

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2018.07.001

论著·临床研究

抽动障碍儿童 Th 淋巴细胞及其亚群的变化

侯晓君 林珊 林祥泉 黄林娟 黄巧燕

(福建省福州儿童医院神经内科, 福建 福州 350005)

[摘要] **目的** 探讨抽动障碍(TD)儿童T辅助(Th)淋巴细胞及其亚群表达变化的临床意义。**方法** 采用流式细胞技术检测TD组和对照组(健康儿童)外周血中Th淋巴细胞及其亚群的表达水平。**结果** 与对照组比较,TD组Th淋巴细胞的百分比明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$);Th淋巴细胞的异常率为68.7%,比对照组(18.8%)增高($P<0.001$);而且Th淋巴细胞百分比和耶鲁综合抽动严重程度评分呈负相关($r=-0.3945$, $P<0.001$)。在Th淋巴细胞亚群中,TD组Th1淋巴细胞百分比明显高于对照组,而Th2淋巴细胞百分比明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.001$)。**结论** Th淋巴细胞及其亚群的平衡失调导致的细胞免疫功能异常可能与儿童TD的发生相关,且Th淋巴细胞水平可作为评估TD严重程度的指标。

[中国当代儿科杂志, 2018, 20(7): 519-523]

[关键词] 抽动障碍; T辅助淋巴细胞; 儿童

Changes in T helper lymphocytes and their subsets in children with tic disorders

HOU Xiao-Jun, LIN Shan, LIN Xiang-Quan, HUANG Lin-Juan, HUANG Qiao-Yan. Department of Neurology, Fuzhou Children's Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350005, China (Email: houxiaojun111@189.cn)

Abstract: Objective To explore the changes in T helper lymphocytes and their subsets in children with tic disorders (TD) and their clinical significance. **Methods** Flow cytometry was used to measure the percentages of T helper lymphocytes and their subsets in the peripheral blood of children with TD and healthy children (controls). **Results** The percentage of T helper lymphocytes was significantly lower in the TD group than in the control group ($P<0.001$). The abnormal rate of T helper lymphocytes in the TD group was significantly higher than that in the control group (68.7% vs 18.8%; $P<0.001$). The percentage of T helper lymphocytes was negatively correlated with Yale Global Tic Severity Scale score ($r=-0.3945$, $P<0.001$). As for the subsets of T helper lymphocytes, the TD group had a significantly higher percentage of Th1 cells and a significantly lower percentage of Th2 cells compared with the control group ($P<0.001$). **Conclusions** The abnormality of T helper lymphocytes and the imbalance of their subsets may be associated with the pathogenesis of TD in children. The percentage of T helper lymphocytes can be used as an indicator for assessing the severity of TD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(7): 519-523]

Key words: Tic disorder; T helper lymphocyte; Child

抽动障碍(tic disorders, TD)是以运动抽动和/或发声抽动为特征的神经精神障碍,可累及全身不同部位的肌肉,具有不自主、快速、频繁发作等特点。TD临床症状多变,容易反复,且治疗效果欠佳,对患儿的学习、生活和社交能力造成严重不良影响,也给家长带来沉重的心理负担。目

前TD的病因和发病机制尚不明确,一般认为是遗传与环境因素共同作用,导致中枢神经系统递质失衡的结果^[1]。近年来TD的患病率呈明显上升的趋势,可能和外界过敏原刺激以及病原微生物感染后引起体内免疫功能的异常息息相关。研究表明多种病毒的感染可能与TD的发病有一定关系,

