· 血液/肿瘤疾病 ·

血浆及全血 EB 病毒 DNA 对 EB 病毒相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿预后的影响

扫码阅读电子版

张晴[1]　崔蕾[1]　马宏浩[2]　王冬[2]　赵云泽[2]　王天有[2]　李志刚[1]　张蕊[2]
[1]国家儿童医学中心,首都医科大学附属北京儿童医院,北京市儿科研究所,血液疾病研究室,北京 100045;[2]国家儿童医学中心,首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心,儿童血液病与肿瘤分子分型北京市重点实验室,儿科重大疾病研究教育部重点实验室,北京 100045
通信作者:张蕊,Email:ruizh1973@126.com

【摘要】 **目的** 探讨血浆及全血 EB 病毒(EBV)DNA 水平对 EBV 相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(EBV-HLH)患儿预后的影响。**方法** 对 2016 年 1 月至 2017 年 12 月首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心收治的 66 例 EBV-HLH 患儿的临床资料进行回顾性分析,包括入院时、治疗 2 周、治疗 4 周血浆及全血 EBV-DNA 的动态改变,并根据 EBV-DNA 的拷贝数将血浆 EBV-DNA 分为阳性组和阴性组,利用受试者工作特征曲线(ROC)将全血 EBV-DNA 分为高水平组及低水平组;采用 χ^2 检验比较不同水平患儿之间预后不良发生率,*Log-Rank* 检验评估无事件生存情况来分析其预后意义。**结果** 单因素分析结果显示,入院时血浆或全血 EBV-DNA 水平对 EBV-HLH 预后影响不大,治疗 2 周及 4 周血浆 EBV-DNA 阳性(≥500 拷贝/mL)或全血 EBV-DNA 载量 >(5.04 ~ 5.09) × 10^5 拷贝/mL 是影响患儿预后及无进展生存的重要因素(P < 0.001)。此外中枢神经系统受累(P = 0.025)、白细胞(WBC)减少(WBC ≤ 3 × 10^9/L, P = 0.031)、中性粒细胞(ANC)缺乏(ANC ≤ 0.5 × 10^9/L, P = 0.041)、血红蛋白(Hb)降低(Hb ≤ 90 g/L, P = 0.023)及清蛋白减少(≤26 g/L, P = 0.012),提示也具有一定预后意义。*Cox* 回归多因素分析显示,仅治疗 4 周时血浆 EBV-DNA 载量与中枢神经系统累及是独立预后因素(风险比率 = 7.139, P = 0.032;风险比率 = 6.455; P = 0.042),而不同时间点的全血及治疗 2 周时血浆 EBV-DNA 水平的预后价值较低。**结论** EVB-HLH 患儿治疗 4 周血浆 EBV-DNA 水平可作为早期判断病情、尽早识别预后不良的客观指标,能更好地指导 EBV-HLH 的治疗。

【关键词】 儿童;EB 病毒相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症;EB 病毒 DNA;预后
基金项目:国家自然科学基金(81800189);北京市医院管理中心儿科学科协同发展中心专项经费(XTZD20180202);北京市医院管理中心"青苗"计划专项经费(QML20181205);北京市教育委员会科技发展计划一般项目(KM201910025011)
DOI:10.3760/cma.j.cn101070-20190614-00530

Prognostic significance of plasma and whole blood Epstein – Barr virus – DNA load during treatment in children with Epstein – Barr virus – associated hemophagocytic lymphohistiocytosis

Zhang Qing[1], Cui Lei[1], Ma Honghao[2], Wang Dong[2], Zhao Yunze[2], Wang Tianyou[2], Li Zhigang[1], Zhang Rui[2]
[1]Laboratory of Hematologic Diseases, Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China; [2]Beijing Key Laboratory of Pediatric Hematology Oncology, Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education, Department of Hematology Oncology Center, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China
Corresponding author: Zhang Rui, Email: ruizh1973@126.com

【**Abstract**】 **Objective** To evaluate the prognostic value of Epstein – Barr virus (EBV) – DNA level in plasma and whole blood in treatment of children with EBV – associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV – HLH). **Methods** Clinical data of 66 children with EBV – HLH, who were admitted to the Hematology and Oncology Center of Beijing Children's Hospital, Capital Medical University from January 2016 to December 2017 were retrospectively reviewed and analyzed. The data included the dynamic changes of the EBV – DNA level in plasma (P – EBV – DNA) and whole blood (W – EBV – DNA) at the time of admission, 2 and 4 weeks after treatment. P – EBV – DNA was divided into the positive group and the negative group according to the copy number of EBV – DNA, and W – EBV – DNA was divided into the high and the low level group by the receiver operating characteristic curve (ROC); the incidence of poor prognosis was compared between different groups by *Chi – Square* test; the event – free survival (EFS) was evaluated by the *Log – Rank* test to identify its prognostic significance. **Results** The analysis showed that both P – EBV – DNA and W – EBV – DNA at admission could not be associated with a poor outcome; P – EBV – DNA (≥500 copies/mL) or W – EBV – DNA [> (5.04 – 5.09) × 10^5 copies/mL] after 2 and 4 weeks of treatment could be a good marker of a poor outcome and progression – free survival (P < 0.001). Besides, central nervous system (CNS) involvement (P = 0.025), sever leukopenia (WBC ≤ 3 × 10^9/L, P = 0.031), neutropenia (ANC ≤ 0.5 × 10^9/L, P = 0.041), albumin reduction (≤26 g/L, P = 0.012) and hemoglobin decrease (≤90 g/L, P = 0.023) at diagnosis are also associated with worse outcomes. In multivariate analysis, only P – EBV – DNA at 4th week and CNS involvement were indepen-

