

传染性单核细胞增多症患儿外周血 B 淋巴细胞中免疫抑制因子的表达及意义

谭艳芳 黄小平 姜涛 欧阳文献 唐莲 李双杰

作者单位: 410007 湖南长沙, 湖南省儿童医院肝病中心(谭艳芳、姜涛、欧阳文献、唐莲、李双杰)

410007 湖南长沙, 湖南省长沙市妇幼保健院儿科(黄小平)

通信作者: 李双杰, Email: lesjie62@vip.sina.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.04.013

【摘要】 目的 观察 4 种免疫抑制因子[程序性死亡受体-1(PD-1)、程序性死亡受体-1 配体(PD-L1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)、含 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白(TIGIT)]在传染性单核细胞增多症(IM)B 淋巴细胞上的表达水平及临床意义。**方法** 以 2017 年 4 月—9 月湖南省儿童医院收治的 IM 患者为研究对象(IM 组),急性期 59 例,恢复期 34 例,20 例健康体检儿童为正常对照组。采用流式细胞术分别检测 PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIGIT 在各组 B 淋巴细胞上的表达水平及急性期表达量与血浆/血清 EBV-DNA 含量的相关性。**结果** 与正常对照组比较,IM 急性期组患者的 PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIGIT 在 B 细胞上均显著升高[PD-1: 5.22(3.15)% 比 0.76(0.86)%, PD-L1: 7.80(5.29)% 比 0.87(0.09)%, CTLA-4: 4.23(6.21)% 比 0.52(0.28)%, TIGIT: 9.78(5.72)% 比 2.23(1.05)%, 均 $P < 0.05$]。IM 恢复期组 PD-L1、TIGIT 在 B 细胞上的表达较正常对照组明显升高[PD-L1: 4.43(6.27)% 比 0.87(0.09)%, TIGIT: 6.03(5.46)% 比 2.23(1.05)%, 均 $P < 0.05$],但其升高程度明显低于急性期组(均 $P < 0.05$)。对急性期 59 例患者抽血查 EBV-DNA 检测结果为 $(8.44 \pm 2.04) \times 10^5$ 拷贝/mL。相关性分析显示,IM 患者急性期 TIGIT 在 B 细胞上表达水平与 EBV-DNA 含量呈正相关($r = 0.371, P = 0.006$);而其余 3 个指标则无相关性,PD-1: $r = 0.049, P = 0.723$; PD-L1: $r = 0.068, P = 0.625$; CTLA-4: $r = 0.662, P = 0.659$ 。**结论** PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIGIT 在 IM 急性期表达上调,随着疾病恢复而表达有所下降,提示在 IM 发病中有一定作用;同时急性期 TIGIT 表达水平与血浆/血清 EBV-DNA 含量高低有关。

【关键词】 传染性单核细胞增多症; 程序性死亡受体-1; 程序性死亡受体-1 配体; 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4; 含 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白

Expression and clinical significance of immunosuppressive factor in children with infectious mononucleosis

Tan Yanfang, Huang Xiaoping, Jiang Tao, Ouyang Wenxian, Tang Lian, Li Shuangjie. Hepatopathy Center, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan, China (Tan YF, Jiang T, Ouyang WX, Tang L, Li SJ); Department of Paediatrics, Changsha Hospital for Maternal & Child Health Care, Changsha 410007, Hunan, China (Huang XP)

Corresponding author: Li Shuangjie, Email: lesjie62@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To observe the expression and clinical significance of four immunosuppressive factors [programmed death 1 (PD-1), programmed death 1 ligand (PD-L1), cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and T cell immunoreceptor with Ig and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory domains (TIGIT)] in B lymphocytes of patients with infectious mononucleosis (IM). **Methods** The IM patients admitted to the Hunan Children's Hospital from April 2017 to September 2017 were selected as research objects, including 59 cases in acute phase, 34 cases in recovery phase, and 20 healthy children as control group. Flow cytometry was used to detect the expression levels of PD-1, PD-L1, CTLA-4 and TIGIT in B lymphocytes of each group, and the correlation between the expression in acute phase and the contents of EBV-DNA in plasma/serum. **Results** Compared with the control group, PD-1, PD-L1, CTLA-4 and TIGIT were significantly increased on B cells in the acute phase of IM [PD-1: 5.22 (3.15)% vs. 0.76 (0.86)%, PD-L1: 7.80 (5.29)% vs. 0.87 (0.09)%, CTLA-4: 4.23 (6.21)% vs. 0.52 (0.28)%, TIGIT: 9.78 (5.72)% vs. 2.23 (1.05)%, all $P < 0.05$]. During the IM recovery phase, PD-L1 and TIGIT were obviously elevated on B cells [PD-L1: 4.43 (6.27)% vs. 0.87 (0.09)%, TIGIT: 6.03 (5.46)% vs. 2.23 (1.05)%, $P < 0.05$]. However, the degree of increase was significantly lower than that of acute stage, both $P < 0.05$. The EBV-DNA test results of 59 patients in acute phase were $(8.44 \pm 2.04) \times 10^5$ copy/mL. The correlation analysis showed

