

淋巴细胞亚群检测在 CAEBV 与 IM 患儿鉴别诊断中的研究

张婧祎 章云霞

(十堰市妇幼保健院, 湖北十堰 442000)

摘要 目的: 研究淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测在慢性活动性 EB 病毒感染 (CAEBV) 与传染性单核细胞增多症 (IM) 患儿鉴别诊断中的应用价值。方法: 纳入 2017 年 4 月至 2019 年 4 月于我院收治的 102 例 EB 病毒 (EBV) 感染患儿为对象, 按疾病类型将其分为 CAEBV 组 (42 例) 和 IM 组 (60 例); 另选取同期入院的 60 例健康儿童为正常对照组。采集外周静脉血标本, 利用流式细胞术检测淋巴细胞亚群。观察三组淋巴细胞亚群及血常规检测结果, 并分析三组免疫球蛋白 A (IgA)、免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM) 水平, 判断淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测在 CAEBV 与 IM 患儿鉴别诊断中的应用价值。结果: CAEBV 组外周血 B 淋巴细胞、NK 淋巴细胞、CD₃⁺T 淋巴细胞、CD₄⁺T 淋巴细胞、CD₈⁺T 淋巴细胞、淋巴细胞计数均显著低于 IM 组和正常对照组 ($P < 0.05$), 且外周血白细胞计数显著低于 IM 组 ($P < 0.05$); IM 组外周血 B 淋巴细胞计数显著低于正常对照组 ($P < 0.05$), 且外周血 CD₃⁺T 淋巴细胞、CD₄⁺T 淋巴细胞、淋巴细胞、白细胞计数均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)。CAEBV 组和 IM 组 IgA、IgG 水平均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 但 IgM 水平较正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); CAEBV 组 IgA、IgG、IgM 水平较 IM 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 在 CAEBV 与 IM 患儿鉴别诊断中, 外周血淋巴细胞亚群水平检测具有指导作用, 而免疫球蛋白检测并无明显临床指导意义。

关键词 淋巴细胞亚群; 慢性活动性 EB 病毒感染; 传染性单核细胞增多症; 儿童

Study of lymphocyte subsets detection in differential diagnosis of CAEBV and im in children

Zhang Jingyi; Zhang Yunxia

(Shiyan maternal and child health care hospital, Shiyan, Hubei 442000)

Abstract Objective: To study the value of lymphocyte subsets and immunoglobulin detection in differential diagnosis between chronic active EBV infection (CAEBV) and infectious mononucleosis (IM). Methods: 102 children with EBV infection admitted to our hospital from April 2017 to April 2019 were divided into CAEBV group (42 cases) and IM group (60 cases) according to the type of disease; Another 60 healthy children admitted in the same period were selected as normal control group. Peripheral venous blood samples were collected and lymphocyte subsets were detected by flow cytometry. The lymphocyte subsets and blood routine test results of three groups were observed, and the levels of immunoglobulin A (IgA), G (IgG), M (IgM) in three groups were analyzed to determine the value of lymphocyte subsets and immunoglobulin detection in differential diagnosis between CAEBV and IM children. Results: The peripheral blood B lymphocyte, NK lymphocyte, CD₃⁺ T lymphocyte, CD₄⁺ T lymphocyte, CD₈⁺ T lymphocyte and lymphocyte count in CAEBV group were significantly lower than those in IM group and normal control group ($P < 0.05$), and the peripheral blood leukocyte count was significantly lower than that in IM group ($P < 0.05$); The peripheral blood B lymphocyte count in IM group was significantly lower than that in normal control group ($P < 0.05$), and the peripheral blood CD₃⁺ T lymphocyte, CD₄⁺ T lymphocyte, lymphocyte and white blood cell count were significantly higher than that in normal control group ($P < 0.05$). The levels of IgA and IgG in

收稿日期: 2020-8-18

作者简介: 张婧祎 (1975-11-2), 女, 本科, 十堰市妇幼保健院。

通讯作者: 章云霞。

CAEBV group and IM group were significantly higher than those in normal control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in IgM level between CAEBV group and IM group ($P > 0.05$); There was no significant difference in IgA, IgG and IgM levels between CAEBV group and IM group ($P > 0.05$). Conclusion: In the differential diagnosis between CAEBV and IM children, the detection of lymphocyte subsets in peripheral blood is of guiding significance, while the detection of immunoglobulin has no obvious clinical significance.

