本文引用:王倩楠,唐成和,石计朋,等. 亚低温治疗对缺氧缺血性脑病新生儿白细胞介素-17和调节性T细胞水平的影响[J]. 新乡医学院学报,2018,35(8):677-680. DOI:10.7683/xxyxyxb.2018.08.007.

【临床研究】

亚低温治疗对缺氧缺血性脑病新生儿白细胞介素-17和调节性T细胞水平的影响

王倩楠, 唐成和, 石计朋, 尚 云
(新乡医学院第一附属医院新生儿科,河南 卫辉 453100)

摘要: **目的** 探讨全身亚低温治疗对出生6~12 h的缺氧缺血性脑病(HIE)新生儿外周血白细胞介素-17(IL-17)和调节性T细胞(Treg)的影响。**方法** 选取2015年11月至2017年9月新乡医学院第一附属医院新生儿科收治的出生后6~12 h的HIE患儿39例为研究对象,依据治疗方法分为亚低温组和对照组。对照组患儿采用常规支持治疗,亚低温组患儿在常规支持治疗基础上给予全身亚低温治疗。所有患儿治疗前和治疗72 h后行外周血IL-17和Treg细胞测定;出生后14、28 d行新生儿神经行为测定(NBNA)量表评分。**结果** 治疗前,亚低温组与对照组中、重度HIE患儿血Treg细胞、IL-17水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。对照组中、重度HIE患儿及亚低温组重度HIE患儿治疗72 h后血Treg细胞、IL-17水平与治疗前比较差异均无统计学意义($P>0.05$);亚低温组与对照组重度HIE患儿治疗72 h后血Treg细胞、IL-17水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗72 h后,亚低温组中度HIE患儿血Treg细胞水平显著高于治疗前($P<0.05$),IL-17水平显著低于治疗前($P<0.05$);亚低温组中度HIE患儿血Treg细胞水平显著高于对照组($P<0.05$),IL-17水平显著低于对照组($P<0.05$)。出生后14、28 d,亚低温组中度HIE患儿NBNA评分显著高于对照组($P<0.05$),但2组重度HIE患儿NBNA评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 出生后6~12 h中度HIE患儿行全身亚低温治疗可能仍然有效,而重度HIE患儿效果不明显,亚低温治疗HIE患儿可能通过升高Treg细胞比例和抑制IL-17产生而发挥脑保护作用。

关键词: 亚低温;缺氧缺血性脑病;调节性T细胞;白细胞介素-17
中图分类号: R722.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)08-0677-04

Effect of mild hypothermia therapy on the levels of interleukin-17 and regulatory T cells in newborns with hypoxic ischemic encephalopathy

WANG Qian-nan, TANG Cheng-he, SHI Ji-peng, SHANG Yun
(*Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui* 453100, *Henan Province, China*)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of mild hypothermia therapy on the levels of interleukin-17 (IL-17) and regulatory T cells (Treg) in 6 – 12 hours newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. **Methods** A total of 39 newborns with HIE in the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University from November 2015 to September 2017 were selected as research subjects. The newborns were divided into mild hypothermia group and control group according to the treatment method. The neonates in the control group received routine supportive treatment, while the neonates in the mild hypothermia group received routine supportive treatment and systemic mild hypothermia therapy. The levels of peripheral blood IL-17 and Treg cell were detected before treatment and 72 hours after treatment. The neonates were performed with neonatal behavioral neurological assessment (NBNA) scale at 14 and 28 days after birth. **Results** There was no significant difference in peripheral blood Treg cell and IL-17 levels of moderate and severe HIE neonates between mild hypothermia group and control group before treatment ($P>0.05$). After 72 h treatment, there was no significant difference in peripheral blood Treg cell and IL-17 levels of the moderate and severe HIE neonates in control group and the severe HIE neonates in the mild hypothermia group before and 72 hours after treatment ($P>0.05$). There was no significant difference in peripheral blood Treg cell and IL-17 levels of severe HIE neonates between the mild hypothermia group and control group at 72 hours after treatment ($P>0.05$). The peripheral blood Treg cell level of moderate HIE neonates after 72 hours of treatment was significantly higher than that before

