

文章编号:1007-4287(2023)01-0033-04

T 细胞亚群中 Ki-67 的表达及与自闭症儿童肠道菌群结构、核心症状的关联及价值研究

杨锦容¹, 苏雅丹², 朱竞繁³, 巫清鹏^{4*}

(1. 惠州市中心人民医院 儿科, 广东 惠州 516000; 2. 惠州市第六人民医院 儿科, 广东 惠州 516211;
3. 惠州市第六人民医院 神经内科, 广东 惠州 516200; 4. 广东省河源市妇幼保健院 发育行为专科, 广东 河源 517300)

摘要:目的 分析自闭症儿童 T 细胞亚群中 Ki-67 的表达及与肠道菌群结构、核心症状的关联及价值研究。方法 选取惠州市中心人民医院 2020 年 4 月-2021 年 4 月收治的 50 例自闭症儿童为研究对象, 作为研究组, 另外选取来院体检的 50 例典型发育儿童作为对照组, 检测 T 细胞表面受体细胞、CXCR4、CXCR7 细胞、CD45R、HLA-DR、GATA3、Helios、FOXP3 中 Ki-67 表达水平、肠道菌群 α 多样性、肠道菌群门水平、ABC、SRS、CARS 评分。结果 与对照组相比, 研究组患儿 CD3+、CD4+、CD8+、CXCR4、CXCR7、CD45R、HLA-DR、GATA3 细胞产生的 Ki-67 表达水平较高, Helios、FOXP3 细胞产生的 Ki-67 较低, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 研究组患儿 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数、拟杆菌门、放线菌门水平降低, Simpson 指数、厚壁菌门、变形菌门水平升高, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 研究组患儿 ABC、SRS、CARS 评分升高, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。与 Ki-67 非异常组相比, 调整其混杂因素, 发现 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数、Simpson 指数、拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、放线菌门为造成患儿 Ki-67 异常的危险因素, Ki-67 异常组患儿 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数、拟杆菌门、放线菌门低于 Ki-67 非异常组, Simpson 指数、厚壁菌门、变形菌门高于 Ki-67 非异常组, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。与 Ki-67 非异常组相比, 调整其混杂因素, 发现 ABC、SRS、CARS 为影响患儿 Ki-67 异常的危险因素, Ki-67 异常组患儿 ABC、SRS、CARS 评分高于 Ki-67 非异常组, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。结论 自闭症儿童体内 Ki-67 表达水平较高, 且与自闭症儿童肠道菌群结构、核心症状具有一定相关性, 检测 Ki-67 表达水平, 可对患儿进行早期干预。

关键词: 自闭症儿童; 肠道菌群结构; 核心症状; Ki-67; T 细胞亚群

中图分类号: R725.7

文献标识码: A

Expression of Ki-67 in T Cell Subgroups and Its Association with the Structure and Core Symptom of Intestinal Microflora in Children with Autism and Its Value YANG Jin-rong¹, SU Ya-dan², ZHU Jing-fan³, et al. (1. Department of Pediatrics of Central People's Hospital of Huizhou, Huizhou 516000, China; 2. Department of Pediatrics of The Sixth People's Hospital of Huizhou, Huizhou 516211, China; 3. Department of Neurology of The Sixth People's Hospital of Huizhou, Huizhou 516200, China)

Abstract: Objective To analyze the expression of Ki-67 in t cell subsets and its correlation with the structure of intestinal flora and core symptoms in children with autism and its value. **Methods** A total of 50 autistic children admitted to Central People's Hospital of Huizhou hospital from April 2020 to April 2021 were selected as the research group, and another 50 typical developing children admitted to our hospital for physical examination were selected as the control group. The expression levels of Ki-67 in T cell surface receptor cells, CXCR4 and CXCR7 cells, CD45R, HLA-DR, GATA3, Helios and FOXP3, intestinal microflora α diversity, intestinal microflora level, ABC, SRS and CARS scores were detected. **Results** Compared with the control group, the expression levels of Ki-67 produced by CD3+, CD4+, CD8+, CXCR4, CXCR7, CD45R, HLA-DR and GATA3 cells were higher in the study group, while the expression levels of Ki-67 produced by Helios and FOXP3 cells were lower, with statistical differences ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of Chao1 index, Ace index, Shannon index, Bacteroidetes and actinomycetes decreased in the study group, while the levels of Simpson index, Firmicutes and proteobacteria increased, with statistical differences ($P < 0.05$). Compared with the control group, the scores of ABC, SRS and CARS in the study group were higher, with statistical differences ($P < 0.05$). Compared with the non-abnormal ki-67 group, the confounding factors were adjusted and Chao1 index, Ace index, Shannon index, Simpson index, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria and actinomycetes were found to be the risk factors affecting the abnormal Ki-67 in children. The Chao1 index, Ace index, Shannon index,

