儿童哮喘外周血T淋巴细胞亚群与IFN- γ 和VEGF变化及与病情关系

翁海冰¹, 曾德海¹, 陈玉晶¹, 杨颖², 曹岚³

(1. 文昌市庆龄妇幼保健院儿科, 海南 文昌 571300; 2. 浙江大学医学院附属儿童医院儿科, 浙江 杭州 310003; 3. 四川绵阳四〇四医院儿科, 四川 绵阳 621000)

摘要:目的 探讨儿童哮喘外周血T淋巴细胞亚群、干扰素- γ (IFN- γ)、血管内皮生长因子(VEGF)水平变化及与病情的关系。方法 选取2018年11月-2019年11月文昌市庆龄妇幼保健院60例儿童哮喘患者作为哮喘组,另选取60名健康体检儿童作为健康组,所有研究对象均检测外周血T淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)、IFN- γ 、VEGF水平,并将哮喘组患儿依照疾病时期分为急性期($n=31$)与缓解期($n=29$),依照疾病严重程度分为轻度组($n=22$)、中度组($n=20$)、重度组($n=18$),分析T淋巴细胞亚群、IFN- γ 、VEGF表达水平及其临床意义。结果 哮喘组CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺表达水平高于健康组,CD8⁺表达水平低于健康组($t=9.119, 9.438, 2.728, P<0.05$);哮喘组IFN- γ 表达水平低于健康组,VEGF表达水平高于健康组($t=15.020, 21.236, P<0.05$);急性期患儿CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、VEGF表达水平高于缓解期患儿,IFN- γ 表达水平低于缓解期患儿($P<0.05$);轻度组CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、VEGF表达水平低于中度组,中度组低于重度组($P<0.05$);轻度组IFN- γ 表达水平高于中度组,中度组高于重度组($P<0.05$);Spearman相关性分析结果显示,CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、血清VEGF水平与患儿病情呈正相关($r=0.575, 0.591, 0.616, P<0.05$);血清IFN- γ 水平与患儿病情呈负相关($r=-0.581, P<0.05$)。结论 哮喘患儿外周血T淋巴细胞亚群以及IFN- γ 、VEGF表达水平均存在异常,其表达水平的高低可反映哮喘的严重程度。

关键词:哮喘;儿童;T淋巴细胞亚群;干扰素- γ ;血管内皮生长因子

中图分类号:R725.6

文献标识码:B

文章编号:1672-3619(2021)11-1426-04

Expression levels and clinical significance of T lymphocyte subsets, IFN- γ and VEGF in peripheral blood of asthma children

WENG Hai-bing¹, ZENG De-hai¹, CHEN Yu-jing¹, YANG Ying², CAO Lan³

(1. Department of Pediatrics, Wenchang Qingling Maternal and Child Health Hospital, Wenchang, Hainan 571300;

2. Department of Neurology, Children's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310003;

3. Department of Pediatrics, 404 Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Corresponding author: WENG Hai-bing, E-mail: wenghaib1122@163.com

Abstract: Objective To explore the expression levels and clinical significance of T lymphocyte subsets, interferon- γ (IFN- γ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in peripheral blood of asthma children. **Methods** During the period from November 2018 to November 2019, 60 asthma children in the hospital were enrolled as asthma group, while 60 healthy children who underwent physical examination were enrolled as healthy group. All the subjects were tested for levels of T lymphocyte subsets (CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺), IFN- γ and VEGF in peripheral blood. According to different disease periods, children in asthma group were divided into acute stage group ($n=31$) and remission stage group ($n=29$). According to different disease severity, they were divided into mild group ($n=22$), moderate group ($n=20$) and severe group ($n=18$). Expression levels and clinical significance of T lymphocyte subsets, IFN- γ and VEGF were analyzed. **Results** The levels of CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in asthma group were higher than those in healthy group, while CD8⁺ level was lower than that in healthy group ($t=9.119, 9.438, 2.728, P<0.05$). The expression level of IFN- γ was lower than that in healthy group, while expression level of VEGF was higher than that in healthy group ($t=15.020, 21.236, P<0.05$). The levels of CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and VEGF in children during acute stage were higher than those during remission stage, while expression level of IFN- γ was lower than that during remission stage ($P<0.05$). The levels of CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and VEGF in mild group were lower than those in moderate group, which were lower in moderate group than severe group ($P<0.05$). IFN- γ level in mild group was

基金项目:海南省自然科学基金项目(813265)

作者简介:翁海冰(1984-),女,本科,主治医师,主要从事于儿科方面工作, E-mail: wenghaib1122@163.com

higher than that in moderate group, which was higher in moderate group than severe group ($P < 0.05$). The results of Spearman correlation analysis showed that levels of $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ and serum VEGF were positively correlated with conditions of children ($r=0.575, 0.591, 0.616, P < 0.05$), while level of serum $IFN-\gamma$ was negatively correlated with it ($r=-0.581, P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of T lymphocyte subsets, $IFN-\gamma$ and IL-4 in peripheral blood were abnormal in asthma children, and their levels could reflect the severity of asthma.

