

· 临床研究 ·

激素治疗对原发性肾病综合征患儿淋巴细胞影响的研究

曾令丽

(四川省德阳市人民医院儿科 618000)

摘要:目的 通过观察激素治疗前、后原发性肾病综合征(PNS)患儿外周血淋巴细胞亚群的变化,探讨儿童 PNS 的发病机制。方法 选择 PNS 患儿 47 例,其中单纯型肾病(SNS)31 例,肾炎型肾病(NNS)16 例,同时选择 20 例健康体检儿童作为正常对照组;激素治疗前、后分别采用流式细胞术检测外周血 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺、B 细胞和 NK 细胞比例。结果 与正常对照组比较,治疗前 SNS 组和 NNS 组患儿外周血 CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺ 和 NK 细胞比例明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),CD3⁺CD8⁺ 和 B 细胞比例显著升高($P < 0.01$)。激素治疗后,SNS 组 28 例(占 90.32%)患儿得到缓解,NNS 组 11 例(占 68.75%)患儿得到缓解;与治疗前比较,治疗后 SNS 组和 NNS 组缓解患儿外周血 CD3⁺CD8⁺ 和 B 细胞比例均明显下降($P < 0.05$),CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺ 和 NK 细胞比例显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 儿童 PNS 的发病机制可能与 CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺ 和 NK 细胞的下降以及 CD3⁺CD8⁺ 和 B 细胞升高有关,激素可通过调节淋巴细胞各亚群比例发挥治疗作用。

关键词:肾病综合征;淋巴细胞亚群;激素类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.17.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)17-1968-03

The effect of hormone therapy on lymphocyte subsets in children with primary nephrotic syndrome

Zeng Lingli

(Paediatrics Department, Deyang People's Hospital, Deyang, Sichuan 618000, China)

Abstract: Objective To explore the pathogenesis of primary nephrotic syndrome(PNS) in children by observing the changes of lymphocyte subsets in peripheral blood before and after hormone treatment. **Methods** 47 cases of children with PNS were selected including 31 cases of simple nephrotic syndrome(SNS) and 16 cases of nephritis nephropathy syndrome(NNS), while 20 cases of healthy children were selected as normal control group; Flow cytometry was used to detected the proportion of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, B cells and NK cells in peripheral blood before and after hormone therapy. **Results** Compared with the normal control group, the proportion of CD3⁺CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ and NK cells in peripheral blood of children in SNS group and NNS group significantly reduced before treatment($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the CD3⁺CD8⁺ and B cells proportion significantly increased($P < 0.01$). 28 patients(90.32%) had been alleviated in SNS group, and 11 patients(68.75%) had been alleviated in NNS group after hormone therapy; compared with pre-hormone therapy, the proportion of CD3⁺CD8⁺ and B cells of children with remission in SNS and NNS group were significantly decreased after treatment($P < 0.05$), CD3⁺CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ and NK cells proportion was significantly higher($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The pathogenesis of PNS in children may be relate to the decline of CD3⁺CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ and NK cells, and CD3⁺CD8⁺ and B cells' increation, hormones plays a therapeutic effect by adjusting lymphocyte subsets proportion.

Key words: nephrotic syndrome; lymphocyte subsets; hormones

原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)是由于肾小球基底膜通透性增加,导致大量蛋白尿、低清蛋白血症以及一系列病理、生理改变的临床综合征,学龄前儿童为该病的高发人群。研究报道,儿童 PNS 发病率和患病率分别为(2~4)/10 万和 16/10 万,儿科住院泌尿系统疾病患儿中 PNS 约占 20%~30%,且具有增多趋势^[1-2]。目前,儿童 PNS 的病因和发病机制尚不清楚,多数研究认为与其免疫功能紊乱有关^[3-4]。因此,本研究通过检测激素治疗前、后儿童 PNS 患者外周血淋巴细胞亚群的变化,探讨其在儿童 PNS 发病机制中的作用,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 11 月至 2012 年 8 月在本院儿科诊断和治疗的 PNS 患儿 47 例,根据中华医学会儿科学分会 2009 年肾脏病学组修订的 PNS 诊断标准^[5]分为单纯型肾病(SNS)和肾炎型肾病(NNS),同时选择在本院儿童保健科体检的 22 例健康儿童作为正常对照组。研究对象一般情况比较见

表 1。

1.2 试剂与仪器 FITC/PE 标记的单克隆抗体:CD3-FITC/CD16 + 56-PE、CD4-FITC/CD8-PE、CD3-FITC/HLADR-PE、CD4-FITC/CD25-PE 和 CD19-PE(Immunotech 公司,法国);美国 Beckman coulter XL 型流式细胞分析仪。

