

• 论 著 •

淋巴细胞功能测定对小儿过敏性紫癜诊断与治疗的 价值初探

鲍丽娟,李文利,皮 蕾,张白杜
(广州市妇女儿童医疗中心检验科 510623)

摘 要:目的 研究过敏性紫癜(HSP)患儿急性期外周血淋巴细胞功能的变化,探讨其在 HSP 诊断与治疗中的意义。方法 采用流式细胞术(FCM)对 51 例 HSP 患儿急性期和 40 例健康查体儿童外周血淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺ 和 NK 细胞(CD16⁺CD56⁺)进行检测。结果 与对照组儿童比较,HSP 患儿急性期外周血 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 NK 细胞(CD16⁺CD56⁺)数量明显减低($P<0.01$),CD8⁺ 和 CD19⁺ 细胞比率明显增高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 HSP 患儿急性期存在免疫功能紊乱,外周血淋巴细胞功能测定对 HSP 患儿的早期诊断与治疗有重要意义。

关键词:过敏性紫癜; 流式细胞术; 淋巴细胞亚群
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.008 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)07-0890-03

Preliminary study on value of lymphocyte function detection in diagnosis and therapy of Henoch-Schonlein purpura
BAO Lijuan, LI Wenli, PI Lei, ZHANG Baidu
(Department Clinical Laboratory, Guangzhou Municipal Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of peripheral blood lymphocyte function in the children patients with acute phase of Henoch-Schonlein purpura(HSP), and to explore its significance in the diagnosis and therapy of HSP. **Methods** The peripheral blood lymphocytes subsets CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ and NK cells(CD16⁺CD56⁺) were detected in 51 children patients with acute phase of HSP and 40 children undergoing physical examination by flow cytometry(FCM). **Results** Compared with the control group, the counts of peripheral blood CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and NK cells(CD16⁺CD56⁺) in the acute stage of the HSP group were significantly decreased($P<0.01$), while the proportions of CD8⁺ and CD19⁺ cells were significantly increased($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** The immunity dysfunction exists in the children patients with acute phase of HSP. The peripheral blood lymphocyte function detection has an important significance for the early diagnosis and treatment of HSP.

Key words: henoch-schonlein purpura; flow cytometry; lymphocyte subsets

过敏性紫癜(henoch-Schonlein purpura, HSP)是儿童时期最常见的一种自身免疫反应介导的全身性血管炎^[1]。目前其发病机制尚未完全阐明,近年来有研究认为 HSP 患者机体存在着免疫功能紊乱^[2]。本研究拟通过应用流式细胞仪(FCM)检测 HSP 患儿急性期外周血淋巴细胞亚群,包括 T 淋巴细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺),B 淋巴细胞(CD19⁺),自然杀伤细胞(CD16⁺CD56⁺)细胞活性的变化,了解 HSP 患儿免疫功能状态,并探讨淋巴细胞功能测定在 HSP 患儿早期诊断及治疗中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HSP 组为本院临床收治的 HSP 患儿 51 例,均符合 HSP 的诊断标准^[3],其中男 38 例,女 13 例,年龄 3~14 岁,均为急性发作期。发病前 1~3 周 41 例有呼吸道前驱感染史,10 例有食物过敏史,1 例有动物毛接触史。临床表现:发热 21 例,咳嗽 31 例,腹痛 20 例,关节痛 30 例,51 例均有皮肤紫癜。检测前 2 周内均未接受过激素及免疫抑制剂或免疫调节剂治疗。健康对照组为门诊健康体检儿童 40 例,与对照组比较年龄及性别均差异无统计学意义($P>0.05$)。近期无感染,既往无血液及肾脏疾病,无变态反应性疾病史。

1.2 仪器与试剂 美国 BD 公司 Canto II 双激光 8 色流式细胞仪,鼠抗人单克隆抗体以及相关试剂均购自 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 HSP 患儿于入院后,治疗前抽静脉血 2 mL 置于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管中,12 h 内进行检测分析。

1.3.2 流式细胞仪检测:应用美国 BD 公司 Canto II 双激光 8 色流式细胞仪检测 T 淋巴细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺),B 淋巴细胞(CD19⁺)及自然杀伤细胞 NK(CD16⁺CD56⁺)亚群细胞活性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件分析,实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HSP 急性期患儿外周血淋巴细胞功能测定结果 HSP 急性期患儿外周血 CD3⁺ 细胞数量与对照组相比无明显变化,CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 NK(CD16⁺、CD56⁺) 细胞数量明显减低,CD8⁺ 与 CD19⁺ 细胞数量明显增高,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 对照组儿童外周血淋巴细胞亚群流式细胞散点图 健康体检儿童,男,5 岁,CD3⁺ 淋巴细胞比例占 72.66%,CD3⁺ 与 CD4⁺ 淋巴细胞比例占 42.79%,CD3⁺ 与 CD8⁺ 淋巴细胞占 28.79%,CD19⁺ 淋巴细胞比例占 12.70%,CD16⁺ 56⁺ NK 细

