

重症与轻症登革热B细胞反应动态变化及差异

李 泽, 王茜茜, 温莺芬, 郭文靖, 赵令斋, 洪文昕, 张复春, 庾 蕾
(广州医科大学附属广州市第八人民医院, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨登革病毒I型(DENV-1)感染时, 机体B细胞和浆细胞随病程的动态变化及其与疾病严重性的关系, 为重症登革热的早期预警或治疗提供可能依据。【方法】选择2014年9月至12月登革热住院病例62例, 设轻症登革热组(DF, $n=33$)、重症登革热组(SD, $n=29$)及对照组(control, $n=6$)。采用多色流式细胞技术分析患者急性期及极期的外周血中B细胞及浆细胞随病程的动态变化及其在重症和轻症组的差异。进一步通过系列样品分析同一感染者(包括轻症和重症各3例)浆细胞随病程的变化, 并且观察登革病毒初次及二次感染时, B细胞及其亚群即初始B细胞、记忆B细胞和浆细胞的变化。【结果】重症组B细胞扩增明显高于轻症组($P=0.013$), 特别是在病程第5~6天($P=0.017, 0.002$)。轻症组和重症组浆细胞与对照组相比均有明显的增殖($P=0.011, 0.032$), 但轻症和重症两组间相比差异无统计学意义。同一感染者系列样品分析显示, 轻症病例浆细胞在病程第7~8天达高峰, 第10天基本恢复正常。重症病例在病程第7~9天达高峰, 但在病程10 d后仍有一定量的增殖。对于轻症登革热, 二次感染组表现出更明显的B细胞增殖、初始B细胞减少及记忆B细胞减少($P=0.028, 0.010, 0.037$), 但浆细胞变化未体现出差异。而对于重症登革热, 在二次感染时仅初始B细胞明显减少($P=0.018$)。【结论】DENV-1血清型感染时轻症和重症登革热组B细胞反应呈现不同的趋势。宿主在病程早期B细胞的明显扩增以及浆细胞延迟反应可能与疾病严重性相关。

关键词:登革热; B细胞; 浆细胞; 增殖变化

中图分类号: R511

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2020)02-0300-06

Dynamic Changes and Differences of B-cell Responses between Severe Dengue Disease and Mild Dengue Fever

LI Ze, WANG Qian-qian, WEN Ying-fen, GUO Wen-jing, ZHAO Ling-zhai, HONG Wen-xin,
ZHANG Fu-chun, YU Lei

(Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510060, China)

Corresponding to: YU Lei, E-mail: leiyl1393@126.com

Abstract: 【Objective】To find out the possible marker for early warning or therapeutic target of severe dengue disease, we studied B cell responses during natural dengue virus (DENV) infection and their association with disease severity. 【Methods】Sixty-two cases and their blood samples were collected from the patients hospitalized during September to December in 2014 and three groups were designated as mild dengue (DF, $n=33$), severe dengue (SD, $n=29$) and control group (Control, $n=6$). Multicolor flow cytometry was used to analyze the dynamic changes of B cells and plasmablasts in the peripheral blood of patients during the acute phase and the critical phase. The plasmablasts in a succession of samples from the same infected patients (including 3 mild and 3 severe cases) were further analyzed. We also observed the changes of B cells and their subsets, including naive B cells, memory B cells and plasmablasts, during primary and secondary infections. 【Results】The expansion of B cells in the severe group was significantly higher than that in the mild group ($P=0.013$), especially on day 5 and day 6 after the symptom onset ($P=0.017$ and 0.002 , respectively).

