

流感患者 TNF- α 和 IL-10 水平以及与病毒载量相关性研究

覃 岭, 代艳超, 孙坚萍, 赵 艳, 孙焕芹, 张永宏

[摘要] 目的 探讨流行性感(流感)患者与健康人群血清中细胞因子水平的差异, 分析 TNF- α 和 IL-10 与流感病毒载量的关系。方法 通过 Luminex 平台多因子检测系统对 40 例健康对照者和 36 例流感患者血清中的细胞因子进行定量分析。通过实时荧光定量 PCR 技术对 36 例流感患者体内流感病毒进行定性及定量分析。结果 36 例流感患者血清中, TNF- α 和 IL-10 水平均显著高于健康对照者, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05); 且 IL-10 水平随流感病毒载量的增多而升高。结论 细胞因子 TNF- α 和 IL-10 水平在流感病程中显著增高, IL-10 水平与流感病毒载量呈正相关关系。

[关键词] IL-10; TNF- α ; 流感病毒载量

[中国图书资料分类号] R511.7; R392.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2019)05-0415-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2019.05.008

Levels of TNF- α and IL-10 and their correlation with influenza virus load in influenza patients

QIN Ling, DAI Yan-chao, SUN Jian-ping, ZHAO Yan, SUN Huan-qin, ZHANG Yong-hong*

Department of Biomedical Information Center, Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Infection Related Disease Biomarker, 100069, China

*Corresponding author, E-mail: 13810108505@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the differences of plasma cytokine levels between influenza patients and healthy population, and analyze the relationship between the levels of TNF- α and IL-10 and influenza virus load. **Methods** The Luminex platform multifactor detection system was used to quantitatively analyze the plasma cytokines in 40 healthy controls and 36 influenza patients. The influenza virus were qualitatively and quantitatively analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Among the 36 influenza patients, the levels of TNF- α and IL-10 were significantly higher than those in healthy controls ($P < 0.05$). IL-10 level increased along with the increase of influenza virus load. **Conclusions** The levels of TNF- α and IL-10 increased significantly in influenza patients, and IL-10 level is positively related to influenza virus load.

[Key words] interleukin-10; tumor necrosis factor- α ; influenza virus load

流行性感(流感)是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病, 在世界范围内暴发和流行, 病死率较高, 给社会和人民生活带来严重影响。流感病毒主要分为甲、乙、丙 3 型, 其中甲型流感病毒常发生变异, 其典型的临床症状为急起高热、全身疼痛、显著乏力和轻度呼吸道症状, 秋、冬季节是高发期, 引起的并发症和死亡现象非常严重。在流感发生发展中, 细胞因子参与机体抗流感病毒免疫应答, 发挥免疫调节作用。研究证实, 流感患者体内细胞因子会发生一定的变化, 但目前关于流感患者体内细胞因子与病毒载量的关系报道甚少^[1-3]。故本研究将着重探讨流感患者体内细胞因子分泌水平与流感病毒载量的关系。

[基金项目] 国家自然科学基金(81320108017); 北京市医院管理局临床医学发展专项(XMLX201411); 北京佑安肝病艾滋病基金资助院内中青年人才孵育项目(YNKT20160030); 北京市科学技术委员会创新基地培育与发展专项(Z171100002217091); 北京市医院管理局“登峰”计划专项(DFL20181701)

[作者单位] 100069, 首都医科大学附属北京佑安医院生物医学信息中心, 传染病相关疾病生物标志物北京市重点实验室(覃岭、代艳超、孙坚萍、孙焕芹、张永宏), 临床检验中心(赵艳)

[通信作者] 张永宏, E-mail: 13810108505@163.com

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2014 年 11 月—2015 年 3 月北京佑安医院急诊科收治的流感患者共 36 例(流感组)作为研究对象, 诊断标准参照《流行性感(流感)诊断与治疗指南(2011 年版)》^[4]及《流行性感(流感)诊疗方案(2018 年版修订版)》^[5]。健康对照者为 2014—2015 年间公开招募的近 6 个月未患流感的健康大学生志愿者, 共 40 例(健康组)。排除标准: ①严重心、脑、肝及肾等器官性疾病者; ②出血性疾病、恶性肿瘤及精神类疾病者。所有入组人员均签署知情同意书。

