

儿童腺病毒肺炎患儿部分细胞因子水平及临床意义*

樊慧峰¹, 卢秉泰², 黄莉³, 杨迪元¹, 卢根^{1**}, 张明杰⁴, 施婷婷¹

(1. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心 呼吸科, 广东 广州 510623; 2. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心 儿科研究所, 广东 广州 510623; 3. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心 儿童重症监护室, 广东 广州 510623; 4. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心 影像科, 广东 广州 510623)

[摘要] 目的: 分析不同病情腺病毒肺炎患儿血浆以及肺泡灌洗液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及干扰素 γ (IFN- γ)水平。方法: 腺病毒肺炎患儿36例分为轻症和重症两组, 并选取同期的12例健康儿童作为对照组, 采用流式细胞仪检测3组儿童血浆及轻重症组腺病毒肺炎患儿支气管肺泡灌洗液中的IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、TNF- α 及IFN- γ 水平。结果: 与对照组比较, 腺病毒肺炎患儿血浆中IL-4、IL-5、IFN- γ 水平均明显降低, 而TNF- α 、IL-6水平明显升高($P < 0.05$); 在急性期腺病毒肺炎患儿肺泡灌洗液中IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-9、IFN- γ 水平明显高于血浆($P < 0.05$); 轻重症患儿血浆中IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-9、IFN- γ 水平比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 重症腺病毒肺炎患儿急性期肺泡灌洗液中的IL-6、IL-8、IFN- γ 水平均显著高于轻症腺病毒肺炎组($P < 0.05$)。结论: 急性期腺病毒肺炎患儿肺部炎症反应重于全身炎症反应, 重症患儿肺部炎症反应更为严重, TNF- α 和IL-6可能作为预测重症腺病毒肺炎的指标。

[关键词] 腺病毒肺炎; 儿童; 血浆; 支气管肺泡灌洗液; 白细胞介素类; 肿瘤坏死因子 α ; 干扰素 γ

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)05-0606-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.05.022

Clinical Significance of Cytokines in Children with Adenovirus Pneumonia

FAN Huifeng¹, LU Bingtai², HUANG Li³, YANG Diyuan¹, LU Gen¹, ZHANG Mingjie⁴, SHI Tingting¹

(1. Department of Respiratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, Guangdong, China; 2. Guangzhou Institute of Pediatrics, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, Guangdong, China; 3. Pediatric Intensive Care Unit, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, Guangdong, China; 4. Department of Radiology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To investigate the cytokines levels in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in children with adenovirus pneumonia. **Methods:** Thirty-six children with adenoviral pneumonia were enrolled and divided into mild group and severe group. Twelve healthy children in the same period were selected as the control group. Flow cytometry was used to detect levels of cytokines including IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, TNF- α and IFN- γ in plasma and BALF. **Results:** Compared with the control group, levels of plasma IL-4, IL-5 and IFN- γ were significantly decreased in children with adenoviral pneumonia, while levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased ($P < 0.05$). In acute phase, the levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-9 and IFN- γ in BALF were significantly higher than those in plasma in children with adenovirus pneumonia ($P < 0.05$). There were no signifi-

*[基金项目]广东省科技计划项目(2014A020212020)

**通信作者 E-mail:lugen5663330@sina.com

网络出版时间:2019-05-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190528.0228.022.html>

cant differences in the levels of plasma IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-9 and IFN- γ between mild group and severe group ($P > 0.05$). At the acute phase, the levels of IL-6, IL-8, IFN- γ in BALF were remarkably higher in severe group than those in mild group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The pulmonary inflammatory response in children with adenovirus pneumonia at acute phase is more serious than systemic inflammatory response. The pulmonary inflammation is more serious in severe group. More importantly, the level of TNF- α and IL-6 may be used as indicators to predict severity of adenovirus pneumonia.

