

重症登革热临床和实验室特征及其细胞因子的动态变化

廖宝林 张复春 唐漾波 胡凤玉 周伟泽 王建 洪文昕 张霞意

【摘要】 目的 观察重症登革热的临床和实验室特征,检测患者血清中细胞因子的表达,为进一步探讨重症登革热的发病机制提供临床和实验依据。**方法** 回顾性分析重症登革热的临床和实验室特点,采用 ELISA 法检测 32 例重症登革热患者与 23 例非重症登革热患者血清中 IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 及 sTNFR I 的表达水平。**结果** 重症患者的临床表现及实验室指标均与非重症患者有显著差异;除 IL-17A,上述其他细胞因子在重症登革热患者中的表达水平均比非重症患者高。**结论** IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 及 sTNFR I 在重症登革热的发病机制中均起着重要的作用。

【关键词】 登革热病毒;登革热,重症;细胞因子类;白细胞介素 6;干扰素 II 型;肿瘤坏死因子 α

Clinical and laboratory characteristics of severe dengue fever and the dynamic changes of cytokines LIAO Bao-lin, ZHANG Fu-chun, TANG Yang-bo, HU Feng-yu, ZHOU Wei-ze, WANG Jian, HONG Wen-xin, ZHANG Xia-yi. Department of Infectious Diseases, The Eighth People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: ZHANG Fu-chun, Email: zfc8y@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the clinical and laboratory characteristics in patients with severe dengue fever and further discuss of the dynamic changes of cytokines, so as to provide the evidences to pathogenesis of severe dengue fever. **Methods** The characteristics of clinical and laboratory tested retrospectively were analyzed in 32 severe dengue fever patients and 23 mild dengue fever patients, and the levels of IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α and sTNFR I were measured by ELISA in serial serum from these patients. **Results** There were significant differences between patients with severe dengue fever and patients with mild dengue fever in clinical and experiment indexes. Cytokines were higher in severe group than that in mild group statistically,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.02.003

基金项目:广东省自然科学基金(10151006002000001);广州市科技支撑计划(2008Z1-E401);广州市医药卫生科技项目(201102A212020)

作者单位:510060 广州,广州医学院附属市第八人民医院

通讯作者:张复春,Email:zfc8y@yahoo.com.cn

except for IL-17A. **Conclusions** IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α and sTNFR I may play important roles in the pathogenesis of severe dengue.

【Key words】 Dengue virus; Dengue fever, severe; Cytokines; Interleukin-6; Interferon type II; Tumor necrosis factor- α

登革热病毒(dengue virus, DENV)属黄病毒科黄病毒属。DENV 感染所引起的登革热(dengue fever, DF)是世界上最重要的人类虫媒病毒感染性疾病,已经威胁到热带和亚热带 100 多个国家的 25 亿人口,其中重症 DF 造成每年约 22,000 例患者死亡,成为影响发展中国家公共健康的一种重要疾病。DENV 感染的发病机制,特别是重症 DF 的发病机制至今尚未完全阐明,细胞因子在其中的作用成为近几年来研究的热点,而目前国内尚少见有关重症 DF 患者血清细胞因子动态变化的研究报道。因此,本研究观察重症 DF 的临床和实验室特征,检测重症 DF 患者血清中细胞因子的表达,为进一步探讨重症 DF 的发病机制提供临床参考和实验基础。

材料与方法

一、研究对象

DF 诊断标准为患者突发高热、疲乏、骨骼肌肉酸痛、皮疹等症状体征,实验室检查显示白细胞和(或)血小板数减少,血清特异性 IgM 抗体阳性、IgG 抗体滴度升高 4 倍以上、体外分离到 DENV 或 RT-PCR 法检测到 DENV。重症 DF 诊断标准为 DF 确诊病例加上以下至少 1 项:胃肠道出血、血小板数减少(血小板计数 $< 50 \times 10^3/\text{ml}$)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)或天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)升高 5 倍或以上($> 200 \text{ U/L}$)和(或)肌酸激酶(creatine kinase, CK)升高 2 倍或以上($> 348 \text{ U/L}$)^[1]。在 DF 确诊病例中,选取 32 例至少保存有 2 份血清标本的重症 DF 患者(从发热当天至发热后第 17 天)与 23 例非重症 DF 患者的各项指标进行比较。

