

【论著】

文章编号:1000-7423(2002)-06-0348-03

脑囊尾蚴病患者 Th2 型细胞因子的研究

徐宏秀 贾凤菊 刘玉冰 徐靖 魏冬冬

【摘要】 目的 探讨脑囊尾蚴病患者 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10、IL-13 水平及其免疫调控作用。方法 用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离淋巴细胞,按异硫氰酸胍一步法提取 RNA,在逆转录酶作用下合成 cDNA,用 PCR 法对 cDNA 进行扩增,最后对扩增产物进行电泳鉴定。结果 30 例脑囊尾蚴病患者外周血淋巴细胞,发现 27 例有细胞因子表达,3 例未检测到细胞因子。在 27 例有细胞因子表达的患者中,IL-4、IL-10、IL-13 的表达分别为 16 例、17 例和 14 例,27 例均有 IL-4 和(或)IL-10 和(或)IL-13 表达。10 例健康人外周血淋巴细胞仅发现 1 例表达低水平的 IL-4 和 IL-10,其余均未测出。结论 脑囊尾蚴病患者 Th2 型细胞因子表达水平明显升高,其体液免疫功能增强。

【关键词】 脑囊尾蚴病;细胞因子;RT-PCR;Th2 型

中图分类号:R532.333

文献标识码:A

Studies on Th2 Type Cytokines in Patients with Neurocysticercosis

XU Hong-xiu, JIA Feng-ju, LIU Yu-bing, XU Jing, WEI Dong-dong
(Shandong Institute of Parasitic Diseases, Jining 272000)

【Abstract】 **Objective** To explore the level of Th2 type cytokines including IL-4, IL-10 and IL-13, and the immunoregulation of cytokines in patients with neurocysticercosis. **Methods** Lymphocytes in patients with neurocysticercosis were separated from the blood sample with density gradient centrifugation and the total RNA was extracted by guanidine isothiocyanate method. cDNA was synthesized by reversed transcription reaction. The target gene was then amplified by PCR. The PCR products were analyzed by electrophoresis. **Results** Results of RT-PCR showed that cytokines mRNA in lymphocytes of peripheral blood were detected in 27 patients with neurocysticercosis but not in the other 3 cases. Among the positive cases, mRNA of IL-4, IL-10 and IL-13 was detected in 16, 17 and 14 cases respectively and mRNA of IL-4, IL-10 and/or IL-13 was detected in all the 27 cases. In the detection of lymphocytes in peripheral blood of 10 healthy subjects, expression of IL-4 and IL-10 was found in only one case at low level. **Conclusion** The study revealed that Th2 associated cytokines were expressed at high level and the humoral immunocompetence was relatively strong in patients with neurocysticercosis.

【Key words】 neurocysticercosis, cytokines, RT-PCR, Th2 type

正常机体的 CD4⁺ T 细胞可分泌 Th1/Th2 两类细胞因子, Th1 类细胞因子包括 IL-2 和 IFN-γ 等,介导细胞免疫应答;Th2 类细胞因子包括 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等,可促进肥大细胞和嗜酸粒细胞的分化、增殖和抗体产生,介导体液免疫应答。机体 Th1/Th2 平衡失调,可导致肿瘤发生,细菌、病毒等微生物感染及自身免疫疾病、变态反应性疾病和移植排斥反应的发生。研究机体 Th1/Th2 相关细胞因子,对认识疾病的发生发展规律及以调整 Th1/Th2 平衡为目的,设计相应的治疗方案具有重要意义^[1]。

材料与方法

1 材料

1.1 一般资料 30 例脑囊尾蚴病患者均系按马云祥等^[2]诊断标准确诊,其中男 18 例,女 12 例,最小年龄 8 岁,最大 67 岁,平均 13.3 岁。

1.2 主要症状与体征 癫痫 18 例,头痛、头晕 25 例,肢体麻木、肢瘫 6 例,视力下降、失明 5 例,有绦虫病者 10 例,皮下结节者 8 例,脑电图、脑电地形图

(EEG、BEAM) 异常者 25 例。猪囊尾蚴免疫学检查:血 ELISA、IHA 和 CAg 3 项均为阳性者 26 例,ELISA、IHA 两项阳性者 4 例。脑脊液共检查 19 例,其中 3 项均为阳性者 16 例,ELISA、IHA 两项阳性者 3 例。

