

• 临床检验研究 •

初诊脑瘫患儿外周血淋巴细胞亚群及血清免疫抗体、补体水平的变化

谢晓英, 谢文锋, 曾桦, 丁睿

(中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 分析初诊脑瘫患儿外周血淋巴细胞亚群及血清免疫抗体、补体水平,了解脑瘫患儿细胞及体液免疫状态。**方法** 选取2009年8月至2011年2月于本院小儿科首诊的脑瘫患儿69例,抽静脉血即时检测。应用四色流式细胞术结合CD45⁺设门分析外周血淋巴细胞亚群;采用速率散射比浊法方法检测血清IgA、IgG、IgM、总IgE及补体C3、C4。**结果** 与对照组相比,脑瘫患儿组外周血T淋巴细胞、NK细胞比例显著减少,B淋巴细胞比例显著增高($P<0.05$);IgM、IgG水平显著增高,总IgE水平显著降低($P<0.05$);其他差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 初诊脑瘫患儿存在细胞、体液免疫调节异常,可能与疾病早期免疫系统对受损中枢神经系统的保护作用有关。

关键词: 淋巴细胞亚群; 脑性瘫痪; 体液免疫**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.029**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)03-0320-02

Changes of blood lymphocyte subsets and serum antibody and complement in children with preliminary diagnosis of cerebral palsy

Xie Xiaoying, Xie Wenfeng, Zeng Hua, Ding Rui

(Clinical Laboratory, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Objective To analyze the lymphocyte subsets and serum antibody and complement levels of children with preliminary diagnosis of cerebral palsy to understand the cellular and humoral immunity condition in them. **Methods** Blood samples of 69 children with preliminary diagnosis of cerebral palsy in our hospital from Aug 2009 to Feb 2010 were collected. Four-color flow cytometry were used for detecting the lymphocyte subsets by gating of CD45⁺. Rate nephelometry were used to measure serum IgA, IgG, IgM, total IgE and complement C3 and C4 level. **Results** Compared with control group, the percentage of T lymphocytes and NK cells in children with cerebral palsy reduced significantly, while that of B lymphocytes increased ($P<0.05$), serum IgM and IgG levels reduced significantly, while total IgE level increased ($P<0.05$), and other differences were not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** There were abnormalities of cellular and humoral immune in children with preliminary diagnosis of cerebral palsy, which might be related with the protective effects of immune system to the damaged central nervous system at early stage of disease.

Key words: lymphocyte subsets; cerebral palsy; humoral immunity

小儿脑性瘫痪(cerebral palsy, CP),简称脑瘫,是指新生儿期未因各种原因所致的非进行性脑损伤,主要表现为中枢性运动障碍及姿势异常,常伴有智力低下、语言障碍、癫痫等并发症^[1]。CP是多因素作用的结果,发病过程复杂,近年来对CP患儿免疫功能的研究日渐受到关注^[4-7-8]。本研究对69例初诊CP患儿的外周血进行检测,进一步完善CP患儿免疫功能特点的研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 首诊CP患儿共69例,男44例,女25例,年龄0~7岁,平均1.45岁,其中痉挛型32例、手足徐动型18例、失调型7例、混合型12例,均以《第一届全国小儿脑瘫座谈会标准(1988)》为根据,排除自身免疫疾病、肿瘤、肝肾疾病、急慢性感染;对照组为同期于本院体检健康者49例,男26例,女23例,年龄岁0~9岁,平均2.47岁。CP组与对照组年龄及性别构成差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 试剂为美国Beckman Coulter公司生产的四色荧光单克隆混合抗体(CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5、CD45-FITC/CD(56+16)-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5)、鞘液、溶血素及免疫球蛋白和补体试剂盒;Beckman FC500型流式细胞仪、Beckman Assay 360免疫分析仪也均为美国Beckman Coulter公司产品。

1.3 方法

1.3.1 淋巴细胞亚群检测 采肘静脉血2.0 mL EDTA抗凝,用微量全血直接免疫荧光标记染色法检测。取2管待测抗

凝全血各50 μ L,第1管加入CD45-FITC、CD4-RD1、CD8-ECD、CD3-PC5的混合抗体10 μ L^[12],第2管加入CD45-FITC、CD(56+16)-RD1、CD19-ECD、CD3-PC5的混合抗体10 μ L,避光孵育20 min后,各加入300 μ L溶血素,待红细胞充分溶解,弃上清液,加入PBS 2 mL洗涤,1500 r/min离心5 min,弃上清液后加PBS 500 μ L制备单细胞悬液。利用Beckman FC500型流式细胞仪对细胞悬液进行检测。

