

家系基因筛查及免疫学指标在原发性噬血细胞综合征诊断中的意义

张嘉 王漪旒 王晶石 吴林 魏娜 付丽 高卓 陈建行 裴瑞君 王昭

【摘要】 目的 探讨家系基因筛查及快速免疫学指标检测在原发性噬血细胞综合征(HLH)诊断中的意义。方法 通过对伴有PRF1、UNC13D及SH2D1A基因突变的4例原发性HLH患者展开家系调查,分别完成基因筛查及各项免疫学指标检测(包括NK细胞活性、CD107a检测及HLH相关缺陷蛋白表达测定),评价各项检测指标在原发性HLH诊断中的意义并探讨各项指标间的相关性。结果 4个家系基因突变分别为PRF1基因错义突变c.T172C(p.S58P)和非框架移码突变c.1083_1094del(p.361_365del);PRF1基因错义突变c.C1349T(p.T450M)和框架移码突变c.1090_1091delCT(p.T364fsX93);UNC13D基因错义突变c.G2588A(p.G863D);SH2D1A基因半合子错义突变c.32T>G(p.I11S)。先证者及家系成员分别存在不同程度的NK细胞活性降低,其中PRF1基因及SH2D1A基因突变家系HLH相关基因编码穿孔素蛋白、信号淋巴细胞活化分子相关蛋白(SAP)表达水平下降,UNC13D基因突变先证者及与其存在完全相同突变位点的家系成员细胞毒脱颗粒功能(CD107a表达)显著减低。结论 开展家系基因筛查及快速免疫学指标检测对诊断原发性HLH具有重要意义,两者具有较好的一致性,其中快速免疫学指标检测作为一种高效的检测手段,可为原发性HLH的早期诊断提供可靠依据。

【关键词】 系谱; 基因检测; 免疫学指标; 原发性淋巴组织细胞增多症,嗜血细胞性; 诊断

基金项目:北京市自然科学基金(7132087);国家自然科学基金青年科学基金(81401627);首都医学发展基金(首发2014-4-2025);北京市科委首都特色项目(Z151100004015172);北京市科委首都市民健康项目培育(Z131100006813041);北京市优秀人才资助项目(2013D003034000017);友谊医院科研启动基金(yyqdk2015-9)

The significance of pedigree genetic screening and rapid immunological parameters in the diagnosis of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis Zhang Jia, Wang Yini, Wang Jingshi, Wu Lin, Wei Na, Fu Li, Gao Zhuo, Chen Jianhang, Pei Ruijun, Wang Zhao. Department of Hematology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China
Corresponding author: Wang Zhao, Email: zhaowww263@yahoo.com

【Abstract】 Objective To investigate the significance of pedigree genetic screening and rapid immunological parameters in the diagnosis of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). **Methods** Four cases of primary HLH patients with PRF1, UNC13D and SH2D1A gene mutations were conducted pedigree investigation, including family genetic screening and detections of immunological parameters (NK cell activity, CD107a degranulation and expression of HLH related defective protein), to evaluate the significance of these different indicators in the diagnosis of primary HLH and explore their correlations. **Results** The DNA mutations of the four families included missense mutation c.T172C (p.S58P) and non-frameshift deletions c.1083_1094del (p.361_365del), missense mutation c.C1349T (p.T450M) and frameshift mutation c.1090_1091delCT (p.T364fsX93) in PRF1 gene, missense mutation c.G2588A (p.G863D) in UNC13D gene and hemizygous mutation c.32T>G (p.I11S) in SH2D1A gene. The patients and their family members presented decreased NK cell activities. Individuals who carried mutations of PRF1 gene and SH2D1A gene showed low expression of perforin (PRF1) and signaling lymphocytic activation molecule associated protein (SAP). And the patient with UNC13D gene mutation and his family member with identical mutation showed significant reducing cytotoxic degranulation

function (expression of CD107a). **Conclusion** Pedigree genetic screening and rapid detection of immunological parameters might play an important role in the diagnosis of primary HLH, and both of them had good consistency. As an efficient detection means, the rapid immunological detection indicators would provide reliable basis for the early diagnosis of the primary HLH.

