

• 临床检验研究论著 •

25 例肾病综合征患儿调节性 T 细胞水平变化及意义

连广琬, 赵明奇, 郭敏, 朱冰

(广州市妇女儿童医疗中心, 广东广州 510120)

摘要:目的 观察肾病综合征(NS)患儿外周血中调节性 T 细胞(Treg)、淋巴细胞各亚群的变化,探讨其在疾病发生和发展中的作用。方法 选取 20 例健康儿童作为对照组,25 例患儿作为肾病综合征组。采用流式细胞术对两组儿童进行外周血 Treg、淋巴细胞各亚群检测。结果 与正常对照组比较,NS 组的外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg 细胞、CD3⁺CD4⁺辅助性 T 细胞、CD19⁺B 细胞表达均明显降低($P < 0.05$);而 CD3⁺CD8⁺抑制性 T 细胞表达明显升高($P < 0.05$);肾病综合征组患儿的 CD16⁺CD56⁺NK 细胞表达降低,但与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。结论 淋巴细胞免疫功能的紊乱,特别是 Treg 的表达及其功能的改变,参与了肾病综合征的发病,其检测可有助于肾病综合征的诊治。

关键词:肾病综合征; 调节性 T 细胞; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)07-0843-03

The changes and clinical significance of regulatory T cells in 25 children with nephrotic syndrome

Lian Guangwan, Zhao Mingqi, Guo Min, Zhu Bing

(Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To observe the changes of regulatory T cells (Treg) and lymphocyte subsets in peripheral blood in children with nephrotic syndrome (NS), and to discuss its role in the occurrence and development of the disease. **Methods** Twenty healthy children were set as control group. Twenty-five children with nephrotic syndrome were set as NS group. The expressions of Treg and lymphocyte subsets in peripheral blood were analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with control group, the expression of CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg, CD3⁺CD4⁺T helper cells and CD19⁺B cells in NS group were significantly decreased ($P < 0.05$), while CD3⁺CD8⁺ suppressor T cells were increased significantly ($P < 0.05$). The expression of CD16⁺CD56⁺NK cells in children with NS was decreased, but there was no statistical significance when compared with control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The disorders of lymphocytes, especially the expression and functional changes of regulatory T cells may play a role in NS. The detection of regulatory T cells could contribute to the diagnosis and treatment of patients with NS.

Key words: nephrotic syndrome; regulatory T cells; flow cytometry

儿童肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)临床上表现多为水肿、大量蛋白尿、高脂血症、低清蛋白血症。它并不是一种独立性疾病,而是由于各种原因导致肾小球滤过膜的通透性增高,大量血浆蛋白从尿中丢失而引起的一组临床症候群。

NS是临床常见的慢性迁延性疾病,易复发。儿童发病率高,多见于3~7岁儿童。近年研究表明,NS的发病与机体免疫功能有关。调节性T细胞(Treg)是一群具有免疫调节功能的细胞。但目前此类细胞在儿童NS中研究较少,本研究拟通过流式细胞术,检测肾病综合征患儿外周血CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg的表达,以及淋巴细胞各亚群的数量,探讨其在NS中的作用,为NS患儿的临床诊断和治疗提供一定依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选择2012年至2013年在广州市妇女儿童医疗中心住院的初次确诊为NS患儿25例,各患儿之前均未经过治疗,其中,男性16名,女性9名;平均年龄6岁5个月。20例正常对照组为同期在门诊保健的健康儿童,其中,男性11名,女性9名;平均年龄3岁6个月。两组研究对象在年龄、性别构成方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 试剂与仪器 美国BD公司的抗人CD4-FITC抗体、抗

人CD25-PE抗体,标记Alexa Fluor647的抗人CD127抗体,以及BD MULTITEST™试剂盒。流式细胞仪型号为BD FACSCalibur。

1.3 方法 Treg测定: NS组和正常对照组均空腹抽取外周静脉血2 mL,用EDTA-K₂抗凝。每个标本取抗凝全血100 μL,加入CD4、CD25、CD127荧光抗体各20 μL,混匀后室温下避光反应15 min。加入2 mL溶血素,室温避光,溶血10 min。然后各标本于1 500 r/min离心5 min,去上清,加入2 mL的PBS缓冲液,1 500 r/min离心5 min,去上清后加入450 μL PBS重悬,待上机。

