

• 论 著 •

儿童新型甲型流感疫苗接种后远期 T 淋巴细胞介导的免疫功能变化研究

李延琪, 刘 卓[△], 张进军, 王立军
西安市儿童医院, 陕西西安 710003

摘要:目的 探讨儿童新型甲型 H1N1 流感疫苗接种后远期 T 淋巴细胞介导的免疫功能变化。方法 选取 2017 年 6 月至 2019 年 9 月于该院进行新型甲型 H1N1 流感疫苗接种的儿童 80 例作为研究对象, 将经检测有甲型 H1N1 流感抗体的儿童作为观察组(40 例), 无甲型 H1N1 流感抗体的儿童作为对照组(40 例)。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)与流式微球捕获芯片技术(CBA)测定儿童免疫功能变化及 T 淋巴细胞介导的免疫情况, 随访并测定接种疫苗的儿童 T 淋巴细胞亚群变化情况。结果 疫苗接种后, 观察组中干扰素(IFN)- γ 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-4、IL-10 水平较对照组显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 随访结果显示, 观察组 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺, 以及 IgG、IgM、IgA 水平较对照组显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 观察组疫苗接种后不良反应(局部疼痛、局部瘙痒、局部红肿、头痛头晕、发热、恶心呕吐)发生率明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 儿童新型甲型 H1N1 流感疫苗接种后再刺激 T 淋巴细胞亚群介导的免疫功能变化, 对儿童早期风险评估有重要的预防参考价值, 且安全性较高。

关键词:新型甲型流感疫苗; 抗体; 免疫功能; T 淋巴细胞; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.022

中图法分类号:R511.7;R186

文章编号:1673-4130(2021)13-1626-04

文献标志码:A

Long-term T lymphocyte-mediated changes in immune function after immunization of children with new influenza A H1N1 vaccine

LI Yanqi, LIU Zhuo[△], ZHANG Jinjun, WANG Lijun

Department of Respiratory, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes of long-term T lymphocyte mediated immune function in children with new influenza A H1N1 vaccine. **Methods** From June 2017 to September 2019, a total of 80 children who received the new influenza A vaccine in the hospital were selected as the study subjects. Forty children who had H1N1 influenza antibodies were selected as the observation group, and forty children who didn't had H1N1 influenza antibodies were selected as the control group. ELISA and CBA methods were used to determine the changes in children's immune function and T lymphocyte-mediated immunity, and the changes of T lymphocyte subsets in vaccinated children were measured during follow-up period. **Results** After vaccination, the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-10 in the observation group were significantly decreased compared with the control group, with statistical significance ($P < 0.05$). Follow-up results showed that T lymphocyte CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, IgG, IgM and IgA in the observation group were significantly lower than those in the control group, with statistical significance ($P < 0.05$). The incidence of adverse reactions (local pain, local pruritus, local redness, headache, dizziness, fever, nausea and vomiting) in the observation group after vaccination was significantly lower than that in the control group, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** The changes of immune function mediated by T lymphocyte subsets after the inoculation of the new influenza A H1N1 vaccine in children have important preventive reference value for the early risk assessment of children, and the safety is high.

Key words: new influenza A vaccine; antibody; immune function; T lymphocyte; children

甲型流感是一种急性呼吸道感染, 潜伏期为 7 d, 主要通过飞沫传播, 患者通常出现流感样症状, 有些患者会出现呕吐和腹泻。甲型流感病毒是一种单链、

分节段 RNA 病毒, 该毒株含有猪流感、禽流感和人流感 3 种流感病毒基因片段, 可在人与人之间传播, 人一般易感染甲型 H1N1 流感病毒^[1-2]。甲型 H1N1 流

作者简介: 李延琪, 女, 副主任医师, 主要从事儿童呼吸系统疾病及哮喘研究。 [△] 通信作者, E-mail: liuzhuo3310@163.com。

本文引用格式: 李延琪, 刘卓, 张进军, 等. 儿童新型甲型流感疫苗接种后远期 T 淋巴细胞介导的免疫功能变化研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(13): 1626-1629.

