

论著·临床研究

脱敏疗法对支气管哮喘患儿外周血Ⅱ型固有淋巴细胞的影响及临床意义

张亚萍, 骆长亮

(苏州大学附属儿童医院检验科, 江苏苏州 215003)

摘要:目的 探讨脱敏疗法对支气管哮喘患儿外周血Ⅱ型固有淋巴细胞(ILC2s)的影响和临床意义。方法 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月该院收治的 30 例支气管哮喘患儿, 随机分为单纯药物治疗组($n=15$)和药物联合脱敏治疗组($n=15$), 同时选取 15 例健康体检儿童作为对照组, 分别用流式细胞术和酶联免疫吸附试验检测治疗前后外周血 ILC2s、IL-13、IL-15、IL-33 表达水平。结果 单纯药物治疗组、药物联合脱敏治疗组外周血 ILC2s 水平明显高于对照组($P<0.05$); 单纯药物治疗组治疗 1 年后外周血 ILC2s 水平仍高于对照组($P<0.05$); 药物联合脱敏治疗组治疗 2 个月后外周血 ILC2s 水平较治疗前降低($P<0.05$), 治疗 1 年后与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。单纯药物治疗组、药物联合脱敏治疗组外周血 IL-5、IL-13、IL-33 水平明显高于对照组($P<0.05$); 单纯药物治疗组治疗 1 年后外周血 IL-5、IL-13、IL-33 水平仍高于对照组($P<0.05$); 药物联合脱敏治疗组治疗 2 个月后外周血 IL-5、IL-13、IL-33 水平较治疗前降低($P<0.05$), 治疗 1 年后与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 脱敏疗法能通过改变支气管哮喘患儿过度活跃的固有免疫应答, 使外周血中高表达的 ILC2s 及细胞因子 IL-5、IL-13 水平恢复至正常, 降低哮喘的气道反应性和炎症反应, 达到缓解和治疗哮喘的目的。

关键词: 过敏性哮喘; 脱敏; Ⅱ型固有淋巴细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.06.019

中图法分类号:R562.2

文章编号:1673-4130(2018)06-0699-04

文献标识码:A

Influence and clinical significance of desensitization therapy on peripheral blood type Ⅱ innate lymphocytes in children patients with bronchial asthma

ZHANG Yaping, LUO Changliang

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Children's Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence and clinical significance of desensitization therapy on peripheral blood type Ⅱ innate lymphocytes(ILC2s) in children patients with bronchial asthma. **Methods** 30 children patients with bronchial asthma in this hospital from January 2014 to December 2015 were selected and randomly divided into the simple medication treatment group($n=15$) and medication combined desensitization treatment group($n=15$), meanwhile 15 healthy children undergoing physical examination were selected as the control group. The flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay were used to detect peripheral blood ILC2 and IL-13, IL-15, IL-33 expression levels before and after treatment. **Results** The peripheral blood ILC2s level in the simple medication treatment group and medication combined desensitization treatment group was significantly higher than that in the control group($P<0.05$); the peripheral blood ILC2s level after 1-year treatment in the simple medication treatment was still higher than that in the control group($P<0.05$); the peripheral blood ILC2s level after 2-month treatment in the medication combined desensitization treatment group was decreased compared with before treatment($P<0.05$), which had no statistical difference compared with the control group($P>0.05$). The peripheral blood IL-5, IL-13 and IL-33 levels in the simple medication treatment group and medication combined desensitization treatment group were significantly higher than those in the control group($P<0.05$). The peripheral blood IL-5, IL-13 and IL-33 levels after 1-year treatment in the simple medication treatment group were still higher than those in the control group($P<0.05$); the peripheral

作者简介:张亚萍,女,技师,主要从事临床检验研究。

本文引用格式:张亚萍,骆长亮.脱敏疗法对支气管哮喘患儿外周血Ⅱ型固有淋巴细胞的影响及临床意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(6): 699-702.

blood IL-5, IL-13 and IL-33 levels after 2-month treatment in the medication combined desensitization treatment group were significantly decreased compared with before treatment ($P < 0.05$), and which after 1-year treatment had no difference compared with the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The desensitization therapy can reach the effect for alleviating and treating asthma by changing overactivity innate immune response in children patients with bronchial asthma, making the highly expressed ILC2s, IL-5 and IL-13 levels to recover to normal levels, and reducing the airway reactivity and inflammatory response.

