

• 论 著 •

125 例癫痫患儿外周血 B 淋巴细胞、NK 细胞和 NKT 细胞的检测与分析*

黄永洪¹, 康 颖^{2△}, 韩登科³, 陈 琼³, 徐胜男³

(1. 中山市港口医院内儿科, 广东中山 528447; 2. 广东药科大学附属第一医院临床医学院儿
科教研室, 广东广州 510080; 3. 中山市人民医院检验科, 广东中山 528403)

摘要:目的 探讨癫痫患儿 CD19、CD20、CD3⁻CD16⁺CD56⁺ (NK 细胞) 和 CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (NKT 细胞) 的变化情况和临床意义。**方法** 选取 2013 年 1 月至 2016 年 3 月中山市人民医院儿童神经专科确诊的 125 例癫痫患儿作为癫痫组, 另选取 125 例健康儿童作为对照组, 流式细胞仪检测两组研究对象外周血 CD19、CD20、NK 细胞和 NKT 细胞水平。**结果** 癫痫组 CD19、CD20、NK 细胞和 NKT 细胞水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析, CD19 最佳截断值为 9.4 时, 曲线下面积为 0.903, 灵敏度为 91.7%。CD20 最佳截断值为 7.750 时, 曲线下面积为 0.873, 灵敏度为 91.7%。NK 细胞最佳截断值为 8.55 时, 曲线下面积为 0.805, 灵敏度为 95.8%。NKT 细胞最佳截断值为 0.350 时, 曲线下面积为 0.769, 灵敏度为 91.7%。**结论** CD19、CD20、NK 细胞和 NKT 细胞可作为癫痫患儿免疫状态监测的重要指标。

关键词: 癫痫; CD19; CD20; NK 细胞; NKT 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.23.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)23-3286-03

125 cases of children with epilepsy peripheral blood B lymphocytes, NK cells and NKT cells in the detection and analysis*

HUANG Yonghong¹, KANG Ying^{2△}, HAN Dengke³, CHEN Qiong³, XU Shengnan³

(1. Pediatric Department of Pediatrics, Zhongshan Gangkou Hospital, Zhongshan, Guangdong 528447, China;

2. Department of Pediatrics Teaching and research, Clinical Medicine Hospital of

The First Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of

Laboratory Medicine, The People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To investigate the changes and clinical significance of CD19, CD20, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ (NK cells) and CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (NKT cells) in the children with epilepsy. **Methods** 125 cases of children with epilepsy children confirmed by Pediatric neurology specialists in Zhongshan People's Hospital from January 2013 to March 2016 were selected as epilepsy group, while 125 cases of healthy children were selected as control group, and the levels of CD19, CD20, NK cells and NKT cells in peripheral blood of two groups were detected by flow cytometry. **Results** CD19, CD20, NK cells and NKT cells levels in epilepsy group were higher than those in control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). For ROC curve analysis, CD19 optimal cutoff value of 9.4, the area under the curve was 90.3%, with 91.7% sensitivity. CD20 optimal cutoff value of 7.75, the area under the curve was 87.3%, with 91.7% sensitivity. NK cells optimal cutoff value of 8.55, the area under the curve was 80.5%, with 95.8% sensitivity. NKT cells optimal cutoff value of 0.35, the area under the curve was 76.9%, with 91.7% sensitivity. **Conclusion** CD19, CD20, NK cells and NKT cells can be used as important indexes for monitoring immune conditions in children with epilepsy.

Key words: epilepsy; CD19; CD20; NK cells; NKT cells

癫痫是大脑神经元反复发作性异常放电引起的突发性和一过性脑功能障碍, 以意识障碍、运动、感觉、精神或植物神经功能紊乱为特征^[1]。癫痫的主要原因是大脑细胞内外离子分布异常, 钾离子外流、钙离子内流、钠与氯离子异常转运, 导致脑电生理阵发性去机化漂移, 出现大脑短暂性的功能障碍^[2-3]。近来有研究表明, 频繁的癫痫发作导致机体免疫功能发生变化, 癫痫患儿存在细胞免疫功能紊乱^[4]。本研究从癫痫患儿外周血 B 淋巴细胞、NK 细胞和 NKT 细胞进行分析, 进一步探讨免疫功能检测在癫痫患儿诊疗中的作用, 为临床判断病情和选择适当的治疗方案提供更多的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2013 年 1 月至 2016 年 3 月中山市人民医院确诊为癫痫的住院患儿共 125 例纳入癫痫组, 其

