

传染性单核细胞增多症患儿调节性 T 细胞与 EB 病毒 DNA 浓度的相关性研究

李海霞, 陶永明, 赵秋霞, 王立和, 高晓鹏

(山西省运城市中心医院 儿内科, 山西 运城, 044000)

摘要: **目的** 探讨传染性单核细胞增多症(IM)患儿调节性 T 细胞水平的变化及其与 EB 病毒 DNA (EBV-DNA) 浓度的相关性。**方法** 选取 42 例 IM 患儿作为观察组, 30 例健康儿童作为对照组。采集 2 组儿童的空腹静脉血, 使用流式细胞术测定 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 表达值, 使用聚合酶链反应 (PCR) 法测定 EBV-DNA 浓度。对比 2 组的检测结果, 分析调节性 T 细胞水平与 EBV-DNA 浓度的相关性。**结果** 观察组患儿的 CD3⁺、CD8⁺ 水平均高于对照组, CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 水平均低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。观察组患儿的 EBV-DNA 阳性检出率为 85.71%, 高于对照组的 3.33%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。观察组患儿急性期的 EBV-DNA 含量为 $(76.62 \pm 5.10) \times 10^3$ copies/mL, 高于恢复期的 $(0.68 \pm 2.30) \times 10^3$ copies/mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。IM 患儿急性期的 EBV-DNA 浓度与 CD3⁺、CD8⁺ 水平均呈正相关, 与 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 水平均呈负相关。**结论** IM 患儿的调节性 T 细胞水平与 EBV-DNA 浓度呈负相关, 提示 IM 患儿在急性期普遍存在免疫调节功能紊乱, 且免疫功能紊乱程度与 EB 病毒感染量密切相关。

关键词: 调节性 T 细胞; EB 病毒 DNA; 传染性单核细胞增多症; 免疫功能; 相关性

中图分类号: R 373; R 512.7 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)15-098-04 DOI: 10.7619/jcmp.20211592

Study on the correlation between regulatory T cells and EB virus DNA concentration in children with infectious mononucleosis

LI Haixia, TAO Yongming, ZHAO Qiuxia, WANG Lihe, GAO Xiaopeng

(Pediatric Department of Internal Medicine, Yuncheng Central Hospital of Shanxi Province, Yuncheng, Shanxi, 044000)

Abstract: Objective To investigate the changes of regulatory T cell levels in children with infectious mononucleosis (IM) and its correlation with the concentration of Epstein-Barr virus DNA (EBV-DNA). **Methods** Forty-two children with IM were selected as observation group, and thirty healthy children as control group. The fasting venous blood samples of two groups were collected, and the expression values of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ were determined by flow cytometry, and the EBV-DNA concentration was determined by Polymerase Chain Reaction (PCR). The test results of the two groups were compared, and the correlation between the level of regulatory T cells and the concentration of EBV-DNA was analyzed. **Results** The CD3⁺ and CD8⁺ levels of the observation group were significantly higher than those of the control group, and the CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ levels were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). The positive detection rate of EBV-DNA in the observation group was 85.71%, which was significantly higher than 3.33% in the control group ($P < 0.05$). The EBV-DNA content in the acute phase of the observation group was $(76.62 \pm 5.10) \times 10^3$ copies/mL, and the EBV-DNA content in the recovery phase was $(0.68 \pm 2.30) \times 10^3$ copies/mL. EBV-DNA concentration in the acute phase of IM children was positively correlated with CD3⁺ and CD8⁺ levels,

and negatively correlated with $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+CD127^-$ levels.

Conclusion The level of regulatory T cells in children with IM is negatively correlated with the concentration of EBV-DNA, suggesting that there is a general immune regulatory dysfunction in children with IM in the acute phase, and the degree of immune dysfunction is closely related to the amount of EB virus infection.