Key Words Lymphocyte subsets; Chronic active EB virus infection; Infectious mononucleosis; Children

EB病毒(Epstein-barr virus, EBV)属嗜人类淋巴细胞疱疹病毒,据报道,人群对EBV普遍易感,感染率超过90%,多发生于儿童时期,通常属隐匿感染,而青少年成人大多部分为既往感染,可终生携带^[1]。典型EBV初次感染主要表现为传染性单核细胞增多症(Infectious mononucleosis, IM),大部分呈自限性,临床预后情况较好;但基于遗传缺陷、免疫功能障碍或潜伏感染反复激活状况下,EBV感染可进展为淋巴瘤、慢性活动性EBV感染(chronic active Epstein-barr virus infection, CAEBV)、EBV相关噬血细胞综合征等,预后不良可能性较大^[2]。以往报道认为EBV感染会影响细胞介导的免疫反应,继发机体免疫功能紊乱,诱发或加重机体原发免疫缺陷,导致病情恶化,病死率较高^[3]。而EBV主要经感染B、T、NK淋巴细胞,影响免疫功能,故宿主对EBV免疫的应答功能状态与感染后疾病转归有关^[4]。目前IM、CAEBV作为临床中较为常见的EBV感染相关的非肿瘤性疾病,其与外周血淋巴细胞亚群的关系虽已有报道,但关于淋巴细胞亚群鉴别诊断二者的报道较少,故本文展开相关研究,旨在进一步明确该病发病机制,为临床诊治提供参考依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入2017年4月至2019年4月于我院收治的102例EBV感染患儿为对象,开展回顾性分析,获我院医学伦理委员会批准。按疾病类型,将入选的EBV感染患儿分为CAEBV组(42例)和IM组(60例),其中CAEBV组男24例,女18例,年龄5~12岁,平均(8.05±1.24)岁;IM组男33例,女27例,年龄4~10岁,平均(7.85±1.01)岁。另选取同期入院的60例健康儿童为正常对照组,男39例,

女21例,年龄4~11岁,平均(7.92±1.05)岁。三组性别、年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 诊断标准

参考《儿童主要非肿瘤性EB病毒感染相关疾病的诊断和治疗原则建议》中关于CAEBV和IM的临床诊断标准^[5]。

1.2.1 CAEBV 诊断标准

(1) IM样症状反复发作或持续90d以上;(2)具有明确的EBV感染;(3)排除免疫缺陷性疾病、肿瘤性疾病、自身免疫性疾病引起的上述临床表现。同时满足上述三项者,即可确诊。

1.2.2 IM 诊断标准

(1)临床指标:①咽炎、扁桃体炎;②发热;③颈淋巴结肿大;④眼睑水肿;⑤肝大;⑥脾大。(2)实验室指标:①双份血清抗EBV-VCA-IgG抗体滴度呈4倍以上升高状态;②血清抗EBV-VCA-IgG抗体呈阳性、抗EBV-VCA-IgM呈阴性;③血清抗EBV-VCA-IgM、抗EBV-VCA-IgG抗体均呈阳性,且抗EBV-NA-IgG呈阴性;④淋巴细胞计数增多 $\geq 5.00 \times 10^9/L$ 和(或)外周血异型淋巴细胞比例 $\geq 10\%$ 。符合任意3项临床指标及实验室指标中第4项或者任意3项临床指标及实验室指标中前3项中任意1项。

