

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.023

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.023>

Th17/Treg失衡在肺炎支原体肺炎患儿中的作用及其机制

杜许芳, 周炯英

(常熟市第二人民医院儿科, 江苏 常熟 215500)

[摘要] 目的: 探讨Th17/Treg失衡在肺炎支原体肺炎患儿中的作用及其机制。方法: 纳入2013年6月至2015年1月我院收治的60例肺炎支原体肺炎急性期患儿和30例同期体检的健康儿童为研究对象。流式细胞术分析两组儿童外周血Th17和Treg的百分率, ELISA分析Th17和Treg特异性细胞因子IL-17和IL-10的分泌水平, 定量PCR测定Th17和Treg特异性转录因子ROR γ t和Foxp3 mRNA的表达水平, 以及Notch信号分子(Notch1, Hes1和Hey1)的表达水平。结果: 与健康儿童相比, 肺炎支原体肺炎急性期患儿外周血的Th17的百分率, IL-17分泌水平以及特异性转录因子ROR γ t的表达水平均明显增高, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 而急性期患儿外周血的Treg的百分率, IL-10分泌水平以及特异性转录因子Foxp3的表达水平均较健康儿童明显降低, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。进一步分析显示急性期患儿Notch1、Hes1和Hey1的表达水平均明显高于健康儿童, 其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: Th17/Treg失衡参与儿童支原体肺炎的发生发展, Notch信号通路可能通过调节免疫细胞分化和细胞因子分泌参与Th17/Treg失衡。

[关键词] 肺炎支原体肺炎; Th17; Treg; 机制

Role and mechanism of Th17/Treg imbalance in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia

DU Xufang, ZHOU Jiongying

(Department of Pediatric, Changshu Second People's Hospital, Changshu Jiangsu 215500, China)

Abstract **Objective:** To explore the role and mechanism of Th17/Treg imbalance in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia. **Methods:** 90 children were enrolled in this study from June 2013 to January 2015 at our hospital, among whom 60 cases were diagnosed with mycoplasma pneumoniae pneumonia and 30 cases were healthy children. The percentage of Th17 and Treg cells in both groups were analyzed by flow cytometry, the corresponding cytokines of IL-17 and IL-10 and the mRNA levels of specific transcriptional factors of Th17 and Treg (ROR γ and Foxp3) were analyzed in both groups by ELISA and PCR, respectively. What's more, the Notch signaling molecules (Notch1 and Hes1) were further investigated. **Results:** The percentage of Th17, the level of the associated cytokine (IL-17) and the mRNA level of transcriptional factor (ROR γ) were all significantly higher in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia than those healthy children ($P < 0.05$), While, the percentage of Treg, the level of associated cytokine IL-10 and the mRNA level of transcriptional factor

收稿日期 (Date of reception): 2016-06-24

通信作者 (Corresponding author): 杜许芳, Email: duxufang516@163.com

(Foxp3) were all significantly lower in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia than those in healthy children ($P < 0.05$). Furthermore, the mRNA levels of the Notch signaling molecules (Notch1 and Hes1) were both significantly increased in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia by comparison with those in healthy children ($P < 0.05$). **Conclusion:** Th17/Treg imbalance participates in the development of mycoplasma pneumoniae pneumonia in children. Notch signaling pathway may participate in Th17/Treg imbalance by regulating their differentiation and cytokine secretion.

Keywords mycoplasma pneumoniae pneumonia; Th17; Treg; mechanism

小儿肺炎支原体肺炎(mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP)是由肺炎支原体(mycoplasma pneumonia, MP)引起的肺部感染性疾病^[1]。临床上主要表现为典型的刺激性干咳,部分患儿可伴有发热、喘息等症状,近年来,其发病率有明显增高趋势,约占社区获得性肺炎的10%~30%^[2]。目前,MPP的发病机制尚不完全清楚,大量研究提示免疫功能异常参与了肺炎支原体肺炎的发生发展。张淑花^[3]前期研究发现支原体肺炎患儿急性期和恢复期体内IgG和IgA的水平较正常儿童降低,而且CD3⁺细胞和CD4⁺细胞比例也较正常儿童降低。林茹珠等^[4]研究也发现肺炎支原体患儿体内存在T淋巴细胞活化异常。