Key words: allergic asthma; desensitization; type 2 innate immune cells

支气管哮喘是儿童,特别是婴幼儿常见的一种非特异性慢性气道炎症性疾病^[1]。中国人群中哮喘发病率约为 1%,儿童可达 3%,随着环境污染的严重,这一比率仍在逐渐升高。免疫功能紊乱被认为是哮喘发病的关键因素。以往的研究指出 Th1/Th2 比例失衡、抗原特异性 Th2 细胞过度分化介导的适应性免疫应答与支气管哮喘密切相关^[2]。近年来,人们发现了一种 II 型固有淋巴细胞(ILC2s),其在哮喘患者外周血中表达升高,可分泌细胞因子白细胞介素(IL)-13 和 IL-5, ILC2s 被认为参与了哮喘的发生发展^[3]。脱敏疗法是通过向机体少量多次注射变应原,诱导致敏细胞释放极少量活性介质,不会引起明显的临床症状,逐渐使致敏细胞内活性介质耗竭,消除致敏状态。该疗法在由吸入性过敏原引起的变态反应性疾病治疗中有较好的临床效果^[4],但其治疗机制尚不完全清楚。本研究通过分析支气管哮喘患儿脱敏治疗前后外周血 ILC2s、IL-13、IL-15、IL-33 水平变化,探讨脱敏疗法对支气管哮喘患儿固有免疫应答的调控作用及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月本院风湿免疫科收治的 30 例支气管哮喘患儿,随机分为单纯药物治疗组($n=15$)和药物联合脱敏治疗组($n=15$),其中男 18 例,女 12 例,平均年龄(8.35 ± 4.22)岁。同时,选择 15 例健康体检儿童作为对照组,其中男 9 例,女 6 例,平均年龄(7.66 ± 5.05)岁。所有患儿均符合儿童支气管哮喘诊断与防治指南的诊断标准^[5],并在入组前获得监护人知情同意。各组性别、年龄、病情等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 FACS Calibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司, DNM-9606 酶标分析仪购自北京普朗医用设备有限公司, T1/ST2-FITC、IL-17BR-PE 单克隆荧光抗体购自美国 BD 公司, IL-5、IL-13、IL-33 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 方法 晨起空腹抽取静脉血 2 mL 于乙二胺四乙酸抗凝管,充分颠倒混匀待用。(1)单个核细胞分

离:调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液、佛波酯和离子霉素,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h。(2)ILC2s 细胞检测:取流式细胞管,依次加入单克隆荧光抗体,再加入 $50\ \mu\text{L}$ 单个核细胞悬液, 4°C 避光孵育 15 min, PBS 洗涤 3 次,用 $300\ \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞,采用流式细胞仪检测,结果用 Cell Quest 软件分析。(3)细胞因子检测:按 ELISA 检测试剂盒相关说明进行操作,以标准蛋白浓度及对应吸光值绘制标准曲线,并通过回归方程计算标本蛋白浓度。(4)治疗疗效比较:总有效率=(临床控制例数+显效例数+好转例数)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 STATA11.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student's t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支气管哮喘患儿治疗前后外周血 ILC2s 水平比较 单纯药物治疗组治疗前和治疗 2 个月、1 年后外周血 ILC2s 水平分别为(1.07 ± 0.15)%和(0.99 ± 0.12)%、(0.65 ± 0.11)%。药物联合脱敏治疗组治疗前和治疗 2 个月、1 年后外周血 ILC2s 水平分别为(1.13 ± 0.10)%和(0.81 ± 0.15)%、(0.39 ± 0.07)%。单纯药物治疗组、药物联合脱敏治疗组治疗前外周血 ILC2s 水平明显高于对照组的(0.37 ± 0.11)%,差异有统计学意义($t=6.832, P=0.011$)。单纯药物治疗组治疗 1 年后外周血 ILC2s 水平低于治疗前,但仍高于对照组,差异均有统计学意义(t 值分别为 3.857、4.258, P 值分别为 0.031、0.024)。药物联合脱敏治疗组治疗 2 个月后外周血 ILC2s 水平低于治疗前,差异有统计学意义($t=2.695, P=0.038$);药物联合脱敏治疗组治疗 1 年后外周血 ILC2s 水平恢复至正常,与对照组比较差异无统计学意义($t=1.259, P=0.123$)。

