

哮喘患儿 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞及 IL-10 和 TGF-β₁ 的变化

李敏¹, 宋丽¹, 张建波², 房俊², 李兰¹

(四川省医学科学院四川省人民医院 1. 儿科; 2. 中心实验室, 四川 成都 610072)

[摘要] **目的** 通过测定和分析哮喘急性发作期与缓解期儿童外周血中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 淋巴细胞及其相关细胞因子白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子-β(TGF-β₁) 在哮喘发病中的变化情况,探讨哮喘发作的新的免疫机制。**方法** 分别采集 74 例哮喘发作期和 28 例哮喘缓解期患儿及 20 例健康儿童外周静脉血,通过流式细胞仪分析及酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的百分比和血浆中 IL-10 和 TGF-β₁ 水平。**结果** ①哮喘发作期患儿外周血中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞百分率及 IL-10 水平较缓解期及对照组明显降低($P < 0.01$),而哮喘缓解期明显升高接近正常水平;②哮喘急性发作期患儿 TGF-β₁ 水平较缓解期及对照组明显升高($P < 0.05$)。哮喘缓解期患儿 TGF-β₁ 水平明显降低,仍高于对照组水平;③哮喘发作期、缓解期及对照组各组之间 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞百分率与 IL-10、TGF-β₁ 无相关性($P > 0.05$)。**结论** 哮喘发作期患儿 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞和 IL-10 数量和分泌水平降低、TGF-β₁ 水平增高,导致了全身和局部对炎症反应的抑制作用减弱,可能是导致哮喘发作的原因之一。[中国当代儿科杂志,2009,11(10):829-832]

[关键词] 哮喘;急性发作;CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞;IL-10;TGF-β₁; 儿童
[中图分类号] R562.2⁺5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)10-0829-04

Changes of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, IL-10 and TGF-β₁ levels in peripheral blood in children with asthma

LI Min, SONG Li, ZHANG Jian-Bo, FANG Jun, LI Lan. Department of Pediatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Province People's Hospital, Chengdu 610072, China (Email: lmscsy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective This study determined the changes of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, IL-10 and TGF-β₁ levels in peripheral blood in children with asthma in order to explore immunologic mechanism of asthma attacks. **Methods** Seventy-four children with asthma attacks, twenty-eight children with stable asthma and twenty healthy children were enrolled. The percentage of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in CD4⁺ T cells in peripheral blood was detected by flow cytometry. Serum levels of IL-10 and TGF-β₁ were measured using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The percentage of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and IL-10 levels in peripheral blood in the asthma attacks group were significantly lower than those in the stable asthma and the control groups ($P < 0.01$). The stable asthma group showed a similar percentage of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and IL-10 levels to the control group. Compared with the stable asthma and the control groups, serum TGF-β₁ level in the asthma attacks group increased significantly ($P < 0.05$). In the asthma attacks, the stable asthma, and the control groups, the percentage of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood was not correlated to serum levels of IL-10 and TGF-β₁. **Conclusions** The percentage of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood and serum IL-10 levels decrease and serum TGF-β₁ levels increases in children with asthma attacks, which results in a decreased immunosuppressive effect. This might contribute to one of the immunologic mechanisms of asthma attacks. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (10):829-832]

Key words: Asthma; Asthma attack; CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell; IL-10; TGF-β₁; Child

从 1986 年起,T 辅助淋巴细胞 1/T 辅助淋巴细胞 2(Th1/Th2)平衡理论作为过敏性疾病如支气管哮喘发病机制中的核心已为大多数人所接受,在此基础上,调节性 T 细胞在支气管哮喘中的作用逐渐引起人们的关注。尤其是 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞因其

具有独特的作用方式和功能特征已成为哮喘发病机制中的研究热点,但有关其数量和功能改变的观点存在分歧,作用机制尚不明确。本研究拟探讨 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞及相关细胞因子 IL-10 和 TGF-β₁ 在哮喘发病中的变化情况及相互关系,

[收稿日期]2008-12-19;[修回日期]2009-02-07
[作者简介]李敏,女,大学,主任医师。主攻方向:小儿呼吸系统疾病。

现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

哮喘组:哮喘患儿102 例(男75 例,女27 例),年龄(6.3 ± 3.4)岁。所有病例均符合2004 年全国儿科哮喘协作组制定的支气管哮喘防治指南中规定的诊断标准^[1]。其中急性发作期患儿为新诊断或未接受规范化治疗的患儿,共74 例;缓解期患儿为规则使用吸入糖皮质激素(ICS)或ICS + 长效β₂ 激动剂(LABA)后临床症状消失、肺功能正常并维持4 周以上者,共28 例。正常对照组:健康体检患儿20 例(男13 例,女7 例),年龄(6.1 ± 3.7)岁,均无近期感染及过敏性疾病史,均征得家长知情同意。

