

Th17/IL-17 与呼吸道合胞病毒毛细支气管炎气道炎症相关性探讨

赵茜叶, 周旭华, 于艳艳, 丁铁梅, 孙乾, 侍苏杰, 王宜芬, 肖广艳, 徐海燕, 夏丽娟, 孙大权, 钱前, 严晓芳

连云港市妇幼保健院儿科, 江苏 连云港 222006

摘要: **目的** 通过检测呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)毛细支气管炎(毛支)患儿外周血中 Th17 细胞及细胞因子 IL-17 的水平变化,探讨其与 RSV 毛支气道炎症的相关性。**方法** 选择 40 例初次喘息发作的 RSV 毛支患儿作为研究对象,急性期及恢复期各抽取外周静脉血 2 mL,流式细胞术检测 Th-17 细胞比例,ELISA 法检测 IL-17 水平。**结果** RSV 毛支急性期 Th17 及 IL-17 水平均明显升高($P < 0.01$);与恢复期相比,差异有统计学意义;重度毛支与轻度毛支相比,急性期 Th17 细胞比例及 IL-17 水平明显升高($P < 0.01$),而恢复期差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Th17 及 IL-17 可能参与 RSV 毛支急性期气道炎症反应过程,并与疾病的严重程度相关。

关键词: Th17 细胞; IL-17; 呼吸道合胞病毒; 毛细支气管炎; 气道炎症

中图分类号: R725.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-6579(2014)04-0414-03 **doi:** 10.11852/zgetbjzz2014-22-04-24

Correlation between Th17 cell, Interleukine-17 and airway inflammation after respiratory syncytial virus bronchiolitis. ZHAO Qian-ye, ZHOU Xu-hua, YU Yan-yan, DING Tie-mei, SUN Qian, SHI Su-jie, WANG Yi-fen, XIAO Guang-yan, XU Hai-yan, XIA Li-juan, SUN Da-quan, QIAN Qian, YAN Xiao-fang. (Department of Pediatrics, the Women and Children Hospital of Lianyungang, Lianyungang, Jiangsu 222006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between Th17 cell(Th17), Interleukine-17(IL-17) and airway inflammation through examining the concentration changes of Th17 and IL-17 in serum of children who were suffering from respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. **Methods** Forty infants with the primary RSV bronchiolitis were recruited in this study. Two milliliter blood samples were collected in the acute phase and the recovery phase, respectively. The ratio of Th17 cell was analyzed by flow cytometry, and the concentration of IL-17 was analyzed by and ELISA. **Results** The ratio of Th17 cell and the concentration of IL-17 in the acute phase of RSV bronchiolitis were both significantly higher than those in the recovery phase($P < 0.01$). Moreover, compared to children with mild RSV bronchiolitis, these two indexes in children with severe RSV bronchiolitis were both increased significantly in the acute phase ($P < 0.01$), but no significant changes were detected in the recovery phase($P > 0.05$). **Conclusions** Th17 cells and IL-17 might be involved in the airway inflammation in the acute phase of RSV bronchiolitis, and be associated with the severity of the disease.

Key words: Th17 cell; Interleukine-17; respiratory syncytial virus; bronchiolitis; airway inflammation

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是婴幼儿感染性细支气管炎最常见的病原体。RSV 毛支后气道炎症与 CD4⁺T 淋巴细胞的活化及其所分泌的细胞因子有关^[1]。目前已发现毛支存在 Th1/Th2 调节失衡,调节性 T 细胞负性调节降低等因素, Th17 作为新型 CD4⁺T 淋巴细胞中的一员,是否参与毛支的气道炎症反应过程尚不得而知。本实验通过检测毛支患儿外周血中 Th17 及 IL-17 的水平变化,以了解 Th17/IL-17A 与 RSV 毛支后气道炎症的相关性。

1 资料和方法

1.1 一般资料 2012 年 03 月—2012 年 12 月连云港市妇幼保健院住院患儿中,符合毛细支气管炎诊断标准的 40 例^[2],所有患儿均符合以下标准:1) 年龄 ≤ 2 岁;2) 此次系喘息第一次发作;3) 入院前 1 月未使用过全身糖皮质激素类药物;4) 一周内未使

