

• 论 著 •

儿童传染性单核细胞增多症T细胞亚群的动态分析^{*}

曹友德,聂盛丹,邓中华,龙璐

(湖南省人民医院检验科,长沙 410005)

摘要:目的 检测EB病毒感染引起传染性单核细胞增多症(IM)患儿T细胞亚群的细胞表达情况,探讨IM患儿的细胞免疫功能状况。方法 应用流式细胞术(FCM)检测30例IM患儿组急性期和恢复期外周血T淋巴细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺的细胞表达率,并与随机抽取的24例同龄健康对照组儿童进行比较。结果 IM患儿组急性期CD3⁺、CD8⁺细胞表达率较对照组明显增高($P<0.05$);而CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺较对照组明显降低($P<0.05$)。IM患儿组恢复期CD3⁺、CD8⁺细胞表达率较急性期有所降低,但仍高于健康对照组($P<0.05$);恢复期CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺较急性期有所增加,但仍低于对照组($P<0.05$)。结论 IM患儿急性期外周血T淋巴细胞亚群明显异常,导致机体免疫功能改变是IM发病的主要原因之一,监测IM患儿的细胞免疫功能状况对疾病的预后有重要的临床意义。

关键词:传染性单核细胞增多症; 疱疹病毒4型,人; T淋巴细胞亚群; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)01-0020-03

Dynamic analysis of T lymphocyte subsets in children with infectious mononucleosis^{*}

Cao Youde, Nie Shengdan, Deng Zhonghua, Long Lu

(Department of Clinical Laboratory, Hunan People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To investigate the immunity function in children with infectious mononucleosis(IM), caused by Epstein-Barr virus(EBV) infection, by measuring T lymphocyte subsets in peripheral blood. **Methods** Flow cytometry (FCM) technique was applied to quantitatively analyze CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ T lymphocyte subsets in peripheral blood of 30 cases of child patients with IM at acute or convalescent stage and 24 cases of healthy controls. **Results** Compared with control group, positive rates of CD3⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subsets in child patients at acute phase were obviously increased ($P<0.05$), while CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with child patients at acute stage, positive rates of CD3⁺ and CD8⁺ in child patients at convalescent stage were obviously decreased ($P<0.05$), which were still higher than control group ($P<0.05$), but CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ were significantly increased ($P<0.05$), which were still lower than control group ($P<0.05$). **Conclusion** The variation of immune function, characterized by obvious abnormality of T lymphocyte subsets in peripheral blood at acute stage, could be one of the main causes of IM in child patients. There is vital clinical significance to monitor the immunity function in for the prognosis of IM in child patients.

Key words: infectious mononucleosis; herpesvirus 4, human; T-lymphocyte subsets; flow cytometry

传染性单核细胞增多症(IM)是一种急性感染引起的单核-巨噬细胞系统增生性传染病。其临床症状轻重不一,主要表现为不规则发热、咽峡炎、肝脾淋巴结肿大、皮疹等。IM的主要病原体是EB病毒(EBV),EBV属于 γ 疱疹病毒亚科,是一种嗜淋巴细胞的DNA病毒,其与约1%的肿瘤发病有关^[1]。本文通过检测30例患儿不同时期外周血T淋巴细胞亚群的变化,并与健康儿童相应指标对比分析,探讨IM患儿的免疫功能状况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 30例IM患儿均为2010年2月至2011年2月在本院儿科住院患儿,诊断符合IM诊断标准^[2]。急性期为起病后1~7 d,恢复期为临床症状完全消失后2周,其中男14例,女16例;年龄6个月至12岁,平均年龄3.66岁。急性期与恢复期均未用激素、免疫调节剂。对照组为随机抽取的同期健康体检儿童24例,其中男12例,女12例;年龄5个月至12

岁,平均年龄3.45岁,年龄、性别与IM患儿组比较,差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 血液标本采集 分别采集IM患儿急性期、恢复期及对照组的静脉血液标本约2 mL,EDTA抗凝,标本采集后6 h内测定。

1.2.2 T细胞亚群的检测 取CD3⁺-PC5、CD4⁺-RDI、CD8⁺-ECD鼠抗人荧光单克隆抗体(由美国Beckman Coulter公司生产)各10 μ L,加入100 μ L全血,混匀,室温暗处放置20 min,分别加入200~300 μ L红细胞裂解液,混匀,用PBS洗涤2次,加PBS 400 μ L后在型号为Beckman FC500型流式细胞仪上检测外周血T淋巴细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和CD4⁺/CD8⁺的表达率。