[**Key words**] adenovirus pneumonia; children; plasma; bronchoalveolar lavage fluid; interleukin; tumor necrosis factor- α ; interferon- γ

人腺病毒(human adenovirus, HAdV)是引起儿童呼吸道感染的最常见病原之一,亦是婴幼儿病毒性肺炎的主要病原,其引起肺炎的严重程度也往往重于年长儿,重症腺病毒肺炎发病快、病情重、并发症多、病死率较高^[1-2]。目前对于腺病毒感染没有靶向的治疗手段,重症患儿通常采用糖皮质激素短期抗炎,同时结合免疫球蛋白对症支持治疗。支气管镜肺泡灌洗可以清除病原、坏死脱落组织及细胞,解除支气管阻塞^[3-4],对肺实变的治疗具有重要意义。但是,经过积极治疗后,仍有部分患儿遗留不同程度的后遗症,如闭塞性细支气管炎、支气管扩张、肺透明膜病以及肺纤维化等^[1,5-6]。重症腺病毒肺炎急性期致死率高,同时可引起严重后遗症导致病情迁延反复且预后不良,对儿童的生长及心理发育产生深远的影响。造成重症腺病毒肺炎不同临床表型的机制仍未明确,尤其对病变部位的局部免疫损伤机制并不清楚。因此,本研究检查不同时期、不同病情腺病毒肺炎血浆及肺泡灌洗液中的 IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、TNF- α 及 IFN- γ ,分析这些细胞因子表达谱变化与肺损伤的免疫调控机制及临床意义。

1 资料与方法

1.1 对象

选取 2015 年 12 月~2018 年 12 月符合社区获得性肺炎诊断标准、并进行咽拭子荧光 PCR 检测 ADV 核酸阳性者和(或)血清、肺泡灌洗液 ADV-IgM 抗体阳性、诊断为腺病毒肺炎的 36 例住院患儿作为研究对象,其中男 23 例、女 13 例,年龄 4~72 个月、中位数 22 个月。根据患儿严重程度分为轻症组及重症组,轻症 19 例、重症 17 例,两组患儿的临床特征见表 1。同时选取 12 例健康儿童作为对照组,3 组备检儿童性别、年龄比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。重症腺病毒肺炎标准:(1)

呼吸困难与缺氧症状明显、吸氧后不能缓解,(2)明显中毒症状,(3)心力衰竭,(4)肺部湿性啰音密集、影像提示大片阴影或实变(肺实变大于 1 个肺叶或肺弥漫性渗出达 3 个肺叶以上),(5)合并症如脓胸、脓气胸等;凡具有上述诊断标准 1 项及以上者诊断为重症腺病毒肺炎。排除标准:伴有支气管哮喘、肺结核等其他呼吸系统疾病,伴有免疫缺陷疾病,近期服用过糖皮质激素或者免疫抑制剂等,合并有其它病原感染,合并有严重先天性心脏病、重度营养不良患儿。

1.2 方法

1.2.1 支气管镜取肺泡灌洗液 所有腺病毒肺炎患儿(轻症和重症)胸部影像提示有肺实变征象,符合纤维支气管镜术指征,操作在中度镇静和局麻下进行,肺泡灌洗液收集部位在病变受累最明显部位[主要通过肺部影像和(或)胸部高分辨 CT 观察得到],37℃温盐水灌注 3 至 5 次,每次 5~10 mL(灌注总量约 3~5 mL/kg),回收肺泡灌洗液 $\geq 40\%$ 灌入量为合格。抽取对照组静脉血 2 mL,腺病毒肺炎患儿肺泡灌洗液及静脉血同时送检,测定血浆部分细胞因子水平。所有患儿监护人均签署支气管镜操作知情同意书。

1.2.2 部分细胞因子测定 取对照组儿童血浆两组腺病毒肺炎患儿入院后 72 h 以内血浆及肺泡灌洗液(急性期),使用美国 Bio-Rad 公司提供的“Bio-Plex Pro Human Cytokine plex Assay kit”试剂盒,采用流式细胞术测定细胞因子包括白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及干扰素 γ (IFN- γ)在血浆及肺泡灌洗液中的含量,细胞因子检测和分析系统为 Bio-plex 200 系统,实验步骤按照说明书进行。

