

# 肠道病毒71型衣壳蛋白VP1特异性识别和激活手足口病患儿CD4<sup>+</sup>T细胞免疫活化

高宁 李梅 李亚萍 王文俊 石娟娟 贾晓黎 党双锁

**【摘要】目的** 探讨肠道病毒71型衣壳蛋白VP1诱导EV71感染患儿外周血T淋巴细胞产生干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 应答特征。**方法** 收集2010年9月至2011年12月西安交通大学医学院第二附属医院和西安市儿童医院住院的EV71感染手足口病患儿共31例, 根据临床特征分为3组: 急性感染期组(16例)、临床恢复期组(9例)和感染恢复后1个月组(6例); 另外, 选取10例健康儿童为对照组。通过重叠肽技术合成覆盖EV71衣壳蛋白VP1 36条重叠肽段作为抗原, 采用IFN- $\gamma$ 酶联免疫斑点分析法(ELISPOT)和磁珠分选法(MACs)体外检测各组患儿EV71 VP1特异性CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞免疫应答特征。**结果** 急性感染期组有4例(25%)患儿对VP1蛋白存在T细胞免疫反应, 临床恢复期组5例(56%)患儿对VP1蛋白存在T细胞免疫反应, 其中EV71感染临床恢复期组患者反应强度最强, 显著高于急性感染期, 差异有统计学意义( $Z = -2.042$ 、 $P = 0.041$ ), 而感染恢复后1个月组和对照组均未检测到T细胞免疫反应, 临床恢复期组患者T细胞反应强度显著高于感染恢复后1个月组( $Z = -2.105$ 、 $P = 0.035$ )和对照组( $Z = -2.633$ 、 $P = 0.008$ ), 差异均有统计学意义; 提示EV71感染患儿VP1蛋白被识别的频率(即例数)随着临床症状及体征消失而消失。VP1蛋白诱导的细胞免疫应答以特异性CD4<sup>+</sup>T细胞为主导; 筛选确定了8个EV71 VP1蛋白区CD4<sup>+</sup>T细胞表位。**结论** EV71感染患儿在发病期对VP1蛋白存在特异性T细胞反应, 且以特异性CD4<sup>+</sup>T细胞为主导; 筛选确定EV71感染患儿VP1蛋白的CD4<sup>+</sup>T细胞表位有助于阐明EV71感染的细胞免疫学发病机制。

**【关键词】** 肠道病毒71; T细胞免疫; 衣壳蛋白VP1; 酶联免疫斑点分析; T细胞表位

**Enterovirus 71 capsid protein VP1 specifically recognizes and activates CD4<sup>+</sup>T cell immune activation in children with hand, foot and mouth disease** Gao Ning, Li Mei, Li Yaping, Wang Wenjun, Shi Juanjuan, Jia Xiao li, Dang Shuang suo. Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Shannxi 710004, China

Corresponding author: Dang Shuang suo, Email: dang212@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the characteristics of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) response induced by enterovirus 71 (EV71) capsid protein VP1 in peripheral blood T lymphocytes of children with EV71 infection. **Methods** From September 2010 to December 2011, a total of 31 patients with hand, foot and mouth disease (HFMD) infected with EV71 were collected from the Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University and Xi'an Children's Hospital. According to the clinical features, 31 cases were divided into three groups: acute infection group (16 cases), clinical convalescence group (9 cases) and one month after recovery of infection group (6 cases), in addition, 10 healthy children were selected as control group. Total of 36 overlapping peptides of EV71 capsid protein VP1 were synthesized by overlapping peptide technique as antigens. The immunological responses of EV71 VP1 specific CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T cells were detected by IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunoblot assay (ELISPOT) and magnetic cell sorting (MACs) in vitro. **Results** In the acute infection group, 4 cases

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.05.003

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 81701632); 西安交通大学第二附属医院人才培养专项科研青年基金[No. YJ (QN) 201520]; 陕西省重点研发计划项目 (No. 2017ZDXM-SF-071)

