

骨化三醇对肺炎支原体肺炎患儿 Th17/Treg 失衡的干预作用

曹 正 余 蓉 薛 冰 王建荣

摘 要 **目的** 探讨骨化三醇 $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ 对肺炎支原体肺炎(mycoplasma pneumonia pneumonia, MPP)患儿 Th17/Treg 及相关因子表达的调节作用。**方法** 选取 2018 年 9~12 月在新疆医科大学第五附属医院儿科就诊的 50 例 MPP 患儿为实验组, 并取健康儿童 50 例为对照组, 酶联免疫分析法(ELISA 法)检测血清中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、IL-10 及 IL-17 的含量, 流式细胞分析技术检测 Th17 及 Treg 水平。将实验组随机分为维生素 D 干预组、非维生素 D 干预组各 25 例, 维生素 D 干预组儿童在常规治疗基础上口服维生素 D, 2 周后再次检测两组患儿外周血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、IL-10、IL-17 含量, Th17 及 Treg 水平。**结果** 实验组患儿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、Treg 及 IL-10 水平均低于对照组, Th17 及 IL-17 水平高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$)。干预组治疗后 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、IL-10 水平及 Treg 细胞比率较治疗前显著升高($P<0.05$), IL-17 水平及 Th17 细胞比率较治疗前显著降低(P 均 <0.05), 且变化程度均较非干预组显著($P<0.05$)。非干预组 IL-10 水平及 Treg 细胞比率有所下降, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、IL-17 水平及 Th17 细胞比率有所增加, 但治疗前后差异无统计学意义($P>0.05$)。干预组患儿咳嗽及喘息消失时间均短于非干预组($P<0.05$)。**结论** MPP 患儿存在一定程度的维生素 D 缺乏及 Th17/Treg 表达失衡, 补充维生素 D 可改善患儿 Th17/Treg 失衡及呼吸道症状。

关键词 骨化三醇 肺炎支原体肺炎 Th17 Treg IL-10 IL-17

中图分类号 R72 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.12.028

Intervention Effect of Calcitriol on Th17/Treg Imbalance in Children with Mycoplasma Pneumoniae Pneumonia. Cao Zheng, Yu Rong, Xue Bing, et al. Graduate School, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, China

Abstract Objective To investigate the regulation of calcitriol on the expression of Th17/Treg and related factors in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia. **Methods** Fifty MPP children from September 2018 to December 2018 were selected as the experimental group and 50 healthy children as the control group. The levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, IL-10 and IL-17 in plasma were detected by ELISA, and TH17 and Treg were detected by flow cytometry. The experimental group was randomly divided into VitD intervention group and non-VitD intervention group, 25 cases in each group. In addition to routine treatment, children in VitD intervention group were given VitD orally. After two weeks, the levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, IL-10, IL-17, Th17 and Treg in peripheral blood of the two groups were detected again. **Results** The levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Treg and IL-10 in the experimental group were lower than those in the control group, and the levels of Th17 and IL-17 in the experimental group were higher than those in the control group ($P<0.01$). The levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, IL-10 and Treg cells in the intervention group were significantly higher than those before treatment ($P<0.05$), and the levels of IL-17 and Th17 cells were significantly lower than those before treatment ($P<0.05$), and the change course was significantly lower than that in the non-intervention group ($P<0.05$). The levels of IL-10 and Treg cell ratio decreased in non-intervention group, while the levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, IL-17 and Th17 cell ratio increased, but there was no significant difference before and after treatment ($P>0.05$). The disappearance time of cough and wheeze in intervention group was shorter than that in non-intervention group ($P<0.05$). **Conclusion** Vitamin D deficiency and imbalance of Th17/Treg expression exist in MPP children. Vitamin D supplementation can improve the imbalance of Th17/Treg and respiratory symptoms in MPP children.

