

噬血细胞性淋巴组织细胞增生症患儿及其家系穿孔素和颗粒酶B的表达

周晓姮 罗建明 宾琼 黄小花

【摘要】 目的 了解穿孔素1(PRF1)基因突变型的噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(HLH)患儿穿孔素和颗粒酶B的表达水平,初步探讨PRF1基因突变与患儿免疫细胞功能和临床表现的关系。方法 将8例(例1~8)治疗后HLH患儿、5例(例1~5)患儿的父母及同胞纳入研究,以30名门诊体检正常健康儿童作为正常对照;采用PCR法分段扩增PRF1、Unc13D、STX11、STXBP2、RAB27A、LYST、SH2D1A、BIRC4基因并直接测序;通过ExPASy网站在线分析系统进行PRF1蛋白构象生物信息学分析;采用流式细胞术检测细胞毒T淋巴细胞(CD8⁺T细胞)和NK细胞穿孔素和颗粒酶B的表达。结果 ①8例患儿中有3例存在PRF1外显子编码区杂合错义突变:例1为复合杂合错义突变R4C和R33H,其父、兄也存在相同突变;例2为杂合错义突变V50L,其母、弟也存在相同突变;例3为杂合错义突变R489W,其父不存在R489W,其母未参与检测,推测其突变来自母亲。例1、2、3可明确诊断为家族性HLH第2亚型(FHL2)。②例1及其父、兄以及例2及其母、弟的外周血CD8⁺T细胞穿孔素阳性率(0~1.48%)和NK细胞的穿孔素阳性率(8.69%~32.10%)较正常对照组明显减少,但两组间颗粒酶B表达未见明显差异。结论 R4C和R33H复合杂合突变以及V50L杂合突变均可导致CD8⁺T淋巴细胞和NK细胞穿孔素表达减少,为FHL的致病突变。

【关键词】 淋巴组织细胞增多症,嗜血细胞性; 基因,PRF1; 天然; 穿孔素; 颗粒酶类
基金项目:国家自然科学基金(30860308、81160070)

Expression of perforin and granzyme B in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis Zhou Xiaoheng, Luo Jianming, Bin Qiong, Huang Xiaohua. Department of Pediatrics, Guangxi Medical University First Affiliated Hospital, Nanning 530021, China

Corresponding author: Luo Jianming, Email: jmluo@aliyun.com

【Abstract】 Objective To analyze the correlation between genetic variants of PRF1 and expression level of perforin and granzyme B protein, and further determine the relationship between PRF1 gene variants and cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL2). **Methods** Eight children of FHL2 (P1-P8) after treatment, as well as parents and siblings of P1-P5 were included, and thirty healthy children came for physical examination were designated as controls. PRF1, Unc13D, STX11, STXBP2, RAB27A, LYST, SH2D1A, BIRC4 exons were amplified by PCR and followed by direct sequencing. Bioinformatics analysis of mutant PRF1 was performed by ExPASy online system. Perforin and granzyme B expression on cytotoxic lymphocyte was detected by flow cytometry. **Results** ① Three of eight FHL2 children harbored heterozygous missense of PRF1 exons: P1 had compound heterozygous missense mutations (R4C and R33H) and P2 had heterozygous mutations (V50L), P3 had heterozygous mutations (R489W), which confirmed the diagnosis of FHL2. The father (F1) and younger brother (B1) of P1 also had compound heterozygous missense mutation (R4C/R33H), the mother (M2) and younger brother (B2) of P2 had V50L mutation, the father (F3) of P3 had no R489W mutation and the mother of P3 did not participate in this research, so mutation of R4C/R33H of P1 inherited from paternal line, and V50L mutation of P2 came from maternal line, R489W mutation of P3 came from maternal line. ② Comparing to control group, perforin expression of CD8⁺T cells and natural killer (NK) cells of P1, F1, B1, P2, M2 and B2 decreased

significantly, but there was no significant difference between two groups in terms of granzyme B expression.

Conclusions R4C/R33H compound heterozygous mutation and V50L heterozygous mutation all cause lower expression of perforin on CTL/NK cells, and may be causative mutations for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis.

