

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.01.020

急性脑出血患者早期外周血干扰素- γ 分泌水平与预后关系的研究肖勇,夏正新,张苏宁,凌云,张志飞,周红娟,方玉明[△]
(上海交通大学医学院附属第九人民医院急诊科 201900)

[摘要] 目的 观察急性脑出血患者早期外周血干扰素- γ (IFN- γ)分泌水平与病情预后的关系。方法 选取 2015 年 7 月至 2016 年 8 月在该院急诊科住院的急性脑出血患者 66 例作为试验组,体检中心健康人群 60 例作为空白对照组,分离其外周血单个核淋巴细胞(PBMC)及血浆,ELISA 检测辅助 T 细胞(Th)1/Th2 类细胞因子[IFN- γ 、白细胞介素(IL)-2、IL-4 及 IL-10];流式细胞术检测胞内细胞因子;NIHSS 量表分析试验组发病第 1 天及第 30 天病情变化;分析细胞因子与第 30 天 NIHSS 量表评分预后的关系。结果 两组外周血中 IFN- γ 差异有统计学意义($P < 0.05$),IL-2、IL-4、IL-10 差异无统计学意义($P > 0.05$)。试验组早期外周血 IFN- γ 分泌水平与预后之间存在正向相关($P < 0.05$)。结论 早期外周血 IFN- γ 水平增高与急性脑出血的预后不良相关。

[关键词] 脑出血;干扰素 II 型;预后

[中图分类号] R743.34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)01-0057-03

Relationship between peripheral blood IFN- γ secretion level and its prognosis in patients with early stage of acute cerebral hemorrhageXIAO Yong, XIA Zhengxin, ZHANG Suning, LING Yun, ZHANG Zhifei, ZHOU Hongjuan, FANG Yuming[△]

(Department of Emergency, Shanghai Ninth People's Hospital,

Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China)

[Abstract] **Objective** To observe the relationship between the peripheral blood IFN- γ secretion level and prognosis in the patients with early stage of acute cerebral hemorrhage. **Methods** Sixty-six inpatients with acute intracerebral hemorrhage in the emergency department of this hospital from July 2015 to August 2016 were selected as the experimental group, and 60 healthy people in the physical examination center served as the blank control group. The peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) and plasma were separated. The helper T cells(Th)1/Th2 cytokines(IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10) were detected by using ELISA. The flow cytometry was used to detect intracellular cytokines; the disease condition change from 1 d of onset to 30 d in the experiment group was analyzed by using NIHSS. The relationship between the cytokines and prognosis on 30 d evaluated by NIHSS score was analyzed. **Results** The peripheral blood IFN- γ level had statistically significant difference between the two groups($P < 0.05$), while the levels of IL-2, IL-4 and IL-10 had no statistical difference($P > 0.05$). The peripheral blood IFN- γ secretion level during early stage in the experimental group was positively correlated with the prognosis($P < 0.05$). **Conclusion** The increase of peripheral blood IFN- γ during early stage is correlated with the poor prognosis in the patients with acute intracerebral hemorrhage.

[Key words] cerebral hemorrhage; interferon type II; prognosis

脑出血系指非外伤性原发性脑实质内出血,是一种发病率、致残率及病死率都很高的急性脑血管病^[1]。一旦出现脑出血,患者往往承担较大的致残风险,因此对于预后的早期判断就显得很重要^[2]。大量研究表明机体内细胞因子水平与脑出血的病程变化及预后密切相关^[3-4]。已有研究发现 T 细胞及其分泌的细胞因子亦参与脑出血后的炎症反应^[5-8]。脑出血的预后是否与辅助 T 细胞(Th)1/Th2 型细胞因子相关,现在并未完全明确。本研究拟通过检测脑出血患者早期外周血中 Th1/Th2 类细胞因子的表达水平,并且随访患者发病第 1 天及第 30 天的病情,分析 Th1/Th2 型细胞因子与脑出血病情预后的相互关系,为临床早期及时有效的治疗脑出血患者提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 7 月至 2016 年 8 月在本院急诊科住院的急性脑出血患者 66 例作为试验组,体检中心健康人

