

儿童传染性单核细胞增多症患者外周血 T 细胞、血浆 PD-1 和 Tim-3 水平表达检测的临床意义

王卫国, 王伟伟, 马黎丽 (阜阳市人民医院检验科, 安徽阜阳 236001)

摘要: 目的 探讨儿童传染性单核细胞增多症 (infectious mononucleosis, IM) 患者外周血 T 细胞、血浆 PD-1 和 Tim-3 表达检测的临床意义。方法 采集 67 例 IM 患儿和 20 例健康对照者的外周血, 流式细胞仪检测 PD-1 和 Tim-3 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞上的表达, ELISA 法检测血浆 PD-1 和 Tim-3 的浓度。结果 与对照组比较, IM 组 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞上 PD-1 和 Tim-3 表达百分比、血浆 PD-1 和 Tim-3 浓度均明显增加 ($t=7.646\sim 23.161$, 均 $P < 0.01$)。ROC 曲线分析, 血浆 PD-1 和 Tim-3 诊断 IM 的界值分别为 1.24 ng/ml 和 0.44 ng/ml, 敏感度分别为 62.7% 和 65.7%, 特异度分别为 85.0% 和 75.0%。结论 IM 患儿的免疫抑制与 PD-1 及 Tim-3 表达增高有关, 血浆 PD-1 和 Tim-3 浓度对诊断 IM 具有一定的价值。

关键词: 传染性单核细胞增多症; 程序性死亡分子 1; T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子 3

中图分类号: R512.7; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 02-032-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.008

Clinical Significance of Detecting PD-1 and Tim-3 Expression of T Cells and Plasma in Peripheral Blood from Children with Infectious Mononucleosis

WANG Wei-guo, WANG Wei-wei, MA Li-li

(Department of Clinical Laboratory, Fuyang People's Hospital, Anhui Fuyang 236001, China)

Abstract: Objective To explore the expression changes of PD-1 and Tim-3 of T cells and plasma in peripheral blood and their clinical significance in children with infectious mononucleosis (IM). **Methods** The percentage of PD-1, Tim-3 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed by flow cytometry, plasma concentrations of PD-1 and Tim-3 were tested by ELISA in peripheral blood in 67 children with IM and 20 healthy controls. **Results** Compared with control group, the percentage of PD-1, Tim-3 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells and plasma concentrations of PD-1 and Tim-3 were increased ($t=7.646\sim 23.161$, all $P < 0.01$) in children with IM. ROC curve analysis of plasma PD-1 and Tim-3 yielded cut-off value of for discriminating IM were 1.24 ng/ml and 0.44 ng/ml with sensitivity being 62.7% and 65.7% and specificity being 85.0% and 75.0%, respectively. **Conclusion** The increased expression of PD-1 and Tim-3 were associated with immunosuppression in children with IM. Plasma concentrations of PD-1 and Tim-3 have certain value in diagnosis for IM.

Keywords: infectious mononucleosis; PD-1; Tim-3

传染性单核细胞增多症 (infectious mononucleosis, IM) 是儿童较为常见的急性传染病, 由 EB 病毒感染导致, 发病后淋巴细胞快速增生, 外周血反应性淋巴细胞即异型淋巴细胞迅速增高, 导致发热、淋巴结肿大、咽峡炎等临床症状出现^[1]。IM 患儿机体免疫系统应答迅速, 致使病毒静息下来, 绝大多数形成潜伏感染, 若免疫应答低下或过度可形成慢性活动性 EB 病毒感染或嗜血细胞综合症, 造成不同的疾病和临床结局^[2]。程序性死亡分子 1 (programmed death 1, PD-1) 和 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子 3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3, Tim-3) 是近年来发现的重要的负性免疫调节分子, 在抗病毒和维

持免疫自稳中起着重要作用, 乙肝、丙肝和艾滋病等患者中均发现 PD-1 和 Tim3 表达异常^[3-4]。PD-1 和 Tim-3 在儿童 IM 患者 T 细胞及血浆中如何表达, 目前报道较少, 本研究旨在探讨上述指标的表达变化及其临床价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2018 年 3 月~2020 年 2 月于阜阳市人民医院确诊的 IM 患儿 67 例, 诊断标准参照《诸福棠实用儿科学》(第 8 版), 男性 47 例, 女性 20 例, 年龄 1~8 岁, 平均年龄 3.56 ± 1.91 岁。对照组为健康体检者 20 例, 男性 13 例, 女性 7 例, 年龄 1~9 岁, 平均年龄 3.60 ± 2.23 岁。两组间在性别和年龄上的差异无统计学意义。此次研究通过了本院医学伦理