1.3 纳入标准

(1)CAEBV组和IM组:具有EBV现症感染证据;年龄 ≥ 4 岁,首次发病;入组6个月内未使用免疫抑制剂、糖皮质激素等;无发育畸形及其他基础疾病;临床资料完整;获患儿家属知情同意;(2)正常对照组:年龄 ≥ 4 岁,无任何家族遗传性疾病史、急慢性疾病史、感染及过敏性疾病史,获家属知情同意。

1.4 排除标准

(1) 非 EBV 感染所致 CAEBV、IM；(2) 同时存在其他病毒感染；(3) 伴心、脑、肝、肾及神经、循环系统等原发性疾病；(4) 伴黄疸、白血病。

1.5 方法

清晨空腹采集 2ml 静脉血于 EDTA-K₂ 抗凝管中备用，24h 内进行检测。(1) 淋巴细胞亚群检测：采用 FACSCalibur 型流式细胞仪及配套试剂（美国 Becton Dickinson 公司）检测外周血淋巴细胞亚群，即 B 淋巴细胞 (CD₃⁻CD₁₉⁺)、CD₃⁺T 淋巴细胞 (CD₃⁺)、CD₄⁺T 淋巴细胞 (CD₃⁺CD₄⁺)、CD₈⁺T 淋巴细胞 (CD₃⁺CD₈⁺)、NK 淋巴细胞 (CD₃⁻CD₁₆⁺CD₅₆⁺)。具体方法如下：取全血标本 50 μL，加入淋巴细胞亚群检测试剂荧光标记抗体，充分混匀后室温避光孵育 20min，后加入 1:10 蒸馏水稀释的 500 μL 溶血素，振荡混匀，室温避光孵育 15 min 后上机检测。(2) 血常规检测：采用 Cell-Dyn 3700 型血细胞分析仪及配套试剂（美国 Abbott 公司）检测白细胞计数和淋巴细胞计数。(3) 免疫球蛋白水平检测：采用酶联免疫吸附试验测定血清免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 水平，相关试剂盒均购自上海康郎生物科技有限公司。

1.6 观察指标

观察三组淋巴细胞亚群及血常规检测结果，并分析三组免疫球蛋白水平，判断淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测在 CAEBV 与 IM 患儿鉴别诊断中的应用价值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件处理上述数据，计数资料用百分率 (%) 表示，组间行 χ^2 检验；符合正态分布的计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析；不符合正态分布的计量资料用 M (P_{25} , P_{75}) 表示，多组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验，两两对比采用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组淋巴细胞亚群及血常规检测结果比较

CAEBV 组外周血 B、NK、T 淋巴细胞亚群 (CD₃⁺T、CD₄⁺T、CD₈⁺T)、淋巴细胞计数均显著低于 IM 组和正常对照组 ($P < 0.05$)，且外周血白细胞计数显著低于 IM 组 ($P < 0.05$)；IM 组外周血 B 淋巴细胞计数显著低于正常对照组 ($P < 0.05$)，且外周血 T 淋巴细胞亚群 (CD₃⁺T、CD₈⁺T)、淋巴细胞、白细胞计数显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 三组淋巴细胞亚群及血常规检测结果比较 【M (P_{25} , P_{75})， $\times 10^9/L$ 】