1.3 统计学处理

数据表示为中位数及范围,连续变量的两组分析采用非参数 Mann-Whitney U 检验,配对样本血

浆与肺泡灌洗液比较采用 Wilcoxon 配对有符号秩检验,二分类变量采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。所有数据均使用 Prism 7.0 (GraphPad Software) 进行分析。

表 1 腺病毒肺炎患儿临床特征

Tab. 1 Clinical characteristics of children with adenovirus pneumonia

临床特征	轻症($n=19$)	重症($n=17$)	P
人口学特征			
年龄[中位数(范围),月]	14.5(8~66)	10.5(4~72)	0.122 4
男性($n, \%$)	10(52.6)	13(76.5)	0.182 5
症状及体征			
发热时长[中位数(范围),d]	5.5(1~16)	13(5~35)	0.084 7
咳嗽时长[中位数(范围),d]	22(21~31)	28(10~42)	0.872 9
气促 ⁽¹⁾ ($n, \%$)	0(0)	17(100)	<0.000 1
胃肠道症状 ⁽²⁾ ($n, \%$)	4(21.1)	10(58.8)	0.038 8
呼吸衰竭 ⁽³⁾ ($n, \%$)	0(0)	9(52.9)	0.000 3
实验室检查			
WBC[中位数(范围), $\times 10^9/L$]	8.8(7.6~22.2)	7.1(2.4~23.7)	0.067 0
HsCRP[中位数(范围),mg/L]	2.98(0.6~28.43)	15.745(0.26~29.58)	0.024 4
LDH[中位数(范围),U/L]	290(245~341)	397(304~1 444)	0.016 4
影像学			
肺实变($n, \%$)	19(100.0)	17(100.0)	1
受累肺叶>1($n, \%$)	2(10.5)	17(100.0)	<0.000 1
后遗症($n, \%$)			
闭塞性细支气管炎	0(0.0)	2(11.8)	0.215 9
肺间质纤维化	0(0.0)	1(5.9)	0.472 2
支气管扩张	0(0.0)	1(5.9)	0.472 2

注:⁽¹⁾标准为<2月龄呼吸频率 ≥ 60 次/分,2月龄~1岁呼吸频率 ≥ 50 次/分,1~5岁呼吸频率 ≥ 40 次/分,>5岁呼吸频率 ≥ 30 次/分;⁽²⁾包括食欲下降,呕吐,大便次数增多等;⁽³⁾除气促外,动脉血气提示 $PaO_2 < 50$ mmHg(6.7 kPa)和(或) $PaCO_2 > 50$ mmHg(6.7 kPa)

2 结果

2.1 急性期腺病毒肺炎患儿及对照组儿童血浆细胞因子

与对照组儿童比较,急性期腺病毒肺炎患儿血浆 IL-4、IL-5、IFN- γ 水平均明显降低,而 TNF- α 、IL-6 水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 急性期腺病毒肺炎患儿血浆及肺泡灌洗液中细胞因子

36 例患儿同时留取肺泡灌洗液及血浆测定细胞因子,肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-9、TNF- α 、IFN- γ 水平明显高于血浆,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 急性期轻症及重症腺病毒肺炎患儿血浆及肺泡灌洗液中细胞因子

急性期轻、重症患儿血浆中 IL-1 β 、IL-4、IL-5、

表 2 急性期腺病毒肺炎患儿与对照组儿童血浆 8 种细胞因子水平 [中位数,(范围)]

Tab. 2 Comparison of plasma cytokines in children with adenovirus pneumonia and healthy controls

