

腺病毒与呼吸道合胞病毒肺炎患儿 外周血淋巴细胞亚群差异分析*

付笑迎¹, 秦慧², 郎家庆¹, 杨方华¹, 马东礼¹, 陈运生¹

(1. 深圳市儿童医院检验科, 广东深圳 518038;

2. 蚌埠医学院, 安徽蚌埠 233003)

摘要:目的 比较腺病毒(adeno virus, ADV)与呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)肺炎患儿及健康儿童外周血淋巴细胞亚群的百分比例并探讨其临床意义。方法 收集2014年1月~2015年12月期间在深圳市儿童医院住院的腺病毒肺炎患儿(ADV组)30例, 呼吸道合胞病毒肺炎患儿(RSV组)30例(入选依据:60例病毒感染患儿肺部听诊均可闻及中小湿啰音, 肺部X线片有点状或片状阴影, 临床诊断为肺炎, 直接免疫荧光法检测相关病毒抗原结果为阳性且无其他病原感染的临床及实验室证据)以及健康体检儿童(健康组)35例, 应用流式细胞术检测上述研究对象外周血中CD3⁺T细胞, CD3⁺CD4⁺T细胞, CD3⁺CD8⁺T细胞, CD3⁻CD56⁺NK细胞及CD3⁻CD19⁺B细胞的百分比并比较各组间的差异。结果 与健康组相比较, ADV组[(55.04±8.45)% vs (69.07±9.30)%, $t=3.32$, $P=0.002$]与RSV组[(60.90±11.12)% vs (69.07±9.30)%, $t=2.43$, $P=0.004$]的CD3⁺T细胞比例均下降, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 特别是ADV组[(21.26±6.16)% vs (26.97±7.63)%, $t=1.87$, $P=0.04$]与RSV组[(21.56±7.06)% vs (26.97±7.63)%, $t=1.68$, $P=0.04$]的CD3⁺CD8⁺T细胞比例明显下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$);与此同时, 与健康组相比, ADV组[(28.22±5.16)% vs (17.06±6.42)%, $t=3.25$, $P=0.001$]和RSV组[(29.14±10.96)% vs (17.06±6.42)%, $t=2.79$, $P=0.009$]的CD3⁻CD19⁺B细胞比例升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。与健康组[(13.54±5.95)%, $t=2.01$, $P=0.03$]及ADV组[(16.26±8.34)%, $t=2.89$, $P=0.005$]相比, RSV组的CD3⁻CD56⁺NK细胞亚群比例[(9.59±5.54)%]下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 腺病毒肺炎和呼吸道合胞病毒肺炎患儿外周血淋巴细胞亚群比例存在统计学差异, 病毒性肺炎患儿体内可能存在免疫应答紊乱。

关键词: 儿童; 腺病毒肺炎; 呼吸道合胞病毒肺炎; 淋巴细胞亚群

中图分类号: R373; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)04-087-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.023

Study on Lymphocyte Subpopulations Differences in Children with ADV Pneumonia and RSV Pneumonia

FU Xiao-ying¹, QIN Hui², LANG Jia-qing¹, YANG Fang-hua¹, MA Dong-li¹, CHEN Yun-sheng¹

(1. Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Children's Hospital, Guangdong Shenzhen 518038, China; 2. Bengbu Medical College, Anhui Bengbu 233003, China)

