

· 临床论著 ·

手足口病患儿外周血单核细胞亚群的研究

王军 李蕊 史影 韩俊燕 郝禹 王蓓蓓 冯亮 曾辉 李兴旺

【摘要】目的 探讨未经治疗和随访1、3、5 d手足口患儿外周血单核细胞亚群的变化。**方法** 流式细胞仪检测104例未经治疗手足口患儿(包括阴性患儿62例, EV71阳性患儿37例, CVA16阳性患儿5例)和随访1、3、5 d的患儿外周血单核细胞CD14^{high}CD16⁻亚群、CD14^{high}CD16⁺亚群和CD14^{low}CD16⁺亚群。**结果** 与健康儿童组相比, 手足口患儿CD14^{high}CD16⁺单核细胞亚群所占总单核细胞比例明显升高($t = 4.092, P < 0.001$); CD14^{high}CD16⁻亚群比例明显降低。阴性、EV71型、CVA16型患儿之间CD14^{high}CD16⁻亚群、CD14^{high}CD16⁺亚群和CD14^{low}CD16⁺亚群差异均无统计学意义。**结论** 未经治疗的手足口患儿外周血单核细胞亚群的变化可能与EV71及CVA16病毒的持续感染有关, 与病毒种类相关性不明显。

【关键词】 手足口病; 单核细胞亚群; T淋巴细胞; EV71

Research on peripheral blood monocyte subpopulation in children with HFMD WANG Jun*, LI Rui, SHI Ying, HAN Jun-yan, HAO Yu, WANG Bei-bei, FENG Liang, ZENG Hui, Li Xing-wang. *Beijing Zhongguancun Hospital, Beijing 100190, China

Corresponding author: Li Xing-wang, Email: ditanlxw@yahoo.com.cn; ZENG Hui, Email: hzeng98@yahoo.com

【Abstract】Objective To analyze the changes in peripheral blood monocyte subpopulation in children with hand-foot-and-mouth disease (HFMD). **Methods** Flow cytometry was used to detect CD14^{high}CD16⁻, monocyte subpopulations in peripheral blood from 104 children with untreat HFMD, including 62 cases of latent HFMD, 37 cases of EV71 HFMD and 5 cases of CVA16 HFMD, as well as 25 normal children control. **Result** Compared with the normal control, the proportion of CD14^{high}CD16⁺ monocytes among total monocytes was significantly elevated ($4.0\% \pm 2.4\%$ vs $9.1\% \pm 5.4\%$, $t = 4.092, P < 0.001$), while that of CD14^{high}CD16⁻ monocytes was down-regulated ($91.5\% \pm 5.3\%$ vs $84.7\% \pm 9.8\%$, $t = 3.070, P < 0.01$) in HFMD. No statistical difference was observed in the proportion of CD14^{high}CD16⁻, CD14^{high}CD16⁺ and CD14^{low}CD16⁺ monocytes among the children with EV71, CVA16 HFMD and those with latent HFMD ($t > 1.062$, all $P > 0.05$). **Conclusions** The changes in peripheral blood monocyte subpopulation in children with untreat HFMD may be associated with the permanent infection of enterovirus 71 or Coxsackie virus A16, but have no obvious correlation with the types of virus.

【Key words】 Hand-foot-and-mouth disease; Monocytes; T-lymphocytes; EV71

手足口病是儿童常见的传染性疾病, 近年来, 该病的发病率显著升高。肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒16型(Coxsackie virus, CVA16)是引起手足口病最常见的肠道病毒^[1]。作为天然免疫细胞的主要成分之一, 单核细胞在调节炎症和参与炎症反应中发挥重要作用^[2]。根据单核细胞表面CD14和CD16

的表达差异, 单核细胞可分为CD14^{high}CD16⁻、CD14^{high}CD16⁺和CD14^{low}CD16⁺三类细胞表型和免疫功能不同的亚群。CD14^{high}CD16⁻因参与炎症反应, 又称“炎性单核细胞”, CD14^{high}CD16⁺和CD14^{low}CD16⁺统称为“定居型单核细胞”^[3]。因此, 本研究采用流式细胞术对未经治疗的手足口病患儿及随访1、3、5 d的患儿外周血单核细胞亚群的变化情况进行比例分析。

