

外周血 Th17/Treg 及相关细胞因子表达 在喘息婴幼儿发病中的作用及意义

黄坤玲¹, 刘建华¹, 刘向飞², 帅金凤¹, 牛波¹, 路素坤¹, 曹丽洁¹

[摘要] **目的:**探讨外周血 Th17/Treg 及相关细胞因子表达在喘息婴幼儿发病中的作用及意义。**方法:**选取急性发作期喘息婴幼儿 60 例(喘息组)及下呼吸道感染但不伴喘息发作的婴幼儿 50 例(非喘息组),同时选取同期体检健康婴幼儿 50 名(对照组),并根据患儿既往喘息发作次数,将喘息组分为 A1 组(首次喘息组,34 例)及 A2 组(反复喘息组,喘息发作 \geq 2 次,26 例);根据有无合并哮喘高危因素分为 B1 组(合并高危因素组,25 例)和 B2 组(未合并高危因素组,35 例),分别采用流式细胞仪检测各组婴幼儿 Th17 细胞、Treg 细胞在外周血中的比例,酶联免疫吸附法测定各组婴幼儿血清中的白细胞介素-17(IL-17)、IL-10 的表达。**结果:**3 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及 Treg/Th17 比较差异均有统计学意义($P < 0.01$);其中喘息组、非喘息组的 Treg 细胞及 Treg/Th17 百分数均显著低于对照组($P < 0.01$),而 Th17 细胞百分数显著高于对照组($P < 0.01$);且喘息组 Treg 细胞及 Treg/Th17 百分数显著低于非喘息组($P < 0.01$),Th17 细胞百分数显著高于非喘息组($P < 0.01$)。3 组血清中 IL-17、IL-10 水平比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),其中喘息组、非喘息组的 IL-17 显著高于对照组($P < 0.01$),IL-10 水平显著低于对照组($P < 0.01$),喘息组的 IL-17 显著高于非喘息组($P < 0.01$),IL-10 水平显著低于非喘息组($P < 0.01$)。A1 组外周血 Th17 百分数高于 A2 组($P < 0.05$),Treg 细胞及 Treg/Th17 百分数显著低于 A2 组($P < 0.01$);A1 组 IL-17 显著高于 A2 组($P < 0.01$),IL-10 显著低于 A2 组($P < 0.01$)。B1 组外周血 Th17 百分数显著高于 B2 组($P < 0.01$),Treg 细胞 Treg/Th17 百分数显著低于 B2 组($P < 0.01$);B1 组 IL-17 显著高于 B2 组($P < 0.01$),IL-10 显著低于 B2 组($P < 0.01$)。**结论:**早期监测外周血 Th17/Treg 及相关细胞因子表达可为有支气管哮喘发展倾向的患儿提供早期诊断及早期干预的依据。

[关键词] 喘息;Th17/Treg;白细胞介素-17;白细胞介素-10

[中图分类号] R 446.6

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.11.024

The significance of Th17/Treg and related cytokine levels of peripheral blood in infants with wheezing

HUANG Kun-ling¹, LIU Jian-hua¹, LIU Xiang-fei², SHUAI Jin-feng¹, NIU Bo¹, LU Su-kun¹, CAO Li-jie¹

(1. Department of Pneumology, Hebei Provincial Children's Hospital, Shijiazhuang Hebei 050000;

2. Department of Intervention Medicine, Baoding Infectious Hospital, Baoding Hebei 071000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and significance of Th17/Treg and its related cytokine levels in the pathogenesis of wheezing in infants. **Methods:** Sixty acute attack wheezing infants, 50 lower respiratory infection infants without wheezing and 50 healthy infants were divided into the wheezing group, nonwheezing group and control group, respectively. According to the number of wheezing, the wheezing group was subdivided into the group A1 (first wheezing group, 34 cases) and group A2 (repeat wheezing group, wheezing number \geq 2 times, 26 cases). According to the risk factor of wheezing, the wheezing group was subdivided into the group B1 (complicated with high risk factor group, 25 cases) and group B2 (complicated without high risk factor group, 35 cases). The proportions of Th17 and Treg cells in peripheral blood in all groups were detected using flow cytometry, and the serum levels of interleukin-17 (IL-17) and interleukin-10 (IL-10) in all group were detected using ELISA. **Results:** The differences of the percentages of Th17 and Treg cells, and Treg/Th17 between three groups were statistically significant ($P < 0.01$). The Treg cells and percentage of Treg/Th17 in wheezing group and nonwheezing group were significantly lower than those in control group ($P < 0.01$), and the percentage of Th17 cells in wheezing group and nonwheezing group were significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). The Treg cells and percentage of Treg/Th17 in wheezing group were significantly lower than those in nonwheezing group ($P < 0.01$), and the percentage of Th17 cells in wheezing group was significantly higher than that in nonwheezing group ($P < 0.01$). The differences of the serum levels of IL-17 and IL-10 between three groups were statistically significant ($P < 0.01$). The serum levels of IL-17 in

wheezing group and nonwheezing group were significantly higher than that in control group ($P < 0.01$), and the serum levels of IL-10 in wheezing group and nonwheezing group were significantly lower than that in control group ($P < 0.01$). The serum level of IL-17 in wheezing group was

