

儿童原发性噬血细胞综合征1例

王颖超 朱桂英 殷楚云 蒋兰君 赵晓明 盛光耀

(郑州大学第一附属医院儿科, 河南 郑州 450052)

患儿, 男, 3岁9个月, 因发热20 d入院。患儿入院前20 d受凉后出现不规则发热, 热峰39.5℃左右, 伴阵发性腹痛(脐周为主), 无咳嗽、咳痰、流涕, 无寒颤、抽搐、惊厥, 无皮疹、关节疼痛, 无头痛、恶心、呕吐等, 在当地医院予以抗感染(具体用药不详)治疗, 效果欠佳。起病以来, 患儿神志清楚、热退后精神、食欲可, 大小便正常。

既往体健。出生史、喂养史、生长发育史、家族史均无特殊。

入院体查: 体温39.0℃, 脉搏132次/min, 呼吸26次/min, 血压96/62 mm Hg, 体重15 kg。神志清楚, 精神差, 全身皮肤无苍白、黄染、色素脱失斑及出血点, 颈部及腹股沟可触及数个肿大淋巴结, 最大约2 cm×1 cm, 质中, 无压痛, 活动度可。球结膜无充血, 眼球无震颤, 瞳孔等大等圆、对光反射灵敏。口唇无发绀, 口腔黏膜无破溃, 无异常分泌物, 咽充血, 双侧扁桃体Ⅱ°肿大。心肺无异常。腹平软, 肝脏肋缘下约3 cm、剑突下约4 cm, 脾肋下约3.5 cm, 质韧、界清、无压痛, 肠鸣音正常。脊柱四肢无畸形。肛门外生殖器无异常, 神经系统体查无异常。

实验室检查: 血常规白细胞 $2.6 \times 10^9/L$ 、中性粒细胞 $0.2 \times 10^9/L$ 、血小板 $93 \times 10^9/L$ 、血红蛋白72.0 g/L; 大小便常规、心肌酶、肾功能、免疫球蛋白、心电图均未见明显异常; 电解质: 钠122 mmol/L(正常范围: 135~153 mmol/L), 余项正常; C-反应蛋白6.88 mg/L(正常范围: 0~5 mg/L); 降钙素原0.43 ng/mL(正常范围: 0~0.20 ng/L); EB病毒IgM、IgG均阳性, EB病毒DNA $6.59 \times 10^3/mL$ ($<5.0 \times 10^2/mL$); 肝功能: 谷丙转氨酶234 U/L(正

常范围: 0~40 U/L)、谷草转氨酶195 U/L(正常范围: 0~40 U/L), 甘油三酯2.30 mmol/L(正常范围: <1.7 mmol/L), 血清铁蛋白1286.9 ng/mL(正常范围: 30~400 U/L); 凝血功能: FIB 1.1 g/L(正常范围: 2.0~4.0 g/L)、APTT 51 s(正常范围: 26~40 s)、TT 20 s(正常范围: 10~18 s)、D-Dimer 2.3 mg/L(正常范围: 0~0.3 mg/L), 余正常; NK细胞百分比2.0%(正常范围: 5.0%~27.0%), NK细胞绝对计数280/ μL (正常范围: 150~1100/ μL)。腹部彩超: 肝大, 脾大, 肠系膜多发肿大淋巴结; 肺部CT: 双肺炎症; 骨髓细胞学(图1): 骨髓增生明显活跃, 粒红比值正常, 全片有核细胞未见包涵体, 可见吞噬细胞(吞噬粒细胞、有核红细胞和血小板)。患儿父母EB病毒IgM均阴性、IgG均阳性, EB病毒DNA均 $<5.0 \times 10^2/mL$ 。

