

哮喘患者诱导痰和外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞的检测及意义

李向阳 何江玲 曾宪升 郑玉兰 吴 斌

(襄阳市中心医院(襄樊学院附属医院) 湖北 襄阳 441021)

摘要 目的 研究 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞在哮喘患者急性发作期诱导痰和外周血中的比例改变,并探讨其临床意义。方法 以 28 例哮喘急性发作期患者为研究组,22 名正常人作为对照组,采用二色直接荧光素标记法和多参数流式细胞仪检测诱导痰和外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞的比例,同时检测外周血 IL-4、Ig-E 及 INF- γ 等水平。结果:哮喘患者急性发作期诱导痰和外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞明显高于健康对照组 ($P<0.01$)。哮喘患者急性发作期外周血 IL-4、Ig-E 及 INF- γ 等水平明显高于健康对照组 ($P<0.05$)。哮喘患者外周血中 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞比例与 IL-4、Ig-E 及 INF- γ 升高成正相关。结论 哮喘患者急性发作期诱导痰和外周血中的 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞明显增高,CD3⁺CD56⁺NKT 细胞可能通过调节 IL-4、Ig-E 及 INF- γ 等细胞因子从而在哮喘的发病机制发挥重要作用。

关键词 哮喘; NKT 细胞; 免疫调节; 流式细胞术

中图分类号: R562.25 **文献标识码**: A **文章编号**: 1673-6273 (2011) 09-1751-03

Significance of Detecting CD3⁺ CD56⁺ NKT Cells in Induced Sputum and Peripheral Blood from Patients with Asthma

LI Xiang-yang, HE Jiang-ling, ZENG Xian-sheng, ZHENG Yu-lan, WU Bin

(The Central Hospital of Xiangyang City, 441021, XiangFan, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of CD3⁺ CD56⁺ NKT cells in induced sputum and peripheral blood in pathogenesis of acute asthma. **Methods:** CD3⁺ CD56⁺ NKT cells in the induced sputum and peripheral blood in 28 patients with acute asthma and in 22 normal subjects were detected by fluorescein labeling method and flow cytometry, at the same time, the levels of IL-4, Ig-E and INF- γ in the peripheral blood were detected. **Results:** The percentage of CD3⁺ CD56⁺ NKT cells in 28 patients with acute asthma was much higher than that of induced sputum and peripheral blood in normal subjects ($P<0.01$). And the levels of IL-4, Ig-E and INF- γ in 28 patients were higher than that of peripheral blood in normal subjects ($P<0.05$). The percentage of CD3⁺ CD56⁺ NKT cells were positively correlated with IL-4 and NF- γ . **Conclusions:** CD3⁺ CD56⁺ NKT cells in the induced sputum and peripheral blood in acute asthma patients was increased, CD3⁺ CD56⁺ NKT cells perhaps play an important role in the pathogenesis of asthma by modulating IL-4, Ig-E and INF- γ .

Key words: Asthma; NKT cells; Immunoregulation; Flow cytometry

Chinese Library Classification: R562.25 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 09-1751-03

前言

支气管哮喘是以嗜酸粒细胞、肥大细胞和 T 淋巴细胞浸润为主的多种炎性细胞、炎症介质参与的气道慢性炎症疾病。其中 T 细胞是调节炎症反应的重要环节之一,它通过多功能细胞因子的释放调节炎症反应过程。通常认为 T 辅助细胞 (CD4⁺T 细胞) 参与哮喘气道炎症过程,CD4⁺T 细胞按照其功能的不同分为 Th1 和 Th2 两群, Th1/Th2 型免疫应答失衡, Th2 型优势问答是哮喘慢性气道炎症形成的基础。然而近年来,自然杀伤 T 细胞 (NKT 细胞) 在哮喘中的作用日益受到重视, NKT 细胞在包括过敏性哮喘在内的多种哮喘的发病机理中具有重要作用, 本文通过检测哮喘急性发作期患者和对照组诱导痰及外周血中 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞的比例变化, 以及血清 IL-4、Ig-E 及 INF- γ 等水平变化, 以探讨哮喘发病的免疫学机制。

1 材料和方法

作者简介 李向阳 (1968), 男, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向:

气道炎症。E-mail: lixiangyanglx@126.com

(收稿日期 2011-02-21 接受日期 2011-03-15)

