

论著·临床研究

EB病毒感染患儿CD163表达及其临床意义

陈燕丽¹ 陈福雄² 邓长柏¹ 夏波² 吴丽萍² 吴泽霖² 卢慧敏²

(1. 广州医科大学附属第五医院儿科, 广东 广州 510700;
2. 广州医科大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510120)

[摘要] **目的** 通过检测EB病毒(EBV)感染患儿CD163水平,探讨CD163在EBV相关噬血细胞综合征(HLH)的诊断、病情监测及预后中的意义。**方法** 将因不同感染就诊的94例患儿分为EBV阳性组($n=55$)和EBV阴性组($n=39$,对照组),进一步将EBV阳性患儿分为传染性单核细胞增多症(IM)组($n=47$)和HLH组($n=8$)。应用酶联免疫法检测血清可溶性CD63(sCD163)水平;流式细胞术检测外周血单核细胞表面CD163表达率。**结果** HLH患儿血清sCD163水平均 >10000 ng/mL,其中3例 >30000 ng/mL;HLH组患儿血清sCD163水平远高于对照组和IM组($P<0.05$)。EBV阳性患儿血清sCD163水平与EBV-DNA拷贝数、乳酸脱氢酶和血清铁蛋白水平呈正相关,与白细胞计数、中性粒细胞计数、血红蛋白和血小板计数呈负相关($P<0.05$)。HLH患儿sCD163水平在治疗后逐步下降,但随病情反复又升高。**结论** EBV感染患儿的CD163水平与临床严重程度密切相关,sCD163 >10000 ng/mL的EBV感染患儿需警惕并发HLH。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(5): 492-495]

[关键词] EB病毒;噬血细胞综合征;CD163;儿童

Expression of CD163 in children with Epstein-Barr virus infection

CHEN Yan-Li, CHEN Fu-Xiong, DENG Chang-Bo, XIA Bo, WU Li-Ping, WU Ze-Lin, LU Hui-Min. Department of Pediatrics, Fifth Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510700, China (Deng C-B, Email: dengchangbo@163.com)

Abstract: Objective To study the clinical significance of CD163 in the diagnosis and the evaluation of severity and prognosis of childhood hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). **Methods** Ninety-four children were classified into Epstein-Barr virus (EBV)-positive ($n=55$) and EBV-negative groups ($n=39$; control group). The EBV-positive group was subgrouped into infectious mononucleosis (IM; $n=47$) and HLH ($n=8$). Serum levels of soluble CD163 were measured using ELISA. Expression of CD163 on mononuclear cells was detected by flow cytometry. **Results** The serum levels of soluble CD163 were >10000 ng/mL in all eight HLH patients (>30000 ng/mL in 3 cases). The mean serum levels of soluble CD163 in the HLH group were significantly higher than in the control and IM groups ($P<0.05$). The serum levels of soluble CD163 in EBV-positive children were positively correlated with EBV-DNA copies and serum levels of ferritin and LDH, but were negatively correlated with white blood cell count, neutrophil count, hemoglobin and platelet count. The follow-up after treatment for three HLH patients showed that serum levels of soluble CD163 were significantly reduced, but the soluble CD163 levels rebounded in one patient who was complicated by fungal pneumonia infection. **Conclusions** The levels of serum soluble CD163 may be related to the severity in children with HLH. The EBV-positive children with soluble CD163 levels >10000 ng/mL should be considered the possibility of HLH.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(5): 492-495]

Key words: Epstein-Barr virus; Hemophagocytic lymphohistiocytosis; CD163; Child

噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH)是多种

原因造成自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和T细胞功能缺陷,引起大量炎症细胞因子释放,造

[收稿日期] 2014-10-14; [接受日期] 2014-12-13

[作者简介] 陈燕丽,女,硕士,医师。

[通信作者] 邓长柏,男,主任医师。

成机体巨噬细胞活化, 机体脏器、组织损伤的一组临床综合征^[1]。HLH 病因及发病机制复杂, 临床表现具有特征性但缺乏特异性, 易与传染性单核细胞增多症 (IM)、脓毒症、自身免疫性疾病、病毒感染和造血系统恶性疾病相混淆, 并且病情进展迅猛而凶险, 如不及时给予诊断及治疗, 则预后差, 病死率极高, 因此如何提高 HLH 的早期诊断, 实施有效的治疗, 是临床工作中亟待解决的问题。