细胞因子	血浆(ng/L)		P
	对照组($n=12$)	患儿($n=36$)	
IL-1 β	2.19(0.58~5.05)	1.73(0.13~7.34)	0.130 4
IL-4	3.26(0.36~5.50)	0.52(0.09~3.67)	<0.000 1
IL-5	12.95(7.82~24.97)	0.17(0.17~19.22)	<0.000 1
IL-6	0.37(0.37~2.17)	2.02(0.13~9.63)	0.013 9
IL-8	5.35(1.31~9.33)	3.59(0.84~23.08)	0.595 8
IL-9	9.83(0.46~49.44)	3.59(0.84~23.08)	0.343 7
TNF- α	10.495(0.06~90.50)	40.05(3.78~100.00)	0.000 3
IFN- γ	112.67(61.12~323.05)	2.23(0.14~125.81)	<0.000 1

IL-6、IL-8、IL-9、TNF- α 及 IFN- γ 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 2A;而急性期重症腺病毒肺炎组患儿肺泡灌洗液中的 IL-6、IL-8、IFN- γ 水平均显著的高于轻症腺病毒肺炎患儿($P < 0.05$),见图 2B。

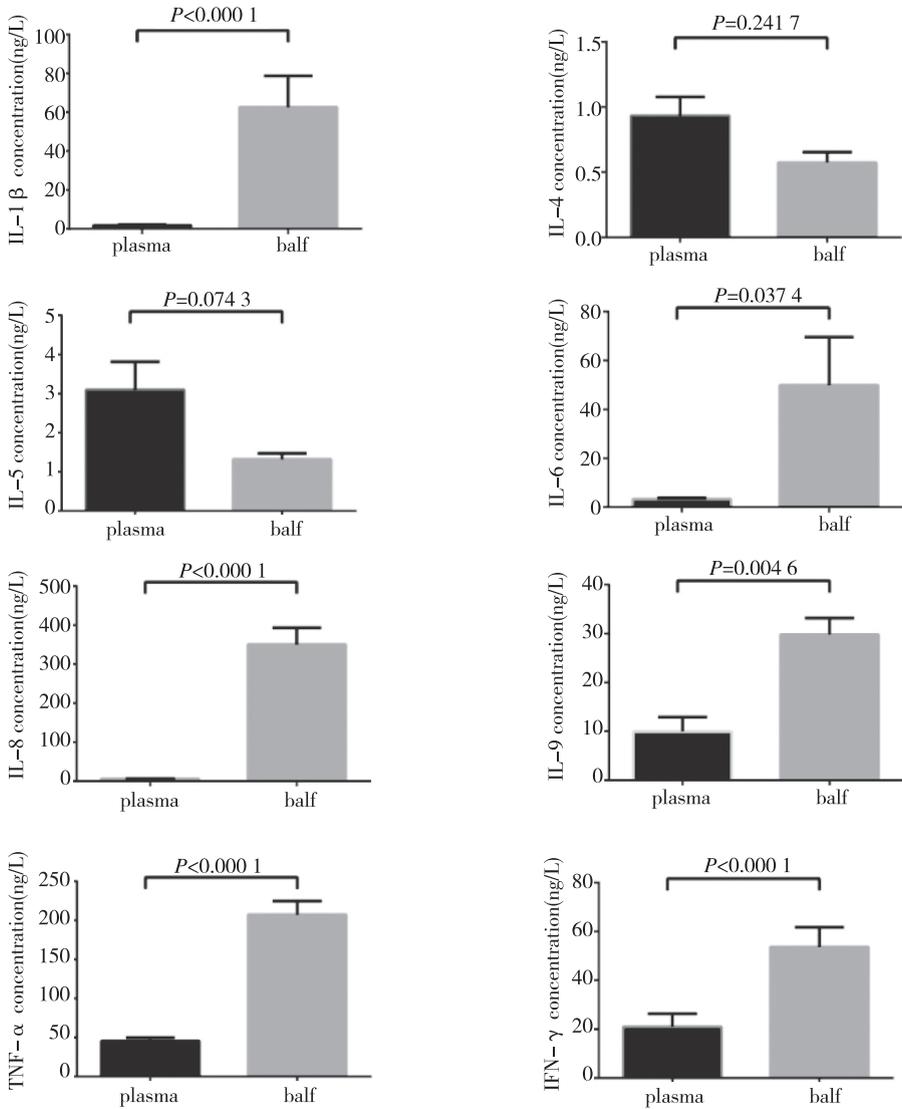


图1 腺病毒肺炎患儿血浆及肺泡灌洗液中8种细胞因子水平

Fig.1 Comparison of cytokines in plasma and BALF in children with adenovirus pneumonia

