

## 哮喘患儿的外周血淋巴细胞 CD40/CD40L 的表达 及其与 Tc1 和 Tc2 的关系

黄花荣<sup>1</sup>, 刘甜甜<sup>1</sup>, 魏菁<sup>2</sup>, 吴葆菁<sup>1</sup>, 檀卫平<sup>1</sup>, 麦贤弟<sup>1</sup>

(中山大学附属第二医院 1. 儿科, 2. 医学研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要:** 【目的】研究发作期哮喘患儿的外周血 CD40、CD40L 的表达率及其与 Tc1 和 Tc2 的关系。【方法】应用流式细胞术检测 30 例哮喘患儿和 20 例正常对照儿童的外周血淋巴细胞 CD40、CD40L 的表达率和 Tc1、Tc2 的细胞数。【结果】哮喘患儿和正常对照组的外周血淋巴细胞 CD40 表达率分别为  $21.59 \pm 7.61$  和  $15.82 \pm 4.44$  ( $t=3.376$ ,  $P < 0.001$ ); CD40L 表达率分别为  $0.20 \pm 0.11$  和  $0.33 \pm 0.12$  ( $t=-2.747$ ,  $P < 0.05$ ); Tc1 细胞数分别为  $9.06 \pm 3.80$  和  $7.28 \pm 3.01$  ( $t=0.582$ ,  $P > 0.05$ ); Tc2 细胞数分别为  $7.64 \pm 3.67$  和  $3.02 \pm 1.38$  ( $t=3.981$ ,  $P < 0.001$ )。CD40 和 CD40L 表达率与 Tc1、Tc2 数量无显著的相关性 ( $r$  分别为  $-0.004$  和  $0.231$ 、 $-0.280$  和  $0.186$ ,  $P > 0.05$ )。【结论】发作期哮喘患儿存在明显的 CD40/CD40L、Tc1/Tc2 的异常, 这可能与哮喘的发生有重要的关联。

**关键词:** 哮喘; 白细胞分化抗原 40/40 配体; 细胞毒性 T 细胞; 淋巴细胞; 儿童

中图分类号: R

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0079-04

### Expression of CD40/CD40L of Lymphocytes and Their Correlation with Tc1 and Tc2 Cells in Peripheral Blood in Asthmatic Children

HUANG Hua-rong, LIU Tian-tian, WEI Jing, WU Bao-jing, TAN Wei-ping, MAI Xian-di

(Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the expression of CD40/CD40L and their correlation with Tc1/Tc2 cells of peripheral blood in children with attack asthma. 【Methods】The flow cytometry was used to detect the expression of CD40/CD40L and change of Tc1 and Tc2 cells of peripheral blood in 30 children with attack asthma and 20 normal children. 【Results】The expression levels of CD40 were  $21.59 \pm 7.61$  and  $15.82 \pm 4.44$  ( $t=3.376$ ,  $P < 0.001$ ), CD40L were  $0.20 \pm 0.11$  and  $0.33 \pm 0.12$  ( $t=-2.747$ ,  $P < 0.05$ ) in asthmatic children and the control, respectively. The percentages of Tc1 cells were  $9.06 \pm 3.80$  and  $7.28 \pm 3.01$  ( $t=0.582$ ,  $P > 0.05$ ), Tc2 cells were  $7.64 \pm 3.67$  and  $3.02 \pm 1.38$  ( $t=3.981$ ,  $P < 0.001$ ) in asthmatic children and the control, respectively. There were no significant correlation between the expressions of CD40 or CD40L and the percentage of Tc1 or Tc2 cells.  $r$  were  $-0.004$ ,  $0.231$ , and  $-0.280$ ,  $0.186$ , respectively;  $P > 0.05$ . 【Conclusions】Expression of CD40/CD40L and changes of Tc1/Tc2 cells are significant abnormal of peripheral blood in children with attack asthma, which can contribute to the immune pathogenesis of asthma.