Key words: regulatory T cells; Epstein-Barr virus DNA; infectious mononucleosis; immune function; correlation

传染性单核细胞增多症(IM)是一种由EB病毒感染引起的急性或亚急性全身性疾病,临床特征多为不规则发热、肝脾及淋巴结肿大、咽峡炎、周围血象出现异常淋巴细胞,临床结合实验室检查可确诊^[1]。IM好发于小儿时期,且一年四季都可发病,应用抗生素治疗无效,而使用抗病毒药物治疗有效。IM可引起消化、呼吸、神经、血液、泌尿等多系统损害,严重者还可能引发肿瘤,再加上其临床症状多样,早期较易发生漏诊、误诊^[2]。人体中存在辅助性T细胞1(Th1)、辅助性T细胞2(Th2)、辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)4类T细胞亚群,其中Treg是具有抑制性作用的负调控功能细胞,其在人体中发挥维持自身免疫稳定、预防自身免疫性疾病等重要作用。报道^[3]显示,这类T细胞除与免疫性疾病有关,还与移植、感染等密切相关。本研究探讨IM患儿的Treg水平变化及其与EB病毒DNA(EBV-DNA)浓度的相关性,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院在2018年8月—2020年8月收治的42例IM患儿作为观察组。纳入标准:符合IM的诊断标准^[4]者;初次发病者;未应用过糖皮质激素类药物、细胞毒性药物或免疫调节剂者;患儿家属对本研究知情同意,并签署知情同意书。排除标准:非首次发病者;合并其他病毒感染者;近期应用过免疫抑制剂或糖皮质激素类药物者。其中男23例,女19例,年龄3~12岁,平均 (5.3 ± 2.1) 岁。另选取同期进行健康体检的30例健康儿童作为对照组,对照组儿童无任何过敏性疾病史或感染史,其中男19例,女11例,年龄2~11岁,平均 (4.8 ± 1.7) 岁。2组儿童的性别构成比、年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

标本采集:2组受检儿童均在清晨空腹状态

下采血。2组使用真空采集管采集1 mL外周静脉血,使用EDTA抗凝管保存,快速送至流式细胞室进行T细胞检测。观察组患儿还需采集2 mL外周静脉血,以EDTA抗凝管保存,送至PCR室进行EBV-DNA检测。观察组患儿在急性期进行T细胞亚群与EBV-DNA浓度检测,在恢复期进行1次EBV-DNA浓度检测。

主要仪器:美国BD公司生产的FACSCanto II型流式细胞仪;科大创新股份有限公司生产的KD640型低速离心机;姜堰新康医疗器械有限公司生产的XK96-B快速混匀器、微量移液器;北京鑫诺美迪公司生产的ABI-7300实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)仪。检测试剂包括PerCP(多甲藻红素-叶绿素)标记的CD45单克隆抗体, FITC(异硫氰酸荧光素)标记的CD4单克隆抗体, PE(藻红蛋白)标记的CD127、CD8单克隆抗体, APC(别藻蓝蛋白)标记的CD3、CD25单克隆抗体,溶血素,均由美国BD公司提供。EB病毒核酸扩增荧光定量检测试剂盒由中山大学达安基因股份公司提供。

检验方法:(1) T细胞亚群。检测前先确认标本是否凝血,凝血标本需重新采血、处理。对标本进行编号,放入试管架。在试管中分别加入单克隆抗体 A: CD4-FITC/CD8-FE/CD45-PerCP/CD3-APC, B: CD4-FITC/CD127-PE/CD45-PerCP/CD25-APC, 各10 μ L。每支试管中加入20 μ L抗凝全血,混合后避光孵育20 min。在每支试管中加入90 μ L红细胞裂解液,孵育15 min,使红细胞充分裂解。加入0.5 mL生理盐水,离心5 min(转速1 000 r/min),摒弃上清液。剩余液体加入适量生理盐水,用流式细胞仪进行检测,测定 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ 、 $CD4^+CD25^+CD127^-$ 比例。(2) EBV-DNA: ① 阴性质控品处理。以8 000 r/min的速度离心5 s,吸取50 μ L液体加入灭菌离心管(0.5 mL)中,加入DNA提取液混合均匀,100 $^{\circ}$ C恒温处理10 min,离心备用。②