对象与方法

一、研究对象

选择104例2008年5月至7月在首都医科大学附

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.002

基金项目: 国家自然科学基金(81071587)

作者单位: 100190 北京, 北京市中关村医院(王军、史影); 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 新发突发传染病研究北京市重点实验室(李蕊、韩俊燕、郝禹、王蓓蓓、曾辉); 首都医科大学附属北京地坛医院预防门诊(冯亮)

通信作者: 李兴旺, Email: ditanlxw@yahoo.com.cn; 曾辉, Email: hzeng98@yahoo.com

第一作者: 李蕊和王军为共同第一作者

表1 健康儿童与手足口病儿童的基本资料特点[例(%)]

	性别比例(男/女)	年龄(男/女)
健康儿童组($n=25$)	14/11(56/44)	3.4/3.2[(2~4)/(2~4)]
阴性组($n=62$)	42/20(40/19)	2.6/2.4[(0.3~6)/(1.3~8)]
EV71型组($n=37$)	19/18(18/17)	2.7/2.11[(0.7~6)/(1~10)]
CVA16型组($n=5$)	2/3(2/3)	2.4/3.9[(1.8~3)/(3~4)]

属北京地坛医院儿科就诊的手足口病门诊患儿。根据卫生部发布的《手足口病诊疗指南(2008年版)》明确诊断并未经治疗的手足口患儿。104例患儿中,其中男性63例(60.6%),女性41例(39.4%),男女比例为1.54:1,患儿年龄范围在2个月龄至10岁。所有患儿家长均已签署知情同意书。采集104例患儿咽拭子标本,进行RT-PCR确定病原。分别使用EV71和CVA16核酸检测试剂盒检测肠道病毒(达安基因公司),其中,EV71试剂盒检测阳性标本判定为EV71型肠道病毒阳性,为EV71型组;CVA16试剂盒检测阳性标本判定为CVA16型肠道病毒阳性,为CVA16型组;检测样本无典型S型扩增曲线或Ct值>39,则判定样本为阴性,为阴性组,各组之间年龄分布无差异。所有患儿在入组时,均未经过药物治疗。104例患儿样本中,肠道病毒阳性标本占总数的40.4%(42/104),EV71阳性标本占总数的35.6%(37/104),CVA16阳性标本占总数的4.8%(5/104)。健康儿童对照组25例来自北京中关村医院体检儿童,性别和年龄与实验组基本一致,病毒血清学检测为阴性,无其他疾病史(表1)。

二、方法

1. 标本收集:抽取健康儿童对照组和入组患儿EDTA-K2抗凝静脉血2 ml。

2. 仪器和试剂:T淋巴细胞亚群检测试剂(CD3/4/8/45 multitest)和单核细胞亚群检测抗体(抗-人CD14和CD16抗体)均购自美国BD公司。常规染色后,流式细胞仪检测(FACS Calibur,美国BD公司)。

3. 流式细胞仪检测单核细胞亚群:将130 μ l全血加入流式管,加入2 ml溶血素,室温孵育10 min,1200 r/min,5 min离心,弃上清液,加入洗液(含5% FBS的PBS),充分混匀,1200 r/min,5 min离心,弃上清液,加入抗-CD14和CD16抗体组合,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,加入洗液,离心后弃上清液,流式细胞仪检测单核细胞亚群的变化,用Cell Quest Pro软件分析。

4. 流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群:将50 μ l全血反向加入TruCount管中,加入20 μ l T淋巴细胞亚

群检测抗体,充分混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,加入450 μ l溶血素,4 $^{\circ}$ C避光10 min,采用流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群的绝对计数。采用Multiset软件获取数据。

5. 统计学分析:采用SPSS 17.0软件进行数据的统计学分析。检测数据采用 $\bar{x} \pm s$,比较健康儿童对照组和手足口患儿组间的差异,采用独立样本 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、手足口患儿单核细胞亚群的变化

根据前向角(FSC)和侧向角(SSC)对单核细胞设门(图1左),分析单核细胞膜表面CD14和CD16的表达,根据文献报道^[3],将单核细胞分为3个亚群,CD14^{high}CD16⁻单核细胞亚群(Mo1)、CD14^{high}CD16⁺(Mo2)单核细胞亚群和CD14^{low}CD16⁺(Mo3)单核细胞亚群,并分析所占单核细胞的比例(图1)。