Key words Calcitriol; Mycoplasma pneumoniae pneumonia; Th17; Treg; IL-10; IL-17

基金项目: 新疆医科大学科研创新基金资助项目 (XYDCX2016100)

作者单位: 830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学研究生院(曹正); 830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学第五附属医院儿科(余蓉、薛冰、王建荣)

通讯作者: 王建荣, 电子信箱: 1259053526@qq.com

肺炎支原体肺炎(mycoplasma pneumonia pneumonia, MPP)是由肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)引起的肺实质和(或)间质的急性感染, 约占儿童社区获得性肺炎的 10%~30%^[1]。世界范围内流行病学研究表明, 每隔 3~7 年 MP 感染会出现周期

性社区流行,持续数月数年不等^[2]。部分患儿病情较重,常累及全身多个系统,严重影响儿童的身心健康。骨化三醇 $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ 作为体内维生素 D 的重要产物,近年来,应用不仅局限于调节钙磷代谢及内分泌功能,其抗炎、抗感染、免疫调节作用得到广泛关注^[3]。刘金等^[4]研究表明,MPP 患儿存在维生素 D 缺乏。杜许芳等^[5]研究表明,Th17/Treg 失衡参与了 MPP 的发病过程。邵美琪等^[6]报道予以维生素 D 体外培养哮喘患者外周血单个核细胞,可使 Treg 细胞水平升高,Th17 细胞降低。但 MPP 患儿能否口服维生素 D 调节 Th17/Treg 失衡,目前少见相关报道。本实验拟定以维生素 D 辅助治疗 MPP,旨在探索维生素 D 对 Th17/Treg 失衡的调节作用及可能存在的机制,为 MPP 患儿合理补充维生素 D 改善免疫失衡及临床症状提供理论依据。

对象与方法

1. 研究对象:选取 2018 年 9~12 月在新疆医科大学第五附属医院儿科病房收治的 50 例 MPP 患儿为实验组,并选取 50 例健康儿童为对照组,两组患儿在年龄、性别、BMI 方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组纳入标准:50 例患儿均符合 MPP 的诊断标准^[7]:病程 3~7 天,伴咳嗽、发热;肺部听诊可闻及固定湿性啰音,胸部 X 线检查显示点片状阴影;血清特异性 MP-IgM $\geq 1:160$ 为阳性。排除标准:①合并肺部其他疾病及多种病原体感染;②合并先天性疾病、免疫缺陷病、营养不良、甲状腺、肝脏、肾脏疾病及佝偻病;③入院前或病程中需要应用激素及免疫调节剂。实验组随机分为维生素 D 干预组、非维生素 D 干预组各 25 例,两组患儿一般情况及病情严重程度比较,差异无统计学意义,均给予常规治疗

(止咳祛痰药物静脉滴注+阿奇霉素口服,所用药物频次及厂家相同),干预组在常规治疗基础上同时口服维生素 D 制剂(400 IU/次,1 次/天,厦门星鲨)治疗 2 周。本研究经医院伦理学委员会同意,所有参与者受试前均签署知情同意书。

2. 研究方法:纳入标准的患儿均于入院第 2 天及 2 周后采集清晨空腹血 6ml,肝素抗凝,取 3~4ml 全血加入 PBS 对倍稀释,缓慢倒入装有 4ml 淋巴细胞分离液的离心管中,离心后取白膜层,3 倍体积的 PBS 将其洗 3 遍,1640 培养基重悬,调整细胞浓度 $2 \times 10^6/\text{ml}$,收集 100 μl 细胞至离心管中,严格按照说明书步骤依次加入胞内染色冲洗缓冲液(intracellular staining perm wash buffer)、固定缓冲液(fixation buffer)洗涤重悬细胞,加入 20 μl Th17/Treg 细胞抗体,避光孵育 0.5h,洗涤后重悬细胞,加入细胞染色缓冲液(cell staining buffer)0.5ml,分别以 $\text{CD}3^+/\text{CD}4^+/\text{IL}-17^+$ 、 $\text{CD}4^+/\text{CD}25^+/\text{Foxp}3$ 设门,上机检测。分析 Th17、Treg 细胞的百分率。其余静脉血静置 2~4h 后以 3000r/min 速率离心 15min,分离血清,ELISA 法检测血清中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、IL-17 及 IL-10 水平(美国 BD 公司),严格按照操作说明进行。

3. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用两样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