二、临床及实验室指标

观察患者的临床表现及体征,如头痛、皮疹、瘀斑等。检测患者血清中登革热特异性的 IgM 与 IgG 抗体,试剂盒购自澳大利亚 Panbio Brisbane 公司,操作步骤按说明书进行。每 3 d 进行 1 次血常规检查,每 7 d 进行 1 次肝肾功能检查。

三、重症登革热血清细胞因子的动态变化

血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、IL-17A、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)检测采用法国 Diaclone 公司 ELISA 试剂盒,可溶性肿瘤坏死因子受体 I(soluble tumor necrosis factor receptor I, sTNFR I)检测采用美国 RD Systems 公司的 ELISA 试剂盒,具体操作步骤按说明书进行。根据血清采集时间划分为不同时间段,分别为发病后第 1~3、4~6、7~9 及 10 天以后,不同时间段所采集重症 DF 的血清例数分别为 12、38、28 和 19 例;所采集非重症 DF 患者的血清例数分别为 25、49、23 和 4 例。其中,第 1

~3 天为发病早期,第 4~6 天为中期,第 7 天后为后期。

四、统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行相关统计学分析,其中两组临床特征的差异进行 χ^2 检验,实验室指标及细胞因子表达水平的比较使用两独立样本的非参数检验,变量之间的相关性分析则进行 Pearson 秩相关检验。

结 果

一、登革热患者的临床及实验室检查特征

重症 DF 患者中男性 19 例(59.4%)、女性 13 例(41.6%),平均年龄 38.6 岁。非重症 DF 患者中男性 12 例(52.2%)、女性 11 例(47.8%),平均年龄 36.9 岁,两组间的性别及年龄比较无统计学差异。重症 DF 患者的恶心、瘀斑、腹泻及束臂实验阳性发生率较非重症患者高,其他症状/体征无显著差异。重症 DF 患者中性粒细胞及血小板数较非重症 DF 患者明显下降,而 ALT、AST 及 CK 均较非重症 DF 患者明显升高,其他实验室指标无显著性差异,见表 1~2。

表 1 重症与非重症登革热患者的临床特征 [例(%)]

	疲乏	恶心	呕吐	肌肉痛	关节痛	皮疹	腹泻	牙龈出血	瘀斑	胃肠道出血	束臂实验阳性
重症 DF	20(62.5)	12(37.5)	7(21.9)	23(71.9)	14(43.8)	16(50.0)	6(18.8)	2(6.3)	12(37.5)	3(9.4)	15(46.9)
非重症 DF	10(43.5)	3(13.0)	2(8.7)	16(69.6)	15(65.2)	14(60.9)	0(0)	0(0)	3(8.7)	0(0)	0(0)
P	0.162	0.045	0.277	0.852	0.116	0.425	0.035	0.504	0.045	0.257	0.000

注:以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义

表 2 重症与非重症登革热患者的实验室检查指标 ($\bar{x} \pm s$)

	白细胞计数 ($\times 10^3/\text{ml}$)	中性粒细胞计数 ($\times 10^3/\text{ml}$)	血小板计数 ($\times 10^3/\text{ml}$)	ALT(U/L)	AST(U/L)	CK(U/L)	HCT(%)
重症 DF	2.61 \pm 1.41	1.30 \pm 0.67	65.56 \pm 6.96	102.34 \pm 13.29	163.25 \pm 19.26	399.71 \pm 71.56	36.38 \pm 5.12
非重症 DF	2.91 \pm 0.34	2.01 \pm 0.31	112.62 \pm 8.86	32.48 \pm 4.08	44.52 \pm 3.80	122.61 \pm 15.86	44.20 \pm 37.13
P	0.306	0.034	0.000	0.000	0.000	0.001	0.495