用抗组胺类药物;5) 排除先天性心脏病、结核病、气管异物、气道狭窄及软化等表现为喘息的疾病。按 Lowell 评分法^[3]对疾病严重程度进行评分, ≥ 10 分重度, < 10 分轻度。其中重度毛支 10 例,轻度 30 例;男 28 例,女 12 例,男女比例约为 7:3;年龄 1 月~1 岁 7 月,平均年龄(8.20 ± 3.23)月;病程 < 7 d 22 例,病程 7~14 d 18 例;疗程 7~10 d 约 38 例,11~21 d 2 例。胸片示两肺纹理增多,紊乱伴肺气肿表现 30 例,符合支气管肺炎改变 5 例,间质性肺部炎症改变 5 例。两组患儿在年龄、性别方面相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 所有患儿均于急性期(入院后当天)及恢复期(症状控制后即恢复期,约住院 10 d 左右)抽取外周空腹静脉血 2 mL,肝素钠抗凝,静脉血 3 000 转/min,离心 10 min。将分离血清分装在洁

净 0.5 mL Eppendorf 管中, -70℃ 保存备检。用 Ficoll 分离液提取单个核细胞, 用 PBS 调节细胞数至 1×10^6 /mL 后待检 Th17 细胞数。

1.2.2 标本检测 直接免疫荧光法检测气道分泌物 RSV、ADV、FluA、FluB 等 7 种主要呼吸道病毒; 应用 ELISA 试剂盒检测血清 IL-17 浓度; 流式细胞术分析 Th17 细胞数。

1.2.3 Th17 细胞检测步骤 取全血标本 50 μ L, 用 RPMI1640 1 : 1 等体积稀释至 100 μ L。加入 1 μ L BD Golgiplug (BD 公司), 混匀。37℃, 5% CO₂ 培养箱培养 3~6 h。混匀, 在刺激管中加入 10 μ L CD8 PerCP-Cy 5.5 和 2.5 μ L CD3 APC(BD 公司), 室温避光孵育 15 min。管中加入 100 μ L Fix&Perm 中的 Reagent A, 室温避光孵育 15 min。每管中加入 3 mL PBS, 1 200 rpm 离心 5 min, 弃除上清, 加入 100 μ L Fix & Perm (ADG 公司) 中的 Reagent B, 破膜后加入 IL-17A-PE 10 μ L 或同型对照抗体(BD 公司) 进行细胞免疫荧光标记。室温避光孵育 15 min。每管中加入 3 mL PBS, 1 200 rpm 离心 5 min, 弃除上清。0.5 mL PBS 重悬细胞, 使用 BD FACSCalibur 流式细胞仪进行检测。用 Cell Quest Pro Software 应用软件手分析 10 000 个细胞进行数据分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用独立 *t* 检验。

2 结果

2.1 RSV 毛支患儿急性期及恢复期外周血中 Th17 及 IL-17 水平 具体比较内容见表 1, 图 1。

表 1 急性期及恢复期 RSV 毛支 Th17 细胞及 IL-17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the ratio of Th17 cell and the concentration of IL-17 between the acute and the recovery phase of RSV bronchiolitis ($\bar{x} \pm s$)

| 分期 | Th17 细胞 (%) | IL-17(pg/mL) |
|------------|---------------|-----------------|
| 急性期 | 0.061 ± 0.032 | 66.409 ± 49.072 |
| 恢复期 | 0.020 ± 0.038 | 10.132 ± 3.880 |
| <i>t</i> 值 | 2.575 | 4.790 |
| <i>P</i> 值 | <0.01 | <0.01 |

