

• 临床检验研究论著 •

婴幼儿支原体感染与免疫功能的变化

苏晓霁, 卓佳佳, 许自成, 程邦宁[△]

(安徽省儿童医院检验中心, 安徽合肥 230001)

摘要:目的 检测肺炎支原体(Mp)感染婴幼儿的细胞免疫功能和体液免疫功能, 研究结果的变化规律, 探讨临床相关的诊断指标。方法 收集肺炎支原体感染的患儿的外周血标本, 采用流式细胞术检测淋巴细胞表面分化抗原 CD3、CD4、CD8 的表达, 利用生化仪检测血清中 IgM、IgG、IgA 的浓度; 同时设立健康对照组。结果 肺炎支原体患儿外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值和免疫球蛋白 IgA、IgG 浓度低于健康儿童, 免疫球蛋白 IgM 浓度高于正常儿童; 低拷贝组患儿外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞比例和免疫球蛋白 IgM 浓度低于高拷贝组。结论 肺炎支原体感染的患儿免疫状态发生明显变化, T 淋巴细胞免疫功能被抑制, 体液免疫功能发生一定的紊乱。

关键词:肺炎支原体; 细胞免疫; 体液免疫

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)24-3327-03

Changes of immune function in infants with *Mycoplasma pneumoniae* infection

Su Xiaoji, Zhuo Jiajia, Xu Zicheng, Cheng Bangning[△]

(Clinical Laboratory Center, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei, Anhui 230001, China)

Abstract: Objective To detect the cellular immune and humoral immune function in infants with *Mycoplasma pneumoniae*(Mp) infection, and to study its change regularity and the related clinical indexes. **Methods** The peripheral blood samples were collected from infantile patients with MP infection. The expression of CD3, CD4 and CD8 on the surface of T lymphocyte(T-cell) were detected by the flow cytometry and the concentrations of IgG, IgA and IgM in serum were detected by the automatic biochemistry analyzer. At the same time the normal control group was set up. **Results** The proportion of CD3⁺ and CD4⁺ T-cell, CD4⁺/CD8⁺ ratio and the concentration of IgG, IgA in the patient group were significantly lower than those in the control group, while the concentration of IgM in the patient group were significantly lower than those in the normal children. The concentration of IgM was higher than that in the normal children; the proportion of peripheral blood CD4⁺ T-cell and the concentration of IgM in the low-copy group were significantly lower than those in the high-copy group. **Conclusion** The immune status in children with Mp infection has obvious change. The immune function of T-cell is suppressed, the humoral immune function has certain turbulence.

Key words: mycoplasma pneumoniae; cellular immunity; humoral immunity

肺炎支原体肺炎(MPP)是婴幼儿常见的呼吸道感染疾病,多见于5岁以上儿童,近年来逐渐趋向低龄化,发病率也有所上升^[1-4]。临床表现为急性呼吸道感染伴肺炎,病变主要位于肺间质。病情的迁延可引起支气管哮喘的发作,同时还可伴有脏器和系统的肺外并发症发生。最新的研究认为,肺炎支原体的感染可引起机体的细胞免疫和体液免疫功能状态的改变^[5-6],造成某些患者的严重感染,病情的迁延和长期处于携带感染状态等。了解 Mp 感染后患儿免疫功能的变化,探讨临床相关的诊断指标,选取本院 2013 年 6 月至 2014 年 1 月, MPP 患儿 71 例和健康儿童 55 例,检测全血中淋巴细胞表面分化抗原 CD3、CD4、CD8 的表达和血清中 IgM、IgG、IgA 的浓度。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2013 年 6 月至 2014 年 1 月,住院肺炎支原体肺炎患儿 71 例(患儿组),其中男 50 例,女 21 例,年龄(3.87±3.07)岁,每个病例通过细菌培养、病毒抗体等相关指标检测,排除存在混合感染的可能。利用纤维支气管镜收集患儿支气管肺泡灌洗液,并采用 PCR 技术检测其中肺炎支原体拷贝数。根据测得拷贝数(1.50E+2~1.48E+9)将患儿分为 2 组:高拷贝组(>1.00E+5 copies/mL)25 例和低拷贝组(1.00E+2~1.00E+5 copies/mL)46 例;健康对照组为门诊

