维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0828-03

遗传因素对脐血 Th1/Th2 平衡的影响

朱丽敏,钱 迪,董小琴,洪苏玲

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨遗传影响因素(父母有无过敏性疾病(Allergic diseases,AD)史)对新生儿脐血单个核细胞 Th1/Th2 平衡的影响。方法:取正常足月新生儿脐血为研究对象,其中 20 例父母有过敏性疾病史(AD 组)和 20 例无过敏性疾病史(对照组)。收集脐血血浆并分离单个核细胞(CBMC),体外经植物血凝素(PHA)刺激,MTT 比色法检测细胞增殖活性,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测培养 48h 后细胞培养上清液中 IL-2、IL-4、IFN-r、GM-CSF 的水平。结果:数据显示:AD 组与对照组相比:(1)脐血血浆中 IL-2、IL-4、GM-CSF 有显著性差异($P < 0.05$),IFN-r 无显著性差异;(2)PHA 干预培养 48h 后细胞培养上清夜中 IL-2、IL-4、IFN-r、GM-CSF 均有显著性差异($P<0.05$)。结论:遗传因素与新生儿变应性疾病的发生有密切相关。

【关键词】遗传;脐血;变应性疾病;Th1/Th2

【中国图书分类法分类号】R593.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-31

Heredity effect on cord blood Th1/Th2 cells

ZHU Li-min, et al

(*Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of heredity on functional states of Thl/Th2 in cord blood mononuclear cells(CBMC) of neonates, whether their parents have anaphylactic disease. *Methods*: Cord blood was taken from 40 normal full term neonatals, who were divided into 20 ones with their parents having anaphylactic disease(AD group), and 20 not(control group). Collect blood plasma and cord blood mononuclear cells(CBMC)of neonates were separated, Blood plasma was collected and after stimulation with PHA, cell proliferation was detected by MTT method. IL-2, IL-4, IFN-r, and GM-CSF in supernatant were assayed by ELASA after CBMCs were cultured in vitro for 48h. *Results*: In AD group, as compared with control group: (1)The expression of IL-2, IL-4 and GM-CSF in blood plasma were higher than those of control group($P<0.05$), but not IFN-r.(2) Cytokines' expression of IL-2, IL-4, IFN-r, and GM-CSF were increased after PHA stimulation for 48 hours, with significant different from those in control group($P<0.05$). *Conclusion*: Heredity effect may play an important role in generation and progression of newborn allergic diseases.

【Key words】 Heredity; Cord blood; Allergic diseases; Thl/Th2

近年来 AD 在国内外均有逐渐增高趋势,其发病机制与多种病因有关:遗传易感性,环境变应原接触,产前危险因素的暴露,炎症刺激,社会心理因素等[1],而先天因素在其中可能占据主导地位。研究表明,I 型变态反应发生与个体的遗传过敏体质关系甚大,在相同抗原、相同剂量抗原的接触下,具有遗传过敏体质者往往表现为较强的特异性免疫应答,在体内产生较多的 IgE,因此较易发生各种速发型的变态反应疾病。已有研究证实,新生儿期 Th 细胞功能明显低下,产生各种细胞因子的能力普遍不足[2,3],尤以 Th1 类细胞因子低下更显著,呈现低水平的 Th2 优势状态,本研究旨在探讨遗传影响因素中新生儿父母有过敏性疾病史或家族史对新生儿 Th1/Th2 平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

作者介绍:朱丽敏(1981-),女,硕士,研究方向:免疫性疾病的基础与临床研究。

通讯作者:洪苏玲,女,教授,E-mail:hsl_prof@163.com。

基金项目:国家"十五"科技攻关项目(2004BA720A19-02)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2006 年 6 月～12 月在重庆医科大学附属第一医院妇产科出生的正常足月产新生儿脐血 40 例(男 19 例,女 21 例;胎龄 37～41 周;出生体重 2 500～4 000g),出生无窒息史,无胎膜早破和宫内感染史,其母无异常妊娠史及血制品、免疫调节药物应用史。分为对照组 20 例(新生儿父母均无过敏性疾病史);过敏组 20 例(新生儿父亲或母亲有过敏性疾病史(如变应性鼻炎、哮喘、湿疹、荨麻疹、血管神经性水肿、接触性皮炎、药物或食物过敏史)者)。植物血凝素(PHA)(美国 Sigma 公司),人淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限公司),新生小牛血清(四季青),四氮唑蓝(MTT)(重庆基研所),细胞因子 ELASA 检测试剂盒(晶美公司)。全自动酶标仪(TECAN)。

