

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.09.009

论著·临床研究

## 儿童巨细胞病毒感染致喘息发生的免疫学机制

朱晓华<sup>1,2</sup> 陈强<sup>2</sup> 李秋根<sup>3</sup> 李岚<sup>2</sup> 柯江维<sup>4</sup> 刘志强<sup>4</sup> 冉飞<sup>4</sup>

(1. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330006; 2. 江西省儿童医院呼吸科, 江西 南昌 330006;  
3. 江西省人民医院, 江西 南昌 330006; 4. 江西省儿童医院检验科, 江西 南昌 330006)

**[摘要]** **目的** 探讨巨细胞病毒(CMV)感染儿童喘息发作可能的免疫学发病机制。**方法** 选取5岁以下CMV感染喘息患儿25例,测定血清调节性T细胞(Treg)、辅助性T细胞17(Th17)细胞因子IL-10、IL-6、IL-17表达水平和外周血淋巴细胞亚群。20例同年龄段健康儿童作为对照组。**结果** 与对照组比较,CMV感染喘息组血清IL-10降低,IL-6、IL-17升高,淋巴细胞亚群NK细胞降低、CD8<sup>+</sup>T细胞、CD19<sup>+</sup>B细胞百分比升高,差异均有统计学意义。**结论** CMV感染喘息儿童存在Treg/Th17失衡、细胞免疫功能紊乱,推测Treg/Th17失衡及细胞免疫功能紊乱可能是CMV感染后儿童喘息发生发展重要的免疫学发病机制。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(9): 831-834]

**[关键词]** 巨细胞病毒感染; 喘息; 免疫学机制; 儿童

### Immunological mechanism of wheezing attack in children with cytomegalovirus infection

ZHU Xiao-Hua, CHEN Qiang, LI Qiu-Gen, LI Lan, KE Jiang-Wei, LIU Zhi-Qiang, RAN Fei. School of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China (Email: zxhxmc@163.com)

**Abstract: Objective** To study the possible immunological mechanism of wheezing attack in children with cytomegalovirus (CMV) infection. **Methods** A total of 25 under-5-year-old children with wheezing following CMV infection were enrolled. The expression of serum regulatory T cells (Treg)/T helper 17 (Th17) cytokines interleukin (IL)-10, IL-6, and IL-17, and peripheral blood lymphocyte subsets were determined. Twenty age-matched healthy children were selected as the control group. **Results** The wheezing group had a significantly reduced serum IL-10 level, significantly increased IL-6 and IL-17 levels, significantly reduced levels of natural killer cells, and significantly increased levels of CD8<sup>+</sup>T cells and CD19<sup>+</sup>B cells, as compared with the control group. **Conclusions** Wheezing children with CMV infection have Treg/Th17 imbalance and cellular immune dysfunction, which may be an important immunological mechanism of the development of wheezing in children after CMV infection.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(9): 831-834]

**Key words:** Cytomegalovirus infection; Wheezing; Immunological mechanism; Child

喘息是儿童下呼吸道疾病常见症状之一,我国儿童首次喘息90.33%发生在5岁以下;儿童常见的喘息性疾病包括毛细支气管炎、喘息性支气管炎、喘息性支气管肺炎和哮喘;病毒感染是儿童时期喘息最常见的病因之一,常见以呼吸道合胞病毒(RSV)、巨细胞病毒(CMV)、鼻病毒、腺病毒、偏肺病毒等感染为主<sup>[1-2]</sup>。病毒感染与机体调节性T细胞免疫功能有重要关系<sup>[3]</sup>。CMV感

染在我国广泛流行,是近年围产医学、儿科学、病毒学密切关注的焦点问题,而儿童特别是婴幼儿因免疫功能发育不成熟成为最大的易感人群。儿童感染CMV后,在外周血中出现具有抑制细胞毒表型的活化T淋巴细胞,如果宿主的T细胞功能受损,潜伏的病毒就可能激活并引起多种症候群,如CMV肝炎、CMV肺炎等。研究证实CMV感染在免疫系统发育不成熟和免疫缺陷的人群中

