

外周血自然杀伤 T 淋巴细胞和 CD4⁺ 自然杀伤 T 淋巴细胞对哮喘患儿发病的影响

叶建兰(解放军第四一一医院妇儿科,上海 200081)

【摘要】 目的 探讨外周血自然杀伤 T 淋巴细胞(NKT 细胞)和 CD4⁺ NKT 细胞对哮喘患儿发病的影响。**方法** 选取 2008 年 1 月至 2012 年 12 月住院治疗的哮喘病患儿 150 例(哮喘组),另选 160 例体检健康的儿童作为健康对照组。收集研究对象外周静脉血标本,采用密度梯度离心法分离获得外周血单个核细胞,应用免疫荧光标记和流式细胞术检测哮喘组和健康对照组儿童外周血 NKT 细胞和 CD4⁺ NKT 细胞的比例,并观察两类细胞与过敏指标总免疫球蛋白 E(IgE)、嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)的相关性。酶联免疫吸附试验检测外周血细胞因子白细胞介素(IL)-4、IL-10、干扰素- γ (IFN- γ)水平。比较两组间的差异。**结果** 哮喘组患儿的 NKT 细胞和 CD4⁺ NKT 细胞比例均较健康对照组明显下降($P < 0.05$)。NKT 细胞、CD4⁺ NKT 细胞的比例与总 IgE、ECP 均无明显相关性($P > 0.05$)。外周血 IL-4 水平较健康对照组明显升高($P < 0.05$),IL-10 水平明显下降($P < 0.05$),而 IFN- γ 水平与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** NKT 细胞和 CD4⁺ NKT 细胞数量降低下及所分泌细胞因子功能变化是导致哮喘发病的重要原因。

【关键词】 自然杀伤 T 细胞; 支气管哮喘; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.22.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)22-3109-03

Effect of natural killer T lymphocytes and CD4⁺ natural killer T lymphocytes s levels in peripheral blood on onset of children asthma YE Jian-lan (Departnet of Gynecology and Pediatrics, the 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of natural killer T(NKT)lymphocytes and CD4⁺ NKT lymphocytes levels in peripheral blood onset of children asthma. **Methods** 150 asthmatic children inpatients from January 2008 to December 2012 were selected as the asthmatic group. 160 healthy children were selected as the healthy control group. The peripheral venous blood specimens were collected. The peripheral blood mononuclear cells were obtained by using the density gradient centrifugation method. The ratio of peripheral blood NKT cells and CD4⁺ NKT cells were assessed by immunofluorescence and flow cytometry assays. The relationships between the two kinds of NKT cells with allergic indexes of the total IgE and eosinophil cationic protein(ECP)was observed. The levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ in peripheral blood were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Compared with the healthy control group, the ratio of peripheral blood NKT and CD4⁺ NKT cells in the asthmatic patients was significantly decreased($P < 0.05$). There was no significant correlation between the NKT cells and proportion of CD4⁺ NKT cells with the allergic indexes of the total IgE and ECP($P > 0.05$). The level of IL-4 in peripheral blood in the asthmatic group was significantly higher than that of the healthy control group($P < 0.05$), but the level of IL-10 was decreased significantly($P < 0.05$); There was no statistically significant difference in the IFN- γ level between the asthmatic group and the healthy control group($P > 0.05$). **Conclusion** The low count of NKT cells and CD4⁺ NKT cells and the functional change of cytokines secreted by NKT cells are the important causes leading to asthma onset.

【Key words】 nature killer T cell; asthma; children

支气管哮喘是一种以气道高反应性为特征的疾病,发病机制复杂,多种细胞和细胞组分参与气道慢性炎症性疾病^[1]。自然杀伤 T 淋巴细胞(NKT 细胞)是一类特殊的 T 淋巴细胞,属于第 4 类免疫细胞,激活后可迅速产生白细胞介素(IL)-4、IL-10、干扰素- γ (IFN- γ)等多种细胞因子,对淋巴细胞免疫功能产生重要影响^[2-3]。因此 NKT 细胞及其分泌的细胞因子可能参与哮喘的发病。本研究通过免疫荧光标记,分析哮喘患儿的 NKT 细胞和 CD4⁺ NKT 细胞的数量变化,同时观察 NKT 细胞所产细胞因子(IL-4、IL-10、IFN- γ)的变化,探讨外周血 NKT 细胞和 CD4⁺ NKT 细胞对哮喘患儿发病的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2008 年 1 月至 2012 年 12 月在本院住

