临床研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1394-04

儿童斑秃与 Th1/Th2 型细胞因子关系的临床研究

欧阳莹[1],王 华[1],蒋利萍[2],王莉佳[2]
(1. 重庆医科大学附属儿童医院皮肤科,重庆 400014;2. 重庆医科大学附属儿童医院免疫研究室,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨 Th1/Th2 细胞因子平衡失调在斑秃发病中的作用,以及 Th1 型细胞功能与斑秃发病的关系。方法:对 45 例斑秃患儿按其严重程度分为局限性斑秃(Localizef alopecia areata patients,LAA)活动期组 35 例,全秃(Alopecia totalis patients,AT)及普秃(Alopecia universalis patients,AU)为一组 10 例,并以 25 例健康儿童为正常对照组作为研究对象。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测在卡介苗多糖核酸(BCG-PSN)治疗前后 3 个月血清中 IFN-γ、IL-12 及 IL-4、IL-10 水平。结果:①斑秃患儿存在 Th1/Th2 细胞因子平衡紊乱,表现为血清中 IFN-γ 均明显高于正常组儿童,且 AT/AU 组明显高于 LAA 组;IL-12 水平在 LAA 组与正常组儿童无显著差别,但 AT/AU 组明显高于正常对照组;而 IL-4、IL-10 水平在 LAA 组及 AT/AU 组与正常对照组相比均无显著性差异。②BCG-PSN 治疗后可使斑秃患儿血清中 IFN-γ 水平较治疗前明显下降,同时 IL-12 水平在 LAA 组较治疗前也明显下降,但 AT/AU 组治疗前后无显著差别。而 IL-4、IL-10 水平治疗前后均无显著性差异。③血清中 IFN-γ 与 IL-12 水平成显著正相关。结论:①斑秃的发病与 Th1/Th2 细胞因子平衡失调有关,表现为 Th1 型细胞反应亢进,其中可能主要与 IFN-γ、IL-12 水平有关。②血清 IFN-γ、IL-12 水平高低可以作为提示斑秃病情严重性的指标。

【关键词】斑秃;Th1/Th2;IFN-γ;IL-12
【中国图书分类法分类号】R758.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-20

Clinical research on the relationship between type Th1/Th2 cytokine and childhood alopecia areata

OU Yang-ying, et al
(*Department of dermatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: In order to demonstrate the role of Th1/Th2 lymphocyte imbalance in the mechanism of alopecia areata (AA) and the relationship between Th1 function and AA. ***Methods***: Forty-five AA patients and 25 healthy children (control group) were involved in the study. According to the extent of the disease, all involved patients were then divided into 2 groups: LAA group (35 localized alopecia areata patients), and AT/AU group (10 alopecia totalis or alopecia universalis patients). IFN-γ, IL-12, IL-4 and IL-10 levels were detected using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in childhood alopecia areata before and after 3 months treatment. ***Results***: ①The balance of Th1/Th2 was disturbed in childhood alopecia areata. The serum levels of IFN-γ were significantly increased in the AA patients compared to the the levels in control group, and the level of AT/AU patients was higher than LAA patients. The level of IL-12 in AT/AU group had significant difference between patients and control, but there wan no significant difference in LAA group. In addition, the difference related to the IL-4 and IL-10 levels was not significant. ②The level of serum IFN-γ in AA patients were significantly decreased after the treatment of BCG-PSN; and the result of serum IL-12 in LAA group was same to IFN-γ, but AT/AU patients had no significant difference. While no difference on the IL-4 and IL-10 levels between before and after the treatment significantly. ③The serum IFN-γ levels had a positive correlationship with the serum IL-10 levels. ***Conclusions***: ①Th1/Th2 immunoregulation disturbance was related with the occurrence of AA, characterized by Th1 lymphocyte hyperaction. The onset of the disease was regulated by the Th1 cytokines, and IFN-γ and IL-12 probably played a leading role. ②The serum levels of IFN-γ and IL-12 could be used as indicators of the extent of the disease.

