

## 二氢罗丹明流式细胞分析方法用于 X-连锁慢性肉芽肿病诊断和携带者筛查

贺建新<sup>1</sup> 尹青琴<sup>1</sup> 佟月娟<sup>1</sup> 刘秀云<sup>2</sup> 徐保平<sup>2</sup> 赵顺英<sup>2</sup> 申昆玲<sup>2</sup> 江载芳<sup>2</sup>

(首都医科大学附属北京儿童医院 1. 北京市儿科研究所; 2. 呼吸中心, 北京 100045)

吞噬细胞在吞噬过程中产生过氧阴离子和其他反应性氧复合物, 此过程被称为呼吸爆发, 这些代谢产物与溶酶体酶共同参与杀灭被吞噬的微生物。慢性肉芽肿病 (chronic granulomatous disease, CGD) 患者存在吞噬细胞呼吸爆发缺陷<sup>[1]</sup>, 该病诊断基于体外检测中性粒细胞刺激后消耗氧和产生氧代谢物缺陷。检测吞噬细胞呼吸爆发的实验方法很多, 二氢罗丹明 (dihydrorhodamine 123, DHR123) 流式细胞分析方法是检测吞噬细胞呼吸爆发的特异方法, 在国外已常规应用于临床<sup>[2]</sup>。国内只是近年才认识到慢性肉芽肿病的重要性, 关于该方法经验还比较少。本研究发现与磷酸盐缓冲液 (PBS) 处理标本相比, 经佛波酯 (PMA) 刺激后, 正常人中性粒细胞有明显移位, 而 X-连锁慢性肉芽肿病 (X-CGD) 患儿无移位, 携带者母亲可有双峰, 提示该方法在 X-CGD 诊断和携带者筛查中有重要的应用价值。

### 1 资料与方法

#### 1.1 研究对象

自 2012 年 9 月至 2013 年 3 月, 选取于我院经基因突变分析明确诊断为 X-CGD 的 7 例患儿纳入本研究, 且均获得患儿家属的知情同意, 同时以患儿父亲做为健康对照。

#### 1.2 基因分析

抽取静脉血, EDTA 抗凝, 用 TIANamp Blood DNA 试剂盒 (天根生化有限公司) 提取基因组 DNA, 设计外显子及内含子交界处引物 (自行设计, 上海生工有限公司合成), 扩增 13 个外显

子。反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 50 次; 72℃ 终延伸 2 min。产物送上海生工公司测序。参照 CYBB 基因组 DNA (NC\_000023.10) 序列用 NCBI 的 BLAST 程序进行同源分析。

#### 1.3 DHR123 流式细胞术分析中性粒细胞呼吸爆发试验

取患儿及其家族成员、健康对照肝素抗凝血 3 mL, 每份标本分为对照管和刺激管 2 管。向对照管和刺激管内加入 100 μL 全血、20 μL DHR123 (0.1 mg/mL) 和 5 μL 过氧化氢酶 (70 U/μL), 对照管内再加入 200 μL PBS, 而向刺激管内再加入 200 μL PMA 工作液 (1 μg/mL), 混匀后 37℃ 水浴 10 min; 加 5 mL PBS 至各管, 1500 rpm 离心 5 min, 洗两次; 弃上清, 加 500 μL 溶血素至各管, 剧烈混悬, 放置 5 min 后加 125 μL 1% 多聚甲醛 (终浓度 0.2%), 立即涡旋; 加 5 mL PBS, 洗两次; 将细胞团重悬于 1 mL 冷 PBS 中, 置于冰上, 30 min 内检测。

### 2 结果

#### 2.1 临床表现

7 例患儿均于生后 6 个月内起病, 临床表现为肺炎 7 例, 卡介苗淋巴结炎 4 例, 腹泻病 2 例, 肛周脓肿 1 例, 淋巴结炎 1 例, 肝脾大 1 例, 败血症 1 例, 皮肤肉芽肿 1 例, 心肌炎 1 例。见表 1。

#### 2.2 基因突变分析结果

7 例患儿的突变分别位于外显子 1、6、10、13、1~13 及内含子 1、6, 其中错义突变 3 例, 插

入/缺失 1 例,全外显子缺失 1 例,拼接区突变 2 例。新发现突变 2 例。见表 2。

### 2.3 DHR123 流式细胞术分析结果

与 PBS 处理组相比, PMA 刺激后, 正常人中

性粒细胞峰有明显移位; X-CGD 患儿中性粒细胞峰无移位; 患儿母亲作为携带者, 中性粒细胞峰呈现为双峰, 提示发生明显峰移位的细胞为正常细胞, 峰无移位的细胞为缺陷细胞。见图 1。

