

哮喘患儿自然杀伤细胞及 γ -干扰素水平的变化^①

黄花荣 黄绍良 麦贤弟

(中山医科大学孙逸仙纪念医院儿科, 广州, 510120)

摘要 目的: 探讨哮喘患儿自然杀伤细胞及 γ -干扰素水平的变化及意义。方法: 应用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法、流式细胞术(FCM)及生物素-亲和素双抗体夹心酶联免疫吸附分析术(ABC-ELISA)检测哮喘患儿外周血自然杀伤细胞(NKC)活性、CD56⁺细胞数及单个核细胞(PBMNC)诱生 γ -干扰素(IFN- γ)水平。结果: 哮喘发作期及缓解期NKC活性与正常对照比较均无显著差异($P > 0.05$); 发作期CD56⁺细胞数明显低于正常对照($P < 0.01$), 后者与缓解期无显著性差异($P > 0.05$); PBMNC诱生IFN- γ 水平发作期及缓解期均显著低于正常对照($P < 0.01$)。结论: IFN- γ 产生减少可能与哮喘的发生和易诱发病毒反复感染有一定关系; 而NK细胞活性在发病过程中变化不大。

关键词 哮喘; 天然杀伤细胞; 干扰素 γ

中图分类号 R 725.6

RESEARCH ON THE CHANGES OF NATURAL KILLER CELL AND INTERFERON- γ LEVEL IN ASTHMATIC CHILDREN

Huang Huarong Huang Shaoliang Mai Xiandi

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

Abstract Objective: This study probed into the changes and significance of natural killer cell and interferon- γ level in asthmatic children. **Methods:** The cytotoxic activity of peripheral blood natural killer(NK) cell, the percentage of CD56⁺ cell, interferon- γ (IFN- γ) level induced by peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) of asthmatic children were assayed by means of MTT colorimetric method, a flow cytometric assay (FCM), avidinbiotin complex enzyme-linked immunosorbent assay method (ABC-ELISA) respectively. **Results:** NK activity of asthmatic children in acute attack and remission stage had no obviously difference, compared with the control ($P > 0.05$); the percentage of CD56⁺ cell in acute attack was significantly lower than that of the control ($P < 0.01$), while there was no significant difference between remission stage and the control ($P > 0.05$); IFN- γ level induced by PBMNC from asthmatic children in acute attack and remission stage were significantly lower than that of the control ($P < 0.01$). **Conclusions:** These results suggested that the reduced IFN- γ levels may at least partly account for the development of childhood asthma and repetitive viral infections. However, NK activity has no obviously variety during childhood asthma.

Subject headings asthma; killer cells, natural; interferon-gamma

支气管哮喘的病因及发病机理尚未完全阐明。呼吸道感染是小儿哮喘最常见的诱发因素, 这是否意味着哮喘患儿存在某种抗病毒的免疫缺陷? 为此, 我们用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测哮喘患儿外周血自然杀伤(NK)细胞活性、用流式

细胞仪(FCM)检测CD56⁺(NK)细胞百分数, 以及应用生物素-亲和素双抗体夹心酶联免疫测定法(ABC-ELISA)检测外周血单个核细胞(PBMNC)诱生IFN- γ 水平, 以探讨哮喘患儿NK细胞、IFN- γ 水平的变化及意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

所有病例均来自我科哮喘专科门诊。参照1992年第3届全国小儿呼吸道疾病学术会议制定的儿童哮喘诊断标准进行诊断^[1]。①NK活性测定:正常对照组23例,平均年龄(3.67±2.47)岁;发作期组31例,平均年龄(4.08±2.02)岁;缓解期组20例,平均年龄(4.32±3.04)岁。②CD56⁺细胞数测定:正常对照组30例,平均年龄(3.48±2.15)岁;发作期组41例,平均年龄(4.13±2.58)岁;缓解期组27例,平均年龄(3.82±2.67)岁。③PBMNC诱生IFN- γ 水平测定:正常对照组30例,平均年龄(3.96±2.15)岁;发作期组41例,平均年龄(4.87±2.26)岁;缓解期组25例,平均年龄(4.33±3.10)岁。对照组均为健康小儿,均排除个人及家族性变态反应性疾病,近2周内无感染及预防接种史。发作期组均为轻中度发作,抽血前2周内未予激素、免疫抑制剂等治疗。缓解期组要求至少近2周内无喘息发作。