基金项目: 阜阳市卫生健康委科研课题 (编号: 2019-93)。

作者简介: 王卫国 (1974-), 男, 专科, 副主任技师, 研究方向: 血液病学, E-mail: wangweiguoguo388@163.com。

委员会的批准。

1.2 试剂和仪器 CD3, CD4, CD8, PD-1, Tim-3, CD45 及相关同型对照荧光标记抗体购自 BD 公司; 人血浆 PD-1 和 Tim-3 检测 ELISA 试剂购自江莱生物公司; 芬兰雷勃 mk3 酶标仪和美国 BD Calibur 流式细胞仪。

1.3 方法

1.3.1 T 细胞 PD-1 和 Tim-3 表达检测: 取四支流式管, 每种抗体用量为 10 μl。第 1 和第 2 支加入 CD3, CD4 和 CD45 后, 再分别加入 PD-1 和 Tim-3, 第 3 和第 4 支加入 CD3, CD8 和 CD45 后, 再分别加入 PD-1 和 Tim-3, 各管加入 50 μl EDTA 抗凝全血, 避光染色 30 min, 溶血后离心弃上清, 加入磷酸盐缓冲液上机检测。cell quest 软件分析, 以百分比 (%) 表示 PD-1 和 Tim-3 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞上的表达。

1.3.2 血浆 PD-1 和 Tim-3 的水平检测: 按试剂盒操作说明书进行: 样本孔和标准品孔各加 50 μl 样品和辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μl, 封板后 37 °C 孵育 30 min, 洗涤 5 次后加入酶作用底

物, 15 min 后加入终止液, 于酶标仪 450 nm 波长读取吸光度值, 采用曲线回归方程计算血浆 PD-1 和 Tim-3 浓度 (ng/ml)。

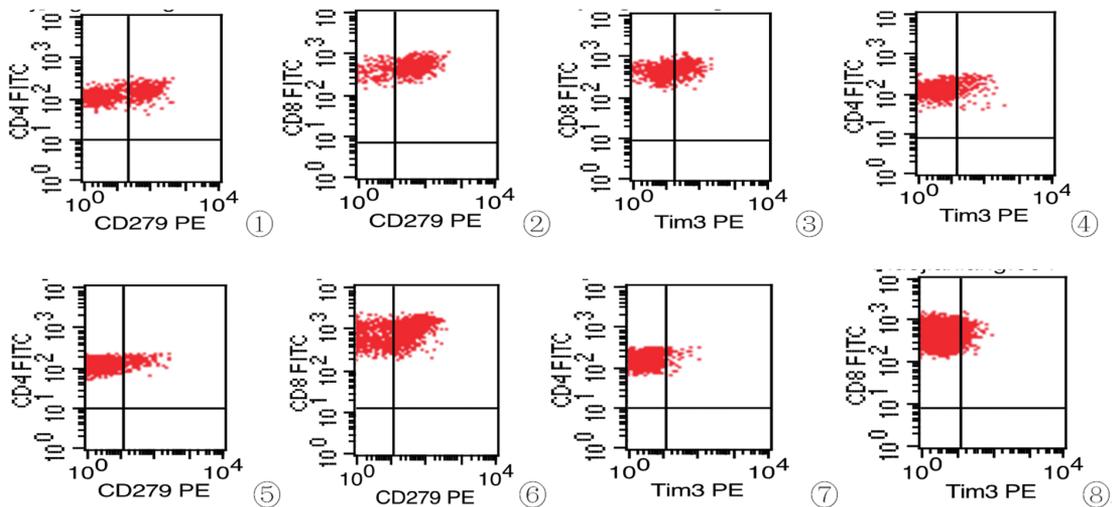
1.4 统计学分析 应用 SPSS 18.0 软件, 正态分布资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验、*t'* 检验和相关性分析, 绘制 ROC 曲线, 评估其诊断的价值。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IM 组和对照组 T 细胞上 PD-1, Tim-3 表达百分比比较 见表 1, 图 1。与对照组比较, IM 患儿 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞上 PD-1 和 Tim-3 表达百分比均明显升高 (均 *P* < 0.01)。

表 1 IM 组和对照组 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞上 PD-1 和 Tim3 表达百分比 (%) 比较