作者单位: 710004 西安市, 西安交通大学第二附属医院感染科

通信作者: 党双锁, Email: dang212@126.com

(25%) had T cell immune response to VP1 protein, 5 cases (56%) in the clinical convalescence group had T cell immune response to VP1 protein. The strength of T-cell responses in clinical convalescence group had the strongest, significantly higher than acute infection group ( $Z = -2.042$ ,  $P = 0.041$ ), and one month after recovery of infection group ( $Z = -2.105$ ,  $P = 0.035$ ) and control group ( $Z = -2.633$ ,  $P = 0.008$ ), with significant differences. The T cell immune response was not detected in the control group and one month after recovery of infection group. The results suggested that the frequency of VP1 protein recognition (the number of cases) disappeared with the disappearance of clinical symptoms and signs in children with EV71 infection. The cellular immune response induced by VP1 protein was dominated by specific  $CD4^+$  T cells. Eight  $CD4^+$  T cell epitopes of EV71 VP1 protein region were identified. **Conclusions** There was a specific T cell response to VP1 protein in children with EV71 infection, and the specific  $CD4^+$  T cells were dominant. The  $CD4^+$  T cell epitopes of VP1 protein were identified in EV71 infected children. It is helpful to elucidate the cellular immunopathogenesis of EV71 infection.

**【Key words】** Enterovirus 71; T cell-mediated immunity; Capsid protein VP1; Enzyme-linked immunospot assays; T cell Epitope

人肠道病毒71型 (enterovirus 71, EV71) 是引发婴幼儿手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 的主要病原体之一。自1969年 Schmidt等<sup>[1]</sup>首次分离EV71以来, 至今为止EV71感染已在全球引起三次大范围的暴发与流行, 且出现严重的神经系统并发症<sup>[2-3]</sup>。EV71被认为是继脊髓灰质炎病毒后最值得关注的嗜神经组织性肠道病毒<sup>[4-5]</sup>。分子流行病学研究显示, EV71病毒衣壳蛋白VP1是病毒的主要中和决定子, 直接决定病毒的抗原性, 具有与病毒血清型完全对应的遗传多样性, 也是目前最具有研究价值的结构蛋白<sup>[6-9]</sup>。为此, 本研究选取EV71衣壳蛋白VP1作为研究靶蛋白, 临床收集31例EV71感染患儿外周血样本, 通过重叠肽技术合成覆盖EV71病毒VP1蛋白区重叠肽段, 采用酶联免疫斑点 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT) 和磁珠分选 (magnetic cell sorting, MACs) 技术, 检测其EV71特异性 $CD4^+$  T和 $CD8^+$  T细胞免疫反应特点, 探讨VP1诱导EV71感染者在不同临床阶段时外周血T细胞免疫应答特点以及初步筛选其T细胞表位, 现报道如下。

## 资料与方法

### 一、研究对象

收集2010年9月至2011年12月西安交通大学医学院第二附属医院、西安市儿童医院 (陕西省手足口病重症及危重症病例定点收治单位) 住院手足口

病患儿共31例 (均签署知情同意书)。31例EV71感染患儿根据临床特征分为3组, 分别是急性感染期组 (发病2~4 d) 16例, 临床恢复期组 (即临床治愈出院当天) 9例, 感染恢复后1个月组 (既往感染EV71) 6例; 对照组为正常儿童即其他肠道病毒感染 (EV71、CA16和ECHO IgM均阴性) 10例。对照组入选标准: 肝、肾功能正常, HBV和HCV血清学指标阴性, 既往无过敏史, 无自身免疫性疾病、肿瘤、免疫缺陷者, 未使用激素和免疫抑制剂, 近2周内无任何疾病和不适症状, 无家族性疾病史及传染病史。

### 二、诊断标准

依据我国卫生部制定的《手足口病预防控制指南 (2010年) 》诊断标准<sup>[10]</sup>: 临床诊断病例: ①在流行季节发病, 常见于学龄前儿童, 婴幼儿多见。②发热伴手、足、口、臀部皮疹, 部分病例可无发热。③极少数重症病例皮疹不典型, 临床诊断困难, 需结合病原学或血清学检查做出诊断。无皮疹病例, 临床不宜诊断为手足口病。