DOI:10.7683/xxyxyxb.2018.08.007
收稿日期:2018-01-12
基金项目:河南省神经修复重点实验室开放课题项目(编号:HNSJXF-2016-019);新乡医学院研究生科研创新支持计划项目(编号:YJSCX201646Y)。
作者简介:王倩楠(1991-),女,河南扶沟人,硕士研究生在读,研究方向:新生儿脑损伤。
通信作者:唐成和(1968-),男,河南安阳人,硕士,主任医师,研究方向:新生儿脑损伤;E-mail:tch8275@163.com。

treatment in the mild hypothermia group($P<0.05$). The peripheral blood Treg cell level of moderate HIE neonates in the mild hypothermia group was significantly higher than that in the control group after 72 hours of treatment($P<0.05$). The peripheral blood IL-17 level of moderate HIE neonates after 72 hours of treatment was significantly lower than that before treatment in the mild hypothermia group($P<0.05$). The peripheral blood IL-17 level of moderate HIE neonates in the mild hypothermia group was significantly lower than that in the control group after 72 hours of treatment($P<0.05$). The NBNA score of moderate HIE neonates in mild hypothermia group was significantly higher than that in the control group at 14 and 28 days after birth ($P<0.05$). There was no significant difference in the NBNA score of severe HIE neonates between the mild hypothermia group and control group at 14 and 28 days after birth ($P>0.05$). **Conclusions** Mild hypothermia therapy for 6 – 12 hours newborns with moderate HIE may still be effective, but the mild hypothermia therapy for severe HIE neonates is not effective. Mild hypothermia may play a neuroprotective role by increasing the ratio of Treg cell and inhibiting the production of IL-17.

Key words: mild hypothermia; hypoxic-ischemic encephalopathy; regulatory T cells; interleukin-17

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy,HIE)是围产期多种原因造成缺氧与脑血流减少而引起的新生儿脑部受损[1],导致高病死率和长期神经功能障碍。亚低温治疗是唯一被证明对 HIE 有确切疗效的方法,一般认为出生后 6 h 内为最佳的治疗时间窗[2]。临床上许多 HIE 患儿错过了最佳治疗时机,对该类患儿应用亚低温治疗是否仍有脑保护作用,临床认识尚不统一。同时免疫炎症在 HIE 中的作用日益受到重视,因此本研究以出生后 6 ~ 12 h 的 HIE 患儿为研究对象,通过观察治疗前后新生儿神经行为测定(neonatal behavioral neurological assessment,NBNA)评分及外周血 调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)和白细胞介素-17(interleukin 17,IL-17)表达的变化,探讨延长亚低温治疗时间窗的可行性及免疫炎症在其中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 11 月至 2017 年 9 月新乡医学院第一附属医院新生儿科收治的中、重度 HIE 患儿为研究对象。纳入标准:(1)所有患儿均符合 HIE 诊断标准[3];(2)均在出生后 6 ~ 12 h 内入院治疗,出生体质量 2.5 ~ 4.0 kg,37 周≤胎龄 < 42 周;(3)出生后 1 min Apgar 评分≤3,5 min Apgar 评分≤5。排除标准:(1)严重先天畸形;(2)颅脑创伤或中、重度颅内出血;(3)血小板 $<50\times10^9$ L^{-1};(4)严重感染性疾病等。该研究共纳入 HIE 患儿 39 例,根据患儿治疗方法不同分为亚低温组和对照组。对照组 18 例,男 10 例,女 8 例;胎龄 37.0 ~ 41.2(38.4 ± 1.3)周;出生体质量 1.63 ~ 4.05(3.22 ± 0.61)kg;中度 HIE 10 例,重度 HIE 8 例。亚低温组 21 例,男 12 例,女 9 例;胎龄 37.0 ~ 41.0(38.7 ± 1.2)周;出生体质量 2.50 ~ 4.39(3.26 ± 0.60)kg;中度 HIE 12 例,重度 HIE 9 例。2 组患儿的性别、胎龄、出生体质量和病情程度比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过医院医学伦理委员会批准,患儿监护人均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 流式细胞分析用溶血素、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的鼠抗人 CD4、别藻青蛋白(allophycocyanin,APC)标记的鼠抗人 CD25、藻红蛋白(phycoerythrin,PE)标记的鼠抗人 CD127、人 Th1/Th2/Th17 细胞因子试剂盒和流式细胞仪均购自美国 BD 公司。

