临床研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1094-03

支气管哮喘患儿诱导痰 IL-17 水平分析

高 惠，罗征秀，刘 超，任 洛，蒋永惠，王莉佳，刘恩梅，符 州
（重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心，重庆 400014）

【摘 要】目的：分析儿童支气管哮喘急性发作期、慢性持续期及临床缓解期诱导痰上清液白细胞介素-17（Interleukin 17，IL-17）、白细胞介素-6（Interleukin 6，IL-6）、转化生长因子-β（Transforming growth factor-β，TGF-β）水平，探讨其在哮喘发病过程中的作用。方法：收集支气管哮喘急性发作期 25 例、慢性持续期 15 例、缓解期 17 例及健康对照儿童 13 例诱导痰，采用 ELISA 法测定诱导痰上清液 IL-17、IL-6 及 TGF-β 水平，比较各组细胞因子水平差异。结果：哮喘患儿急性发作期诱导痰上清液 IL-17 浓度为（855.39±46.89）pg/ml，慢性持续期为（705.63±46.29）pg/ml，临床缓解期为（597.09±60.26）pg/ml，健康对照儿童为（434.12±43.63）pg/ml，哮喘患儿诱导痰上清液 IL-17 水平显著高于健康对照儿童，差异具有统计学意义（$P<0.05$），且哮喘急性发作期 IL-17 水平显著高于慢性持续期、缓解期，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；哮喘患儿急性期 IL-6 水平明显高于其他各组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；各组 TGF-β 水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。结论：诱导痰上清液 IL-6、IL-17 表达增加在哮喘发病中有重要作用。

【关键词】支气管哮喘；诱导痰；白细胞介素-17；白细胞介素-6；转化生长因子-β
【中国图书分类法分类号】R725.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-16

Research on the concentrations of interleukin-17 in induced sputum of patients with asthma

GAO Hui, LUO Zheng-xiu, LIU Chao, REN Luo, JIANG Yong-hui, WANG Li-jia, LIU En-mei, FU Zhou
(*Respiratory Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of IL-17, TGF-β and IL-6 concentrations in the induced sputum of asthma patients of different stages. *Methods*: Sputum IL-17, TGF-β and IL-6 concentrations were measured in 57 patients with asthma including 25 in acute stage, 15 in chronic stage, and 17 in remission stage, and another 13 healthy children were in the control group. They were measured with sandwich enzyme immunosorbent assay (ELISA). *Results*: The IL-17 concentration in different stages was as follows: (855.39±46.89) pg/ml in acute stage, (705.63±46.29) pg/ml in chronic stage, and (597.09±60.26) pg/ml in remission stage, the IL-17 concentration in healthy control group was (434.12±43.63) pg/ml. The mean IL-17 concentration was increased in asthma compared with healthy control group ($P<0.05$). The IL-17 and IL-6 concentrations in acute stage were significantly higher than in chronic and remission stage ($P<0.05$). TGF-β concentration was measured in the different stages, and there

作者介绍：高 惠（1984-），女，硕士，
研究方向：呼吸道感染与免疫。
通信作者：罗征秀，女，副教授，Email：luozhengxiu816@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81070015）、重庆市科委基金资助项目（编号：CSTC2009BB5258）、重庆市卫生局基金资助项目[渝卫科教（2009）66 号-2009-2-241]。

小，最低检测限达到 2 ng/ml，适用于 beagle 犬血浆样品PMEA的含量测定及临床前药物动力学研究。

参 考 文 献

[1] 王季午，刘克洲，陈 智.人类病毒性疾病[M].北京：人民卫生出版社，2002.489-490.

[2] Rajan Subramaniam S, Saradhi P P.Rapid multiplication of Phyllanthus fratevnus:a plant with anti-hepatitis viral activity [J].Industrial Crops and Products, 1997, 6(1):35-40.

[3] 陈大明，肖 宏.抗乙型肝炎病毒药物研发现状[J].药学服务与研究，2006，6(3)：193-196.

[4] 王桂爽，蔡皓东.阿德福韦酯和替诺福韦相关性肾小管病[J].药物不良反应杂志，2010，12(1)：31-36.