1.2 方法

1.2.1 CD4⁺CD25⁺T 细胞的测定 分别采集哮喘患儿及健康儿童外周静脉血2 mL,肝素抗凝;取肝素抗凝的全血100 μL,加入CD4-PE/CD25-FITC 单克隆抗体20 μL,IgG2a-PE/ IgG1-FITC 作为同型对照,室温闭光反应30 min;加2 mL 溶血剂在室温下溶解红细胞约10 min;PBS 洗涤,离心5 min (1 500 r/min),弃上清;每份标本加入1 g/L 多聚甲醛500 μL 后用流式细胞仪检测。流式细胞仪为Beckman-CoulterXL100。

1.2.2 IL-10 和TGF-β₁ 的测定 同时取静脉血3 mL,离心后取血清,置于-70℃ 冰箱冻存。血清IL-10 和TGF-β₁ 的测定采用ELISA 法。操作步骤严格按说明书进行。

1.2.3 统计学分析 所有数据经Kolmogorov-Smirnov 检验正态性,符合正态分布的数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,偏态分布数据用中位数和四分位数(M ± QR)表示,SPSS 11.5 统计软件分析所有数据,正态分布数据用析因设计方差分析和单因素方差分析,LSD 检验对各组均数进行两两比较,偏态分布数据用秩和检验分析,直线相关分析外周血CD4⁺CD25⁺T 细胞百分率与细胞因子水平间相关性, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分率变化

哮喘发作期、哮喘缓解期及对照组之间外周血CD4⁺、CD25⁺T 细胞百分率比较差异有显著性($F = 34.74, P < 0.01$);急性发作期哮喘患儿外周血

中CD4⁺CD25⁺调节性T 细胞比率明显低于哮喘缓解期及对照组,哮喘缓解期患儿CD4⁺CD25⁺调节性T 细胞比率明显升高,接近正常水平(表1)。

表1 3 组血 CD4⁺CD25⁺T 细胞变化 (%)

组别	例数	外周血 CD4 ⁺ CD25 ⁺
对照组	20	11.1 ± 3.4
哮喘缓解期	28	10.9 ± 2.4
哮喘发作期	74	6.4 ± 3.0 ^{a,b}

a:与对照组比较, $Q = 8.94, P < 0.01$; b:与缓解期比较, $Q = 9.61, P < 0.01$

2.2 血浆 IL-10 水平的变化情况

血浆IL-10 测定结果变异较大,部分哮喘组和对对照组在pg/mL 水平仍测不出,该结果按零处理。IL-10 数据经分析呈非正态分布、方差不齐,因此采用M ± QR 描述,Kruskal Wallis 秩和检验进行统计分析。哮喘发作期、哮喘缓解期及对照组之间差异有显著性($\chi^2 = 31.123, P < 0.01$)。急性哮喘发作期较缓解期及对照组IL-10 水平明显降低($P < 0.01$),缓解期哮喘患儿IL-10 水平明显升高,接近对照组水平(表2)。

表2 3 组血浆 IL-10 水平 (M ± QR, pg/mL)

组别	例数	IL-10	Mean rank
对照组	10	47.4 ± 8.8	23.95
哮喘缓解期	17	46.3 ± 22.5	25.65
哮喘发作期	38	7.8 ± 12.3 ^{a,b}	9.75

a:与对照组比较, $\chi^2 = 9.752, P < 0.01$; b:与缓解期比较, $\chi^2 = 10.242, P < 0.01$

2.3 血浆 TGF-β₁ 水平的变化情况

哮喘急性发作期患儿外周血中TGF-β₁ 水平较缓解期及对照组明显升高($F = 4.86, P < 0.05$)。缓解期哮喘患儿TGF-β₁ 水平明显降低,与对照组比较,差异无显著性,但仍显示高于对照组水平。

表3 3 组血浆 TGF-β₁ 水平 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	例数	TGF-β ₁
对照组	10	218.7 ± 75.5
哮喘缓解期	17	263.5 ± 88.8
哮喘发作期	38	331.4 ± 129.6 ^{a,b}

a:与对照组比较, $Q = 3.95, P < 0.05$; b:与缓解期比较, $Q = 2.9, P < 0.05$

2.4 外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分率与血浆细胞因子相关性分析

经 Spearman's 相关性分析,各组 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分率与 IL-10 和 TGF- β_1 无相关性, $P > 0.05$ 。

