

EV71感染手足口病患儿T细胞亚群表达

邹莉 梅文静

【摘要】目的 分析EV71感染手足口病患儿T细胞亚群的表达。**方法** 选取2015年10月至2017年10月于惠州市中心人民医院接受治疗的手足口病患儿共302例, 其中EV71感染患儿110例, 依据EV71感染患儿中枢神经有无被累及分成轻症组(69例)与重症组(41例), 选取同期于本院体检的健康儿童110例作为对照组; 流式细胞仪对T淋巴细胞亚群 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD8^-$ 、 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD8^-/CD3^+CD8^+$ 、Th1、Th2、Th1/Th2、Tc1、Tc2、Tc1/Tc2、Th17、Tc17、调节性T淋巴细胞(Treg)及Th17/Treg所占比率进行检测, ELISA法检测各组对象血清内转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、白细胞介素4 (IL-4)、白细胞介素17A (IL-17A) 及 γ 干扰素 (IFN- γ) 含量变化。**结果** 轻症组患儿血清Th1、Th1/Th2、Tc1和Tc1/Tc2所占比率为 $(9.59 \pm 2.15)\%$ 、 $(8.67 \pm 2.19)\%$ 、 $(28.82 \pm 5.49)\%$ 和 $(56.39 \pm 10.48)\%$, 重症组分别为 $(13.58 \pm 2.74)\%$ 、 $(9.45 \pm 2.29)\%$ 、 $(40.46 \pm 6.37)\%$ 和 $(54.87 \pm 9.61)\%$, 均显著高于对照组患儿, 差异均有统计学意义($F = 12.159, 11.470, 13.925, 10.542, P = 0.016, 0.013, 0.008, 0.035$); 轻症组患儿血清IFN- γ 和IL-17A水平分别为 (11.32 ± 2.76) pg/ml和 (6.38 ± 2.10) pg/ml, 重症组分别为 (11.38 ± 2.65) pg/ml和 (12.59 ± 3.58) pg/ml, 均显著高于对照组患儿, 差异均有统计学意义($F = 12.590, 11.664, P = 0.024, 0.019$)。**结论** EV71感染后手足口患儿体内Th17/Treg与Th1/Th2比例失衡。

【关键词】 手足口病; 肠道病毒71型; T细胞亚群

Expression of T cell subsets in children with hand, foot and mouth disease caused by enterovirus 71 infection Zou Li, Mei Wenjing. Department of Pediatrics, Huizhou City People's Hospital, Huizhou 516001, China

Corresponding author: Zou Li, Email: 3056961993@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the expression of T cell subsets in children with hand, foot and mouth disease (HFMD) of EV71 infection. **Methods** From October 2015 to October 2017, 302 children with HFMD were treated in Huizhou City People's Hospital, including 110 cases with EV71 infection. According to whether or not the central nervous system was involved in children with EV71 infection, cases were divided into mild group (69 cases) and severe group (41 cases), while 110 healthy children were selected as the control group. T lymphocyte subsets $CD3^+$, $CD3^+CD8^-$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD8^-/CD3^+CD8^+$, Th1, Th2, Th1/Th2, Tc1, Tc2, Tc1/Tc2, Th17, Tc17 and regulatory T cells (Treg) and Th17/Treg ratio were detected by flow cytometry, respectively. The change of serum TGF-beta 1 (TGF- $\beta 1$), interleukin-4 (IL-4), interleukin-17A (IL-17A) and interferon gamma (IFN- γ) were detected by ELISA. **Results** The levels of serum Th1, Th1/Th2, Tc1 and Tc1/Tc2 of cases in mild group were $(9.59 \pm 2.15)\%$, $(8.67 \pm 2.19)\%$, $(28.82 \pm 5.49)\%$ and $(56.39 \pm 10.48)\%$; while those in severe group were $(13.58 \pm 2.74)\%$, $(9.45 \pm 2.29)\%$, $(40.46 \pm 6.37)\%$ and $(54.87 \pm 9.61)\%$, respectively, which were all significantly higher than those of the control group, with statistically significant differences ($F = 12.159, 11.470, 13.925, 10.542, P = 0.016, 0.013, 0.008, 0.035$). The levels of serum IFN- γ and IL-17A levels of cases in mild group were (11.32 ± 2.76) pg/ml, (6.38 ± 2.10) pg/ml, while in severe group were (11.38 ± 2.65) pg/ml, (12.59 ± 3.58) pg/ml, which were all significantly higher than those of the control group, with significant differences ($F = 12.590, 11.664; P = 0.024, 0.019$). **Conclusion** The proportion of Th17/Treg and Th1/Th2 in children with HFMD after EV71 infection is unbalanced.