### 三、方法

1. EV71 VP1蛋白基因序列重叠肽库的建立: 通过生物信息技术设计并合成36条覆盖EV71 VP1蛋白基因序列重叠多肽, 重叠多肽由自动多肽合成机 (MBS396, Advanced Chem Tech, Louisville, KY) 合成, 其中每条多肽由15~20个氨基酸组成, 相邻多肽间10个氨基酸重叠。其中VP1蛋白基因序列肽库1含1~18个重叠肽段, 每个肽库包含18条肽段, 氨基酸数目为566~719, VP1蛋白基因

序列肽库2含有19~36个重叠肽段,氨基酸数目为720~862。

2. 主要试剂: RPMI 1640完全培养液购于美国GIBCO公司; 淋巴细胞分离液均购于中国天津灏洋生物制品科技有限责任公司; 植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)和胎牛血清购于美国Sigma公司; 聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜酶标板购于法国Millipore公司; 干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) ELISPOT检测试剂盒、碱性磷酸酶标记的链霉亲和素(streptavidin labeled by alkaline phosphatase, SAAP)均购于瑞典Mabtech公司; 碱性磷酸酶显色剂购于美国Bio-Rad; 抗-CD4和抗-CD8包被的磁珠, 磁力架(Dynabeads, Invitrogen); FITC Mouse anti-human CD8和PE Mouse anti-human CD4购于美国BD公司; 重叠肽段购于PEP screen Sigma-Aldrich公司。

3. 分离外周血单核细胞及磁珠分选CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T细胞: 肝素钠抗凝新鲜外周静脉血约5 ml, 应用Ficoll密度梯度离心法分离获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 加入完全RPMI 1640培养液(含有10%胎牛血清+50 U/ml亲霉素+50 U/ml链霉素)。采用阴性磁珠分选法, 首先用不含Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液洗涤抗-CD4或抗-CD8包被的磁珠两遍, PBMCs中分别加入结合磁珠的抗体, 4℃摇晃孵育30 min后, 磁力架静置5 min后吸取获得不含CD4<sup>+</sup>T细胞和不含CD8<sup>+</sup>T细胞的细胞, 制成单细胞悬液待用, 同时采用流式细胞方法检测CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的纯度达98%以上。

4. 体外IFN- $\gamma$  ELISPOT法: ①包被: 用每孔50 ml终浓度10 mg/ml抗人IFN- $\gamma$ 抗体包被96孔PVDF膜酶标板, 4℃过夜; ②加样: 用RPMI 1640培养液洗板6次后, 每孔加完全RPMI 1640培养液50 ml, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱中封闭30 min后弃之; 分别加入实验组重叠肽库5 ml终浓度为2.5  $\mu$ g/ml每个肽段和100 ml上板前已计数的细胞[(0.5~10)  $\times 10^5$ 个细胞], 阳性对照组为同一细胞加PHA 5 ml终浓度为10 mg/ml, 阴性对照组为同一细胞加完全1640培养液5 ml, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱中过夜(12~18 h); ③显色: 每孔加入0.05% Tween 20-PBS 200 ml洗板6遍后加入终浓度为1  $\mu$ g/ml生物素标记的抗人INF- $\gamma$ 抗体(二抗)100  $\mu$ l, 室温放置2 h后; 0.05% Tween 20-PBS 200 ml

洗板6遍, 每孔加50 ml碱性磷酸酶标记的链霉亲和素(1:1000), 室温放置1 h, 0.05% Tween 20-PBS 200 ml洗板6遍后加50 ml/孔显色剂, 反应孔出现蓝色斑点, 并且斑点不再增加即可停止显色。弃掉显色液, 用自来水流水直接冲洗96孔板终止反应。④计数: 待反应板自然干后, ELISPOT reader(德国AID公司)读取反应孔蓝色斑点数, 每个斑点代表一个特异性T细胞, 用斑点形成单位(spot forming cells, SFUs)/10<sup>6</sup> PBMCs表示; 设定反应孔内SFUs>20个, 并且>3倍阴性对照孔SFUs为阳性反应判定标准。反应强度用每10<sup>6</sup>个PBMCs中斑点形成单位数表示, EV71病毒蛋白特异性免疫反应的反应频率用特异性反应阳性例数占全部例数的百分比表示。

5. 血清EV71-IgM抗体的检测: 采集31例临床诊断HFMD患儿入院后第2天内血清和阴性对照组10名健康儿童血清, 使用北京万泰生物药业股份有限公司生产的肠道病毒71型抗体(IgM)检测试剂盒(酶联免疫法), 严格按照试剂盒说明书检测抗-EV71-IgM。