实验组患儿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、Treg 及 IL-10 细胞水平均低于对照组儿童,Th17 及 IL-17 高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 实验组及对照组患儿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、IL-10、IL-17 含量及 Treg、Th17 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/ml)	Th17 (%)	IL-17 (pg/ml)	Treg (%)	IL-10 (pg/ml)
对照组	25.27 ± 6.92	1.29 ± 0.13	244.4 ± 44.1	2.58 ± 0.48	15.1 ± 3.8
实验组	15.88 ± 8.08	1.77 ± 0.21	273.1 ± 42.6	1.43 ± 0.47	13.5 ± 1.8
t	6.25	6.71	2.39	5.08	2.70
P	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01

治疗前两组患儿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、Treg、IL-10、Th17 及 IL-17 水平比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05),具有可比性。干预组治疗后 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、Treg 及 IL-10 水平较治疗前增加($P < 0.05$),Th17 及 IL-17 水平较治疗前降低($P < 0.05$);非干预组治疗后 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、Treg 及 IL-

10 水平较前增加,Th17 及 IL-17 含量降低,但治疗前后比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 2。

干预组与非干预组治疗效果比较,干预组患儿咳嗽消失时间及喘息消失时间均低于非干预组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。干预组患儿肺部啰音消失时间、体温正常时间及平均住院时间与非干预组比

较,差异无统计学意义($P>0.05$),详见表 3。

表 2 两组治疗前后 1,25(OH)₂D₃、IL-10、IL-17 含量及 Treg、Th17 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	1,25(OH) ₂ D ₃ (ng/ml)		Treg(%)		Th17(%)		IL-17(pg/ml)		IL-10(pg/ml)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
非干预组	15.24±5.47	15.32±5.23	1.43±0.57	2.18±0.34	1.75±0.27	1.47±0.09	280.9±27.6	258.3±48.0	11.8±2.6	15.3±3.1
干预组	15.78±6.26	25.37±6.28* [#]	1.40±0.38	2.45±0.18* [#]	1.80±0.09	1.36±0.12* [#]	266.4±97.6	230.6±35.6* [#]	10.8±2.2	17.5±2.9* [#]

与本组治疗前比较,* $P<0.05$;与非干预组治疗后比较,[#] $P<0.05$

表 3 两组患儿治疗效果比较($\bar{x}\pm s$,天)

组别	n	咳嗽消时间	喘息消失时间	肺部啰音消失时间	体温恢复正常时间	平均住院时间
非干预组	25	7.5±1.6*	3.9±1.3*	7.6±0.9	3.2±0.7	12.1±2.4
干预组	25	6.3±1.3	3.1±0.9	7.8±0.9	2.8±0.9	11.5±2.8

与干预组比较,* $P<0.05$

讨 论

MPP 是儿童常见的呼吸道感染性疾病,其发病机制尚不十分明确,研究多倾向于病原对气道上皮直接破坏和免疫功能引起的损伤,其中免疫紊乱被认为是推动 MPP 病情进展的关键因素^[2]。Treg 及 Th17 细胞均由转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)诱导初始 T 细胞分化而成,在功能上相互抑制,且在一定情况下可以互相转化,共同维持免疫状态的稳定^[8]。Treg 细胞对免疫细胞具有负性调节作用,通过分泌 IL-10、IL-4 等效应细胞因子抑制 T 细胞的活化和增殖,间接发挥免疫抑制功能^[9];Th17 则以分泌效应性细胞因子 IL-17 为特征,诱导中性粒细胞和单核细胞聚集,刺激并释放大 量炎性因子及趋化因子,如 IL-8、TNF-α 和 IL-1β 等,促进和放大炎性反应^[10]。

本研究表明,MPP 患儿急性期存在 Th17/Treg 细胞失衡,促炎性细胞 Th17 升高,抑制炎性细胞 Treg 降低,与朱章华等^[11]研究结果相一致,其机制可能为 MP 感染后通过黏附蛋白吸附于上皮细胞表面受体,激活并诱导抗原递呈细胞分泌炎性细胞因子如 IL-1β 和 IL-6 等,导致 Treg 细胞凋亡并向 Th17 细胞转化,产生 IL-17 以发挥其促炎作用,最终 Th17/Treg 免疫平衡失调,推动了 MPP 患儿疾病的进展^[12]。