注:以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义

二、登革热患者血清细胞因子的动态变化

重症 DF 患者不同阶段所检测的细胞因子水平比非重症 DF 患者均明显升高。IL-6 水平在发病后第 4~6 天稍下降,其后逐渐升高并于第 10 天达到最高峰,而重症 DF 患者第 7~9 天明显升高,见图 1A。重症 DF 患者 IL-10 水平于第 4~6 天快速达到最高值后又快速下降,发病的中后期其水平均比非重症的高,非重症 DF 患者 IL-10 变化则相对平缓,图 1B。虽然重症 DF 患者的 IL-17A 水平在发病初期较非重症患者高,但整个病程中其水平在两组间无显著差异,图 1C。IFN- γ 水平变化与 IL-10 相似,重症 DF 患者于第 4~6 天明显升高,图 1D。重症 DF 患者 TNF- α 水平于第 7~9 天升至最高值,其中第 4~9 天明显升高,而其在非重症患者中的变化则相对平缓,图 1E。sTNFR1 水平则在发病后逐渐下降,在重症患者于第 4~6 天明显升高,图 1F。

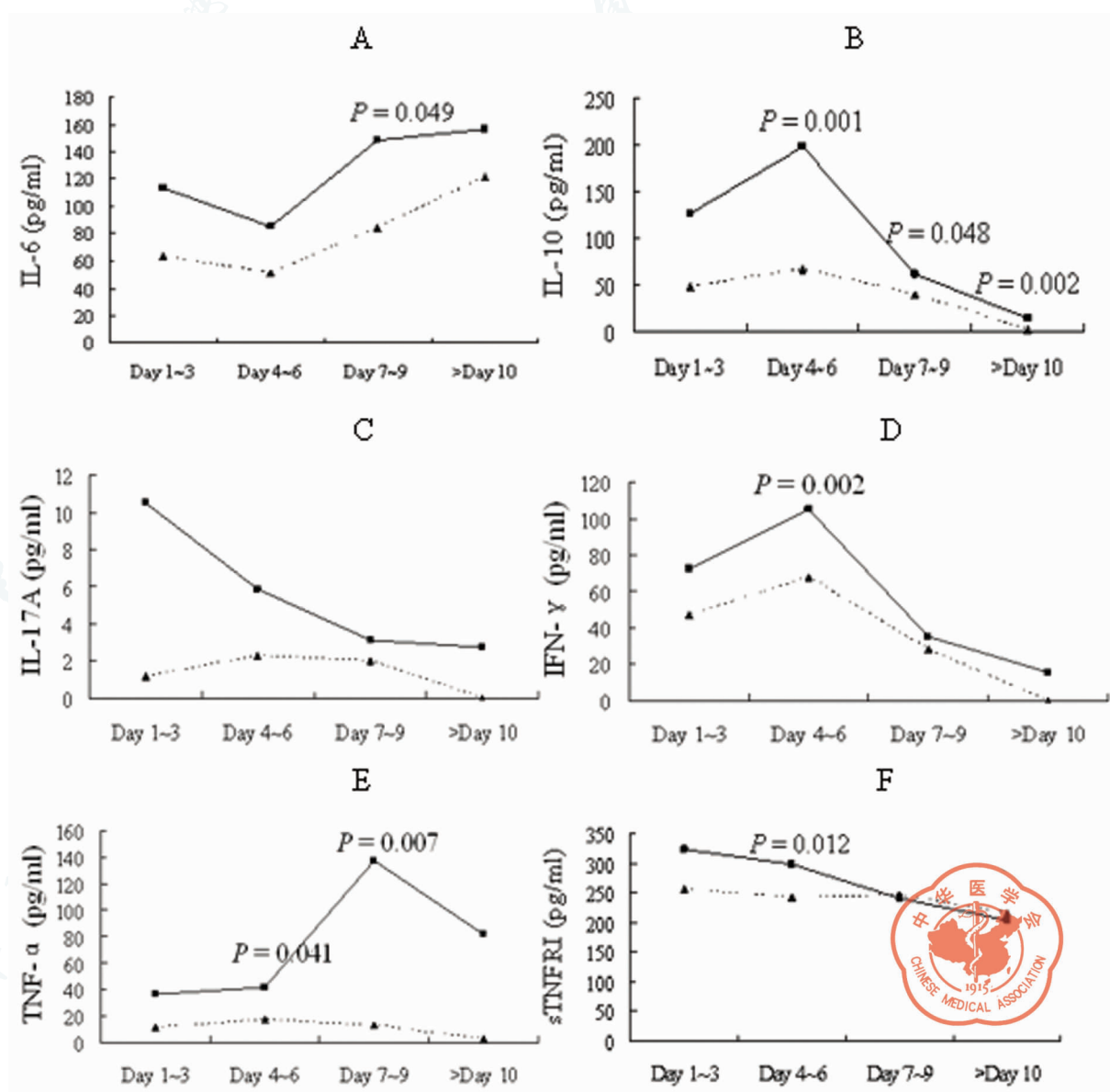


图 1 重症登革热患者血清各种细胞因子的动态变化

讨 论

WHO 曾建议将 DF 分为典型 DF、登革出血热 (dengue haemorrhagic fever, DHF) 和登革休克综合征 (dengue shock syndrome, DSS) 3 种临床类型。近年来,国内外越来越多的医师对以上分类提出质疑,因为若严格按照 WHO 的分类标准会漏诊重症患者^[2]。Gupta 等^[3]研究发现部分患者虽存在 1 种或以上的出血表现,但仍不能诊断为 DHF。本课题组前期研究则发现,我国 2002 至 2006 年 DF 流行期间仅 0.15% (2/1342) 患者符合 DHF 诊断标准,但 4.8% 患者存在消化道出血等重症表现^[5]。其实,出血表现如牙龈出血、瘀斑、胃肠道出血等在 DF 患者中并不

