

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)07-0748-03

呼吸道合胞病毒感染细支气管炎患儿外周血树突状细胞的数量及其与临床症状的相关性

张家祥^{1*}, 翁开枝¹, 梅序桥², 张宝忠¹, 郑源海², 柯专叶¹, 吴阿阳²
(福建医科大学附属漳州市医院: ¹儿科; ²检验科, 福建 漳州 363000)

[摘要] 目的 检测呼吸道合胞病毒(RSV)感染细支气管炎患儿外周血髓样树突状细胞(mDC)及浆细胞样树突状细胞(pDC)的数量,并分析它们与疾病严重程度之间的关系。方法 采用PCR方法检测鼻咽部分泌物的呼吸道合胞病毒。通过流式细胞仪检测71例RSV感染(轻度、中度和重度)细支气管炎患儿及48例正常婴幼儿外周血mDC及pDC的数量。结果 RSV感染细支气管炎患儿外周血mDC数量明显高于正常婴幼儿($P < 0.01$),pDC数量明显低于正常婴幼儿($P < 0.01$)。重度RSV感染细支气管炎患儿入院时外周血mDC、pDC数量均明显低于轻度组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 RSV感染细支气管炎患儿早期外周血mDC明显升高、pDC降低。mDC数量越高,提示其病情越轻;pDC数量越低,提示喘息越重。

[关键词] 树突状细胞;细支气管炎;呼吸道合胞病毒

[中图分类号] R392.12, R562.2*1, R373.1*4 **[文献标志码]** A

Correlation between the numbers of peripheral blood dendritic cells and the clinical manifestations in children with respiratory syncytial virus bronchiolitis

ZHANG Jiexiang^{1*}, WENG Kaizhi¹, MEI Xuqiao², ZHANG Baozhong¹, ZHENG Yuanhai², KE Zhuanye¹, WU Ayang²

¹Department of Pediatrics, ²Department of Laboratory Medicine, Zhangzhou Municipal Hospital, Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, China

[Abstract] **Objective** To detect the quantity of peripheral blood myeloid dendritic cells (mDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in children with bronchiolitis infected by respiratory syncytial virus (RSV) and analyze the correlation with the severity of the disease. **Methods** PCR was used to detect RSV in nasopharyngeal secretions. Flow cytometry was performed on the peripheral blood to detect the quantity of mDCs and pDCs in 71 children with bronchiolitis by RSV infection (including mild, moderate and severe infection) and 48 healthy control infants. **Results** The quantity of peripheral blood mDCs in the children with bronchiolitis by RSV infection was significantly higher than that of healthy controls ($P < 0.01$), while the number of pDCs was significantly lower than that of healthy controls ($P < 0.01$). The children with severe bronchiolitis by RSV infection had significantly lower quantity of peripheral blood mDCs and pDCs as compared with the mild group ($P < 0.05$). **Conclusion** The number of mDCs in peripheral blood of the children with RSV bronchiolitis significantly increased at the early stage, and in contrast pDCs were reduced. The increased number of mDCs indicates that the clinical manifestations are slighter, and the decreased number of pDCs suggests more wheezing of the children.

[Key words] dendritic cells; bronchiolitis; respiratory syncytial virus

细支气管炎是一种婴儿常见的下呼吸道病毒感染性疾病,最常见的病原体为呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)^[1],而RSV感染细支气管炎比其他病毒感染的细支气管炎病情似乎更严重^[2]。RSV

感染细支气管炎患儿在儿童期易患哮喘,其中重症RSV感染细支气管炎发生哮喘高达50%^[3]。

呼吸道黏膜为上皮细胞及树突状细胞(dendritic cell, DC)提供了一个与不同功能淋巴细胞之间相互

收稿日期: 2013-01-12; 接受日期: 2013-04-17

基金项目: 2011年福建省医学创新课题(2011-CXB-26)