3 讨论

目前,哮喘发病率仍呈明显的上升趋势,最重要的原因是至今尚未完全阐明的复杂的发病机制。近年来研究发现,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在哮喘的免疫调节中发挥重要作用^[2]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是目前研究较多的细胞,它来源于胸腺,在外周血中发挥功能,约占外周血 CD4⁺T 细胞的 5% ~ 10%,是维持外周免疫耐受的关键细胞,它可介导机体对过敏原耐受的形成,抑制 Th2 反应及气道的嗜酸性粒细胞炎症,从而下调哮喘气道炎症,最终起到抑制哮喘发展的作用。本研究中哮喘组患儿发作期外周血中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率较对照组患儿明显降低,且随着患儿临床症状的控制,进入哮喘缓解期后外周血中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率明显升高接近正常对照水平,与相关文献报道一致^[3,4]。提示哮喘患儿 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量的降低可能减弱对 Th2 细胞的接触性抑制作用,使 Th2 型免疫反应增强,IL-4、IL-5 等细胞因子产生增加,导致机体全身和局部免疫紊乱,造成哮喘过敏性气道炎症的发生。由此我们推论支气管哮喘的发病机制可能与体内 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数目减少不能有效发挥免疫抑制功能有关。

TGF- β_1 是一种多功能的调节细胞生长、分化的细胞因子,在哮喘中可由多种活化的细胞产生,被认为具有促纤维化和抗炎双重作用。通常 TGF- β_1 发挥着负反馈作用来抑制炎症细胞的活化,哮喘患者 TGF- β_1 水平增高可代偿性抑制气道炎症细胞的活化和气道高反应性、又参与了气道损伤的修复过程;但如果 TGF- β_1 持续增高,可引起气道纤维化和气道重建,反而加重气道炎症反应^[5]。本研究发现哮喘发作期患儿血浆 TGF- β_1 水平较缓解期及对照组患儿增高,吸入激素治疗使哮喘患者临床症状控制进入缓解期后 TGF- β_1 水平有所降低,但仍高于正常对照组水平,与秦鑫等^[6]的报道一致。提示 TGF- β_1 可能参与哮喘发病,其水平的升高与哮喘的炎症反应及气道损伤的修复有关,虽然在治疗后临床症状得到控制,但有可能气道壁因炎症和损伤而出现气道壁粘膜的重建和纤维化,造成了 TGF- β_1 的持续分泌,使之维持在较高水平。因此,如何调节

体内 TGF- β_1 的合成并维持在合理水平,既不使免疫系统处于高敏状态,又不能导致气道纤维化的发生,将是哮喘防治的一条新途径。

IL-10 是有效的抗炎和免疫抑制细胞因子,可调节哮喘等过敏性疾病的效应细胞,包括抑制 Th2 细胞因子的产生和肥大细胞、嗜酸性细胞功能,并抑制免疫球蛋白 E (IgE) 的产生、增强免疫球蛋白 G4 (IgG4) 的产生,从而调节 IgG4 与 IgE 的比例^[7,8]。目前关于 IL-10 在哮喘中的变化仍然存在争论,一些研究发现哮喘患者较正常对照 IL-10 表达升高^[9],相反,一些则发现 IL-10 水平降低^[8]。在本研究中,哮喘患儿外周血 IL-10 较哮喘缓解期及对照组明显降低,吸入糖皮质激素治疗后达到缓解期的哮喘患儿 IL-10 水平明显升高达到对照组水平。提示 IL-10 降低参与哮喘发病,可能是导致哮喘患儿机体不能有效抑制 Th2 反应、炎症前细胞因子合成及释放增加的原因之一,而糖皮质激素可能通过诱导机体合成 IL-10 途径来发挥抗炎作用。

IL-10 和 TGF- β 对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在外周血中的分化过程起重要作用。国内郑峻松等^[10]研究发现,IL-10 和 TGF- β_1 体外和胸腺内注射均能诱导 CD4⁺CD25⁺T 细胞增殖。有研究显示 CD4⁺CD25⁺T 细胞能诱导 CD25⁻T 细胞成为 Tr1 和 Th3 细胞,从而促进 IL-10 和 TGF- β 的分泌^[11,12]。本研究中各组哮喘患儿血浆 IL-10 和 TGF- β_1 分泌水平与外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量变化无相关性,原因可能是外周血中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞仅部分由 IL-10 和 TGF- β 诱导产生,还有部分由胸腺内产生,因此,这两种细胞因子水平的改变不能完全影响外周血总的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞水平。同样,IL-10 和 TGF- β_1 除了由外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞分泌外,还由多种细胞分泌,因此,在体内,这两种细胞因子水平是综合因素影响的结果,不能简单归因于外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的改变。

总之,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量减少,IL-10 分泌水平降低及 TGF- β_1 分泌水平增高均参与哮喘发病过程,而随着吸入糖皮质激素治疗使疾病控制,可使 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞及 IL-10 的数量和水平提高接近正常对照组水平^[13]。因此我们认为,监测哮喘患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量和 IL-10、TGF- β_1 分泌水平将有助于我们了解病情及观察糖皮质激素治疗的疗效;进一步研究 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞及相关细胞因子 IL-10 和 TGF- β_1 的免疫抑制作用,将有助于阐明哮喘的免疫发病机制。

[参 考 文 献]

[1] 中华医学会儿科分会呼吸学组. 儿童哮喘防治常规[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2):100-106.

