

时的感染率有显著增强,并通过 real-time PCR 的 Ct 平均值进一步证实了病毒感染率的增强。

因 real-time PCR 实验过程中采用的样本为病毒感染细胞悬液后提取的核酸,故不需要设置标准曲线及内参,只需通过 Ct 值相对定量模板量。起始拷贝数越多, Ct 值越小。本实验中抗体稀释度为 1/2560 时的 Ct 平均值最小,即此稀释度的抗体-DV Ⅲ复合物感染 K562 后的病毒模板起始拷贝数最多,病毒感染率最强。在免疫荧光染色过程中,稀释度为 1/10、1/40、1/160、1/163840 的抗体与病毒结合感染细胞后,镜下染色结果显示这些稀释度的细胞均呈规律性脱落。原因未明,有待继续研究讨论。

本实验中我们通过摸索 DENV Ⅲ对 K562 的最佳感染条件及不同稀释度的抗体与 DENV Ⅲ结合感染 K562 的最佳稀释度建立了 DENV 的体外 ADE 模型,为体外研究登革热病毒抗体依赖性感染增强作用及登革热病毒感染引起的登革出血热和登革休克综合征的作用机制提供可靠的模型和实验基础。在后续的试验中我们将以此模型为基础对其进行蛋白质组学研究,结果将另文报道。

参考文献

- 1 Chunya P, Poonsook K, Nuanpan K, *et al.* Novel anti-dengue monoclonal antibody recognizing conformational structure of the prM-E heterodimeric complex of dengue virus [J]. J Med Virol, 2008, 80(1):125-133
- 2 Janjoree N, Sansanee N, Chunya P, *et al.* Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis[J]. Virus Research, 2010, 147(2):275-283
- 3 Susana V, Didy R, Rafael B, *et al.* Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010, 68(1):46-49
- 4 Liao HW, Xu J, Huang J. FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells[J]. Journal of Medical Virology, 2010, 82(8):1392-1399

- 5 Alegria L, Nereida V, Luz ME, *et al.* Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue[J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2010, 104(1):16-23
- 6 Kobporn B, Bonnie MS, Timothy HB, *et al.* Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection[J]. Journal of Virology, 2008, 86(6):3939-3951
- 7 Pathama K, Mingkwan P, Nitwara W, *et al.* Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways[J]. Virology, 2011, 409(2):189-197
- 8 Eduardo JM, Ana MS, Marli TC, *et al.* Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity[J]. Plos One, 2009, 4(8):e6782
- 9 Panisadee A, Anja F, Richard EH, *et al.* Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1[J]. JEM, 2010, 207(4):793-806
- 10 Erin M, Camilo AS, Syd J, *et al.* complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner[J]. Cell Host & Microbe, 2007, 2(6):417-426
- 11 Amanda TC, Elzinandes LA, Alessandro SM, *et al.* Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2009, 104(8):1091-1099
- 12 Panisadee A, Nuntaya P, Sansanee N, *et al.* Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral Protein NS1 and complement[J]. Journal of Infectious Diseases, 2006, 193(8):1078-1088
- 13 Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(1):33-42
- 14 Chunya P, Tanapan P, Nathaporn U, *et al.* The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus[J]. JCV, 2011, 50(4):314-319
- 15 朱玉兰,王佃鹏,甄胜西,等.登革热病毒 RNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].热带医学杂志,2009,9(11):1244-1246

(收稿日期:2012-02-27)

(修回日期:2012-03-21)

丙酸氟替卡松鼻喷雾剂对儿童过敏性鼻炎血清 VCAM-1、IL-4、IL-12 表达水平的研究

王 斌 王 戩 刘 锋 周水森

摘 要 目的 探讨儿童过敏性鼻炎患者血清血管细胞间黏附分子-1(VCAM-1)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院耳鼻咽喉头颈外科