淋巴细胞各亚群测定: NS组和正常对照组均空腹抽取外周静脉血2 mL,用EDTA-K₂抗凝。两组儿童各取50 μL抗凝全血分别加入置有相应20 μL荧光抗体的专用的计数管中,混匀室温避光孵育15 min,每管加入450 μL溶血素,室温避光孵育15 min后,待上机检测。

1.4 收集数据 用三色校准荧光微球和APC荧光标记微球制备定标液,通过FACSCOMP软件调整仪器前角、侧角,及其4个通道的电压和补偿。应用CELLQUEST软件获取10 000个淋巴细胞进行分析,计算CD44⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg细胞占CD4⁺T细胞的比例。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例: NS 组为 (7.82 ± 1.92)%, 显著低于正常对照组 (9.34 ± 2.10)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。NS 组患儿的 CD3⁺CD4⁺ 辅助性 T 细胞绝对值、CD19⁺B 细胞绝对值均明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CD3⁺CD8⁺ 抑制性 T 细胞升高 ($P < 0.05$), 见图 1、表 1。

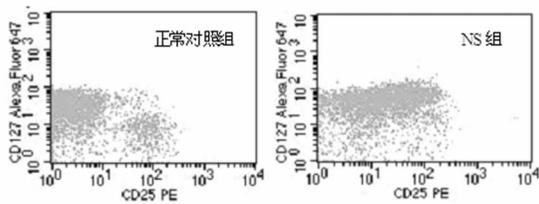


图 1 NS 组与正常对照组 Treg 结果比较

表 1 NS 组与对照组儿童外周血淋巴细胞各亚群结果比较

组别	n	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 绝对值(cells/ μ L)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 绝对值(cells/ μ L)	CD19 ⁺ 绝对值(cells/ μ L)	CD16 ⁺ CD56 ⁺ 绝对值(cells/ μ L)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{-/low} Treg (%)
正常对照组	20	1881.00 ± 86.83	955.10 ± 302.07	1087.45 ± 517.37	453.65 ± 259.89	9.34 ± 2.10
NS 组	25	1328.08 ± 595.00	1430.44 ± 685.58	737.48 ± 369.67	400.52 ± 395.13	7.82 ± 1.92
<i>t</i>		2.685	3.110	2.645	0.518	2.532
<i>P</i>		0.010	0.004	0.011	0.607	0.015

3 讨 论

NS 是由于肾小球滤过膜对血浆蛋白的通透性增高, 大量血浆蛋白从尿中丢失而导致一系列病理生理改变的一种临床综合征^[1]。迄今为止, 其发病机理还是不明确, 近年发现, NS 的发病与机体免疫功能异常有关^[2]。

机体的免疫主要分为细胞免疫和体液免疫。T 淋巴细胞是机体细胞免疫的基础, 可分为 CD3⁺CD4⁺ 辅助性 T 细胞 (Th) 和 CD3⁺CD8⁺ 抑制性 T 细胞 (Ts) 两大类。Th 的作用是增强免疫应答、活化细胞, 增强其吞噬或杀伤功能。而 Ts 细胞则是识别存在于靶细胞表面上的 MHC-I 类分子与抗原结合的复合物, 特异性直接杀伤靶细胞。作者在研究中发现, NS 组患儿的 Th 细胞绝对值明显低于正常对照组, 这与文献报道的相一致^[3]; 且 Ts 细胞绝对值升高。结果提示 NS 患儿的 Th 和 Ts 细胞的比例失衡, 引起了机体的细胞免疫反应, 引发炎症介质的连锁释放, 从而激活了炎症因子网络, 导致肾小球屏障的破坏^[4]。Th 细胞按其分泌的细胞因子及功能不同, 可分为 Th1 和 Th2 两大亚群。Th1 细胞主要分泌白细胞介素-2 (IL-2)、干扰素 (IFN), 以及肿瘤坏死因子 β (TNF- β) 等, 其作用是介导与炎症有关的免疫应答, 辅助抗体生成, 参与细胞免疫。Th2 细胞主要分泌白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-5 (IL-5)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-10 (IL-10) 等, 可刺激 B 细胞增殖并产生 IgG 和 IgE 抗体。在生理情况下, Th1/Th2 细胞相互制约, 相对平衡, 以维持机体正常的免疫状态。当某一亚群细胞数量或功能发生变化时, 这个平衡将会被打破。Bagga 等^[5]研究发现, 在 NS 患儿肾脏组织中 Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子高度表达, 肾小球的免疫复合物沉积, 及其所致损伤与这些细胞因子高表达密切相关。提示 T 细胞参与了肾脏组织的免疫损伤^[6]。