Abstract: Objective To compare the percentage of lymphocyte subsets in children with adenovirus (ADV) pneumonia and respiratory syncytial virus (RSV) pneumonia and healthy children, and explore its clinical significance. Methods Research objective obtained from January 2014 to December 2015 from Shenzhen Children's Hospital inpatients diagnosed as ADV pneumonia 30 cases and RSV pneumonia 30 cases (inclusion criteria: 60 cases of viral infections in children with lung auscultation could be heard in small and medium wet rales, lung X-ray film a bit like or patchy shadow, clinical diagnosis of pneumonia, direct immunofluorescence assay associated viral antigens were positive and clinical and laboratory evidence of no other pathogens) and 35 cases of healthy check-up children as control group. The percentage of lymphocyte subsets including CD3⁺T cells, CD3⁺CD4⁺T cells, CD3⁺CD8⁺T cells, CD3⁻CD19⁺B cells and CD3⁻CD56⁺NK cells were detected by flow cytometry. Results Compared with control group, the expression of CD3⁺T cells was significantly decreased in ADV group [(55.04±8.45)% vs (69.07±9.30)%, $t=3.32$, $P=0.002$] and RSV group [(60.90±11.12)% vs (69.07±9.30)%, $t=2.43$, $P=0.004$], especially the expression of CD3⁺CD8⁺T cells was significantly decreased in ADV group [(21.26±6.16)% vs (26.97±7.63)%, $t=1.87$, $P=0.04$] and RSV group [(21.56±7.06)% vs (26.97±7.63)%, $t=1.68$, $P=0.04$]. Meanwhile, the proportion of CD3⁻CD19⁺B cells in both ADV [(28.22±5.16)% vs (17.06±6.42)%, $t=3.25$, $P=0.001$] and RSV groups [(29.14±10.96)% vs (17.06±6.42)%, $t=2.79$, $P=0.009$] were significantly increased. More important, the percentage of CD3⁻CD56⁺NK cells in RSV group [(9.59±5.54)%] was markedly lower compared

* 基金项目: 深圳市科技创新委员会自由探索项目(JCYJ20160429175623274), 广东省医学科学技术研究基金项目(201711515315444)。

作者简介: 付笑迎(1985-), 女, 博士, 主管技师, 从事流式诊断工作, 研究方向: 儿童感染性疾病的免疫调控, E-mail: xiaoying_fu@foxmail.com。

with ADV group $[(16.26 \pm 8.34)\%, t=2.89, P=0.005]$ and control group $[(13.54 \pm 5.95)\%, t=2.01, P=0.03]$. **Conclusion** Significant percentage of lymphocyte subsets difference was detected among ADV group, RSV group and healthy control group. There may exist immune response disorder with children of RSV or ADV pneumonia.

Keywords: children; adenovirus pneumonia (ADV); respiratory syncytial virus pneumonia (RSV); lymphocyte subsets

儿童的呼吸系统发育尚未完全成熟,其机体自身免疫功能不完善,呼吸道极易受感染,急性呼吸道感染(acute respiratory tract infection, ARI)是儿科常见疾病,其中病毒感染占相当大的比重,以腺病毒(adenovirus, ADV)及呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染为主,并呈一定的季节流行趋势,以冬春季节多发^[1~3]。儿童感染病毒严重会发展为肺炎,并引起各种并发症,甚至导致患儿死亡,后果不可想象^[3]。我们前期的研究表明:在腺病毒感染的情况下,白细胞总数显著升高,且以中性粒细胞为主。而呼吸道合胞病毒感染的情况下,白细胞总数未见明显升高,且以淋巴细胞为主^[5]。由此推测,免疫系统在病毒感染性疾病的发生发展过程中发挥重要作用。本文通过分析腺病毒及呼吸道合胞病毒肺炎患儿外周血淋巴细胞亚群的百分比变化差异,进一步认识病毒感染过程中淋巴细胞的比例变化,更好地了解免疫系统在病毒感染性疾病中的应答,为临床诊断儿童病毒感染性疾病提供更全面的理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2014年1月~2015年12月临床诊断为急性呼吸道感染的住院患儿,根据直接免疫荧光法检测七项呼吸道病毒抗原水平,将60例病毒检测阳性患儿分为腺病毒阳性组(ADV组)30例,其中男性18例,女性12例,平均年龄 18.12 ± 8.26 月;呼吸道合胞病毒阳性组(RSV组)30例,其中男性16例,女性14例,平均年龄 7.55 ± 12.78 月。60例病毒感染患儿肺部听诊均可闻及中小湿啰音,肺部X线片有点状或片状阴影,临床诊断为肺炎,无其他病原感染的临床及实验室证据。并随机选取同期在保健科进行健康体检的婴幼儿35例作为健康对照组,其中男性20例,女性

