

· 论 著 ·

EB 病毒和调节性 T 细胞检测在诊断儿童急性 B 淋巴细胞白血病中的意义

侯 森¹, 党小军², 刘晓良¹

(1. 陕西省商洛市中心医院检验科 726000; 2. 陕西省人民医院检验科, 西安 710068)

摘要:目的 探讨 EB 病毒(EBV)和调节性 T 细胞(Treg)检测在诊断儿童急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)中的意义。方法 2014 年 9 月至 2015 年 12 月收治的 45 例 B-ALL 纳入 B-ALL 组, 40 例健康体检儿童纳入对照组, 收集外周血标本, 流式细胞仪测定 Treg 平均荧光强度(MFI), ELISA 检测血浆抗 EBV VCA IgG、抗 EBV 核抗原(EBNA)IgG(潜伏感染), 抗 EBV VCA IgM(急性感染)。分析 B-ALL 组 EBV 感染情况和 Treg 比例变化及意义。**结果** B-ALL 组 Treg 比例与 FoxP3 MFI 明显高于对照组, 差异均有统计学意义($P=0.004, P=0.001$)。B-ALL 组中 EBV 急性感染、潜伏感染和血清学检查阴性者的年龄、性别、血红蛋白、血小板计数、白细胞计数和骨髓原始细胞比例比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。B-ALL 组潜伏感染者 Treg 比例和 FoxP3 MFI 均高于其他被试, 差异有统计学意义($P<0.05$); 对照组血清反应阴性者 Treg 比例和 FoxP3 MFI 均低于其他被试, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 其他类型被试 Treg 比例和 FoxP3 MFI 比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。Common-B-ALL 者较 pro-B-ALL 和 pre-B-ALL 者 Treg 比例减少, 差异有统计学意义($P=0.020$), 而 FoxP3 MFI 和 EBV 感染情况比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。EBV 潜伏感染评估对 B-ALL 发病风险的 OR 值为 4.060, 95%CI 为 1.21~13.64 ($P=0.020$), 即 EBV 潜伏感染是 B-ALL 发病的危险因素。**结论** EBV 潜伏感染和 Treg 比例升高在儿童 B-ALL 的诊断中具有重要意义, 潜伏感染是儿童 B-ALL 发病的危险因素。

关键词: EB 病毒; 调节性 T 细胞; 儿童; 急性 B 淋巴细胞白血病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.026 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)19-2766-03

Significance of EB virus and regulatory T cells in the diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia B

HOU Miao¹, DANG Xiaojun², LIU Xiaoliang¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shangluo City Hospital, Shangluo, Shaanxi 72600, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Shaanxi People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

Abstract: **Objective** To investigate the value of EB virus (EBV) and regulatory T cells (Treg) in the diagnosis of acute B-lymphocytes (B-ALL) leukemia in children. **Methods** A total of 45 cases with B-ALL were collected in B-ALL group from September 2014 to December 2015, 40 healthy children in control group, blood samples were collected, flow cytometry was used to detect mean fluorescence intensity (MFI) of regulatory T cells (Treg), ELISA was used to detect plasma anti-EBV VCA IgG, anti-EBV nuclear antigen (EBNA) IgG (latent infection), anti-EBV VCA IgM (acute infection). EBV infection and Treg ratio were analyzed in the two groups. **Results** Treg cell percentage and FoxP3 MFI in the B-ALL group was higher than those in the control group ($P=0.004, P=0.001$). Acute EBV infection, latent infection and serum serology negative age, sex, hemoglobin, platelet count, white blood cell count and bone marrow blast cell proportion in the B-ALL group had no significant differences ($P>0.05$). Treg ratio and FoxP3 MFI of EBV latent infection patients in the B-ALL group were higher than other objects ($P<0.05$), Treg ratio and FoxP3 MFI of serum negative patients in the control group were lower than other patients ($P<0.05$). The proportion of Treg in Common B-ALL patients decreased compared with pro-B-ALL and pre-B-ALL patients ($P=0.020$). Using EBV latent infection to assess the risk of B-ALL, OR was 4.060, 95%CI was 1.21-13.64 ($P=0.020$). **Conclusion** EBV latent infection and increased Treg are value for the diagnosis of acute B lymphoblastic leukemia, EB virus latent infection is a risk factor for acute B lymphoblastic leukemia in children.

