

• 论 著 •

EB 病毒衣壳抗原抗体 IgM 阳性儿童的免疫功能评估研究

陈 刚, 张 薇, 胡 冬, 庄利东, 吴 茜, 向礼贤
(绵阳市中心医院检验科, 四川绵阳 621000)

摘 要:目的 探讨儿童 EB 病毒(EBV)感染者免疫功能状态及变化。方法 采用免疫散射比浊法检测 58 例 EB 病毒衣壳抗原抗体 IgM(EBV-CA IgM)阳性儿童血清免疫球蛋白, 用流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺, 同期检测 50 例同龄健康儿童相同指标作为对照组。结果 EBNA-IgG 阴性组 IgG、IgA 较 EBNA-IgG 阳性组和对照组明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而 EBNA-IgG 阴性组、EBNA-IgG 阳性组血清总 IgM 和对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。EBNA-IgG 阴性组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺较 EBNA-IgG 阳性组和对照组明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 EBNA-IgG 阴性组 CD8⁺较 EBNA-IgG 阳性组和对照组明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 EBNA-IgG 阳性患儿免疫功能接近对照组优于 EBNA-IgG 阴性患儿, EBNA-IgG 的出现可对患儿的免疫功能状况做初步的评估, 通过检测免疫球蛋白和 T 细胞亚群、B 淋巴细胞比例可了解儿童现症感染者免疫状态, 对其感染阶段做进一步的评估。

关键词: EB 病毒; 免疫球蛋白; T 细胞亚群

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2152-03

Analysis of immune function in children with EB virus EBV-IgM positive patients

Chen Gang, Zhang Wei, Hu Dong, Zhuang Lidong, Wu Qian, Xiang Lixian

(Department of Clinical Laboratory, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract:Objective To explore children infected immune functional state and change. **Methods** using nephelometry in 58 cases of EBV-IgM positive children serum immunoglobulin, T lymphocyte subsets CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ blood flow cytometry peripheral detection at the same period, 50 cases of healthy children as control group in the same index. **Results** EBNA-IgG negative group of children IgG, IgA was EBNA-IgG positive group and control group decreased significantly, the difference was statistically significant($P < 0.05$), The EBNA-IgG negative group, EBNA-IgG positive group serum total IgM and control group compared, the difference was not statistically significant($P > 0.05$). The EBNA-IgG negative group of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ in children with EBNA-IgG positive group and control group decreased significantly, the difference was statistically significant($P < 0.05$), while CD8⁺ was the EBNA-IgG positive group and the control group increased significantly, the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** EBNA-IgG positive immune function of children with close to healthy group is better than that of EBNA-IgG negative group, the emergence of EBNA-IgG status on immune function of children do preliminary assessment, through the detection of immunoglobulin and T cell subsets, B lymphocyte ratio can understand the immune state of children's infection, further evaluation of infection phase.

Key words: EB virus; immunoglobulin; T cell subsets

EB 病毒(EBV)属疱疹病毒家族, 是儿科常见的一种病毒性疾病。根据血清学调查, 我国 3~5 岁儿童的 EBV VCA-IgG 抗体阳性率达近 90%^[1], 是引起学龄前儿童发热的一种常见病原体。B 细胞是原发性 EB 病毒感染最初靶细胞, 也是病毒在体内建立持续感染的终身潜伏场所。EBV 感染可直接引起传染性单核细胞增多症(IM), 还与人类几种常见的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。细胞免疫在对 EB 病毒活化的监视和清除受感染的靶细胞中起着关键性作用, 研究提示 EB 病毒感染的细胞免疫功能不足和缺乏是发生肿瘤主要原因。本文通过检测 58 例 EBV-CA IgM 阳性的儿童 EBV 感染者外周血 T 淋巴细胞亚群以及血清免疫球蛋白, 并与相同时期的 50 例健康儿童比较, 观察 EB 病毒核心抗原 IgG(EBNA-IgG)阴性 EBV 感染儿童免疫功能状况的变化, 探讨其对患儿所处的临床时期和预后的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 7 月至 2014 年 2 月绵阳市中心