3 讨论

HAdV 是儿童急性呼吸道感染的重要病原之一。近年来 HAdV 感染在全球范围内出现过广泛流行,部分引起严重的腺病毒肺炎,重症患儿病情重、进展快、病程迁延,中毒症状重,可伴有多种严重并发症如呼吸衰竭、肺不张、单侧透明肺等。部分遗留肺纤维化,闭塞性细支气管炎,支气管扩张等后遗症^[5-7]。本组患儿重症组较轻症组临床上主要表现为发热时间长,常伴有胃肠道症状,气促明显甚至发生呼吸衰竭。实验室检查为 CRP 和 LDH 增高明显,肺部影像提示受累范围广泛,常伴

有超过一个肺叶肺实变,部分患儿合并有胸腔积液。提示重症患儿无论是从临床表现,实验室检查以及肺部受累方面都不同于轻症患儿。

目前,造成重症腺病毒肺炎不同临床表型的机制仍未明确,但认为与病毒亚型和滴度以及宿主的免疫动态相关。腺病毒呼吸道感染的严重程度除了和病毒的致病力相关外,也和机体的免疫应答能力相关。免疫系统的激活和细胞因子或炎性介质的产生在炎性反应的激活以及组织损伤机制中起非常重要的作用^[8]。本组腺病毒肺炎患儿与对照组比较,血浆中 IL-4、IL-5、IFN-γ 水平均明显降低,而 TNF-α、IL-6 水平明显升高,差异具有统计学意义。说明这些细胞因子可能参与了腺病毒感染的

