

25OHD₃ 和 IL - 21 在哮喘患儿血清中的表达及临床意义

张雪雅 陈小芳 李昌崇

摘要 **目的** 分析哮喘急性发作患儿血清中 25OHD₃、白细胞介素 - 21 (IL - 21) 水平的变化, 探讨其临床意义。**方法** 分别采用电化学发光免疫分析法和酶联免疫吸附法测定 51 例哮喘急性发作患儿 (哮喘组) 和 75 例体检健康儿童 (对照组) 血清 25OHD₃、IL - 21 水平。比较两组间患儿血清 25OHD₃、IL - 21 水平, 对哮喘急性发作患儿血清 25OHD₃、IL - 21 行 ROC 曲线分析。**结果** 哮喘组患儿血清 25OHD₃ 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$); 两组间不同年龄儿童 25OHD₃ 血清水平存在显著差异, 对照组 < 6 岁儿童明显高于哮喘组 < 6 岁儿童 ($P < 0.05$), 对照组 ≥ 6 岁儿童明显高于哮喘组 ≥ 6 岁儿童 ($P < 0.05$)。哮喘组患儿血清 IL - 21 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。血清 IL - 21、25OHD₃ 水平对急性发作期哮喘诊断曲线下面积分别为 0.76、0.61。**结论** IL - 21、25OHD₃ 在儿童哮喘急性发作中发挥作用, 可作为诊断哮喘急性发作的生物学标志物。

关键词 哮喘 儿童 白介素 - 21 25OHD₃

中图分类号 R725.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.02.030

Expression and Clinical Significance of 25OHD₃ and IL - 21 in Serum of Children with Asthma. Zhang Xueya, Chen Xiaofang, Li Changchong. Department of Pediatric Respiratory Disease, the Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To analyze the changes of serum levels of interleukin - 21 (IL - 21) and 25OHD₃ in children with acute attack of asthma, and to explore their clinical significance. **Methods** The serum levels of 25OHD₃ and IL - 21 in 51 children with acute asthma attack (asthma group) and 75 healthy children (control group) were measured by electrochemiluminescence immunoassay and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The ROC curve analysis was performed for serum IL - 21 and 25OHD₃ in children with acute asthma attack. **Results** The serum 25OHD₃ level in asthma group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). There were significant differences in the serum level of 25OHD₃ between the two groups of children of different ages, < 6 years old children in the control group higher than asthma group < 6 years old Children ($P < 0.05$), ≥ 6 years old children in the control group higher than asthma group ≥ 6 years old children ($P < 0.05$). The level of serum IL - 21 in asthma group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The areas under the curve of serum IL - 21 and 25OHD₃ in the diagnosis of acute attack asthma were 0.76 and 0.61, respectively. **Conclusion** IL - 21 and 25OHD₃ play a role in acute attack of asthma, appearing to be the promising diagnostic biomarkers for asthma.

Key words Asthma; Children; Interleukin - 21; 25OHD₃

支气管哮喘是儿童最常见的慢性肺部疾病, 以慢性气道炎症、可逆性气流受限、气道高反应性为特征。据估计, 全世界受哮喘影响的患者超过 3 亿, 造成每天 1000 人死亡。哮喘死亡主要发生在急性恶化期间。2010 年第 3 次全国城市儿童哮喘调查发现, 在 43 个城市中, 14 岁以下儿童哮喘的发生率从 2000 年的 2.0% 上升到 3.0%。学龄前儿童哮喘发生率为

3.8%, 高于婴幼儿和学龄儿童。由此可见, 儿童尤其是学龄前儿童哮喘早期诊断及治疗具有非常重要的意义。近年来研究表明, 维生素 D 缺乏与哮喘之间存在关系。儿童维生素 D 缺乏 (vitamin D deficiency, VDD) 与哮喘风险增加、症状恶化和肺功能下降有关^[1]。维生素 D 不仅通过抑制 T 辅助细胞 1 (T-helper cells 1, Th1) 相关细胞因子合成, 而且通过调节 Th2 细胞, 调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 和 Th17 细胞的活性来发挥免疫调节作用^[2]。白细胞介素 - 21 (interleukin - 21, IL - 21) 是 IL - 2 细胞因子家族中的一员, 主要由活化的 CD4⁺ T 细胞