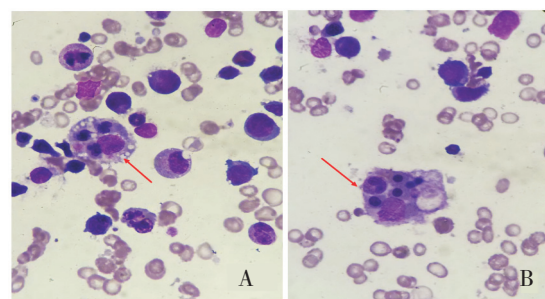


图1 患儿骨髓细胞学形态(瑞氏染色×100) A: 骨髓组织细胞吞噬有核红细胞和血小板(箭头所示); B: 骨髓组织细胞吞噬粒细胞和有核红细胞(箭头所示)。

经家属知情同意, 将患儿及其父母血标本送检至康圣环球医学特检集团, 通过高通量测序(NGS)法, 使用Life Technologies公司的Ion Proton测序仪检测家族性噬血细胞综合征(familial

[收稿日期] 2016-08-14; [接受日期] 2016-09-22

[作者简介] 王颖超, 男, 博士, 副主任医师。

hemophagocytic lymphohistiocytosis, FHL) 10 个相关基因, PRF1、UNC13D、STX11、STXBP2、XIAP、SH2D1A、Rab27a、AP3B1、LYST、ITK, 使用 DNASTar 软件包中的 Seqman 进行测序基因与正常 LYST 基因的比对分析。

结果: 患儿及其父亲 LYST 基因有一处杂合突变: 第 46 号外显子 10526 位 G → A, 导致编码的 3509 位精氨酸被谷氨酰胺代替 (Arg → Gln, Arg3509Gln), 为错义突变, 患儿母亲第 46 号外显子测序未发现此突变 (图 2)。经检索人类基因突变数据库和最新文献, 位于第 46 号外显子的突变 c.10526G>A (p.Arg3509Gln) 为新突变, 该突变在人群中发生率极低, 排除其单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。

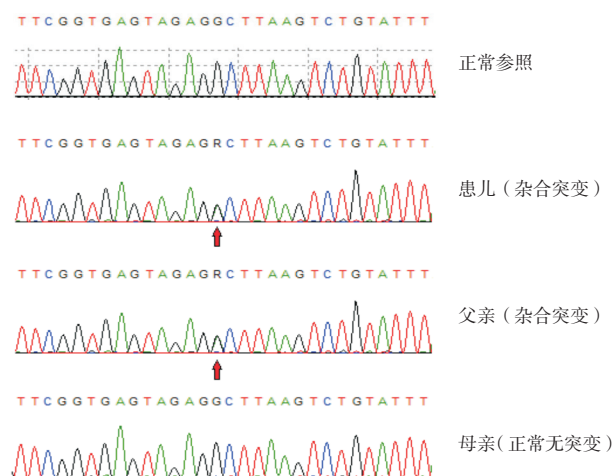


图 2 患儿及其父母 LYST 基因 46 号外显子检测结果
患儿及其父亲均存在 c.10526G>A 突变, 突变位点如箭头所指。
患儿母亲未检测到基因突变。

治疗第 20 周再次入院时, 通过流式细胞术检测外周血 NK 细胞和 CTL 细胞在刺激前后的细胞膜 CD107a 分子表达。与刺激前相比, 刺激后 CD107a 分子在 NK 和 CTL 细胞膜上的表达增加, 但增加幅度低于正常参考范围, 表明患儿 NK 和 CTL 细胞脱颗粒功能存在异常 (见表 1)。

表 1 CD107a 激发实验检测结果

细胞类型	刺激前	刺激后	Δ 值
NK-CD107a (%)	5.30	9.02	3.72
CTL-CD107a (MFI)	7 200.7	1 0801.3	1.5

注: ΔNK-CD107a = 刺激后 - 刺激前, <5% 为脱颗粒功能缺陷, 5%~10% 提示脱颗粒功能异常, >10% 提示脱颗粒功能正常。
ΔMFI = 刺激后 / 刺激前, ≥ 2.8 提示脱颗粒功能正常。

