

· 临床经验 ·

重症卡介苗淋巴结炎与儿童 X 连锁慢性肉芽肿病

贺建新¹ 赵顺英² 江载芳²

(1. 北京儿童医院儿研所呼吸分解室, 北京 100045; 2. 北京儿童医院呼吸科, 北京 100045)

[中图分类号] R725 [文献标识码] D [文章编号] 1008-8830(2010)06-0490-04

慢性肉芽肿病(chronic granulomatous disease, CGD)是少见的原发性吞噬细胞免疫缺陷病。患者的多形核粒细胞不能通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)氧化酶产生超氧阴离子(O_2^-)来有效杀灭入侵的微生物。患者在儿童早期易于发生反复致命的过氧化氢酶阳性细菌和真菌感染,在慢性炎症部位形成肉芽肿^[1]。CYBB 基因突变引起 X-连锁隐性慢性肉芽肿病(X-linked recessive CGD, XLR-CGD)占有慢性肉芽肿病的 65%。本研究报道明确基因诊断的 XLR-CGD 25 例,总结分析与卡介苗接种相关反应的临床特点,以便能及时地诊断与治疗。

1 对象与方法

1.1 病例入选

收集 2007 年 7 月至 2009 年 7 月北京儿童医院临床疑诊为 CGD 患儿共 25 例,所有患儿均为男性,根据既往反复感染病史(肺脏、皮肤、淋巴结、肛周等),常规体液及细胞免疫功能正常,疑诊为 CGD。用 NBT 和/或 DHR123 流式细胞分析方法进行 CGD 功能诊断。患儿的母亲包括在本研究内,获得其知情同意。

1.2 CYBB 基因突变分析

抽取静脉血 2 mL, EDTA 抗凝,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,用安徽优品公司的 H. Q. & Q. 血液 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。用 UV752 紫外可见分光光度计测定 DNA 的浓度。扩增基因组 CYBB 基因外显子引物及条件参见文献^[2],略有改动,引物由上海生物工程有限公司合成,PCR 的条件:25 μ L 反应体系包括

2 $\times$ TaqPCRMasterMix(天根公司)的 12.5 μ L, 10 μ M 的引物各 1 μ L,模板 DNA 0.5 μ L 或 1 μ L,补水至 25 μ L。外显子 5、6、8、9[1]、9[2]、10、11、12、13 加 Tris-HCl 至 100 mM,外显子 6、9[2]、10 同时加甲酰胺至 2.5%。PCR 反应循环的设置:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,退火 1 min(不同引物退火温度不同),72 $^{\circ}$ C 25 s,72 $^{\circ}$ C 5 min,40 个循环。PCR 产物送交利嘉泰成公司测序。参照 CYBB 基因组 DNA(编号:AF469759-AF469769)用 NCBI 的 BLAST 程序进行同源分析。有新的拼接区突变者,用 TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA)提取总 RNA。RT-PCR 产物直接测序。同源分析参照 CYBB cDNA 序列(编号:NM_000397)。

2 结果

2.1 患儿一般资料

所有患儿均为男性,6 例有家族史,起病年龄 0~7.1(0.67 $\pm$ 1.47)岁,诊断年龄 0~7.2(2.44 $\pm$ 2.66)岁。

2.2 与 BCG 接种相关的临床特点

在 24 例接种 BCG 的患儿中,14 例有 BCG 接种同侧腋下淋巴结钙化,4 例有远距离淋巴结钙化及可疑播散(例 4 有皮肤结核,例 8 有骨结核),6 例有局部结痂延迟、脓肿形成及流脓等。4 例不能完全除外肺结核,4 例高度怀疑肺结核。见表 1。

2.3 CYBB 基因突变分析

25 例患儿 CYBB 基因突变分析显示:缺失或插入突变 4 例,拼接区突变 7 例,无义突变 6 例,错义突变 8 例。其中 10 例为新发现的突变。见表 2。