基金项目: 浙江省温州市科技局项目 (Y20170625)

作者单位: 325027 温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院儿
童呼吸科

通讯作者: 李昌崇, 教授, 主任医师, 电子信箱: wzlichch@163.com

(包括 T 滤泡辅助细胞和 Th17 细胞)和自然杀伤性 T 细胞产生,作用于多种免疫细胞。在过敏性气道炎症动物模型中发现,IL-21R 的缺失导致 2 型 CD4⁺T 细胞反应受损^[3]。此外,大量体外研究表明 IL-21 对 CD4⁺T 细胞分化起关键作用,IL-21 可促进 Th17 分化,同时抑制 FoxP3⁺Treg 细胞^[4,5]。因此,探讨哮喘急性发作患儿血清中 IL-21、25OHD₃ 水平的变化具有重要意义。

对象与方法

1. 研究对象:选取笔者医院 2019 年 9 月~2020 年 8 月收治的住院哮喘急性发作患儿共 51 例,其中男性 30 例,女性 21 例,患者年龄 3~10 岁,平均年龄为 5.70±2.13 岁。选择同期在笔者医院体检健康儿童 75 例纳入对照组,其中男性 40 例,女性 35 例,年龄 3~10 岁,平均年龄为 6.30±2.07 岁。两组儿童均无基础疾病,且年龄、性别及基础疾病比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2. 诊断标准:符合中华医学会儿科学分会呼吸学组 2016 年《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》^[6]。急性发作期是指突然发生喘息、咳嗽、气促、胸闷等症状,或原有症状急剧加重。维生素 D 缺乏定义为血清总 25OHD₃ 水平低于 20ng/ml,维生素 D 不足为 20~30ng/ml^[7]。

3. 纳入标准:哮喘组:①中华医学会儿科学分会呼吸学组 2016 年《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》,哮喘急性发作期患儿;②年龄为 3~14 岁;③近 1 个月内未使用免疫抑制剂及口服或静脉激素。对照组:既往无喘息史、过敏性疾病病史、佝偻病病史及自身免疫病病史,且近 30 天内无感染病病史^[6]。所有纳入者自愿签署知情同意书,本研究已通过笔者医院医学伦理学委员会批准。

4. 哮喘组和对照组排除标准:①存在肺结核或其他慢性肺部疾病;②过去 3 个月内有眼、腹或胸外科手术;③过去 3 个月因心血管疾病住院;④过去 3 个月内服用维生素 D 剂和钙剂;⑤不能配合完成血液标本采集视为脱落标准;⑥存在肝脏、肾脏、心脏功能损害视为剔除标准。

5. 主要试剂及仪器:IL-21ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司),全自动电化学发光免疫分析仪(瑞士罗氏公司),酶标仪(美国 Thermo 公司),数字显示隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),离心机(上海安亭科学仪器厂),移液枪(美国 Thermo 公司)等。

6. 血清 25OHD₃ 检测:采用电化学发光免疫分析法,按照标准流程操作检测 25OHD₃ 水平。

7. 血清 IL-21 检测:取已分离-80℃保存血清,4℃解冻,采用酶联免疫吸附法,严格按照试剂盒说明书配置试剂及检测 IL-21 水平。

8. 统计学方法:采用 GraphPad Prism 8.3 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料比较采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。血清指标对急性发作期哮喘的诊断价值分析采用受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组间血清 25OHD₃ 水平的比较:哮喘组急性发作患儿血清 25OHD₃ 水平明显低于对照组(29.00±9.16ng/ml vs 32.89±10.15ng/ml, $P<0.05$)。同时,对照组 <6 岁儿童 25OHD₃ 血清水平明显高于哮喘组 <6 岁儿童(39.85±10.14ng/ml vs 33.91±7.92ng/ml),对照组 ≥6 岁儿童 25OHD₃ 血清水平明显高于哮喘组 ≥6 岁儿童(27.98±6.79ng/ml vs 22.54±6.26ng/ml),差异均有统计学意义($P<0.05$)。此外,组内 25OHD₃ 血清水平比较发现对照组 <6 岁儿童显著高于对照组 ≥6 岁儿童(39.85±10.14ng/ml vs 27.98±6.79ng/ml),哮喘组 <6 岁儿童显著高于哮喘组 ≥6 岁儿童(33.91±7.92ng/ml vs 22.54±6.26ng/ml),差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2. 两组间血清 IL-21 水平比较:哮喘组与对照组中血清 IL-21 水平经 t 检验,差异有统计学意义($P<0.05$),哮喘组急性发作患儿血清 IL-21 水平(422.1±201.0ng/ml)明显高于对照组(233.8±169.8ng/ml)。

