

• 临床检验研究论著 •

## 儿童支气管哮喘患者外周血 Th17 百分数及 FOXP3 水平的变化及意义\*

张晴菊, 龚芳, 申卫红

(南通大学第三附属医院检验科, 江苏无锡 214041)

**摘要:**目的 探讨外周血 Th17 细胞百分数和叉头状转录因子 P3(FOXP3)水平在儿童支气管哮喘患者中的变化及意义。方法 选取支气管哮喘患儿(哮喘组)和健康儿童(对照组)各 30 例,采用流式细胞术检测外周血 Th17 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的百分数、实时荧光定量 PCR 检测外周血 FOXP3 mRNA 的表达,ELISA 法检测血浆中 IL-17 和 IL-10 的表达水平。结果 哮喘组外周血 Th17 细胞百分数及血浆 IL-17 水平均高于对照组( $P < 0.05$ );哮喘组外周血 FOXP3 表达及血浆 IL-10 水平均低于对照组( $P < 0.05$ )。结论 Th17/FOXP3 的失衡可能在儿童支气管哮喘的发病机制中起重要作用。

**关键词:**支气管哮喘; 辅助性 T 细胞; 调节性 T 细胞; 叉头状转录因子 P3

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.012

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2014)18-2451-02

### Changes and clinical significance of Th17 percentage and FOXP3 concentration in peripheral blood of children with bronchial asthma\*

Zhang Qingju, Gong Fang, Shen Weihong

(Department of Laboratory Medicine, the Third Affiliated Hospital of Nantong University, Wuxi, Jiangsu 214041, China)

**Abstract: Objective** To investigate the percentage of Th17 cells and FOXP3 concentration in peripheral blood of children with bronchial asthma and their clinical significance. **Methods** Thirty children with bronchial asthma and thirty healthy children as control group were enrolled in the study. The percentage of Th17 and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells in the peripheral blood were determined by flow cytometry(FCM). The mRNA expression of FOXP3 in the peripheral blood was determined by quantitative real-time PCR. The concentrations of IL-17 and IL-10 in plasma were measured by using ELISA. **Results** In children with bronchial asthma, the proportions of Th17 cells in the peripheral blood and concentration of IL-17 in plasma increased, while the expression of FOXP3 in the peripheral blood and concentration of IL-10 in plasma decreased. **Conclusion** The imbalance of Th17/FOXP3 may contribute to the proceeding of bronchial asthma in children.

**Key words:** bronchial asthma; helper T cells; regulatory T cells; forkhead transcription factor 3

支气管哮喘是由多种细胞和细胞因子共同参与的呼吸道变态反应性疾病,其发病率在儿童患者中呈上升趋势。近年来的研究发现,辅助性 T 细胞 Th17 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>的调节性 T 细胞及其细胞因子在支气管哮喘发病中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。Th17 细胞主要分泌细胞因子白细胞介素-17(IL-17),是近年来发现的一类辅助性 CD4<sup>+</sup>T 细胞,在自身免疫性疾病、变态反应性疾病中发挥重要作用。调节性 T 细胞是一类具有免疫抑制功能的 T 淋巴细胞,在维持机体免疫自稳、调控免疫应答方面起重要作用,特征性表达叉头状转录因子 P3(forkhead transcription factor 3, FOXP3),分泌细胞因子白细胞介素-10(IL-10),通过细胞接触和细胞因子作用方式对免疫细胞具有平衡调节作用<sup>[2-3]</sup>。国外的许多研究表明,改变外周血中 Th17 细胞和 FOXP3 的表达可以影响支气管哮喘患者的气道炎性反应,从而参与支气管哮喘的发生<sup>[4-5]</sup>。本文通过检测儿童支气管哮喘患者外周血中 Th17 细胞的百分数和 FOXP3 及其相关细胞因子 IL-17、IL-10 在血浆中的表达水平,探讨 Th17 细胞百分数和 FOXP3 表达水平在儿童支气管哮喘患者外周血中的变化及意义,旨在为儿童支气管哮喘患者的免疫治疗提供一个新的方向。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年在无锡市第三人民医院住院治疗的儿童支气管哮喘患者 30 例作为哮喘组。诊断标准符合