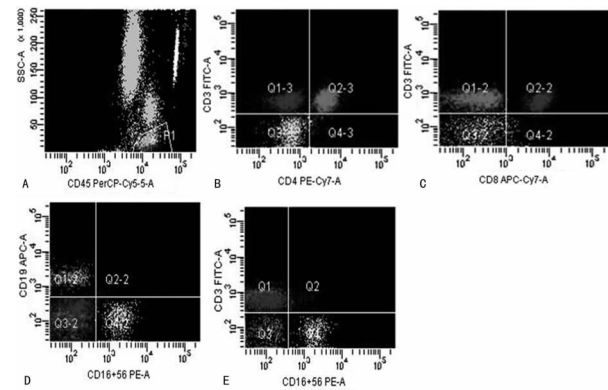
作者简介:鲍丽娟,女,主管技师,主要从事临床医学检验基础研究。

胞比例占 14.64%，具体结果见图 1。

表 1 HSP 患儿急性期外周血淋巴亚群检测结果(̄x±s, %)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD16 ⁺ CD56 ⁺
HSP 组	51	63.93±10.31	27.29±6.03 [#]	34.11±5.94 [*]	0.92±0.41 [#]	26.13±3.99 [#]	8.92±2.21 [#]
对照组	40	65.02±10.21	40.98±5.51	25.07±5.02	1.55±0.38	13.11±4.31	19.04±5.07

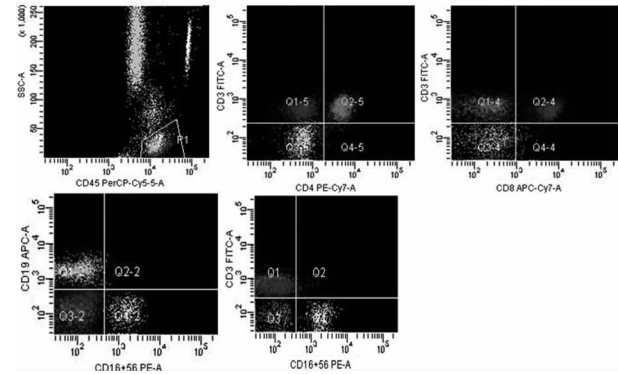
注：与对照组比较，* P<0.05；[#] P<0.01。



注：A 为外周血淋巴细胞分布图；B 为 CD3⁺ 与 CD4⁺ 淋巴细胞分布图；C 为 CD3⁺ 与 CD8⁺ 淋巴细胞分布图；D 为 CD19⁺ 淋巴细胞分布图；E 为 CD16⁺CD56⁺ NK 细胞分布图。

图 1 健康对照组儿童外周血淋巴亚群流式细胞散点图

2.3 HSP 患儿外周血淋巴亚群流式细胞散点图 HSP 患儿，男，7 岁，CD3⁺ 淋巴细胞比例占 64.99%，CD3⁺ 与 CD4⁺ 淋巴细胞比例占 27.12%，CD3⁺ 与 CD8⁺ 淋巴细胞占 36.56%，CD19⁺ 淋巴细胞比例占 26.02%，CD16⁺CD56⁺ NK 细胞比例占 8.99%，具体结果见图 2。



注：A 为外周血淋巴细胞分布图；B 为 CD3⁺ 与 CD4⁺ 淋巴细胞分布图；C 为 CD3⁺ 与 CD8⁺ 淋巴细胞分布图；D 为 CD19⁺ 淋巴细胞分布图；E 为 CD16⁺CD56⁺ NK 细胞分布图。

图 2 HSP 患儿外周血淋巴亚群流式细胞散点图

3 讨 论

HSP 患儿起病方式多种多样，细菌或病毒感染及食物过敏是最主要诱因。50%~90% 的儿童于发病前数天常因有上呼吸道及消化道感染症状而到医院就诊，其可引起多脏器损害，主要累及皮肤、关节、胃肠道及肾脏等系统，出现皮肤紫癜、关节炎、腹痛、便血、血尿和蛋白尿等临床表现^[4]。在疾病早期一般的实验室检查常无特殊发现，因而临床上对这些病例的早期诊断有时甚为困难，容易出现漏诊和误诊的情况，延误了对