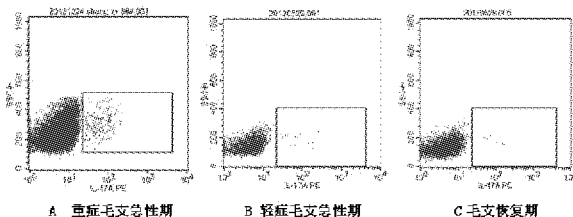


图 1 各期 Th17 细胞百分率流式代表图

Fig. 1 Flow represent graphic of Th17 cell percentage in different phase

2.2 Th17 及 IL-17 水平与 RSV 毛支严重度的关系 轻、重度 RSV 毛支外周血 Th17 细胞比率及 IL-17 表达水平的均值比较, 见表 2。

表 2 不同时期轻、重度 RSV 毛支外周血 Th17 细胞比率及 IL-17 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the ratio of Th17 cell and the concentration of IL-17 between mild and severe of RSV bronchiolitis in different phases ($\bar{x} \pm s$)

| 分度 | Th17 细胞 (%) | | IL-17(pg/mL) | |
|------------|---------------|---------------|-----------------|----------------|
| | 急性期 | 恢复期 | 急性期 | 恢复期 |
| 轻度 | 0.069 ± 0.065 | 0.019 ± 0.011 | 37.041 ± 48.066 | 8.342 ± 3.012 |
| 重度 | 0.156 ± 0.065 | 0.020 ± 0.011 | 99.131 ± 32.740 | 10.224 ± 5.680 |
| <i>t</i> 值 | 2.575 | 0.297 | 3.788 | 1.075 |
| <i>P</i> 值 | <0.01 | >0.05 | <0.01 | >0.05 |

3 讨论

3.1 Th17 的生物学效应 Th17 细胞是 2005 年发现的一类新的 CD4⁺ T 细胞亚群^[4], 主要通过分泌 IL-17 起作用。目前已知 IL-17 主要由激活的 CD4⁺、CD45RO 记忆 T 细胞所产生, 其中以 CD4⁺ T 淋巴细胞分泌 IL-17 为主。其中 IL-17A 具有强大的致炎性。它与中性粒细胞的增殖、成熟及趋化关系密切^[5]。同时还可以导致趋化性细胞因子 IL-8、MCP-1 及 GRO- α 等增高, 从而促进中性粒细胞及单核细胞募集。

3.2 中性粒细胞与 RSV 毛支气道炎症 T Hashimoto 等^[6]认为中性粒细胞介导的炎症反应在 RSV 感染的发病机制中发挥着重要作用; K Yasuik 等^[7]研究发现, RSV 毛支的肺泡灌洗液中, 中性粒细胞占 50%~76%, 说明其为占主导地位的炎性细胞。过表达 IL-17 能增加哮喘小鼠气道高反应性、粘液分泌及中性粒细胞气道浸润^[8]。在 IL-17 基因敲除的小鼠中, RSV 感染后气管内粘液的分泌明显减少^[9]。以上说明 Th17 /IL-17 可能与 RSV 毛支气道炎症有关。

3.3 Th17/IL-17 与 RSV 毛支的关系 本研究发现, RSV 毛支急性期 Th17 细胞及 IL-17 水平明显升高, 与恢复期相比, 差异有显著性; 10 例重度毛支患儿急性期 Th17/IL-17 水平较轻度毛支明显升高; 而在恢复期, 重度及轻度 Th17/IL-17 水平之间无显著差异。基于以上实验结果, 因此有理由推测, Th17 细胞参与 RSV 毛支急性期细胞免疫过程, 并通过分泌 IL-17A 促进中性粒细胞管壁及管腔浸润, 从而导致 RSV 毛支气道炎症损伤及气道高反应性; 同时 RSV 毛支病情越重, 由初始活化的 CD4⁺ T 细胞分化成 Th17 细胞越多, 分泌 IL-17 水平越高, 管壁炎性水肿及呼吸道粘液异常分泌所引起的小气道阻塞性通气功能障碍越严重。因此, Th17/IL-17A

水平与 RSV 毛支疾病的严重程度有关。

参考文献

- [1] Zhu YF, Zhu JY, Li WW, *et al.* Relationship of levels of CD4 (+)CD25 (+) regulatory T cells and expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood with serum immunoglobulin E level in children with bronchiolitis[J]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2009, 11(5): 349-353.
- [2] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002; 1200-1202.
- [3] Lowell DI, Lister G, Von Koss H, *et al.* Wheezing in infants: the response to epinephrine[J]. *Pediatrics*, 1987, 79(6): 939-945.
- [4] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type and lineages[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [5] Li HJ, Zhang CQ, Yu CX, *et al.* Roles of Th17 lymphocytes and inflammatory cytokines in airway inflammation exacerbation of murine asthmatic model[J]. *Fen Zi Mian Yi Xue*

Za Zhi, 2012, 28(11): 1126-1128.