感并不是一种新疾病,由于人们普遍缺乏特异性免疫力,因此传播迅速,传染性强,病例分布广泛,年轻人比老年人更容易感染^[3]。

免疫细胞在人类免疫细胞群中起着重要的作用,是细胞免疫的基础,而 T 淋巴细胞在细胞免疫中起着识别和记忆特定抗原的作用^[4]。B 淋巴细胞可以持续分泌特异性抗体,帮助机体抵抗外来微生物的入侵,而 T 淋巴细胞介导的免疫应答对防御细胞内感染微生物,如新型甲型 H1N1 流感病毒的侵袭更为重要^[5]。本文以来本院进行新型甲型 H1N1 流感疫苗接种的儿童为研究对象,探讨儿童新型甲型 H1N1 流感疫苗接种后远期 T 淋巴细胞介导的免疫功能变化,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 6 月至 2019 年 9 月于该院进行新型甲型 H1N1 流感疫苗接种的儿童 80 例,将经检测有甲型 H1N1 流感抗体的儿童作为观察组(40 例),无甲型 H1N1 流感抗体的儿童作为对照组(40 例)。纳入标准^[6]:(1)符合人民卫生出版社第 9 版教材《传染病学》对新型甲型 H1N1 流感疫苗接种标准;(2)年龄 3~6 岁,无其他并发症;(3)自愿加入,无传染病史。排除标准:(1)合并发热(感冒)或精神疾病者;(2)研究期间接种过其他类型流感疫苗者;(3)不积极配合治疗者;(4)对疫苗过敏或有严重心、肾疾病者。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》,并已获得本院伦理委员会批准,所有儿童家属均签署知情同意书。观察组儿童年龄、性别及职业分布与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 两组一般资料比较

组别	n	年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)	性别[n(%)]		职业分布[n(%)]	
			男	女	学生	其他
观察组	40	4.91±1.71	25(62.5)	15(37.5)	38(95.0)	2(5.0)
对照组	40	4.16±1.62	22(55.0)	18(45.0)	36(90.0)	4(10.0)
χ^2/t		0.277	3.300		2.034	
P		0.802	0.081		0.135	

1.2 方法

1.2.1 T 淋巴细胞分离和培养方法 抽取入选儿童肘部静脉血 6 mL,其中 3 mL 抗凝,另外 3 mL 不抗凝。首先,取 3 mL 抗凝血放于抗凝管中并轻轻摇动试管,搅拌均匀后放在工作台上 5 min;然后,加入 3 mL 的 D-Hank's 平衡盐溶液并摇匀;最后,取等量淋巴细胞分离液置于灭菌后的离心管中,用刻度管吸取稀释后的血液并缓慢加入淋巴细胞分离液的液面,以保持 2 种液体的界面清晰。将离心管平衡后放入离心机,3 000 r/min 离心 10 min,将毛管移液管插入白膜层界面处的淋巴细胞层沿试管壁吸至离心管,将 5

倍于 D-Hank's 平衡盐溶液体积的液体加入离心管中,轻轻旋转离心管进行混合,然后 3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,加入 3 mL RPMI 1640 培养基,搅拌均匀。调节淋巴细胞的数量至 1×10^9 个/mL,铺板至 96 孔培养板中。观察组和对照组每孔加入浓度为 3 μ g/mL 的新型甲型 H1N1 流感疫苗 50 μ L,放入 5% CO₂ 培养箱中 50 h,每天轻轻晃动几次。培养结束后,将 96 孔培养板放入 96 孔板离心机,以 800 r/min 离心 10 min。从各孔轻轻吸取上清液。

1.2.2 细胞因子及血清抗体检测方法 采集儿童清晨空腹肘部静脉血 3 mL,3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清于一 70 ℃ 冰箱中保存。采用流式微球捕获芯片技术(CBA)检测 T 淋巴细胞因子,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清抗体。

CBA 检测细胞因子:采用 Assay Diluent 稀释冻干的细胞因子干扰素(IFN)- γ 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-4、IL-10 标准品,将其制备成浓度梯度细胞因子标准品和阴性指控管(0 pg/mL);将细胞因子混合,捕获微球,通过涡旋振荡器进行混合均匀后,室温下 200 $\times$ g 离心 5 min;接着,加入等体积的血清增强液,再次涡旋振荡混匀后,室温孵育 30 min,孵育时注意避光;随后,加入标准品、标本及有标记的细胞因子,室温孵育 3 h;最后,将反应后的标本进行清洗,重悬细胞,用流式细胞仪进行检测,并采用 FCAP Array v1.0 软件对收集后的数据进行处理和分析。

ELISA 检测血清抗体:使用 Bio-Rad 550 酶标仪(美国伯乐公司)及美国 DLS 公司的 intact-10-8000 试剂盒测定血清抗体。严格按照试剂盒说明书操作步骤进行检测。

