

# 儿童病毒性脑炎患者外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞检测的临床意义

谢文锋, 曾 华, 张智贤, 韦 婕(中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120)

**【摘要】** 目的 探讨儿童病毒性脑炎(VE)患者外周血中  $\gamma\delta$ T 细胞的表达及其临床意义。方法 应用流式细胞仪对 32 例儿童 VE 患者和 23 例健康儿童外周血中  $\gamma\delta$ T 细胞的表达以及 Th/Ts 比值进行检测;同时分析 VE 患者治疗前后的细胞表达情况。**结果** VE 患者  $\gamma\delta$ T 细胞为  $13.31\% \pm 4.61\%$ , 显著高于健康对照组  $7.47\% \pm 2.78\%$  ( $P < 0.01$ ); 而 Th/Ts 比值为  $0.99 \pm 0.34$ , 显著低于健康对照组 ( $1.34 \pm 0.28$ ,  $P < 0.05$ )。VE 患者治疗后  $\gamma\delta$ T 细胞为  $8.32\% \pm 3.06\%$ , 较治疗前为  $13.31\% \pm 4.61\%$  明显降低, 差异有统计学意义 ( $t = -9.352$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** VE 患者外周血  $\gamma\delta$ T 细胞表达变化与病情密切相关,  $\gamma\delta$ T 细胞检测可作为 VE 治疗的一项免疫监测指标。

**【关键词】** 病毒性脑炎; 流式细胞术;  $\gamma\delta$ T 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.20.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)20-2464-02

**Detection of  $\gamma\delta$ T cells of peripheral blood in viral encephalitis children and its clinical significance** XIE Wen-feng, ZENG Hua, ZHANG Zhi-xian, WEI Jie (Department of Clinical Laboratory, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**【Abstract】** **Objective** To detect the expression and explore the clinical significance of  $\gamma\delta$ T cells in peripheral blood of viral encephalitis (VE) children. **Methods**  $\gamma\delta$ T cells and Th/Ts ratio were detected by flow cytometry in 32 children patients with VE and 23 healthy children. **Results** The detected  $\gamma\delta$ T cells [ $(13.31 \pm 4.61)\%$  vs  $(7.47 \pm 2.78)\%$ ,  $P < 0.01$ ] in VE patients was significantly higher than that in healthy control group, while the Th/Ts ratio [ $(0.99 \pm 0.34)$  vs  $(1.34 \pm 0.28)$ ,  $P < 0.05$ ] was significantly lower than the healthy control group. After treatment, the  $\gamma\delta$ T cells [ $(8.32 \pm 3.06)\%$  vs  $(13.31 \pm 4.61)\%$ , ( $t = -9.352$ ,  $P < 0.01$ )] decreased significantly compared with the amount before treatment. **Conclusion** Aberrant expression of  $\gamma\delta$ T cells is highly relevant to VE patients, therefore  $\gamma\delta$ T cells can be used as an immune monitoring indicator for VE treatment.

**【Key words】** viral encephalitis; flow cytometry;  $\gamma\delta$ T cells

病毒性脑炎(viral encephalitis, VE)是指由病毒直接侵犯脑实质而引起的原发性脑炎,是儿科比较常见的由各种病毒引起的中枢神经系统感染性疾病。已有研究表明,机体的免疫功能与VE的发病过程密切相关。 $\gamma\delta$ T细胞是T淋巴细胞的一个特殊亚群,自从Pardoll等<sup>[1]</sup>和Weintraub等<sup>[2]</sup>验证了 $\gamma\delta$ T细胞表面分子的存在后, $\gamma\delta$ T细胞作为T淋巴细胞亚群(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)才被确定下来。 $\gamma\delta$ T细胞主要分布在黏膜和上皮组织中,是机体的一种重要的免疫细胞,在机体免疫中发挥着重要作用。近年来学者们开始关注 $\gamma\delta$ T细胞在感染、炎症和自身免疫性疾病中的作用。Th/Ts比值是重要的免疫状态监测指标,用于评价自身免疫失调或免疫缺陷患者的免疫状态,其比例的降低与免疫系统损害的程度相关。为了探讨儿童VE患者外周血中 $\gamma\delta$ T细胞的变化以及与临床病情变化的关系,本研究应用流式细胞仪检测儿童VE患者以及治疗后外周血中Th/Ts比值和 $\gamma\delta$ T(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)细胞的表达情况,报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

**1.1.1 VE患者组** 收集2008年6月至2011年5月中山大学孙逸仙纪念医院住院的儿童VE患者32例,其中男20例,女12例,年龄6个月至15岁,平均年龄5岁。全部患儿符合病毒性脑炎诊断标准<sup>[3-4]</sup>。入选病例均为新诊断病例,无其他免疫或感染性疾病。全部病例均做血常规、病原微生物、脑脊液及脑电图检查,并查头颅CT或MRI,在治疗前后均有做淋巴细胞亚群分析。