项目	IM 组 (n=67)	对照组 (n=20)	<i>t'</i> / <i>t</i>	<i>P</i>
CD4 ⁺ PD-1 ⁺ /CD4 ⁺	35.94 ± 10.17	16.29 ± 5.18	11.561	0.000
CD4 ⁺ Tim-3 ⁺ /CD4 ⁺	10.18 ± 3.92	4.82 ± 2.29	7.646	0.000
CD8 ⁺ PD-1 ⁺ /CD8 ⁺	74.38 ± 7.62	29.94 ± 7.21	23.162	0.000
CD8 ⁺ Tim-3 ⁺ /CD8 ⁺	26.74 ± 9.55	11.82 ± 4.60	9.586	0.000



注: ①, ②, ③, ④为 IM 患者; ⑤, ⑥, ⑦, ⑧为对照组。

图 1 PD-1 和 Tim-3 表达流式图

2.2 IM 组和对照组血浆 PD-1 及 Tim-3 水平比较 见表 2。与对照组比较, IM 患儿血浆 PD-1 和 Tim-3 浓度明显升高 (均 *P* < 0.01)。ROC 曲线分析, 血浆 PD-1 和 Tim-3 浓度诊断 IM 的曲线下面积分别为 0.794 (95% 可信区间为 0.694~0.894, *P*=0.000) 和 0.722 (95% 可信区间为 0.611~0.833, *P*=0.003), Youden 指数最大点对应的诊断界值分别为 1.24 ng/ml 和 0.44 ng/ml, 血浆 PD-1 的敏感度和特异度分别为 62.7% 和 85.0%, 血浆 Tim-3 的敏感度和特异度分别为 65.7% 和 75.0%, 两者联合诊断的敏感度和特异度分别为 52.2% 和 95.0%, ROC

曲线见图 2。相关性分析, 血浆 PD-1 和 Tim-3 水平呈正相关 (*r*=0.63, *P* < 0.01)。

表 2 IM 组和对照组血浆 PD-1 及 Tim-3 水平 (ng/ml) 比较

项目	IM 组	对照组	<i>t'</i>	<i>P</i>
PD-1	1.61 ± 0.67	0.92 ± 0.41	5.649	0.000
Tim-3	0.57 ± 0.31	0.34 ± 0.17	4.241	0.000

3 讨论

细胞免疫异常是 EB 病毒感染后发病和转归的关键因素。研究发现^[5-6]: 急性期 IM 患者 CD8⁺ T

细胞迅速增加; CD4⁺ T 细胞分化漂移, 效应性 Th1 细胞增加; 具有免疫抑制作用的 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞和 CD4⁻ CD8⁻ 双阴性 T 细胞增加等, 表明 IM 患者抗病毒和抑制性免疫反应可同时存在。