少见,DF 患者还可并发肝炎、心肌炎、脑炎等^[46]。2009 年,WHO 新出版的登革热指南建议更新登革热分类,依据疾病严重程度分为 DF 及重症 DF^[7],该分类方法更适用于临床。

Thomas 等^[8]研究发现,严重的血小板数低下和急性肝炎可区分严重的 DF 患者,而腹泻与重症临床表现的发展显著相关,并应被视为警告信号。虽然本项研究中重症 DF 标准并不严格,但发现重症 DF 患者在临床表现及实验室指标中均与非重症 DF 患者有显著差异。重症 DF 患者出现恶心、腹泻及瘀斑的比例较非重症 DF 明显升高,转氨酶及 CK 水平也明显升高,而中性粒细胞与血小板数则明显下降。这提示 DENV 感染所引起的细胞因子风暴在重症 DF 患者更为剧烈,并且合并肝功能损伤是重症患者的特点之一。

DENV 感染,特别是重症 DF 感染的发病机制一直是研究重点,发病机制包括二次感染、毒力变异、免疫机制和宿主基因背景等学说,但具体机制至今尚未阐明。近年研究发现 T 细胞激活和细胞因子释放在 DENV 感染发病中起重要作用,已证实在 DENV 感染过程中出现多种细胞因子并对 DENV 起着不同的作用。

国外已有关于 DENV 感染后细胞因子水平变化的报道,指出 DHF/DSS 患者或重症 DF 患者的 IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 及 sTNFR I 较普通 DF 患者高^[9-15]。本研究结果显示,重症 DF 患者的以上细胞因子在不同时间段均较非重症 DF 患者高,同时重症 DF 患者的细胞因子变化较为明显,而非重症 DF 则相对平缓。其中,IL-6 与 TNF- α 于发病后期达到峰值,而 IL-10 及 IFN- γ 发病后快速升高并于发病中期达到最高值后快速下降,sTNFR I 水平则随病情进展而缓慢下降。结合重症患者的临床表现及实验室检查,提示重症患者免疫系统激活后所导致的炎症反应较非重症患者剧烈,但其在重症 DF 患者中的具体发病机制尤其是血管内皮损伤机制仍待进一步深入研究。