组别	B 淋巴细胞	NK 淋巴细胞	CD ₃ ⁺ T 淋巴细胞	CD ₄ ⁺ T 淋巴细胞	CD ₈ ⁺ T 淋巴细胞	淋巴细胞计数	白细胞计数
CAEBV 组 ($n=42$)	0.03(0.02, 0.05)	0.05(0.03, 0.07)	0.35(0.30, 0.76)	0.23(0.18, 0.37)	0.23(0.17, 0.24)	1.03(0.74, 1.33)	4.24(3.55, 5.43)
IM 组 ($n=60$)	0.04(0.03, 0.06) [⊙]	0.27(0.18, 0.46) [⊙]	8.50(6.75, 14.91) [⊙]	0.89(0.74, 1.24) [⊙]	7.14(5.64, 13.06) [⊙]	11.37(9.62, 15.24) [⊙]	16.67(14.24, 20.97) [⊙]
正常对照组 ($n=60$)	0.32(0.24, 0.40) ^{⊙⊙}	0.38(0.28, 0.54) [⊙]	2.03(1.78, 2.21) ^{⊙⊙}	0.89(0.51, 1.01) [⊙]	0.60(0.40, 0.71) ^{⊙⊙}	3.46(2.52, 4.47) ^{⊙⊙}	5.27(4.20, 6.22) [⊙]
H	41.250	31.063	47.054	45.321	26.057	44.635	37.156
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：与 CAEBV 组比较，[⊙] $P < 0.05$ ；与 IM 组比较，^{⊙⊙} $P < 0.05$

2.2 三组免疫球蛋白水平比较

CAEBV 组和 IM 组 IgA、IgG 水平均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)，但 IgM 水平较正常对照组比

较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；其中，CAEBV 组 IgA、IgG、IgM 水平较 IM 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 2。

表 2 三组免疫球蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$, g/L)

组别	IgA	IgM	IgG
CAEBV 组 ($n=42$)	5.06 ± 1.96	1.31 ± 0.37	14.60 ± 4.50
IM 组 ($n=60$)	5.33 ± 1.70	1.33 ± 0.39	14.50 ± 4.25
正常对照组 ($n=60$)	2.60 ± 0.64 ^①	1.30 ± 0.35	9.71 ± 2.04 ^②
<i>F</i>	58.892	0.101	32.743
<i>P</i>	0.000	0.904	0.000

注: 与 CAEBV 组比较, ^① $P < 0.05$; 与 IM 组比较, ^② $P < 0.05$

3 讨论

据报道, EBV 感染普遍流行, 国外累计感染率约为 95% 左右, 国内 EBV 既往感染率约为 90.0% 左右, 多发于婴幼儿时期或青春期, 感染后呈潜伏状态^[6-7]。而 CAEBV、IM 均属儿童非肿瘤性 EBV 感染疾病, 其中 CAEBV 临床表现复杂多样, 以间断或持续发热、肝脾肿大等 IM 样表现为主要特征, 还存在皮疹、腹泻、视网膜炎、心肌炎等症状; 而 IM 隐匿起病, 以咽扁桃体炎、发热、咽扁桃体炎等为典型症状。虽然 CAEBV 与 IM 的发病均与淋巴细胞亚群有关, 但目前鲜有关于淋巴细胞亚群检测在二者鉴别诊断中的应用报道^[8]。

本研究结果显示, CAEBV 组和 IM 组患儿外周血淋巴细胞亚群检测结果存在较大差异, 其中 IM 组患儿淋巴细胞计数显著升高, 以 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 淋巴细胞为主, 而 CD_8^+ T 淋巴细胞异常升高具明显代表性, 与 Salve S 等^[9]报道相似。上述结论表明, 患儿受 EBV 病毒入侵后出现淋巴细胞 (CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 淋巴细胞) 强烈反映, 三种淋巴细胞快速生长, 数量不断扩大, 导致异常 T 淋巴细胞形成, 而 CD_8^+ T 淋巴细胞受 EBV 影响后存在扩增, 加之其融细胞能力, 经释放大量细胞因子, 引起 IM。而 IM 组患儿外周血 CD_3^+ 、 CD_8^+ T 淋巴细胞计数异常升高, 预示患儿 EBV 感染后继发 T 淋巴细胞强烈反应, 大量扩增 T 淋巴细胞, 导致外周血中异常淋巴细胞形成。郑丽君等^[10]也证实典型 IM 大部分出现 CD_8^+ T 淋巴细胞扩增活化, 因具有较好的溶细胞能力, 故能有效识别并杀死因 EBV 感染的 B 淋巴细胞, 抑制其分化增殖, 经细胞因子大量释放诱发 IM。既往报道发