* 通讯作者

Bacteroidetes and actinobacteria in the Ki-67 abnormal group were lower than those in the Ki-67 non-abnormal group, while the Simpson index, Firmicute and Proteobacteria were higher than those in the Ki-67 non-abnormal group, with statistical differences ($P < 0.05$). Compared with the non-abnormal Ki-67 group, confounding factors were adjusted and ABC, SRS and CARS were found to be the risk factors for abnormal Ki-67. The scores of ABC, SRS and CARS in the abnormal Ki-67 group were higher than those in the non-abnormal Ki-67 group, with statistical difference ($P < 0.05$).

Conclusion Ki-67 expression level in autistic children is high, and it has a certain correlation with the intestinal flora structure and core symptoms of autistic children. Detection of Ki-67 expression level can be used for early intervention in children.

Key words: Children with autism; Structure of intestinal flora; Core symptoms; Ki-67; T cell subsets

(Chin J Lab Diagn, 2023, 27; 0033)

自闭症(ASD)为神经行为发育障碍,临床主要表现为社交障碍、兴趣狭窄、刻板行为^[1],可能与早期肠道菌群失调、免疫状态异常相关,自闭症发生后,患儿可出现胃肠胀气、腹泻、便秘等肠胃功能紊乱^[2]。研究显示^[3],肠道菌群的改变可促进自闭症的发展,且自闭症可导致患儿免疫系统失调,T淋巴细胞发生改变。Ki-67高表达于增殖细胞,在多种癌症的诊断中具有重要意义^[4]。基于此,本文分析T细胞亚群中Ki-67的表达及与自闭症儿童肠道菌群结构、核心症状的关联及价值研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2020年4月-2021年4月惠州市中心人民医院收治的50例自闭症儿童为研究对象,作为研究组,另外选取来院体检的50例典型发育儿童作为对照组,两组一般资料具有可比性($P > 0.05$)。本研究经伦理委员会批准。

纳入标准:患儿均符合《孤独症谱系障碍儿童早期识别筛查和早期干预专家共识》^[5]中对于自闭症的诊断标准。

排除标准:存在严重躯体障碍,神经发育出现障碍,存在其他慢性、急性疾病,患儿存在脑损伤,患有感染性疾病。

1.2 方法

1.2.1 Ki-67表达水平检测 采集两组儿童空腹静脉血5 ml,以离心半径15 cm,转速3 000 r/min离心处理10 min,提取上层清液,于-80℃保存,待检。使用抗CD3,抗CD4,抗CD8,抗CXCR4,抗CXCR7,抗CD45R,抗HLA-DR,抗Ki-67,抗GATA3,抗Helios和抗FOXP3抗体染色。固定细胞并通透,使用FC 500流式细胞仪Beckman Coulter使用CXP软件采集和分析数据。使用Trizol试剂从PBMC中提取RNA并根据试剂盒说明步骤进行定量。用Nandrop分光光度计测定RNA浓度。使

用大容量cDNA逆转录试剂盒合成cDNA。使用SYBR Green预混液进行定量RT-PCR。测定中使用的引物如下:Ki-67, F: 5'-GGATCGTCCCAGTG-GAAGAG-3', R: 5'-TCTCGTGGGCCACATTTTC-T-3'; GAPDH, F: 5'-AATGGGCAGCCGTTAG-GAAA-3', R: 5'-GCGCCCAATACGACCAAATC-3'。数据以Ki-67相对GAPDH的mRNA表达的变化表示。