1.3 随访 疫苗接种后第 1 个月及以后每隔 1 个月电话随访了解基本状况 1 次,并测定疫苗接种后 3 个月及 6 个月时 T 淋巴细胞亚群及血清抗体水平。随访时间 24~36 个月。

1.4 统计学处理 采用 SPSS24.0 统计软件进行数据处理,服从正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验,不服从正态分布或服从正态分布但方差不齐的多样本均数比较采用非参数检验;计数资料以率或构成比表示,采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞因子水平比较 观察组 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平均较对照组显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中细胞因子 IL-10 水平下降最为明显。见表 2。

2.2 两组 T 淋巴细胞亚群及血清抗体水平比较 与对照组相比,观察组自愿进行新型甲型 H1N1 流感疫苗接种的儿童 CD3⁺、CD4⁺ 显著下降,CD8⁺ 及 IgG、IgM、IgA 水平显著升高,差异均有统计学意义($P<$

0.05);随访 3 个月和 6 个月时,观察组 IgM 抗体水平低于对照组,IgG 抗体水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

表 2 两组细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

分组	<i>n</i>	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-10
观察组	40	176.92 $\pm$ 10.27	152.87 $\pm$ 21.42	221.65 $\pm$ 20.19	80.53 $\pm$ 30.18
对照组	40	185.19 $\pm$ 17.18	173.26 $\pm$ 19.27	229.72 $\pm$ 21.37	405.80 $\pm$ 40.06
<i>t</i>		21.334	12.343	18.957	4.297
<i>P</i>		<0.001	0.001	<0.001	0.023

2.3 疫苗安全性分析 疫苗接种后不良反应分析,结果见表 4。与对照组相比,观察组中局部疼痛、局部瘙痒、局部红肿、头痛头晕、发热、恶心呕吐的人数显著下降,其中对照组中局部疼痛人数 1 人,而观察组中 0 人;对照组中局部瘙痒人数 2 人,而观察组中 1

人;对照组中局部红肿人数 5 人,而观察组中 3 人;对照组中头痛头晕人数 1 人,而观察组中 0 人;对照组中发热人数 3 人,而观察组中 2 人;对照组中恶心呕吐人数 1 人,观察组中 0 人。

表 3 两组 T 淋巴细胞亚群及血清抗体水平比较

项目	观察组		对照组	
	3 个月	6 个月	3 个月	6 个月
CD3 ⁺ (%)	45.81 $\pm$ 20.02	38.14 $\pm$ 13.05	57.07 $\pm$ 10.16	52.64 $\pm$ 21.08
CD4 ⁺ (%)	52.65 $\pm$ 11.01	46.37 $\pm$ 10.02	48.93 $\pm$ 1.06	47.22 $\pm$ 1.47
CD8 ⁺ (%)	18.18 $\pm$ 10.05	28.07 $\pm$ 10.16	27.13 $\pm$ 10.18	28.64 $\pm$ 14.08
IgG(g/L)	5.40 $\pm$ 2.05	11.65 $\pm$ 1.01	4.24 $\pm$ 1.26	6.52 $\pm$ 3.13
IgM(g/L)	121.81 $\pm$ 6.02	140.98 $\pm$ 7.05	561.23 $\pm$ 40.21	620.14 $\pm$ 31.08
IgA(g/L)	9.12 $\pm$ 3.13	11.14 $\pm$ 3.08	274.06 $\pm$ 1.03	297.22 $\pm$ 1.47
<i>t</i>	4.382		4.392	
<i>P</i>	0.022		0.007	

表 4 疫苗安全性分析[*n*(%)]

组别	局部疼痛	局部瘙痒	局部红肿	头痛头晕	发热	恶心呕吐	合计
观察组	0(0.00)	1(2.50)	3(7.50)	0(0.00)	2(5.00)	0(0.00)	6(15.00) ^a
对照组	1(2.50)	2(5.00)	5(12.50)	1(2.50)	3(7.50)	1(2.50)	13(32.50)