表 1 7 例患儿临床表现

| 编号 | 性别 | 诊断年龄     | 起病年龄 | 临床表现                                | 家族史 |
|----|----|----------|------|-------------------------------------|-----|
| 1  | 男  | 6 月      | 1 月  | 肺炎、卡介苗淋巴结炎、腹泻                       | 阴性  |
| 2  | 男  | 4 月      | 3 月  | 肺炎、卡介苗淋巴结炎                          | 阴性  |
| 3  | 男  | 1 月 12 d | 9 d  | 肺炎(真菌?)                             | 阳性  |
| 4  | 男  | 1 岁 4 月  | 2 月  | 肺炎、卡介苗淋巴结炎                          | 阴性  |
| 5  | 男  | 2 月      | 15 d | 肺炎、淋巴结炎、肝脾大、败血症                     | 阴性  |
| 6  | 男  | 4 岁 4 月  | 未知   | 反复呼吸道感染、腹泻、肺炎(结核?)                  | 阳性  |
| 7  | 男  | 2 岁 6 月  | 6 月  | 皮肤肉芽肿(毛霉菌)、肛周脓肿、肺炎(真菌?)、卡介苗淋巴结炎、心肌炎 | 阳性  |

表 2 7 例患儿基因突变分析

| 编号 | 基因                | 性别 | 外显子/内含子   | 突变性质           | 编码区改变          | 刺激指数* | 母亲双峰 |
|----|-------------------|----|-----------|----------------|----------------|-------|------|
| 1  | CYBB              | 男  | exon 1    | 1 A>C          | Met1Val        | 1     | +    |
| 2  | CYBB              | 男  | Intron 6  | +6 T>C         | skipped exon 6 | 1     | +    |
| 3  | CYBB              | 男  | Intron 1  | -2 A>G         | skipped exon 2 | 1     | +    |
| 4  | CYBB              | 男  | exon 13   | 1702 G>A       | Glu568Lys      | 1     | +    |
| 5  | CYBB <sup>#</sup> | 男  | exon 6    | 564-567delAATT | 189fsx25       | 1     | -    |
| 6  | CYBB              | 男  | exon 1~13 | del            | del1-570AA     | 1     | 未测   |
| 7  | CYBB <sup>#</sup> | 男  | exon 10   | 1234 G>A       | Gly412Arg      | 1     | +    |

注: \* 示刺激指数是指经佛波酯(PMA)刺激后的平均荧光强度除以 PBS 刺激后的平均荧光强度; # 示新发现的突变类型。

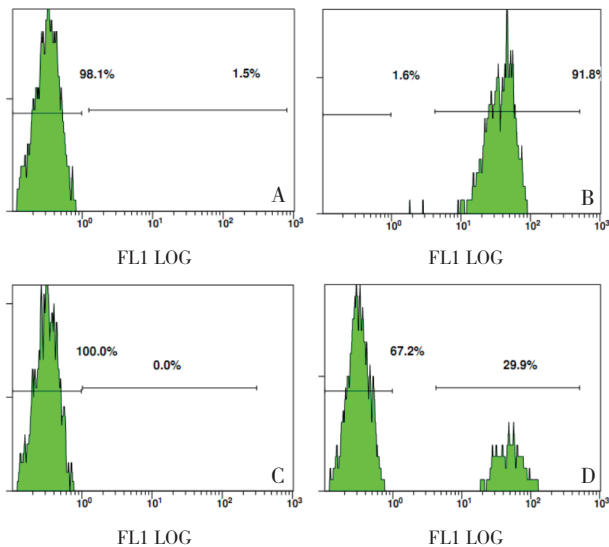


图 1 DHR123 流式峰图 A: 健康对照(PBS); B: 健康对照(PMA), 相比健康对照(PBS), 中性粒细胞峰发生明显移位; C: X-CGD 患儿(PMA), 男, 1 月 12 d, 与健康对照(PBS)相比, 中性粒细胞峰未发生移位; D: 患儿母亲(PMA), 中性粒细胞峰呈现双峰。