2.2 支气管哮喘患儿治疗前后外周血 IL-5、IL-13、IL-33 水平比较 单纯药物治疗组、药物联合脱敏治疗组外周血 IL-5、IL-13、IL-33 水平明显高于对照组,差异有统计学意义(t 值分别为 6.427、6.033、7.425, $P < 0.05$)。单纯药物治疗组治疗 1 年后 IL-5、IL-13、IL-33 水平仍高于对照组,差异有统计学意义(t 值分

别为 2.979、2.652、2.783, $P<0.05$)。药物联合脱敏治疗组治疗 2 个月后 IL-5、IL-13、IL-33 水平明显低于治疗前, 差异有统计学意义(t 值分别为 3.486、

5.755、3.276, $P<0.05$); 药物联合脱敏治疗组治疗 1 年后 IL-5、IL-13、IL-33 水平恢复至正常, 与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 支气管哮喘患儿外周血 IL-5、IL-13、IL-33 水平 ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	治疗时间	IL-5	IL-13	IL-33
单纯药物治疗组	治疗前	78.62±13.35*	128.62±17.56*	95.45±10.38*
	治疗 2 月后	74.97±11.48*	122.19±14.38*	89.48±9.67*
	治疗 1 年后	55.38±9.83*△	95.39±12.45*△	66.48±8.56*△
药物联合脱敏治疗组	治疗前	80.28±14.73*	126.67±16.38*	94.29±10.63*
	治疗 2 月后	62.56±10.46*△	95.56±14.32*△	73.48±10.47*△
	治疗 1 年后	45.12±8.54△	84.87±12.65△	58.78±12.36△
对照组		42.79±10.28	82.36±12.49	57.74±10.62

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与同组治疗前相比,△ $P<0.05$

2.3 两种方案治疗疗效比较 单纯药物治疗组临床控制 5 例, 显效 5 例, 好转 3 例, 无效 2 例, 总有效率为 86.7%。药物联合脱敏治疗组临床控制 6 例, 显效 7 例, 好转 1 例, 无效 1 例, 总有效率为 93.3%。两组治疗总有效率比较, 差异有统计学意义($\chi^2=5.132$, $P<0.05$)。

3 讨 论

支气管哮喘是儿童最常见的过敏性疾病之一, 目前尚无有效根治方法, 临床治疗以抗炎、解痉等对症为主, 但存在停药后易复发, 长期用药还可能对患者尤其是儿童生长发育产生一定的影响^[6]。脱敏疗法是将过敏原制成一定浓度浸出液, 以逐渐递增浓度的方式少量多次给患者输入, 促使体内产生相应抗体, 达到免疫耐受的治疗目的^[7]。研究发现, 脱敏疗法可能改变哮喘自然病程, 是一种对因治疗, 且大量临床试验已经证实了其有效性^[8], 但脱敏疗法的相关治疗机制目前尚不完全清楚。

固有免疫细胞占全部免疫细胞的比例很小, 以往对于哮喘发病的机制研究主要围绕适应性免疫应答^[9]。ILC2s 这类固有免疫细胞在淋巴细胞中所占比例小, 在表型和功能上与 Th2 细胞有很多共同之处^[10]。气道壁细胞在过敏原刺激下分泌细胞因子 IL-33, 激活 ILC2s, 并诱导其分泌大量 IL-5、IL-13 等典型的 Th2 型细胞因子, 参与哮喘主要的免疫应答过程^[11]。支气管黏膜内嗜酸性粒细胞聚集是支气管哮喘的重要标志, 嗜酸性粒细胞在气道壁聚集并分泌大量炎性因子及细胞毒素产物, 其中 IL-5 在嗜酸性粒细胞的募集、增殖、活化和趋化中发挥作用, 是调节嗜酸性粒细胞功能和气道炎症的关键调控因子^[12]。IL-13 能与组胺、内皮素和其他炎性因子协同作用: (1) 引起哮喘气道炎症的发生和提高机体敏感性, 促进气道上

