

哮喘患儿外周血白细胞介素及其对白细胞介素调节作用

★ 吴昔林 农定猛 (广东省东莞市寮布医院内儿科 东莞 523400)

摘要:目的:探讨白细胞介素 2、10(IL-2、10),一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)在小儿哮喘发病机制中的作用。方法:采用双抗夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)技术检测 28 例哮喘患儿血浆及外周血单个核细胞(PBMC)在植物血凝素(PHA)刺激下产生 IL-10 的水平,同时检测了 NO、IL-2 和 TNF- α 的水平,并研究了重组人 IL-10(rhIL-10)对 PBMC 体外诱导 NO、IL-2 和 TNF- α 的调节作用。结果:(1)急性发作期哮喘患儿血浆及 PBMC 在 PHA 刺激下产生 IL-10 水平均比正常儿低($P < 0.05$);(2)急性发作期患儿血浆及 PBMC 在 PHA 刺激下产生 NO 水平均升高($P < 0.05 \sim 0.01$),而在缓解期恢复正常($P > 0.05$);(3)急性发作期哮喘患儿 PBMC 在 PHA 刺激下产生 IL-2 和 TNF- α 水平升高(P 均 < 0.01);(4)急性发作期哮喘患儿 PBMC 在 PHA 刺激下产生 IL-10 水平与 IL-2 和 TNF- α 呈负相关($r = -0.319, P > 0.05$);(5)IL-10 能明显抑制 PHA 刺激的哮喘患儿 PBMC 诱导 NO、IL-2 和 TNF- α ,呈剂量依赖关系。结论:哮喘发作时 IL-10 分泌及释放减少,NO、IL-2 和 TNF- α 升高,rhIL-10 对 PHA 刺激的哮喘患儿 PBMC 体外诱导 NO、IL-2 和 TNF- α 呈负相调节作用。

关键词:白细胞介素 10;白细胞介素 2;一氧化氮;肿瘤坏死因子;哮喘

中图分类号:R 725.6 **文献标识码:**B

为探讨 Th1 与 Th2 两类细胞因子在小儿哮喘时的相互调节,我们检测了哮喘患儿外周血 IL-2、10,一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子(TNF- α)水平,并研究了重组人 IL-10(rhIL-10)对外周血单个核细胞(PBMC)体外产生 IL-2、NO 及 TNF- α 的调节作用。以探讨 IL-10 和 NO 等在小儿哮喘发病机理中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

1.1.1 对照组 正常健康体检儿童 20 名,2~10 岁(平均 5.0 岁),男 11 名,女 9 名。既往无哮喘病史,采血前 4 周内无感染及用药史。

1.1.2 哮喘组 确诊为支气管哮喘的本院患儿,均为急性发作期患儿,男 17 例,女 11 例,共 28 例,年龄 1~12 岁(平均 5.2 岁)。采血前 4 周内未用口服及静脉糖皮质激素以及免疫增强或抑制剂等药物。其中 18 例患儿经糖皮质激素及气管舒张剂等药物治疗,等临床症状缓解后,于出院前再次采周围静脉血标本待测。

1.2 方法

1.2.1 外周血 PBMC 培养上清液的制备 无菌采取肝素抗凝静脉血 5~6 mL,以淋巴细胞分离液常

规分离 PBMC,离心洗涤 3 次,用 RPMI 1640 培养液调细胞浓度为 5×10^6 /mL,种入 24 孔细胞培养板,每孔 1 mL,加入 1% (V:V)植物血凝素(PHA)置 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱中培养 48 小时,收集收清液置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

1.2.2 IL-10 测定 采用双抗夹心 ELISA 法,人 IL-10 ELISA 试剂盒购于美国 Genzyme 公司。首先将标准品 rIL-10 依次稀释为 512、256、64、15、8、0 ng/mL。待测血浆及 PBMC 培养上清标本不稀释。将各浓度标准品 rIL-10、培养的上清液标本分别加入已用鼠抗人 IL-10 单克隆抗体包被的微孔板内,每孔 100 μL ,室温避光孵育 1 小时,洗涤 3 次拍干,加 100 μL 链霉素亲和素,孵育 30 分钟,洗涤,加 100 μL 底物,孵育约 15 分钟,待标准浓度各孔呈现颜色梯度后加终止液。于 450 nm 吸收波长处测定光度(A,旧称光密度 OD),绘制标准曲线,根据各标本 A 植在标准曲线上查行相应 IL-10 浓度。

1.2.3 NO 测定 血浆 NO 水平和 PBMC 诱导 NO 水平用镉还原柱层析和比色法,通过检测 NO_2^- / NO_3^- 浓度以代表 NO 水平^[1]。

1.2.4 IL-2 测定 PBMC 诱导 IL-2 水平用 CTLL

细胞株生物活性法测定^[2]。

1.2.5 TNF- α 测定 PBMC 诱生 TTNF- α 水平用 L₉₂₉ 细胞株生物活性法^[3]测定。

1.2.6 IL-10 对 PBMC 诱生 NO、IL-2 及 TNF- α 的调节作用 同方法 1, 在加入 1% PHA 的同时加入不同浓度的重组人 IL-10 (rhIL-10) (为美国 Genzyme 公司产品)。另设不加 rhIL-10 对照。置 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 48 小时, 收集上清液置 -20℃ 保存待测。

