

● 临床研究 ●

重症流行性出血热患者 PBMC 中 Fas/FasL 表达及免疫机制研究*

李珊

(福建省南平市第一医院重症医学科 南平 353000)

摘要:目的:探讨重症流行性出血热 5 期中各阶段外周血单个核细胞(PBMC)中 Fas/FasL 表达情况及相关免疫机制。方法:选取经典 5 期经过的重症流行性出血热患者 50 例,分为发热期组(I 期组)、低血压休克期组(II 期组)、少尿期组(III 期组)、多尿期组(IV 期组)和恢复期组(V 期组)。AO/EB 双染色观察各组 PBMC 细胞的凋亡率;ELISA 法检测外周血中 TNF- α 、IL-6 水平;RT-PCR 和 Western Blot 法分别检测 Fas、FasL 基因和蛋白的表达。结果:I 期组、II 期组、III 期组 PBMC 细胞凋亡率明显高于 IV 期组和 V 期组,差异均有统计学意义(1 h: $F=29.12, P<0.001$; 6 h: $F=27.54, P<0.001$; 12 h: $F=25.23, P=0.003$; 24 h: $F=18.17, P=0.005$)。I 期组、II 期组、III 期组外周血 PBMC 中的 Fas 和 FasL 蛋白表达较 V 期组明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$); I 期组、II 期组及 III 期组 PBMC 中的 Fas 和 FasL mRNA 表达亦较 V 期组明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。前 3 期组的 TNF- α 、IL-6 水平较 V 期组明显升高,尤其是 I 期组致炎因子最高,IV 期组表达量水平相对较低,差异均有统计学意义(TNF- α : $F=42.35, P<0.001$; IL-6: $F=31.27, P<0.001$)。结论:重症流行性出血热的病理机制存在 Fas/FasL 介导的细胞凋亡,其浓度高低与机体损害的程度有关。

关键词:重症流行性出血热;细胞凋亡;外周血单个核细胞

Study on Expression of Fas/FasL in PBMC of Patients with Severe Epidemic Hemorrhagic Fever and Its Immune Mechanism*

LI Shan

(Department of Critical Medicine, Nanping First Hospital, Fujian, Nanping 353000)

Abstract: Objective: To investigate the expression of Fas / FasL in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and its related immune mechanism in phase 5 of severe epidemic hemorrhagic fever. Methods: Fifty patients with severe epidemic hemorrhagic fever who passed through the classic phase 5 were divided into fever phase group (phase I group), hypotension shock phase group (phase II group), oliguria phase group (phase III group), polyuria phase group (phase IV group) and recovery phase group (phase V group). The apoptosis rate of PBMC cells in each group were observed by AO/EB double staining; detection of TNF- α , IL-6 level in peripheral blood by ELISA; RT-PCR and Western Blot were used respectively to detect the expression of Fas and FasL genes and proteins. Results: The apoptosis rate of PBMC in phase I group, phase II group and phase III group were significantly higher than those in phase IV group and phase V group, the differences were statistically significant (1 h: $F=29.12, P<0.001$; 6 h: $F=27.54, P<0.001$; 12 h: $F=25.23, P=0.003$; 24 h: $F=18.17, P=0.005$). The expression of Fas and FasL protein in PBMC in phase I group, phase II group and phase III group were significantly higher than those in phase V group, there were significant differences ($P<0.05$). The expression of Fas and FasL mRNA in PBMC in phase I group, phase II group and phase III group were also significantly higher than those in phase V group, there were significant differences ($P<0.05$). The levels of TNF- α and IL-6 in the phase I group, phase II group and phase III group were significantly higher than those in the phase V group, especially the inflammatory factors in the and phase III group phase I group was the highest, and the expression level in the phase IV

* 基金项目:福建省卫生健康委青年课题项目(编号:2017-1-94)

group was relatively low, the differences were statistically significant (TNF- α : $F=42.35$, $P<0.001$; IL-6: $F=31.27$, $P<0.001$). Conclusion: The pathological mechanism of severe epidemic hemorrhagic fever is Fas / FasL mediated apoptosis, and its concentration is related to the degree of body damage.