2008 年中华医学会儿科学分会修订的《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》中的诊断标准<sup>[6]</sup>,其中男性 15 例、女性 15 例,平均(8.0±2.2)岁。同期于本院行健康体检且结果合格 30 例作为对照组,其中男性 15 例、女性 15 例,平均(18.0±2.0)岁,均为无过敏性疾病和近期无呼吸道感染,近一个月内未使用糖皮质激素、免疫抑制剂等。所有纳入研究者均知情、同意。

#### 1.2 方法

**1.2.1 外周血 Th17 及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群的检测** 分别抽取哮喘组患者和对照组静脉血 2 mL,枸橼酸钠抗凝后取全血标本 100 μL,分别加入 PE 标记的 CD4、FITC 标记的 CD25 抗体(均购自美国 BD 公司)、PE 标记的抗人 IL-17 抗体(购自美国 eBioscience 公司)各 10 μL,室温避光孵育 30 min。然后再加入红细胞裂解液(购自美国 BD 公司),振荡混匀。离心后弃上清液,用 PBS 洗涤后混匀,用流式细胞仪进行计数(美国 BD 公司, FACS Calibur)。以 Cellquest 软件获取并分析数据,获得 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞以及 Th17 细胞的百分数。

**1.2.2 FOXP3 mRNA 表达的检测** 采用实时荧光定量 PCR 法检测 FOXP3 mRNA 的表达,以 GAPDH 做为内参基因。按照试剂盒(购自德国 QIAGEN 公司)说明书提取 RNA,FOXP3 的引物设计如下,正向:5'-GAA CGC CAT CCG CCA CAA CCT GA-3';反向:5'-CCC TGC CCC CAC CAC CTC TGC-3'。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,69 ℃ 30 s,

\* 基金项目:无锡市医院管理中心医学技术重大扶持项目(YGZF1101)。作者简介:张晴菊,女,检验技师,主要从事临床免疫学与检验的研究。

72 ℃ 1 min, 共 30 个循环。反应结束后设定最佳阈值, 根据仪器给出的标准曲线和斜率获得 FOXP3 的相对表达指数。

**1.2.3 细胞因子水平检测** 所有实验者清晨空腹抽取静脉血 4 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离出血浆待检。细胞因子 IL-17、IL-10 的检测, 采用 ELISA 试剂盒(美国 BD 公司)进行检测, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

**1.2.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件对样本数据进行处理, 所得计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间的均数比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 外周血 Th17、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群的检测** 通过流式细胞仪检测了 30 例儿童支气管哮喘患者和 30 例健康者外周血 Th17、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群的百分数, 结果表明: 哮喘组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞约占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的 (2.57 ± 1.18)%, 明显低于对照组的 (4.13 ± 2.31)%; 哮喘组外周血 Th17 细胞约占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的 (4.26 ± 1.25)%, 明显高于对照组的 (1.84 ± 0.65)%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 外周血 FOXP3 mRNA 表达的检测** 由于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞特征性地表达转录因子 FOXP3, 因此本课题组进一步检测了儿童哮喘患者外周血中是否表达 FOXP3 mRNA。通过实时荧光定量 PCR 技术分别扩增哮喘组和对照组外周血 FOXP3 的 mRNA, 发现哮喘组 FOXP3 mRNA 的表达量 (3.02 ± 0.21) 明显低于对照组的表达量 (4.28 ± 0.35), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 细胞因子 IL-17、IL-10 的检测** 本课题组通过 ELISA 法分别检测了哮喘组和对照组血浆细胞因子 IL-17、IL-10。哮喘组 IL-17 的浓度明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 IL-10 的浓度明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 哮喘组和对照组血浆 IL-17、IL-10 表达量的比较 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	IL-17	IL-10
哮喘组	30	62.59 ± 30.36 *	40.13 ± 19.27 *
对照组	30	38.83 ± 29.19	59.89 ± 37.41

