关键词] 喘息; 髓系抑制细胞; 婴幼儿

Levels of myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood of infants with recurrent wheezing

WANG Xiu-Fang, HAN Ying, ZHANG Yan-Li, SONG Li, XU Chun-Na. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China (Email: wxf456@126.com)

Abstract: Objective To study myeloid-derived suppressor cells (MDSC) levels in peripheral blood of infants with recurrent wheezing, and the role of MDSC in the development of recurrent wheezing. **Methods** Thirty-one infants with recurrent wheezing at wheezing attacks were randomly enrolled in the study. Twenty-seven infants with bronchopneumonia and 27 preoperative infants (hernia or renal calculus), without infectious or neoplastic diseases, were selected as controls. The proportion of MDSC in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was measured by flow cytometry. **Results** The proportion of MDSC in PBMC in infants with wheezing was significantly higher than in those with bronchopneumonia and preoperative infants ($P<0.05$). **Conclusions** MDSC levels increase in infants with recurrent wheezing, suggesting that MDSC may play a crucial role in the development of this disorder.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(12): 1116-1118]

Key words: Wheezing; Myeloid-derived suppressor cell; Infant

喘息是婴幼儿时期常见的呼吸道症状,原因常与感染、特应性体质有关,加之婴幼儿时期气管、支气管缺乏弹性组织、支撑作用薄弱,细支气管无软骨、呼气时受压,且黏膜柔嫩、血管丰富、富含黏液腺,因此炎症时更易致管腔狭窄,喘息常反复发生。国内研究表明婴幼儿反复喘息第一位的病因为病毒感染,其次为婴幼儿哮喘^[1]。但目前对婴幼儿喘息反复发生的机制及其预后尚不完全清楚。髓系抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是上世纪80年代在肿瘤患者体内发

现的具有负向调节机体免疫功能的髓系来源的抑制性细胞群体^[2-4]。随着研究的不断深入,近年来发现MDSCs不仅在肿瘤发生发展中起重要作用,而且在慢性感染、脓毒血症、骨髓移植、自身免疫性疾病等病理状态下亦有MDSCs的高表达,且发挥重要作用^[5]。国外尚有研究表明MDSCs在肺部过敏性炎症中高表达,且参与哮喘肺部炎症、气道高反应及气道重塑的形成^[6]。但目前尚未见有关MDSCs与婴幼儿反复喘息之间关系的报道。本研究主要通过检测反复喘息婴幼儿外周血中的

[收稿日期] 2013-06-24; [修回日期] 2013-07-21

[作者简介] 王秀芳,女,主任医师,教授。

MDSCs 比例, 探讨其在婴幼儿反复喘息发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选取2012年10月至2013年4月在我院呼吸病区住院的反复喘息婴幼儿31例为喘息组, 均处于急性发作期, 肺部可闻及广泛哮鸣音, 其中男16例, 女15例, 年龄在8个月至3岁, 平均年龄为1岁8个月, 入组患儿在过去的12个月内至少有3次及以上喘息发作史, 并排除先天发育畸形、肺结核、异物吸入、纵膈占位等其他由明确病因引起的喘息; 选取同期在我院住院的同年龄支气管肺炎患儿27例为肺炎组, 其中男15例, 女12例, 年龄在3个月至3岁, 平均年龄为1岁7个月, 诊断符合第7版诸福棠实用儿科学支气管肺炎诊断标准^[7]; 另选取同期在我院外科住院的患有疝气、肾结石等非感染、非肿瘤性疾病的术前同年龄患儿27例为对照组, 其中男14例, 女13例, 年龄在3个月至3岁, 平均年龄为1岁5个月。所有入组患儿均为足月出生, 近2周无激素及其他免疫调节剂使用史, 3组患儿在年龄、性别等方面比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$), 且获得医院医学伦理学委员会批准, 并征得家长知情同意。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和实验仪器 藻红蛋白(PE)标记的 anti-CD33⁺ 和藻蓝蛋白(APC)标记的 anti-CD11b⁺ 均购自美国 B.D 公司; FACS Calibur 型流