#### 四、统计学处理

使用GraphPad Prism 5.0软件作图和统计学分析。非参数数据比较采用多组独立样本的Kruskal-Wallis秩和检验比较各组间的反应强度差异, 若各组间反应强度的差异有统计学意义, 再采用两组独立样本的Mann-Whitney U检验分别比较每两组间差异, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、研究对象的临床特征

入选对象均临床诊断为手足口病的住院患儿共31例, 年龄0~5岁, 男性患儿17例、女性患儿14例, 入院时平均病程为(3.91  $\pm$  1.51) d; 检测入院后第2天血清EV71-IgM阳性, 研究对象临床特征见表1。

### 二、VP1蛋白特异性T细胞反应特征分布

31例EV71感染住院患儿、10例正常小孩均采用IFN- $\gamma$  ELISPOT法检测覆盖EV71病毒衣壳蛋白VP1序列重叠肽库, 体外诱导研究对象的PBMCs应答反应, 研究发现(见图1): EV71感染患儿对VP1蛋白存在特异性T细胞反应, 其中急性感染期组患儿中有25%(4/16)对VP1蛋白存在T细胞免疫

反应,临床恢复期组患儿有56% (5/9) 患儿对VP1蛋白存在T细胞免疫反应,而感染恢复后1个月组患儿和对照组均未检测到T细胞免疫应答。

三、VP1蛋白特异性T细胞在EV71不同感染期患儿的反应特点

31例EV71感染住院患儿均采用体外IFN- $\gamma$  ELISPOT法, 分析比较EV71病毒VP1蛋白重叠肽库特异性T细胞产生IFN- $\gamma$ 反应强度和阳性反应例数(即频率)。EV71病毒衣壳蛋白VP1可诱导EV71感染各阶段患儿特异性T细胞免疫反应。如图2所示各组人群VP1蛋白特异性T细胞反应强度, 其中EV71感染临床恢复期组最强, 显著高于急性感染期, 差异有统计学意义 ( $Z = -2.042$ 、 $P = 0.041$ ); 而感染恢复后1个月组患儿和对照组均无T细胞免疫反应, 临床恢复期组显著高于感染恢复后1个月组患儿 ( $Z = -2.105$ 、 $P = 0.035$ ) 和对照组 ( $Z = -2.633$ 、 $P = 0.008$ ), 差异均有统计学意

义(详见表2), 各组人群中VP1蛋白被识别的频率随着感染恢复后而消失。为进一步分析VP1蛋白诱导特异性CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞在EV71不同感染期患儿的反应特点, 通过体外IFN- $\gamma$  ELISPOT分别检测MACs技术获得的CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞反应强度。结果显示CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞在EV71感染急性期均参与VP1蛋白特异性细胞免疫应答。VP1蛋白特异性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞在急性感染期组患儿中应答强度比例分别为41%和59%、临床恢复期组患儿分别为79%和21%。可见, VP1蛋白诱导的免疫应答急性感染期以特异性CD8<sup>+</sup>T细胞为主导, 临床恢复期组则以特异性CD4<sup>+</sup>T细胞为主导。

