

• 论 著 •

流行性感冒发病初期利用流式细胞仪检测相关细胞因子的临床应用价值探讨*

李 娟,赵苗苗,马雪瀛,曲 沛,张 响,郭 杰,周 宇,宋淑静
(首都医科大学附属北京地坛医院检验科,北京 100015)

摘 要:目的 通过观察流感患者发病初期细胞因子水平变化,初步建立以流式多重微球芯片技术为主要方法的临床细胞因子检验方法,并探讨其临床意义。**方法** 选取 54 例甲流病毒核酸阳性和 20 例甲流病毒核酸阴性的流感样患者作为流感发病组,其中甲流病毒核酸阳性患者分为轻症组和重症组,甲流病毒核酸阴性的流感样患者为甲流核酸阴性组;另选取 35 例健康对照人群作为对照组,对所有全血标本的细胞因子进行检测和统计学分析。**结果** 细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-21(IL-21)、白细胞介素-12p70(IL-12p70)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10(IL-10)、趋化因子-10(IP-10)、白细胞介素-2(IL-2)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平在流感患者发病初期明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$); γ -干扰素(IFN- γ)在流感发病组和对对照组中比较,差异无统计学意义($P>0.05$);重症组 IL-6、IP-10 水平比较轻症组、甲流病毒核酸阴性组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** IL-6、IL-21、IL-12p70、IL-1 β 、IL-10、IP-10、IL-2、MCP-1 均可作为发热患者的临床生物学评价指标,其中 IL-6、IP-10 可作为病情进展评估的重要指标。

关键词:甲型流感病毒性感冒; 流式多重微球芯片; 细胞因子; 临床价值
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.24.014 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)24-3396-03

Clinical application value of flow cytometry in detection of related cytokines at the early stage of influenza*

LI Juan, ZHAO Miaomiao, MA Xueying, QU Pei, ZHANG Xiang, GUO Jie, ZHOU Yu, SONG Shujing

(1. Department of Laboratory, Beijing Ditan Hospital affiliated to Capital Medical University, Beijing 100015 China)

Abstract: **Objective** To establish a clinical cytokine test method based on flow multiple microarray technology, and discuss its clinical significance by observing the change of cytokines level in the early stage of influenza. **Methods** 54 cases of influenza A virus positive and 20 cases of influenza A virus negative influenza like patients were selected as influenza group. Among them, influenza A virus positive patients were divided into mild group and severe group, influenza A virus negative influenza like patients were as negative group. In addition, 35 healthy people were selected as the control group, and the cytokine of all the whole blood samples was detected and statistically analyzed. **Results** Interleukin-6 (IL-6), interleukin-21 (IL-21), interleukin-12p70 (IL-12p70), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10), chemokine-10 (IP-10), interleukin-2 (IL-2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels were significantly higher in the patients with early onset of influenza, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The difference of interferon- γ (IFN- γ) between the influenza group and the control group was not statistically significant ($P>0.05$). The levels of IL-6 and IP-10 in the severe group were higher than that of the mild group and the negative group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** IL-6, IL-21, IL-12p70, IL-1 β , IL-10, IP-10, IL-2 and MCP-1 levels can be used as clinical biological evaluation indicators of patients with fever, of which IL-6 and IP-10 can be used as important indicators for disease progression assessment.

Key words: influenza A; multiple bead arrays; cytokines; clinical value

流行性感冒(流感)是世界范围内广泛关注的公共卫生问题,几百年来不仅有世界范围的流感大流行,还有程度各异的地地区小流行,轻则影响患者生活质量,重则导致死亡^[1-2]。流感发病机制与呼吸道病毒感染及肺损伤的免疫应答有关。在人体和动物流感病毒感染模型中,由细胞因子和趋化因子升高引发的细胞因子风暴越来越多地被认为与较差的临床转归和病理损伤有关。也就是说,因流感引起的免疫应答与病程进展有很重要的关系^[3-6]。本研究通过检测多种细胞因子,观察不同病原学感染对发热流感样患者发病初期以及健康人群体内的细胞因子水平的影响,初步建立以流式多重微球芯片技术为主要方法细胞因子检测手段,并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年底至 2016 年春本院收治的发热待查流感样患者为研究对象,其中 54 例甲型流感病毒感染患者为病例组,20 例甲流病毒核酸阴性的其他流感患者为阴性组。将 54 例甲型流感病毒核酸检测阳性患者以是否出现呼吸困难,肺部影像学实性病变和或肝功能出现异常为标准,将其分为 30 例轻症组,24 例重症组,另选取无发热健康人群为对照组共 35 例。各组一般资料差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 BD 公司 Calibur 流式细胞仪,流式多重微球芯片。