本研究采集健康儿童及新入院未经治疗手足口病患儿的外周血,检测基线外周血单核细胞亚群的变化。健康儿童Mo1单核亚群占总单核细胞的91.5% \pm 5.3%、Mo2单核亚群占总单核细胞的4.0% \pm 2.4%和Mo3单核亚群占总单核细胞的4.5% \pm 3.2%(图2)。与健康儿童组相比,各组Mo1亚群所占单核细胞比例明显降低,阴性组为85.5% \pm 8.9%、EV71组为83.7% \pm 11.6%及CVA16组为82.6% \pm 4.8%。Mo2亚群所占单核细胞比例明显升高,阴性组所占比例为8.7% \pm 4.9%、EV71组所占比例为9.5% \pm 6.4%及CVA16组所占比例为10.5% \pm 1.9%。手足口病各组与健康儿童组差异均有统计学意义,但手足口病各组之间的单核细胞亚群比例之间无统计学差异(图2)。

二、手足口患儿单核细胞亚群的动态变化

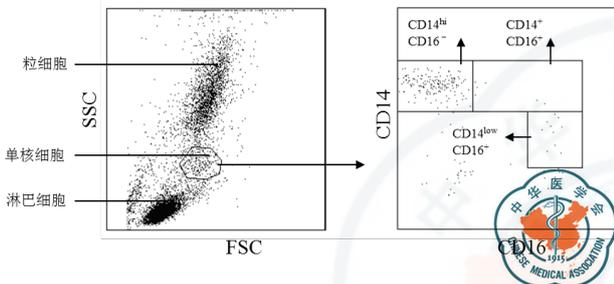
为进一步观察临床治疗对单核细胞比例的影响,于治疗1、3、5 d随访观察EV71手足口患儿外周血单核细胞亚群的动态变化。结果显示,在治疗1 d,各单核细胞亚群的比例与0 d基本一致,随着治疗时间的推移,Mo1亚群比例呈上升趋势,Mo2

和Mo3亚群占总单核细胞比例呈下降趋势, 并基本恢复至健康儿童组水平。但由于不能随访到全部0 d 患儿的病例, 样本量不足, 故单核细胞亚群比例在每个时间点之间无统计学差异(图3)。

三、手足口患儿T淋巴细胞亚群的变化

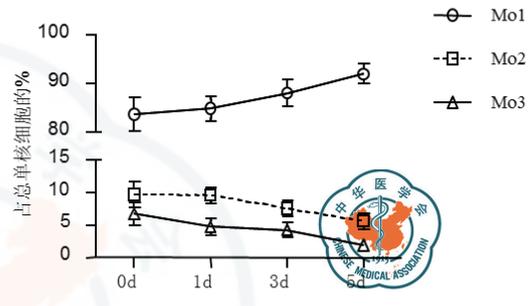
采集未经治疗手足口患儿外周血, 检测T淋巴细胞亚群的变化, CD4⁺ T淋巴细胞绝对计数为(1296 ± 611) 个/μl, 其中阴性组(1286 ± 628) 个/μl; EV71型组(1240 ± 609) 个/μl; CVA16型组(1549 ± 639) 个/μl。CD8⁺ T淋巴细胞绝对计数为(894

± 460) 个/μl, 其中阴性组(1008 ± 524) 个/μl; EV71型组(719 ± 303) 个/μl; CVA16型组(1037 ± 545) 个/μl。CD4/CD8比值为1.4 ± 1.3, 其中阴性组1.3 ± 1.2, EV71型组1.7 ± 2.0, CVA16型组1.5 ± 1.2。患儿CD4⁺和CD8⁺均在正常范围内(图4中虚线框)。除EV71型组与阴性组CD8⁺T淋巴细胞的绝对计数相比, 有统计学意义($t = 2.112, P < 0.05$)外, 其余各组之间差异均无统计学意义(图4)。