式细胞仪购自美国 B.D 公司。

1.2.2 标本的采集及检测 各组患儿均在入院24 h 内采集空腹静脉血 1 mL, EDTA 抗凝, 室温保存。取抗凝血 0.1 mL, 加入流式细胞仪专用管中, 避光条件下加入 anti-CD11b⁺ 和 anti-CD33⁺ 各 30 μ L, 震荡、混匀; 管底部插入冰中避光孵育 20 min; 加入红细胞裂解液 1 mL, 震荡混匀后避光裂解 15 min, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 液 1 mL 洗涤, 如此反复离心 3 次后, 弃上清, 加入 4% 多聚甲醛 0.3 mL, 震荡、混匀, 固定后上流式细胞仪, 检测 MDSCs 在外周血中单个核细胞比例, 应用 CELLQuest 软件, 用前向角散射(forward scatter, FSC) / 侧向角散射(side scatter, SSC) 设门画出有核细胞群(R1), 以去除死细胞及细胞碎片, 二维点图显示 R1 内细胞, 右上象限显示 CD11b⁺CD33⁺MDSCs 细胞群, 见图 1。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血 MDSCs 占单个核细胞比例比较

3 组患儿外周血中 MDSCs 占单个核细胞比例(MDSCs%) 差异有统计学意义($F=590.24$, $P<0.05$)。其中喘息组 MDSCs% ($3.2\% \pm 0.7\%$) 高于肺炎组($0.8\% \pm 0.7\%$)和对照组($0.5\% \pm 0.5\%$), 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。见图 1。

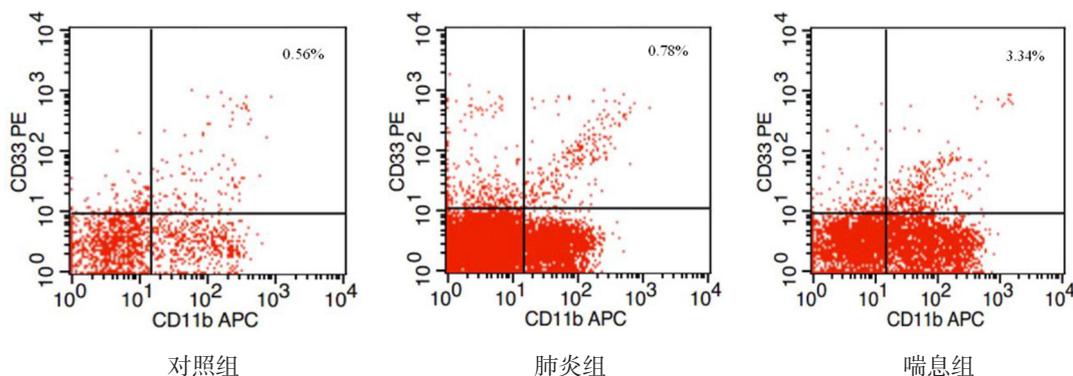


图 1 3 组患儿外周血 MDSCs 占单个核细胞比例流式图 右上象限示 CD11b⁺CD33⁺MDSCs 细胞群。

3 讨论

喘息是婴幼儿时期常见的呼吸道症状,约 30% 的儿童在 3 岁之前至少发生过 1 次喘息,约 50% 的儿童在 6 岁以前发生过 1 次喘息,而其中 30% 的儿童在 6 岁以后发展为持续哮喘^[8]。婴幼儿喘息多与呼吸道病毒感染、特应性体质有关,且与儿童哮喘存在类似的病理特点。Renzi 等^[9]曾对反复喘息患儿进行免疫学检测,结果发现嗜酸性粒细胞数增多, Th1 类细胞特征性细胞因子如 IFN- γ 水平明显降低,而 Th2 类细胞特征性细胞因子如 IL-4 明显升高,证实反复喘息患儿存在 Th1/Th2 细胞失衡,并指出辅助性 T 细胞的平衡紊乱可能是造成婴幼儿反复喘息的根本原因。