3. ROC 曲线分析:血清 IL-21、25OHD₃ 对哮喘急性发作诊断 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC)分别为 0.76 和 0.61,其中 IL-21 的 ROC 曲线 AUC 大于 25OHD₃。进一步分析发现,25OHD₃ 分别对 <6 岁患儿哮喘急性发作和 ≥6 岁患儿哮喘急性发作诊断 AUC 分别为 0.67 和 0.72(图 1,表 1)。

讨 论

支气管哮喘是目前威胁儿童生命健康最常见的慢性肺部疾病。早期诊断和治疗是改善儿童生活质量和挽救生命的有效手段。但是由于其发病机制复杂,目前尚未完全阐明。近年来研究表明,维生素 D 缺乏在支气管哮喘发病机制中起重要作用,可能与气

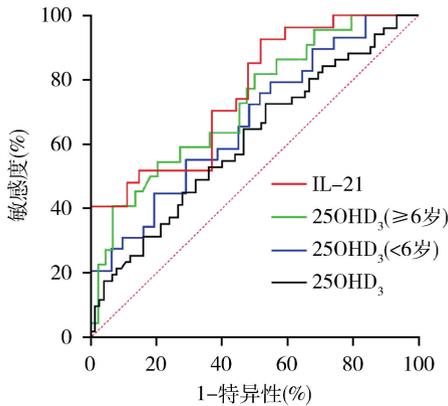


图1 哮喘急性发作期血清 IL-21、25OHD₃ ROC 曲线分析

表1 血清 IL-21、25OHD₃ AUC 比较

项目	AUC	标准差	P	95% CI
IL-21	0.76	0.064	0.001	0.6338 ~ 0.8861
25OHD ₃	0.61	0.051	0.036	0.5099 ~ 0.7108
25OHD ₃ (<6岁)	0.67	0.069	0.024	0.5340 ~ 0.8053
25OHD ₃ (≥6岁)	0.72	0.066	0.003	0.5949 ~ 0.8524

道高反应性、肺功能下降、哮喘恶化以及对激素治疗反应性降低有关^[7,8]。Jolliffe 等^[9]研究发现,与安慰剂比较,补充维生素 D 可降低哮喘急性发作需要使用全身性皮质类固醇治疗或者住院治疗的比例。进一步研究发现,这种作用与血清 25OHD₃ 浓度相关。对于血清 25OHD₃ 浓度 < 25nmol/L 的受试者,补充维生素 D 显著降低哮喘严重急性发作,但对于血清 25OHD₃ ≥ 25nmol/L 的人群,补充维生素 D 对减少哮喘严重急性发作无统计学意义。本研究发现,与对照组比较,哮喘组儿童血清 25OHD₃ 降低,两组比较差异有统计学意义。进一步研究发现,血清 25OHD₃ 浓度与年龄密切相关。≥ 6 岁正常儿童血清 25OHD₃ 浓度为 27.98 ± 6.79ng/ml,存在维生素 D 不足,且明显低于 < 6 岁正常儿童(39.85 ± 10.14ng/ml)。而 < 6 岁哮喘儿童血清 25OHD₃ 浓度为 33.91 ± 7.92ng/ml 虽低于 < 6 岁正常儿童,但明显高于 ≥ 6 岁哮喘儿童(22.54 ± 6.26ng/ml)。由此笔者推测,补充维生素 D 对于 ≥ 6 岁哮喘儿童尤为重要。