[收稿日期] 2016-12-14

[作者单位] 1. 河北省儿童医院 呼吸二科, 河北 石家庄 050000;

2. 河北省保定市传染病医院 介入医学科, 071000

[作者简介] 黄坤玲(1982-), 女, 硕士, 主治医师。

significantly higher than that in nonwheezing group ($P < 0.01$), and the serum level of IL-10 in wheezing group was significantly lower than that in nonwheezing group ($P < 0.01$). The percentage of Th17 cells in group A1 was higher than that in group A2 ($P < 0.01$), the Treg cells and percentage of Treg/Th17 in group A1 were significantly lower than those in group A2 ($P < 0.01$). The IL-17 level in group A1 was significantly higher than that in group A2 ($P < 0.01$), and the IL-10 level in group A1 was significantly lower than that in group A2 ($P < 0.01$). The percentage of Th17 cells in group B1 was significantly higher than that in group B2 ($P < 0.01$), and the Treg cells and percentage of Treg/Th17 in group B1 were significantly lower than those in group B2 ($P < 0.01$). The IL-17 level in group B1 was significantly higher than that in group B2 ($P < 0.01$), and the IL-10 level in group B1 was significantly lower than that in group B2 ($P < 0.01$). **Conclusions:** Early detection of Th17/Treg and related cytokines in peripheral blood may provide the basis of early diagnosis and intervention for children with bronchial asthma development tendency.

[**Key words**] wheezing; Th17/Treg; interleukin-17; interleukin-10

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^[1]。近年流行病学调查^[2]结果显示,婴幼儿喘息的发生率逐年增高,且由于婴幼儿气道发育尚不完善,初次发生喘息后,部分患儿会有反复的喘息发作,反复发作的喘息是哮喘的高危因素,患有反复喘息的婴幼儿的哮喘发生率是无喘息症状儿童的 5~10 倍,严重影响儿童的生活质量,甚至威胁生命。但目前关于婴幼儿喘息性疾病的发病机制并未完全明确,还无可靠的客观指标来区分喘息婴幼儿中的哮喘患儿。因此,探讨婴幼儿喘息性疾病的发病机制,分析早期预测婴幼儿哮喘发生的可靠指标,及早发现有哮喘倾向的喘息患儿,给予早期干预和治疗,防止其进一步发展成为支气管哮喘,具有重要的临床意义。本研究通过测定 Th17/Treg 及相关细胞因子表达在喘息婴幼儿外周血中的变化,探讨其在喘息婴幼儿发病中的作用机制,以为临床提供依据,现作报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 7 月至 2016 年 7 月住院的急性发作期喘息婴幼儿 60 例(喘息组),均符合诸福棠《实用儿科学》关于喘息的诊断标准^[3]。纳入标准:年龄 1 个月至 3 岁;住院前 4 周内均未服用激素及免疫抑制剂类药物;家属对本研究知情,并签署知情同意书。排除标准:严重心、肝、肾功能不全者;排除支气管异物、心源性哮喘、先天性喉喘鸣、嗜酸粒细胞性肺炎、胃食管反流等疾病引起的喘息;正在参与其他临床研究者。其中男 33 例,女 27 例;毛细支气管炎 35 例,喘息性支气管炎 13 例,喘息性支气管肺炎 12 例。选择同期我院收治下呼吸道感染但不伴喘息发作的婴幼儿 50 例(非喘息组),均符合诸福棠《实用儿科学》的诊断标准^[3],且经影像学证实存在支气管炎、支气管肺炎,但肺部听诊无哮鸣音及喘鸣音。纳入标准:年龄 1 个月至 3 岁;院前 4 周内均未服用激素及免疫抑制剂类药物;家属对