【Key words】 Hand foot and mouth disease; Enterovirus 71; T cell subgroup

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)为临床常见急性传染疾病,一般5岁以下的婴幼儿多发,柯萨奇病毒16(Coxsackievirus 16, CoxA16)与肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)为主要病原体。多数患儿病情较轻且有自限性,但也有部分感染EV71患儿伴有并发症,如肺水肿、无菌性脑膜炎和脑干脑炎等,甚至会引发死亡^[1-2]。目前关于感染EV71致病机制尚未完全明确,研究显示感染EV71以后机体炎症介质含量上升,包含 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、干扰素诱导蛋白10、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素8(interleukin-8, IL-8)和白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等,患儿体内炎症介质和其疾病程度与预后密切相关。多种免疫相关疾病引发感染的主要因素为机体T细胞亚群不平衡^[3-4]。本文通过分析手足口病患儿的T细胞亚群在EV71感染后机体免疫应答相关机制,为HFMD患儿治疗提供一定的实验室依据,现报道如下。

资料与方法

一、一般资料

选取2015年10月至2017年10月于惠州市中心人民医院接受治疗的HFMD患儿共302例,其中EV71感染患儿110例,依据EV71感染患儿中枢神经有无被累及分成轻症组(69例)与重症组(41例),有中枢神经相关并发症如脑炎、无菌性脑膜炎等列入重症组,无中枢神经相关并发症患儿列入轻症组;选取同期于本院体检健康儿童110例作为对照组;本研究经医院伦理委员会批准,患儿及家属知情并同意;轻症组和重症组患儿血清WBC水平均高于对照组,重症组患儿发病持续时间高于轻症组患儿,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表1。

二、研究对象纳入及排除标准

1. 纳入标准: HFMD诊断依据2008年卫生部门制定诊断准则^[5];在入院时采集患儿大便与咽拭子标本,大便或者咽拭子内EC71病毒的核酸阳性判定为EV71感染。

2. 排除标准: ①进行过类固醇和免疫丙种球蛋白治疗患儿;②合并造血系统、心脑血管、肾及肝等原发性疾病。

三、方法

1. 标本收集: 入院3 d内采集患儿标本,大便标本与咽拭子用病毒运输管采集,外周血清使用肝素抗凝管收集,血清内单核细胞使用淋巴细胞分离液进行分离,胎牛血清内重悬,细胞浓度为 2×10^6 个/ml。

2. T淋巴细胞亚群分析: Th1、Tc1、Th2、Tc2、Th17及Tc17细胞,CD3/CD8细胞于表面染色后固定、破膜,加入抗人IL-17A、IL-4与IFN- γ 抗体行胞内染色。重悬Treg细胞在无PMA语离子霉素条件下,经CD4/CD25染色20 min,固定破膜以后,加入Foxp3行胞内染色。使用流式细胞仪和Cell Quest软件上机检测分析。为确定阳性和阴性细胞的界值,荧光阴性范围由同型对照建立。

3. ELISA法检测三组对象血清内转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素17A(interleukin-17A, IL-17A)及IFN- γ 含量,试剂盒购自美国RD公司,具体步骤依据试剂盒说明书来进行,IFN- γ 最低检测浓度为0.20 pg/ml,IL-4为0.20 pg/ml,IL-17A为0.21 pg/ml,TGF- β 为4.61 pg/ml。

4. 患儿家属填写由本院自行拟定的调查表,分析患儿EV71感染相关危险因素。

四、统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。各组研究对象的T淋巴细胞亚群、血清TGF- β 1、IL-4、IL-17A及IFN- γ 含量为计量资料且呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表

表1 重症组、轻症组 HFMD 患儿及健康对照组一般资料 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	男/女 (例)	平均年龄 (岁)	最高体温 (℃)	发病持续时间 (d)	中性粒细胞 (%)	WBC ($\times 10^9/L$)	CRP (mg/L)
轻症组	69	47/22	2.08 \pm 0.93	38.62 \pm 0.42	2.70 \pm 1.24	59.06 \pm 13.72	10.28 \pm 2.16	5.97 \pm 2.49
重症组	41	26/15	1.97 \pm 0.86	38.78 \pm 0.49	4.31 \pm 1.46	63.58 \pm 16.43	12.26 \pm 2.58	8.04 \pm 3.45
对照组	110	63/47	2.05 \pm 0.84	—	—	62.07 \pm 8.51	6.21 \pm 0.37	—
统计量	$\chi^2 = 1.027$		$F = 2.119$	$F = 0.983$	$F = 10.481$	$F = 1.697$	$F = 11.452$	$F = 2.067$
P值	0.183		0.229	0.604	0.032	0.315	0.025	0.174