Fossiez 等^[16]研究发现 IL-17 能够诱导上皮细胞、内皮细胞等分泌 IL-6、IL-8、MCP-1 和 GM-CSF,均参与 DENV 感染的发病机制,故有学者推测 IL-17 在 DENV 感染致病机制中同样起着重要作用^[17],但目前尚无直接关于 Th17、IL-17 与 DF 发病之间关系的报道。本研究首次对重症 DF 患者血清中 IL-17A 水平的研究发现,重症 DF 的 IL-17A 水平在发病早期较非重症明显升高但差异不具有统计学意义,但不排除与样本量较少有关,Th17、IL-17 在重症登革热中的作用值得进一步深入探讨。

Chaturvedi 等^[18]研究发现,DF 患者中以 Th1 型反应为主,而发展到 DHF 则转变为以 Th2 型反应为主,这种转变是由细胞因子 IFN- γ /IL-10、IL-12/TGF- β 的相对水平所调节。通过细胞因子动态变化图可发现,重症 DF 患者 TNF- α 与 IL-6、IFN- γ 与 IL-10 的总体变化趋势相似,这可能是由于重症患者 Th1 型细胞因子升高发挥抗病毒作用时,Th2 型细胞因子相应升高以抑制其作用而维持 DENV 感染。

本研究结果提示肝脏转氨酶明显升高是重症 DF 的特点之一,而 IL-6、IL-10、

IFN- γ 、TNF- α 及 sTNFR I 可能与重症患者的发病机制有关。虽然细胞因子在 DENV 感染发病机制中的相关研究已取得不少成果,但仍然有待于进一步探索。

参 考 文 献

- 1 Tang Y, Kou Z, Tang X, et al. Unique impacts of HBV co-infection on clinical and laboratory findings in a recent dengue outbreak in China. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 79(2):154-158.
- 2 周伟泽, 张复春. 重症登革热的研究进展. *国际内科学杂志*, 2009, 36(12):734-738.
- 3 Gupta P, Khare V, Tripathi S, et al. Assessment of World Health Organization definition of dengue hemorrhagic fever in North India. *J Infect Dev Ctries*, 2010, 4(3):150-155.
- 4 Zhang FC, Tang XP, Hu XC, et al. A clinical, epidemiological and virological study of a dengue fever outbreak in Guangzhou, China, 2002-2006. *Dengue Bulletin WHO*, 2007, 31:10-18.
- 5 Salgado DM, Rodríguez JA, Garzón M, et al. Clinical and epidemiological characterisation of dengue haemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 2007, 9(1):53-63.
- 6 Varatharaj A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. *Neurol India*, 2010, 58(4):585-591.
- 7 World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009.
- 8 Thomas L, Brouste Y, Najioullah F, et al. Predictors of severe manifestations in a cohort of adult dengue patients. *J Clin Virol*, 2010, 48(2):96-99.
- 9 Levy A, Valero N, Espina LM, et al. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2010, 104(1):16-23.
- 10 Jufrie M, Meer GM, Hack CE, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65(1):70-75.
- 11 Pérez AB, García G, Sierra B, et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol*, 2004, 73(2):230-234.
- 12 Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*, 2008, 8:86.
- 13 Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, et al. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2008, 41(1):6-10.
- 14 Braga EL, Moura P, Pinto LM, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96(2):229-232.
- 15 Chen RF, Yang KD, Wang L, et al. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2007, 101(11):1106-1113.
- 16 Fossiez F, Banchereau J, Murray R, et al. Interleukin-17. *Int Rev Immunol*, 1998, 16(5-6):541-551.
- 17 Gupta N, Chaturvedi UC. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever? *Indian J Med Res*, 2009, 130(1):5-8.
- 18 Chaturvedi UC. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. *Indian J Med Res*, 2009, 129(1):1-3.

(收稿日期:2010-12-16)

(本文编辑:孙荣华)

廖宝林,张复春,唐漾波,等. 重症登革热临床和实验室特征及其细胞因子的动态变化[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2011, 5(2):142-147.