1.1 检测对象

哮喘组 28 例, 男 16 例, 女 12 例, 年龄 18-62 岁, 平均 35.7 岁, 均为急性发作期住院患者, 符合中华医学会呼吸学分会制定的哮喘诊断标准^[1]。健康对照组 22 例, 男 15 例, 女 7 例, 年龄 19-58 岁, 平均 37.2 岁, 均为健康成年人。

1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂与仪器 FITC 标记的鼠抗人 CD3 抗体、PE 标记的鼠抗人 CD56 抗体均购自美国 Beckman-Coulter 公司。IL-4、Ig-E 和 INF- γ 检测试剂购自美国 USB 公司。流式细胞仪型号 Beckman-Coulter EPICS XL MCL (Coulter 公司产品)。YS29801 型医用超声雾化器 (上海亿圣科技有限公司)。涡旋式混合器 (XW280A, 上海医大仪器厂)

1.2.2 流式细胞仪检测 于上午 7:00 采集对象肘静脉血 3 ml, 肝素抗凝, 标本在采集后 2 小时内测定。检测时取抗凝全血 50 μ l, 加入 CD56-PE、CD3-FITC 各 10 μ l, 混匀后室温下避光反应 15 分钟后加入 1 ml 溶血剂 (flow cytometry lysing solution), 室温下溶解红细胞 5 分钟, 待完全溶血后 PBS 溶液洗涤, 离心 5 分钟 (1500r/min), 弃上清液, 涡旋混匀。每份标本加入 1% 多聚

甲醛固定液 300 μl 并重悬细胞,上流式细胞仪检测。每次检测前常规用荧光微球 (flow check) 和同型阴性对照试剂对仪器进行质量监测和调控,并用标准方法对各荧光素之间的干扰进行补偿。检测时先根据前向角 (FSC) 和侧向角 (SSC) 散射光信号,对淋巴细胞群进行设门,每次获取设门内细胞 10000 个以上并保存数据。

1.2.3 诱导痰液的留取和处理 取痰前彻底清洁口腔和鼻咽腔,以减少痰液的污染,将 4%氯化钠 20ml 加入超声雾化吸入器中,进行痰液诱导,收集痰液需在 2 小时内处理,称重后加入 4 倍 0.1%二硫苏糖醇,混匀,37℃ 温浴 15-20min,涡旋式混合器上轻轻振动,60μm 的尼龙膜过滤,1500r/min 离心 5min,细胞成分重悬于 1mlPBS 中,用血细胞计数器计数总细胞数,苔盼蓝染色检查细胞活力。瑞氏染色,有核细胞计数进行诱导痰液炎性细胞分类,以百分数表示 (细胞活力大于 50%,鳞状上皮细胞小于 20%为合格痰液)。取上述处理后的细胞悬液 50μL,分别加入荧光色素标记的单克隆抗体 CD56-PE、CD3-FITC 各 10 μl,孵化后 1%多聚甲醛固定,上流式细胞仪检测。

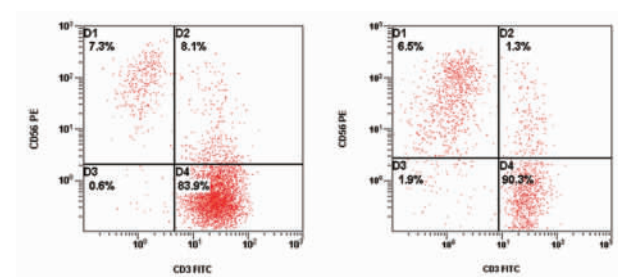


图 1 哮喘急性发作期患者和对照组诱导痰中 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞流式分布图例

Fig.1 CD3⁺CD56⁺NKT cells flow cytometry scattergram of induced sputum in acute asthma Patients and in normal subjects

1.2.4 血清学指标检测 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定血清 IL-4、Ig-E 和 INF-γ 值。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 10.0 软件包进行统计。计量资料用均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,先行方差齐性检验,然后做两样本均数的 t 检验或 t' 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。相关分析采用直线相关分析。

2 结果

2.1 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞流式检测结果

流式细胞仪检测 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞流式检测结果的表达示意图。通过设门分析,严格定位 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞群。可见哮喘急性发作期患者和健康对照组诱导痰及外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞分布情况 (图 1、图 2)。哮喘急性发作期患者诱导痰及外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞较正常对照组明显增高 (P<0.01) (表 1)。

