

网络出版时间: 2017-7-29 12:01 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.020.html>

◇ 临床医学研究 ◇

游离氨基酸对牛奶蛋白过敏患儿 CD4⁺ T 细胞功能影响

李传应, 秦臻, 王震, 梅少华, 吴成

摘要 目的 探讨游离氨基酸配方对牛奶蛋白过敏患儿 CD4⁺T 淋巴细胞免疫功能的影响。方法 牛奶蛋白过敏患儿 37 例, 随机分为对照组(18 例)和观察组(19 例)。观察组患儿以游离氨基酸配方联合双歧杆菌四联活菌片治疗 3 个月, 对照组患儿采用深度水解蛋白配方联合双歧杆菌四联活菌片治疗 3 个月。检测游离氨基酸配方干预前后患儿外周血淋巴细胞增殖水平、白细胞介素(IL)-17 和 IL-10 含量水平、Th17 和 Treg 比例。结果 治疗前淋巴细胞增殖水平、IL-17 和 IL-10 含量以及 Th17 和 Treg 比例两组间差异无统计学意义; 干预后, 两组淋巴细胞增殖水平显著下降, IL-17 和 Th17 水平显著降低, Treg 和 IL-10 水平显著增加, 且游离氨基酸配方改善 CD4⁺T 淋巴细胞免疫功能明显强于深度水解蛋白配方($P < 0.05$)。结论 游离氨基酸配方可显著改善牛奶蛋白过敏患儿 CD4⁺T 淋巴细胞亚群 Th17 和 Treg 之间失衡, 且效果优于深度水解蛋白配方。

关键词 游离氨基酸配方; 食物过敏; Th17 细胞; Treg 细胞

中图分类号 R 155.3; R 392.8; R 781.6+7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1508-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.020

牛奶蛋白过敏(milk allergy, MA)可引起多器官受累, 多见于婴幼儿和低年龄儿童, 发生率为 5%~8%, 严重时可能影响患儿生长发育^[1-2]。MA 临床干预手段是采用游离氨基酸配方和深度水解蛋白配方替代品以及补充适量益生菌。与深度水解蛋白配方不同, 游离氨基酸配方无免疫原性, 广泛用于婴幼儿 MA。

Th17 和 Treg 细胞是 CD4⁺T 细胞主要亚群细胞。Th17 分泌白细胞介素(interleukin, IL)-17 促进炎症反应, Treg 分泌 IL-10 抑制炎症反应^[3]。食物过敏(food allergy, FA)患者外周血 IL-17 明显高于正常人群, 而 Treg 水平较弱^[4-5]。课题组研究^[6]显

示 FA 患儿 CD3⁺CD8⁺ 百分比明显降低, CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 比例异常升高, 提示 FA 患儿 CD4⁺T 细胞亚群异常。该研究主要考察游离氨基酸配方对 MA 患儿 CD4⁺T 细胞免疫功能及亚群影响, 以明确游离氨基酸配方对 MA 患儿免疫功能的改善作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2016 年 1 月~12 月因消化道症状或伴有皮肤黏膜、呼吸系统症状, 临床疑似为 FA 住院患儿。详细询问包括年龄、生产史、喂养史、家族过敏史、出生体重、疾病史、母亲怀孕情况以及环境因素, 记录家长认为小儿不适症状等。所有患儿在检测前未用或停用抗组胺药 1 周以上。体格检查合格, 排除其它过敏。

1.2 血清特异性 IgE 抗体测定和 FA 诊断 对疑似 FA 患儿清晨空腹抽取静脉血 3 ml 静置、分离血清, 采用人血清食物特异性 IgE 抗体检测试剂盒(杭州浙大迪迅生物基因工程有限公司), 对疑似患儿血清特异性 IgE 抗体进行定性检测。结果阳性者予以食物回避 2 周, FA 症状减轻或消失, 再次进食该食物, 上述 FA 症状再现即可确诊。

1.3 FA 患儿病例资料 经食物回避 2 周, FA 症状减轻或消失, 再次进食该食物, 上述 FA 症状再现, 即食物回避和(或)食物激发试验阳性确诊 FA 患者 53 例(单一 FA 患儿 18 例, 多种食物交叉过敏 35 例), 其中 MA 患儿总共 37 例入选, 随机分为两组, 分别为观察组(19 例)和对照组(18 例), 观察组患儿月龄 2~12(6.58±2.65)个月, 男 12 例, 女 7 例; 对照组患儿月龄 2~12(6.78±2.27)个月, 男 8 例, 女 10 例。经统计, 两组患儿在性别和年龄上差异无统计学意义, 两组患儿 MA 临床症状见表 1。该研究已得到安徽医科大学附属省儿童医院医学伦理委员会批准, 并与患者或亲属签署知情同意书。

