

儿童复发性呼吸道乳头状瘤患儿 T 细胞亚群的变化研究

匡玉婷 赵斯君 沈 平

【摘要】 目的 分析儿童复发性呼吸道乳头状瘤病(Jo-RRP)患儿外周血 T 细胞亚群的变化并探讨其临床意义。**方法** 40 例 Jo-RRP 患儿为病例组,选择同期体检的 20 例儿童做健康对照组,采用流式细胞仪对 Jo-RRP 病例组、健康对照组外周血 T 细胞亚群进行检测,并分析患儿 T 细胞亚群的变化与疾病进程的相关性。**结果** Jo-RRP 病例组 CD_3^+ T、 CD_4^+ T 细胞百分率及 CD_4^+/CD_8^+ 比值较健康对照组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Jo-RRP 患儿存在 T 细胞介导的免疫功能障碍,免疫功能降低在 Jo-RRP 的进程中起重要的作用。

【关键词】 呼吸系统; 乳头状瘤; T 淋巴细胞亚群; 儿童

Changes of T lymphocytes Subsets in peripheral blood of children with juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis. KUANG Yu-ting, ZHAO Si-jun, SHEN Ping. Department of Otorhinolaryngologic, Children's Hospital of Hu Nan Province, Changsha 410007, China

【Abstract】 Objective To investigate the Changes of T lymphocytes Subsets in Peripheral Blood of children with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (Jo-RRP) and discuss the clinical significance. **Methods** forty patients of Jo-RRP counted as group A. Twenty healthy children who had physical examination during the same period were enrolled as the control group B. Flow cytometric analysis was employed to study T lymphocytes Subsets in Peripheral Blood of 40 children with Jo-RRP and 20 health control group. **Results** The percentage of CD_3^+ T、 CD_4^+ T lymphocytes subsets and the ratio of CD_4^+/CD_8^+ of the Jo-RRP children (group A) were significantly lower than the healthy children (group B, $P < 0.05$). **Conclusion** T lymphocytes Subsets mediate the cellular immune function is depressed in children with Jo - RRP. Decrease of immunity function play important roles during the progress of Jo-RRP.

【Key words】 Respiratory System; Papilloma; T-Lymphocyte Subsets; Child

复发性呼吸道乳头状瘤病(recurrent respiratory papillomatosis RRP)是由人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)6型和11型感染的侵及喉部的一种良性上皮肿瘤。此二型 HPV 病毒即生殖器尖锐湿疣的重要致病因子,母婴垂直传播为重要的传播方式。因其具有高度的复发性,常累及喉部,侵犯呼吸道、消化道等其他器官,且伴有气道外生性生长,易引起气道梗阻,故临床治疗很棘手^[1-3]。每一个儿童复发性呼吸道乳头状瘤病(juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis Jo-RRP)患儿的一生中需要接受多次手术治疗,给患儿及其家庭带来沉重的经济及心理负担。所以我们在不断研究新的手

术方式的同时更加需要关注如何有效的预防和延缓该疾病的进程。近年来,对 Jo-RRP 的患儿是否存在免疫功能障碍存在着一定的争议。本文研究 Jo-RRP 患儿外周血 T 淋巴细胞亚群的变化,评估 Jo-RRP 患儿的免疫功能,并探讨 Jo-RRP 患儿的免疫功能与疾病进程的相关性,希望为 Jo-RRP 的免疫治疗提供相关的理论依据。

材料和方法

一、临床资料

将 2012 年 3 月至 2013 年 3 月在我科就诊的 40 例 Jo-RRP 患儿作为病例组,并以同期体检的 20 例儿童作为健康对照组。40 例患儿中男 22 例,女 18 例,年龄(2.9 ± 1.86),健康对照组男 11 例,女 9 例,年龄(3.1 ± 1.25)岁,两组患儿在年龄及性别上差

异无统计学意义,具有可比性。Jo-RRP 病例组中,初次手术患儿 7 例,普通复发患儿 18 例(发病周期在 6 个月以上),频繁复发患儿 15 例(每年发作 >4 次);气管切开患儿 1 例,病变向下气道侵袭患儿 14 例。

二、病例选择标准

1. 病例组纳入标准:①符合喉乳头状瘤的诊断标准。诊断依据和标准:渐进性声嘶、喉鸣、呼吸困难三联征,电子喉内镜检查病变部位乳头状新生物^[4];②有完整的临床资料。排除标准:①患儿有其他的免疫系统的疾病;②术前应用过免疫性制剂;③术前 6 个月内使用过激素、血液制品等影响免疫功能的药物;④无完整的临床资料。

2. 健康对照组纳入标准:①同期,未患喉乳头状瘤的患儿;②有完整的调查资料。排除标准:①患有其他免疫系统的疾病(其他免疫系统的疾病也可引起 T 细胞亚群的异常,使分析结果产生偏差);②抽血前 6 个月使用过激素、血清制剂、免疫制剂等影响免疫功能的药物;③无完整的调查资料。