收稿日期: 2019-12-02

基金项目: 广州市健康医疗协同创新重大专项(201803040006)

作者简介: 李泽, 在读硕士生, 研究方向: 传染病, E-mail: 2437391255@qq.com; 庾蕾, 通信作者: 医学博士, 副主任技师, 硕士生导师, 研究方向: 病毒感染宿主B细胞免疫保护及致病机制, E-mail: leiyl1393@126.com

Compared with those in the control group, the plasmablasts in the mild and severe groups showed significant proliferation ($P = 0.011$ and 0.032 , respectively), but no statistical difference was observed between these two groups. The analysis of the serial blood samples showed that the plasmablasts, in mild cases, peaked on day 7 and 8 and returned to baseline on day 10, whereas in the severe group, peaked on day 7 to 9, and still existed at a certain rate after day 10. In mild dengue group, more proliferative B cells, less naïve B cells and memory B cells were found in secondary infection than in primary infection ($P = 0.028$, 0.010 and 0.037 , respectively), but plasmablasts revealed no difference. In severe dengue group, only naïve B cells significantly decreased in secondary infection ($P = 0.018$). 【Conclusion】 B cell responses between mild and severe dengue after DENV-1 infection present different trends. The significant proliferation of B cells in the early stage of the disease and the persistent existence of plasmablasts may be related to the severity of the dengue disease.

Key words: dengue fever; B cells; plasmablasts; proliferation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(2): 300-305]

登革热(dengue fever, DF)是登革病毒经蚊媒传播引起的一种急性全身性疾病^[1]。2014年广东省爆发了近十年来最严重的登革热疫情,主要为登革病毒血清1型感染(DENV-1),出现了重症甚至死亡病例^[2]。登革病毒感染可导致严重的血浆渗漏、血小板减少、严重出血及器官损害等,即重症登革热(severe dengue, SD),如不及时救治会危及生命^[3]。重症登革热的发病机制仍不清楚,目前普遍认为二次感染是重症登革热发生的危险因素^[4-6]。有研究报道二次感染时显著的浆细胞扩增与疾病的严重性相关^[7]。目前,与病毒感染所诱导机体免疫反应的相关研究,多数集中于血清抗体反应,而缺乏对产生抗体的B细胞反应的研究,特别是在出现临床症状的急性期。本文以2014年因登革病毒感染住院病例为研究对象,探讨了DENV-1感染时,机体B细胞和浆细胞随病程的动态变化及其与疾病严重性的关系。从B细胞反应的角度探讨机体抗体反应机制,为重症登革热的早期预警和早期治疗提供可能的依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本

1.1.1 样本来源 选择2014年9月至12月,广州市第八人民医院住院确诊的DENV-1患者急性期或极期(即病程3~11 d)外周血样本,病例总数62例,样本数共97份。所选样本均用于医学研究,已征得患者或家属知情同意,并通过我院伦理委员会批准。登革热诊断和临床分型参照国家卫生计生委《登革热诊疗指南(2014年第2版)》^[8]。登革病毒初次和二次感染判定,依据登革病毒感

染者IgM和IgG在病程中的动态变化。认为病程5 d内可检测到登革病毒特异性IgM或第8~10天检测到IgG出现且升高为初次感染;认为病程开始检测到IgG持续且迅速升高为二次感染^[1]。

1.1.2 研究分组 研究分为轻症登革热组和重症登革热组。轻症组(DF, $n=33$),单时间点病例数30例,包括登革病毒初次感染20例,二次感染10例;系列时间点病例数3例,样品数18份。重症组(SD, $n=29$),单时间点病例数26例,包括登革病毒初次感染14例,二次感染12例;系列病例数3例,样品数23份。选择同期门诊发热且排除登革热患者的外周血作为对照组(control, $n=6$),样品数共6份。轻症登革热组包括男性15例,女性18例,年龄17~82岁,年龄 $M(QR)$ 为46(37.5)岁;重症登革热组包括男性16例,女性13例,年龄17~98岁,年龄 $M(QR)$ 为69(52.5)岁;经检验两组性别($\chi^2=0.583$, $P=0.445$)、年龄($Z=-1.799$, $P=0.072$)均无统计学差异。

1.2 试剂及仪器

淋巴细胞分离液(GE Healthcare, 美国);B细胞及其亚群标志抗原荧光抗体试剂盒(Beckman, 美国),包括:CD45-KO、CD19-ECD、IgD-FITC、CD27-PC7、IgM-PB和CD38-APC A750;流式细胞仪(BeckmanGallios流式细胞仪,美国)