1.3 统计学处理

组间两样本均数比较用 *t* 检测, 并做直接相关分析。

2 结果

2.1 哮喘患儿血浆和 PBMC 产生 IL-10 的水平

如表 1 所示, 急性发作期哮喘患儿血浆和

表 1 哮喘患儿外周血 IL-10、NO₂⁻/NO₃⁻、IL-2 及 TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-10/ng·L ⁻¹		NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ /μmol·L ⁻¹		IL-2/KU·L ⁻¹		TNF- α /KU·L ⁻¹	
		血浆	PBMC	血浆	PBMC	PBMC	PBMC	PBMC	PBMC
对照组	20	11.2±2.9	64±10	29.6±2.9	46±9	37±6	50±15		
发作组	28	7.2±2.2**	22±5**	32.7±4.5*	57±10**	51±9**	213±47**		
缓解组	18	9.2±1.6*	57±10*	30.2±3.1	43±9	39±6	66±17**		

注: *与对照组比较, *P*<0.05; **与对照组和缓解组比较, *P*<0.01。

表 2 不同浓度 IL-10 对两组各 10 例 PBMC 诱生 IL-2、TNF- α 和 NO₂⁻/NO₃⁻ 的调节作用 ($\bar{x} \pm s$)

IL-10/ng·L ⁻¹	IL-2/KU·L ⁻¹		TNF- α /KU·L ⁻¹		NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ /μmol·L ⁻¹	
	对照组	哮喘组	对照组	哮喘组	对照组	哮喘组
0	36.8±5.9	50.6±9.2	50±15	213±47	46±9	57±10
10	20.8±1.6	35.4±2.8	30±11	93±25	37±7	38±6
20	15.7±2.1	28.9±1.3	20±10	63±13	32±9	30±7
30	11.2±1.2	20.4±1.9	12±6	45±18	31±6	29±7
40	8.0±1.2	14.7±1.3	8±4	23±10	24±6	26±6

表 3 IL-2、TNF- α 、NO₂⁻/NO₃⁻ (*x*) 与 IL-10 (或 logTNF-10) 的相关与回归

变量 X	直线回归与相关			对数回归与相关	
	相关系数(<i>r</i>)	Y = a + bX	相关系数(<i>r</i>)	log Y = a + bX	
IL-2	对照组	-0.940*	Y = 31.94 - 0.672X	-0.992**	log Y = 1.25 - 0.016X
	哮喘组	-0.982**	Y = 47.36 - 0.868X	-0.997**	log Y = 1.701 - 0.013X
INF- α	对照组	-0.959*	Y = 44.48 - 1.023X	-0.999**	log Y = 1.691 - 0.020X
	哮喘组	-0.906*	Y = 173.18 - 4.288X	-0.987**	log Y = 2.274 - 0.023X
NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	对照组	-0.978**	Y = 44.12 - 0.718X	-0.984**	log Y = 1.652 - 6.451X
	哮喘组	-0.904*		-0.939**	log Y = 1.701 - 8.115X

注: **P*<0.05, ***P*<0.01。

2.3 哮喘患儿 PBMC 产生 IL-2 的水平

如表 1 所示, 急性发作期患儿 PBMC 产生 IL-2 水平升高 (*t* = 5.874, *P*<0.01), 缓解期患儿 PBMC 产生 IL-2 水平较发作期降低 (*t* = 4.828, *P*<0.01), 与对照组比较差异无显著意义 (*P*<0.05)。

2.4 哮喘患儿 PBMC 产生 TNF- α 的水平

PBMC 产生 IL-10 水平降低 (*t* 分别 = 5.358、18.004, *P* 均 <0.01); 缓解期血浆和 PBMC 产生 IL-10 水平均较发作期升高 (*t* 分别 = 3.36、14.681, *P* 均 <0.01), 但仍低于正常水平 (*t* 分别 = 2.481、2.144, *P* 均 <0.05)。

2.2 哮喘患儿血浆和 PBMC 产生 NO 水平

由表 1 可见, 急性发作期患儿血浆和 PBMC 产生 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平均升高 (*t* 分别 = 2.630、4.057, *P* 分别 <0.05, 0.01); 缓解期血浆 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平较发作期虽有下降趋势, 但差异无显著意义 (*P*>0.05), 与对照组比较差异亦无显著意义 (*P*>0.05), 而 PBMC 产生 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平较发作期降低 (*t* = 5.034, *P*<0.01), 与对照组比较差异无显著意义 (*P*>0.05)。

如表 1 所示, 急性发作期患儿 PBMC 产生 TNF- α 水平升高 (*t* = 14.931, *P*<0.01), 而在缓解期虽较发作期有所降低 (*t* = 12.746, *P*<0.01), 但仍然高于对照组 (*t* = 3.002, *P*<0.01)。