1.2 实验方法

1.2.1 标本收集及处理 分别抽取患儿及正常对照肝素抗凝血5 mL及EDTA抗凝血1 mL(后者可直接检测CD56⁺细胞数)。将肝素抗凝血在无菌条件下用常规Ficoll梯度离心收集PBMNC, Hank's液洗涤3次后,用含10%小牛血清的RPMI 1640培养液分别调细胞浓度为 $5 \times 10^9/L$ (用以NK活性测定)、 $1 \times 10^9/L$ (IFN- γ 诱生)备用。

1.2.2 K₅₆₂细胞(NK的靶细胞) 用含10%小牛血清的RPMI1640常规培养K₅₆₂细胞株24 h,再以上培养液调至浓度为 $5 \times 10^8/L$ 的细胞悬液备用。

1.2.3 IFN- γ 的诱生和细胞培养 将调好的细胞悬液($1 \times 10^9/L$)加至24孔细胞培养板中,每孔0.5 mL,加入植物血凝素(PHA)使终浓度为100 mg/L。置37℃, 5% CO₂培养箱中培养72 h,离心收集上清液,分装后-20℃保存待测。

1.2.4 NK活性测定 采用MTT(四甲基偶氮唑盐)比色法,参照王新江^[2]等实验方法。

1.2.5 CD56⁺细胞百分数检测 用异硫氰基荧光素(FITC)标记鼠抗人CD56⁺单抗(美国Immunotech公司),按试剂说明方法标记,应用EPICS ELITE流式细胞仪(美国Coulter公司)进行检测。

1.2.6 IFN- γ 水平测定 采用生物素-亲和素双抗体夹心酶联免疫测定(ABC-ELISA)^[3](第二军医大学微生物教研室),稍加以改良。终止反应后在酶联免疫检测仪490 nm处读取各孔光密度值,IFN- γ 含量从标准曲线上查得。

1.3 统计学处理

所有实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计的方差分析。所有数据统计均运用SAS(6.04)软件进行运算。

2 结果

哮喘患儿发作期NK活性及缓解期与正常对照比较均无显著性差异($P > 0.05$),结果见表1。发作期CD56⁺细胞数明显低于正常对照($P < 0.01$),后者与缓解期无显著差异($P > 0.05$),结果见表2。PBMNC诱生IFN- γ 水平发作期与缓解期均显著低于正常对照($P < 0.01$),结果见表3。

表1 哮喘患儿NK细胞活性变化

Table 1 Changes of NK activity in asthmatic children ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	NK activity(%)	F	P
Control	23	41.49±12.86		
Acute attack	31	45.51±11.74	0.98	> 0.05
Remission stage	20	41.41±12.11		

表2 哮喘患儿CD56⁺细胞数测定结果

Table 2 Percentage of CD56⁺ cell in asthmatic children ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CD56 ⁺ cell(%)	F	P
Control	30	11.97±3.09		
Acute attack	41	9.48±2.24 ¹⁾	9.98	< 0.01
Remission stage	27	12.06±3.09		

1) compared with control group $P < 0.01$

表3 哮喘患儿PBMNC诱生IFN- γ 水平

Table 3 IFN- γ level induced by PBMNC in asthmatic children ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	IFN- γ ($\mu g/L$)	F	P
Control	30	7.42±1.82		
Acute attack	41	2.54±1.10 ¹⁾	120.9	< 0.01
Remission stage	25	3.20±1.11 ^{1), 2)}		

1) compared with control group $P < 0.01$; 2) compared with acute attack $P < 0.05$

3 讨论

3.1 哮喘患儿 PBMNC 诱生 IFN- γ 水平低下

哮喘多是由 IgE 介导的 I 型变态反应性呼吸道疾病,患者体内 IgE 明显升高。近年研究发现, Th₁ 细胞分泌 IFN- γ 抑制 IgE 合成, Th₂ 细胞则分泌 IL-4 诱导 B 细胞合成 IgE^[4]。本文结果表明,哮喘患儿在发作及缓解期,其 PBMNC 诱生 IFN- γ 水平明显低于正常对照 ($P < 0.01$)。Rinas^[5] 等发现有阳性特异性疾病家族史的新生儿脐血 PHA 诱生 PBMNC 的 IFN- γ 水平明显低于对照组。Tang^[6] 等证实高 IgE 综合征患儿 PBMNC 诱生 IFN- γ 水平亦明显低于对照组。这表明特异性疾病包括支气管哮喘患儿皆存在 IFN- γ 诱生应答的障碍,结合报道哮喘患儿 IL-4 水平升高且与 IgE 水平呈正相关^[7],推测哮喘患儿可能存在 Th₁ 功能低下, Th₂ 功能亢进。此外,目前认为小儿哮喘发病诱因中呼吸道感染(主要为呼吸道合胞病毒、副流感病毒等)占 58.4%~99.0%^[8],这一群体对病毒易感,提示存在某种抗病毒有关的免疫缺陷。本文显示哮喘患儿 PBMNC 诱生 IFN- γ 水平低下,表明患儿在病毒侵袭下,不能诱生足量的 IFN- γ 以抗病毒,这可能是小儿感染性哮喘中病毒变应性哮喘的主要原因。