CD163 是一种仅仅在单核细胞-巨噬细胞系统细胞膜上表达的跨膜糖蛋白分子, 可作为一项反应单核巨噬细胞系统功能状态的临床实用指标^[2]。CD163 存在形式有两种, 一种是以膜性形式 (membranous CD163, mCD163) 存在于单核细胞和巨噬细胞膜上, 另一种以可溶性形式 (soluble CD163, sCD163) 存在于血清、血浆或其他组织液内。sCD163 是巨噬细胞活化的重要标志物, 在一些疾病中作为标记物监测巨噬细胞活性。Jordan 等^[3]提出把血清中 sCD163 的升高作为 HLH 的诊断指标之一。巨噬细胞活化可能在脓毒症炎症失控反应中起核心作用, 其过度活化引起感染相关性 HLH 可能是脓毒症进展甚至引起死亡的原因之一。因此, 本研究通过检测 EB 病毒 (EBV) 感染患儿 CD14⁺ 细胞膜表面 CD163 与血清中相应 sCD163 的水平, 分析两种不同存在形式之间的关系, 并探讨其与患儿临床表现、疗效及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 6 月至 2013 年 9 月因不同感染就诊于广州医科大学附属第一医院的患儿 94 例为研究对象, 其中男 52 例, 女 42 例, 年龄最大 16 岁, 最小 2 个月, 平均年龄 4.3 岁。依据 EBV 检测结果将患儿分为 EBV 阳性组 ($n=55$) 和 EBV 阴性组 (对照组, $n=39$); 依据《诸福棠实用儿科学》^[4] 以及 HLH-2004^[5] 诊断标准, 进一步将 EBV 阳性患儿分为 IM 组 ($n=47$) 和 HLH 组 ($n=8$)。

1.2 标本和临床资料采集

所有患儿标本在入院时采集, 干燥管和 EDTA 管分别收集外周静脉血 1 mL; 3 例 HLH 患儿于住院诊断后的第 1、2、3、4 周, 其中 1 例患儿还于

住院诊断后第 5 周再次抽取血标本。干燥管收集的血标本以 3000 rpm 离心 15 min, 吸取上层血清, 放于 -80°C 冰箱待测; 同步收集患儿住院期间的临床资料进行回顾性分析。

1.3 酶联免疫法检测血清 sCD163 水平

按照美国 R&D 公司的人可溶性 CD163 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 试剂盒的检测范围为 0~100 pg/mL。

1.4 流式细胞术检测外周血单核细胞表面 CD163 表达率

CD14 为单核细胞表面的标记抗原, 先以 CD14 荧光强度对侧向角散射 (SSC) 做散点图, 用门技术圈出 CD14⁺ 的单核细胞群, 每份检测 10000 个细胞。以十字门划定 CD14⁺CD163⁺ 细胞群, 用该细胞群占 CD14⁺ 的单核细胞群的百分比作为外周血单核细胞表面 CD163 表达水平, 所用单克隆抗体均购买自美国 BD 公司。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 两变量间的相关分析采用 Pearson 相关分析; 非正态分布计量资料用中位数 (范围) 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney 秩和检验, 两变量间的相关分析采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同感染患儿入院时血清 sCD163 水平

对照组、IM 组和 HLH 组血清 sCD163 水平分别为 4190 ± 1733 ng/mL、 7212 ± 5814 ng/mL、和 28369 ± 6254 ng/mL。三组间血清 sCD163 水平比较差异有统计学意义 ($F=3.252$, $P=0.023$), 其中 HLH 组血清 sCD163 水平远高于对照组和 IM 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 EBV 感染患儿血清 sCD163 与主要实验室数据相关性分析

将 55 例 EBV 感染患儿血清 sCD163 水平与主要实验室数据进行相关性分析, 结果显示: 血清 sCD163 水平与异型淋巴细胞比例、淋巴细胞比例、单核细胞比例、谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶

(AST)均无显著相关性($P>0.05$)；血清sCD163水平与EBV-DNA拷贝数($r=0.456$, $P=0.003$)、乳酸脱氢酶($r=0.301$, $P=0.032$)和血清铁蛋白($r=0.853$, $P=0.001$)呈正相关；血清sCD163水平与白细胞计数($r=-0.361$, $P=0.001$)、中性粒细胞计数($r=-0.441$, $P=0.001$)、血红蛋白($r=-0.372$, $P=0.005$)和血小板计数($r=-0.378$, $P=0.004$)呈负相关。

2.3 HLH患儿血清sCD163水平及预后

本研究8例HLH患儿血清sCD163水平均 >10000 ng/mL, 有3例 >30000 ng/mL；其中1例患儿sCD163水平 >30000 ng/mL并伴有EBV-DNA拷贝数(9.25×10^8 copies/mL)明显升高, 临床上呈暴发性经过, 迅速死亡；余7例经HLH-2004方案治疗后, 好转4例, 死亡3例。

