

毛细支气管炎患儿外周血单个核细胞 CD40 / CD40L 的表达

朱萍, 邹丽萍

(郑州大学第三附属医院儿内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 毛细支气管炎的确切发病机制尚不明确,常给治疗带来很大困难,目前认为毛细支气管炎是在病毒感染后继发的免疫功能异常。CD40/CD40L 是免疫应答中的一对协同刺激分子,它们在毛细支气管炎的发病及 IgE 的产生中可能起到至关重要的作用。该文旨在观察毛细支气管炎患儿外周血单个核细胞(PBMC) CD40/CD40L 的表达水平及其与血清 IgE 的相关性及与毛细支气管炎的发病关系。方法 采用流式细胞术对 30 例毛细支气管炎患儿,26 例支气管肺炎患儿、30 例正常对照组儿童 PBMC CD40 及 CD40L 的表达情况检测,同时用 ELISA 方法检测血清总 IgE 含量。结果 与对照组相比,CD40L 在毛细支气管炎组和肺炎组表达均增高 ($P < 0.05$),且毛细支气管炎组的表达高于肺炎组 ($P < 0.05$);CD40 在毛细支气管炎组的表达高于肺炎组及对照组 ($P < 0.01$);IgE 在毛细支气管炎组的表达高于肺炎组和对照组 ($P < 0.01$),肺炎组和对照组差异无显著性意义;在毛细支气管炎组中 CD40 及 CD40L 的表达与 IgE 均成正相关 ($r = 0.607, 0.819$, 均 $P < 0.01$),在肺炎组和对照组中二者无相关性。结论 毛细支气管炎患儿存在 CD40/CD40L 及 IgE 的表达增高,且二者具有正相关性,这可能是毛细支气管炎发生发展的重要机制。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(5):354-356]

[关键词] 毛细支气管炎;外周血单个核细胞;CD40/CD40L;儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)05-0354-03

Expression of CD40 and CD40 ligand in peripheral blood mononuclear cells in children with bronchiolitis

ZHU Ping, ZOU Li-Ping. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Zou L-P, Email: zlpzlpzy@163.com)

Abstract: Objective The pathogenesis of bronchiolitis has not been fully identified. Immune function abnormality following virus infection may be associated with the pathogenesis. CD40 and CD40 ligand (CD40L) is a pair of co-stimulatory molecules in immunoreaction. They might play an important role in the development of bronchiolitis. This study aimed to investigate the expression of CD40 and CD40L in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in children with bronchiolitis and explore their possible roles in the disease. **Methods** Thirty children with bronchiolitis, 26 children with bronchopneumonia and 30 healthy children (control) were enrolled. Flow cytometry was used to detect CD40 and CD40L expression in PBMCs. Total serum IgE level was measured using ELISA. **Results** Compared with the control group, CD40L expression significantly increased in the bronchiolitis and bronchopneumonia groups ($P < 0.05$). The CD40L expression in the bronchiolitis group was significantly higher than that in the bronchopneumonia group ($P < 0.05$). A significantly increased CD40 expression was also found in the bronchiolitis group when compared with the bronchopneumonia and the control group ($P < 0.01$). Total serum IgE level in the bronchiolitis group was significantly higher than the bronchopneumonia and the control groups ($P < 0.01$). CD40 and CD40L expression was positively correlated with serum IgE level in the bronchiolitis group ($r = 0.607, r = 0.819$, respectively; $P < 0.01$). **Conclusions** CD40 and CD40L expression in PBMCs and serum IgE level increased and there is a positive correlation between CD40 and CD40L expression and serum IgE level in children with bronchiolitis. Over-expression of CD40 and CD40L may play an important role in the development of bronchiolitis. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(5):354-356]

Key words: Bronchiolitis; Peripheral blood mononuclear cell; CD40/CD40 ligand; Child

毛细支气管炎是婴儿期较常见的一种急性下呼吸道感染性疾病,临床以骤发喘憋、三凹征和喘鸣为主要临床特点。毛细支气管炎仅见于2岁以下婴幼儿

儿,易于病后数年内反复发生喘息,约22.1%~53.2%发展为哮喘^[1],且近年有上升趋势^[2]。其确切发病机制仍不清楚,认为与免疫、感染、环境及遗传

[收稿日期]2008-07-25; [修回日期]2008-09-05

[作者简介]朱萍,女,硕士研究生。主攻方向:小儿呼吸系统疾病。

[通讯作者]邹丽萍,女,教授,郑州大学第三附属医院儿内科,邮编:450052。

传等多因素相互作用有关。目前研究认为毛细支气管炎是在病毒感染后继发的免疫功能异常,CD40/CD40L是参与多种免疫反应和疾病致病过程的细胞介质,CD40与CD40L之间的相互作用在炎症性疾病、抗病毒及免疫调节中起着重要的作用,而毛细支气管炎患儿存在气道炎症、气道高反应性、细胞因子分泌异常、IgE生成增加等。CD40与CD40L的交联反应促进呼吸道炎症反应、呼吸道高反应性,并能使IgE的生成增加。本研究将探讨CD40/CD40L在毛细支气管炎患儿体内的表达情况及其与血清IgE的关系,从而为毛细支气管炎的发病机制和寻找新的有效的治疗方法提供有价值的实验依据。

