

床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证[S]. 北京:中国标准出版社,2013.

[5] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:153-159.

[6] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2008:111-138.

[7] 张秀明,庄俊华,郑松柏,等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(11):

1293.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2000.

[9] 王蓓丽,孙林,潘柏申. 低密度脂蛋白胆固醇检测方法的研究进展[J]. 检验医学,2013,28(11):975-980.

(收稿日期:2016-01-12)

• 临床研究 •

病毒性心肌炎患者外周血中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 细胞因子水平的分析

陈 锐,陈艳清,贾 建,许 瑶,张达秀,李婉葵,邵锦欢
(东莞市塘厦医院检验科,广东东莞 523721)

摘要:目的 研究病毒性心肌炎患者外周血中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)的水平,分析上述指标与心肌炎的相关性。方法 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月间入院就诊的病毒性心肌炎患者 32 例,作为实验组。选取同期入院体检的健康人 32 例作为对照组。应用 ELISA 方法检测血清中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平。32 例病毒性心肌炎患者应用常规抗病毒、镇静治疗后,应用实时荧光定量 PCR 法检测 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平,观察并比较治疗前后 3 项指标的变化。结果 病毒性心肌炎患者急性期 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平最高,在恢复期稍有下降,但仍显著高于对照组($P < 0.05$)。与对照组相比,病毒性心肌炎患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平明显较高($P < 0.05$)。结论 血清中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 水平变化在病毒性心肌炎发病中有重要作用,可在临床作为病情判断及疗效评价的参考指标。

关键词:病毒性心肌炎; 肿瘤坏死因子- α ; 转化生长因子- β 1; 细胞因子干扰素- γ

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.045

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)08-1119-02

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)指病毒感染心肌细胞,导致细胞溶解引起心肌局限性或弥漫性的急性或慢性炎症病变,结果造成病毒对心肌细胞直接损伤和继发免疫反应对心肌组织的持续损害^[1]。目前临床尚未能确认 VMC 确切的发病机制,但机体免疫功能紊乱和炎性细胞因子在其发病中的作用不容小觑。细胞因子是由免疫细胞和某些非免疫细胞经刺激合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质,通过结合相应受体从而具有调节细胞生长、分化、调节免疫应答的作用。本研究就 VMC 患者外周血中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 细胞因子的水平进行了分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月间入院就诊的病毒性心肌炎患者 32 例,作为实验组。所有患者均符合成年人急性病毒性心肌炎的诊断参考标准^[2-3]。选取同期入院体检的健康人 32 例作为对照组。排除标准:先天性心脏病、心脏病等心脏疾病;1 个月内无感染、腹泻病史;智力及精神异常,无法配合此次研究者。实验组 32 例患者中,男 19 例、女 13 例;年龄 30~65 岁,平均(46.25 \pm 12.03)岁;发病前 1~3 周均有上呼吸道感染史。对照组 32 例中男 18 例、女 14 例;年龄 32~61 岁,平均(46.32 \pm 11.91)岁。两组在年龄、性别等基础资料方面无统计学差异,可参与比较。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有受试者在清晨空腹抽取静脉血 3 mL, 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,分装-20 $^{\circ}$ C 留存备用。

1.2.2 标本的检测 应用 ELISA 检测两组患者血清中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白含量,试剂盒购自 bd biosciences

pharmingen 公司。操作步骤如下,(1)标准曲线:冻干标准品复溶,静置 15 min,倍比梯度稀释(标准曲线取 7 个点,最高浓度为 1 000 pg/mL,标准品稀释液直接加入作为 0 浓度)。(2)取标本血清及标准品 100 μ L 加入相应孔中,封板,室温孵育 2 h,洗板 5 次,拍干。加生物素化抗体 100 μ L 到每孔,封板,室温孵育 1 h,洗 5 次,拍干。加酶结合物 100 μ L,封板,暗室室温孵育 20 min,洗 5 次,拍干。加显色剂 100 μ L,暗室室温孵育 20 min,加终止液 100 μ L 终止反应。(3)酶标仪检测,读其 A450 值,绘制标准曲线,算出标本浓度。并在 32 例病毒性心肌炎患者应用常规抗病毒、镇静治疗后,另行蛋白水平检测。设定实验组治疗前为 VMC 急性期,治疗后为 VMC 恢复期。

同时应用实时荧光定量 PCR 法,见表 1,检测两组患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平。检测试剂盒、引物和探针序列均由上海基康生物技术有限公司提供,检测仪器使用罗氏 Lightcycler 荧光定量 PCR 仪。

1.3 统计学处理 数据均应用 SPSS21.0 软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量数据两组比较应用 t 检测,计数数据比较应用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平 病毒性心肌炎患者急性期 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平最高,在恢复期稍有下降,但仍显著高于正常对照组($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平 与对照组相比,病毒性心肌炎患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平明显较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 实时荧光定量法检测 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平

指标	上游引物	下游引物	产物大小(bp)
TNF- α	5'-GGT GAT CGG TGC CAA CAA GGA-3'	5'-CAC GCT GGC TCA GCC ACT G-3'	173
TGF- β 1	5'-CCA ACT ATT GCT TCA GCT CCA-3'	5'-GTG TCC AGG CTC CAA ATG T-3'	154
IFN- γ	5'-CAT CGG GTT CCC ATA AAG-3'	5'-TGG ACA CCT GGA CGC TAA-3'	359

表 2 两组患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (ng/L)	TGF- β 1 (ng/mL)	IFN- γ (ng/L)
VMC 急性期	32	128.31 \pm 12.48 [#]	15.18 \pm 1.42 [#]	37.57 \pm 0.91 [#]
VMC 恢复期	32	88.24 \pm 7.18 ^{#*}	9.53 \pm 1.41 ^{#*}	30.99 \pm 0.74 [#]
对照组	32	73.46 \pm 5.71	6.27 \pm 0.83	27.53 \pm 0.62