中男孩 86 例, 女孩 39 例, 平均年龄 (5.7 ± 4.3) 岁, 根据《儿科学 (第 7 版)》癫痫诊断标准^[5]: (1) 有明确的癫痫发作史。 (2) 脑电图中出现棘样、尖波、棘慢复合波等痫样发放波者。入选标准: (1) 确诊为癫痫者。 (2) 住院前未接受抗癫痫治疗。 (3) 过去 6 周没有使用对免疫系统有影响的药物或食物疗法。 (4) 合并有遗传性代谢疾病、影响免疫系统疾病的患儿不采纳。对照组: 健康儿童共 125 例, 其中男孩 88 例, 女孩 37 例, 平均年龄 (4.6 ± 2.3) 岁。入选标准: (1) 无癫痫发作史。 (2) 脑电图正常。

1.2 方法 用 EDTA-K₂ 抗凝管采集受试者空腹静脉血标本 2 mL。采用直接免疫荧光标记全血溶血法。取 100 μL 全血制成单细胞悬液, 采用 Counter EpicsXL-MCL 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司) 检测 CD19、CD20、NK 细胞和 NKT

* 基金项目: 广东中山市医学科研基金项目 (2015J012)。

作者简介: 黄永洪, 男, 主治医师, 主要从事内科学方向研究。 △ 通信作者, E-mail: kangyinger@126.com。

细胞。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 并作 ROC 曲线分析各项指标灵敏度和特异度。

2 结果

2.1 癫痫组与对照组基线特征 癫痫组 CD19、和 CD20、NK

细胞和 NKT 细胞水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CD8⁺CD28⁺ 和 CD8⁺CD28⁻ 这两个项目比较, 差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 癫痫患儿 CD19、CD20 和 CD56 结果在癫痫诊断中 ROC 曲线分析 ROC 曲线见图 1, ROC 曲线分析结果见表 2。

表 1 自闭症组与对照组基线特征 ($\bar{x} \pm s$)

指标	癫痫组	对照组	Mann-Whitner U	Wilcoxon W	Z	P
CD19	17.792 ± 6.145	9.733 ± 2.527	58.000	383.000	-4.843	0.000*
CD20	17.388 ± 5.999	9.988 ± 3.166	76.000	401.000	-4.484	0.000*
CD8 ⁺ CD28 ⁺	12.800 ± 3.157	12.663 ± 1.853	282.000	607.000	-0.361	0.718
CD8 ⁺ CD28 ⁻	9.629 ± 4.608	11.663 ± 2.068	213.000	513.000	-1.742	0.081
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	13.683 ± 4.339	9.237 ± 3.253	117.000	442.000	-3.663	0.000*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	4.521 ± 3.758	1.358 ± 1.245	138.500	463.500	-3.233	0.001*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

表 2 CD19、CD20、NK 细胞和 NKI 细胞在癫痫诊断 ROC 曲线分析结果

指标	95%CI	AUC	SE	P	cut-off	灵敏度	特异度
CD19	0.819~0.988	0.903	0.043	0.000*	9.400	91.700	48.000
CD20	0.769~0.978	0.873	0.053	0.000*	7.750	91.700	24.000
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.685~0.925	0.805	0.061	0.000*	8.550	95.800	48.000
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.628~0.911	0.769	0.072	0.001*	0.350	91.700	20.000

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

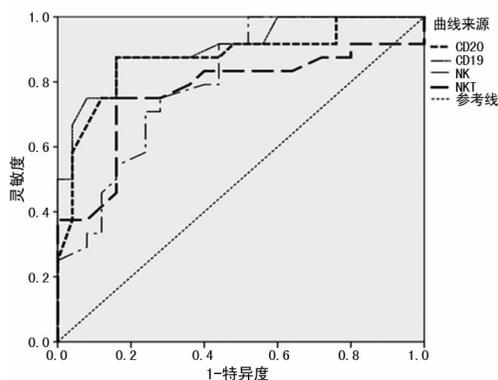


图 1 ROC 曲线

3 讨论

癫痫是一种慢性的、常见的儿童神经系统发育障碍的疾病, 大多数癫痫患儿病情可得到及时诊断和治疗, 但仍有部分患儿错过了早诊断和治疗的最佳时机^[6]。本文从癫痫患儿的免疫调节水平方面观察其免疫状态的变化情况, 为临床研究癫痫患儿的免疫学发病机制提供可靠的依据。