[5] 丁翔宇，蒋 晔，李艳荣，等.阿德福韦酯及其有关物质的胶束电动毛细管色谱法快速测定[J].分析测试学报，2007，26(6)：914-917.

[6] 褚 扬，武 毅，兰 静，等.液相色谱-质谱-质谱联用法测定人血浆中阿德福韦的浓度[J].中国医院药学杂志，2007，27(7)：894-897.

[7] Zhao L Y, Chen X Y, Zhang Y, et al.Determination of adefovir in macaque plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J].Acta Pharm Sinica, 2003, 38(2):120-123.

（责任编辑：冉明会）

were no significantly differences between them. *Conclusion*: IL-17 and IL-6 concentrations are significantly increased in asthma and may be used as one of the indices of airway inflammation.

【Key words】asthma; induced sputum; IL-17; IL-6; TGF-β

支气管哮喘，简称哮喘(Bronchial asthma)是儿童最常见的慢性气道炎症性疾病，目前认为不能将哮喘发病简单归于 Th1/Th2 功能失衡，Th17/IL-17 在哮喘发病中有重要作用。Th17 通过分泌白细胞介素-17(Interleukin 17，IL-17)，可诱导气道嗜酸性粒细胞浸润、促进气道中性粒细胞募集、激活和哮喘气道炎症形成。我们前期研究发现哮喘患儿经植物血凝素活化的外周血单个核细胞体外培养上清中 IL-17 水平低于正常儿童[1]，提示 IL-17 可能经气道而非全身途径在哮喘发病中发挥作用。因此本研究分析支气管哮喘患儿与正常儿童诱导痰上清液 IL-17、白细胞介素-6(Interleukin 6，IL-6)、转化生长因子-β(Transforming growth factor-β，TGF-β)水平，探讨 IL-17 在支气管哮喘发病中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 3-9 月在重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心就诊的哮喘患儿 57 例，其中急性发作期 25 例，男 14例，女 11 例，平均年龄(9.43±1.24)岁；哮喘慢性持续期 15 例，男 8 例，女 7 例，平均年龄(8.99±1.09)岁；缓解期 17 例，男 9 例，女 8 例，平均年龄(9.02±1.09)岁。支气管哮喘诊断及分类标准参照 2008 年修订的《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》[2]。选取同期健康体检儿童 13 例为对照组，男 7 例，女 6 例，平均年龄(8.48±1.18)岁。

1.2 研究方法

1.2.1 痰诱导方法 根据 Pin 等[3]操作方法改良后诱导痰液，具有较好的安全性[4]，受试者清洁口鼻后，用医用面罩式超声雾化器，直接吸入 4%氯化钠，流量为 1 L/min，诱导 20~30 min，诱导过程中随时将痰咳于无菌的培养皿中。收集的痰液在 1 h 内处理，处理前 4℃冰箱保存。

1.2.2 诱导痰处理 显微镜下鳞状上皮细胞小于 5%并可见肺巨噬细胞的痰液为合格痰液[5]。将合格痰液量体积，加入 4 倍体积的二硫苏糖醇，震荡 10~15 min，再加入 4 倍体积的磷酸盐缓冲液，轻轻吹打至匀浆，48 μm 尼龙膜过滤，2 000 r/min 离心 10 min，上清液保存于-80℃冰箱，用于测定 IL-17、IL-6、TGF-β 等细胞因子。

1.2.3 诱导痰细胞因子测定 IL-17、IL-6、TGF-β 试剂盒为 R&D Systems 公司产品，采用双抗体夹心酶联免疫吸附法，操作严格按照试剂说明书进行。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS11.5 统计软件统计，行单因素方差分析及 *LSD* 法进行两两比较，用直线相关分析探讨两因素之间相关关系，$P<0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 资料基本特征

各组儿童性别、年龄相比无统计学差异($P>0.05$)，见表 1。

表 1 一般资料

分组	例数(n)	男：女	平均年龄
急性发作期组	25	14：11	9.43 ± 1.24
慢性持续期组	15	8：7	8.99 ± 1.09
临床缓解期组	17	9：8	9.02 ± 1.09
对照组	13	7：6	8.48 ± 1.18
P		0.997	0.099

