

# CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞在成人传染性单核细胞增多症患者中的表达分析\*

卢峰<sup>1,2</sup> 李甫罡<sup>2</sup> 罗志刚<sup>2</sup> 冀承杰<sup>2</sup> 刘靳波<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:检测 EB 病毒(EBV)感染所致成人传染性单核细胞增多症(IM)患者外周血淋巴细胞亚群和血浆 EBV DNA 载量,分析 EBV 载量与淋巴细胞亚群的相关性。方法:收集 2016 至 2021 年确诊的成人 IM 患者 318 例作为 IM 组,选择同期体检的健康成人 31 例作为对照组。采用多参数流式细胞术检测外周血各淋巴细胞亚群占总淋巴细胞百分比,实时荧光定量 PCR 测量血浆中的 EBV DNA 载量。结果:IM 组 CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (53.39±8.02)%和 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> (12.17±8.52)%比例明显增高,与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.001$ ); CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (30.7±9.83)%和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (0.60±0.25)明显降低,与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );IM 组 CD3<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> 比例和对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ );IM 组 EBV DNA 载量与 CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> 和 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> 比例呈正相关( $P<0.05$ ),与 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> 比例无相关性( $P>0.05$ )。结论:成人 IM 患者外周血 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞和 CD8 弱阳性 T 淋巴细胞显著增多,EBV DNA 载量与 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞和 CD8 弱阳性 T 淋巴细胞呈正相关,综合淋巴细胞亚群检测结果与血浆 EBV DNA 载量有助于疾病的诊断。

**[关键词]** EB 病毒;传染性单核细胞增多症;淋巴细胞亚群

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2022.06.008

**[中图分类号]** R457.1 **[文献标志码]** A

## Analysis of expression of CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in adult infectious mononucleosis

LU Feng<sup>1,2</sup> LI Fugang<sup>2</sup> LUO Zhigang<sup>2</sup> JI Chengjie<sup>2</sup> LIU Jinbo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, 646000, China; <sup>2</sup>Department of Experimental Medicine, Jianyang City People's Hospital)  
Corresponding author: LIU Jinbo, E-mail:50223232@qq.com

**Abstract Objective:** To detect the peripheral blood lymphocyte subsets and plasma EBV DNA load in adult infectious mononucleosis patients infected by EBV virus, and analyze the correlation between EBV virus load and lymphocyte subsets. **Methods:** A total of 318 adult infectious mononucleosis patients diagnosed in our hospital from 2016 to 2021 were collected as the experimental group(IM group), and 31 healthy adults who underwent physical examination during the same period were selected as the control group. Multi-parameter flow cytometry was used to detect the percentage of lymphocyte subsets in peripheral blood to total lymphocytes, and real-time fluorescence quantitative PCR was used to measure EBV DNA load in plasma. **Results:** The proportion of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (53.39±8.02)% and CD8 weakly positive CD3<sup>+</sup> (12.17±8.52)% in IM group were significantly higher than those in control group( $P<0.001$ ). CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (30.7±9.83)% and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (0.60±0.25) were significantly lower than those in the control group( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the ratio of IM CD3<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> between IM group and control group. In IM group, EBV DNA load was positively correlated with the proportion of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> and CD8 weakly positive CD3<sup>+</sup> ( $P<0.05$ ), but not correlated with the proportion of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** CD8<sup>+</sup>T lymphocytes and CD8 weakly positive T lymphocytes in peripheral blood of adult IM patients significantly increased, and EBV DNA load was positively correlated with the proportion of CD8<sup>+</sup>T lymphocytes and CD8 weakly positive T lymphocytes. Comprehensive detection results of lymphocyte subsets and plasma EBV DNA load may be helpful for diagnosis of the disease.