标本处理。取 1 mL 全血标本加入 1 mL 生理盐水混合。另取试管加淋巴细胞分离液,将稀释后的全血移至加有淋巴细胞分离液的试管中,离心后吸取白细胞层,离心保留沉淀物,加入 DNA 提取液,恒温处理,再次离心备用。③ 临界阳性质控品与强阳性质控品处理。方法均与阴性质控品处理方法相同。④ 聚合酶链反应 (PCR) 扩增。取若干 PCR 反应管,各加入 2 μ L 处理后的标本、阴性质控品、临界阳性质控品、强阳性质控品或阳性定量参考品,离心后放入仪器样品槽中进行检测,记录检测结果。以 5×10^2 copies/ μ L 为检测极限值,若检测数值超过该极限值则判定为阳性。

1.3 统计学方法

研究数据运用 SPSS 20.0 软件进行处理,计

数资料以 $[n(\%)]$ 表示,行卡方检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验,相关性分析采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T 细胞亚群

观察组患儿的 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 水平均高于对照组, $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD4^+ CD25^+$ 、 $CD4^+ CD25^+ CD127^-$ 水平均低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

流式细胞散点图显示,IM 患儿 $CD3^+ CD4^+$ T 淋巴细胞占 $CD3^+$ T 淋巴细胞的百分比为 25.3% (图 1),正常儿童 $CD3^+ CD4^+$ T 淋巴细胞占 $CD3^+$ T 淋巴细胞的百分比为 36.7% (图 2)。

表 1 2 组 T 细胞亚群检测结果对比

组别	$CD3^+ / \%$	$CD4^+ / \%$	$CD8^+ / \%$	$CD4^+ / CD8^+$	$CD4^+ CD25^+ / \%$	$CD4^+ CD25^+ CD127^- / \%$
观察组 ($n=42$)	$82.31 \pm 5.28^*$	$25.84 \pm 9.63^*$	$51.96 \pm 12.58^*$	$0.56 \pm 0.31^*$	$3.37 \pm 1.87^*$	$2.92 \pm 0.96^*$
对照组 ($n=30$)	65.65 ± 6.21	32.75 ± 6.74	24.68 ± 4.59	1.41 ± 0.46	7.62 ± 1.44	5.41 ± 1.58

与对照组比较, $*P < 0.05$ 。

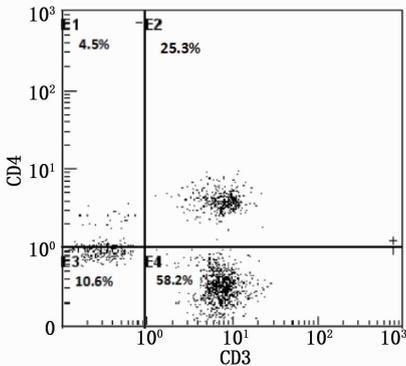


图 1 IM 患儿流式细胞散点图

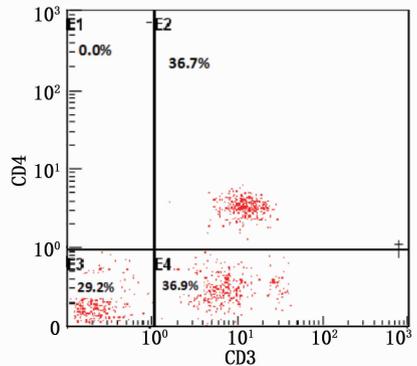


图 2 正常儿童流式细胞散点图

2.2 EBV-DNA 检测结果

观察组患儿的 EBV-DNA 阳性检出率为 85.71%、高于对照组的 3.33%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组 EBV-DNA 阳性检出情况 [$n(\%)$]