CD19⁺ 是成熟 B 淋巴细胞的特异性标志, 是检测 B 淋巴细胞最好的标志物。在研究中发现, NS 患儿 CD19⁺ 的 B 细胞绝对值明显低于对照组, 与 Kemper 等^[7]的研究结果一致, 没

有接受激素治疗的 NS 患儿 CD19⁺ 的 B 细胞均低于正常对照组。

Treg 是一类具有免疫抑制特性的 T 淋巴细胞亚群, 在机体免疫应答调节中发挥重要作用^[8]。早在 1995 年, 日本学者 Sakaguchi 等^[9]发现, 将小鼠外周血中 CD4⁺CD25⁺ 细胞去除后, 会导致小鼠自发产生多种自身免疫性疾病, 而重新回输这些细胞后则阻止了疾病的发生。因此将此群细胞命名为 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞。另外, 在健康人中, 近 10% 的外周血 CD4⁺T 细胞均表达 IL-2 受体 A 链 (即 CD25)。故 CD25 成为 Treg 的一种标志物。但由于 CD25 既是调节性 T 细胞又是活化 T 细胞的标志物, 所以不能单纯依靠 CD25 将二者区分开来。在后续的研究中发现了 Treg 的转录因子 Foxp3, 它是目前最为特异的 Treg 标记物。然而 Foxp3 为胞内蛋白, 需要进行固定、穿孔、染色, 操作繁琐, 不利于分选和纯化, 在临床和科研中推广比较难^[10]。近年研究表明, Treg 表面 CD127 的低表达与胞质内 Foxp3 的高表达具有良好的相关性^[11]。故 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} 成为了 Treg 的新的标志。

作者通过流式细胞术检测了 NS 组患儿和正常对照组的外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例, 结果发现 NS 组患儿的 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg 表达明显低于正常对照组。提示 Treg 细胞数目减少导致其功能失调, 从而使机体免疫抑制功能受损。

Treg 细胞主要是通过直接细胞接触机制或分泌调节性细胞因子机制来主动抑制自身免疫细胞的活化, 在维持机体的平衡方面有重要作用。Treg 细胞可通过细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4)、转化生长因子- β (TGF- β) 以及糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR) 等直接与肾脏组织上的相应受体结合, 并抑制靶细胞上 IL-2R α 链的表达, 降低靶细胞对 IL-2 的反应性。由于 NS 患儿 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg 比例的下降, 使机体对效应 T 细胞的抑制作用减弱, 不能有效防御自身免疫反应的发生。同时, 由于 NS 患儿体内的 CD4⁺

CD25⁺CD127^{-/low} Treg 水平降低,其分泌的细胞因子也会明显降低。Treg 细胞活化后会产生细胞因子 IL-10, TGF-β^[12]。在 NS 早期, Treg 分泌的 IL-10, TGF-β 的水平降低使其通过分泌细胞因子而对 Th1/Th2 细胞亚群的平衡调节能力也相应地降低,导致 Th1/Th2 失衡,进而炎症反应失控导致自身免疫损伤。由于上述多种因素,使机体针对自身肾小球固有抗原和种植抗原的病理性免疫应答的调节能力下降,促进 NS 的发生与发展。

综上所述, NS 患儿外周血中淋巴细胞免疫功能的紊乱,特别是 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg 水平降低,提示其参与了疾病的发生和发展,为今后进一步研究 CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} Treg 在 NS 的发病机制,制备单克隆抗体回输体内的治疗方案等方面提供了新思路及新方法,也为 NS 的临床诊治提供一定的实验室依据。

参考文献

[1] 胡亚美. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005:1641-1647.
 [2] 梁亚浩, 刘光陵. 儿童肾病综合征免疫功能状态的研究进展[J]. 中国全科医学, 2011, 14(24): 2810-2812.
 [3] 丁楠, 郝丽, 黎淮, 等. 原发性肾病综合征患者免疫指标变化的临床意义探讨[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(4): 356-359, 381.
 [4] 何文兵, 刘光陵. 原发性肾病综合征的免疫致病机制探讨[J]. 中国全科医学, 2010, 13(30): 3461-3463.
 [5] Bagga A, Mantan M. Nephrotic syndrome in children[J]. Indian J Med Res, 2005, 122(1): 13-28.