Keywords: Asthma; Child; T lymphocyte subset; Interferon- γ ; Vascular endothelial growth factor

哮喘是一种慢性炎症疾病,以气道慢性炎症、气道对刺激高反应、可逆性气流受限、气道重构等为主要特征^[1]。儿童哮喘和成人基本相似,然而由于儿童心理、生理尚未发育完全,因此又存在一些差异,若治疗不及时可迁延为成人哮喘。T淋巴细胞亚群在哮喘发病机制中具有重要作用,其表达异常与哮喘儿童气道炎症反应与气道重塑密切相关^[2]。干扰素- γ (interferon- γ , $IFN-\gamma$)是参与哮喘病理过程的炎性介质,具有免疫调控作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)又称为血管渗透因子,是血管新生重要的调控因子,是气道重塑核心介质之一^[3]。本研究分析儿童哮喘外周血T淋巴细胞亚群、 $IFN-\gamma$ 、VEGF水平变化,探讨其在儿童哮喘中的临床意义,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年11月-2019年11月文昌市庆龄妇幼保健院60例儿童哮喘者纳入哮喘组,另选取60名于本院体检健康的儿童作为健康组。哮喘组男34例,女26例;年龄3~12岁,平均(7.39±3.74)岁。纳入标准:①符合《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》诊断标准^[4];②年龄1~12岁;③经医院伦理委员会批准,患儿家属知情同意。排除标准:①首次喘息发作;②合并其他心肺疾病,如先天性心脏病、呼吸衰竭、肺栓塞等;③合并自身免疫性疾病;④合并肿瘤等疾病;⑤近2周内使用糖皮质激素、茶碱等药物。健康组包括男33例,女27例;年龄4~12岁,平均(7.41±3.69)岁,健康组儿童均无心肺疾病、感染性疾病、免疫疾病等。两组性别、年龄资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。哮喘组中,将发病2周前均未使用过激素,因接触变应原等刺激物或治疗不当而突发气促、咳嗽、胸闷等症状,或原有症状急剧加重,常有呼吸困难,呼气流量降低为特征的患儿纳入急性期($n=31$),将经过治疗8~12周后的患儿,症状、体征消失,肺功能恢复到急性发作前水平的患儿纳入缓解期($n=29$)。

1.2 标本采集 哮喘组患儿于就诊第2天清晨,健康组儿童于体检当天抽取空腹静脉血3 mL,血清析出后在3 000 r/min转速条件下离心5 min,离心半径13.5 cm,取血清于-20℃条件下保存,用于 $IFN-\gamma$ 、VEGF水平检测,另取2 mL空腹静脉血,抗凝,用于T细胞亚群测定。

1.3 主要器材与试剂 贝克曼流式细胞仪购自BD公司;涡旋混匀器购自IKA公司;CO₂培养箱购自Forma scientific公司;高速冷冻离心机购自KENDRO公司。T淋巴细胞亚群检测试剂盒购自美国BioLegend公司;酶联免疫吸附检测试剂盒购自南京卡米洛生物工程有限公司。

1.4 检测方法 流式细胞仪测定 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $IFN-\gamma$ 、VEGF含量采用酶联免疫吸附法检测,严格按照说明书操作。

1.5 病情严重程度 ①轻度:症状发作不足1次/日,夜间发作>2次/月但<1次/周,可能影响患儿睡眠与活动,第一秒用力呼气量(forced expiratory volume in one second, FEV1)≥80%,预计值或最大呼气流速(peak expiratory flow rate, PEF)≥个人最佳值80%,PEF变异率达20%~30%;②中度:每日发作,夜间发作≥1次/周,影响睡眠和活动,FEV1为60%~79%,预计值或PEF为个人最佳值60%~79%,PEF变异率>30%;③重度:每日发作频繁,夜间亦频繁,活动受限,FEV1<60%,预计值或PEF<个人最佳值60%,PEF变异率>30%^[5]。