【Key words】Alopecia areata; Th1/Th2; IFN-γ; IL-12

近年儿童斑秃的发病率逐年上升,然而其发病原因和机制至今尚不完全清楚。目前对斑秃的研究主要集中在细胞免疫方面,公认的观点是斑秃属一种由 T 淋巴细胞介导的常见毛发病,在皮损内毛囊周围浸润的 T 淋巴细胞及细胞因子在斑秃的发病过程中起着非常重要的作用[1]。为了探讨儿童斑秃与细胞因子的关系,我们观察了斑秃患儿经卡介苗多糖核酸治疗前后 3 个月血清 IFN-γ、IL-12 及 IL-4、IL-10 的水平变化,以探讨 Th1/Th2 细胞因子平衡失调在斑秃发病中的作用,以及 Th1 型细胞功能与斑秃发病的关系。

作者介绍:欧阳莹(1963-),女,副主任医师,硕士,
研究方向:脱发性皮肤病。
通讯作者:王 华,男,副教授,E-mail:huawang@hotmaid.com。

1 对象与方法

1.1 临床资料

选取我院皮肤科门诊斑秃患儿共计 45 例，其中局限性斑秃活动期(Localizef alopecia areata patients，LAA)35 例，男 24 例，女 11 例，正常年龄 1~14 岁，平均(7.67 ± 3.48)岁，病程 15 d 至 2 年，平均病程 2 个月；全秃/普秃(Alopecia totalis patients，AT/Alopecia universalis patients，AU)共 10 例，男 6例，女 4 例，年龄(6.85 ± 4.45)岁，病程 8 个月至 3 年，平均病程 12 月。25 例正常对照来自我院体检健康儿童，年龄 1~14 岁，平均(7.06 ± 3.35)岁，体检及实验室检查均正常，与斑秃组在年龄和性别上无显著性差异($P>0.05$)。

1.2 治疗方法

斑秃患儿组：给予 BCG-PSN(湖南斯奇康医药有限公司)肌注，每次 1 ml(0.35 mg)，隔日 1 次，连用 3 个月，同时采用口服胱氨酸片，B 族维生素。每月复诊 1 次，观察头发生长情况，治疗前后均采血检查血清中 IFN-γ、IL-12 及 IL-4、IL-10 的水平。

1.3 主要试剂及仪器

IL-12、IFN-γ 及 IL-4、IL-10 ELISA 试剂盒：深圳晶美生物工程有限公司；-20℃医用低温冰箱：SANYO，Japan.；台式高速离心机：Eppendorf5415c，German；隔水式电热恒温培养箱：上海跃进医疗器械厂；酶标仪：Sunrise，Austria.

1.4 实验方法

1.4.1 标本收集 在无菌条件下采集外周静脉血 3 ml，置于干燥试管中，经 2 500 r/min 3 min 离心得到待测血清，冷藏于 -20℃冰箱保存待检，等全部标本收齐后进行仪器检测。

1.4.2 细胞因子 ELISA 测量 平衡至室温的密封袋中取出所需板条；除空白孔外，分别将标本或不同浓度标准品加入相应孔中，用封板胶纸封住板孔，37℃孵箱孵育 90 min；洗板 4 次。洗板时，甩尽板内液体，用洗涤液洗涤反应板，并去除水滴；除空白孔外，分别加入生物素抗体工作液(100 μl/孔)，封住板孔，37℃孵箱孵育 60 min；洗板 4 次；除空白孔外，分别加入酶结合物工作液(100 μl/孔)，封住板孔，37℃孵箱孵育 30 min；洗板 4 次；分别加入显色剂 100 μl/孔，37℃孵箱显色 10~15 min；分别加入终止液 100 μl/孔，混匀后即刻测量 OD_{450} 值(5 min 内)。

1.4.3 结果判断 每个标准品和标本的 OD 值减去零孔的 OD 值；以 OD 值为横坐标，以标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线；标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度乘以稀释倍数。

1.5 统计学方法

所有实验数据采用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用 SPSS11.0 统计软件包分析，各组样本均数先进行方差齐性检验，若方差齐同，采用单因素方差分析；若方差不齐，采用多个样本比较的秩和检验。$P<0.05$ 表明差异有统计学意义。2.1 采用单因素方差分析，两两比较用 q 检验；2.2 用配对 t 检验分析；2.3 用多个样本比较的秩和检验；2.4 用配对 t 检验分析；2.5 作正态性检验，数据呈正态分布，采用简单直线相关分析。