1.4 治疗方案 观察组患儿以纽康特(游离氨基酸配方, 纽迪希亚贸易上海有限公司)联合双歧杆菌四联活菌片(杭州龙达新科生物制药有限公司), 6

2016-12-29 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH174)

作者单位: 安徽省儿童医院(安徽医科大学附属省儿童医院)消化内科, 合肥 230051

作者简介: 李传应, 男, 主治医师;

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

个月内: 0.5 g, 每天 2 次; 6 个月 ~ 1 岁: 1.0 g, 每天 2 次; 治疗 3 个月); 对照组患儿采用纽太特(深度水解蛋白配方, 纽迪希亚贸易上海有限公司) 联合双歧杆菌四联活菌片干预。采用平行对照和通行对照, 分别在治疗前和治疗后考察两组患儿体内相关免疫学指标的变化。

1.5 外周血淋巴细胞增殖 在治疗前和治疗后取外周静脉血 5 ml, 采用淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞, 96 孔培养板中调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 / L$, 每孔加入植物凝集素进行刺激 48 h 后, 加入 MTT 溶液(100 μl , 5 g/L) 后继续培养 4 h。采用 ELx800 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司) 检测各孔 570 nm 处吸光度值($A_{570\text{nm}}$), 同时设定阴性对照和空白对照。

1.6 IL-17 和 IL-10 含量检测 治疗前和治疗后取外周血 2 ml。IL-17 和 IL-10 含量测定参照试剂盒说明书(武汉博士德生物工程有限公司) 步骤进行。

1.7 Th17 和 Treg 亚群流式细胞术分析 参照文献^[7], 外周血淋巴细胞悬液 100 μl , 加入 10 μl FITC-CD4(美国 BD 公司) 和 10 μl PE-IL-17A(美国 BD 公司) 对 Th17 亚群进行标记。另取一份细胞悬液, 依次加入 FITC-CD4、PE-CD25(美国 BD 公司)、PE-cy5-FoxP3(美国 BD 公司) 10 μl , 对 Treg 亚群进行标记。FC-500 流式细胞分析仪检测细胞亚群比例, 采用 Cell Quest 软件对流式结果进行分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 定量资料结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 t 检验, 定性资料以百分率表示, 采用 χ^2 检验进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组和对照组患儿 MA 临床症状比较 观察组和对照组患儿 MA 症状均以消化道症状、呼吸系统以及皮肤湿疹为主要表现, 其中观察组患儿表现较多的症状为皮肤湿疹(73.7%) 和呕吐(52.6%); 对照组 MA 症状主要为皮肤湿疹(88.9%) 和腹泻(44.4%), 经统计, 两组 MA 临床症状上发生率均差异无统计学意义, 结果见表 1。

2.2 观察组和对照组患儿外周血淋巴细胞增殖水平比较 干预前观察组和对照组患儿外周血淋巴细胞增殖水平差异无统计学意义; 与干预前比较, 观察组患儿外周血淋巴细胞增殖水平显著降低($P < 0.01$); 干预后观察组患儿淋巴细胞增殖水平显著低于对照组($P < 0.01$), 见图 1。

表 1 观察组和对照组患儿 MA 临床症状比较 [n (%)]

临床症状	观察组 ($n=19$)	对照组 ($n=18$)	χ^2 值	P 值
湿疹	14(73.7)	16(88.9)	1.393	0.238
腹泻	9(47.4)	8(44.4)	0.032	0.858
呕吐、溢奶	10(52.6)	7(38.9)	0.703	0.402
腹痛	4(21.1)	3(16.7)	0.116	0.734
血便	2(10.5)	0(0.0)	2.003	0.157
咳嗽	6(31.6)	3(16.7)	1.117	0.291

