

• 论 著 •

外周血 T 淋巴细胞亚群和细胞因子在儿童肺炎支原体肺炎诊断中的意义^{*}

甄乾娜¹, 张磊^{2△}, 王兴斌³

(重庆医科大学附属第一医院: 1. 内分泌科; 2. 医学检验科 400016;

3. 重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心 400014)

摘要:目的 探讨外周血 T 淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺ T 细胞)及细胞因子[白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-10 和肿瘤坏死因子(TNF)-α]在儿童肺炎支原体肺炎(MPP)诊断中的意义。方法 采用流式细胞仪和酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测 153 例 MPP 患儿(疾病组)和 122 例健康儿童(对照组)外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例, IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF-α 水平, 并对疾病组治疗前、治疗后及疾病组并发胸腔积液伴肺纤维化(纤维化组)与不伴有肺纤维化(非纤维化组)数据进行统计分析。结果 疾病组治疗前外周血 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF-α 水平及 CD8⁺ T 细胞比例均显著高于治疗后和对照组, CD4⁺ T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 均低于治疗后和对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。疾病组治疗后外周血 IL-6、IL-8、IL-10 水平高于对照组, CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。纤维化组外周血 IL-6、IL-8、IL-10 水平和 CD8⁺ T 细胞比例高于非纤维化组, CD4⁺ T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 低于非纤维化组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。受试者工作特征曲线表明, IL-6 和 IL-8 辅助诊断肺纤维化的敏感性和特异性较高, 敏感性分别为 100.0% 和 92.6%, 特异性分别为 95.6% 和 93.0%。结论 联合检测外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比例及细胞因子 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF-α 水平有助于全面了解 MPP 患儿治疗前、后免疫功能的变化。外周血 IL-6 和 IL-8 最有助于 MPP 患儿肺纤维化的辅助诊断。

关键词:肺炎支原体肺炎; 白细胞介素-6; 白细胞介素-10; 肿瘤坏死因子-α

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)08-1060-03

Significance of peripheral blood T lymphocytes subsets and cytokines in diagnosis of child mycoplasma pneumonia^{*}

ZHEN Qianna¹, ZHANG Lei^{2△}, WANG Xingbin³

(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Clinical Molecular Medicine Center, Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To investigate the significance of peripheral blood lymphocytes subsets(CD4⁺, CD8⁺ T and CD4⁺/CD8⁺) and cytokines [interleukin(IL)-6, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor alpha(TNF-α)] in the diagnosis of child mycoplasma pneumoniae pneumonia(MPP). **Methods** The expression of peripheral blood CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ were measured by the flow cytometry, and plasma levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α were measured by the ELISA assay in 153 children patients with MPP (disease group) and 122 healthy children(control group). The data before and after treatment in the disease group, patients with pleural effusion complicating pulmonary fibrosis(fibrosis group) and without complicating pulmonary fibrosis(non-pulmonary fibrosis group) were statistically analyzed. **Results** The levels of peripheral blood IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α and the proportion of CD8⁺ before treatment in the disease group were significantly higher than those after treatment and control group, the proportion of CD4⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ were lower than those after treatment and control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The peripheral blood IL-6, IL-8 and IL-10 levels after treatment in the disease group were higher than those in the control group, while the proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were lower than those in the control group, the difference was statistically significant($P<0.05$). The levels of peripheral blood IL-6, IL-8 and IL-10 and proportion of CD8⁺ T cells in the fibrosis group were higher than those in the non-fibrosis group, the proportion of CD4⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ were lower than those in the non-fibrosis group, the difference was statistically significant($P<0.05$). The receiver operation characteristic(ROC) curve showed that IL-6 and IL-10 had higher sensitivity and higher specificity in the auxiliary diagnosis of pulmonary fibrosis, the sensitivities were 100.0% and 92.6%, and the specificities were 95.6% and 93.0% respectively. **Conclusion** The combined measurement of peripheral blood CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺, and plasma IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α levels is helpful for comprehensively understanding the change of immune function before and after treatment in the patients with MPP. Peripheral IL-6 and IL-8 are most helpful for the diagnosis of pulmonary fibrosis in MPP patients.