机体的免疫系统是一个复杂的网络调控系统,由固有免疫和适应性免疫组成。MDSCs 是一群骨髓来源具有负向调节机体免疫功能的异质性细胞,包含未成熟的巨噬细胞、树突状细胞及粒细胞,其在人体细胞表面共同的标志为 CD11b⁺CD14⁻CD33⁺,缺少 MHC II 类 HLA-DR^[10]。尽管 MDSCs 最初在肿瘤宿主中被描述,但现研究已经证实^[5]:在慢性感染、移植物抗宿主病(GVHD)、应用免疫抑制剂等疾病状态下,MDSCs 可在骨髓、血液、脾脏、淋巴结以及疾病发生部位等组织和器官大量聚积。MDSCs 可通过多种机制对机体固有免疫和适应性免疫系统发挥调节作用。其免疫调节作用主要与两种精氨酸代谢酶密切相关,即精氨酸合酶 1 (ARG1) 和诱导性一氧化氮合酶(iNOS)^[11];MDSCs 高表达 ARG1,分解 L-精氨酸,减少细胞微环境中 L-精氨酸,低 L-精氨酸环境可影响 T 细胞增殖周期,导致 T 细胞周期阻滞在 G0/G1 期无法增殖,发挥免疫抑制功能^[12]。Ray 等^[13]在研究细菌脂多糖(LPS)在肺部过敏性炎症的作用过程中,意外的发现随着 LPS 剂量的增加,哮喘小鼠肺组织中出现 MDSCs 聚集增加,并指出 MDSCs 和调节性 T 细胞(Treg 细胞)一样,能够调节 Th1/Th2 类细胞平衡。

本研究发现反复喘息婴幼儿外周血中高表达 MDSCs,较支气管肺炎组及对照组显著升高,提示可能在婴幼儿反复喘息发生、发展中起重要作用。结合他人研究,考虑 MDSCs 可通过多种途径参与婴幼儿反复喘息的发病机制。本研究推断 MDSCs 可能打破 Th1/Th2 细胞平衡,引起喘息患儿体内免疫紊乱;MDSCs 不仅能介导肿瘤的免疫逃逸,还能介导呼吸道合胞病毒(RSV)的免疫逃逸、致使病毒在宿主肺部增殖,甚至长期生存,导致肺部

炎症反复刺激,形成慢性炎症;MDSCs 高表达的 iNOS,其诱导生成的高浓度一氧化氮可导致微血管渗出增加、DNA 破坏、支气管上皮细胞脱落和功能变性,从而加重气道炎症,致气道反应性升高。此外,MDSC 还能产生其他活性氧族(ROS,主要是 H₂O₂)、活性氮族(RNS)以及这两者结合形成的过亚硝酸盐来发挥免疫调节作用,促进肺部炎症的发生发展。其具体机制有待于进一步深入研究。促进 MDSCs 分化成熟,可能会改善反复喘息婴幼儿体内的免疫紊乱,减少喘息的发生。本研究拟通过拓宽婴幼儿反复喘息发生及发展的视野,希望能为其治疗、改善预后提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] 姚苗苗,王克明,徐群英. 婴幼儿喘息的病因及相关危险因素分析[M]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(3): 195-198.
- [2] Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic lewis lung carcinoma tumors[J]. Cancer Research, 1987, 47(1): 100-105.
- [3] Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(14): 6254-6258.
- [4] Strober S. Natural suppressor(NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships[J]. Annu Rev Immunol, 1984, 2: 219-237.
- [5] Kao J, Ko EC, Eisenstein S, Sikora AG, Fu S, Chen SH. Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 77(1): 12-29.
- [6] Deshane J, Zmijewski JW, Luther R, Gaggari A. Free radical-producing myeloid-derived regulatory cells: potent activators and suppressors of lung inflammation and airway hyperresponsiveness[J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(5): 503-518.
- [7] 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, 2002: 1175-1187.
- [8] Bisgaard H, Szeffler S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children[J]. Pediatr Pulmonol, 2007, 42(8): 723-728.
- [9] Renzi PM, Turgeon JP, Yang JP, Drblik SP, Marcotte JE. Cellular immunity is activated and a TH-2 response is associated with early wheezing in infants after bronchiolitis[J]. J Pediatr, 1997, 130(4): 584-593.
- [10] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid derived suppressor cells as regulators of immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(3): 162-174.
- [11] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 641-654.
- [12] Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB. Regulation of T cell receptor CD3 zeta chain expression by L-arginine[J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21123-21129.
- [13] Ray P, Arora M, Poe SL, Ray A. Lung myeloid-derived suppressor cells and regulation of inflammation[J]. Immunol Res, 2011, 50(2-3): 153-158.

(本文编辑: 周勇)