近年来,随着对哮喘发病机制的深入研究,CD4⁺T 细胞被认为是哮喘发病机制的有效调节因子,尤其是 Th2 在哮喘发病中的作用逐渐得到认可^[10]。IL-4、IL-5 和 IL-13 是 Th2 细胞产生的典型 2 型细胞因子,可介导哮喘和气道炎症的发展,表现为 IgE 介导的过敏反应、气道高反应性以及嗜酸性粒细胞浸润。然而,新的证据表明,T 滤泡辅助细胞,而不

是 Th2 细胞,主要在 B 细胞滤泡中产生 IL-4 和 IL-21,并在小鼠和人类的严重哮喘发展过程中发挥作用^[11-15]。

本研究发现,与对照组比较,哮喘组儿童血清 IL-21 显著升高。类似地,AI-Ayed 等^[16]在沙特儿童研究中发现,与非哮喘儿童比较,哮喘儿童血清 IL-21 水平显著增加。此外,与哮喘控制组比较,IL-21 水平在哮喘未控制组中显著升高。哮喘小鼠模型研究发现不仅在血清及肺泡灌洗液中 IL-21 水平升高,而且在肺和肺淋巴结中 IL-21 转录也发生上调^[17]。另外,卵清蛋白诱导的哮喘小鼠模型研究表明,IL-21 与气道高反应、嗜酸性粒细胞的浸润和 IgE 生成相关^[18]。进一步研究发现,与健康对照组比较,哮喘患者体内表达 IL-21 的 CD4⁺T 细胞的比例增加。这种增加的比例与血液中总 IgE 水平呈正相关。而体外实验表明,在 B 细胞与 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞共培养实验中,阻断 IL-21 可导致 B 细胞产生 IgE 抗体的减少^[19]。这些发现提示,IL-21 在哮喘的发生、发展中起重要作用。此外,本研究 ROC 曲线显示 IL-21 是辅助诊断哮喘急性发作的有效指标。外周血 IL-21 水平似乎是有前途的诊断哮喘的生物学标志物,尤其对于不能配合完成肺功能检查的学龄前儿童。

综上所述,IL-21、25OHD₃ 在儿童哮喘急性发作中发挥作用,可作为诊断哮喘急性发作的辅助手段。随着 IL-21、25OHD₃ 与哮喘的研究不断深入,有可能发现治疗哮喘的新型免疫疗法。

参考文献

- Hall SC, Agrawal DK. Vitamin D and bronchial asthma: an overview of data from the past 5 years [J]. Clin Ther, 2017, 39(5): 917-929
- 杨振东,周高俊,张晓丽,等. 维生素 D 对儿童哮喘发病机制的影响及辅助治疗方案选择[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2020, 14(2): 91-97
- Coquet JM, Schuijs MJ, Smyth MJ, et al. Interleukin-21-producing CD4(1) T cells promote type 2 immunity to house dust mites [J]. Immunity, 2015, 43(2): 318-330
- Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells [J]. Nature, 2007, 448(7152): 484-487
- Tortola L, Pawelski H, Sonar SS, et al. IL-21 promotes allergic airway inflammation by driving apoptosis of FoxP3⁺ regulatory T cells [J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 143(6): 2178-2189
- 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3): 167-181