dent prognostic factors ($HR = 7.139$, $P = 0.032$ and $HR = 6.455$, $P = 0.042$, respectively). The prognostic value of W - EBV - DNA at different time points and P - EBV - DNA after 2 weeks of treatment had a lower prognostic value. **Conclusions** The P - EBV - DNA level after 4 weeks of treatment is a promising risk indicator for early diagnosis of disease and early recognition of poor prognosis in EBV - HLH children, so it provides the guidance for optimal treatment.

【Key words】 Child; Epstein - Barr virus; Epstein - Barr virus - associated hemophagocytic lymphohistiocytosis; Epstein - Barr virus - DNA; Prognosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81800189); Special Fund of the Pediatric Medical Coordinated Development Center of Beijing Hospitals Authority (XTZD20180202); Beijing Hospitals Authority Youth Programme (QML20181205); Scientific Research Common Program of Beijing Municipal Commission of Education (KM201910025011)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101070-20190614-00530

儿童噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH)是由各种原因导致的炎症因子风暴引发的多脏器功能损害[1]。临床表现为持续发热、肝脾大、全血细胞减少及骨髓、肝、脾或淋巴结出现吞噬血细胞现象[2]。感染是引起 HLH 的常见触发因素之一,其中 EB 病毒(Epstein - Barr virus, EBV)感染最为常见[3]。由 EBV 诱发的 HLH 统称为 EBV 相关 HLH(EBV-HLH),既可以是原发性(家族遗传性,由 EBV 感染触发),也可以是继发性(继发于 EBV 感染或 EBV 相关恶性肿瘤等)[4]。EBV-HLH 在亚洲人群中多见,约占我国儿童 HLH 总数的 60%,受到普遍关注[5]。

HLH 临床起病急,病情进展迅速,病死率高,是儿科极危重症之一。目前临床广泛使用的国际组织细胞协会 HLH-1994 和 HLH-2004 方案明显提高了 HLH 的无病生存率,然而近 20 年 HLH 治疗并无明显进展[5 年总生存率:HLH-1994 方案为(54 ± 6)%,HLH-2004 方案为 61%][6-7]。仍有约 30% 的 EBV-HLH 患者预后不良,即化疗效果不好或在治疗过程中病情暂时得到控制,很快又出现 HLH 爆发,迅速导致患儿死亡,对这部分患儿应尽早采用造血干细胞移植才能挽救其生命。目前,尚无特异性指标用于 EBV-HLH 不良预后的早期判断,且多数预后分析集中在诊断时的各项指标。研究表明,诊断时的部分临床特征,如高胆红素血症、高铁蛋白血症或肝功能障碍与预后有一定关系[8-9]。然而,在实际临床经验中,上述指标严重异常的患者最终却得到完全缓解,并未发现这些因素对 EBV-HLH 患者预后的显著影响。因此,如何尽早识别预后不良的患者,以指导早期治疗仍然是临床亟待解决的难题。本研究对 66 例 HLH 患儿的临床资料进行回顾性分析,探讨血浆或全血 EBV-DNA 水平在儿童 EBV-HLH 治疗中的预后意义。

1 资料与方法

1.1 病例来源 对 2016 年 1 月至 2017 年 12 月首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心收治的 66 例初诊 EBV-HLH 患儿进行回顾性分析。本研究通过首都医科大学附属北京儿童医院医学伦理委员会批准(批准文号:2019-k-296),临床病例资料于收集前患儿监护人均签署知情同意书。

1.2 诊断标准 HLH 患儿诊断依据 HLH-2004 方案[10]。EBV-HLH 诊断需同时具备 EBV 感染证据[11]。

1.3 治疗及评估 66 例患儿确诊后,统一采用国际组织细胞协会 HLH-2004 方案治疗,对于复发及难治患者采用 L-DEP(培门冬酶、多柔比星、依托泊苷、甲泼尼龙)二线化疗方案或造血干细胞移植。疗效评价标准分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病进展/复发[12]。无事件生存(EFS)期定义为从诊断到疾病进展/复发或死亡或随访截止。

1.4 方法 采用实时荧光定量 PCR 分别检测 EBV-HLH 患儿入院确诊时、治疗 2 周、治疗 4 周 3 个时间点血浆及全血 EBV-DNA 拷贝数。

1.5 统计学处理 利用 SPSS 17.0 统计学软件进行处理。绘制受试者工作特征曲线(ROC),并确定患儿分组的分界值(Cut-off)。计数资料采用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 *Fisher's* 精确概率法,EFS 率的计算采用 *Kaplan-Meier* 方法,并描绘生存曲线,生存资料比较采用 *Log-Rank* 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

