

论著 · 临床研究

癫痫患儿外周血中调节性 T 细胞的变化及其临床意义

李春¹ 马维宁² 王华¹

(中国医科大学附属盛京医院 1. 小儿神经内科; 2. 神经外科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 研究 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 在癫痫患儿外周血的表达水平, 探讨其在癫痫发病机制中的作用。方法 采用流式细胞术分别检测 41 例癫痫患儿和 38 例健康儿童外周血 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例, 及 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、自然杀伤细胞 (NK)、B 细胞分别占淋巴细胞的比例。结果 癫痫组患儿外周血 Treg 细胞比例、CD4⁺ T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值分别为 (2.4 ± 0.5)%、(35 ± 5)%、1.32 ± 0.24, 较对照组的 (6.1 ± 1.2)%、(38 ± 4)%、1.60 ± 0.24 显著降低 ($P < 0.05$); 而癫痫组 CD8⁺ T 细胞比例、NK 细胞比例、B 淋巴细胞比例分别为 (27 ± 3)%、(11.1 ± 5.1)%、(24 ± 9)%, 较对照组的 (24 ± 3)%、(8.5 ± 1.9)%、(16 ± 5)% 显著升高 ($P < 0.05$)。结论 癫痫患儿外周血中存在 Treg 细胞比例异常, 提示免疫机制可能参与了癫痫的发生和发展。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13 (11): 889 - 892]

[关键词] 癫痫; CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺; 调节性 T 细胞; 流式细胞术; 儿童
[中图分类号] R742.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008 - 8830 (2011) 11 - 0889 - 04

Changes of regulatory T cells in the peripheral blood of children with epilepsy

LI Chun, MA Wei-Ning, WANG Hua. Department of Pediatric Neurology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, China (Wang H, Email: wangh1@sj-hospital.org)

Abstract: Objective To study the levels of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) in the peripheral blood of children with epilepsy and the roles of Tregs in the pathogenesis of epilepsy. **Methods** Forty-one children with epilepsy and thirty-eight healthy children were enrolled. The percentage of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs in CD4⁺ T cells and the percentages of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, nature killer (NK) cells and B cells in lymphocytes were evaluated by flow cytometry. **Results** The percentages of peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs and CD4⁺ T cells and the ratio of CD4⁺ T cells to CD8⁺ T cells in epileptic children were (2.4 ± 0.5)%, (35 ± 5)% and 1.32 ± 0.24 respectively, which were significantly lower than those in healthy children [(6.1 ± 1.2)%, (38 ± 4)% and 1.60 ± 0.24 respectively; $P < 0.05$]. In contrast, the percentages of CD8⁺ T cells, NK cells and B cells in lymphocytes in epileptic children were significantly higher than those in healthy children [(27 ± 3)% vs (24 ± 3)%, (11.1 ± 5.1)% vs (8.5 ± 1.9)% and (24 ± 9)% vs (16 ± 5)% respectively; $P < 0.05$]. **Conclusions** The abnormal percentage of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs in the peripheral blood may be involved in the pathogenesis of epilepsy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (11): 889 - 892]

Key words: Epilepsy; CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺; Regulatory T cell; Flow cytometry; Child

越来越多的人认识到免疫机制在癫痫发病中的作用^[1]。早在 1969 年 Walker 就提出了癫痫发病机制的免疫学假说, 1997 年 Besedevsky 又提出了“神经 - 内分泌 - 免疫”网络 (NEIN), 目前有关癫痫的免疫学研究越来越受到重视。

白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 是一种很重

要的细胞因子, 与癫痫的发病关系密切。癫痫患儿外周血中 IL-2 的浓度显著高于正常儿童^[2]。而调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg 细胞) 的增生和活化依赖于 IL-2 的刺激^[3]。推测癫痫患儿外周血中 Treg 细胞也可能存在异常。

近年来, 关于 Treg 细胞与肿瘤、器官移植、肾病

[收稿日期] 2011 - 06 - 22; [修回日期] 2011 - 08 - 15
[作者简介] 李春, 女, 硕士, 住院医师。
[通信作者] 王华, 教授。