2 结 果

2.1 斑秃患儿和正常儿童血清 IFN-γ、IL-12 的水平比较

经方差分析发现，血清 IFN-γ 水平在 3 组之间有非常显著性差异($P<0.01$)。用 q 检验进行两两比较发现，血清 IFN-γ 水平在 LAA 组和 AT/AU 组均明显高于正常组儿童($P<0.05$ 及 $P<0.01$)，而 AT/AU 组又较 LAA 组明显升高($P<0.05$)。方差分析可见血清中 IL-12 水平在 3 组之间有显著性差异($P<0.05$)。用 q 检验进行两两比较发现 LAA 组与正常组儿童无显著性差异($P>0.05$)，但 AT/AU 组明显高于正常组儿童($P<0.05$)，LAA 组与 AT/AU 组无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 斑秃患儿治疗前后血清中 IFN-γ、IL-12 的水平比较

经配对 t 检验分析，斑秃患儿 LAA 组经治疗后 IFN-γ 水平较治疗前明显降低($P<0.05$)；且 AT/AU 组 IFN-γ 水平较治疗前明显降低($P<0.01$)。同时 IL-12 水平在 LAA 组治疗后亦明显降低($P<0.01$)，但 AT/AU 组治疗前后无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 斑秃患儿和正常儿童血清 IL-4 及 IL-10 的水平比较

用多个样本比较的秩和检验，IL-4 水平在 3 组之间无显著性差异($P>0.05$)，即斑秃患儿与正常组儿童相比 IL-4 水平无明显差别。IL-10 水平在 3 组之间无显著性差异($P>0.05$)，同样表明斑秃患儿 IL-10 水平与正常组儿童比较无明显差别。

表 1 斑秃患儿和正常儿童血清 IFN-γ、IL-12 的水平表达(Pg/ml)

组别	例数	IFN-γ	IL-12
AT/AU	10	12.42 ± 3.25**	122.24 ± 33.48*
LAA	35	9.34 ± 3.50*	110.81 ± 29.51
对照组	25	7.06 ± 5.07	97.05 ± 25.56

注：1.* 表示与对照组相比较，$P<0.05$；2.** 表示与对照组相比较，$P<0.01$

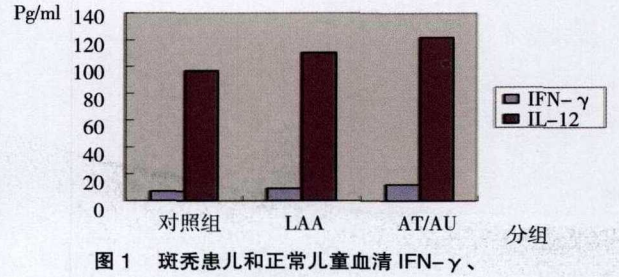


图 1 斑秃患儿和正常儿童血清 IFN-γ、IL-12 的水平表达(Pg/ml)

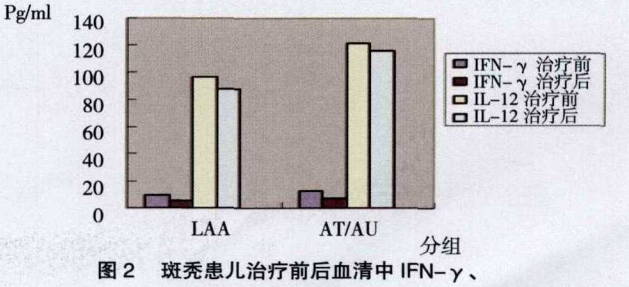


图 2 斑秃患儿治疗前后血清中 IFN-γ、IL-12 的水平表达(Pg/ml)

2.4 斑秃患儿治疗前后血清中 IL-4 及 IL-10 水平

经配对 t 检验分析，斑秃患儿 LAA 组治疗后 IL-4 水平与治疗前相比无升高（$P>0.05$）；AT/AU 组治疗前后亦无显著性差异（$P>0.05$）。IL-10 水平在 LAA 组治疗后与治疗前相比无升高（$P>0.05$）；AT/AU 组同样治疗前后亦无显著性差异（$P>0.05$）。