治疗与演变: 患儿发热 20 d, 伴有脾大、血细胞三系减少、FIB 明显减少、TG 升高、血清铁蛋白显著增高, 以及骨髓涂片发现噬血细胞, 符合噬血细胞综合征诊断标准^[1], 按 2004-HLH 方案 (地塞米松、环孢霉素、依托泊苷)^[1] 规律化疗, 辅以抗感染、粒细胞集落刺激因子、成分输血等支持治疗, 治疗第 2 周体温、血常规基本正常, 肝功能、TG、FIB、铁蛋白等提示已缓解; 治疗第 5 周, 患儿再度出现持续高热, 复查血常规、肝功能、血脂、凝血功能等提示复发 (见表 2~3), 家族性噬血细胞综合征相关基因测序结果提示患儿及其父亲的 LYST 基因存在杂合突变, 诊断原发性噬血细胞综合征, 建议干细胞移植, 家属拒绝, 继续原方案化疗, 病情缓解, 第 6 周出院, 出院后予以维持治疗, 第 9 周复查 HLH 指标稳定; 第 20 周患儿再次出现持续高热, 血常规、肝功能、血脂、凝血功能、铁蛋白等提示 HLH 复发, 行细胞毒脱颗粒检测 (CD107a 激发实验), 显示: ΔNK-CD107a 为 3.72%, CTL 细胞 ΔMFI 为 1.5, 考虑原发性噬血细胞综合征复发, 再次建议行干细胞移植, 目前等待移植中。

表 2 患儿治疗过程中血象、体温的动态变化

日期	血象				体温
	WBC (× 10 ⁹ /L)	NE (× 10 ⁹ /L)	Hb (g/L)	PLT (× 10 ⁹ /L)	
初入院	2.6	0.2	72	53	39.0℃
治疗第 2 周	4.1	2.5	105	167	36.6℃
治疗第 5 周	1.8	0.3	65	40	39.7℃
治疗第 6 周	5.2	2.7	108	200	36.8℃
治疗第 9 周	4.3	2.1	101	203	36.6℃
治疗第 20 周	1.3	0.7	86	75	39.3℃

表 3 患儿治疗过程中的 HLH 相关指标变化

日期	ALT (U/L)	TG (mmol/L)	FIB (g/L)	铁蛋白 (ng/mL)	NK 细胞		EBV 抗体		EBV 载量 (copies/mL)	噬血现象
					百分率 (%)	绝对值 (个/μL)	IgM	IgG		
初入院	198	2.3	1.08	1286.9	2.0	280	+	+	6.59×10^3	+
治疗第 2 周	58	1.6	2.5	600	6.0	845	-	+	5.13×10^2	-
治疗第 5 周	203	2.9	1.3	1306.8	2.4	336	-	+	$<5.0 \times 10^2$	-
治疗第 6 周	23	1.53	2.68	456	8.2	1148	-	+	$<5.0 \times 10^2$	-
治疗第 9 周	56	1.77	1.83	849.9	6.3	883	-	+	$<5.0 \times 10^2$	-
治疗第 20 周	238	3.4	1.2	1856	2.2	308	-	+	$<5.0 \times 10^2$	+

讨论：原发性噬血细胞综合征（primary hemophago-cytic syndrome, pHPS），又称原发性噬血细胞性淋巴组织细胞增生症（primary hemophagocytic lymphohistiocytosis, pHLH），是由多种因素导致机体免疫功能紊乱，引起单核/巨噬细胞系统反应性增生、大量细胞因子释放、导致多脏器浸润及全血细胞减少为特征性疾病^[2]。它是一种常染色体或 X 连锁隐性遗传病，包括 FHL 和原发性免疫缺陷病相关噬血细胞综合征（immunodeficiency related hemophagocytic lymphohistiocytosis, iHLH）^[3]。FHL 有 5 个亚型，FHL1~FHL5。iHLH 包括 Chediak-Higashi 综合征 1 型、Griscelli 综合征 2 型、Hermansky-Pudlak 综合征 II 型和 X-连锁淋巴增殖综合征（XLP，包括 XLP-1 和 XLP-2）等^[3]。pHLH 相关的基因缺陷包括 PRF1、UNC13D、STX11、STXBP2、XIAP、SH2D1A、Rab27a、AP3B1 和 LYST^[4]。越来越多研究提示，即使基因检测为杂合突变，在一定条件下仍可诊断 pHLH^[5]。pHLH 在亚洲地区发病率较高，可达 3.42/100 万，男性：女性为 1:1^[6]。90% 的患儿发病年龄小于 2 岁，少数可延迟至青春期甚至成年后发病^[7]；而迟发性 pHLH 特别是年长儿和成人发病者逐渐增多，目前报道的 pHLH 最大发病年龄为 62 岁^[8]。