Key words: EB virus; regulatory T cells; children; B acute lymphoblastic leukemia

EB 病毒(EBV)属于疱疹病毒科 γ 亚科, 是唯一可致人类感染的淋巴滤泡性病毒, 研究表明, EBV 感染与急性白血病等肿瘤的发生、发展密切相关^[1], 而 $CD4^+ CD25^+$ 调节性 T 细胞(Treg)比例的变化与急性白血病的免疫抑制机制相关^[2]。本研究探讨了 EBV 和 Treg 检测在诊断儿童急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 9 月至 2015 年 12 月陕西省商洛市中心医院和陕西省人民医院收治的 45 例 B-ALL 患儿纳入 B-

ALL 组, 40 例健康体检儿童纳入对照组。B-ALL 组中, 男 24 例, 女 21 例; 年龄 3~14 岁, 平均(8.41±3.60)岁; 血红蛋白为(7.01±1.20)g/dL; 血小板为(45.12±23.21)×10⁹/L; 白细胞计数为(24.72±8.41)×10⁹/L; 免疫表型分类: pro-B-ALL 12 例(26.67%), Common B-ALL 27 例(60.00%), pre-B-ALL: 6 例(13.33%); 累及中枢 2 例(4.44%)。根据血清学结果, B-ALL 组中潜伏感染[包括抗 EBV VCA IgG 和抗 EBV 核抗原(EBNA)IgG 阳性者]14 例(31.11%), 对照组中为 4 例(10.00%)。B-ALL 组中急性感染(抗 EBV VCA IgM 阳性

者)为 6 例(13.33%),对照组中 0 例。对照组中,男 22 例,女 18 例,年龄 4~14 岁,平均(8.26±3.51)岁,与 B-ALL 组比较,性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法 收集外周血标本,流式细胞仪测定 Treg 平均荧光强度(MFI),ELISA 检测血浆抗 EBV VCA IgG、抗 EBNA IgG(潜伏感染),抗 EBV VCA IgM(急性感染)。全自动生化仪检测血红蛋白、血小板、白细胞计数等生化指标。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理及统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料如符合正态分布采用 t 或 F 检验,如不符合正态分布或方差不齐采用非参数检验,取双侧检验。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2

检验;危险因素采用 logistic 回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 Treg 比例和 FoxP3 MFI 比较 B-ALL 组 Treg 比例与 FoxP3 MFI 明显高于对照组,差异均有统计学意义($P=0.004, P=0.001$),见表 1。

表 1 两组 Treg 比例和 FoxP3 MFI 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%)	FoxP3 MFI
对照组	10.61±2.63*	16.78±3.75
B-ALL 组	15.78±4.12*	30.16±7.12*

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

表 2 B-ALL 组不同感染状态的患儿一般情况比较

感染状态	n	年龄[n(%)]		男/女 (n/n)	血红蛋白 ($\bar{x}\pm s, g/dL$)	血小板计数 ($\bar{x}\pm s, \times 10^9/L$)	白细胞计数 ($\bar{x}\pm s, \times 10^9/L$)	骨髓原始细胞 (%)
		≤8 岁	>8 岁					
血清阳性的急性感染	6	4(66.67)	2(33.33)	3/3	6.21±1.82	41.46±18.23	27.23±9.21	67.52±15.01
血清阳性的潜在感染	14	6(42.85)	8(57.15)	8/6	7.02±1.31	49.56±29.10	25.26±8.71	71.84±13.60
血清阴性者	25	11(44.00)	14(56.00)	13/12	6.94±1.10	42.35±20.41	24.56±8.30	74.42±14.01
P		0.503		0.907	0.851	0.324	0.904	0.836

2.2 B-ALL 组不同感染状态患儿一般情况比较 B-ALL 组中 EBV 急性感染、潜伏感染和血清学检查阴性者的年龄、性别、血红蛋白、血小板计数、白细胞计数和骨髓原始细胞比例比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 两组不同感染状态的儿童 Treg 比例和 FoxP3 MFI 比较 B-ALL 组潜伏感染者 Treg 比例和 FoxP3 MFI 均高于 B-ALL 组其他患者及对照组被试,差异有统计学意义($P<0.05$),对照组血清反应阴性者 Treg 比例和 FoxP3 MFI 均低于对照组其他被试及 B-ALL 组患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。其他人 Treg 比例和 FoxP3 MFI 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

2.4 不同免疫表型患者 Treg 比例、FoxP3 MFI 和 EBV 感染情况比较 Common-B-ALL 者较 pro-B-ALL 和 pre-B-ALL 者 Treg 比例减少,差异有统计学意义($P=0.020$),而 FoxP3 MFI 和 EBV 感染情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

2.5 EBV 潜伏感染对 B-ALL 发病风险评估 EBV 潜伏感染

评估对 B-ALL 发病风险的 OR 值为 4.060,95%CI 为 1.21~13.64($P=0.020$),即 EBV 潜伏感染是 B-ALL 发病的危险因素。