2.5 相关性分析

先分别将数据作正态性检验，呈正态分布，故作简单直线相关分析。结果发现 IFN-γ 与 IL-12 水平呈显著正相关，$r=0.77$（$P<0.01$）。IFN-γ 与 IL-4、IL-10 均无相关性。

3 讨 论

斑秃是一种良性、非瘢痕性秃发。Gilhar 等[2]研究结果表明斑秃可被 T 淋巴细胞的转移来诱导产生，而 T 淋巴细胞能识别毛囊自身抗原。同时发现毛发的脱落需要 $CD8^+$ 和 $CD4^+$T 细胞的合作。$CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞之比约为 2:1，以 $CD4^+$T 细胞为主。$CD4^+$T 细胞可分为 Th1 和 Th2 亚群，Th1 主要分泌 IFN-γ、IL-12 等，称为 Th1 型细胞因子。Th2 主要分泌 IL-4、L-10，称为 Th2 型细胞因子。

Th1、Th2 细胞因子可以促进本亚群和抑制另一亚群的生长、分化。Th1 和 Th2 细胞功能失衡和自身免疫性疾病的发生有关。近年来国外的研究认为在器官特异性自身免疫性

表 2 斑秃患儿治疗前后血清中 IFN-γ、IL-12 的水平表达（Pg/ml）

组别	例数		IFN-γ		IL-12	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
AT/AU	10	4	12.42 ± 3.25	7.17 ± 1.00**	122.24 ± 33.48	116.39 ± 9.52
LAA	35	12	9.34 ± 3.50	5.18 ± 1.96*	110.81 ± 29.51	87.90 ± 13.26*

注：1.* 表示与治疗前相比较，$P<0.05$；2.** 表示与治疗前相比较，$P<0.01$

表 3 斑秃患儿和正常儿童血清 IL-4 及 IL-10 的水平（Pg/ml）

组别	例数	IL-4	IL-10
AT/AU	10	16.28 ± 2.22	67.83 ± 19.71
LAA	35	14.13 ± 9.19	78.86 ± 49.80
对照组	25	11.27 ± 7.40	75.67 ± 42.30

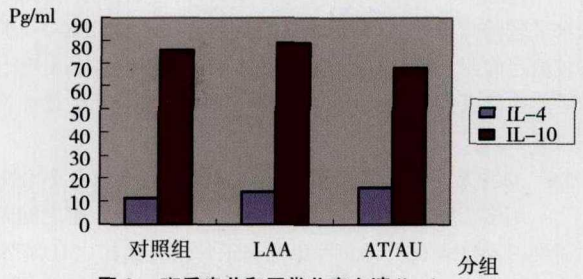


图 3 斑秃患儿和正常儿童血清 IL-4 及 IL-10 的水平（Pg/ml）

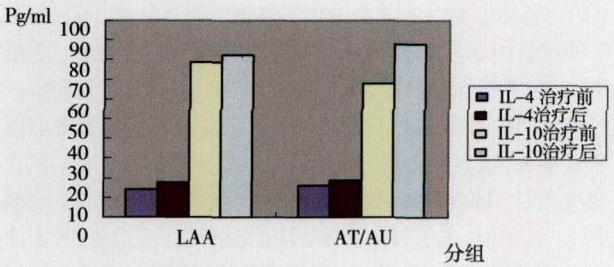


图 4 斑秃患儿治疗前后血清 IL-4、IL-10 水平表达（Pg/ml）

表 4 斑秃患儿治疗前后血清 IL-4、IL-10 水平表达（Pg/ml）

组别	例数		IL-4		IL-10	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
AT/AU	10	4	16.28 ± 2.22	18.63 ± 5.10	67.83 ± 19.71	88.05 ± 39.61
LAA	35	12	14.13 ± 9.19	17.85 ± 10.64	78.86 ± 49.80	82.36 ± 58.21