Key words: Severe epidemic hemorrhagic fever; Apoptosis; PBMC

中图分类号: R512.8

文献标识码: B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2022.05.003

流行性出血热 (Epidemic Hemorrhagic Fever, EHF) 又称肾综合征出血热, 具有一定的地域性, 山区多见。南平市地处闽北山区, 各类啮齿类动物比较多见, 是汉坦病毒携带的宿主^[1]。每年我市 EHF 发病率比较高, 汉坦病毒由于具有泛嗜性的特点, 对各脏器均有致病力, 所以容易导致多脏器功能障碍, 如不及时辨别, 极易进展为重症病例^[2]。况且本病临床表现并不特异, 容易误诊, 往往错过最佳治疗时机^[3]。免疫损伤机制是 EHF 发病的重要机制之一, Fas/FasL 是介导各类细胞凋亡的重要途径, 但关于 Fas 和 FasL 在重症 EHF 患者不同阶段外周血单个核细胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) 中表达情况的研究尚较少见^[4]。本研究探讨 Fas/FasL 在汉坦病毒感染后机体中的表达情况及其免疫反应机制。现报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 4 月至 2021 年 4 月在我院重症监护室住院治疗的 50 例重症 EHF 患者为研究对象。其中男 29 例, 女 21 例; 年龄 23~76 岁。研究对象严格根据病情分期进行分组, 分为以下 5 组: 发热期组 (I 期组)、低血压休克期组 (II 期组)、少尿期组 (III 期组)、多尿期组 (IV 期组) 和恢复期组 (V 期组)。纳入标准: 符合 1986 年全国流行性出血热会议制定的诊断标准, EHF 抗体 IgM 阳性, 具有典型的 5 期经过, 同时排除其他重症疾病^[5]。患者及其家属对研究内容知情并签署知情同意书。本研究获得医院医学伦理委员会批准 (编号: 2017NO.03)。

1.2 设备和试剂 高糖 DMEM 培养液 (Gibco 公司, 美国); GIS 凝胶成像分析系统 (瓦兰科技有限公司, 上海); 高速冷冻离心机 (昊诺斯科技有限公司, 北京); 二氧化碳培养箱 (沃信仪器有限公司, 无锡); 人 Fas 单克隆抗体、兔抗人 FasL 单克隆抗体 (谱析生科有限公司, 上海); PBMC 分离液 (益普生物科技

有限公司, 武汉); 人肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 和白细胞介素 -6 (IL-6) 的 ELISA 试剂盒 (心语生科有限公司, 上海)。

1.3 PBMC 分离采集 分别抽取患者 5 期的静脉血 8 ml (肝素抗凝), 加入 PBS 稀释 2 倍, 混匀, 将 PBMC 分离液加入标本中, 吸出单核细胞层, 再用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 离心 5 min, 弃上清液, 制成细胞悬液, 采用高糖 DMEM 培养液培养。

1.4 双重吖啶橙 (AO)/溴化乙锭 (EB) 染色测 PBMC 凋亡 将 PBMC 进行培养, 根据不同培养时间 (1 h、6 h、12 h 及 24 h) 观察凋亡情况, 然后给予 AO/EB 染色, 按操作步骤进行固定、染色, 最后使用荧光显微镜观察。根据不同 AO/EB 染色的颜色区别正常细胞、早期和晚期凋亡细胞。计算公式如下: PBMC 凋亡率 = (凋亡早期细胞 + 凋亡晚期细胞) / 细胞总数 $\times$ 100%。

1.5 Western Blot 检测 Fas 和 FasL 蛋白表达 使用分离液得到 PBMC, 配成细胞悬液, 高糖 DMEM 培养液培养 24 h, 培养后加入胰酶吹打消化, 离心 (1 000 r/min, 10 min) 获得 PBMC 细胞, 加入裂解缓冲液, 离心 (1 200 r/min, 15 min) 获得蛋白, 同时检测所得蛋白的浓度。根据 Western Blot 操作步骤: 取样、凝胶电泳分离、湿法转膜、移至 PVDF 膜上、封闭 2 h、洗膜, 然后加 Fas、FasL 和 GAPDH 一抗孵育 (4℃ 过夜), TBST 洗 30 min, 重复 3 次, 加入二抗 (辣根过氧化物酶标记) 孵育 2 h; 最后曝光、显影、定影; BandsCan 5.0 图像分析出血热患者各期蛋白的分子量, 以 Fas、FasL 与 GAPDH 蛋白灰度值比值做结果。