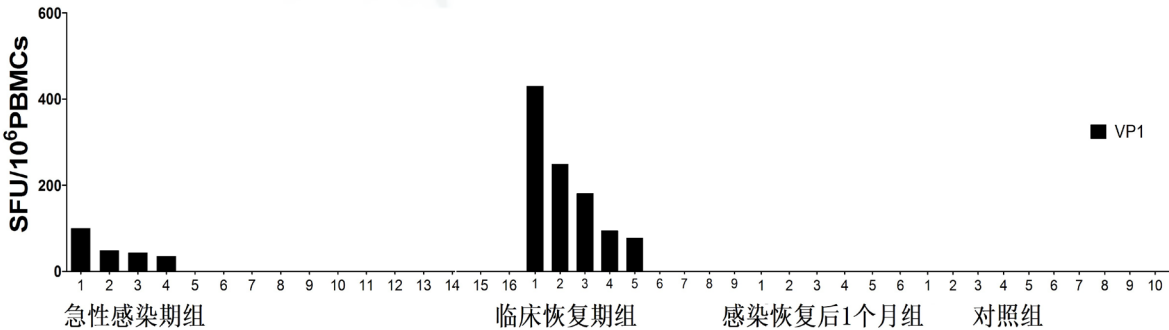
四、VP1蛋白CD4<sup>+</sup>T细胞表位的筛选

上述研究证实EV71感染患儿体外存在较强的VP1特异性T细胞应答, 筛选出VP1蛋白诱导T细胞免疫的区域。本研究将36条重叠肽段合并为2个肽库, 采用IFN- $\gamma$  ELISPOT和MACs技术再次检测,

表 1 EV71 感染 HFMD 患儿入院时临床特征

临床特征	急性感染期组 (16例)	临床恢复期组 (9例)	感染恢复后1个月组 (6例)
发病年龄(月) <sup>a</sup>	23.63 (8~49)	18.22 (9~41)	28.17 (13~43)
性别(女/男, 例)	8/8	2/7	4/2
采血时间(发病天数) <sup>a</sup>	3 (2~4)	11 (8~16)	30
病程(d) <sup>a</sup>	11.56 (8~20)	11.56 (8~17)	10.17 (8~11)
合并中枢神经系统症状[例(%)]	7 (43.75)	1 (11.11)	0 (0.00)
轻型/重型(例)	6/10	7/2	6/0
hsCRP(mg/L) <sup>a</sup>	2.80 (0.8~4.7)	8.10 (4.7~11.9)	—
最高体温(℃) <sup>a</sup>	38.4 (38.0~40.0)	38.5 (38.0~39.2)	38.2 (37.8~38.5)
白细胞计数( $10^9/L$ ) <sup>a</sup>	10.98 (8.30~14.70)	11.06 (6.70~19.90)	7.21 (3.81~11.20)

注:<sup>a</sup>: 数据表示方法为均数和范围, “—”: 无相关数据

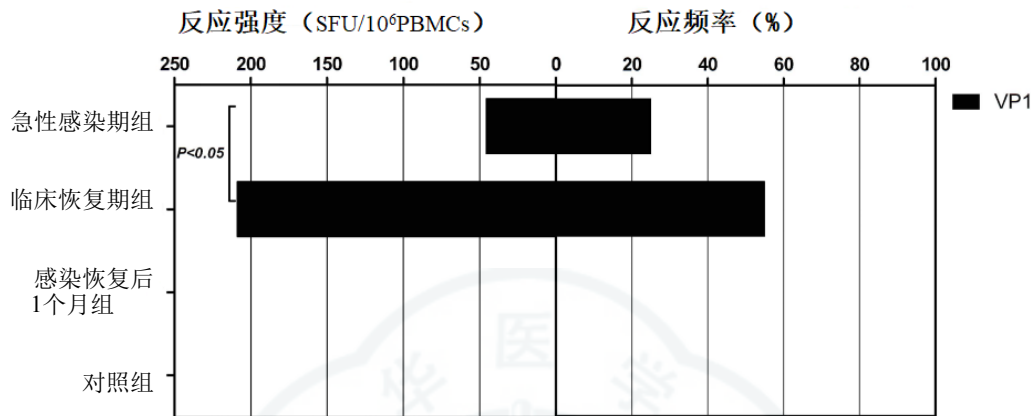


注: 31例HFMD患儿, 包括对EV71 VP1蛋白肽库有或无特异性T细胞反应患儿, 分别来自不同感染阶段: 急性感染期组患儿16例; 临床恢复期组患儿9例; 感染恢复后1个月组患儿6例; 正常对照组为其他肠道病毒感染(EV71, CA16 和ECHO IgM均阴性) 10例; 所有研究人群均以x轴表示; y轴表示ELISpot IFN- $\gamma$ 法检测EV71 VP1(黑色柱状)蛋白肽库诱导所有人群外周血T细胞免疫应答强度, 单位为SFU/ $10^6$  cells

图1 EV71病毒衣壳蛋白VP1特异性T细胞应答强度个体分布

其中从2例EV71感染者筛选到对1个或多个肽库产生特异性细胞免疫应答反应，提示VP1蛋白区域可能具有多个CD4<sup>+</sup>T细胞表位。本研究筛选确定了