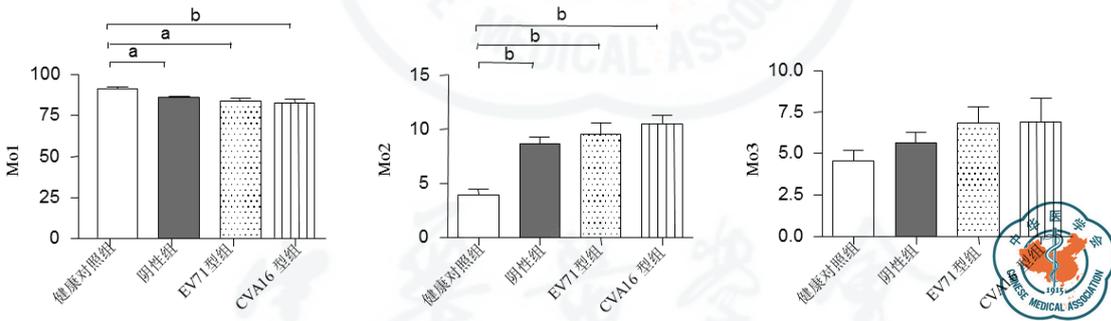
注: 健康儿童外周血单核细胞流式分析图。根据FSC和SSC分为淋巴细胞, 单核和粒细胞并对单核细胞设门(左图); 根据单核细胞表面CD14和CD16的表达差异, 可以将其分为3群, CD14^{high}CD16⁻ Mo1、CD14^{high}CD16⁺ Mo2和CD14^{low}CD16⁻ Mo3亚群(右图)

图1 健康儿童外周血单核细胞流式分析图示



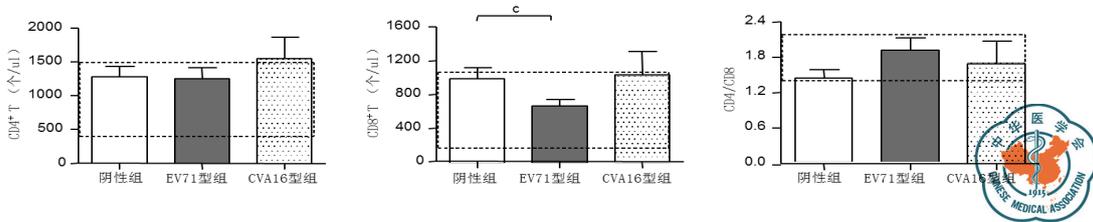
注: 随访1、3、5 d EV71型手足口病患儿外周血单核细胞亚群的动态变化。采集第1、3、5 d接受治疗的EV71患儿外周血, 流式细胞仪检测单核细胞亚群的变化, 动态观察EV71型患儿单核细胞亚群的动态变化

图3 随访EV71型手足口病患儿外周血单核细胞亚群的变化



注: 各组手足口病患儿外周血单核细胞亚群的比例变化。采集健康儿童和未经治疗手足口病患儿外周血, 流式细胞仪检测单核细胞亚群, 分析各亚群的比例变化 ($t \geq 3.070, ^aP < 0.01; t \geq 4.092, ^bP < 0.001$)

图2 健康儿童及手足口病患儿外周血单核细胞亚群的比例



注: 手足口患儿外周血CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞绝对计数及CD4⁺与CD8⁺T淋巴细胞绝对计数的比值。采集未经治疗0d的手足口病患儿外周血, 流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群, 采用Multiset软件获取细胞绝对计数

图4 手足口患儿外周血淋巴细胞绝对计数及比值

讨 论

在本研究中,通过分析未经治疗的手足口患儿(阴性组、EV71型组和CVA16型组)外周血单核细胞亚群及接受治疗后EV71患儿的随访,与健康同龄儿童相比,各组CD14^{high}CD16⁻单核细胞亚群比例明显降低,CD14^{high}CD16⁺亚群比例明显升高。对EV71阳性组患儿的随访观察发现,随着治疗时间的推移,外周血CD14^{high}CD16⁺亚群比例逐渐回落,趋于正常水平。

生理情况下,外周血单核细胞的CD14^{high}CD16⁻亚群占总单核总数的90%~95%,为典型的大单核细胞形态,又称“炎症型单核细胞(inflammation monocyte)”或“经典型单核细胞(classic monocyte)”。在炎症反应中,此型细胞可以分泌大量的炎性细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)参与炎症反应;CD14^{high}CD16⁺亚群和CD14^{low}CD16⁺亚群分别占总单核数的5%和10%,又称为“定居型单核细胞(resident monocyte)”,与成熟巨噬细胞表型相近,高表达HLA-DR、CD64、CCR5和CD86,是具有免疫调节功能的单核细胞,或者为表型介于单核细胞和树突细胞(DCs)之间的细胞^[2-4],尽管该亚群单核细胞所占比例很少,但在脓毒症、病毒感染、结核病、肿瘤等患者外周血中明显升高^[5]。有文献^[6]报道,HIV感染患者外周血中Mo2单核细胞亚群比例明显升高,并与CD4⁺T细胞计数、血浆病毒载量密切相关且随抗病毒治疗逐渐回落。上述研究表明,Mo2单核细胞亚群在疾病的发展中发挥着极为重要的调节功能。