1.6 RT-PCR 法检测 Fas 和 FasL mRNA 表达 每组取 100 μ l 的 PBMC 细胞悬液, 加入 Trizol 裂解液 (200 μ l), 提取总 RNA, 使用分光光度计检测 RNA 浓度, 按 PCR 试剂盒步骤逆转录 cDNA, 将 Fas 和 FasL mRNA 的 PCR 扩增产物进行电泳, 最后用凝

胶成像系统分析条带。Genbank 库查询目标基因序列。见表 1。

表 1 Fas、FasL 和 β -actin 引物序列

引物名称	序列	扩增片段	反应条件
Fas	上游 5'-TGGCTTCATCAGCCTCGATGA-3'	148 bp	94℃ 预变性 2 min 和变性 30 s, 55℃ 退火 35 s, 75℃ 延伸 30 s, 循 环 50 次, 最后 70℃ 再延伸 5 min
	下游 5'-CACTCTAGGAGCCGCCGAATT-3'		
FasL	上游 5'-TTTTATTGTCCAAACCTTCCA-3'	225 bp	
	下游 5'-ATGCTCTGACTCCATCCACCC-3'		
β-actin	上游 5'-ACCTGGACAGCTGCTGAGAC-3'	179 bp	
	下游 5'-AGTGGACACACTGCGTGTG-3'		

注： β -actin 为内参，Fas、FasL 与 β -actin 的比值作为 mRNA 的相对表达量，重复 3 次。

1.7 ELISA 法检测人 TNF- α 和 IL-6 水平 严格依据 TNF- α 和 IL-6 的酶联试剂盒说明书操作。

1.8 观察指标 比较各组 PBMC 细胞凋亡率，外周血中 TNF- α 、IL-6 水平，Fas、FasL 基因和蛋白表达水平。

1.9 统计学方法 采用 SPSS24.0 软件进行统计。各组计量资料符合正态分布以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较用 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重症 EHF 患者 5 期 PBMC 凋亡率 不同时间点 I 期组、II 期组和 III 期组 PBMC 细胞凋亡率与 IV 期组、V 期组比较升高，尤其 I 期组 PBMC 凋亡率最高，各时间点组间比较有差异（1 h: $F=29.12, P < 0.001$; 6 h: $F=27.54, P < 0.001$; 12 h: $F=25.23, P=0.003$, 24 h: $F=18.17, P=0.005$ ）。IV 期组和 V 期组比较提示两组间的 PBMC 凋亡率无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 重症 EHF 患者 5 期 PBMC 凋亡率($\%, \bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	1 h	6 h	12 h	24 h
I 期组	50	28.34 $\pm$ 6.76	24.25 $\pm$ 6.13	19.46 $\pm$ 4.68	15.36 $\pm$ 3.18
II 期组	50	19.46 $\pm$ 4.88	17.57 $\pm$ 3.93	16.11 $\pm$ 3.58	12.35 $\pm$ 3.16
III 期组	50	10.54 $\pm$ 2.87	8.69 $\pm$ 2.74	6.83 $\pm$ 1.39	4.81 $\pm$ 1.32
IV 期组	50	4.28 $\pm$ 1.12	4.03 $\pm$ 1.31	3.68 $\pm$ 0.87	3.54 $\pm$ 0.68
V 期组	50	3.75 $\pm$ 0.87	3.43 $\pm$ 0.61	3.23 $\pm$ 0.59	2.92 $\pm$ 0.51

2.2 重症 EHF 患者 5 期 PBMC 中 Fas 和 FasL 蛋白表达 重症 EHF 患者前 3 期组 Fas 和 FasL 蛋白表达水平与 IV 期组、V 期组比较明显升高，组间差异均有统计学意义（Fas: $F=36.43, P < 0.001$; FasL: $F=33.65, P < 0.001$ ）；IV 期组和 V 期组的 Fas 和 FasL 蛋