作者简介: 张家祥(1964-),男,福建漳州人,主任医师

Tel: 13906942285; E-mail: Zhangzhou363000@163.com

*Corresponding author, 张家祥, E-mail: Zhangzhou363000@163.com

作用的关键微生物界面^[4]。DC是体内功能最强大的专职抗原递呈细胞,能刺激初始CD4⁺T细胞向Th2细胞分化,导致Th2/Th1比例失调而引起变应性哮喘,在哮喘发病过程中起着至关重要的作用^[5]。以往研究表明RSV毛细支气管炎患儿体内存在Th1/Th2失衡^[6],表现为Th2应答增强,与哮喘相似,故DC被公认为研究呼吸道病毒感染发病机制领域的重要对象,但目前关于DC与RSV感染细支气管炎之间相互作用的研究主要集中在体外细胞系和动物模型或者人类呼吸道黏膜^[7],对RSV感染细支气管炎外周血DC的研究甚少。因此,本研究通过检测RSV感染细支气管炎患儿外周血髓样树突状细胞(myeloid DC, mDC)及浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid DC, pDC)的表达水平,分析它们与疾病严重程度之间的关系,为早期治疗和预防RSV感染细支气管炎发展成哮喘提供实验依据。

1 对象和方法

1.1 对象 实验组纳入标准:初次发病,入院前未经糖皮质激素或免疫抑制剂治疗,确诊为细支气管炎,诊断标准参考文献^[8],鼻咽分泌物RSV阳性。实验组剔除标准:再次发作者,有先天性疾病、免疫缺陷病、其他慢性病史。选取2011-11/2012-06期间就诊于福建医科大学附属漳州市医院儿科的71例RSV感染细支气管炎患者,中位年龄5.87月(3~15个月),男57例,女14例。对照组纳入标准:近3周无呼吸道感染病史,无应用糖皮质激素治疗者,非RSV感染,同年龄健康儿童。选取2011-11/2012-06期间就诊于福建省漳州市芗城区妇幼保健院的48例健康体检儿童,中位年龄6.67月(3~13个月),男28例,女20例。根据喂养、呼吸困难程度、缺氧、意识改变、呼吸暂停等情况^[9]将RSV感染细支气管炎分为轻度、中度、重度3组。

1.2 方法

1.2.1 RSV检测 实验组及对照组儿童均采集鼻咽分泌物,通过PCR方法测定RSV,从而确定是否为RSV感染。采用PCR-荧光探针法进行RSV核酸的检测,试剂盒由中山达安公司提供。按照试剂盒说明书严格操作,所用仪器为ABI 7500荧光定量PCR仪。结果判断标准:如果检测样品的扩增曲线无对数增长期或Ct值>37,可判样品为呼吸道合胞病毒阴性;如果检测样品Ct值≤37,且曲线有明显的对数增长期,可判样品为呼吸道合胞病毒阳性。

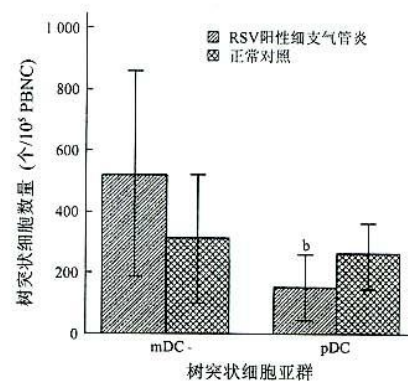
1.2.2 DC免疫表型检测 采静脉血2 mL,肝素钠抗凝,采用全血直接免疫荧光标记法。mDC免疫表型为:lin^{neg}CD11^{high}CD123^{low}, pDC免疫表型为:lin^{neg}CD11^{neg}CD123^{high}。采静脉血2 mL,肝素钠抗凝,置室温4 h内进行流式细胞术检测,采用全血直接染色法检测外周血有核细胞(peripheral blood nucleated cells, PBNC)。实验组及对照组病例,每例4管(A、B、C、D),每管加全血200 μL, A管加入Lineage