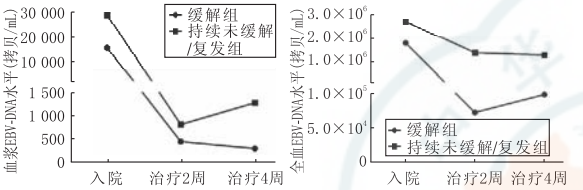
2.1 一般资料 EBV-HLH 患儿共 66 例,占同期 HLH 患儿的 57.4%。根据 EBV 相关抗体类型判断,EBV 原发感染 13 例(19.7%),EBV 既往感染再激活 53 例(80.3%)。66 例中男 34 例,女 32 例;男女比例为 1.09∶1.00;发病年龄 0.8 ~ 16.4 岁,中位发病年龄 2.2 岁,其中 3 岁以下发病 41 例(62.1%)。

2.2 临床症状及体征 EBV-HLH 患儿的临床表现多样、缺乏特异性,表现为多系统、多器官受累的临床综合征,其中以持续发热、肝脾大、淋巴结大为主要临床表现。66 例患儿中持续发热 62 例(93.9%),肝大 58 例(87.9%),呼吸系统受累 55 例(83.3%),脾大 54 例(81.8%),骨髓噬血现象 54 例(81.8%),淋巴结大 39 例(59.1%),浆膜腔积液 23 例(34.8%),中枢神经系统受累 14 例(21.2%),皮疹 9 例(13.6%),出血 8 例(12.1%),黄疸 4 例(6.1%)。

2.3 不同时间点血浆或全血 EBV-DNA 载量对 EBV-

HLH 的预后分析

2.3.1　EBV-HLH 患儿血浆或全血 EBV-DNA 载量随时间变化曲线图　根据不同预后，将 66 例患儿分为缓解组、持续未缓解/复发组，分别统计 2 组患儿不同时间点血浆或全血 EBV-DNA 载量中位数，绘制其动态变化曲线（图 1）。结果显示，2 组患儿入院时血浆及全血 EBV-DNA 载量均较高，随着治疗，2 组患儿 EBV-DNA 分布具有明显差异。缓解组患儿化疗 2 周血浆 EBV-DNA 迅速降为阴性（<500 拷贝/mL），全血 EBV-DNA 也迅速下降，且维持在 1×10^5 拷贝/mL 水平；对于持续未缓解/复发组患儿，尽管治疗 2 周血浆 EBV-DNA 有明显下降趋势，但 EBV-DNA 载量始终为阳性（≥500 拷贝/mL），且治疗 4 周后病情活动，又出现 EBV-DNA 的升高，全血 EBV-DNA 载量始终维持在较高水平。



注：EBV：EB 病毒　EBV：Epstein－Barr virus

图 1　缓解组和持续未缓解/复发组患儿血浆或全血 EBV-DNA 动态变化比较

Figure 1　Comparison of dynamic changes of EBV－DNA level within plasma or whole blood in the remission and progressive/relapsed group respectively

2.3.2　治疗早期血浆 EBV-DNA 对儿童 EBV-HLH 预后的影响　根据血浆 EBV-DNA 拷贝数正常值范围，分别将 66 例 EBV-HLH 患儿确诊时（数据缺失 2 例）、治疗 2 周（数据缺失 5 例）、治疗 4 周（数据缺失 9 例）血浆 EBV-DNA 拷贝数分为 2 组，即血浆 EBV-DNA 阴性组（<500 拷贝/mL）和血浆 EBV-DNA 阳性组（≥500 拷贝/mL），以持续未缓解/复发为事件，分析 2 组不良预后发生率（表 1）。结果显示，确诊时血浆 EBV-DNA 阳性与否对 EBV-HLH 预后无明显影响（$P=0.700$），而治疗 2 周或 4 周，血浆 EBV-DNA 阳性组，其不良预后发生率明显高于阴性组，且差异有统计学意义（$P<0.001$）。

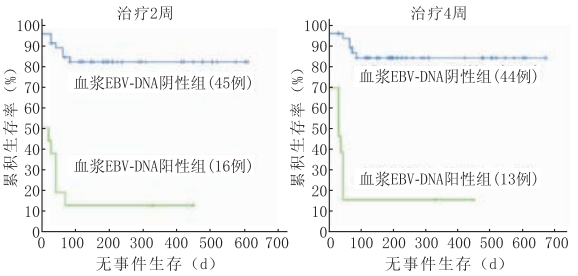
表 1　不同时间点血浆 EBV-DNA 水平与不良预后的相关性　［例（%）］

Table 1　Correlation between plasma EBV－DNA levels and prognosis at different time points　［case（%）］