1.2 标本收集 采集咽拭子标本并置于 3 ml 保存液的专用采集管, -80°C 保存; 血清样本经不含抗凝剂的真空采血管采集, 2200 rpm 离心 7 min 后, 提取, -80°C 保存。

1.3 仪器和试剂 Bio-Plex 细胞因子试剂盒与 Luminex 技术检测仪器购于美国 Bio-Rad 公司; 甲型/乙型流感病毒抗原检测试剂盒(胶体金法)购于北京庄笛浩禾生物医学科技有限公司; RNA 提取试剂盒购于德国 QIAGEN 公司。

1.4 细胞因子检测 按照 Bio-Plex 细胞因子检测试剂盒说明书检测流感组和健康组血清中 TNF- α 和 IL-10 水平。待冻存的血清室温溶解后,按照 1:4 的比例稀释血清样本,备用;准备好室温预热的标准品进行倍比稀释,备用;将含有针对多种细胞因子的微球磁珠与空白对照、标准品及稀释后的血清混合,振荡反应 30 min;用磁力架去除液体,洗涤液 wash buffer 洗 3 min 后,加入检测抗体,混合振荡反应 30 min,再用磁力架去除液体,洗涤液 wash buffer 洗 3 次,加入 1 倍稀释的藻红蛋白标记的链霉亲和素,混合振荡反应 10 min,用 wash buffer 洗涤 3 次。最后加入 125 μ l 的试剂稀释液重悬磁珠,混匀 30 s 后,通过 Luminex 检测仪检测细胞因子浓度。

1.5 流感病毒核酸拷贝数测定 从咽拭子中提取流感病毒 RNA, -80 $^{\circ}$ C 保存,经干冰运输,委托北京市疾病预防控制中心对流感病毒 RNA 拷贝数测定。结果判读如下:在阴阳性对照均成立条件下,CT < 36 为阳性;CT $\geq$ 40 或无数值为阴性;36 $\leq$ CT < 40 重新检测,重复检测结果若 CT < 36 为阳性,否则为阴性。

1.6 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析作图,计数资料采用 χ^2 检验,2 组计量资料采用独立样本 t 检验,相关性分析采用 Pearson 法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料 健康组对照者 40 例(年龄 17 ~ 22 岁,平均 18.9 岁),男 18 例,女 22 例;流感组患者 36 例(年龄 17 ~ 76 岁,平均 43.5 岁),男 16 例,女 20 例。流感组患者年龄显著高于健康组对照者($t=7.341$, $P=0.000$),性别构成比上差异无统计学意义($\chi^2=0.002$, $P=0.961$)。其中流感组患者平均发热天数为 2.45 d,体温最高为 40.2 $^{\circ}$ C,最低为 37.7 $^{\circ}$ C,平均体温为 (38.67 $\pm$ 0.10) $^{\circ}$ C,且均未用药治疗。本研究中流感组患者的血常规检测值均在正常参考值范围内,见表 1。

表 1 流感组患者血常规检查结果

Table 1 Routine blood examination results of influenza group

指标	检测值	正常参考值
白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	7.93 $\pm$ 0.44	3.5 ~ 9.5
中性粒细胞计数 ($\times 10^9/L$)	5.90 $\pm$ 0.46	1.8 ~ 6.3
淋巴细胞计数 ($\times 10^9/L$)	1.32 $\pm$ 0.12	1.1 ~ 3.2
单核细胞计数 ($\times 10^9/L$)	0.64 $\pm$ 0.06	0.1 ~ 0.6
淋巴细胞比值 (%)	19.36 $\pm$ 2.16	20 ~ 50
单核细胞比例 (%)	8.31 $\pm$ 0.57	3 ~ 10
红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$)	4.73 $\pm$ 0.09	3.8 ~ 5.1
血红蛋白浓度 (g/L)	140.10 $\pm$ 4.10	115 ~ 150