**Key words:** asthma; CD40/CD40L; cytotoxic T cell; lymphocyte; child

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 79-82]

小儿哮喘是儿科呼吸道疾病中常见病之一, 发病机制仍未能完全明了, 其中最主要是免疫异

收稿日期: 2006-07-20

基金项目: 广东省卫生厅基金(E002003037), 中山医科大学中青年科研基金(B002001013)

作者简介: 黄花荣(1966-), 女, 河南长葛人, 硕士, 副教授、副主任医师, 主要从事儿科呼吸系疾病和免疫性疾病的研究, Email: hhrvivi@21cn.com

常、气道反应性增强等。在众多实验中发现,发作期哮喘患儿的 T、B 淋巴细胞功能均有不同程度的异常,而以 T 细胞功能异常更为关注<sup>[1-3]</sup>。在免疫反应的起始阶段,T 细胞激活需要两个信号:主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC)- 抗原肽信号和共刺激信号,如缺乏共刺激分子提供的共刺激信号,T 细胞便不能活化,而处于无能状态。CD (cluster of differentiation) 40/CD40L 是重要的协同刺激分子,它们在哮喘中的作用如何,以及它们在哮喘免疫发病中与细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T cell, Tc) 的关系如何鲜见报道。我们应用流式细胞术检测哮喘患儿的外周血淋巴细胞的 CD40、CD40L 表达和 Tc1、Tc2 细胞数的变化,并探讨它们的关系,以进一步探讨哮喘的发病机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

2004 年 3 月~2006 年 3 月,初次发作期哮喘患儿 30 例随机进入研究组,均为我科住院或哮喘专科门诊的病人,均符合我国的儿童哮喘的诊断标准<sup>[4]</sup>,其中男性 21 例,女性 9 例,年龄为 3 月~13 (4.68 ± 3.40) 岁;正常对照组为同期的健康体检者 20 例,无哮喘及过敏性家族史,其中男性 13 例,女性 7 例,年龄为 1.3~12 (4.95 ± 3.20) 岁。两组患儿的年龄分布 ( $t=0.224, P=0.824$ ) 及性别构成 ( $\chi^2=0.138, P=0.710$ ) 均无统计学差异。

### 1.2 方 法

1.2.1 主要试剂及仪器 鼠抗人 CD40-FITC、CD154 (CD40L) - FITC、CD3-TC、CD8-FITC、IFN $\gamma$ -PE、IL4-PE、同型阴性对照鼠抗人 IgG1-PE 和大鼠抗人 IgG1-PE 均购自 BD Pharmingen 公司。流式细胞仪 FACS Calibur, BD 公司产品。

1.2.2 CD40、CD40L 的检测 采集空腹肝素静脉抗凝血 2 mL,密度梯度离心法分离单个核细胞,PBS 洗涤,将浓度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$  单个核细胞以 100  $\mu\text{L}$  加入试验管和阴性对照管中,试验管加入荧光标记的单克隆抗体 CD3-TC+ CD40-FITC、CD3-TC+ CD40L-FITC,阴性对照管中加入 IgG1-PE,用流式细胞仪进行淋巴细胞上 CD40/CD40L 表达率检测。

1.2.3 Tc1、Tc2 的检测 取 100  $\mu\text{L}$  肝素抗凝血

与 100  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 混匀后,加入 5.0  $\mu\text{L}$  PMA (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )、4  $\mu\text{L}$  Ionomycin (50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )、3.4  $\mu\text{L}$  Monensin (0.1  $\text{mg}/\text{mL}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养 4~6 h。吸出 100  $\mu\text{L}$  培养的全血,用做破膜染色 QC 用。加入 20  $\mu\text{L}$  CD3-TC 和 20  $\mu\text{L}$  CD8-FITC,室温避光 15 min 后,分成 4 管 (编号 A1、A2、A3、A4),每管加入 50  $\mu\text{L}$  已染色的全血;每管加入 100  $\mu\text{L}$  Fix Perm 中的 Regent A 液 (固定液),室温避光 15 min,加入 3 mL PBS, 1200 r/min 离心 5 min,弃去上清;每管中加入 100  $\mu\text{L}$  Fix Perm 中的 Regent B 液 (破膜液和溶血液),同时各管中 A1 加鼠抗人 IgG1-PE, A2 加 IFN $\gamma$ -PE, A3 加大鼠抗人 IgG1-PE, A4 加 IL4-PE 各 5  $\mu\text{L}$ ;室温避光 15 min,加入 3 mL PBS, 1200 r/min 离心 5 min,弃去上清;0.5 mL PBS 重悬细胞,上机检测。

### 1.3 统计学处理

定量资料应用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组均数比较采用独立 t 检验。采用 Pearson 相关系数 r 进行相关分析。定性资料应用率或比表示,采用  $\chi^2$  检验。所有数据处理均在计算机 SPSS10.0 软件包进行。

