

doi:10. 13407/j. cnki. jpp. 1672-108X. 2016. 04. 001

· 论 著 ·

儿童 EB 病毒感染 SH2D1A 基因表达水平及意义

张慧,袁远宏,袁鹤立,欧阳文献,李双杰 (湖南省儿童医院,湖南长沙 410007)

[摘要] 目的:研究 EB 病毒(EBV)感染患儿 SH2D1A mRNA 表达情况,探讨 SH2D1A mRNA 表达改变与疾病的关系及其意义。方法:选取 2014 年 10 月至 2015 年 2 月湖南省儿童医院肝病中心收治的初诊为 EB 病毒感染的患儿,选取同期年龄、性别与 EB 病毒感染组匹配的健康体检儿童为对照组。检测 EB 病毒感染组和对照组的 SH2D1A mRNA 表达水平,计算基因相对表达量,检测血生化指标。结果:EB 病毒感染组共 32 例,其中普通传染性单核细胞增多症(普通组)20 例,重症传染性单核细胞增多症(重症组)9 例,慢性活动性 EBV 感染(慢性组)1 例,EBV 相关噬血淋巴组织细胞增多症(噬血组)2 例;对照组 10 例。各组与对照组 SH2D1A mRNA 的相对中位表达量分别为 25.78、40.14、38.72、18.27、4.65 ($H=10.68, P<0.05$),EB 病毒感染组患儿的 SH2D1A mRNA 表达水平显著高于对照组,重症组、慢性组 SH2D1A mRNA 表达水平较普通组、噬血组升高 ($P<0.05$),但重症组与慢性组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。SH2D1A mRNA 表达水平与初诊时最低的纤维蛋白原、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平呈负相关 (P 均 <0.05),与血清铁蛋白、丙氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、甘油三酯、EBV-DNA 水平无相关性。结论:EBV 感染患儿外周血细胞 SH2D1A mRNA 表达水平显著升高,造成机体细胞免疫功能紊乱。

[关键词] EB 病毒;SH2D1A 基因;细胞免疫;儿童

[中图分类号] R725.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2016)04-0001-04

The Significance and Level of SH2D1A Gene Expression in Children with EB Virus Infection

Zhang Hui, Yuan Yuanhong, Yuan Heli, Ouyang Wenxian, Li Shuangjie (Children's Hospital of Hunan Province, Hunan Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To research the expressions of SH2D1A mRNA in children with EB virus (EBV) infection, to discuss the relationship and significance between the change of SH2D1A mRNA expression and the disease. **Methods:** Children who were diagnosed as EB infection were selected as EB virus infection group from October 2014 to February 2015 in Liver Diseases Center of Children's Hospital of Hunan Province. We selected healthy children who were at the same age, sex as the control group. The levels of SH2D1A mRNA in EB virus infection group and control group were detected, the relative expression quantities of genes were calculated, and the blood biochemical indexes were tested. **Results:** The total cases of EB virus infection group was 32, including the common infectious mononucleosis (group common) 20 cases, severe infectious mononucleosis (group severity) 9 cases, chronic active EBV infection (group chronicity) 1 cases, EBV associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (group HLH) 2 cases. The control group was 10 cases. The SH2D1A mRNA relative expression median levels in each group and the control group were 25.78, 40.14, 38.72, 18.27, 4.65 ($H=10.68, P<0.05$). The SH2D1A mRNA levels of EB virus infection group were significantly higher than those of control group. The SH2D1A mRNA levels in group severity, group chronicity increased significantly than those of group common, group HLH, but there were no statistical significance between group severity and group chronicity. The expression level of SH2D1A mRNA was negatively correlated with the initial fibrin minimum raw and CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ levels ($P<0.05$), and it had no correlation with serum ferritin, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase, triglyceride, EBV-DNA levels. **Conclusion:** The levels of SH2D1A mRNA in peripheral blood cells of EBV infection were markedly increase. EB virus infection can result in cellular immune function disorder.

