

• 论 著 •

流式细胞术检测登革热患者 T 淋巴细胞研究

石亚玲¹, 赵 蓉¹, 陈伟烈²

(广州市第八人民医院:1. 检验科;2. 研究所, 广东广州 510060)

摘要:目的 探讨登革热患者的免疫状况。方法 流式细胞术检测登革热患者的 T 淋巴细胞, 从而分析患者的免疫状况。结果 与健康者的参考范围进行比较, 发现登革热患者的 T 淋巴细胞比例相对于健康者显著降低。CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺ 的淋巴细胞百分比分别为(36.54±9.78)%、(17.7±10.01)% , 与对照组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$) ; CD3⁺ CD4⁺ 的淋巴细胞数为(49.98±240.2)cells/μL, 差异有统计学意义($P<0.05$) ; CD3⁺ CD8⁺ 细胞数为(380.9±364.6)cells/μL, 差异有统计学意义($P<0.05$) ; CD3⁺ 细胞数(874.8±541.2)cells/μL, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 登革热患者免疫状况异常, T 淋巴细胞比例相对于健康者显著降低。

关键词:流式细胞术; 登革热; 免疫状况**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.013**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2015)24-3541-02Study on flow cytometry for detecting T lymphocytes in patients with dengue fever^{*}Shi Yaling¹, Zhao Rong¹, Chen Weilie²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Research Institute, Guangzhou Municipal Eighth People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510060, China)

Abstract: Objective To investigate the immune status in the patients with dengue fever. **Methods** The flow cytometry was used to detect the T lymphocytes in the patients with dengue fever for analyzing their immune status. **Results** Compared with the reference range in the healthy individuals, it was found that the T lymphocyte proportion in the patients with dengue fever was significantly reduced compared with the healthy individuals. The percentages of CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes were (36.54±9.78)% and (17.7±10.01)% respectively, which had statistical difference compared with the control group($P<0.05$) ; CD3⁺ CD4⁺ lymphocyte count was (49.98±240.2)cells/μL, the difference was statistically significant ($P<0.05$) ; CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes count was (380.9±364.6)cells/μL, the difference was statistically significant($P<0.05$) . **Conclusion** The immune status in the patients with dengue fever is abnormal, T lymphocyte percentage is significantly reduced compared with the healthy individuals.

Key words: flow cytometry; dengue fever; immune status

登革热是由登革病毒引起, 经伊蚊传播的一种急性传染病, 潜伏期通常约 5~7 d, 具有传播迅猛、发病率高等特点。登革热患者有可能出现极度疲倦及抑郁症状, 少数患者会恶化至登革出血热, 并进一步发生出血、休克, 乃至死亡, 登革热引起的并发症往往是患者致死的主因。一般来说登革热主要分布在热带及亚热带地区。每年世界上有 1 亿人受到登革病毒感染, 近年来, 随着旅游业的发展和全球温暖化, 登革热疫情日益严重, 已经成为一个世界性的严重公共卫生问题^[1]。郭汝宁等^[2]报道 2005~2010 年广东每年都有发生登革热病例现象。

登革热发病机制至今尚未完全清楚, 相关假说有: 病毒亲嗜性、病毒毒力学说、宿主的易感因素、抗体依赖性增强感染作用(ADE)、交叉反应性 T 细胞反应及细胞因子风暴等假说。登革病毒通过伊蚊叮咬进入人体, 在单核-巨噬细胞系统和淋巴组织中复制至一定数量后, 即进入血液循环(第 1 次病毒血症), 然后再定位于单核吞噬系统和淋巴组织之中^[3]。

交叉反应性 T 细胞的激活假说是促进登革病毒感染临床进程的关键, 与 DHF/DSS 发生有关。CD8⁺ T 细胞可以在 DENV 感染早期控制病毒感染, 但是, 在清除感染细胞的同时 CD8⁺ T 也参与了 DENV 感染的病理过程。病毒可以诱导出不同的交叉反应性 T 细胞反应, 这些低亲和力非中和性的细胞无法有效地清除病毒。在初次感染登革病毒的小鼠中, 只产生少量的登革特异性 CD4⁺ T 细胞; 然而, 4 个血清型的登革病