1.3 统计学处理 全部数据采用SPSS17.0统计软件处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较用t检验,以 $P<0.05$ 为差异

* 基金项目:湖南省科技厅资助项目(2010sk3072)。

有统计学意义。

2 结 果

2.1 IM 患儿不同患病期与对照组 T 细胞亚群的比较 IM 患儿组急性期 CD3⁺、CD8⁺ 细胞表达率较健康对照组明显增高 ($P < 0.05$)，而 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。IM 患儿组恢复期 CD3⁺、CD8⁺ 细胞表达率较急性期有所降低，但仍高于对照组 ($P < 0.05$)；恢复期 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 较急性期有所增加，但仍低于对照组 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 IM 患儿急性期、恢复期与对照组 T 细胞亚群的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
IM 患儿组				
急性期	81.23 \pm 3.29	18.15 \pm 3.63	49.89 \pm 6.93	0.35 \pm 0.11
恢复期	74.16 \pm 4.96	27.38 \pm 5.22	34.83 \pm 6.34	0.83 \pm 0.25
对照组	65.54 \pm 7.10	40.00 \pm 7.49	20.29 \pm 4.47	1.92 \pm 0.71
t1	10.76	14.08	18.12	12.00
t2	6.50	7.96	8.79	9.50
t3	5.25	7.29	9.50	7.84

P 均 < 0.05 。t1 为急性期与健康对照比较；t2 为急性期与恢复期比较；t3 为恢复期与健康对照比较。

2.2 IM 患儿组及对照组 T 细胞亚群流式散点图 经对比分析，发现患儿组 CD3⁺、CD8⁺ 细胞较对照组明显增高，CD4⁺ 细胞较对照组明显降低，见图 1、2。

3 讨 论

传染性单核细胞增多症是儿童时期常见的一种感染性疾病，主要是由 EB 病毒感染 B 细胞所致。近年来，IM 的发病率有逐渐上升的趋势，且有继发淋巴细胞白血病和恶性组织细胞增生传染病的危险，并与人类几种常见恶性肿瘤，如霍奇金淋巴瘤、移植后淋巴细胞增生性疾病及鼻咽癌存在密切关系^[3-4]。研究表明^[5-6]，EBV 感染的细胞免疫功能不足和缺乏是发生肿瘤的主要原因，所以，及时了解患者的免疫功能状况是防止病情恶化、降低死亡率的关键。

T 淋巴细胞来源于骨髓中的淋巴样前祖细胞，在胸腺中发育成熟，成熟 T 淋巴细胞定居于周围免疫器官（如淋巴结、脾及黏膜相关淋巴组织等）。CD3 抗原是所有 T 细胞表面的特征性标志，CD4 是辅助性 T 细胞（Th）表面标志，CD8 是细胞毒性 T 细胞的表面标志。CD4⁺ T 细胞通过分泌多种细胞因子如白细胞介素-2 (IL-2)、IL-4、IL-5、干扰素-γ (IFN-γ)、IL-12 等，辅助 B 细胞和效应 T 细胞的激活，增强或扩大免疫应答；CD8⁺ T 细胞通过分泌穿孔素、颗粒酶、颗粒溶解素等直接杀伤靶细胞或通过 Fas/FasL 途径诱导靶细胞凋亡^[7]，故其具有抗病毒、抗肿瘤及重要的调节作用。所以，在人类正常免疫应答过程中，CD4⁺ 与 CD8⁺ 细胞起着十分重要的作用，两者相互诱导、相互制约形成 T 细胞网络，和 B 细胞一起调节和维持着机体的正常免疫功能，故健康人体中 T 细胞亚群数量始终保持一定的正常比例。在感染性疾病中，尤其是病毒感染，容易影响 T 细胞亚群的数量和比例出现明显变化，引起患者的免疫调节功能紊乱^[8]。因此，CD4⁺/CD8⁺ 的比值是重要的免疫状态的监测指标，检测 IM 患儿 T 细胞亚群具有重要临床意义。

本研究结果显示，IM 患儿组 30 例急性期外周血中 CD3⁺、CD8⁺ T 细胞明显增高，CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞明显降低 ($P < 0.05$)，说明 IM 患儿存在一定的细胞免疫功能紊乱，随着临床治疗对感染的控制，恢复期 CD3⁺、CD8⁺ T 细胞较急性期有所降低，但仍高于对照组 ($P < 0.05$)；CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 较急性期有所增加，但其值仍低于对照组 ($P < 0.05$)，这提示随着病情的好转，机体细胞免疫功能有所恢复，同时说明 IM 发病期机体一直处于细胞免疫应急状态。

