

食物过敏患儿临床特点及血清 IL-10、IL-2R、IL-8 水平研究

盛瑶, 吴成, 李传应

摘要 目的 探讨非 IgE、IgE 食物过敏患儿临床特点及白细胞介素 10 (IL-10)、IL-2 受体 (IL-2R) 及 IL-8 水平变化。方法 对患儿临床特点、血常规和血清、外周血单个核细胞 IL-10、IL-2R、IL-8 mRNA 和蛋白表达水平进行分析比较。结果 非 IgE 组与 IgE 组患儿血淋巴细胞计数及嗜酸性粒细胞计数均显著高于对照组。非 IgE 组患儿血清 IL-10 水平和外周血单个核细胞 IL-10 mRNA 水平显著低于对照组和 IgE 组, 但 IgE 组患儿 IL-10 水平与对照组相比差异无统计学意义; 非 IgE 组和 IgE 组患儿血清 IL-2R 水平、外周血单个核细胞 IL-2R mRNA 水平显著高于对照组, 但非 IgE 组与 IgE 组患儿 IL-2R 相比差异无统计学意义; 非 IgE 组患儿血清 IL-8 水平、IL-8 mRNA 水平显著高于对照组, 但与 IgE 组患儿 IL-8 水平相比差异均无统计学意义。结论 非 IgE 食物过敏患儿与 IgE 食物过敏患儿 IL-10、IL-2R 及 IL-8 变化存在明显差异, 可能与食物过敏不同免疫途径有关。

关键词 食物过敏; 白细胞介素 10; 白细胞介素 2 受体; 白细胞介素 8; 儿童

中图分类号 R 392.8; R 781.6+7; R 725

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)07-1150-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.030

食物过敏根据免疫机制的不同,可分为 IgE 或非 IgE 型^[1]。IgE 介导食物过敏主要涉及 I 型变态反应,非 IgE 介导的食物过敏主要涉及 III 型变态反应和 IV 型变态反应 (T 细胞介导)^[2]。目前普遍认为效应性 T 细胞 (effector T cells, Teffs) 中辅助性 T 细胞 (helper T cell, TH) 亚群 TH1/TH2 失衡、调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 功能紊乱是食物过敏重要分子机制之一。白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 及其受体 (interleukin-2 receptor, IL-2R) 在调控

Teffs 及 Tregs 的功能中起到重要作用。IL-10 主要由 Tregs 分泌,是一种免疫抑制因子,对食物过敏免疫耐受性至关重要^[3-4],目前上述细胞因子在不同免疫机制介导的食物过敏患儿体内变化特点尚无相关文献报道^[5]。该研究考察食物过敏患儿临床特点及上述细胞因子水平,为进一步探究不同免疫途径介导的食物过敏相关消化道疾病的免疫学机制提供有价值的线索。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择安徽省儿童医院消化内科 2017 年 12 月~2018 年 6 月临床诊断为食物过敏患儿共 52 例为研究组,所有患儿通过饮食回避、母乳喂养患儿母亲严格回避过敏食物或更换游离氨基酸配方粉后,食物过敏症状减轻或消失,再次进食该食物,食物过敏症状再次出现,即食物回避-激发试验阳性^[6]。另排除其他可引起消化道症状的原因,如先天性巨结肠、炎症性肠病、麦克尔憩室等。根据患儿血清食物特异性 IgE 抗体水平高低,分为非 IgE 组 (36 例) 及 IgE 组 (16 例)。同时选取 2017 年 12 月~2018 年 6 月于安徽省儿童医院体检的 15 例健康儿童作为对照组。研究组与对照组在性别和年龄上差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 1。该研究已通过安徽医科大学附属省儿童医院伦理委员会审批,并与患儿家长签署知情同意书。

表 1 食物过敏患儿与对照组一般资料比较

一般资料	非 IgE 组 (n=36)	IgE 组 (n=16)	对照组 (n=15)	统计 量值	P 值
性别					
男	16	9	10	2.231	0.328
女	20	7	5		
月龄 ($\bar{x} \pm s$)	3.69 $\pm$ 2.40	5.52 $\pm$ 4.24	4.56 $\pm$ 3.92	1.778	0.177