注: “—”: 无相关数据

示, 各组间比较采用单因素方差分析; 其余资料为计数资料, 统计分析采用 χ^2 检验、Fisher确切概率检验或非参数检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组患儿血清CD3⁺和CD8⁺水平及相关比率

各组患儿CD3⁺、CD3⁺CD8⁻、CD3⁺CD8⁺和CD3⁺CD8⁻/CD3⁺CD8⁺差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见表2。

二、各组患儿Tc1/Tc2和Th1/Th2失衡率

轻症组和重症组患儿血清Th1、Th1/Th2、Tc1和Tc1/Tc2所占百分比均比对照组高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 详见表3。

三、各组患儿Treg/Th17失衡率

轻症组和重症组血清Th17、Tc17及Th17/Treg均较对照组高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 详见表4。

四、各组患儿血清相关炎症因子含量变化

轻症组和重症组患儿血清IFN- γ 和IL-17A含量均显著高于对照组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 详见表5。

表2 各组研究对象血清 CD3⁺ 和 CD8⁺ 水平及相关比率 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	例数	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁻	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁻ /CD3 ⁺ CD8 ⁺
轻症组	69	63.80 \pm 10.75	34.52 \pm 9.03	24.69 \pm 6.28	1.49 \pm 0.21
重症组	41	65.08 \pm 9.76	33.71 \pm 7.95	26.27 \pm 6.89	1.36 \pm 0.18
对照组	110	66.62 \pm 9.57	35.98 \pm 9.37	24.95 \pm 7.04	1.45 \pm 0.19
F值		0.895	1.637	2.115	1.492
P值		0.193	0.274	0.182	0.317

表3 各组患儿 Tc1/Tc2 和 Th1/Th2 失衡率 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	例数	Th1	Th2	Th1/Th2	Tc1	Tc2	Tc1/Tc2
轻症组	69	9.59 \pm 2.15	0.99 \pm 0.16	8.67 \pm 2.19	28.82 \pm 5.49	0.46 \pm 0.08	56.39 \pm 10.48
重症组	41	13.58 \pm 2.74	1.38 \pm 0.22	9.45 \pm 2.29	40.46 \pm 6.37	0.61 \pm 0.12	54.87 \pm 9.61
对照组	110	6.87 \pm 1.25	1.16 \pm 0.18	5.16 \pm 1.73	15.21 \pm 2.91	0.42 \pm 0.11	38.81 \pm 8.74
F值		12.159	1.366	11.470	13.925	2.108	10.542
P值		0.016	0.354	0.013	0.008	0.206	0.035

表4 各组患儿 Th17/Treg 失衡率 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	例数	Th17	Tc17	Treg	Th17/Treg
轻症组	69	1.33 \pm 0.24	0.62 \pm 0.16	0.81 \pm 0.17	1.39 \pm 0.36
重症组	41	2.36 \pm 0.61	1.02 \pm 0.24	0.98 \pm 0.23	2.90 \pm 0.67
对照组	110	0.59 \pm 0.12	0.29 \pm 0.05	0.79 \pm 0.21	0.87 \pm 0.24
F值		13.255	14.691	2.108	12.450
P值		0.006	0.009	0.281	0.016

表5 各组患儿血清相关炎症因子含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IFN- γ (pg/ml)	IL-17A (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	TGF- β 1 (ng/ml)
轻症组	69	11.32 \pm 2.76	6.38 \pm 2.10	5.41 \pm 2.10	39.02 \pm 6.17
重症组	41	11.38 \pm 2.65	12.59 \pm 3.58	4.85 \pm 1.86	42.18 \pm 6.50
对照组	110	1.21 \pm 0.47	3.29 \pm 0.82	4.69 \pm 1.63	41.70 \pm 5.23
F值		12.590	11.664	1.491	2.337
P值		0.024	0.019	0.136	0.172

表6 HFMD 患儿 EV71 感染危险因素单因素分析 [例 (%)]

