

• 临床探讨 •

急性呼吸道腺病毒感染患儿血清 TNF、IFN- γ 及 IL-17A 水平变化及临床意义

温大科, 陈灏健, 李天宇, 郁志伟 Δ

(江苏省无锡市儿童医院儿内科 214023)

摘要:目的 探讨急性呼吸道腺病毒感染患儿血清中肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素 γ (IFN- γ)及白细胞介素-17A(IL-17A)水平变化及其临床意义。**方法** 选取 2015 年 3 月至 2016 年 3 月到该院就诊的急性呼吸道腺病毒感染患儿 17 例为观察组,另选 17 例健康儿童为对照组,采用流式液相蛋白定量技术检测患儿血清中 TNF、IFN- γ 及 IL-17A 水平变化,分析其临床意义。**结果** 观察组急性期血清中 TNF 水平显著高于对照组($P < 0.05$),恢复期 TNF 水平显著低于急性期($P < 0.05$),与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组急性期血清中 IFN- γ 水平显著低于对照组($P < 0.05$),恢复期 IFN- γ 水平显著高于急性期($P < 0.05$),与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组相比,观察组急性期、恢复期血清中 IL-17A 水平显著降低($P < 0.05$),恢复期 IL-17A 水平显著高于急性期($P < 0.05$)。**结论** 儿童急性呼吸道腺病毒感染会引起血清中 TNF、IFN- γ 及 IL-17A 水平变化,可能与病情发生发展有关。

关键词: 呼吸道; 腺病毒; 肿瘤坏死因子; 干扰素 γ ; 白细胞介素-17A

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 15. 055 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)15-2311-02

儿童的免疫系统发育尚不完善,极易引起急性呼吸道感染。腺病毒(AdV)是一种不含包膜的双链 DNA 病毒,分为 6 个亚群,51 个血清型,多感染 6 月至 3 岁的儿童,是儿童急性呼吸道感染的主要病原之一^[1-2]。AdV 不同的血清型导致多种不同的疾病,如 AdV 血清型 8、56 会导致流行性角结膜炎^[3]。AdV 3 型和 7 型可引起肺炎,其中 AdV 肺炎是儿童肺炎严重的类型,病死率高^[4]。目前关于 AdV 感染的发病机制尚不完全清楚。研究发现,急性呼吸道 AdV 感染与多种炎性细胞因子有关^[5]。本研究旨在通过检测急性呼吸道 AdV 感染患儿血清中肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素 γ (IFN- γ)及白细胞介素-17A(IL-17A)水平的变化,分析探讨其临床意义,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 3 月至 2016 年 3 月到本院就诊的急性呼吸道 AdV 感染患儿 17 例为观察组,所有患儿均表现为发热、咳嗽、气促等临床症状。急性期患儿为未经抗病毒药物、激素等药物治疗;恢复期为经过药物治疗后体征消失或减轻。经间接酶联免疫吸附试验(ELISA)和荧光定量 PCR 检测 AdV 为阳性。患儿中男 10 例,女 7 例;年龄 8 个月至 5 岁,平均(26.5 \pm 6.7)月;支气管炎 9 例,支气管肺炎 8 例。另选 17 例健康儿童为对照组,其中男 11 例,女 6 例;年龄 5 个月至 5 岁,平均(26.8 \pm 6.9)月。两组年龄、性别等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法 采集所有患儿空腹 12 h 外周静脉血,室温静置 30 min,1 200 r/min 离心 5 min,保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。ELISA 法检测 AdV:(1)室温平衡试剂 15 min 左右;(2)向孔中加入血清,设置临界质控孔,阳性对照孔和阴性对照孔,封板;(3)加入酶标物,室温放置 30 min;(4)弃去孔内液体,加入底物,室温放置 15 min;(5)加入终止液后 30 min 内比色。比值=患儿吸光度/临界质控吸光度。根据比值判定结果,比值 $<$ 0.8 为阴性,比值为 0.8~ $<$ 1.1 为可疑阳性,比值 $>$ 1.1 为阳性。荧光定量 PCR 检测咽拭子核酸病毒:采集住院当天的咽拭子标本,抽提标本 DNA,进行荧光定量 PCR 反应,体系如下:PCR 反应液