【Key words】 Pedigree; Genetic testing; Immunological parameters; Primary lymphohistiocytosis, hemophagocytic; Diagnosis

Fund program: Beijing Natural Science Foundation (7132087); National Natural Science Foundation of Youth Project (81401627); Capital Medical Development Foundation (2014-4-2025); Beijing Municipal Science and Technology Plan of Capital Characteristics Project (Z151100004015172); Beijing Municipal Science and Technology Plan of Health Cultivation Project for Capital Citizens (Z131100006813041); Beijing Talents Funded Project (2013D003034000017); Rising Star Program of Beijing Friendship Hospital (yyqdk2015-9)

噬血细胞综合征又称噬血细胞性淋巴组织细胞增多症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH), 是一种进展迅速、高病死率的血液系统危重疾病, 分为原发性和继发性两类, 不同类型的HLH治疗策略和转归存在差异。原发性HLH是目前治疗手段和疗效较为确切的一种类型, 患者一旦得到正确诊断并采取及时有效的治疗措施, 其生存和预后可以得到明显的提高和改善。因此, 原发性HLH的早期诊断尤为重要。目前临床上对原发性HLH的诊断和鉴别诊断方面仍存在着困惑, 如何早期快速甄别原发性HLH仍有待系统性研究。我们通过对4例经我院诊治的原发性HLH患者的家系调查来进一步探讨和评价基因测序和快速免疫学指标检测在原发性HLH诊断中的意义。

病例与方法

一、仪器及试剂来源

流式细胞仪FACS Calibur为美国BD公司产品, CytoFLEX为美国Beckman Coulter公司产品, Guava EasyCyte™为德国Merck Millipore公司产品; HiSeq 2000测序仪为美国Illumina公司产品; 人全血DNA提取试剂盒(MagaZorb® DNA Kit)为美国Promega公司产品; Annexin V-PE/7AAD凋亡检测试剂盒为美国eBioscience公司产品; 抗体CD8-APC、CD56-PC5.5为美国Beckman Coulter公司产品, 抗体CD107a-PE、CD3-FITC、CD8-PerCP、CD56-APC及穿孔素、颗粒酶B、信号淋巴细胞活化分子相关蛋白(SAP)抗体均为美国eBioscience公司产品; 人外周血淋巴细胞分离液为美国Sigma公司产品; RP-MI 1640培养基、胎牛血清为美国HyClone公司产品。

二、家系调查

原发性HLH患者/监护人及其家系成员签署知

情同意书, 取外周静脉血分别进行基因测序、NK细胞杀伤活性检测、脱颗粒功能CD107a检测及受累基因产物蛋白表达检测。

1. 原发性HLH相关基因筛查:

(1) Sanger测序: 取原发性HLH患者及其家系成员外周静脉血, 提取单个核细胞中的DNA, 通过设计特异性引物并采用PCR扩增得到与HLH相关目的基因的外显子及相关剪切位点产物, 并进行Sanger Biotech双向测序。测序结果经DNASTAR软件、在线BLAST与NCBI标准序列对比, 鉴定突变位点及类型。

(2) 二代测序: 采用Agilent的液相芯片捕获系统, 对原发性HLH患者及其家系成员DNA样本的特定目标区域DNA进行高效富集, HiSeq 2000测序仪测序, 对获得的原始序列全面进行生物信息分析。通过dbSNP数据库及千人基因组数据库滤过进行单核苷酸多态性/插入缺失(SNP/InDel)筛选及数据分析。

应用SIFT及Polyphen2软件对检测SNP位点进行氨基酸功能影响保守性预测, SIFT预测值越小越“有害”, 表明该SNP导致蛋白结构或功能改变的可能性大, D: Deleterious (SIFT \leq 0.05), T: Tolerated (SIFT $>$ 0.05); PolyPhen2预测值越大越“有害”, D: Probably damaging (PolyPhen 2 HDIV \geq 0.957), P: Possibly damaging (0.453 \leq PolyPhen 2 HDIV \leq 0.956), B: Benign (PolyPhen 2 HDIV \leq 0.452)。并应用GenoPro软件绘制家系图谱。