8个CD4<sup>+</sup>T细胞表位，不同个体间识别的T细胞应答强度及表位存在差异可能与HLA分型不同有关（见表3）。



注：图左侧部分为应答强度中位数表示，单位为SFU/10<sup>6</sup> cells，右侧部分为不同感染期蛋白肽库应答的频率（%），EV71 VP1（黑色）。细胞反应强度两组间比较采用非参数Mann-Whitney检验，EV71感染临床恢复期组患儿显著高于急性感染期，差异有统计学意义（Z = -2.042、P = 0.041）

图2 EV71 VP1蛋白在EV71感染患儿的不同阶段特异性T细胞反应强度和频率

表 2 EV71 VP1 蛋白在 EV71 感染患儿的不同阶段 T 细胞反应强度比较

组别	Z值	P值
急性感染期组 vs. 临床恢复期组	-2.042	0.041 <sup>a</sup>
急性感染期组 vs. 感染恢复后1个月组	-1.315	0.189
急性感染期组 vs. 对照组	-1.678	0.093
临床恢复期组 vs. 感染恢复后1个月组	-2.105	0.035 <sup>a</sup>
临床恢复期组 vs. 对照组	-2.633	0.008 <sup>a</sup>
感染恢复后1个月组 vs. 对照组	0.000	1.000

注：采用多组独立样本的 Kruskal-Wallis 秩和检验比较 4 组患儿间反应强度的差异： $\chi^2 = 11.742$ 、 $P = 0.008$ ，各组患儿反应强度的差异有统计学意义。再采用两组独立样本的 Mann-Whitney U 检验分别比较每两组间差异：<sup>a</sup> $P < 0.05$

表 3 EV71 VP1 蛋白重叠肽库中含有的 CD4<sup>+</sup>T 细胞表位

患者编号	重叠肽段 <sup>a</sup>	氨基酸位置	应答强度 <sup>b</sup> (SFUs/10 <sup>6</sup> cells)	肽段序列 <sup>c</sup>	CD4/CD8为主导
1	VP1-22	734~751	711	LAWQTATNPSVFKLSDP	4
	VP1-23	742~759	736	PSVFKLSDPPAQVSVPF	
	VP1-25	758~775	658	PFMSPASAYQWFYDGYPT	
2	VP1-19	710~727	40	<u>EVVPQLLQYMEVPPGAPK</u>	4
	VP1-28	782~799	46	EKDLEYGACPNNMMGTFS	
	VP1-30	798~815	53	FSVRTVGSSKSKYPLVIR	
	VP1-33	822~839	53	<u>HVRAWIPRPMRNQNYLFK</u>	
	VP1-34	830~847	33	PMRNQNYLFSNPNYAGD	

注：<sup>a</sup>病毒株为人肠道病毒 71 型-湖北-2009-中国（GenBank accession number GU434678）；<sup>b</sup>应答强度为减去平均阴性对照值，用 SFU/10<sup>6</sup>cells 表示；<sup>c</sup>下划线加粗表示已报道确定的人 EV71 CD4<sup>+</sup>T 细胞表位<sup>[17]</sup>

## 讨 论

EV71属小RNA病毒科(picornaviridae),是引发世界范围内手足口病大规模暴发与流行的主要病原体之一<sup>[3-6]</sup>。在中国, HFMD重症病例诸如无菌性脑膜炎、脑炎、类脊髓灰质样麻痹等神经系统并发症, 94.4%重症病例由EV71感染引起, 病情凶险, 病死率高<sup>[11-14]</sup>。目前已明确EV71是单股正链RNA, 约含有7 408个核苷酸, 仅有1个开放阅读框, 基因组结构从5'末端至3'末端依次为5'-UTR-VP4-VP2-VP3-VP1-2A-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3' UTR-PolyA, 经翻译后加工, 共编码11个蛋白, VP1、VP2、VP3和VP4为4种衣壳蛋白组成的结构蛋白。在对Picornaviridae病毒研究中, 不难发现其病毒结构蛋白与疾病的特异性细胞免疫反应及疾病进展有关。在对HFMD研究中学者们已注意到VP1的研究价值。其可能与特异性T淋巴细胞免疫反应、嗜神经性导致神经细胞变性坏死或凋亡等相关<sup>[15-17]</sup>。

