

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.12.009  
文章编号: 1005-8982(2020)12-0051-06

## 传染性单核细胞增多症患儿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

祁正红, 陈雪夏, 林先耀, 赵仕勇  
(杭州市儿童医院 感染科, 浙江 杭州 310014)

**摘要:目的** 检测 Epstein-Barr 病毒(EBV)感染的传染性单核细胞增多症(IM)患儿外周血淋巴细胞亚群、细胞因子及 Toll 样受体 7(TLR7)、TLR9 的表达变化及其临床意义。**方法** 选取 2019 年 1 月—2019 年 12 月杭州市儿童医院收治的 98 例感染 EBV 致 IM 急性期患儿作为研究对象, 另外选择 50 例 EBV 感染阴性儿童作为对照组。采用流式细胞术和酶联免疫吸附试验分别检测 IM 患儿急性期、恢复期(病程满 1 个月复查)外周血淋巴细胞亚群和细胞因子水平。另外分离外周血单个核细胞(PBMC), 采用 qRT-PCR 检测 TLR7 和 TLR9 mRNA。**结果** 与对照组比较, IM 急性期患儿外周血 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、IL-8、IL-10、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量升高( $P < 0.05$ ); CD4<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> 降低( $P < 0.05$ )。IM 急性期患儿 EBV DNA 载量与血清 IL-1 $\beta$ 、TLR9 mRNA 呈正相关( $r_s = 0.247$  和  $0.348$ ,  $P < 0.05$ ), 与其他指标无关( $P > 0.05$ )。IM 患儿在恢复期时, 外周血 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量降低( $P < 0.05$ ); CD4<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> 升高( $P < 0.05$ )。**结论** 监测 IM 患儿外周血淋巴细胞亚群、细胞因子及 TLR7、TLR9 的表达变化, 尤其是重点关注血清 IL-1 $\beta$  和 TLR9 mRNA 的表达, 有助于了解病情进展和转归。

**关键词:** 传染性单核细胞增多症; Epstein-Barr 病毒/病毒; 淋巴细胞亚群; 细胞因子; Toll 样受体  
**中图分类号:** R725.1 **文献标识码:** A

## Study on the changes and significance of lymphocytes subsets, cytokines and TLRs in children with infectious mononucleosis

Zheng-hong Qi, Xue-xia Chen, Xian-yao Lin, Shi-yong Zhao  
(Department of Infectious Diseases, Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

**Abstract: Objective** To observe the difference of peripheral blood lymphocytes subsets, cytokines and toll like receptors 7 (TLR7), TLR9 in infectious mononucleosis children infected with epstein-barr virus (EBV). **Methods** Ninety-eight IM children in acute phase and 50 healthy volunteers without EBV infection as control group in our hospital from January to December 2019 were enrolled into the study. The flow cytometry and ELISA methods were used to detected the percent of lymphocytes subsets and levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were isolated from the blood, TLR7 mRNA and TLR9 mRNA in PBMC were detected by RT-qPCR. **Results** Compared with control group, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TLR7 mRNA and TLR9 mRNA levels in acute IM children increased, while

CD4<sup>+</sup>T, CD19<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> declined ( $P < 0.05$ ). Spearman analysis showed that the load of EBV-DNA in acute IM children would be positively related with IL-1 $\beta$  level and TLR9 mRNA ( $r = 0.247$  and  $0.348$ ,  $P < 0.05$ ). At the recovery stage, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TLR7 mRNA and TLR9 mRNA levels declined ( $P < 0.05$ ) and CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> increased ( $P < 0.05$ ), compared with the acute IM stage. **Conclusions** There are some differences of peripheral blood lymphocytes subsets, cytokines and TLR7, TLR9 between acute IM stage and recovery IM stage, while especially the detection of IL-1 $\beta$  and TLR9 levels might be helpful to evaluate the development and clinical outcomes.

