文章编号:1000-5404(2009)19-1897-04

论著

更昔洛韦对巨细胞病毒肝炎婴儿细胞因子水平的影响

李明超,熊 菀 (重庆医科大学附属儿童医院感染消化科,重庆 400013)

摘 要:目的 通过检测更昔洛韦治疗前后巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)肝炎婴儿血清 IL-2、IL-8、IL-10、IFN-γ 水平的变化,了解更昔洛韦在 CMV 肝炎发生、发展和恢复过程中对上述细胞因子的影响,探讨其对机体免疫功能的影响及作用机制。**方法** 采用 ELISA 法检测 72 例患儿血清 CMV-IgM ,定量 PCR 检测血 CMV DNA ,两者均为阳性,而 ALT 正常者作为观察组 1;伴有 ALT 异常者作为观察组 2;正常健康体检婴儿作为健康对照组。采用 ELISA 法检测 3 组血清IL-2、IL-10、IL-8、IFN-γ 水平,并对观察组 2 采用更昔洛韦治疗后再检测上述细胞因子水平。**结果** (1)与健康对照组比较,观察组 1 患儿血清 IL-8、IL-10 均显著升高($t=3.74,9.56$, $P<0.01$),IL-2 显著降低($t=5.87$, $P<0.01$)。(2)观察组 2 患儿血清 IFN-γ 与健康对照组比较显著升高($t=5.93$, $P<0.01$),而观察组 1 患儿与健康对照组儿童血清 IFN-γ 比较无统计学差异($t=0.86$, $P>0.05$)。(3)观察组 2 患儿经更昔洛韦治疗后,血清 IL-2 水平较观察组 1 显著增高($t=3.41$, $P<0.01$),而血清 IL-8、IL-10、IFN-γ 水平则恢复至接近建康对照组儿童水平,两者比较均无显著性差异($t=0.74,0.36,0.54$, $P>0.05$)。(4)观察组 2 用药前后自身对照比较,血清 IL-8、IL-10、IFN-γ 水平显著下降($t=6.52,7.24,14.23$, $P<0.01$),血清 IL-2 水平显著升高($t=5.78$, $P<0.01$)。(5)观察组 2 IFN-γ 水平与 ALT 值有较好的正相关性($r=0.76$, $P<0.01$)。**结论** (1)CMV 感染后导致患儿血清中相关细胞因子分泌紊乱,提示机体出现 Th1/Th2 细胞平衡失调;(2)更昔洛韦除了具有抑制和清除病毒的功能外,还具有改善机体免疫功能的作用,规范使用下安全、可靠、不良反应小。

关键词: 巨细胞病毒感染;更昔洛韦;细胞因子;婴儿
中图法分类号: R392.11; R725.126; R978.7 **文献标识码:** A

Effect of ganciclovir on cytokine levels in infants with cytomegalovirus hepatitis

LI Ming-chao, XIONG Wan (Department of Infectious and Digestive Diseases, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of serum cytokines IL-2, IL-8, IL-10 and IFN-γ in infants with cytomegalovirus hepatitis before and after ganciclovir treatment, and explore the underlying mechanisms of ganciclovir and the immunological changes in the development and progression of cytomegalovirus (CMV) infection. **Methods** CMV-IgM in the serum samples of 72 infants with identified cytomegalovirus infection were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CMV DNA in blood was measured by quantitative PCR. CMV-IgM (+) and CMV DNA (+) were as observed group 1 (35 cases, without hepatitis). Those with abnormality of ALT were regarded as observed group 2 (37 cases, with hepatitis). Another 30 matched healthy infants were enrolled as healthy control group. Levels of serum IL-2, IL-10, IL-8 and IFN-γ of each group were examined by ELISA, and CMV masculine hepatitis group were cured with ganciclovir (5 mg/kg, i.v., twice per day for 14 d, and then once per day for 14 d after a 7 days' interval), then the levels of above factors were examined again. **Results** The levels of IL-8 and IL-10 in observed group 1 were significantly higher than those in healthy control group ($t=3.74, 9.56$; $P<0.01$), but IL-2 were significantly lower ($t=5.87$, $P<0.01$). Compared with healthy control group, the level of IFN-γ in observed group 2 was significantly higher ($t=5.93$, $P<0.01$), but that in observed group 1 was not significantly higher ($t=0.86$, $P>0.05$). After ganciclovir treatment, the level of IL-2 in observed group 2 was significantly higher than that in observed group 1 ($t=3.41$, $P<0.01$), then the levels of IL-8, IL-10 and IFN-γ were not significantly different with healthy control group ($t=0.74, 0.36, 0.54$; $P>0.05$). The levels of IL-8, IL-10 and IFN-γ