1.3 方法

1.3.1 治疗方法 两组患者给予相同的治疗即诱导缓解阶段给予泼尼松每天 2 mg/kg,分 2 次口服;待尿蛋白转阴后,每晨顿服,持续 6 周。巩固维持阶段隔日晨顿服每天 1.5 mg/kg,持续 6 周;当尿蛋白持续阴性时,逐渐减量。泼尼松足量每天 2 mg/kg,治疗小于 4 周,尿蛋白转阴者判定为缓解即激素敏感型 PNS;以泼尼松足量治疗大于 4 周,尿蛋白仍阳性者判定为未缓解即激素耐受型 PNS。

1.3.2 标本采集 所有研究对象在入院时首次采空腹静脉血 2 mL,检测淋巴细胞各亚群比例;待激素治疗后尿蛋白连续 3 次检查阴性,血清蛋白恢复正常水平后再次采血复查。

1.3.3 检测指标 各取 100 μL 待测血样分别加入 CD3-FITC/CD16 + 56-PE、CD4-FITC/CD8-PE、CD4-FITC/CD25-PE、CD19-PE 标记的单克隆抗体,然后严格按照试剂盒说明书处理样本后,采用流式细胞仪检测 CD3⁺(总 T 细胞)、CD3⁺CD4⁺(辅助性 T 细胞)、CD3⁺CD8⁺(细胞毒性 T 细胞)、CD4⁺CD25⁺(调节性 T 细胞)、CD19⁺(B 细胞)和 CD3⁺CD56⁺(NK 细胞)百分率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行分析处理,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK 法,组内前后比较采用配对 *t* 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 研究对象治疗前活动期各淋巴细胞亚群比较 与正常对照组比较,SNS 组和 NNS 组患儿外周血 CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺和 NK 细胞比例均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)

或 $P<0.01$);CD3⁺CD8⁺和 B 细胞比例升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。SNS 组和 NNS 组患儿外周血各淋巴细胞亚群间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.2 激素治疗前、后各淋巴细胞比例变化情况 经激素治疗后,PNS 患儿有 39 例得到缓解,未缓解 8 例,激素敏感率为 82.98%;SNS 组有 28 例(90.32%)患儿得到缓解;NNS 组有 11 例(68.75%)患儿得到缓解。与治疗前比较,治疗后 SNS 组和 NNS 组缓解患儿外周血 CD3⁺CD8⁺和 B 细胞比例均明显下降($P<0.05$),CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺和 NK 细胞比例显著升高,而未缓解患儿各淋巴细胞亚群变化比较差异无统计学意义。治疗后 SNS 组和 NNS 组缓解患儿外周血 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺和 NK 细胞比例低于正常对照组($P>0.05$),CD3⁺CD8⁺和 B 细胞比例高于正常对照组($P>0.05$),而未缓解患儿各淋巴细胞亚群变化与正常对照组比较差异有统计意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见表 3。

表 1 研究对象一般情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	性别		年龄(岁)	尿蛋白(n)		清蛋白(g/L)	胆固醇(mmol/L)
		男	女		+++	++++		
正常对照组	22	17	5	5.81±2.86	—	—	32.36±8.71	3.89±0.92
SNS 组	31	23	8	5.63±3.02	21	10	17.58±3.42*	6.92±2.07*
NNS 组	16	12	4	5.57±2.95	11	5	18.05±4.30*	7.03±2.11*
F 或 χ^2		0.067		2.415	0.005		5.470	5.030
P		0.967		0.103	0.944		0.004	0.008

* : $P<0.01$,与正常对照组比较;—:此项无数据。

表 2 研究对象治疗前活动期各淋巴细胞亚群比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	淋巴细胞亚群					
		CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	B 细胞	NK 细胞
正常对照组	22	58.69±7.33	30.84±7.38	25.90±5.21	3.94±0.41	20.41±5.68	14.03±10.83
SNS 组	31	56.25±6.58	26.19±6.62*	28.89±6.07*	2.75±1.07**	26.23±7.71**	5.63±4.11**
NNS 组	16	57.48±11.24	27.32±10.45*	29.03±8.69*	2.57±1.03**	28.09±7.32**	7.52±6.08**
F		2.037	2.879	4.251	5.227	5.362	7.639
P		0.115	0.036	0.026	0.007	0.006	0.000