1.3.2 抗体及补体检测 采肘静脉血3.0 mL于干燥管,以离心半径8 cm,500 r/min离心5 min,分离血清随机待检。采用速率散射比浊法,利用Beckman Assay 360免疫分析仪检测血清中IgA、IgG、IgM、总IgE及补体C3、C4含量。

1.4 统计学处理 实验数据均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用SPSS11.0进行统计学分析,两组间均数比较采用独立样本t检验,经方差齐性检验后, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 外周血淋巴细胞亚群百分比比较 根据淋巴细胞侧向散射光(side scatter, SSC)特点及其免疫表型(CD45⁺)进行设门(图1)。与对照组相比,CP患儿T淋巴细胞亚群(CD3⁺)、自然杀伤细胞(NK, CD3⁻/CD56⁺ 16⁺)百分比明显降低($P<0.05$),B淋巴细胞亚群(CD19⁺)百分比明显增高($P<0.05$),辅助T淋巴细胞(Th, CD3⁺/CD4⁺ CD8⁻)、抑制T淋巴细胞(Ts, CD3⁺/CD8⁺ CD4⁻)及二者比值(Th/Ts)差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.2 血清抗体、补体浓度比较 与对照组比较,CP患儿血清

IgM、IgG 水平显著增高, 总 IgE 水平显著降低 ($P < 0.05$),

IgA、补体 C3、C4 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 CP 组与对照组外周血淋巴细胞亚群百分比比较 ($\bar{x} \pm s$)

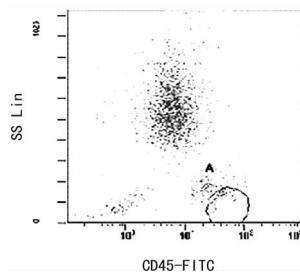
分组	T 淋巴细胞(%)	B 淋巴细胞(%)	NK 细胞(%)	Th 细胞(%)	Ts 细胞(%)	Th/Ts
对照组	70.28 ± 8.81	17.81 ± 6.92	11.06 ± 4.40	33.53 ± 10.21	25.13 ± 6.64	1.40 ± 0.75
CP 组	61.75 ± 11.33 [*]	24.00 ± 8.89 [*]	9.61 ± 7.39 [*]	38.83 ± 8.00	22.57 ± 6.89	1.70 ± 0.84

^{*}: 与对照组比较, $P < 0.05$

表 2 CP 组与对照组血清 IgA、IgG、IgM、总 IgE 及补体 C3、C4 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	IgA (g/L)	IgG (g/L)	IgM (g/L)	总 IgE (mg/L)	C3 (mg/L)	C4 (mg/L)
对照组	1.22 ± 0.64	9.00 ± 4.71	1.30 ± 0.63	441.73 ± 837.16	1149.45 ± 232.46	217.51 ± 59.74
CP 组	0.84 ± 0.82	14.36 ± 14.58 [*]	1.60 ± 0.53 [*]	91.96 ± 179.12 [*]	1037.52 ± 191.30	208.09 ± 223.00

[#]: 与对照组相比, $P < 0.05$



A 门: CD45-FITC 设门的淋巴细胞。

图 1 流式细胞仪检测细胞散点图

3 讨 论

CP 是小儿神经系统的常见病之一, 也是儿童肢体致残的主要疾病之一, 世界范围内发病率有上升趋势, 给社会、家庭和个人带来了极大的心理压力和经济负担^[2,11]。近年来 CP 患儿的免疫功能在疾病发生发展中的作用日渐受到关注, 但相关研究尚少, 较为零散且存在争议。