2. 免疫学指标检测:

(1) 病毒转染荧光细胞联合流式细胞术检测NK细胞活性: 提取原发性HLH患者和携带相同缺陷基因的家系成员的外周血单个核细胞, 通过慢病毒转染技术构建稳定表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的K562细胞作为靶细胞(EGFP-K562), 按

照特定效/靶细胞比共孵育,采用流式细胞术检测 Annexin V-PE 和 7AAD 标记的靶细胞,通过测定靶细胞的凋亡比例,从而计算NK 细胞杀伤活性(检测技术国家发明专利号:ZL 201410005008.7)。

(2)脱颗粒功能检测:提取原发性 HLH 患者及携带相同缺陷基因家系成员的外周血单个核细胞并计数,按照不同效/靶细胞混合比例,分别加入特定靶细胞及抗体进行刺激共孵育,同时将未加靶细胞刺激组作为对照。待孵育完成,加入 CD3-FITC、CD8-APC、CD56-PC5.5、CD107a-PE 抗体进行流式细胞术检测,用刺激前后囊泡膜蛋白标志物 CD107a 阳性细胞的变化幅度来评价细胞毒细胞脱颗粒功能。

(3)流式细胞术测定受累基因相关蛋白表达水平:提取原发性 HLH 患者和携带相同缺陷基因的家系成员的外周血单个核细胞,采用 CD3-FITC、CD8-PerCP、CD56-APC 抗体标记后进行细胞固定及破膜,进而分别采用穿孔素、颗粒酶 B、SAP 抗体进行标记,利用流式细胞术测定细胞内功能蛋白表达水平。

结 果

1. PRF1 突变家系 1:先证者,男,11 岁,PRF1 基因存在复杂杂合突变,分别为错义突变 c.T172C (p.S58P)和非框架移码突变 c.1083_1094del (p.361_365del) (表 1、图 1A),上述突变位点目前均未在 dbSNP 数据库中收录。其中错义突变 c.T172C (p.S58P)位点 SIFT 预测值为 0.1 (T),提示该突变为可容忍的;PolyPhen2 预测值为 0.669 (P),提示该突变可能会对蛋白功能造成影响。家系调查经 Sanger

测序证实两个突变位点均分别来源于父母双方,先证者两位胞姊各自携带不同突变位点(表 2),家族史中先证者另有两位已故胞姊均在幼年死于不明原因发热。经检测家系成员均存在不同程度 NK 细胞活性降低及穿孔素蛋白表达水平下降(表 2),家系成员颗粒酶 B 表达均正常。