组别	n	EBV-DNA 阳性	EBV-DNA 阴性
观察组	42	36 (85.71)*	6 (14.29)
对照组	30	1 (3.33)	29 (96.67)

与对照组比较, $*P < 0.05$ 。

观察组患儿急性期的 EBV-DNA 含量为 $(76.62 \pm 5.10) \times 10^3$ copies/mL,恢复期的 EBV-DNA 含量为 $(0.68 \pm 2.30) \times 10^3$ copies/mL。观察组患儿急性期的 EBV-DNA 含量高于恢复期,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 相关性分析

IM 患儿急性期的 EBV-DNA 浓度与 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 水平均呈正相关关系,与 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD4^+ CD25^+$ 、 $CD4^+ CD25^+ CD127^-$ 水平均呈负相关关系。见表 3。

3 讨论

EB 病毒为疱疹病毒属,为嗜淋巴细胞 DNA 病毒,具有明显的转化与潜伏特性。儿科多种疾病特别是发热性疾病的发生都与 EB 病毒感染有关。多数儿童在感染 EB 病毒后会表现为 IM,一些患儿还会因病情控制不当导致病情迁延不愈,或继发霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌、Burkitt 淋巴瘤等恶性疾病^[5]。

表 3 IM 患儿急性期 EBV-DNA 浓度与 T 细胞亚群的相关性分析

EBV-DNA	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻
相关系数 <i>r</i>	0.293	-0.406	0.169	-0.473	-0.655	-0.708
<i>P</i>	0.012	0.005	0.024	0.002	0.006	0.005

IM 的临床症状多样,且出现时间不确定,临床主要通过实验室检查和临床症状进行诊断,但是传统的外周血淋巴细胞检查、嗜异性凝集反应有一定的假阳性与假阴性率。BV 病毒特异性抗体检测有较高的灵敏度与特异性,但对一些免疫力低下或使用过免疫抑制剂的患儿难以获得准确的诊断结果。在分子生物学技术的持续发展下,PCR 技术在血清、血浆 EB 病毒 DNA 含量检测中的应用也越来越多^[6]。本研究结果显示,观察组患儿的 EBV-DNA 阳性检出率显著高于对照组,达到了 85.71%,说明 EBV-DNA 检测对 IM 有较高的灵敏度,是早期诊断 IM 的可靠方法。结果还显示,观察组患儿恢复期的 EBV-DNA 含量明显低于急性期,这可能是因为 IM 是一种自限性疾病,感染 BV 病毒的 B 淋巴细胞在不断增殖的过程中,也会释放病毒颗粒而引发一系列免疫反应,免疫反应可在 4~6 周后使 BV 病毒细胞明显减少,从而使疾病自愈。

CD3⁺ 是 T 细胞共同的表面标志,标记了所有 T 淋巴细胞。自然 Treg 主要为 CD4⁺ 细胞,其在外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞总数中占 5%~10%,发挥免疫调节作用,CD4⁺CD25⁺ 是 Treg 细胞的主要表型,CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 则是近期被发现的新型 Treg 标志物。除 CD4⁺ Treg 外,CD8⁺ Treg 在免疫调节中也发挥着重要作用,其能通过多种途径调控免疫应答,抑制自身免疫性疾病的发生,诱导移植耐受,并能发挥肿瘤免疫调节等作用。研究^[7]显示,IM 的发病过程中存在着明显的细胞免疫异常情况,这可能是因为人体感染 EB 病毒后,病毒在细胞内复制,细胞溶解后病毒被释放到血液中。因人体内 B 细胞中存在着 EB 病毒受体,所以血液中的 EB 病毒会最先感染 B 细胞,之后 T 细胞、NK 细胞相继受累,从而释放出大量的细胞因子。活化 B 细胞会刺激 CD8⁺ 细胞增殖,同时 B 细胞还会与 CD8⁺ 细胞结合而出现凋亡,使淋巴细胞呈现出自限性增殖特点。由此可见,对于 EB 病毒感染引起的 B 细胞增殖,CD8⁺ 细胞发挥着重要的抑制作用,而 CD4⁺ 细胞则能促进多种免疫细胞增殖,从而清除 EB 病毒。据此认为在 EBV 感染中,细胞免疫起着决定性作用,