CD19 是 B 淋巴细胞限制性抗原的一种 I 型跨膜糖蛋白, 作为 B 淋巴细胞表面标志性分子参与到 B 细胞活化和信号传导中^[7]。CD20 是 B 系特异性膜表面抗原分子, 除了造血干细胞、B 系祖细胞和浆细胞以外的所有 B 细胞各个分化阶段均有表达, 是抗体产生活化前的状态^[8]。本研究中癫痫组患儿 CD19、CD20 水平较对照组明显升高, 提示在癫痫时, B 淋巴细胞显著增生、活化导致体内免疫功能亢进。研究表明, 活化的 B 淋巴细胞能分泌大量的免疫球蛋白和细胞因子, 使癫痫患儿的神

经兴奋性和神经递质释放发生改变, 促进癫痫的发作^[9-10]。

NK 细胞 CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 是固有免疫应答细胞, 主要参与机体体液免疫应答, 直接杀伤病原体、被感染的靶细胞和肿瘤细胞。当机体感染后, NK 细胞活化, 分泌大量的细胞因子, 诱导 Th1 型免疫反应^[11]。NKT 是一类特殊的 T 淋巴细胞, 同时具备 T 淋巴细胞和 NK 细胞特性的新型 T 淋巴细胞亚群, 对淋巴细胞免疫功能产生重要的影响。NKT 细胞表面的分子表型以 CD3⁺、CD16⁺、CD56⁺ 为特征, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 与 T 淋巴细胞之比是 NKT 的值^[12-13]。由 MHC-I 分子提呈的糖脂类抗原与 CD1d 分子、T 细胞受体形成三联体激活 NKT 后, 机体产生相应的 Th1 和 Th2 型细胞因子, 调节 T 淋巴细胞向 Th1 和 Th2 方向分化^[14]。本研究中, 癫痫患儿的 NK 细胞和 NKT 细胞数增高, 使外周血自然杀伤细胞活性和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用增强。NK 细胞和 NKT 细胞数升高, 使细胞因子分泌增加, 使神经元细胞间兴奋因子改变, 从而改变神经兴奋性, 导致癫痫发作^[15-16]。

综上所述, 上述免疫指标和癫痫患儿之间关系密切, 从而肯定了对癫痫患儿进行免疫状态监测的价值。但本研究仅比较癫痫患儿与健康儿童之间外周血的变化情况, 且研究标本量有限, 需进一步验证。

参考文献

[1] 黄圣明, 王海珍, 黄希顺, 等. 奥卡西平治疗癫痫的临床研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(1): 30-32.
 [2] 丁玲, 李梅, 康照. 奥卡西平对特发性癫痫患儿免疫功能的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 19(10): 24-26.
 [3] 高阳. 免疫调节剂对难治性癫痫患儿免(下转第 3290 页)

中也有类似机制存在, VEGF 作为调控新生血管增殖形成的重要调控因子, 在大部分恶性血液病细胞中呈现高表达状态。VEGF 的高表达促进了血管新生及新生血管的自分泌与旁分泌, 进而加速了肿瘤细胞增殖, 同时还具有抑制细胞凋亡的功能。既往研究提示^[8-10], 在实体肿瘤中当肿瘤直径大于 2 毫米时, 肿瘤的生长和增殖就要依赖于新生血管的形成, 所以血管生成与肿瘤的生长浸润以及预后的复发转移等均存在一定的关联, 但是新生血管的形成以及相关作用机制在血液肿瘤研究当中尚处于起步阶段。虽然有研究报道^[11-12]提示二者存在关联, 但关联程度等细节还有待更多研究提供依据。

本研究中急性白血病患者治疗后 1 年随访, 血清 VEGF 表达阳性组中急性髓性白血病复发病例检出 19 例, 阴性患者中检出 1 例, 阳性患者中复发比例明显高于阴性患者; 其他的血清 VEGF 表达阳性患者和骨髓 VEGF 表达阳性患者中同时检出多例复发病例, 而阴性患者中均未发现复发病例, 印证了 VEGF 表达与白血病发生之间存在的关联。同时, 本研究还发现治疗后 1 年随访测定血清和骨髓 VEGF 水平, 两型急性白血病复发者的血清和骨髓 VEGF 水平均明显高于缓解者, 表明在缓解状态下 VEGF 表达可出现下降趋势, 而复发状态下水平更高, 表明了血清与骨髓中的 VEGF 表达增高可以预测白血病复发风险。

综上所述, 血中及骨髓细胞中的 VEGF 水平均可在急性白血病的初诊以及复发时表现出高表达状态, 而在缓解状态下表达水平免贵性下降, 特别是在复发状态下, 表达水平相对更高, 提示了外周血与骨髓中 VEGF 表达水平有助于预测白血病复发风险。

