HDV阳性重型肝炎患者外周血中 TNF IL-1及 IL-6的变化

李奇芬* 王宇明 彭齐荣** (第三军医大学附属西南医院全军传染病专科中心) 重庆, 400038

提 要 目的: 观察 HDV(+)重型肝炎外周血中 TNF IL-1及 IL-6变化状况。方法: 分离 16例 HDV(+)/HBV(+)重型肝炎血清和 PBMC培养上清, EIA法测 TNF, IL-1参照 Mizel法, IL-6参考 Okuda与 Muraguchi法, 以 21例 HDV(-)/HBV(+)重型肝炎为疾病对照, 20例献血员为正常对照。结果: 两组重型肝炎患者血清及 PBMC上清中 TNF IL-1及 IL-6均非常显著升高, 与献血员比较, $P < 0.001$, 但两组间无差异($P > 0.05$)。结论: 提示已发展为重型肝炎的 HDV(+)/HBV(+)患者体内之炎性细胞因子均因单核巨噬细胞被激活而呈高度增高状态。结合 HDV(+)CH组 IL-6显著高于 HDV(-)CH组, 提示 IL-6可能在 HDV发病中占有重要地位。

关键词 细胞因子; TNF; IL-1; IL-6; HDV感染; 重型肝炎
中图法分类号 R512.6

TNF、IL-1和 IL-6等细胞因子具有激活和诱导机体的 T、B细胞分化, 增强单核细胞和 NK细胞的杀伤功能, 是机体炎症反应过程和病理生理过程中的一组重要介质。为探讨上述几种细胞因子与 HDV致病关系, 本研究观察 HDV(+)/HBV(+)重型肝炎患者体内肿瘤坏死因子(TNF)水平、白细胞介素 I(IL-1)、白细胞介素 VI(IL-6)活性并以 HDV(-)/HBV(+)重型肝炎患者作疾病对照, 健康献血员作正常对照, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 对象

本科部分住院之重型病毒性肝炎(Severe hepatitis, SH)患者共 37例, 其中急性重型(Acute severe hepatitis, ASH) 6例, 亚急性重型(Subacute severe hepatitis, SSH) 8例, 慢性重型(Chronic severe hepatitis, CSH) 23例, 全部有病理诊断, 标准按 1994年北京肝炎会议修订的防治方案。每例至少有一项血清 HBV感染标志。根据患者血清中 HDAg和/或抗 HDV阳性与否, 又将患者分为 HDV(+)/SH组 16例(含 ASH 2例, SSH 4例, CSH 10例, 男 12例, 女 4例, 年龄 19~48岁)和 HDV(-)SH组 21例(含 ASH 4例, SSH 4例, CSH 13例, 男 17例, 女 4例, 年龄 19~65岁); HDV(+)和 HDV(-)两组患者的几种血清肝功能变化(如 TB、ALT、TP和 ALB等)无统计学意义之差异。唯凝血酶原时间(PT)在 HDV(+)SH组为 29.63±4.17 s, HDV(-)SH25.5±6.0 s, 差异显著($P < 0.05$)。两 SH组预后差异亦显著, HDV(+)SH组无一例存活。HDV(-)SH组存活率为 57.14%(13/21例) $\chi^2 = 7.13$($P < 0.05$)。以 20例献血员作为正常对照。

1.2 标本

每例患者于入院 3 d内采集空腹血标本。血清分离后 -20℃保存, 分批集中检测; 肝素抗凝血立即进行外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离与培养。简要步骤: 抗凝血+等量 RPMI-1640液(Gibo, USA)→置于 Ficoll-Hypagu淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)面上→离心(2 000 r/min×20 min)→收集界面 PBMC→洗涤×3次→以含 10%小牛血清 RPMI-1640液悬浮, 调整细胞浓度为 1×10⁶/ml→加入 24孔细胞培养板内 1 ml/孔, 每孔加 PHA-P(华美生化工程公司产) 10 μg→37℃, 5% CO_2恒温箱中培养 48 h→收集各孔上清→0.02 μm微孔膜过滤后, -20℃冷藏, 待检。

1.3 血清和 PBMC培养上清中 TNF测定(EIA法)

根据 TNF检测试剂盒(军事医学科学院产品)说明书操作, 以 ng/ml表示。

1.4 PBMC培养上清中 IL-1测定

以 C^3H/HeJ小鼠胸腺细胞为反应细胞, 细胞浓度为 1×10⁷/ml, 100 μl/孔, 加不同稀释浓度的培养上清 100 μl/孔, 培养 50 h后加入 0.5 μCi ^{3}HTdR/孔, 继续培养 16 h, 以多头细胞收集器将细胞收集到玻璃纤维膜上, 烘干, 在 LKB-1217闪烁计数仪(瑞典)测定 CPM值, 结果以其均值表示。

1.5 PBMC培养上清液中 IL-6含量测定

对照 Okuda与 Muraguchi介绍的方法, 即在 96孔平底细胞培养板中加入 0.1 ml生长旺盛的 CESS细胞(日本大孤大学岗田教授赠), 细胞浓度为 8×10⁵/ml, 100 μl/孔, 同时加入 100 μl/孔待检上清, 37℃, 5% CO_2恒温箱中培养 48 h, 取出上清, 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定上清中 IgG含量, 并以此表示 IL-6活性水平。