皮细胞分泌白三烯、几丁质酶等介质; (2) 引起平滑肌细胞收缩, 诱导金属蛋白酶的高表达; (3) 引起肺气肿和肺上皮细胞的黏液化生^[13-15], 进一步加重支气管哮喘的病理过程。

本研究中, 支气管哮喘患儿急性发作未进行治疗前, 外周血 ILC2s 水平明显升高, 同时 IL-5、IL-13 水平升高。这是由于在哮喘急性发作过程中, 损伤的气道上皮细胞分泌的各种炎性介质, 如 IL-33 等作为内源性危险信号, 诱导 ILC2s 细胞大量增殖, 并分泌 IL-5、IL-13^[16]。治疗 2 个月后, 所有支气管哮喘患儿临床症状均有所缓解, 但经单独药物治疗后, 患儿外周血 ILC2s、IL-5、IL-13 水平无明显改变, 而经药物联合脱敏治疗后, 它们的水平明显下降。这说明脱敏治疗能降低哮喘患儿外周血 ILC2s 水平, 抑制过度活化的固有免疫应答。经药物联合脱敏治疗 2 个月后, 患儿外周血 ILC2s、IL-5、IL-13 水平虽有降低, 但较对照组仍处于升高状态, 持续治疗 1 年后, 患儿外周血 ILC2s、IL-5、IL-13 水平才基本恢复至正常。这说明脱敏疗法对支气管哮喘患儿 ILC2s 及细胞因子过度表达的抑制作用是一个持续、缓慢的过程, 其也可能是临床上脱敏治疗需要持续 1~2 年的原因。IL-33 是 IL-1 家族成员, 是支气管哮喘的一个致病因子, 其诱导气道出现以 Th2 应答为主的炎性反应, 并通过引起 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、ILC2s 等的变化而导致机体免疫平衡紊乱, 促进哮喘的进展^[17]。本研究结果显示, 支气管哮喘患儿外周血 IL-33 水平呈高表达, 随着治疗的进行, 其水平逐渐下降, 经药物联合脱敏治疗 1 年后, 患儿 IL-33 水平恢复至正常, 而经单独药物治疗 1 年后, 其水平较治疗前仍明显升高。IL-33 水平与 ILC2s、IL-5、IL-13 水平变化趋势相一致, 与临床表现相吻合。

综上所述,脱敏治疗能抑制哮喘患儿急性发作时过度活化的固有免疫应答,降低固有免疫细胞 ILC2s 及细胞因子 IL-5、IL-13 水平,参与哮喘的免疫调节。本研究拓展了固有免疫系统在支气管哮喘中作用的认识,也丰富了脱敏疗法治疗过敏性哮喘作用机制的研究,为临床治疗提供了理论依据,有助于今后改进治疗方案并在临床中推广应用。

参考文献

- [1] 罗星星,陈展泽,许扬扬,等.血清 IgG4 和 IgE 在儿童过敏性哮喘和过敏性鼻炎中的应用[J].国际检验医学杂志,2017,38(4):442-443.
- [2] 张红,顾猛.过敏性哮喘患儿血浆 IFN- γ 与 IL-4 及粪便双歧杆菌检测及分析[J].国际检验医学杂志,2015,36(3):367-368.
- [3] SPITS H,ARTIS D,COLONNA M,et al. Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature[J]. Nat Rev Immunol,2013,13(2):145-149.
- [4] 李超乾,徐永健,杨丹蕾,等. $\gamma\delta$ T 细胞与哮喘特异性致敏原皮下脱敏疗法的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2003,23(8):599-603.
- [5] 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[J].中华儿科杂志,2009,24(1):20-22.
- [6] 陈再历.哮喘药物的应用技术[J].中国实用儿科杂志,2001,16(12):760-762.
- [7] 韦中盛. II 型固有淋巴细胞在哮喘发病机制及治疗中的研究进展[J].临床肺科杂志,2015,20(11):2104-2105.
- [8] 李付广,王芳,杨桂枝,等.儿童过敏性哮喘特异性免疫治疗过程中 IL-10、TGF- β 1 和 CD4⁺CD25⁺T 细胞的变化

[J].现代免疫学,2009,29(1):59-62.