1 材料与方法

1.1 对象

①毛细支气管炎组:来自我院住院治疗的患儿,符合毛细支气管炎诊断标准^[1],临床以咳嗽同时发生、骤发喘憋、三凹征和喘鸣为主要特点。共30例,其中男17例,女13例,年龄45 d至1岁10个月,平均年龄 8.7 ± 6.3 个月,均为第1次喘息发作。②支气管肺炎组:来自我院同期住院治疗的患儿,符合支气管肺炎诊断标准,共26例,其中男12例,女14例,年龄33 d至1岁11个月,平均年龄 11.3 ± 5.6 个月。既往无个人和家族哮喘史及其他变态反应性疾病史。以上两组均为发病5 d内的患儿,采血前无使用糖皮质激素(包括静脉和雾化)及其他免疫增强剂或免疫抑制剂等病史,近2周均无其他感染性疾病史。③正常对照组:系我院同期儿保门诊体检的健康儿童及外科非感染性疾病患儿,共30例,其中男15例,女15例,年龄2个月至2岁,平均年龄 8.8 ± 6.2 个月,患儿及家族无过敏性疾病及其他变态反应性疾病史。3组患儿的年龄分布及性别构成差异均无显著性意义。

1.2 主要试剂及仪器

鼠抗人CD40-FITC、CD40L-PE均购自eBioscience公司,IgE试剂盒购自美国R&D公司,流式细胞仪为FACScan,购自BD公司。

1.3 实验方法

①血标本的处理:各组均于入院当天或体检当天取外周静脉血5 mL,其中3 mL经肝素抗凝后备用,剩余2 mL经离心后取血清-80℃冻存。②外周血单个核细胞(PBMC)分离:肝素抗凝静脉血3 mL,30 min内加入PBS液及淋巴细胞分离液,2 500 r/min离心15 min,吸取PBMC,用PBS液

洗涤2次,调细胞浓度为 1×10^6 /mL。③流式细胞术检测PBMC的CD40/CD40L的表达情况:取已处理PBMC 50 μL依次加入CD40-FITC、CD40L-PE各10 μL,20℃~25℃避光孵育30 min,红细胞裂解后PBS液洗涤,上机检测。每份标本均设有阴性对照。④血清总IgE的检测:采用ELISA方法,按试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学处理

采用SPSS 15.0统计软件进行统计学分析,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用方差分析,两两比较采用 q 检验,采用Pearson相关系数进行相关性分析。

2 结果

2.1 PBMC中的CD40,CD40L及血清总IgE的表达情况

与对照组相比较,CD40L在毛细支气管炎组和肺炎组表达均增高($P < 0.05$),且在毛细支气管炎组的表达高于肺炎组($P < 0.05$)。CD40在毛细支气管炎组的表达高于肺炎组及对照组($P < 0.01$),在肺炎组的表达高于对照组,但差异无显著性意义。血清总IgE在毛细支气管炎组的表达高于肺炎组和对照组($P < 0.01$,表1)。

表1 3组儿童外周血PBMC CD40/CD40L及IgE检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD40L (%)	CD40 (%)	IgE (ng/mL)
对照组	30	2.76 ± 2.94	8.40 ± 4.50	113.05 ± 53.62
肺炎组	26	4.76 ± 3.73 ^a	11.10 ± 5.21	115.14 ± 63.80
毛支组	30	6.72 ± 4.26 ^{a,c}	17.27 ± 6.10 ^b	218.92 ± 92.83 ^b
F值		8.701	21.885	20.513
P值		<0.01	<0.01	<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与对照组及肺炎组比较, $P < 0.01$; c:与肺炎组比较, $P < 0.05$

2.2 PBMC中的CD40/CD40L与血清总IgE的相关性分析

毛细支气管炎组CD40,CD40L和IgE呈正相关($r = 0.607, 0.819, P < 0.01$),肺炎组和对照组CD40,CD40L和IgE无相关性。

3 讨论

毛细支气管炎主要为病毒感染所致,其病理学改变为纤毛上皮坏死、黏膜下水肿、管壁淋巴细胞浸

润、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等炎症细胞聚集至气道局部并激活,从而引发气道炎症并导致气道高反应性^[3],但胶原及弹性组织无破坏。毛细支气管炎患儿存在不同程度的气道高反应性,病后易于反复喘息,在儿童期易患哮喘,而缓解后早期干预可以减少哮喘的发生率^[4]。最近有研究认为 CD40 和 CD40L 的相互作用参与了黏膜的防御和保护作用^[5]。毛细支气管炎患儿是否存在 CD40/CD40L 的表达异常尚未有报道。

