

布地奈德对支气管哮喘患儿体内 Th17 细胞的影响及临床意义

林应荣 江金彪 罗玲玲 潘丹峰

摘要 **目的** 探讨布地奈德治疗儿童支气管哮喘对患儿体内 Th17 细胞的影响,从而指导临床用药。**方法** 收集支气管哮喘患儿 60 例,轻度组 20 例,中度组 20 例和重度组 20 例,另选健康幼儿 15 例作为正常对照。使用布地奈德治疗哮喘患儿,分别于治疗前、治疗后 4 周、治疗后 8 周和治疗后 12 周分离各组外周血单个核细胞,采用流式细胞术检测 Th17 细胞和 IL-22⁺CD4⁺ 细胞;采用 ELISA 检测 IL-17 和 IL-22 水平。**结果** 与对照组相比,哮喘患儿体内 Th17 细胞和 IL-22⁺CD4⁺ 细胞及其相关细胞因子 IL-17 和 IL-22 明显增加($P < 0.05$),且增加的程度与病情严重程度相关。使用布地奈德治疗后,哮喘患儿体内 IL-17 和 IL-22 水平下降,且下降程度随布地奈德使用时间延长而增加。**结论** Th17 细胞及其细胞因子在儿童支气管哮喘的发病中起着十分重要的作用,布地奈德可通过抑制 Th17 细胞产生 IL-17 和 IL-22 控制支气管哮喘。

关键词 支气管哮喘 Th17 细胞 布地奈德

[中图分类号] R562 [文献标识码] A

Effect of Budesonide on Level of Th17 Cells in Children with Bronchial Asthma. Lin Yingrong, Jiang Jinbiao, Luo Lingling, et al. Area 3, Department of Pediatrics, The First People's Hospital, Wenling City, Zhejiang 317500, China

Abstract **Objective** To explore the effect of Budesonide on level of Th17 cells in children with bronchial asthma and then to guide clinical medication. **Methods** Totally 60 children with bronchial asthma were recruited in this research, with 20 in mild group, 20 in moderate group and 20 in severe group. Besides, 15 healthy children were also recruited as control group. Children with bronchial asthma in different groups were treated with Budesonide. Peripheral venous blood samples were collected before or 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks after Budesonide treatment, followed by the separation of PBMCs. Numbers of Th17 cells and IL-22⁺CD4⁺ cells were detected by FACS. Levels of IL-17 and IL-22 were detected by ELISA. **Results** Compared with control group, Th17 cells and IL-22⁺CD4⁺ cells were significantly increased in groups of children with bronchial asthma. What's more, degree of increase was related to the severity of the disease. After Budesonide treatment, levels of IL-17 and IL-22 dropped in groups of children with bronchial asthma. And the decreasing degree was related to the length of Budesonide use. **Conclusion** Th17 cells and related cytokines play an important role in the pathogenesis of children bronchial asthma. Bronchial asthma could be well controlled by Budesonide though the inhibition of Th17 cells producing IL-17 and IL-22.

Key words Bronchial asthma; Th17 cells; Budesonide

支气管哮喘(bronchial asthma,以下简称哮喘)是一种常见的慢性气道炎症性疾病,主要病理生理表现为肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞在气道局部聚集,并与气道的上皮细胞、平滑肌细胞和其细胞组分共同参与,引起气道炎症、气道高反应及气道重塑等改变^[1]。早期的研究认为,Th1/Th2 细胞的免疫平衡失调在哮喘的发病过程中起着重要作用^[2],而 Th17 细胞,作为 Th 细胞家族中新发现的重要成员,已有国内外的研究表明其参与多种炎症性疾病。Th17 细胞及分泌的 IL-17、IL-22 和其他细胞

因子,可加重哮喘患者的气道高反应性,从而进一步加重病情的发展^[3]。布地奈德作为临床常用的有效控制哮喘的激素类药物,在缓解哮喘的过程中,是否对哮喘患者体内 Th17 细胞有影响,目前尚不清楚。本研究主要观察了在使用布地奈德的不同时间段,哮喘患儿体内 Th17 细胞的波动,以探讨布地奈德的作用机制,为指导临床用药提供最新的理论依据。