[Keywords] EB virus; SH2D1A gene; cellular immunity; children

EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是一种人类疱疹病毒,人群感染率超过 90%,感染 EBV 后成为终身潜伏感染。B 细胞是 EBV 的靶细胞,EBV 同时通过感染的 B 细胞作为中介感染 T 细胞或 NK 淋巴细胞^[1],也有报道推测 EBV 可能直接感染 T 细胞^[2]。儿童 EBV 感染临床表现复杂多样,非肿瘤性 EBV 感染疾病主要包括传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)、慢

性活动性 EBV 感染(chronic active Epstein-Barr virus infection, CAEBV)、EBV 相关噬血淋巴组织细胞增生症(Epstein-Barr virus related hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome, EBV-HLH)。EBV 感染的不同临床表现及转归与 EBV-DNA 病毒量^[3]和机体免疫功能有关^[4]。本研究检测 EBV 感染患儿外周血 SH2D1A mRNA 表达水平及其外周血多种血生化指标,探讨 EBV 感染患儿外周

基金项目:2012 年湖南省卫生厅科研基金指导课题,项目编号 C2012-016。

作者简介:张慧(1981~),女,大学本科,主治医师,主要从事小儿肝病及感染性疾病研究,E-mail: zhangh17120@163.com。

通讯作者:李双杰(1961~),男,博士,主任医师,主要从事小儿肝病及感染性疾病研究,E-mail: lesjie62@vip.sina.com。

血 SH2D1A mRNA 表达改变的机制及其对机体细胞免疫系统方面的影响。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 10 月至 2015 年 2 月湖南省儿童医院肝病中心收治的初诊为 EBV 感染的患儿。EBV 感染患儿纳入标准:EBV 感染诊断以《诸福棠实用儿科学》^[5]中的标准为依据:(1)血清学抗体检测提示原发性急性 EBV 感染或活动性感染;(2)分子生物学方法检测包括 PCR、原位杂交和 Southern 杂交从患儿血清、骨髓、淋巴结等受累组织检测 EBV 阳性。符合以上两条之一。选取同期年龄、性别与 EBV 感染患儿匹配的我院儿童保健科的健康体检儿童:(1)近 3 个月内无感染性疾病;(2)血常规指标、肝功能正常。

1.1.1 IM 诊断标准 参照《诸福棠实用儿科学》第 7 版中诊断标准,根据临床表现、外周血象和血清学检查结果确诊^[5]。诊断为 IM 的患儿,同时伴有至少 2 个系统受累即诊断为重症 IM^[6]。出现以下临床特征需高度重视:(1)持续高热>1 周,明显肝脾肿大;(2)外周血象 2 系或 3 系显著下降,但未达到 EBV-HLH 标准;(3)转氨酶水平显著异常,尤其是乳酸脱氢酶水平显著升高;(4)呼吸、吞咽困难,并发肺炎、胸腔积液等;(5)心电图异常,心肌炎。

1.1.2 CAEBV 的诊断标准^[7-8] (1)持续或反复发作的 IM 类似症状和体征,包括发热、肝脾肿大、持续性肝功能损伤、全血细胞减少、多发性淋巴结病、视网膜炎、间质性肺炎、蚊虫过敏及牛痘样水疱等,并持续 3 个月以上可诊断 CAEBV。(2)有 EBV 感染及引起组织病理损害的证据,达到下述标准 1 条及以上可诊断:①血清 EBV 抗体滴度异常增加,包括抗 VCA-IgG $\geq 1:640$ 或抗 EA-IgG $\geq 1:160$,VCA/EA-IgA 阳性;②Southern 杂交在组织或外周血中检测出 EBV-DNA;③在感染的组织或外周血中检测出 EBER-1 阳性细胞;④外周血 PBMC 中 EBV-DNA 水平高于 $10^{2.5}$ 拷贝/ μg DNA;⑤在感染组织中 EBV-EBER_s 原位杂交或 EBV-LMP1 免疫组化染色阳性。(3)排除其他疾病所致的上述临床表现。

1.1.3 EBV-HLH 的诊断标准 (1)HLH 诊断标准^[9]:依据 HLH-2004 方案,以下 8 条有 5 条符合即可诊断 HLH:①发热;②脾大;③血细胞减少(影响 2 或 3 系外周血细胞,血红蛋白 $<90\text{ g/L}$,血小板 $<100\times 10^9/\text{L}$,中性粒细胞 $<1.0\times 10^9/\text{L}$);④高甘油三酯血症和(或)低纤维蛋白原血症;⑤骨髓、脾脏或淋巴结中发现噬血细胞现象而无恶变证据;⑥NK 细胞活力降低或缺乏;⑦血清铁蛋白 $\geq 500\text{ }\mu\text{g/L}$;⑧可溶性 CD25 (sIL-2r) $\geq 2400\text{ U/mL}$ 。(2)EBV 感染的诊断。