1.3 PCR 引物 β-actin 和 3 种细胞因子 IL-4、IL-10、IL-13 的上游引物(P1)和下游引物(P2)的序列分别为:

β-actin P1:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'

P2:5'-CTCCTTAATGTCAACGCACGATTT-3'

IL-4 P1:5'-ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT-3'

P2:5'-CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCTCAT-3'

IL-10 P1:5'-ATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA-3'

P2:5'-GTTTCGTATCTTCATTGTCAT-3'

IL-13 P1:5'-CAGGATCCCTCCCTCTACAGCCCTCAGG-3'

P2:5'-CGGAATTCCTAGTTGACCGTCCCTCGCG-3'

2 方法

2.1 RNA 提取 按异硫氰酸胍一步法提取,紫外分光光度法测 RNA 含量,甲醛变性,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。

2.2 RT 反应 取 5 μg RNA,加入 0.1 mol/L DTT 2

μl, MMLV 200 U(1 μl), 4×dNTP(10 mmol/L) 1 μl, 下游引物 P2 0.5 μl(50 pmol), 总反应体积 20 μl. 37℃ 1 h 后, 95℃ 10 min 灭活 MMLV.

2.3 PCR 反应体系 20 μl RT 反应产物, 15 mmol MgCl₂ 13.3 μl, 4×dNTP 1 μl, 上游引物 P1 0.5 μl(50 pmol), Taq DNA 聚合酶 2 μl(1 U/μl), 循环条件 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 35 次, 末次 72℃, 延长 7 min, 电泳鉴定。

结 果

1 脑囊尾蚴病患者 Th2 型细胞因子表达

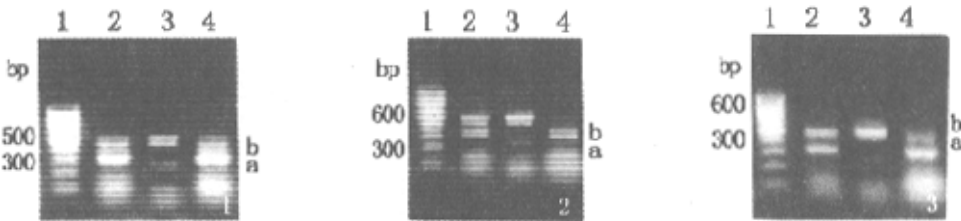


图 1 脑囊尾蚴病患者表达 IL-4, IL-10, IL-13 细胞因子的琼脂糖凝胶电泳 1 PCR 标志物 2 a 白介素 13 b 500 bp 内参照 3 a 白介素 10 b 500 bp 内参照 4 a 318 bp 内参照 b 白介素 4 图 2 脑囊尾蚴病患者表达 IL-10, IL-13 细胞因子的琼脂糖凝胶电泳 1 PCR 标志物 2 a 白介素 13 b 500 bp 内参照 3 a 白介素 10 b 500 bp 内参照 4 a 318 bp 内参照 图 3 脑囊尾蚴病患者表达 IL-4, IL-13 细胞因子的琼脂糖凝胶电泳 1 PCR 标志物 2 a 白介素 13 b 500 bp 内参照 3 b 500 bp 内参照 4 a 318 bp 内参照 b 白介素 4
 Fig. 1 Electrophoresis of IL-4, IL-10, IL-13 from patients with neurocysticercosis Lane 1 PCR marker Lane 2 a IL-13 b 500 bp β-actin Lane 3 a IL-10 b 500 bp β-actin Lane 4 a 318 bp β-actin b IL-4 Fig. 2 Electrophoresis of IL-10, IL-13 in patients with neurocysticercosis Lane 1 PCR marker Lane 2 a IL-13 b 500 bp β-actin Lane 3 a IL-10 b 500 bp β-actin Lane 4 a 318 bp β-actin b IL-4 Fig. 3 Electrophoresis of IL-4, IL-13 in patients with neurocysticercosis Lane 1 PCR marker Lane 2 a IL-13 b 500 bp β-actin Lane 3 b 500 bp β-actin Lane 4 a 318 bp β-actin b IL-4