[收稿日期] 2018-03-03; [接受日期] 2018-04-16

[基金项目] 福州市科技计划项目社会发展项目(2016-S-128)。

[作者简介] 侯晓君,男,博士,副主任医师。

这些病原体感染机体后, 会使T淋巴细胞亚群中的T辅助(Th)和T抑制(Ts)淋巴细胞发生平衡失调, 导致细胞免疫功能紊乱^[2]。本研究拟进一步探讨Th淋巴细胞及其亚群的表达变化在TD中的临床意义, 分析其与反映TD症状分级的耶鲁综合抽动严重程度评分(Yale Global Tic Severity Scale, YGTSS)^[3]之间的相关性, 旨在为TD病情的评估提供客观的依据, 并发展可能有价值的干预手段。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2016年1月至2017年8月在我科治疗的TD患儿和同时期在我院儿童保健门诊体检的健康儿童作为研究对象。纳入TD患儿150例, 其中男127例(84.7%), 女23例(15.3%); 年龄 7.5 ± 2.2 岁。TD患儿入组条件: (1)符合美国精神疾病诊断统计手册第4版中TD的诊断标准^[4]; (2)为初诊TD患儿, 未使用治疗药物。对患儿最近1周出现的抽动症状, 按照YGTSS评分法进行评分^[3]。轻度<25分, 中度25~50分, 重度>50分。正常对照组共纳入健康体检儿童80例, 其中男67例(83.8%), 女13例(16.2%); 年龄 7.6 ± 1.9 岁。对照组入组条件: (1)排除TD及其他神经系统疾病; (2)无感染性、慢性以及恶性疾病等; (3)近期末使用过任何药物。两组儿童年龄、性别比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究通过我院伦理委员会审核批准, 并获得监护人知情同意。

1.2 试剂与仪器

采用美国BD公司的淋巴细胞亚群检测试剂。荧光标记的单克隆抗体: CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC、CD3-PerCP/CD8-FITC/IFN- γ -APC/IL-4-PE; 相应的同型对照; 配套的溶血剂(FACS lysing solution)、穿孔素(FACS permeablizing solution); 刺激剂: 佛波醇酯类(PMA)和离子霉素; 蛋白转运抑制剂(BFA); RPMI1640培养液; 乙二胺四乙酸(EDTA)、二甲基亚砷(DMSO)和磷酸盐缓冲溶液(PBS)。检测仪器为美国BD公司的FACSCalibur流式细胞仪。

1.3 标本采集

清晨空腹抽取TD患儿和健康对照组4 mL静脉血, 其中2 mL用肝素钠抗凝进行Th淋巴细胞及其亚群检测; 另外2 mL用于总IgE和抗链球菌溶血素“O”(ASO)检测, 并保存少量血清于冻存管中, 放置在-80℃冰箱备检 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)的含量。

1.4 T淋巴细胞亚群检测

用流式细胞仪专用试管分别加入20 μ L的MultiTEST荧光单抗和50 μ L的抗凝全血, 混匀后室温避光放置15 min, 加入450 μ L的溶血素, 混匀放置15 min, 上机检测。应用MultiSet软件分析获得T淋巴细胞亚群CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺的百分率和CD4⁺/CD8⁺比值, 其中CD3⁺细胞代表总T淋巴细胞, CD3⁺CD4⁺细胞代表Th淋巴细胞, CD3⁺CD8⁺细胞代表Ts淋巴细胞。

1.5 Th淋巴细胞亚群的检测

从两组标本中随机各抽取40例进行Th淋巴细胞亚群的检测。取200 μ L肝素钠抗凝全血加入等体积的RPMI1640, 然后加入20 μ L的50 ng/mL的PMA和8 μ L的1 μ g/mL的离子霉素以及8 μ L的BFA, 37℃水浴箱中孵育5 h后, 收集细胞。未刺激样本同上处理, 但不加PMA和离子霉素刺激。标记4支上样管, 分别为刺激、未刺激样本管和刺激、未刺激对照管, 加入CD3-PerCP和CD8-FITC各20 μ L, 混匀, 室温避光孵育20 min; 然后加入1 mL溶血剂10 min, 洗涤, 2000 rpm离心5 min, 弃上清; 加入500 μ L穿孔素10 min, 洗涤, 2000 rpm离心5 min, 弃上清。样本管加入5 μ L的IFN- γ -APC和20 μ L的IL-4-PE; 对照管加入相应的同型抗体, 室温避光孵育30 min, 洗涤, 2000 rpm离心5 min, 弃上清; 加入300 μ L的PBS重悬细胞, 上机检测。以前向角(FSC)和侧向角(SSC)散射光散点图设门区分淋巴细胞, 以CD3和CD8散点图设门区分Th细胞(CD3⁺CD8⁻), 最终以IFN- γ 和IL-4的散点图表示Th1淋巴细胞和Th2淋巴细胞。应用CellQUEST Pro软件分析结果。