15例,平均年龄 12.55 ± 9.84 月,三组的年龄和性别之间差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。经深圳市儿童医院伦理委员会审核同意,取得家长知情同意后对三组患儿及儿童的外周血进行流式淋巴细胞亚群检测。

1.2 试剂和仪器 流式抗体:抗人CD3-APC-Cy7,抗人CD4-FITC,抗人CD8-APC,抗人CD56-PECy7和抗人CD19-PE,购自美国BD ebioscience公司;红细胞裂解液,购自Beckman公司;仪器:FACS Canto II流式细胞仪,购自美国BD公司。

1.3 方法 淋巴细胞亚群的检测:在患儿入院当天即空腹抽取EDTA-K₂抗凝血2 ml,健康对照组于体检当日抽取EDTA-K₂抗凝血2 ml。每支试管内分别加入相应抗体(抗人CD3-APC-Cy7,抗人CD4-FITC,抗人CD8-APC,抗人CD56-PECy7和抗人CD19-PE)和100 μ l抗凝血充分震荡混匀,常温避光孵育15 min;再加入细胞裂解液200 μ l混匀,室温孵育15 min,加PBS缓冲液洗涤2次,300 μ l PBS缓冲液重悬混匀待检测。淋巴细胞亚群检测采用美国BD公司的FACS Canto II流式细胞仪收集细胞检测荧光,计数10 000~15 000个淋巴细胞。并用Diva软件分析结果,分别得出CD3⁺T细胞,CD3⁺CD4⁺T细胞,CD3⁺CD8⁺T细胞,CD3⁻CD56⁺NK细胞及CD3⁻CD9⁺B细胞的百分比。

1.4 统计学分析 所有数据均来自于实验室信息管理系统(Lis系统),数据用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)%表示,采用SPSS13.0软件进行分析,多组中的两组间比较应用成组设计资料的 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 不同组间淋巴细胞亚群比例比较:见表1。

表1 不同组间淋巴细胞亚群百分比(%)的差异比较

项 目	ADV组	RSV组	健康组	ADV组 & RSV组		ADV组 & 健康组		RSV组 & 健康组	
				t	P	t	P	t	P
CD3 ⁺ T细胞	55.04 \pm 8.45	60.90 \pm 11.12	69.07 \pm 9.30	0.87	0.45	3.32	0.002	2.43	0.004
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T细胞	31.14 \pm 8.78	37.32 \pm 12.48	36.36 \pm 8.76	0.05	0.91	0.09	0.62	0.06	0.87
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	21.26 \pm 6.16	21.56 \pm 7.06	26.97 \pm 7.63	0.05	0.90	1.87	0.04	1.68	0.04
NK细胞	16.26 \pm 8.34	9.59 \pm 5.54	13.54 \pm 3.95	2.89	0.005	0.62	0.09	2.01	0.03
CD19 ⁺ B细胞	28.22 \pm 5.16	29.14 \pm 10.96	17.06 \pm 6.42	0.08	0.72	3.25	0.001	2.79	0.009