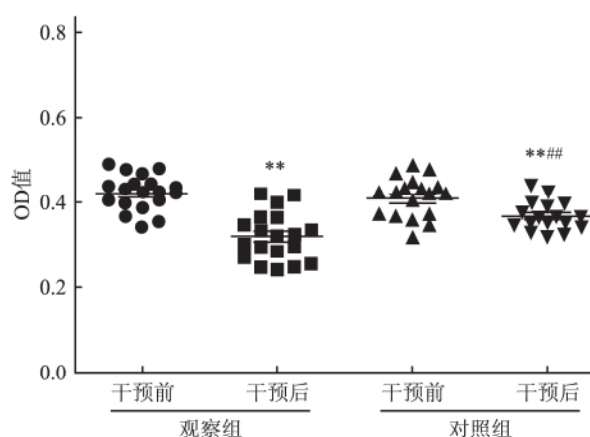


图 1 观察组和对照组患儿外周血淋巴细胞增殖水平比较
与同组干预前比较: ** $P < 0.01$; 与观察组干预后比较: ### $P < 0.01$

2.3 观察组和对照组患儿外周血 IL-17 和 IL-10 含量水平比较 干预前观察组患儿和对照组患儿外周血 IL-17 和 IL-10 含量水平差异无统计学意义; 与干预前相比, 观察组患儿外周血 IL-17 含量水平均显著降低, 同时 IL-10 含量水平均显著升高($P < 0.01$); 与观察组干预后相比, 对照组患儿外周血 IL-17 含量水平明显较高($P < 0.01$), 而 IL-10 含量水平明显较低($P < 0.01$), 见图 2。

2.4 观察组和对照组患儿在临床干预前后外周血 Th17 亚群和 Treg 亚群比较 观察组和对照组患儿在治疗前外周血 Th17 亚群比例依次为 0.273% 和 0.298%, Treg 亚群比例依次为 2.242% 和 2.324%, 两组之间差异无统计学意义; 与干预前比较, 观察组患儿 Th17 亚群比例显著降低, 同时 Treg 亚群比例显著升高($P < 0.01$); 与对照组干预后比较, 观察组外周血 Th17 亚群比例明显低于对照组($P < 0.05$), 而 Treg 亚群比例则明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 2、图 3。

3 讨论

一般认为 MA 病理机制主要与口服免疫耐受系统建立不完善、肠道菌群紊乱、小肠黏膜屏障损伤、

表2 观察组和对照组患儿外周血 Th17 亚群和 Treg 亚群比较(% $\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ IL-17 ⁺		CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	
	干预前	干预后	干预前	干预后
观察(n = 19)	0.273 ± 0.076	0.042 ± 0.011 ^{**#}	2.242 ± 0.473	6.451 ± 1.043 ^{**##}
对照(n = 18)	0.298 ± 0.053	0.126 ± 0.031 ^{**}	2.324 ± 0.611	3.467 ± 0.522 ^{**}
t 值	0.563	5.423	0.201	7.254

与同组干预前比较: ** P < 0.01; 与对照组干预后比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