毒二次感染后将导致 CD4⁺ T 细胞的反应明显增加, 不但提高了 CD4⁺ T 细胞的 INF-γ 分泌水平, 也增加了 CD8⁺ T 细胞的活化^[3-4]。

本实验通过流式细胞术对登革热患者的 T 淋巴细胞进行检测, 分析患者是否出现 T 细胞免疫异常。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院确诊登革热患者 1 112 例, 平均年龄(48.5±10.88)岁, 无相关自身免疫性疾病、肿瘤或近期感染史, 50 例健康者作为对照组。登革热患者的主要临床症状: 发热、食欲下降、恶心、呕吐; 皮疹持续 3~4 d, 一般与发热同时消退; 不同部位、不同程度的出血, 如消化道出血, 血尿及阴道出血等; 淋巴结肿大。

1.2 仪器与试剂 仪器为 BD CantoII, 试剂为 CD3、FITC/CD8、PE/CD45、PERCP/CD4、APC、溶血素、绝对计数管, 均购自 BD 公司。

1.3 方法 抗体与外周血加入绝对计数管中孵育 15 min, 加入 500 μL 1×溶血素, 避光孵育 10 min, 震荡混匀, 上机检测。

1.4 统计学处理 使用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 若方差不齐, 则组间比较采用秩和检验。使用 GraphPad Prism5 软件进行作图分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

流式细胞术检测出各细胞绝对计数值, 与健康者进行比

较,发现登革热患者的T淋巴细胞比例相对于健康者显著降低。CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺的淋巴细胞百分比分别为(36.54±9.78)%、(17.7±10.01)% ,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$) ;CD3⁺CD4⁺的淋巴细胞数为(49.98±240.2) cells/nL,差异有统计学($P<0.05$) ;CD3⁺CD8⁺细胞数为(380.9±364.6) cells/nL,差异有统计学意义($P<0.05$),CD3⁺细胞数(874.8±541.2) cells/nL,差异有统计学意义($P<0.05$)

<0.05),见表1、图1。

112例登革热患者中,总体趋势相对健康者是降低,但是也有患者在正常范围之内,也有患者是呈升高趋势:其中CD3⁺低于正常值的人数占64%,高于正常值的占2%;CD3⁺CD4⁺低于正常值的人数占60%,高于正常值的占1%;CD3⁺CD8⁺低于正常值的人数占50%,高于正常值的占7%,Th/Ts低于正常值的人数占6%,高于正常值的占16%。

表1 登革热患者与健康者T细胞统计

组别	n	CD3 ⁺ 细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞	CD45 ⁺ 淋巴细胞数	Th/Ts
百分比(%)						
登革热组	1112	52.63±11.65	36.54±9.78*	17.70±10.01*	52.48±25.01	1.59±1.00
对照组	50	69.69±19.44	44.97±19.77	27.51±16.25	62.48±19.32	1.60±0.91
绝对计数(cells/μL)						
登革热组	1112	874.80±541.20*	49.98±240.20*	380.90±364.60*	1296.00±811.00	
对照组	50	1611.00±994.80	1002.00±894.90	668.60±654.50	2680.00±1045.00	