溶酶体运输调节因子基因（lysosomal trafficking regulator gene, LYST），定位于常染色体 1q42.1-42.2，全长 205 878 kb，含 52 个内含子、53 个外显子，编码 LYST^[9]。LYST 含 3801 个氨基酸，参与溶酶体形成和细胞内运输过程。LYST 基因突变位点散布于大的编码区内，突变点约 50 多个，多为无义突变、错义突变和框移突变，如 c.11362 G>A (p.G3725R)、c.961 T>C (p.C258R) 和 c.925C>T

(p.R309X)^[9-11]。LYST 基因突变位点也可位于内含子，如 c.7060-1 G>A, NM_000081^[12]。LYST 基因突变导致细胞毒性颗粒不能正常释放，积聚成大的颗粒，致使 CTL 和 NK 细胞不能有效清除被感染细胞；巨噬细胞被活化的 T 细胞刺激，分泌过量细胞因子，使 T 细胞及巨噬细胞处于失控的活化状态，继而表现出 HLH 的一系列症状。

本研究通过 NGS 发现患儿及其父亲 LYST 基因有一处杂合突变，而且 CD107a 激发实验阳性，支持 pHLH 的诊断。溶酶体相关膜蛋白 -1（LAMP-1 或 CD107a）是一种高糖基化蛋白，约占溶酶体膜蛋白的 50%，当 NK 细胞杀伤靶细胞时，细胞毒颗粒将到达浆膜面并与细胞膜融合，引起颗粒内容物释放，最终杀死靶细胞。随着脱颗粒的发生，CD107a 分子被转运至膜表面，并且 CD107a 分子的表达上调与穿孔素的分泌一致^[13]，因此，CD107a 表达率可以反映 NK 细胞杀伤活性。有学者^[14]提出，流式细胞术检测穿孔素或者 CD107a 激发试验对于静息状态下 NK 细胞和/或 CTL 细胞功能的反映具有一致性。Bryceson 等^[15]对可疑 HLH 患者进行 CD107a 激发实验前瞻性队列研究，发现静息状态下 NK 细胞 CD107a 低于 5% 对于 FHL 诊断的敏感性为 96%、特异性为 88%。近年来研究提示，即使基因检测阴性或为杂合突变，在一定条件下仍可诊断为 pHLH。Spessott 等^[5]曾报道存在 STXBP2 基因杂合突变的患儿，因其相关蛋白 munc18-2 受影响而干扰溶酶体颗粒释放，最终诊断为 FHL5；周晓姮^[16]研究中有 2 例患儿，1 例 PRF1 基因存在杂合错义突变 V50L，1 例 PRF1 基因存在杂合错义突变 R489W，综合穿孔素或颗粒酶 B 表达异常，明确诊断为 FHL2。

本研究患儿及其父亲的 LYST 基因均出现同

一杂合突变,但患儿发病、父亲无症状,推测有以下原因:(1)本研究患儿的CD107a明显降低,但因条件所限未完善患儿父亲的CD107a以及LYST蛋白检测,患儿父亲目前处于无病状态,不排除其CD107a和LYST蛋白均正常的可能。