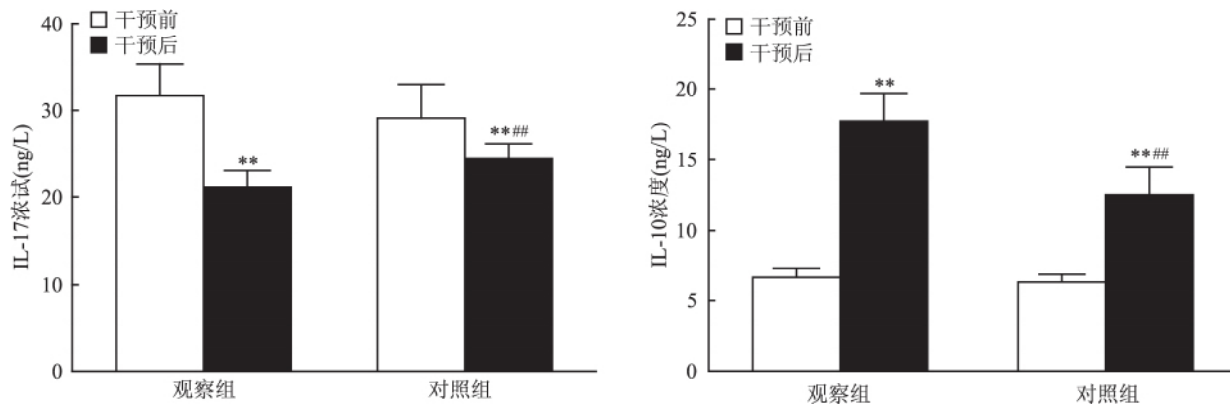


图2 观察组和对照组患儿外周血 IL-17 和 IL-10 含量水平

与同组干预前比较: ** P < 0.01; 与观察组干预后比较: ## P < 0.01

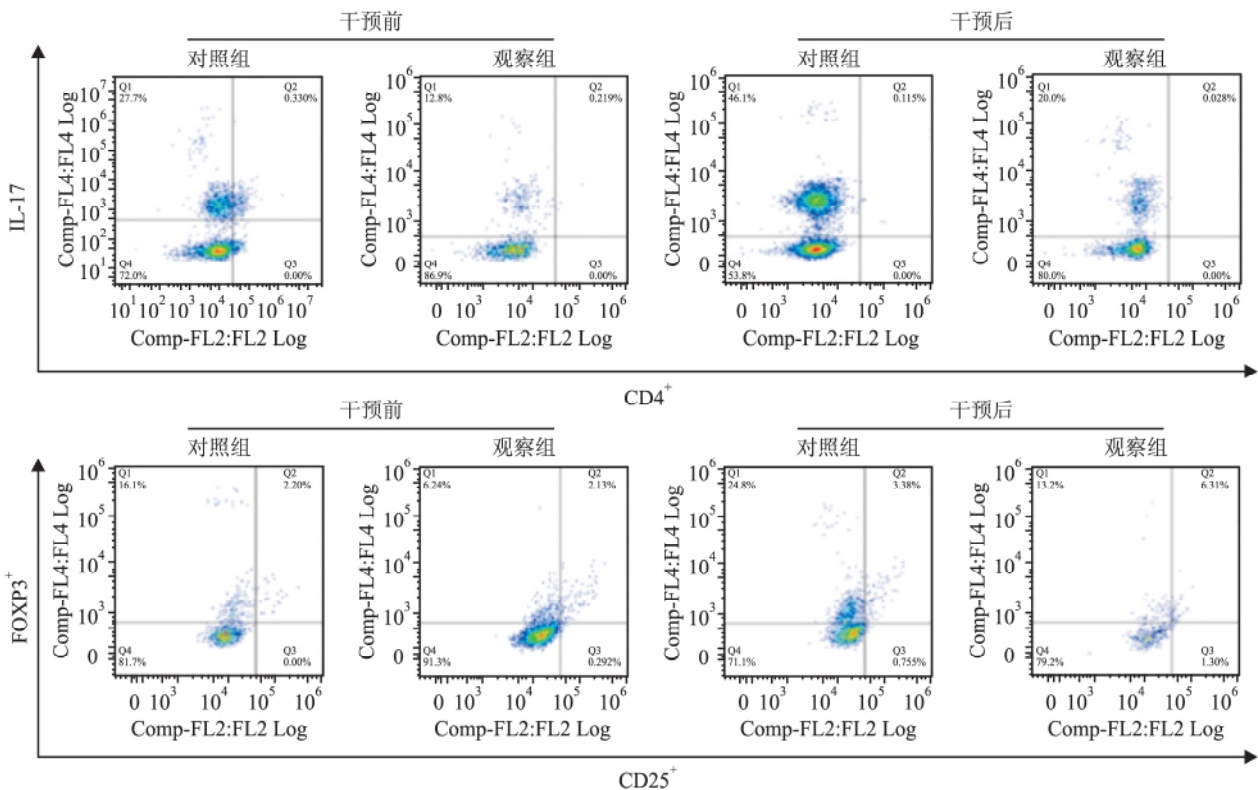


图3 观察组和对照组患儿外周血 Th17 亚群和 Treg 亚群比例比较

食物抗原跨上皮运输异常等多种因素有关^[1]。儿童胃肠道发育不完善,特别是婴幼儿缺乏相应酶消化蛋白,导致牛奶蛋白以多肽或其它免疫原性较强分子形式吸收,可引起多种临床症状,最常见的是消化系统、皮肤黏膜和呼吸系统,严重时影响患儿生

长发育,给家庭和社会造成极大的负担^[1-2,8]。尽管 MA 发病诱因已阐明,但临床尚无特异性的治疗方法。近年来研究^[9]显示口服诱导免疫耐受治疗成人 FA 安全有效,但在低龄段患儿尚处于临床试验阶段,因此患儿 MA 治疗仍是采用一些免疫原性较