影响因素	例数	EV71感染	χ^2 值	P值
发热			10.287	0.042
是	268	105 (39.18)		
否	34	5 (14.71)		
首发症状			13.551	0.026
先出疹	52	7 (13.46)		
先发热	129	43 (33.33)		
发热同时出疹	121	60 (49.59)		
最高体温 > 38.5 °C			12.750	0.017
是	237	96 (40.51)		
否	65	14 (21.54)		
咽峡部疱疹			10.352	0.028
是	78	43 (55.13)		
否	224	67 (29.91)		
与患儿接触			11.221	0.035
是	71	45 (63.38)		
否	231	65 (28.14)		
抽搐			9.069	0.029
是	58	34 (58.62)		
否	244	76 (33.93)		
呕吐			14.922	0.011
是	79	52 (65.82)		
否	223	58 (26.01)		

五、HFMD患儿EV71感染危险因素单因素分析

发热、首发症状、最高体温、咽峡部疱疹、与患儿接触、抽搐、呕吐均为HFMD患儿EV71感染的危险因素，差异均有统计学意义（ P 均<0.05），详见表6。

讨 论

肠道病毒EV71为一种人肠道病毒，临床常引起HFMD或病毒性咽峡炎等，部分重症患儿甚至合并心肌炎、肺水肿和脑炎等。该病好发于儿童，多发于3岁以下婴幼儿，少数病情较重患儿可危及生命。目前有研究显示体内免疫炎症反应异常会加速EV71感染所致HFMD患儿的病情进展，但在感染EV71后宿主免疫反应与体内T淋巴细胞改变相关研究还相对缺乏^[6-7]。本研究对EV71感染所引发不同程度病情患儿细胞炎性因子与T细胞亚群进行研究分析显示：患儿疾病状况与细胞炎性因子及T细胞亚群密切相关，如HFMD患儿血清IL-17A、IFN- γ

及Th1、Tc1、Th17与Tc17比率较高，提示EV71感染会激活宿主的免疫系统。另有相关研究显示，HFMD合并肺水肿患儿血清IFN- γ 、IL10与IL13含量显著升高，提示EV71感染可能造成患儿免疫系统功能失衡^[8-10]。

目前尚无研究表明HFMD患儿血清Th1异常表达，但通过对IF- γ 在内Th1型细胞进行研究显示血清Th1在HFMD患儿发病因素中有重要影响^[11-13]。本研究显示，轻症组与重症组患儿血清内Tc1与Th1淋巴细胞和IFN- γ 含量显著升高，此外Th1/Th2比值亦升高，提示EV71感染可造成Th细胞表型向Th1进行转化，进而推测手足口病可能为Th1所介导的临床感染性疾病。另外，本研究显示HFMD患儿血清Th17水平较对照组升高，与姚学君及符青松等相关研究结果一致^[14-16]，提示HFMD患儿发病时机体内Th1/Th2表达不平衡，同时Th17/Treg表达不平衡也加速病情进展。王戡等^[17-19]研究显示，促炎细胞因子IL-17A通过对趋化因子级细胞产生刺激，进而加速中性粒细胞成熟与迁移，提示Th17具有免疫保护作用，即Th17双重生物学能力会因为感染不同病毒而出现差异^[20-22]，EV71感染会加速疾病进展^[23-25]。本研究对EV71感染危险因素进行单因素分析显示发热、体温过高、咽峡部有疱疹、曾与患儿接触、发生抽搐与呕吐均为患儿感染相关危险因素。

综上所述，HFMD患儿机体内Th17/Treg与Th1/Th2失衡可能在EV71感染发展进程中具有重要影响。

参 考 文 献

- [1] 李莉, 张倩, 罗云娇, 等. CD8⁺ T细胞在肠道病毒71型感染重症手足口病中的作用研究[J]. 中国小儿急救医学, 2016, 23(9): 600-603.
- [2] 茆静, 何雅青, 余光清, 等. Toll样受体7在肠道病毒71型感染人Jurkat T细胞诱导炎症因子中的作用[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(3): 266-269.
- [3] Lim CTK, Jiang L, Ma S, et al. Basic reproduction number of coxsackievirus type A6 and A16 and enterovirus 71: estimates from outbreaks of hand, foot and mouth disease in Singapore, a tropical city-state[J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(5): 1028-1034.
- [4] 李晶, 单若冰, 刘瑞海, 等. 肠道病毒71型感染手足口病S100B基因多态性研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(8): 904-907.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2008年版)[J]. 首都公共卫生, 2008, 6(4): 146-148.
- [6] 陈清. IL-6和IL-13与EV71型肠道病毒感染手足口病患儿发病的相关性[J]. 重庆医学, 2015, 18(26): 3634-3636.
- [7] 石银月, 孙浩淼, 尹力扬. 首次实验室指标分析对EV71感染重症手足口病诊疗的意义[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(16): 1836-1838.