1.6 血清中IFN- γ 和IL-4的测定

以上Th淋巴细胞亚群的区分是通过流式细胞仪检测活细胞经刺激后表达的IFN- γ 和IL-4。本研究亦采用ELISA法测定Th淋巴细胞分泌至血清中

的 IFN- γ 和 IL-4 含量。试剂盒购自武汉华美生物工程公司，检验程序严格按照说明书进行。为确保检测结果的稳定性和可比性，所有标本所用的试剂均为同一批次，并同时检测。

1.7 统计学分析

数据应用 SPSS 10.0 软件进行分析处理，计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用成组 t 检验；计数资料以率 (%) 表示，组间比较采用 χ^2 检验；两变量之间的相关性分析采用 Pearson 相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TD 患儿 T 淋巴细胞亚群的变化

TD 组 CD3⁺ 细胞即总 T 淋巴细胞的百分比低

于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺CD4⁺ 细胞即 Th 淋巴细胞的百分比低于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.001$)；CD3⁺CD8⁺ 细胞即 Ts 淋巴细胞的百分比高于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.001$)；Th/Ts 比值明显降低，差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 1 和图 1。

表 1 两组 T 淋巴细胞亚群的测定结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	总 T 淋巴细胞	Th 淋巴细胞	Ts 淋巴细胞	Th/Ts 比值
对照组	80	68 \pm 7	36 \pm 6	26 \pm 5	1.4 \pm 0.4
TD 组	150	66 \pm 7	29 \pm 6	30 \pm 6	1.0 \pm 0.4
t 值		2.06	8.59	4.82	7.66
P 值		0.04	<0.001	<0.001	<0.001

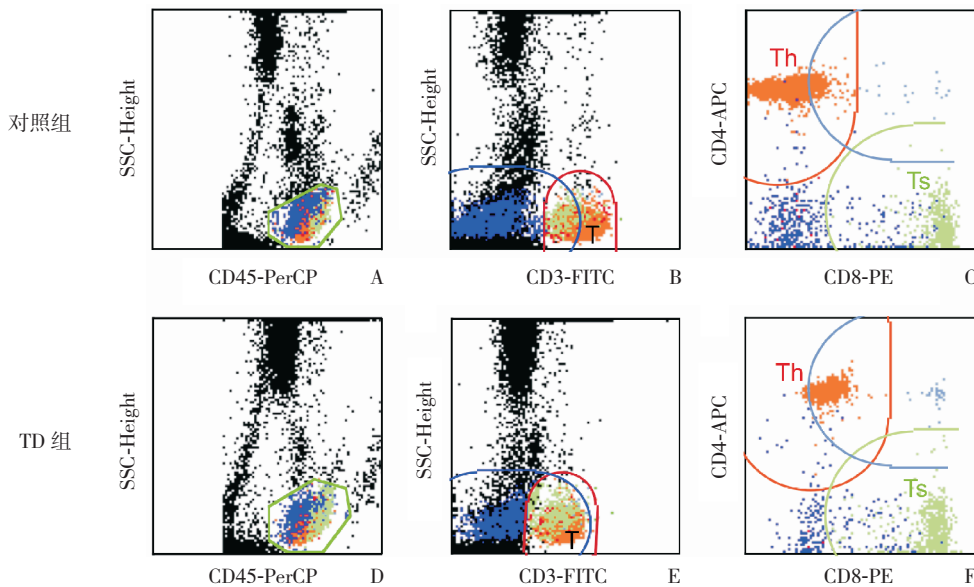


图 1 两组 T 淋巴细胞亚群的比较 A、D 表示 CD45⁺ 淋巴细胞的表达，见绿色线条圈起部分。B、E 表示 CD45⁺CD3⁺ 细胞的表达，代表的是总 T 淋巴细胞，见红色线条圈起部分，显示 TD 组总 T 淋巴细胞的百分比低于对照组。C、F 中 CD45⁺CD3⁺ CD4⁺ 细胞代表的是 Th 淋巴细胞，见红色线条圈起部分，显示 TD 组 Th 淋巴细胞的百分比低于对照组；CD45⁺CD3⁺CD8⁺ 细胞代表的是 Ts 淋巴细胞，见绿色线条圈起部分，显示 Ts 淋巴细胞的百分比高于对照组。

