

HCMV 感染患儿血浆可溶性 HLA - G 及 IL - 10 检测的意义

田可港 浮 苗 郑晓群

摘 要 **目的** 探讨血浆可溶性人类白细胞抗原 - G (soluble human leukocyte antigen - G, sHLA - G) 及白细胞介素 - 10 (interleukin - 10, IL - 10) 在儿童巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 感染中的意义。**方法** 分别收集 75 例 HCMV 活动性感染患儿的外周血及尿液标本, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血浆 sHLA - G 和 IL - 10 水平; 采用实时荧光定量 PCR (FQ - PCR) 检测尿液 HCMV DNA 载量。**结果** HCMV 活动性感染患儿血浆 sHLA - G 水平 [54.91 (6.75 ~ 282.72) U/ml] 明显高于对照组 [21.32 (1.07 ~ 260.35) U/ml], 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 血浆 IL - 10 的水平 [9.24 (1.61 ~ 41.77) pg/ml] 明显高于对照组 [1.82 (1.03 ~ 3.98) pg/ml], 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 血浆 sHLA - G 和 IL - 10 水平与尿液 HCMV DNA 载量之间无明显相关性 ($P > 0.05$)。**结论** HCMV 活动性感染患儿血浆 sHLA - G 和 IL - 10 水平显著升高, 可作为 HCMV 活动性感染诊断的指标。

关键词 人巨细胞病毒 人类白细胞抗原 - G 白细胞介素 - 10

Plasma HLA - G and IL - 10 Detection in Children with Human Cytomegalovirus Infection. Tian Kegang, Fu Miao, Zheng Xiaogun. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To discuss the significance of plasma levels of soluble human leukocyte antigen - G (sHLA - G) and interleukin - 10 (IL - 10) in children with human cytomegalovirus (HCMV) infection. **Methods** The study included 75 patients with active HCMV infection. Plasma levels of sHLA - G and IL - 10 were determined using enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA), and real - time fluorescence quantitative PCR (FQ - PCR) was used to detect the urine HCMV DNA load. **Results** Significant increases were observed in soluble HLA - G level [54.91 (6.75 ~ 282.72) U/ml; $P < 0.001$] and IL - 10 level [9.24 (1.61 ~ 41.77) pg/ml; $P < 0.001$] among patients with active HCMV infection as compared with that among healthy control subjects. Furthermore, no significant correlation was established between urine HCMV DNA load and levels of sHLA - G and IL - 10 ($P > 0.05$). **Conclusion** Plasma sHLA - G and IL - 10 levels were increased during active HCMV infection. No correlation was established between urine HCMV DNA load and levels of sHLA - G and IL - 10.

Key words HCMV; HLA - G; IL - 10

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 是一种普遍存在的 β 疱疹病毒, 发达国家人群 HCMV 的感染率为 40% ~ 60%, 发展中国家感染率更高, 且多在婴幼儿时期发生。在正常免疫功能的个体 HCMV 感染几乎不引起并发症, 但对发育不成熟的婴幼儿或免疫功能不全者可引起严重的临床症状^[1]。非经典的人白细胞抗原 - G (human leukocyte antigen - G, HLA - G) 已经被认为是一个重要的免疫抑制分子, 能够调节许多有免疫细胞, 如 NK 细胞、T 淋巴细胞和树突状细胞。HLA - G 分子的表达与免疫耐受、

器官移植、肿瘤和自身免疫性疾病等发病相关^[2]。在病毒感染中, 病毒感染的细胞中 HLA - G 的诱导表达被认为是帮助病毒破坏宿主抗病毒防御的一个机制^[3]。白细胞介素 - 10 (interleukin - 10, IL - 10) 为具有免疫抑制功能的细胞因子, 对免疫反应进行负性调节, HCMV 感染后会促进 IL - 10 的表达^[4]。本研究通过检测 HCMV 感染患儿血浆中可溶性 HLA - G (sHLA - G) 和 IL - 10 的水平, 探讨其在 HCMV 活动性感染中的意义。

对象与方法

1. 对象: 2010 年 10 月 ~ 2011 年 5 月温州医学院附属育英儿童医院收治确诊为 HCMV 活动性感染的患儿 75 例, 男性 41 例, 女性 34 例, 患者年龄 0.6 ~ 5.0 岁, 其中婴儿肝炎综合征 34 例, 支气管肺炎 19 例, 肠胃炎 22 例。诊断标准参照中

基金项目: 温州市对外合作交流科技计划项目 (H20090077)

作者单位: 325027 温州医学院附属第二医院检验科

通讯作者: 郑晓群, 电子信箱: zxq@wzhealth.com

华医学会儿科学分会 1999 年制定的巨细胞病毒感染诊断方案^[5]。活动性感染的诊断标准:血清 HCMV IgM 抗体阳性;外周血多形核白细胞(PMNLs)中 HCMV pp65 抗原阳性;双份血清 HCMV IgG 抗体效价呈≥4 倍增高;满足任何 1 项即可诊断为活动性感染。对照组 150 例为年龄和性别匹配的健康体检儿童,男性 82 例,女性 68 例。

