

中重度哮喘患儿白细胞介素-17与中性粒细胞炎症反应的关系

李 静, 檀卫平*, 吴葆菁, 蓝 丹, 李文益, 麦贤弟, 范玲玲

(中山大学孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨白细胞介素-17(IL-17)在中重度儿童哮喘发病、气道中性粒细胞炎症反应中的作用。【方法】中重度持续哮喘发作期儿童45例,其中中度持续组(20例)与重度持续组(25例);以健康儿童20例为对照组。以酶联免疫吸附法(ELISA)检测两组患儿外周血单个核细胞(PBMC)在CD3和CD28单克隆抗体刺激下分泌的IL-17水平,检测诱导痰中性粒细胞数量;对以上病例进行联合治疗3个月后随访,达到临床缓解的病例20例纳入哮喘缓解组,复查其IL-17水平。比较不同病情间IL-17的表达水平,了解IL-17与儿童哮喘临床病情、气道炎症反应的关系。【结果】哮喘患儿PBMC表达IL-17水平显著高于正常对照组($2\,685 \pm 1\,081$) pg/mL,其中哮喘发作组($5\,355 \pm 813$) pg/mL显著高于哮喘缓解组($4\,504 \pm 687$) pg/mL (P 均 < 0.05);重度持续组患儿PBMC表达IL-17水平($5\,830 \pm 807$) pg/mL显著高于中度持续组($4\,962 \pm 751$) pg/mL ($P < 0.05$);急性发作期哮喘患儿IL-17水平($5\,355 \pm 813$) pg/mL与诱导痰中性粒细胞比例($X_{\min} = 0$, $X_{\max} = 98.8$, $M = 44.73$)%、血中性粒细胞比例(51.72 ± 13.43)%成正相关($r = 0.820, 0.736$, $P < 0.001$)。【结论】中重度哮喘患儿外周血单个核细胞IL-17表达水平升高,并与哮喘临床病情、气道炎症反应密切相关。

关键词: 哮喘; IL-17; 中性粒细胞

中图分类号: R34

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)04-0549-03

Relationship between Interleukin-17 and Neutrophil Inflammation Reaction in Children with Moderate to Severe Asthma

LI Jing, TAN Wei-ping*, WU Bao-jing, LAN Dan, LI Wen-yi, MAI Xian-di, FAN Ling-ling

(Department of Pediatrics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of interleukin-17 (IL-17) on the pathogenesis of moderate to severe children asthma and on the airway neutrophil inflammation reaction. 【Methods】Forty-five patients (20 patients with moderate persistent asthma, 25 patients with severe persistent asthma), as well as 20 normal control subjects, were included in this study. ELISA was used to measure IL-17 concentration in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 65 children. PBMC were stimulated by anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3) (0.2 mg/L) and anti-CD28 monoclonal antibody (anti-CD28) (1 mg/L). The sputum specimens were assayed for cellular differential count. Then the asthmatic children received combined treatment for 3 months, 20 cases were relieved, their IL-17 concentration in PBMC were measured again. The correlation between the IL-17 levels and the percentage of eosinophil, neutrophil in the induced sputum was analyzed. IL-17 levels were compared between moderate persistent group and severe persistent group, between the acute group and the remission group. The relationship between IL-17 and the disease severity and airway inflammation was analyzed. 【Results】The IL-17 levels of asthmatic group were significantly higher than that of control group ($2\,685 \pm 1\,081$) pg/mL, and the level of acute group ($5\,355 \pm 813$) pg/mL were also significantly higher than that of remission group ($4\,504 \pm 687$) pg/mL ($P < 0.05$). The IL-17 levels of severe persistent group ($5\,830 \pm 807$) pg/mL were significantly higher than those of moderate persistent group ($4\,962 \pm 751$) pg/mL ($P < 0.05$). The IL-17 level ($5\,355 \pm$

收稿日期: 2009-12-30

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B030704004); 广东省自然科学基金(9451008901003013)

作者简介: 李静, 硕士, 主治医师, 主要从事儿科哮喘的临床及研究工作, E-mail: joycesums@126.com; 13826019138; * 通信作者: 檀卫平, 博士, 副教授, 主要从事儿科哮喘的临床及研究工作, E-mail: weiptan@yahoo.com.cn

813) pg/mL was positively related to the percentage of neutrophil in the induced sputum ($X_{\min} = 0$, $X_{\max} = 98.8$, $M = 44.73$)% and the percentage of neutrophil in the peripheral blood (51.72 ± 13.43)% ($r = 0.820$, 0.736 , $P < 0.001$). 【Conclusion】 The levels of IL-17 expressed by PBMC of moderate to severe asthmatic children increased and had close correlation with asthma severity and the degree of airway inflammation.