**Key words** Epstein-Barr virus; infectious mononucleosis; lymphocyte subsets

\*基金项目:简阳市人民医院科研课题(No:JY201943)

<sup>1</sup>西南医科大学附属医院医学检验部(四川泸州,646000)

<sup>2</sup>简阳市人民医院实验医学科

通信作者:刘靳波,E-mail:50223232@qq.com

传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)是一种单核巨噬细胞系统急性增生性传染病,主要表现为咽峡炎、发热和颈部淋巴结肿大<sup>[1]</sup>。本病呈散发性,可在人群中广泛引起流行传播,其致病原多为 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV),IM 是 EBV 感染所致的非肿瘤性疾病的主要代表<sup>[2]</sup>。目前的研究还不能明确 IM 的发病机制,大多数患者可表现为特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞的增殖、活化,引起细胞免疫过度激活,免疫功能紊乱<sup>[3-4]</sup>。以往关于 EBV 感染与 IM 的研究,多集中报道分析儿童患者<sup>[5-6]</sup>,但是成年人亦属于 EBV 的易感人群,成人感染 EBV 后导致的 IM 报道较少。本研究采用多参数流式细胞术检测成人 IM 患者的外周血淋巴细胞免疫表型,同时测量患者血浆 EBV DNA 载量,并将病毒载量与淋巴细胞亚群做相关性分析。

1 资料与方法

1.1 对象

收集我院 2016 至 2021 年确诊的成人 IM 患者 318 例作为 IM 组。其中男 185 例,女 133 例;年龄 18~50 岁,中位年龄 21.5 岁。纳入标准:①临床病历和实验室检查资料完整;②年龄≥18 岁;③以急性发热、咽峡炎、淋巴结肿大、肝脾大等为主要临床表现,均根据《传染病学》(9 版)明确诊断;④EBV DNA 检测阳性的患者。排除标准:①临床病历不完整或实验室检查缺项目者;②年龄<18 岁;③合并慢性感染性或肿瘤等疾病;④近期有其他病毒感染;⑤临床表现典型,但 EBV 衣壳抗体 IgG 和核心抗体 IgG 阳性,且 EBV DNA 阴性的患者。另选取同期在我院进行体检的 31 例 EBV 阴性健康成年人作为对照组。其中男 18 例,女 13 例;年龄 18~52 岁,中位年龄 32.3 岁。本研究经医院医学伦理学委员会批准(编号:简医伦理 2019041),受试者知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

EBV 核酸定量检测试剂盒(湖南圣湘生物科技有限公司)、淋巴细胞亚群检测试剂(美国贝克曼库尔特公司);DxFLEX 流式细胞仪(美国贝克曼库

尔特公司)、ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.3 方法

1.3.1 淋巴细胞亚群检测 采集 IM 组与对照组清晨外周血 2 mL 于 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管中保存,6 h 内完成检测。取 2 支试管编为 1、2 号管,1 号管加入 CD8<sup>-</sup> FITC、CD4<sup>-</sup> PE、CD3<sup>-</sup> ECD、CD45<sup>-</sup> PC5 抗体各 10 μL;2 号管加入 CD3<sup>-</sup> FITC、CD16<sup>+</sup> 56<sup>-</sup> PE、CD19<sup>-</sup> ECD、CD45<sup>-</sup> PC7 抗体各 10 μL。2 支试管再分别加入待测样本 50 μL,涡旋混匀,室温避光 15 min 后,加入 500 μL 贝克曼溶血素混匀,再次避光放置 15 min,2 h 内上机测试。

1.3.2 EBV DNA 载量检测 采集 IM 组与对照组清晨外周血 2 mL 于 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管中,4℃ 保存。24 h 内完成样本 DNA 提取。采用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪检测(湖南圣湘生物科技有限公司)EBV DNA 载量,严格按照试剂和仪器说明书进行操作。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{X} \pm S$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,样本间相关性分析采用 Pearson 相关性分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