**Keywords:** infectious mononucleosis; epstein-barr virus; lymphocytes subsets; cytokines; toll like receptors

Epstein-Barr 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 属于人类疱疹病毒  $\gamma$  亚科嗜 B 淋巴细胞组群中的 DNA 病毒<sup>[1]</sup>, 在学龄前儿童中较为常见, 是引起儿童传染性单核细胞增多症 (infectious mononucleosis, IM) 最主要的病原体之一<sup>[2]</sup>。在感染潜伏期, EBV 主要是附着于 B 淋巴细胞中, 但此时 B 细胞并不表达 EBV 核蛋白, 故不具备致病性<sup>[3]</sup>。但是当极少数记忆 B 细胞分化成浆细胞时, 可释放出病毒颗粒, 激活细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL), 导致炎症因子大量释放, 包括肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和多种白细胞介素 (Interleukin, IL) 等<sup>[4]</sup>。此时 EBV 从潜伏状态变为增殖状态, 可引发一系列临床症状。此外, 在 EBV 感染早期, 单核细胞、树突状细胞等抗原提呈细胞表面的 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 可识别病毒蛋白, 进而启动宿主的抗病毒免疫应答<sup>[5]</sup>。炎症反应和免疫破坏协同作用可能是导致 IM 预后不良的重要原因<sup>[6]</sup>。本研究旨在分析 EB 感染 IM 患儿外周血淋巴细胞亚群、细胞因子, 以及 TLR7、TLR9 分子的表达情况, 以揭示 EBV 感染对儿童免疫功能的影响及 IM 的发病机制, 为临床检测和治疗提供新的思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月—2019 年 12 月杭州市儿童医院收治的 98 例感染 EBV 致 IM 急性期患儿作为研究对象。其中, 男性 58 例, 女性 40 例; 年龄 13 个月 ~ 13 岁, 平均 ( $52.39 \pm 28.35$ ) 个月。纳入标准: ①符合《儿童 EB 病毒相关疾病的诊断标准和治疗原则》<sup>[7]</sup> 中临床诊断及实验室诊断标准; ②初诊为感染 EBV 致 IM, 发病 1 ~ 7 d; ③ EBV DNA  $> 1 \times 10^3$  拷贝/ml, EBV-VCA IgM (+) 或早期抗原 IgG (+), 且抗 EBV-EBNA1 IgG (-); ④ 1 ~ 13 岁儿童; ⑤配合完成治疗

及相关检查, 急性期与恢复期均未使用激素、免疫调节剂。排除标准: ①先天性免疫缺陷或合并免疫系统疾病, 既往有变态反应疾病史; ②合并恶性肿瘤、血液系统疾病; ③入组前 3 个月服用糖皮质激素、细胞毒性药物或其他免疫抑制剂。另选取同期本院体检的健康儿童 50 例作为对照组, 血浆 EBV-DNA 检查为阴性。对照组男性 25 例, 女性 25 例; 年龄 1 ~ 13 岁, 平均 ( $49.36 \pm 25.78$ ) 个月。两组年龄、性别等一般资料比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会审核批准, 患儿家属或法定监护人均签署知情同意书。

### 1.2 主要仪器与试剂

TG16 台式高速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司), Cytomics FC500 型流式细胞仪、流式试管及配套设备 (美国 Beckman Coulter 公司), SpectraMax M3 多功能酶标仪 (美国 MD 公司), Ficoll 单个核细胞分离液 (北京索莱宝生物科技有限公司)。EBV 特异性抗体试剂盒 (深圳赛尔生物技术有限公司), FITC-CD3、RD1-CD4、ECD-CD8、PE-CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>、APC-CD19 荧光标记单克隆抗体及同型对照抗体 (美国 Beckman Coulter 公司), 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (美国 R&D 公司), Trizol 试剂和 M-MLV 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒 (大连宝生生物工程股份有限公司), 核酸提取试剂盒 (广州中山大学达安基因股份有限公司)。