Key words: asthma; IL-17; neutrophil

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4):549-551;556]

支气管哮喘是由多种炎症细胞、细胞因子及炎症介质参与的气道慢性炎症性疾病。Th1/Th2 平衡理论、嗜酸性粒细胞炎症学说的炎症机制已经广为接受。而近年研究显示中性粒细胞在哮喘,尤其是重型哮喘发病中起着重要的作用^[1]。新发现的 Th17^[2-3]通过分泌白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17),可能介导中性粒细胞募集,参与哮喘的慢性气道炎症,并可能与气道重塑有关。有研究^[4-7]显示 IL-17 参与成人重度哮喘与激素抵抗型哮喘的发病,并有可能参与气道重塑的发生。但在儿童中重度哮喘中 IL-17 的地位如何尚无报道。本实验拟结合临床哮喘患儿的临床病情及其血液、痰液标本中以上炎症细胞及因子的改变进行分析研究,从而了解 IL-17 及中性粒细胞在中重度儿童哮喘中的作用,为探索哮喘的新治疗手段提供基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

中重度持续发作哮喘儿童 45 例(男 27 例,女 18 例),其中中度持续组(20 例)与重度持续组(25 例),平均年龄 6.9($S = 2.4$)岁。于其急性发作期取血及痰液标本,并行肺功能检测。经联合治疗后(治疗方案参照 2007GINA 方案)病情缓解儿童 20 例,纳入缓解组研究对象(男 13 例,女 7 例),平均年龄 6.7($S = 2.3$)岁。诊断、分级、分期标准参照中华医学会儿科分会 2008 年制定的儿童支气管哮喘防治常规^[8]。剔除标准:①近 2 周口服或静脉使用过糖皮质激素或免疫调节剂;②第一次喘息发作;③哮喘合并其他免疫性疾病如结核病、系统性红斑狼疮、幼年类风湿性关节炎等;④心肺功能衰竭者。正常对照组:来自同期本院健康体检儿童共 20 例(男 12 例,女 8 例),平均年龄 5.9($S = 1.5$)岁,对照组儿童无特应性疾病及免疫性疾病史。急性发作组、缓解组及对照组三组儿童性别($\chi^2 = 1.029$, $P > 0.05$ 、年龄($F = 1.933$, $P > 0.05$)经统计

学处理差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 主要试剂

淋巴细胞分离液购自达科为生物技术公司, PBS、RPMI1640 培养液、二硫苏木糖醇(DDT)购自威佳公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,鼠抗人 CD3 单克隆抗体(OKT3)、鼠抗人 CD28 单克隆抗体(anti-CD28)购自 BD/Pharmingen 公司, IL-5、IL-17 ELISA 试剂盒购自武汉中美科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 诱导痰的采集和处理 由喷射式雾化仪吸入 3%高张盐水 10 ~ 15 min,将咳出的痰液收集至约 1 mL,取 0.5 g 左右黏稠痰液,加入适量的裂解液(0.1%DTT),混匀后 37 °C 水浴 10 min 并振荡 10 min。将痰液用 40 μ m 滤网过滤,1 500 $\times$ g 离心 10 min,细胞沉渣置于 PBS 中涂片,以甲醇固定,经 White Giemsa 染色,如痰样镜检中鳞状上皮细胞占有核细胞比例 < 20%,则认为样本合格。计数 200 个非上皮细胞进行细胞分类,分类计算中性粒细胞、嗜酸性粒细胞的百分比。

1.3.2 外周血单个核细胞(PBMC)的分离和培养 所有急性期患者于治疗前静脉采血 2 mL, EDTA 抗凝, PBS 等体积稀释,缓慢加入淋巴细胞分离液上, 1 500 $\times$ g 离心 20 min。吸取中间白膜层,以 PBS 充分洗涤 2 次, 1 000 $\times$ g 离心 10 min, 加入 RPMI1640 培养液重悬 PBMC, 调整细胞密度为 1×10^6 /L。将 PBMC 1×10^6 细胞/L 培养于 96 孔培养板中,加入 anti-CD3(OKT3) (0.2 mg/L) + antiCD28(1 mg/L)共培养。培养板置于 37 °C, 体积分数 5%CO₂, 饱和湿度培养箱中培养, 72 h 后收集上清存放至 -80 °C 冰箱。

1.3.3 外周血单个核细胞(PBMC)培养上清 IL-17 的测定 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 PBMC 培养上清 IL-17 水平,单位为 pg/mL。

1.3.4 血细胞形态的测定 血细胞形态: 静脉采血 1 mL 涂片后,经 HE 染色和 White Giemsa 染色,分类计算中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞的百分比并观察各细胞的形态。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据整理和分析,符合正态分布连续性计量资料用均数符合正态分布连续性计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数比较采用独立样本 t 检验,多组均数比较采用方差分析,采用配对样本 t 检验进行组间比较;非正态分布计量资料用全距(中位数)表示,双变量相关分析采取变量间 Spearman 相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 哮喘患儿 IL-17 水平的变化