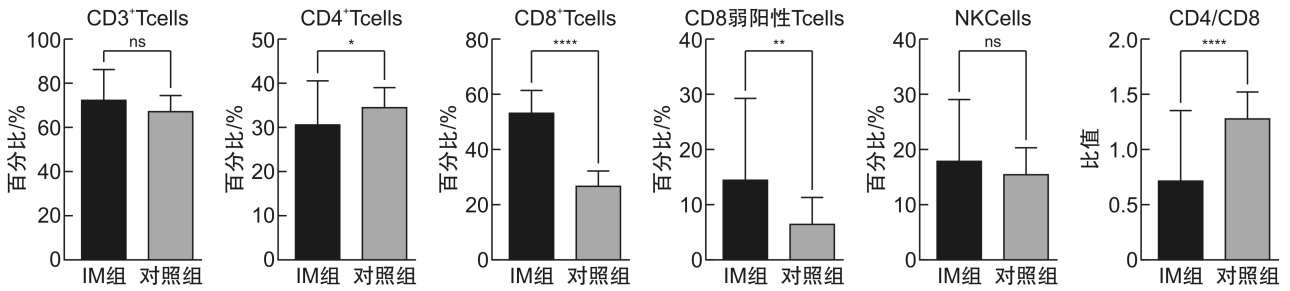
2.1 IM 组与对照组淋巴细胞亚群分析

成人 IM 患者 CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例显著升高,与对照组比较差异有统计学意义(*P* < 0.001)。IM 组 CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例、CD4<sup>+</sup> /CD8<sup>+</sup> 比值降低,与对照组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。IM 组和对照组总 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>)、NK 细胞(CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>)比例比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1 和图 1。

1 例健康成人淋巴细胞亚群流式散点图见图 2。1 例成人 IM 患者淋巴细胞亚群流式细胞散点图见图 3,CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例增加,且出现了 CD8 弱阳性 T 淋巴细胞。

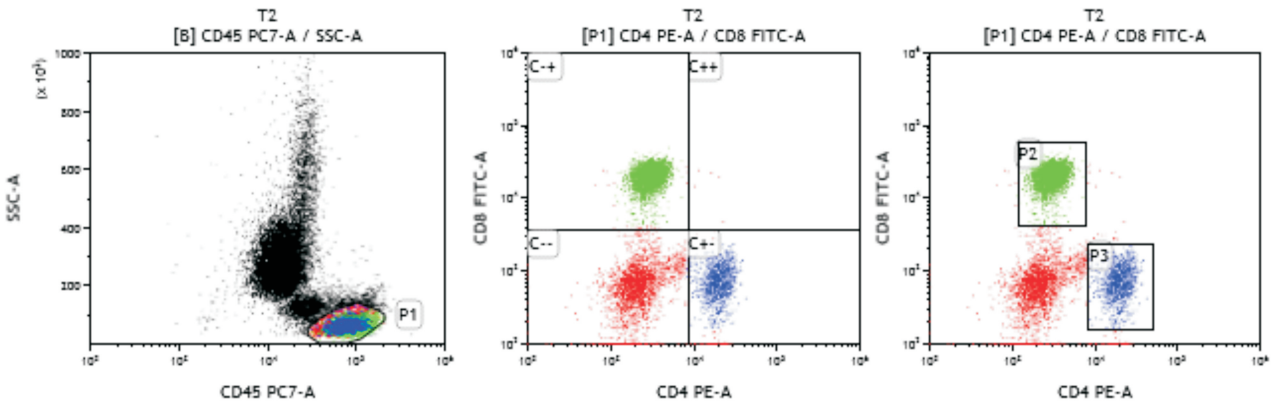
表 1 IM 组与对照组淋巴细胞亚群比较分析

组别	CD3 <sup>+</sup> / %	CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> / %	CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> / %	$\bar{X} \pm S$		
				CD8 弱阳性 CD3 <sup>+</sup> / %	CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> / %	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup>
IM 组	72.66 ± 13.58	30.7 ± 9.83	53.39 ± 8.02	12.17 ± 8.52	18.21 ± 10.98	0.60 ± 0.25
对照组	68.13 ± 6.43	34.67 ± 4.30	27.36 ± 4.81	6.58 ± 4.66	15.79 ± 4.70	1.30 ± 0.23
<i>t</i>	1.83	-2.22	17.75	3.60	1.22	-14.87
<i>P</i>	0.07	0.03	<0.001	<0.001	0.230	<0.001