1.2 方法

1.2.1 血细胞学检测 取研究组患儿及正常对照组儿童外周静脉血 2 ml 加入肝素抗凝管中,测定全血细胞计数 (complete blood count, CBC) 与差分计数,以评估白细胞数 ($\times 10^9/L$)、淋巴细胞数

2019-01-30 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085MH174); 安徽省卫生计生委科研计划项目 (儿科医学科研课题) (编号: 2017ek007)

作者单位: 安徽医科大学附属省儿童医院消化内科,合肥 230051

作者简介: 盛瑶,女,硕士研究生;

吴成,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wucheng0706@126.com

李传应,男,副主任医师,责任作者, E-mail: lcy056500@hotmail.com

($\times 10^9/L$)、嗜酸性粒细胞数($\times 10^9/L$)、嗜酸性粒细胞比(%)、血红蛋白(g/L)水平。

1.2.2 细胞因子及受体检测 使用西门子医学诊断产品有限公司生产的 IMMULITE 1000 全自动化学发光免疫分析仪定量检测研究组患儿及正常对照组儿童血清中细胞因子 IL-10、IL-2R 及 IL-8 水平(化学发光法),具体操作步骤参照 IMMULITE 1000 操作手册进行实验前的准备、设置、稀释、校准、测定和质控程序。

1.2.3 外周血单核细胞制备及 RNA 提取 取实验组患儿及正常对照组儿童外周静脉血 5 ml,肝素钠抗凝,采用 Ficoll 密度梯度法分离血浆并提取外周血单核细胞,培养基重悬细胞,调整浓度为 3×10^6 个/ml。采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,利用 PrimeScript™ 逆转录试剂盒(日本 TAKARA 公司)合成 cDNA。引物序列由 TAKARA 公司合成。IL-10 序列信息: 5'-ACATCAAGGCGCATGTGAAC-3', 5'-TA GAGTCGCCACCTGATGT-3'; IL-2R 序列信息: 5'-GACAGGCCACACAGATGCTA-3', 5'-GCTGGGATTC ACTCAGTTTGT-3'; IL-8 序列信息: 5'-CCACCG-GAAGGAACCATCTC-3', 5'-TTCCTTGGGGTCCAGA-CAGA-3'; GAPDH 序列信息: 5'-TTCAACGGCA-CAGTCAAG-3', 5'-CCAGCATCACCCCATTT-3'。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应,具体步骤按照说明书进行。利用 Ct 值计算目的基因的相对表达量: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{病例组}} - Ct_{\text{GAPDH}}) - (Ct_{\text{对照组}} - Ct_{\text{GAPDH}})$ 。病例组目的基因 mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.5 血清总 IgE 抗体及食物特异性 IgE 抗体检测 使用西门子医学诊断产品有限公司生产的 IMMULITE 2000 XPI 全自动化学发光免疫分析仪定量检测研究组患儿血清中总 IgE 水平(化学发光法),具体步骤参照 IMMULITE 2000 操作手册进行实验前的准备、设置、稀释、校准、测定和质控程序。采用欧蒙医学实验诊断股份公司生产的吸入性及食物性过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒(免疫印迹法),在体外半定量检测血清中特异性 IgE 抗体浓度。检测项目: 柳树/杨树/榆树、普通豚草、艾蒿、屋尘螨/粉尘螨、屋尘、猫毛、狗上皮、蟑螂、点青霉/分枝孢霉/烟曲霉/交链孢霉、葎草、鸡蛋白、牛奶、花生、黄豆、牛肉、羊肉、鳕鱼/龙虾/扇贝、虾、蟹。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计处理。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,非正

态分布的计量资料用 $M(IQR)$ 描述,正态分布的计量资料多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用最小显著差异法(LSD);非正态分布的计量资料采用对数转换,转换成正态分布、方差齐后再进行检验,若仍为非正态分布,组间的比较采用秩和检验。计数资料用百分率表示,采用 χ^2 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征 非 IgE 组和 IgE 组食物过敏患儿均以消化道症状及湿疹为主要临床表现,其中非 IgE 组患儿出现较多的临床症状为腹泻(58.33%)、血便(33.33%)和湿疹(55.56%);IgE 组患儿出现较多的临床症状为腹泻(68.75%)和湿疹(62.50%)。经统计,非 IgE 组与 IgE 组患儿临床症状发生率差异无统计学意义,见表 2。