[收稿日期] 2016-04-18; [接受日期] 2016-06-15  
[作者简介] 朱晓华,女,硕士,主任医师。

可引起严重疾病<sup>[4]</sup>，免疫异常是CMV感染发病的关键机制<sup>[5]</sup>。有研究发现CMV感染可导致婴儿初次喘息发作<sup>[6]</sup>，小儿喘息性疾病的发生与CMV活动性呼吸道感染密切相关<sup>[7]</sup>，其发病不仅与病毒侵犯气道上皮细胞直接引起损伤相关，还可能与免疫反应相关<sup>[8]</sup>。

本研究收集江西省儿童医院呼吸科1年中儿童喘息病例，计算CMV感染阳性率，以健康儿童作为对照，调查5岁以下CMV感染喘息儿童调节性T细胞(Treg)、辅助性T细胞17(Th17)细胞因子IL-10、IL-6、IL-17的表达和淋巴细胞亚群的变化，分析CMV感染与儿童喘息发病的关系，探讨CMV感染儿童喘息发生可能的免疫学机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

研究对象为江西省儿童医院呼吸科2014年12月至2015年11月收治的临床表现有咳嗽、气促、喘息，体检肺部可闻及喘鸣音，临床诊断符合喘息性支气管炎、喘息性支气管肺炎、毛细支气管炎、哮喘的住院病例，均除外先天性喉喘鸣等先天气道发育畸形、呼吸道异物等疾病，诊断标准参照第8版《儿科学》<sup>[9]</sup>。入院均完善血清CMV-IgM、IgG抗体和其他感染病原如支原体、衣原体及其他呼吸道病毒检测、痰培养、血培养等，记录CMV感染阳性人数，计算感染阳性率，并将CMV-IgM阳性定义为CMV近期感染<sup>[10]</sup>。选取单纯CMV阳性喘息患儿(其他病原检测均阴性)25例为观察组，其中男19例，女6例，中位年龄10个月(范围1~48个月)。选取同期我院儿童保健门诊体检健康儿童20例为对照组，其中男15例，女5例，中位年龄7.5个月(范围1~57个月)。两组男女性别构成经 $\chi^2$ 检验差异无统计学意义( $\chi^2=0.006$ ,  $P=0.938$ )；两组年龄经秩和检验差异亦无统计学意义( $Z=0.321$ ,  $P=0.748$ )。本研究获得患儿家长知情同意并经过了医院伦理委员会批准。

### 1.2 标本采集

所有病例均于住院当日或次日采集痰、咽拭子、血标本送检。(1)痰培养细菌检测：无菌负压吸引法采集合格痰液标本即刻送痰培养检测。

(2)病毒抗原检测：取咽拭子或痰液标本，采用直接快速检测RSV、腺病毒、流感病毒A型、流感病毒B型、副流感病毒1、2、3型等7种呼吸道病毒抗原。(3)血标本检测：取血标本行CMV抗体、肺炎支原体、衣原体抗体、血培养等检测。

### 1.3 细胞因子IL-6、IL-10、IL-17表达水平的检测

均采用仪器IMMULIE1000进行细胞因子测定，检测方法均为ELISA法，其中IL-6、IL-10通过SIEMENS公司生产的配套试剂盒来检测，IL-17通过北京索莱宝生物公司生产的试剂盒来检测。均按试剂盒说明书操作进行检测。

### 1.4 外周血淋巴细胞亚群测定

采用仪器BD FACSCanto II，通过应用BD FACSDiva Software软件及配套试剂，按说明书操作步骤进行淋巴细胞亚群分析检测。

### 1.5 统计学分析

所有数据用SPSS 18.0统计软件处理，计数资料以率(%)表示。CMV感染喘息儿童与对照儿童两组间IL-6、IL-10、IL-17 3个指标经Kolmogorov-Smirnov法进行正态性检验，不服从正态分布，故用中位数和四分位间距[ $P_{50}$ ( $P_{25}$ ,  $P_{75}$ )]描述，组间比较采用秩和检验。NK细胞、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>T细胞、CD19<sup>+</sup>B细胞5个指标经Kolmogorov-Smirnov法进行正态性检验，服从正态分布，以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示，组间比较进行成组 $t$ 检验(方差不齐时用近似 $t$ 检验)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CMV感染阳性率