[#]:与对照组相比, $P < 0.05$; * :与 VMC 急性期相比, $P < 0.05$ 。

表 3 两组患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF- α	TGF- β 1	IFN- γ
VMC 组	32	3.29 \pm 0.46	5.69 \pm 1.01	1.17 \pm 0.38
对照组	32	1.55 \pm 0.67	2.42 \pm 0.72	0.76 \pm 0.32
P	—	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

目前对 VMC 发病机制抑制存在诸多争议,以免疫学说与细胞因子论支持者较多^[4]。VMC 是由多种病毒引起的以心肌间质炎症为主的疾病,柯萨奇 B 组病毒是主要病原。病毒通过消化道或呼吸道侵入人体发生病毒血症,侵犯心肌。感染初期机体首先发动细胞免疫反应,增强机体对病毒免疫力,同时单核巨噬细胞趋化,产生及分泌细胞因子^[5],进而调控疾病进展。

TNF- α 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,可增强中性粒细胞吞噬能力、促进细胞增殖与分化并具有抗感染作用,其既参与机体免疫系统,也是机体炎症反应及损伤的重要调节因子^[6]。TNF- α 来源广泛,主要由巨噬细胞和活化的单核细胞产生,心脏既是 TNF- α 的合成场所又是其作用的靶器官。在本次研究中, TNF- α 在 VMC 急性期表达高达 (128.31 \pm 12.48)ng/L,且 TNF- α mRNA 水平也显著高于对照组,提示 TNF- α 参与了病毒性心肌炎的发展过程。

TGF- β 1 是胶原纤维细胞外基质合成和沉积的强有力的始动因子,也是诸多因素导致心肌纤维化最后的共同的中介物之一,研究认为 TGF- β 1 阳性表达是反映心肌炎症性损伤修复的灵敏指标^[7]。本次研究中,VMC 急性期患者 TGF- β 1 蛋白水平为 (15.18 \pm 1.42)ng/mL,VMC 恢复期则为 (9.53 \pm 1.41)ng/mL,正常对照组仅为 (6.27 \pm 0.83)ng/mL。汪东华等研究中^[8],TGF- β 1 在明确心肌炎患者中的表达水平高达 (32.97 \pm 4.88)ng/mL,界限性心肌炎组则为 (15.17 \pm 1.62)ng/mL,正常对照组 TGF- β 1 水平仅为 (6.62 \pm 0.98)ng/mL。提示 TGF- β 1 在健康人中水平较低,而病毒性心肌炎病情越重则 TGF- β 1 水平越高。同时本次研究中 TGF- β 1 水平整体偏低可能与

VMC 患者病情程度有关。

IFN- γ 是由活化的 T 细胞产生的,具有抗病毒的作用,同时通过参与诱导主要组织相容性复合体 II 类抗原的表达而发挥一定的免疫调节作用^[9]。IFN- γ 表达过高会引起自身细胞的损伤,并可通过影响细胞表面特定受体而产生负性肌力作用^[10]。同时 IFN- γ 可抑制病毒复制,过低水平的 IFN- γ 不利于清除病毒。在本次研究中,VMC 恢复期 IFN- γ 水平介于较高的 VMC 急性期及较低的对照组之间,证实了上述理论。

综上所述,血清中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 水平变化在病毒性心肌炎发病中有重要作用,可在临床作为病情判断及疗效评价的参考指标。

参考文献

- [1] 张艳,石搏,王元春,等. 病毒性心肌炎患儿外周血中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 细胞因子水平分析[J]. 中国妇幼保健,2013,28(5):789-790.
- [2] 中华内科杂志编委会. 全国心肌炎心脏病专题座谈会纪要[J]. 中华内科杂志,1987,26(35):597-601.
- [3] 全国心肌炎. 心肌病专题研讨会组委会. 全国心肌炎、心肌病专题研讨会纪要[J]. 临床心血管病杂志,1995,11(6):324-326.
- [4] Adamopoulos S, Kolokathis F, Gkouziouta A, et al. Cytokine gene polymorphisms are associated with markers of disease severity and prognosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. Cytokine,2011,54(1):68-73.
- [5] 张小佛,于小华,郭富强,等. 病毒性心肌炎患儿血清巨噬细胞移动抑制因子、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 表达及其意义[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(1):35-36.
- [6] 李友邕,周碧燕,覃李线,等. 病毒性心肌炎患儿血清中 TNF- α 、hs-CRP、cTnI 检测的临床意义[J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(17):1368-1369.
- [7] 马文东,袁媛,杨奕,等. TGF- β 1 介导的 RhoA/ROCK 通路在大鼠肺肌成纤维细胞分化中的调节作用[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(10):1758-1763.
- [8] 江东华,罗斌,孔小平,等. 病毒性心肌炎猝死心肌 MMP-9 和 TGF- β 1 表达与心肌纤维化的关系[J]. 中国法医学杂志,2008,23(3):163-166.
- [9] 李艳花,张海飞,张鑫辰,等. INF- γ 在可溶性 β -淀粉样蛋白 (fA β) 介导的小胶质细胞神经毒性中的增敏作用[J]. 复旦学报:医学版,2013,40(3):259-264.
- [10] Balci SO, Col-Araz N, Baspinar O, et al. Cytokine gene polymorphisms in childhood dilated cardiomyopathy: interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 genes are associated with the disease in Turkish patients[J]. Iran J Pediatr,2013,23(5):603-604.