that in the acute phase of IM patients the expression level of TIGIT on B cells was positively correlated with EBV-DNA content ($r = 0.371$, $P = 0.006$), while there was no correlation among the other 3 indexes (PD-1: $r = 0.049$, $P = 0.723$; PD-L1: $r = 0.068$, $P = 0.625$; CTLA-4: $r = 0.662$, $P = 0.659$). **Conclusions** PD-1, PD-L1, CTLA-4 and TIGIT are up-regulated in the acute phase of the disease, and the expression decreases with the recovery of the disease. This study suggests that it may be involved in the pathogenesis of IM. At the same time, the expression level of TIGIT in acute phase is positively correlated with EBV-DNA content in plasma/serum.

【Key words】 Infectious mononucleosis; Programmed death 1; Programmed death 1 ligand; Cytotoxic T lymphocyte antigen 4; T cell immunoreceptor with Ig and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory domains

病毒感染后免疫异常是 EB 病毒(EB virus, EBV)相关感染性疾病的重要发病机制,免疫细胞表面表达的多种免疫抑制因子可抑制免疫细胞的增殖及活化、下调免疫反应从而达到免疫抑制的作用^[1]。本项目以健康儿童和传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)患儿为研究对象,动态监测免疫抑制检测点[如程序性死亡受体-1(programmed death 1, PD-1)及其配体(PD-L1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4)、含 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白(T cell Ig and ITIM domain, TIGIT)]在 IM 发病机制中的作用,为临床治疗提供科学理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2017 年 4 月—9 月湖南省儿童医院 59 例 IM 住院患者,分别于急性期和恢复期抽血,并签署知情同意书。另选本院 20 例健康体检儿童作为正常对照组,无 EBV 感染症状和体征,肝脏生化指标正常,按性别、年龄匹配。

1.1.1 IM 诊断标准 IM 诊断符合《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》^[2],既往无 EBV 感染史。

1.1.2 排除标准 合并其他器官基础疾病者及不合作者。

1.1.3 实验室确诊病例 符合下列临床指标中任意 3 项及实验室指标中第 1~3 项中任意一项。

1.1.3.1 临床指标 ① 发热;② 咽峡炎;③ 颈部淋巴结肿大;④ 脾脏肿大;⑤ 肝脏肿大;⑥ 眼睑水肿。

1.1.3.2 实验室指标 ① 抗 EBV-衣壳蛋白(viral capsid antigen, VCA)-免疫球蛋白 M(immunoglobulin M, IgM)和抗 EBV-VCA-IgG 抗体阳性,且抗 EBV 核心抗原(EB nuclear antigen, EBNA)-免疫球蛋白 G(IgG)阴性;② 抗 EBV-VCA-IgM 抗体阴性,但抗 EBV-VCA-IgG 抗体阳性,且为低亲和力抗体;③ 双份血清抗 EBV-VCA-IgG 抗体滴度升高 4 倍以上;④ 外周血异型淋巴细胞比例 ≥ 0.10 和(或)淋巴细胞计数(lymphocyte, Lym)升高($\geq 5.0 \times 10^9/L$)。