医院检验科检测的 EBV-CA IgM 阳性发热待诊儿童感染者血清 58 例, 无其他感染性、免疫性及系统性疾病, 分为 EBNA-IgG 阳性组 30 例, 男 11 例, 女 19 例; EBNA-IgG 阴性组 28 例, 男 13 例, 女 15 例, 年龄 2.5~7.5 岁, 平均(5.0±2.5)岁; 50 例健康儿童作为对照组, 其中男 25 例, 女 25 例, 年龄 2.5~8.0 岁, 平均(5.0±3.0)岁。两组年龄、性别构成等比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 样本采集 采集发热待诊儿童及对照组儿童清晨静脉空腹血 3 mL 于 BD 凝胶试管内, 用于 EB 病毒抗体和免疫球蛋白的检测; 抽取 EDTA-K2 抗凝血 1 mL 用于 T 细胞亚群的检测(于 2 h 内检测完毕)。

1.3 方法

1.3.1 EB 病毒抗体的检测 应用德国 LIASION XL 全自动化学发光仪直接化学发光法及其配套试剂进行 EB 病毒抗体检测, 判定标准为 EBV-CA IgM > 20 U/mL 判为 EBV-CA IgM 阳性; EBNA-IgG ≤ 20 U/mL 判为 EBNA-IgG 阴性, EBNA-IgG > 20 U/mL 判为 EBNA-IgG 阳性。仪器操作严格按

照仪器 SOP 进行。

1.3.2 免疫球蛋白的检测 应用德国西门子 BNP 特定蛋白分析仪,采用免疫散射比浊法及其配套试剂进行免疫球蛋白检测,仪器操作严格按照仪器 SOP 进行。

1.3.3 淋巴细胞亚群检测 应用美国 BD 流式细胞仪(FACS caliber),采用流式细胞技术及其配套试剂检测各组 CD 抗原表达率。采外周静脉血 1 mL,肝素抗凝;取各种单克隆抗体 20 mL 与 100 μL 抗凝血混合室温避光放置 20 min;加 10 倍稀释溶血素 2 mL 室温避光放 10 min;1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;用磷酸盐缓冲液洗两遍,重悬细胞上机检测。仪器操作严格按照仪器 SOP 进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血清免疫球蛋白比较 EBNA-IgG 阴性组 IgA、IgG

明显低于 EBNA-IgG 阳性组 and 对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组血清免疫球蛋白比较(g/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IgG	IgA	IgM
EBNA-IgG 阳性组	30	9.93±2.83	1.18±0.43	1.63±0.75
EBNA-IgG 阴性组	28	7.70±2.68*	0.75±0.34*	1.54±0.75
对照组	50	10.8±2.95	1.22±0.77	1.46±0.97

* : $P < 0.05$,与其他两组比较。

2.2 各组外周血 T 淋巴细胞亚群比较 EBNA-IgG 阴性组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺较 EBNA-IgG 阳性组和对照组明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而 EBNA-IgG 阴性组 CD8⁺较 EBNA-IgG 阳性组和对照组明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组外周血 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞比较

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺ (%)
EBNA-IgG 阳性组	30	0.726 0±0.085 0	0.335 0±0.037 4	0.341 0±0.057 0	1.35±0.44	0.157 0±0.029 0
EBNA-IgG 阴性组	28	0.596 0±0.075 0 [#]	0.215 0±0.032 4 [#]	0.641 0±0.051 0 [#]	0.32±0.24 [#]	0.059 0±0.021 4 [#]
对照组	50	0.742 0±0.073 0	0.416 0±0.043 5	0.325 1±0.045 5	1.48±0.65	0.195 0±0.071 0

[#] : $P < 0.05$,与其他两组比较。

3 讨 论

EBV 感染在上呼感染者中吸道感染和肺炎占 60% 以上^[1]。婴幼儿 EBV 感染是传染性单核细胞增多症的主要病因。EBV 感染可呈自限性,大多预后良好,但其与鼻咽癌、淋巴瘤的相关及少数传染性单核细胞增多症伴有严重并发症越来越受重视。有研究表明,由于感染 EBV 的患儿细胞免疫功能的缺陷或不足很容易导致肿瘤的发生^[2],而直接影响到预后^[3-4]。通过检测血清 EBV-IgM 阳性可确定 EBV 是否为现症感染。通过检测 EBNA-IgG 是否阳性来区分感染后的不同时期,EBNA-IgG 一般为出现临床症状后 3~4 周出现,EBNA-IgG 阴性为初次 EBV 感染的初期,EBV-IgG 阳性为初次感染的末期(即恢复期)或既往感染后的再发感染中后期。检测 EBV 感染者血清免疫球蛋白和 T 细胞亚群、B 淋巴细胞的比例可了解感染者机体体液免疫和细胞免疫的状况。本研究免疫蛋白的结果提示 EBV 感染者在感染初期的体液免疫功能低下,随着感染的逐渐好转及控制,患者的免疫球蛋白也逐渐恢复到正常水平。细胞免疫提示 EBV 感染初期 T 细胞亚群的失衡,CD4⁺/CD8 明显下降。随着病毒的逐步清理,感染后期 T 细胞亚群的比例恢复正常。这些检测为在通过实验数据判断患儿的感染阶段提供了依据。