【Key words】 Lymphohistiocytosis, hemophagocytic; Gene, PRF1; Porforin; Granzymes

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30860308, 81160070)

噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH), 也称噬血细胞综合征(hemophagocytic syndromes, HPS)。目前认为HLH主要的发病机制是由于细胞毒T淋巴细胞(CTL)/NK细胞功能低下,不能及时有效地清除病毒或其他抗原而持续刺激和活化免疫细胞,导致淋巴细胞和组织细胞增殖并大量释放多种细胞因子(即细胞因子风暴),引起多器官高炎症反应和组织损伤^[1-3]。HLH按病因可分为原发和继发,其中原发性HLH包括家族性HLH(FHL)和免疫缺陷综合征相关性HLH;继发性HLH常继发于病毒、原虫、真菌、细菌、自身免疫性疾病、恶性肿瘤等。

目前国际上统一将FHL分为5种亚型,对FHL1型的研究尚未明确相关的致病基因,其余4型相关基因分别为穿孔素1(PRF1)、UNC13D、STX11和STXBP2基因,都与CTL/NK细胞“PRF/颗粒酶(Grz)-细胞死亡途径”中蛋白的表达密切相关^[4-6]。在本研究中我们对携带PRF1基因突变型的HLH患儿及其家系进行CTL/NK细胞PRF和GrzB表达水平检测,旨在初步探讨PRF1基因突变与患儿免疫细胞功能和临床表现的关系。

病例与方法

1. 研究对象:病例为2008年2月至2015年10月在我院诊治的8例HLH患儿,男6例,女2例,中位年龄6岁9个月(3岁~9岁10个月),诊断依据为国际组织细胞病协会修订的《HLH-2004诊断及治疗指南》标准^[7]。5例患儿(例1~5)的父母和同胞也纳入研究。以30名来自门诊体检的正常健康儿童为对照,中位年龄7(6~10)岁,男女各15名。研究获得监护人知情同意。

2. 基因组DNA制备:取被研究者外周静脉血3~4 ml, EDTA抗凝。采用血液基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司产品]提取DNA,严格按试剂盒说明书进行操作。

3. PCR扩增及DNA测序:对相关的8个致病基因(PRF1、Unc13D、STX11、STXBP2、RAB27A、

LYST、SH2D1A、BIRC4)进行扩增,将获得的PCR扩增产物送上海生工生物工程技术有限公司进行测序(ABI 3730 DNA测序仪,美国ABI公司产品),测序结果通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)基因库BLAST软件进行在线比对寻找突变位点。若发现有突变位点,则在NCBI多态性数据库中查询是否为已报道的基因多态性位点。

4. 流式细胞术检测PRF和GrzB表达水平:采集被研究者外周静脉血2 ml,置于EDTA抗凝管中(12 h内处理),采用人外周血淋巴细胞分离液分离单个核细胞(PBMNC),加入以下表面抗体进行染色:anti-CD3-PerCP、anti-CD8-FITC、anti-CD56-APC(CD3⁺CD8⁺CTL细胞、CD3⁻CD56⁺NK细胞)。常规固定、破膜、洗涤后加入PE标记的PRF或GrzB抗体或其相应的同型抗体,室温下避光孵育1 h后洗涤,24 h内上流式细胞仪(美国BD公司FACS CANTO II产品)进行分析。以上所用抗体均为美国BD Biosciences公司产品。以PRF或GrzB阳性细胞率表示PRF或GrzB水平。

5. NK细胞毒性试验:同上分离PBMNC。实验分组:①实验组:每孔加入适量CFSE标记的靶细胞和效应细胞(PBMNC),效靶比约10:1。②靶细胞自然死亡对照组:不加PBMNC只加CFSE标记的靶细胞。③空白对照组:加PBMNC和未标记CFSE的靶细胞,效靶比约10:1。实验在24孔板内进行,每孔加入适量RPMI 1640培养液轻轻混匀,将24孔板放入37℃、5%CO₂培养箱孵育6 h。每组设3个复孔,实验重复3次。反应结束后,将每个孔的细胞悬液分别收集到流式细胞管中,常规洗涤、重悬;除空白对照管外,其余各管均加100 μg/ml碘化丙锭30 μl,避光孵育30 min后上流式细胞仪进行分析。CFSE阳性的为靶细胞,被杀伤的靶细胞表现为CFSE/PI双阳性,检测双阳性细胞占靶细胞的比例可反映NK细胞毒性(即NK细胞活性)。