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞分离及保存 取病例组以及对照组EDTA抗凝血5 mL,离心分离血浆后,重悬下层细胞,并加入GE-淋巴细胞分离液充分混匀,再次离心后收集外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),计数保存于液氮。

1.3.2 多色流式细胞技术分析 解冻保存于液氮

中的PBMC,将实验设置为空白细胞管、单个抗体染色管(CD45-KO、CD19-ECD、IgD-FITC、CD27-PC7、IgM-PB和CD38-APC A750 抗体)以及上述混合抗体染色管,振荡混匀,室温避光孵育。

期间取实验室预存健康人PBMC,设置调整Beckman Gallios 流式细胞仪上机参数,待实验样品避光孵育结束后上机。采用Kaluza1.3软件分析收集上机数据,首先通过CD45-KO抗体荧光确认标记CD45的外周血单个核细胞范围,从中以CD19-ECD抗体荧光圈出B细胞(CD19⁺),再依次找出B细胞亚群,包括初始B细胞(IgD⁺CD27⁻)、记忆B细胞(CD27⁺CD38^{low})和浆细胞(CD27⁺⁺CD38⁺⁺),最终计算各自所占比率。

1.4 统计学分析

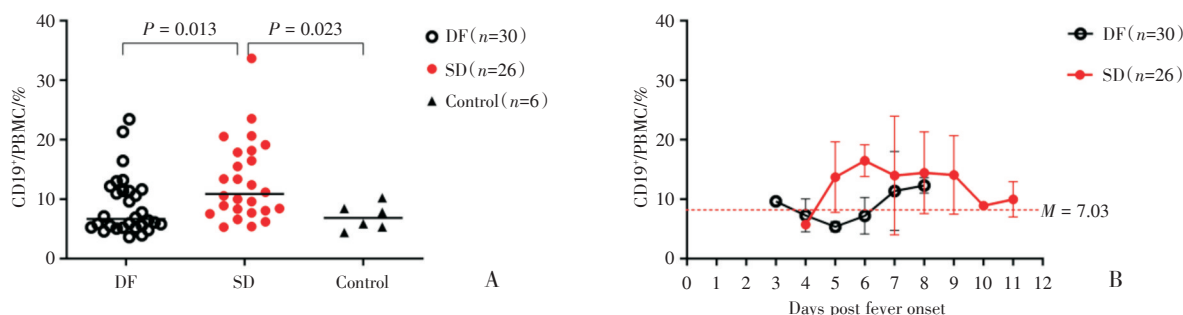
数据应用SPSS 25.0统计学软件分析。计数资料以例数统计描述,采用Pearson卡方检验统计分析;计量资料符合正态分布,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),不符合正态分布,采用中位数(四分位间距)即 $M(QR)$ 描述;多组计量资料符合正态分布且方差齐性,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),有统计学意义时进行多重比较(LSD法)。非正态分布资料且方差齐性,采用Wilcoxon检验,多组比较采用Kruskal-Wallis H 检验,有统计学意义时进

行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 轻症与重症登革热B细胞反应动态变化

为了解登革病毒感染所诱导的宿主抗体反应与疾病严重性是否相关,本研究首先观察了轻症与重症登革热患者的B细胞反应变化。我们选取轻症组单时间点病例(DF, $n=30$)、重症组单时间点病例(SD, $n=26$),以及对照组(control, $n=6$),分析各组中B细胞占PBMC的比率(图1A)。经检验3组差异有统计学意义($H=10.213$, $P=0.006$),两两比较后可知,重症组相较轻症组与对照组,差异有统计学意义($P=0.013, 0.023$),且重症组B细胞比率高于其他两组,而轻症组与对照组相比差异无统计学意义($P=1.000$)。为进一步探讨B细胞反应随感染病程的变化,我们分析了轻症、重症组B细胞比率与发热起病天数的关系(图1B)。由图可知,轻症和重症组B细胞反应呈现不同的趋势。重症组B细胞比率在病程的第5和6天明显高于轻症组,差异均有统计学意义($F=10.650$, 20.188 ; $P=0.017, 0.002$)。即重症在感染后第5和6天B细胞增殖明显高于轻症感染者。