维生素 D 在肺的微环境中发挥重要的免疫调节作用,目前测定血清 1,25(OH)₂D₃ 评估体内维生素 D 的含量是最准确的方法^[13]。本研究纳入 50 例 MPP 患儿,检测出血清中 1,25(OH)₂D₃ 水平低于对照组,差异有统计学意义,与缪美华等^[14]研究结果相一致,考虑体内 1,25(OH)₂D₃ 缺乏可能是导致儿童

MPP 发生的潜在病因,其水平降低能引起呼吸道黏膜上皮变性、角化和增生,致使气道上皮合成并分泌抗菌肽、防御素、单核-吞噬细胞等减少;同时引起 B 淋巴细胞分化和成熟障碍,免疫球蛋白水平降低,多种因素共同作用下患儿免疫功能出现紊乱,增加了 MPP 患儿的发病风险^[15,16]。

1,25(OH)₂D₃ 作为体内最基本的信号分子,通过内分泌的方式联系细胞外刺激和细胞内基因应答^[17]。气道上皮细胞、单核细胞及树突状细胞中均存在维生素 D 受体(vitamin D receptor,VDR)的表达,肺部受到感染时,局部组织 1,25(OH)₂D₃ 合成增加,通过维生素 D 结合蛋白(vitamin D binding protein,VDBP)运送至细胞核内的 VDR,激活并表达一系列抗菌因子调节肺组织局部免疫^[18]。Gregori 等^[19]动物实验表明维生素 D 可诱导小鼠体内 Treg 细胞的生成,王茜等^[20]报道维生素 D 可通过抑制 Rhoa/Rock 信号通路,减少 Th17 及 IL-17 的产生。本研究发现,常规治疗基础上给予 MPP 患儿口服维生素 D 可提高体内 1,25(OH)₂D₃ 浓度,有效降低 Th17 细胞水平,提高 Treg 细胞比例,部分纠正 Th17/Treg 细胞失衡。分析其机制为在幼稚 T 细胞发育的过程中,1,25(OH)₂D₃ 一方面可阻止幼稚树突状细胞向成熟树突状细胞分化,促进 Treg 生成并分泌 IL-10 因子,还可通过 IL-17 启动子招募组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC),抑制 IL-17 启动子募集 Runt 相关转录因子 1(Runx1)来下调 IL-17 的水平,进而阻抑 CD4⁺T 细胞向 Th17 亚群分化^[21,22]。本实验研究过程中共有 3 例患儿出现肺不张、胸腔积液等肺内外并发症,多次调整抗生素并予

以地塞米松静脉滴注,因糖皮质激素具有抑制细胞及体液免疫、抗炎、退热等功效,为实验混杂因素,故未纳入实验结果。

研究显示,IL-17 可促进 α -平滑肌肌动蛋白和 RhoA 蛋白的表达,导致小气道广泛的收缩痉挛,加重气道反应性^[23]。本实验干预组患儿给予维生素 D 后咳嗽及喘憋症状消失时间较非干预组缩短,考虑维生素 D 可通过下调 IL-17 减轻气道炎性反应,进而改善呼吸道症状;干预组患儿体温恢复正常时间及总住院时间较非干预组缩短,但差异无统计学意义,可能与样本量较少有关,两组患儿肺部啰音吸收时间比较差异无统计学意义。IL-17 为具有双向作用的因子,急性感染期机体需要强有力的免疫应答清除病原,此时 IL-17 在炎性反应部位聚集并发挥其抗感染作用,据此可推测早期感染越重,炎性反应越强烈,IL-17 水平越高,在疾病恢复期高水平的 IL-17 可致炎性损伤不利于疾病转归,有研究证实 MPP 患儿严重程度与血清 IL-17 水平呈正相关^[24]。若 MPP 患儿病情发展至重症肺炎支原体肺炎(severe MPP, SMPP),则治疗难度较大,能否通过口服维生素 D 降低 IL-17 以减少 SMPP 发病的风险,为今后研究方向。

综上所述,维生素 D 辅助治疗 MPP 可在一定程度上调节 Th17/Treg 失衡并改善呼吸道症状。由于本研究样本量较小、观察周期较短,需扩大样本量明确其临床疗效,并规范维生素 D 的用法、用量,随着研究的不断深入,将为 MPP 的干预和治疗提供新的靶点。