CD4⁺/CD8⁺ 比值是临床用于反映人体免疫状态的重要指标,CD4⁺/CD8⁺ 比值降低通常预示着机体发生了免疫系统损伤。本研究结果显示,相比健康儿童,IM 患儿急性期的 CD3⁺、CD8⁺ 水平明显更高,而 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平明显更低。这一结果说明 EB 病毒感染使机体发生了强烈的 T 细胞反应,受 EB 病毒感染者的细胞免疫功能明显下降,这与相关文献^[8]报道结论相符。学者^[9]指出,IM 患儿普遍存在免疫调节功能紊乱,从而削弱了机体的抗病毒能力,这也是导致 IM 患儿病情加重的主要原因。在人体免疫细胞中,调节性 T 细胞是一群具有免疫抑制作用的免疫细胞,能对效应 T 细胞的过度活化发挥抑制作用,从而起到维持机体免疫稳定、避免自身免疫发生的作用。CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 在多种疾病的发病机制中都扮演着十分重要的角色,但是目前关于 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 与 EB 病毒感染相关性的报道还较少。本研究对 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 与 EB 病毒感染的关系进行探究,结果显示 IM 患儿外周血中的 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 比例明显低于正常儿童,这提示在 IM 发病过程中可能有 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 调节 T 细胞的参与。本研究还发现,CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 与 EBV-DNA 浓度有负相关关系。有文献^[10]报道,IM 患儿的 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 调节 T 细胞水平与 CD19⁺CD23⁺ 水平呈正相关,CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 可能会抑制 EB 病毒转化为永生细胞。EB 病毒在感染 B 细胞后,可诱发 CD23 持续表达,并促使其成为永生细胞,EB 浓度越高,永生细胞越多,由此也间接反映 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 能够对 EB 病毒发挥一定的抑制作用。

综上所述,IM 患儿的调节性 T 细胞水平与 EBV-DNA 浓度呈负相关,提示 IM 患儿在急性期普遍存在免疫调节功能紊乱,且免疫功能紊乱程度与 EB 病毒感染量密切相关。

参考文献

- [1] 陈树霞. 小儿传染性单核细胞增多症 68 例临床特点分析[J]. 世界复合医学, 2019, 5(12): 104-106.

绪,降低了患儿住院期间的生理应激性。

针对危急重症患儿的应用无间隙护理模式,可有效提高专科护理、危重患者护理、急救药品和器械、护理记录以及病房环境安全指标评分。这是因为无间隙护理模式在儿科急诊护理急救中形成安置-评估-静脉通道-体征监护-病史采集-心理干预护理,以及症状提取-针对处理-快速转移-交接护理-评估转移 2 条护理程序,使危急重症患儿始终接受、连续及有序的护理。护理人员和急诊医师密切配合,各司其职,规范了护理流程,使各个护理环节均能达到高质量。同时患儿及家属对无间隙护理中关于危急情况处理、护理技术、护理服务以及情感支持等方面评分显著提高,提示患儿及家属满意度有所提升,由此推测无间隙护理模式护理效果较好,提高了患儿及家属的就医满意度。

参考文献

- [1] 李欢,赵丽萍,石莹,等. 回归分析在儿科急诊治疗室管理中的应用[J]. 当代护士(上旬刊), 2018, 25(6): 32-34.
- [2] 刘美娟,胡婷,梁敏丽. 标准化沟通模式在儿科急诊院内转运中的应用[J]. 全科护理, 2016, 14(34): 3629-3630.