B 淋巴细胞是 EB 病毒的靶细胞,其表面有 EBV 受体,故在 EBV 感染时先受累,导致 B 细胞抗原性改变,使 B 细胞形成有 EBV 核抗原(EBNA),早期抗原(EA)及衣壳抗原(EBV-CA IgM)阳性的 B 细胞。激活 T 细胞转化为细胞毒性效应细胞,直接破坏携带 EBV 的 B 细胞。故 CD19⁺的 B 淋巴细胞损耗增多,感染初期下降明显^[5],与本文提示结果一致。本文还显示 EBV 感染者 CD4⁺辅助性 T 淋巴细胞数量下降,CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞的数量上升明显,因而导致 CD4⁺/CD8⁺倒置。一般认为 T 细胞活化增殖^[6]后通过 CD95-CD95L、颗粒

酶及穿孔素、TRAIL、肿瘤坏死因子等途径溶解感染的 B 细胞。且随着感染进行,B 细胞和 T 细胞之间的相互作用导致 T 细胞和巨噬细胞活性增强,从而阻碍 B 细胞增殖。CD4⁺ T 细胞能够辅助 B 细胞、细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)和其他免疫细胞的增殖及分化,调节体液免疫和细胞免疫。有文献^[7-9]认为,EBV 感染患儿急性期存在的免疫失衡原因可能是由于 CD4⁺ CD25⁺ Treg 数量降低及其转录因子 Foxp3 表达下调导致的免疫抑制功能不足所致。CD8⁺ T 细胞由 CTL 和抑制性 T 细胞组成,可直接杀伤靶细胞。Hoshino 等^[7]在对急性 EBV 感染的患儿连续抽血检验中发现,EBV 的量与特异性的 CD8⁺ T 细胞的量密切相关。Barbara 等^[8]利用酶免疫吸附斑点法(EIISPOIT)检测到裂解期肽即早期抗原 BMLFI 特异性 CD8⁺ CTL 具有很强的分泌 γ 干扰素的反应。提示 CD8⁺ T 细胞增殖对于病毒的清除有着重要的意义。T 细胞转化为细胞毒性效应细胞的增多,导致 T 细胞亚群的失衡,CD4⁺/CD8 明显下降。随着病毒的逐步清理,感染后期 T 细胞亚群的比例恢复正常。

EBNA-IgG 一般出现在临床症状后 3~4 周,大多数时患儿体液免疫和细胞免疫应逐渐恢复正常,但也有一小部分病例的数据和初次感染早期的患儿接近,研究者认为此部分病例可能是既往感染后的再发感染的早期或免疫力低下的初次反复持续感染,故依靠 EBNA-IgG 无法评估此时是否为恢复阶段。通过联合检测 EBV 抗体、免疫球蛋白和 T 细胞亚群、B 淋巴细胞比例可对儿童现症感染者的免疫状态和感染阶段做大致的评估:(1)EBNA-IgG 阴性、免疫功能低下为初次 EBV 感染的初期;(2)EBNA-IgG 阳性、免疫功能接近正常为初次感染的末期(即恢复期)或既往感染后的再发感染中后期;(3)EBNA-IgG 阳性、免疫功能低下可能是既往感染后的再发感染的早期或免疫力低下的初次反复持续感染。为临床(下转第 2155 页)

续表 1 β 地贫基因突变类型及构成比		
β 地贫基因型	n	构成比(%)
IVS-II-654 /N	40	20.83
-28/N	3	1.56
CD71-72/N	2	1.04
βE /N	1	0.52
-29/N	1	0.52
CD14-15/N	1	0.52
双重杂合子		
IVS-II-654/CD17	7	3.65
IVS-II-654/CD41-42	6	3.13
CD41-42/CD17	3	1.56
-28/CD17	2	1.04
IVS-II-654/-28	2	1.04
IVS-II-654/-32	1	0.52
CD41-42/CD71-72	1	0.52
CD41-42/βEM	1	0.52
CD41-42/-32	1	0.52
合计	192	100.00

表 2 β 地贫等位基因及构成比		
基因类型	等位基因数(n)	基因构成比(%)
CD17	95	41.30
CD41-42	63	27.39
IVS-II-654	56	24.35
-28	7	3.04
CD71-72	3	1.30
-32	2	0.87
βE	2	0.87
-29	1	0.43
CD14-15	1	0.43
合计	230	100.00