A: The ratio of B cells to PBMC in each group. B: Changes in the ratio of B cells to PBMC in each group during the course of the disease. DF: Mild dengue fever; SD: Severe dengue fever; M: The mean ratio of B cell in the control group

图1 轻症与重症登革热组B细胞变化比较

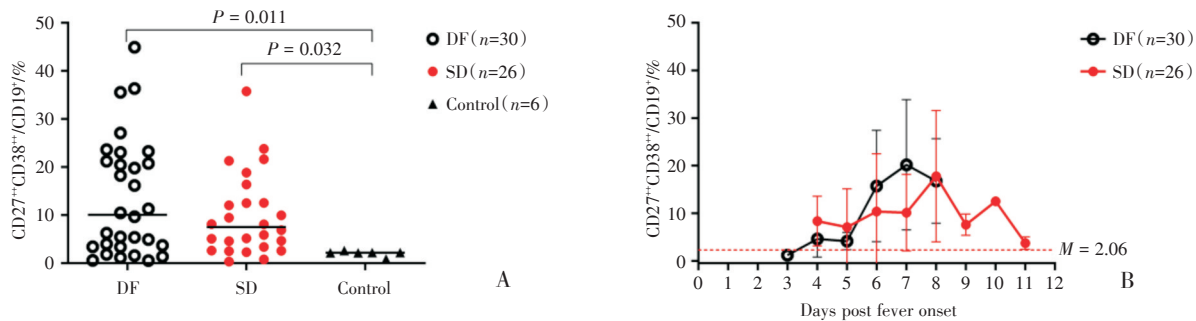
Fig.1 Comparison of B cell percentage in PBMC between mild and severe denguevirus infection groups

2.2 浆细胞在轻症和重症登革热病程中的变化趋势

2.2.1 单时间点轻、重症组浆细胞变化 为进一步分析轻症和重症患者急性期B细胞不同程度的扩增,是否与其浆细胞扩增相关,我们观察了轻、重症登革热单时间点病例以及对照组的浆细胞,在病程中的变化规律。图2A显示轻症和重症组

浆细胞与对照组相比均有明显的增殖,经检验上述3组差异有统计学意义($H = 8.525$, $P = 0.014$),其中轻症和重症组相比对照组,差异均有统计学意义($P = 0.011, 0.032$),但轻症组和重症组相比差异无统计学意义($P = 1.000$)。从感染病程的角度观察(图2B),发现轻症组在病程第7天浆细胞扩增达高峰,而重症组在病程第8天达高峰,但两

组之间差异无统计学意义($F = 3.065, 0.008; P = 0.099, 0.931$)。



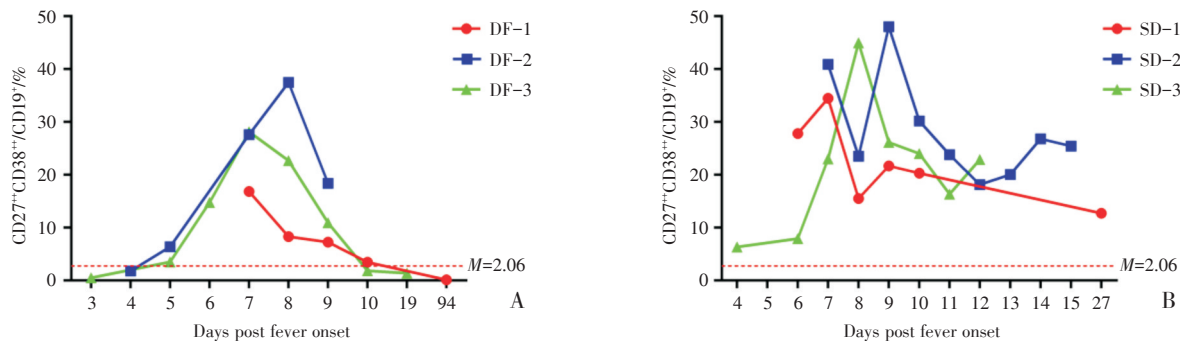
A: The ratio of plasmablasts to B cells in each group. B: Changes in the ratio of plasmablasts to B cells in each group during the course of the disease. DF: Mild dengue fever; SD: Severe dengue fever; M: The mean ratio of plasma cells in the control group