Key words: mycoplasma pneumoniae pneumonia; interleukin-8; interleukin-10; TNF-α

肺炎支原体肺炎(MPP)占住院儿童社区获得性肺炎的 10%~40%, 已成为儿科医师密切关注的临床问题^[1-2]。肺炎支原体(MP)侵入机体后刺激宿主免疫系统产生炎性因子, 炎

性因子在局部聚集、扩散和蔓延, 严重者可导致多器官功能衰竭或死亡^[3]。MPP 的发生与免疫因素密切相关^[4-5], 故全面研究 MPP 患儿体内 T 淋巴细胞亚群和血清细胞因子的变化有

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(81200294)。

作者简介: 甄乾娜, 女, 技师, 主要从事临床检验诊断方面的研究。△ 通信作者, E-mail: leizi198315@163.com。

助于 MPP 患儿的辅助诊断、治疗及预后判断。本研究以 MPP 患儿为研究对象,全面探讨 T 淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)和血清细胞因子白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-10 和肿瘤坏死因子(TNF)-α 对 MPP 患儿免疫功能的影响及 MPP 儿童肺纤维化的辅助诊断价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2016 年 6 月在重庆医科大学附属儿童医院儿科病房收治的 MPP 患儿 153 例(疾病组);男 70 例,女 83 例;年龄 0.6~12.0 岁,平均年龄(6.1±4.9)岁。MPP 患儿诊断参照《实用儿科学》标准^[6],排除肺结核、支气管哮喘等呼吸系统疾病。MPP 患儿常规检查包括胸片、B 超、心电图、心肌酶谱和肝肾功能等。153 例 MPP 患儿中 45 例有胸腔积液,其中 18 例有肺纤维化改变(纤维化组),27 例未伴有肺纤维化改变(非纤维化组)。MPP 患儿检测前未使用抗菌药物、皮质激素或免疫抑制剂。选择同期 122 例健康儿童为对照(对照组);其中男 57 例,女 65 例;年龄 1.0~12.0 岁,平均年龄为(5.8±5.5)岁。排除有器质性疾病或 1~2 个月内有急性感染病史的儿童。2 组儿童年龄、性别比差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 标本采集 分别空腹静脉采集 MPP 患儿治疗前及治疗后、健康儿童外周血 2~4 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,采用梯度离心分离单个核细胞,采用贝克曼流式细胞仪及配套试剂盒检测 T 淋巴细胞亚群(CD4⁺和 CD8⁺比值),ELISA 及配套试剂盒检测血浆细胞因子 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF-α 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析;计量

资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,MPP 患儿治疗前、后比较采用配对 t 检验,MPP 患儿治疗前与对照组、MPP 患儿治疗后与对照组、肺纤维化组与非纤维化组比较均采用独立样本 t 检验;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组外周血 T 淋巴细胞亚群和细胞因子比较 疾病组治疗前外周血 IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α 水平和 CD8⁺ T 细胞比例均高于治疗后和对照组,CD4⁺ T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 均低于治疗后及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。疾病组治疗后外周血 IL-6、IL-8、IL-10 水平高于对照组,CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 MPP 胸腔积液患儿肺纤维化组与肺非纤维化组外周血 T 淋巴细胞亚群和细胞因子比较 纤维化组外周血细胞因子 IL-6、IL-8 和 IL-10 水平和 CD8⁺ 淋巴细胞比例高于非纤维化组,CD4⁺ T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 低于非纤维化组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 MPP 胸腔积液患儿外周血细胞因子和 T 淋巴细胞亚群对肺纤维化的诊断价值比较 4 种血浆细胞因子中,IL-6 和 IL-10 对 MPP 胸腔积液患儿肺纤维化的诊断价值最高,TNF-α 最低。IL-6 诊断 MPP 肺纤维化的 AUC、敏感性和特异性分别为 1.00(95%CI 为 1.00~1.00),100.0%和 95.6%。T 淋巴细胞中 CD4⁺/CD8⁺ 比值诊断 MPP 胸腔积液患儿肺纤维化的诊断效能较高(AUC=0.90),敏感性和特异性分别为 77.8%和 94.4%。见表 3。

表 1 3 组外周血 T 淋巴细胞亚群和细胞因子比较($\bar{x}\pm s$)

分组	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
疾病组							
治疗前	22.9±2.15	26.1±2.03	19.2±3.87	28.2±1.65	34.5±4.33	28.2±4.67	1.24±0.21
治疗后	9.22±1.94	11.6±0.88	10.1±0.82	11.5±1.01	34.9±5.91	21.6±4.25	1.68±0.44
对照组	7.31±1.15	9.09±0.79	8.74±1.56	11.4±1.50	39.8±6.25	24.9±4.89	1.67±0.42
$t_{\text{治疗前-治疗后}}$	-57.00	-81.26	-28.69	-110.20	0.69	-13.10	11.43
P	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.491	0.000*	0.000*
$t_{\text{治疗前-对照组}}$	77.01	95.08	30.49	87.40	-8.03	5.52	-10.01
P	0.000 [#]	0.000 [#]	0.000 [#]	0.000 [#]	0.000 [#]	0.000 [#]	0.000 [#]
$t_{\text{治疗后-对照组}}$	10.15	24.89	8.56	0.37	-6.66	-5.90	0.39
P	0.000 Δ	0.000 Δ	0.000 Δ	0.710	0.000 Δ	0.000 Δ	0.690