讨 论

机体感染囊尾蚴后, 免疫功能发生变化, 细胞因子作为一种免疫调节剂, 在抗感染中可促进免疫系统发挥抗感染作用, 也可引起免疫病理损伤, 同时也受 T、B 淋巴细胞影响^[3]。机体内 T 淋巴细胞分为 Th1 和 Th2 细胞, 两者产生的细胞因子在疾病变化中起拮抗作用, Th1 细胞反应与抗感染有关, Th2 细胞反应则与疾病易感性有关^[4]。IL-4、IL-10、IL-13 是由 Th2 细胞产生的, 机体内过量的表达 IL-4、IL-10、IL-13, 表明 T 淋巴细胞的免疫功能处于抑制状态, 有利于寄生虫的生存^[5]。在实验性利什曼原虫感染的鼠模型中发现, 大多数品系的小鼠在感染利什曼原虫后能诱发强烈的细胞免疫应答, 但 BALB/c 鼠无此抵抗能力, 可导致致死感染, 究其原因发现 BALB/c 鼠体内表现为 Th2 型反应, IL-4、IL-5、IL-10 表达量明显增高, 由此而引出 Th1/Th2 漂移与疾病发生相关联的概念^[6]。目前已发现微生物感染、肿瘤、自身免疫疾病、变态反应、移植排斥反应等多种疾病有 Th1/Th2 漂移现象。

用 RT-PCR 检测 30 例脑囊尾蚴病患者外周血淋巴细胞, 发现 27 例有细胞因子表达, 3 例未检测到细胞因子, 在 27 例有细胞因子表达的患者中 IL-4、IL-10、IL-13 的表达分别为 16、17 和 14 例(图 1~3), 27 例均有 IL-4 和(或)IL-10 和(或)IL-13 表达, Th2 型细胞因子表达水平明显升高。

2 健康人 Th2 型细胞因子表达

10 例健康人外周血淋巴细胞(未进行体外刺激)仅发现 1 例表达低水平的 IL-4 和 IL-10, 其余均未测出。

但对脑囊尾蚴病而言, 因囊尾蚴虫体较大, 抗原成份十分复杂, 是由多种生物分子组成的不确定的异质混合物, 特别是脑囊尾蚴病患者体内虫源性 CAg 复杂多样, 在这方面的研究起步较晚。张唯哲等^[7]采用生物活性测定法检测到脑囊尾蚴病患者外周血单核细胞体外诱导 IL-2、IFN-γ 的水平明显降低; 朱家勇等^[8]采用双抗体夹心 ELISA 测出囊尾蚴病患者血清中 IL-6、IL-8 的水平均显著高于正常组, 据此两种检验结果推测脑囊尾蚴病患者也可能存在 Th1/Th2 的漂移现象, 即机体感染囊尾蚴后可能导致 Th1/Th2 平衡状态失调。本研究采用 RT-PCR 技术从基因水平检测到脑囊尾蚴病患者亦表现为 Th2 型反应, IL-4、IL-10、IL-13 表达量明显增高, 表明其免疫调节机能异常, 呈抑制趋势。这可为脑囊尾蚴病患者的肿瘤免疫逃逸, 易于合并其它肿瘤及细菌、病毒感染提供理论依据。臧旭^[9]报道在日本乙型流行性脑炎的患者中, 猪囊尾蚴发现的频率很高, 在 34 例中就有 11 例, 其发生率约为 32%。由此可见, 促使 Th2 向 Th1 漂移可能是脑囊尾蚴病免疫治疗的手段之一。

Terrazas 等^[1]证实鼠体内,囊尾蚴感染早期出现短暂的 Th1 型细胞因子表达,并伴随幼虫生长繁殖率降低。本研究 3 例脑囊尾蚴病患者未检测到 Th2 型细胞因子,该 3 例患者均系囊尾蚴感染的早期,病史短,脑 CT 显示多发低密度小囊。随着感染程度加重,小鼠出现持续较长时间的 Th2 型细胞因子表达,导致囊尾蚴繁殖率增加,提示 Th2 向 Th1 型细胞因子的漂移,有利于囊尾蚴的寄生和繁殖。这表明抗囊尾蚴免疫应答以 Th1 占优势状态为好。本文对 30 例的研究结果与 Terrazas 等研究鼠囊尾蚴病的结果相似,但脑囊尾蚴病患者的 Th2 型细胞因子反应是囊尾蚴寄生和繁殖的前因还是后果,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Abbas AK, Murphy KM, Sher A, et al. Functional diversity of helper T lymphocytes[J]. Nature, 1996, 383(6603):787-790.
[2] 马云祥,薛晓玲,丁庆林,等. 脑囊虫病诊断、临床分型与疗效