表 2 非 IgE 组与 IgE 组食物过敏患儿临床特征比较[n(%)]

临床特征	非 IgE 组 (n=36)	IgE 组 (n=16)	χ^2 值	P 值
临床症状				
腹泻	21(58.33)	11(68.75)	0.508	0.476*
血便	12(33.33)	1(6.25)	3.009	0.083*
呕吐	5(13.89)	3(18.75)	0.001	0.974**
纳差	4(11.11)	2(12.50)	0.000	0.999**
腹胀	0(0.00)	1(6.25)	-	0.674#
湿疹	20(55.56)	10(62.50)	0.219	0.640*
咳嗽	2(5.56)	0(0.00)	-	0.857#
营养不良	1(2.78)	1(6.25)	-	0.999#
一级亲属过敏史	7(19.44)	3(18.75)	0.000	0.999**

* 采用 χ^2 检验, ** 采用校正 χ^2 检验, # 采用 Fisher 精确概率法

2.2 血细胞学分类 与对照组比较,非 IgE 组与 IgE 组患儿血淋巴细胞计数及嗜酸性粒细胞计数均显著高于对照组($P < 0.05$),非 IgE 组与 IgE 组比较,淋巴细胞计数及嗜酸性粒细胞计数差异无统计学意义($P > 0.05$),而白细胞计数、嗜酸性粒细胞比例及血红蛋白计数非 IgE 组、IgE 组与对照组两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

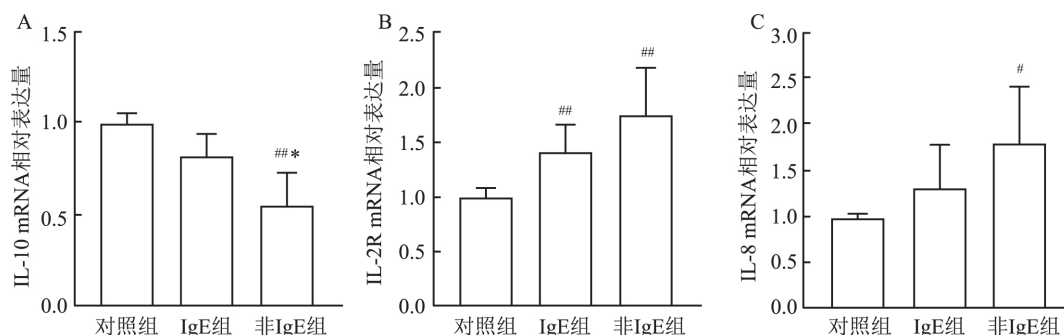
2.3 血清细胞因子及受体水平比较 非 IgE 组患儿血清 IL-10 水平和外周血单个核细胞 IL-10 mRNA 水平显著低于对照组和 IgE 组($P < 0.05$),但 IgE 组 IL-10 血清水平和细胞 mRNA 水平与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。非 IgE 组和 IgE 组患儿血清 IL-2R 以及外周血单个核细胞 IL-2R mRNA 水平显著高于对照组($P < 0.05$),但非 IgE 组与 IgE 组 IL-2R 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。此

表3 食物过敏患儿与对照组儿童血细胞学分类 [$\bar{x} \pm s / M(IQR)$]

血细胞学分类	非 IgE 组($n=36$)	IgE 组($n=16$)	对照组($n=15$)	统计量值
白细胞计数($\times 10^9 / L$)	9.62 $\pm$ 2.65	10.13 $\pm$ 3.05	8.40 $\pm$ 2.73	1.637
淋巴细胞计数($\times 10^9 / L$)	5.73 $\pm$ 2.24*	5.47 $\pm$ 1.84*	3.73 $\pm$ 1.89	5.065
嗜酸性粒细胞计数($\times 10^9 / L$)	0.47 $\pm$ 0.44*	0.45 $\pm$ 0.28*	0.21 $\pm$ 0.16	2.911
嗜酸性粒细胞比例(%)	3.65(3.20)	4.22(5.10)	3.20(2.20)	3.433
血红蛋白计数(g/L)	118.39 $\pm$ 61.60	111.25 $\pm$ 12.10	109.80 $\pm$ 14.83	0.241