参考文献

[1] 张文菊, 弓文秀. 形态学及化学染色早期诊断急性白血病 1 例[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(19): 2920-2920.
 [2] 唐雪, 肖剑文. 急性早前 T 细胞淋巴细胞白血病研究进展

[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(20): 3027-3029.
 [3] 王海玲, 阮林海, 赵小强. 急性白血病中 OPN, VEGF 的表达以及与血管新生关系[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(4): 926-929.
 [4] 张育, 顾健, 王敏, 等. 白血病患者血管新生及相关因素研究[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(3): 175-178.
 [5] 叶琇锦, 王丽君, 林茂芳, 等. 急性白血病患者骨髓血管新生的研究及临床意义[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(7): 486-489.
 [6] 高玉萍, 董平, 刘永, 等. WT1, VEGF 基因在急性白血病患者外周血中的表达及其意义[J]. 医学临床研究, 2015, 32(12): 2454-2456.
 [7] 贺今, 纪春岩. NOTCH, VEGF 信号通路在急性髓性白血病发生及血管新生中的作用[J]. 中国临床研究, 2016, 29(4): 558-559.
 [8] 何晓娟, 尹列芬. 血管内皮细胞生长因子靶向治疗急性髓系白血病的研究进展[J]. 中国综合临床, 2016, 32(7): 659-661.
 [9] 刘学文, 白学琴, 韩轩茂, 等. 急性白血病治疗前后骨髓中 VEGF、CTGF mRNA 水平的研究[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(4): 359-362.
 [10] 郭霞, 李强. 急性白血病发病机制研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(7): 690-693.
 [11] 马丽萍, 廖鹏军. 初诊老年急性髓性白血病患者预后因素分析[J]. 循证医学, 2015, 15(2): 83-85.
 [12] 陈颖, 王瑾, 刘元昉, 等. 急性白血病患者化疗前后外周血 IL-2, TNF- α 和 VEGF 水平变化及与临床预后的关系[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(20): 3892-3894.

(收稿日期: 2017-06-26 修回日期: 2017-08-10)

(上接第 3287 页)

疫球蛋白及 T 淋巴亚群的影响[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(4): 553-559.
 [4] 王树红, 庞保东, 曹丽华, 等. 奥卡西平对癫痫患儿细胞免疫功能调节作用的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(10): 1261-1263.
 [5] 沈晓明, 王卫平, 常立文, 等. 儿科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 396-397.
 [6] Ito Y, Natsume J, Kidokoro H, et al. Seizure characteristics of epilepsy in childhood after acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion[J]. Epilepsia, 2015, 56(8): 1286-1293.
 [7] 朱晓华, 陈强, 柯江维, 等. 支气管肺炎患儿免疫功能变化的临床分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(3): 175-178.
 [8] 李平甘, 杨炼红, 罗向阳. 免疫球蛋白对 Landau-Kleffner 综合征疗效分析(附 1 例报道)[J]. 岭南急诊医学杂志, 2008, 13(4): 257-259.
 [9] 谢文锋, 严海燕, 曾华, 等. 癫痫患儿外周血 CD19⁺ B、CD20⁺ B 淋巴细胞和自然杀伤细胞的检测及意义[J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10(9): 914-918.
 [10] Golombek KS, Bonte K, Monig C, et al. Evidence of a

pathogenic role for CD8(+) T cells in anti-GABAB receptor limbic encephalitis[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2016, 3(3): e232.
 [11] 李晓狄, 季伟, 尤海章, 等. EV71 型手足口病患儿细胞免疫变化[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(6): 525-527.
 [12] 陈京, 林涛. 肾母细胞瘤患儿外周血调节性 T 细胞和自然杀伤 T 细胞的表达研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(12): 1222-1226.
 [13] 庞迪舟, 檀卫平, 蓝丹. 哮喘患儿外周血 CD3⁺ TCR α 24 + NKT 细胞亚群分析[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(5): 441-446.
 [14] 梁俊娟, 乔晓红, 谢晓恬. 骨髓 NKT 细胞活性与儿童再生障碍性贫血相关性研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2016, 37(2): 35-39.
 [15] 李春, 马维宁, 王华. 癫痫患儿外周血中调节性 T 细胞的变化及其临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(11): 889-891.
 [16] Nowak M, Bauer S, Haag A, et al. Interictal alterations of cytokines and leukocytes in patients with active epilepsy [J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(3): 423-428.

(收稿日期: 2017-07-12 修回日期: 2017-09-11)