此病的治疗。

T 细胞在免疫反应及炎性反应过程中起着关键作用。根据是否表达 CD4⁺ 与 CD8⁺，T 细胞又可分为 CD4⁺ 的 T 细胞与 CD8⁺ T 细胞亚群，各有不同的免疫功能。我们的检测结果显示，HSP 患儿急性期外周血 CD3⁺ 细胞数量无明显变化，T 细胞亚群 CD4⁺ 细胞百分率降低(P<0.01)，CD8⁺ 细胞百分率增高(P<0.05)，CD4⁺/CD8⁺ 比值降低(P<0.01)，与对照组比较差异显著，与文献报道一致^[5]。表明 HSP 患儿急性期存在着 T 细胞亚群紊乱，CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例失衡可能是 HSP 发病因素之一。

近来的研究表明^[6]，基于其分泌的细胞因子，表达的膜蛋白分子及功能的不同，CD4⁺ T 细胞又可分为 Th1、Th2、Th17 和 Treg(regulatory T cell, Treg)等亚群。Th1 细胞主要分泌细胞因子 IL-2、TNF-β 及 INF-γ，参与细胞免疫反应。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 及 IL-6，Th17 细胞主要分泌 IL-17，辅助 B 淋巴细胞，参与体液免疫反应，与机体 Ig 的合成有关。Treg 细胞则具有抑制 B 淋巴细胞的增殖与分化作用。生理状况下，Th1/ Th2、Th17/ Treg 细胞功能相互制约，相对平衡，维持机体正常的免疫状态。而在 HSP 急性期患者 CD4⁺ T 细胞中，Th2 与 Th17 细胞高于正常对照，Th2/ Th1 与 Th17/ Treg 比率明显增高^[7]。同时，患者体内的细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-17A 也明显高于对照组，说明 Th2 与 Th17 细胞处于优势活化状态，可促进 B 细胞的分化增殖^[8]。CD19 是 B 细胞特有的表面分化蛋白，可作为 B 细胞的特异性标志。本研究结果显示，HSP 患儿急性期外周血 CD19⁺ 细胞数量明显增高，与对照组相比有非常显著的差异(P<0.01)。提示 B 淋巴细胞被过度激活，导致表达增高。这也从侧面证实了上述研究观点。

本研究结果还显示，HSP 患儿急性期外周血 NK 细胞百分率明显低于对照组，二者差异有统计学意义(P<0.01)。NK 细胞是一组非特异性免疫效应细胞，其不但能直接杀伤病毒及靶细胞，而且具有免疫调节功能，能直接识别 B 淋巴细胞，影响 B 淋巴细胞的分化增殖^[9]。NK 细胞活性降低，则机体对 B 淋巴细胞的分化增殖抑制作用减弱，B 淋巴细胞活性增高。机体体液免疫功能亢进导致 Ig 的分泌增多，合成的抗原抗体复合物增加并沉积于血管壁及肾小球基底膜上，激活补体，致血管内皮细胞与基底膜的损害^[10]。同时，分泌过多的炎症介质，作用于小血管平滑肌，使小动脉和毛细血管扩张，通透性增加，引起皮肤、黏膜及内脏的水肿出血^[11]。这就是 HSP 致病的病理生理过程。

综上所述，HSP 患儿急性期即出现细胞免疫和体液免疫功能紊乱，外周血淋巴细胞功能测定对此病的早期诊断具有重要意义。并提示临床医生在治疗此病过程中(下转第 894 页)

B27 的灵敏度和特异度上均具有较高的临床适用性。实时荧光 PCR 技术易于标准化,准确性高,更具优势。

参考文献

[1] Van den Berg R, Hooge M, Van Gaalen F, et al. Percentage of patients with spondyloarthritis in patients referred because of chronic back pain and performance of classification criteria: experience from the Spondyloarthritis Caught Early (SPACE) cohort[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2013, 52(8):1492-1499.

[2] Liu X, Li YR, Hu LH, et al. High frequencies of HLA-B27 in Chinese patients with suspected of ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatol Int*, 2010, 30(10):1305-1309.

[3] Brewerton DA, Cafrey M, Hart FD, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27[J]. *Lancet*, 1973, 27(9):904.