在 IM 患者感染后，EBV 在其感染的 B 细胞内大量增殖，进而激发机体产生一系列的免疫应答，所以 T 细胞的大量增殖，并非仅仅是 EB 病毒感染了这些细胞，而是它产生了强烈的免疫反应。其中 CD8⁺ T 细胞起着最为强烈作用，在 EBV 感染的急性期，由于病毒抗原选择性克隆扩增导致大量 EBV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量及活性增加，且具有很强的细胞毒作用。所以，杀灭感染的 B 细胞，清除大多数 EB 病毒，少量的 EBV 在永生 B 细胞内低水平复制，建立终生感染。活化的 T 细胞的作用在于减少潜在性损伤 T 细胞的反应。机体需要进行系统调节，促进 IM 的恢复^[9]。同时，CD4⁺ T 细胞通过分泌多种细胞因子参与细胞免疫反应的调控，在控制和清除 EBV 感染的 B 细胞过程中，被大量消耗，导致其在外周血中的绝对数量明显减低。近年有研究表明^[10]，EBV 除了感染 B 淋巴细

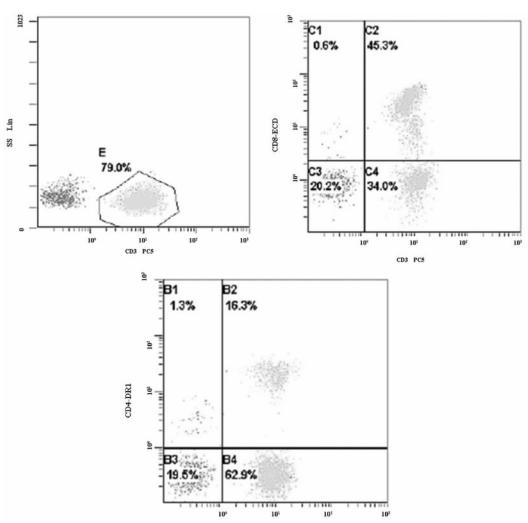


图 1 患儿组 T 细胞亚群流式散点图

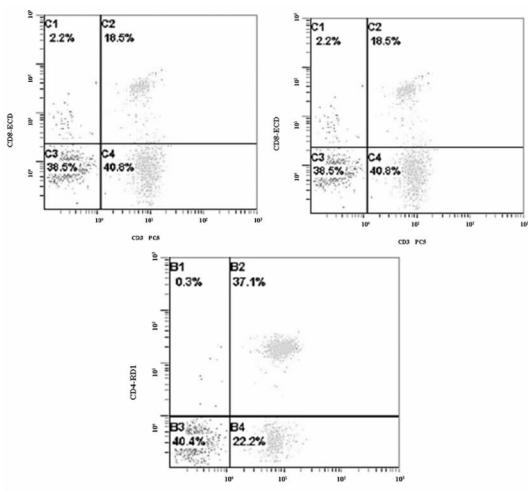


图 2 对照组 T 细胞亚群流式散点图

胞外,还能感染T或者NK细胞并产生大量细胞因子,以抑制受感染的细胞。这也是引起T细胞免疫功能紊乱不可忽视的原因之一。

本研究通过健康儿童的相应指标对IM患儿急性期、恢复期T细胞亚群的对比分析,初步揭示了正常免疫感染EBV之后不同时期T细胞亚群的变化规律,对监测IM患儿不同时期细胞免疫状态,及时了解患儿病情发展和预后,警惕EBV相关疾病的发生有重要意义。IM患儿急性期外周血T淋巴细胞亚群的明显异常,导致机体免疫功能改变是IM发病的主要原因之一,监测IM患儿的免疫功能状况对疾病的预后有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Delecluse HJ, Feederle R, O'Sullivan B, et al. Epstein-Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(12): 1358-1364.
- [2] 胡亚美,江载芳. 诸福堂实用儿科学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2002:821-825.
- [3] Peterson MR, Emery SC, Yung GL, et al. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder following lung transplantation is more commonly of host origin[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(2): 176-180.