随着对T淋巴细胞亚群的深入研究,两种新的T细胞亚群,Th17和Treg在肺炎发生发展中的作用越来越引起关注^[5]。而目前,Th17和Treg细胞在肺炎支原体肺炎中的作用的研究报道较少,有研究^[6]显示肺炎支原体肺炎患儿体内存在Th17/Treg失衡现象,但其作用机制并不清楚。本研究中,我们收集了2013年6月至2015年1月我院收治的60例肺炎支原体肺炎急性期患者和同期30例体检正常的健康儿童为研究对象,分析两组儿童外周血中Th17和Treg细胞的百分率,相应细胞因子IL-17和IL-10的表达水平,以明确Th17和Treg细胞在肺炎支原体肺炎患儿外周血的分布特点和作用。ROR γ t和Foxp3分别是Th17细胞和Treg细胞特异性的转录因子,参与了细胞增殖和分化。另外,T淋巴细胞的分化受多种信号传导通路的调节,Notch信号通路是公认的重要的调节细胞分化、增殖和凋亡的信号转导系统。最近的研究^[7-8]提示Notch信号通路参与Th17和Treg细胞的分化和功能调节。为进一步明确Th17和Treg细胞在肺炎支原体肺炎中的作用机制,我们进一步分析两组儿童体内ROR γ t和Foxp3 mRNA的表达水平,以及Notch通路中信号分子(Notch1和Hes1)的表达水平。本研究的发现将为临床治疗方案(尤其是免疫治疗)的制定提供理论基础和新的思路。

1 对象与方法

1.1 一般资料

以2013年6月至2015年1月我院收治的60例肺炎支原体肺炎急性期患儿和30例同期体检的健康儿童为研究对象。患儿组:男35例、女25例,年龄(6.3 \pm 3.9)岁,健康儿童组:男18例、女12例,年龄(6.8 \pm 3.1)岁,两组儿童在年龄、性别方面差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。60例患儿均符合肺炎支原体肺炎的诊断标准^[9]:咳嗽突出而持久;早期可出现X线胸片改变;外周血白细胞数多数正常;血清肺炎支原体IgM抗体阳性或血清冷凝集滴度 $> 1:32$ 。患儿就诊均处于急性期(发病1周内),病程3~7 d不等,主要表现为咳嗽,其中56例为典型的刺激性干咳,18例伴喘息症状;53例患儿伴有发热(其中高热43例,中低度发热10例)。体征:46例肺部听诊可闻及一过性干湿性啰音,X线胸片检查示36例可见片状阴影,16例可见点片状阴影,8例可见条索状或楔形阴影。所有受试儿童均排除患有其他炎症性疾病,免疫系统疾病、肿瘤以及长期使用免疫抑制剂或影响免疫功能的药物的患者。本研究经医院伦理委员会同意,所有参与者受试前均签署知情同意书。

1.2 临床标本采集

外周血淋巴细胞制备:采集空腹静脉血5 mL分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),具体步骤参见人淋巴细胞分离液说明书(美国BD公司)。血清制备:采集空腹静脉血2 mL,于2 500 g离心10 min,分离血清后保存于-20 °C冰箱。

1.3 流式检测 Th17, Treg 细胞的比例

以CD3⁺/CD8⁻/IL-17⁺设门,分析Th17细胞在外周血中的比例。以CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺设门,分析Treg细胞在外周血中的比例。流式分析抗体和固定破膜剂均购自美国BD公司。

1.4 细胞因子检测

酶联免疫吸附法检测血清中IL-17、IL-10的分泌水平。具体步骤参见商品化ELISA试剂盒(美国R&D公司): 1)样品和标准品加入反应孔,同时设立空白孔,37℃孵育1h后用洗涤液充分洗涤3遍。2)加入Biotin标记的二抗,37℃孵育1h;充分洗涤3遍。3)加入HRP标记的链亲和素,37℃孵育1h,充分洗涤。4)TMB室温显色5min,终止显色后于450nm处读取OD值。绘制标准曲线并计算血清中IL-17、IL-10的浓度。

1.5 转录因子和信号分子的表达水平检测

实时定量PCR检测两组儿童转录因子(ROR γ t和Foxp3),以及Notch信号分子(Notch1和Hes1)mRNA的表达水平。主要步骤如下:1)按TRIzol试剂说明书提取外周血淋巴细胞总RNA;2)参照反转录试剂盒说明书合成第一条cDNA链;3)以 β -actin为内参,SYBR Green定量PCR试剂盒进行目的基因扩增,2^{- Δ Ct}法进行mRNA的相对定量分析。引物序列见表1。

1.6 统计学处理

SPSS19.0统计软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验。计数资料以率

表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组儿童外周血中Th17和Treg细胞的比例和相应细胞因子分泌水平