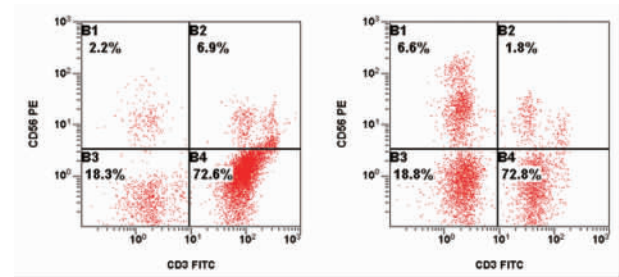


图 2 哮喘急性发作期患者和对照组外周血中 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞流式分布图例

Fig. 2 CD3⁺CD56⁺NKT cells flow cytometry scattergram of peripheral blood in acute asthma Patients and in normal subjects

表 1 哮喘急性发作期患者与对照组诱导痰及外周血中 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞比例值

Table 1 The percentage of CD3⁺CD56⁺NKT cells of induced sputum and peripheral blood in the two groups

Group	induced sputum CD3 ⁺ CD56 ⁺	peripheral blood CD3 ⁺ CD56 ⁺
Asthma group (n=28)	8.82± 2.13 [△]	6.96± 1.88 [△]
Control group (n=22)	1.34± 0.41	1.62± 0.35

Note: Compared with Control group, [△]P<0.01.

2.2 哮喘急性发作期患者及对照组血清 IL-4、INF-γ 及 IgE 的检测结果

哮喘急性发作期患者血清中 IL-4、INF-γ 及 IgE 水平均高

于健康对照组 (P<0.05) (表 2)。哮喘患者外周血中 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞比例与 IL-4、INF-γ、成正相关关系 (r=0.8235, P<0.05; r=0.7452, P<0.05) (图 3、图 4)

表 2 哮喘组与健康对照组外周血中 IL-4、INF-γ 及 IgE 的比较

Table 2 The comparison of level of IL-4、INF-γ、IgE in peripheral blood between the two groups

Group	IL-4 (ng/L)	INF-γ (ng/L)	IgE(ug/L)
Asthma group (n=28)	118.34± 12.28 [△]	56.51± 18.69 [▲]	2640.32± 411.79 [△]
Control group (n=22)	21.35± 3.77	32.41± 7.78	385.77± 85.34

Note: Compared with Control group, [▲]P<0.05. [△]P<0.01

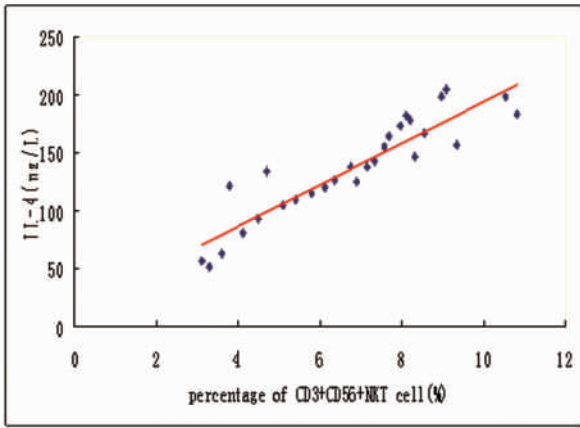


图3 哮喘急性发作期患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞百分率与 IL-4 值成正相关 ($r=0.8235, P<0.05$)

Fig. 3 Percentage of CD3⁺CD56⁺NKT cells of peripheral blood were positive correlated with IL-4 in acute asthma Patients ($r=0.8235, P<0.05$)

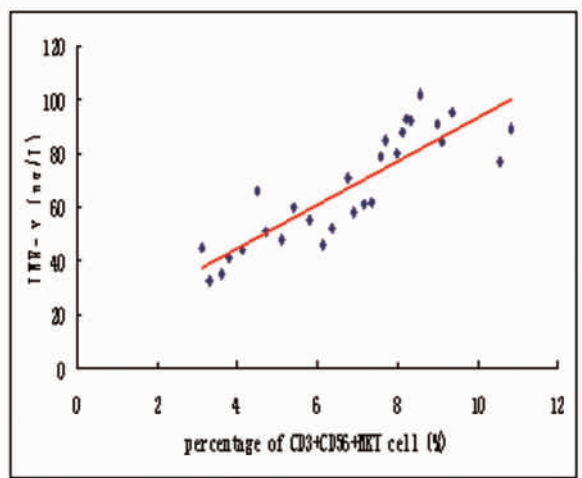


图4 哮喘急性发作期患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞百分率与 INF-γ (ng/L)值成正相关 ($r=0.7452, P<0.05$)