体外与抗-CD3 单克隆抗体与抗-CD28 单克隆抗体共培养支气管哮喘患儿 PBMC,产生的 IL-17 水平,哮喘组显著高于正常对照组($2\ 685 \pm 1\ 081$) pg/mL,而哮喘急性发作组($5\ 355 \pm 813$) pg/mL 又明显高于临床缓解组($4\ 504 \pm 687$) pg/mL,差异具有统计学意义($F = 52.387, P < 0.05$)。在急性发作组中,重度持续组的 IL-17 水平($5\ 830 \pm 807$) pg/mL 显著高于中度持续组($4\ 962 \pm 751$) pg/mL,差异具有统计学意义($F = 0.954, P < 0.05$)。

2.2 支气管哮喘患儿外周血、诱导痰中性粒细胞比例与 IL-17 水平的关系

将急性发作期支气管哮喘患儿外周血、诱导痰中性粒细胞比例(%)分别与 IL-17 水平(pg/mL)进行相关分析,发现哮喘患儿外周血中性粒细胞比例(51.72 ± 13.43)%、诱导痰中性粒细胞比例($X_{\min} = 0, X_{\max} = 98.8, M = 44.73$)%与 IL-17 水平($5\ 355 \pm 813$) pg/mL 成正相关, r_p 分别为 0.736、0.820, $P < 0.001$ (图 1)。

3 讨 论

支气管哮喘是一个慢性气道炎症伴气道重塑的过程,涉及嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞等。目前的 Th1/Th2 平衡理论及嗜酸性粒细胞炎症学说并不能完全解释哮喘的发病过程。有学者将哮喘按不同的炎症机制分为非嗜酸细胞型及嗜酸细胞型^[9]。研究非嗜酸细胞型哮喘通过 IL-17 驱动的中性粒细胞炎症机制对发展新的治疗措施有重要的意义。目前研究^[1,10]提示难治性哮喘、哮喘持续状态、吸入激

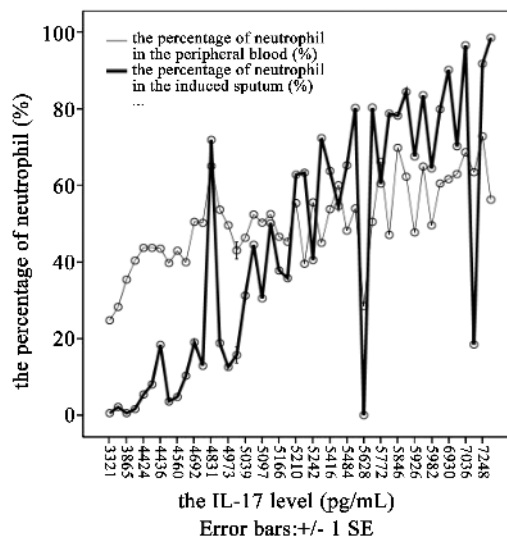


图 1 急性发作组外周血、诱导痰中性粒细胞比例与 IL-17 水平相关分析

Fig.1 The correlation analysis of the IL-17 level and the percentage of neutrophil in the peripheral blood and induced sputum in the acute group

素过快减量等病人诱导痰中性粒细胞明显增高,肯定了中性粒细胞在难治性哮喘中的作用,但中性粒细胞和 IL-17 在儿童中重度哮喘的具体作用未明。

本研究发现哮喘病人的 IL-17 水平显著高于正常对照者,急性发作组的中性粒细胞比例及 IL-17 水平明显高于缓解组,外周血、诱导痰中性粒细胞比例与 IL-17 水平成正显著正相关,表明 IL-17 及中性粒细胞在哮喘的急性发作、加重中起着重要作用,IL-17 与哮喘炎症中性粒细胞活化、趋化过程密切相关^[11]。

Bullens 等^[12]发现中重度持续哮喘病人诱导痰中 IL-17mRNA 与 CD3 γ mRNA 以及痰中性粒细胞计数成正相关,中重度持续的哮喘病人中均可发现高 IL-17AmRNA 水平表达,但并未对两组不同病情的 IL-17AmRNA 水平进行比较。我们对急性发作组病人不同病情(中度持续组与重度持续组)间 IL-17 水平进行了比较,发现重度持续组的 IL-17 水平显著高于中度持续组,提示相对高的 IL-17 可驱动更严重的中性粒细胞炎症反应。

综上所述,支气管哮喘的慢性炎症过程中,中性粒细胞发挥了重要作用,其活化体系中的炎症因子及细胞因子形成复杂的网络结构,进一步研