判定标准的建议[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1989, 7: 134-135.
[3] Street NE. Functional diversity of T-lymphocytes due to secreting of different cytokine patterns[J]. FASEB J, 1991, 5:171-177.
[4] Grau CE. Immune mechanisms in bacterial and parasitic diseases. Protective immunity vs pathology[J]. Curr Opin, 1991, 3:480-485.
[5] Rigano R, Profumo E, Teggi A, et al. Production of IL-5 and IL-6 by PBMC from patients with *Echinococcus granulosus*[J]. Clin Exp Immunol, 1996, 105:456-463.
[6] Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response[J]. J Exp Med, 1993, 177:797-802.
[7] 张唯哲,徐之杰,赵育莹,等. 脑囊虫病患者外周血单个核细胞体外诱生 IL-2, IFN-γ 及 TNF-α 活性的研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1997, 4:207-208.
[8] 朱家勇,黄静,汤斌. 囊虫病患者血清 SiL-2R, TNF-α, IL-6, IL-8 的测定及临床意义[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1996, 9:288-289.
[9] 藏旭,胡正祥. 日本乙型流行性脑炎与脑膜囊虫病的关系及豚囊虫在脑内引起的变化[J]. 中华病理学杂志, 1955, 1:53-54.
[10] Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, et al. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2 type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)[J]. J Parasitol, 1998, 84:74-81.

(收稿日期:2002-05-27 编辑:富秀兰)

文章编号:1000-7423(2002)-06-0350-01

【病例报告】

21 例脑型疟的临床表现及误诊分析

李苏¹ 杨俊芳² 张芝群³

中图分类号:R531.33 文献标识码:D

近 10 年来,我们共收治脑型疟 21 例,其临床表现及误诊情况报道分析如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 18 例是当地民工从疟区回归人员,1 例是外来者疟区回归人员,2 例是内源感染。其中男 16 例,女 5 例。10 岁以下 1 例,16~20 岁 6 例,20~40 岁 8 例,40~60 岁 6 例。发病季节 4 月份 3 例,5~6 月份 3 例,7 月份 10 例,9~11 月份 4 例,12 月份 1 例。

1.2 临床表现 潜伏期最短为 5 d,最长为 10 d。症状主要为高热(39℃~41.5℃)、昏迷、头痛,伴寒战、抽搐、腹痛、酱油色尿、进行性贫血及意识障碍、脑膜刺激征候群,其次为黄疸、肝脾肿大。

1.3 实验室检查 分别制作厚、薄血膜,吉氏液染色,镜检,检出恶性疟原虫 18 例,3 例未检出疟原虫。腰椎穿刺 10 例,脑脊液压力高,余结果均正常。血常规检查 Hb 45~95 g/L, RBC (1.68~3.25)×10¹²/L, WBC (4.7~13.5)×10⁹/L。

1.4 治疗 二盐酸奎宁静滴 19 例,蒿甲醚肌注 2 例(1 例 4 d

后复燃)。高热疑似病例 3 例未检出疟原虫,均经药物诊断性治疗痊愈,20 例治愈,1 例死亡。

2 误诊情况

误诊为乙脑 4 例,病毒性脑炎 2 例,重症黄疸肝炎 2 例,伤寒 2 例,胆石症、胆道感染各 1 例,总误诊率为 57.1%。

3 讨论

本组病例多为无免疫力人群进入疟区初次感染发病。由于病情凶险,症状复杂多样,易误诊为乙脑、伤寒、重症肝炎等。脑型疟患者病程不规律,可不出现嗜睡期而迅速昏迷,对抗疟药治疗反应好,恢复快。凡遇原因不明的急性发热,并有疟区外归史者,应考虑疟疾,并及时、多次查疟原虫。一旦诊断明确,必须及时治疗。

本文 3 例患者当中未查到疟原虫,多与入院前不规律用抗疟药及预防药有关。提示对高度疑似病人,用二盐酸奎宁常规剂量作诊断性治疗,但须注意个别抗氯喹恶性疟病例。

脑型疟病人常见特征性表现为痴呆、失语、俗称“哑瘧”。患者能端坐、呼之能凝视医生,但失语,满脸茫然,多出现在昏迷早期,必须注意观察,以免漏诊。

(收稿日期:2002-06-25 编辑:庄兆农)

作者单位:1 云南省腾冲县妇幼保健院,腾冲 679100;
2 云南省腾冲县卫生局,腾冲 679100;
3 云南省腾冲县卫生防疫站,腾冲 679100