外源性抗原进入机体后,由抗原提呈细胞(APC)捕获并加工处理后通过辅助 T 淋巴细胞(T_H 细胞)分别与 T 细胞、B 细胞作用产生细胞免疫和体液免疫,在此过程中 CD40/CD40L 具有重要的作用,其表达异常与某些炎症反应、自身免疫性疾病和免疫缺陷病的发病密切相关^[6]。大量研究表明 CD40/CD40L 信号转导途径的异常在系统性红斑狼疮、肿瘤^[7]、移植物抗宿主^[8]等多种疾病的发病过程中起着非常重要的作用。近来有研究发现 CD40 在呼吸道上皮细胞的损伤和炎症过程中也具有非常重要的作用^[5,9]。

CD40 和 CD40L 的交联促进 B 细胞的活化、增殖, Ig 类别转换,而 T 细胞表面的 CD40L 在 Ig 类别转换中起了重要作用。CD40 参与诱导细胞间相互作用,活化 T_H 细胞表达 CD40L 增加,可以与 B 细胞表面的 CD40 结合,刺激 B 细胞分泌白介素-4 (IL-4),而 IL-4 对 IgE 产生至关重要。本研究发现 CD40, CD40L 在毛细支气管炎组患儿 PBMC 中的表达都增高,血清总 IgE 在毛细支气管炎组中的表达高于肺炎组及对照组,且 CD40, CD40L 的表达与血清总 IgE 具有相关性。提示 CD40 及 CD40L 的高表达在毛细支气管炎的发病机制及促进 B 淋巴细胞合成和分泌 IgE 的过程中具有重要作用。

CD40L 主要在激活的 T 细胞表达,其表达的增加可以使 APC 的抗原提呈能力大大增加,并诱导白介素-12 (IL-12) 分泌增强,加强细胞免疫。另外, CD40L 触发的信号还可以加强自然杀伤细胞裂解细胞的功能。Kothlow 等^[10] 在实验中证实 CD40L 可以直接诱导 B 细胞产生白介素-6 (IL-6),而 IL-6 是重要的致炎因子,在炎症反应中具有重要的作用。在本实验中 CD40L 的表达在各组间的差异均有显著性意义,提示它可能在炎症过程中具有更为重要的作用。

本研究提示毛细支气管炎患儿存在 CD40,

CD40L 及 IgE 的表达异常,其可能是毛细支气管炎发生发展的重要机制,进一步揭示了毛细支气管炎患儿是在遗传的基础上由于感染而继发的免疫功能紊乱^[11,12]。在哮喘患儿中亦存在 CD40, CD40L 的表达异常^[13] 及 IgE 的合成增加,提示毛细支气管炎和哮喘可能存在相似的发病机制。在理论上可以通过阻断 CD40/CD40L 通路以减少 IgE 的合成,亦可以减轻炎症反应。是否可以应用免疫调节法如 CD40 或 CD40L 的抗体治疗毛细支气管炎以减轻临床症状及降低哮喘的发病率尚有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 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,2002,1199-1200.
- [2] Fleming DM, Pannell RS, Elliot AJ, Cross KW. Respiratory illness associated with influenza and respiratory syncytial virus infection[J]. Arch Dis Child, 2005, 90(7):741-746.
- [3] Dakhama A, Park JW, Taube C, El Gazzar M, Kodama T, Miyahara N, et al. Alteration of airway neuropeptide expression and development of airway hyperresponsiveness following respiratory syncytial virus infection[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(4): L761-770.
- [4] 黄海忠,李颖红,李玉华. 毛细支气管炎后早期干预对哮喘发生率的影响[J]. 实用医院临床杂志, 2006, 3(3): 41-42.
- [5] Merendino AM, Bucchieri F, Gagliardo R, Daryadel A, Pompeo F, Chiappara G, et al. CD40 ligation protects bronchial epithelium against oxidant-induced caspase-independent cell death[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 35(2): 155-164.
- [6] 易学瑞,孔祥平. CD40-CD40L 与疾病[J]. 国外医学·免疫学分册, 2001, 24(2): 80-82.
- [7] Murugaiyan G, Martin S, Saha B. Levels of CD40 expression on dendritic cells dictate tumour growth or regression[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 149(1):194-202.
- [8] 陈纯,吴燕峰,魏菁,方建培,黄绍良. CD40 和 CD40 配体表达在异基因造血干细胞移植后移植物抗宿主病发生中的变化[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(3): 190-192.
- [9] Caqnoni F, Oddera S, Giron-Michel J, Riccio AM, Olsson S, Dellacasa P, et al. CD40 on adult human airway epithelial cells: expression and proinflammatory effects[J]. J Immunol, 2004, 172(5):3205-3214.
- [10] Kothlow S, Morgenroth I, Tregaskes CA, Kaspers B, Young JR. CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture[J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32(9):1015-1026.
- [11] 高武红,李成荣. 婴儿急性毛细支气管炎随访分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4):357-358.
- [12] 李兰,王智斌,李敏,张剑波,陈昌辉,李波,等. 呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿 T 细胞亚群检测的临床价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(5):421-422.
- [13] 刘筱萍,胡晓艳,曾宾,钱卫疆,王新根. 哮喘患儿淋巴细胞 CD40/CD40 L 信号分子的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3): 225-227.

(本文编辑:吉耕中)