表 3 两组不同感染状态的儿童 Treg 比例和 FoxP3 MFI 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%)	FoxP3 MFI
B-ALL 组			
急性感染	6	14.31±1.72* Δ	26.81±8.02* Δ
潜伏感染	14	19.56±4.90 Δ	34.41±9.30 Δ
血清反应阴性	25	15.93±2.81* Δ	27.01±6.30* Δ
对照组			
潜伏感染	4	13.02±2.20* Δ	25.71±3.62* Δ
血清反应阴性	36	9.21±2.56*	15.91±3.51*

注:与 B-ALL 组潜伏感染者比较,* $P<0.05$;与对照组血清反应阴性者比较, $\Delta P<0.01$ 。

表 4 不同免疫表型患者 Treg 比例、FoxP3 MFI 和 EBV 感染情况比较[n(%)]

免疫表型	n	D4+CD25 ⁺ Treg 比例		FoxP3 MFI		EBV 感染情况		
		≤15.00%	>15.00%	≤30	>30	急性感染	潜伏感染	血清阴性
Pro-B-ALL	12	3(25.00)	9(75.00)	5(41.67)	7(58.33)	2(16.67)	6(50.00)	4(33.33)
Common-B-ALL	27	17(62.96)	10(37.04)	15(55.60)	12(44.40)	3(11.10)	5(18.50)	19(70.40)
Pre-B-ALL	6	1(16.67)	5(83.33)	2(33.33)	4(66.67)	1(16.67)	3(50.00)	2(33.33)
P			0.020		0.501			0.171

3 讨 论

EBV 属于 IV 型人类疱疹病毒,为双链 DNA 致瘤性病毒,基因组含 172 000 个碱基,在多种淋巴瘤或上皮样恶性肿瘤(如白血病、鼻咽癌和霍奇金淋巴瘤等)中可检测到^[3]。90% 的成人均受过 EBV 感染,且为终生携带者。EBV 的主要传播媒介为口腔黏膜分泌物和输血^[4]。EBV 初次感染即可呈潜伏感染状态,其基因组出现闭合环状,且以形成附加体于细胞染色体外游离,因此给宿主细胞带来一定的生存优势。由 EBV 编码的非编码 RNA,是 EBV 潜伏感染细胞中表达最多的转录产

物^[5]。EBV 主要侵袭人体 B 型淋巴细胞和鼻咽部上皮细胞^[6],其存在于受感染的细胞中主要有 2 种方式,一种为产病毒感染,即以线型状分子插入到宿主细胞的染色体 DNA 中,可进行完整的 DNA 复制、转录翻译等过程,并进行病毒装配,随后释放病毒颗粒,使细胞发生裂解。另一种方式为潜伏感染,即以环状分子的形式于细胞染色体 DNA 外游离,随着细胞分裂的进行而一直存在于细胞中,并不释放病毒颗粒^[7],一旦静止状态的病毒被活化就可导致包括肿瘤在内的诸多疾病的发生、发展,或者因宿主免疫功能降低时,潜伏于 B 淋巴细

胞中的 EBV 就可大量增殖而导致疾病的发生^[8]。本研究中,总的潜伏感染数在 B-ALL 组中占 31.00%,不同免疫表型患者 EBV 感染情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而 B-ALL 组中 EBV 急性感染、潜伏感染和血清血清学检查阴性者的年龄、性别、血红蛋白、血小板计数、白细胞计数和骨髓原始细胞比例比较,差异也无统计学意义($P>0.05$),可能还需多中心大样本的数据以进一步研究。

Treg 是具有免疫调节功能的 CD4⁺T 细胞亚群之一,能抑制肿瘤特异性 T 细胞参与抗肿瘤应答的调节^[9]。研究表明,肿瘤发生、发展的关键机制在于人体抗肿瘤免疫应答功能低下,导致肿瘤细胞逃避免疫监视及清除^[10]。CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 主要通过细胞间接触或分泌其特异性细胞因子的形式使抗肿瘤效应细胞的发育与活化受抑制,Treg 对抗肿瘤的抑制作用是使肿瘤免疫逃逸发生的重要因素^[11]。

既往研究表明血液恶性肿瘤与多种实体瘤的 Treg 功能或数量异常^[12]。FoxP3 是 Treg 特异性转录因子,在 Treg 分化、成熟和功能维持中起到关键作用^[13]。有研究发现,EBV 潜伏感染时 Treg 比例较急性感染是增加,提示潜伏感染时的免疫抑制状态较急性感染时更甚^[14-15]。本研究中,B-ALL 组 Treg 比例和 FoxP3 MFI 高于对照组,其差异均具有统计学意义($P<0.05$)。B-ALL 组中潜伏感染者 Treg 比例和 FoxP3 MFI 均高于 B-ALL 组及对照组其他被试,对照组血清反应阴性者 Treg 比例和 FoxP3 MFI 均低于 B-ALL 组及对照组其他被试,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Common-B-ALL 者较 pro-B-ALL 和 pre-B-ALL 者 Treg 比例减少。