体检的健康儿童 55 例,其中男 31 例,女 24 例,年龄(4.12±2.89)岁。

1.2 仪器与试剂 美国 Beckman Coulter 公司 Fc 500 台式流式细胞仪、美国 ABI 公司 7300 实时荧光定量 PCR 仪、雅培 Abbott 16000 全自动生化仪、美国 Beckman 公司 CD3-PC5、CD4-FITC、CD8-PE 荧光标记复合检测试剂、湖南圣湘公司肺炎支原体荧光定量检测试剂盒。

1.3 方法 全血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞比例的检测:取 100 μL EDTA-K₂ 抗凝全血,加入 10 μL 复合检测试剂,混匀后 37 ℃避光孵育 20 min,加入溶血素 500 μL,混匀后 37 ℃避光孵育 20 min,上机检测。血清中 IgM、IgG、IgA 浓度的检测:抽取患儿外周血 1~2 mL 注入专用生化离心管,待血清自然析出后 3 500 r/min 离心 5 min,取血清上机进行检测。肺炎支原体拷贝数检测:取混匀的支气管肺泡灌洗液 1 mL 加入 1.5 mL 规格 Ep 管,按照试剂盒说明操作,配制好的反应体系放入 PCR 仪进行自动反应,根据标准曲线获知拷贝数高低。

1.4 统计学处理 使用 SPSS Statistics 17.0 软件进行数据处理和统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患儿组与健康对照组外周血淋巴细胞亚群检测结果 患

儿组 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺ 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值低于健康对照组 ($P<0.05$),CD3⁺CD8⁺ 细胞比例差异无统计学意义 ($P>0.05$),结果见表 1。

表 1 肺炎支原体患儿组与健康对照组外周血淋巴细胞亚群检测结果

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
患儿组	71	58.87±12.69*	28.73±8.65*	24.14±7.49	1.29±0.54*
健康对照组	55	67.74±4.04	33.25±4.38	22.89±3.12	1.45±0.27

* : $P<0.05$,与健康对照组比较。

2.2 患儿组与健康对照组外周血免疫球蛋白检测结果 患儿组 IgM 浓度高于健康对照组 ($P<0.05$),IgG、IgA 浓度低于健康对照组 ($P<0.05$),结果见表 2。

表 2 肺炎支原体患儿组与健康对照组外周血 IgM、IgG、IgA 检测结果

组别	<i>n</i>	IgM(g/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)
患儿组	71	1.79±1.01*	7.51±2.87*	0.87±0.67*
健康对照组	55	1.05±0.38	10.09±1.75	1.31±0.53

* : $P<0.05$,与健康对照组比较。

2.3 患儿不同拷贝组外周血淋巴细胞亚群检测结果 低拷贝组 CD3⁺CD4⁺ 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值低于高拷贝组 ($P<0.05$),CD3⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞比例,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见表 3。

表 3 患儿低拷贝组与高拷贝组外周血淋巴细胞亚群检测结果

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
低拷贝组	25	56.64±15.57	25.91±8.99*	25.07±7.33	1.17±0.37*
高拷贝组	46	60.09±10.80	30.26±8.14	23.63±7.61	1.35±0.58

* : $P<0.05$,与高拷贝组比较。

2.4 患儿不同拷贝组外周血免疫球蛋白检测结果 低拷贝组 IgM 浓度低于高拷贝组 ($P<0.05$),低拷贝组的 IgG 和 IgA 浓度与高拷贝组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),结果见表 4。

表 4 低拷贝组与高拷贝组外周血 IgM、IgG、IgA 检测结果

组别	<i>n</i>	IgM(g/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)
低拷贝组	25	1.47±0.93*	7.35±3.50	0.68±0.59
高拷贝组	46	1.96±1.01	7.59±2.51	0.98±0.69