注:疾病组治疗前与治疗后比较,* $P<0.05$;疾病组治疗前与对照组比较,[#] $P<0.05$;疾病治疗后与对照组比较, Δ $P<0.05$ 。

表 2 MPP 胸腔积液患儿肺纤维化组与非纤维化组外周血 T 细胞亚群和细胞因子比较($\bar{x}\pm s$)

分组	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
纤维化组	28.4±2.11	27.9±1.65	26.8±1.87	26.9±1.62	33.4±4.56	29.3±4.44	1.15±0.16
非纤维化组	22.1±1.31	24.6±1.94	20.9±1.71	26.5±1.42	36.3±3.30	25.5±3.29	1.44±0.17
t	12.470	6.077	10.910	0.895	2.320	-3.154	5.912
P	0.000	0.000	0.000	0.376	0.025	0.003	0.000

表 3 外周血细胞因子和 T 淋巴细胞亚群对 MPP 胸腔积液患儿肺纤维化的诊断价值

指标	AUC	95%CI	敏感性(%)	95%CI	特异性(%)	95%CI	临界值
IL-6	1.00	1.00~1.00	100.0	87.2~100.0	95.6	81.5~100.0	25.540
IL-8	0.91	0.84~0.99	70.4	49.8~86.3	94.4	72.7~99.8	25.710
IL-10	0.99	0.97~1.00	92.6	75.7~99.1	93.0	72.0~99.6	23.480
TNF-α	0.57	0.40~0.75	29.6	13.8~50.2	88.9	65.3~98.6	25.200
CD4 ⁺	0.69	0.54~0.85	33.3	16.5~54.0	94.3	72.7~99.8	31.000
CD8 ⁺	0.76	0.61~10.90	74.1	53.8~88.9	83.3	58.6~96.4	26.280
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.90	0.81~0.99	77.8	57.7~91.4	94.4	72.7~99.6	1.214

3 讨 论

MP 是一类革兰染色阴性、缺乏细胞壁的原核致病微生物,主要引起社区获得性肺炎。MP 肺炎的发病机制尚未完全阐明,可能与机体的细胞免疫和体液免疫密切相关。机体的免疫平衡状态依赖于各淋巴细胞亚群的相互协调、相互制约。T 淋巴细胞是机体免疫反应的效应细胞和免疫调节细胞,其表面抗原 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的相互诱导和相互制约对调节免疫应答和维持自身稳定有重要意义。程燕^[7]发现,MP 感染人体后体内 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值失衡,B 细胞大量增殖并产生抗体,抗原抗体反应引起机体病理损伤。何红霞等^[8]进一步证实,MPP 患儿急性期和恢复期 CD4⁺ T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ T 均显著降低,CD8⁺ T 细胞比例较对照组升高。本研究发现,MPP 患儿在治疗前外周血 CD4⁺ T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 均显著低于对照组,CD8⁺ T 细胞比例显著高于对照组但治疗后均显著下降,与以上报道一致。MPP 时机体成熟 T 细胞数目减少,辅助性 T 细胞(Th 细胞)免疫功能下降而抑制性 T 细胞(Ts 细胞)免疫功能增强,T 细胞亚群平衡发生紊乱,最终引起系列病理损伤^[9]。

体液免疫在 MPP 的发病中起着重要作用,当病原体侵蚀机体时可激活免疫系统,产生多种细胞因子。TNF- α 、IL-6、IL-8 和 IL-10 等细胞因子在 MPP 发病机制中起重要作用,其增高度与疾病的严重程度、病程发展有关^[10]。IL-6 是炎性介质中最强的细胞因子,参与体液免疫的调节及肺部炎症反应的病理过程,其水平高低可反映肺部感染程度,还可加强 TNF- α 等炎性因子的产生而加重炎症损伤^[11]。IL-8 对中性粒细胞和 T 淋巴细胞等均有强烈趋化作用,这些炎性细胞在 IL-8 的趋化作用下在受累组织积聚、浸润并释放活性物质,造成组织损伤。IL-10 对 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 有显著的抑制作用^[12]。本研究发现,MPP 患儿治疗前血浆炎性因子(IL-6、IL-8、TNF- α)和 IL-10 均增高,在治疗后均下降,提示 TNF- α 、IL-6、IL-8 和 IL-10 在 MPP 的发生、发展和维持体内免疫平衡中有重要意义。