### 1.3 治疗

IM 患儿入院后首先完成血常规、生化指标、肝肾功能检查。采用 ELISA 检测 EBV 特异性抗体, 予以卧床、退热、补充体液及维生素、保护脏器等综合性支持治疗, 保持呼吸道畅通; 必要时给予阿昔洛韦注射液 (武汉普生制药有限公司, 规格 0.25 g/支, 批准文号: 国药准字 H4202019) 10 mg/(kg·d) 抗病毒治疗, 静脉注射, 1 次/8 h, 连续治疗 7 d。伴有细

菌感染的患儿则给予抗生素治疗, 并积极应对并发症, 必要时纠正血清电解质紊乱和酸碱平衡。

## 1.4 检测指标

**1.4.1 血液标本采集** 患儿治疗前(急性期)和病程满 1 个月复查(恢复期)时, 由儿科护士分别无菌抽取患儿清晨空腹静脉血 2、2 和 4 ml, 置于肝素抗凝管、采血管、乙二胺四乙酸抗凝管中, 分别用于检测外周血淋巴细胞亚群比例、血清细胞因子水平, 以及收集外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。对照组儿童采用同样的方法采集外周静脉血, 收集全血和血清, 保存至  $-80^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.4.2 淋巴细胞亚群检测** 采用全血免洗法检测  $\text{CD}3^{+}$ 、 $\text{CD}4^{+}$ 、 $\text{CD}8^{+}$ 、 $\text{CD}19^{+}$ 、 $\text{CD}16^{+}56^{+}$ 。

**1.4.3 细胞因子检测** 采用 ELISA 抗体双夹心法检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、 $\alpha$  干扰素(Interferon- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ )、IFN- $\gamma$ 。取出试剂盒及血清标本, 温度平衡至室温。使用前将所有试剂充分摇匀, 严格按照操作说明书进行检测。

**1.4.4 TLR7 和 TLR9 mRNA 检测** 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周全血 PBMC, 采用 Trizol 试剂提取 PBMC 的总 RNA, 并逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 采用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒进行 qRT-PCR 反应, 反应体系为 20  $\mu\text{l}$ , 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $52^{\circ}\text{C}$  退火 10 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 共 36 个循环。以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  表示目的基因 mRNA 相对表达量。qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
TLR7	正向: 5'-ATTGTGAAGTCCAGACTCTTTGTC-3'	142
	反向: 5'-CCTGCTGCCAGTGGCTGACCACT-3'	
TLR9	正向: 5'-CAGGGACAACCACCACTTCT-3'	194
	反向: 5'-AGCCTTCGGTAGCATTATTG-3'	
GAPDH	正向: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	226
	反向: 5'-GAAGATGCTGATGGGATTC-3'	

**1.4.5 EBV DNA 载量检测** 采用 qRT-PCR 检测全血标本 EBV DNA 载量。BamH1-W 正向引物: 5'-GCCAGAGGTAAGTGGACTTT-3', 反向引物: 5'-TACCACCTCCTCTTCTTGCT-3', 长度 389 bp; 荧光探针序列: 5'-CACACCCAGGCACACACTACACAT-3'。根据标准曲线计算 EBV-DNA 载量。

## 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 或中位数和四分位数 [M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)] 表示, 比较用  $t$  检验或秩和检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用  $\chi^2$  检验; 相关性分析采用 Spearman 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组外周血淋巴细胞亚群、细胞因子、TLRs mRNA 比较

两组外周血淋巴细胞亚群百分比 ( $\text{CD}3^{+}$ 、 $\text{CD}4^{+}$ 、 $\text{CD}8^{+}$ 、 $\text{CD}19^{+}$ 、 $\text{CD}16^{+}56^{+}$ )、细胞因子水平 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )、TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量比较, 经  $t$  或秩和检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, IM 组患儿急性期外周血  $\text{CD}3^{+}$ 、 $\text{CD}8^{+}$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量升高,  $\text{CD}4^{+}$ 、 $\text{CD}19^{+}$ 、 $\text{CD}16^{+}56^{+}$  降低。两组血清 IFN- $\alpha$  水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2 ~ 4。