时间点	组别	总例数	持续未缓解/复发	缓解	χ^2 值	P 值
确诊时	阳性组	56	21（37.5）	35（62.5）	0.475	0.700
	阴性组	8	2（25.0）	6（75.0）		
治疗 2 周	阳性组	16	14（87.5）	2（12.5）	24.884	0.001
	阴性组	45	8（17.8）	37（82.8）		
治疗 4 周	阳性组	13	11（84.6）	2（15.4）	21.924	0.001
	阴性组	44	7（15.9）	37（84.1）		

注：EBV：EB 病毒　EBV：Epstein－Barr virus

Kaplan-Meier 生存分析，治疗 2 周及 4 周血浆 EBV-DNA 阴性组 1 年 EFS 率分别为（81.9±5.8）%、（83.7±5.6）%，而阳性组分别为（12.5±8.3）%、（15.4±9.9）%，与阴性组相比，血浆 EBV-DNA 阳性组具有较差的 EFS（*Log-Rank*：$P<0.001$）（图 2）。



注：EBV：EB 病毒　EBV：Epstein－Barr virus

图 2　血浆 EBV-DNA 水平对 EBV 相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿预后的影响。治疗 2 周、治疗 4 周的 EBV-DNA 阳性组具有较差的无事件生存率（*Log Rank*：$P<0.001$）

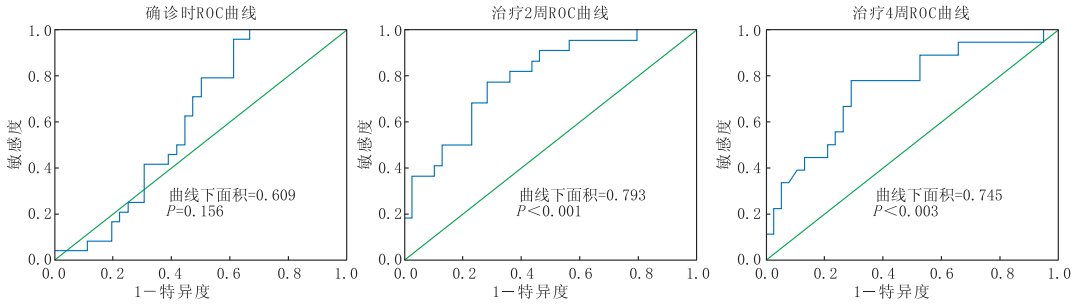
Figure 2　The prognostic value of plasma EBV－DNA level for EBV associated hemophagocytic lymphohistiocytosis children during chemotherapy. Group with higher EBV－DNA level at the 2nd or 4th week after treatment had a worse event－free survival（*Log Rank*：$P<0.001$）

2.3.3　治疗早期全血 EBV-DNA 载量在儿童 EBV-HLH 中的预后意义　分别将患儿入院确诊时、治疗 2 周及治疗 4 周全血 EBV-DNA 拷贝数作为连续性数值变量，以病情持续未缓解/复发作为事件，绘制 ROC 曲线（图 3），曲线下面积（AUC）确诊时为 0.609（$P=0.156$）、治疗 2 周为 0.793（$P<0.001$）、治疗 4 周为 0.745（$P=0.003$），表明治疗 2 周及 4 周全血 EBV-DNA 水平对儿童 HLH 的不良预后具有较好的预测价值。根据曲线坐标得出治疗 2 周 EBV-DNA 水平的分界值为 5.04×10^5 拷贝/mL 时，具有较好的敏感性（77.3%）及特异性（71.8%）；治疗 4 周 EBV-DNA 水平的分界值为 5.09×10^5 拷贝/mL 时，具有较好的敏感性（77.8%）及特异性（71.1%）。

根据分界值 5.04×10^5 拷贝/mL，将治疗 2 周的 66 例（数据缺失 5 例）患儿分为全血 EBV-DNA 高水平（29 例）、低水平（32 例）2 组，以持续未缓解/复发为事件，χ^2 检验分析 2 组不良预后发生率分别为 58.6%、15.6%（表 2），差异有统计学意义（$P<0.001$）。同样，根据分界值 5.09×10^5 拷贝/mL，将治疗 4 周的 66 例（数据缺失 10 例）患儿分为全血 EBV-DNA 高水平（25 例）、低水平（31 例）2 组，以持续未缓解或复发为事件，分析 2 组不良预后发生率分别为 56.0%、12.9%（表 2），差异有统计学意义（$P<0.001$）。

Kaplan-Meier 生存分析，治疗 2 周及 4 周 EBV-DNA 低水平组 1 年 EFS 率分别为（84.3±6.5）%、（87.0±6.1）%，而高水平组 EFS 率分别为（41.4±9.1）%、（44.0±9.9）%，与低水平组相比，EBV-DNA 高水平组具有较差的 EFS 率（*Log-Rank*：$P<0.001$，图 4）。

2.3.4　多因素分析血浆及全血 EBV-DNA 在儿童 EBV-HLH 中的预后意义　诊断时各临床特征以及治疗过程中血浆及全血 EBV-DNA 载量与预后的相关性见表 3。治疗后 2 周和 4 周的血浆 EBV-DNA 阳性（≥500