1.2 伦理与知情同意

本研究经我院伦理委员会批准,所用外周血标本系

临床检验项目剩余标本。所有儿童加入研究均征得家长知情同意。

1.3 研究设计

采用病例对照研究设计,病例组和对照组年龄、性别匹配。比较两组儿童外周血 SH2D1A mRNA 表达水平,分析 EBV 感染患儿 SH2D1A mRNA 表达与多种生化指标的相关性。

1.4 标本采集与处理

收集研究对象临床检验剩余抗凝外周全血标本 0.5 mL,加入 TRIzol 总 RNA 提取试剂,混匀后冻藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.5 外周血总 RNA 提取和 cDNA 制备

采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离制备外周血单个核细胞,RNA 提取试剂盒提取制备外周血总 RNA,试剂盒随机引物逆转录制备 cDNA。

1.6 EvaGreen 定量 RT-PCR

应用 SsoFast EvaGreen RT-PCR 试剂盒,总反应体积 20 mL。预实验优化各种引物扩增反应条件。每一样本重复 PCR 扩增 3 次, $\Delta\Delta C_t$ 法计算基因的相对表达量^[10]。

1.7 血生化指标检测

采用直接化学发光法检测血脂和肝肾功能,比浊法测定血清纤维蛋白原水平;采用直接化学发光法测量血清铁蛋白水平,检测上限为 5 000 mg/L;采用流式细胞仪检测外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞水平;采用荧光定量 PCR 法检测外周血 EBV-DNA 水平(参考范围为病毒拷贝数 0~5 000 拷贝数/mL)。

1.8 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件,非正态分布计量资料以中位数表示,采用非参数统计秩和检验(Kruskal-wallis 法),组间比较采用 Nemenyi 法,相关性分析采用 Spearman's 等级相关检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象一般情况

共入组 32 例 EBV 感染患儿,其中,男 18 例,女 14 例,年龄 8 个月~12 岁[(3.82 $\pm$ 0.76)岁]。根据诊断标准分为普通 IM(普通组)20 例,重症 IM(重症组)9 例,CAEBV(慢性组)1 例,EBV-HLH(噬血组)2 例。对照组 10 例,其中男 6 例,女 4 例,年龄 1~14(4.64 $\pm$ 0.59)岁。五组患儿性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

2.2 EBV 感染组和对照组 SH2D1A mRNA 表达比较

EBV 感染组与对照组 SH2D1A mRNA 的相对中位表达量分别为 31.79 和 4.65,EBV 感染组表达水平高于

对照组 ($P<0.05$)。EBV 感染组中普通组、重症组、慢性组、噬血组 SH2D1A mRNA 的相对中位表达量分别为 25.78、40.14、38.72、18.27,重症组、慢性组 SH2D1A mRNA 表达水平较普通组、噬血组升高 ($P<0.05$),但重症组与慢性组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 EBV 感染组与对照组 SH2D1A mRNA 的表达

组别	例数	SH2D1A mRNA
EBV 感染组	32	31.79
对照组	10	4.65
<i>u</i>		3.182
<i>P</i>		<0.05

表 2 EBV 感染各组 SH2D1A mRNA 的表达

组别	例数	SH2D1A mRNA
普通组	20	25.78
重症组	9	40.14
慢性组	1	38.72
噬血组	2	18.27
<i>H</i>		10.68
<i>P</i>		>0.05

2.3 EBV 感染组 SH2D1A mRNA 表达的相关性分析

SH2D1A mRNA 相对表达水平与 EBV 感染患儿初诊时最低的纤维蛋白原 (FG)、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平呈负相关 ($P<0.05$),但与血清铁蛋白 (SF)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、乳酸脱氢酶 (LD)、甘油三酯 (TG)、EBV-DNA 水平无相关性。

表 3 EBV 感染组 SH2D1A mRNA 表达与生化指标的相关性

相关指标	<i>r</i>	<i>P</i>
SF	-0.142	>0.05
ALT	0.242	>0.05
LD	-0.286	>0.05
TG	-0.315	>0.05
EBV-DNA	0.184	>0.05
FG	-0.489	<0.01
CD4 ⁺	-0.472	<0.01
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-0.385	<0.05