ADV组与健康组相比,ADV组总CD3⁺T细胞比例显著下降,差异具有统计学意义($P<$

0.01),其中以 $CD3^+CD8^+$ T 细胞比例下降为主,差异亦具有统计学意义($P<0.05$)。与此同时,ADV 组的 $CD3^+CD19^+$ B 细胞百分比显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。RSV 组与健康组间淋巴细胞亚群比较:总 $CD3^+$ T 细胞比例显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),其中以 $CD3^+CD8^+$ T 细胞比例下降为主,差异亦具有统计学意义($P<0.01$)。与此同时, $CD3^+CD19^+$ B 细胞亚群显著升高,且 RSV 组的 NK 细胞比例显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),与 ADV 组相比,RSV 组的 NK 细胞比例明显下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),而其余各组淋巴细胞亚群之间的比例差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论 支气管肺炎是儿科下呼吸道感染的常见病和多发病,儿童因其自身免疫系统未完全成熟,易发生急性呼吸道感染,其中病毒感染占相当大的比例,以呼吸道合胞病毒和腺病毒常见^[6,7]。人免疫系统在婴幼儿病毒感染疾病发生发展过程中发挥着非常重要的作用,固有免疫和适应性免疫,细胞免疫和体液免疫都各司其职。细胞免疫中,T 淋巴细胞扮演着重要角色,抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)通过 MHC 分子将内源性或外源性抗原肽呈递给 T 淋巴细胞,与 T 淋巴细胞膜表面受体特异性结合,激活 T 淋巴细胞,同时释放活性物质进一步活化巨噬细胞和 B 细胞,并分泌多种细胞因子,引起免疫损伤。活化的 $CD8^+$ T 细胞能够在 MHC 限制的条件下,通过脱颗粒作用,迅速释放细胞内预存的穿孔素(perforin)和颗粒酶 B(granzyme B),发挥杀伤靶细胞的免疫应答作用;还能通过释放即时合成的细胞因子以及趋化因子等发挥免疫调节作用。与 $CD4^+$ T 辅助细胞相似的是, $CD8^+$ T 细胞在不同的细胞因子诱导条件下,亦可以分化为不同的 Tc 细胞亚群,表达不同的特异性转录因子,并发挥不同的免疫应答作用。目前发现的有 Tc1 细胞,Tc2 细胞和 Treg 细胞等,研究表明,Tc1,Tc2 细胞以及 $CD8^+CD25^+$ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞都参与了病毒感染性疾病的发生发展过程,并在其中发挥重要的免疫应答效应^[9]。我们的研究结果提示 $CD8^+$ T 细胞百分比有所下调,提示我们病毒性肺炎患儿外周血中的 $CD8^+$ T 细胞的免疫应答状态发生变化,病毒感染时机体通过增强细胞免疫功能来发挥抗病毒作用。

B 淋巴细胞是机体适应性免疫系统的重要组成部分,B 细胞的主要功能即为产生免疫球蛋白(Ig),介导体液免疫应答;此外,B 细胞还能够分泌细胞因子(如 IL-4,IL-5,IL-6 和 TNF 等),且具有将抗原递呈给初始 T 细胞的潜能^[9]。我们的研究结果

提示病毒性肺炎患儿外周血 B 淋巴细胞亚群比例明显增高,提示我们体液免疫应答在机体对抗病毒过程中发挥重要作用,亦有研究表明呼吸道合胞病毒特异性抗体 IgM,IgG 和 IgA 不能单独作为早期感染呼吸道合胞病毒的诊断指标^[10]。

人自然杀伤细胞(NK 细胞)是固有免疫系统的重要组成部分,是机体自身发挥抗病毒作用的免疫先锋,在无预先致敏的情况下迅速杀伤靶细胞并释放多种细胞因子(如 IFN- γ , TNF- α , GM-CSF 等),为机体提供快速的防御保护作用^[11]。我们的研究表明,在腺病毒肺炎患儿的外周血中,NK 细胞的比例有所下降,提示我们 NK 细胞在病毒感染过程发挥了其效应功能。近来的研究提示人的体内存在多种类型的固有淋巴细胞(innate lymphoid cells, ILCs),ILC 发育分化早期存在着共同前体,在后期阶段受不同转录因子调控,不同 ILC 亚群有着不同的细胞因子分泌谱^[11]。根据杀伤功能强弱,ILC 可以被分为两类:一类是具有较强杀伤活性的 NK 细胞,另一类是不具备或仅有较弱杀伤能力的辅助性 ILC。有研究发现,重症肺炎患儿比轻症患儿 NK 细胞降低更为显著^[12],而辅助性 ILC 细胞亚群在病毒性肺炎患儿的病程中扮演怎样的调控角色还有待进一步研究。