注：ROC：受试者工作特征曲线；EBV：EB 病毒　ROC：receiver operating characteristic curve；EBV：Epstein－Barr virus

图 3　ROC 曲线法分析全血 EBV-DNA 水平预测儿童 EBV 相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症不良预后的价值

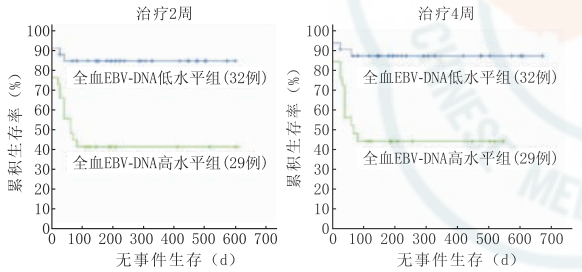
Figure 3　The value of whole blood EBV－DNA level in predicting poor prognosis for EBV associated hemophagocytic lymphohistiocytosis children by ROC curve analysis

表 2　治疗 2 周及 4 周全血 EBV-DNA 水平与不良预后的相关性　[例(%)]

Table 2　Correlation between the EBV－DNA level in whole blood and the prognosis at the 2nd and 4th week after treatment　[case(%)]

时间点	组别	总例数	持续未缓解/复发	缓解	χ^2 值	P 值
治疗 2 周	高水平组	29	17(58.6)	12(41.4)	11.301	0.001
	低水平组	32	5(15.6)	27(84.4)		
治疗 4 周	高水平组	25	14(56.0)	11(44.0)	11.785	0.001
	低水平组	31	4(12.9)	27(87.1)		

注：EBV：EB 病毒　EBV：Epstein－Barr virus



注：EBV：EB 病毒；治疗 2 周、治疗 4 周的 EBV-DNA 高水平组具有较差的无事件生存（*Log Rank*：$P<0.001$）　EBV：Epstein－Barr virus；group with higher EBV－DNA level at the 2nd or 4th week after treatment had a worse event－free survival（*Log Rank*：$P<0.001$）

图 4　全血 EBV-DNA 水平对 EBV 相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿预后的影响

Figure 4　The prognostic value of EBV－DNA level in whole blood for EBV associated hemophagocytic lymphohistiocytosis children during chemotherapy

拷贝/mL)或全血 EBV-DNA 负荷[>(5.04～5.09)×10^5 拷贝/mL]均与预后显著相关($P<0.001$)。此外，中枢神经系统受累、血细胞减少(血红蛋白≤90 g/L，中性粒细胞绝对值≤0.5×10^9/L、白细胞≤3×10^9/L)和清蛋白水平下降(≤26 g/L)也与预后明显相关(表 3)。可溶性 CD_{25} 水平较高(>15 000 U/L)、自然杀伤(NK)细胞活性降低(≤15%)与不良预后具有相关趋势。其他常见临床特征，包括发热、脾大或噬血现象、铁蛋白、纤维蛋白原或三酰甘油、总胆红素、丙氨酸转氨酶或天冬氨酸转氨酶水平均未见明确预后意义。

对上述单因素分析中 $P<0.100$ 的 11 个指标进行多因素 *Cox* 回归分析，结果显示治疗 4 周血浆 EBV-DNA 负荷是儿童 EBV-HLH 的独立预后危险因素。治

表 3　EBV 相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿常见临床特征、血浆和全血 EBV-DNA 负荷与预后的关系　(%，$\bar{x}\pm s$)

Table 3　The correlation between various clinical characteristics, plasma or whole blood EBV－DNA load and the prognosis of patients with EBV associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (%，$\bar{x}\pm s$)

指标	总例数(66 例)	无事件生存	χ^2 值	P 值
诊断年龄				
　<2 岁 | 29 | 64.8±9.0 | 0.051 | 0.822 |
　≥2 岁 | 37 | 62.2±8.0 | | |
诊断标准 | | | | |
　发热 | | | | |
　　<38.5 ℃ | 4 | 50.0±25.0 | 0.213 | 0.644 |
　　≥38.5 ℃ | 62 | 64.2±6.1 | | |
　脾大 | | | | |
　　有 | 54 | 62.6±6.6 | 0.107 | 0.756 |
　　无 | 12 | 66.7±13.6 | | |
　白细胞数 | | | | |
　　≤3×10^9/L | 31 | 76.1±7.4 | 4.659 | 0.031 |
　　>3×10^9/L | 34 | 48.4±9.0 | | |
　血红蛋白 | | | | |
　　≤90 g/L | 34 | 50.0±8.7 | 5.166 | 0.023 |
　　>90 g/L | 31 | 76.9±7.7 | | |
　血小板 | | | | |
　　≤50×10^9/L | 42 | 58.9±7.7 | 0.396 | 0.592 |
　　>50×10^9/L | 23 | 69.3±9.7 | | |
　中性粒细胞绝对数 | | | | |
　　≤0.5×10^9/L | 22 | 43.8±4.8 | 4.556 | 0.033 |
　　>0.5×10^9/L | 43 | 72.0±6.9 | | |
　三酰甘油 | | | | |
　　≤3 mmol/L | 34 | 64.7±8.2 | 0.132 | 0.716 |
　　>3 mmol/L | 31 | 60.5±8.9 | | |
　纤维蛋白原 | | | | |
　　≤1.5 g/L | 29 | 54.2±9.4 | 1.299 | 0.254 |
　　>1.5 g/L | 36 | 68.3±7.7 | | |
　铁蛋白 | | | | |
　　<2 000 g/L | 27 | 68.3±7.6 | 1.044 | 0.307 |
　　≥2 000 g/L | 38 | 54.6±9.7 | | |
　自然杀伤细胞活性 | | | | |
　　≤15% | 42 | 52.9±8.1 | 3.698 | 0.054 |
　　>15% | 24 | 77.8±8.0 | | |
　可溶性 CD_{25} | | | | |
　　<15 000 U/L | 23 | 78.8±8.4 | 3.740 | 0.053 |
　　≥15 000 U/L | 46 | 53.7±7.8 | | |
　噬血现象 | | | | |
　　是 | 54 | 62.6±6.6 | 0.185 | 0.667 |
　　否 | 12 | 66.7±13.6 | | |