1.1.4 IM 表现

1.1.4.1 急性期 有发热、咽峡炎、颈部淋巴结肿大、肝脾肿大,白细胞计数升高($> 10 \times 10^9/L$)。

1.1.4.2 恢复期 体温正常持续 1 周以上和(或)发病 2 周以上、无咽峡炎、肝脏缩小等临床症状缓解。

1.2 实验方法

1.2.1 临床资料收集 详细记录临床各项资料,包括基线资料,如姓名、性别、年龄、热程(患者发热以腋温 $\geq 37.5^\circ\text{C}$ 为标准,从第 1 天开始计算,到体温恢复正常并稳定 48 h 为止;第 2 天 08:00 有发热则记为发热 1 d,无发热则不计入内)以及肝脏肿大(4 岁以下为 2 cm 以上、4 岁以上为可触及)、脾脏肿大(肋下 1 cm 以上)、转氨酶升高[丙氨酸转氨酶 > 40 U/L 和(或)天冬氨酸转氨酶 > 40 U/L]、EBV-DNA 定量(> 400 拷贝/mL 为升高)等临床症状、体征和实验数据。

1.2.2 EBV 抗体检测 抽取静脉血 2 mL,采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定 EBV 的 4 种抗体,包括早期抗原(early antigen, EA)-IgG、VCA-IgM、VCA-IgG 和 EBNA-IgG。

1.2.3 EBV-DNA 含量 标本为血浆或血清,采用荧光定量聚合酶链反应系统进行检测(正常参考范围: < 400 拷贝/mL)。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布的计量资料以中位数(四分位数间距)[$M(Q_R)$]表示;两变量间相关性分析,符合正态分布数据采用 Pearson 相关分析,符合非正态分布数据采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 59 例 IM 患者中男性 35 例(59.3%)、女性 24 例(40.7%);年龄 1 岁 1 个月~10 岁 10 个月;平均热程(6.02 ± 3.40)d;59 例中有 34 例于恢复期抽血复查(其余 25 例患儿因检测血标本不合格或出院时未抽血),故 IM 恢复期组共纳入 34 例。各组

年龄、性别比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), 说明有可比性。

2.2 3 组免疫抑制因子表达水平比较 与正常对照组比较, IM 患者急性期组 PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIGIT 在 B 淋巴细胞上表达水平均明显升高($P < 0.05$); 在 IM 恢复期组上述各指标均有所恢复, 其中 PD-L1、TIGIT 与正常对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。且恢复期组 PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIGIT 与急性期组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组免疫抑制因子在外周血 B 淋巴细胞上表达水平的比较 [$M(Q_R)$]

组别	例数(例)	PD-1(%)	PD-L1(%)
正常对照组	20	0.76(0.86)	0.87(0.09)
IM 急性期组	59	5.22(3.15) ^a	7.80(5.29) ^a
IM 恢复期组	34	1.27(1.20) ^b	4.43(6.27) ^{ab}
组别	例数(例)	CTLA-4(%)	TIGIT(%)
正常对照组	20	0.52(0.28)	2.23(1.05)
IM 急性期组	59	4.23(6.21) ^a	9.78(5.72) ^a
IM 恢复期组	34	1.78(1.65) ^b	6.03(5.46) ^{ab}

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IM 急性期组比较, ^b $P < 0.05$

2.3 免疫抑制因子在 IM 患者外周血 B 细胞上的表达水平与 EBV-DNA 定量的相关性 共 59 例急性期患儿查 EBV-DNA, 平均为 $(8.44 \pm 2.04) \times 10^5$ 拷贝/mL。相关性分析显示, EBV-DNA 定量与 PD-1、PD-L1 和 CTLA-4 表达无相关性, 但与 TIGIT 表达呈明显正相关。相关性分析公式如下: $Y = -235\,242.276 + 45\,480.922X$ ($r = 0.371$, $P = 0.006$)。见表 2, 图 1。

表 2 免疫抑制因子在 IM 患者外周血 B 细胞上表达水平与 EBV-DNA 定量的相关性

指标	r 值	P 值
PD-1	0.049	0.723
PD-L1	0.068	0.625
CTLA-4	0.662	0.659
TIGIT	0.371	0.006