**1.1.2 健康对照组** 23例体检健康儿童,男14例,女9例,年龄2~14岁,平均年龄6岁。其中年龄和性别构成比例与VE患者组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 仪器与试剂** Cytomics™ FC500型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司),所用试剂和光路校正品、质控品均为原装配套试剂。乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝真空管购自广州阳普医疗用品有限公司。

**1.3 方法** 用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝真空管采集受试者空腹静脉血标本2 mL,4 h内完成检测。标记抗体采用直接免疫荧光标记全血溶血法。在试管中加入10  $\mu$ L的CD45-FITC/CD3-PC5/CD4-PE/CD8-ECD荧光标记单克隆抗体,接着加入外周全血100  $\mu$ L,室温避光孵育20 min后,加入500  $\mu$ L溶血素,室温避光放置15 min,待红细胞充分溶解后,加入1 mL磷酸盐缓冲溶液,摇匀,即制成所需的单细胞悬液。应用贝克曼FC500型流式细胞仪对制备好的单细胞悬液进行检测,通过贝克曼CXP流式细胞分析软件系统,可得出外周血 $\gamma\delta$ T细胞占总T淋巴细胞的比例和Th/Ts的比值。在明确诊断和完成检查后,32例患者在常规降颅压、退热、止惊、抗病毒基础上加用静脉注射免疫球蛋白(IVIG)治疗。IVIG用量400 mg/(kg·d),分3 d静脉滴注,均在用药7 d后复查淋巴细胞亚群。

**1.4 统计学方法** 采用SPSS17.0统计软件分析数据,各项检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前和治疗后均数比较用配对样本t检验,其他采用独立样本t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 在荧光散点图中设门选定 $\gamma\delta$ T细胞** 应用流式细胞仪,

通过流式细胞分析软件,根据淋巴细胞的侧向散射光(SSC)特点及其免疫表型进行设门分析选定 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>)。对所分析的 T 淋巴细胞设门后,根据被标记细胞 CD4、CD8 的免疫荧光特点,在荧光散点图中对 T 淋巴细胞的免疫表型进行分析,得出外周血中  $\gamma\delta$ T 细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)的表达情况。

**2.2 各组外周血 Th/Ts 比值和  $\gamma\delta$ T 细胞表达情况** 与健康对照组比较,VE 治疗前外周血  $\gamma\delta$ T 细胞比例明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );VE 患者治疗后外周血中  $\gamma\delta$ T 细胞比例显示,治疗后的  $\gamma\delta$ T 细胞比例明显低于治疗前,其差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。治疗前 Th/Ts 比值与健康对照组比较偏低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

**表 1 VE 各组与健康对照组外周血  $\gamma\delta$ T 细胞比例的比较(%, $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	$\gamma\delta$ T 细胞	Th/Ts
VE 治疗前	32	13.31 ± 4.61 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.34 <sup>c</sup>
VE 治疗后	32	8.32 ± 3.06 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.30
健康对照	23	7.47 ± 2.78	1.34 ± 0.28

注:与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与治疗前比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与健康对照组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