群 60 例作为空白对照组,收集两组相关临床样本。脑出血患者入选标准:按照《中华医学会第四届全国脑血管病学术会议》脑血管病诊断标准及相关临床标准。并按美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)对脑出血患者发病第 1 天及第 30 天进行病情评估。选择 NIHSS 评分为 15~20 分的患者进行预后相关性分析(评分为 0~42 分,0~1 为正常,1~4 分为轻微,5~15 分为中度,15~20 分为中重度,20 分以上为重度,选择 15~20 分组可以有效观察治疗后的病情变化,其他组因变化无该组明显故排除)。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 RPMI1640 及胎牛血清购自美国 Gibco 公司。人淋巴细胞分离液购自达科为生物工程有限公司。ELISA 试剂盒[干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-2、IL-4 及 IL-10]均购自美国 R&D 公司。异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗人 CD4 抗体,PE 标记抗人 IFN- γ 及同型对照均购自 eBio-

science 公司。细胞固定剂和破膜剂 Invitrogen 公司产品。

1.2.2 标本收集 试验组在发病第 1 天内采集患者外周血 10 mL, 对照组采集健康体检人群外周血 10 mL, 肝素抗凝, 使用人淋巴细胞分离液在 24 h 内采用 Ficoll 密度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 方法可见参考文献[9], 得到 PBMC 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 调成 1×10^6 /mL 水平, 然后接种于 6 孔培养板, 用于胞内细胞因子的分析 (流式检测), 并吸取最上层血浆, 用于细胞因子的分析 (ELISA 检测)。住院患者常规留取血标本送检本院临检科, 包括检测降钙素原 (PCT) 指标。

1.2.3 血浆细胞因子的检测 采用 ELISA 检测, 严格按 ELISA 试剂盒的说明书进行操作。以 A 值为纵坐标, 以标准品水平为横坐标, 绘制标准曲线。通过曲线根据 A 值计算出 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 的水平, 检测结果以 pg/mL 表示, 方法可见参考文献[10]。

1.2.4 CD4⁺T 细胞内细胞因子检测 采用流式细胞仪 (美国 Beckman 公司) 检测, 收集分离 PBMC 细胞, 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤 2 次后收集, 加入 5 μ L FITC-CD4 抗体常温暗处孵育 20 min 后; 加 1 mL PBS 洗液, 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 洗涤 2 次, 使用 100 μ L 固定剂固定 15 min, PBS 洗涤后加破膜剂 100 μ L 作用 10 min, 破膜剂作用后直接加荧光素 PE 标记抗人 IFN- γ 抗体 5 μ L, 室温暗处孵育 30 min; 加 1 mL PBS 洗液, 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 洗涤 2 次, 用 PBS 重悬至 500 μ L, 上机检测细胞荧光强度, 方法可见参考文献[9]。

1.2.5 相关性分析 试验组按 NIHSS 量表对脑出血患者发病第 1 天及第 30 天进行病情评估。将发病第 30 天 NIHSS 评分与 IFN- γ 水平水平进行相关性分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 组间采用 χ^2 检验; 相关性分析使用 Spearman 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

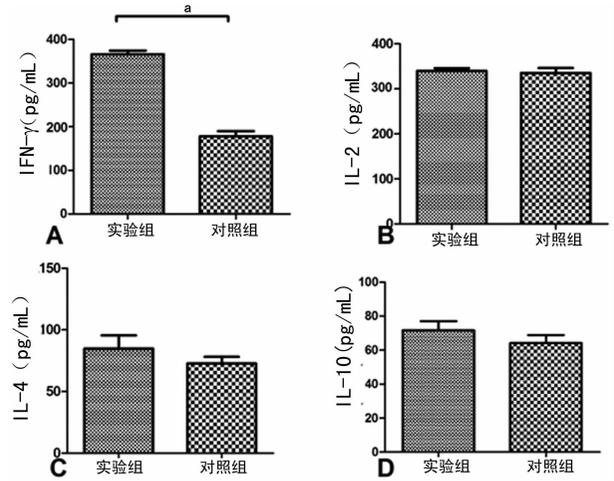
2.1 两组一般情况比较 试验组与对照组在性别、年龄比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性, 见表 1。