20 μ L,Taq 酶 0.2 μ L。反应程序如下:94 $^{\circ}$ C,2 min;94 $^{\circ}$ C,15 s;55 $^{\circ}$ C,15 s;72 $^{\circ}$ C,20 s;5 个循环;(不收集荧光)94 $^{\circ}$ C,5 s;55 $^{\circ}$ C,35 s;32 个循环(55 $^{\circ}$ C 时收集荧光)。把报告基因设为 FAM,淬灭基因设为 TAMRA。根据 Ct 值判定结果,Ct 值 \leq 30 为阳性,Ct 值 $>$ 30 为阴性。ELISA 结果和 PCR 结果均为阳性入选观察组。流式液相蛋白定量技术检测患儿血清中 TNF、IFN- γ 及 IL-17A 水平,步骤如下:(1)向检测管中加入稀释好的标准品和待测标本;(2)加入各种因子的捕获微球混合液;(3)加入 PE 检测试剂,室温避光孵育 3 h;(4)用洗涤缓冲液洗涤,1 500 r/min 离心 3 min,弃上清;(5)加入洗涤缓冲液重悬标本;(6)流式细胞仪上样检测。

1.3 统计学处理 使用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与对照组相比,观察组急性期血清中 TNF 水平显著升高($P < 0.05$);观察组恢复期 TNF 水平与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);观察组恢复期 TNF 水平显著低于急性期,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,观察组急性期血清中 IFN- γ 水平显著降低($P < 0.05$),恢复期 IFN- γ 水平与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);与急性期相比,恢复期 IFN- γ 水平显著升高($P < 0.05$)。与对照组相比,观察组急性期、恢复期血清中 IL-17A 水平显著降低($P < 0.05$),恢复期 IL-17A 水平显著高于急性期($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组研究对象 TNF、IFN- γ 及 IL-17A 水平比较(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF	IFN- γ	IL-17A
对照组	17	10.57 \pm 2.34	16.45 \pm 4.96	116.23 \pm 28.64
观察组急性期	17	12.68 \pm 2.56*	9.73 \pm 1.96*	85.79 \pm 21.52*
观察组恢复期	17	10.81 \pm 2.10#	14.32 \pm 3.82#	96.41 \pm 23.85*#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与观察组急性期比较,# $P < 0.05$

Δ 通信作者,E-mail:yu98204@163.com。

3 讨 论

临床上通常采用 ELISA 法检测血清或血浆中的细胞因子,但该方法 1 次只能测量 1 种因子,浪费血清标本。本研究采用流式液相蛋白定量技术检测血清中 TNF、IFN- γ 及 IL-17A 水平,克服了以上缺点,可以 1 次从单个标本中测量多种细胞因子,所需的标本量少,并且具有灵敏度高、重复性好等优点,是一种新的蛋白测量方法^[6]。其工作原理如下:首先用特异性的捕获抗体包被不同荧光强度的微球,形成捕获微球,和待测样本混合,微球上的特异性抗体和样品中的细胞因子特异性结合,然后加入荧光标记的检测抗体,形成三明治夹心复合物,上流式细胞仪检测。

AdV 感染是儿童常见的疾病之一,可发展为严重的 AdV 肺炎,甚至会引起严重的并发症^[7]。机体的免疫反应是影响 AdV 感染疾病发生发展的最重要的因素。机体对 AdV 的免疫包括体液免疫和细胞免疫,体液免疫主要通过分泌抗体,与病毒特异性结合来保护气管、肺部等组织。细胞免疫则直接作用于病毒内部蛋白来发挥抗感染作用,在对抗病毒感染中起主要作用。AdV 感染后,可以活化 T 细胞产生大量细胞因子。人类辅助性 T 细胞中,Th1 型 T 细胞主要分泌 TNF、IFN- γ 等,Th1 细胞分泌 IL-17A、IL-17F 等细胞因子,其中 IL-17A 具有很强的促炎症作用,可以与 Th1、Th2、调节性 T 细胞共同参与机体的免疫防御过程^[8]。研究发现,IL-17A 能增强 TNF 诱导的 IL-6 的表达,从而激活免疫反应^[9-10]。TNF 是一种能使肿瘤出血坏死的细胞因子,对肿瘤细胞和病毒感染细胞有抑制作用和细胞毒性作用,通过激活巨噬细胞、NK 细胞等间接发挥抗病毒作用。IFN- γ 是一种典型的 Th1 型细胞因子,可以抑制或干扰病毒的复制,具有促进组织相容性抗原的表达、诱导 B 细胞产生抗体等作用。IFN- γ 水平降低,可能导致机体清除病毒的能力降低。研究发现^[11],呼吸道病毒感染患儿血清中 IFN- γ 降低,IL-4 升高,提示 Th1 细胞功能受到抑制,IFN- γ 的分泌减少。