如表2所示,肺炎支原体肺炎组外周血Th17细胞的比例和相应细胞因子IL-17的分泌水平均明显高于健康对照组,其差异均具有统计学意义($P<0.05$)。而肺炎支原体肺炎组外周血Treg细胞的比例和相应细胞因子IL-10的分泌水平均明显低于健康对照组,其差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 两组ROR γ t和Foxp3 mRNA以及Notch1和Hes1的表达水平

如表3所示,肺炎支原体肺炎组外周血Th17特异性转录因子细胞ROR γ t mRNA的表达水平明显高于健康对照组,其差异均具有统计学意义($P<0.05$)。而肺炎支原体肺炎组外周血Treg细胞特异性转录因子细胞Foxp3 mRNA的表达水平明显低于健康对照组,其差异均具有统计学意义($P<0.05$)。而且,肺炎支原体肺炎组Notch信号通路分子(Notch1和Hes1)mRNA表达水平明显高于健康对照组,其差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

表1 实时定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of Real-time PCR

基因名称	上游引物	下游引物
ROR γ t	TTTCCGAGGATGAGATGTC	CTTCCACATGCTGGCTACA
Foxp3	GTGGCCCCGATGTGTGAAG	GGAGCCCTGTTCGGATGATG
Notch1	CAATGTGGATGCCGCAGTTGTG	CAGCACCTTGGCGGTCTCGTA
Hes1	CTCTCTTCCCTCCGACTCT	AGGCGCAATCCAATATGAAC
β -actin	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG	GGAGCAATGATCTTGATCTTC

表2 两组Th17, Treg细胞的比例以及IL-17和IL-10分泌水平

Table 2 Percentage of Th17 and Treg cells, secretory levels of IL-17 and IL-10

组别	Th17/%	Treg/%	IL-17/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
MMP组	3.11 \pm 1.06	3.15 \pm 0.91	18.61 \pm 3.01	8.97 \pm 0.91
对照组	1.66 \pm 0.33*	7.31 \pm 1.06*	9.71 \pm 2.26*	21.93 \pm 1.16*

与对照组相比, * $P<0.05$ 。

Compared with MMP group, * $P<0.05$.

表3 两组ROR γ t和Foxp3 mRNA, 以及Notch1和Hes1的表达水平Table 3 Expression levels of ROR γ t and Foxp3 mRNA, Notch1 and Hes1

组别	ROR γ t	Foxp3	Notch1	Hes1
MMP组	5.69 \pm 0.61	2.29 \pm 0.66	8.01 \pm 1.33	4.83 \pm 0.61
对照组	1.81 \pm 0.63*	6.10 \pm 0.71*	2.26 \pm 0.98*	1.63 \pm 0.36*

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with MMP group, * $P < 0.05$.

3 讨论

Th17和Treg细胞是免疫学中两种新发现的T细胞亚群。Th17细胞主要通过分泌效应性细胞因子IL-17, 促进和放大炎症反应。Treg细胞则对免疫细胞具有负性调节作用, 通过分泌IL-10等效应细胞因子抑制T细胞的活化和增殖, 发挥免疫抑制功能的^[10]。既往研究发现肿瘤患者和慢性感染患者体内存在Th17/Treg失衡。尽管前期研究^[3-4,6]提示, 肺炎支原体肺炎患儿体内存在体液和细胞免疫功能紊乱, 特别是细胞免疫功能障碍。但既往研究主要集中在对Th1和Th2和CD8⁺ T淋巴细胞的研究上。而Th17和Treg在肺炎支原体肺炎发展中的作用, 目前研究报道甚少, 其可能的作用机制尚不完全清楚。

本研究中, 我们分析了肺炎支原体肺炎患儿和正常健康者外周血Th17和Treg免疫细胞比例, 以及相应的效应细胞因子IL-17和IL-10的分泌水平。研究结果显示, 肺炎支原体肺炎组外周血Th17细胞的比例和相应细胞因子IL-17的分泌水平明显高于健康对照组, 其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。而肺炎支原体肺炎组外周血Treg细胞的比例和相应细胞因子IL-10的分泌水平明显低于健康对照组, 其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。说明Th17/Treg失衡参与了肺炎支原体肺炎的发生发展。

ROR γ t和Foxp3分别是Th17和Treg细胞特异性的转录因子, 参与了两种细胞的分化和细胞因子的分泌^[11-12]。前期研究^[13]证实Notch信号通路参与Th17和Treg细胞的分化和相应细胞因子的分泌。为进一步明确肺炎支原体肺炎患者中Th17/Treg失衡的分子机制, 我们进一步分析Th17细胞特异性转录因子ROR γ t和Treg细胞特异性转录因子Foxp3的表达水平, 以及Notch信号通路分子Notch1和Hes1 mRNA的表达水平。研究结果显示, 肺炎支原体肺炎组外周血Th17特异性转录因子细胞ROR γ t mRNA的表达水平明显高于健康对照组,