三、研究方法

(一)仪器和试剂

1. 试剂:红细胞膜通透液、CD₃⁺T 细胞抗体、CD₄⁺T 细胞抗体、CD₄⁺T 细胞抗体、CD₈⁺T 细胞抗体由美国 BECTON DICKINSON(BD)公司提供。

2. 仪器:流式细胞仪为美国 BECKMAN - COULTER 公司产品,型号为 EPICSALTRAHyperSort

TM。分析系统软件为 EXPO32 系统。

(二)方法

①40 例 JLP 患者住院时抽血化验 T 淋巴细胞亚群,20 例体检儿童在门诊抽血化验 T 淋巴细胞亚群。②T 淋巴细胞亚群的检测:取外周血 2 mL,EDTA 抗凝,分别加入 20 μL CD₃⁺T 细胞抗体、CD₄⁺T 细胞抗体、CD₄⁺T 细胞抗体、CD₈⁺T 细胞抗体,摇匀后室温避光孵育 20 min,加入 1 mL 红细胞裂解液,PBS 洗涤 2 次,分别加入 0.5 mL 的缓释液。用流式细胞仪进行淋巴细胞亚群的测定,分析计算 CD₃⁺T、CD₄⁺T、CD₈⁺T 细胞的数值。

四、统计学处理

将原始资料导入 Excel 文档,对录入资料经人核对后,将整理好的 Excel 数据库导入 SPSS13.0 的软件包。采用 SPSS13.0 的统计软件进行统计学分析,计数资料采用卡方检验,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本间采用 *t* 检验。

结 果

Jo-RRP 病例组与健康对照组 T 细胞亚群的比较:Jo-RRP 病例组 CD₃⁺T、CD₄⁺T 细胞及 CD₄⁺/CD₈⁺ 比值较健康对照组降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05);JLP 病例组 CD₈⁺T 细胞与健康对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 Jo-RRP 病例组与健康对照组 T 细胞亚群的比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Compare the changes of T lymphocytes subsets between two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	CD ₃ ⁺ T (%)	CD ₄ ⁺ T (%)	CD ₈ ⁺ T (%)	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺ 比值
Jo-RRP 病例组(40)	62.6 ± 4.1	31.8 ± 4.0	24.8 ± 2.4	1.18 ± 0.26
健康对照组(20)	69.3 ± 3.2	38.7 ± 3.4	25.1 ± 2.8	1.52 ± 0.41
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

讨 论

儿童复发性呼吸道乳头状瘤具有高度复发性、侵袭性和自限性的特点,且因肿瘤的大小及数量,可引起致命性的喉梗阻,常需多次外科手术治疗。HPV 可以作为一个潜在感染潜伏于上皮细胞而不使上皮细胞转化为瘤。在机体生理功能发生某种变化时,HPV 可被激活而诱发乳头状瘤。研究认为这主要与宿主的免疫状态有关^[5]。有关疾病发展过程和严重程度的相关因素研究显示,2 岁以下患儿

疾病的复发率和侵袭性较强,而随着年龄的增加,患儿复发次数减少,有的甚至可自愈,说明该病的发展进程同样与患儿机体免疫力有关。目前,HPV 感染的具体免疫机制尚未完全清楚,但早在 1988 年,Kousy 等就提出喉乳头状瘤以细胞免疫为主,病毒和免疫系统间的作用发生于上皮内,通过宿主的第一道防线巨噬细胞处理并传递病毒抗原,同时激活了 T 细胞发挥效应。目前通过许多临床表现及实验室数据也发现,在 HPV 感染患者的免疫系统中,细胞免疫所起的作用比体液免疫所起的作用更为重要^[6,7]。T 淋巴细胞不仅是细胞免疫的效应细胞,而