3 讨论

SH2D1A (SH2 结构域蛋白 1A 基因) 位于 X 染色体的 q25 位置,主要表达于活化的 T 细胞和自然杀伤细胞 (NK 细胞)^[10],其基因突变/缺失与致死性 EBV 感染、EBV 相关性噬血淋巴组织细胞增多症、X 连锁淋巴组织增生综合征、霍奇金氏淋巴瘤等疾病相关^[11]。SH2D1A 基因编码的表面信号淋巴细胞激活分子 (SLAM) 相关蛋白 (SAP) 是 T 淋巴细胞、NK 细胞^[12]、NKT 淋巴细胞^[13] 和 B 淋巴细胞维持正常免疫功能的关键性调节因子^[14]。SAP 缺乏将会影响 SLAM 介导的 T、B 淋巴细胞作用,从而导致活化信号过度放大,机体失去控制 B 淋

巴细胞增殖的能力^[15]。感染人类疱疹病毒 (EBV) 后,EBV 潜伏膜蛋白-1 (EBV-LMP1) 可抑制 SAP 的表达并上调 Th1 型细胞因子水平,在转录水平抑制编码 SPA 基因 (SH2D1A) 的表达并活化下游的 ERK 分子和 IFN- γ ,导致 T 细胞显著活化及 Th1 细胞因子分泌增加^[16]、巨噬细胞活化,引起组织噬血现象^[17],导致噬血细胞淋巴瘤组织增生症 (HLH)。

本研究显示,EB 病毒感染组与对照组 SH2D1A mRNA 的相对中位表达量分别为 31.79 和 4.65,EBV 感染组表达水平显著高于对照组 ($P<0.05$)。EBV 感染组中普通组、重症组、慢性组、噬血组 SH2D1A mRNA 的相对中位表达量分别为 25.78、40.14、18.27、38.72,重症组、噬血组 SH2D1A mRNA 水平较普通组、慢性组显著升高 ($P<0.05$),但重症组、噬血组之间比较差异无统计学意义。感染 EBV 后 SH2D1A mRNA 表达水平显著升高,可能提示该组患儿并未存在 SH2D1A mRNA 的突变及缺失,感染 EBV 后 SH2D1A mRNA 编码 SAP 蛋白水平升高,从而调节机体细胞免疫,避免严重疾病如致死性感染、噬血淋巴组织细胞增多、慢性活动性感染等的发生。

SH2D1A mRNA 相对表达水平与 EBV 感染患儿初诊时最低的纤维蛋白原、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平呈负相关 ($P<0.05$),但与血清铁蛋白、丙氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、甘油三酯、纤维蛋白原、EBV-DNA 水平无相关性。纤维蛋白原、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 降低提示 EBV 感染后患儿易发生一些严重的疾病。

研究表明,普通 EBV 感染后患儿 SH2D1A mRNA 相对表达水平明显升高,这与一些报道 EBV 感染后抑制 SH2D1A mRNA 表达的结论不同,提示 EBV 感染的转归和预后可能与 SH2D1A mRNA 的表达水平密切相关。因此,今后有待进一步增加样本量,检测血中 SAP 蛋白、相关炎症因子水平,动态监测 SH2D1A mRNA 表达水平及患儿后期疾病转归,为临床疾病诊断及预后提供新的诊断思路。

参考文献:

[1] SHANNON-LOWE C D, NEUHIERL B, BALDWIN G, et al. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells [J]. Proc Natl Sci USA, 2006, 103 (18): 7065-7070.

[2] KAWAGUCHI H, MIYASHITA T, HERBST H, et al. Epstein-Barr virus infected T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome [J]. J Clin Invest, 1993, 92 (3): 1444-1450.

[3] AHN J S, REW S Y, SHIN M G, et al. Clinical significance of clonality and Epstein-Barr virus infection in adult patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Am J Hematol, 2010, 85 (9): 719-722.