院治疗的哮喘病患儿 150 例为哮喘组。其中男 85 例,女 65 例;年龄 5~15 岁,平均(8.57 $\pm$ 3.12)岁。所有患儿均符合儿童哮喘诊断标准。对所有患儿均仔细进行体格检查,必要时行 X 线片检查,排除肺部感染因素。同时选择 160 例体检健康儿童作为健康对照组,其中男 88 例,女 72 例;年龄 5~16 岁,平均(8.62 $\pm$ 2.84)岁。本研究获医院伦理委员会同意,所有儿童家长均知情同意。

1.2 试剂与仪器 所用淋巴细胞分离液、红细胞裂解液、酶联免疫吸附试验(ELISA)Kit IL-4、IL-10、IFN-1 及 Anti-human CD4-APC 均购自武汉博士德试剂公司;TCRV α 24-PE、TCRV β 11-FITC 购自美国 Beckman Coulter 公司; α -Galcer、RPMI-1640 培养液、胎牛血清购自美国 Enzo 公司;流式细胞仪购

自美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMNCs)分离 采集患儿及健康对照组儿童外周血 4~5 mL 放置于肝素抗凝管中,磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液等体积稀释,然后放置于淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 20 min,收集白膜细胞层,PBS 洗涤后重悬于 RPMI-1640 培养液,计数备用。

1.3.2 NKT 细胞检测 采集患儿及健康对照组儿童外周血 100 μ L 于流式检测管中,加入 CD4-APC、TCRV α 24-PE、TCRVB11-FITC 抗体各 10 μ L,混匀孵育后加入红细胞裂解液 1 mL,充分裂解后,2 500 r/min 离心 3 min,弃上清液,加入 PBS 缓冲液 2 mL,洗涤后使用流式细胞仪检测 NKT 细胞及 CD4⁺NKT 细胞。

1.3.3 NKT 细胞扩增活化 将分离的 PBMNCs 置于含 100 g/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,于 25 cm² 培养瓶中培养,每瓶 3 mL,加入 α -Galcer(终质量浓度为 100 μ g/L),置于含 50 mL/L 二氧化碳、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内培养。分别于培养 24、48、72 h 时间点收取培养上清液。

1.3.4 检测 IL-4、IFN- γ 、IL-10 的表达 取培养上清液,按 ELISA 试剂盒说明书对 IL-4、IFN- γ 、IL-10 水平进行测定。

1.4 临床资料收集 由本院检验科对哮喘患儿常规变应性指标进行检测,包括总免疫球蛋白 E(IgE)、嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)等。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,两变量间的相关分析采用直线相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 3 NKT 细胞扩增活化后外周血 IL-4、IL-10、IFN- γ 水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	<i>n</i>	IL-4			IL-10			IFN- γ		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
健康对照组	160	11.7 $\pm$ 7.3	76.4 $\pm$ 34.6	92.5 $\pm$ 43.8	34.6 $\pm$ 17.9	98.7 $\pm$ 61.3	94.6 $\pm$ 59.4	144.2 $\pm$ 53.1	409.4 $\pm$ 215.2	221.4 $\pm$ 95.3
哮喘组	150	31.2 $\pm$ 8.9	141.3 $\pm$ 36.3	289.4 $\pm$ 81.4	15.2 $\pm$ 4.6	24.8 $\pm$ 17.9	20.9 $\pm$ 9.8	134.6 $\pm$ 34.8	379.5 $\pm$ 94.2	212.6 $\pm$ 84.7
<i>t</i>		21.147	16.116	26.746	12.879	14.206	15.004	1.869	1.567	0.857
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨 论

NTK 细胞是一类特殊的 T 淋巴细胞,激活后可迅速产生具有免疫调节作用的细胞因子,影响 Th1/Th2 免疫失衡,并且较普通 T 淋巴细胞产生细胞因子的速度更快^[4-5]。NKT 细胞可能通过两种方式促进哮喘的发生,一种是间接方式:NKT 细胞和 CD3⁺T 细胞相互作用并促使它们释放 Th2 类细胞因子;另一种是直接方式,哮喘患者循环的 NKT 细胞选择性高表达 Th1 类细胞因子,一旦到达呼吸道黏膜上皮细胞,NKT 细胞就偏向于 Th2 细胞,高表达 IL-13、IL-4。