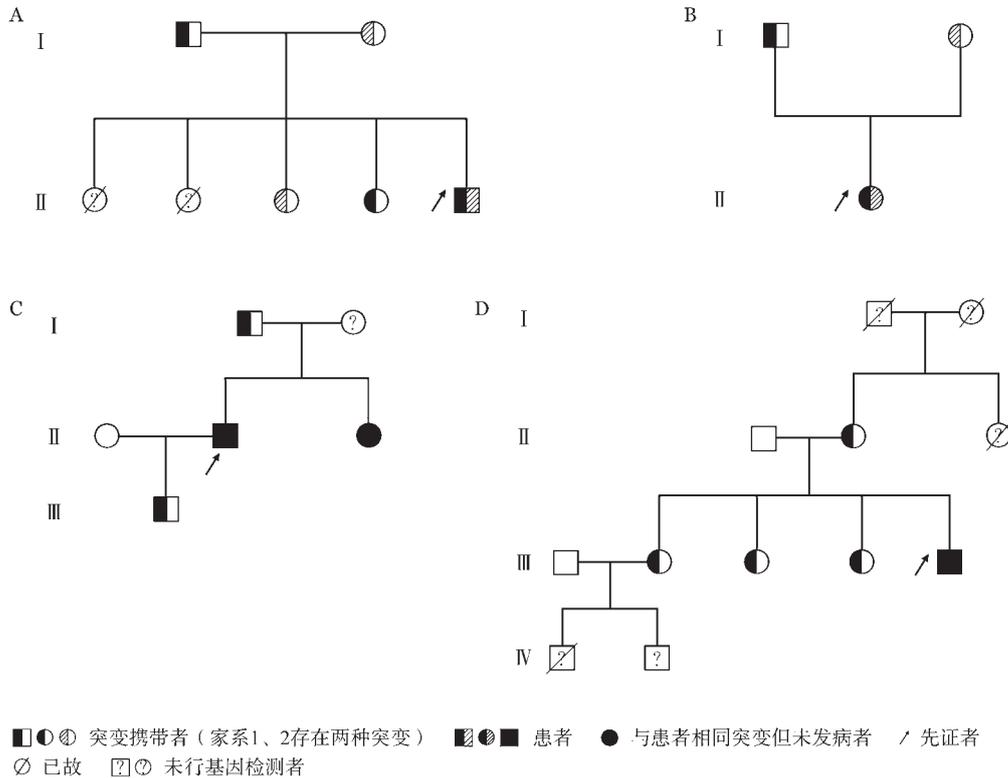
2. PRF1 突变家系 2:先证者,女,2 岁,PRF1 基因存在复杂杂合突变,分别为错义突变 c.C1349T (p.T450M)和框架移码突变 c.1090_1091delCT (p.T364fsX93) (表 1,图 1B),其中突变位点 c.C1349T (p.T450M)在 dbSNP 数据库中已有收录, ID 号 rs189650890, SIFT 预测值为 0.01 (D), PolyPhen2 预测值为 0.982 (D),均提示该突变可能影响蛋白功能,为有害突变,并可检索到与 HLH 致病相关文献报道^[1-2]。家系调查经 Sanger 测序证实上述两个突变位点均分别来源于父母双方,先证者及其父母均存在不同程度 NK 细胞活性降低及穿孔素蛋白表达量下降(表 2)。

3. UNC13D 突变家系:先证者,男,52 岁, UNC13D 基因存在纯合错义突变 c.G2588A (p.G863D) (表 1、图 1C),该突变位点在 dbSNP 数据库中已有收录, ID 号 rs140184929, SIFT 预测值为 0.02 (D), PolyPhen2 预测值为 1.000 (D),均提示该突变可能影响蛋白功能,为有害突变。家系调查经 Sanger 测序证实,先证者父亲及儿子均为杂合突变(母亲未能完成家系调查,推测先证者纯合突变分别来源于杂合突变的父母双方),先证者胞姊存在与其完全相同的纯合错义突变但未发病。经检测先证者及胞姊细胞毒脱颗粒功能(CD107a 表达)均存在明显减低(表 3)。检测先证者 EB 病毒 DNA 定

表 1 4 例原发性噬血细胞综合征患者基因突变

例号	基因名称	突变位置	ID 号	氨基酸改变	突变类型	SIFT 预测值	PolyPhen2 预测值
1	PRF1	Exon2		c.T172C (p.S58P)	错义突变	0.10	0.669
	PRF1	Exon3		c.1083_1094del (p.361_365del)	非框架移码突变		
2	PRF1	Exon3	rs189650890	c.C1349T (p.T450M)	错义突变	0.01	0.982
	PRF1	Exon3		c.1090_1091delCT (p.T364fsX93)	框架移码突变		
3	UNC13D	Exon27	rs140184929	c.G2588A (p.G863D)	错义突变	0.02	1.000
4	SH2D1A	Exon1		c.T32G (p.I11S)	错义突变	0	0.992

注:SIFT:Sorting Intolerant From Tolerant



A:家系1 (PRF1 突变);B:家系2 (PRF1 突变);C:家系3 (UNC13D 突变);D:家系4 (SH2D1A 突变)