图2 轻症与重症登革热组浆细胞变化比较

Fig.2 Comparison of Plasmablast percentage in B cell between mild and severe dengue groups

2.2.2 系列时间点轻、重症组浆细胞变化 从来源于同一感染者的系列样品(轻症和重症各3例)分析浆细胞随病程的变化。图中表明轻症病例

(图3A)浆细胞在病程第7~8天达高峰,第10天基本恢复正常。重症病例(图3B)在病程第7~9天达高峰,但在病程10 d后仍有一定量的浆细胞增值。



A: Changes in the ratio of plasmablasts to B cells in mild cases during the course of the disease. B: Changes in the ratio of plasmablasts to B cells in severe cases during the course of the disease. DF: Mild dengue fever; SD: Severe dengue fever; M: The mean ratio of plasma cells in the control group

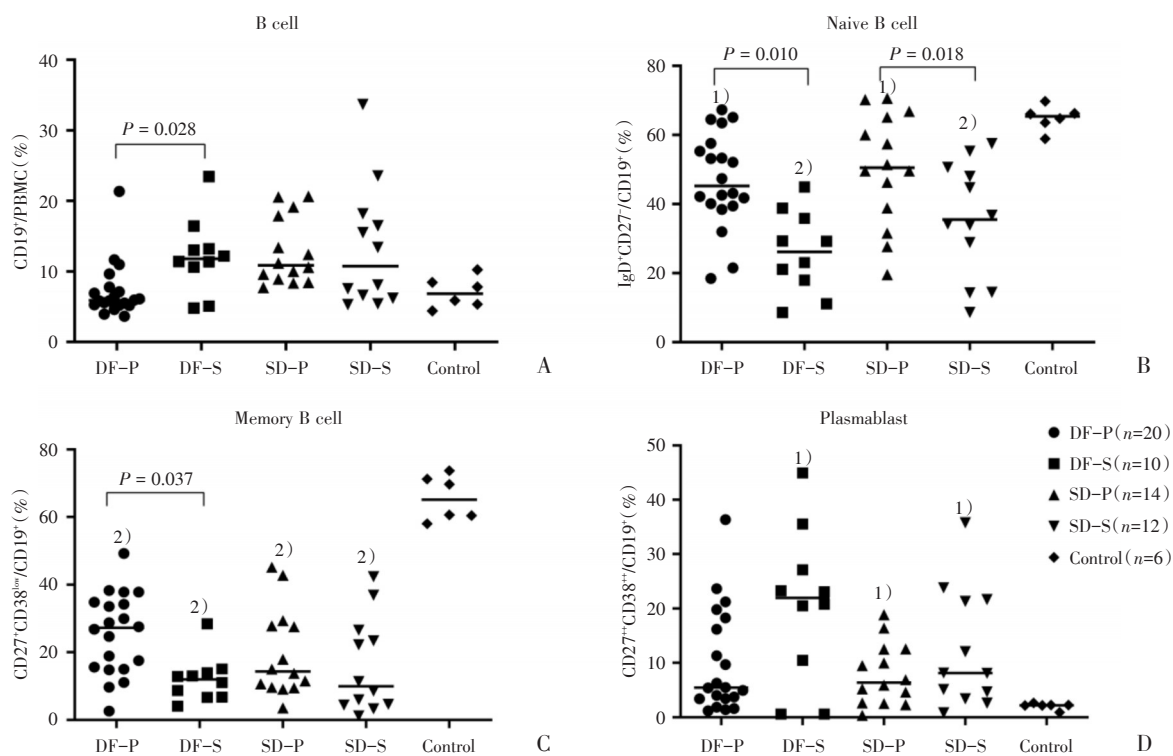
图3 登革病毒感染患者浆细胞随感染病程的变化

Fig.3 The dynamics of Plasmablasts in series samples from the dengue during the course of disease