目前,NKT 参与调节固有免疫和获得性免疫,在移植免疫、抗肿瘤、抗感染、参与自身免疫性疾病等多种疾病中发挥重要作用。研究证实 NKT 细胞在动物模型中,能够有效诱导气道高反应性,从而导致动物哮喘发作,但由于伦理学、技术难度及人群选择等原因,在人群中的研究较为有限^[6]。虽然 NKT 细胞在体内的水平很少,但其功能是不容忽视的。此外,NKT 细胞在人体外周血中较难大量获取,制约了人体 NKT 细胞的研究。随着医学技术的发展,体外细胞扩增技术逐渐应用于人

2 结 果

2.1 两组研究对象外周血 NKT 细胞和 CD4⁺NKT 细胞的比例 与健康对照组比较,哮喘组患儿外周血中的 NKT 细胞和 CD4⁺NKT 细胞比例均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组研究对象外周血 NKT 细胞和 CD4⁺NKT 细胞的比例($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	NKT 细胞	CD4 ⁺ NKT 细胞
健康对照组	160	0.136 $\pm$ 0.072	61.45 $\pm$ 16.57
哮喘组	150	0.061 $\pm$ 0.022	44.01 $\pm$ 14.02
<i>t</i>		12.232	9.971
<i>P</i>		<0.05	<0.05

2.2 相关性分析 NKT 细胞、CD4⁺NKT 细胞与总 IgE、ECP 均无明显相关性(均 $P>0.05$)。见表 2。

表 2 NKT 细胞、CD4⁺NKT 细胞与总 IgE、ECP 相关性分析

项目	<i>r</i>	
	总 IgE	ECP
NKT 细胞	-0.157	-0.104
CD4 ⁺ NKT 细胞	0.085	0.125

2.3 NKT 细胞扩增活化后外周血 IL-4、IL-10、IFN- γ 水平 哮喘组患儿 IL-4 水平较健康对照组明显升高($P<0.05$),IL-10 水平明显下降($P<0.05$),但 NKT 细胞扩增活化后分泌的 IFN- γ 水平较健康对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

体,研究发现 α -Galcer 可体外刺激 NKT 细胞扩增,且所扩增细胞具有 NKT 细胞相似的分泌功能,产生较多种类的细胞因子^[7]。本研究以抗人 TCRV α 24-PE、TCRVB11-FITC 单克隆抗体标记 NKT 细胞,利用流式细胞分析技术检测细胞数量,极大提高了试验的准确性。CD4⁺NKT 细胞具有辅助诱导性 T 细胞亚群,可以刺激 B 细胞产生相关抗体,且 CD4⁺NKT 细胞往往能同时产生 IL-4 和 IFN- γ ,当 CD4⁺NKT 细胞分泌的 IL-4/IFN- γ 比例增高,可促进 IgE 的合成,造成 IgE 的过度产生,并促进嗜酸性粒细胞的分化、增殖,诱导其向呼吸道浸润,导致呼吸道炎性反应的发生,最终导致哮喘发作。近年在哮喘患者的气道黏膜中,发现含有大量处于激活状态的 TH2 细胞(CD4⁺细胞的一种功能亚群),在哮喘患者外周血中 CD4⁺细胞的水平也明显增多。

本研究发现,哮喘患儿外周血中的 NKT 和 CD4⁺NKT 细胞比例均明显低于健康对照组,提示哮喘患儿的发病与 NKT 和 CD4⁺NKT 细胞可能相关。据报道,哮喘发病与 Th1/Th2 之间的平衡失调是目前较为认可的机制,而 Th1/Th2 之间的

平衡是由 IL-4、IL-10、IFN- γ 水平决定的, NKT 细胞具有编码 IL-4、IL-10 的 mRNA, NKT 细胞被激活后便能迅速分泌这两种细胞因子, 同时 CD4⁺NKT 则具有编码 IFN- γ 的 mRNA, 两类细胞正是通过产生 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 来调节免疫应答, 对哮喘炎性反应的发生具有促进或抑制作用^[8-9]。本研究发
现, 在体外用 α -Galcer 刺激 NKT 细胞扩增活化培养 24、48、72 h 后进行测定, 发现哮喘组患儿 IL-4 水平较健康对照组明显下降, IL-10 较健康对照组明显上升, 而 IFN- γ 则与健康对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果提示, 哮喘患儿存在 NKT 细胞功能上的改变, 有诱导免疫应答向 Th2 诱导的体液免疫偏移, 抑制了 Th1 反应。