(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)-FITC、HLA-DR-PerCP、小鼠IgG2a-PE; B管加入Lineage(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)-FITC、HLA-DR-PerCP、CD11c-PE; C管加入Lineage(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)-FITC、HLA-DR-PerCP、小鼠IgG1-PE; D管加入Lineage(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)-FITC、HLA-DR-PerCP、CD123-PE单克隆抗体各20 μL,充分混匀,混匀于4℃暗处温育45 min;加2 mL溶血素,置室温暗处温育10 min,1 000 r/min离心10 min,弃上清后,加PBS洗涤2遍,再离心弃上清,加入鞘液0.2 mL,用Beckman型流式细胞仪,采用Cellquest软件采集分析数据,每次至少分析1×10⁵个细胞。

1.2.3 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过独立样本t检验,同时所有数据均经过方差齐性分析,由SPSS18.0 for Windows系统软件完成。

2 结果

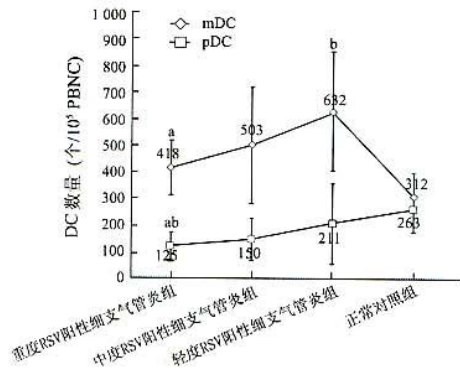
2.1 RSV感染细支气管炎、正常对照组外周血树突状细胞亚群的数量 RSV感染细支气管炎外周血10⁵个PBNC中含mDC数量(个)明显高于正常对照组(557±334 vs 312±209),差异有统计学意义(P<0.01,图1);10⁵个PBNC中含pDC数量明显低于正常对照组(178±151 vs 263±115),差异有统计学意义(P<0.01,图1)。



^bP<0.01 vs 正常对照组。

图1 RSV阳性细支气管炎患儿与正常对照组外周血DC数量

2.2 RSV感染的细支气管炎患者外周血DC亚群数量与病情的相关性 重度RSV感染细支气管炎患儿入院时外周血mDC、pDC数量均明显低于轻度组,差异有统计学意义(P<0.05,图2);重度组外周血pDC数量明显低于正常对照组,轻度组mDC数量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(P<0.01);且病情越重mDC、pDC有越低的趋势(图2)。而重度组mDC和轻度组pDC数量与正常对照组差异无统计学意义(P>0.05)。



* $P < 0.05$ vs 轻度RSV阳性细支气管炎组; $bP < 0.01$ vs 正常对照组。

图2 不同病情RSV阳性细支气管炎及正常对照组外周血DC的数量

3 讨论

DC是体内功能最强大的专职抗原提呈细胞^[10], 诱导和控制免疫反应。外周血DC被分成2个亚群: mDC免疫表型为: $lin^{neg}CD11^{high}CD123^{low}$, pDC免疫表型为 $lin^{neg}CD11^{neg}CD123^{high}$ 。呼吸道黏膜中的pDC通过1型干扰素和调节性T细胞在细支气管炎中发挥抗病毒作用, 而mDC可能在呼吸道合胞病毒对宿主免疫反应的逃避方面起作用^[7]。所以, DC在固有免疫与适应性免疫中起着重要的桥梁作用, 且在细支气管炎免疫机制起着关键性的作用^[11]。本研究发现RSV感染细支气管炎患儿早期外周血mDC数量明显升高, pDC数量降低, 结果与Hagendorens等^[12]和Silver等^[13]研究的过敏体质或哮喘患儿外周血DC数量改变一致, 提示DC在细支气管炎患儿中的变化与其在哮喘或过敏体质患儿中的改变相似, 但是, 究竟是RSV感染直接诱导或导致哮喘, 还是RSV感染的细支气管炎仅仅是哮喘特异性体质的一个早期表现, 目前尚无定论。本研究发现RSV感染细支气管炎中入院时mDC数量比正常婴幼儿明显增高, 表明RSV感染早期即启动mDC免疫反应。重度RSV感染细支气管炎患儿mDC数量明显低于轻度组, 早期mDC表达越高, 患儿临床症状、体征越轻, 故认为mDC可以作为早期预测细支气管炎病情严重程度的一个指标。