续表 3　EBV 相关噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿常见临床特征、血浆和全血 EBV-DNA 负荷与预后的关系　（%，$\bar{x} \pm s$）

Table 3　The correlation between various clinical characteristics, plasma or whole blood EBV－DNA load and the prognosis of patients with EBV associated hemophagocytic lymphohistiocytosis（%，$\bar{x} \pm s$）

指标	总例数（66 例）	无事件生存	χ^2 值	P 值
其他指标				
中枢神经系统受累				
是	14	28.6 ± 12.1	12.429	0.004
否	52	72.7 ± 6.2		
丙氨酸转氨酶				
<200 U/L	29	62.5 ± 17.1	0.002	0.962
≥200 U/L	36	62.7 ± 6.5		
天冬氨酸转氨酶				
<200 U/L	41	50.0 ± 20.4	0.426	0.514
≥200 U/L	24	64.0 ± 6.3		
总胆红素				
≤25 μmol/L	49	75.0 ± 10.8	0.745	0.388
>25 μmol/L	16	60.6 ± 7.1		
清蛋白				
≤26 g/L	51	42.9 ± 13.2	6.309	0.012
>26 g/L	14	70.1 ± 6.5		
乳酸脱氢酶				
<2 000 U/L	14	78.6 ± 11.0	1.760	0.191
≥2 000 U/L	51	58.3 ± 7.0		
血浆 EBV-DNA				
治疗 2 周				
+	16	12.5 ± 8.3	35.794	<0.001
−	45	81.9 ± 5.8		
治疗 4 周				
+	13	15.4 ± 10.0	34.090	<0.001
−	44	83.7 ± 5.6		
全血 EBV-DNA				
治疗 2 周				
≤5×10^5 拷贝/mL	23	91.3 ± 5.9	10.680	<0.001
>5×10^5 拷贝/mL	38	47.4 ± 8.1		
治疗 4 周				
≤5×10^5 拷贝/mL	31	87.0 ± 6.1	11.030	<0.001
>5×10^5 拷贝/mL	25	44.0 ± 9.9		

注：EBV：EB 病毒　EBV：Epstein－Barr virus

疗 4 周血浆 EBV-DNA 持续阳性患儿的生存率明显低于血浆 EBV-DNA 转阴患儿（风险比率 = 7.14，P = 0.032；95% CI：1.189 ~ 12.880）。此外，诊断时中枢神经系统受累（风险比率 = 6.455，P = 0.042，95% CI：0.640 ~ 18.649）也与 EBV-HLH 患儿预后不良独立相关，结果见表 4。

表 4　多因素分析预测预后危险因素

Table 4　Multivariate analysis of putative prognostic factors

项目	分界值	风险比率	95% CI	P 值
白细胞（$\times 10^9$/L）	3	1.570	0.351 ~ 7.038	0.555
血红蛋白（g/L）	90	0.630	0.152 ~ 2.626	0.527
中性粒细胞绝对数（$\times 10^9$/L）	0.5	2.775	0.512 ~ 15.041	0.237
自然杀伤细胞活性（%）	15	1.260	0.352 ~ 4.508	0.722
可溶性 CD_{25}（U/L）	15 000	2.336	0.365 ~ 14.942	0.370
中枢神经系统受累	+/−	6.455	0.640 ~ 18.649	0.042
清蛋白（g/L）	26	0.356	0.053 ~ 2.381	0.287
2 周血浆 EBV-DNA	+/−	1.653	0.265 ~ 10.315	0.590
4 周血浆 EBV-DNA	+/−	7.140	1.189 ~ 12.88	0.032
2 周全血 EBV-DNA（拷贝/mL）	5.04×10^5	5.356	0.616 ~ 16.574	0.128
4 周全血 EBV-DNA（拷贝/mL）	5.09×10^5	0.583	0.075 ~ 4.535	0.606