### 2.2 IM 患儿外周血淋巴细胞亚群、细胞因子、TLRs mRNA 与 EBV DNA 载量的关系

经 Spearman 相关性分析, IM 患儿急性期 EBV DNA 载量与血清 IL-1 $\beta$  和 TLR9 mRNA 呈正相关 ( $r = 0.247$  和  $0.348$ ,  $P = 0.017$  和  $0.000$ ), 与其他指标无关 ( $P > 0.05$ )。见图 1。

### 2.3 急性期和恢复期患儿外周血淋巴细胞亚群、细胞因子、TLRs mRNA 相对表达量比较

急性期与恢复期患儿外周血淋巴细胞亚群百分比 ( $\text{CD}3^{+}$ 、 $\text{CD}4^{+}$ 、 $\text{CD}8^{+}$ 、 $\text{CD}19^{+}$ 、 $\text{CD}16^{+}56^{+}$ )、细胞

表 2 两组外周血淋巴细胞亚群比较 ( $\%$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	$\text{CD}3^{+}$	$\text{CD}4^{+}$	$\text{CD}8^{+}$	$\text{CD}19^{+}$	$\text{CD}16^{+}56^{+}$
对照组	50	67.27 $\pm$ 5.91	36.82 $\pm$ 5.74	27.65 $\pm$ 6.17	19.74 $\pm$ 3.59	17.81 $\pm$ 5.27
IM 组急性期	98	82.17 $\pm$ 5.78	17.45 $\pm$ 5.97	55.16 $\pm$ 10.81	6.94 $\pm$ 3.76	7.34 $\pm$ 3.81
<i>t</i> 值		14.721	18.910	16.647	19.885	13.834
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 两组外周血清细胞因子水平比较 [pg/ml, M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]

组别	n	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10
对照组	50	3.28 (0.97, 8.96)	1.39 (0.28, 3.44)	5.29 (1.37, 16.45)	5.41 (1.69, 9.34)
IM 组急性期	98	23.19 (8.74, 44.36)	28.83 (16.14, 55.21)	75.99 (48.56, 203.98)	22.27 (12.49, 34.85)
Z 值		165.824	77.394	98.463	11.486
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

组别	TNF-α	IFN-α	IFN-γ
对照组	4.35 (1.17, 12.38)	2.84 (3.13, 6.47)	9.84 (2.20, 16.57)
IM 组急性期	12.33 (5.34, 25.96)	3.87 (2.15, 8.15)	94.26 (44.95, 163.81)
Z 值	19.271	2.014	287.139
P 值	0.000	0.158	0.000

表 4 两组外周血 PMBCs 中 TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TLR7 mRNA	TLR9 mRNA
对照组	50	1.12 ± 0.33	1.04 ± 0.25
IM 组急性期	98	2.71 ± 0.95	6.75 ± 2.13
t 值		11.471	18.859
P 值		0.000	0.000

因子水平 (IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α、IFN-γ)、TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量比较, 经 t 或秩和检验, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 与急性期相比, 恢复期外周血 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α、IFN-γ、TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量降低, CD4<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> 升高。急性期与恢复期患儿血清 IFN-α 水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 5 ~ 7。