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

## 3 讨论

支气管哮喘是一种慢性的气道炎症性疾病, 多种组织细胞和炎症细胞参与哮喘炎症的发生、发展。Th17 细胞主要分泌 IL-17, 可以促进支气管成纤维细胞、上皮细胞和平滑肌细胞的活化, 在自身免疫性疾病和炎症性疾病等多种疾病中发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>。国外有研究显示, 通过给支气管哮喘小鼠输入活化的 Th17 细胞, 能够促进气道中性粒细胞性炎症。另有许多研究发现, 在中、重度支气管哮喘患者外周血中, Th17 细胞及其分泌的 IL-17 的表达均增加<sup>[9-10]</sup>。可见 Th17 细胞在哮喘的发病机制中发挥着重要作用, 而其效应的发挥主要通过特征性细胞因子 IL-17 来完成。

近年来调控免疫反应的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞成为免疫抑制治疗的研究焦点。Treg 特征性地表达转录因子 FOXP3, 可通过细胞间直接接触或分泌细胞因子 IL-10 等方式来抑制免疫应答, 从而使机体产生免疫耐受。有研究显示, 儿童哮喘患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞明显减少。另有研究发现, 在 FOXP3 表达减少的小鼠中过敏原诱导的气道反应性增加。因此, FOXP3 表达减少或缺乏可加重哮喘的发作<sup>[11-12]</sup>。

本研究结果显示, 哮喘组外周血 Th17 细胞表分数及血浆 IL-17 水平均高于对照组, 而 FOXP3 表达及血浆 IL-10 水平均低于对照组, 提示 Th17 细胞和 FOXP3 的表达参与了儿童支气管哮喘的发病。Th17 细胞和 FOXP3 表达存在着密切的联系。本研究中, 哮喘组同时存在 Th17 细胞百分数增加而 FOXP3 表达减少的情况, 表明 Th17/FOXP3 表达失衡可能在儿童支气管哮喘的发病机制中起重要作用。

综上所述, 在儿童支气管哮喘的发病过程中, Th17 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞免疫应答起重要作用。因此, 在儿童支气管哮喘的治疗中, 对 Th17 细胞和 FOXP3 介导的免疫耐受进行干预是十分必要的。

## 参考文献

- [1] Albano GD, Di Sano C, Bonanno A, et al. Th17 immunity in children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e58892.
- [2] van Mierlo GJ, Scherer HU, Hameetman M, et al. Cutting edge: TNFR-shedding by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators [J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 2747-2751.
- [3] Kim HI, Kim H, Cho HW, et al. The ratio of intra-tumoral regulatory T cells (Foxp3<sup>+</sup>)/helper T cells (CD4<sup>+</sup>) is a prognostic factor and associated with recurrence pattern in gastric cardia Cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104(7): 728-733.
- [4] Robinson DS. Regulatory T cells and asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(9): 1314-1323.
- [5] Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD [J]. *Chest*, 2010, 138(5): 1140-1147.
- [6] 中华医学会儿科学会呼吸学组, 《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*, 2008, 46(10): 745-753.
- [7] Togbe D, Fauconnier L, Madouri F, et al. Thymic stromal lymphopoietin enhances Th2/Th22 and reduces IL-17A in protease-allergen-induced airways inflammation [J]. *ISRN Allergy*, 2013, 1(2): 971036.
- [8] Bajoriūnien I, Malakauskas K, Lavinskien S, et al. Peripheral blood Th17 cells and neutrophils in Dermatophagoides pteronyssinus-induced early- and late-phase asthmatic response [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2012, 48(9): 442-451.
- [9] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(10): 1023-1032.
- [10] Bajoriūnien I, Malakauskas K, Lavinskien S, et al. Response of peripheral blood Th17 cells to inhaled Dermatophagoides pteronyssinus in patients with allergic rhinitis and asthma [J]. *Lung*, 2012, 190(5): 487-495.
- [11] Eusebio M, Kraszula L, Kupczyk M, et al. Low frequency of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3(BRIGHT) T cells and FOXP3 mRNA expression in the peripheral blood of allergic asthma patients [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2012, 26(2): 211-220.
- [12] Shi Y, Jin Y, Guo W, et al. Blockage of nerve growth factor modulates T cell responses and inhibits allergic inflammation in a mouse model of asthma [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(12): 1369-1378.

(收稿日期: 2014-03-25)