2. 主要试剂与仪器: HCMV DNA 实时 FQ-PCR 试剂盒,由广州达安基因诊断有限公司提供; sHLA-G 测定试剂盒,由捷克 Exbio 公司提供; IL-10 测定试剂盒,由美国 Ray Biotech 公司提供; AB7500 荧光定量 PCR 仪,美国 AB 公司生产;全自动酶标仪 2010 型,丹麦 Bio-Cell 公司生产等。

3. 血浆 sHLA-G 测定:采用 ELISA 法。严格按照说明书操作步骤进行检测, sHLA-G 检测范围为 0~125U/ml,超出范围,稀释后重新测定。

4. 血浆 IL-10 测定:采用 ELISA 法。严格按照说明书操作步骤进行检测, IL-10 最低检测限是 1.0pg/ml。

5. 尿液 HCMV DNA 载量测定:采用实时荧光定量 PCR (FQ-PCR)法。取新鲜混匀晨尿 1ml,8000×g 离心 10min,弃上清加 DNA 裂解液 50 μl,混匀,沸水浴 10min,冷却后 10000×g 离心 5min,取上清液 2μl 作为模板进行实时 FQ-PCR 检测。具体按试剂盒说明书进行操作,每次实验做标准曲线,同时设置阳性、阴性和空白对照。

6. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析,组间 sHLA-G 与 IL-10 水平比较应用 Mann-whitney U 检验, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

结 果

1. HCMV 活动性感染患儿血浆 sHLA-G 和 IL-10 水平: HCMV 活动性感染患儿血浆 sHLA-G 水平[中位数,54.91(6.75~282.72)U/ml]明显高于对照组[中位数,21.32(1.07~260.35)U/ml],差异有统计学意义($P<0.001$);血浆 IL-10 的水平[中位数,9.24(1.61~41.77)pg/ml]明显高于对照组[中位数,1.82(1.03~3.98)pg/ml],差异有统计学意义($P<0.001$)。

2. HCMV 感染相关疾病患儿血浆 sHLA-G 和 IL-10 水平:75 例 HCMV 活动性感染患儿中,按婴儿肝炎综合征、支气管肺炎和肠胃炎分组,组间血浆 sHLA-G 与 IL-10 水平差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

表 1 HCMV 感染相关疾病组间血浆 sHLA-G 与 IL-10 水平比较

组别	n	sHLA-G (U/ml)	IL-10 (pg/ml)
		中位数(四分位数)	中位数(四分位数)
婴儿肝炎综合征	34	57.44(7.93~264.25)	12.24(1.61~31.60)
支气管肺炎	19	54.02(6.75~229.17)	11.69(2.49~41.77)
肠胃炎	22	49.47(14.59~282.72)	11.97(3.34~37.96)

3. 血浆 sHLA-G、IL-10 水平与尿液 HCMV DNA 载量的关系分析:75 例 HCMV 活动性感染患儿 HCMV DNA 载量的对数转化均值为 5.35 ± 1.24 ,经相关分析,血浆 sHLA-G 水平与尿液 HCMV DNA 载量的对数值间无明显相关性($r=0.198, P>0.05$);血浆 IL-10 水平与尿液 HCMV DNA 载量的对数值间无明显相关性($r=0.214, P>0.05$)。

讨 论

HCMV 能够引起广泛持续的感染,作为疱疹病毒家族的一员,整个生命周期可以分为产毒性感染,潜伏感染和再激活感染这 3 个时期。免疫力正常人群感染后一般呈隐性感染,但可终生携带病毒,一旦机体免疫力降低,可再次激活。HCMV 感染可导致儿童先天性畸形、智力低下、发育迟缓等中枢神经系统疾病,严重者可引起肝炎、肺炎和胃肠道疾病,甚至死亡^[1]。

HLA-G 基因属于非经典 HLA-I b 类基因,定位于第 6 号染色体短臂 6p21.3。到目前为止,证实 HLA-G 有 23 个等位基因(16 个位于外显子,7 个位于内含子)^[5]。HLA-G 通过与其特异性受体 ILT2 (LILRB1/CD85j)、ILT4 (LILRB2/CD85d) 和 KIR2DL4 (CD158d) 结合,抑制 DC、NK 细胞和 T 细胞的毒性作用,从而发挥免疫抑制效应,在维持母胎免疫耐受、肿瘤免疫逃避和促进病毒感染等机制中起到重要作用^[6]。我们研究表明, HCMV 活动性感染患儿血浆 sHLA-G 水平显著升高。HCMV 感染患者 HLA-G 的诱导表达可抑制许多免疫细胞的功能,包括抑制细胞毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞的细胞毒活性,诱导活化的 CD8 阳性的 T 细胞和 CD8 阳性的 NK 细胞的凋亡,抑制同种异基因 CD4 阳性 T 细胞的增生,干涉天然 CD4 阳性 T 细胞的启动^[7-9]。因此, sHLA-G 分子可帮助 HCMV 破坏宿主的防御,有助于病毒的播散,并能加重 HCMV 相关疾病。