[收稿日期]2009-11-26;[修回日期]2010-01-13
[作者简介]贺建新,女,博士,副主任医师。

表 1 25 例 XLR-CGD 患儿分枝杆菌感染特征

编号	年龄(岁)	起病年龄(岁)	BCG 接种	BCG 疤痕	累及程度				肺结核	PPD
					局部	区域	远距离	播散		
1	3.4	0	+	+		+	+	-	高度怀疑	5 IU (++)
2	3.1	0	+	+	+	+	+	-	不能排除	5 IU (++)
3	1.3	0.5	+	+	+	+	-	-	不能排除	5 IU (-)
4	6.8	0.7	+	+	-	+	+	-	-	5 IU (++)
5	2.2	0.1	+	+	-	+	-	-	高度怀疑	1 IU (++)
6	7.2	7.1	+	+	+	+	-	-	高度怀疑	5 IU (-)
7	0.3	0.1	+	+	-	-	-	-	-	未查
8	10	2.0	+	+	-	+	+	-	不能排除	5 IU (++)
9	3.6	0.1	+	+	-	-	-	-	-	5 IU (+)
10	7.0	0.3	+	+	-	-	-	-	-	5 IU (-)
11	0.3	0	+	未查	-	-	-	-	-	未查
12	0.4	0.1	+	+	+	-	-	-	-	未查
13	3.3	0	+	+	+	+	-	-	高度怀疑	5 IU (++++)
14	2.0	2.0	+	+	-	+	-	-	-	5 IU (+)
15	0.2	0	+	+	-	-	-	-	-	5 IU (+)
16	0.6	0	+	+	-	+	-	-	-	1 IU (++)
17	0.2	0	+	+	-	-	-	-	-	5 IU (-)
18	2.0	0.5	+	+	-	+	-	-	不能排除	5 IU (++)
19	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	未查
20	0.1	0	+	+	-	-	-	-	-	1 IU (-)
21	2.0	1.0	+	+	-	+	-	-	-	未查
22	2.0	0.3	+	+	-	+	-	-	-	5 IU (++)
23	0	0	+	+	-	-	-	-	-	未查
24	1.0	0	+	+	+	+	-	-	-	5 IU (++)
25	1.5	1.5	+	+	-	-	-	-	-	5 IU (++)

表 2 25 例 XLR-CGD 患儿 CYBB 基因突变特征

患儿序号	外显子内含子	CYBB 结构域	突变	核苷酸改变	编码区改变	描述	母亲携带状态
1	Exon 11 *	NADPH	missense	1333T > C	Cys445 Arg	点突变	携带者
2	Exon 9	FAD	missense	965G > A	Gly322Glu	点突变	携带者
3	Exon 10 *	DADPH	missense	1234G > A	Gly412Arg	点突变	携带者
4	Exon 3	NT	splice site	252G > A	外显子 3 缺失	拼接点改变	携带者
5	Exon 11	NADPH	nonsense	1320C > G	Tyr440X	点突变	非携带者
6	Intron 3	NT	splice site	+ 5G > A	外显子 3 缺失	拼接点改变	携带者
7	Exon 10 *	NADPH	missense	1235G > A	Gly412Glu	点突变	未查
8	Exon 10 *	NADPH	del/insert	1177delA	Thr393LeufsX12	移码突变	携带者
9	Intron 10 *	NADPH	splice site	-2A > C	外显子 11 缺失?	拼接点改变?	未查
10	Intron 3	NT	splice site	+ 5G > A	外显子 3 缺失	拼接点改变	携带者
11	Exon 7	NT	nonsense	676C > T	Arg226X	点突变	携带者
12	Exon 11	NADPH	nonsense	1437C > A	Tyr479X	点突变	携带者
13	Exon 7	NT	nonsense	676C > T	Arg226X	点突变	携带者
14	Exon 9	FAD	missense	1012C > T	His338Tyr	点突变	携带者
15	Intron 4	NT	splice site	+ 1G > A	外显子 4 缺失	拼接点改变	携带者
16	Intron 3 *	NT	del/insert	+ 2insertT	外显子 3 缺失?	拼接点改变?	携带者
17	Exon 11	NADPH	nonsense	1437C > A	Tyr479X	点突变	携带者
18	Exon 9	FAD	missense	1016C > A	Pro339His	点突变	未查
19	Exon 3	NT	splice site	252G > A	外显子 3 缺失	拼接点改变	携带者
20	Exon 9 *	FAD	missense	1081T > C	Trp361 Arg	点突变	携带者
21	Exon 6 *	NT	missense	626A > G	H209R	点突变	未查
22	Exon 6 *	NT	nonsense	603C > G	Tyr201X	点突变	未查
23	Exon 9 *	FAD	del/insert	1095delG	Phe366SerfsX20	移码突变	携带者
24	Exon 9 + Intron 9	FAD	del/insert	1150-1151delAA + 1-2delGT	-	-	携带者
25	Intron 3 *	NT	splice site	-3A > G	外显子 3 缺失?	拼接点改变?	携带者