2.4 HLH患儿血清sCD163的动态变化

HLH患儿中有3例进行了血清sCD163水平的动态观察, 第一周依据HLH-2004方案予化疗后sCD163水平均明显降低, 且在随后3周内呈平缓下降趋势；其中1例患儿在治疗第5周时合并真菌性肺炎, 病情重新活动, 此时血清sCD163水平虽仍呈下降趋势, 但下降幅度较前减小(图1)。

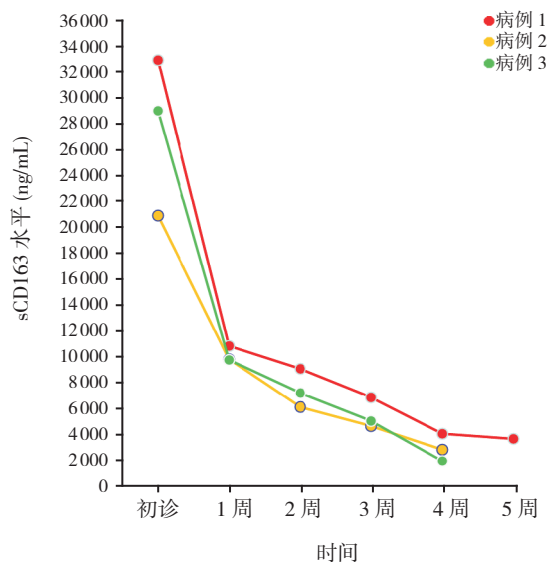


图1 3例HLH患儿血清sCD163动态变化

2.5 不同感染患儿入院时外周血单核细胞CD163表达率

本研究利用流式细胞术检测46例不同感染患儿入院时外周血单核细胞表面CD163表达

率, 其中对照组24例, IM组19例, HLH组3例, 外周血单核细胞表面CD163表达率分别为 $34\% \pm 15\%$ 、 $37\% \pm 19\%$ 、 $45\% \pm 34\%$, 3组CD163表达率差异无统计学意义($F=0.641$, $P=0.529$)。

2.6 IM患儿血清sCD163水平与单核细胞表面CD163表达率的相关性分析

将19例IM患儿血清sCD163水平与单核细胞表面的CD163表达率进行相关性分析, 结果显示两者之间无明显相关性($r=0.109$, $P>0.05$)。

3 讨论

单核巨噬细胞是机体炎症和天然免疫的关键效应细胞, CD163具有单核巨噬细胞系表达特异性, 可作为巨噬细胞活化的标记, 而由CD163分子胞外段释放的sCD163也是一种新型巨噬细胞活化血清标志物。血清sCD163性能稳定, 在 -20°C 下可保持至少7个月, 在 -80°C 可保持更长时间, 而且实验证明反复冻融至少7次的血清与新鲜血清sCD163水平之间无明显差异^[6]。Schaer等^[7]检测到可溶性CD163在反应性HLH、败血症、急性IM、利什曼虫感染患者及健康对照者血清中的平均水平分别为39、9.1、8.2、6.7、1.8 mg/L。本研究将EBV感染患儿血清sCD163水平与主要实验室指标进行相关性分析, 结果提示sCD163水平与EBV感染患儿的疾病严重程度相关。本研究结果显示HLH组血清sCD163水平远高于对照组和IM组, 并且本研究中的8例HLH患儿血清sCD163水平均 >10000 ng/mL, 与文献报道^[8]一致。

本研究动态观察了3例HLH患儿血清sCD163水平的变化, 结果显示第1周按照HLH-2004方案予化疗后sCD163水平均明显下降, 在随后的3周时间里呈平缓下降趋势；其中1例在治疗第5周时合并真菌性肺炎, 此时血清sCD163水平虽仍呈下降趋势, 但下降幅度较前减小, 考虑合并的感染有诱发巨噬细胞重新活化的趋势, 但正在使用的免疫抑制剂控制了其活化的程度。Schaer等^[7]对1位EBV相关HLH患者进行2年的随访发现, 每一次病情的复发都伴随sCD163的突然异常升高。而另1位巨细胞病毒相关HLH患者经过化疗后, 病情明显改善, 但随后并发致命的细菌性败血症, 检查发现与细菌感染相关的炎症