且还是重要的免疫调节细胞,其中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞对机体的细胞免疫及体液免疫功能均发挥着重要的作用。在正常生理中各 T 细胞亚群相互作用,维持着机体的正常免疫功能,但当 T 淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时,机体就可能导致免疫紊乱并发生疾病,这可能也是乳头状瘤复发的原因之一^[8,9]。Palefsky^[10]对尖锐湿疣及生殖器疱疹患者的免疫状态研究中发现,病毒免疫应答的过程中存在这 T 细胞介导的细胞因子作用失衡的现象。Cameron^[11]对研究发现 Th 细胞的免疫反应模式及激活的杀伤细胞反应与 HPV 的清除密切相关。王军^[12]等研究分析了复发性呼吸道乳头状瘤患者(RRP)的相关免疫基因谱,结果显示 RRP 患者与免疫应答过程相关的多个基因表达异常,提出 HPV 逃逸机体免疫监视是 HPV 感染机体的重要因素。崔彦儒^[13]等对 19 例儿童复发性呼吸道乳头状瘤患儿进行外周血 T 淋巴细胞检测,结果发现患儿 CD_3^+ 、 CD_4^+ T 细胞及 CD_4^+/CD_8^+ T 细胞比值以及 Th1/Th2 均低于正常儿童($P < 0.05$),进一步证实了喉乳头状瘤患者存在 T 细胞介导的免疫功能障碍,紊乱的免疫功能与病程存在着相互促进的关系。陈波蓓^[14]等对 20 例 JLP 患儿进行体液免疫检查结果均正常,而细胞免疫水平比正常儿童明显下降,患病时与痊愈后亦有明显差异。本研究结果与上述结论一致,提示 JLP 患者存在 T 淋巴细胞亚群的失衡,导致不同程度的免疫抑制。喉乳头状瘤患儿 CD_4^+ T 细胞比值的下降可影响细胞毒性淋巴细胞的功能,导致细胞毒作用增加,对正常的组织起破坏作用,而 CD_4^+/CD_8^+ 比值的下降可增加机体对各种致病因子的易感性,导致了肿瘤的复发。

综上所述,Jo - RRP 患儿存在 CD_3^+ 、 CD_4^+ T 细胞及 CD_4^+/CD_8^+ 比值降低的细胞免疫失衡的免疫功能缺陷,而这种免疫功能失衡影响着乳头状瘤的发生、发展及自愈,这为 Jo - RRP 患者的免疫治疗提供了一定的理论依据。免疫治疗近年来也成为防治乳头状瘤病毒感染的热点,四价的 HPV 疫苗已应用于临床并取得一定的成效,该疫苗已被证明是安全的、具有高度免疫原性的疫苗^[15-16]。而 HPV 疫苗的研制应用的原理之一即是 T 细胞的免疫功能,故充分了解 Jo - RRP 患儿 T 细胞的免疫功能机制及特点对于疫苗的研发有着极其重要的作用。

参 考 文 献

1 Lopezamado M, Garciacaballero T, Lozanoramirez A, et al.

- The detection of human papillomavirus in papillomas of the larynx and tonsils through immunohistochemistry and DNA in situ hybridization [J]. *Ann Otorhinolaryngol Ibero Am*, 1997, 24: 269-280.
- 2 Andrus JG, Shapshay SM. Contemporary management of laryngeal papilloma in adults and children [J]. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006, 39: 135-158.
- 3 周星星, 张溪英, 屈双权, 等. 支撑喉镜下小儿喉乳头状瘤手术的麻醉体会 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2007, Vol. 6, No. 1: 74, 78.
- 4 张亚梅, 张天宇. 实用小儿耳鼻咽喉科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011. 402-403.
- 5 Carvalho C M, Huot L, Charlois A L, et al. Prognostic factors of recurrent respiratory papillomatosis from registry of 72 patients [J]. *Acta Otolaryngol*, 2009, 129 (4): 462-470.
- 6 Syrjanen K. Mechanisms and predictors of high-risk human papillomavirus (HPV) clearance in the uterine cervix [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2007, 28: 337-351.
- 7 Eddie A. James, James A. DeVoti. Papillomavirus - specific CD_4^+ T cells exhibit reduced STAT - 5 signaling and altered cytokine in patients with recurrent respiratory papillomatosis [M]. *J Immunol*, 2011, 186: 6633-6640.
- 8 渠晓丽, 王军. 影响幼年型复发性呼吸道乳头状瘤病程因素 [J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 34 (6): 359-361.
- 9 邹耘, 陈兴平, 涂亚庭. 尖锐湿疣患者外周血 TH1/TH2 细胞因子及局部 NK 细胞的变化 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2009, 38 (1): 68-71.
- 10 Palefsky J. Biology of HPV in HIV infection [J]. *Adv Dent Res*, 2006, 19: 99-105.
- 11 Cameron JE, Hagensee ME. Human Papillomavirus infection and disease in the HIV individual [J]. *Cancer Treat Res*, 2007, 133: 185-213.
- 12 王军, 马丽晶, 叶京英. 复发性呼吸道乳头状瘤病的免疫逃逸机制 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, Vol. 16, No. 6: 331-333.
- 13 崔彦儒, 王军, 王阳, 等. 幼年型复发性呼吸道乳头状瘤病患儿外周血 T 细胞初探 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 15 (11): 649-652.
- 14 陈波蓓, 包其郁, 王宗敏, 等. 小儿喉乳头状瘤 HPV-DNA 及体液免疫检测 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2000, 14 (6): 262-264.
- 15 赵斯君, 李赞, 彭湘粤, 等. 综合疗法治疗复发性儿童喉乳头状瘤 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2012, 11 (5): 338-339.
- 16 Pawlita M, Gissmann L. Recurrent respiratory papillomatosis: indication for HPV vaccination [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2009, 134 (Suppl 2): S100-S102.