注：* 示新发现的突变

3 讨论

NADPH 氧化酶由 5 个蛋白亚单位组成:gp^{91phox}和 p^{22phox} 位于细胞质膜及特异颗粒膜,组成细胞色素 b₅₅₈ 异源二聚体;p^{47phox}、p^{67phox} 和最近鉴定的 p^{40phox} 是胞浆蛋白,当多形核细胞活化时与细胞色素结合。gp^{91phox} 基因 CYBB 位于 Xp^{21.1},基因长 30 kb,包含 13 个外显子,其突变引起 XLR-CGD, 占有 CGD 的 65%。此外,至少有 3 种常染色体隐性遗传 CGD (AR-CGD) 已被认识,按频率排列为:p^{47phox} (33%), p^{67phox} (5%), p^{22phox} (5%)^[2]。

卡介苗 (Bacille Calmette-Guérin, BCG) 是来自于牛分枝杆菌亚株的减毒活疫苗,和环境非结核分枝杆菌 (enviromental mycobacteria, EM) 共同属于人类弱致病力的分枝杆菌菌种。BCG 疫苗在世界大部分地区常规接种,覆盖 85% 儿童。可预防儿童结核的严重形式,包括粟粒性肺结核和结核性脑膜炎。活的 BCG 疫苗直接接种偶尔导致无害的局部良性淋巴结炎。然而,少部分病人 BCG 接种导致播散性感染包括淋巴结、肺、肾、脾和其他器官,这类感染被称为播散性卡介苗病 (BCG-osis), 是 BCG 注射最严重的并发症,病死率 71%^[3]。

通常认为 BCG 和环境分枝杆菌感染很少见,但在一定流行病学背景下也可发生。各种获得性免疫缺陷使 BCG/EM 感染易发,如获得性免疫缺陷病、毛细胞白血病、移植等。人类遗传异常使其易发,如囊性纤维化患者尽管免疫功能正常,易患呼吸道慢性 EM 感染。其他播散性 BCG/EM 感染无一例外好发于单基因免疫异常,分枝杆菌病出现于 1/3 严重联合免疫缺陷病和伴有无汗性外胚层发育不良的免疫缺陷病和少部分 CGD 和高 IgE 综合症病人^[4]。有研究报道 15 例严重联合免疫缺陷病患者,仅 1 例诊断为淋巴结结核^[5],提示国内情况似有不同。仅半数播散性 BCG 感染能查到特异性免疫缺陷,BCG 和 EM 在没有经典原发免疫缺陷的相对健康人可引起播散性疾病,这个综合征被命名为分枝杆菌病孟德尔敏感性 (Mendelian susceptibility to mycobacterial disease, MSMD), 目前已鉴定出 5 个 (IFNGR1、IFNGR2、STAT1、IL12B、IL12RB1) 与此综合征相关的基因,不同突变共形成 10 种异常,最近 NEMO 被认为亦参与其中^[6]。

美国登记随访 368 例 CGD 病人,结果表明肺部感染占 75% ~ 80%, 其中分枝杆菌感染占 3%^[7], 未描述 BCG-itis 或 BCG-osis 的情况。在美国,新生儿

出生后不常规接种卡介苗,卡介苗相关事件表现不突出。国际上大部分与 CGD 相关的 BCG-itis 和/或 BCG-osis 为个案报道。巴西的单中心研究表明 14 例 CGD 患儿中 5 例有 BCG-osis, 其中 2 例死亡^[8]。Bustamante 等^[9] 研究表明 BCG-itis 和/或 BCG-osis 可以是部分 CGD 患儿唯一的临床表现,BCG-osis 患儿死亡率高。Lee 等^[10] 对中国香港和大陆儿童 17 例 XLR-CGD 研究结果显示:7 例有结核感染,7 例有 BCG 接种处结痂延长或局部化脓,1 例有 BCG-osis, 其中 4 例同时有结核感染和 BCG 相关事件,提示 CGD 患者易于出现结核和 BCG 并发症,说明氧呼吸爆发在抗分枝杆菌感染中起重要作用。

BCG 相关的疾病分为 4 类:局部性 (regional) 包括接种部位大于 1 厘米的化脓或严重的结痂溃疡;区域性 (local) 包括区域淋巴结肿大、化脓或窦道形成或接种部位以外的损伤如接种部位同侧腋下淋巴结;远距离性 (distant) 包括区域淋巴结之外的任何部位受累;播散性 (disseminated) 包括 1 个以上的远距离部位受累或至少一次血或骨髓培养阳性。确诊需要通过生化方法或 PCR 方法证明为牛型 BCG 分枝杆菌。若与之前的接种或局部病变有时相关系则可作出可能诊断^[11]。