该院呼吸科2014年12月至2015年11月收治住院总人数共5247人，其中喘息性疾病住院患儿1962人(37.39%)，CMV-IgM阳性的有95例，其阳性率为4.84%。

### 2.2 血清细胞因子IL-6、IL-10、IL-17的表达

与对照组比较，CMV感染喘息组血IL-6、IL-17水平升高，IL-10降低，差异均有统计学意义( $P<0.05$ )，见表1。

表 1 两组细胞因子表达水平的比较 [P<sub>50</sub> (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]

组别	n	IL-6	IL-10	IL-17
对照组	20	4.8(4.3,5.5)	122.1(76.8,143.2)	76.2(44.8,123.1)
喘息组	25	11.3(5.9,23.9)	5.1(3.7,9.3)	335.0(182.7,645.6)
Z 值		3.598	5.711	4.568
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 2 两组淋巴细胞免疫功能指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	NK	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>
对照组	20	11 ± 6	39.3 ± 7.6	20.5 ± 3.8	20.9 ± 5.4	66.9 ± 5.7
喘息组	25	7 ± 5	33.7 ± 11.8	25.9 ± 9.7	27.4 ± 12.7	63.1 ± 2.6
t 值		-2.23	-1.84	2.57*	2.27*	-1.31*
P 值		0.031	0.072	0.015	0.030	0.201

注: \* 采用近似 t 检验。

### 3 讨论

本研究结果显示 1 年间该院呼吸科因喘息性疾病住院人数占总住院人数的 37.39%, CMV-IgM 阳性率为 4.84%, 提示 CMV 感染是儿童喘息性疾病重要感染病原之一, 临床应引起高度关注。

Treg/Th17 失衡在哮喘发病中起重要作用<sup>[11]</sup>, 也是促进变应性气道疾病症状加重的关键因素<sup>[12]</sup>, 当 Treg/Th17 平衡失调, 出现 Th17 优势反应, 就会发生免疫反应异常, 造成哮喘等变应性气道疾病的发生。儿童喘息性疾病与哮喘发生关系非常密切, 减少婴幼儿喘息性疾病的发生有可能降低儿童哮喘的发病率<sup>[13]</sup>。喘息性疾病患儿存在着 T 淋巴细胞及其亚群失衡, 提示早期喘息性疾病与哮喘发病机制存在类似的细胞因子及 T 细胞亚群变化<sup>[14]</sup>。IL-17 是 T 细胞调节中性粒细胞参与哮喘炎症反应的中介, 是一种具有促炎作用的细胞因子。IL-10 是具有抗炎作用的细胞因子, 可抑制促炎细胞因子的合成, 与 IL-17 在功能上相互拮抗<sup>[15-16]</sup>。IL-17、IL-10 能在一定程度上反映 Th17、Treg 细胞亚群的功能状态, 因而成为监测 Treg/Th17 细胞功能的常用指标。

CD4<sup>+</sup> T 细胞的免疫应答发挥了多种不同的效应功能<sup>[17]</sup>。CD4<sup>+</sup> T 细胞包括 Th1 细胞、Th2 细胞、Treg 和 Th17 细胞。其中 Th1 细胞产生 IFN- $\gamma$ , Th2 细胞主要分泌 IL-4, Treg 主要相关因子有 IL-10、TGF- $\beta$ , 而 Th17 细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-6、IL-23 等细胞因子。CMV 感染可通过上调 IL-17、

### 2.3 外周血淋巴细胞亚群流式分析

与对照组比较, CMV 感染喘息组血 NK 水平降低, 血 CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD19<sup>+</sup> B 细胞百分比升高, 差异有统计学意义 (P<0.05); 两组间血 CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> T 细胞水平比较差异无统计学意义 (表 2)。