2.2 各组诱导痰上清液 IL-17、IL-6、TGF-β 水平比较

哮喘患儿诱导痰 IL-17、IL-6 水平显著高于健康对照组；且急性期 IL-17、IL-6 水平较慢性持续期、缓解期显著增高，差异有统计学意义($P<0.05$)；诱导痰 TGF-β 水平在哮喘患儿、健康对照组间无显著差异($P>0.05$)。见表 2。

2.3 诱导痰 IL-6、TGF-β 与 IL-17 相关性分析

诱导痰 IL-6 与 IL-17 水平呈正相关($r=0.724$，$P<0.05$)，而 TGF-β 水平与 IL-17 水平无明显相关($r=0.174$，$P>0.05$)。

表 2 各组诱导痰 IL-17、IL-6 及 TGF-β 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-17(pg/ml)	IL-6(pg/ml)	TGF-β(pg/ml)
急性发作期(1)		855.39 ± 46.89	109.84 ± 23.12	528.40 ± 58.19
慢性持续期(2)	25	705.63 ± 46.29$^{\triangle}$	55.87 ± 8.29$^{\triangle}$	506.81 ± 52.73*
临床缓解期(3)	15	597.09 ± 60.26$^{\#\blacksquare}$	55.81 ± 10.02$^{\#\square}$	509.50 ± 62.14$^{※\square}$
对照组(4)	17	434.12 ± 43.63$^{\diamond\star\circ}$	45.11 ± 5.76$^{\diamond\star\blacktriangle}$	499.08 ± 53.31$^{\diamond\star\blacktriangle}$
F	13	225.951	74.458	0.935
P		0.000	0.000	0.425

注：(1)组与(2)组比较：△，$P<0.05$，*，$P>0.05$；(1)组与(3)组比较：#，$P<0.05$，※，$P>0.05$；(1)组与(4)组比较：◇，$P<0.05$，◆，$P>0.05$；(2)组与(3)组比较：■，$P<0.05$，□，$P>0.05$；(2)组与(4)组比较：★，$P<0.05$，☆，$P>0.05$；(3)组与(4)组比较：○，$P<0.05$，▲，$P>0.05$

3 讨 论

哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的慢性气道炎症性疾病。在哮喘发病的不同阶段，气道内的炎症细胞、细胞组分会发生不同变化。经典理论认为哮喘发病机制为 Th1/Th2 失衡，以产生 γ 干扰素为标志的 Th1 反应低下，免疫反应向Th2型反应倾斜，近来发现 IL-17 通过多种途径参与哮喘的发病和调节。IL-17 是由 Th17 细胞分泌的一种前炎性细胞因子，文献报道[6]，哮喘患者支气管活检、肺泡灌洗液和痰中均有 IL-17 表达，IL-17 作为哮喘发病相关细胞因子网络的重要成员之一，一方面诱导气道嗜酸性粒细胞浸润推动气道高反应性形成[7]；另一方面 IL-17 具有强大招募中性粒细胞作用，促进气道中性粒细胞募集、激活和哮喘气道慢性炎症形成，还参与变应原暴露诱发的哮喘气道炎症[8]。动物实验发现变应原激发后哮喘小鼠气道 IL-17mRNA 表达增加，且与气道炎症密切相关，IL-17 单克隆抗体则显著抑制这种炎症[9]。因此，IL-17 在哮喘发病中有重要作用。

我们研究显示哮喘患儿诱导痰 IL-17 水平明显高于正常儿童，与 Molet S 等[6]研究一致，而陈杰华等[1]报道哮喘患儿外周血单个核细胞体外培养上清中 IL-17 水平低于正常儿童，提示 IL-17 可能经气道而非全身途径在哮喘发病中发挥重要作用。哮喘急性发作期 IL-17 水平显著高于慢性持续期、缓解期，与黄秋生等[10]研究报道一致。气道 IL-17 水平升高，释放中性粒细胞弹性蛋白酶和 TNF-α 等降解弹性蛋白并促进气道腺细胞分泌产生氧自由基、白三烯类物质，导致肺组织破坏、气道腺体过度分泌、气道上皮细胞损伤、气道平滑肌痉挛、气道高反应性等，进而产生哮喘急性发作临床表现。同时 IL-17 可以通过诱导趋化因子 IL-8 释放，参与哮喘慢性炎症及气道重塑[11]。