1.2 脐血血浆收集及 CBMC 提取

取抗凝脐血离心后收集血浆于 -80℃保存以备测,然后采用密度梯度离心法分离 CBMC,等量 PBS 稀释后每管加等倍体积的淋巴细胞分离液,2 000r/min,离心 20min 后取中间环状乳白色单个核细胞层后等倍 1640 洗涤 2 遍后,采用台盼兰染色,活细胞计数 > 95%,用 RPMI1640 培养液配制成 1×10^9 个 /L 的细胞悬液。

1.3 MTT 法检测 PHA 对 CBMC 增殖的影响

以 10^5 个 /mlCBMC 培养于含 PHA(终浓度为 5g/ml)的含 10%小牛血清 1640 培养液的 96 孔板中,以 RPMI1640 培养液做空白对照,每孔 200μl。每组均设 4 复孔,分别在 37℃ 5%CO_2 孵箱中孵育培养 24h、48h、72h。停止孵育前 4h 每孔加入 MTT20μl(终浓度 5g/L),4h 后离心后弃去上清,加入 DMSO200μl,振荡 10min 后酶标仪 570nm 处测 OD 值。每组检测前均用台盼蓝染色,活细胞均 > 95%。

1.4 细胞培养上清液的提取

取 200μl 密度为 10^7 个 /mlCBMC 细胞悬液加入 1.8ml 含 10%的灭活小牛血清和 PHA(终浓度为 5μg/ml)的 RPMI1640 培养瓶中混匀后,放入 37℃体积分数 0.05 的 CO_2 培养箱中培养 48h,然后收集上清液 1 500μl 于 -80℃保存以备测。

1.5 细胞因子的检测

脐血血浆与培养液中 IL-2、IL-4、IFN-r、GM-CSF 的测定:采用 ELISA 法,按试剂盒说明书进行。

1.6 结果判断

在全自动酶标仪(TECAN)上,波长为 450nm 处测 OD 值。以标准品浓度作横坐标,OD 值作纵坐标,绘制标准曲线,通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学处理。多组均数间比较用方差分析,两两间比较用 t 检验,全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两变量间相关分析采用直线相关分法。

2 结 果

2.1 PHA 对 CBMC 增殖的影响结果分析

培养 24h、48h、72h3 个时间段里,OD 值均增高,但是和 24h 相比,48h 时的 OD 值有突出的显著性差异(见表 1)。

2.2 脐血血浆 IL-2、IL-4、IFN-r、GM-CSF 的测定

AD 组血浆中 IL-4、GM-CSF 高于非 AD 组,IL-2 低于非 AD 组,均有明显差异性($P<0.05$),IFN-r 无显著差异性(见表 2)。

2.3 CBMC 培养上清液中 IL-2、IL-4、IFN-r、GM-CSF 的测定

表 1 PHA 对 CBMC 增殖的影响结果

时间	OD 值
24h	0.019 ± 0.015
48h	0.055 ± 0.011[b]
72h	0.067 ± 0.028[a]

a. $P<0.05$, b. $P<0.01$, 与 24h 比较

表 2 2 组血浆中 IL-2、IL-4、IFN-r、GM-CSF 水平($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	IL-2(pg/ml)	IL-4(pg/ml)	IFN-r(pg/m)	GM-CSF(pg/ml)
对照组	20	19.040 ± 2.528	10.842 ± 2.696	15.159 ± 6.633	22.501 ± 5.57
AD 组	20	11.015 ± 3.339[b]	29.040 ± 9.401[b]	14.094 ± 8.027	38.464 ± 12.900[b]

b. $P<0.01$, 与对照组比较

表 3 CBMC 培养液中细胞因子检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	IL-2(pg/ml)	IL-4(pg/ml)	IFN-r(pg/ml)	GM-CSF(pg/ml)
对照组	20	14.185 ± 2.499	23.143 ± 4.767	13.568 ± 5.430	134.081 ± 119.898
AD 组	20	10.674 ± 2.725[b]	20.440 ± 3.362	18.176 ± 4.641[a]	231.864 ± 316.258[a]

a. $P<0.05$, b. $P<0.01$, 与对照组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