病毒感染机体后, 可以诱导机体产生特异性免疫应答包括B细胞产生的中和抗体和T细胞介导的细胞免疫反应。现已有报道针对EV71 B细胞表位<sup>[18-19]</sup>, 中和抗体表位主要位于结构蛋白VP1上。然而对T细胞表位的研究是空白, 特别是EV71蛋白特异性细胞免疫在HFMD疾病进展中的作用尚不清。目前已明确, HFMD患儿产生的抗-EV71中和抗体水平与疾病严重程度无相关性<sup>[20]</sup>, 推测在发病中起作用的更可能是细胞免疫。在已知与EV71同一病毒属Picornaviridae的研究中不难发现这些病毒均含有B和T细胞表位。如口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)<sup>[21]</sup>、B19细小病毒(parvovirus B19)<sup>[22]</sup>和猴病毒(simian virus 40, SV40)<sup>[23]</sup>等病毒衣壳蛋白或结构蛋白VP1通常参与中和反应。本课题组选取EV71衣壳蛋白VP1作为研究免疫优势表位候选靶蛋白<sup>[24]</sup>。通常细胞免疫在病毒清除过程中起主要作用, 本研究重点进行T细胞表位的研究。

本研究采用IFN- $\gamma$  ELISPOT技术检测覆盖EV71衣壳蛋白VP1的36条重叠肽段, 体外诱导31例EV71感染不同临床阶段患儿外周血特异性T细胞免疫应答特点。急性感染期组有25% (4/16) 患儿对VP1蛋白存在T细胞免疫反应, 临床恢复期组有56% (5/9) 患儿对VP1蛋白存在T细胞免疫反应, 而感染恢复后1个月组和对照组均未检测到T细胞

免疫反应; 提示随着EV71感染进展, VP1诱导T细胞产生IFN- $\gamma$ 的反应强度和频率显著增加, 而在EV71感染完全恢复1个月后即既往感染状态时T细胞免疫应答消失。提示EV71感染患儿的VP1蛋白被识别的频率随着临床症状及体征的消失而消失, 证实在EV71感染发病阶段VP1蛋白存在T细胞免疫反应参与了发病过程。此外, 本研究发现在EV71感染早期, EV71感染患儿可检测到VP1蛋白特异性CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞免疫应答, 但在疾病恢复期发现CD4<sup>+</sup>T逐渐转化为主导地位。提示VP1蛋白诱导的免疫应答EV71感染早期以特异性CD8<sup>+</sup>T细胞为主导, 而在EV71感染HFMD恢复后则完全为特异性CD4<sup>+</sup>T细胞免疫反应。

本研究初步筛选的8个EV71 VP1 蛋白的T细胞表位, 这些单个重叠肽段同时可以诱导CD4<sup>+</sup>T细胞产生IFN- $\gamma$ , 说明CD4<sup>+</sup>T细胞能够识别这些抗原表位, 诱导细胞免疫主导应答。Foo等<sup>[18-19, 25]</sup>研究中发现, EV71衣壳蛋白VP1分别位于66~77、145~159和247~261位氨基酸合成肽, 通过体外T细胞增殖实验可诱导EV71感染者体外CD4<sup>+</sup>T细胞增殖反应有效产生IL-2和IFN- $\gamma$ , 提示VP1蛋白区上存在T细胞表位。本研究筛选确定的VP1-19上位于710~727氨基酸EVVPQLQLQYMFVPPGAPK与Foo等<sup>[18]</sup>报道合成肽SP2中145~159位氨基酸部分重叠, 也再次确认VP1蛋白上存在重要的CD4<sup>+</sup>T细胞表位。这些结果提示VP1蛋白诱导的细胞免疫应答参与了疾病的进展过程, 而且是以特异性CD4<sup>+</sup>T细胞为主导。此发现提示EV71衣壳蛋白VP1特异性T细胞反应在宿主抗病毒免疫反应中扮演着重要角色。

综上, EV71衣壳蛋白VP1特异性T细胞免疫应答在EV71感染者中普遍存在, 并且以特异性CD4<sup>+</sup>T细胞为主导; 筛选所确定的VP1蛋白区CD4<sup>+</sup>T细胞表位, 有助于阐明EV71感染的细胞免疫应答机制。

## 参 考 文 献

- [1] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system[J]. J Infect Dis, 1974, 129(3):304-309.
- [2] 高宁, 党双锁, 李梅. 肠道病毒71型手足口病致神经系统发病机制的最新进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2012, 6(2):162-164.
- [3] Weng KF, Chen LL, Huang PN, et al. Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection[J]. Microbes Infect, 2010, 12(7):505-510.