基金项目: 重庆市卫生局科研基金(2005)
Supported by the Foundation of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2005)
作者简介: 李明超,男,河南省杞县人,硕士研究生,主要从事小儿消化道疾病方面的研究。E-mail: limingchao104@126.com
通信作者: 熊 菀,电话:(023)63632914,E-mail:xiongwan1962@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-06-11;**修回日期:** 2000-07-09

were decreased significantly ($t=6.52$, 7.24, 14.23; $P<0.01$), and that of IL-2 was increased significantly ($t=5.78$, $P<0.01$) before and after ganciclovir treatment in observed group 2. The level of IFN-γ showed a positive association with ALT in observed group 2 ($r=0.76$, $P<0.01$). **Conclusion** CMV infection results in parasecretion of cytokine, suggesting the dysequilibrium of Thl/Th2; besides the level of IFN-γ is higher, and the degree of height is closely related with the extent of damage of liver. Ganciclovir can not only remove the virus, but also improve immune function, to use it normaly is safe and less side effects.

Key words: cytomegalovirus infection; ganciclovir; cytokine; infants

人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus,HCMV)感染婴儿常可引起黄疸、肝损害、肺炎、神经系统等损害,导致机体免疫功能低下,从而增加对其他病原体的易感性。而在有症状的婴儿巨细胞病毒(cytomegaovirus, CMV)感染中,CMV 肝炎发病率最高,其病死率高达20% ,因此,对 CMV 感染的研究一直是国际上医学界关注的热点[1,2]。目前研究已证实[3] CMV 感染的发病机制与机体免疫功能异常有关,而细胞因子的改变和细胞因子网络的失衡在发病中起到重要的作用。作为巨细胞病毒肝炎治疗的临床一线药物更昔洛韦是否在抑制 CMV 复制后,对机体的免疫状态产生影响呢? 国内尚少见报道。我们通过检测巨细胞病毒肝炎婴儿血清 IL-2、IL-8、IL-10、IFN-γ 水平在应用更昔洛韦治疗前后的变化,了解在巨细胞病毒肝炎发生、发展和恢复过程上述细胞因子的变化,探讨更昔洛韦治疗对机体免疫功能的影响及作用机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

根据中华医学会儿科学分会感染消化学组制定的诊断标准[4]收集 2007 年 1 – 12 月在本院住院诊断为 CMV 感染患儿,共 72 例,其中男性 43 例,女性 29 例,年龄为 1.24 ~ 12.35 (6.58 ± 2.09)个月。采用 ELISA 检测 72 例患儿血清 CMV-IgM,定量 PCR 检测血 CMV-DNA ,两者均为阳性,而 ALT 正常者作为观察组 1(CMV 感染非肝炎组),男性 20 例,女性 15 例,共计 35 例,年龄为 1 ~ 12(6.87 ± 3.12)个月,其中肺炎 28 例,血小板减少性紫癜 5 例,先天性胆道畸形 2 例;伴有 ALT 异常者作为观察组 2(CMV 感染肝炎组),男性 23 例,女性 14 例,年龄为 1 ~ 12(7.23 ± 2.46)个月,共计 37 例;儿保科门诊健康体检婴儿做为正常对照组,男性 20 例,女性 10 例,年龄为 1 ~ 12 (5.73 ± 1.35)个月,共计 30 例。3 组婴儿在性别、年龄等构成比方面均无统计学差异($P>0.05$)。