综上所述 EBV 潜伏感染是 B-ALL 发病的危险因素。Treg 比例与儿童 B-ALL 表型密切相关,且 EBV 潜伏感染时其细胞比例最高,且潜伏感染为其发病的危险因素,因此,在儿童 B-ALL 中检测 EBV 和 Treg 具有重要意义,可在临床进一步推广。

参考文献

- [1] Pan H, Feng DN, Song L, et al. Acute myeloid leukemia following etoposide therapy for EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report and a brief review of the literature[J]. BMC Pediatr, 2016, 16: 116.
- [2] Pavlovic A, Glavina Durdov M, Capkun V, et al. Classical hodgkin lymphoma with positive Epstein-Barr virus status is associated with more FOXP3 regulatory T cells[J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 2340-2346.
- [3] 赖辉红, 马廉. EB 病毒相关恶性肿瘤研究进展[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2013, 18(6): 245-249.
- [4] 张征, 刘德良. EB 病毒相关胃癌的研究进展[J]. 医学临床研究, 2015, 32(5): 986-992.

- [5] Yui S, Yamaguchi H, Imadome K, et al. Epstein-Barr virus-positive T-cell lymphoproliferative disease following umbilical cord blood transplantation for acute myeloid leukemia[J]. J Nippon Med Sch, 2016; 83(1): 35-42.
- [6] 林涛, 陈焕辉, 陈翊, 等. 儿童急性白血病与 TORCH 和 EB 病毒感染[J]. 中国妇幼健康研究, 2015, 26(6): 1207-1211.
- [7] Higuchi M, Sasaki S, Kawadoko S, et al. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma following acute myeloid leukemia: a Common clonal origin indicated by chromosomal translocation t(3; 4)(p25; q21)[J]. Int J Hematol, 2015, 102(4): 482-487.
- [8] Barberi W, Perrone S, Iori AP, et al. Proven Epstein-Barr encephalitis with negative EBV-DNA load in cerebrospinal fluid after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a child with acute lymphoblastic leukemia[J]. Pediatr Transplant, 2015, 19(1): E19-24.
- [9] 牟冠男, 徐雯. 调节性 T 细胞在急性髓细胞白血病中的作用[J]. 国际免疫学杂志, 2013, 36(2): 106-110.
- [10] 陆春伟, 佟海侠, 王秋实. 恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 医学临床研究, 2011, 28(1): 17-23.
- [11] Manlove LS, Berquam-Vrieze KE, Pauken KE, et al. Adaptive Immunity to Leukemia Is Inhibited by Cross-Reactive Induced Regulatory T Cells[J]. J Immunol, 2015, 195(8): 4028-4037.
- [12] 王纓, 王国兵, 文飞球, 等. 儿童急性 B 淋巴细胞白血病 CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺调节性 T 细胞亚群改变及意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34(3): 194-198.
- [13] Tian T, Yu S, Liu L, et al. The profile of T helper subsets in bone marrow micro environment is distinct for different stages of acute myeloid leukemia patients and chemotherapy partly ameliorates these variations[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131761.
- [14] Ji J, Yuan Z, Zhang X, et al. Detection for pathway effect contributing to disease in systems epidemiology with a case-control design[J]. BMJ Open, 2015, 5(1): e006721.
- [15] Duppach J, Francois S, Joedicke JJ, et al. Expanded regulatory T cells in chronically friend retrovirus-infected mice suppress immunity to a murine cytomegalovirus superinfection[J]. J Virol, 2014, 88(23): 13892-13896.

(收稿日期: 2016-03-25 修回日期: 2016-05-18)

(上接第 2765 页)

- 板生成素联合地塞米松治疗原发免疫性血小板减少症的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(3): 628-630.
- [12] 袁冬冬, 凌云, 陈学敏, 等. 大剂量地塞米松治疗成人原发性免疫性血小板减少症的效果[J]. 江苏医药, 2013, 39(3): 332-334.
 - [13] 熊琼英, 杨晓红, 鲍引娣. 344 例妊娠期血小板减少合并肝功能异常临床分析[J]. 中华全科医学, 2015, 13(8):

1286-1287.

- [14] Habas E, Rayani A, Ganterie R. Thrombocytopenia in hypertensive disease of pregnancy[J]. J Obstet Gynaecol India, 2013, 63(2): 96-100.
- [15] 孙淑川, 刘娟娟. 100 例妊娠期血小板减少症孕妇的分娩结局分析[J]. 河北医学, 2011, 17(10): 1324-1326.

(收稿日期: 2016-03-10 修回日期: 2016-05-19)