注:与对照组比较, $\chi^2=3.644$,^a $P=0.040$ 。

3 讨 论

近年来,疫苗接种被认为是预防和控制甲型流感新流行最经济有效的手段之一,由于甲型 H1N1 流感病毒为新的免疫原,因此有必要开发一种新的疫苗来刺激人体产生相应的抗体以产生免疫保护^[7]。有学者对甲型流感病毒基因进行了测序,这为以后的疫苗研制奠定了基础。关于甲型 H1N1 流感疫苗的免疫原性和免疫耐受性,国内外有对儿童接种后最长时间为 1 年的监测报告,且有对成人接种后 27 个月的监测报告,但鲜见更长时间的免疫效果监测报告^[8]。另外,这些报告都是通过 ELISA 法测定体内血清抗体水平的滴度^[9]。陈雪青等^[10]采用 ELISA 法检测儿童新型流感疫苗接种特异性抗体水平,采用 CBA 法检测儿童新型流感疫苗接种后疫苗活化 T 淋巴细胞的因子的分泌情况。此外,分析疫苗接种后的长期抗体水平和免疫记忆状况,可为新型流感疫苗的免疫程序、免疫原性和新疫苗的设计提供理论依据^[11]。

当特异性 T 淋巴细胞再次受到抗原刺激时,效应 T 淋巴细胞反应迅速,能迅速产生细胞因子参与免疫应答,T 淋巴细胞不同,其增殖反应强烈,并产生效应细胞,维持长期保护^[12]。激活时,CD4⁺T 淋巴细胞不仅能分化为不同功能的细胞,还能分泌多种具有不同生物活性的细胞因子,一般传统上分为 Th1 和 Th2 细胞两个亚群^[13]。T 淋巴细胞分泌的 IFN- γ 和 TNF- α 等细胞因子的主要作用是增强人体免疫功能,是人体细胞抵抗细胞内病原体感染和肿瘤细胞感染

的重要因素^[14]。本研究采用 ELISA 与 CBA 法对疫苗接种后儿童血清抗体及细胞因子水平进行分析,结果发现,与对照组相比,观察组中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平均显著下降($P<0.05$),其中细胞因子 IL-10 水平下降最为显著,对照组中 IL-10 水平为(405.80 $\pm$ 40.06)pg/mL,而观察组中 IL-10 水平为(80.53 $\pm$ 30.18)pg/mL,差异有统计学意义($P<0.05$)。IFN- γ 作为 T 淋巴细胞的代表细胞因子,是一种非常重要的炎症因子,在细胞免疫调节、抑制病毒扩散、激活巨噬细胞、增强靶细胞杀伤能力等方面发挥着重要作用。同时,其能有效提高 T 淋巴细胞的增殖速度,抑制 T 淋巴细胞分泌,促进 B 淋巴细胞分化,产生抗体^[15-18]。TNF- α 能激活 T 淋巴细胞,也属于炎症因子,具有细胞防御、免疫保护作用,能有效发挥人体抗感染的作用^[19]。本研究中经过随访测定接种疫苗的儿童 T 淋巴细胞亚群变化情况,结果发现,与对照组相比,观察组自愿进行新型甲型 H1N1 流感疫苗接种的观察组患儿 CD3⁺、CD4⁺ 显著下降,CD8⁺、IgG、IgM、IgA 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。本研究中疫苗接种后不良反应分析发现,与对照组相比,观察组中局部疼痛、局部瘙痒、局部红肿、头痛头晕、发热、恶心呕吐的人数显著下降。

虽然本研究取得了一定的进展,但仍存在以下不足。首先,本研究为病例对照研究,并非随机对照实验,未设置盲法,因此仍存在一定的偏倚风险;其次,

本研究为单中心临床研究,纳入的样本量较少,后续仍需加大样本量并进行多中心临床研究;最后,本研究的临床随访时间较短,仍需临床长期随访观察^[20-23]。

疫苗接种后,采用 ELISA 与 CBA 对儿童免疫功能变化及 T 淋巴细胞介导的免疫情况检测发现,有甲型 H1N1 流感抗体的儿童 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平比无甲型 H1N1 流感抗体的儿童免疫功能好。疫苗接种后不良反应分析发现,有甲型 H1N1 流感抗体的儿童的局部疼痛、局部瘙痒、局部红肿等较轻。新型甲型 H1N1 流感疫苗接种后刺激 T 淋巴细胞亚群介导的免疫功能改变对儿童早期风险评估具有重要的参考价值,但新型甲型 H1N1 流感疫苗的特异性仍不强,长期免疫效果欠佳。