本研究知情,并签署知情同意书;既往无喘息病史及过敏史。排除标准:严重心、肝、肾功能不全者;合并肺结核、心脏病、肾脏病等病史;正在参与其他临床研究。其中男 26 例,女 24 例;支气管炎 29 例,支气管肺炎 21 例。同时选取同期我院保健门诊体检健康婴幼儿 50 名(对照组),纳入标准:年龄 1 个月至 3 岁;于我院门诊就诊前 1 个月内无感染性疾病;既往无哮喘及反复呼吸道感染病史;无过敏史;无自身免疫性疾病、无免疫缺陷、无心脏病;未使用激素和免疫抑制剂类药物。其中男 28 例,女 22 例。3 组在性别、年龄方面均具有可比性。

1.2 喘息组分组 根据患儿既往喘息发作次数,将喘息组分为 A1 组(首次喘息组,34 例)及 A2 组(反复喘息组,喘息发作 ≥ 2 次,26 例),其中 A1 组:男 18 例,女 16 例,年龄(1.24 ± 0.27)岁;A2 组:男 15 例,女 11 例,年龄(1.22 ± 0.24)岁。A1 和 A2 组性别和年龄均具有可比性。

根据有无合并哮喘高危因素分为 B1 组(合并高危因素组,25 例)和 B2 组(未合并高危因素,35 例),其中哮喘的高危因素为:父母有哮喘史、医生诊断的湿疹、对 1 种以上气传性过敏原致敏、非感冒性喘息、外周血中嗜酸性粒细胞 ≥ 0.40 、对牛奶、鸡蛋或花生等食物性过敏原致敏者。其中 B1 组:男 14 例,女 11 例,年龄(1.24 ± 0.29)岁;B2 组:男 19 例,女 16 例,年龄(1.22 ± 0.25)岁。B1 和 B2 组性别和年龄均具有可比性。

1.3 标本采集及相关指标的测定 喘息组和非喘息组患儿于入院时,对照组健康者于体检时抽取空腹外周静脉血 2~3 mL 于 5 mL 肝素钠抗凝负压真空采血管中,于 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

采用美国 Beckman coulter 公司生产流式仪 Epics XL 检测外周血单个核细胞 $\text{CD3}^+ \text{CD8}^- \text{IL-17}^+$ (Th17) 细胞及 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{T}$ (Treg) 细胞浓度,步骤包括:外周血单个核细胞的分离、PBMC 细胞体外刺

激培养、检测 Th17、Treg 比例(参照说明书进行)。酶联免疫吸附法测定各组婴幼儿血清中的白细胞介素-17(IL-17)、IL-10 的表达。

1.4 统计学方法 采用方差分析、 q 检验和 t 检验。

2 结果

2.1 3 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及在外周血中的比例比较 3 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及 Treg/Th17 比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。其中喘息组、非喘息组的 Treg 细胞及 Treg/Th17 百分数均显著低于对照组($P < 0.01$), 而 Th17 细胞百分数显著高于对照组($P < 0.01$); 且喘息组 Treg 细胞及 Treg/Th17 百分数显著低于非喘息组($P < 0.01$), Th17 细胞百分数显著高于非喘息组($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 3 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及在外周血中的比例比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Th17 细胞	Treg 细胞	Treg/Th17
喘息组	60	0.48 ± 0.11	5.60 ± 1.12	11.67 ± 2.37
非喘息组	50	0.33 ± 0.10 **	8.04 ± 1.15 **	27.39 ± 2.90 **
对照组	50	0.25 ± 0.09 **△△	9.76 ± 1.32 **△△	39.04 ± 3.44 **△△
F	—	74.23	168.89	1 233.86
P	—	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	—	0.010	1.428	8.429

q 检验:与喘息组比较 ** $P < 0.01$;与非喘息组比较△△ $P < 0.01$

2.2 3 组血清中的 IL-17、IL-10 水平比较 3 组血清中 IL-17、IL-10 水平比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 其中喘息组、非喘息组的 IL-17 显著高于对照组($P < 0.01$), IL-10 水平显著低于对照组($P < 0.01$), 喘息组的 IL-17 显著高于非喘息组($P < 0.01$), IL-10 水平显著低于非喘息组($P < 0.01$)(见表 2)。

表 2 3 组血清中的 IL-17、IL-10 水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	IL-17/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
喘息组	60	150.22 ± 18.17	5.12 ± 1.01
非喘息组	50	121.02 ± 19.15 **	13.44 ± 1.11 **
对照组	50	70.65 ± 14.19 **△△	18.66 ± 1.37 **△△
F	—	289.25	1 906.35
P	—	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	—	301.367	1.354

q 检验:与喘息组比较 ** $P < 0.01$;与非喘息组比较△△ $P < 0.01$

2.3 A1、A2 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及 IL-17、IL-10 水平比较 A1 组外周血 Th17 百分数高于 A2 组($P < 0.05$), Treg 细胞及 Treg/