1.3 治疗方法 对照组患儿采用常规支持治疗,如纠正低血压、低氧血症和代谢性酸中毒等。亚低温组患儿在常规支持治疗的基础上加用全身亚低温治疗,患儿尽量裸露并远离一切加温设施,置于自动调控的冰毯上,开始诱导降温时速度要快,要求在 1 ~ 2 h 达到目标温度,将直肠温度控制在 33.5 ~ 34.5 ℃,持续治疗 72 h,随后给予自然复温,一般复温速度为每 2 h 升高 1 ℃,至少持续 6 h 后再恢复到正常体温。亚低温治疗期间密切观察患儿的神经系统表现,动态监测患儿血压、呼吸、电解质和凝血功能等。如果在此过程中出现严重不良反应则立即终止亚低温治疗。

1.4 2 组患儿血 Treg 细胞检测 治疗前及治疗 72 h 后抽取各组新生儿静脉血 1 mL 于抗凝采血管中,24 h 内完成检测;上样管中加入 CD4、CD25 和 CD127 抗体各 3 μL,全血 40 μL,混匀后避光孵育 15 min;加入 1 mL 溶血素,混匀后避光静置 15 min;3 000 r · min^{-1} 离心 5 min;弃上清液后加入 1 mL 鞘液洗涤 2 次;0.5 mL 鞘液重悬后用流式细胞仪检测。以 $CD4^+$ 细胞设门,分析 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg 细胞占 $CD4^+$ 细胞的百分比[4]。

1.5 2 组患儿血 IL-17 水平检测 治疗前及治疗 72 h 后抽取各组患儿外周静脉血 1 mL 置于含有促凝剂的采血管中,待血液凝固后 3 000 r · min^{-1} 离

心 5 min,取 40 μL 血清,依照试剂说明书方法处理样本,用流式细胞仪检测细胞因子,结果用 FCAP Array 软件分析。

1.6　新生儿神经功能评价　入组患儿均采用 NBNA 评分,于出生后 14、28 d,以 20 项新生儿行为神经测查法为标准,从行为能力、被动肌张力、主动肌张力、原始反射和一般评估等 5 个方面进行测评,满分为 40 分,≥35 分表示患儿的行为神经功能正常,<35 分表示新生儿的行为神经功能异常。

1.7　统计学处理　应用 SPSS 21.0 进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组样本均数比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验;$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　2 组患儿血 Treg 细胞及 IL-17 水平比较　结果见表 1。治疗前,亚低温组与对照组中、重度 HIE 患儿血 Treg 细胞、IL-17 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。治疗 72 h 后,对照组中、重度 HIE 患儿及亚低温组重度 HIE 患儿血 Treg 细胞、IL-17 水平与治疗前比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。亚低温组中度 HIE 患儿血 Treg 细胞水平显著高于治疗前及对照组中度 HIE 患儿,IL-17 水平显著低于治疗前及对照组中度 HIE 患儿,差异均有统计学意义($P<0.05$);亚低温组重度 HIE 患儿血 Treg 细胞、IL-17 水平与对照组重度 HIE 患儿治疗后比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1　2 组患儿治疗前后血 Treg 细胞及 IL-17 水平比较

Tab.1　Comparison of the levels of peripheral blood Treg cell and IL-17 between the two groups before and after treatment　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Treg 细胞/%		IL-17/(ng·L^{-1})	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组					
中度 HIE	10	7.65 ± 1.19	8.60 ± 1.66	18.10 ± 2.01	14.51 ± 3.04
重度 HIE	8	5.27 ± 0.90	5.50 ± 0.82	46.22 ± 5.40	40.77 ± 5.06
亚低温组					
中度 HIE	12	7.62 ± 1.63	10.56 ± 1.38^{ab}	17.93 ± 2.86	10.13 ± 3.03^{ab}
重度 HIE	9	5.11 ± 0.76	5.38 ± 1.12	45.39 ± 7.66	40.66 ± 6.70