3.2 NK 细胞在小儿哮喘中的作用

NK 细胞在哮喘等变态反应性疾病中起何作用?已有一些报道,但结果不一致。Hall^[9] 等报道过敏性鼻炎和/或哮喘患者 NK 活性与对照组无差异,而严重的湿疹患者 NK 活性则明显降低。本文结果表明,哮喘患儿发作期及缓解期 NK 细胞活性与正常对照相比,均无显著性差异 ($P > 0.05$)。研究发现 3 种 IFN (α, β, γ) 均可增强外周血 NK 细胞活性,其中以 IFN- γ 作用最强。IL-2 也是 NK 细胞重要的激活剂,本文结果表明哮喘患儿诱生 IFN- γ 水平明显低于正常对照,结合文献报道哮喘患儿 IL-2 水平明显升高,因此,我们认为哮喘患儿 NK 细胞活性处于正常水平的原因,可能是 IFN- γ 、IL-2 共同作用的结果。

对 NK 细胞数量的检测表明,哮喘患儿在发作期 NK 细胞数明显低于正常对照 ($P < 0.01$),而缓解期与正常对照无显著差异 ($P > 0.05$)。同期的 IFN- γ 水平检测表明,发作期患儿 IFN- γ 诱生水平明显低于缓解期 ($P < 0.05$),而 NK 细胞的前

体细胞主要在 IFN- γ 作用下转变为 NK 细胞^[10],这提示发作期 NK 细胞数量的减少,可能是 IFN- γ 水平严重低下所致。另一方面,我们在研究中发现,哮喘患儿发作期单个核细胞数较正常对照及缓解期明显升高。因此,不能排除发作期 NK 细胞百分比的降低是由 PBMNC 增多所致。

综上所述,哮喘患儿存在细胞免疫、体液免疫及免疫调节的异常,其发生及发展是多因素综合作用的结果。本文结果表明:哮喘患儿对病毒易感可能与 IFN- γ 水平低下有关,而与 NK 细胞活性无关。

参 考 文 献

- 1 陈育智,华云汉,文昭明,等. 儿童哮喘诊断标准. 中华儿科杂志, 1993, 31: 222
- 2 王新江,陆 华,谷淑燕. 用 MTT 比色法检测人 NK 细胞活性. 中华实验和病毒学杂志, 1992, 6(1): 69
- 3 缪晓辉,潘 卫,吴清璇,等. ABC-ELISA 检测人天然及重组 γ -干扰素. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14: 58
- 4 Del Prete, Maggi E, Parranchi P, *et al.* IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. J Immunol, 1988, 140: 4193
- 5 Rinas U, Horneff G, Wahn V. Interferon-gamma production by cord-blood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE-levels. Pediatr Allergy Immunol, 1993, 4: 60
- 6 Tang M, Kemp A, Varigos G. IL-4 and interferon-gamma production in children with atopic disease. Clin Exp Immunol, 1993, 92: 120
- 7 Akcakaya N, Sozer V, Cokugras H, *et al.* A preliminary study on IL-4 levels in extrinsic atopic asthmatic children. Turk J Pediatr, 1994, 36: 105
- 8 全国小儿哮喘南片协助组. 我国中南、西南地区儿童哮喘流行病学调查研究. 实用儿科杂志, 1993, 8: 104
- 9 Hall T J, Rycroft R, Brostoff J. Decreased natural killer cell activity in atopic eczema. Immunology, 1985, 56: 337
- 10 谢 琪,余传霖. 自然杀伤细胞. 见林飞卿,余传霖,何球藻主编. 医学基础免疫学. 上海:上海医科大学出版社, 1992, 77

(1997-09-05 收稿 1997-11-03 修回)