通讯作者:刘锋,电子信箱:doctor_fliu@163.com

-12(IL-12)表达水平和作用,以及丙酸氟替卡松鼻喷雾剂的干预作用。**方法** 采用 ELISA 法检测 32 例变应性鼻炎患者应用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂治疗前、治疗 1 个月以后以及 20 例健康体检者外周血清 VCAM-1、IL-4、IL-12 水平。**结果** 过敏性鼻炎患者治疗前血清中 sVCAM-1、IL-4、IL-12 的含量与健康体检组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。过敏性鼻炎患者血清中 sVCAM-1、IL-4、IL-12 的含量经使用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂治疗前后比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。过敏性鼻炎患者治疗后血清中 sVCAM-1、IL-4、IL-12 的含量与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** VCAM-1、IL-4、IL-12 在过敏性鼻炎的发生发展中起着重要的作用。丙酸氟替卡松鼻喷雾剂鼻腔局部用药可以通过抑制 VCAM-1 和调节 Th1/Th2 型细胞因子的动态平衡来治疗过敏性鼻炎。

关键词 过敏性鼻炎 丙酸氟替卡松 血管细胞间黏附分子 Th1/Th2 细胞因子 白细胞介素-4 白细胞介素-12

Investigation of the Expression Level of sVCAM-1, IL-4 and IL-12 in Child-hood Patients with Allergic Rhinitis Treated with Fluticasone Propionate. Wang Bin, Wang Jian, Liu Feng, Zhou Shuimiao. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To investigate the expression level of serum vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-12 (IL-12), and study the role of fluticasone propionate in childhood patients with allergic rhinitis. **Methods** The expression level of VCAM-1, IL-4, IL-12 in 32 patients with allergic rhinitis and 20 normal men were detected by ELISA before the treatment, and 1 month after treatment. **Results** The expression level of VCAM-1, IL-4, IL-12 in patients with allergic rhinitis, was significantly different between the patient group and the control group. The expression level of VCAM-1, IL-4, IL-12 was significantly different in patients with allergic rhinitis before the treatment and post-treatment. The expression level of VCAM-1, IL-4, IL-12 in post-treatment patients was not significantly different to that in the control group. **Conclusion** VCAM-1, IL-4 and IL-12 may play an important role in development of allergic rhinitis. VCAM-1 and Th1/Th2 Cell factors can be down-regulated by fluticasone propionate.

Key words Allergic rhinitis (AR); Serum vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1); Th1/Th2 cell factors; Interleukin-4 (IL-4); Interleukin-12 (IL-12)

过敏性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 又称变应性鼻炎,是鼻腔黏膜的变应性疾病,并可引起多种并发症,临床上有常年性发作和季节性发作之分。它主要由 IgE 介导的 I 型变态反应,其发病机制是目前国内外研究的热点^[1,2],近年来,研究证明血清血管细胞间黏附分子-1 (serum vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)、白细胞介素 (interleukin, IL) 在过敏性鼻炎的发生、发展中发挥着重要的作用^[3,4]。本文通过丙酸氟替卡松鼻喷雾剂鼻腔局部用药治疗过敏性鼻炎,检测血清 VCAM-1、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 和白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 的表达水平变化,探讨外周血 sVCAM-1 的作用及 Th1/Th2 型细胞因子失衡的调节作用,为研究过敏性鼻炎的发病机制和相应的预防治疗措施提供理论基础。

资料与方法

1. 一般资料:选择 2011 年 1 月~2012 年 1 月在笔者医院门诊就诊的儿童过敏性鼻炎患儿 32 例,年龄 5~11 岁,平均年龄 8 岁。其中男性 20 例,女性 12 例,病程最长 5 年,最短 6 个月。诊断符合 2004 年兰州会议《变应性鼻炎的诊治原则和推荐方案》^[5] 的标准:具有鼻痒、喷嚏、鼻分泌物和鼻塞 4 项症状中至少 3 项,常年性者在有症状的日子里每日累计达 0.5~1.0h,鼻腔检查可见鼻黏膜苍白、水肿或充血、肿胀。另取同