AD 组与对照组相比，IL-2、IFN-r、GM-CSF 有显著性差异($P < 0.05$)，IL-4 无明显差异(见表 3)。

3 讨 论

变应性鼻炎是儿童常见的变态反应性疾病，一个全球性常见病，全球发病率有增高趋势。涉及到遗传、环境、免疫、自身因素、母亲病史、社会行为、经济状况、个体行为及心理因素等诸多方面[1-4]，越来越引起众多学者的注意。其中遗传和环境因素的改变是导致疾病发生的重要原因。从免疫学理论上讲防治变态反应的关键在于阻止 Th0(未受抗原刺激的 T 辅助淋巴细胞)向 Th2 转化，或已有 Th2 占优势的向 Th1 转化。新生儿是个特殊时期，由于免疫细胞未受到抗原刺激，因而免疫功能不成熟。细胞因子如 IFN-r、IL-2、IL-4 免疫功能不成熟。细胞因子如 IFN-r、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 等明显低于成年人和成长儿，这是新生儿易发生感染的重要原因，随着不断接触各种抗原免疫细胞，尤其是 T 淋巴细胞功能逐渐完善，上述细胞因子随之达到正常水平。虽然上述细胞因子在新生儿均低下，但为防止母婴排斥反应(Th1 细胞负责排斥反应)，Th1 类细胞因子 IFN-r、IL-2、IL-12、IL-18 水平呈生理性低下，因此在此时期接触过敏原最易引发过敏性体质，因为 Th1 低下，Th2 就会相对占优势，而过敏性体质是由于 Th2 类细胞因子产生过多，Th1 类细胞因子不足所致，这也是日后发生哮喘、过敏性鼻炎、异位性皮炎的基础。因此，在此时期，甚至婴幼儿期接触过敏原最易引发过敏性体质。

本实验采用 ELASA 方法检测脐血血浆中细胞因子，发现其表达量均不高，AD 组血浆中 IL-4、GM-CSF 高于非 AD 组，IL-2 低于非 AD 组，均有明显差异性($P<0.05$)，IFN-r 无显著差异性；PHA 干预培养 CBMC48h 后细胞因子中 IL-2、IL-4、IFN-r、GM-CSF 均增多，其中 AD 组 IL-2、IFN-r、GM-CSF 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)，IL-4 无明显差异，提示父母遗传因素对新生儿免疫状态有一定的影响。

有学者曾提出“变应性鼻炎和支气管哮喘是一个被低估了的疾病”，主要是指低估了它的严重性，对生活质量的显著影响和人与自然的和谐，患病率或发病率与上下呼吸道炎症反应的相关性等。高危患儿基于本身的遗传因素、特异性体质、社会环境等因素而构成特殊群体，该群体具有可转化性，上述诸多因素的存在都驱使该群体中部分患儿在今后生长发育的某个阶段或某种诱发因素的作用而成为变态反应性疾病患者，但早期干预治疗可增加其逆转过程，使该群体中多数患儿通过干预治疗减少发病或转化为健康儿童[5,6]。

目前变应性鼻炎的治疗主要包括避免接触致敏的变应原、药物治疗、免疫治疗(脱敏治疗)和手术治疗。免疫治疗是通过直接影响患者的免疫系统，从细胞和体液免疫的角度，调节患者的免疫平衡，其基本原理是通过抑制 Th2 免疫反应和刺激 Th1 免疫反应，达到控制变应性症状的目的。免疫治疗在变态反应病方面发挥重要作用，而细胞免疫在抗变态反应中发挥重要作用。Th1/Th2 失衡假说，认为 I 型变态反应所致的过敏性疾病的发生与其失衡密切相关，通过干预淋巴细胞凋亡，调节 Th1/Th2 平衡来调节 T 淋巴细胞功能是新生儿免疫治疗的重要方法[7]。随着流行病学、免疫学、遗传学和分子生物学研究水平的不断提高，以及对变应性疾病的深入研究，相信不久就会有一套有效的诊断、治疗和预防办法。

参 考 文 献

[1] Chung EK, Miller RL, Wilson MT, et al. Antenatal risk factors, cytokines and the development of atopic disease in early childhood [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007; 92(1): F68-73.

[2] Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, et al. Age-related changes in intracellular Th1/Th2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults[J]. Biol Neonate, 2003; 84(4): 297-303.

[3] Perez-Cruz I, Fallen P, Madrigal JA, et al. Naive T cells from cord blood have the capacity to make Types 1 and 2 cytokines[J]. Immunol Lett, 2000; 75(1): 85-88.

[4] Devereux G, Barker RN, Seaton A. Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens[J]. Clin Exp Allergy, 2002; 32(1): 43-50.

[5] Arshad SH, Tariq SM, Matthews S, et al. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 Years: a whole population birth cohort study[J]. Pediatrics, 2001; 108(2): E33.

[6] Van Bever HP. Early events in atopy[J]. Eur J Pediatr, 2002; 161(10): 542-546.

[7] Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease[J]. Clin Exp Allergy, 2002; 32(5): 796-802.

(责任编辑：冉明会)