资料与方法

1. 临床资料:收集 2012 年 3 月~2013 年 9 月来笔者医院就诊的支气管哮喘患儿,所有入选者均为首次确诊哮喘或激素停用超过 3 个月后再次发作。根据中华医学会呼吸病学分会哮喘学组于 2013 年最新修订的《支气管哮喘防治指南》(基

层版)^[4],将哮喘患儿分为轻度、中度和重度 3 组,各入选 20 例。另选取同期来笔者医院体检的健康幼儿 15 例归入对照组,其中男性 7 例,女性 8 例,平均年龄 5.1 ± 1.6 岁,平均体重 17.8 ± 5.7 kg。所有入选者均无合并免疫相关性疾病,近 1 个月内均无激素、免疫抑制剂或免疫调节药物使用史,无急性感染史。3 组患儿分组后,轻度组男性 11 例,女性 9 例,平均年龄 5.3 ± 2.0 岁,平均体重 16.7 ± 5.3 kg。中度组男性 10 例,女性 10 例,平均年龄 4.9 ± 1.8 岁,平均体重 16.3 ± 4.9 kg;重度组男性 8 例,女性 12 例,平均年龄 4.8 ± 1.9 岁,平均体重 16.1 ± 5.1 kg。本研究 4 组观察对象的性别构成、平均年龄及平均体重差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 治疗及采血方案:3 组哮喘患儿均常规予以吸氧、抗感染及止咳化痰等对症支持治疗。所有患儿均给予布地奈德混悬液(普米克令舒,阿斯利康)雾化吸入治疗,2 毫克/次,每天 2 次,共持续治疗 12 周。分别于治疗前、治疗 4 周、治疗 8 周及治疗 12 周时,抽取清晨空腹外周静脉血 4ml,置于无菌肝素抗凝管中,用于后续研究。

3. 主要仪器及试剂:流式细胞仪(LSR_II,美国 Beckman)、酶标仪(Mk3,芬兰雷勃)、二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司生产)和冷冻离心机(美国 Sigma 公司生产)。抗人 IL-17、IL-22 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司,96 微孔平底酶标板购自上海凯博,PE-CD₃、PerCP-CD₄、APC-CD₈、FITC-IL-17、PEcy5-IL-22 等流式单克隆抗体均购自美国 BD 公司;淋巴细胞分离液、红细胞裂解液、RPMI 1640 培养基及 Hank's 液购自美国 Gibco 公司;佛波酯(PMA)、离子霉素(Inomycin)和蛋白转运抑制剂(BFA)购自美国 Sigma 公司。

4. 细胞分离培养:以等量的 Hank's 液稀释抽取所得静脉血,以 Ficoll 密度梯度离心法,2500r/min 离心 20min,分离外周血单个核细胞(PBMC)。用 Hank's 液洗涤细胞 2 次后,以 RPMI 1640 重悬细胞,调整细胞浓度至 2×10^6 /ml。以 PMA(50ng/ml)和离子霉素(500ng/ml)作为细胞刺激剂加入细胞悬液中。向 96 微孔平底酶标板内加入细胞悬液,200 微升/孔,置于 5% CO₂ 孵箱 37℃ 孵育 48h,吸取上清液,置于 0.5ml EP 管内,-20℃ 备用。

5. ELISA 检测:IL-17 和 IL-22 严格按照人 IL-17 和 IL-22 ELISA 试剂盒使用说明书对各标本进行检测,并根据标准品绘制标准曲线。

6. 流式细胞术检测:将调整好浓度的细胞悬液置于 5ml 培养管内,并加入 BFA,37℃ 孵育 6h 后,经 PBS 洗涤、破膜、固定处理后,以相应抗体进行细胞染色,4℃ 避光 20min,洗去游离抗体后,置于流式管内,100 微升/管,以流式细胞仪进行细胞亚群和细胞因子检测,并采用 Flowjo 软件分析数据。

7. 统计学方法:采用 SPSS 12.0 统计软件包对数据进行单因素 Student-t 检验分析,本研究所有计量数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 支气管哮喘患儿 Th17 和 IL-22⁺CD4⁺ 细胞