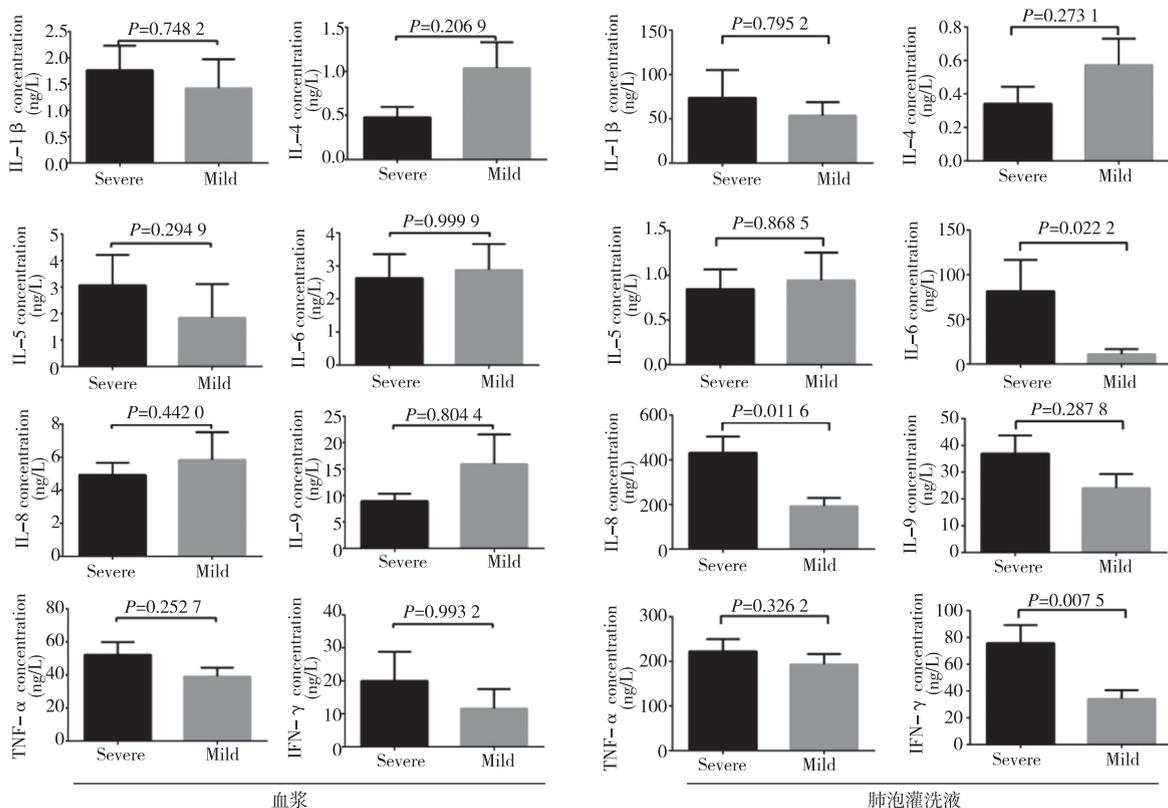


图2 急性期轻重腺病毒肺炎患儿血浆及肺泡灌洗液8种细胞因子水平比较

Fig. 2 Comparison of cytokines in plasma and BALF between mild adenovirus pneumonia and severe adenovirus pneumonia at acute phase

发病。IL-4 是一种多功能的细胞因子,一方面通过诱导 T 细胞分化,加强炎性细胞因子的释放,促进炎症的发生,另一方面可以促使自身抗体的产生,诱导自身免疫性疾病的发生。本组腺病毒患儿急性期血清中 TNF-α、IL-6 水平明显升高,提示在腺病毒感染状态下,机体 TNF-α、IL-6 合成及释放增多。IL-6 可由单核巨噬细胞、淋巴细胞、上皮细胞等多种细胞产生,当机体处于健康状态时 IL-6 分泌很少,而在炎症和感染的状态下,单核-巨噬细胞和 T 淋巴细胞会合成释放大量 IL-6^[8-9]。结合本实验结果提示 TNF-α、IL-6 合成及释放的程度可能与重症腺病毒感染的发生、发展有密切关系。

针对评估下呼吸道感染局部的免疫机制,支气管肺泡灌洗目前为非常有价值的研究手段。肺泡巨噬细胞被认为是腺病毒感染后初始细胞因子信号源。在小鼠模型研究显示在腺病毒感染后 30 min, TNF-α、IL-6 的 mRNA 首先在巨噬细胞中表达,而不是气道上皮细胞和血管内皮细胞^[10]。因此本组腺病毒肺炎患儿急性期肺泡灌洗液和血浆中细胞因子比较, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-9, TNF-α,

IFN-γ 在肺泡灌洗液中明显增高。提示肺泡灌洗液中细胞因子水平较血浆更能反映患儿的病情严重程度及局部的免疫状况。有研究表明, IL-4 在难治性支原体肺炎 (refractory mycoplasma pneumonia, RMPP) 急性期肺泡灌洗液中增高明显,对 RMPP 疾病的进展具有重要的鉴别意义^[11]。但本组患儿 IL-4 在急性期血浆中是降低的,肺泡灌洗液中也未见增高,是由于病原不同导致免疫反应机制不同,还是本研究样本量偏小所致不得而知,还需要今后进一步深入研究。IL-6 可以诱导 T 细胞分化,进而加强其他炎性因子的释放,促进炎症发生。TNF-α 能趋化激活中性粒细胞,促进黏附分子表达,参与内毒素性休克等^[12]。TNF-α、IL-6 在本组腺病毒肺炎患儿急性期血浆及肺泡灌洗液中均增高,提示 TNF-α、IL-6 既能反映出全身又能反映出局部的免疫反应,与机体的免疫调节及肺部炎性反应的过程均有关。而且其过度表达可能参与了患儿肺部的免疫损伤。TNF-α 和 IL-6 可能作为预测重症腺病毒肺炎的指标。