### 3 讨 论

病毒性脑炎(VE)是常见的中枢神经系统感染性疾病,其发病取决于病毒侵入的数量、毒力和机体的免疫功能。因此,当人体免疫功能降低时,病毒可经血液循环突破血脑屏障侵入中枢神经系统,并引起中枢神经系统的广泛性病变。现代免疫学观点认为,T 淋巴细胞在介导细胞免疫、调节机体免疫功能方面起着重要作用。因此,在机体免疫调节的平衡中,T 淋巴细胞亚群适当的比例非常重要。Th 细胞是 CD4<sup>+</sup> 辅助性 T 细胞,对免疫的启动、表现形式和免疫的强弱起关键作用。Ts 细胞是 CD8<sup>+</sup> 抑制性 T 细胞,主要是直接杀伤病毒感染的靶细胞。而  $\gamma\delta$ T 细胞作为 T 淋巴细胞的一个亚群,主要分布在黏膜和上皮组织,也是机体的一种重要的免疫细胞。外周血  $\gamma\delta$ T 细胞主要为 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 细胞,主要以主要组织相容性复合体非限制性方式识别各类抗原,发挥细胞毒作用,并可分泌多种细胞因子如 IL-2、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子等调节免疫应答<sup>[5]</sup>。而且活化的  $\gamma\delta$ T 细胞还有更强的细胞毒活性和产生多种细胞因子的能力<sup>[6]</sup>。研究表明, $\gamma\delta$ T 细胞有抑制病毒复制和控制感染的作用<sup>[7]</sup>,且体外实验也证明,IFN- $\gamma$  有抑制病毒复制的效应<sup>[8]</sup>。可见,T 细胞的表达在机体抗感染及自身免疫调控中发挥着重要的作用。本研究主要是对 VE 患者外周血中  $\gamma\delta$ T 细胞百分含量和 Th/Ts 比值的变化进行分析研究,发现 VE 患者外周血中的  $\gamma\delta$ T 细胞百分含量明显高于健康对照组,而 Th/Ts 比值明显低于健康对照组,表明 VE 患者体内处于杀伤抑制病毒免疫状态。 $\gamma\delta$ T 细胞在健康人外周血中占 CD3<sup>+</sup>T 细胞的 0.5%~10%,它既有杀伤自然杀伤敏感和自然杀伤不敏感靶细胞的细胞毒活性,又能分泌 IL-2、IL-17 和 IFN- $\gamma$  等各种细胞因子,在病毒感染性疾病中发挥着重要的免疫作用。有研究表明,在艾滋病病毒和 EB 病毒感染者的外周血中  $\gamma\delta$ T 细胞比例显著增加<sup>[9]</sup>。病毒的感染诱发了  $\gamma\delta$ T 细胞的活化, $\gamma\delta$ T 细胞在清除病毒的同时也激活了相应疾病的进展,炎症的发生不可避免地损伤了神经细胞,从而导致不同程

度的临床症状。 $\gamma\delta$ T 细胞是 IL-17 的主要来源,IL-17 被证明在中枢神经系统炎症发病机制中起着关键作用<sup>[10]</sup>。可见, $\gamma\delta$ T 细胞对病毒感染的反应发挥着促炎和抗炎双重作用。因此,在临床上对病毒性脑炎患者应用免疫调节剂或 IVIG 治疗,使 T 淋巴细胞亚群比例及功能恢复正常,增强机体抗病毒能力,减轻免疫反应所致的脑损伤有一定的临床意义。

本研究对观察的 32 例 VE 患者进行了常规及免疫治疗,治疗后患者细胞免疫状态发生了明显改变, $\gamma\delta$ T 细胞百分含量比治疗前明显降低;而 Th/Ts 比值比治疗前有升高,但升高的差异没有显著性。研究还发现, $\gamma\delta$ T 细胞百分含量的变化与 VE 患者的病情变化密切相关。

综上所述,研究表明,儿童 VE 患者外周血 T 淋巴细胞亚群比例及功能异常。免疫治疗后,患者细胞免疫状态发生了改变,T 淋巴细胞亚群恢复正常,减轻了促炎免疫反应所致的脑组织损伤。外周血  $\gamma\delta$ T 细胞表达变化与 VE 患者病情密切相关, $\gamma\delta$ T 细胞检测可作为 VE 治疗的一项免疫监测指标。

### 参考文献

- [1] Pardoll DM, Fowlkes BJ, Lew AM, et al. Thymus-dependent and thymus-independent developmental pathways for peripheral T cell receptor-gamma delta-bearing lymphocytes[J]. J Immunol, 1988, 140(12): 4091-4096.
- [2] Weintraub BC, Hedrick SM. The enigmatic specificity of gamma delta T cells[J]. Immunol Res, 1995, 14(3): 163-175.
- [3] 胡亚美,江载芳.实用儿科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2002:759-763.
- [4] 左启华.小儿神经系统疾病[M].2版.北京:人民卫生出版社,2002:589-590.
- [5] 李丽,吴长有.人  $\gamma\delta$ T 细胞表型与功能特征的探讨[J].免疫学杂志,2008,24(6):609-612.
- [6] Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology[J]. Cancer Res, 2007, 67(1):5-8.
- [7] Dyugovskaya L, Hirsh M, Ginsburg H. Phenotypic profile and functional characterization of rat lymph node-derived  $\gamma\delta$ T cells: implication in the immune response to cytomegalovirus[J]. Immunology, 2003, 108(2): 129-136.
- [8] Poccia F, Agrati C, Castilletti C, et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus immune responses; the role played by V gamma 9V delta 2 T cells[J]. J Infect Dis, 2006, 193(9): 1244-1249.
- [9] Zheng NN, McElrath MJ, Sow PS, et al. Association Between Peripheral  $\gamma\delta$  T-Cell Profile and Disease Progression in Individuals Infected With HIV-1 or HIV-2 in West Africa[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011, 57(2):92-100.
- [10] Sarma JD.  $\gamma\delta$ T cells and IL-17/IL-17R signaling axis in CNS inflammation[J]. Int J Interferon Cytokine Mediator Res, 2010, 2(1), 149-155.