结 果

1. HLH患儿临床特征:8例患儿中,均存在持续

发热>1周、肝大、血清铁蛋白 $\geq 500 \mu\text{g/L}$;7例脾大和骨髓象中出现噬血现象;6例血清三酰甘油 $\geq 3.0 \text{ mmol/L}$ 、血细胞三系减少和NK细胞活性 $< 6.0\%$;4例纤维蛋白原 $\leq 1.5 \text{ g/L}$;2例血细胞两系减少。例6、8有EB病毒感染,其余无巨细胞病毒、EB病毒等感染。

2. 基因测序:测序发现实验组有3例患儿及其部分家人存在PRF1外显子编码区杂合错义突变,其中3个为杂合错义突变c.10C>T(rs12161733)、c.98G>A(rs531407289)和c.148G>C(rs776299562),2个同义突变c.822C>T(rs885821)和c.900C>T(rs885822),另外发现1个新的突变位点c.1465 A>T(R489W),除c.822C>T(rs885821)和c.900C>T(rs885822)外均导致相应氨基酸改变(图1)。例1及其父、兄存在复合杂合错义突变R4C(rs12161733)和R33H(rs531407289);例2及其母、弟存在杂合错义突变V50L(rs776299562);例3为杂合错义突变R489W(其父不存在R489W,其母未参与检测,推测其突变来自母亲)。结合PRF蛋白理论的功能结构域分析,发现R4C(rs12161733)位于PRF信号肽部位,R489W突变位于C2结构域(图2)。为了排除多态性,用同样的方法对30名正常健康儿童进行等位基因测序分析,未发现上述改变。

3. 流式细胞术检测PRF和GrzB表达水平:例1及其父、兄存在c.10C>T(rs12161733)和c.98G>A(rs531407289)突变,例2及其母、弟存在c.148G>C(rs776299562)突变,上述者外周血CD8⁺T细胞和NK细胞PRF表达水平明显低于正常组参考值范围;例3存在c.1465A>T(R489W)突变,但其PRF表达水平与正常儿童相比未见明显减少(表1)。PRF1有义突变患者及其家人的GrzB表达水平与正常组以及无PRF1突变的患者相比差异无统计学意义(CD8⁺T细胞: $t=13, P>0.05$;NK细胞: $t=11, P>0.05$)。将对照组30名健康儿童GrzB水平进行统计学分析,计算出CD8⁺T细胞表达GrzB的正常参考值范围为15.40%~34.20%,NK细胞表达GrzB的正常参考值范围为74.19%~95.70%。有文献报道1~15岁正常人外周血NK细胞表达GrzB的正常参考值范围为77%~95%^[8]。