1.3 方法 对所有样本进行白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介

* 基金项目:北京新发突发传染病研究重点实验室开放研究课题(DTKF201501)。

作者简介:李娟,女,主管技师,主要从事临床分子免疫学方向研究。

素-21(IL-21)、白细胞介素-12p70(IL-12p70)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10(IL-10)、趋化因子-10(IP-10)、白细胞介素-2(IL-2)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子(IFN- γ)的检测,具体方法为 50 μ L 全血样本加入 50 μ L 微球中孵育 1 h,加 50 μ L 相应抗体,应用 Calibur 流式细胞仪检测,并应用相应软件进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析,不符合正态的数据用中位数(四分位数)表示,采用 Mann-Whitney *U* 检验进行 2 组间比较,3 组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组和所有流感发病组相关指标比较 病例组 IL-6、IL-21、IL-12p70、IL-1 β 、IL-10、IP-10、IL-2、MCP-1 的含量水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组 IFN- γ

含量水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 3 组相关指标比较 三组 IL-21、IL-12p70、IL-1 β 、IL-10、IL-2、MCP-1、IFN- γ 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。3 组 IL-6、IP-10 水平差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 两组相关指标比较

指标	对照组($n=35$)	病例组($n=54$)	<i>Z</i>	<i>P</i>
IL-6	1.10(0.08,2.06)	17.79(6.88,41.99)	-7.523	0.000
IL-21	0.00(0.00,25.39)	23.83(0.00,59.94)	-2.589	0.010
IL-12p70	1.01(0.00,2.62)	2.68(1.48,4.15)	-3.447	0.001
IL-1 β	0.69(0.00,2.45)	1.84(1.15,3.30)	-3.372	0.001
IL-10	0.45(0.00,1.38)	5.52(3.15,9.03)	-7.561	0.000
IP-10	84.39(68.68,134.87)	696.37(423.31,1101.74)	-7.383	0.000
IL-2	0.00(0.00,2.91)	4.26(1.97,8.80)	-5.211	0.000
MCP-1	45.41(30.26,72.51)	88.86(33.27,203.27)	-2.478	0.013
IFN- γ	6.23(2.72,12.52)	8.71(4.05,16.39)	-1.777	0.076

表 2 三组相关指标比较

指标	阴性组($n=20$)	轻症组($n=34$)	重症组($n=20$)	<i>H</i>	<i>P</i>
IL-6	8.08(6.54,24.98)	22.82(14.82,319.58)	23.09(5.09,30.83)	7.372	0.0256
IL-21	43.19(20.92,62.16)	22.96(0.00,47.61)	11.52(0.00,62.67)	2.424	0.298
IL-12p70	4.26(2.35,5.47)	2.61(1.27,3.66)	2.22(1.15,4.02)	3.043	0.218
IL-1 β	2.33(1.44,3.31)	1.84(1.08,2.75)	1.47(1.15,3.71)	0.715	0.699
IL-10	4.33(2.81,6.00)	4.85(2.41,7.09)	7.58(3.94,14.73)	4.621	0.099
IP-10	446.29(340.99,612.70)	796.50(492.35,1105.23)	899.18(533.53,1366.46)	6.856	0.032
IL-2	7.63(5.43,9.51)	3.83(1.46,9.75)	4.01(1.84,5.17)	4.949	0.084
MCP-1	79.08(28.56,123.39)	55.24(20.38,223.26)	103.43(41.23,231.89)	1.488	0.475
IFN- γ	8.30(4.05,13.65)	8.81(3.44,14.13)	9.89(3.52,20.52)	0.359	0.836