ROR- $\gamma$ t 表达, 下调 IL-10、Foxp3 表达, 而导致 Treg/Th17 分化失衡, 表现为 Th17 细胞呈优势应答状态, 进而引发异常免疫反应造成病理状态, 证实 Treg/Th17 平衡参与了 CMV 感染发病机制, 并可能与病毒活动状态相关<sup>[18]</sup>。但也有研究发现人 CMV 感染后会促进 IL-10 的表达<sup>[19]</sup>。本研究显示, 与健康儿童比较, CMV 感染后喘息患儿血 IL-6、IL-17 水平均升高, Th17 细胞呈优势应答, 促进机体炎症反应发生, 而 IL-10 水平降低, 抗炎作用减弱, Treg/Th17 免疫异常, 从而导致 CMV 感染后喘息的发生。

细胞免疫功能紊乱也参与儿童喘息性疾病的发病<sup>[13]</sup>, 研究显示 CMV 感染后病毒与机体相互作用导致机体免疫功能紊乱, 尤其是细胞免疫功能, CMV 感染可明显降低机体免疫功能, 尤其是细胞免疫功能<sup>[20]</sup>, 在 CMV 持续感染过程中, 细胞免疫在肝细胞损害及病毒清除中起重要作用<sup>[21]</sup>。T 细胞是参与机体细胞免疫反应, 并在免疫应答中起重要调节作用的免疫细胞<sup>[22]</sup>。B 淋巴细胞是发挥体液免疫功能的主要细胞, 这类细胞以表达和分泌免疫球蛋白为特征。CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> 细胞是成熟 B 细胞特异性标志, 是鉴别 B 细胞最好的标志。CD3<sup>+</sup> 细胞是成熟 T 淋巴细胞的特征性标志, 反映了 T 淋巴细胞活化的比例, CD4<sup>+</sup> 细胞是辅助性 T 淋巴细胞, 它具有辅助 T、B 淋巴细胞应答的功能。本研究显示, CMV 感染后喘息儿童 NK 细胞水平降低, 血 CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD19<sup>+</sup> B 细胞水平升高, CMV 感染可影响 T 细胞亚群的平衡, 出现机体免

疫功能的失调。CMV感染后,在免疫监视中起重要作用的NK细胞首先出现反应,NK细胞活性降低,CD8<sup>+</sup>T细胞含量增多,这是机体对首先感染的病原作出的保护性反应<sup>[5]</sup>。研究发现哮喘急性发作组和喘息性肺炎组CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>和CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>淋巴细胞水平较正常组显著升高,提示B淋巴细胞在哮喘发作及肺炎发生喘息时表达增强,大量B细胞活化增殖产生抗体增多,也证实喘息性肺炎与支气管哮喘之间可能存在着共同的发病机制<sup>[14]</sup>。有研究显示,有症状的CMV感染患儿外周血CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平均低于无感染症状者及健康对照组,CD8<sup>+</sup>T细胞水平明显高于无感染症状者及健康对照组,且差异有统计学意义,其中CD4<sup>+</sup>T细胞水平降低最明显,由此说明CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞亚群细胞水平可作为判断新生儿CMV感染活动性的有效参考<sup>[20]</sup>。本研究显示CMV感染的喘息患儿血CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>T细胞水平降低,但与健康儿童相比差异无统计学意义,与上述研究<sup>[20]</sup>结果不尽相同,分析原因可能与本研究选取样本量偏少有关。

总之,喘息性疾病是儿童常见疾病,CMV感染是儿童喘息发病的重要病因之一。CMV感染后喘息患儿不仅存在Th17/Treg平衡紊乱,也存在淋巴细胞免疫功能紊乱,免疫调节稳态失衡是CMV感染后靶器官进一步损伤的重要因素之一。以上结果提示,Th17/Treg失衡及细胞免疫功能紊乱可能是CMV感染后儿童喘息发生发展重要的免疫学发病机制,应提高对CMV感染儿童喘息的临床认识,并从病因学、免疫学等方面进行综合治疗,从而更好地控制儿童喘息的发生、发展。