本研究对患儿常规变应性指标进行检测, 结果发现 NKT 细胞和 CD4⁺NKT 细胞的比例与哮喘的常见指标总 IgE、ECP 无明显相关性, 这与国外的研究结果相似。在炎性反应过程中, 患者外周血中常规变应性指标总 IgE、ECP 会有明显升高, 而 NKT 细胞和 CD4⁺NKT 细胞则可能由外周血向炎症部位聚集和迁移, 发挥局部炎症控制的作用, 导致外周血中 NKT 细胞和 CD4⁺NKT 细胞比例减少。

综上所述, 哮喘患儿外周血中 NKT 细胞和 CD4⁺NKT 细胞是明显减少的, 可能与气道局部变态反应有关, 同时 NKT 细胞所产生的 IL-4、IL-10 等因子在哮喘发病过程中产生重要作用, 导致 Th1/Th2 之间的失衡。

参考文献

[1] 王炜, 李芳, 段国威, 等. 不同淋巴细胞激活物对支气管哮喘患儿 Foxp3 表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(9): 666-668.

(上接第 3108 页)

养鉴定时间, 提高患者救治率。

参考文献

[1] 邓蕙, 段明纲, 黄文祥, 等. 106 例重型肝炎并发医院感染的危险因素分析[J]. 重庆医学, 2006, 35(1): 49-51.
[2] 班俊. 院内感染对肝硬化失代偿期患者预后的影响[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(5): 658-659.
[3] 梁波. 肝硬化患者医院感染调查研究[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(5): 323-325.
[4] Campillo B, Richardet JP, Kheo T, et al. Nosocomial spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients: impact of isolate type on prognosis and characteristics of infection[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35(1): 1-10.
[5] López Sastre JB, Solís DP, Serradilla VR, et al. Evaluation of procalcitonin for diagnosis of neonatal sepsis of vertical transmission[J]. BMC Pediatr, 2007, 7(7): 9.
[6] Indino P, Lemarchand P, Bady P, et al. Prospective study on procalcitonin and other systemic infection markers in patients with leukocytosis[J]. Int J Infect Dis, 2008, 12(3): 319-324.
[7] Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations[J]. Crit Care Med, 2008, 36(3): 941-952.

[2] Umetsu DT, Dekruyff RH. Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma; the many pathways to asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(5): 975-979.
[3] Holtzman MJ. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens[J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2741-2748.
[4] 赵晓平, 徐圣君. 舒利迭治疗老年支气管哮喘患者临床疗效分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(15): 2023-2024.
[5] 卢燕鸣, 曹兰芳, 薛海燕, 等. 支气管哮喘患儿外周血自然杀伤 T 淋巴细胞的变化及临床意义[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(10): 775-777.
[6] Thomas SY, Chung YH, Luster AD. Natural killer T cells are not the predominant T cell in asthma and likely modulate, not cause, asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(5): 980-984.
[7] Iwamura C, Nakayama T. Role of NKT cells in allergic asthma[J]. Curr Opin Immunol, 2010, 22(6): 807-813.
[8] 李志伟, 程晓明, 林科雄, 等. 影响支气管哮喘气道阻塞不完全可逆危险因素分析[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(4): 330-331.
[9] 季加芬, 管立学, 王立杰, 等. 支气管哮喘患儿白细胞介素-10 基因-592C/A 多态性及其与白细胞介素-10 水平的相关性[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(4): 261-264.

(收稿日期: 2014-02-21 修回日期: 2014-05-10)

[8] Matthaïou DK, Ntani G, Kontogiorgi M, et al. An ESICM systematic review and Meta-analysis of procalcitonin-guided antibiotic therapy algorithms in adult critically ill patients[J]. Intensive Care Med, 2012, 38(6): 940-949.
[9] Dellit TH, Owens RC, McGowan JE, et al. Infectious diseases society of America and the society for healthcare epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(2): 159-177.
[10] 保勇, 史梦, 喻华, 等. 检测血清降钙素原对感染性疾病及脓毒症的诊断价值[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(1): 94-96.
[11] 张芙蓉, 张隆, 孙继民. 血清降钙素原在儿童重症监护病房的临床应用[J]. 中国小儿急救医学, 2012, 19(5): 510-511.
[12] Tavares E, Maldonado R, Ojeda ML, et al. Circulating inflammatory mediators during start of fever in differential diagnosis of gram-negative and gram-positive infections in leukopenic rats[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(9): 1085-1093.
[13] Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, et al. Contribution of toll-like receptors to the innate immune response to gram-negative and gram-positive bacteria[J]. Blood, 2007, 109(4): 1574-1583.

(收稿日期: 2014-02-10 修回日期: 2014-04-12)