2.3 初次和二次感染对B细胞反应的影响

本研究中我们以轻症和重症登革热单时间点病例作为研究对象,分析病毒初次(primary infection)和二次感染(secondary infection)时B细胞(B cell)及其亚群,即初始B细胞(naive B cell)、记忆B细胞(memory B cell)和浆细胞(plasmablast)的变化。在图4 A~D所示的四类不同细胞群中,轻症初次、二次感染以及对照组差异均有统计学意义(从A~D的 H 分别为7.053, 19.822, 20.843, 8.188; P 分别为0.029, < 0.001 , < 0.001 , 0.017),其中轻症二次感染组相较初次感染组,表现为B细胞增殖、初始B细胞减少和记忆B细胞减少($P =$

0.028, 0.010, 0.037),但浆细胞变化无统计学意义($P = 0.434$);在图4 A至D所示的四类不同细胞亚群中,重症初次、二次感染组以及对照组,在B细胞中的差异无统计学意义($F = 2.227, P = 0.126$),而在初始B细胞、记忆B细胞和浆细胞群中差异有统计学意义(F 分别为8.121, 35.594, 3.611; P 分别为0.002, < 0.001 , 0.040)。其中重症初次、二次感染组,在初始B细胞亚群中存在统计学差异($P = 0.018$),表现为二次感染时初始B细胞明显减少,而在记忆B细胞和浆细胞亚群中差异无统计学意义($P = 0.469, 0.154$)。



A: The ratio of B cells to PBMC in each group. B: The ratio of Naive B cells to B cells in each group. C: The ratio of Memory B cells to B cells in each group. D: The ratio of Plasmablasts to B cells in each group. DF-P: Primary infection of mild dengue fever; DF-S: Secondary infection of mild dengue fever; SD-P: Primary infection of severe dengue fever; SD-S: Secondary infection of severe dengue fever; Compared with controls, 1) means $P < 0.05$, 2) means $P < 0.01$

图4 登革病毒感染者B细胞及其亚群与初次与二次感染的关系

Fig.4 Comparison of B cell and its subsets between primary and secondary infection in dengue fever

3 讨论

典型登革热病程分为3期,即急性发热期、退热期或极期和恢复期。极期通常出现在病程的第6~7天,部分患者在此期发热减退时可出现病情加重,发展成为重症登革热^[9]。早期预警和干预是救治重症登革热及降低病死率的关键。本研究初步观察了登革病毒感染时B细胞随病程的变化,发现在病程的第5~6天B细胞明显增殖且与疾病的严重性相关,而在病程早期出现的B细胞明显扩增现象是否可作为登革热的重症预警指标还需进一步明确。

现许多研究报道认为登革病毒感染可诱导人体B细胞大量快速增殖,其中浆细胞为主要组分^[10-11]。另有研究报道证实登革病毒感染引起的浆细胞反应程度远大于接种疫苗或者感染其他发热性疾病^[5]。本研究观察到登革病毒感染后,无论轻症或重症登革热患者均可见浆细胞的大量扩

增,这与上述报道的结果一致。目前有关浆细胞扩增与登革热疾病进展相关性的报道仍较少,而在本研究中,我们发现仅比较轻症与重症登革热浆细胞的扩增是无明显差异的,但轻症与重症浆细胞扩增随病程的变化规律不同。从病程角度观察,轻症登革热组中的浆细胞在发热起病第7~8天达高峰,于第10天基本恢复至正常水平,而重症登革组中的浆细胞在病程第7~9天达高峰,且在病程第10天后仍维持一定量的浆细胞扩增,我们推测这种浆细胞延迟反应可能与疾病严重性相关。