2.2 TD 患儿总 IgE、ASO 以及 T 淋巴细胞亚群的异常率

依据我院相关实验室检测的正常参考值 (总 IgE: 0~87 IU/mL; ASO: 0~200 IU/mL; 总 T 淋巴细胞: 55%~84%; Th: 31%~60%; Ts: 13%~41%)，TD 患儿血清中总 IgE 值的异常率

比对照组增高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，ASO 值异常率也较对照组升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TD 组 T 淋巴细胞亚群中 Th 淋巴细胞的异常率高于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.001$)；而总 T 淋巴细胞和 Ts 淋巴细胞的异常率两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表2 两组总 IgE、ASO 以及 T 淋巴细胞亚群的异常率 [n (%)]

组别	例数	总 IgE	ASO	Th 淋巴 细胞	总 T 淋 巴细胞	Ts 淋巴 细胞
对照组	80	15(18.8)	5(6.2)	13(16.2)	1(1.2)	5(6.2)
TD 组	150	59(39.3)	23(15.3)	103(68.7)	8(5.3)	11(7.3)
χ^2 值		10.13	4.03	>10.83	2.31	0.09
P 值		0.001	0.04	<0.001	0.13	0.76

2.3 TD 患儿 T 淋巴细胞亚群水平和 YGTSS 评分的关系

相关性分析显示，TD 患儿 T 淋巴细胞亚群中 Th 淋巴细胞水平越低，YGTSS 分数越高，即抽

动症状越严重，两者呈负相关关系 ($r=-0.3945$, $P<0.001$)；而 Ts 淋巴细胞的水平和 YGTSS 评分无明显相关性 ($r=0.1208$, $P>0.05$)。

2.4 两组儿童 Th 淋巴细胞亚群的比较

流式细胞仪检测两组儿童 Th 淋巴细胞亚群的结果显示：TD 组 Th1 淋巴细胞百分比明显高于对照组，Th2 淋巴细胞百分比较对照组明显降低，差异均有统计学意义 ($P<0.001$)，见图 2 和表 3。ELISA 方法测定血清中的 IFN- γ 和 IL-4 含量显示：与对照组相比，TD 组 Th1 淋巴细胞分泌的 IFN- γ 浓度有所上升，Th2 淋巴细胞分泌的 IL-4 浓度有所下降，但两组间二者比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见表 3。