* : $P<0.05$,与高拷贝组比较。

3 讨 论

肺炎支原体是一种介于病毒和细菌之间的最小原核生物,无细胞壁,能自行繁殖,是引起儿童肺炎的常见病原体。近年来有研究证实支原体感染与体液、细胞免疫均有关,在机体内存在免疫调节、免疫抑制、免疫逃逸等多种免疫作用^[7-8]。肺炎支原体感染后可以通过黏附在气管上皮细胞表面受体上,除释放有毒的代谢物 H₂O₂、NH₃ 等外,Mp 抗原成分还与人体某些组织存在共同抗原,可刺激 B 细胞产生自身抗体,形成免疫复合物,导致机体免疫损伤,引起病理性免疫功能变化^[9-11]。机体内的 T 淋巴细胞是介导细胞免疫的主要效应细胞之一,T

淋巴细胞亚群的比例是反映机体免疫功能变化的主要指标。表面分化抗原 CD3⁺ 是成熟 T 淋巴细胞的特征性标志^[12],CD3⁺ 细胞的比例反映 T 淋巴细胞的成熟程度。成熟的 T 淋巴细胞根据表面标志物又可分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两群,机体维持正常的免疫功能状态,有赖于之间的相互协作或相互制约,以产生适度的免疫应答,使之既能清除异物抗原,又不致损伤机体自身组织。正常情况下,T 细胞及其亚群的数目在周围组织中相对稳定,CD4⁺/CD8⁺ 比值已成为监测人体细胞免疫功能,反映机体免疫状态的主要指标。CD4⁺/CD8⁺ 比值发生异常改变就说明机体免疫功能发生了紊乱^[12]。

本实验通过检测肺泡灌洗液中 Mp 的拷贝数判断患儿感染与否。对相关检测数据的观察和分析发现,肺炎支原体感染患儿 CD3⁺T 淋巴细胞下降,说明机体的成熟 T 淋巴细胞功能被抑制,CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞也下降提示对肺炎支原体介导的免疫反应的应答被抑制,这可能是导致机体的免疫功能降低的关键因素。CD3⁺CD8⁺T 细胞比例未见明显改变,导致 CD4⁺/CD8⁺ 比值发生了明显下降,说明肺炎支原体感染后,尤其在病程急性期体内 T 细胞亚群的分布平衡被打乱,导致免疫紊乱和免疫防御能力的降低。另一方面,患儿的外周血免疫球蛋白、IgM 浓度显著高于健康儿童,提示肺炎支原体感染患儿体内 B 淋巴细胞受到刺激开始增殖活化,与 T 淋巴细胞的变化之间呈现一种负相关,而 IgA 和 IgG 浓度显著低于健康儿童,进一步反映了机体免疫功能的失衡和紊乱。实验中根据测得肺泡灌洗液中 Mp 的拷贝数高低,将患儿分为低拷贝组和高拷贝组,比较 2 组之间 T 淋巴细胞亚群比例和免疫球蛋白浓度。分析后发现,低拷贝组患儿外周血 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞比例和免疫球蛋白 IgM 浓度低于高拷贝组,而 CD3⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值和 IgA、IgG 浓度,2 组间未见明显差异。其中 CD4⁺T 淋巴细胞比例的统计学比较 $P=0.047$,略小于 0.05,考虑到 2 组的样本量较少,所以可以忽略这种差异,认为 2 组间 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞比例没有显著差异。在疾病感染急性期,肺炎支原体在体内大量复制增殖,对于体液免疫系统产生强力刺激,B 淋巴细胞受到刺激后增殖活化,免疫球蛋白 IgM 是最早出现的抗体,感染的越严重的患儿,IgM 的浓度上升越迅速和明显^[11]。高拷贝组免疫球蛋白 IgA、IgG 浓度虽略高于低拷贝组,但由于处于急性期,这种改变不是很显著,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