Fig. 4 Percentage of CD3⁺CD56⁺NKT cells of peripheral blood were positive correlated with INF-γ in acute asthma Patients ($r=0.7452, P<0.05$)

3 讨论

支气管哮喘是由多种细胞(T细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞等)及细胞组分(白介素-4、白介素-5、白介素-10、白介素-13及IgE等)参与的慢性气道炎症,伴随气道反应性增高及可逆的气流受限,表现为反复发作的喘息、气促、咳嗽、胸闷等症状。通常认为哮喘患者存在CD4⁺T细胞来源的Th2型细胞的优势应答,Th2细胞分泌IL-5、IL-4、IL-13等细胞因子,对嗜酸粒细胞的生存、成熟和趋化起重要作用,IL-4和IL-13可启动B细胞合成IgE,并通过表达于血管内皮的内皮细胞上黏附分子使嗜酸粒细胞聚集。近年来发现,哮喘气道炎症反应比先前推测的Th2型细胞理论要复杂的多,虽然变应原Th2型细胞能解释过敏性哮喘的很多特征但不能解释所有的哮喘病例,如感染、空气污染和运动所致的哮喘并没有明显过敏原存在,另外INF-γ、IL-17等非Th2细胞因子以及中性粒细胞在多种哮喘中出现,尤其是在临床重度哮喘病人^[2]。

NKT细胞是在鼠和人中发现的独特的T细胞群,它们除了表达T细胞的标志外,也能表达NK细胞的一些标志,CD3⁺CD56⁺是NKT细胞的主要表型,它们通过产生细胞因子IL-4和INF-γ的作用成为先天性免疫和获得性免疫中发挥关键作用的一类调节细胞^[3]。研究发现,IL-12缺乏时NKT不能被正常激活^[4],IL-18可以促进NKT细胞释放Th2类细胞因子,促进Th0细胞由Th1细胞向Th2细胞分化,维持机体免疫反应的动态平衡^[5]。此外,NKT细胞的激活也与抗原呈递细胞(APC)的类型有关,Wesley等^[6]指出NKT细胞的活化信号完全由DC传递,Bezbradica等^[7]认为B细胞对NKT细胞的活化起抑制作用。最近研究发现,哮喘患者气管活检组织中存在大量NKT细胞,提示NKT细胞在人哮喘病的发病中起重要作用^[8]。Hamzaoui等证实成人重度哮喘患者诱导痰液中NKT百分比明显增高^[9]。

本实验研究结果显示哮喘急性发作期患者诱导痰和外周血中的CD3⁺CD56⁺NKT细胞较健康对照组明显增高,这与以上报道相一致。我们还发现哮喘急性发作期患者外周血中IL-4、Ig-E及INF-γ等细胞因子较健康对照组也明显增高,且

外周血中的CD3⁺CD56⁺NKT细胞百分率升高与IL-4、INF-γ的增高存在直线相关性,说明在哮喘急性发作期患者尤其是中重度住院病人,激活的NKT细胞可以同时介导Th1细胞和Th2细胞的活化。研究发现,NKT细胞在较长的鞘氨醇链(如α-GalCer)刺激下以INF-γ的分泌为主,而在较短的鞘氨醇链(如α-GalCer的类似物OCH)刺激下则以IL-4的分泌为主^[10],NKT细胞活化后分泌的大量IL-4促进Th0细胞向Th2细胞分化,而其在IL-12诱导下也可分泌INF-γ,从而促进Th1细胞分化和生物学作用。Th1细胞和Th2细胞的活化,可进一步介导多种细胞因子TNF-α、IL-1β、MIP-1α、IL-13及IgE等炎症细胞因子的分泌和紊乱,促进哮喘病程的恶化和发展^[11-12]。