3 讨 论

流感病毒侵入人体后的一系列免疫应答所致后果具有双面性:一方面通过体液和细胞免疫效应,控制细胞内病毒复制并中和细胞外病毒;另一面通过大量炎症细胞浸润肺脏、炎性细胞因子高表达,导致严重的病毒性肺炎并激发感染等并发症。细胞因子是免疫应答,免疫调节和炎性反应的重要介质之一,因此开展对流感相关细胞因子的研究,既有助于分析外周血细胞因子表达水平与病毒致病能力的关系,也可能对临床诊断治疗有一定的提示作用,促进对疾病的研究和防治^[7-11]。本研究通过检测 IL-6、IL-21、IL-12p70、IL-1 β 、IL-10、IP-10、IL-2、MCP-1、IFN- γ 九种细胞因子,探讨了其在流感发病初期的水平与正常人群的差异,同时比较了轻症与重症甲流,还有非甲流发热患者的水平差异。在临床甲流感染初期,IL-6、IL-21、IL-12p70、IL-1 β 、IL-10、IP-10、IL-2、MCP-1 均不同程度升高。检测到 IP-10 和 IL-6 明显升高则往往提示病情发展迅速,需要引起重视。未来研究的重点将是着重探讨不同的甲流分型中细胞因子的变化趋势和差异。利用多重流式芯片技术分析流感时血清中细胞因子的变化及其规律,通过研究和验证这些细胞因子的变化规律,不仅有利于评估流感对机体的损伤程度,还有利于预测流感的疾病进程与转归,并筛选出可预测细胞因子风暴的警戒指标及水平。

抑制病毒复制的抗病毒药物存在发生突变的风险而使得治疗无效,调节宿主免疫应答可以避免耐药性的产生。为了使免疫反应既不损害病毒清除又可以避免过度产生细胞因子,在

下一个致命的流感病毒大流行出现前希望有新的免疫疗法可以有效帮助人类治愈流感^[12]。

参考文献

[1] 王坤,李宏,张淑艳,等.急性呼吸道感染病毒性病原种类及主要特征[J].灾害医学与救援(电子版),2016,5(2):120-123.

[2] 杨国松.应用实时荧光定量 PCR 法进行急性呼吸道、传染病病原的筛查分析[J].医学信息,2017,30(0-4):283-284

[3] 中华医学会呼吸病学会,中华医学会儿科学分会.流行性感冒抗病毒药物治疗与预防应用中国专家共识[J].浙江医学,2016,38(5):305-310

[4] 中国医师协会呼吸医师分会.合理应用抗流行性感冒病毒药物治疗流行性感冒专家共识(2016 年)[J].中华内科杂志,2016,55(3):244-248

[5] 许宏涛,李毅,陈东科,等.北京地区成人呼吸道感染病毒流行病学分析[J].检验医学,2016,31(6):499-502

[6] English AI. Epidemiological summary of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus - Ontario, Canada, June 2009 [J]. Releve Epidemiologique Hebdomadaire, 2009, 84(47):485.

[7] Cilloniz C,Shinya K,Peng X,et al. Lethal Influenza Virus Infection in Macaques Is Associated(下转第 3400 页)

增加宫颈细胞发生癌变的风险^[12]。大样本量的研究显示,与传统 HPV-DNA 检测相比,E6/E7 检测能够有效排除 HPV 一过性感染病例,显著降低筛查的假阳性率^[13-14]。

通过 TCT 联合宫颈 E6/E7 检测进行筛查,能够将 TCT 高特异度和宫颈 E6/E7 检测检查高特异度的优点进行整合,从而大大提高了诊断效能^[15-16];而 ROC 曲线也显示,联合诊断的 AUC>0.9,属于较高诊断效能。但由于本研究纳入的病例数较少,且单中心研究易受取样、操作和判读等因素影响,联合筛查还需大样本量、多中心研究进一步验证。

综上所述,宫颈 E6/E7 检测具有较低的特异度,TCT 检查的灵敏度较低;宫颈 E6/E7 检测与 TCT 联合检测具有较高的筛查准确度,并能够提高诊断的灵敏度和特异度。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 宫颈癌及癌前病变规范化诊疗指南(试行)[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版),2013,14(8):40-49.