- [9] 徐艳,何成诗.支气管哮喘的免疫治疗进展[J].实用临床医学,2011,12(3):121-124.
- [10] 袁琳洁,陈诗皓,安高,等. IL-33 诱导的小鼠过敏原非依赖性哮喘样模型肺组织免疫细胞及亚群的变化[J].首都医科大学学报,2016,37(5):561-567.
- [11] KAMIJO S,TAKEDA H,TOKURA T,et al. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation[J]. J Immunol,2013,190(9):4489-4499.
- [12] 刘颖慧,蒋捍东.变应性鼻炎和哮喘患者血清 IL-5、IL-15 及 IL-18 的水平研究[J].国际免疫学杂志,2010,33(6):495-497.
- [13] 蒋群芳.儿童支气管哮喘血清 IL-4、IL-13 及 IgE 水平变化的意义[J].国际检验医学杂志,2013,34(11):1446-1447.
- [14] 卢继芳,刘振玲.孟鲁司特联合沙美特罗替卡松治疗儿童中度哮喘的疗效及对 IL-13 和 TNF- α 水平的影响[J].临床和实验医学杂志,2014,13(8):647-650.
- [15] 朱艳.哮喘患者血浆 IL-13、LTB4、MMP-9、TIMP-1 变化及临床意义[J].放射免疫学杂志,2010,23(4):429-431.
- [16] DU W Y,CHEN C W,LIN F K,et al. IL-33 mediates the expressions of IL-5 and IL-13 in *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice[J]. Exp Parasitol,2013,135(3):587-594.
- [17] 徐燕全,吴长有. IL-25 和 IL-33 促进 Th2 细胞分化的研究进展[J].国际免疫学杂志,2010,33(6):417-419.

(收稿日期:2017-06-02 修回日期:2017-09-02)

(上接第 698 页)

- [9] STANG A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses[J]. Eur J Epidemiol,2010,25(9):603-605.
- [10] ZHANG S M,ZHONG G Z,HE W,et al. LncRNA up-regulated in nonmuscle invasive bladder cancer facilitates tumor growth and acts as a negative prognostic factor of recurrence[J]. J Urol,2016,196(4):1270-1278.
- [11] ILIEV R,KLEINOVA R,JURACEK J,et al. Overexpression of long non-coding RNA TUG1 predicts poor prognosis and promotes cancer cell proliferation and migration in high-grade muscle-invasive bladder cancer[J]. Tumor Biol,2016,37(10):13385-13390.
- [12] DUAN W L,DU L T,JIANG X M,et al. Identification of a serum circulating lncRNA panel for the diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer[J]. Oncotarget,2016,7:78850-78858.
- [13] ZHAO X L,ZHAO Z H,XU W C,et al. Increased ex-

pression of SPRY4-IT1 predicts poor prognosis and promotes tumor growth and metastasis in bladder cancer[J]. Int J Clin Exper Pathol,2015,8:1954-1960.

- [14] CHEN T,XIE W Q,XIE L G,et al. Expression of long noncoding RNA lncRNA-n336928 is correlated with tumor stage and grade and overall survival in bladder cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun,2015,468(4):666-670.
- [15] MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ M,FEVER A,DUEÑAS M,et al. Analysis of the polycomb-related lncRNAs HO-TAIR and ANRIL in bladder cancer[J]. Clin Epigenet,2015,7:109.
- [16] FAN Y,SHEN B,TAN M,et al. TGF-beta-induced up-regulation of malat1 promotes bladder cancer metastasis by associating with suz12[J]. Clin Cancer Res,2014,20:1531-1541.

(收稿日期:2017-09-28 修回日期:2017-11-18)