[6] 毛晓燕, 莫樱, 蒋小云. 激素敏感型肾病综合征儿童外周血 T, B 淋巴细胞亚群的研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2012, 33(4): 504-507, 511.
 [7] Kemper MJ, Zepf K, Klaassen I, et al. Changes of lymphocyte populations in pediatric steroid-sensitive nephrotic syndrome are more pronounced in remission than in relapse[J]. Am J Nephrol, 2005, 25(2): 132-137.
 [8] Stephens LA, Barclay AN, Mason D. Phenotypic characterization of regulatory CD4⁺CD25⁺T cells in rats[J]. Int Immunol, 2004, 16(2): 365-375.
 [9] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
 [10] Banham AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FoxP3⁺ regulatory T cells[J]. Trends Immunol, 2006, 27(12): 541-544.
 [11] Liu W, Putnam AL, Xu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells[J]. J Exp Med, 2006, 203(7): 1701-1711.
 [12] Reduta T, Stasiak-Barmuta A, Laudanska H. CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in disseminated and localized forms of allergic contact dermatitis: relation to specific cytokines[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2011, 49(2): 255-254.

(收稿日期: 2013-10-16)

(上接第 842 页)

注意的是阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌对亚胺培南和厄他培南耐药率有明显升高趋势,其耐药株主要分离自泌尿外科病房患者,可能与导尿管的使用有关。对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌,其耐药机制主要是产碳青霉烯酶,目前研究发现的碳青霉烯酶有 70 多种,可通过质粒和染色体介导,引起耐药性的水平和垂直传播^[4-6]。肠球菌属仍是尿路感染的第 2 位病原菌,万古霉素、利奈唑胺、替加环素等抗菌药物对葡萄球菌属和肠球菌属也保持良好抗菌活性。检出 3 株耐万古霉素的尿肠球菌,尿肠球菌耐药主要是 VanA 的产生^[7-9],且有研究者认为耐万古霉素的金黄色葡萄球菌(VRSA)的产生是 VanA 基因从 VRE 经耐药基因水平传递的方式转移至金黄色葡萄球菌的结果,应引起高度重视,有研究表明,加强医院内感染控制和抗菌药物使用管理可有效控制和降低 VRE 的发生^[10]。

近年来,随着广谱抗菌药物的广泛使用,造成的选择性压力使细菌的耐药率逐年上升^[11-12],治疗尿路感染应依据药敏结果或参考本单位细菌耐药情况合理选择抗菌药物。

参考文献

[1] 叶志华, 刘碧清. 临床尿路感染的病原菌分布及耐药性分析[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(2): 196-197.
 [2] 杨青, 陈晓, 孔海深, 等. Mohnarin 2011 年度报告: 尿标本细菌耐药监测[J]. 中国医院感染学杂志, 2012, 22(24): 5503-5507.
 [3] 朱德妹, 汪复, 胡付品, 等. 2010 年中国 CHINET 尿液标本中细菌的分布和耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(4): 241-250.
 [4] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lac-

tamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(3): 969-976.
 [5] 夏云, 曹何, 张晓恒, 等. 革兰阴性杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药率的变化及用量的关系[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(3): 237.
 [6] 沈纪录, 朱德妹, 吴卫红, 等. 革兰阴性杆菌碳青霉烯酶的产生与细菌耐药性关系的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(4): 408-414.
 [7] 孙宏莉, 王辉, 陈民均, 等. 2008 年中国十二家教学医院革兰阳性球菌耐药性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(3): 224-230.
 [8] 王贺, 徐英春, 谢秀丽, 等. 万古霉素耐药肠球菌的同源性及其耐药机制分析[J]. 中华医学科学院学报, 2008, 30(5): 521-524.
 [9] Zhu X, Zheng B, Wang S, et al. Molecular characterization of outbreak-related strains of vancomycin-resistant enterococci faecium from an intensive care unit in Beijing, China[J]. Chin J Hosp Infect, 2009, 72(2): 147-154.
 [10] Ozorowski T, Kawalec M, Zaleska M, et al. The effect of an antibiotic Policy on the control of vancomycin-resistant enterococci outbreak and on the resistance patterns of bacteria isolated from the blood of patients in a hematology unit[J]. Pol Arch Med Wewm, 2009, 119(11): 712-718.
 [11] Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century-A Clinical Super-Challenge[J]. N Engl J Med, 2009, 360(5): 439-443.
 [12] 陈民均. 细菌耐药性监测的前景[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(6): 605.

(收稿日期: 2013-10-15)