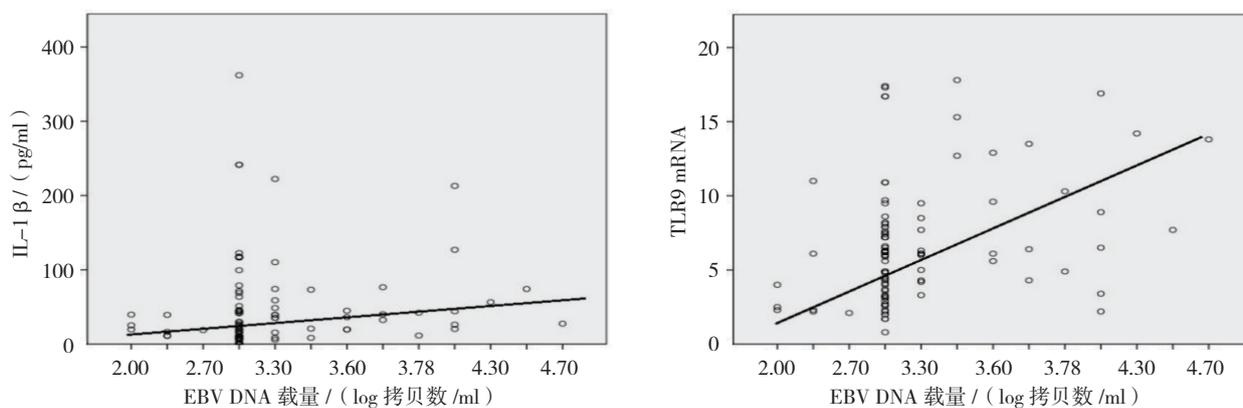


图 1 IM 患儿急性期 EBV DNA 载量与 IL-1β、TLR9 mRNA 的相关性

表 5 急性期与恢复期患儿外周血淋巴细胞亚群比较 (n=98, %,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>
急性期	82.17 ± 5.78	17.45 ± 5.97	55.16 ± 10.81	6.94 ± 3.76	7.34 ± 3.81
恢复期	73.53 ± 7.56	27.57 ± 7.31	40.34 ± 8.65	12.69 ± 4.10	12.75 ± 5.02
t 值	8.742	17.328	10.436	13.208	9.236
P 值	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000

表 6 急性期与恢复期患儿外周血清细胞因子水平比较 [n=98, pg/ml, M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]

时间	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-10
急性期	23.19 (8.74, 44.36)	28.83 (16.14, 55.21)	75.99 (48.56, 203.98)	22.27 (12.49, 34.85)
恢复期	15.71 (4.82, 31.79)	11.53 (2.38, 28.79)	37.12 (18.58, 97.46)	16.43 (8.22, 29.73)
Z 值	34.835	17.514	29.668	6.845
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

时间	TNF- $\alpha$	IFN- $\alpha$	IFN- $\gamma$
急性期	12.33 (5.34, 25.96)	3.87 (2.15, 8.15)	94.26 (44.95, 163.81)
恢复期	9.58 (4.43, 17.45)	3.54 (2.08, 7.62)	36.85 (28.72, 87.63)
Z 值	5.120	1.439	70.941
P 值	0.000	0.386	0.000

表 7 急性期与恢复期患儿外周血 PMBCs 中 TLRs mRNA 相对表达量比较 (n=98,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	TLR7 mRNA	TLR9 mRNA
急性期	2.71 $\pm$ 0.95	6.75 $\pm$ 2.13
恢复期	1.75 $\pm$ 0.56	3.38 $\pm$ 1.43
t 值	5.688	8.923
P 值	0.000	0.000

### 3 讨论

EBV 感染在学龄前儿童中较为常见, 易引起多种急性传染性疾病, 其中 IM 较为常见。蓝仙娥等<sup>[8]</sup>对 25 185 例学龄前儿童的血液标本进行 EBV-EBNA1 IgG 和 EBV-VCA IgG 抗体检测, 发现 EBV 累积感染率为 48.80%, 其中 IM 患病率为 7.90%。虽然 IM 属于自限性疾病, 预后良好, 但是由于儿童机体免疫系统尚未发育完全, 极少数患儿可能会伴发周围神经炎、脑膜炎、肝损伤等疾病<sup>[9]</sup>, 机体不同免疫状态感染 EBV 导致 IM 的转归和预后也存在较大差异。

EBV 属于嗜 B 淋巴细胞 DNA 病毒, 由于 B 淋巴细胞表面存在 EBV 受体, 因此 EBV 进入宿主体内后, 主要附着于 B 淋巴细胞中。在感染潜伏期, EBV-EBNA2 可驱动 B 细胞大量增殖并分化成为记忆 B 细胞, 但此时 B 淋巴细胞并不表达 EBV 核蛋白, 故 EBV 无自我复制能力。随着 EBV 感染的进展, 携带 EBV 的 B 淋巴细胞在外周血中大量增殖, 可诱导机体固有免疫应答清除大部分 EBV 阳性 B 淋巴细胞, 但是仍有极少部分 B 淋巴细胞逃避机体免疫系统的攻击, 分化成浆细胞, 释放出病毒颗粒, 此时 EBV 感染进入急