- [4] Zhang W, Dai W, Zhang C, et al. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1):94.
- [5] Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, et al. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(11):1097-1105.
- [6] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11):778-790.
- [7] Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(13):929-935.
- [8] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26(1):91-107.
- [9] Tseng FC, Huang HC, Chi CY, et al. Epidemiological survey of enterovirus infections occurring in Taiwan between 2000 and 2005: Analysis of sentinel physician surveillance data[J]. *J Med Virol*, 2007, 79(12):1850-1860.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 手足口病的诊疗指南(2010年版)[J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(24):1473-1475.
- [11] Dang SS, Li M, Gao N, et al. Clinical feature of 36 critical cases of hand foot and mouth disease[J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(11):S41-S42.
- [12] Wang Y, Feng ZJ, Yang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease in China patterns of spread and transmissibility[J]. *Epidemiology*, 2011, 22(6):781-792.
- [13] Chang LY, Hsiung CA, Lu CY, et al. Status of cellular rather than humoral immunity is correlated with clinical outcome of enterovirus 71[J]. *Pediatr Res*, 2006, 60(4):466-471.
- [14] Dang SS, Gao N, Li M. The pathogenesis during enterovirus 71-induced HFMD[J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(11):S108-S108.
- [15] Fujii K, Sudaka Y, Takashino A, et al. VP1 amino acid residue 145 of enterovirus 71 is a key residue for its receptor attachment and resistance to neutralizing antibody during cynomolgus monkey infection[J]. *J Virol*, 2018. [Epub ahead of print].
- [16] Kataoka C, Suzuki T, Kotani O, et al. The role of VP1 amino acid residue 145 of enterovirus 71 in viral fitness and pathogenesis in a cynomolgus monkey model[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(7):e1005033.
- [17] Victorio CB, Xu Y, Ng Q, et al. Cooperative effect of the VP1 amino acids 98E, 145A and 169F in the productive infection of mouse cell lines by enterovirus 71 (BS strain)[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5:e60.
- [18] Foo DGW, Alonso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. *Virus Res*, 2007, 125(1): 61-68.
- [19] Foo DGW, Ang RX, Alonso S, et al. Identification of immunodominant VP1 linear epitope of enterovirus 71 (EV71) using synthetic peptides for detecting human anti-EV71 IgG antibodies in western blots[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(3):286-288.
- [20] Yang C, Deng C, Wan J, et al. Neutralizing antibody response in the patients with hand, foot and mouth disease to enterovirus 71 and its clinical implications[J]. *J Virol*, 2011, 8(16):1261-1263.
- [21] Bae JY, Moon SH, Choi JA, et al. Recombinant DNA and protein vaccines for foot-and-mouth disease induce humoral and cellular immune responses in mice[J]. *Immune Netw*, 2009, 9(6):265-273.
- [22] Lindner J, Barabas S, Saar K, et al. CD4(+) T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent parvovirus B19 infection[J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2005, 52(7-8):356-361.
- [23] Lundstig A, Eliasson L, Lehtinen M, et al. Prevalence and stability of human serum antibodies to simian virus 40 VP1 virus-like particles[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 6):1703-1708.
- [24] Yuan J, Shen L, Wu J, et al. Enterovirus A71 proteins: structure and function[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9(21):286.
- [25] Foo DGW, Macary PA, Alonso S, et al. Identification of human CD4(+) T-cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71[J]. *Viral Immunol*, 2008, 21(2):215-224.

(收稿日期: 2018-05-29)

(本文编辑: 孙荣华)

高宁, 李梅, 李亚萍, 等. 肠道病毒71型衣壳蛋白VP1特异性识别和激活手足口病患儿CD4<sup>+</sup> T细胞免疫活化[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(5):427-433.