表 1 两组一般临床资料比较

指标	试验组 (<i>n</i> =66)	对照组 (<i>n</i> =60)	χ^2/t	<i>P</i>
男/女(<i>n/n</i>)	30/36	26/34	0.015	0.840
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	52.43 \pm 12.74	55.37 \pm 11.42	-0.545	0.677

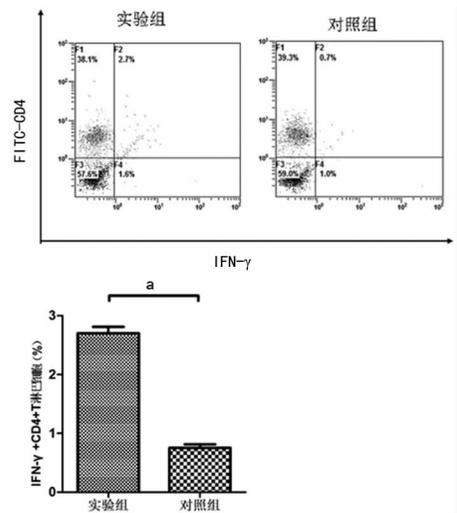
2.2 两组外周血 IFN- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 分泌水平比较 试验组外周血中 IFN- γ 平均水平为 (366.30 \pm 18.69) pg/mL 高于对照组 IFN- γ 水平 (178.30 \pm 25.83) pg/mL ($t = 13.18$, $P < 0.05$), 见图 1A。试验组外周血 IL-2、IL-4、IL-10 水平与对照组水平比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.355$ 、 1.017 、 1.046 ; $P = 0.732$ 、 0.333 、 0.326), 见图 1B、1C、1D。

2.3 两组外周血 CD4⁺T 细胞内 IFN- γ 表达水平比较 试验组外周血 CD4⁺T 细胞内 IFN- γ 表达平均水平为 (2.70 \pm 0.22)%, 高于对照组 (0.75 \pm 0.13)%, 差异有统计学意义 ($t = 15.50$, $P < 0.05$), 见图 2。



$a: P < 0.05$

图 1 两组外周血中的 Th1/Th2 类细胞因子分泌水平



$a: P < 0.05$

图 2 两组外周血中 CD4⁺T 细胞内 IFN- γ 表达水平

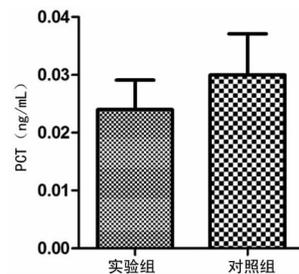


图 3 两组体内 PCT 水平

2.4 两组 PCT 表达水平比较 为了排除感染因素对外周血 IFN- γ 分泌水平影响, 同时检测两组 PCT 水平, 结果提示两组 PCT 水平均在正常范围, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.5 两组外周血 IFN- γ 分泌水平与预后关系 为进一步了解 IFN- γ 与预后的关系, 对急性脑出血患者发病第 1 天 NIHSS 评分为 (17.50 \pm 6.80) 分, 第 30 天评分为 (6.32 \pm 4.30) 分, 并分析胞内外 IFN- γ 分泌水平与第 30 天脑出血患者 NIHSS 评分相关性, 发现脑出血患者早期外周血 IFN- γ 分泌水平与预后之间存在正向相关 ($r = 0.741$, $P = 0.014$; $r = 0.687$, $P =$