## 2 结 果

### 2.1 哮喘患儿外周血 CD40、CD40L 的表达

哮喘患儿的外周血淋巴细胞 CD40 表达率明显高于正常对照组 ( $t=3.376, P<0.001$ ); 而 CD40L 表达率明显低于正常对照组 ( $t=-2.747, P<0.05$ ; 表 1; 图 1-3)。

表 1 哮喘患儿外周血 CD40、CD40L 的表达率和 Tc1、Tc2 细胞数的变化 (%)

Table 1 Expression of CD40, CD40L and change of Tc1, Tc2 cells in peripheral blood in asthmatic children (%)

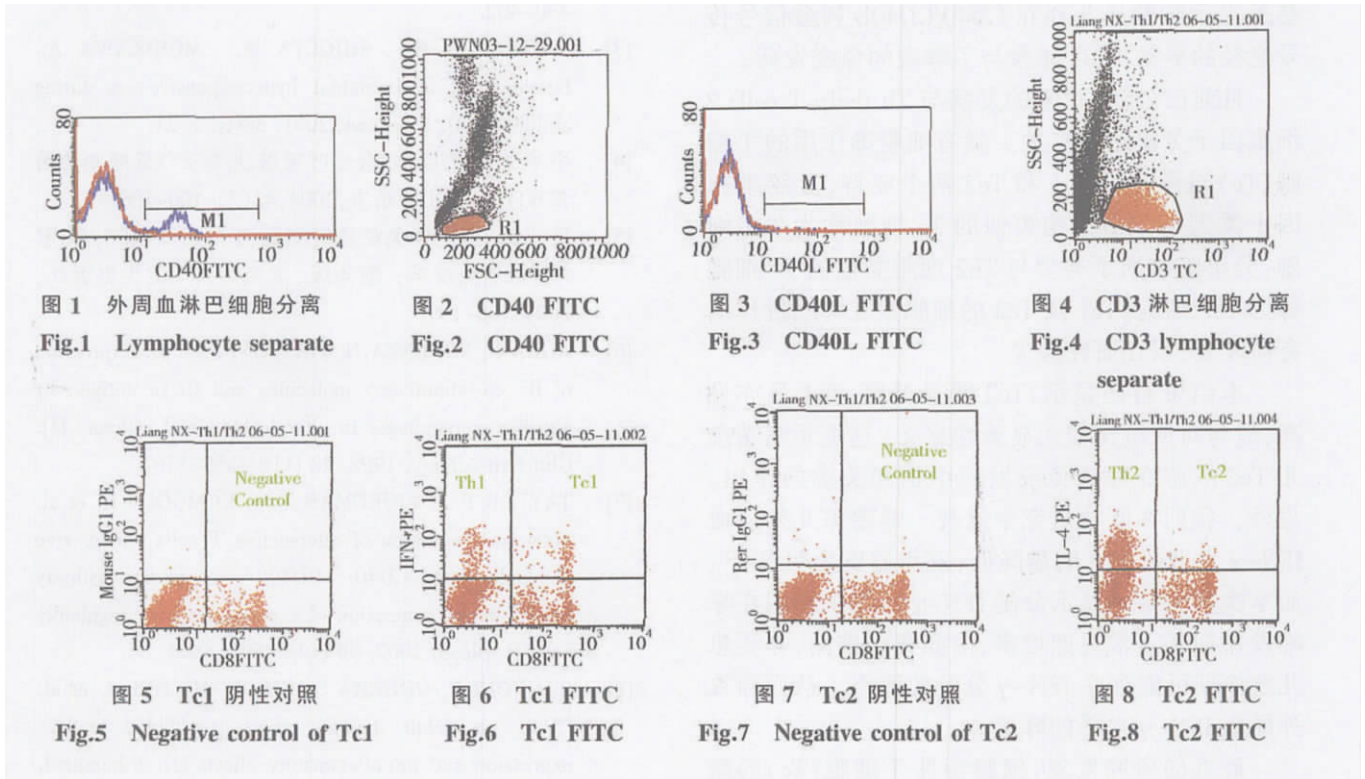
	n	CD40	CD40L	Tc1	Tc2
Control group	20	15.82 ± 4.44	0.33 ± 0.12	7.28 ± 3.01	3.02 ± 1.38
Asthma group	30	21.59 ± 7.61 <sup>1)</sup>	0.20 ± 0.11 <sup>2)</sup>	9.06 ± 3.80	7.64 ± 3.67 <sup>3)</sup>