白表达均无显著性差异 ($P > 0.05$)。见图 1、表 3。

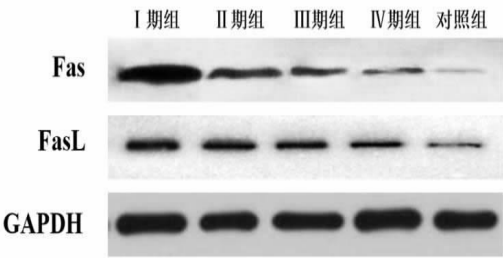


图 1 重症 EHF 患者 PBMC 中 Fas 和 FasL 蛋白表达

表 3 5 期重症 EHF 患者的 Fas 和 FasL 蛋白表达情况($\text{ng/ml}, \bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	Fas	FasL
I 期组	50	1.23 $\pm$ 0.36	1.19 $\pm$ 0.32
II 期组	50	0.77 $\pm$ 0.18	0.81 $\pm$ 0.21
III 期组	50	0.41 $\pm$ 0.11	0.52 $\pm$ 0.13
IV 期组	50	0.26 $\pm$ 0.08	0.31 $\pm$ 0.09
V 期组	50	0.14 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.07

2.3 重症 EHF 患者 5 期 PBMC 中 Fas 和 FasL mRNA 表达 RT-PCR 结果显示 Fas 和 FasL mRNA 在 I 期组、II 期组、III 期组中均呈高表达，而 IV 期组和 V 期组中表达量比较低，组间比较具有统计学差异（Fas: $F=15.89, P=0.007$; FasL: $F=14.54, P=0.011$ ）；IV 期组和 V 期组的 Fas 和 FasL mRNA 表达均无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 5 期重症 EHF 患者的 Fas 和 FasL mRNA 表达情况($\text{ng/ml}, \bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	Fas	FasL
I 期组	50	9.32 $\pm$ 2.34	11.67 $\pm$ 3.38
II 期组	50	7.63 $\pm$ 1.56	9.79 $\pm$ 2.53
III 期组	50	5.24 $\pm$ 1.24	6.32 $\pm$ 1.89
IV 期组	50	2.38 $\pm$ 0.39	2.67 $\pm$ 0.44
V 期组	50	1.84 $\pm$ 0.25	1.99 $\pm$ 0.41

2.4 重症 EHF 患者 5 期 PBMC 中 TNF- α 和 IL-6

表达 前 3 期组 TNF-α 和 IL-6 表达水平与 V 期组比较明显升高,尤其是 I 期组致炎因子水平最高,IV 期组表达量水平相对较低,组间差异有统计学意义(TNF-α: $F=42.35, P<0.001$; IL-6: $F=31.27, P<0.001$)。见表 5。

表 5 重症 EHF 患者 PBMC 中 TNF-α 和 IL-6 表达(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)			
分组	n	TNF-α	IL-6
I 期组	50	115.32± 21.34	123.45± 5.67
II 期组	50	101.63± 18.56	97.45± 24.21
III 期组	50	93.24± 16.74	89.45± 16.79
IV 期组	50	65.38± 14.26	67.32± 13.47
V 期组	50	34.64± 7.47	23.34± 4.98

3 讨论

南平地区处于山区,EHF 实质上是一种地域性疾病,十个县市患者临床特点无明显差异,病毒基本来源同一种属,病毒致病力相似^[6]。大多数重症患者具有典型 5 期表现,部分患者可出现多期重叠表现,主要的表现是发热、充血、出血、肾功能异常、低血压,甚至少尿、无尿、休克等^[7-8]。汉坦病毒是一种有包膜的负链 RNA 病毒(包括 L、M 和 S 3 个基因组),属布尼亚病毒科,可以编码核蛋白、G 糖蛋白、L 聚合酶蛋白^[9-10]。已经证实病毒的直接致病是主要发病机制,肾脏是主要靶器官,在早期阶段即会出现原发性损伤,但对免疫损伤机制仍有待探索。

本研究发现重症 EHF 患者各期外周血 PBMC 的 Fas 表达升高,尤其是前期阶段,与恢复期的患者比较具有显著性,发热期患者 Fas 表达明显最强,随着病程的推移,表达也逐渐下降,重症 EHF 患者各期之间存在差异。重症 EHF 患者外周血 PBMC 中 FasL 的表达在发热期、低血压休克期、少尿期也明显增强,而在多尿期、恢复期患者表达相对较低。有研究表明,FasL 在 T 淋巴细胞表达量明显^[11],FasL 可以与 Fas 进行结合,相互结合后机体对 Fas⁺ 靶细胞发挥细胞毒的生物活性,从而反馈性引起免疫细胞凋亡。