0.045), 见图 4。

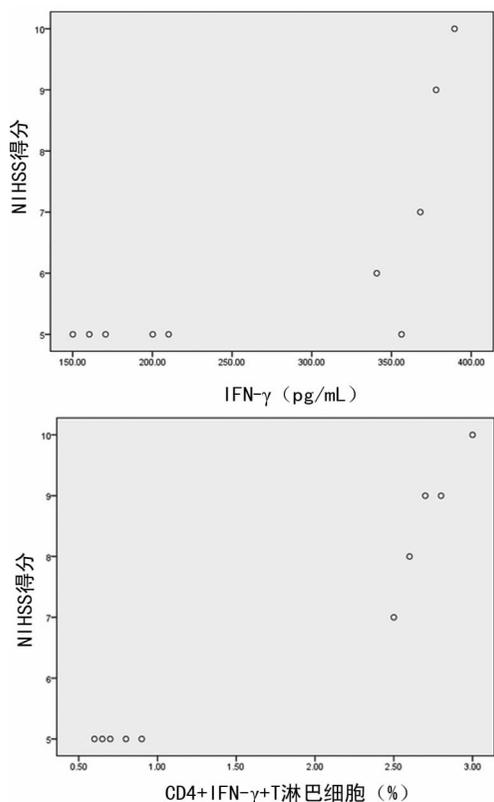


图 4 病例组脑脊液中 IFN- γ 的水平与 NIHSS 评分相关性分析

3 讨 论

脑出血是脑血管疾病中严重威胁人类健康的常见病,是最难治疗的脑卒中之一^[11]。脑出血造成脑组织损伤导致各种细胞因子水平异常,并通过体液作用于全身各个系统而发生全身炎症反应综合征,引起免疫功能紊乱和组织损伤^[12]。大量研究表明 Th1/Th2 类细胞因子在调节各种急慢性脑出血炎症变化过程中发挥极为重要的作用^[13],Th1 类细胞因子包括 IFN- γ 、IL-2、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 IL-12,主要介导细胞免疫反应。Th2 类细胞因子包括 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13,主要参与体液免疫反应。这些细胞因子根据机体不同状态调节分泌水平保持机体免疫系统的动态平衡^[14-15]。本研究发现急性脑出血患者外周血中 IFN- γ 的水平较对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),细胞因子 IL-2、IL-4 及 IL-10 差异无统计学意义($P > 0.05$)。为了排除感染因素对人体内细胞因子水平影响,笔者同时分析了两组 PCT 表达水平,结果提示两组 PCT 均在正常范围,差异无统计学意义($P > 0.05$)。进一步研究发现急性脑出血患者外周血 CD4⁺ T 细胞内 IFN- γ 表达水平显著升高($P < 0.05$),与上述结果一致,提示脑出血患者早期外周血 IFN- γ 分泌水平参与脑出血后的发病过程。

NIHSS 是美国国立卫生研究院卒中量表,为急性脑卒中的治疗研究设计了一个 15 个项目的神经功能检查量表。它是从 3 个量表(Toronto Stroke Scale, Oxbury Initial Severity Scale, Cincinnati Stroke Scale)中选取有意义的项目组成一个量表,每个主要脑动脉病变可能对应出现的神经系统检查项目(如视野评测大脑后动脉梗死),该量表已经被国内外多项研究作为判断脑卒中预后的标准化量表^[16]。

脑出血急性发作导致暂时性的缺血、缺氧,缺血、缺氧引起

组织损伤导致细胞因子水平的动态平衡受到破坏^[11]。研究表明 IFN- γ 在免疫炎症中扮演重要角色,参与脑出血后的发病过程,可能是诱发急性脑出血病情恶化的原因之一^[17-18]。为进一步了解 IFN- γ 与预后的关系,在发病第 30 天对病例组人群进行 NIHSS 评分,并与上述研究结果进行相关性分析,结果发现急性脑出血患者早期外周血 IFN- γ 水平与发病第 30 天的 NIHSS 评分存在正相关($P < 0.05$),表明早期检测急性脑出血患者外周血中 IFN- γ 水平可对判断急性脑出血预后提供参考。