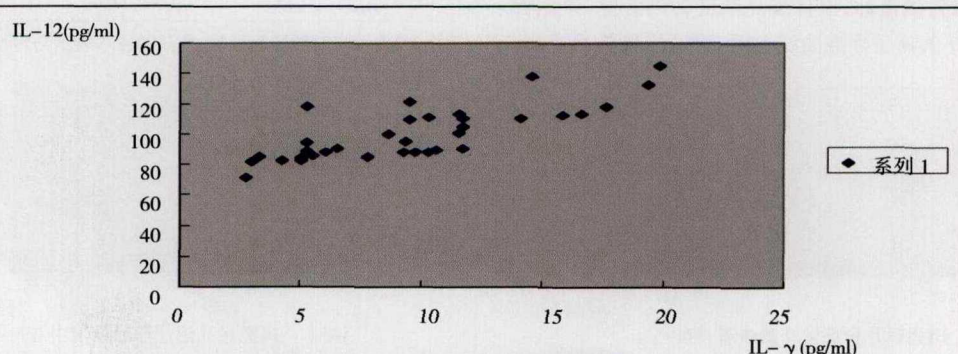


图 5 IFN-γ 与 IL-12 水平的散点图

疾病中,Th1 型细胞因子可以诱导疾病发生,加快疾病进程;Th2 型细胞因子能阻止发病,缓解病情[3]。Namazi[4]认为 Th1 淋巴细胞在斑秃的发病机理方面起着关键的作用。Th2 淋巴细胞的反应可以抑制 Th1 的组织损伤作用。

Gilhar 等[5]研究发现 Th1 细胞因子在斑秃皮损内活性增高;由 $CD4^+$ 细胞产生的 IFN-γ 通过诱导 HLA—A,B,C 以及 CD54 在毛囊上皮细胞表达而促进 $CD8^+$ 细胞发挥作用,且 $CD4^+$ 细胞通过细胞因子 IL-2 等介导 CD8+ 细胞激活及细胞毒作用。Gilhar[6]等研究结果也支持 IFN-γ 介导的 Th1 淋巴细胞在斑秃发病中的主导作用。IFN-γ 在细胞介导的免疫应答中起着很重要的作用。Arca 等[7]研究发现在斑秃患者中 LAA 及 AT/AU 组血清 IFN-γ 水平均明显高于正常对照组,而在 LAA 及 AT/AU 组的血清 IFN-γ 水平却无明显的差异。由此推论 IFN-γ 水平升高可以反映斑秃病情的严重程度。测定患者血清中 IFN-γ 的水平有利于区分持续发作的局限性斑秃是否可能发展为普秃,可以作为斑秃预后的指征。本研究发现 IFN-γ 水平在斑秃患儿 LAA 组及 AT/AU 组均明显高于正常组儿童。但与 Arca 等观察结果不同的是:AT/AU 组 IFN-γ 水平亦明显高于 LAA 组($P<0.05$)。由此进一步说明斑秃病情的轻重可能与 IFN-γ 水平高低有关。Skurkovich 等[8]认为 IFN—γ 在正常免疫过程中是一个重要的免疫调控因子,当 IFN—γ 的含量升高时,就会引起各种自身免疫性疾病。我们的结果也说明了血清 IFN-γ 水平升高,可能代表斑秃病情的严重程度,可以作为观测斑秃患儿病情严重性的指标。IL-12 与 IFN-γ 之间的作用是相互的。Namazi[9]发现 IL-12 在辅助性 T 细胞调控的细胞免疫反应中,起着关键的作用,通过抑制 IL—12 的活性可以治疗斑秃。本实验发现 IL-12 水平在 LAA 组与正常组儿童无显著性差异;但 AT/AU 组明显高于正常组儿童($P<0.05$)。从以上 IFN-γ 与 IL-12 的相互关系,我们将 IFN-γ 与 IL-12 作了相关性分析,结果为 IL-12 与 IFN-γ 成显著正相关($r=0.77$,$P<0.01$)。故我们推测 IL-12 水平的高低可以同时作为观察斑秃病情严重性的指征。