讨 论

人类PRF1基因定位于10q21-22,包括3个外显

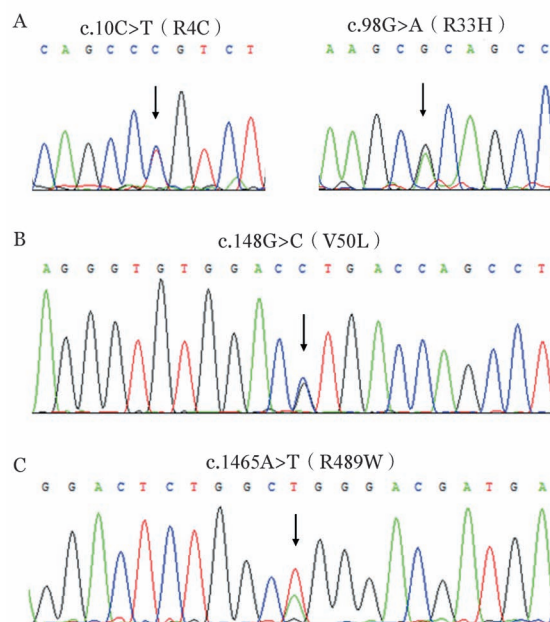
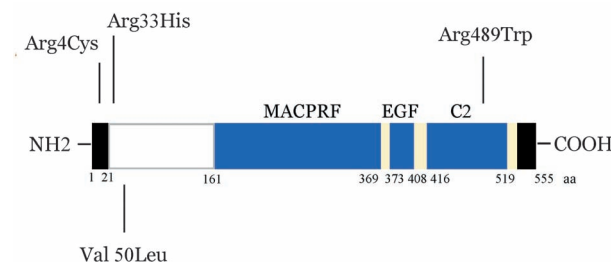


图1 A、B、C分别为例1、2、3的穿孔素1基因第2、3外显子测序结果(箭头所示为突变位点)



MACPRF:膜攻击复合体/穿孔素结构域;EGF:表皮生长因子结构域;C2:蛋白激酶C保守区2

图2 穿孔素1基因外显子编码区杂合错义突变Arg4Cys(rs12161733)、Arg33His(rs531407289)、Val 50Leu(rs776299562)和Arg489Trp突变位点示意图(水平条图表示穿孔素蛋白理论的功能结构域,左端黑色区域为第1~21位氨基酸,代表信号肽,右端黑色区域为C-末端肽)

子和2个内含子,仅第2和第3外显子参与编码蛋白,共编码555个氨基酸^[5,9]。PRF1基因编码PRF蛋白前体,N端的前21个氨基酸是信号肽,作用是引导核糖体合成的蛋白进入粗面内质网腔,随后在信号肽酶的作用下被切除^[8]。PRF蛋白前体包含3个结构域:膜攻击复合体/PRF结构域(MACPRF)、表皮生长因子结构域(EGF)、蛋白激酶C保守区2(C2)^[9-11]。MACPRF约由300个氨基酸组成,位于蛋白序列中间,参与孔隙形成。C2结构域位于416~519位氨基酸,而409~521位氨基酸之间的蛋白质序列与蛋白激酶C的C2结构域具有同源性,该结构域已被证明是钙依赖性结合磷脂的部位^[9-10,12]。

表1 8例噬血细胞综合征患者及部分家系穿孔素1(PRF1)基因突变情况及PRF、颗粒酶B(GrzB)的表达

例号	PRF1 基因突变	氨基酸改变	年龄(岁)	性别	CD8 ⁺ T细胞		NK细胞	
					PRF(%)	GrzB(%)	PRF(%)	GrzB(%)
1	10C>T(rs12161733)	R4C	7	男	0	7.49	26.30	80.20
	98G>A(rs531407289)	R33H						
1(兄)	10C>T(rs12161733)	R4C	10	男	0	30.00	32.10	92.00
	98G>A(rs531407289)	R33H						
1(姐)	无		11	女	5.82	28.50	87.00	83.40
1(父)	10C>T(rs12161733)	R4C	33	男	0	45.60	28.30	91.00
	98G>A(rs531407289)	R33H						
1(母)	无		35	女	3.00	22.30	86.20	86.80
2	148G>C(rs776299562)	V50L	6	男	0	29.00	8.69	84.80
2(弟)	148G>C(rs776299562)	V50L	4	男	0	21.10	15.50	77.70
2(父)	无		26	男	7.50	32.00	88.00	79.10
2(母)	148G>C(rs776299562)	V50L	25	女	1.48	34.60	24.10	88.70
3	1465A>T	R489W ^a	9	男	2.36	11.30	81.30	79.20
3(父)	无		41	男	9.54	44.50	91.40	92.70
4	无		7	男	0	43.70	35.70	75.60
4(父)	无		45	男	2.15	47.50	62.60	85.40
4(母)	无		44	女	3.47	45.40	73.70	88.40
5	无		8	男	2.10	15.10	84.60	73.50
5(父)	无		46	男	3.34	26.40	82.60	87.30
5(母)	无		39	女	7.37	41.00	86.00	82.20
6	无		5	男	2.30	20.60	80.20	90.50
7	无		3	女	6.81	39.50	70.50	64.80
8	无		3	男	12.30	36.90	75.00	64.70
正常值			1~<15		2.00~11.00	20.00~30.00	81.00~91.00	77.00~95.00
			15~50		8.00~28.00	20.00~30.00	86.00~98.00	77.00~95.00