Compared with the normal control group: 1)  $t=3.376, P<0.001$ ; 2)  $t=-2.747, P<0.05$ ; 3)  $t=3.981, P<0.001$

### 2.2 哮喘患儿的外周血 Tc1、Tc2 细胞数的变化

哮喘患儿的外周血 Tc1 细胞数高于对照组,但无显著性差异 ( $t=0.582, P>0.05$ ); 而 Tc2 细胞数明显高于对照组 ( $t=3.981, P<0.001$ ), 差异有统

计学意义(表 1; 图 4~8)。



### 2.3 哮喘患儿外周血 CD40、CD40L 的表达与 Tc1、Tc2 细胞数的关系

CD40、CD40L 的表达率与 Tc1、Tc2 的细胞数无明显相关性(表 2)。

表 2 哮喘患儿外周血 CD40、CD40L 的表达与 Tc1 和 Tc2 细胞的关系

Table > Expressions of CD40 and CD40L were related with Tc1 and Tc2 cells in peripheral blood in asthmatic children (%)

		CD40	CD40L	Tc1	Tc2
CD40	r		-0.114	-0.004	0.231
	P		0.548	0.985	0.266
CD40L	r	-0.114		-0.282	0.186
	P	0.548		0.175	0.373
Tc1	r	0.352	-0.282		-0.019
	P	0.084	0.175		0.928
Tc2	r	0.231	0.186	-0.019	
	P	0.266	0.373	0.928	

### 3 讨 论

初始 T 细胞的完全活化, 需要两种活化信号分子的协同作用, 第 1 信号由 T 细胞抗原受体(T cell antigen receptor, TCR)识别抗原产生, 经 CD 分

子将信号转导至细胞内, 第 2 信号(或称协同刺激信号) 则由抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC)或靶细胞的协同刺激分子与 T 细胞表面的相应的协同刺激分子受体相互作用而产生。在协同刺激信号的作用下, 已活化的抗原特异性 T 细胞增殖、分化为效应 T 细胞。目前已知的协同刺激分子有 B7/CD28 和 CD40/CD40L 等<sup>[5]</sup>。已有研究表明: B7/CD28 在哮喘中起重要作用<sup>[6]</sup>, 但有关 CD40/CD40L 在哮喘患儿免疫发病机制中的作用研究较少, 且结果不统一。

CD40 分布广泛, 主要表达在 B 细胞、单核细胞、树突状细胞、成纤维细胞等。CD40L 主要由活化的 T 细胞表达, 其中在 CD4T 细胞的表达明显高于 CD8T 细胞, 而 B 细胞、NK 细胞和单核细胞表面也有少量表达。表达于 T 细胞表面的 CD40L 通过 CD40 对 B 细胞介导的免疫反应发挥重要的调节作用。如果缺乏刺激信号, 则 T 细胞不能完全活化, 而处于无能状态<sup>[5,7]</sup>。

本组资料表明: 在哮喘发作期患儿外周血淋巴细胞的 CD40 表达明显升高, 这与国外多项研究的结果一致<sup>[8,10]</sup>。但 CD40L 则降低, 这提示在哮喘发作期, 哮喘患儿 T 细胞的活化功能或数量是降低的, B 细胞活化还存在着其它激发途径, 如 T、B

细胞间其它信号分子和细胞因子的刺激<sup>[11]</sup>。这些结果提示哮喘患儿存在 CD40/CD40L 刺激信号传导途径的异常,有可能参与了哮喘的免疫发病。

目前已公认,哮喘的发病与 Th (help T cell) 2 细胞因子分泌过多有关。具有细胞毒作用的 T 细胞 (Tc) 同样分为 Tc1 和 Tc2 两个亚群,分泌细胞因子类型与 Th1 细胞类似的 Tc 细胞称为 Tc1 细胞,分泌细胞因子类型与 Th2 细胞类似的 Tc 细胞称为 Tc2 细胞。Tc1 及 Tc2 的细胞数在哮喘发作期有何改变,以往研究甚少。