现 T 淋巴细胞活化增殖后经穿孔素、颗粒酶、肿瘤坏死因子及其相关凋亡诱导配体等途径使感染 B 淋巴细胞被溶解, 并随感染的不断加重, 经 B、T 淋巴细胞间相互作用, 能增强巨噬细胞及 T 淋巴细胞活性, 使 B 淋巴细胞增殖活化受抑; 而细胞毒性效应细胞由活化的 T 淋巴细胞转化而成, 能影响携带 EBV 的 B 淋巴细胞, 故急性感染期 B 淋巴细胞 (CD_{19}^+) 显著下降, 与本结论一致^[11]。另有报道发现 IM 患儿急性期 NK 淋巴细胞、 CD_4^+ T 淋巴细胞计数较健康儿童并无明显变化^[12]。而符佳等^[13]发现 IM 患儿 CD_4^+ T 淋巴细胞计数接近于健康对照组水平, NK 淋巴细胞计数呈轻度升高。陈春法等^[14]研究发现 IM 组急性期 CD_4^+ T 淋巴细胞计数显著低于健康对照组, NK 淋巴细胞计数较健康对照组无明显差异。分析造成上述差异的原因, 可能与患儿机体免疫系统、遗传背景、病毒等因素有关。

本研究发现, CAEBV 组外周血淋巴细胞计数、B 和 NK 淋巴细胞计数及 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 淋巴细胞均明显低于 IM 组和正常对照组, 与国内外报道^[15]相似。而 CAEBV 组 CD_3^+ 、 CD_8^+ T 淋巴细胞计数显著下降, 与 IM 组 CD_3^+ 、 CD_8^+ T 淋巴细胞计数改变特征相反, 预示 IM 患儿 CD_3^+ T 淋巴细胞高度活化、增殖, 有助于体内病毒清除; 而 CAEBV 组 B 和 NK 淋巴细胞计数、 CD_4^+ T 淋巴细胞明显下降, 提示 CAEBV 患儿存在 EBV 免疫缺陷, 病毒无法有效控制及清除, 机体免疫系统异常紊乱, 是诱发 EBV 慢性持续感染的重要机制。以往报道认为针对 CAEBV 患儿, 其 EBV 感染可侵入多种淋巴细胞 (如 B、T、NK 淋巴细胞等), 引起多种淋巴细胞不同程度增殖, 主要以某种淋巴细胞内 EBV-DNA 增殖为主, 预示 CAEBV 淋巴细胞增殖存在多克隆性^[16]。笔者认为, 清除 EBV 主要细胞为 CD_8^+ T 淋巴细胞, 以其为主型的患儿一旦 EBV 入侵全部 CD_8^+ T 淋巴细胞, 细胞增殖自多克隆可能进展为寡克隆或单克隆肿瘤样增殖, 引发淋巴瘤或白血病, 预后较差。而本研究中, 与正常对照组相比, CAEBV 组和 IM 组 NK 淋巴细胞计数均明显下降, 但 CAEBV 组下降幅度更大, 表明 IM 慢性期症状更为明显, 免疫功能损伤更为严重, 预示 CAEBV 患儿伴 EBV 免疫系统缺陷, 是诱发 CAEBV

的主要机制。

本研究发现, CAEBV 组和 IM 组血清 IgA、IgG 明显高于正常对照组, 预示患儿体内免疫反应强烈, 可能与人体免疫系统异性抗体相关。笔者认为, EBV 潜伏期较长, 经干扰机体可形成特异性抗体, 产生免疫复合物, 并刺激补体, 诱导免疫细胞被激活, 产生强大免疫效应, 最终损伤自身免疫系统。但这类免疫功能损伤是否与 EBV 感染或患儿自身免疫缺陷有关, 尚不明确, 有待今后深入研究。