通过以上的分析,可以得出结论:在患儿感染 Mp 的急性期,机体的细胞免疫和体液免疫功能都发生了明显改变。细胞免疫功能被抑制,CD3⁺T 细胞、CD3⁺CD4⁺T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值下降,体液免疫功能被激活,B 淋巴细胞活化增值,免疫球蛋白、IgM 浓度显著上升。在对不同感染程度患儿的分析中发现,免疫功能的变化主要体现在体液免疫的变化,大量免疫球蛋白 IgM 与抗原成分形成免疫复合物,导致机体免疫损伤。而 CD3⁺CD4⁺T 细胞比例的差别不大。因此,提示临床对于 Mp 感染患儿的治疗,应多考虑运用免疫调节的手段,纠正细胞免疫和体液免疫失衡的紊乱状态,帮助患儿更快、更好地恢复健康。

参考文献

[1] Hamano-Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, et al. Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia [J]. J Infect Chemother, 2008, 14(6): 424-432. (下转第 3331 页)

十分必要的。

有国外文献报道 HAART 治疗开始后,严重的肝毒性发生率为 2%~18%^[4],但在本研究中只出现 1 例严重肝毒性,发生率仅为 0.98%,有可能是因为患者出现肝毒性以后都及时进行了保肝治疗,因此没有发展为重度肝毒性。多数研究报道 NVP 比 EFV 更容易导致肝毒性,有文献报道两者肝毒性发生率分别为 88.9%和 33.3%^[5],还有文献报道两者肝毒性发生率分别为 49.8%和 31.7%^[6],并且两者差异有统计学意义($P<0.05$),从本研究的结果来看,NVP 治疗的患者肝毒性的发生率显著高于 EFV 治疗的患者(35.6%和 13.8%, $P<0.05$),说明治疗方案中含有 NVP 更易引起肝毒性,这与其他学者的研究结果基本一致,但具体数值还因地区及人群不同而有所差别。

合并感染 HBV/HCV 一直是研究者比较认可的肝毒性危险因素^[7-8],但在本研究中,合并 HBV 感染的患者只有 1 例,无法分析其与肝毒性的相关性,所以只将合并感染 HCV 与性别、年龄、民族、传播途径、基线 CD4⁺值、基线 ALT 升高、基线 AST 升高等因素作为 HAART 治疗的可能风险因素进行单因素 Logistics 回归分析,结果显示性别、年龄、民族、传播途径、基线 CD4⁺值、基线 AST 升高与肝毒性的出现无明显联系,合并感染 HCV、基线 ALT 升高为 HAART 治疗出现肝毒性的风险因素($P<0.05$)。多因素分析结果也显示合并 HCV 感染、基线 ALT 升高为肝毒性出现的独立风险因素($P<0.05$)。通过肝毒性的发生率显示,使用 NVP 会增加肝损害的风险,国内学者也有同样的结论^[9-10],其肝毒性产生的机制有可能是因为机体的超敏反应或者是线粒体毒性。合并 HCV 感染会增加肝毒性的风险也已有学者广泛报道^[7-8],其机制可能是 HIV 病毒抑制了人体的免疫系统,有利于 HCV 病毒的复制,从而加重对肝脏的损害。并且国内外也有研究发现基线 ALT 升高会增加肝毒性发生的风险因素^[6,11]。因此,在对患者进行治疗前一定关注上述 3 种因素,采取相应措施,预防肝毒性的发生。另外要提到的是基线 CD4⁺数量这一因素,有文献报道,基线 CD4⁺升高是肝毒性出现的风险因素^[12],但在本研究中并未发现相似结果,原因分析如下:本科室门诊对 HIV-1 抗体阳性患者开始治疗是以 CD4⁺数目小于或等于 200 为标准,因此 CD4⁺数目大于 200 即为基线 CD4 增高,但 CD4⁺>200 开始治疗的患者例数少,并且其具体数值并没有特别明显的增

高,总体看来 2 组 CD4⁺数值差别不大,因此无法体现其危险性。

综上所述,本研究发现接受含 NVP 的 HAART 治疗的患者比接受含 EFV 的 HAART 治疗的患者更易出现肝毒性,但肝毒性以 1 级为主,4 级肝毒性出现罕见。另外合并 HCV 感染、基线 ALT 升高为肝毒性出现的独立风险因素($P<0.05$)。从而为艾滋病临床治疗提供进一步的指导。

参考文献

[1] 罗玲,李太生. AIDS 抗病毒治疗的历史、现状与未来[J]. 传染病信息,2009,6(3):321-329.