现已明确B细胞是由功能不同的细胞亚群组成,但各细胞亚群在登革病毒感染中的作用尚不清楚。不同血清型登革病毒二次感染时所产生的抗体依赖性感染增强作用(antibody dependent enhancement, ADE)可导致疾病进展为重症表现^[3, 4, 12-13]。本研究观察了B细胞及各亚群在轻症、重症登革热中的变化与初次、二次感染之间的关系。结果发现,二次感染时轻症和重症登革热

组初始B细胞均表现为明显减少,提示二次感染时可能由B细胞的其他亚群发挥主要作用。此外,本研究还发现记忆B细胞的增殖在初次感染和二次感染中的差异并无统计学意义,但有报道认为登革病毒二次感染时,机体中已存在的记忆B细胞被激活,发挥主要作用^[14-16]。这与本研究中所观察到的现象似乎并不一致,而这是否同

个体免疫、样本数量或者病程有关,仍需要进一步明确。

总之,我们观察了DENV-1血清型感染时B细胞反应随病程的变化以及在轻症和重症登革热之间的差异。研究表明登革热病程早期B细胞的明显扩增以及浆细胞延迟反应可能与疾病严重性相关。

参考文献:

- [1] Guzman MG, Harris E. Dengue [J]. Lancet, 2015, 385(9966):453-465.
- [2] 熊益权,陈清. 1978~2014年我国登革热的流行病学分析[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(12): 1822-1825.
Xiong YQ, Chen Q. Epidemiology of dengue fever in China from 1978 to 2014 [J]. J South Med Univ, 2014, 34(12): 1822-1825.
- [3] Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans [J]. Science, 2017, 358(6365): 929-932.
- [4] Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection [J]. Arch Virol, 2013, 158(7): 1445-1459.
- [5] Hong WX, Zhao H, Deng YQ, et al. Severe dengue due to secondary DENV-1 infection in Mainland China [J]. J Clin Virol, 2013, 57(2): 184-186.
- [6] Halstead S, Wilder-Smith A. Severe dengue in travellers: pathogenesis, risk and clinical management [J]. J Travel Med, 2019, 26(7). doi: 10.1093/jtm/taz062.
- [7] Garcia-Bates TM, Cordeiro MT, Nascimento EJ, et al. Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients [J]. J Immunol, 2013, 190(1): 80-87.
- [8] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 登革热诊疗指南(2014年第2版) [J]. 传染病信息, 2014, 27(5): 262-265.
Health and family planning commission of the People's Republic of China. Diagnosis and treatment of dengue fever (second edition of 2014) [J]. Infect Dis Info, 2014, 27(5): 262-265.
- [9] Geneva: World Health Organization. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: New edition [M]. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee, 2009.
- [10] Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans [J]. J Virol, 2012, 86(6): 2911-2918.
- [11] Nivarthi UK, Tu HA, Delacruz MJ, et al. Longitudinal analysis of acute and convalescent B cell responses in a human primary dengue serotype 2 infection model [J]. E Bio Med, 2019, 41: 465-478.
- [12] Kuczera D, Assolini JP, Tomiotto-Pellissier F, et al. Highlights for dengue immunopathogenesis: antibody-dependent enhancement, cytokine storm, and beyond [J]. J Interferon Cytokine Res, 2018, 38(2): 69-80.
- [13] Ceron GM, Yang HM. A simple mathematical model to describe antibody-dependent enhancement in heterologous secondary infection in dengue [J]. Math Med Biol, 2019, 36(4): 411-438.
- [14] 游艳,肖建华,廖勇. 干扰素抗病毒作用机制的研究进展 [J]. 广东医学, 2014, 35(11): 1795-1797.
You Y, Xiao JY, Liao Y. Research progress of antiviral mechanism of interferon [J]. Guangdong Med J, 2014, 35(11): 1795-1797.
- [15] Fink K. Origin and function of circulating plasmablasts during acute viral infections [J]. Front Immunol, 2012, 3: 78.
- [16] 张萍. 宿主细胞抗登革病毒的应答 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2020, 41(1): 16-23.
Zhang P. Host cell responses to Dengue virus [J]. J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(1): 16-23.

(编辑 孙慧兰)