注:a:新发现的突变碱基

1999年Stepp等^[13]首次证实PRF1与FHL2有关。不同PRF1突变类型对CTL/NK细胞功能影响的程度不同,缺失型突变多导致移码突变和截短型PRF的表达,对功能影响较严重,患者多于1~2岁发病;而点突变多影响较轻,且患者发病年龄较晚^[8,14-15]。

FHL发病率占每年新生儿的0.12/10万,亚洲地区发病率为0.342/10万,男女比例为1:1^[16]。目前已报道的PRF1突变约100种,均发生于编码区第2和第3外显子,突变率为18%~50%^[17-20]。最常见的突变位点为c.1122G>A,可导致374位的色氨酸密码子突变成终止密码子,产生1个截短且无功能的PRF蛋白,该突变位点在土耳其HLH患者中发生率更高^[21]。国内曾有研究报道S168N和T450M较为常见,rs885821和rs885822为最常见的SNP位点^[22-24]。目前已有研究者报道了70多种PRF1基因突变类型(如665A>G、50delT、1628insT、160C>T、133G>A、160C>A、116C>A、445G>A等)可导致HLH患者外周血CD8⁺T/NK细胞PRF蛋白表达显

著下降或缺乏^[8,17]。

在本研究中我们发现,例1及其父、兄均存在R4C(rs12161733)和R33H(rs531407289)两个突变位点,结合PRF蛋白理论的功能结构域分析,发现R4C(rs12161733)位于PRF信号肽部位,使该部位的信号肽从原来的碱性氨基末端变成了中间疏水序列(信号肽的主要功能区),从而很可能影响新合成的PRF进入内质网腔,进而阻止蛋白质运送到胞质内。而R33H(rs531407289)位于PRF蛋白催化活性部位,因此该部位的氨基酸改变可能会影响PRF的催化活性。流式细胞术检测发现例1及其父、兄PRF表达缺乏或显著下降,表明R4C(rs12161733)和(或)R33H(rs531407289)突变明显影响PRF蛋白的生成。例2及其母、弟存在V50L(rs776299562)突变,三者CD8⁺T/NK细胞PRF蛋白表达水平较正常人明显降低,表明V50L(rs776299562)突变可导致PRF蛋白生成减少。国外曾有文献报道V50M突变的HLH患者NK细胞仅少量表达PRF蛋白^[18]。例1和例2均发热大于1周,体温高于39℃,伴咳

嗽,未合并其他疾病,EB病毒和巨细胞病毒阴性,可推测患儿受外界感染刺激后,体内免疫细胞被激活,而由于两例患儿PRF1基因存在突变,导致CD8⁺T/NK细胞表达PRF蛋白减少,稳定性下降,受损的PRF蛋白不能顺利的在靶细胞膜上形成孔道,导致GrzB不能进入靶细胞诱导靶细胞凋亡和渗透性溶解,从而引起淋巴细胞和组织细胞大量增殖,分泌大量细胞因子,导致发病。

例3存在的R489W突变位于C2结构域,但其CD8⁺T细胞和NK细胞可正常表达PRF,表明此突变不影响PRF的合成和表达,可能影响PRF的功能。该患儿除了诊断为HLH,还合并有真菌性肺炎和少量胸腔积液,但EB病毒、巨细胞病毒及细菌检测阴性,考虑为真菌感染诱发患儿发病。