性期, 逐渐表现出颈部淋巴结肿大、咽痛、扁桃体肿大、发热、皮疹等临床症状<sup>[10]</sup>。CD19 是 B 淋巴细胞表面的特异性糖基化跨膜蛋白标志分子<sup>[11]</sup>。本研究结果表明, IM 急性期患儿 CD19<sup>+</sup> 较对照组降低, 但是与 EBV-DNA 载量无直接关系, 说明 B 淋巴细胞在 EBV 急性期并不能直接反映 EBV 的复制情况。这主要是由于绝大多数 EBV 阳性 B 细胞被 CTL 杀伤破坏, 只有极少数 B 细胞被激活, 进而刺激 T 淋巴细胞的活化和增殖, 刺激机体发生获得性免疫应答。因此, 在本研究中, IM 急性期患儿 CD3<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 升高, 同时 CD4<sup>+</sup> 降低。有研究提出, CD4<sup>+</sup> 细胞不仅可以协助 B 细胞产生抗体, 中和抗原, 还能够诱导和维持 CD8<sup>+</sup> 细胞发挥细胞毒作用, 进而影响 EBV 阳性 B 细胞增殖, 例如在 CD4<sup>+</sup> 细胞缺失时, CD8<sup>+</sup> 细胞对 EBV 阳性 B 细胞增殖的抑制作用不明显<sup>[12]</sup>。IM 急性期患儿体内 EBV 特异性 CD4<sup>+</sup> 细胞占血液循环 CD4<sup>+</sup> 细胞的 1% 左右, EBV 特异性 CD4<sup>+</sup> 细胞可产生功能性细胞因子, 进而抑制 EBV 诱导的 B 细胞转化; 此外还可诱导特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞识别 EBV 裂解期抗原, 进而杀伤 EBV 阳性 B 细胞。与潜伏期相比, EBV 特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞显著增殖, 通过分泌穿孔素 / 颗粒酶直接杀伤感染 EBV 的 B 淋巴细胞, 或通过肿瘤坏死因子途径诱导 EBV 感染的 B 淋巴细胞凋亡。当 IM 患儿进入恢复期后, CD4<sup>+</sup> 升高, CD8<sup>+</sup> 降低, 说明机体免疫功能逐渐恢复正常, 同时可避免效应 T 细胞的过度增殖, 以及细胞因子大量分泌对机体造成的过度免疫损伤<sup>[13]</sup>。

此外, EBV 在 B 淋巴细胞中建立潜伏感染后, 树突状细胞、自然杀伤细胞均被激活, 其表面 TLRs 可识别 EBV 膜蛋白, 并将信号传递给细胞内的各类接

头分子,进而激活下游炎症因子,例如浆细胞样树突状细胞通过 TLR9 分子识别 EBV 颗粒中的线性病毒 DNA,而髓样树突状细胞则可通过 TLR7 识别 EBV 衍生的单链 RNA,向初始 T 淋巴细胞传递 EBV 抗原,并刺激初始 T 淋巴细胞分化为 CTL、辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞等,进而启动获得性免疫应答<sup>[4]</sup>。炎症反应与免疫破坏协同作用,可能是导致 IM 预后不良的重要原因。本研究结果表明,IM 急性期患儿外周血 PBMC 中 TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量显著升高,说明 EBV 感染可通过激活 TLR7 或 TLR9 mRNA 表达,使宿主 B 细胞存活,并借助细胞因子逃避宿主的免疫杀伤作用。EBV 除了通过影响 TLRs 的表达及信号传递影响 B 细胞增殖以外,还可以通过影响下游细胞因子的分泌,干扰机体抗病毒能力。在本研究中,IM 急性期患儿血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平升高,也进一步证实 EBV 感染可通过 TLRs 信号通路诱发机体炎症反应,并且协助 EBV 的免疫逃逸。而患儿进入恢复期后,TLR7 和 TLR9 mRNA 相对表达量降低,外周血淋巴细胞亚群逐渐恢复正常。VALENTE 等<sup>[15]</sup>研究证实,上调 TLR7 和 TLR9 可促进干扰素调节因子 IRF7 的产生,进而激活 EBV *LMP1* 基因的表达。而 IRF7 与 EBV 阳性 B 淋巴细胞的分化和增殖密切相关,因而干扰 TLR7 或 TLR9 mRNA 的表达有望成为治疗 EBV 感染的重要方法。