注：EBV：EB 病毒　EBV：Epstein－Barr virus

3　讨论

EBV-HLH 是感染相关继发性 HLH 中最常见的类型，但发生机制仍不明确。有研究认为，EBV 通过感染 $CD8^+$ T 淋巴细胞或 NK 细胞，导致淋巴组织过度激活，而引发细胞因子风暴[13-14]。此外，EBV-HLH 在亚洲国家的发病率相对较高，提示了 EBV-HLH 的潜在遗传背景。

目前，EBV-HLH 的治疗主要采用 HLH-94 或 HLH-04 一线化疗方案。Imashuku 等[15]报道 HLH-94 方案使 EBV-HLH 患者 43 个月生存率提高至 75.6%。然而，仍有约 30% 的 EBV-HLH 患者化疗无效，这类患儿往往于化疗后几周内病情迅速爆发而死亡。因此，早期识别预后不良的患者，及时进行挽救治疗是改善预后的必要条件。

血液中 EBV-DNA 载量常被作为一种微创标志物，用于筛查或评估一系列 EBV 相关恶性肿瘤的治疗反应[16-19]，但不同血液成分来源的 EBV-DNA 载量，如血浆游离 DNA 或外周血单个核细胞（PBMCs）DNA，其对临床的指导意义仍存在争议[20]。PBMCs 中 EBV-DNA 也常在未诊断 EBV 感染或病情缓解的患者中检测到，因此越来越多的数据表明血浆游离 EBV-DNA 作为 EBV 相关疾病的标志物优于 PBMCs 中 EBV-DNA[20]。许多实验室也开展了全血 EBV-DNA 定量检测，其主要缺点是无法区别在 PBMCs 和血浆中 EBV-DNA 水平。目前，血浆游离 EBV-DNA 已被公认为未分化鼻咽癌的肿瘤标志物，在其诊断、分期、评估治疗反应和预后方面均具有重要价值[17,21]。

尽管人们对血液 EBV-DNA 作为肿瘤标志物越来越感兴趣，但很少有研究探讨其在 EBV-HLH 患者中的意义，特别是治疗期间其动态变化水平对预后的影响。基于以上背景，本研究分析患儿治疗过程中血浆及全血 EBV-DNA 动态水平在儿童 EBV-HLH 中的预后意义。与既往研究[8]一致，本研究未发现初诊时的血浆及全血 EBV-DNA 与预后之间的联系。治疗后 2 周及 4 周血浆 EBV-DNA 阳性（≥500 拷贝/mL）、或全血 EBV-DNA 载量 >（5.04 ~ 5.09）$\times 10^5$ 拷贝/mL，是影响患者预后及无进展生存的重要因素（P < 0.001）。然而，在多因素 *Cox* 回归分析中，全血 EBV-DNA 的预后价值低于血浆 EBV-DNA，且 4 周时血浆 EBV-DNA 是一个独立预后因素。此外，初诊时中枢神经系统受累也是重要的预后危险因素（风险比率 = 6.455，P = 0.042）。综上，根据本研究，初诊时中枢神经系统受累及治疗 4 周血浆 EBV-DNA 水平，可作为儿童 EBV-HLH 个性化治疗的分层标志物，从而更好地指导早期治疗，提高患儿生存。由于样本量较小、随访时间较短，本研究尚存一些不足之处，未来还需更大样本、多中心的研究进一步验证本研究结

论。

此外,与其他研究[8-9,22-23]不同的是,本研究提示,诊断时大多数临床和实验室特征,包括严重的转氨酶血症、凝血异常、高胆红素血症、高铁蛋白血症或低清蛋白血症,与不良预后无明确相关性。事实上,HLH 是一种异质性疾病,其触发因素多种多样,从基因异常到各种感染,症状轻重不一,临床病程也参差不齐。不同研究纳入的患者情况不同,其预后影响因素可能存在显著差异。此外,不同年龄分布和治疗方案也可能是潜在的影响因素。事实上,其他研究之间也有很多差异。因此,作者认为单一的临床和实验室参数可能不足以准确评估治疗反应和预后。多个因素的联合分析,特别是对一些因素的动态监测可能对预后评估具有更好的效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 魏昂,李志刚,王天有. 噬血细胞综合征发病机制及治疗研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2019,34(3):227-230. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2019.03.018.
Wei A, Li ZG, Wang TY. Research progress of pathogenesis and treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2019, 34(3): 227-230. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2019.03.018.

[2] Jordan MB, Allen CE, Greenberg J, et al. Challenges in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis: recommendations from the North American Consortium for Histiocytosis (NACHO)[J]. Pediatr Blood Cancer, 2019, 66(11): e27929. DOI: 10.1002/pbc.27929.

[3] 文凤云,肖莉,廖美玲,等. EB 病毒相关噬血细胞淋巴组织细胞增生症中枢神经系统受累的临床特点及预后分析[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(6):453-457. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2018.06.014.
Wen FY, Xiao L, Liao ML, et al. Clinical features and prognosis of central nervous system involvement in patients with Epstein-Barr virus associated hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2018, 33(6): 453-457. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2018.06.014.