[2] McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability[J]. Clin Liver Dis, 2015, 19(2): 223-238.

[3] Reid JL, Wright TC, Stoler MH, et al. Human papillomavirus oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening: baseline and longitudinal results from the CLEAR study[J]. Am J Clin Pathol, 2015, 144(3): 473-483.

[4] Sawaya GF, Kulasingam S, Denberg TD, et al. Cervical cancer screening in average-risk women: best practice advice from the clinical guidelines committee of the American college of physicians[J]. Ann Intern Med, 2015, 162(12): 851-859.

[5] 王轶英,王悦,乔友林,等. 中国宫颈癌筛查未来之路—细胞学初筛的弃或守[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 33(3): 324-326.

[6] Liang H, Fu M, Zhou J, et al. Evaluation of 3D-CPA, HR-HPV, and TCT joint detection on cervical disease screening[J]. Oncol Lett, 2016, 12(2): 887-892.

[7] Zhang Q, Xie W, Wang F, et al. Epidemiological investigation and risk factors for cervical lesions: cervical cancer screening among women in rural areas of Henan province China[J]. Med Sci Monit, 2016, 22(76): 1858-1865.

[8] 章文华. 如何提高子宫颈细胞学取样的质量—细胞学取样的要点和难点[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(3): 211-212.

[9] 姚济荣,贺茂林,张京,等. 急性脑卒中吞咽障碍康复护理干预不同介入时间与远期功能改善效果的关系[J]. 中国慢性病预防与控制, 2012, 20(2): 158-160.

[10] Castle PE, Stoler MH, Wright TC, et al. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the Athena study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(9): 880-890.

[11] Zhang L, Yang B, Zhang A, et al. Association between human papillomavirus type 16 E6 and E7 variants with subsequent persistent infection and recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion after conization [J]. J Med Virol, 2016, 88(11): 1982-1988.

[12] Ting J, Smith JS, Myers ER. Cost-Effectiveness of high-risk human papillomavirus testing with messenger RNA versus DNA under United States guidelines for cervical cancer screening[J]. J Low Genit Tract Dis, 2015, 19(4): 333-339.

[13] Castle PE, Cuzick J, Stoler MH, et al. Detection of human papillomavirus 16, 18, and 45 in women with ASC-US cytology and the risk of cervical precancer: results from the CLEAR HPV study[J]. Am J Clin Pathol, 2015, 143(2): 160-167.

[14] Monson J, Hudgens MG, Zerat L, et al. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (the FASE study)[J]. Gynecol Oncol, 2012, 125(1): 175-180.

[15] 张博,张颖,牛力春,等. 液基细胞学联合 HPV mRNA 检测对宫颈癌的诊断价值[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(1): 118-122.

[16] 郑文华,李可瑜,唐璇霓. 薄层液基细胞学联合 HPV 检测在宫颈癌筛查中的应用[J]. 广东医学, 2013, 34(14): 2189-2191.

(收稿日期:2017-07-18 修回日期:2017-09-25)

(上接第 3397 页)

with Early Dysregulation of Inflammatory Related Genes [J]. Plos Pathogens, 2009, 5(10): e1000604.

[8] Brody H. Influenza[J]. Przegląd Epidemiologiczny, 2011, 480(7376): 629-633.

[9] Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family - cytokine, host defense, caspase-1, autoinflammatory, inflammasome[J]. Ann Rev Immun, 2009, 27(1): 519

[10] Nair H, Brooks WA, Katz M, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young

children; a systematic review and meta-analysis. [J]. Lancet, 2011, 378(9807): 1917-1930.

[11] Pang IK, Iwasaki A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus [J]. Trends Immunol, 2011, 32(1): 34-41.

[12] Teijaro JR. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2015, 38(6): 3-22.

(收稿日期:2017-05-24 修回日期:2017-08-13)