呼吸道 AdV 感染可引起免疫系统和多种炎性反应因子发生紊乱^[12]。卢华君等^[13]发现 AdV 感染患儿血清中 IL-2、IL-4、IL-6、TNF、IL-17A 水平显著高于健康儿童,IL-10、IFN- γ 水平显著低于健康儿童。而 AdV 感染患儿外周血中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD16⁺CD56⁺ 水平及 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著低于健康儿童,而 CD19⁺ B 淋巴细胞则明显高于健康儿童。赵明奇等^[14]也发现 AdV 感染患儿急性期血清中的 IL-6、TNF、IL-17A 等细胞因子水平显著高于恢复期和正常儿童。本研究发现类似的结果,与对照组相比,AdV 感染患儿急性期血清中 TNF 水平显著升高,IFN- γ 、IL-17A 水平显著下降。说明 AdV 感染呼吸道后,T 细胞分泌 IFN- γ 、IL-17A 减少,TNF 水平增加。经药物治疗后,TNF 水平下降,IFN- γ 、IL-17A 水平显著升高,逐渐恢复到正常水平。

综上所述,儿童急性呼吸道 AdV 感染会引起血清中 TNF、IFN- γ 及 IL-17A 水平变化,可能与病情发生发展有关。

参考文献

[1] Mangel WF, San MC. Structure, function and dynamics in

adenovirus maturation[J]. *Viruses*, 2014, 6(11): 4536-4570.

- [2] 张学兰,朱宏,邵雪军,等. 2001 年至 2008 年苏州地区儿童急性呼吸道感染中腺病毒感染的流行趋势[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2010, 30(5): 998-1001.
- [3] Adhikary AK, Banik U. Human adenovirus type 8: The major agent of epidemic keratoconjunctivitis(EKC)[J]. *J Clin Virol*, 2014, 61(4): 677-686.
- [4] Rajkumar V, Chiang CS, Low JM, et al. Risk Factors for Severe Adenovirus Infection in Children during an Outbreak in Singapore[J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2015, 44(2): 50-59.
- [5] 贾安奎,刘彦轩,许光霞. 急性腺病毒上呼吸道感染患儿血清白细胞介素-6 和 α 1-酸性糖蛋白的测定[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(4): 732-733.
- [6] 肖平,曾耀英,林蔚. 流式细胞术微球阵列法检测急性白血病患者血清 IL-6、IL-10 和 TNF 水平[J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2008, 29(4): 375-377.
- [7] Bretonniere C, Touzeau C, Guillaume T, et al. Multiple organ failure and disseminated adenoviral infection[J]. *Med Mal Infec*, 2010, 40(5): 296-298.
- [8] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(9): 888-898.
- [9] Henness S, Johnson CK, Ge Q, et al. IL-17A augments TNF-alpha-induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(4): 958-964.
- [10] Ma X, Reynolds SL, Baker BJ, et al. IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes[J]. *J Immunol*, 2010, 184(9): 4898-4906.
- [11] 钟晓方,雷春莲. 儿童非细菌性下呼吸道感染血清 Th 源细胞因子在发病中的作用[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2005, 25(6): 476-477.
- [12] 姜天俊,郭晓东,范荣,等. 人腺病毒 55 型感染肺部病变与外周血淋巴细胞关系研究[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(31): 6073-6075.
- [13] 卢华君,赵忠艳,李云芳,等. 呼吸道腺病毒感染患儿细胞因子及淋巴细胞亚群的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(8): 808-811.
- [14] 赵明奇,连广琬,朱冰,等. 急性呼吸道腺病毒感染患儿血清细胞因子的动态变化[J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(1): 60-62.

(收稿日期:2017-03-15 修回日期:2017-05-23)