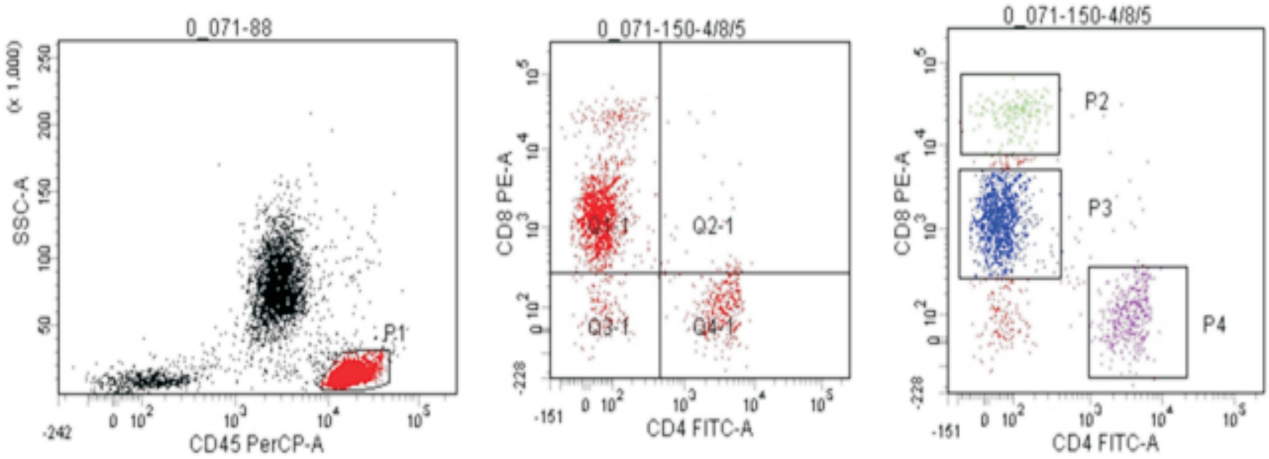
\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\*\* :  $P < 0.00001$ , ns : 差异无统计学意义。

图 1 IM 组、对照组淋巴细胞亚群检测结果



P1: 淋巴细胞, P2: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞, P3: CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞, 未见 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞。

图 2 1 例健康成人淋巴细胞亚群流式散点图



P1: 淋巴细胞, P2: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞, P3: CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞, P4: CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞。

图 3 1 例成人 IM 患者淋巴细胞亚群流式散点图

## 2.2 IM 组 EBV DNA 载量与淋巴细胞亚群的相关性分析

IM 组患者血浆 EBV DNA 载量与 CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>和 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup>淋巴细胞比例呈正相关 ( $P < 0.05$ ), 而与 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>淋巴细胞比例无相关性 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。将 EBV DNA 载量取对数处理后, 利用 GraphPad 软件分析 EBV DNA 载量与淋巴细胞亚群相关性, 结果见表 2, 图 4。

表 2 IM 组患者 EBV DNA 载量与淋巴细胞亚群比例相关性分析

比值	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD8 弱阳	CD16 <sup>+</sup>
	/%	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	性 CD3 <sup>+</sup>	CD56 <sup>+</sup>
		/%	/%	/%	CD3 <sup>-</sup> /%
R	0.043	0.029	0.161	0.378	-0.012
P	0.446	0.606	0.004	<0.001	0.832