综上所述,IM 患儿机体免疫系统、炎症反应及 TLRs 信号通路都与疾病的发生和转归有关,监测 IM 患儿不同时期外周血淋巴细胞亚群、细胞因子、TLR7 和 TLR9 mRNA 变化,尤其是血清 IL-1 $\beta$  和 TLR9 mRNA 的表达,有助于及时了解 IM 患儿的免疫状态及病情发展,为临床治疗提供一定的参考。

#### 参 考 文 献:

- [1] 刘晓东,王华,江玮. 婴幼儿 EB 病毒感染的临床特点及免疫研究 [J]. 医学综述, 2018, 24(16): 3299-3302.
- [2] 刘雪凯,王迎时,辛勤,等. EB 病毒感染患儿免疫细胞功能变化及其临床意义 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(8): 72-75.

- [3] 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): 1472-1475.
- [4] FORREST C, HISLOP A D, RICKINSON A B, et al. Proteome-wide analysis of CD8<sup>+</sup> T cell responses to EBV reveals differences between primary and persistent infection[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(9): DOI: 10.1371/journal.ppat.1007110.
- [5] SHEHAB M, JAMMAZ R, SALLOUM N, et al. Endosomal toll-like receptors (TLRs) mediate enhancement of il-17a production triggered by Epstein-Barr virus (EBV) DNA in mice[J]. J Infect Dev Ctries, 2018, 12(2.1): DOI: 10.3855/jidc.10074.
- [6] 尹静. 儿童传染性单核细胞增多症的临床治疗方法研究进展 [J]. 中国处方药, 2019, 17(6): 32-34.
- [7] 王群,谢正德. 儿童 EB 病毒相关疾病的诊断标准和治疗原则 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2010, 25(10): 706-708.
- [8] 蓝仙娥,文尚梅,曾秀珍. EB 病毒感染现状常见相关疾病发生于学龄前儿童临床研究 [J]. 中国医药科学, 2019, 9(11): 176-179.
- [9] 王凯,王超,王红. EB 病毒感染相关性疾病患者免疫功能变化研究进展 [J]. 山东医药, 2015, 55(43): 101-103.
- [10] 肖楠阳,陈骥,蔡少丽. Epstein-Barr 病毒的免疫调控与逃逸机制 [J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 19-25.
- [11] CAVALCANTE P, BARZAGO C, BAGGI F, et al. Toll-like receptors 7 and 9 in myasthenia gravis thymus: amplifiers of autoimmunity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1413(1): 11-24.
- [12] 赵青松,方瑞,刘亢亢,等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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.
- [13] GUJER C, MURER A, MÜLLER A, et al. Plasmacytoid dendritic cells respond to Epstein-Barr virus infection with a distinct type I interferon subtype profile[J]. Blood Adv, 2019, 3(7): 1129-1144.
- [14] 韩红满,李四强. 传染性单核细胞增多症相关免疫学研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(3): 443-447.
- [15] VALENTE R M, EHLERS E, XU D, et al. Toll-like receptor 7 stimulates the expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): DOI: 10.1371/journal.pone.0043317.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 祁正红,陈雪夏,林先耀,等. 传染性单核细胞增多症患儿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.