注:与治疗前比较$^{a}P<0.05$;与对照组中度 HIE 患儿比较$^{b}P<0.05$。

2.2　2 组患儿 NBNA 评分比较　结果见表 2。出生后 14、28 d,亚低温组中度 HIE 患儿的 NBNA 评分显著高于对照组中度 HIE 患儿,差异有统计学意义($P<0.05$);亚低温组与对照组重度 HIE 患儿的 NBNA 评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2　2 组患儿不同时间 NBNA 评分比较

Tab.2　Comparison of NBNA score between the two groups at different time　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NBNA 评分	
		出生后 14 d	出生后 28 d
对照组			
中度 HIE	10	33.30 ± 1.64	34.30 ± 1.83
重度 HIE	8	31.38 ± 1.19	32.75 ± 0.89
亚低温组			
中度 HIE	12	34.75 ± 1.06^{a}	36.75 ± 0.75^{a}
重度 HIE	9	32.00 ± 2.35	33.67 ± 1.00

注:与对照组中度 HIE 患儿比较$^{a}P<0.05$。

3　讨论

亚低温治疗 HIE 有显著的神经保护作用[5],Meta 分析已证实,亚低温能显著降低足月 HIE 患儿的病死率和远期神经系统疾病发生率[6]。许多国家已将亚低温治疗列为新生儿 HIE 的常规治疗方法,有效降温也已列入新生儿窒息复苏后的常规管理办法[2]。亚低温干预的最佳时期是在出生后 6 h 之内,但临床上有部分患儿由于各种原因错过了最佳的治疗时机。LI 等[7]研究认为,出生后 6 ~ 10 h 开始亚低温治疗是有效的。也有研究发现,延迟至 6 ~ 12 h 开始亚低温治疗可能仍有效[8-9]。最近美国一项多中心临床研究发现,HIE 患儿生后 6 ~ 24 h 开始亚低温治疗可以降低患儿 18 个月内死亡或残疾的风险,但最终指出效果仍不确定[10]。这些研究表明,超过最佳治疗时间窗进行亚低温治疗也有一定的脑保护作用,但目前尚存在争论。本研究结果显示,出生后 14、28 d,亚低温组中度 HIE 患儿 NBNA 评分较对照组中度 HIE 患儿高,而 2 组之间重度 HIE 患儿 NBNA 评分比较差异无统计学意义,提示中度 HIE 患儿出生后 6 ~ 12 h 行亚低温治疗可能仍然有效,而对重度 HIE 患儿效果不明显,这可能是因为严重的缺氧缺血导致在亚低温治疗介入前二次能量衰竭已经发生。

免疫反应和炎症在新生儿 HIE 中发挥了重要作用[11]。缺氧缺血引起血管内炎症级联反应,同时应激或死亡的神经元引起脑固有免疫细胞的活化以及外周免疫细胞的脑浸润,这些免疫细胞通过释放神经毒性物质(如活性氧和炎性细胞因子等)最终导致了继发性神经元死亡[12]。亚低温治疗不仅可以减少脑细胞的代谢率,还能抑制免疫反应,进而起到神经保护作用[13]。Treg 细胞通过细胞间的直接接触和分泌细胞因子来发挥抗炎作用。Treg 细胞能有效抑制自身免疫反应,是维持免疫稳态和限制炎

性损伤的关键因素[14]。IL-17 主要由 Th17 细胞分泌,炎症早期许多固有免疫细胞也能迅速分泌 IL-17,是典型的促炎细胞因子。IL-17 通过活化丝裂原活化蛋白激酶途径和核转录因子-κB 途径促进促炎性分子的产生,进而导致损伤部位炎性细胞浸润和坏死[15]。在免疫炎症反应中,存在 Treg/Th17 失衡[16]。在缺血性脑卒中患者中,存在 IL-17 升高和 Treg 细胞降低[17-18]。有研究表明,在新生儿 HIE 中,脑损伤程度与外周血中 IL-17 水平呈正相关,与 Treg 细胞水平呈负相关[19]。本研究结果显示,治疗 72 h 后,各组 HIE 患儿血 Treg 细胞均较治疗前升高,IL-17 水平均较治疗前降低,但仅亚低温组中度 HIE 患儿治疗后血 Treg 细胞及 IL-17 水平与治疗前及对照组比较差异有统计学意义,因此,6 ~ 12 h 开始亚低温治疗可能通过维持较高的 Treg 细胞比例调节免疫反应抑制炎症,同时通过抑制 IL-17 等促炎性细胞因子及其诱导的炎症级联反应来降低脑损伤,但在重度 HIE 患儿中这一效果并不明显。