的变化:对照组中健康幼儿的 Th17 和 IL-22⁺CD4⁺ 细胞比率均较低,分别为 0.28% 和 0.31%。而支气管哮喘患儿,随着病情严重程度的增加,其体内 Th17 和 IL-22⁺CD4⁺ 细胞比率有明显增加;与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

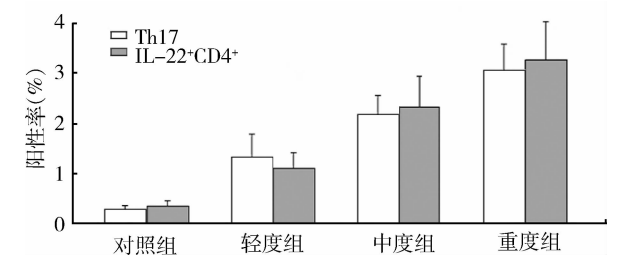


图 1 各组 Th17 和 IL-22⁺CD4⁺ 细胞比较

2. 治疗前后各组 IL-17 和 IL-22 比较:使用布地奈德治疗前,支气管哮喘患儿,无论是轻度组、中度组还是重度组,其体内 IL-17 水平均显著高于对照组(表 1)。经布地奈德治疗 4 周后,哮喘患儿体内 IL-17 水平有一定程度的下降,但与治疗前差异无统计学意义($P > 0.05$),而在治疗 8 周及 12 周后,IL-17 水平进一步下降,与治疗前差异有统计学意义($P < 0.05$)。笔者观察 Th17 相关的另一细胞因子 IL-22,发现哮喘患儿体内 IL-22 水平显著高于对照组(表 2)。在布地奈德治疗后,IL-22 也呈现了与 IL-17 类似的下降趋势。

表 1 治疗前及治疗后不同时间段 IL-17 比较

组别	IL-17 (pg/ml)			
	治疗前	治疗后 4 周	治疗后 8 周	治疗后 12 周
对照组	29.7 ± 6.2	-	-	-
轻度组	124.1 ± 14.8 *	100.6 ± 10.2	79.7 ± 11.3 #	36.9 ± 7.9 #
中度组	169.2 ± 17.3 * Δ	132.7 ± 11.9	93.6 ± 14.2 #	48.5 ± 9.1 #
重度组	214.3 ± 17.9 * Δ ▲	172.4 ± 13.2	123.5 ± 10.6 #	65.1 ± 12.4 #

与对照组相比,* $P < 0.05$;与轻度组相比,Δ $P < 0.05$;与中度组相比,▲ $p < 0.05$;与治疗前相比,# $P < 0.05$

表 2 治疗前及治疗后不同时间段 IL-22 比较

组别	IL-22 (pg/ml)			
	治疗前	治疗后 4 周	治疗后 8 周	治疗后 12 周
对照组	18.4 ± 5.1	-	-	-
轻度组	91.6 ± 8.7 #	72.4 ± 7.1	59.1 ± 6.3 #	24.3 ± 6.5 #
中度组	126.3 ± 14.6 * Δ	102.9 ± 11.5	66.8 ± 10.2 #	34.5 ± 12.1 #
重度组	175.8 ± 19.2 * Δ ▲	151.0 ± 17.4	92.7 ± 12.8 #	43.3 ± 12.6 #

与对照组相比,* $P < 0.05$;与轻度组相比,Δ $P < 0.05$;与中度组相比,▲ $P < 0.05$;与治疗前相比,# $P < 0.05$

讨 论

支气管哮喘在我国儿童中的患病率逐年上升。最近的一项流行病学调查显示,我国儿童哮喘患病率为 0.12% ~ 3.34%,较 10 年前平均升高了 64.8%^[5]。虽然哮喘的发病机制尚未完全明确,但免疫调节机制失衡已被公认在哮喘的发病和病情进展中起着十分重要的作用。研究表明,Th 细胞作为机体辅助特异性免疫应答的重要组分,是哮喘的细胞免疫学机制的主角。传统上,根据产生细胞因子的不同,Th 细胞被分为以分泌 IFN- γ 、IL-2 为主的 Th1 细胞和以分泌 IL-4、IL-5、IL-13 为主的 Th2 细胞。早期的实验观察到哮喘患者体内,Th2 细胞及相关细胞因子水平升高,但随着研究的深入,发现并不能完全用 Th1/Th2 失衡理论来解释哮喘的一些分子水平实验和临床现象。