与对照组比较: * $P < 0.05$ 表4 食物过敏患儿与对照组儿童血清细胞因子水平 [$\bar{x} \pm s / M(IQR)$]

细胞因子	非 IgE 组($n=36$)	IgE 组($n=16$)	对照组($n=15$)	统计量值
IL-10(ng/L)	3.47(1.38) ***	9.20(2.14)	14.00(13.61)	45.024
IL-2R(IU/L)	2 048.58 $\pm$ 495.79*	1 772.50 $\pm$ 888.11*	1 112.00 $\pm$ 364.35	13.332
IL-8(ng/L)	22.30(49.70) *	15.10(10.10)	13.20(9.20)	7.726

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 IgE 组比较, # $P < 0.05$ 图1 食物过敏患儿与对照组儿童外周血单核细胞细胞因子 mRNA 水平($\bar{x} \pm s$ $n=15 \sim 36$)

A: 非 IgE 组、IgE 组与对照组患儿外周血单个核细胞 IL-10 mRNA 水平; B: 非 IgE 组、IgE 组与对照组患儿外周血单个核细胞 IL-2R mRNA 水平; C: 非 IgE 组、IgE 组与对照组患儿外周血单个核细胞 IL-8 mRNA 水平; 与对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 IgE 组比较: * $P < 0.05$

外, 非 IgE 组患儿血清 IL-8 水平和外周血单个核细胞 IL-8 mRNA 水平显著高于对照组($P < 0.05$), 而 IgE 组患儿 IL-8 水平与对照组、非 IgE 组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4、图 1。

3 讨论

研究^[7-8]表明, IL-10 血清浓度降低与食物过敏的高风险存在紧密联系。牛奶蛋白过敏患儿游离氨基酸配方干预前血清 IL-10 水平比干预后显著降低, 提示牛奶蛋白过敏患儿体内 IL-10 水平异常。根据本研究结果显示, 非 IgE 介导的食物过敏中, Tregs 活性降低, 其分泌 IL-10 等免疫抑制因子水平较低, 不足以调节炎症反应, 导致了口服免疫耐受缺陷, 从而引起了一系列临床症状, 如腹泻、血便等, 而 IgE 介导的食物过敏主要涉及 TH2 型细胞因子如组胺、IL-4、肿瘤坏死因子 α 等为主导的 I 型变态反应, 与 Tregs 活性及 IL-10 水平高低关系不大。本研究还显示, IgE 组患儿血清 IL-10 水平显著高于非 IgE 组, 推测与体液免疫应答中, IL-10 能够增强 B 细胞上 II 类表达并诱导免疫球蛋白的生成有关^[9]。

综上考虑, 检测食物过敏患儿血清 IL-10 水平高低对于初步判断食物过敏免疫类型具有一定的指向性意义。

IL-2 结合 IL-2R 可激活三种不同的信号通路发挥作用^[10]。IL-2 与 Tregs 表面 IL-2R 结合可激活并诱导 Tregs, 并加强 Tregs 的杀伤作用(免疫激活); IL-2 与 Th1 表面 IL-2R 结合是维持 Th1 细胞存活及发挥作用的必要条件^[11](维持免疫耐受)。本研究结果表明, IL-2 和 IL-2R 信号通路在食物过敏中主要表现为免疫激活而非免疫耐受, 推测与在 IL-2R 高表达条件下, Tregs 处于高度活化状态, 可积极发挥免疫激活作用, 而 Tregs 维持免疫耐受功能并不明显有关。这与本研究中非 IgE 组患儿血清 IL-10 水平、IL-10 mRNA 水平显著低于对照组相一致。此外, 食物过敏患儿血清 IL-2R 水平均显著升高, 表明检测患儿血清 IL-2R 水平可作为快速明确食物过敏诊断的重要指标之一。

Kimura et al^[12]对食物蛋白诱导的小肠结肠炎患儿血清细胞因子进行检测发现, 血清中 IL-2、IL-5 及 IL-8 水平显著升高, 提示 IL-2、IL-5 和 IL-8 参与