本研究发现,重症腺病毒肺炎组急性期肺泡灌

洗液中的 IL-6、IL-8、IFN- γ 水平均显著的高于轻症腺病毒肺炎组,提示血浆中细胞因子水平并不能及时反映出肺部的炎症状况和疾病的严重程度。IL-6、IL-8、IFN- γ 等细胞因子在宿主的防御反应中起重要作用,能增强 T 细胞、NK 细胞及 B 细胞等的免疫活性^[13-14]。IFN- γ 由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,能够激活巨噬细胞以发挥其吞噬受病原体感染的细胞的功能,并可破坏病原体而作为一种抗炎细胞因子。本组腺病毒肺炎急性期患儿血浆中 IFN- γ 水平较对照组均明显降低,但在肺泡灌洗液中却明显升高,而且重症患儿 IFN- γ 水平高于轻症患儿,推测有可能在重症急性期患儿分泌 IFN- γ 的相关细胞从外周血迁移至靶器官肺部发挥作用。

综上所述,IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-9、TNF- α 及 IFN- γ 等可能参与了腺病毒呼吸道感染的发病。急性期腺病毒肺炎患儿肺部炎症反应重于全身炎症反应,而重症患儿表现为更为强烈的局部炎症反应,与轻症患儿也有所不同。TNF- α 和 IL-6 可能作为预测重症腺病毒肺炎的指标。

4 参考文献

[1] LOW S Y, TAN T T, LEE C H, et al. Severe adenovirus pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation support-Serotype 7 revisited[J]. *Respir Med*, 2013, 107(11):1810-1813.

[2] WANG Y F, SHEN F C, WANG S L, et al. Molecular epidemiology and clinical manifestations of adenovirus respiratory infections in taiwanese children[J]. *Medicine (Baltimore)*, 1995(18):e3577.

[3] SILVA R C, SIMONS J P, CHI D H, et al. Endoscopic treatment of plastic bronchitis[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011, 137(4):401-403.

[4] ZHANG J, KANG X. Plastic bronchitis associated with influenza virus infection in children: a report on 14 cases[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2015, 79(4):481

-486.

[5] LEE J, CHOI E H, LEE H J. Clinical severity of respiratory adenoviral infection by serotypes in Korean children over 17 consecutive years (1991-2007) [J]. *J Clin Virol*, 2010, 49(2):115-120.

[6] HONG J Y, LEE H J, PIEDRA P A, et al. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis[J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 32(10):1423-1429.

[7] LI Y N, LIU L, QIAO H M, et al. Post-infectious bronchiolitis obliterans in children: a review of 42 cases[J]. *BMC Pediatrics*, 2014, 14(1):238.

[8] CHEN R F, LEE C Y. Adenoviruses types, cell receptors and local innate cytokines in adenovirus infection[J]. *Int Rev Immunol*, 2014, 33(1):45-53.

[9] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014, 6(10):a016295.

[10] ZSENGELLER Z, OTAKE K, HOSSAIN S A, et al. Internalization of adenovirus by alveolarmacrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection [J]. *J Virol*, 2000, 74(20):9655-9667.

[11] 蓝引乐, 杨德华, 陈志敏, 等. 甲泼尼龙治疗儿童难治性肺炎支原体肺炎的效果及患儿肺泡灌洗液细胞因子改变[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(10):779-783.

[12] MAZZON E, CUZZOCREA S. Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation [J]. *Respiratory Research*, 2007, 8(1):75.

[13] ALLEN T C, KURDOWSKA A. Interleukin 8 and acute lung injury[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2014, 138(2):266-269.

[14] ZHANG P, SUMMER W R, BAGBY G J, et al. Innate immunity and pulmonary host defense[J]. *Immunological Reviews*, 2010, 173(1):39-51.

(2019-02-10 收稿, 2019-04-25 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