Th17 细胞是近年来新发现的 Th 细胞亚群,以分泌 IL-17、IL-21 和 IL-22 为主要特征^[6]。Th17 细胞可参与多种炎症性疾病,其主要通过募集中性粒细胞和肥大细胞等炎性细胞、诱导成纤维细胞和上皮细胞产生 IL-6 等多种炎性细胞因子而引发局部及全身的炎症性反应。哮喘的动物模型实验显示,Th17 细胞在哮喘的发病中既有局部效应,也有全身作用,主要表现为其产生的 IL-17 可增加小鼠下呼吸道和肺部的趋化因子水平,介导中性粒细胞对气道上皮细胞和平滑肌细胞的浸润,同时可增强全身固有免疫应答^[7]。国内外研究发现,IL-17 在哮喘患者体内表达增加。本实验通过同时检测 Th17 细胞及其分泌的细胞因子 IL-17 和 IL-22,从单个细胞水平进一步证实了 Th17 细胞及相关细胞因子 IL-17、IL-22 在哮喘患儿体内增加,并且随着病情的加重,Th17 细胞增加更为显著。因此我们认为,Th17 细胞与哮喘的严重程度密切相关。

本研究还动态观察了布地奈德在治疗哮喘过程中,患儿体内 IL-17 和 IL-22 的变化。布地奈德作

为一种吸入性糖皮质激素,是临床指南用于哮喘治疗、长期控制和预防发作的一线药物之一。本研究中,随着布地奈德治疗时间的增加,Th17 相关细胞因子水平逐步下降,这表明布地奈德可通过下调 Th17 细胞及其细胞因子,而抑制其下游炎症因子和炎症细胞的趋化及活化,从而达到抑制气道炎症反应、减轻气道重建的作用。

总之,通过本研究笔者认为 Th17 细胞及其细胞因子在支气管哮喘的发病中起着十分重要的作用,布地奈德可以抑制 Th17 细胞产生炎症性细胞因子。将来的研究可在分子及基因水平进一步深入探讨 Th17 细胞在支气管哮喘的作用机制,并揭示布地奈德抑制 Th17 细胞的途径,从而为临床一线工作者用药提供实验理论基础。

参考文献

- 1 Asthma Workgroup, Chinese Thoracic Society, Chinese Society of General Practitioners. Chinese guideline for the prevention and management of bronchial asthma (primary health care version) [J]. J Thorac Dis, 2013, 5(5): 667-677
- 2 唐丹,梁萍,苏培媛. 支气管哮喘患儿 Th1/Th2 细胞免疫平衡变化研究[J]. 中国医药科学, 2011, 10: 43-44
- 3 Zhao Y, Yang J, Gao YD, *et al.* Th17 Immunity in Patients with Allergic Asthma[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2010, 151(4): 297-307
- 4 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组,中华医学会全科医学分会. 中国支气管哮喘防治指南(基层版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(5): 331-336
- 5 侯志云,张永祥. 变应性支气管肿曲菌病临床分析[J]. 中国医刊, 2012, 47(8): 37-39
- 6 Albano GD, Di Sano C, Bonanno A, *et al.* Th17 immunity in children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e58892
- 7 Wong CK, Cao J, Yin YB, *et al.* Interleukin-17A activation on bronchial epithelium and basophils: a novel inflammatory mechanism [J]. Eur Respir J, 2010, 35(4): 883-893

(收稿日期: 2013-12-25)

(修回日期: 2014-01-07)

更正启事 发表于《医学研究杂志》2014 年 43 卷第 5 期虞琳等的论文《麻杏石甘汤对哮喘大鼠气道上皮 STAT6 和黏蛋白表达的调控》,添加通讯作者:叶乐平,电子信箱:yeleping@163.com;基金项目更正为:国家自然科学基金资助项目(81102150);浙江省中医药科技局计划项目(2010ZA091),特此更正。

《医学研究杂志》编辑部