- [6] Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, *et al.* Th17 lymphocytes in respiratory syncytial virus infection[J]. *Virus*, 2013, 5(3): 777-791.
- [7] Yasui K, Baba A, Iwasaki Y, *et al.* Neutrophil-mediated inflammation in respiratory syncytial viral bronchiolitis[J]. *Pediatrics Int*, 2005, 47(2): 190-195.
- [8] Kawaguchi M, Kokubu F, Fujita J, *et al.* Role of interleukin-17F in asthma[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(5): 383-389.
- [9] Mukherjee S, Lindell DM, Berlin AA, *et al.* IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(1): 248-258.

【基金项目】连云港市卫生局(ZC325)

【作者简介】赵茜叶(1973-), 女, 陕西人, 副主任医师, 硕士学位, 研究方向为呼吸系统疾病。

收稿日期: 2013-08-22

本刊网址: www.cjchc.net

· 临床研究与分析 ·

1998—2012 年早产儿呼吸窘迫综合征的临床治疗

韩彤妍, 童笑梅, 朴梅花, 李在玲, 崔蕴璞, 汤亚南, 常艳美

北京大学第三医院儿科, 北京 100191

摘要: 目的 回顾性分析新生儿病房 1998—2012 年来诊断为新生儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)的早产儿病例, 总结在治疗措施方面的进展。方法 回顾性病例对照研究, 1998 年 1 月—2012 年 12 月本院新生儿重症监护病房(NICU)收治的 <34 周新生儿呼吸窘迫综合征早产儿病例, 记录母孕期情况和围产期情况, 出生史和采用呼吸支持方式(有创或无创呼吸支持), 是否应用肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS), 用药剂量以及患儿的合并症和结局。结果 自 1998 年 1 月—2004 年 12 月为 A 组, 63 例; 2005 年 1 月—2012 年 12 月病例为 B 组, 151 例。B 组患儿出生体重[(1 284.50±252.15)g]明显低于 A 组[(1 424.27±329.44)g]($t=3.292, P<0.001$), 分娩前应用激素促进肺成熟的病例数明显增加(B 组 139 例, 92.1%; A 组 44 例, 69.8%; $\chi^2=17.704, P<0.001$); B 组应用 PS 总量为(195.00±59.87)mg, A 组中应用 PS 总量为(169.66±57.97)mg, 两组间差异有统计学意义($P=0.041$); 计算 PS 与体重比值, B 组为(147.71±42.09)mg/kg, A 组为(115.86±37.11)mg/kg, 差异显著($P<0.01$)。B 组 85(70.8%)应用有创呼吸支持, 较 A 组 39 例(90.7%), 显著降低($\chi^2=6.86, P<0.01$)。B 组 33 例(27.5%)诊断支气管肺发育不良(BPD), 较 A 组 4 例(9.3%)显著增高($\chi^2=5.97, P=0.02$)。住院天数、NICU 住院天数、氧疗天数都是 B 组显著长于 A 组。A 组 12 例死亡, 病死率 27.9%, 而 B 组 14 例死亡, 病死率 11.7%, 两组比较差异有统计学意义($\chi^2=6.23, P=0.01$)。结论 在过去十余年来, 随着分娩前应用激素促肺成熟及外源性表面活性物质的引入, 采用适宜的呼吸支持方式, 使越来越多的 RDS 早产儿得以存活。

关键词: 新生儿呼吸窘迫综合征; 肺表面活性物质; 早产儿

中图分类号: R722.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-6579(2014)04-0416-04 doi:10.11852/zgetbjzz2014-22-04-25

Retrospective study of preterm infants with respiratory distress syndrome during 1998—2012. HAN Tong-yan, TONG Xiao-mei, PIAO Mei-hua, LI Zai-ling, CUI Yun-pu, TANG Ya-nan, CHANG Yan-mei. (Department of Pediatrics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

Corresponding author: TONG Xiao-mei, E-mail: tongxm2007@126.com

Abstract: Objective To study changes of treatment in preterm infants with respiratory distress syndrome (RDS)