综合征及自身免疫性肝炎等疾病的报道较多,同时发现神经系统疾病如多发性硬化、重症肌无力、格林巴利综合征、成胶质细胞瘤等患者也存在 Treg 细胞的异常^[3-5]。目前尚无有关 Treg 细胞与癫痫关系的报道。本研究对 41 名癫痫患儿进行外周血 Treg 细胞的测定,旨在探讨 Treg 细胞在癫痫患儿的变化及临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 癫痫组 于 2010 年 3~12 月在我院小儿神经内科病房住院或门诊就诊的癫痫患儿 41 例,年龄 1.5 个月至 11 岁。本研究将癫痫患儿分为 2 个亚组: >3 岁组(26 例),其中男 14 例,女 12 例,平均 6.29±2.31 岁;≤3 岁组(15 例),其中男 10 例,女 5 例,平均 0.85±0.78 岁。

入组标准:①首次发病,发作后 24 h 内就诊,检查前未服用任何抗癫痫药物。②根据 2001 年国际抗癫痫联盟(ILAE)制定的癫痫和癫痫综合征的分类标准^[4],全部病例均符合强直-阵挛发作诊断;③年龄在 1 个月到 14 岁之间;④所有病例行动态脑电图检查发现癫痫波,头颅磁共振排除占位、出血等颅内病变,血生化(血糖、血氨、血乳酸、甲状腺功能等)排除代谢异常,且需排除以下情况:感染性疾病、近半年内接受过免疫调节治疗、肝肾功能不全、有严重精神疾患、两周内有过手术病史和严重外伤。

1.1.2 对照组 对照组 38 例,为同期门诊体检的健康儿童,近 2 周内无感染性疾病病史,无其他急、慢性疾病,无过敏等免疫相关的疾病。年龄 2 个月至 10 岁。分为 2 个亚组:>3 岁组(23 例),其中男 15 例,女 8 例,年龄 6.25±2.63 岁;≤3 岁组(15 例),其中男 9 例,女 6 例,年龄 1.47±1.02 岁。癫痫组与对照组间不同年龄组别的性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得医院医学伦理委员会批准及家长知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 Treg 细胞测定 癫痫组患儿于入院 24 h 内取空腹静脉血 2 mL,对照组健康儿童取空腹静脉血 2 mL,经肝素抗凝后,加淋巴细胞分离液并行 1800 r/min 离心 15 min,吸取中层淋巴细胞,2400 r/min 离心 5 min,弃上清后加 100 μL 生理盐水重悬,取 10 μL 稀释 10 倍用细胞计数池计数细胞密度,根据结果把细胞稀释成 1×10^7 /mL。经过固定、透膜、培养、冲洗等步骤后,上机分析(流式细胞仪采用 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪),以 CD4⁺ 细胞设门,分析门内 CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞亚群,每份标本计数 20000 个淋巴细胞,结果以 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞占 CD4⁺ 细胞的百分率表示。

1.2.2 淋巴细胞亚群测定 用流式细胞术测定淋巴细胞亚群,包括 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)、B 细胞分别占淋巴细胞的比例。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行分析,数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数的比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞免疫指标的比较

癫痫组外周血 Treg 细胞比例、CD4⁺ T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值均较对照组显著降低($P<0.05$),而 CD8⁺ T 细胞比例、NK 细胞比例、B 淋巴细胞比例较对照组显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

与对照组≤3 岁儿童比较,癫痫组≤3 岁儿童外周血 Treg 细胞比例、CD4⁺ T 细胞比例以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均显著降低($P<0.05$),B 淋巴细胞比例显著升高($P<0.05$),见表 2。年龄>3 岁的癫痫组外周血 Treg 细胞比例较同年龄的对照组显著降低($P<0.01$),CD8⁺ T 细胞比例、B 淋巴细胞比例均显著升高($P<0.05$),见表 3。

表 1 癫痫组与对照组儿童细胞免疫指标的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Treg(%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞(%)	B 淋巴细胞(%)
对照组	38	6.1±1.2	38±4	24±3	1.60±0.24	8.5±1.9	16±5
癫痫组	41	2.4±0.5	35±5	27±3	1.32±0.24	11.1±5.1	24±9
t 值		11.57	2.48	-2.201	3.697	-2.46	-3.24
P 值		<0.001	0.01	0.03	0.001	0.018	0.002