指标 CRP 持续上升,而反映巨噬细胞活化的指标 sCD163 却持续下降。

以上研究结果提示血清 sCD163 升高可作为 HLH 的诊断指标之一,并可帮助评估疗效、预后和及时了解病情变化。与检测血清 sCD163 的 ELISA 实验方法比较,细胞表面 mCD163 的流式细胞术检测手段更加操作简捷、所需样本量少且结果快速精准。Weaver 等^[9]研究显示,sCD163 系由活化 Toll 样受体或炎症因子激活基质金属蛋白酶,磷酸化 mCD163,自单核细胞和巨噬细胞膜表面脱落形成。那么,细胞表面 CD163 在 EBV 感染的患儿体内的表达及其与血清 sCD163 的关系又是如何,目前国内外尚未见相关文献报道。本研究在前期的预实验中曾经采用肝素管收集血标本,结果在单核细胞群内检测不到 CD163 的表达。文献报道^[10],单核细胞 CD163 的表达率在 5%~30% 左右,对血标本使用不同的抗凝剂和处理方法对 CD163 的流式细胞术检出率影响很大,EDTA 抗凝和全血处理法最佳。本研究结果显示 CD14⁺ 单核细胞表面 CD163 表达率在对照组、IM 组和 HLH 组差异无统计学意义,并且在 IM 患儿中的表达与血清 sCD163 无明显相关性。该结果与 Onofre 等^[11]的研究结果不同:血浆中 sCD163 浓度与外周血单核细胞和组织中的巨噬细胞膜表面 mCD163 表达水平成反比,两者之间的平衡与单核巨噬细胞的功能状态有关,而与其绝对计数无关。推测其中原因可能与 CD163 在成熟组织(例如肝、脾、骨髓和淋巴结)中的巨噬细胞的表达要高于外周血单核细胞^[12]有关,而本研究尚未对组织中的巨噬细胞膜表面 mCD163 的表达水平进行检测。尽管如此,但因为单核细胞是巨噬细胞的前体,所以通过检测外周血单核细胞表面 CD163 表达率来反映机体的免疫活化还是有一定意义的。

有研究表明,不同的活化信号激活巨噬细胞,根据分泌产物以及生物学标志,将活化巨噬细胞分为经典激活和选择性激活巨噬细胞两群^[13]。经典激活的巨噬细胞主要发挥杀伤效应,而选择性活化的巨噬细胞倾向免疫调控和机体恢复。在炎症过程中,巨噬细胞的经典激活与选择性激活互相协调,达到一个平衡。一旦平衡失调,无论哪种方式过强,都可能引起病理损伤。本研究 HLH

患儿数量有限,故 HLH 患儿外周血单核细胞尤其是组织中巨噬细胞表面 CD163 的表达水平及其与病情变化、与血清 sCD163 水平关系如何尚待进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders[J]. Hematol Am Soc Hematol Educ Program, 2009: 127-131.
- [2] Switala JR, Hendricks M, Davidson A, et al. Serum ferritin is a cost-effective laboratory marker for hemophagocytic lymphohistiocytosis in the developing world[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2012, 34(3): e89-e92.
- [3] Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, et al. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Blood, 2011, 118(15): 4041-4052.
- [4] Henter JI, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Pediatr Blood Cancer, 2007, 48(2): 124-131.
- [5] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社,2002: 821-825.
- [6] Moller HJ, Hald K, Moestrup SK. Characterization of enzyme-linked immunosorbent assay for soluble CD163[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2002, 62(4): 293-299.
- [7] Schaer DJ, Schleiffenbaum B, Kurrer M, et al. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome[J]. Eur J Haematol, 2005, 74(1): 6-10.
- [8] Moller HJ. Soluble CD163[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72: 1-13.
- [9] Weaver LK, Pioli PA, Wardwell K, et al. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell surface Toll-like receptors[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(3): 663-671.
- [10] Moniuszko M, Kowal K, Rusak M, et al. Monocyte CD163 and CD36 expression in human whole blood and isolated mononuclear cell samples: influence of different anticoagulants[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(6): 704-707.
- [11] Onofre G, Kolackova M, Jankovicova K, et al. Scavenger receptor CD163 and its biological functions[J]. Acta Medica (Hradec Kralove), 2009, 52(2): 57-61.
- [12] Nguyen TT, Schwartz EJ, West RB, et al. Expression of CD163 in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage[J]. Am J Surg Pathol, 2005, 29(5): 617-624.
- [13] Kowal K, Silver R, Stawinska E, et al. CD163 and its role in inflammation[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2011, 49(3): 365-374.

(本文编辑: 万静)