- [8] Lee DS, Lee YI, Ahn JB, et al. Massive pulmonary hemorrhage in enterovirus 71-infected hand, foot, and mouth disease.[J]. Korean J Pediatr,2015,58(3):112-116.
- [9] 毛莉萍, 秦刚, 徐明, 等. 肠道病毒71型, 柯萨奇病毒A组16型相关手足口病临床特征分析[J]. 疑难病杂志,2015,5(7):746-748.
- [10] Caine EA, Fuchs J, Das SC, et al. Efficacy of a trivalent hand, foot, and mouth disease vaccine against enterovirus 71 and Coxsackieviruses A16 and A6 in mice[J]. Viruses,2015,7(11):5919-5932.
- [11] 舒剑波, 孟英韬, 党利亨, 等. 手足口病患者176例病原检测及肠道病毒71型基因特征分析[J]. 中国实用儿科杂志,2015,7(4):296-299.
- [12] ZF Li, JJ Guo, QH Huang, et al. Molecular epidemiology and evolution of human enterovirus 71 and hand, foot and mouth disease[J]. Hereditas,2015,37(5):426-431.
- [13] 吉彦莉, 杨青俊, 王永全, 等. 北京市西城区手足口病患者肠道病毒71型VP1区基因进化分析[J]. 公共卫生与预防医学,2016,27(2):22-25.
- [14] Duong V, Mey C, Eloit M, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 at the origin of an epidemic of fatal hand, foot and mouth disease cases in Cambodia[J]. Emerg Microbes Infect,2016,5(9):104-107.
- [15] 姚学君, 金鹏飞, 嵇红, 等. 肠道病毒71型和柯萨奇病毒A组16型所致手足口病相关特征分析[J]. 中华疾病控制杂志,2015,19(4):385-388.
- [16] 符青松, 黄循斌. 外周血T淋巴细胞亚群在EV71型手足口病患者病情判断中的价值[J]. 中国医药导报,2016,13(4):113-116.
- [17] 王骥, 李琴丽, 马超锋, 等. 西安市2011-2012年重症手足口病病原学及肠道病毒71型基因特征分析[J]. 中国实用儿科杂志,2015,3(4):292-295.
- [18] 李法锦, 王丹, 韦小瑜, 等. 2015年贵州省手足口病死亡病例流行特征和肠道病毒71型VP1区基因特征[J]. 中国疫苗和免疫,2016,9(6):611-615.
- [19] 王跃飞, 林邦长, 何哲航, 等. T淋巴细胞亚群与调节性B细胞在儿童手足口病中的表达及临床意义[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(14):3319-3322.
- [20] 吴慧莲. 手足口病患者T淋巴细胞亚群与NK细胞和血清白介素, TNF- α 变化的研究[J]. 中国妇幼保健,2017,32(13):2921-2923.
- [21] Chen W, Yang Z, Lian L, et al. Case report: Features of hand, foot and mouth disease in neonates[J]. Medicine,2017,96(42):8307.
- [22] 钟少龙. 手足口病毒分型及药物干预对免疫功能的影响[J]. 中国妇幼保健研究,2017,28(9):1074-1079.
- [23] 林洁, 胡志宏, 王洁, 等. Th22细胞在肠道病毒71型感染导致手足口病患者中的表达及其临床意义[J]. 中华临床感染病杂志,2017,10(2):146-149.
- [24] Second J, Velter C, Cală SS, et al. Clinicopathologic analysis of atypical hand, foot, and mouth disease in adult patients[J]. J Am Acad Dermatol,2017,76(4):722-729.
- [25] 周亚兵, 吴敏, 沈袁恒, 等. 小儿重症手足口病的细胞免疫和体液免疫临床特征研究[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(12):1163-1165.

(收稿日期: 2017-12-27)

(本文编辑: 孙荣华)

邹莉, 梅文静. EV71感染手足口病患者T细胞亚群表达[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018,12(4):397-401.