1.2 研究方法

1.2.1 血清 CMV-IgM 检测 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清 CMV-IgM。抗体试剂由晶美生物技术有限公司提供,操作过程严格按试剂盒说明进行,用酶标仪(Sunnie Demote 型)读取和记录结果。

1.2.2 定量 PCR 检测血 CMV-DNA

1.2.2.1 标本收集 入院后 24 h 抽取患儿外周血 2 ml,EDTA 抗凝,密封送检。

1.2.2.2 DNA 模板提取 淋巴细胞分离液,分离沉淀白细胞,于沉淀物中加 50 μl DNA 裂解液,煮沸 10 min,离心沉淀,取上清液 2 μl 供作 PCR。

1.2.2.3 PCR 程序 于 PCR 反应管中(由中山医科大学达安基因诊断中心提供),加 2 μl DNA 模板提取液,总容量为 50 μl。用已知 HCMV-DNA 含量的标准阳性对照品,制备标准曲线,同时设置阳性和阴性对照,于荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)扩增仪中(Light Cycle),93 ℃预变性 2 min,进入循环,93 ℃ 45 s,55 ℃ 120 s,共 40 个周期,由电脑自动计算和读取结果。

1.2.3 ALT 检测 ALT 采用美国德林公司杜邦全自动生化分析仪(BIMEN SION RSL)检测,操作过程严格按试剂盒说明进行。

1.2.4 实验分组 CMV-IgM 及 CMV-DNA 两者均阳性为 CMV 感染, 再根据 ALT 是否异常分为观察组 1 和观察组 2。

1.2.5 更昔洛韦治疗方案 对观察组 2 患儿采用更昔洛韦治疗,方案如下:诱导治疗阶段:5 mg/kg 溶于 5% 葡萄糖溶液 100 ml,静脉滴注,每 12 小时 1 次,每次滴注持续时间不少于 1 h,持续 14 d,休息 7 d,进入维持治疗阶段;维持治疗阶段:5 mg/kg 溶于 5% 葡萄糖溶液 100 ml,静脉滴注,每天 1 次,持续 14 d。

1.2.6 细胞因子检测 所有 CMV 感染患儿及正常对照组患儿于入院 24 h 内及更昔洛韦治疗疗程结束后 24 h 内抽静脉血 3 ml,离心分离血清,采用 ELISA 方法测 IL-2、IL-10、IL-8、IFN-γ,试剂盒购自晶美生物技术有限公司,操作过程严格按试剂盒说明进行。并按要求设置阳性和阴性对照。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.5 统计软件进行方差分析,组间均数比较行 t 检验。TNF-γ 和 ALT 值之间的关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 各组血清 IL-2、IL-8、IL-10、IFN-γ 水平检测

1)观察组 1 患儿与正常对照组儿童相比较,血清 IL-8、IL-10 明显升高,差异显著($t=3.74$,9.56, $P<0.01$),血清 IL-2 水平则明显降低,有显著差异($t=5.87$,$P<0.01$),而血清 IFN-γ 水平则无显著性差异($t=0.86$,$P>0.05$)。2)观察组 2 在使用更昔洛韦干预治疗前不仅血清 IL-8、IL-10 明显高于正常对照组($t=7.17$,15.08 $P<0.01$),血清 IFN-γ 水平也显著高于正常对照组($t=5.93$,$P<0.01$),血清 IL-2 水平则明显降低,差异非常显著($t=5.65$,$P<0.01$)。3)观察组 2 经更昔洛韦治疗后:①与治疗前相比(自身对照比较)各因子均有显著差异,即:血清 IL-8、IL-10、IFN-γ 水平显著下降,IL-2 水平显著升高($t=6.52$,7.24,14.23,5.78,$P<0.01$);②与正常对照组相比 IL-8、

IL-10、IFN-γ 水平基本恢复到正常范围($t=0.74,0.36,0.54$, $P>0.05$), IL-2 水平不仅明显升高,且超过正常对照组,差异显著($t=3.41$, $P<0.01$);③与观察组 1 比较 IL-8、IL-10 水平明显降低($t=6.43,9.47$, $P<0.01$),IL-2 水平则明显升高($t=6.71$, $P<0.01$),而 IFN-γ 水平无显著差异($t=0.27$, $P>0.05$),见表 1。