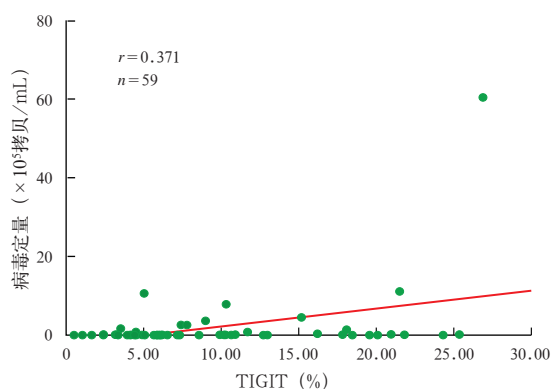


图 1 TIGIT 在 IM 患者 B 细胞上的表达水平与 EBV-DNA 定量的相关性

3 讨论

IM 是由 EBV 原发感染引起的急性感染性疾病, 临床上以发热、咽喉痛、眼睑浮肿、肝脾和淋巴结肿大及外周血出现异型淋巴细胞等为特征, 临床不典型病例逐渐增多, 给诊断和治疗带来一定的困难。EBV 主要累及 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞, 受感染的 B 淋巴细胞表明抗原发生变化, 生成 EBV 特异性抗原, 引起 T 淋巴细胞免疫应答而转化为 CD8⁺T 细胞, CD8⁺T 细胞能杀伤感染的 B 细胞, 有效清除 EBV, 从而导致 IM 一系列临床症状呈自限性^[3]。

以往研究显示, 免疫细胞表面存在正性刺激因子和免疫抑制因子表达, 其相互维持免疫应答和免疫耐受, 如果免疫抑制因子过表达, 与相应受体结合后, 就会产生抑制性信号, 从而下调免疫应答^[4]。另外, 婴幼儿时期 IM 典型病例很少, 主要原因是婴幼儿不能对 EBV 产生充分免疫应答, 因此, 宿主的免疫应答在病毒清除过程中起着非常重要的作用。

PD-1 主要在激活的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞中表达, 功能是抑制细胞的激活, 从而使细胞呈无反应性。PD-L1 是其配体, 在病毒感染、肿瘤及某些免疫系统疾病患者中表达上调, 形成免疫紊乱^[5]。研究表明, PD-1 与 PD-L1 结合在慢性乙型肝炎病毒感染中可以抑制效应 T 细胞的增殖和活化, 同时抑制细胞因子分泌, 为 HBV 逃避免疫应答发挥重要作用^[6]。本研究还显示, PD-1/PD-L1 在 IM 急性期表达上调, 形成免疫抑制, 而在恢复期较之前下降, 为细胞免疫功能的恢复发挥正向作用, 进一步造成病毒清除, 这与 IM 的发病进程相符, 由此推测 PD-1/PD-L1 可能在 EBV 复制和清除中发挥作用。

CTLA-4 是 T 细胞上的一种跨膜受体, 与 B7 分子结合后, 能诱导 T 细胞无反应性, 参与免疫反应的负调节, 抑制细胞免疫和体液免疫反应^[7]。Kared 等^[8]报道 CTLA-4 在慢性丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 患者外周血特异性 CD4⁺T 淋巴细胞上显著表达, 从而抑制其活化, 在使用相关阻断剂后特异性 CD4⁺T 淋巴细胞功能得以恢复, 证实 CTLA-4 高表达参与 HCV 持续感染。本研究表明, CTLA-4 在 IM 急性期表达上调, 推测其与配体结合后产生抑制性信号, 诱导机体免疫耐受, 从而促进 EBV 清除。

TIGIT 是一种新发现的免疫球蛋白超家族成员, 主要表达于活化的免疫细胞表面, 包括 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、辅助性 T 细胞和 NK 细胞等。有研究显示, TIGIT 可直接作用于 T 细胞, 抑制 T 细胞

活化,也可与抗原提呈细胞上的 PVR 结合,增强其分泌抗炎因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10),从而抑制 T 细胞应答^[9]。Fromentin 等^[10]的研究表明,CD4⁺T 细胞单个或联合表达 PD-1、TIGIT、LAG-3 在抗反转录病毒治疗中导致人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染持续加重。本研究显示,IM 患者急性期有 TIGIT 表达,通过与恢复期 34 例 IM 患者自身对照比较发现,急性期 TIGIT 在 B 细胞上的表达水平高于恢复期,差异有统计学意义,这与前面的研究结果相符。推测 TIGIT 在病毒的急性感染状态下过表达,造成免疫失调,随着疾病恢复和病毒逐渐被清除,机体免疫功能趋于正常,其表达量也随之下降,以上研究表明免疫细胞表面的 TIGIT 表达可能与 IM 疾病进展相关。