了 FPIES 相关的免疫应答反应,这与本研究中非 IgE 组 IL-8 水平、IL-8 mRNA 水平显著高于对照组相一致。然而,IL-8 是一种强中性粒细胞趋化因子,其可趋化中性粒细胞定向游走到病灶并释放一系列炎症活性因子,通常认为中性粒细胞浸润是急性炎症反应的特征之一,目前食物过敏发病机制虽尚未完全阐明,但国内外公认食物过敏是免疫介导的变态反应,故而食物过敏并不支持急性炎症反应。因此,对于 IL-8 在食物过敏患儿血清水平的变化可能需要进一步研究阐明。

参考文献

- [1] Ruffner M A, Spergel J M. Non-IgE-mediated food allergy syndromes[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016, 117(5): 452-4.
- [2] Turcanu V, Brough H A, Du Toit G, et al. Immune mechanisms of food allergy and its prevention by early intervention[J]. *Curr Opin Immunol* 2017, 48: 92-8.
- [3] Geginat J, Larghi P, Paroni M, et al. The light and the dark sides of interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016, 30: 87-93.
- [4] 陈曦希,杨明珍,夏瑞祥. 调节性T细胞及相关细胞因子在慢性髓系白血病中的变化[J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(7): 1015-8.
- [5] Tordesillas L, Berin M C, Sampson H A. Immunology of food allergy[J]. *Immunity* 2017, 47(1): 32-50.
- [6] 中华医学会儿科学分会消化学组. 食物过敏相关消化道疾病诊断与管理专家共识[J]. *中华儿科杂志* 2017, 55(7): 487-92.
- [7] Burton O T, Noval Rivas M, Zhou J S, et al. Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells[J]. *Immunity* 2014, 41(1): 141-51.
- [8] 李传应,秦臻,王震,等. 游离氨基酸对牛奶蛋白过敏患儿 CD4⁺ T 细胞功能影响[J]. *安徽医科大学学报* 2017, 52(10): 1508-12.
- [9] Saxena A, Khosraviani S, Noel S, et al. Interleukin-40 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy[J]. *Cytokine* 2015, 74(1): 27-34.
- [10] Ross S H, Rollings C, Anderson K E, et al. Phosphoproteomic analyses of interleukin 2 signaling reveal integrated JAK kinase-dependent and independent networks in CD8⁺ T cells[J]. *Immunity* 2016, 45(3): 685-700.
- [11] Waters R S, Perry J S, Han S, et al. The effects of interleukin-2 on immune response regulation[J]. *Math Med Biol* 2018, 35(1): 79-119.
- [12] Kimura M, Ito Y, Shimomura M, et al. Cytokine profile after oral food challenge in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome[J]. *Allergol Int* 2017, 66(3): 452-7.

Clinical characteristics and the levels of interleukin - 10 , interleukin - 2 receptor , interleukin - 8 in children with food allergy

Sheng Yao , Wu Cheng , Li Chuanying

(Dept of Gastroenterology ,Children's Hospital Affiliated to Anhui Medical University ,Hefei 230051)

Abstract Objective To study clinical characteristics and the levels of interleukin-10(IL-10) ,IL-2 receptor(IL-2R) and IL-8 levels in children with non-IgE-mediated food allergy and IgE-mediated food allergy. **Methods** Clinical characteristics , blood routine and the concentration of IL-10 , IL-2R and IL-8 in serum were analyzed and compared. Moreover , mRNA levels of IL-10 , IL-2R and IL-8 in peripheral blood mononuclear cells were compared. **Results** The blood lymphocyte count and eosinophil count in non-IgE and IgE group were significantly higher than those in control group. The serum concentration and mRNA levels of IL-10 in non-IgE group were significantly lower than those in control group and IgE group , and there was no statistic difference in the levels of IL-10 between control group and IgE group. The serum concentration and mRNA levels of IL-2R in non-IgE group and IgE group were both higher than those in control group. However , there were no difference in the levels of IL-2R between non-IgE and IgE. Moreover , the serum concentration and mRNA levels of IL-8 in non-IgE group were higher than those in control group , and there was no statistic difference in the levels of IL-8 between non-IgE group and IgE group. **Conclusion** There are different profiles of IL-10 , IL-2R and IL-8 between non-IgE and IgE-mediated food allergy , which may be caused by different immune pathways.

Key words food allergies; interleukin-10; interleukin-2 receptor; interleukin-8; children