#### [参 考 文 献]

- [1] 程远,陈德晖,黄向晖,等. 5岁以下儿童喘息性疾病与呼吸道合胞病毒、偏肺病毒、博卡病毒的相关临床分析[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(4): 339-341.
- [2] Zhang Q, Gao Y, Peng Y, et al. Epidemiological survey of human cytomegalovirus antibody levels in children from Southeastern China[J]. Virol J, 2014, 11: 123.
- [3] Veiga-Parga T, Sehrawat S, Rouse BT. Role of regulatory T cells during virus infection[J]. Immunol Rev, 2013, 255(1): 182-196.
- [4] Cicin-Sain L, Sylwester AW, Hagen SI, et al. Cytomegalovirus-specific T cell immunity is maintained in immunosenescent rhesus macaques[J]. J Immunol, 2011, 187(4): 1722-1732.
- [5] Solana R, Tarazona R, Aiello AE. CMV and immunosenescence: from basics to clinics[J]. Immun Ageing, 2012, 9(1): 23-31.
- [6] Morisawa Y, Maeda A, Sato T, et al. Cytomegalovirus infection and wheezing in infants [J]. Pediatr Int, 2008, 50(5): 654-657.
- [7] 钱前,曾昭成,王卫兵,等. 婴幼儿喘息性疾病与巨细胞病毒感染关系[J]. 山东医药, 2013, 53(44): 47-48.
- [8] 潘嘉严,徐济宝. 小儿喘息性疾病与巨细胞病毒抗体关系研究[J]. 医学综述, 2010, 16(18): 2880-2881.
- [9] 李昌崇. 呼吸系统疾病[M]//儿科学. 王卫平. 第8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 264-287.
- [10] Tyagi N, Vacek TP, Fleming JT, et al. Hyperhomocysteinemia decreases bone blood flow [J]. Vasc Health Risk Manag, 2011, 7: 31-35.
- [11] Jiang H, Wu X, Zhu H, et al. FOXP3(+)Treg/Th17 cell imbalance in lung tissues of mice with asthma[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3): 4158-4163.
- [12] 张杨,甄宏韬. Th17细胞和Treg细胞与变态反应性气道疾病[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(22): 7330-7332.
- [13] 牟京辉,陈慧中. 病毒感染与婴幼儿喘息性疾病[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(16): 1212-1214.
- [14] 周炜,季伟,俞君. T细胞亚群在儿童喘息性疾病中表达的研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(8): 848-850.
- [15] 陈长荣,邓静敏,龚臣,等. 慢性持续期过敏性支气管哮喘外周血IL-17、IL-10与IL-4、IFN- $\gamma$ 失衡状态的研究[J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(3): 414-416.
- [16] 陈啸洪,李华浚,姚欢银,等. 外周血Th17和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞变化与患儿支气管哮喘活动状态的相关性研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(8): 969-971.
- [17] Pieters J. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance[J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(6): 399-407.
- [18] 谭艳芳,于四景,王婕,等. Treg/Th17平衡在巨细胞病毒感染发病机制中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(6): 649-651.
- [19] 武丽娜,梁建芳,郑绘霞,等. TNF- $\alpha$ 、IL-10、bcl-2、bax与人巨细胞病毒感染导致胚胎停育的相关性[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(4): 373-375.
- [20] 乔增培,刘彩霞,谢奇朋. T细胞亚群水平检测对判断新生儿巨细胞病毒感染活动性的意义[J]. 检验与临床, 2012, 50(1): 84-85.
- [21] 熊苑. 更昔洛韦治疗婴儿巨细胞病毒肝炎的临床疗效评价及对细胞因子的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(11): 1130-1132.
- [22] Jartti T, Paul-Anttila M, Lehtinen P, et al. Systemic T-helper and T-regulatory cell type cytokine responses in rhinovirus vs. respiratory syncytial virus induced early wheezing: an observational study[J]. Respir Res, 2009; 10: 85-90.

(本文编辑: 邓芳明)