[4] 张慧, 李双杰, 袁远宏, 等. 儿童 EB 病毒感染不同临床疾病

- 类型免疫功能研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6): 464-466.
- [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, 2003; 821-827.
- [6] 蒋娟, 于洁, 王晓莉, 等. 伴有多脏器功能损害的传染性单核细胞增多症 51 例临床分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2007, 22(2): 919-922.
- [7] OKANO M, KAWA K, KIMURA H, et al. Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection [J]. *American Journal of Hematology*, 2005, 80: 64-69.
- [8] 申昆玲, 段红梅. 重症 EB 病毒感染相关疾病的现状和诊治进展[J]. 小儿急救医学, 2005, 12(5): 342.
- [9] HENTER J I, HORNE A, ARICÓ M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Pediatric Blood Cancer*, 2007, 48(2): 124-131.
- [10] KIS L L, NAGY N, KLEIN G, et al. Expression of SH2D1A in five classical Hodgkin's disease-derived cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(5): 658-661.
- [11] PAROLINI O, KAGERBAUER B, SIMONITSCH-KLUPP I, et al. Analysis of SH2D1A mutations in patients with severe Epstein-Barr virus infections, Burkitt's lymphoma, and Hodgkin's lymphoma [J]. *Ann Hematol*, 2002, 81(8): 441-447.
- [12] SHARIFI R, SINCLAIR J C, GILMOUR K C, et al. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease [J]. *Blood*, 2004, 103(10): 3821-3827.
- [13] NAKAJIMA H, CELLA M, BOUCHON A, et al. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(11): 3309-3318.
- [14] CINDY S M A, ELISSA K DEENICK. The role of SAP and SLAM family molecules in the humoral immune response [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011(1217): 32-44.
- [15] RICHARD PROUST, JACQUES BERTOGLIO, FRANCK GESBERT. The adaptor protein SAP directly associates with CD3 chain and regulates T cell receptor signaling [J]. *PLoS One*, 2012, 8(7): 1-10.
- [16] MCCAUSLAND M M, YUSUF I, TRAN H, et al. SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and fyn kinase [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(2): 817-828.
- [17] CHUANG H C, LAY J D, HSIEH W C, et al. Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome [J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3090-3096.

(编辑:王乐乐)

(收稿日期:2015-06-23 修回日期:2015-09-18)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2016.04.002

· 论著 ·

氯胺酮对 SD 幼鼠海马 GAP-43 蛋白表达的影响

应迪琪, 严海雅 (宁波市妇女儿童医院, 浙江宁波 315012)

[摘要] 目的: 分析氯胺酮对 SD 幼鼠海马 GAP-43 蛋白表达的影响。方法: 取 7~10 日龄的 SD 幼鼠 36 只, 随机分为 A、B、C 三组各 12 只。A 组注射生理盐水 50 mg/kg, B 组注射氯胺酮 25 mg/kg, C 组注射氯胺酮 50 mg/kg。24 h 后处死小鼠取海马组织, 分别采用免疫组化与 Western Blotting 检测海马 GAP-43 蛋白的表达情况。结果: 经图像分析软件处理后得知, A 组、B 组、C 组条带灰度值分别为 187.43 ± 7.98 、 164.87 ± 8.35 、 154.31 ± 6.98 , 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。A 组、B 组、C 组 GAP-43 阳性细胞计数分别为 (87.45 ± 14.98) 个/ mm^2 、 (66.48 ± 12.36) 个/ mm^2 、 (35.32 ± 9.93) 个/ mm^2 , 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 氯胺酮可明显降低 SD 幼鼠海马 GAP-43 蛋白的表达水平, 这可能与其影响幼鼠神经系统发育有关。

[关键词] 氯胺酮; SD 幼鼠; 海马组织; GAP-43 蛋白

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2016)04-0004-03

Effect of Ketamine on GAP-43 Protein Expression in Hippocampus of SD Rats

Ying Diqi, Yan Haiya (Ningbo Women and Children's Hospital, Zhejiang Ningbo 315012, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ketamine on the expression of GAP-43 protein in hippocampus of SD rats. **Methods:** Thirty six SD rats who were 7 to 10 days old, were randomly divided into three groups. Group A of 12 rats were injected with saline 50 mg/kg, group B of 12 rats were injected with ketamine 25 mg/kg, group C of 12 rats were injected with ketamine 50 mg/kg. All rats were sacrificed and the hippocampuses were drawn out after 24 hours. Immunohistochemistry and Western Blotting were used to detect