参考文献

- Samransamruajkit R, Jitchaiwat S, Wachirapaes W, *et al.* Prevalence of Mycoplasma and Chlamydia pneumonia in severe community-acquired pneumonia among hospitalized children in Thailand[J]. Jpn J Infect Dis, 2008, 61(1): 36-39
- 刘瀚雯, 马融. 儿童肺炎支原体肺炎中西医结合诊治专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2017, 32(12): 881-885
- 张晓丹, 赵贝, 李光慧, 等. 维生素 D 缺乏与感染发生的相关性及其机制研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(5): 710-715
- 刘金, 闫虹, 陈小庚, 等. 儿童血清维生素 A、D、E 水平与肺炎支原体肺炎相关性的临床研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2018, 26(1): 97-99
- 杜许芳, 周炯英. Th17/Treg 失衡在肺炎支原体肺炎患儿中的作用及其机制[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(12): 2017-2021
- 邵美琪, 吴世满, 刘娟, 等. 骨化三醇对支气管哮喘患者外周血 Th17/Treg 表达的调节作用[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2015, 9(19): 3521-3526
- 胡亚美, 江载芳, 褚福棠. 实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1322-1326
- 柴巧利. 阿奇霉素与甘草锌联合治疗对支原体肺炎患儿炎症反应程度及免疫应答功能的影响[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(14): 1938-1940
- 杜许芳, 周炯英. Th17/Treg 失衡在肺炎支原体肺炎患儿中的作用及其机制[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(12): 2017-2021
- 张国辉, 吴福玲, 李晓梅, 等. 过敏性紫癜合并肺炎支原体感染儿童血 Th17/Treg 平衡性检测[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(1): 8-11
- 朱章华, 潘小晶, 王锁英, 等. Th17/Treg 细胞在儿童肺炎支原体肺炎中的作用研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(36): 6040-6043
- 丁斌, 李小兵, 李雷雷. Th17/Treg 细胞在儿童支原体肺炎发病中的作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(12): 1758-1760
- 覃燕莉, 秦晨光, 尹太勇, 等. 维生素 D 在儿童哮喘发病中的作用研究[J]. 华南国防医学杂志, 2018, 32(3): 202-205
- 缪美华, 邵雪君, 朱宏, 等. 婴儿血清 25 羟维生素 D 水平与呼吸道病原易感关系研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 29(3): 226-230
- Bartley J. Vitamin D, innate immunity and upper respiratory tract infection[J]. J Laryngol Otol, 2010, 124(5): 465-469
- 李晓娟, 安俊杰. 肺炎支原体感染患儿免疫球蛋白、补体及 T 淋巴细胞亚群的水平[J]. 中国临床医生杂志, 2019, 47(3): 361-363
- 宋宇, 刘晓民. 1,25(OH)₂ 维生素 D 与社区获得性肺炎[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2015, 8(2): 259-262
- 律立红, 徐智儒. 疾病的发生发展与骨化三醇体内水平间的相互影响及其相关机制[J]. 世界临床药物, 2018, 39(10): 699-704
- Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, *et al.* Regulatory T cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance[J]. J Immunol, 2001, 167(4): 1945-1953
- 王茜, 罗静, 郭琿. 1,25-二羟维生素 D₃ 对肾间质纤维化大鼠 IL-17 的调节作用[J]. 临床医药实践, 2017, 26(4): 289-292
- Nashold FE, Nelson CD, Brown LM, *et al.* One calcitriol dose transiently increases Helios + FoxP3 + T cells and ameliorates autoimmune demyelinating disease[J]. J Neuroimmunol, 2013, 263(1-2): 64-74
- Joshi S, Pantaleo LC, Liu XK, *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D₃ ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(17): 3653-3669
- 牛成成, 尤青海. 白细胞介素-17 受体 C 与肺部及相关疾病的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2013, 6(4): 364-367
- 邵亚望, 张维, 周金玲, 等. 血清 IL-15、IL-17 测定在判断肺炎支原体肺炎严重程度中的作用[J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(2): 282-284

(收稿日期: 2019-04-06)

(修回日期: 2019-04-23)