1.6 统计学分析 采用SPSS 20.0统计学软件,呈正态分布计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用F检验,组间两两比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组T淋巴细胞亚群比较 哮喘组 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 表达高于健康组, $CD8^+$ 表达低于健康组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 两组 $IFN-\gamma$ 、VEGF表达水平比较 哮喘组 $IFN-\gamma$ 表达水平低于健康组,VEGF表达水平高于健康组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表1 两组T淋巴细胞亚群比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of T lymphocyte subsets between the two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
哮喘组	60	62.15±10.84	38.91±6.30	24.89±4.18	1.56±0.30
健康组	60	64.73±12.88	28.66±6.01	27.04±4.45	1.06±0.28
t值		1.187	9.119	2.728	9.438
P值		0.238	<0.001	<0.007	<0.001

2.3 急性期与缓解期亚组外周血T淋巴细胞亚群、IFN- γ 、VEGF水平比较 急性期患儿CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、VEGF水平高于缓解期患者,IFN- γ 表达水平低于缓解期患儿,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.4 不同病情程度亚组外周血T淋巴细胞亚群、

表2 两组IFN- γ 、VEGF表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison on the expression levels of IFN- γ and VEGF between the two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IFN- γ (ng/L)	VEGF(pg/mL)
哮喘组	60	40.94±6.10	296.85±80.06
健康组	60	72.25±14.95	70.28±20.50
t值		15.020	21.236
P值		<0.001	<0.001

IFN- γ 、VEGF水平比较 轻度组CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、VEGF水平低于中度组,中度组低于重度组,差异有统计学意义($P<0.05$);轻度组IFN- γ 水平高于中度组,中度组高于重度组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表4。

表3 急性期与缓解期亚组外周血T淋巴细胞亚群、IFN- γ 、VEGF水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comparison on levels of T lymphocyte subsets, IFN- γ and VEGF in peripheral blood between acute stage and remission stage subgroups($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	IFN- γ (ng/L)	VEGF(pg/mL)
急性期	31	41.25±5.80	24.86±3.84	1.66±0.21	22.08±5.17	384.25±60.13
缓解期	29	36.41±5.84	24.92±4.01	1.46±0.19	61.10±8.28	203.42±75.42
t值		3.219	0.059	3.859	22.050	10.302
P值		0.002	0.953	<0.001	<0.001	<0.001

表4 不同病情程度患儿外周血T淋巴细胞亚群、IFN- γ 、VEGF水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Comparison on levels of T lymphocyte subsets, IFN- γ and VEGF in peripheral blood among children with different disease severity($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	IFN- γ (ng/L)	VEGF(pg/mL)
轻度组	22	34.60±6.02	25.73±3.91	1.34±0.19	49.15±4.05	251.63±50.84
中度组	20	38.35±5.77	25.02±4.05	1.53±0.24	40.57±5.77	290.79±54.55
重度组	18	44.80±5.83	23.72±3.73	1.89±0.27	34.56±6.03	358.85±69.76
F值		15.026	1.328	28.012	38.619	16.921
P值		<0.001	0.273	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 外周血T淋巴细胞亚群、IFN- γ 、VEGF水平与病情程度的相关性分析 Spearman相关性分析显示,CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、血清VEGF水平与患儿病情呈正相关($r=0.575, 0.591, 0.616, P<0.05$);血清IFN- γ 水平与患儿病情呈负相关($r=-0.581, P<0.05$)。

3 讨论

近年来支气管哮喘发病率与死亡率均明显上升,目前全世界约有将近3亿哮喘患者,即每20人中就有1位哮喘患者,且哮喘发病率正以每10年50%的速度上升,每年由于哮喘死亡的人数超过18万^[6]。儿童期是支气管哮喘发作敏感时期,严重影响儿童健康、学习与生活,其中部分儿童哮喘可迁

延为成人哮喘,成为终生疾患,因此临床上儿童哮喘的防治具有重要价值^[7]。

研究显示T淋巴细胞亚群异常与哮喘气道炎症和重塑相关^[8]。CD4⁺、CD8⁺水平分别代表协助与抑制细胞和体液免疫强弱,其比值是评估人体免疫的重要指标。本研究中哮喘组CD3⁺表达水平与健康组比较无明显差异,与绝大多数研究结果一致^[9],然而CD4⁺/CD8⁺比值较健康组高,提示由于病原体感染的存在,患儿淋巴细胞抑制和辅助功能受限,免疫功能下降。刘超等^[10]研究结果显示急性期患者T淋巴细胞亚群高于缓解期患者,本研究结果与其一致,提示气道高反应性与气道炎症因子诱发支气管痉挛是哮喘急性发作的重要病理过程^[11]。

此外本研究显示不同病情程度亚组外周血T淋巴细胞亚群CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平存在明显差异,病情越严重的患儿CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平越高,外周血T淋巴细胞亚群水平与患儿病情具有良好的相关性。