T 淋巴细胞和 NK 细胞介导细胞免疫和非特异性免疫。周亚新等^[3]认为, 在长期的应激状态下, 活化的 T 淋巴细胞、NK 细胞等可通过血脑屏障进入中枢神经系统, 产生大量细胞因子如 IL-6、TNF-2 等, 介导中枢神经系统的损伤。脑室旁白质软化 (periventricular leukomalacia, PVL) 是 CP 的主要病理改变之一^[9]。Kadhim 等^[4]的研究显示, 与不伴有 PVL 的脑缺血相比, 伴有 PVL 者 T 淋巴细胞活化增强, 并且 TNF- α 、IL-2 表达增多, 这种免疫/炎性反应可直接造成少突胶质细胞凋亡及髓鞘变性。而本研究发现, 初诊 CP 患儿外周血中 T 细胞和 NK 细胞百分比明显降低 ($P < 0.05$)。有研究者认为, 在疾病早期, 机体可以通过合理调节的自身免疫 (如下调 T 淋巴细胞表达), 增强促进神经元存活的因素的作用而削弱损伤因素的作用, 因而在中枢神经系统受损伤时发挥保护作用^[5]。本研究选择的对象均为初诊患儿, 病程较短 (平均年龄仅 1.45 岁), 其自身细胞免疫功能的下调, 可能是机体对神经系统损伤的一种保护性调节。作为主要的免疫细胞, B 细胞介导体液免疫, 还可以分泌 NGF、BDNF、NT-3 等神经营养因子^[6]。在本研究中发现, 初诊 CP 患儿外周血中 B 淋巴细胞亚群百分比明显增高 ($P < 0.05$), 也可能与免疫系统对神经损伤的早期保护有关。

IgG 是最主要的免疫球蛋白, 刘志刚等^[7]通过检测 46 例 CP 患儿血浆抗体的研究表明其 IgG 高于健康对照组; 与本研究结果一致。同时刘志刚等^[7]的研究显示 CP 患儿 IgM 也高于正常, 而朱立平等^[8]研究发现 CP 患儿血浆 IgM 含量降低, 二者存在争议。本研究结果显示, 未经治疗且排除免疫性疾病

病、急慢性感染及肝肾疾病等的 CP 患儿血清中 IgM 显著增高 ($P < 0.05$), 可能与部分 CP 患儿存在宫内感染、早产等因素有关^[10]。另有研究显示 CP 患儿总 IgE 含量下降, 可能与患儿丘脑下部的免疫中枢受损, 以及微量元素缺乏、免疫球蛋白合成下降有关^[11]。

综上所述, 初诊 CP 患儿即存在细胞免疫及体液免疫功能的异常调节, 可能与免疫系统对中枢神经损伤的保护性调节有关; 免疫系统对 CP 患儿疾病的发生发展和转归是否存在影响, 值得进一步研究。

参考文献

- 胡莹媛. 脑性瘫痪定义的历史沿革[J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(5): 257-258.
- Pakula AT, Van Naarden Braun K, Yeargin-Allsopp M. Cerebral palsy: classification and epidemiology[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2009, 20(3): 425-452.
- 周亚新, 钱传忠. 病毒性脑炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞变化的临床研究[J]. 实用临床医药杂志, 2008, 12(2): 82-83.
- Kadhim H, Sébire G. Immune mechanisms in the pathogenesis of cerebral palsy: implication of proinflammatory cytokines and T lymphocytes[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2002, 6(3): 139-142.
- 李霞, 钱韶红. 自身免疫的神经保护作用及应用前景[J]. 中国耳鼻喉科杂志, 2007, 7(3): 199-201.
- 方琪, 董万利, 徐嵩, 等. 脑梗死患者外周血淋巴细胞神经营养因子及受体 mRNA 和相关蛋白质产物的表达[J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 12(4): 490-492.
- 刘志刚, 李铁生, 吴军. 脑瘫患儿的免疫异常研究[J]. 现代康复, 1999, 3(7): 804-805.
- 朱立平, 李媛森, 郝艳秋. 微量元素锌硒对脑瘫患儿免疫功能影响的研究[J]. 中华现代儿科学杂志, 2006, 3(2): 123-124.
- 房巧燕, 陈贻骥. 早产儿脑损伤的非创伤性检查方法[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(6): 668-669.
- Kim SK, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Evidence of changes in the immunophenotype and metabolic characteristics (intracellular reactive oxygen radicals) of fetal, but not maternal, monocytes and granulocytes in the fetal inflammatory response syndrome [J]. J Perinat Med, 2009, 37(5): 543-552.
- 祁岩超, 刘振寰. 小儿脑瘫的治疗现状与展望[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2006, 9(1): 102-104.
- 余颖, 许志良, 陈益民, 等. 流式细胞术检测淋巴细胞亚群抗体用量的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(7): 630-631.