Th17 百分数显著低于 A2 组($P < 0.01$); A1 组 IL-17 显著高于 A2 组($P < 0.01$), IL-10 显著低于 A2 组($P < 0.01$)(见表 3)。

表 3 A1、A2 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及 IL-17、IL-10 水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Th17 细胞	Treg 细胞	Treg/Th17	IL-17/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
A1 组	34	0.51 ± 0.10	5.20 ± 1.15	10.20 ± 2.33	166.89 ± 20.22	4.23 ± 0.97
A2 组	26	0.44 ± 0.13	6.12 ± 1.19	13.91 ± 2.43	128.42 ± 19.14	6.28 ± 1.14
t	—	2.36	3.02	6.00	7.47	7.52
P	—	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 B1、B2 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及 IL-17、IL-10 水平比较 B1 组外周血 Th17 百分数显著高于 B2 组($P < 0.01$), Treg 细胞 Treg/Th17 百分数显著低于 B2 组($P < 0.01$); B1 组 IL-17 显著高于 B2 组($P < 0.01$), IL-10 显著低于 B2 组($P < 0.01$)(见表 4)。

表 4 B1、B2 组外周血单个核细胞 Th17、Treg 细胞百分数及 IL-17、IL-10 水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Th17 细胞	Treg 细胞	Treg/Th17	IL-17/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
B1 组	25	0.58 ± 0.12	5.07 ± 1.15	8.74 ± 2.45	170.75 ± 20.22	4.10 ± 1.11
B2 组	35	0.41 ± 0.09	5.97 ± 1.20	14.56 ± 2.47	135.56 ± 19.14	5.84 ± 1.15
t	—	6.27	2.91	9.03	6.86	6.87
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

婴幼儿喘息性疾病是指一组具有喘息症状的呼吸道综合征,据报道约 1/3 的儿童至少有一次喘息发作史^[4]。婴幼儿喘息是与哮喘密切相关的气道炎症性疾病,研究^[5]发现 50% ~ 70% 婴幼儿喘息经治疗后仍可反复发作,其中有近 40% 患儿日后可持续发展为支气管哮喘。但由于婴幼儿不能很好地配合完成肺通气功能及哮喘诊断的辅助检查,且婴幼儿早期哮喘临床症状表现不明显,因此很难从婴幼儿喘息疾病中将哮喘区分出来,从而延误哮喘的诊断或过度诊断哮喘,严重影响婴幼儿的身心健康^[6]。因此如何从喘息患儿中鉴别出真正的哮喘患儿,探寻可预测哮喘的可靠性指标,进行早期干预、治疗,可在早期阻断肺功能不可逆损害,降低哮喘的发病率,具有重要的临床意义。

以往研究认为 Th1/Th2 失衡是支气管哮喘的经典免疫学机制,近年来研究^[7-8]发现 Th17、Treg

细胞作为一种新型的辅助性 T 细胞,在哮喘发病中扮演着重要的角色。Th17 细胞是一种 CD4⁺ 效应 T 细胞,主要分泌 IL-17、IL-21、IL-22 等细胞因子,据研究报道 Th17 细胞及其分泌的 IL-17 在促炎性反应和自身免疫病中发挥重要作用^[9], BULLENS 等^[10] 研究证实哮喘病人血清中 IL-17 mRNA 和蛋白质水平明显增高,并与气道高反应程度呈正相关关系。本研究结果显示喘息患儿的 Th17 细胞百分比及 IL-17 水平均显著高于非喘息患儿和健康对照组婴幼儿,且反复喘息发作患儿及合并哮喘高危因素患儿的 Th17 细胞百分比及 IL-17 水平也显著高于首次喘息发作患儿及未合并哮喘高危因素患儿,说明喘息患儿 Th17 细胞诱导分化增强,血浆 IL-17 分泌增加,Th17 细胞通过 IL-17 介导发挥效应的,参与了喘息患儿发病初期的气道炎症过程,起正性调控作用。Treg 细胞是一种功能独特的 T 细胞亚群,通过分泌细胞因子 IL-10 和/或 TGF- β 抑制抗原特异性免疫应答,使机体产生免疫耐受^[11],据研究^[12] 报道 Treg 可显著抑制 Th 的活化和增殖,显著减少促炎因子的合成和降低 IgE 水平,减轻呼吸道炎症和呼吸道高反应性,与哮喘密切相关。本研究结果显示喘息患儿和非喘息患儿的 Treg 细胞百分比及 Treg 细胞分泌的 IL-10 均显著性低于健康对照者,且喘息性患儿的 Treg 细胞分泌的 IL-10 均显著性低于非喘息性患儿,且反复喘息发作患儿及合并哮喘高危因素患儿 Treg 细胞分泌的 IL-10 均显著性低于首次喘息发作患儿及未合并哮喘患儿,说明喘息性患儿及非喘息性患儿均存在免疫功能平衡失调,其中喘息患儿更为严重,反复喘息患儿及合并哮喘高危因素患儿较首次喘息患儿及未合并哮喘患儿更为严重。介导免疫耐受的 Treg 细胞与介导炎症反应的 Th17 细胞两者在功能和分化上相互拮抗、相互制约以维持机体免疫平衡。本研究结果显示喘息患儿及非喘息患儿的 Treg/Th17 均显著低于健康对照者,且喘息患儿低于非喘息患儿,反复喘息发作患儿及合并哮喘高危因素患儿 Treg/Th17 均显著低于首次喘息发作患儿及未合并高危因素患儿,说明喘息患儿特别是反复喘息发作患儿及合并高危哮喘因素