表 1　各组血清 IL-2、IL-8、IL-10、IFN-γ 水平比较($\mu g/L$, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-2	IL-8	IL-10	IFN-γ
正常对照组	30	209.00±12.10	0.347±0.027	78.07±4.90	803.68±14.81
观察组 1	37	178.40±49.87	0.587±0.052[a]	177.10±71.67[a]	794.45±16.98
观察组 2					
治疗前	35	177.18±42.22[b]	0.601±0.063[b]	202.75±94.60[b]	946.00±82.62[b]
治疗后	35	231.60±88.39	0.341±0.028	79.72±6.47	807.68±19.00

a: $P<0.01$,与正常对照组比较;b: $P<0.01$,与观察组 2 治疗后比较

2.2　血清 IFN-γ 和 ALT 水平相关性分析

将观察组 2 患儿血清 IFN-γ 水平与 ALT 水平进行相关分析,结果显示 IFN-γ 与 ALT 水平的变化呈显著的正相关($r=0.76$, $P<0.01$)。

2.3　疗效及不良反应观察

观察组 2 患儿经过更昔洛韦按疗程经过诱导及维持 2 个阶段规则治疗后,所有患儿(100%)的肝功能均恢复到正常范围,3 例患儿(8.1%)出现轻微的不良反应,主要表现为一过性白细胞总数降低、恶心、食欲下降等胃肠道症状,经对症处理后很快消失。

3　讨论

我国是 HCMV 感染的高发区,儿童感染率达 85%左右[5]。CMV 侵入人体后,在细胞内增殖可在多种器官的上皮细胞内长期存在,造成组织病变。新生儿、婴幼儿由于免疫系统不成熟,缺乏有效免疫反应,病毒得以不断复制,这是导致婴幼儿 HCMV 感染发病率高的根本原因。而在 CMV 感染机体的免疫应答过程中,Th1/Th2 细胞及其分泌的细胞因子在免疫防御和免疫病理过程中发挥着重要的作用。

Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN-γ 等细胞因子,介导细胞免疫,增强巨噬细胞吞噬病原体的能力,在抗细胞内病原体(包括病毒、细菌及寄生虫等)感染中发挥重要作用。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10 等细胞因子,主要参与体液免疫、环境中抗原物质的变态反应等[5]。研究证明,CMV 感染后导致 Th2 细胞免疫功能增高,使 Th1/ Th2 细胞平衡失调,使机体特异性细胞免疫功能受到抑制[6,7]。更昔洛韦(ganciclovir)作为一种新的广谱抗 DNA 病毒药物,它的主要抗病毒作用机制是进入宿主细胞后由一种或多种细胞激酶磷酸化为更昔洛韦三磷酸,终止病毒 DNA 的链增长,达到抑制病毒复制,治疗疾病的目的。由于病毒 DNA 聚合酶在病毒感染细胞内的浓度可以高于非感染细胞的 100 倍,因此它不仅不易产生耐药性,而且对非感染的正常细胞功能的影响也非常小,毒副作用也非常低[8]。