参考文献

- [1] LIU M, WU B, WANG W Z, et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(5): 456-464.
- [2] 赵冬. 我国人群脑出血发病率、病死率的流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(3): 236-239.
- [3] CHAMORRO Á, MEISEL A, PLANAS A M, et al. The immunology of acute stroke[J]. Nat Rev Neurol, 2012, 8(7): 401-410.
- [4] CHEN T H, YANG Y C, WANG J C, et al. Curcumin treatment protects against renal ischemia and reperfusion injury-induced cardiac dysfunction and myocardial injury[J]. Transplant Proc, 2013, 45(10): 3546-3549.
- [5] WANG X M, ZHANG Y G, LI A L, et al. Expressions of serum inflammatory cytokines and their relationship with cerebral edema in patients with acute basal ganglia hemorrhage[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(13): 2868-2871.
- [6] SHI L J, QIN J, SONG B, et al. Increased frequency of circulating regulatory T cells in patients with acute cerebral hemorrhage[J]. Neurosci Lett, 2015, 591(30): 115-120.
- [7] ZHU J F, PAUL W E. Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors[J]. Immunol Rev, 2010, 238(1): 247-262.
- [8] KHANNA S, HEIGEL M, WEIST J, et al. Excessive α -tocopherol exacerbates microglial activation and brain injury caused by acute ischemic stroke[J]. FASEB J, 2015, 29(3): 828-836.
- [9] TANG Y Y, WANG J L, ZHANG Y, et al. Correlation between low tapasin expression and impaired CD8⁺ T-cell function in patients with chronic hepatitis B[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3315-3322.
- [10] 唐余燕, 陈小华, 汤正好, 等. 胞质转导肽-HBcAg18-27-Tapasin 诱导 C57BL/6 小鼠 T 淋巴细胞分泌 Th1 型细胞因子及 HBV 特异性 CTL 的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(3): 229-232.
- [11] 毕胜, 刘群, 范佳, 等. 脑出血患者外周血干扰素- γ 、细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 mRNA 表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(10): 2674-2675.
- [12] KES V B, SIMUNDIC A M, NIKOLAC N, et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early (下转第 62 页)

技术对早期乳腺癌组织中 HOXB7 蛋白表达进行了检测,发现其在癌组织中的表达水平显著高于正常乳腺上皮组织。另外, YUAN 等^[9]检测了 224 例结直肠癌样本中 HOXB7 蛋白水平,发现其表达水平与患者的 TNM 分期、Dukes 分期及 5 年生存率明显相关。

目前关于 HOXB7 蛋白对肿瘤发生、发展过程的影响主要包括促进肿瘤细胞增殖,促进肿瘤血管生成,促进肿瘤的侵袭和转移,以及参与 DNA 损伤的修复和细胞周期的调控^[10]。BHATLEKAR 等^[11]发现,HOXB7 蛋白高表达可提高前列腺癌细胞的增殖能力。同时,采用 siRNA 技术抑制 HOXB7 蛋白的表达时,可抑制乳腺癌、肺癌细胞的增殖^[12]。根据肿瘤类型的不同,HOXB7 蛋白对肿瘤侵袭和转移过程的影响不同,例如 HOXB7 蛋白高表达对结直肠癌发生上皮-间质转化现象具有促进作用;而在宫颈癌细胞系中,抑制 HOXB7 蛋白的表达可观察到宫颈癌细胞的侵袭能力显著降低^[13]。

本研究显示,HOXB7 蛋白在结直肠癌组织中表达上调显著高于癌旁正常组织,且 HOXB7 mRNA 在结直肠癌组织中表达水平显著高于癌旁正常组织($P < 0.05$),提示在结直肠癌诊断中 HOXB7 蛋白可能作为一种潜在的分子标志物。通过对 HOXB7 蛋白表达与结直肠癌患者临床病理参数分析,结果表明,HOXB7 蛋白阳性表达与患者 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移有显著相关性($P < 0.05$),提示 HOXB7 蛋白可能参与了结直肠癌的转移过程。随访结果显示,HOXB7 蛋白表达阳性的结直肠癌患者相比于表达阴性的患者具有更差的预后,这提示了 HOXB7 蛋白可能是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素,对 HOXB7 蛋白的检测,可成为判断结直肠癌患者预后的手段之一。