2.2 病毒核酸拷贝数测定结果 流感组患者 1 年内均未接种过流感疫苗,经咽拭子检测,均为甲型流感病毒阳性,提示:所感染的流感病毒亚型为甲型流感病毒;经过流感病毒核酸检测和拷贝数测定,流感组患者的流感病毒载量最大为 35 copies/ml,最小为 14 copies/ml,平均为 (33.57 $\pm$ 4.29) copies/ml。

2.3 细胞因子检测结果 流感组患者 TNF- α 和 IL-10 水平分别为 (18.18 $\pm$ 1.53) pg/ml 和 (9.64 $\pm$ 0.88) pg/ml,均显著高于健康组的 (5.03 $\pm$ 0.40) pg/ml 和 (1.78 $\pm$ 0.52) pg/ml, $P=0.000$,见图 1。

2.4 TNF- α 和 IL-10 水平与流感病毒载量相关性分析 流感患者分泌的 TNF- α 水平与病毒载量相关系数 $r=0.200$,无显著相关性;IL-10 水平与病毒载量相关系数 $r=0.677$,呈中等程度正相关,见图 2。

3 讨论

流感是急性呼吸道传染病,其主要特征为传染性强、传播快、潜伏期短、发病率高,易出现暴发流行。虽然流感大多为自限性,但仍有一部分患者易出现肺炎等并发症,甚至发展为重症流感,由于病情的进展较快最终可因呼吸窘迫或多脏器衰竭而死亡。在流感发展过程中,细胞因子发挥免疫调节作用,但其是否与流感病毒载量有相关性尚无定论。

本研究纳入 36 例流感患者和 40 例健康对照者,对其相应指标进行分析,着重探讨细胞因子水平与流感病毒载量的相关性。结果显示,36 例流感患者均处于急性期, TNF- α 和 IL-10 水平均显著高于健康对照者,上述结果与既往文献报道一致^[6-7]。此外, Rogo 等^[8] 和 Martinez-Ocaña 等^[9] 做了更深入的研究发现 TNF- α 和 IL-10 基因多态性对流感病毒有影响。TNF- α 是一种促炎因子,过度表达会导致细胞因子风暴,使细胞因子功能失调,打破免疫平衡,从而加重病情。IL-10 是一种可以监测感染流感病毒后易患肺炎的一个重要指标^[10],与流感患者病情进展有一定的关系^[11],另外 IL-10 还是一种抑制性细胞因子,对免疫应答有抑制作用, Yamamura 等^[12] 发现, IL-10 可能会抑制机体对流感病毒的清除。而本研究也发现, IL-10 水平与流感病毒载量呈正相关 ($r=0.677$),进一步验证了 IL-10 对流感病毒清除作用的抑制性,提示 IL-10 分泌量可能是流感患者体内病毒复制的指标之一。

本研究对 TNF- α 水平与流感病毒载量相关性进行了分析,结果显示 TNF- α 水平与病毒载量无

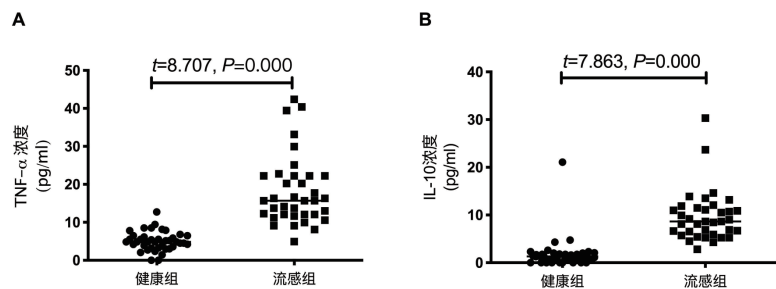


图 1 健康组和流感组 TNF-α 和 IL-10 水平比较
A. 2 组 TNF-α 水平; B. 2 组 IL-10 水平

Figure 1 Comparison of the levels of TNF-α and IL-10 between healthy group and influenza group