* : $P<0.05$,** : $P<0.01$,与正常对照组比较。

表 3 激素治疗前、后各淋巴细胞亚群变化情况(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	淋巴细胞亚群						
		CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD4 ⁺	CD8 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	B 细胞	NK 细胞	
正常对照组	22	58.69±7.33	30.84±7.38	25.90±5.21	3.94±0.41	20.41±5.68	11.03±7.83	
SNS 组缓解	治疗前	28	56.31±6.42	26.08±6.66	29.16±6.91	2.73±1.12	26.41±7.64	5.59±3.89
	治疗后	28	57.16±7.02	28.53±5.97*	26.43±6.05*	3.25±1.01*	22.49±11.46*	10.46±3.93**
SNS 组未缓解	治疗前	3	56.10±6.14	26.33±6.59	28.54±5.72	2.81±1.02	26.16±6.93	5.71±4.17
	治疗后	3	57.95±6.89	26.76±6.25 Δ	27.92±5.98 Δ	2.93±0.97 Δ	24.57±6.28 Δ	6.24±3.37 $\Delta\Delta$
NNS 组缓解	治疗前	11	57.06±10.95	27.35±10.37	29.21±7.64	2.60±0.99	27.83±7.51	7.47±6.13
	治疗后	11	57.42±10.19	29.43±8.62*	26.61±8.52*	3.29±1.38**	22.12±6.39*	10.39±6.56**
NNS 组未缓解	治疗前	5	56.77±11.17	27.11±10.20	28.69±7.90	2.62±1.05	28.21±7.24	7.58±5.89
	治疗后	5	57.01±10.75	27.69±10.04 Δ	27.97±8.82 Δ	2.76±1.12 $\Delta\Delta$	26.91±6.82 $\Delta\Delta$	8.44±5.73 $\Delta\Delta$

* : $P<0.05$,** : $P<0.01$,与治疗前比较; Δ : $P<0.05$, $\Delta\Delta$: $P<0.01$,与正常对照组比较。

3 讨 论

3.1 各淋巴细胞亚群在 PNS 发病机制中的作用 PNS 是儿童常见的肾脏疾病之一,约占小儿时期肾病综合征总数的 90%^[6]。其发病可能与遗传、过敏性体质、免疫机制、炎性介质等因素有关,多数研究表明免疫功能紊乱在 PNS 发病中占主导地位^[7]。机体通过各淋巴细胞亚群间相互作用来维持免疫功能的稳定,根据淋巴细胞表型和功能的不同分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞等亚群。

T 细胞不产生抗体而直接发挥免疫作用,按其免疫效应功能分为辅助性 T 细胞(Th 细胞)、细胞毒性 T 细胞(CTL 细胞)和调节性 T 细胞(Treg 细胞)3 个亚群。Th 细胞是由 CD3⁺CD4⁺ T 细胞识别 MHC II 类分子提呈的外源性抗原肽活化后分化而来,包括 Th1、Th2 和 Th3 共 3 类细胞;Th1 分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF 等细胞因子,Th2 分泌细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 等,Th3 分泌 TGF- β 细胞因子;Th1 和 Th2 在细胞免疫和体液免疫中发挥作用,Th3 在免疫应答中起负调节作用^[8]。CTL 细胞是由 CD3⁺CD8⁺ T 细胞识别 MHC I 类分子提呈的内源性抗原肽活化后分化而来,包括 Tc1 和 Tc2 两类细胞,Tc1 和 Tc2 分泌的细胞因子分别与 Th1 和 Th2 相似^[8]。Treg 细胞可表达膜蛋白分子 CD4 和 CD25,CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞具有免疫抑制性,可抑制 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞及 B 细胞的活化和细胞因子的分泌,在机体免疫反应中起负调节作用^[9]。本研究表明,SNS 和 NNS 患儿外周血 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺ T 细胞比例低于健康儿童,而 CD3⁺CD8⁺ T 细胞比例高于健康儿童。