总之,本研究发现了哮喘急性发作期诱导痰和外周血中的CD3⁺CD56⁺NKT细胞较正常明显增高,NKT细胞可能通过调节IL-4、Ig-E、INF-γ等多种细胞因子从而在哮喘的发病机制发挥重要作用。随着对NKT细胞在哮喘发病机制中的深入研究,有助于进一步阐明哮喘的发病机制,为哮喘的防治提供新的途径。

参考文献(References)

- [1] 中华医学会呼吸病学会.支气管哮喘防治指南[J].中华结核和呼吸杂志,2003,26(3):132-139
Chinese Medical Association, Institute of Respiratory Diseases, Diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease guidelines [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2002, 25(8):453-460
- [2] Dale T.Umetu,Rosemarie H.DeKruyff. The regulatory role of natural killer T cells in the airways [J]. The international of Biochemistry Cell Biology,2010,42:529-534
- [3] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells [J]. Annu Rev Immunol, 2007,25:297-336
- [4] Duthie MS, Kahn M, White M, et al. Both CD1d antigen presentation and interleukin-12 are required to activate natural killer T cells during trypanosoma cruzi infection [J]. Infect Immun, 2005,73(3):1890-1894

(下转第1788页)

育转变为以学生为主体,教师为主导,激发了学生主动学习的兴趣,调动学习的积极性,课堂上学生精力集中,教学效果显著,符合现代教育理念。我们将在妇产科学理论教学中深入开展这一教学方法,进一步探索其应用价值。

参考文献(References)

- [1] 姜美玲. 基于问题的学习 :一种可借鉴的教学模式[J].全球教学展望,2003,9 (3) :62-66
Jiang Mei-ling. Problem-based Learning: a teaching mode that can be learned from[J]. Global Education, 2003,9(3):62-66.(In Chinese)
- [2] Kaplowitz J,Darling LM,Wilkerson L. Reaching and teaching new medical students[J]. Acad Med,2002,77 (11) :1173

- [3] 赵卫,曹红,何小艳.病例导入法在医学微生物学教学中的应用[J].中国医学教育杂志,2006,26 (1) :62-63
Zhao Wei, Cao Hong, He Xiao-yan. Application of case introduced method in medical microbiology course[J]. Chinese Journal of Medical Education, 2006,26(1):62-63(In Chinese)
- [4] 周毕军,胡泊. 浅谈病例导入式教学法在外科理论教学中的应用[J].基层医学论坛,2009,13 :371-372
Zhou Bi-jun, Hu Bo. Application of case based study in theory teaching of surgery[J]. Public Medical Forum Magazine, 2009,13:371-372 (In Chinese)

(上接第 1753 页)

- [5] Maria CL, Agathe H, Maria P, et al. IL-18 Enhances IL-4 production by ligand activated NKT lymphocytes: a Pro Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells[J]. J Immunol, 2001,166 (2) :945 - 951
- [6] Wesley JD , Robbins SH , Sidobre S , et al . Cutting edge : IFN- γ signaling to macrophages is required for optimal V α 14 iNKT/ NK cell cross-talk [J]. J Immunol, 2005, 174 (4) :3864 - 3868
- [7] Bezbradica J S, Stanic AK, Matsuki N, et al. Distinct roles of dendritic cells and B cells in V α 14Ja18 natural T cell activation in vivo [J]. J Immunol, 2005,174 (8) :4696 - 46705
- [8] KayAB. Natural killer Tcell and asthma [J]. NEngl J Med, 2006,354: 1186-1188
- [9] HamzaouiA, CheikRouhouS, GrariH, et al. NKT cells in the induced sputum of severe asthmatics [J]. Mediators Inflamm, 2006, 6: 12-14

- [10] Oki S, Chiba A, Yamamura T, et al. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells [J]. J Clin Invest, 2004,113 (11): 1631-1640
- [11] G. Tumurkhuu, N. Koide, et al. The mechanism of development of acute lung injury in lethal endotoxic shock using a-galactosylceramide sensitization [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2008,152: 182-191
- [12] Ji Hyung Kim, Doo Hyun Chung. CD1d-Restricted IFN-g-Secreting NKT Cells Promote Immune Complex-Induced Acute Lung Injury by Regulating Macrophage-Inflammatory Protein-1 α Production and Activation of Macrophages and Dendritic Cells [J]. The Journal of Immunology, 2010, doi:10.4049