3 讨 论

据国内、外相关文献报道,β 珠蛋白基因突变类型有 360 种以上,且不同地区、种族的人群中基因突变类型存在差异^[4]。本研究中,研究人群主要来源于川南地区,319 例疑似地贫患

者中,检出 192 例 β 地贫携带者,其检出率为 60.1%,17 种 β 地贫基因突变类型共检出 9 种,其中,前 3 位分别是 CD17、CD41-42、IVS-II-654 型基因构成比分别为 41.3%、27.39%、24.35%。表明本地区主要类型为 CD17,与文献[5-6]研究具有相似性,而广西地区以 CD41-42 突变类型为主,有一定差异^[7]。

β-地贫临床上主要表现为慢性溶血性贫血,重症患者只能靠输血维持生命,但仍然难以存活至成年,并且目前尚无有效的治疗方法^[3]。因此,本病重在预防,应用基因检测技术进行产前诊断可有效预防重症地中海贫血患儿的出生。PCR 结合 RDB 技术成熟,是临床应用中检测 β 地贫的主要基因检测方法^[8]。本地区 β 地贫发病率较高,对其基因突变类型及构成比进行研究,积累及获取 β 地贫遗传流行病学资料,积极开展人群筛查,做好婚前指导,对避免重型患儿的出生有重要意义。

参考文献

[1] 麦凤鸣,颜双鲤.地中海贫血筛查指标的分析评价[J]. 中华全科医学,2013,11(3):350.

[2] 全国血红蛋白病研究协作组. 20 省、市、自治区 60 万人血红蛋白调查[J]. 中华医学杂志,1983,63(1):382-385.

[3] 吕福通,谢丹尼.地中海贫血的相关研究进展[J]. 中国计划生育学杂志,2013,21(7):490-493.

[4] Firdous N,Gibbons S,Modell B. Falling prevalence of beta-thalassaemia and eradication of malaria in the Maldives[J]. J Community Genet,2011,2(3):173-189.

[5] 李熙鸿,王晓阳,汪凤兰,等. 四川地区重型 β-地中海贫血患儿及双亲基因突变的研究[J]. 四川大学学报:医学版,2004,35(3):388-390.

[6] 杨夕,汪文明,安刚,等. 南川地区地中海贫血基因分型的分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(21):2830-2834.

[7] 何升,李东明,赖允丽,等. 2685 例贫血患儿 β-地中海贫血基因分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(4):29-33.

[8] Phylipsen M, Vogelaar IP, Schaap RA, et al. A new alpha(O)-thalassemia deletion found in a Dutch family(-(AW))[J]. Blood Cells MolDis,2010,45(2):133-135.

(收稿日期:2015-05-06)

(上接第 2153 页)
治疗和预后提供一定的依据。

参考文献

[1] 蒋陵岚,李启宇. 71 例婴幼儿 EB 病毒感染的临床特征分析[J]. 实用预防医学,2010,17(7):1369-1370.

[2] Delecluse I J,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.

[3] 黄志卓,谢正德,闫静,等. EB 病毒相关噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增生症患儿的 EB 病毒感染特征[J]. 实用儿科临床杂志,2012,20(3):181-183.

[4] 王伟杰,阮仙利. 小儿传染性单核细胞增多症免疫状态变化及临床意义[J]. 浙江中西医结合杂志,2012,22(4):299-300.

[5] 王亚军,王尚昆. 519 例小儿 EB 病毒感染临床分析[J]. 中国医学工程,2011,19(1):128-130.

[6] Scherrcnburg J,Piriou ER,Nanlohy NM,et al. Detailed analysis of Epstein-Barr vilus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses during infectious mononucleosis [J]. Ciln Exp ImmBnoI,2008,153(2):231-239.

[7] Hoshino Y,Nishikawa K,Ito Y,et al. Kinetics of Epstein-Barvrius load and virus-specific CD8⁺ T cell in acute infectious mononucleosis[J]. J clin Virol,2010,23(1):244-246.

[8] Barbara C,Mandvi B,Jacqueline B,et al. Prolonged illness after Infectious Mononucleosis is associated with altered immunity but not with increased viral load[J]. J Infect Dis,2006,193(5):664-671.

[9] 王强,王佐凤,董巍,等. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞及 Foxp3 在儿童传染性单核细胞增多症发病中的作用[J]. 中华妇幼临床医学杂志,2013,9(2):144-147.

(收稿日期:2015-02-22)