重症 EHF 患者病程早期 PBMC 凋亡率最高,而且血涂片中会发现大量异型淋巴细胞,实质上也是一种免疫活化的淋巴细胞,在细胞免疫中起着重要的作用,参与机体的免疫损伤^[12-13]。我们亦发现早期外周血 PBMC 中 Fas 和 FasL 的表达均明显增

强,与汉坦病毒全身血症的级联爆发时间相吻合,随着病程进展,在疾病的多尿期和恢复期,两者 PBMC 细胞凋亡率无显著性差异($P>0.05$)。重症 EHF 患者不同时期的 TNF-α 和 IL-6 表达水平也有所不同,均较恢复期的患者炎症水平高,尤其是发热期的患者炎症指标升高最明显,也提示我们要遵循早诊断、早治疗的原则,早期控制本病对防止重症化是非常关键的^[14-15]。

综上所述,Fas、FasL 浓度高低与机体损害的程度有关,该途径可能介导重症 EHF 患者 5 期发展的致病过程,对外周血单个核细胞具有免疫调控作用;如果能有效抑制 Fas/FasL 途径,可以减轻免疫损伤,对改善病毒血症反应具有一定的临床价值。

参考文献

[1]周济华,张云智,章域震,等.云南省 2012-2020 年肾综合征出血热流行特征分析[J].中国媒介生物学及控制杂志,2021,32(6):715-719.

[2]Mariappan V,Pratheesh P,Shanmugam L,et al.Viral hemorrhagic fever: Molecular pathogenesis and current trends of disease management-an update [J].Current Research in Virological Science, 2021,2:100009.

[3]姜泓,黄长彤,白雪帆,等.《肾综合征出血热防治专家共识》要点解读[J].中华传染病杂志,2021,39(8):461-463.

[4]冯丽娟,陈丙军,任体莲,等.云南省祥云县肾综合征出血热患者 391 例的临床特点[J].中华传染病杂志,2021,39(9):561-564.

[5]中华预防医学会感染性疾病防控分会,中华医学会感染病学分会.肾综合征出血热防治专家共识[J].中国实用内科杂志,2021,41(10):845.

[6]卓鸣莺,张芝平,蔡长煌,等.南平市 2016-2019 年流行性出血热流行特征[J].海峡预防医学杂志,2021,27(3):26-28.

[7]YOU SF.Discussion on the syndrome distribution of epidemic hemorrhagic fever based on modern literature[J].Traditional Chinese Medicine,2020,9(1):22-33.

[8]Lu QB,Li H,Jiang FC,et al.The differential characteristics between severe fever with thrombocytopenia syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome in the endemic regions [J].Open Forum Infect Dis,2019,6(12):ofz477.

[9]Yang Z,Hu Q,Feng Z,et al.Development and validation of a nomogram for predicting severity in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome: A retrospective study[J].Open Med,2021,16(1):944-954.

[10]Tkachenko EA,Ishmukhametov AA,Dzagurova TK,et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia[J].Emerg Infect Dis, 2019,25(12):2325-2328.

[11]李琴丽,蔡正华,邢远,等.2009-2018 年西安市肾综合征出血热发病特征[J].中华地方病学杂志,2021,40(6):470-474.

[12]Zhao HD,Li YP,Zhao WW,et al.Correlation of CD38 expression with the progression of hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. Arch Virol,2021,166(9):2399-2406.

[13]王丽娜,韩增磊,李晓斐.肾综合征出血热患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化及意义[J].检验医学,2015,30(1):58-60.

[14]Kim HK,Chung JH,Kim DM,et al.Hemorrhagic fever with renal syndrome as a cause of acute diarrhea [J].Am J Trop Med Hyg, 2019,100(5):1236-1239.

[15]Zhao Y,Ge L,Liu J,et al.Analyzing hemorrhagic fever with renal syndrome in Hubei Province, China: a space-time cube-based approach[J].J Int Med Res,2019,47(7):3371-3388.