图1 4例原发性噬血细胞综合征患者家系图谱

表2 两个 PRF1 突变家系相关指标检测结果

家系	突变1 错义突变	突变2 移码突变	CTL-穿孔素蛋白 (%)	NK-穿孔素蛋白 (%)	NK 细胞活性 (%)
家系1					
正常对照1	-	-	31.07	82.45	15.78
正常对照2	-	-	31.61	80.33	17.35
先证者	c.T172C	c.1083_1094del	6.66	6.93	10.74
父亲	c.T172C	-	9.75	54.32	12.29
母亲	-	c.1083_1094del	15.31	55.60	12.58
大姐	-	c.1083_1094del	26.29	57.96	13.78
二姐	c.T172C	-	17.50	68.04	12.41
家系2					
正常对照	-	-	34.35	82.13	16.54
先证者	c.C1349T	c.1090_1091delCT	0.16	0.31	9.90
父亲	c.C1349T	-	17.91	86.16	13.03
母亲	-	c.1090_1091delCT	31.82	43.87	10.28

注:NK 细胞活性正常参考值为 15.11%~26.91%

量为 2.1×10^4 拷贝/ml,而其胞姊为阴性。

4. SH2D1A 突变家系:先证者,男,32岁,X-连锁淋巴增殖综合征1型(XLP-1),SH2D1A 基因半合子突变,c.32T>G (p.I11S) (表1、图1D),该位点目前尚未被 dbSNP 数据库收录,SIFT 预测值为 0 (D),

PolyPhen2 预测值为 0.992 (D),均提示该突变可能影响蛋白功能,为有害突变。检测先证者 EB 病毒 DNA 定量为 8.8×10^4 拷贝/ml。家系调查经 Sanger 测序证实,先证者突变位点来源于母亲,其3位胞姊均发现携带相同致病位点,另对家系成员进行相关病

史采集发现,先证者外祖父30多岁去世,具体死因不详;先证者外甥(其大姐儿子,1岁)与其同期发病,症状相似,入院1周内死亡。SH2D1A基因编码相关蛋白检测提示,先证者SAP蛋白表达水平显著降低(图2)。

表3 流式细胞术检测UNC13D突变家系CD107a表达及NK细胞活性

家系成员	NK-CD107a(%)		ΔCD107a	NK细胞活性(%)
	刺激前	刺激后		
正常对照	0.56	20.37	19.81	19.42
先证者	0.68	7.83	7.15	13.50
父亲	0.59	12.40	11.81	15.03
胞姊	0.30	1.41	1.11	13.23
儿子	0.23	18.50	18.27	16.28

注:ΔCD107a=刺激后-刺激前。ΔCD107a>10%:脱颗粒功能正常;ΔCD107a 5%~10%:脱颗粒功能异常;ΔCD107a≤5%:脱颗粒功能缺陷。NK活性正常参考值为15.11%~26.91%

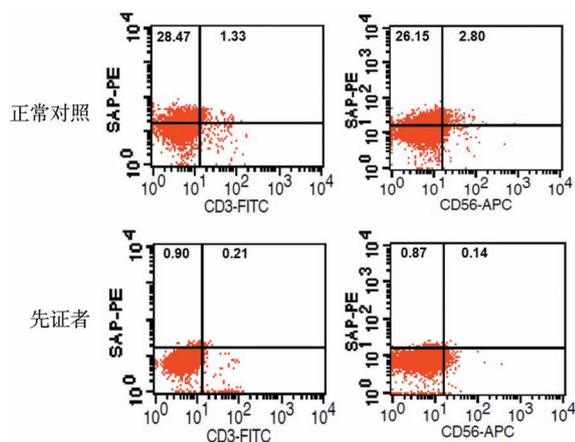


图2 流式细胞术检测SH2D1A突变家系先证者SAP蛋白表达水平

讨论

原发性HLH是一种常染色体和(或)性染色体隐性遗传病,其发病基础是由基因缺陷引起的NK细胞和CTL功能减低或缺如所导致的过度免疫激活^[3],是一种进展迅速、危及生命的严重疾病。但原发性HLH的治疗手段目前较为确切,大宗临床研究显示一旦获得确诊,尽早行异基因造血干细胞移植是唯一有望治愈的手段。因此早期诊断并了解潜在的基因缺陷对治疗非常重要,关系到患者的长期生存及预后。