低的水解蛋白配方以及服用一些改善肠道菌群的药品,如益生菌和益生元。益生菌是一类对宿主有益的活性微生物,可定植于人体肠道内,改善宿主生态平衡。常规免疫疗法外加益生菌可明显改善患儿体内免疫反应,延缓并阻止过敏性疾病发生^[10-11]。此外,牛奶蛋白高度过敏患儿选用游离氨基酸配方更有利于吸收^[12]。深度水解蛋白配方为蛋白质降解处理后的肽链,仍然保留了一定的免疫原性,在临床上主要应用于轻、中度 MA 患儿,游离氨基酸配方是肽链彻底水解后的游离氨基酸,无免疫原性,吸收较好,主要用于重度 MA 患儿。有研究^[8]显示游离氨基酸配方不仅能有效改善 MA 患儿过敏症状,同时对应深度水解蛋白配方不理想患儿 MA 亦有较好改善作用。此外,游离氨基酸配方联合益生菌对婴幼儿 MA 安全有效,可显著改善 MA 患儿临床症状^[13-14]。

本研究显示游离氨基酸配方联合双歧杆菌四联活菌片改善 Th17/Treg 平衡能力显著优于深度水解蛋白配方,这可能与以下两方面有关:首先,已有研究^[15]显示益生菌能够通过改善机体肠道菌群平衡,诱导 Treg 细胞亚群分化,抑制 Th17 亚群介导免疫反应。其次,本研究结果也表明观察组和对照组患儿体内 CD4⁺T 淋巴细胞介导免疫反应存在差异,这种现象可能与游离氨基酸配方无免疫原性,而深度水解蛋白配方具有一定免疫原性,可作为抗原进一步刺激并活化体内诸多免疫细胞,如抗原呈递细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞等。

综上所述,游离氨基酸配方可显著改善 MA 患儿 CD4⁺T 淋巴细胞的免疫功能,恢复 Th17 和 Treg 亚群之间失衡;游离氨基酸配方对 MA 患儿 CD4⁺T 淋巴细胞免疫功能的改善作用优于深度水解蛋白配方。

参考文献

- [1] Turner P J, Boyle R J. Food allergy in children: what is new[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014, 17(3): 285-93.
 [2] Wang J, Jones S M, Pongracic J A, et al. Safety, clinical, and immunologic efficacy of a Chinese herbal medicine (Food Allergy

- Herbal Formula-2) for food allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(4): 962-70.
 [3] 李娜, 张家祥, 朱启星. Th 细胞亚群失衡在免疫性肝损伤中的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(9): 1384-7.
 [4] Zbikowska-Gotz M, Pałgan K, Gawrońska-Ukleja E, et al. Expression of IL-17A concentration and effector functions of peripheral blood neutrophils in food allergy hypersensitivity patients [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2016, 29(1): 90-8.
 [5] Dang T D, Allen K J, J Martino D, et al. Food allergic infants have impaired regulatory T cell responses following *in vivo* allergen exposure [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2016, 27(1): 35-43.
 [6] 梅少华, 吴成. 食物过敏患儿特异性抗体与细胞免疫因子变化特点及氨基酸乳品联合益生菌干预效应[J]. *安徽医学*, 2014, 35(1): 75-8.
 [7] 高军, 郝丽, 马胜银. 枸橼酸盐透析液对慢性肾衰患者外周血 Th17 的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(10): 1436-40.
 [8] Vanderhoof J, Moore N, de Boissieu D. Evaluation of an amino acid-based formula in infants not responding to extensively hydrolyzed protein formula [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016, 63(5): 531-3.
 [9] Marrs T, Flohr C, Perkin M R. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomised controlled trial: a critical appraisal [J]. *Br J Dermatol*, 2015, 173(5): 1125-9.
 [10] Randazzo C L, Pino A, Ricciardi L, et al. Probiotic supplementation in systemic nickel allergy syndrome patients: study of its effects on lactic acid bacteria population and on clinical symptoms [J]. *J Appl Microbiol*, 2015, 118(1): 202-11.
 [11] Enomoto T, Sowa M, Nishimori K, et al. Effects of bifidobacterial supplementation to pregnant women and infants in the prevention of allergy development in infants and on fecal microbiota [J]. *Allergol Int*, 2014, 63(4): 575-85.
 [12] 刘亚婷, 李涛, 徐恩君, 等. 132 例儿童食物不耐受情况分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(7): 1033-5.
 [13] Dupont C, Hol J, Nieuwenhuis E E, et al. An extensively hydrolysed casein-based formula for infants with cows' milk protein allergy: tolerance/hypo-allergenicity and growth catch-up [J]. *Br J Nutr*, 2015, 113(7): 1102-12.
 [14] Harvey B M, Langford J E, Harthoorn L F, et al. Effects on growth and tolerance and hypoallergenicity of an amino acid-based formula with synbiotics [J]. *Pediatr Res*, 2014, 75(2): 343-51.
 [15] Fu L, Peng J, Zhao S, et al. Lactic acid bacteria-specific induction of CD4⁺ Foxp3⁺ T cells ameliorates shrimp tropomyosin-induced allergic response in mice *via* suppression of mTOR signaling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1987.