IL-4 及 IL-10 同为 Th2 型细胞因子,在斑秃中研究较多的是 IL-10。其主要作用是抑制 Th1 型细胞的免疫应答,对 IL-12 的合成有强烈抑制效应,是免疫系统中显示抑制作用的重要因子。IL—10 最近被认为是 Th1 细胞的免疫调节剂。它可以恢复内环境的稳定,通过抑制某些 Th1 细胞因子的产生,用于治疗一些自身免疫性疾病,包括斑秃[10,11]。Tang 等[12]在 DEBR 斑秃大鼠模型中检测到经蒽林治疗后长出毛发的皮损处 Th1 细胞因子 IFN-γ,TNF-α 表达受抑制,而 Th2 细胞因子 IL-10,IL-4 表达增强。本研究发现斑秃患儿与正常组儿童之间 IL-4、IL-10 水平均无明显差别,这与国内一学者[13]报道结果相似。说明 Th2 细胞因子在斑秃的发病中可能不起主要作用。我们将 IFN-γ 与 IL-4、IL-10 作了相关性分析,发现 IFN-γ 与 IL-4、IL-10 均无相关性。由此进一步说明了斑秃主要是由 Th1 型细胞因子介导的,与细胞免疫有关的自身免疫性疾病。表现为 Th1 型细胞反应亢进。

我们的研究首次将 Th1 型代表细胞因子 IL-12、IFN-γ 一起观察在儿童斑秃发病中的作用。结果发现 Th1 型细胞反应亢进,而 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 反应稳定不变。以致引起 Th1/Th2 平衡失调,导致疾病的发生。结果表明斑秃的发病与 Th1/Th2 细胞因子平衡失调有关,表现为 Th1 型细胞反应亢进,其中可能主要与 IFN-γ、IL-12 水平有关。通过观察 IFN-γ、IL-12 水平的高低可以作为提示斑秃病情严重性的指标。本研究为临床上判断斑秃病情的严重性提供了充分的实验室证据。并为临床上用免疫调节剂治疗斑秃提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

[1] Kalish R S, Johnson K L, Hordinsky M K. Alopecia areata. Autoreactive T cells are variably enriched in scalp lesions relative to peripheral blood[J]. Arch Dermatol, 1992, 128(8): 1072-1077.

[2] Gilhar A, Shalaginov R, Assy B. Alopecia areata is a T-lymphocyte mediated autoimmune disease: lesional human T-lymphocytes transfer alopecia areata to human skin grafts on SCID mice[J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 1999, 4(3): 207-210.

[3] Teraki Y, Imanishi K, Shiohara T. Cytokines in alopecia areata: contrasting cytokine profiles in localized form and extensive form (alopecia universalis) [J]. Acta Derm Venereol, 1996, 76(6): 421-423.

[4] Namazi M R. Nitric Oxide donors as potential additions to anti-alopecia areata armamentarium[J]. Inflamm Res, 2003, 52(6): 227-229.

[5] Gilhar A, Landau M, Assy B, et al. Alopecia areata is mediated by coorperation between $CD4^+$ and $CD8^+$ T-lymphocytes: transfer to human scape explants on Prkdcscid mice[J]. Acta Dermatol, 2002, 138(7): 916-922.

[6] Gilhar A, Kalish R S. Alopecia areata: a tissue specific autoimmune disease of the hair follicle[J]. Autoimmun Rev, 2006, 5(1): 64-69.

[7] Arca E, Musabak U, Akar A, et al. Interferon-gamma in alopeia areata [J]. Eur J Dermatol, 2004, 14(1): 33-36.

[8] Skurkovich B, Skurkovich S. Anti-interfon-gamma antibodies in the Treatment of autoimmune disease[J]. Curr Opin Mol Ther, 2003, 5(1): 52-57.

[9] Namazi M R. The potential efficacy of thalidomide in the treatment of recalcitrant alopecia areata[J]. Med Hypotheses, 2003, 60(4): 513-514.

[10] Hoffmann R, Wenzel E, Huth A, et al. Cytokine mRNA Levels in alopecia areata before and after treatment with the contact allergen diphenylcyclopropenone [J]. J Invest Dermatol, 1994, 103(4): 530-533.

[11] Skurkovich S V, Skurkovich B, Kelly J A. Anticytokine therapy-new approach to the treatment of autoimmune and cytokine-disturbance diseases[J]. Med Hypotheses, 2002, 59(6): 770-780.

[12] Tang L R, Cao L P. Cytokines and siganl transduction pathways mediated by anthralin in alopecia areata affected dundee experimental balding rats [J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 2003, 8(1): 87-90.

[13] 岁 敏,章进华,廖朝晖,等. 斑秃患者血清 r 干扰素和白介素 10 水平的研究[J]. 岭南皮肤性病学杂志, 2004, 11(1): 6-8.

(责任编辑:冉明会)