患儿的机体内免疫调控机制发生紊乱,不能维持机体 Treg/Th17 平衡,更容易诱发哮喘。

总之,喘息性疾病是儿童常见疾病,喘息患儿存在 Th17/Treg 平衡紊乱,且反复喘息发作患儿和合并哮喘高危因素患儿的 Th17/Treg 平衡紊乱更为严重,其可能参与喘息发生发展重要的免疫学发病机制,早期监测外周血 Th17/Treg 及相关细胞因子表达可能有利于为支气管哮喘发展倾向的患儿提供早期诊断及早期干预的依据。

[参 考 文 献]

- [1] 赵德育. 婴幼儿喘息流行病学及发展趋势[J]. 中国实用儿科杂志,2014,29(6):401.
- [2] 陈晓媛. 婴幼儿喘息的相关因素分析[D]. 银川:宁夏医科大学,2015.
- [3] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1171.
- [4] 王攀,吕剑平,吕进泉. 反复喘息的婴幼儿外周血髓源性抑制细胞和 Th17 细胞的检测及意义[J]. 中国当代儿科杂志,2015,17(4):312.
- [5] 张静. 调节性 T 细胞、活化 NK 细胞、IL-17 与婴幼儿喘息辨证分型的关系[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [6] 朱晓华,陈强,李秋根,等. 儿童巨细胞病毒感染致喘息发生的免疫学机制[J]. 中国当代儿科杂志,2016,18(9):831.
- [7] MAUAD T, BEL EH, STERK PJ. Asthma therapy and airway remodeling[J]. J Allergy Clin Immunol,2007,120(5):997.
- [8] SAMITAS K, CHORIANOPOULOS D, VITTORAKIS S, et al. Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity[J]. Respir Med, 2009,103(5):750.
- [9] 方骞,梁庆红,郝明明,等. 小儿喘息型支气管炎肠道微生态学变化与 Treg/Th17 作用关系的研究[J]. 中国实用儿科杂志,2014,29(1):33.
- [10] BULLENS DM, TRUYEN E, COTEUR L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? [J]. Respir Res, 2006, 7(1):135.
- [11] 袁颖志,贺宇彤,吴成,等. Th1/Th2/Th17/Treg 对鉴别儿童支气管哮喘与单纯性肺炎的意义[J]. 河北医药,2016,38(9):1285.
- [12] 郭智兰. CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 细胞在细支气管炎患儿外周血中的表达及意义[D]. 郑州:郑州大学,2013.

(本文编辑 刘璐)

(上接第 1512 页)

- [8] 陈彤,班遵浦. 糖尿病与自体动静脉内瘘后期失功的相关性分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2012,13(3):238.
- [9] 钟海英,王意清,吴风金,等. 自体动静脉内瘘失功的相关因素[J]. 广东医学,2010,31(24):3249.
- [10] 李彩凤,许树根,沈淑琼,等. 维持性血液透析患者动静脉内瘘栓塞影响因素分析[J]. 中国血液净化,2013,12(2):78.

- [11] 侯静,温向琼,刘进,等. 左卡尼汀和蔗糖铁对老年血液透析患者肾性贫血及氧化应激的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,7(5):1184.
- [12] 李晴,高琳,王巍,等. 维持性血液透析患者血清成纤维细胞生长因子 23 水平与血清钙、磷水平及左心室功能的关系研究[J]. 中国全科医学,2013,15(35):4173.

(本文编辑 刘梦楠)