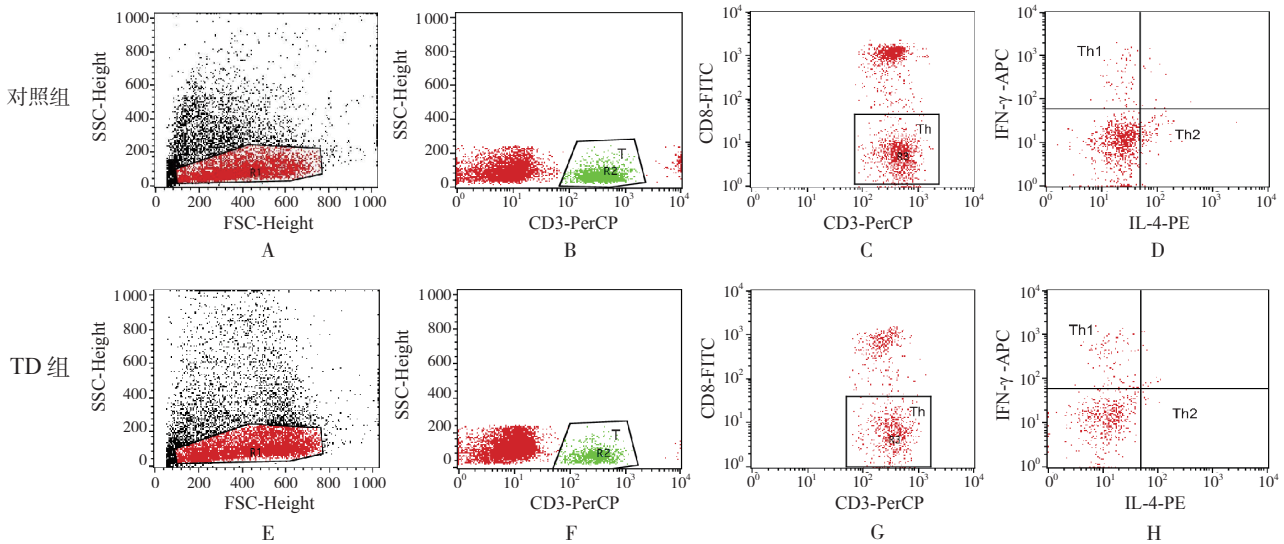


图2 两组 Th 淋巴细胞亚群的比较 A、E 中 R1 区表示淋巴细胞；B、F 中 R2 区表示 CD3⁺ 细胞，代表的是总 T 淋巴细胞；C、G 中 R3 区表示 CD3⁺CD8⁻ 细胞，代表的是 Th 淋巴细胞；D、H 中 IFN- γ ⁺ 代表的是 Th1 淋巴细胞，IL-4⁺ 代表的是 Th2 淋巴细胞，显示 TD 组 Th1 淋巴细胞的百分比高于对照组，而 Th2 淋巴细胞的百分比低于对照组。

表3 两组 Th 淋巴细胞亚群的测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	流式细胞仪检测 (%)		ELISA 检测 (pg/mL)	
		Th1	Th2	IFN- γ	IL-4
对照组	40	8.2 \pm 2.5	2.4 \pm 1.4	4.7 \pm 2.0	4.3 \pm 1.9
TD 组	40	17.8 \pm 6.4	1.2 \pm 0.7	5.1 \pm 2.6	4.0 \pm 2.2
t 值		8.77	4.83	0.77	0.68
P 值		<0.001	<0.001	0.44	0.50

3 讨论

近年发现 TD 病例有明显增加的趋势，其确切病因仍不清楚，可能与遗传、神经递质失衡以及

心理和环境等多因素有关^[5-7]。TD 患儿在过敏季节或病原体感染后，经常出现症状加重或复发的现象，提示免疫功能的异常可能与 TD 的发生密切相关。国内外均有报道 TD 患儿存在免疫应答的过度活跃以及免疫功能紊乱的情况^[8-10]。本研究发现，在 TD 患儿中，总 T 淋巴细胞较对照组降低，说明 TD 患儿存在细胞免疫功能的异常。而在 T 淋巴细胞亚群中，TD 患儿 Th 细胞明显减少、Ts 细胞明显增加，因此 Th/Ts 比值显著下降，说明 TD 患儿细胞免疫功能的异常主要表现为 T 淋巴细胞亚群的平衡失调。本研究中 TD 患儿 Th 水平和 Th/Ts 比值显著降低与既往文献报道一致^[11-12]，显示出 Th

淋巴细胞表达低下在TD中的重要作用。本研究还根据我院相关实验室指标检测的正常参考值范围,比较了TD患儿血总IgE、ASO以及T淋巴细胞亚群的异常率,结果显示血清总IgE和ASO的异常率均有升高,尤其是IgE水平,说明过敏和感染等环境因素对TD发病率的增加有明显作用;更为重要的是,Th淋巴细胞的异常率在TD组中明显增加,而总T淋巴细胞和Ts淋巴细胞的异常率按照我院的正常参考值标准却未发现明显变化。这些结果提示过敏或感染等各种病因可能是通过影响机体Th淋巴细胞的功能,参与神经免疫的过程,最终导致TD的发生。

目前广泛应用于临床的YGTSS是美国耶鲁大学研制的评估抽动症状的量表,该量表从多个维度反映了TD的严重程度,包括抽动症状的各个方面:数量、频率、强度、复杂性、干扰程度以及总体缺损率,分级准确。然而该量表只是经诊医师通过家长对抽动表现的主观观察和描述来进行量化评估,临床上缺乏实验室的判断TD严重程度的客观依据。因此本研究分析了Th淋巴细胞水平和YGTSS评分的相关性,发现Th淋巴细胞百分比与YGTSS总分呈负相关,即Th淋巴细胞水平越低,临床上YGTSS评分越高,抽动症状越严重;而Ts淋巴细胞的水平和YGTSS分值无明显相关性。这些结果表明Th淋巴细胞水平可作为反映TD患儿病情严重程度的一个良好客观指标。