许多因素例如细胞因子和 HLA-G 基因的遗传状态可以调节 HLA-G 的表达^[10]。在 HCMV 感染中能够普遍的观察到细胞因子表达的改变和其修饰。在病毒感染中, IL-10 已经被报道能够诱导 HLA-G 的表达。我们观察到 HCMV 活动性感染患儿血浆 IL-10 水平显著升高,但血浆 sHLA-G 和 IL-10 水平与尿液 HCMV DNA 载量之间没有相关性。总之,我们研究提示, HCMV 感染上调 HLA-G 的表达可能是 HCMV 破坏宿主防御的一个机制,但仍需要更多的研究来阐明 HCMV 感染时 HLA-G 表达的作用机制。

参考文献

- 1 Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments[J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4(12):725-738
 - 2 Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, *et al.* HLA-G: from biology to clinical benefits[J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(3):125-132
 - 3 Tripathi P, Agrawal S. The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection[J]. *AIDS*, 2007, 21(11):1395-1404
 - 4 武丽娜, 梁建芳, 郑绘霞, 等. TNF- α 、IL-10、bcl-2、bax 与人巨细胞病毒导致胚胎停育的相关性[J]. *山西医科大学学报*, 2008, 39(4):373-380
 - 5 Favier B, LeMaoult J, Rouas FN, *et al.* Research on HLA-G: an update[J]. *Tissue Antigens*, 2007, 69(3):207-211
 - 6 Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, *et al.* Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(44):16412-16417
 - 7 Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, *et al.* Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus[J]. *J Clin Virol*, 2008, 41(3):206-212
 - 8 Lin A, Yan WH, Xu HH, *et al.* HLA-G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function[J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(11):1804-1809
 - 9 Le Rond S, Azéma C, Krawice-Radanne I, *et al.* Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(5):3266-3276
 - 10 Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(3):209-232
- (收稿:2011-08-04)
(修回:2011-09-05)

哺乳期过度喂养致幼鼠肥胖及动脉粥样样病变

黄先玫 郑绪阳 袁静泊 李晓伟

摘要 目的 探讨 SD 大鼠哺乳期过度喂养乳汁与幼年大鼠肥胖及动脉粥样样病变的关系。**方法** 将出生第 3 天的雄性 SD 新生大鼠随机分为对照组和模型组,模型组 3 只一笼,过度喂养组 10 只一笼,每笼分别由其母孕鼠喂养至 21 天,断乳后两组大鼠均正常食料喂养 60 天,观察两组大鼠体重、身长,计算 Lee's 指数;测定附睾及肾周脂肪重量,计算体脂比;测定两组大鼠血糖、血脂、胰岛素,计算胰岛素敏感指数。HE 染色观察腹主动脉组织病理改变。**结果** 出生 21 天时,过度喂养组较对照组体重、脂体比、Lee's 指数明显增加($P < 0.05$, t 值分别为 -13.93, -2.73, -4.87),血胰岛素分泌和胰岛素敏感指数均较对照组高($P < 0.01$, t 值分别为 -10.217, 12.027),血糖无明显差异($t = -2.08$, $P > 0.05$)。出生后 60 天,过度喂养组较对照组体重、脂体比、Lee's 指数明显增加($P < 0.01$, t 值分别为 -10.55, -3.93, -5.99),血胰岛素分泌和胰岛素敏感指数、血糖和血三酰甘油均明显升高($P < 0.05$, t 值分别为 -2.26, -9.028, 9.734, -5.472)。生后 60 天过度喂养组大鼠腹主动脉内膜明显增厚伴纤维化,内膜与中膜间可见粥样斑块、泡沫细胞及散在钙化灶,中膜平滑肌细胞增多、排列紊乱、核深染,其长轴垂直于弹力纤维,血管壁向管腔内突出。**结论** 哺乳期过度喂养乳汁可致乳鼠肥胖,终止过度喂养后大鼠肥胖仍可持续至青春期并出现代谢综合征及动脉粥样样病变。

关键词 哺乳期 幼鼠 肥胖 动脉粥样样病变

Over-feeding During Lactation Induced the Obesity and Atherosclerosis of Rats in Adolescence. Huang Xianmei, Zheng Xuyang, Yuan Jingbo, Li Xiaowei. Department of Pediatrics, Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To investigate the effect of over-feeding during lactation on obesity and atherosclerosis of SD male rats in adolescence. **Methods** At postnatal 3 days, male rats were randomly distributed among the mothers. The litter size was adjusted to 10 newborns to induce normo-feeding (control) or to three rats to induce overfeeding (model). At postnatal 21 days, they were weaned and normal fed. 60 days later, a group of 6 were randomly selected to observed body weight, length, epididymal and perirenal fat weight, Lee's index, while animals in each group were measured for blood glucose, blood lipids, insulin and calculate insulin sensitivity index. HE stain we observed the pathological changes of the abdominal aorta. **Results** The body weight, body fat ratio, Lee's index, insulin secretion and insulin sensitivity index in over-feeding group were significantly higher than the control group ($P < 0.05$) at postnatal 21

基金项目:杭州市医药卫生科技基金资助项目(2007B002)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院儿科