[4] Roelandse-Koop EA, Buisman B, Vanhannen EJ, et al. Rapid HLA-B27 screening with real-time TaqMan PCR: a clinical validation in the Dutch population [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(12):1979-1985.

[5] 侯伟, 许晓东. 2 种 HLA-B27 检测方法在强直性脊柱炎诊断中的比较[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(24):3398-3400.

[6] 陈慧毅, 褚为靖, 张会英, 等. 实时荧光 PCR 法与流式细胞术两种方法检测 HLA-B27 的比较[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(12):2251-2254.

[7] 贺秋萍, 隋秀丽. 流式细胞术检测 HLA-B27 抗原在强直性脊柱炎诊断中的价值[J]. *中国误诊学杂志*, 2008, 8(27):6654-6655.

[8] 刘毓刚, 李琳. 流式细胞法检测人类白细胞抗原 B27/B7 表达在诊断强直性脊柱炎中的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(2):138-140.

[9] 李伯利, 陈葆国, 徐丹萍, 等. HLA-E、HLA-F 及 HLA-G 与母胎免疫耐受研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(1):178-179.

[10] Jucaud V, Ravindranath MH, Terasaki PI, et al. Serum antibodies to human leucocyte antigen (HLA)-E, HLA-F and HLA-G in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) during disease flares: Clinical relevance of HLA-F autoantibodies[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 183(3):326-340.

[11] Goodridge JP, Lee N, Burian A, et al. HLA-F and MHC-I Open Conformers Cooperate in a MHC-I Antigen Cross-Presentation Pathway [J]. *J Immunol*, 2013, 191(14):1567-1577.

[12] Lee N, Geraghty DE. HLA-F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP[J]. *Immunol*, 2003, 171(50):5264-5271.

(收稿日期:2016-08-23 修回日期:2016-11-25)

(上接第 891 页)

可适当应用一些调节免疫功能的药物^[12]。及早干预患儿机体疾病免疫的进程,以避免或减少继发性损害的发生。

参考文献

[1] Zaffanello M, Brugnara M, Franchini M. Therapy for children with Henoch-Schonlein purpura nephritis: a systematic review[J]. *Sci World J*, 2007(1):20-30.

[2] Donadio ME, Loiacono E, Peruzzi L, et al. Toll-like receptors, immunoproteasome and regulatory T cells in children with Henoch-Schonlein purpura and primary IgA nephropathy[J]. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29(9):1545-1551.

[3] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007:168-170.

[4] Johnson EF, Lehman JS, Wetter DA, et al. Henoch-Schonlein purpura and systemic disease in children: retrospective study of clinic findings, histopathology and direct immunofluorescence in 34 paediatric patients[J]. *Br J Dermatol*, 2015, 172(5):1358-1363.

[5] Chang H, Zhang QY, Lin Y, et al. Correlation of TLR2 and TLR4 expressions in peripheral blood mononuclear cells to Th1 and Th2-type immune responses in children with Henoch-Schonlein purpura[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8):13532-13539.

[6] Li YY, Li CR, Wang GB, et al. Investigation of the change in CD4(+) T cell subset in children with Henoch-Schon-

lein purpura[J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(12):3785-3792.

[7] Yuan LP, Ling L, Bo H. T-cell immunoglobulin and Mucin-domain-containing molecule-1 in peripheral blood mononuclear cells in Henoch-Schnlein purpura[J]. *Indian Pediatrics*, 2012, 49(3):225-227.

[8] Jen HY, Chuang YH, Lin SC, et al. Increased serum interleukin-17 and peripheral cells in children with acute Henoch-Schnlein purpura [J]. *Pediatr Allergy immunol*, 2011, 22(8):862-868.

[9] Dorothy Y. The role of CD2 family members in NK-cell regulation of B-cell antibody production[J]. *Antibodies*, 2014, 3(1):1-15.

[10] Yang YH, Chuang YH, Wang LC, et al. The immunobiology of Henoch-Schnlein purpura [J]. *Autoimmu Rev*, 2008, 7(3):179-184.

[11] Li YH, Feng XC, Huang L, et al. Hematologic and immunological characteristics of Henoch-Schnlein purpura in rat and rabbit models induced with ovalbumin based on type III hypersensitivity[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):1-6.

[12] Ohara S, Kawasaki Y, Miyazaki K, et al. Efficacy of cyclosporine A for steroid-resistant severe Henoch-Schonlein purpura nephritis[J]. *Fukushima J Med Sci*, 2013, 59(2):102-107.

(收稿日期:2016-10-21 修回日期:2017-01-23)