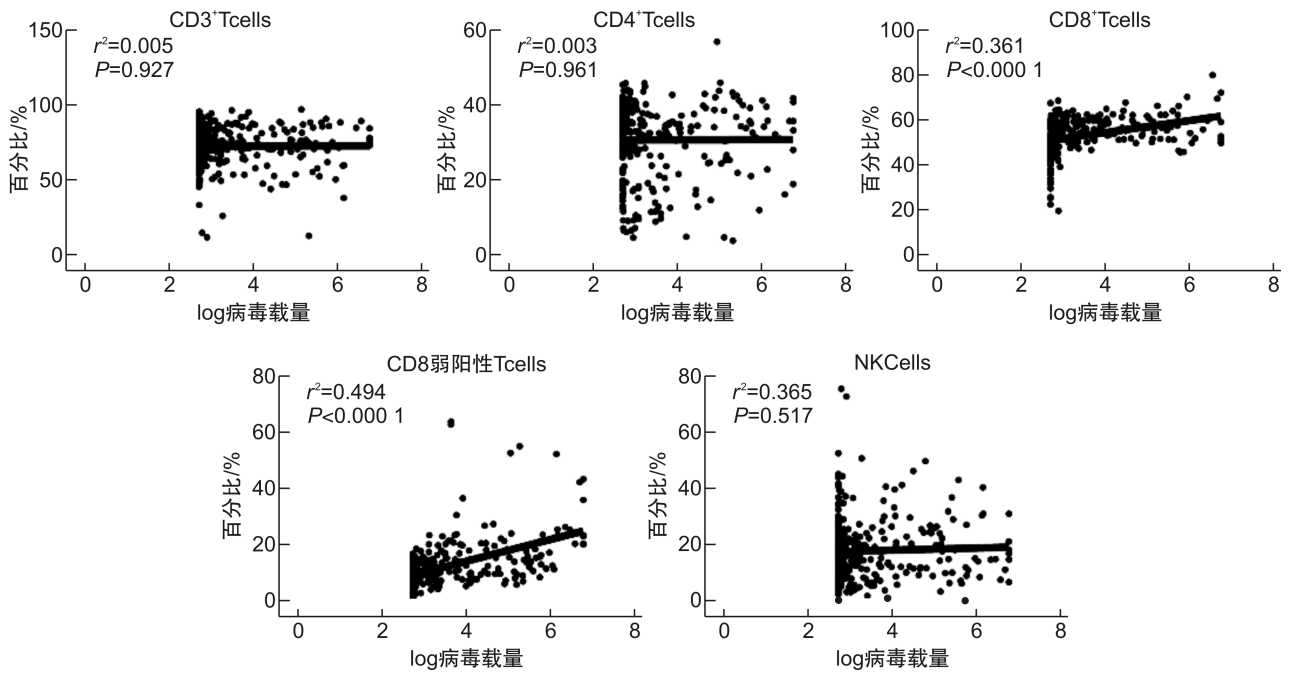


图 4 IM 组患者 EBV DNA 载量与淋巴细胞亚群相关性分析

### 3 讨论

EBV 是目前最为常见的感染性病毒,人类普遍易感,主要经口腔传播,儿童感染后大多症状轻微,而青少年和年轻人感染后可表现为 IM。IM 患者临床表现多样、症状不典型、病变常累及多个系统,容易被误诊为上呼吸道感染、淋巴瘤、化脓性扁桃体炎等疾病<sup>[7]</sup>。虽大多数 IM 患者预后良好,但是持续的 EBV 感染,会造成鼻咽癌、NK/T 细胞淋巴瘤以及伯基特淋巴瘤等恶性肿瘤的发病率显著增加<sup>[8]</sup>。目前 EBV 感染人体后免疫反应机制尚不清楚,同时也无针对 IM 或其他 EBV 相关疾病的疫苗或有效治疗方法。