- 7 Pollard SL, Lima JJ, Karina R, *et al.* Associations between serum 25 (OH)D concentrations and prevalent asthma among children living in communities with differing levels of urbanization: a cross-sectional study[J]. *Asthma Res Pract*, 2017, 3: 5
- 8 Pollard SL, Lima JJ, Mougey E, *et al.* Free 25 (OH)D concentrations are associated with atopy and lung function in children with asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2017, 119(1): 37-41
- 9 Jolliffe DA, Greenberg L, Hooper RL, *et al.* Vitamin D supplementation to prevent asthma exacerbations: a systematic review and Meta-analysis of individual participant data[J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(11): 881-890
- 10 Muehling LM, Lawrence MG, Woodfolk JA. Pathogenic CD4⁺ T cells in patients with asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(6): 1523-1540
- 11 Ballesteros-Tato A, Randall TD, Lund FE, *et al.* T follicular helper cell plasticity shapes pathogenic T helper 2 cell-mediated immunity to inhaled house dust mite[J]. *Immunity*, 2016, 44(2): 259-273
- 12 Coquet JM, Schuijs MJ, Smyth MJ, *et al.* Interleukin-21-producing CD4⁺ T cells promote type 2 immunity to house dust mites[J]. *Immunity*, 2015, 43(2): 318-330
- 13 Kobayashi T, Iijima K, Dent AL, *et al.* Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(1): 300-313
- 14 Noble A, Zhao J. Follicular helper T cells are responsible for IgE responses to Der p 1 following house dust mite sensitization in mice[J]. *Clin Exp Allergy*, 2016, 46(8): 1075-1082
- 15 Kubo M. T follicular helper and TH2 cells in allergic responses[J]. *Allergol Int*, 2017, 66(3): 377-381
- 16 Al-Ayed MS, Al-Shaibari KS, Alshehri D, *et al.* Serum ghrelin levels in Saudi obese asthmatic school-children—correlation with interleukin-4, interleukin-5, and interleukin-21[J]. *Intl J Environ Res Public Health*, 2020, 17(5): 1656
- 17 Lajoie S, Lewkowich I, Herman NS, *et al.* IL-21 receptor signalling partially mediates Th2-mediated allergic airway responses[J]. *Clin Exp Allergy*, 2014, 44(7): 976-985
- 18 Wu J, Zhang S, Qin T, *et al.* IL-21 alleviates allergic asthma in DOCK8-knockout mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(1): 92-99
- 19 Gong F, Zheng T, Zhou P. T follicular helper cell subsets and the associated cytokine IL-21 in the pathogenesis and therapy of asthma[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2918

(收稿日期: 2020-10-07)

(修回日期: 2020-10-26)

岩藻多糖通过 SIRT1/Nrf2 抑制高脂饮食诱导神经前体细胞衰老的研究

刘希鹏 张美芳 唐雯 赵安达 孙娟 张海峰

摘要 目的 研究岩藻多糖(fucoidan)抑制高脂饮食诱导神经前体细胞衰老的作用及机制。方法 选用C17.2细胞作为神经前体细胞的模型细胞,根据不同的刺激条件分为对照组、棕榈酸刺激组、棕榈酸+岩藻多糖组,刺激72h。观察各组的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase activity, β -gal)染色情况,细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,p21、p53、SIRT1蛋白表达情况。根据观察结果初探岩藻多糖抑制棕榈酸诱导C17.2细胞衰老的机制。增加SIRT1和Nrf2抑制剂组,观察 β -gal染色、ROS水平、p21、p53、Nrf2、Nqo1蛋白表达情况。根据观察结果,验证SIRT1/Nrf2在岩藻多糖抑制棕榈酸诱导C17.2细胞衰老过程中的作用。**结果** 与棕榈酸刺激组比较,棕榈酸+岩藻多糖组细胞 β -gal染色阳性率和衰老相关蛋白p53、p21表达显著降低($P < 0.05$)。SIRT1、Nrf2、Nqo1的蛋白表达水平以及Nrf2的入核水平均明显增加($P < 0.05$)。加入SIRT1抑制剂NAM后,Nrf2和Nqo1蛋白表达、Nrf2入核水平显著降低($P < 0.05$),ROS水平明显增加($P < 0.05$)。加入NAM或Trigonelline后,C17.2细胞的衰老表型明显增加($P < 0.05$)。**结论** 岩藻多糖可抑制高脂饮食诱导的神经前体细胞衰老,这一过程可能与激活SIRT1/Nrf2抑制细胞氧化应激有关。

关键词 岩藻多糖 高脂饮食 神经前体细胞衰老 SIRT1/Nrf2

中图分类号 R459.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.02.031

A Study of Fucoidan Inhibiting the Premature Senescence of Neural Precursor Cells Induced by High-fat Diet through SIRT1/Nrf2. Liu Xipeng, Zhang Meifang, Tang Wen, *et al.* Department of Clinical Nutrition, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院临床营养科

通讯作者:张海峰,电子邮箱:zhanghf1290@163.com