MP 是引起胸腔积液的第 2 病因,仅次于肺炎链球菌^[13]。前期研究表明,合并胸腔积液的 MPP 患儿恢复时间更长且易形成气道黏液栓和并发肺纤维化^[11,14]。因此,MPP 胸腔积液患儿肺纤维的早期诊断对于促进患儿愈合,改善预后均有重要意义。目前,少有 T 淋巴细胞亚群在 MPP 致患儿肺纤维化的相关报道。本研究中,纤维化组外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞比例显著高于非纤维化组,CD4⁺ T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 低于非纤维化组,提示 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例及 CD4⁺/CD8⁺ 紊乱与肺纤维化的发生、发展有关。在胸腔积液的 MPP 患儿中,细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 和 IL-10 等水平的变化对临床诊断、治疗 MPP 患儿均有一定的应用价值。孙子梅^[4]研究发现,纤维化患儿血清 IL-8 水平和 TNF- α 显著高于肺纤维化组,故监测血清 IL-8 水平和 TNF- α 水平有利于肺纤维化患儿的辅助诊断。本研究中,MPP 胸腔积液患儿外周血纤维化组炎性因子(IL-6 和 IL-8)和抗炎性因子(IL-10)均显著升高,而 TNF- α 水平变化差异无统计学意义($P>0.05$),与以上报道相似。此外,4 项炎性因子中 IL-6 和 IL-10 的 AUC 达到 0.99~1.0,敏感性和特异性均在 92.0% 以上,故 IL-6 和 IL-10 是诊断或研究 MPP 致肺纤维化的潜在标志物。

目前尚未见联合检测外周血 T 淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)和血浆细胞因子(IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α)对 MPP 患儿免疫功能影响和肺纤维化的相关报道。本研究结果表明,外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比例和 IL-6 和 IL-10 最有助于了解 MPP 患儿治疗前、后及 MPP 胸腔积液患儿肺纤维化时体内免疫状态。测定血浆 IL-6 和 IL-10 有助于深入了解 MPP 致儿童肺纤维化的机制和辅助诊断方法。尽管如此,本研究中 MPP 胸腔积液肺纤维化患儿较少,故全面探讨 T 淋巴细胞亚群和多种细胞因子对 MPP 致患儿肺纤维化的诊断价值尚需大样本深入研究。

参考文献

- [1] Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al. Community-Acquired pneumonia requiring hospitalization among U. S. adults[J]. N Engl J Med, 2015, 373(5): 415-427.
- [2] 编辑委员会. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [3] 王卫平. 儿科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 286-287.
- [4] 孙子梅. 血清细胞因子检测在儿童肺炎支原体肺炎诊治中的意义[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(3): 273-275.
- [5] 王颖洁, 白雪梅, 刘正娟, 等. 儿童肺炎支原体肺炎免疫功能, 降钙素原及 C-反应蛋白变化及意义[J]. 中国小儿急救医学, 2014, 21(8): 501-503.
- [6] 胡亚美, 江载芳, 褚福棠. 实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1204-1205.
- [7] 程燕. 肺炎支原体感染的免疫反应与临床[J]. 中国小儿急救医学, 2006, 13(4): 387-388.
- [8] 何红霞, 寿小群. 肺炎支原体肺炎患儿 T 细胞亚群变化及匹多莫德的治疗作用[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(32): 4560-4561.
- [9] Guleira R, Nisar N, Chwla TC, et al. Mycoplasma pneumoniae and central nervous system complications: a review[J]. J Lab Clin Med, 2005, 146(2): 55-63.
- [10] Zi MS. Significance of serum cytokine in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Journal of Hainan Medical University, 2016, 22(3): 69-71.
- [11] 曹岩, 刘红, 卢晟晔, 等. 儿童肺炎支原体肺炎血清中 TNF- α 、IL-6、IL-8 和 IL-10 浓度测定及其临床意义的研究[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(18): 2575-2578.
- [12] Li W, Liu YJ, Zhao XL, et al. Th-1/Th-2 cytokine profile and its diagnostic value in mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Iran J Pediatr, 2016, 26(1): 3807.
- [13] Shen YH, Hwang KP, Niu CK. Complicated parapneumonic effusion and empyema in children[J]. Microbiol Immunol Infect, 2006, 39(6): 483-488.
- [14] 安淑华, 张丽君, 李金英. 气道黏液栓形成的肺炎支原体肺炎患儿的预后分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(5): 487-491.

(收稿日期: 2016-12-22 修回日期: 2017-01-13)