2.5 直线相关性

急性发作期患儿 PBMC 产生 IL-10 水平与 IL-

2、TNF- α 呈显著负相关($r = -0.504$ 、 -0.528 , P 均 <0.01),而与 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平相关不显著($r = -0.319$, P 均 <0.05)。

2.6 IL-10 对哮喘患儿 PBMC 诱生 IL-2、TNF- α 及 NO 的影响

由表 2、3 可见,IL-10 能明显抑制 PHA 刺激的哮喘患儿 PBMC 诱生 IL-2、TNF- α 及 NO,呈剂量依赖关系。在对照组也呈相同趋势。

由表 3 可见,IL-10 浓度与 IL-2、TNF- α 、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 均呈负相关关系, P 均 <0.05 或 $P<0.01$;直线相关系数在 $-0.904 \sim -0.982$ 之间,而与 IL-2、TNF- α 、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的对数值的相关系数均有提高,在 $-0.939 \sim -0.999$ 之间。

3 讨论

本结果表明,重组人 IL-10 能抑制 PHA 刺激的哮喘患儿 PBMC 体外产生 NO、IL-2 和 TNF- α ,其作用呈剂量依赖关系。故哮喘患儿 IL-10 水平降低,可导致 NO、IL-2 和 TNF- α 等炎症前炎症细胞因子合成及释放增加,导致或加重气道慢性炎症,引起气道高反应性(BHR)而诱导或加重哮喘发病。

急性发作期哮喘患儿外周血 PBMC 产生 IL-10 的水平与 IL-2 和 TNF- α 呈显著相关,表明 IL-10 能抑制 TNF- α 的合成及释放,降低由 IL-2、TNF- α 所介导的一系列生物学效应。有研究发现,IL-10 能明显抑制鼠巨噬细胞合成及释放 NO 的量^[4],如此就可减轻气道慢性炎症,降低 BHR,故 IL-10 具有潜在哮喘治疗作用,值得进一步探索。

另外,我们还发现哮喘患儿经糖皮质激素等治疗后,在缓解期血浆和 PBMC 产生 IL-10 水平有明

显升高,但仍未恢复正常水平,NO、IL-12 和 TNF- α 水平较发作期有明显降低,但 TNF- α 水平仍然高于正常对照组。因缓解期 IL-10 及 TNF- α 水平仍未恢复正常,气道慢性炎症仍然存在,故需继续抗炎治疗。糖皮质激素可促进 IL-10 的大量合成^[5],IL-10 又可抑制多种细胞合成及释放 NO、IL-2 和 TNF- α 等多种炎症或前炎症细胞因子,且糖皮质激素还可直接抑制 NO、IL-2 和 TNF- α 等的产生及活性,发挥其抗炎作用,减轻气道炎症反应。这也是糖皮质激素的抗炎机制之一。

综上所述,哮喘发作时 PBMC 无论刺激与否,其合成及释放 IL-10 的量均低于正常儿童 NO、IL-2 和 TNF- α 水平升高,导致或加重气道慢性炎症反应,引起 BHR 而诱气哮喘发病,糖皮质激素可促进 IL-10 的合成,抑制 NO、IL-2 和 TNF- α 的产生,具有明显抗炎作用,是治疗哮喘的有效药物。

参考文献

- [1] Shi Y, Shen JG, Wang JG, et al. Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis[J]. J Pediatr, 1993, 123: 435~438
- [2] 蒋东波,沈际,杨锡强,等.哮喘患儿白细胞介素 2,6 的检测及其意义[J].中华儿科杂志,1994,32:219~221
- [3] 凶玉昆,赵福生.肿瘤坏死因子的生物活性检测.实用免疫学新技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994.55~57
- [4] 戴山林,殷凯生.白介素-10 与支气管哮喘[J].国外医学呼吸系统分册,1997,17:57~61
- [5] Brinkmann V, Krislofic C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4⁺ effector T cells generated from CD45RO⁻ and CD45RO⁺ subsets[J]. J Immunol, 1995, 155: 3322~3327

(收稿日期:2006-04-07)

实验研究

《江西中医药》征订启事

《江西中医药》创刊于 1951 年,是新中国创办最早的中医药杂志,也是第一批进入中文核心期刊的中国医药类核心期刊,并被多家知名权威检索期刊及数据库确定为固定信息源。五十多年来,《江西中医药》发表了数以万计的优秀论文,一大批中医药学者就是从这里走向成功、走向成名的。21 世纪,《江西中医药》迎来的更大的发展机遇,2002 年评为华东地区优秀期刊、江西省优秀期刊,2004 年评为全国高校优秀期刊。2003 年成功改为月刊,赢得了更多读者的青睐。本着“面向临床,面向基层,坚持传统,注重实用”的办刊思路,我们进一步充实内容,调整栏目,使文章更具可读性、实用性、信息性,以满足读者的需要。

《江西中医药》(ISSN 0411-9584, CN 36-1095/R)为月刊,面向国内公开发行人。国内邮发代号为 44-5,国外代号为 BM1012。每期定价:4.80 元。