手足口病是由肠道病毒引起的传染病,引发手足口病的肠道病毒有20多种,其中EV71和CVA16较多见,在本研究队列中,EV71阳性标本占总数的35.6%,CVA16阳性标本占总数的4.8%。手足口患儿外周血单核细胞亚群的变化是由于EV71型和CVA16型肠道病毒持续感染造成,反映了患儿体内天然免疫的状态,而其中CD14^{high}CD16⁺单核细胞比例的增加,可能代表手足口病天然免疫反应机制在清除手足口病毒方面具有重要意义。随着抗病毒治疗的干预,单核细胞水平逐渐恢复至接近健康儿童水平。在本研究队列中,还包括约60%的RT-PCR未鉴定出病毒类型的阴性病例,但阴性组与EV71型组和CVA16型组单核细胞比例变化无统计学意义。这说明,手足口病的发病机制可能与感染的病毒

类型无关,但感染病毒的类型决定疾病的严重程度^[7],这一点与既往报道一致^[8]。

CD8⁺T淋巴细胞作为获得性免疫的重要组成部分,参与手足口病的发生与发展^[9]。我们的队列发现,手足口患儿外周血CD4⁺T淋巴细胞亚群的绝对计数并无明显变化,EV71型组患儿CD8⁺T细胞亚群值低于阴性组,这提示EV71型病毒的感染可能造成较为严重的T淋巴细胞免疫异常,外周血淋巴细胞数目的降低程度与患儿病情相关^[10-11]。文献报道^[12-14],在手足口患儿中,外周血CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞亚群均降低,重症患儿的淋巴细胞低于普通患儿。

目前,手足口病既无预防性疫苗也无特异性的抗病毒治疗^[15],了解手足口病免疫发病机制,对免疫调节治疗有指导意义。本研究初步揭示了外周血单核细胞亚群在手足口病患儿机体中的变化,并辅助对T淋巴细胞亚群计数进行了分析,但复杂的天然免疫和适应性免疫在手足口病发病机制方面的意义尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 黎念,雷伟.手足口病研究进展.重庆医学,2011,40(1):93-95.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*,2010,327(5966):656-661.
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*,2012,53(1-3):41-57.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*,2005,5(12):953-964.
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*,2007,81(3):584-592.
- Han J, Wang B, Han N, et al. CD14^{high}CD16⁺ rather than CD14^{low}CD16⁺ monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *AIDS*,2009;52(5):553-559.
- 毛国顺,罗玲,刘晓琳,等.手足口病轻症与重症患者临床特征比较.中华传染病杂志,2008,26(7):387-390.
- 陈宏,苏俐.手足口病的研究现状.现代中西医结合杂志,2012,21(2):224-226.
- 付丹,李成荣,何颜霞,等.肠道病毒71型感染患儿免疫功能探讨.中华儿科杂志,2009,47(11):829-833.
- 蔡莉芬,孙梅花,王立静. EV71感染手足口病患儿免疫功能研究及其临床意义.河北医药,2011,33(7):1055-1057.
- Chang LY, Lin TY, Hsu KH, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet*,1999,354(9191):1682-1686.
- 曾慧慧,顾燕,段雪飞,等.手足口病患儿外周血T淋巴细胞亚群的临床研究.中华传染病杂志,2010,28(2):82-85.
- 庄宇,温柏平,杨晓红,等.手足口病患儿T淋巴细胞亚群检测.中华民族民间医药,2010,19(4):82.
- 莫扬.手足口病危重症患儿淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测.微循环学杂志,2011,21(4):58-59.
- Wei R, Yang C, Zeng M, et al. A Dominant EV71-Specific CD4⁺T Cell Epitope Is Highly Conserved among Human Enteroviruses. *PLOS One*,2012,7(12):1-8.

(收稿日期:2013-03-07)

(本文编辑:李卓)