期笔者医院健康体检中心的健康体检者为正常对照组 20 人,男性 13 例,女性 7 例,年龄 5~11 岁,排除过敏性鼻炎及哮喘,近 1 个月内均未服用过糖皮质激素。所有患者既往未经任何手术治疗,且无糖皮质激素应用的禁忌证。

2. 治疗方法:32 例 AR 患者均按照说明应用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂治疗,开始每个鼻孔各 1 喷,每喷 50 μ g,2 次/天。视症状消失情况,3~10 天后减为每个鼻孔各 1 喷,1 次/天,再用至 1 个月后来院抽取静脉血,未辅助其他治疗。

3. 标本采集、试剂及试验方法:AR 组标本于治疗前与治疗 1 个月均常规取空腹静脉血 5ml,对照组取空腹静脉血 5ml,所有血液标本均经离心、提取血清、分装、保存于 -30℃ 待检。人 sVCAM-1、IL-4、IL-12 的 ELISA 试剂盒均购自深圳晶美生物制品公司,实验步骤按照试剂盒说明书进行。

4. 统计学方法:测得的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,样本均数比较采用两样本 t 检验或配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

结 果

从表 1 可以看出,AR 组治疗前血清中 sVCAM-1、IL-4、IL-12 的含量与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。AR 组治疗前后患者血清中 sVCAM-1、IL-4、IL-12 的含量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。AR 组治疗后 AR 患者血清中 sVCAM-1、IL-4、IL-12 的含量与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 AR组治疗前后分别与正常对照组血清sVCAM-1、IL-4、IL-12的比较(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	sVCAM-1	IL-4	IL-12
AR组治疗前	32	88.58 ± 14.54 *	78.51 ± 14.34 *	25.94 ± 17.52 *
t		2.746	2.235	-2.179
AR组治疗后	32	47.95 ± 13.33	44.72 ± 14.23	58.53 ± 18.91
t		0.221	0.530	-0.688
对照组	20	44.39 ± 11.27	42.57 ± 15.56	61.32 ± 18.83

讨 论

变应性鼻炎是有多种免疫细胞和细胞因子参与的,由IgE介导的I型变态反应,其相互作用和调节机制目前尚不完全清楚。近年来,研究发现AR患者嗜酸性粒细胞通过VCAM-1向炎性组织选择性趋化,Th1/Th2细胞失衡可能与AR的发生、发展密切相关。因此,研究阐明AR发病机制各个环节的作用和角色,有望为变应性鼻炎的发病机制提供新的理论依据和相应的预防治疗措施。

在某些致炎因子的刺激下(如TNF- α 、LPS等),促进血管内皮细胞表面的P2Y6受体表达,进而激活了下游的NF- κ B信号通路,导致细胞内大量生物学活性物质的产生、释放,如IL-8、VCAM-1、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)等^[6]。VCAM-1释放入血与嗜酸性粒细胞表面的配基VIA-4结合才能发挥其生物学活性,促进嗜酸性粒细胞的定向移动。本研究发现过敏性鼻炎患者血清中VCAM-1的含量高于正常对照组($P < 0.05$)。经糖皮质激素治疗后,32例过敏性鼻炎患者的鼻塞、打喷嚏、流清涕等症状均有不同程度的减轻,血清中sVCAM-1的含量与正常对照组比较无明显差异,但在治疗前后AR患者血清中VCAM-1的含量比较,差异有显著性。研究提示,VCAM-1在过敏性鼻炎的发生、发展、预后的过程中起着重要的作用,通过阻断P2Y6受体介导的NF- κ B信号通路,抑制血管内皮细胞生成VCAM-1,有望成为治疗过敏性鼻炎的新靶点。探索糖皮质激素在VCAM-1形成阶段阻断其产生、释放和在趋化阶段阻断与嗜酸性粒细胞表面的配基VIA-4结合的机制,为进一步完善过敏性疾病的发病机制提供了更有力的理论基础,在诊断、治疗、预防等方面具有重要的理论指导意义和广泛的临床应用价值。

