检验与临床

EB 病毒相关性噬血细胞综合征患儿 T 淋巴细胞 CD69 的表达及意义

白志瑶　宋建新

作者单位:655000　曲靖市,云南省曲靖市第二人民医院检验科(白志瑶)

650032　昆明市,云南省第一人民医院检验科血液病诊断室(宋建新)

通讯作者:宋建新,E-mail:songjianxin8@126.com

【摘要】 **目的**　探讨外周血 T 淋巴细胞 CD69 表达在 EB 病毒相关性噬血细胞综合征 (epstein-barr virus-associated hemophagocytic syndrome, EBV-AHS)患儿中的变化及意义。**方法**　应用流式细胞术检测 EBV-AHS 患儿(急性期 28 例,缓解期 21 例)及 30 例健康对照儿童外周血 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的表达水平,对检测结果进行统计学分析。**结果**　三组受试者间 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的表达水平差异均有统计学意义(P 均< 0.01);急性期组 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的表达水平明显高于缓解期组及对照组, 且差异均有统计学意义 (P 均< 0.01); 缓解期组 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的表达水平明显高于对照组,且差异均有统计学意义(P 均< 0.01)。**结论**　T 淋巴细胞的过度活化在 EBV-AHS 发病过程中起重要作用,是 EBV-AHS 重要的发病机理之一。检测 T 淋巴细胞 CD69 的表达有利于临床判断治疗效果,并为应用免疫调节剂提供理论依据。

【关键词】 EB 病毒相关性噬血细胞综合征;T 淋巴细胞;CD69;儿童

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2014.03.011

Expression and significance of T lymphocyte CD69 in children paitents with epstein-barr virus -associated hemophagocytic syndrome

BAI Zhi-yao[1], SONG Jian-xin[2]. [1]Department of Clinical Laboratory, the Second People´s Hospital of Qujing City, Qujing 655000, China　[2]Department of Clinical Laboratory, Blood Diseases Diagnosis Room, the First People´s Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the change and significance of the peripheral blood T lymphocyte CD69 expression in children patients with epstein-barr virus-associated hemophagocytic syndrome (EBV-AHS). **Methods**　The expression levels of $CD3^+CD4^+CD69^+$ and $CD3^+CD8^+CD69^+$ in EBV-AHS children(28 cases in acute phase and 21 cases in paracmasis) and 30 cases of healthy controls were detected by flow cytometry method. The results were analyzed statistically. **Results**　There were statistical significance in the differences of $CD3^+CD4^+CD69^+$ and $CD3^+CD8^+CD69^+$ expression levels among three groups(Pall< 0.01). The expression levels of $CD3^+CD4^+CD69^+$ and $CD3^+CD8^+CD69^+$ in acute phase group were all higher than that of paracmasis group and control group, and the differences all had statistiacal significance (Pall< 0.01). The expression levels of $CD3^+CD4^+CD69^+$ and $CD3^+CD8^+CD69^+$ in paracmasis group were all higher than that of control group, and the differences all had statistiacal significance(Pall< 0.01). **Conclusion**　Excessively activate of T lymphocyte play an important role in the EBV-AHS attack procession. Detection of T lymphocyte CD69 expression is helpful for treatment effect judgment in clinical, and provide theoretical basis for application of immune modulators.

【**Key words**】 Epstein-barr virus associated hemophagocytic syndrome; T lymphocyte; CD69; Children

噬血细胞综合征 (hemophagocytic syndrome, HPS) 又称噬血细胞性淋巴组织细胞增生症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH), 是由多种致病因素引起的巨噬细胞增生和活化伴随其吞噬血细胞现象的综合征。其中与 EB 病毒感染相关的 HPS 称为 EB 病毒相关性噬血细胞综合征(epstein-barr virus-associated hemophagocytic syndrome, EBV-AHS)[1]。临床表现以多脏器受损, 病情进展迅速,病死率高为特征。其发病机理目前尚不明确,但免疫功能紊乱在疾病的发生发展过程中起了重要作

用[2]。本文应用流式细胞仪对 28 例急性期 EBV-AHS 患儿及其 21 例缓解期患儿外周血 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$进行检测,探讨 T 淋巴细胞 CD69 在 EBV-AHS 发病中的作用及临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2010 年 3 月至 2013 年 12 月我院儿科收治的 28 例初诊为 EBV-AHS 的患儿为急性期组。其中男 16 例,女 12 例;年龄 11 个月至 12 岁;经诱导治疗后取得临床缓解 21 例(缓解期),5 例转院或自动出院失访,死亡 2 例。选择 30 例健康儿童作为正常对照组,其中男 18 例,女 12 例;年龄 1~12 岁。