表 2 ≤3 岁的两组儿童细胞免疫指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Treg(%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞(%)	B 淋巴细胞(%)
对照组	15	5.7 ± 0.8	39 ± 4	25 ± 4	1.61 ± 0.28	8.4 ± 2.2	16 ± 4
癫痫组	15	2.5 ± 0.5	34 ± 6	27 ± 4	1.27 ± 2.42	11 ± 5	24 ± 12
<i>t</i> 值		12.453	2.306	-1.85	3.3	-1.736	-2.33
<i>P</i> 值		<0.001	0.03	0.076	0.003	0.095	0.03

表 3 >3 岁的两组儿童细胞免疫指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Treg(%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞(%)	B 淋巴细胞(%)
对照组	23	7.3 ± 1.8	36 ± 2	23 ± 0.8	1.56 ± 0.12	8.8 ± 1.3	15 ± 7
癫痫组	26	2.3 ± 0.6	35 ± 4	26 ± 0.7	1.36 ± 0.23	11 ± 5	24 ± 5
<i>t</i> 值		7.49	0.669	-2.804	1.616	-0.812	-3.15
<i>P</i> 值		0.003	0.516	0.013	0.126	0.429	0.006

2.2 癫痫患儿各年龄组之间细胞免疫指标的比较

癫痫组患儿不同年龄组别的各项细胞免疫指标

比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 癫痫患儿各年龄组之间细胞免疫功能的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Treg(%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞(%)	B 淋巴细胞(%)
≤3 岁组	15	2.3 ± 0.6	35 ± 4	26 ± 4	1.36 ± 0.23	11 ± 5	24 ± 5
>3 岁组	26	2.5 ± 0.5	34 ± 6	27 ± 4	1.27 ± 2.42	11 ± 5	24 ± 12
<i>t</i> 值		-1.02	0.275	-0.989	1.035	-0.318	-0.041
<i>P</i> 值		0.32	0.785	0.33	0.31	0.753	0.968

3 讨论

Treg 细胞是在胸腺发育中的一种特殊的 T 细胞群体,通过抑制其他免疫效应细胞的功能发挥免疫抑制活性,调节机体免疫反应。既往认为 Treg 细胞表面表达分子标志物 CD4 和 CD25,但一部分辅助 T 细胞(包括 Th1 和 Th2)表面也表达 CD25,因此,CD4⁺CD25⁺T 细胞并不能代表全部有免疫活性 Treg 细胞。新近学者发现成熟并发挥功能的 Treg 细胞内叉状头转录因子 3(forkhead transcription factor 3,Foxp3)阳性,并具有特异性^[1]。三标的 CD4、CD25 和 Foxp3 是目前检测 Treg 细胞最精确的方法。

目前国内外尚无有关 Treg 细胞与癫痫关系的报道,本研究对 1 个月至 14 岁癫痫患儿外周血 Treg 细胞比例的测定显示癫痫组患儿 Treg 细胞比例较健康儿童显著降低。另外,本研究显示癫痫组患儿外周血中 CD4⁺T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺比值较健康儿童显著降低,CD8⁺T 细胞比例、NK 细胞比例显著升高,这与国外学者的研究结果一致^[6-8]。

Bhatt 等^[9]发现 Treg 细胞比例在脐血中最高,随着胎儿娩出后 36 个月内 Treg 细胞比例逐渐下降,中青年 Treg 细胞比例趋于稳定,到老年 Treg 细胞比例

又出现 2~3 倍的升高。本研究发现 >3 岁及 ≤3 岁癫痫患儿外周血 Treg 细胞比例均较健康儿童显著降低,癫痫组患儿不同年龄组别的 Treg 细胞比例差异无统计学意义,考虑这可能与癫痫患儿体内异常的免疫调节抑制了其正常的生理分泌有关。

癫痫发病的免疫学机制尚未完全阐明,根据本研究结果推测:Treg 细胞比例降低,免疫抑制活性减弱,导致 CD8⁺T 细胞比例、NK 细胞等效应细胞活化,产生大量细胞因子如 IL-2,通过与靶细胞膜上的受体结合,不仅参与外周免疫应答,还可透过血脑屏障进入中枢神经系统,通过升高神经元细胞内游离钙离子浓度,促进 N-甲基-D-天门冬氨酸 I 型亚单位(NMDAR1)合成,NMDAR1 释放后影响神经细胞间兴奋传递,增强突触后电位活动,改变中枢神经系统兴奋性,导致癫痫发病^[2]。

对于癫痫患儿的细胞免疫功能异常发生在服药前还是服药后,目前还存在争议。本研究数据均为癫痫确诊后使用抗癫痫药物之前获得,结果显示癫痫患儿本身存在免疫功能异常,这与国内研究结果一致^[10]。综上所述,本研究证实癫痫患儿外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的比例异常,提示了免疫功能可能参与了癫痫的发生和发展。

[参 考 文 献]

[1] Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation[J]. Nature, 2007, 445(7130): 931-935.