综上所述,在结直肠癌中 HOXB7 蛋白表达显著上调,且其表达与结直肠癌的发生、发展、转移和预后具有相关性,检测 HOXB7 蛋白水平有助于对结直肠癌患者进行准确诊治和预后判断。

参考文献

- [1] 王欣,傅仲学. 结直肠癌的分子生物学研究进展[J]. 中国普通外科杂志,2010,19(4):426-429.
- [2] 牛苗苗,战军,张宏权. HOX 基因在肿瘤发生发展过程中

的作用[J]. 解剖学报,2014,3(3):430-436.

- [3] 原薇薇,谭艳,杜敏,等. HOXB7 基因在肺癌中的表达及其临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2014,19(11):987-991.
- [4] 张利飞. 结直肠癌预后预测研究进展[J]. 中国普通外科杂志,2015,24(4):581-588.
- [5] 朱发霞,马瑞,林从尧. 同源异型盒基因 HOXB7 在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. 武汉大学学报(医学版),2015,36(1):58-61.
- [6] 郭贞,焦锋,金子良,等. 转录因子 HOXB7 在肿瘤及相关信号通路中的作用[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(2):200-203.
- [7] 林飞燕,吴爱华,张培丽,等. HoxB8 对结直肠癌细胞生长迁移的影响[J]. 温州医科大学学报,2015,45(11):785-790.
- [8] WU X Y, CHEN H X, PARKER B, et al. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Res*, 2006,66(19):9527-9534.
- [9] YUAN W W, ZHANG X L, XU Y, et al. Role of HOXB7 in regulation of progression and metastasis of human lung adenocarcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2014,53(1):49-57.
- [10] 齐鲁,丁彦青. HOXB7 调控 NKX3-1 促进大肠癌转移机制分析[J]. 上海交通大学学报(医学版),2014,3(3):323-328.
- [11] BHATLEKAR S, FIELDS J Z, BOMAN B M. HOX genes and their role in the development of human cancers [J]. *JMM*, 2014,92(8):811-823.
- [12] 刘逸,陈名华,陈德鑫,等. 结直肠癌中同源盒基因 B9 的表达及临床意义[J]. 中国热带医学,2014,14(4):396-400.
- [13] LIAO W T, JIANG D, YUAN J, et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2011,17(11):3569-3578.

(收稿日期:2017-06-23 修回日期:2017-09-12)

(上接第 59 页)

- neurological deficit and stroke outcome[J]. *Clin Biochem*, 2008,41(16):1330-1334.
- [13] NAYAK A R, KASHYAP R S, PUROHIT H J, et al. Evaluation of the inflammatory response in sera from acute ischemic stroke patients by measurement of IL-2 and IL-10[J]. *Inflamm Res*, 2009,58(10):687-691.
 - [14] MORIYAMA M, NAKAMURA S. Th1/Th2 immune balance and other T helper subsets in IgG4-Related disease [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017,401:75-83.
 - [15] MALAIYAN J, RAMANAN P V, SUBRAMANIAM D, et al. Analysis of serum Th1/Th2 cytokine levels in patients with acute mumps infection[J]. *J Glob Infect Dis*, 2016,8(2):87-92.
 - [16] NILANONT Y, PHATTHARAYUTTAWAT S, CHIE-

WIT P, et al. Establishment of the Thai version of National Institute of Health Stroke Scale(NIHSS) and a validation study[J]. *J Med Assoc Thai*, 2010,93(1):S171-S178.

- [17] JENKINS B J. Transcriptional regulation of pattern recognition receptors by Jak/STAT signaling, and the implications for disease pathogenesis[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014,34(10):750-758.
- [18] SZABO S J, SULLIVAN B M, STEMMANN C, et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells[J]. *Science*, 2002,295(5553):338-342.

(收稿日期:2017-07-12 修回日期:2017-09-21)