参考文献

- [1] 许晶,史伟,张蕾,等. 2017—2018 年度陕西省甲型 H1N1 流感病毒基因特征分析[J]. 现代预防医学, 2019, 46(20):3782-3786.
- [2] 李永春,孙树雅,郭翠芳,寇学冬. 兰紫解毒糖浆联合磷酸奥司他韦对甲型流感疗效及血清转化生长因子 $\beta 1$ 和 γ -谷氨酰转移酶水平的影响[J]. 吉林中医药, 2020, 40(2): 205-208.
- [3] 孟思明. 80 例流感病例的临床特点分析[J]. 贵州医药, 2020, 44(2):258-260.
- [4] RONDY M, LAUNAY O, CASTILLA J, et al. Repeated seasonal influenza vaccination among elderly in Europe: effects on laboratory confirmed hospitalised influenza[J]. Vaccine, 2017, 35(34):4298-4306.
- [5] 吴晓敏,王艳旭,包名家,等. 佳木斯市 2004—2017 年肾综合征出血热流行病学特征及疫苗效果[J]. 实用预防医学, 2020, 27(3):300-302.
- [6] UPADHYAY A K, SRIVASTAVA S. Association between Haemophilus influenza type B (Hib) vaccination and child anthropometric outcomes in Andhra Pradesh (India): evidence from the young lives study[J]. J Public Health (Bangkok), 2017, 25:581-589.
- [7] 王琳. 新型冠状病毒肺炎流行期间免疫规划疫苗延迟接种安全性和有效性分析及接种建议(第一版)[J]. 中国儿童保健杂志, 2020, 28(3):242-246.
- [8] 李志芳,王帅,李晶鑫,等. 长治市医学和非医学大学生 HPV 疫苗相关知识现况调查[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(3):522-525.
- [9] 林艳,杨巨飞,蔡志波. 儿童急性淋巴细胞白血病患者接种流感疫苗的有效性和安全性系统评价[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(2):153-160.
- [10] 陈雪青,张金源,陈雪吟,等. 牛痘疫苗接种家兔炎症皮肤提取物不同给药方式预防性治疗腰椎间盘突出术后残余

神经症状的疗效[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(1):53-57.

- [11] BRODERICK R, VENTURA I, SOROOSH S, et al. Reducing missed opportunities for influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis: evaluation of a multi-system intervention[J]. J Rheumatol, 2018, 45(9):1220-1228.
- [12] 吴琳琳,刘捷宸,邵慧勇,等. 上海市儿童肠道病毒 71 型灭活疫苗接种率和疑似预防接种异常反应监测[J]. 中国疫苗和免疫, 2020, 26(1):62-66.
- [13] 英国建议对免疫力减弱和 60 岁以上人群接种黄热减毒活疫苗采取进一步警示[J]. 中国医药导刊, 2019, 21(12):766.
- [14] ANDERSON L J, SHEKELLE P, EMMETT K, et al. The cost of interventions to increase influenza vaccination: a systematic review[J]. Am J Prev Med, 2018, 54(2):299-315.
- [15] 李晓静,张荣芳,申洪娇,等. “互联网+预防接种”在安阳市社区婴幼儿疫苗接种过程中的应用调查[J]. 中国卫生产业, 2019, 16(35):176-178.
- [16] 何左,徐然. 大理白族自治州 14 岁及以下儿童乙肝疫苗接种和感染现状及影响因素分析[J]. 解放军医学院学报, 2019, 40(11):1039-1043.
- [17] 姚雪江,肖利金,陈霞. HPV 疫苗推广两年后适龄女性对 HPV 疫苗知晓率及接种意愿等调查分析[J]. 中国乡村医药, 2019, 26(23):54-55.
- [18] LU P J, SRIVASTAV A, AMAYA A, et al. Association of provider recommendation and offer and influenza vaccination among adults aged ≥ 18 years—United States[J]. Vaccine, 2018, 36(6):42-44.
- [19] 侯小转. 微信平台的延续护理干预对犬咬伤患者狂犬病疫苗全程接种依从性的影响[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(2):336-338.
- [20] SHIM E, SMITH K J, NOWALK M P, et al. Impact of seasonal influenza vaccination in the presence of vaccine interference[J]. Vaccine, 2018, 36(6):853-858.
- [21] 陈白莱. 预防性护理在减低乙肝疫苗接种过程不良反应中的应用效果观察[J]. 中外医学研究, 2018, 16(35):93-94.
- [22] BODDINGTON N L, WARBURTON F, ZHAO H, et al. Influenza vaccine effectiveness against hospitalisation due to laboratory-confirmed influenza in children in England in the 2015—2016 influenza season: a test-negative case-control study[J]. Epidemiol Infect, 2019, 147:e201.
- [23] BARTOSZKO J J, MCNAMARA I F, ARAS O A, et al. Does consecutive influenza vaccination reduce protection against influenza: a systematic review and meta-analysis[J]. Vaccine, 2018, 36(24):3434-3444.