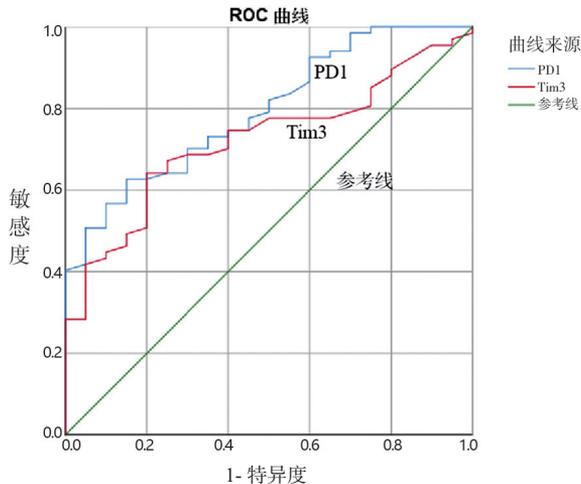


图2 PD-1, Tim-3 的 ROC 曲线

本次实验发现: 较对照组, IM 患儿 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表面 PD-1 及 Tim-3 表达明显升高, 血浆中 PD-1 和 Tim-3 水平明显升高。PD-1 在活化的淋巴细胞中诱导性的表达上调, 能抑制 T 细胞增殖和 IL-2 产生, 许多病毒和肿瘤均是通过 PD-1 途径逃避机体的免疫防御和监视。CD4⁺ T 细胞主要包括辅助性 T 细胞和调节性 T 细胞, IM 患者不论哪种类型 CD4⁺ T 细胞 PD-1 表达增加, 都导致机体快速清除病毒的能力减弱, 而且会导致 CD8⁺ T 细胞向效应性的细胞毒性细胞分化减少。CD8⁺ T 细胞主要包括抑制性和细胞毒性细胞, IM 患儿 CD8⁺ T 细胞 PD-1 表达升高, 从理论上讲是促进抑制性功能和减弱细胞毒作用, 但 CHATTERJEE 等^[7] 发现 PD-1 阳性 CD8⁺ T 细胞保留了增殖、细胞因子产生和细胞毒性的能力, 而且在 EB 病毒特异性细胞毒性 CD8⁺ T 上也发现升高的 PD-1 表达^[6], 提示 IM 患儿 PD-1 表达升高可能在抗病毒和维持过度的免疫应答方面都起着一定的作用。Tim-3 负性调节 T 细胞的应答反应, 过表达能引起病毒感染过程中 T 细胞的衰竭, 引起免疫功能无能。研究发现越来越多的肿瘤细胞对抗 PD-1 发生耐药, 而抗 Tim-3 和抗 PD-1 联合用药可以解决该问题^[8], 也证明了 Tim-3 在免疫抑制中的关键作用。与其他免疫检查点分子不同, Tim-3 不是在所有的 T 细胞活化后表达增加, 只在 Th1 和具有细胞毒作用的 CD8⁺ T 中表达上调。IM 患儿 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞 Tim-3 表达增高, 提示两种主要的抗病毒效应细胞存在免疫功能被抑制。血浆 PD-1 和 Tim-3 主要来自于膜型分子的裂解或细胞基因编码产生, 不论是膜型还是

可溶性分子, 均与受体结合的信号途径发挥作用。PD-1 和 Tim-3 与其受体的信号途径可致使病毒特异性 T 细胞的失能及耗竭, IFN- γ , IL-2 和 TNF 等抗病毒的细胞因子水平降低, 导致病毒感染的持续或潜伏^[8-9], 但新的研究似乎并不支持 PD-1 抗体应用于 EBV 感染。ROC 曲线显示: 血浆 PD-1 和 Tim3 浓度对诊断 IM 的灵敏度不佳, 而特异度较好, 两者联合诊断 IM 的特异度可达 95%, 显示其血浆水平在排除性诊断中具有一定的价值。IM 患儿血浆 PD-1 和 Tim3 水平呈正相关, 提示两者在抑制性功能上具有协同作用。

综上所述, IM 患儿 PD-1 和 Tim 表达水平升高, 一方面降低了免疫应答, 另一方面可能预防了过激的免疫反应, 维持机体相对的免疫自稳, 致使病毒静息和潜伏起来。

参考文献:

- [1] 肖波, 毛金娥, 陈万新. 外周血细胞形态学检查与 EBV-DNA 定量分析在小儿传染性单核细胞增多症早期诊断中的价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(3):114-116, 120.
XIAO Bo, MAO Jine, CHEN Wanxin. Value of detecting peripheral blood cell morphology combined with EBV-DNA quantity in the initial diagnosis for infants patients with infectious mononucleosis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016,31(3):114-116,120.
- [2] KAWAMOTO K, MIYOSHI H, SETO M, et al. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection[J]. Rinsho Ketsueki, 2019, 60(8): 944-952.
- [3] 杨荣荣, 张萍. 外周血液狼疮抗凝物质比值及 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 水平与孕早期复发性流产的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020,35(1): 60-64.
YANG Rongrong, ZHANG Ping. Study on the relationship between ratio of lupus anticoagulant and levels of T-cell immunoglobulin-mucin molecule 3 in peripheral blood and recurrent abortion in early pregnancy [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020,35(1):60-64.
- [4] 刘宗萍. 慢性乙肝患者血清 Tim-3, HBsAg, TGF- β 1 水平表达与病情程度相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6):77-81.
LIU Zongping. Study on the correlation between the expression of serum Tim-3, HBsAg, TGF-beta 1 and the Severity of chronic hepatitis B [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34 (6):77-81.
- [5] ZHONG Huaqing, HU Xinran, JANOWSKI A B, et al. Whole transcriptome profiling reveals major cell types in the cellular immune response against acute and chronic active Epstein-Barr virus infection[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):1993-2000.
- [6] BARROS M H M, LOZADA M G V, SEGGES P, et al. Revisiting the tissue microenvironment of infectious mononucleosis: identification of EBV infection in T cells and deep characterization of immune profiles[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10:146.(下转第 38 页)