Effects of amino acid-based formula on CD4⁺ T lymphocytes function in infants with milk allergy

Li Chuanying, Qin Zhen, Wang Zhen, et al

(Dept of Gastroenterology Anhui Children's Hospital Hefei 230051)

Abstract Objective To investigate the effect of free amino acid-based formula on CD4⁺ T lymphocyte immune

function in infants with milk allergy. **Methods** The infants(37 cases) with milk protein allergy were randomly divided into control group(18 cases) and observational group(19 cases) . The infants in observational group were treated with free amino acid-based formula and bifidobaeterium tetravaccine table for three months , while those in control group received extensively hydrolyzed protein formula and bifidobaeterium tetravaccine table for three months. The proliferation of peripheral blood T lymphocytes , levels of interleukin(IL) -17 and IL-10 , and the ratio of Th17 and Treg were measured in both groups before and after intervention of free amino acid-based formula recipients. **Results** There were no significant difference in T lymphocytes proliferation , IL-17 , and IL-10 levels , and the ratio of Th17 and Treg between two groups. After intervention , the proliferation of T lymphocytes and the levels of IL-17 and Th17 were significantly decreased , and IL-10 and Treg levels were obviously increased in both groups. Moreover , the free amino acid-based formula to improve CD4⁺ T lymphocyte immune function was significantly better than that of extensively hydrolyzed protein formula($P < 0.05$) . **Conclusion** Amino acid-based formula can significantly improve the disequilibrium between Treg and Th17 in infants with milk allergy , and the effect is better than that of extensively hydrolyzed protein formula.

Key words amino acid-based formula; food allergies; Th17 cells; Treg cells

(上接第 1507 页)

- [12] Li S , Sun Z , Zhang Y , et al. COX-2/mPGES-1/PGE₂ cascade activation mediates uric acid-induced mesangial cell proliferation [J]. *Oncotarget* , 2017 8(6) : 10185 - 98.
- [13] Poulriot M , James M J , McColl S R , et al. Monosodium urate microcrystals induce cyclooxygenase-2 in human monocytes [J].

Blood , 1998 91(5) : 1769 - 76.

- [14] Getting S J , Christian H C , Flower R J , et al. Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis [J]. *Arthritis Rheum* , 2002 46(10) : 2765 - 75.

Role of COX-2 on monosodium urate induced acute gouty arthritis in rabbits and intervention effect of extracts of *paederia scandens*

Lv Xinrui , Xu Zhehao , Ma Ying , et al

(*Dept of Pharmacology Anhui Medical University Hefei 230032*)

Abstract Objective To study the role of cyclooxygenase (COX) -2 on monosodium urate induced acute urate arthritis (UA) in rabbits and the intervention effect of extracts of *paederia scandens*(EPS) . **Methods** UA model was prepared by injecting monosodium urate crystals(MSU) into rabbit's joint. Joint sizes were measured with vernier caliper at different time , leukocyte infiltration in synovial fluids were analyzed. HE staining was used to study the histopathology of articular synovial tissue , prostaglandin E₂(PGE₂) level was measured by ultraviolet spectrophotometry , COX-2 mRNA levels were monitored by RT-PCR. Treatment groups received different doses of EPS daily for 7 days. **Results** Joints of UA rabbit showed significant swelling , synovial membrane tissue presented inflammatory cell infiltration , hyperplasia like change , PGE₂ content in the joint effusion increased and the mRNA expression of COX-2 up-regulated($P < 0.01$) . Intervention of EPS significantly inhibited joint swelling of rabbits , improved the histopathologic changes , reduced the content of PGE₂ in synovial fluid , and suppressed the COX-2 mRNA expression in synovium of UA rabbits($P < 0.01$, $P < 0.05$) . **Conclusion** MSU could activate the expression of COX-2 mRNA , increase the content of PGE₂ and inflammation , and promote the formation of acute UA model in rabbits. EPS possess anti-urthritis effects , its mechanism may be related to the inhibition of leukocyte infiltration , reducing the content of PGE₂ , down-regulating the mRNA expression for COX-2 in UA joints , thus reducing COX-2-mediated inflammatory injury.

Key words extracts of *paederia scandens*; urthritis; cyclooxygenase-2