VEGF在诱导血管新生、提高血管渗透性、促进血管内皮细胞生长、抑制细胞凋亡等方面具有重要作用。有研究表明支气管哮喘可见VEGF高表达^[12],VEGF使呼吸道黏膜以及黏膜下血管床通透性提高,气道壁变厚。本研究中哮喘组VEGF表达水平高于健康组,且病情越严重,VEGF表达水平越高,提示VEGF促进气道水肿和重构,高表达者通气障碍更为严重^[13]。Th1/Th2细胞平衡失调是支气管哮喘发病重要基础,气道炎症过程中细胞增殖与分化受到IFN- γ 等多种细胞因子调控,IFN- γ 促进Th1、抑制Th2细胞反应,同时抑制支气管上皮细胞的增殖。Genç等^[14]研究结果显示支气管哮喘儿童IFN- γ 信号通路表达持续降低,IFN- γ 在哮喘的发生与发展中具有负调控作用。本研究中哮喘组患儿IFN- γ 水平低于健康组,且急性期IFN- γ 表达水平低于缓解期患儿,IFN- γ 在抑制气道炎症,改善患儿临床症状方面具有关键性作用。胡小容等^[15]研究结果显示,不同哮喘疾病严重程度患儿IFN- γ 、IL-4水平具有明显差异,本研究中轻度组IFN- γ 水平高于中度组,中度组高于重度组,与其研究结果一致,血清IFN- γ 水平与患儿病情严重程度呈现负相关。

综上所述,哮喘患儿外周血T淋巴细胞亚群以及IFN- γ 、VEGF表达水平均存在异常,参与气道炎症反应及气道重塑,外周血T淋巴细胞亚群、IFN- γ 、VEGF水平高低可反映哮喘的严重程度,为临床上哮喘病情判断和治疗提供相关理论基础。

参考文献

[1] 易绘,梁亚勇,肖奕青,等.婴幼儿和儿童哮喘过敏原IgE检测及临床意义[J].中国免疫学杂志,2019,35(3):340-344.
[2] Bai Y, Zhou Q, Fang Q, et al. Inflammatory cytokines and T-Lymphocyte subsets in serum and sputum in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 2206-2210.

[3] 陈凯鹏,林惠玲,张超,等.信号转导子和转录激活子-1、干扰素调节因子-1及干扰素- γ 在支气管哮喘儿童中的表达及其临床意义[J].中国小儿急救医学,2018,25(11):834-838.
[4] 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(2016年版)[J].中华儿科杂志,2016,54(3):167-181.
[5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J].中华哮喘杂志(电子版),2008,2(1):3-13.
[6] 买智涛,姜明明,万善志.FeNO联合血清ECP、IgE检测对支气管哮喘的临床诊断价值[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(5):625-628,633.
[7] 曾建兴,林利平,李国花,等.外周血T淋巴细胞亚群在不同致敏原因哮喘儿童中的表达研究[J].中国实验诊断学,2019,23(12):2074-2076.
[8] Dashti S, Zare L, Shahmari M, et al. Association between tobacco smoke exposure (Environmental and Direct) and incidence and control of bronchial asthma [J]. Open Journal of Nursing, 2018, 8(2):150-156.
[9] 查琳,董质冰,马井国.匹多莫德联合丙酸氟替卡松吸入治疗儿童哮喘的临床效果及对血清白细胞介素16和T淋巴细胞亚群水平的影响[J].中国医药,2018,13(1):44-47.
[10] 刘超.CD4+CD25+Foxp3+调节性T细胞在儿童哮喘中的作用研究[J].中国妇幼保健,2019,34(5):1055-1057.
[11] 张薇,孙浩森,王洁.肺炎患儿外周血miR-146a,miR-155表达水平及其与T淋巴细胞亚群和炎症因子的关系[J].热带医学杂志,2019,19(11):1404-1407.
[12] 徐影,王健,甘丽杏.外周血内T淋巴细胞亚群、IgE、CRP及PCT对儿童哮喘的临床意义[J].热带医学杂志,2018,18(4):515-518.
[13] 朱乔波,吴春红,肖佳荔,等.加用异丙托溴铵对哮喘患儿肺功能、炎症因子及VEGF表达的影响[J].实用药物与临床,2019,22(6):625-628.
[14] Genç D, Zibandeh N, Nain E, et al. IFN- γ stimulation of dental follicle mesenchymal stem cells modulates immune response of CD4⁺ T lymphocytes in Der p1⁺ asthmatic patients in vitro [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2019, 47(5):467-476.
[15] 胡小容,张承,徐刚.降钙素原、IFN- γ 和IL-10联合检测在支气管哮喘患者中变化及意义的相关性分析[J].标记免疫分析与临床,2018,25(2):250-252,257.

收稿日期:2020-06-22