近年来研究已证实变应性鼻炎的发病涉及全身性因素。T细胞是唯一直接和抗原发生反应的细胞,Th前体细胞在抗原刺激下,分化为中间阶段的Th0细胞,Th0细胞又在不同因素作用下选择性地分化为

两个亚群:Th1细胞和Th2细胞,前者介导细胞免疫,后者介导体液免疫。正常情况下Th1、Th2细胞相互协调、相互抑制,通过保持动态平衡,维持机体的正常生理功能。而在AR发病过程中存在Th1和Th2细胞及其细胞因子网络平衡的失衡,黏膜局部Th2细胞浸润,Th2免疫活性过度增高,血清和鼻黏膜组织匀浆中IL-4等Th2细胞因子的含量明显增加,IL-12等Th1细胞因子水平降低。IL-4作为Th2细胞的特征性细胞因子,能抑制Th1细胞产生细胞因子的能力,并能增强B细胞对T细胞的相互作用,促进体液免疫应答,特别是作为IgE的特异性诱导剂促进IgE介导的免疫应答反应。正常情况下,两者处于相对平衡状态,维持着机体正常的细胞免疫和体液免疫功能。当机体受到异常抗原刺激时,上述平衡被打破,Th1、Th2细胞中Th2亚群功能升高,而Th1亚群功能降低,即可引起异常的免疫应答。而有研究表明Th1和Th2细胞间免疫反应失衡是导致变应性鼻炎的免疫学基础^[7,8]。本文试验结果显示,AR患者Th1类细胞因子IL-12显著降低,而Th2类细胞因子IL-4显著升高,经过糖皮质激素治疗后,二者恢复至与健康查体组无明显差异,提示丙酸氟替卡松鼻喷雾剂可诱导Th1细胞分化、成熟,促进其细胞因子IL-12的表达,抑制Th2细胞分化、成熟及其细胞因子IL-4的产生;促进Th1/Th2细胞趋向平衡,通过对Th1/Th2失衡的调节,可以有效防治AR的发生、发展。

鼻用糖皮质激素作为局部用药,其优势在于与局部受体结合发挥作用,其生物利用率低,全身不良反应小,可以长期使用。但市场上有多种糖皮质激素的鼻喷雾剂型,本研究选择丙酸氟替卡松鼻喷雾剂,是其剂量小,每喷50 μ g,儿童使用时不致过量引起不良反应。近年来有许多文献报道,成人过敏性鼻炎患者使用其他糖皮质激素对外周血清VCAM-1、IL-4、IL-12表达水平改变,效果确切,对于儿童的研究限于失访等原因,目前没有文献报道,本研究也是做了大量工作才得以完善,但对于儿童有无远期影响尚需进一步论证。

参考文献

- 1 Dosanjh A. Allergic rhinitis and childhood sleep disordered breathing [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2009, 37(3):171-172
- 2 Kamisawa T, Anjiki H, Egawa N, *et al.* Allergic manifestations in autoimmune pancreatitis [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(10):1136-1139
- 3 Petti FB, Liguori A, Ippoliti F. Study on cytokines IL-2, IL-6, IL-10 in patients of chronic allergic rhinitis treated with acupuncture [J]. *J Tradit Chin Med*, 2002, 22(2):104-111
- 4 Mats W, Johansson H, Steven R, *et al.* Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(4):413-422
- 5 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会, 中华医学会耳鼻咽喉科分会. 变应性鼻炎的治疗原则和推荐方案 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 40(3):166-167
- 6 Riegel AK, Faigle M, Zug S, *et al.* Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation [J]. *Blood*, 2011, 117(8):2548-2555
- 7 Baars EW, Savelkoul HF. Citrus/Cydonia comp. can restore the immunological balance in seasonal allergic rhinitis-related immunological parameters in vitro [J]. *Mediators Inflamm*, 2008, 20(3):496-497
- 8 Xiao C, Li H, Li H, *et al.* The effect of specific immunotherapy on the regulation of Th1/Th2 cell ratio of the patients with allergic rhinitis in serum [J]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2010, 24(20):924-927 (收稿日期:2012-05-30)
(修回日期:2012-06-26)