### 3 讨论

当病原微生物侵入时, 天然免疫系统是人体的第一道防线, 吞噬细胞及补体是天然免疫系统的重要组成部分。吞噬细胞通过呼吸爆发反应产生过氧阴离子非特异杀灭入侵的微生物。CGD 的发病机制源于吞噬细胞呼吸爆发缺陷。患者主要表现为反复细菌、真菌感染和炎性肉芽肿<sup>[3]</sup>。虽然该病是少见病, 但我国人口基数大, 病人总数是可观的。随着认识的深入, 近年国内报道的病例数逐渐增多, 我院每年病例数至少十余例<sup>[4-5]</sup>, 因此尽快明确诊断, 及时有效的治疗, 系统的预防治疗对此类患儿尤其重要。

评价呼吸爆发的实验方法有很多, 如光泽精(lucigenin)或鲁米诺(luminol)依赖的化学发光, 细胞色素 C 还原实验或四氮唑蓝(p-Nitro-Blue tetrazolium chloride, NBT)还原实验<sup>[6]</sup>。NBT 还原实验是最先应用的 CGD 的筛查方法<sup>[7]</sup>。NBT 是淡黄色染料, 被过氧化物还原为深蓝色的不溶于水

的代谢产物。CGD患者的中性粒细胞在NBT和适当刺激孵育下,不能形成细胞内深蓝色的沉积物,借以与正常中性粒细胞区别。NBT实验是CGD筛查的准确方法,但主观性强,而且是基于有限数量细胞的显微镜观察。大部分CGD患者用该方法检测不到活性,但一些病例可产生少量过氧化物( $X^+$ -CGD),无呼吸爆发,稳定的活性可持续1h或更久。由于NBT依赖于蓝黑色沉淀物的聚集,随时间延长,这部分患儿会表现正常。因此正常的NBT结果不能除外CGD。NBT方法用于 $X^+$ -CGD携带者筛查较困难,因为在显微镜下区分两群细胞很困难,甚至正常人10%的细胞NBT阴性。

呼吸爆发反应理想的评价方法应该做到需血量少、技术简单、能行定量分析,能区分病态和正常细胞,DHR123流式细胞分析方法均可满足上述条件<sup>[2]</sup>。DHR123可自由出入细胞,定位于线粒体,经过氧化氢和过氧阴离子氧化后形成罗丹明123(rhodamine 123, R123),经蓝光(488 nm)激发后产生绿色荧光(500~540 nm)。刺激指数是指经PMA刺激后的平均荧光强度除以PBS刺激后的平均荧光强度。美国NIH DHR数据库显示正常人刺激指数(SI)为127.9(85.2~264.6),X-CGD患者为1.3(0.9~2.2),p47phox CGD(常染色体隐性CGD最常见类型)患者为13.2(3.5~52.1),但需注意其中17% X-CGD患儿SI大于4.5,6.4% p47phox CGD患儿SI小于4.5,二者有重叠<sup>[8]</sup>。可见需结合蛋白表达分析和基因突变分析来明确诊断。

正常人中性粒细胞经PBS及PMA刺激后阳性细胞百分数是质控标准,PBS刺激后阳性细胞百分数应<3%,PMA刺激后阳性细胞百分数应接近100%,由于实验室条件不同,会有一定出入,但不应偏移太大。由于X-CGD患者吞噬细胞不产生过氧化物,PMA刺激后峰图和PBS刺激后峰图相近,完全无移位,换算出的SI接近1。由于常染色体隐性CGD产生一定量的过氧化物,PMA刺激后细胞基本都移位至阳性区,只不过细胞荧光强度较分散,平均荧光强度低,换算出的SI大于1<sup>[9]</sup>。因此在CGD的诊断中平均荧光强度及SI是最重要的指标。由于本课题组开展此实验较晚,观察目前的结果,与文献报道比较,正常人经PMA