本研究发现成人 IM 患者外周血 CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例显著高于对照组,而 CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例低于对照组,这与国内外报道一致<sup>[1,4]</sup>。在 EBV 感染初期主要入侵淋巴结中的纯真 B 淋巴细胞,将其转化为活化的淋巴增殖母细胞,同时由于 EBV 抗原的驱动作用,会促使人体 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的寡克隆扩增。大量的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞作用于被 EBV 感染的 B 淋巴细胞,促使病毒的清除<sup>[9]</sup>。也有研究报道 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞上调 PD-1<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup> 和 KLRG1<sup>+</sup> 蛋白的表达,通过分泌细胞因子和自身细胞毒性的作用对这种普遍存在的人类肿瘤病毒进行有效的免疫抑制<sup>[8]</sup>。在 EBV 感染的中后期,CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例随着 IM 患者血浆 EBV 载量的降低而下降<sup>[10]</sup>。谢静等<sup>[11]</sup> 对于成人 IM 患者 EBV 感染后淋巴细胞亚群分析提示 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞是以激活的处于分化晚期的效应 T 细胞为主,这部分细胞高表达细胞活化的标志 CD38 和 HLA-DR。在临床试验中

CD4/CD8 比例常用于辅助诊断感染原因及评估患者的细胞免疫状态。本研究中 IM 患者 CD4/CD8 比例显著低于正常对照组,说明 IM 患者存在明显的免疫功能紊乱。

笔者在工作中发现 IM 患者外周血中会出现一群 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞,这部分细胞 CD8 的表达强度介于强表达和不表达(图 3),P3 门内的细胞。本研究发现成人 IM 患者 CD8 弱阳性 T 淋巴细胞比例显著高于对照组,CD8 弱阳性 T 淋巴细胞占总淋巴细胞的比例与 IM 患者血浆 EBV DNA 载量呈正相关。这与 Chen 等<sup>[12]</sup> 报道一致。关于 CD8 弱阳性 T 淋巴细胞的来源,有研究通过膜联蛋白 V 和荧光染料 PI(碘化丙啶)染色 EBV 感染患者淋巴细胞亚群,显示大部分的 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞表达膜联蛋白 V 和 PI,而大部分的 CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞不表达膜联蛋白 V 和 PI<sup>[13-14]</sup>。这也证实了 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞处于细胞凋亡的晚期。天冬半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)作为真核细胞凋亡相关因子下游的启动子,活化后能激活 Caspase 级联反应,导致细胞凋亡。机体感染 EBV 后,上调 Caspase-8 蛋白的表达,活化 Caspase 家族的其他蛋白酶,引发活化级联放大效应,从而促使细胞的凋亡,造成 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例增加。血浆中 EBV DNA 仅在活动性 EBV 感染时呈阳性,在恢复期和潜伏期均呈阴性,且健康成人血浆中很难检测到 EBV DNA,因此 EBV DNA 可作为诊断 IM 的指标<sup>[15]</sup>。