de Heer等^[14]研究表明pDC缺陷的老鼠气道内吸入OVA后容易诱导哮喘模型, 如果运用OVA致敏之前在气道内适当的移入pDCs则不易诱导哮喘模型, 说明pDCs是在哮喘发作中起到保护作用。同样, Liu等^[15]研究发现pDCs在病毒或某种TLR激动剂刺激下产生大量的IFN- α , 从而产生抑制过敏的气道炎症, Silver等^[13]也研究表明RSV感染细支气管炎日后诊断为哮喘的患儿其外周血循环中的pDC较非哮喘儿童低, 进一步揭示pDCs可减少气道高反

应。本实验研究发现RSV感染细支气管炎患儿入院时外周血pDC数量低于正常婴幼儿, 重度RSV感染细支气管炎患儿其pDC明显低于轻度组, 且pDC越低喘息症状越重, 表明RSV感染的细支气管炎患儿外周血pDC缺陷, 易发生喘息。Bacharier等^[3]研究表明有过严重RSV感染细支气管炎经历的患儿中大约50%以后被诊断为哮喘, 因此, RSV感染早期细支气管炎患儿外周血DC改变, 可能是其日后容易发展成哮喘的早期免疫表达。

总之, RSV感染细支气管炎患儿早期外周血mDC表达活跃, pDC表达低下, 与哮喘患儿外周血表达相似, 且mDC早期表达越高, 其病情越轻; pDC数量越少的患儿临床喘息越明显。

参考文献:

- [1] Nair H, Nokes D, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet*, 2010, 375(9725): 1545-1555.
- [2] Hervás D, Reina J, Yañez A, et al. Epidemiology of hospitalization for acute bronchiolitis in children: differences between RSV and non-RSV bronchiolitis[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(8): 1975-1981.
- [3] Bacharier LB, Cohen R, Schweiger T, et al. Determinants of asthma after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(1): 91-100.
- [4] Hansel TT, Johnston SL, Openshaw PJ. Microbes and mucosal immune responses in asthma[J]. *Lancet*, 2013 Feb 18. pii: S0140-6736(12)62202-8. 10.1016/S0140-6736(12)62202-8. [Epub ahead of print]
- [5] Gill MA. The role of dendritic cells in asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(4): 889-901.
- [6] Cautivo KM, Bueno SM, Cortes CM, et al. Efficient lung recruitment of respiratory syncytial virus-specific Th1 cells induced by recombinant bacillus Calmette-Guérin promotes virus clearance and protects from infection[J]. *J Immunol*, 2010, 185(12): 7633-7645.
- [7] Maggina P, Christodoulou I, Papaevangelou V, et al. Dendritic cells in viral bronchiolitis[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2009, 5(3): 271-282.
- [8] 申昆玲. 毛细支气管炎, 儿科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 281-284.
- [9] Fitzgerald DA, Kilham HA. Bronchiolitis: assessment and evidence-based management[J]. *Med J Aust*, 2004, 180(8): 399-404.
- [10] Reizis B. Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(6): 1053-1056.
- [11] Schwarze J. Lung dendritic cells in respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2008, 27(10 Suppl): S89-S91.
- [12] Hagendorens MM, Ebo DG, Schuerwegh AJ, et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children[J]. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33(5): 633-639.
- [13] Silver E, Yin-DeClue H, Schechtman KB, et al. Lower levels of plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood are associated with a diagnosis of asthma 6 yr after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009, 20(5): 471-476.
- [14] de Heer HJ, Hammad H, Soullié T, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(1): 89-98.
- [15] Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 275-306.