1.2 诊断标准 参照国际组织细胞协会 HLH-2004 年修订的 HPS 诊断指南[3]标准,满足 8 条中的 5 条即可诊断为 HPS。所有患儿均有 EBV 感染依据:即 EBV 衣壳抗原 IgM(+)和(或)实时荧光定量 PCR 扩增的 EBV 基因拷贝数阳性。

1.3 试剂和仪器 CD3-PE-CY5、CD4-PE、CD8-PE、CD69-FITC 及同型对照购自美国 BD 公司,流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司 FC500 型。

1.4 $CD3^+CD4^+CD69^+$、$CD3^+CD8^+CD69^+$检测 分别取外周血 100 μl,置于流式管中,加入 CD3-PE-CY5/CD4 -PE/CD69 -FITC、CD3 -PE -CY5/CD8 -PE/CD69-FITC 各 20 μl,同时做同型对照管,混匀,避光孵育 20 min,溶血后上机检测分析,每管获取 10 000 个细胞,结果以百分率表示。

1.5 统计学处理 用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间计量资料的比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的检测结果比较 三组受试者间 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的表达水平差异均有统计学意义(P 均<0.01);急性期组 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的表达水平明显高于缓解期组及对照组,且差异均有统计学意义 (P 均<0.01);缓解期组 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$的表达水平明显高于对照组,差异均有统计学意义(P 均<0.01),见表 1。

表 1 EBV-AHS 患儿及对照组外周血 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$检测结果比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	例数	$CD3^+CD4^+CD69^+$	$CD3^+CD8^+CD69^+$
对照组	30	2.10±0.18	1.78±0.17
急性期组	28	7.94±0.86*#	5.63±0.52*#
缓解期组	21	3.53±0.60*	3.18±0.58*
F 值	-	31.59	26.83
P 值	-	<0.01	<0.01

注:*与对照组相比,$P<0.01$;#与缓解期组相比,$P<0.01$

3 讨论

HPS 是由淋巴细胞、巨噬细胞非恶性增生,分泌大量炎性因子,伴吞噬血细胞现象的一组综合征。HPS 可分为原发性 HPS 和继发性 HPS。原发性 HPS 发病年龄多小于 2 岁,大多伴有常染色体或性染色体隐性遗传。而继发性 HPS 可继发于由肿瘤、病毒感染(如 EB 病毒)、细菌、真菌及原虫的感染和自身免疫病等。在我国以 EBV 感染引起者更常见,EBV-AHS 的确切发病机制至今仍未完全阐明,多数学者认为患儿存在免疫功能失调,导致淋巴细胞、组织细胞/巨噬细胞过度激活和增殖,产生大量炎性因子,如 IL-l、IL-2、IL-6、IL-18、IFN-γ、TNF-α 等,产生高细胞因子血症[4],引起"细胞因子风暴",从而导致过度的炎症反应、多器官损害。

CD69 被称为活化诱导分子、早期活化抗原-1 等,是 C-型凝集素受体家族的成员。CD69 是 T 淋巴细胞活化后最早表达的表面抗原,当其表达后,可作为共刺激信号促进 T 细胞进一步活化和增殖[5]。

本文研究结果显示,急性期 EBV-AHS 患儿外周血 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$表达与对照组相比显著增高,提示 EBV-AHS 患儿外周血中 T 淋巴细胞处于高度的活化状态,与皇甫春荣等[6]的研究结果一致。活化的 T 淋巴细胞产生大量的细胞因子,导致巨噬细胞活化而吞噬血细胞,活化的巨噬细胞又分泌大量的细胞因子,如 IL-12、IL-10、IL-18、TNF-α 及其他细胞因子,其中 IL-12 能诱导分泌 Thl 细胞因子的发展并促进这些细胞和 NK 细胞产生 IFN-γ,促进炎性因子的进一步释放,形成恶性循环[7],加重机体过度的炎症反应,致器官功能受损,如黄疸、肝脾肿大、肝功能异常、全血细胞减少、脂代谢异常、凝血功能障碍,并伴有免疫功能紊乱等多种临床表现[8]。本文研究结果还显示,急性期组 CD69 表达水平明显高于缓解期组,而缓解期组又明显高于对照组。提示 $CD3^+CD4^+CD69^+$及 $CD3^+CD8^+CD69^+$表达与 EBV-AHS 病情相关,T 淋巴细胞 CD69 表达越高,症状越重,炎性因子参与免疫损伤的程度越强。在缓解期,T 细胞仍处于高激活状态,说明 EBV-AHS 患儿免疫功能还未完全恢复,仍需进一步治疗。

综上所述,EBV-AHS 患儿 $CD3^+CD4^+CD69^+$、$CD3^+CD8^+CD69^+$表达异常增高,T 淋巴细胞处于高活

化状态，其水平可反映 EBV-AHS 患儿病情的活动性。检测 T 淋巴细胞 CD69 的表达有利于临床判断治疗效果,并为应用免疫调节剂提供理论依据。

4 参考文献

1 Rouphael NG, Talati NJ, Vaughan C, et a1. Infections associated with haemophagocytic syndrome. Lancet Infect Dis,2007,7:814-822.