本研究进一步分析了TD患儿Th淋巴细胞亚群的变化。Th淋巴细胞可以分为Th1和Th2两种亚群的细胞,它们通过分泌各自不同的细胞因子相互调节并处于相对平衡的状态以维持机体正常的免疫功能。当上述平衡被打破时,可引起异常的免疫应答^[13]。Th1细胞主要分泌IFN- γ ,参与细胞免疫;Th2细胞的功能主要是辅助B淋巴细胞产生抗体,参与体液免疫,以分泌IL-4为特征。本研究采用流式细胞仪检测Th淋巴细胞亚群,结果显示:在病例组,Th1细胞增多,Th2细胞减少,提示TD儿童中存在的免疫异常可能以细胞免疫为主。这种Th1和Th2的比例失调会导致过度的免疫应答,促进非特异性炎症的发生,使神经组织受损,从而在该疾病的发展过程中起重要作用。本研究也应用ELISA法测定血清中IFN- γ 和IL-4的浓度,结果与流式细胞仪检测相符:TD组IFN- γ 浓度有所上升,IL-4浓度有所下降,但两组

间二者比较差异无统计学意义,可能和Th淋巴细胞未经刺激,外分泌细胞因子量甚微有关。由于ELISA法较为简便,今后可以尝试先激活Th淋巴细胞,再对其分泌的这些细胞因子进行检测。

综上所述,Th淋巴细胞及其亚群的平衡失调导致的细胞免疫异常可能与儿童TD的发病关系密切;而且Th淋巴细胞水平可作为评估TD严重程度的客观检验指标。因此,临床上有望通过调节TD患儿Th淋巴细胞及其亚群的功能,以达到治疗该疾病的良好效果。

[参 考 文 献]

- [1] 石森. 抽动障碍的发病机制及治疗[J]. 国际精神病学杂志, 2014, 41(3): 164-167.
- [2] 陈江鱼, 赵宏伊, 李杰, 等. 儿童抽动障碍与病原微生物感染及其免疫的相关性[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(19): 1536-1537.
- [3] Leckman JF, Riddle MA, Hardin MT, et al. The Yale Global Tic Severity Scale: initial testing of a clinician-rated of tic severity[J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 1989, 28(4): 566-573.
- [4] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV)[M]. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994: 100-105.
- [5] Georgitsi M, Willsey AJ, Mathews CA, et al. The genetic etiology of Tourette syndrome: large-scale collaborative efforts on the precipice of discovery[J]. Front Neurosci, 2016, 10: 351.
- [6] Moya PR, Wendland JR, Rubenstein LM, et al. Common and rare alleles of the serotonin transporter gene, SLC6A4, associated with Tourette's disorder[J]. Mov Disord, 2013, 28(9): 1263-1270.
- [7] 张燕, 邱秀娟. 儿童抽动症病因及治疗研究进展[J]. 山东医药, 2015, 55(42): 103-105.
- [8] 冯雪英, 衣明纪, 侯建文. 抽动障碍儿童免疫状况及预防接种问题[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(1): 62-64.
- [9] Martino D, Zis P, Buttiglione M. The role of immune mechanisms in Tourette syndrome[J]. Brain Res, 2015, 1617: 126-143.
- [10] Spinello C, Laviola G, Macri S. Pediatric autoimmune disorders associated with streptococcal infections and Tourette's syndrome in preclinical studies[J]. Front Neurosci, 2016, 10: 310.
- [11] 刘张, 季金萍, 陈虹, 等. Tourette综合征儿童T淋巴细胞亚群与情绪的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(27): 101-105.
- [12] 程德君, 张桂艳, 王娟, 等. 儿童抽动障碍患儿病毒与细菌感染血清中IL-6和TNF- α 水平变化的分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(17): 4070-4072.
- [13] 汤璐敏, 车妙琳, 杨海芸, 等. 尿路感染患者Th细胞亚群的变化和临床意义[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2017, 14(1): 37-39.

(本文编辑: 邓芳明)