1.2.2 肠道菌群检测 采集所有儿童新鲜粪便,放于-80℃,保存,待检。提取粪便中DNA,采用MiSeq对其进行检测,后采用SiLva数据库对其肠道菌群多样性、肠道菌群门水平检测。

1.2.3 ABC评分检测 采用孤独症行为量表(ABC)对患儿病情严重程度进行评价,该量表共5个维度,评分越高,患儿病情越严重。采用SRS量表评估患儿社交障碍情况,分数越高,症状越严重。采用CARS量表评估患儿孤独症状,分数越高,症状越严重。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行分析处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较采用独立样本t检验,计数资料采用%表示,组间比较采用 χ^2 检验,使用ROC曲线寻找T细胞亚群中Ki-67的表达截断值,采用线性回归分析自闭症儿童T细胞亚群中Ki-67的表达及与肠道菌群结构、核心症状的关联研究, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T细胞亚群中Ki-67的表达水平

如表1所示,与对照组相比,研究组患儿CD3+、CD4+、CD8+、CXCR4、CXCR7、CD45R、HLA-DR、GATA3细胞产生的Ki-67表达水平较高,Helios、FOXP3细胞产生的Ki-67表达水平较低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组肠道菌群结构比较

如表 2 所示,与对照组相比,研究组患儿 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数降低,Simpson 指数升高,拟杆菌门、放线菌门水平降低,厚壁菌门、变形菌门水平升高,具有统计学差异($P<0.05$)。

表 1 对照组与研究组患儿 T 细胞表面受体细胞中 Ki-67 表达水平 ($n=50, \bar{x} \pm s$)

组别	对照组	研究组	<i>t</i>	<i>P</i>
CD3+Ki-67(%)	0.63±0.19	1.52±0.63	9.889	0.001
CD4+Ki-67(%)	0.51±0.16	1.44±0.52	12.560	0.001
CD8+Ki-67(%)	0.57±0.14	1.83±0.84	11.170	0.001
CXCR4+Ki-67(%)	0.51±0.17	1.59±0.43	31.760	0.001
CXCR7+Ki-67(%)	0.55±0.16	1.48±0.51	12.810	0.001
CD45R+Ki-67(%)	1.02±0.22	2.43±0.75	24.120	0.001
HLA-DR+Ki-67(%)	0.75±0.18	2.76±0.78	36.600	0.001
GATA 3+Ki-67(%)	0.48±0.15	1.23±0.43	22.530	0.001
Helios+Ki-67(%)	0.83±0.19	0.32±0.14	36.620	0.001
FOXP3+Ki-67(%)	0.81±0.18	0.46±0.15	26.230	0.001

表 2 对照组与研究组患儿肠道菌群结构比较 ($n=50, \bar{x} \pm s$)

组别	对照组	研究组	<i>t</i>	<i>P</i>
Chao1 指数	381.31±78.25	263.64±69.47	7.952	0.001
Ace 指数	371.65±77.14	267.18±65.01	7.323	0.001
Shannon 指数	3.76±0.43	3.05±0.41	8.450	0.001
Simpson 指数	0.10±0.02	0.24±0.03	27.460	0.001
拟杆菌门(%)	53.14±6.28	17.62±2.33	37.500	0.001
厚壁菌门(%)	31.25±4.37	62.47±7.38	25.740	0.001
变形菌门(%)	3.55±0.42	11.02±2.34	22.220	0.001
放线菌门(%)	12.62±2.47	8.54±0.92	10.950	0.001

表 4 Ki-67 表达水平对自闭症儿童肠道菌群结构的影响结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Ki-67 非异常组($n=18$)	Ki-67 异常组($n=32$)	β 值(95%CI)	<i>P</i>
Chao1 指数	301.62±70.55	241.62±42.18	3.345(1.522-7.712)	0.001
Ace 指数	298.65±66.14	249.14±43.84	2.014(1.334-5.178)	0.001
Shannon 指数	3.45±0.43	2.88±0.32	4.224(3.247-8.741)	0.001
Simpson 指数	0.18±0.06	0.30±0.05	2.547(1.746-4.287)	0.001
拟杆菌门(%)	22.64±3.84	14.79±2.01	2.669(1.384-5.974)	0.001
厚壁菌门(%)	52.14±6.38	68.26±8.33	4.117(2.147-5.336)	0.001
变形菌门(%)	8.62±0.95	14.24±2.92	3.647(1.247-7.643)	0.001
放线菌门(%)	10.14±1.22	7.64±0.74	3.028(1.487-7.544)	0.001