原发性HLH包括家族性HLH、免疫缺陷综合征以及EB病毒驱动型HLH^[4],发病率约为2/10万,2岁以内发病者占90%以上^[5]。临床以持续性发热、肝脾肿大、全血细胞减少以及骨髓、肝、脾、淋巴结组织发现噬血现象为主要特征。最初诊断原发性

HLH要求患者年幼发病,并有阳性家族史作为支持依据。直至20世纪末,巴黎的研究组发现了首个原发性HLH相关基因图谱^[6],这开创了HLH诊断研究的新纪元。国际组织细胞协会据此制定了HLH-2004诊断指南,明确指出基因缺陷是原发性HLH的确诊金标准。在随后的研究中发现,基因序列的改变也可在成人HLH患者中出现,北美、欧洲均有关于成人原发性HLH的报道和基因型研究^[7-8],我国最大样本的成人原发性HLH研究发表于2014年^[9]。日本Nagafuji等^[10]曾报道1例62岁男性原发性HLH患者。随着成人原发性HLH被陆续报道和逐渐被认识,年龄已不再作为其诊断依据。本文UNC13D突变患者确诊时已52岁,其胞姊(56岁)存在完全相同的纯合错义突变但未发病,患者EB病毒检测结果为阳性,而其胞姊为阴性,提示原发性HLH的发病除自身固有的免疫缺陷外可能还与触发因素有关。

现已知的原发性HLH相关基因至少有12种,包括PRF1、UNC13D、STX11、STXBP2、LYST、RAB27A、ADTB3A、SH2D1A、BIRC4、ITK、CD27、MAGT1^[4]。有学者也习惯将一些原发性免疫缺陷病归于HLH^[11]。对于疑似HLH的患者可通过基因测序完善目前已知的HLH缺陷基因筛查从而进行鉴别,检测方法包括传统的双脱氧DNA链合成终止法进行PCR产物直接测序,以及高通量DNA测序技术。目前HLH相关候选基因的发现仍是冰山一角,而二代测序技术的应用无疑对鉴定和拓展新的致病基因突变较传统的Sanger测序凸显绝对优势。但由于基因测序所需花费的时间相对较长,以及相对昂贵的费用,而HLH病情进展迅猛,临床治疗时机不可延误,因此正确筛选需要进行基因检测的患者对合理分配医疗资源、在提高诊断水平的同时节省医疗费用具有重要意义。

近来,流式细胞术被用来作为鉴定原发性HLH的筛选方法^[12]。细胞内着色可以用来检测穿孔素、颗粒酶B、SAP[X-连锁淋巴增殖综合征(XLP-1)]和XIAP(XLP-2)等,从而反映基因突变对蛋白表达量的影响。另有报道称,检测血小板Munc13-4蛋白表达有望成为快速筛查FHL-3的新手段^[13],目前正在等待大样本检测结果。此外,NK细胞活性降低或缺如是HLH-2004诊断标准中重要的一项,反映了机体的免疫缺陷状态。Janka等^[5]发现原发性HLH患者在疾病早期NK细胞活性几乎均降低,因此及时检测NK细胞活性对早期诊断极为重要。转染荧

光细胞联合流式细胞术测定NK细胞活性是本研究团队主持研发的新技术^[14]。与颗粒胞吐损害(FHL-3-5、GS-2、CHS-1和HPS-II)有关的基因缺陷导致了溶酶体相关膜糖蛋白CD107a转移到细胞表面的功能受损。欧洲协作组对494例患者进行了评估, NK细胞脱颗粒分析可以清楚地区分存在颗粒胞吐功能缺陷的患者和获得性HLH或者其他遗传性缺陷患者^[15]。CD107a检测作为一种高效灵敏的鉴别原发性HLH的手段,未来有望被修订纳入HLH最新诊断标准当中。免疫学检测指标的时效性明显优于基因检测,国际上关于HLH诊断流程的研究将其作为快速筛查原发性HLH的有效手段^[15-16]。但免疫学检测不能完全替代基因检测,一旦上述免疫学指标提示HLH患者存在遗传基础,分子鉴定需进一步进行,包括父母及同胞。