2 结果

2.1 HDV(+)重型病毒性肝炎患者血清和 PMBC培养上清中 TNF含量

* 李奇芬, 女, 67岁, 主任医师, 教授
** 广州空军医院传染病中心, 广州, 510000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HDV(+)和 HDV(-)SH患者血清和 PBMC上清中 TNF含量较正常人均显著升高 ($P < 0.001$),但两组之间差异不显著 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 HDV(+)肝炎患者血清和 PBMC培养上清中 TNF含量

Tab 1 TNF level in the serum and supernatant of the cultured PBMC of HDV(+) patients with severe hepatitis

Group	n	TNF(ng/ml)	
		Serum	Supernatant of cultured PBMC
HDV(+)SH	16	186.88± 43.97	23.88± 5.43
HDV(-)SH	21	178.25± 28.57	23.74± 4.31
Blood donors	20	20.47± 8.53	19.47± 2.16

2.2 HDV(+)重型病毒性肝炎患者 PMBC上清中 IL-1、IL-6水平

两组 SH患者 PBMC上清中 IL-1、IL-6均显著高于献血员 ($P < 0.001$),但两组之间差异不显著 ($P > 0.05$),见表 2。

表 2 HDV(+)肝炎患者 PBMC培养上清中 IL-1、IL-6活性

Tab 2 IL-1 and IL-6 levels in the supernatant of the cultured PBMC of HDV(+) patients with severe hepatitis

Group	n	Supernatant of cultured PBMC	
		IL-1 (cpm/ml)	IL-6(ng/ml)
HDV(+)SH	16	2 695.63± 259.75	84.98± 16.99
HDV(-)SH	21	2 715.09± 195.78	85.88± 19.46
Blood donors	20	2 227.29± 226.63	23.97± 8.26

3 讨论

TNF、IL-1、IL-6等几种体内免疫调节因子或致炎物质在乙型病毒肝炎及其他肝脏疾病中均已报道有不同程度的异常表达[1-3]。在重型肝炎尤其是死亡组病例中更为显著[4,5]。本实验结果显示,不论是 HDV(+)或 HDV(-)的重型肝炎其血清或 PBMC上清中表达的 TNF、IL-1及 IL-6都非常显著地高于正常人群,提示上述几种炎症介质不但参与了 HDV(-)的乙型肝炎的发病,可能也影响了 HDV(+)的丁型肝炎的疾病过程。

人们知道,在各型肝炎病毒中,HDV被认为是一种致病性很强的感染因子,常可使 HBV携带者病情迅速加重,甚至呈致死性变化[6],这种致病性极强的感染因子,对于本实验中的三种致炎因子的表达是否产生影响,是本研究者最初的困扰,实验结果表明 HDV阳性重型丁型肝炎血清及 PBMC上清中 TNF、IL-1、IL-6等几种细胞因子检测结果与 HDV阳性重型乙型肝炎的结果比较,两组没有明显差异,即未能看到 HDV这一感染因子对机体单核巨噬细胞系统的刺激原作用,其原因可能是 HDV与 HBV具有相同的外壳蛋白 HBsAg致使 HDV不能直接作为刺激原发挥其致病作用;另一个应当考虑的因素是本组患者均为重型,病情已达疾病之极期,几种炎症介质的表达可能已达极限,难以作出比较,理由是在比较一组慢性肝炎(CH)患者血清和 PBMC上清中 TNF、IL-1及 IL-6时发现,HDV(+)CH组 IL-6值显著高于 HDV(-)CH组(前者为 59.55± 12.91 ng/ml,后者为 43.13± 14.6 ng/ml,二者比较 $P < 0.05$, TNF和 IL-1两组无差异),即病情轻于重型的慢性肝炎患者中 HDV(+)与 HDV(-)组之间就可看到其不同之处。此结果也提示,所检测的三个因子中,唯 IL-6在两组有不同的表现,是否说明在三种介质中,IL-6在 HDV感染发病机制中,占有一定的地位,值得进一步探讨。

参考文献

1 Bendtzen K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. Immunol Lett, 1988, 19(1): 183

2 Tilg H, Wilmer A, Vogel W, *et al*. Serum levels of cytokines in chronic liver Diseases. Gastroenterology, 1992, 103(1): 264

3 孙永良,张立煌,方海林,等.病毒性肝炎患者 IL-1、IL-6和 TNFα 活性的检测.中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14(3): 187

4 Muto Y, Nouri-Aria K T, Meager A, *et al*. Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. Lancet, 1988, 2(8602): 72

5 Sekiyama K D, Yoshiba M, Thomson A W. Circulating proinflammatory cytokines (IL-β, TNFα and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. Clin Exp Immunol, 1994, 98(1): 71

6 Rizzetto M. The delta agent. Hepatology, 1983, 3(5): 729

(收稿: 1998-12-20;修回: 1999-03-31)

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net