2.5 Ki-67 表达水平对自闭症儿童核心症状的影响结果

如表 5 所示,与 Ki-67 非异常组相比,调整其混杂因素,发现 ABC、SRS、CARS 为影响患儿 Ki-67

2.3 各组核心症状比较

如表 3 所示,与对照组相比,研究组患儿 ABC、SRS、CARS 评分升高,具有统计学差异($P<0.05$)。

表 3 各组核心症状比较 ($n=50, \bar{x} \pm s$)

组别	对照组	研究组	<i>t</i>	<i>P</i>
ABC	70.21±8.36	79.62±6.32	6.349	0.001
SRS	80.25±9.21	96.24±10.14	8.254	0.001
CARS	32.64±3.24	45.12±3.22	19.320	0.001

2.4 Ki-67 表达水平对自闭症儿童肠道菌群结构的影响结果

CD3 +、CD4 +、CD8 +、CXCR4、CXCR7、CD45R、HLA-DR、GATA3 细胞中 Ki-67 表达截断值为(0.947,0.910,0.955,1.234,0.915,1.880,1.740,0.915,0.545,0.615),本研究中,5 项及以上 Ki-67 表达异常,定为 Ki-67 异常组($n=32$),其余为 Ki-67 非异常组($n=18$)。如表 4 所示,与 Ki-67 非异常组相比,调整其混杂因素,发现 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数、Simpson 指数、拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、放线菌门为影响患儿 Ki-67 异常的危险因素,Ki-67 异常组患儿 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数、拟杆菌门、放线菌门低于 Ki-67 非异常组,Simpson 指数、厚壁菌门、变形菌门高于 Ki-67 非异常组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

异常的危险因素,Ki-67 异常组患儿 ABC、SRS、CARS 评分高于 Ki-67 非异常组差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 5 Ki-67 表达水平对自闭症儿童核心症状的影响结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Ki-67 非异常组($n=18$)	Ki-67 异常组($n=32$)	β 值(95%CI)	<i>P</i>
ABC	75.26±8.01	83.62±9.22	3.305(1.216-5.352)	0.001
SRS	90.22±10.01	99.14±11.22	4.140(2.316-7.122)	0.001
CARS	41.04±5.21	49.27±5.88	4.314(2.997-6.478)	0.001

3 讨论

Ki-67 在 T 细胞中表达较高,其表达水平可影响患者免疫功能,导致其发生免疫障碍^[6]。趋化因子受体可促进神经疾病的发展,促进神经元细胞 T 细胞活化,CXCR4 表达于内皮细胞,促进内皮细胞发挥功能,CXCR7 表达于小胶质细胞、星形胶质细胞、内皮细胞、大脑神经元,可促进中枢神经系统的发展^[7-8]。研究显示^[9-10],孕妇体内 CXCR4 表达水平升高可使新生儿自闭症发生率升高。HLA-DR 为甲状腺功能减退、类风湿关节炎、自身免疫性糖尿病易感标志物,可促进自闭症的发展^[11]。GATA3 表达水平升高可使 5-羟色胺能加速神经元发育,导致自闭症的发生,GATA3 还可调节多巴胺 β 羟化酶活性,表达于中枢神经系统,脑中区域^[12-13]。本研究发现,自闭症儿童 CXCR4、CXCR7、HLA-DR、GATA3 细胞中 Ki-67 表达水平升高,表明 CXCR4、CXCR7、HLA-DR、GATA3 细胞中 Ki-67 表达水平升高与儿童免疫功能失调、患儿行为、核心症状的改变有关,以至于其沟通能力、行为能力出现障碍,导致自闭症的发生。本文研究显示,Helios 细胞 Ki-67 在 ASD 受试者中表达显著减少,这可能与这些个体的免疫功能障碍有关。FOXP3 在平衡过度活跃的免疫系统方面起着至关重要的作用,其缺乏可能与自身免疫性疾病和 ASD 有关^[14]。