[2] Lehtimäki KA, Keränen T, Palmio J, Mäkinen R, Hurme M, Honkaniemi J, et al. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy[J]. Acta Neurol Scand, 2007, 116(4): 226-230.

[3] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self[J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 345-352.

[4] Engel J. International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology[J]. Epilepsia, 2001, 42(6): 796-803.

[5] El Andaloussi A, Lesniak MS. An increase in CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme[J]. Neuro Oncol, 2006, 8(3): 234-243.

[6] Bauer S, Köller M, Cepok S, Todorova-Rudolph A, Nowak M, Nockher WA, et al. NK and CD4⁺ T cell changes in blood after seizures in temporal lobe epilepsy[J]. Exp Neurol, 2008, 211(2): 370-377.

[7] Montelli TC, Soares AM, Peraçoli MT. Immunologic aspects of West syndrome and evidence of plasma inhibitory effects on T cell function[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2003, 61(3B): 731-737.

[8] 蓝菊红, 吴日荷, 吕卓超. 热性惊厥患儿 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 的变化及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(6): 492-493.

[9] Bhatt R, Bhatt S, Hameed M, Rameshwar P, Siegel A. Amygdaloid kindled seizures can induce functional and pathological changes in thymus of rat: role of the sympathetic nervous system[J]. Neurobiol Dis, 2006, 21(1): 127-137.

[10] 陈英才, 穆莉芳, 梁淑芬, 吴春燕, 赵红立, 谢丹. 儿童癫痫的细胞免疫研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(4): 374-375.

(本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

国际儿科肾脏病学会(中国)培训中心招募学员通知

2010年4月北京大学第一医院儿(肾)科联合香港玛嘉烈医院青少年部被国际儿科肾脏病学会(International Pediatric Nephrology Association, IPNA)正式批准为中国首家国际儿科肾脏病学会培训中心(IPNA Training Center)。该中心主任为丁洁教授,副主任为赵孟准教授(香港)、肖慧捷主任医师、姚勇主任医师,主要专家还有钟旭辉、赖伟明(香港)、谢纪超(香港)等医师。我国拥有国际性儿科肾脏病培训中心可以避免在其他国家受训时的语言障碍,非常有利于我国儿肾医师队伍的培养和壮大。按照IPNA规定,学员在培训中心经过系统培训期满后,经中心评估、IPNA审查后可以获得“IPNA Fellow”的称号,并享有IPNA给予的如下待遇:(1)获得IPNA颁发的“IPNA Fellow”证书;(2)获得IPNA赠送的一部Pediatric Nephrology专著;(3)由IPNA资助(免会议注册费,提供交通费和食宿费)参加一次亚洲或国内学术会议、或继续医学教育(CME)课程。

IPNA(中国)中心将于2012年继续招收培训学员,预计招收1~2名学员,培训时间约8个月(其中2个月在香港玛嘉烈医院青少年部接受培训);IPNA将资助学员在培训期间的食宿费用、学员所在地至北京及北京至香港的往返机票。

申请者条件:医学本科以上学历、有儿内科执业医师证书并有三年以上临床工作经验、有一定英语基础的儿科医生。

申请程序:(1)申请者将个人简历(包括学历、职称、英语水平以及肾脏领域的医、教、研经历等)、所在单位(科室)负责人和一位正高职称医师的书面推荐信寄往北京大学第一医院儿(肾)科;(2)IPNA(中国)培训中心将对申请者材料进行审核;(3)获准学员的资料将被报送IPNA备案;(4)由IPNA(中国)培训中心通知被批准学员具体事宜。

申请材料邮寄地址:北京市西城区西安门大街1号,北京大学第一医院儿科(信封外面标注“IPNA培训中心”字样);邮编100034;收件人钟旭辉医师。

申请截止日期为2012年1月15日。

联系人:钟旭辉医师;联系电话:010-83572168;Email: xuhui7876@yahoo.com.cn。

北京大学第一医院儿(肾)科