在中国新生儿出生后常规接种卡介苗,卡介苗接种相关事件在 CGD 患儿中的表现需要特殊关注。本研究中 BCG 接种同侧腋下淋巴结钙化发生率为 58% (14/24), 明显高于正常患儿接种 BCG 后的发生率。钙化的出现提示既往淋巴结有干酪坏死,有病理意义。因为正常儿童 BCG 接种后局部淋巴结肿大很少见,出现钙化则更少见。大部分患儿无局部结痂延迟或流脓。2 例患儿淋巴结病理检查示抗酸染色阳性,但未进行牛型 BCG 分型,因此只能做出可能诊断。虽然无病原微生物学分类的证据,临床仍考虑与 BCG 接种有关,提示 X-CGD 患儿针对卡介苗的局部免疫反应减弱,支持呼吸爆发反应在抗分枝杆菌免疫反应中起重要作用,具体机制不清。本研究 4 例患儿高度怀疑肺结核,4 例不能完全除外肺结核。由于原发性肺结核患儿痰菌阳性率低,临床不常规开展细针穿刺或病理活检,8 例患儿的诊断均基于临床、放射线和/或活动性结核感染的微生物学证据进行临床诊断,肺内病灶是否与卡介苗播散有关,未找到病原学证据,但经抗结核治疗后肺内病变明显吸收支持分枝杆菌感染。鉴于 BCG-osis 可出现于 CGD 病人,临床不能排除与 BCG 的相关性,建议 CGD 患者避免接种 BCG。

Rae 等^[12] 从 131 个 XLR-CGD 家系中鉴定出

103个特异CYBB突变:缺失11%,移码突变24%,无义突变23%,错义突变23%,拼接区突变17%和调节区突变2%。CYBB基因突变类型几乎涵盖了破坏基因表达的所有机制。此外CYBB基因内部突变的分布呈现广泛的异质性。位于氨基端跨膜区的突变明显多于位于胞浆区的突变。在本研究目前获得的25例CYBB突变中,除了未发现大的缺失和调节区突变外,可见其他各种突变类型。11例位于氨基端跨膜区,14例位于胞浆区,与国外报道的有区别,希望可作为既往数据库内容的补充。目前尚未观察到BCG接种相关事件与CYBB基因突变类型的相关性。

抗分枝杆菌的免疫机制复杂,虽然以获得性免疫为主,越来越多的证据表明天然免疫亦起不可或缺的作用。本研究发现XLR-CGD患儿易于出现BCG相关事件,有力地证明了氧呼吸爆发参与抗分枝杆菌的免疫过程。相关机制的阐明有助于加深抗分枝杆菌免疫机制的理解。

[参 考 文 献]

[1] van den Berg JM, van Koppen E, Åhlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease; the European experience[J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5234.

[2] Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease [J]. Medicine,2000, 79(3): 170-200.

[3] Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria; the human model [J]. Annu Rev Immunol, 2002,20:581-620.

[4] Reichenbach J, Rosenzweig S, Döffinger R, Dupuis S, Holland SM, Casanova JL. Mycobacterial diseases in primary immunodeficiencies [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001,1(6):503-511.

[5] 贺建新,赵顺英,江载芳.重症联合免疫缺陷病15例[J].实用儿科临床杂志,2008,23(21):1666-1668.

[6] Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways [J]. Immunol Rev, 2005, 203:38-47.

[7] Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients[J]. Medicine, 2000, 79(3): 155-169.

[8] Grumach AS, Duarte AJ, Bellinati-Pires R, Pastorino AC, Jacob CM, Diogo CL, et al. Brazilian report on primary immunodeficiencies in children:166 cases studied over a follow-up time of 15 years [J]. J Clin Immunol, 1997, 17(4):340-345.

[9] Bustamante J, Aksu G, Vogt G, de Beaucoudrey L, Genel F, Chappier A, et al. BCG-osis and tuberculosis in a child with chronic granulomatous disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 120(1): 32-38.

[10] Lee PP, Chan KW, Jiang L, Chen T, Li C, Lee TL, et al. Susceptibility to mycobacterial infections in children with X-linked chronic granulomatous disease: a review of 17 patients living in a region endemic for tuberculosis [J]. Pediatr Infect Dis J, 2008, 27(3): 224-230.

[11] Kusuha K, Ohga S, Hoshina T, Saito M, Sasaki Y, Ishimura M, et al. Disseminated Bacillus Calmette-Guérin lymphadenitis in a patient with gp91phox-chronic granulomatous disease 25 years after vaccination [J]. Eur J Pediatr, 2009,168(6):745-747.

[12] Rae J, Newburger PE, Dinuer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, et al. X-linked chronic granulomatous disease; mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox compotent of respiratory-burst oxidase [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(6): 1320-1331.

(本文编辑:黄 榕)