综上所述,亚低温治疗对出生后 6 ~ 12 h 的中度 HIE 患儿仍具有脑保护作用,通过刺激 Treg 细胞的生成和抑制促炎性细胞因子 IL-17 发挥脑保护作用。由于本研究观察时间短、样本量较少,后期需要纳入更多的样本及延长观察时间,来观察延长亚低温治疗时间窗的疗效与安全性,以使更多的患儿受益于亚低温治疗。

参考文献:

[1] 徐立,宋文婷,任建勋,等. 结扎颈总动脉复合低氧致 *C57BL/6* 小鼠缺血缺氧性脑病模型的建立及溶栓胶囊的作用[J]. 世界中医药,2018,13(1):17-20.

[2] WYLLIE J,PERLMAN J M,KATTWINKEL J,*et al*. Part 7:neonatal resuscitation:2015 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations[J]. *Resuscitation*,2015,95(1):169-201.

[3] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[J]. 中国当代儿科杂志,2005,13(2):584-584.

[4] 黄惠君,杨军,王国兵,等. $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 淋巴细胞与 Th17 细胞在新生儿脓毒症炎性免疫反应中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(9):676-678.

[5] SILVEIRA R C,PROCIANOY R S. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy[J]. *J Pediatr*,2015,91(6 Suppl 1):S78-S83.

[6] JACOBS S E,BERG M,HUNT R,*et al*. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy[J/CD]. *Cochrane Database Syst Rev*,2013,2013(1):CD003311. DOI:10.1002/14651858.CD003311.pub3.

[7] LI T,XU F,CHENG X,*et al*. Systemic hypothermia induced within 10 hours after birth improved neurological outcome in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Hosp Pract*,2009,37(1):147-152.

[8] 贾雯,李清平,董文斌,等. 不同亚低温时间窗治疗新生儿缺氧缺血性脑病的对比研究[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(14):1076-1080.

[9] JIA W,LEI X,DONG W,*et al*. Benefits of starting hypothermia treatment within 6 h *vs* 6-12 h in newborns with moderate neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *BMC Pediatr*,2018,18(1):50.

[10] LAPTOOK A R,SHANKARAN S,TYSON J E,*et al*. Effect of therapeutic hypothermia initiated after 6 hours of age on death or disability among newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy:a randomized clinical trial[J]. *JAMA*,2017,318(16):1550-1560.

[11] LAI J C Y,ROCHA-FERREIRA E,EK C J,*et al*. Immune responses in perinatal brain injury[J]. *Brain Behav Immun*,2017,63(1):210-223.

[12] LI B,CONCEPCION K,MENG X,*et al*. Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Prog Neurobiol*,2017,159(1):50-68.

[13] DRURY P P,GUNN E R,BENNET L,*et al*. Mechanisms of hypothermic neuroprotection[J]. *Clin Perinatol*,2014,41(1):161-175.

[14] LIESZ A,KLEINSCHNITZ C. Regulatory T cells in post-stroke immune homeostasis[J]. *Transl Stroke Res*,2016,7(4):313-321.

[15] SONG X,QIAN Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases[J]. *Cell Signal*,2013,25(12):2335-2347.

[16] 柯莉芹,王凤美,罗运春. 血管活性肠肽对哮喘小鼠气道炎症及 Th17/Treg 平衡的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2017,19(6):699-704.

[17] HU Y,ZHENG Y,WU Y,*et al*. Imbalance between IL-17A-producing cells and regulatory T cells during ischemic stroke[J]. *Mediators Inflamm*,2014,2014:813045.

[18] RUHNAU J,SCHULZE J,VON SARNOWSKI B,*et al*. Reduced numbers and impaired function of regulatory T cells in peripheral blood of ischemic stroke patients[J]. *Mediators Inflamm*,2016,2016:2974605.

[19] 尚云,杨卫红,任芳,等. 缺氧缺血性脑病新生儿血清白细胞介素-6 和 S-100β 蛋白水平变化及临床意义[J]. 新乡医学院学报,2017,34(5):378-380.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)