2 段红梅,谢正德,申昆玲. EB 病毒相关淋巴细胞增生性噬血综合征研究进展. 临床儿科杂志,2005,23:425-429.

3 Henter JI, Home A, Atieo M, et a1. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. Pediatr Blood Cancer,2007,48:124-131.

4 Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. Hematology Am Soc Hematol Educ Program,2009:127-131.

5 汪慧英, James J Lee, Nancy A Lee. CD69 的表达在小鼠嗜酸细胞的活化与凋亡中的作用. 中国病理生理杂志,2009,25:1-6.

6 皇甫春荣,付红敏. EB 病毒相关性噬血细胞综合征的临床特征及外周血淋巴细胞亚群的变化. 中国小儿急救医学,2010,17:330-320.

7 Nagafuji K, Nonami A, Kumnao T, et, al. Perforin genemutations in adult -onset hemophagocytic lymohohistiocytosis. Haematologica, 2007,92:978-981.

8 Jin YK, Xie ZD, Yang S, et a1. Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: a retrospective study of 78 pediatric cases in mainland of China. Chin Med J (Engl),2010,123:1426-1430.

(收稿日期:2014-04-16)

(本文编辑:陈淑莲)

(上接第 186 页)

各种免疫因素相互作用的机制研究,这将有助于我们进一步正确认识 AS 的发生发展机制。

5 参考文献

1 Potempa LA, Siegel JN, Fedel BA, et al. Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. Molecular immunology,1987,24:531-541.

2 Ji SR, Wu Y, Zhu L, et al. Cell membranes and liposomes dissociate C-reactive protein(CRP) to form a new, biologically active structural intermediate: mCRP(m). FASEB J,2007,21:284-294.

3 Eisenhardt SU, Habersberger J, Murphy A, et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. Circulation research, 2009,105:128-137.

4 Habersberger J, Strang F, Scheichl A, et al. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction. Cardiovasc Res,2012,96:64-72.

5 Ji SR, Ma L, Bai CJ, et al. Monomeric C-reactive protein activates endothelial cells via interaction with lipid raft microdomains. FASEB J,2009,23:1806-1816.

6 Mihlan M, Blom AM, Kupreishvili K, et al. Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells. FASEB J,2011,25:4198-4210.

7 Lauer N, Mihlan M, Hartmann A, et al. Complement regulation at necrotic cell lesions is impaired by the age-related macular degeneration-associated factor-H His402 risk variant. J Immunol,2011,187:4374-4383.

8 Hein TW, Singh U, Vasquez-Vivar J, et al. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. Atherosclerosis,2009,206:61-68.

9 Li R, Ren M, Luo M, et al. Monomeric C-reactive protein alters fibrin clot properties on endothelial cells. Thromb Res,2012,129:e251-e256.

10 Ahrens I, Domeij H, Eisenhardt SU, et al. Opposing effects of monomeric and pentameric C-reactive protein on endothelial progenitor cells. Basic Res Cardiol,2011,106:879-895.

11 Grad E, Pachino RM, Danenberg HD. Endothelial C-reactive protein increases platelet adhesion under flow conditions. Am J Physiol Heart Circ Physiol ,2011,301:H730-H736.

12 Eisenhardt SU, Starke J, Thiele JR, et al. Pentameric CRP attenuates inflammatory effects of mmLDL by inhibiting mmLDL monocyte interactions. Atherosclerosis,2012,224:384-393.

13 Shih HH, Zhang S, Cao W, et al. CRP is a novel ligand for the oxidized LDL receptor LOX-1. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009,296:H1643-H1650.

14 宋旭东. C 反应蛋白介导脂质紊乱参与动脉粥样硬化早期形成的研究. 第一军医大学,2007.

15 Ma X, Ji SR, Wu Y. Regulated conformation changes in C-reactive protein orchestrate its role in atherogenesis. Chinese Science Bulletin, 2013,58:1642-1649.

16 刘海行,赵冬,王薇. C-反应蛋白全基因测序及基因变异与血清水平的关联. 心肺血管病杂志,2010,29:521-524.

17 Kong H, Qian YS, Tang XF, et al. C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms, CRP levels and risk of incident essential hypertension: findings from an observational cohort of Han Chinese. Hypertens Res,2012,35:1019-1023.

18 赵晓丽. C-反应蛋白单核苷酸多态性与缺血性卒中的关联研究. 山西医科大学,2011.

(收稿日期:2014-06-03)

(本文编辑:张志成)