欧阳文献等^[11]报道全血 EBV-DNA 拷贝数在疾病恢复后会持续很长一段时间,故不建议判断 IM 病情时检测全血标本,宜使用血清或血浆标本,故本研究亦如此。已有研究显示,EBV-DNA 定量与 IM 病情的严重程度有一定的相关性,有助于该病的诊断^[12]。免疫反应失调可能造成 EBV 免于被自动清除,从而导致该病毒不断复制,甚至出现慢性感染的状态,由此估计细胞表面的免疫抑制因子过表达使其免疫应答下调,与 EBV-DNA 定量升高有关。因此本研究检测 TIGIT 在 B 淋巴细胞上的表达率并分析其与 EBV-DNA 定量的相关性,结果显示 TIGIT 在 B 细胞上的表达水平与 EBV-DNA 定量呈正相关,同时还显示, TIGIT 在 IM 急性期表达明显上调,形成免疫失调,最终导致 EBV 不能被有效清除,使 EBV-DNA 定量升高。当然,由于样本量有限,仍需进一步扩大样本量验证该结果。本研究也显示,IM 患者 EBV-DNA 定量越高,其临床症状越重,与以往

研究结果一致。TIGIT 是否可以作为重症 IM 的预测指标,后续实验还将进一步深入研究探索。

参考文献

- 1 Liu S, Zhang Q, Huang D, et al. Comprehensive assessment of peripheral blood TCR β repertoire in infectious mononucleosis and chronic active EBV infection patients [J]. Ann Hematol, 2017, 96(4): 665-680. DOI: 10.1007/s00277-016-2911-8.
- 2 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.08.002.
- 3 Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, et al. Anti-CCR4 monoclonal antibody mogamulizumab for the treatment of EBV-associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(19): 5075-5084. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0580.
- 4 Song Y, Wang B, Song R, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain contributes to CD8⁺ T-cell immunosenescence [J]. Aging Cell, 2018, 17(2): e12716. DOI: 10.1111/ace1.12716.
- 5 Kong X, Zhang Q, Lai Y, et al. Global patent landscape of programmed cell death 1: implications of the rapid expansion [J]. Expert Opin Ther Pat, 2018, 28(1): 69-80. DOI: 10.1080/13543776.2017.1378349.
- 6 申红玉,杭双熊,童学成,等. 抗病毒治疗对慢性 HBV 感染者外周血中 PD-1 和 PD-L1 的影响及其与血清 HBV-DNA 的关系[J]. 广东医学, 2015, 36(6): 870-873.
- 7 Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy [J]. Blood, 2018, 131(1): 58-67. DOI: 10.1182/blood-2017-06-741033.
- 8 Kared H, Fabre T, Bédard N, et al. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(6): e1003422. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003422.
- 9 Sasidharan NV, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells [J]. Immunol Cell Biol, 2018, 96(1): 21-33. DOI: 10.1111/imcb.1003.
- 10 Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, et al. CD4⁺ T Cells expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 contribute to HIV persistence during ART [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(7): e1005761. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005761.
- 11 欧阳文献,张慧,刘静,等. 儿童传染性单核细胞增多症临床特征及治疗的单中心研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(1): 12-16. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2018.01.003.
- 12 Niller HH1, Bauer G. Epstein-Barr virus: clinical diagnostics [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1532: 33-55. DOI: 10.1007/978-1-4939-6655-4_2.

(收稿日期: 2019-11-08)

(本文编辑: 张耘菲)

读者·作者·编者

本刊常用不需要标注中文的缩略语 (五)

γ -干扰素释放试验(interferon γ -release assay, IGRA)
总三碘甲状腺原氨酸(total tri-iodothyronine, TT₃)
总甲状腺素(thyroxine, TT₄)
游离三碘甲状腺原氨酸(free tri-iodothyronine, FT₃)
游离甲状腺素(free thyroxine, FT₄)
促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)
甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)
甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TGAAb)

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)
睡眠呼吸暂停综合征(sleep apnea syndrome, SAS)
睡眠呼吸暂停低通气指数(apnea hypopnea index, AHI)
平均血氧饱和度(average blood oxygen saturation, A-SpO₂)
最小血氧饱和度(minimum blood oxygen saturation, M-SpO₂)
急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)
手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)
降钙素原(procalcitonin, PCT)