[2] 代丽丽,张彤,李在村. HIV/AIDS 初始抗反转录病毒治疗新进展[J]. 中国病原生物学杂志,2012,6(4):469-472.

[3] AIDS Clinical Trials Group. Division of AIDS table for grading the severity of adult and pediatric adverse events. Clarification,2009.

[4] Marina Núñez. Hepatotoxicity of antiretrovirals: Incidence, mechanisms and management[J]. J Hepatology,2006,44(1):132-139.

[5] 李在村,高艳青. 艾滋病患者抗逆转录病毒治疗的肝毒性特点分析[J]. 中国病原生物学杂志,2009,1(6):405-407.

[6] 高世成,桂希恩. 奈韦拉平相关肝毒性的发病率及危险因素[J]. 中华肝脏病杂志,2010,21(9):689-693.

[7] 李凌华,唐小平. 艾滋病合并丙型肝炎抗病毒治疗中肝损害的相关因素[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2010,21(3):181-184.

[8] Mamta K. Jain,MD,MPH. Drug-Induced Liver Injury Associated with HIV Medications. Clin Liver Dis,2007,11(6):615-639.

[9] 韦秋玲. 109 例 HIV/AIDS 患者抗病毒治疗临床观察[J]. 中国艾滋病性病,2010,22(4):375-378.

[10] 陆铭,蒙燕. 艾滋病抗病毒治疗药物不良反应 104 例观察[J]. 传染病信息,2008(6):373-375.

[11] Esteban Martinez,Jose L. Blanco. Hepatotoxicity in HIV-1-infected patients receiving nevirapine-containing antiretroviral therapy[J]. AIDS,2001,15(12):1261-1268.

[12] Kathryn M. Chu,Andrew M. Boulle Nevirapine-Associated Early Hepatotoxicity: Incidence, Risk Factors, and Associated Mortality in a Primary Care ART Programme in South Africa[J]. PLoS ONE,2010,5(2):205-208.

(收稿日期:2014-04-05)

(上接第 3328 页)

[2] 刘东. 几种口服药减少静脉用阿奇霉素副作用的临床观察[J]. 新乡医学院学报,2006,23(5):495-496.

[3] 陈建萍,李恒涛,杨波,等. 上海梅陇地区儿童肺炎支原体抗体检测情况[J]. 实用儿科临床杂志,2007,22(10):738-739.

[4] 刘禧杰,辛德莉,李靖,等. 肺炎支原体对大环内酯类抗生素的耐药分子机制[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(22):1730-1733.

[5] Kraft M, Cassell GH, Pak J, et al. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in asthma: effect of clarithromycin[J]. Chest,2002,121(6):1782-1788.

[6] Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, et al. Regulation of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with Mycoplasma pneumoniae[J]. Infect Immun,2002,70(7):3649-3655.

[7] Hassan J, Irwin F, Dooley S, et al. Mycoplasma pneumoniae infection in a pediatric population: analysis of soluble immune markers

as risk factors for asthma[J]. Hum Immunol,2008,69(12):851-855.

[8] Stelmach I, Podisadłowicz-Borzecka M, Grzelewski T, et al. Humoral and cellular immunity in children with Mycoplasma pneumoniae infection: a 1-year prospective study[J]. Clin Diagn Lab Immunol,2005,12(10):1246-1250.

[9] 袁壮,董宗祈,胡仪吉,等. 患儿肺炎支原体肺炎诊断治疗中的几个问题[J]. 中国实用儿科杂志,2002,17(8):449-457.

[10] 候安存,卢炎,沙莉,等. 支原体肺炎患儿辅助性 T 细胞亚群 Th1、Th2 细胞状况[J]. 中华儿科杂志,2003,41(9):652-656.

[11] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1204-1205.

[12] 龚菲力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2004:144-153.

(收稿日期:2014-03-19)