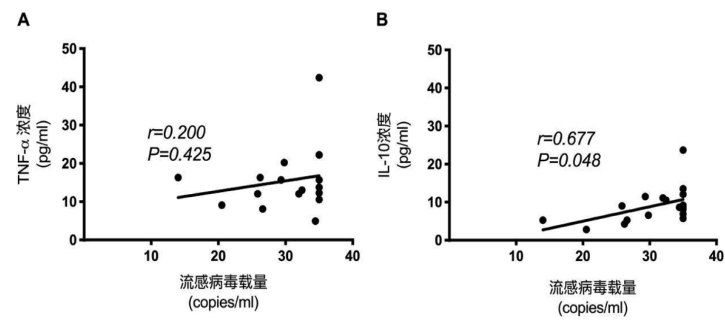


图 2 流感病毒载量与 TNF-α 和 IL-10 水平相关性分析
A. TNF-α 水平与流感病毒载量相关性分析; B. IL-10 水平与流感病毒载量相关性分析

Figure 2 Correlation of influenza virus load with levels of TNF-α and IL-10

显著相关性。TNF-α 是一种促炎因子，过度表达会导致细胞因子风暴，使细胞因子功能失调，打破免疫平衡，从而加重病情。但是与流感病毒载量的相关性目前未见报道。

虽然本研究发现了一些有意义的结果，但是也存在一些问题，例如因样本量较小的原因，无法对 IL-10 和 TNF-α 的水平是否与年龄有关进行深入探讨。有文献报道，TNF-α 在老年人中出现高水平分泌^[13]；IL-10 在青年人和正常老年人中的水平无显著差异，在有感染的老年人中分泌水平显著增高^[14]。而杨蓬勃等^[15]研究发现 IL-10 和 TNF-α 水平在不同年龄组和不同性别人群中差异均无统计学意义。因此，IL-10 和 TNF-α 的水平与年龄的相关性须要进一步增大样本量加以研究证实。

综上所述，在流感患者中高表达的细胞因子主要是 TNF-α 与 IL-10，且 IL-10 水平与流感病毒载量呈中等程度正相关，本研究认为 IL-10 可以作为流感病毒在体内复制的一个潜在的免疫学监测指标。

【参考文献】

[1] Lee N, Wong CK, Chan PK, *et al.* Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among

hospitalized adults [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e26050.
[2] 张永宏, 王大燕, 王爽, 等. Th1/Th2 类细胞因子在新型甲型 H1N1 流感重症患者不同预后转归中作用分析 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2011, 25(4):274-276.
[3] 彭志元, 刘梅, 张泓, 等. 甲型流感患者 IL-1β、IL-6、IFN-γ 和 IL-10 的表达与分析 [J]. *中国医药指南*, 2013, 11(10):477-478.
[4] 卫生部流行性感冒诊断与治疗指南编撰专家组. 流行性感冒诊断与治疗指南 (2011 年版) [J]. *全科医学临床与教育*, 2011, 34(10):725-734.
[5] 国家卫生健康委员会. 流行性感冒诊疗方案 (2018 年版修订版) [J]. *传染病信息*, 2018, 31(6):500-504.
[6] Rothberg MB, Haessler SD. Complications of seasonal and pandemic influenza [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(4 Suppl):S91-S97.
[7] Lee N, Chan PK, Wong CK, *et al.* Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalized for pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus pneumonia [J]. *Antivir Ther*, 2011, 16(2):237-247.
[8] Rogo LD, Rezaei F, Marashi SM, *et al.* Seasonal influenza A/H3N2 virus infection and IL-1β, IL-10, IL-17, and IL-28 polymorphisms in Iranian population [J]. *J Med Virol*, 2016, 88(12):2078-2084.
[9] Martinez-Ocaña J, Olivo-Díaz A, Salazar-Dominguez T, *et al.* Plasma cytokine levels and cytokine gene polymorphisms in Mexican patients during the influenza pandemic A(H1N1)pdm09 [J]. *J Clin Virol*, 2013, 58(1):108-113.
[10] Van der Sluijs KF, Van Elden LJ, Nijhuis M, *et al.* IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection [J]. *J Immunol*, 2004, 172(12):7603-7609.