本组资料还显示:Tc2 明显升高,Tc1 虽亦升高,但与对照组比较无显著性意义。这提示哮喘患儿 Tc2 细胞在哮喘免疫发病中也起关键的作用。另外,我们在既往研究中发现,哮喘患儿外周血 IFN- $\gamma$  水平较正常明显降低,发作期更为明显<sup>[1,12]</sup>,而本次实验结果显示分泌 IFN- $\gamma$  的 Tc1 细胞在哮喘发作期较正常对照增多,由此我们推测,哮喘患儿发作期可能存在 IFN- $\gamma$  分泌的障碍,从而导致外周血 IFN- $\gamma$  水平的降低。

最近的研究发现,细胞毒性 T 细胞 (Tc) 的激发可通过激发树突状细胞 (DC) 的 CD40 分子而绕过 Th 细胞的辅助作用,这对激发体内 Tc 提供了新的手段<sup>[13]</sup>。我们分析 CD40/CD40L 的表达与 Tc1、Tc2 细胞数的关系,结果提示:哮喘患儿发作期 CD40、CD40L 表达与 Tc1、Tc2 细胞数均无明显相关性。这些结果提示 CD40、CD40L 表达可能与 T 细胞的活化功能有密切的关联,而与 T 细胞的数量多少无明显的关联,从而可能从侧面帮助说明在哮喘发病机制中 Th 细胞起着关键性的作用。最近有研究认为,CD40 和 CD40 与 CD40L 的相互作用,参与了黏膜的防御和保护作用<sup>[10,14]</sup>。

因此,在哮喘患儿中,可能存在极其复杂的免疫与免疫调节异常,需要更广泛、更深入免疫学的研究。本组资料提示:CD40/CD40L 的表达和 Tc1/Tc2 细胞数的异常,可能与哮喘的发生有重要的关联。

#### 参考文献:

- [1] 黄花荣,麦贤弟.哮喘患儿外周血 CD25 与 IFN- $\gamma$  的水平变化及其相关性研究 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(5): 361-363.
- [2] 麦贤弟,赵 莉,檀卫平,等.哮喘患儿 IL-12、IL-13 与 IgE 水平变化[J].中山医科大学学报, 2000, 21(5): 400-402.
- [3] MOCHIZUKI H, SHIGETA M, MORIKAWA A. Development of bronchial hyperresponsiveness during childhood [J]. J Asthma, 2001, 38(1): 1-21.
- [4] 中华医学会儿科学分会呼吸组.儿童支气管哮喘防治常规[J].中华儿科杂志, 2004, 42(2): 100-106.
- [5] 姚 智.适应性免疫应答细胞:T 淋巴细胞[M]//陈慰峰.医学免疫学,第 4 版.北京:人民卫生出版社, 2004: 100-109.
- [6] AGEA E, FORENZA N, PIATTONI S, et al. Expression of B7 co-stimulatory molecules and CD1a antigen by alveolar macrophages in allergic bronchial asthma [J]. Clin Exp Allergy, 1998, 28 (11): 1359-1367.
- [7] TAYLOR P A, FRIEDMAN T M, KOMGOLD R, et al. Tolerance induction of alloreactive T cells via ex vivo blockade of the CD40: CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell [J]. Blood, 2002, 99 (12): 4601-4609.
- [8] CAGNONI F, ODDERA S, GIRON-MICHEL J, et al. CD40 on adult human airway epithelial cells: expression and proinflammatory effects [J]. J Immunol, 2004, 172(5): 3205-3214.
- [9] BURGESS J K, BLAKE A E, BOUSTANY S, et al. CD40 and OX40 ligand are increased on stimulated asthmatic airway smooth muscle [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(2): 302-308.
- [10] MERENDINO A M, BUCCHIERI F, GAGLIARDO R, 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.
- [11] NISHIOKA Y, LIPSKY P E. The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell-B cell collaboration [J]. J Immunol, 1994, 153 (3): 1027-1036.
- [12] 黄花荣,黄绍良,麦贤弟,等.哮喘患儿自然杀伤细胞及  $\gamma$ -干扰素水平的变化 [J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(3): 187-189.
- [13] RIDGE J P, DI ROSA F, MATZINGER P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell [J]. Nature, 1998, 393 (6684): 474-478.
- [14] 阳 晓,叶任高,汪 涛,等.腹膜转运与防御机制的研究[J]. 中山大学学报:医学科学版,2004, 25(1):3-9.

(编辑 张恩健)