例4无PRF1有义突变,而其NK细胞PRF表达水平轻微下降。流式细胞术检测却发现其CD8⁺T细胞不表达PRF,NK细胞仅少量表达PRF,与文献[8,17,25]报道PRF1有义突变的HLH患者PRF表达下降或缺乏相反,其原因仍不清楚,可能是调控基因转录的序列出现异常或者是翻译过程出现异常。

例7和例8的NK细胞表达PRF和GrzB轻度下降,可能与正在接受化疗,免疫细胞受到抑制有关。其余患儿及其家人无论是否有PRF1突变GrzB表达均正常或接近正常。与Brose等^[12]报道的PRF1有义突变患者治疗后CD8⁺T/NK细胞GrzB表达高于正常水平不一致。也有文献报道,HLH患者治疗前NK细胞GrzB表达增高,治疗后表达下降至正常^[26]。

除少数HLH病例外,FHL2患者发病时临床表现的轻重程度与基因突变类型(错义、无义及移码突变)无关^[13,18-19,27]。在本研究中我们发现有无PRF1突变对患儿发病时临床表现的轻重程度无影响。国内外研究结果显示越来越多的PRF1基因突变类型与FHL患者发病有关^[13,28-29],部分患者单纯化疗后可缓解,有些患者则病情反复,单纯化疗后不能缓解,最后死于多器官功能衰竭及感染,这类患者应尽早行造血干细胞移植^[30]。

我们对PRF1基因R4C(rs12161733)突变曾有报道^[31],R33H(rs531407289)、V50L(rs776299562)和R489W在国内外文献均未见报道。HLH因起病急骤、病情凶险、易误诊为病毒感染或恶性肿瘤,而导致治疗无效,病死率高。因此探寻并完善HLH发病的遗传学背景与免疫细胞和临床表现的相关性,

对避免误诊、漏诊及选择正确的治疗方案至关重要。

参考文献

- [1] Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Annu Rev Med*, 2012, 63: 233-246. doi: 10.1146/annurev-med-041610-134208.
- [2] Risma K, Jordan MB. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: updates and evolving concepts[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2012, 24(1): 9-15. doi: 10.1097/MOP.0b013e32834ec9e1.
- [3] Tang YM, Xu XJ. Advances in hemophagocytic lymphohistiocytosis: pathogenesis, early diagnosis/differential diagnosis, and treatment[J]. *Scientific WorldJournal*, 2011, 11: 697-708. doi: 10.1100/tsw.2011.62.
- [4] Janka GE. Hemophagocytic syndromes[J]. *Blood Rev*, 2007, 21(5): 245-253.
- [5] Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, et al. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A[J]. *Hum Mutat*, 2006, 27(1): 62-68.
- [6] Davis JE, Sutton VR, Browne KA, et al. Purification of natural killer cell cytotoxic granules for assaying target cell apoptosis[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 276(1-2): 59-68.
- [7] 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.
- [8] Molleran Lee S, Villanueva J, Sumegi J, et al. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *J Med Genet*, 2004, 41(2): 137-144.
- [9] Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, et al. Structure and function of human perforin[J]. *Nature*, 1988. 335(6189): 448-451.
- [10] An O, Gursoy A, Gurgey A, et al. Structural and functional analysis of perforin mutations in association with clinical data of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2 (FHL2) patients[J]. *Protein Sci*, 2013, 22(6): 823-839. doi: 10.1002/pro.2265.
- [11] Uellner R, Zvelebil MJ, Hopkins J, et al. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain[J]. *EMBO J*, 1997, 16(24): 7287-7296.
- [12] Brose N, Hofmann K, Hata Y, et al. Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(42): 25273-25280.
- [13] Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1957-1959.
- [14] Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, et al. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(1): 182-192.
- [15] Imashuku S, Ueda I, Teramura T, et al. Occurrence of haemo-