本研究发现:(1)观察组 1 -2 血清 IL-2 水平均显著降低,而 IL-8、IL-10 水平则显著升高($P<0.01$),表明婴儿感染 CMV 后 Th1 细胞功能受到抑制,而 Th2 细胞功能异常增强,Th1/Th2 细胞平衡遭到破坏,一方面使机体清除病毒的能力降低,另一方面导致机体组织器官异常的免疫反应,触发其炎症反应和功能障碍。(2)经过更昔洛韦规则治疗后,观察组 2 血清 IL-2 水平显著回升,甚至超过正常对照组儿童,而 IL-8、IL-10 水平则显著下降,基本接近正常健康儿童的水平,与治疗前相比有显著差异($P<0.01$),表明由于更昔洛韦对 CMV 的抑制和干预作用,使 Th1 细胞功能得到恢复,而异常增强的 Th2 细胞功能得到抑制,Th1/Th2 细胞又恢复正常的平衡状态。证明更昔洛韦的确不仅能快速、有效、低毒的抑制和清除 CMV 对机体组织器官的损害,而且能对 CMV 导致的 Th1/Th2 细胞平衡失调及其相关细胞因子分泌紊乱进行干预,使其恢复正常; Cesaro 等[8]研究表明接受细胞移植后的 CMV 视网膜炎,经过更昔洛韦正规抗病毒治疗后,使机体产生免疫重建从而达到治疗 CMV 感染的效果,本研究结果与其基本一致。(3)在 CMV 感染后虽然 Th1 细胞功能受到部分抑制,但其分泌 IFN-γ 能力却异常增高,且与患儿 ALT 的升高密切相关($r=0.76$, $P<0.01$)。众所周知 IFN-γ 具有介导细胞免疫,增强巨噬细胞介导抗感染能力,同时还有促进 NK 细胞功能,增强机体非特异性免疫功能[9,10],这有利于机体清除和抑制外来病毒,但过高的 IFN-γ 可诱导 MHC Ⅱ 类抗原的表达,进而增强这些细胞的免疫原性及 T 细胞对其的识别能力,产生超强的免疫应答反应,导致和加重组织器官的损伤,因而也是引起肝脏功能异常升高的重要原因之一。(4)观察组 2 患儿经过更昔洛韦按规则治疗后,所有患儿(100%)的肝功能均恢复到正常范围,仅 3 例患儿(8.1%)出现轻微的不良反应,表明更昔洛韦不仅对 CMV 肝炎患儿治疗有效,而且安全、副作用小,因而值得推广应用。

总之,婴儿感染 CMV 病毒后不仅可以导致肝脏等组织器官严重损害,而且可以引起机体 Th1/Th2 细胞平衡失调,导致相关细胞因子分泌紊乱,加重组织器官的损害;而更昔洛韦不仅能抑制和清除 CMV 肝炎患儿机体组织器官中的 CMV,而且能对 CMV 导致的 Th1/Th2 细胞平衡失调及其相关细胞因子分泌紊乱进行干预,使其迅速恢复正常,达到有效、安全、低毒治疗婴儿 CMV 肝炎的目的。当然由于我们的研究病例有限,且 CMV 病毒感染机体免疫功能的变化是非常复杂的,更昔洛韦治疗 CMV 病毒感染的确切机制尚未十分明了,因此它对婴儿巨细胞病毒肝炎细胞因子水平干预的效果及结论只是我们初步研究的结果,尚需进行更深入、细致的研究。

参考文献：

[1] Joseph S A, Beliveau C, Muecke C J, *et al*. Risk factors for cytomegalovirus seropositivity in a population of day care educators in Montreal, Canada[J]. Occup Med (Lond), 2005, 55(7): 564-567.
[2] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 820.
[3] 刘海智, 陈素华, 闻良珍, 等. 晚期孕妇血清sIL-2R水平与先天性HCMV感染的相关性[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(10): 21-23.
[4] 中华医学会儿科学分会感染消化学组. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(7): 441.
[5] 方 峰. 关于儿童巨细胞病毒感染性疾病诊断与防治的几点认识[J]. 国际儿科学杂志, 2006, 33(2): 143-145.
[6] 沈玲云, 蒋琼俏. 更昔洛韦治疗儿童巨细胞病毒感染两组方案的比较[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(7): 989.
[7] 熊 菀, 刘 瑜, 陈 琼, 等. 细胞因子水平改变在婴儿巨细胞病毒感染中的临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 623-625.
[8] Cesaro S, Boaro M P, Pillon M, *et al*. Immune reconstitution complicated by CMV retinitis in a pediatric patient who underwent haploidentical CD34$^+$-selected hematopoietic stem cell transplant for acute lymphoblastic leukemia[J]. Int J Hematol, 2008, 88(4): 145-148.
[9] 赵若雯, 陆俏群, 崔曲情, 等. 更昔洛韦加思美泰治疗巨细胞病毒感染引起的婴儿淤胆型肝炎疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(6): 860-862.
[10] 夏 杰, 杨占宇, 陈 佳, 等. 肝移植术后乙型肝炎病毒再感染的预防与诊治[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(5): 348-351.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2009)19-1900-01