B 细胞是由淋巴样前体细胞分化成熟而来,可表达 MHC I 类、II 类抗原,其与 CD19、CD21 等膜蛋白分子非共价相联形成 B 细胞受体,增强对抗原刺激的敏感性;CD19 可在 B 细胞整个成熟过程中持续表达,其表达水平代表 B 细胞水平,而 CD21 仅在成熟 B 细胞表达,因此,将 CD19 作为分选 B 细胞的标记。研究发现,PNS 患儿外周血 B 细胞数明显高于正常儿童,应用 B 细胞单克隆抗体(利妥昔单抗等)可有效治疗^[10-11]。NK 细胞即自然杀伤细胞,可经 CD2、CD3 分子和细胞因子(IL-2、IFN- α 、TNF- α 、LR 等)等多种途径被活化而分泌细胞因子和发挥细胞毒作用,与机体抗感染、抗肿瘤以及免疫调节等密切相关。研究发现,IgAN 患儿中外周血 NK 细胞明显低于正常对照组^[12];慢性肾炎以及慢性肾功能衰竭患者体内的 NK 细胞活性明显低于健康人,且肾损害越重,NK 细胞活性下降越明显^[13]。本研究表明,SNS 和 NNS 患儿外周血 B 细胞比例高于健康儿童,而 NK 细胞比例低于健康儿童。

3.2 PNS 的治疗方法和效果 目前,PNS 治疗以糖皮质激素(GC)和细胞毒性药物为主,其中 GC 为治疗 PNS 的首选药物。GC 具有抗炎和免疫调节作用,可直接影响细胞免疫反应的抗原识别、免疫活化、细胞增殖、免疫效应等。研究表明,PNS 患儿对 GC 治疗的敏感性不同,GC 受体基因或蛋白质结构及其数量的异常是导致 GC 耐药的最可能机制之一^[15]。本研究发现,经 GC 治疗后 PNS 患儿敏感率为 82.98%,SNS 组敏感率为 90.32%,NNS 组敏感率为 68.75%。经 GC 治疗后,SNS 组和 NNS 组缓解患儿外周血 CD3⁺变化不明显,CD3⁺CD4⁺、

CD4⁺CD25⁺和 NK 细胞比例显著升高,CD3⁺CD8⁺和 B 细胞比例均明显下降,而未缓解患儿外周血各淋巴细胞亚群变化不明显。综上可知,CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺和 NK 细胞的下降以及 CD3⁺CD8⁺和 B 细胞升高可能参与了 PNS 的发病过程,GC 可通过改变各淋巴细胞亚群细胞比例而发挥治疗作用。

参考文献:

- [1] Imai E, Yokoyama H. Epidemiology of nephrotic syndrome [J]. Nihon Jinzo Gakkai shi, 2010, 52(7): 877-881.
- [2] Gordillo R, Spitzer A. The nephrotic syndrome [J]. Pediatr Rev, 2009, 30(3): 94-104.
- [3] 王晓玉, 李伟. 肾病综合征患者免疫功能紊乱研究进展 [J]. 临床医学, 2010, 23(19): 3714-3715.
- [4] Bertelli R, Bodria M, Nobile M, et al. Regulation of innate immunity by the nucleotide pathway in children with idiopathic nephrotic syndrome [J]. Clin Exp Immunol, 2011, 166(1): 55-63.
- [5] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(一): 激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(试行) [J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(3): 167-170.
- [6] Banaszak B, Banaszak P. The increasing incidence of initial steroid resistance in childhood nephrotic syndrome [J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27(6): 927-932.
- [7] 何文兵, 刘光陵. 原发性肾病综合征的免疫致病机制探讨 [J]. 中国全科医学, 2010, 13(30): 3461-3463.
- [8] 梁丽俊, 周娅, 陆彪. 儿童原发性肾病综合征激素治疗前后免疫学指标的变化及意义 [J]. 宁夏医科大学学报, 2009, 31(4): 441-443.
- [9] 杨玉京, 封其华. 原发性肾病综合征患儿 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的变化及临床意义 [J]. 江苏医药, 2010, 36(10): 1127-1129.
- [10] Kamei K, Ito S, Nozu K, et al. Single dose of rituximab for refractory steroid-dependent nephrotic syndrome in children [J]. Pediatr Nephrol, 2009, 24(7): 1321-1328.
- [11] 孟磊, 任榕娜, 余自华. 利妥昔单抗治疗儿童原发性肾病综合征研究进展 [J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(5): 375-378.
- [12] Kim JK, Kim JH, Lee SC, et al. Clinical features and outcomes of IgA nephropathy with nephrotic syndrome [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2012, 7(3): 427-436.
- [13] 王勤, 闵月, 李晓忠, 等. 过敏性紫癜患儿淋巴细胞亚群的变化及意义 [J]. 江苏医药, 2012, 38(2): 156-157.
- [14] Ulinski T, Aoun B. New treatment strategies in idiopathic nephrotic syndrome [J]. Minerva Pediatr, 2012, 64(2): 135-143.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-02-17)