[2] Rutkowski R, Moniuszko T, Stasiak-Barmuta A, Kosztyla H, Alifier M, Rutkowski K, et al. CD80 and CD86 expression on LPS-stimulated monocytes and the effect of CD80 and CD86 blockade on IL-4 and IFN- γ production in nonatopic bronchial asthma[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2003, 51(6):421-428.

[3] Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, Lickie MJ, Kanabar V, Knan J, et al. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response[J]. Lancet, 2000, 356(9248):2149-2153.

[4] Sigurs N, Bjarnadon R, Sigurtergson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis; a prospective cohort study with matched controls[J]. Pediatrics, 1995, 95(4):500-505.

[5] 徐毛治, 黄茂. 转化生长因子 β_1 与支气管哮喘的关系[J]. 国外医学呼吸分册, 2005, 25(4):275-276.

[6] 秦鑫, 刘卓拉, 李建强, 薄建平, 刘又宁. IFN- γ 和糖皮质激素对哮喘病人 T 淋巴细胞中的 TGF- β 的作用[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(3):292-294.

[7] Moore KW, Malefyt R de Waal, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19(1):683-765.

[8] Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4):271-283.

[9] Grissell TV, Powell H, Shafren DR, Boyle MJ, Hensley MJ, Jones PD, et al. Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma[J]. Am J Respir Crit Cure Med, 2005, 172(4):433-439.

[10] 郑峻松, 吴军, 易绍莹, 贺伟峰, 陈希炜, 解志杰, 等. 细胞因子及胸腺微环境影响 Treg 细胞增殖机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21):1885-1887.

[11] Jonuleit H, Schmitt E, Kackmar H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance; human CD25⁺ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4⁺ T helper cells[J]. J Exp Med, 2002, 196(2):255-260.

[12] Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells[J]. J Exp Med, 2002, 196(2):247-253.

[13] 李敏, 宋丽, 张建波, 房俊, 李兰. 糖皮质激素对哮喘小鼠 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(4):527-530.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

2010 儿科高级研修班招生简章

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心是上海市人民政府与美国世界健康基金会 (Project HOPE) 的合作建设项目, 是一所集医疗、科研和教学于一体的儿科综合性医院。医院技术力量雄厚, 设施齐全, 拥有国家和市级重点学科, 如小儿心血管中心、血液肿瘤科和儿童保健科。上海儿童医学中心自建院起, 始终秉承“培训—培训者”(Training-Trainer) 理念, 为全国各地尤其是贫困和欠发达地区培训了大批儿科方面的骨干型人才, 并通过他们又培养了一大批儿科专业人士, 从而为提高和推动当地的儿童医疗健康事业提供了最有力的支持, 儿科高级研修班就是这一理念的最佳体现。

招生地区: 不限

要求: ① 进修医生: 本科毕业; 二级医院需工作 5 年以上; 三级医院需工作 4 年以上。② 进修护士: 中专以上学历; 二级医院需工作 5 年以上; 三级医院需工作 3 年以上。

培训科目: 招生专业: 急救与 PICU 科、新生儿与 NICU 科、儿内科 (包括, 消化、呼吸、肾脏、风湿免疫、神经、内分泌)、血液肿瘤科、小儿外科、小儿骨科、麻醉科、放射科、儿保科。

培训时间: 2010 年 3 月——2011 年 2 月 (一年)

奖学金: 被录取者均属获得奖学金者, 将享有免收进修费、住宿费并给生活津贴 (医生 10000 元/年, 护士 8000 元/年)。

报名办法: 请报名者将个人简历、进修科目、一位正高级职称医师推荐信、盖有单位公章的介绍信于 2009 年 11 月 30 日前寄联系人。面试时间和面试地点另行通知。

联系地址: 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心; 上海东方路 1678 号 (200127)

电话: 021-38626161 × 3190/3082 传真: 021-50904612

请从医院网站索取申请表, 网址: www.scmc.com.cn

联系人: 上海儿童医学中心—科教部 杨子贵, 陆梅华