- [3] 王京,顾玲燕,王婷婷. 风险防范护理在儿科急诊输液中的应用[J]. 齐鲁护理杂志, 2021, 27(7): 134-136.
- [4] 胡君. 儿科急诊预检分诊系统实施效果的观察[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2018, 3(46): 61-61.
- [5] 张宁,林玉琴,叶剑琴. 急诊预检分诊智能化管理系统对急诊预检分诊质量的影响[J]. 护理实践与研究, 2019, 16(24): 152-154.
- [6] 王冬雁,张爽,夏颖,等. 无缝隙护理在极低出生体重儿脐静脉置管联合 PICC 中的应用效果分析[J]. 河北医药, 2018, 40(22): 3508-3511.
- [7] 廖红艳,陈云云. 无间隙个性化护理模式在急诊护理中的应用效果[J]. 职业卫生与应急救援, 2019, 37(3): 280-282.
- [8] 余良珍,李玲,李艳伟. 标准化急救护理流程在规范儿科急诊护士急救护理行为中的应用[J]. 中国护理管理, 2018, 18(9): 1226-1230.
- [9] 刘梅. 优化急诊护理流程对急性脑梗死患者急救效率的影响[J]. 中国实用医药, 2019, 14(9): 158-159.
- [10] 刘焱,孟倩倩,张洪磊,等. 急诊危重患者院内转运质量评价指标的构建[J]. 中华护理杂志, 2021, 56(3): 336-341.
- [11] 邢娴静. 无间隙护理模式应用于妇产科感染控制中的效果观察[J]. 吉林医学, 2020, 41(6): 1491-1492.
- [12] 曾淑玲,江丹玲. 分析急诊护理中无间隙个性化护理的效果[J]. 医学信息, 2020, 33(z1): 185-186.

(本文编辑:吕振宇)

(上接第 101 面)

- [2] 胡振华,樊一算,汪浩,等. 外周血 CD4⁺CD8⁻双阴性 T 细胞在小儿传染性单核细胞增多症患者中的表达[J]. 国际免疫学杂志, 2019, 42(5): 486-489.
- [3] 赵青松,方瑞,刘亢亢,等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞在儿童传染性单核细胞增多症的变化及作用[J]. 安徽医学, 2019, 40(2): 175-177.
- [4] 叶冬梅,张志伟,刘勇. 传染性单核细胞增多症的病理分期与鉴别诊断[J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(05): 421-424.
- [5] 樊亚楠,施逸怡,徐京杭,等. 274 例青少年和成人传染性单核细胞增多症患者肝损伤临床特征分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(3): 636-641.
- [6] 高荣理,陈垂婉,蔡翠珠,等. EBV 合并 CMV 感染的传染性单核细胞增多症患者 T 细胞免疫状态及炎症指标变化[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(19): 2975-2978.
- [7] SAKHARNOV N A, UTKIN O V, FILATOVA E N, *et al.*

Apoptosis-and survival-related gene mRNA profile in peripheral blood leukocytes in children with acute EBV infectious mononucleosis[J]. *Iimm*, 2020, 9(5/6): 723-734.

- [8] HOSAKA S, KOBAYASHI C, SAITO H, *et al.* Establishment of immunity against Epstein-Barr virus infection in a patient with CHARGE/complete DiGeorge syndrome after peripheral blood lymphocyte transfusion[J]. *Pediatr Transplant*, 2019, 23(4): e13424.
- [9] 张莉,朱红胜,马钧,等. 血清 ADA、LDH 及外周血淋巴细胞亚群比例联合检测对传染性单核细胞增多症的诊断价值[J]. 检验医学, 2020, 35(9): 881-884.
- [10] 祁正红,陈雪夏,林先耀,等. 传染性单核细胞增多症患者外周血淋巴细胞亚群、细胞因子、TLRs 的表达变化及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(12): 51-56.

(本文编辑:周娟)