外阴子宫内膜异位症误诊1例

宋秋荷[1]，赖雪花[2]（九江学院：[1]临床医学院皮肤性病科，[2]护理学院，江西 九江 332000）

外阴子宫内膜异位症在女性妇科疾病子宫内膜异位症中所占的比例很小，在皮肤科诊断中很容易被误诊。我们现报告1例病程长达8年，曾被误诊为“尖锐湿疣”的外阴子宫内膜异位症，现报告如下。

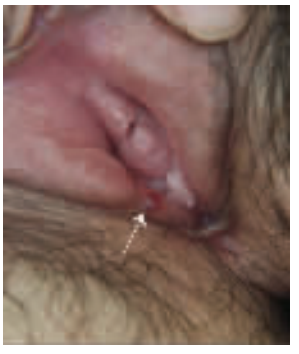
1 临床资料

1.1 临床病史

患者，女性，40岁。2008年6月患者因右侧小阴唇皮疹伴间歇性疼痛7~8年来我院诊治。患者于生育后2年起发现右侧小阴唇下方皮疹，于月经来潮时疼痛并出血，经后可自行好转。平素无异常感觉。皮疹未见明显增大，偶有经期合并感染伴疼痛加剧，经抗炎后消退。曾在当地医院就诊，诊断为“尖锐湿疣”，给予口服及外用药物（具体不详），治疗无效。起病后皮疹从未消退，月经正常，无腹部疼痛、腰部坠胀及性交后疼痛，否认发热及关节痛等症状。否认冶游史，无输血及使用血制品，无吸毒史，家族中无类似病史。

1.2 检查

生命体征正常，一般情况良好，发育正常。心、肝、肺、腹部及神经系统检查未见异常。皮科检查：右侧小阴唇下方见一绿豆大小红色斑丘疹，表面欠光滑，中央轻度糜烂，无明显分泌物，周围少许红晕；触之柔软，触及后不易出血（图1）。近位淋巴结未触及。醋酸白试验阴性。口腔黏膜完整，眼部检查正常。实验室检查：血、尿常规正常；局部细菌及真菌培养均阴性。梅毒血清、生殖器疱疹检查，均为阴性。子宫及附件超声检测未见异常。组织病理检查：病变中央表皮萎缩变薄，两侧表皮增生肥厚，表皮突伸长增宽，真皮浅层可见较多腺管样结构，管腔由柱状上皮组成，真皮上部可见带状致密的淋巴细胞及组织细胞浸润（图2）。根据典型病史、临床表现及辅助检查诊断为外阴子宫内膜异位症。



↑：红色斑丘疹

图1 外阴子宫内膜异位症的皮肤表现

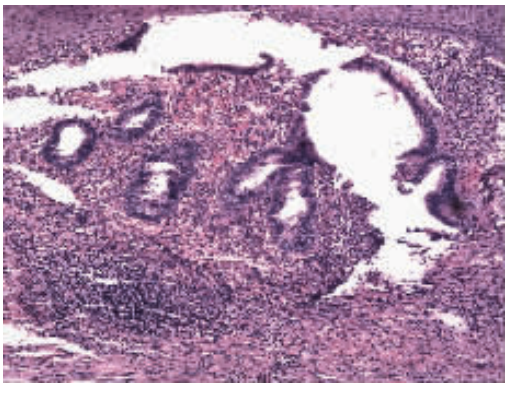


图2 外阴子宫内膜异位症的病理观察（HE×400）

作者简介：宋秋荷，女，山东省泰安市人，博士研究生，副主任医师，副教授，主要从事医学真菌病学、皮肤肿瘤病理学、银屑病发病机制方面的研究。电话：(0792)8563776，E-mail：sqh913@163.com

收稿日期：2009-07-22；**修回日期：**2009-07-27

（下转1904页）