综上, CAEBV 与 IM 患儿淋巴细胞亚群检测结果存在较大差异, 反映机体 EBV 感染后不同疾病预后免疫机制不一致, 在 CAEBV、IM 鉴别诊断中具有重要指导意义, 临床应引起足够重视。但本文因样本量偏小, 加之受检测过程差异, 导致结果可能存在一定偏倚, 有待今后进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 夏璐, 吴小平. EB 病毒与炎症性肠病[J]. 中国医师杂志, 2016, 18(9):1281-1284.
- [2] 荣婷婷, 王维维, 王娟娟, 等. EB 病毒感染患儿淋巴细胞亚群特征和 EBV DNA 载量分析[J]. 检验医学, 2018, 33(4):285-289.
- [3] 刘璐瑶, 孙金娇, 王晓川. EB 病毒感染的免疫机制研究进展[J]. 中国循证儿科杂志, 2017, 12(3):219-232.
- [4] 艾军红, 谢正德. EB 病毒免疫逃避机制研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(1):98-102.
- [5] 中华医学会儿科学分会感染学组, 全国儿童 EB 病毒感染协作组. 儿童主要非肿瘤性 EB 病毒感染相关疾病的诊断和治疗原则建议[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(8):563-568.
- [6] Liu X Q, Cohen J I. Epstein-barr virus (EBV) tegument protein BGLF2 promotes EBV reactivation through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J Virol, 2015, 90(2):1129-1138.
- [7] Kato S, Asano N, Miyatakata T, et al. T-cell receptor (TCR) phenotype of nodal Epstein-barr virus (EBV)-positive cytotoxic T-cell lymphoma (CTL): a clinicopathologic study of 39 cases[J]. Am J Surg Pathol, 2015, 39(4):462-471.
- [8] 吴小容, 王建林, 段子渊. 慢性活动型 EB 病毒感染的致病机理研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2016, 43(10):980-989.
- [9] Salve S, Carone AE, Fumi M, et al. Detection of Apoptotic Lymphocytes Through Sysmex XN-1000 As a Diagnostic Marker for Mononucleosis Syndrome[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(5):779-793.
- [10] 郑丽君, 吴梦, 张淑平, 等. 传染性单核细胞增多症患儿外周血淋巴细胞亚群的分布及意义[J]. 现代免疫学, 2017, 37(6):47-50.
- [11] 崔强华, 孙莉, 吴琳, 等. EB 病毒感染对儿童传染性单核细胞增多症 T 细胞亚群的影响[J]. 重庆医学, 2017, 46(25):41-43.
- [12] 于嘉, 任立红. 传染性单核细胞增多症研究进展[J]. 中国医师进修杂志, 2016, 39(5):475-478.
- [13] 符佳, 张玉凤, 朱欣欣, 等. 传染性单核细胞增多症外周血淋巴细胞亚群和免疫球蛋白变化特点分析[J]. 中国妇幼健康研究, 2018, 29(11):121-124.
- [15] 陈春法, 张文喜, 赵佳佳, 等. 传染性单核细胞增多症患儿血淋巴细胞亚群及 NK 细胞的变化分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(20):4727-4729.
- [16] Imajoh M, Hashida Y, Murakami M, et al. Characterization of Epstein-barr virus (EBV) BZLF1 gene promoter variants and comparison of cellular gene expression profiles in Japanese patients with infectious mononucleosis, chronic active EBV infection, and EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. J Med Virol, 2015, 84(6):940-946.
- [17] 谢静, 王焕玲, 邱志峰, 等. 成人传染性单核细胞增多症和慢性活动性 EB 病毒感染外周血淋巴细胞亚群分析[J]. 中华内科杂志, 2016, 55(6):455-459.