[4] Marsh RA. Epstein-Barr virus and hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Front Immunol, 2018, 8: 1902. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01902.

[5] Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: pathogenesis and treatment[J]. Front Pediatr, 2016, 4: 47. DOI: 10.3389/fped.2016.00047.

[6] Bergsten E, Horne A, Aricó M, et al. Confirmed efficacy of etoposide and dexamethasone in HLH treatment: long-term results of the cooperative HLH-2004 study[J]. Blood, 2017, 130(25): 2728-2738. DOI: 10.1182/blood-2017-06-788349.

[7] Trottestam H, Horne A, Aricò M, et al. Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: long-term results of the HLH-94 treatment protocol[J]. Blood, 2011, 118(17): 4577-4584. DOI: 10.1182/blood-2011-06-356261.

[8] Kogawa K, Sato H, Asano T, et al. Prognostic Factors of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: report of the Japan Histiocytosis Study Group[J]. Pediatr Blood Cancer, 2014, 61(7): 1257-1262. DOI: 10.1002/pbc.24980.

[9] Koh KN, Im HJ, Chung NG, et al. Clinical features, genetics, and outcome of pediatric patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis in Korea: report of a nationwide survey from Korea Histiocytosis Working Party[J]. Eur J Haematol, 2015, 94(1): 51-59. DOI: 10.1111/ejh.12399.

[10] Henter JI, Horne A, Aricó M, et al. HLH-2004: diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Pediatr Blood Cancer, 2007, 48(2): 124-131. DOI: 10.1002/pbc.21039.

[11] 中华医学会儿科学分会感染学组,全国儿童 EB 病毒感染协作组. 儿童主要非肿瘤性 EB 病毒感染相关疾病的诊断和治疗原则建议[J]. 中华儿科杂志,2016,54(8):563-568. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.08.002.
Subspecialty Group of Infectious Diseases, the Society of Pediatrics, Chinese Medical Association; National Group of Epstein-Barr Virus Associated Diseases in Children. Principle suggestions for diagnosis and treatment of main nontumorous Epstein-Barr virus-associated diseases in children[J]. Chin J Pediatr, 2016, 54(8): 563-568. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.08.002.

[12] Wang Y, Huang W, Hu L, et al. Multicenter study of combination DEP regimen as a salvage therapy for adult refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Blood, 2015, 126(19): 2186-2192. DOI: 10.1182/blood-2015-05-644914.

[13] Kim WY, Montes-Mojarro IA, Fend F, et al. Epstein-Barr virus-associated T and NK-cell lymphoproliferative diseases[J]. Front Pediatr, 2019, 7: 71. DOI: 10.3389/fped.2019.00071.

[14] Kasahara Y, Yachie A. Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 44(3): 283-294. DOI: 10.1016/S1040-8428(02)00119-1.

[15] Imashuku S, Teramura T, Tauchi H, et al. Longitudinal follow-up of patients with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Haematologica, 2004, 89(2): 183-188.

[16] Welch JJG, Schwartz CL, Higman M, et al. Epstein-Barr virus DNA in serum as an early prognostic marker in children and adolescents with Hodgkin lymphoma[J]. Blood Adv, 2017, 1(11): 681-684. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016002618.

[17] Chan KCA, Woo JKS, King A, et al. Analysis of plasma Epstein-Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer[J]. N Engl J Med, 2017, 377(6): 513-522. DOI: 10.1056/NEJMoa1701717.

[18] Park JH, Yoon DH, Kim S, et al. Pretreatment whole blood Epstein-Barr virus-DNA is a significant prognostic marker in patients with Hodgkin lymphoma[J]. Ann Hematol, 2016, 95(5): 801-808. DOI: 10.1007/s00277-016-2610-5.

[19] Tsai DE, Luskin MR, Kremer BE, et al. A pilot trial of quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction in patients undergoing treatment for their malignancy: potential use of Epstein-Barr virus polymerase chain reaction in multiple cancer types[J]. Leuk Lymphoma, 2015, 56(5): 1530-1532. DOI: 10.3109/10428194.2014.963577.

[20] Kanakry JA, Hegde AM, Durand CM, et al. The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases[J]. Blood, 2016, 127(16): 2007-2017. DOI: 10.1182/blood-2015-09-672030.

[21] Fung SY, Lam JW, Chan KC. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin Clin Oncol, 2016, 5(2): 18. DOI: 10.21037/cco.2016.03.07.

[22] Luo ZB, Chen YY, Xu XJ, et al. Prognostic factors of early death in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Cytokine, 2017, 97: 80-85. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.03.013.

[23] Oguz MM, Sahin G, Acoglu EA, et al. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in pediatric patients: a single center experience and factors that influenced patient prognosis[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2019, 36(1): 1-16. DOI: 10.1080/08880018.2019.1572253.

(收稿日期:2019-06-14)
(本文编辑:申玉美)