(下转第 421 页)

本研究的 74 例患者中采用了 6 种治疗方案, 其中 5- 氟胞嘧啶联合氟康唑和两性霉素 B, 5- 氟胞嘧啶联合氟康唑 2 种治疗方案占的比例较大, 分别是 25 例 (33.78%) 和 24 例 (32.43%), 但采用 5- 氟胞嘧啶联合氟康唑治疗患者中有 2 例死亡、1 例未治愈。分析药敏试验结果发现, 1 例死亡患者对 5- 氟胞嘧啶耐药, 对氟康唑中介, 另 1 例死亡患者对 5- 氟胞嘧啶中介, 对氟康唑耐药, 2 例未治愈患者分离的新型隐球菌对 5- 氟胞嘧啶和氟康唑均耐药, 这提示临床治疗该类疾病时一定要结合药敏试验结果选择药物。

总之, 新型隐球菌感染仍是 AIDS 患者发病或死亡的一个重要原因, 其临床表现以头痛、发热为主, 脑脊液压力大部分 $> 200 \text{ mmH}_2\text{O}$, 新型隐球菌对多种抗真菌药物敏感, 临床可以根据患者的疾病进展采用不同治疗方案, 大部分患者转归较好, 但 5- 氟胞嘧啶联合氟康唑治疗的方案中出现 2 例死亡, 1 例未治愈, 提示该治疗方案可能不是临床治疗的首选。

【参考文献】

- [1] 代丽丽, 郭彩萍. HIV/AIDS 患者并发新型隐球菌脑膜炎的诊疗新进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(5):393-395.
- [2] Vu K, Garcia JA, Gelli A, et al. Cryptococcal meningitis and anti-virulence therapeutic strategies [J]. Front Microbiol, 2019, 10:353.
- [3] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组, 中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南 (2018 版) [J]. 传染病信息, 2018, 31(6):481-499.
- [4] Cogliati M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types [J]. Scientifica(Cairo), 2013, 2013:675213.
- [5] 汪习成, 樊移山. AIDS 并发隐球菌脑膜炎的诊断和治疗 [J]. 传染病信息, 2009, 22(6):370-374.
- [6] Chen J, Varma A, Diaz MR, et al. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(5):755-762.
- [7] Desnos-Ollivier M, Patel S, Raoux-Barbot D, et al. Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* speciation [J]. MBio, 2015, 6(3):e00311.
- [8] Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4(7):a019760.
- [9] 王昱俊. 结核性脑膜炎与新型隐球菌型脑膜炎病例鉴别分析 [J]. 中国实用神经病杂志, 2013, 16(5):33-35.
- [10] 薛成莲, 马刺芳. 艾滋病并发新型隐球菌脑膜炎 28 例临床分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(11):1147-1149.
- [11] 王大模, 陈忠伦, 文世全, 等. 新型隐球菌脑膜炎的临床分析 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10(9):92-93.
- [12] Gomes FEES, Arantes TD, Fernandes JAL, et al. Polymorphism in mitochondrial group I introns among *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genotypes and its association with drug susceptibility [J]. Front Microbiol, 2018, 9(86):1-6.
- [13] 《中国真菌学杂志》编辑委员会. 隐球菌感染诊治专家共识 [J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(2):65-68.
- [14] 李晓杰, 王庆亮, 周文营, 等. 新型隐球菌颅内感染的临床特征及治疗转归 [J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(17):2564-2566.
- [15] 伍秋云, 卢祥婢, 黄爱春, 等. AIDS 合并新型隐球菌脑膜炎 2 种治疗方案的疗效比较 [J]. 传染病信息, 2014, 27(1):22-37.

(2019-08-17 收稿 2019-09-16 修回)
(本文编辑 闫晶晶)

(上接第 417 页)

- [11] Yu X, Zhang X, Zhao B, et al. Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6 [J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28680.
- [12] Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis [J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62(1):20-25.
- [13] De Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernández M, et al. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF- α and

IL-6 as possible biomarkers [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(5):733-777.

- [14] Castañeda-Delgado JE, Frausto-Lujan I, González-Curiel I, et al. Differences in cytokine production during aging and its relationship with antimicrobial peptides production [J]. Immunol Invest, 2017, 46(1):48-58.
- [15] 杨蓬勃, 李捷, 李世超, 等. 年龄和烟酒对血浆炎性因子水平的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2013, 32(7):751-753.

(2017-08-18 收稿 2019-01-30 修回)
(本文编辑 揣征然)