- phagocytic lymphohistiocytosis at less than 1 year of age: analysis of 96 patients[J]. *Eur J Pediatr*, 2005, 164(5): 315-319.
- [16] Gholam C, Grigoriadou S, Gilmour KC, et al. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in the genetic basis, diagnosis and management[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 163(3): 271-283. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04302.x.
- [17] Kogawa K, Lee SM, Villanueva J, et al. Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members[J]. *Blood*, 2002, 99(1): 61-66.
- [18] Göransdotter Ericson K, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S, et al. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(3): 590-597.
- [19] Suga N, Takada H, Nomura A, et al. Perforin defects of primary haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan [J]. *Br J Haematol*, 2002, 116(2): 346-349.
- [20] Cetica V, Pende D, Griffiths GM, et al. Molecular basis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Haematologica*, 2010, 95(4): 538-541. doi: 10.3324/haematol.2009.019562.
- [21] Okur H, Balta G, Akarsu N, et al. Clinical and molecular aspects of Turkish familial hemophagocytic lymphohistiocytosis patients with perforin mutations[J]. *Leuk Res*, 2008, 32(6):972-975.
- [22] 谢淑佩, 徐忠金, 范小菊. 噬血细胞综合征患儿中穿孔素基因突变的研究[J]. *江西医药*, 2013, 48(9): 810-811.
- [23] 刘红星, 童春容, 王卉, 等. 家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症一例病因和遗传学研究[J]. *中华内科杂志*, 2011, 50(2): 132-135. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2011.02.012.
- [24] 孙舒雯, 郭霞, 朱易萍. 一个家族性噬血细胞综合征家系的临床表型和基因突变分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(5): 570-573. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.05.005.
- [25] Mhatre S, Madkaikar M, Desai M, et al. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) patients in India[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2015, 54(3): 250-257. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.11.023.
- [26] Mellor-Heineke S, Villanueva J, Jordan MB, et al. Elevated Granzyme B in Cytotoxic Lymphocytes is a Signature of Immune Activation in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 72. doi: 10.3389/fimmu.2013.00072.
- [27] Feldmann J, Le Deist F, Ouachée-Chardin M, et al. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(4): 965-972.
- [28] Ishii E, Ueda I, Shirakawa R, et al. Genetic subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: correlations with clinical features and cytotoxic T lymphocyte/natural killer cell functions [J]. *Blood*, 2005, 105(9): 3442-3448.
- [29] Lu G, xie Z, Shen K, et al. Mutations in the perforin gene in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(23): 2851-2855.
- [30] 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.
- [31] 黄小花, 罗建明, 宾琼, 等. 穿孔素基因多态性与儿童噬血细胞综合征的相关性研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(7): 677-682.

(收稿日期:2015-10-21)

(本文编辑:刘志红)

·消息·

第五届全国血液肿瘤学术大会暨2016年金陵淋巴瘤论坛征文及会议通知

由中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会主办,中国医学科学院血液学研究所血液病医院、江苏省抗癌协会和江苏省人民医院共同协办的“第五届全国血液肿瘤学术大会暨2016年金陵淋巴瘤论坛”定于2016年5月20日至22日在江苏省南京市召开。会议由江苏省抗癌协会和江苏省人民医院承办。本次论坛采取特邀报告、大会发言和讨论的形式进行,将就血液肿瘤基础研究和临床诊治的进展、热点问题和发展趋势进行广泛交流。

征文内容及要求:有关淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓系肿瘤和淋巴细胞白血病的诊治及其血液肿瘤的基础研究与综合血液病理诊断等。凡未在全国性公开刊物上发表的论文均可投稿。征文要求600字左右摘要1份,按标题、姓名、作者单位、联系方式(通信地址、电话、电子邮箱)、目的、方法、结果、结论撰写,请不要附图表,不接受综述性文章投稿。投稿请采用Word文档格式、中文撰写,Email:zgkxhxyzl@126.com。截稿日期为2016年4月10日。

会议将组织专家对投稿论文进行评审,推选优秀论文进行会议演讲;会议期间将组织专家从演讲者中评选出一等奖1名、二等奖3名、三等奖5名,获奖者将予以奖励。与会者可获得国家级医学继续教育I类学分10分。欢迎踊跃投稿并莅临参会。

会议注册费:1500元/人;学生1000元/人。

联系人及联系方式:徐卫、范磊,电话:025-68302182

中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会