(2)pHLH是常染色体或X连锁隐性遗传病,但单纯的基因缺陷有时并不能导致疾病的发生,往往由继发因素包括感染、免疫缺陷病、肿瘤及组织损伤等诱发,在儿童时期多为细菌或病毒感染诱发,而成人常为感染、恶性淋巴瘤及免疫性疾病等诱发。本研究患儿存在EB病毒感染,而患儿父亲无诱发因素。(3)目前发现的pHLH相关基因有PRF1、UNC13D、STX11、STXBP2、XIAP、SH2D1A、Rab27a、AP3B1和LYST,但辛辛那提儿童医疗中心诊断的HLH患儿有一半以上不能用这些基因缺陷解释^[17],提示将近一半的pHLH相关基因未被克隆出来,因此不能排除该患儿尚存在某些未被检测到的致病基因。(4)某些不典型突变所处区域编码的分子功能并不很重要,一般处于沉默状态,虽然可以导致NK细胞和CTL功能障碍,但无典型的HLH临床表现,称为温和突变,这可能是部分pHLH发病延迟的原因^[18]。患儿父亲长期处于无病状态,不排除该突变位点为温和突变的可能性。pHLH相关的基因突变及其对特定蛋白质的作用仍需进一步研究。

综上,pHLH诊断困难,可通过基因检测确诊,但基因检测阴性或仅为杂合突变时,需要结合临床特征、相关基因的蛋白表达以及CD107a激发实验。深入地研究pHLH相关基因突变及其与特定蛋白质的相互作用,了解基因突变如何导致CTL和NK细胞功能障碍、建立pHLH快速诊断方法是今后努力的方向。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Gholam C, Grigoriadou S, Gilmour KC, et al. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in the genetic basis, diagnosis and management[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 163(3): 271-283.
- [3] Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Annu Rev Med*, 2012, 63: 233-246.
- [4] Cetica V, Sieni E, Pende D, et al. Genetic predisposition to hemophagocytic lymphohistiocytosis: Report on 500 patients from the Italian registry[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(1): 188-196.
- [5] Spessott WA, Sanmillan ML, McCormick ME, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by dominant-negative mutations in STXBP2 that inhibit SNARE-mediated membrane fusion[J]. *Blood*, 2015, 125(10): 1566-1577.
- [6] Gholam C, Grigoriadou S, Gilmour KC, et al. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in the genetic basis, diagnosis and management[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 163(3): 271-283.
- [7] Sieni E, Cetica V, Piccin A, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis may present during adulthood: clinical and genetic features of a small series[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44649.
- [8] Nagafuji K, Nonami A, Kumano T, et al. Perforin gene mutations in adult-onset hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Haematologica*, 2007, 92(7): 978-981.
- [9] Sepulveda FE, Burgess A, Heiligenstein X, et al. LYST controls the biogenesis of the endosomal compartment required for secretory lysosome function[J]. *Traffic*, 2015, 16(2): 191-203.
- [10] Sánchez-Guiu I, Antón AI, García-Barberá N, et al. Chediak-Higashi syndrome: description of two novel homozygous missense mutations causing divergent clinical phenotype[J]. *Eur J Haematol*, 2014, 92(1): 49-58.
- [11] Al-Tamemi S, Al-Zadjali S, Al-Ghafri F, et al. Chediak-Higashi syndrome: novel mutation of the CHS1/LYST gene in 3 Omani patients[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 36(4): e248-250.
- [12] Nielsen C, Agergaard CN, Jakobsen MA, et al. Infantile hemophagocytic lymphohistiocytosis in a case of chediak-higashi syndrome caused by a mutation in the LYST/CHS1 gene presenting with delayed umbilical cord detachment and diarrhea[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2015, 37(2): e73-e79.
- [13] Alter G, Malenfant JM, Altfeld M, et al. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity[J]. *Immunol Methods*, 2004, 294(1-2): 15-22.
- [14] Chen Y, Wang Z, Cheng Y, et al. Novel mutations in the UNC13D gene carried by a Chinese neonate with hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Yonsei Med J*, 2013, 54(4): 1053-1057.
- [15] Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes[J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2754-2763.
- [16] 周晓姮, 罗建明, 宾琼, 等. 噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿及其家系穿孔素和颗粒酶B的表达[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(3): 227-232.
- [17] Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: 127-131.
- [18] 王旖旎, 王昭, 王晓琳. 成人原发性噬血细胞综合征一例报告及文献复习[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(4): 291-293.

(本文编辑: 俞燕)