(上接第19页)

能及代谢状态低下。因此,对于合并有肝硬化的肝癌患者,加强围术期间肝脏储备功能的维护和支持,改善肝脏有效血流供给,具有重要的意义。

肝脏是体内胆汁酸代谢的惟一器官,胆汁酸进入肠腔后绝大部分在回肠和结肠被重吸收,经门静脉进入肝脏。肝硬化时,肝细胞功能降低使肝脏对胆汁酸的摄取清除功能下降,门体分流使门脉血流避过肝脏而直接进入体循环,使血清TBA进一步升高。PA半衰期仅1.9 d,且99%来源于肝脏,能敏感而特异地反映肝脏合成代谢功能。TBA和PA浓度变化可灵敏地反映肝脏损害程度及储备功能,并与预后密切相关^[10-11]。TBIL、ALB和PT是Child-Pugh分级中重要的客观指标,对判断肝功能状态有重要意义。结果显示,上述指标随疾病严重程度发生变化,且与ICGR₁₅和EHBF显著相关($P < 0.001$),表明这些常规指标亦可作为评价肝癌患者肝脏储备功能的补充,对反映病情变化及判断预后具有良好的临床参考价值。

参考文献

- [1] Omagari K, Ohba K, Kadokawa Y, et al. Comparison of the grade evaluated by "liver damage" of liver cancer study group of Japan and Child-Pugh classification in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2006, 34(4): 266-272.
- [2] 熊炬,张金辉,张朝霞,等.原发性肝癌患者术前肝储备功能的预测和术后评价[J].肝胆外科杂志,2007,15(2):93-96.
- [3] Mizushima Y, Tohira H, Mizobata Y, et al. Assessment of effec-

- [4] 张明.传染性单核细胞增多症分析[J].医药论坛杂志,2004,25(20):51.
- [5] Nikiforow S, Bottomlu K, Miller G. Cytolytic CD4(+)T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced-B cell proliferation[J]. J Virol, 2003, 77(22): 12088-12104.
- [6] Yamashita N, Kimura H, Morishima T. Virological aspects of Epstein-Barr virus infections[J]. Acta Med Okayama, 2005, 59(6): 239-246.
- [7] 曾宾,肖燕,金润铭,等.儿童EB病毒感染的免疫功能状况[J].实用儿科临床杂志,2006,21(22):1549-1550.
- [8] 王明圣,靳杭红,陈宇英,等.传染性单核细胞增多症患儿免疫功能变化及其临床意义[J].中国优生与遗传杂志,2009,17(4):19-20.
- [9] Marshall NA, Culligan DJ, Johnston PW. CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in infectious mononucleosis and EBV-associated non-Hodgkin lymphoma; Th1 in active disease but Th1 in remission[J]. British Journal of Haematology, 2007, 139(1): 81-89.
- [10] Inashuku S. Clinical features and treatment strategies Epstein-Barr virus associated hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 44(3): 259-272.

(收稿日期:2011-10-08)

tive hepatic blood flow in critically ill patients by noninvasive pulse dye-densitometry[J]. Surg Today, 2003, 33(2): 101-105.

- [4] 戴朝六.合并肝功能不全外科病人的处理[J].中国实用外科杂志,2005,25(12):708-710.
- [5] Fazakas J, Mandli T, Ther G, et al. Evaluation of Liver Function for Hepatic Resection[J]. Transplantation Proceedings, 2006, 38(3): 798-800.
- [6] Hashimoto M, Watanabe G. Hepatic parenchymal cell volume and the indocyanine green tolerance test[J]. Surg Res, 2000, 92: 222-227.
- [7] 漆德芳.肝硬化[M].北京:北京科学技术出版社,2000:210-222.
- [8] Imai T, Takahashi K, Goto F, et al. Measurement of blood concentration of indocyanine green by pulse dye densitometry-comparison with the conventional spectrophotometric method[J]. Clin Monit, 1998, 14: 477-484.
- [9] Iijima T, Aoyagi T, Iwao Y, et al. Cardiac output and circulating blood volume analysis by pulse dye-densitometry[J]. Clin Monit, 1997, 13(2): 81-89.
- [10] Matsuzaki Y, Saito Y, Kobayashi K, et al. Clinical significance of serum total bile acids and indocyanine green test for the estimation of plasma free etoposide ratio in anicteric hepatocellular carcinoma patients[J]. Hepatology Research, 1997, 9: 113-123.
- [11] 陶春华,申振宇,孙斌,等.BA、CHE、PA测定在肝硬化中的临床意义[J].同济大学学报:医学版,2008,29(2):57-58.

(收稿日期:2011-11-08)