从本文4例基因突变患者家系调查来看,原发性HLH患者及无症状基因突变携带成员分别存在不同程度的NK细胞活性降低,其中PRF1基因及SH2D1A基因突变家系相关基因编码穿孔素、SAP蛋白表达量下降,UNC13D基因突变患者及与其存在完全相同突变位点的家系成员CD107a表达显著减低,体现了免疫学指标与遗传学检测的较好一致性。另有Spessott等^[17]研究证实即使基因筛查为单个位点的杂合错义突变也可能导致蛋白功能异常从而确诊为原发性HLH,因此,基因检测也同时需要免疫学功能检测加以确证。此外,突变预测软件SIFT及Polyphen2可在一定程度上对突变位点的致病性给予较好的提示,但不可过分依赖。本文PRF1突变家系1中错义突变c.T172C(p.S58P)位点SIFT预测值为0.1,提示该突变为可容忍,但家系调查中携带该突变位点的患者父亲及二姐均存在NK细胞活性减低及穿孔素蛋白表达水平下降。

综上,临床实践中应将免疫学检测和遗传学检测密切结合起来,提高原发性HLH诊断的时效性及准确性,并合理分配医疗资源。

参考文献

- [1] Ueda I, Kurokawa Y, Koike K, et al. Late-onset cases of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with missense perforin gene mutations [J]. *Am J Hematol*, 2007, 82(6):427-432. doi: 10.1002/ajh.20878.
- [2] Zhang K, Jordan MB, Marsh RA, et al. Hypomorphic mutations in PRF1, MUNC13-4, and STXBP2 are associated with adult-onset familial HLH [J]. *Blood*, 2011, 118(22):5794-5798. doi: 10.1182/blood-2011-07-370148.
- [3] Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, et al. Perforin is a critical physiologic regulator of T-cell activation [J]. *Blood*, 2011, 118(3): 618-626. doi: 10.1182/blood-2010-12-324533.
- [4] Chandrakasan S, Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in pathophysiology, diagnosis, and treatment [J]. *J Pediatr*, 2013, 163(5): 1253-1259. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.06.053.
- [5] Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Eur J Pediatr*, 2007, 166(2): 95-109. doi: 10.1007/s00431-006-0258-1.
- [6] Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le DF, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1957-1959.
- [7] Zhang K, Jordan MB, Marsh RA, et al. Hypomorphic mutations in PRF1, MUNC13-4, and STXBP2 are associated with adult-onset familial HLH [J]. *Blood*, 2011, 118(22): 5794-5798. doi: 10.1182/blood-2011-07-370148.
- [8] 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. doi: 10.1371/journal.pone.0044649.
- [9] Wang Y, Wang Z, Zhang J, et al. Genetic features of late onset primary hemophagocytic lymphohistiocytosis in adolescence or adulthood [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107386. doi: 10.1371/journal.pone.0107386.
- [10] Nagafuji K, Nonami A, Kumano T, et al. Perforin gene mutations in adult-onset hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Haematologica*, 2007, 92(7): 978-981.
- [11] Faitelson Y, Grunebaum E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and primary immune deficiency disorders [J]. *Clin Immunol*, 2014, 155(1): 118-125. doi: 10.1016/j.clim.2014.09.008.
- [12] Lehmborg K, Ehl S. Diagnostic evaluation of patients with suspected haemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(3): 275-287. doi: 10.1111/bjh.12138.
- [13] Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, et al. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein [J]. *Blood*, 2011, 118(5): 1225-1230. doi: 10.1182/blood-2011-01-329540.
- [14] 张嘉, 王晶石, 王旖旎, 等. 一种新型稳定的流式细胞术检测NK细胞活性的方法 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2015, 24(8): 464-466, 470. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-9921.2015.08.005.
- [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. doi: 10.1182/blood-2011-08-374199.
- [16] Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, et al. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Blood*, 2011, 118(15): 4041-4052. doi: 10.1182/blood-2011-03-278127.
- [17] 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. doi: 10.1182/blood-2014-11-610816.

(收稿日期:2016-02-24)

(本文编辑:王叶青)