IL-6 是由 Th2 细胞产生的一种多功能细胞因子，在免疫和炎症反应中起重要作用。哮喘患者诱导痰、肺组织 IL-6 水平升高[12]，过度表达人 IL-6 基因的转基因小鼠气道内可见淋巴细胞浸润、气道壁增厚和上皮下纤维化，IL-6 可参与哮喘气道炎症和气道结构重建过程[13]。TGF-β 是一种抗炎细胞因子，可以通过调控和抑制 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的增殖而阻碍 Th2 细胞功能和细胞因子的生成；又是一种促进炎症发展的细胞因子，可诱导大量炎性细胞趋化，研究发现[14]，TGF-β 促进 Th17 细胞分化而促进前炎症反应，缺乏 TGF-β 的小鼠体内 Th17 细胞明显减少。

本研究发现儿童哮喘急性发作期诱导痰 IL-6 明显增高，诱导痰 IL-17 与 IL-6 水平呈正相关，有研究证实 IL-6诱导表达 IL-21，通过放大自分泌形式诱导 CD4+T 细胞产生大量 IL-21、IL-23 受体，IL-21、IL-23 联合 TGF-β 诱导 Th17 表达启动 IL-17 分泌[15]。因此 IL-6、IL-17 在哮喘发病中均有重要作用。而我们发现各组儿童诱导痰 TGF-β 水平差异无统计学意义，TGF-β 与 IL-17 水平无相关性，可能与 TGF-β 本身具有双元作用有关。

诱导痰 IL-6、IL-17 在哮喘发病中具有重要作用，监测其变化水平可以了解哮喘控制水平。

参 考 文 献

[1] 陈杰华，刘恩梅，陈坤华，等.哮喘急性发作期患儿外周血 Th17 水平及其功能初步研究[J].细胞与分子免疫学杂志，2009，25(4)：359-361.

[2] 中华医学会儿科学分会呼吸学组.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.

[3] Pin I，Gibson P G，Kolendowice R，et al.Use of induced sputum cell count to investigate airway inflammation in asthma[J].Thorax，1992，47(1)：25-29.

[4] 罗征秀，蒋永惠，龚财惠，等.哮喘儿童诱导痰液安全性分析[J].重庆医科大学学报，2005，30(5)：755-756.

[5] Gibson P G，Zorzila M Z，Fakes K，et al.Pattern of airway inflammation and its determination in children with acute severe asthma[J].PediatrPulmonol，1999，28(4)：261-270.

[6] Molet S，Hamid Q，Davoine F，et al.IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines[J].J Allergy Clin Immunol，2001，108(3)：430-438.

[7] 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 Criti Care Medicine，2008，178(10)：1023-1032.

[8] Oboki K，Ohno T，Saito H，et al.Th17 and allergy[J].Allergol Int，2008，57(2)：121-134.

[9] Hellings P W，Kasran A，Liu Z，et al.Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma[J].Am J Respir Cell Mol Biol，2003，28(1)：42-50.

[10] 黄秋生，黄 茂，苏 梅，等.支气管哮喘患者诱导痰中 IL-17 水平变化及意义的探讨[J].南京医科大学学报，2003，24(4)：373-375.

[11] Kang M，Choi J，Lee C，et al.Interleukin-18 induces pulmonary inflammation and remodeling via an IL-17-dependent pathway[J].Am J Respir Crit Care Med，2010，181：A5089.

[12] Neveu W A，Allard J L，Raymond D M，et al.Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function[J].Respir Res，2010，11(1)：28.

[13] Kuhn C 3rd，Homer R J，Zhu Z，et al.Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice.Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung[J].Am J Respir Cell Mol Biol，2000，2(3)：289-295.

[14] Harrington L E，Hatton R D，Mangan P R.Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J].Nat Immunol，2005，6(11)：1123-1132.

[15] Zhou L，Ivanov I I，Spolski R，et al.IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways[J].Nature Immunology，2007，8(9)：967-974.

（责任编辑：冉明会）