CXCR7 在急性肝衰竭大鼠肝组织中的表达及意义

洪 巧 王柯尹 董进忠 施春玮 卢明芹 陈永平

摘 要 **目的** 探讨急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)大鼠肝组织内趋化因子受体 7(chemokine acceptors, CXCR7)的表达变化及意义。**方法** 36 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组和急性肝衰竭(ALF)组, ALF 组同时腹腔注射 D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)和脂多糖(D-galactosamine, LPS)诱导模型建立, 分别于注射后 2、6、12、24、48h 留取血清及肝组织; 采用 HE 染色, 光学显微镜下观察肝组织病理变化; 采用 RT-PCR、Western blot 法检测 CXCR7 mRNA 及 CXCR7 蛋白质表达水平; 同时检测血清 ALT、AST 水平; 统计处理采用 LSD 检验和 Dunnet's T 检验。**结果** ALF 组 24、48h 时肝组织病理呈现大量炎性细胞浸润和明显坏死; ALF 组血清 ALT、AST 水平于 24h 达高峰且分别明显高于正常组(4670.667 ± 372.436 U/L, 30.667 ± 3.670 U/L; 4930.333 ± 81.158 U/L, 67.667 ± 8.140 U/L, $P < 0.01$); 在 2、6、12、24、48h 时, ALF 组 CXCR7 mRNA 与 β -肌动蛋白(β -actin)吸光度比值分别为 1.106 ± 0.017 、 1.231 ± 0.014 、 1.249 ± 0.013 、 1.159 ± 0.014 、 1.095 ± 0.028 , 各时间点与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); CXCR7 蛋白与 GAPDH 灰度值比值分别为 0.520 ± 0.011 、 0.536 ± 0.007 、 0.587 ± 0.005 、 0.712 ± 0.004 、 0.579 ± 0.098 , 各点与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 成功诱导 ALF 大鼠模型建立, ALF 时 CXCR7 mRNA 及 CXCR7 蛋白质表达可能在肝组织损伤过程中发挥重要作用。

关键词 肝衰竭 急性 趋化因子受体 CXCR7

Dynamic Expressions of CXCR7 in Rats with Acute Hepatic Failure and Its Significance. Hong Qiao, Wang Keyin, Dong Jinzhong, Shi Chunwei, Lu Mingqin, Chen Yongping. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the dynamic expressions of CXCR7 in rats with acute hepatic failure(ALF) and its significance after building the ALF model. **Methods** Thirty-six male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal group and model group(ALF group). The rat models were established by intraperitoneal injection of D-galactosamine(D-Gal) + Lipopolysaccharide(LPS). At 2, 6, 12, 24 and 48 h time point after injection, the serum were used to detect ALT and AST. The liver pathologic changes were observed with HE staining by microscope. The mRNA expressions of CXCR7 mRNA were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) and CXCR7 were detected by Western blot. **Results** In ALF group, The liver pathologic changes were most serious at 24h and 48h. The serum levels of ALT and AST were significantly increased at 24h compared to those in normal group(4670.667 ± 372.436 U/L, 30.667 ± 3.670 U/L; 4930.333 ± 81.158 U/L, 67.667 ± 8.140 U/L, $P < 0.01$), respectively. While the CXCR7 mRNA/ β -

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY12H3002);温州市科技计划基金资助项目(Y20090277)

作者单位:325000 温州医学院第一附属医院

通讯作者:卢明芹, 电子信箱:lmq0906@163.com