肠道菌群与机体之间存在动态平衡,其多样性降低,可引起炎症性肠病、精神分裂症、免疫力降低、以及抑郁症的发生^[16-17]。本文研究发现,自闭症儿童中肠道菌群多样性降低,可使其肠道菌群失衡,变形菌门丰富度升高,可使机体内肠道菌群发生紊乱,并使肠道炎症反应增加,应激反应升高,导致自闭症的发生。

参考文献:

- [1] Manoli DS, State MW. Autism Spectrum Disorder Genetics and the Search for Pathological Mechanisms[J]. Am J Psychiatry, 2021,178(1):30.
- [2] Hörnberg H, Pérez-García E, Schreiner D, et al. Rescue of oxytocin response and social behaviour in a mouse model of autism[J]. Nature, 2020,584(7820):252.
- [3] 邹 荣,郑华军. 肠道菌群与儿童自闭症谱系障碍关系的研究进

展[J]. 中华神经医学杂志,2020,19(3):320.

- [4] 郝 鹏,胡海龙,都吉海,等. p53 和 Ki-67 基因表达与膀胱癌分级、分期相关性的大样本回顾性研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2021,41(1):84.
- [5] 中华医学会儿科学分会发育行为学组,中国医师协会儿科分会儿童保健专业委员会,儿童孤独症诊断与防治技术和标准研究项目专家组. 孤独症谱系障碍儿童早期识别筛查和早期干预专家共识[J]. 中华儿科杂志,2017,55(12):890.
- [6] 魏晓颖,王军涛,田景霞,等. 微 RNA-214 靶向性别决定区 Y-box 4 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖凋亡的影响[J]. 中华风湿病学杂志,2021,25(7):455.
- [7] 赵秀敏,李 杰,彭洋颖,等. 子宫腺肌病患者 CXCL12/CXCR4/CXCR7 mRNA 及其蛋白表达水平[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版),2020,16(3):309.
- [8] 卢莹莹,李文辉. CXCL12-CXCR4 轴、CCL21-CCR7 轴在非霍奇金淋巴瘤中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2021,29(15):2712.
- [9] 李珍玲,那佈其,王雪妍,等. 皮肤鳞状细胞癌中 SDF-1/CXCR4 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2021,37(10):1221.
- [10] 魏 明,高凤娇,杨 琳,等. SDF-1/CXCR4 激活 ERK 和 PI3K/AKT 通路介导髓核致炎根性疼痛[J]. 中山大学学报(医学科学版),2021,42(3):373.
- [11] 刘 涛,李站虎. 儿童穿孔性阑尾炎患者外周血单核细胞表面 HLA-DR/CD14 表达率及与临床诊疗的相关性[J]. 现代检验医学杂志,2021,36(3):141.
- [12] 杨 静,王亚冰,聂 敏,等. GATA3 基因变异导致甲状旁腺功能减退症患者的临床特征和分子机制[J]. 中华内科杂志,2022, 61(1):66.
- [13] 危丽华,张 新,封 伟. 子痫前期孕妇血清 SOCS3, PP-13, GATA-3 水平变化及其预测价值研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022,37(1):48,87.
- [14] Ahmad SF, Zoheir KMA, Ansari MA, et al. Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T regulatory cell-related transcription factor signaling in children with autism[J]. Mol. Neurobiol, 2017, 54:4390.
- [15] Safari MR, Ghafouri-Fard S, Noroozi R, et al. FOXP3 gene variations and susceptibility to autism: A case-control study[J]. Gene, 2017,596:119.
- [16] 朱力立,陈 栋,张怡颖,等. 基于肠道菌群理论探讨针刺在孤独症谱系障碍中的作用机制[J]. 上海针灸杂志,2020,39(10): 1351.
- [17] 马冰洁,梁晶晶,静 进. 孤独症谱系障碍儿童肠道菌群与症状严重程度的关系研究[J]. 教育生物学杂志,2020,8(1):30.

(收稿日期:2022-04-19)