综上所述,成人 IM 患者外周血中 CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>

T 淋巴细胞和 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例显著增高,CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8 弱阳性 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例与 EBV DNA 载量呈正相关,结合淋巴细胞亚群检测结果和 EBV DNA 载量可以用于 IM 的辅助诊断。遗憾的是本研究未能将调节性 T 淋巴细胞和细胞因子纳入分析范围。此 2 种成分在 EBV 感染后的免疫机制中发挥着重要的作用<sup>[16]</sup>,后续的研究可以综合淋巴细胞亚群和细胞因子检测结果分析 EBV 感染后 T 淋巴细胞的凋亡过程。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 胡岩岩,潘家华,周浩泉. 儿童传染性单核细胞增多症临床及实验室检查特点分析[J]. 中华全科医学, 2021,19(9):1510-1513.
- [2] Womack J,Jimenez M. Common questions about infectious mononucleosis[J]. Am Fam Physician,2015, 91(6):372-376.
- [3] Tangye SG,Palendira U,Edwards ES. Human immunity against EBV-lessons from the clinic[J]. J Exp Med,2017,214(2):269-283.
- [4] Sulik A,Oldak E,Krotten A,et al. Epstein-Barr virus effect on frequency of functionally distinct T cell subsets in children with infectious mononucleosis[J]. Adv Med Sci,2014,59(2):227-231.
- [5] 景清. 小儿传染性单核细胞增多症 112 例临床分析[J]. 四川医学,2018,39(1):79-82.
- [6] 荣婷婷,王维维,王娟娟,等. EB 病毒感染患儿淋巴细胞亚群特征和 EBV DNA 载量分析[J]. 检验医学, 2018,33(4):285-289.
- [7] 孙敏,盛艳蕊,周洪静. 成人传染性单核细胞增多症临床表现及实验室检查特点分析[J]. 中国药物与临床, 2020,20(10):1707-1708.
- [8] Chatterjee B,Deng Y,Holler A,et al. CD8<sup>+</sup> T cells re-
- tain protective functions despite sustained inhibitory receptor expression during Epstein-Barr virus infection in vivo[J]. PLoS Pathog,2019,15(5):e1007748.
- [9] Maini MK,Gudgeon N,Wedderburn LR,et al. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype[J]. J Immunol,2000, 165(10):5729-5737.
- [10] Hoshino Y,Morishima T,Kimura H,et al. Antigen-driven expansion and contraction of CD8<sup>+</sup>-activated T cells in primary EBV infection[J]. J Immunol,1999, 163(10):5735-5740.
- [11] 谢静,王焕玲,邱志峰,等. 成人传染性单核细胞增多症和慢性活动性 EB 病毒感染外周血淋巴细胞亚群分析[J]. 中华内科杂志,2016,55(6):455-459.
- [12] Chen T,Chen Y,Bao W,et al. T-lymphocyte subsets and Th1/Th2 cytokines in convalescent patients with Epstein-Barr virus-associated aplastic anemia[J]. Hematology,2020,25(1):11-16.
- [13] Song YL,Wang BF,Jiang NG,et al. CD8dimCD3<sup>+</sup> lymphocytes in fever patients might be biomarkers of active EBV infection and exclusion indicator of T-LGLL[J]. Biomark Med,2020,14(18):1703-1715.
- [14] Taylor GS,Long HM,Brooks JM,et al. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease[J]. Annu Rev Immunol,2015,33:787-821.
- [15] Balfour HH Jr,Holman CJ,Hokanson KM,et al. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis[J]. J Infect Dis,2005,192(9):1505-1512.
- [16] Wingate PJ,McAulay KA,Anthony IC,et al. Regulatory T cell activity in primary and persistent Epstein-Barr virus infection[J]. J Med Virol,2009,81(5):870-877.

(收稿日期:2021-11-30)

(上接第 422 页)

- [18] De La Garza A,Cameron RC,Gupta V,et al. The splicing factor Sf3b1 regulates erythroid maturation and proliferation via TGFβ signaling in zebrafish[J]. Blood Adv,2019,3(14):2093-2104.
- [19] Huang Y,Hale J,Wang Y,et al. SF3B1 deficiency impairs human erythropoiesis via activation of p53 pathway: implications for understanding of ineffective erythropoiesis in MDS[J]. J Hematol Oncol,2018, 11(1):19.
- [20] Lieu YK,Liu Z,Ali AM,et al. SF3B1 mutant-induced missplicing of MAP3K7 causes anemia in myelodysplastic syndromes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022,119(1):e2111703119.
- [21] Clough CA,Pangallo J,Sarchi M,et al. Coordinated missplicing of TMEM14C and ABCB7 causes ring sideroblast formation in SF3B1-mutant myelodysplastic syndrome[J]. Blood,2022,139(13):2038-2049.

(收稿日期:2021-11-25)