刺激后中性粒细胞移位程度不够大,算出的SI值小,因此需要更加优化实验条件。可能由于此,目前常染色体隐性CGD患儿与X-CGD患儿不能通过DHR来鉴别。

如果平均荧光强度正常,但阳性细胞百分数未达到90%,甚至更低,说明凋亡细胞过多。一方面需改进操作手法,由于中性粒细胞在体外非常脆弱,对外力极其敏感,操作过程一定要轻柔。另一方面可用DNA染液区分活细胞和死细胞,然后针对活细胞再进行分析。取血时负压过高,部分抗凝,运输时间过长或室温孵育,很多情况下可出现功能不健全的细胞群,甚至功能健全的细胞数量很少。基于以上因素用于携带者筛查,需要仔细控制实验分析。如果可能的携带者出现双峰,一定要控制不同门的位置。携带者的两群细胞刺激后一直移位到固定位置。如果DHR方法损伤细胞与携带者有重叠,可做蛋白表达,由损伤引起者DHR与蛋白表达的差别可达6%。如果无重叠或无损伤的细胞,二者的差别小于1%。体外强力的损伤也可引起蛋白表达的人工双峰,此种情况下,DHR方法提示蛋白表达阴性细胞的损伤,功能完整细胞一致性正常,故可除外携带者。用流式方法检测功能健全细胞是很大的优势,如果有正常细胞群,基本可除外CGD,除非X-CGD携带者由于极端莱昂化可出现CGD症状。当然,如果X-CGD患者母亲向正常细胞偏移明显,DHR分析可不表现双峰<sup>[10]</sup>。

由于DHR分布不成对称性,正常范围不能用标准差,而是用百分位数来表示。DHR不受儿童年龄、性别或症状影响(严重败血症可使中性粒细胞代谢耗竭)。儿童和成人正常标准无区别,尽管儿童的平均值略高,可能与实验操作有关,而不是生理或医学因素,因此不影响日常CGD诊断<sup>[10]</sup>。髓过氧化物酶(MPO)缺陷可出现假阳性,一方面两种疾病的临床表现不同,另一方面可用其他方法来鉴别,如MPO缺陷者嗜酸性粒细胞的DHR功能正常;体外加入重组人MPO,DHR荧光信号明显增强;用光泽精标记会有正常的强荧光信号产生<sup>[11]</sup>。

DHR123流式细胞分析是X-CGD诊断及携带者筛查既敏感又特异的方法。

## 【参考文献】

- [1] Segal BH, Leto TL, Gallin JJ, et al. Genetic, biochemical and clinical features of chronic granulomatous disease[J]. *Medicine*, 2000, 79(3): 170-200.
- [2] Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, et al. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes[J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 331(1-2): 103-110.
- [3] Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, et al. Chronic granulomatous disease report on a national registry of 368 patients[J]. *Medicine*, 2000, 79(3): 155-169.
- [4] 贺建新, 赵顺英, 江载芳. 儿童X连锁慢性肉芽肿病临床特点和CYBB基因突变分析[J]. *临床儿科杂志*, 2011, 29(1): 41-45.
- [5] 贺建新, 赵顺英, 江载芳. 重症卡介苗淋巴结炎与儿童X连锁慢性肉芽肿病[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(6): 490-493.
- [6] Rothe G, Emmendorfer A, Oser A, et al. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123[J]. *J Immunol Methods*, 1991, 138(1): 133-135.
- [7] Vowells SJ, Fleisher TA, Malech HL. Testing for chronic granulomatous disease[J]. *The Lancet*, 1996, 347(9007): 1048.
- [8] Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, et al. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(2): 374-379.
- [9] Crockard AD, Thompson JM, Boyd NA, et al. Diagnostic and carrier detection of chronic granulomatous disease in five families by flow cytometry[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997, 114(2): 144-152.
- [10] van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, et al. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst[J]. *J Immunological Methods*, 1996, 191(2): 187-196.
- [11] Mauch L, Lun A, O'Gorman MR, et al. Chronic granulomatous disease and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(5): 890-896.

( 本文编辑: 刘伟 )

· 消息 ·

## 《儿科临床技能》征订通知



Dr. Goldbloom 主编的《儿科临床技能》自 1992 年出版后深受各国儿科医生的喜欢, 迄今已发行第 4 版。该书有别于其他教科书传统的书写方法, 把临床技能、临床思维培养作为书写的主线, 集中阐述了与家长及患儿交流沟通、采集病史以及准确体格检查的技能, 并应用大量病例资料进行诊断分析, 以提高年轻医生的临床思维能力。

《儿科临床技能》一书是国内首版, 本书不但涵盖了儿科临床常用知识, 还在新版中增加了儿童青少年心理问题、儿童行为异常和儿童虐待等目前儿科界日益增加的新的健康问题。该书内容通俗易懂, 是一本适合医学生和儿科临床医师学习、工作的良师益友。

本书已于 2013 年 12 月由北京大学医学出版社出版。由北京解放军第 302 医院新生儿诊疗中心主任张雪峰主译。ISBN: 978-7-5659-0670-1, 定价: 125 元。

购书信息: (1) 零售: 北京大学医学出版社读者服务部 010-62046414 或当当网、亚马逊; (2) 10 本以上可直接联系北京大学医学出版社发行部周老师, 电话: 010-82802611。

北京大学医学出版社  
2014 年 1 月