其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。而肺炎支原体肺炎组外周血Treg细胞特异性转录因子细胞Foxp3 mRNA的表达水平明显低于健康对照组, 其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。进一步分析显示肺炎支原体肺炎组Notch信号通路分子(Notch1和Hes1) mRNA表达水平明显高于健康对照组, 其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。据我们所知, 本研究首次证实了Notch信号通路参与了肺炎支原体肺炎的发展, 我们推测Notch信号通路通过调节Th17和Treg的细胞分化和细胞因子的分泌, 参与了肺炎支原体肺炎的Th17/Treg的免疫失衡。

本研究尚有一些不足之处, 如研究病例数较少, 没有对恢复期患儿体内的免疫水平进行检测。另外, 本研究中仅以健康儿童作为对照, 并不能排除其他病原体肺炎或感染性疾病也出现类似的变化, 因此, 本研究在病例纳入时排除了患有其他炎症性疾病, 免疫系统疾病、肿瘤以及长期使用免疫抑制剂或影响免疫功能的药物的患儿, 以提高结果的客观性。

综上所述, 肺炎支原体肺炎患儿体内存在Th17/Treg细胞失衡现象, Notch信号通路可能参与Th17和Treg细胞的分化, 调节细胞因子的分泌, 导致肺炎支原体肺炎患儿体内的细胞免疫失衡状态。本研究取得的发现将为临床制定临床免疫治疗方案提供理论基础, 以进一步提高肺炎支原体肺炎的临床治疗效果。

参考文献

1. von Baum H, Welte T, Marre R, et al. Mycoplasma pneumoniae pneumonia revisited within the German Competence Network for Community-acquired pneumonia (CAPNETZ)[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9: 62.
2. Samransamruajkit R, Jitchaiwat S, Wachirapaes W, et al. Prevalence of Mycoplasma and Chlamydia pneumonia in severe community-acquired pneumonia among hospitalized children in Thailand[J]. Jpn J Infect

- Dis, 2008, 61(1): 36-39.
- 张淑花. 支原体肺炎儿童免疫功能的检测与分析[J]. 航空航天医学杂志, 2011, 22(11): 1307-1309.
ZHANG Shuhua. Immune function test and analyse in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Aerospace Medicine, 2011, 22(11): 1307-1309.
 - 林茹珠, 邓向红, 何洁冰, 等. 儿童感染肺炎支原体后细胞免疫状态的变化及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(5): 689-691.
LIN Ruzhu, DENG Xianghong, HE Jiebing, et al. Changes and clinical significance of cytological immune function in children infected with mycoplasma pneumoniae[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2008, 23(5): 689-691.
 - 蔡清, 倪春辉. Treg与Th17细胞在肺炎与肺纤维化中作用的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32(1): 75-78.
CAI Qing, NI Chunhui. Research progress of Treg and Th17 cells in the role of pneumonia and pulmonary fibrosis[J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2014, 32(1): 75-78.
 - 朱章华, 潘小晶, 王锁英, 等. Th17/Treg细胞在儿童肺炎支原体肺炎中的作用研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(36): 6040-6043.
ZHU Zhanghua, PAN Xiaojing, WANG Suoying, et al. Th17/Treg in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2013, 28(36): 6040-6043.
 - Asano N, Watanabe T, Kitani A, et al. Notch1 signaling and regulatory T cell function[J]. J Immunol, 2008, 180(5): 2796-2804.
 - Ma D, Dai J, Zhu X, et al. Aberrant expression of Notch signaling molecules in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. Ann Hematol, 2010, 89(2): 155-161.
 - 胡亚美, 江载芳, 褚福棠. 实用儿科学[M]. 第7版, 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1204.
HU yamei, JIANG Zaifang, ZHU Futang. Practical pediatrics[M]. 7th edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 1204.
 - Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 485-517.
 - Laurence A, O'Shea JJ. T(H)-17 differentiation: of mice and men[J]. Nat Immunol, 2007, 8(9): 903-905.
 - Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
 - Keerthivasan S, Suleiman R, Lawlor R, et al. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation[J]. J Immunol, 2011, 187(2): 692-701.

本文引用: 杜许芳, 周炯英. Th17/Treg失衡在肺炎支原体肺炎患儿中的作用及其机制[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(12): 2017-2021. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.023

Cite this article as: DU Xufang, ZHOU Jiogying. Role and mechanism of Th17/Treg imbalance in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(12): 2017-2021. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.023