*: $P<0.05$,与对照组比较。

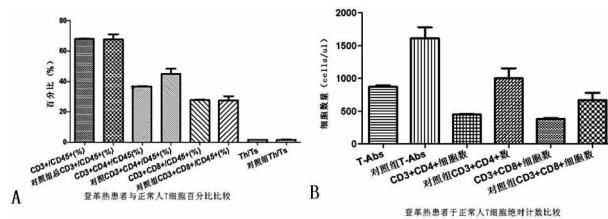


图1 登革热患者与健康者T细胞比较

3 讨 论

对于登革病毒,目前并没有特异的疫苗与病原治疗药物,主要采取对症治疗措施,医生尽可能做到早发现、早隔离、早治疗^[5-6]。登革出血热,有休克、出血等严重症状,需积极处理。休克者应及时补充血容量,可选用右旋糖酐40(低分子右旋糖酐)、平衡盐液、葡萄糖盐水等。目前很多种具有应用前景的登革热疫苗和抗病毒药物正在开发,进入临床试验阶段,但是仍存在许多亟待解决的问题^[7]。

登革热发病机制至今仍未完全阐明,其症状的严重程度受多种因素的影响。初次感染登革病毒,临幊上表现为典型登革热,不发生出血和休克。再次感染异型登革病毒时,病毒在血液中与原有的抗体结合,形成免疫复合物,激活补体,引起组织免疫病理损伤,临幊上呈现出出血和休克。涉及参与的免疫反应包括体液免疫、细胞免疫、Fc受体介导的细胞凋亡等多个机制,彼此相互交错、促进和制约,推动疾病的进程^[8]。

宿主的易感性影响到宿主对登革病毒感染的免疫应答,而免疫应答产生的细胞因子和交叉反应性T细胞在清除病毒的同时又可以引起组织和细胞损伤,加之病毒血清型毒力不同,产生的二次感染诱导ADE,使病理过程更加严重。最近有研究同样表明,登革病毒感染后首要靶细胞是单核细胞,而不是T细胞或B细胞^[3,9-10]。

本研究中,流式细胞术检测出各细胞绝对计数值,与健康者进行比较,发现登革热患者的T淋巴细胞比例相对于健康者显著降低。CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺与健康者相比显著降低。在1112例登革热患者中,总体趋势相对健康者是降低,但是也有患者在正常范围之内,也有患者是呈升高趋势:其中CD3⁺低于正常值的人数占64%,高于正常值的占2%;CD3⁺CD4⁺低于正常值的人数占60%,高于正常值的占1%;

CD3⁺CD8⁺低于正常值的人数占50%,高于正常值的占7%,Th/Ts低于正常值的人数占6%,高于正常值的占16%。大多数研究机制都说明T细胞会降低^[11],本研究中发现有一部分登革热患者T细胞升高,不管是升高还是降低,说明其免疫机制是紊乱的,具体的免疫机制需要进一步的研究。

参考文献

- 刘红,孙泉云.近几年暴发流行的三种蚊媒性病毒传染病[J].动物科学与动物医学,2002,19(8):33-35.
- 郭汝宁,何剑峰,梁文佳.广东省2005—2010年登革热流行特征分析[J].实用医学杂志,2011,27(19):3477-3480.
- 黄俊琪.登革热发病机制的研究进展[J].实用医学杂志,2011,27(19):3464-3465.
- Beaumier CM, Rothman AL. Cross-reactive memory CD4⁺ T cells alter the CD8⁺ T-cell response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner[J]. Viral Immunol, 2009, 22(3):215-219.
- 卫生部疾病预防控制局.登革热防治手册[M].2版.北京:人民卫生出版社,2008:74-84.
- Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of Aedes albopictus for dengue virus transmission [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(5):6461-6469.
- 姬广辉,戴建新.登革热药物防治研究进展[J].第二军医大学学报,2009,30(20):213-216.
- 吴冰珊,严延生.登革热发病机制的研究进展[J].海峡预防医学杂志,2009,15(4):22-24.
- 岳耀斐.登革热抗体依赖性感染增强(ADE)的机制研究[D].北京:北京协和医学院,2013.
- Kou Z, Quinn M, Chen H, et al. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus(DV)infection among human peripheral blood mononuclear cells [J]. J Med Virol, 2008, 80(1):134-146.
- Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdavifar S, et al. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 2004, 292(12):1-15.

(收稿日期:2015-05-12)