综上所述,病毒性肺炎患儿免疫细胞亚群发生变化,且存在淋巴亚群紊乱,不同类型的病毒感染引起患儿外周血淋巴细胞亚群的变化亦不同,临床可通过检测患儿外周血 T 淋巴细胞亚群,NK 细胞及 B 细胞的亚群比例变化,反映患儿机体的免疫状态,为患儿的诊断提供免疫依据。

参考文献:

- [1] 杨翠珍,任宪辉,杨洪亮,等.病毒性肺炎患儿外周血自然杀伤细胞和 T 淋巴细胞亚群的变化规律探索[J].微量元素与健康研究,2016,33(3):31-32.
Yang CZ, Ren XH, Yang HL, et al. The research of natural killer cells and T lymphocytes subsets in peripheral blood of children with viral pneumonia[J]. Studies of Trace Elements and Health, 2016, 33(3): 31-32.
- [2] 王和平,郑跃杰,邓继岩,等.深圳市儿童医院住院儿童常见呼吸道病毒病原学分析[J].临床和实验医学杂志,2013,12(21):1722-1724.
Wang HP, Zheng YJ, Deng JK, et al. Analysis common viral pathogen of respiratory infection in hospitalized children in Shenzhen Children's Hospital[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2013, 12(21):1722-1724.
- [3] 解娟,张梦瑶,李小侠,等.九项呼吸道病原体 IgM 抗体联合检测对儿童呼吸道感染的临床意义[J].现代检验医学杂志,2016,30(4):110-112,116.

- Xie J,Zhang MY,Li XX,et al. Clinical significance of detecting immunoglobulin-M of nine pathogens in serum of children with respiratory tract infection[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine 2016,30(4): 110-112,116.
- [4] 刘春艳,肖 艳,张 辉,等. 儿童急性呼吸道感染病毒感染特点分析[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(8):631-633.
- Liu CY,Xiao Y,Zhang H,et al. Characteristic adenovirus infection in children with acute respiratory tract infection[J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics, 2010,25(8):631-633.
- [5] 付笑迎,杨方华,孙丽芳,等. 血细胞常规,C反应蛋白及降钙素原联合检测诊断儿童病毒感染性疾病的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(23):3390-3392.
- Fu XY,Yang FH,Sun LF,et al. The clinical significance of blood routine test combined with C reactive protein and procalcitonin detection in diagnosis of virus infectious disease in children [J]. International Journal of Laboratory Medicine,2015,36(23):3390-3392.
- [6] De Souza Costa VH,Baurakiades E,Viola Azevedo ML,et al. Immunohistochemistry analysis of pulmonary infiltrates in necropsy samples of children with non-pandemic lethal respiratory infections (RSV; ADV;PIV1;PIV2;PIV3;FLU A;FLUB)[J]. J Clin Virol,2014,61(2):211-215.
- [7] 李素芳,袁永红,田 军. 病毒性肺炎患儿的病原学及细胞免疫功能分析研究[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(6):1278-1280.
- Li SF,Yuan YH,Tian J,et al. Study on etiology and cellular immune function of children with viral pneumonia[J]. Chinese Journal of Nosocomiology,2015,25(6):1278-1280.
- [8] Kakaradov B,Arsenio J,Widjaja CE,et al. Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8(+) T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing[J]. Nat Immunol,2017,18(4):422-432.
- [9] Frasca D,Blomberg BB. B cell function and influenza vaccine responses in healthy aging and disease[J]. Curr Opin Immunol,2014,29:112-118.
- [10] 吴 意,金 娟,樊春卉,等. 儿童呼吸道合胞病毒感染血清特异性抗体 IgM,IgG 和 IgA 表达的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2018,33(2):82-85.
- Wu Y,Jin X,Fan CH,et al. Correlation research of serum specific antibody expression of IgM,IgG and IgA in children with respiratory syncytial virus infection[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018,33(2):82-85.
- [11] Del Zotto G,Marcenaro E,Vacca P,et al. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2017,92(2):100-114.
- [12] Klose CS,Flach M,Mohle L,et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages[J]. Cell,2014,157(2):340-356.