

· 综述 ·

肠道病毒 71 相关性手足口病新进展

刘映霞 周伯平

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV 71)是引起手足口病(Hand foot and mouth disease, HFMD)的常见病因,因近年来 EV 71 相关性 HFMD 在全球多个国家和地区暴发流行,且与神经系统严重并发症的发生密切相关,对 EV 71 的研究成为了热点。

一、重症手足口病临床特征

HFMD 的基本临床表现是发热、手足皮疹和口腔溃疡。与轻型患者比较,重型手足口病发热率和发热程度更高,皮疹分布更稀疏。90% 以上重型患者出现肢体抖动,常伴有脑膜炎、脑炎、脑干脑炎、肺水肿等并发症^[1]。

EV 71 累及神经系统主要表现为急性无菌性脑膜炎、脑干脑炎、脊髓灰质炎样麻痹等,多发生于 5 岁以下幼儿,1 岁以下婴儿发病率最高。深圳某医院 2008 年 5 月~2008 年 6 月收治重症 HFMD 患者 21 例,重症患者特点如下^[1]:EV 71 检出率高达 67% (14/21);100% 患者出现神经系统并发症,可表现为脑膜炎、脑炎、脑干脑炎和脊髓炎;全部患者发病初期有肢体抖动;90% (19/21) 患者出现脑脊液改变,主要是细胞数增高,WBC 为 $(20 \sim 610) \times 10^9/L$;14 例行头颅 MRI,2 例异常,分别为脱髓鞘病变和脑回肿胀,均得以恢复。笔者分析深圳市 272 例手足口病患者,并对其中 42 例伴有中枢神经系统并发症(CNSC)者进行多因素 Logistic 分析,探讨 CNSC 的高危因素^[2]。发现肢体抖动,外周血白细胞计数 $> 1.2 \times 10^9/L$ 。EV 71 感染是手足口病 CNSC 的高危因素,而且肢体抖动具有最大相对危险度($OR = 242.848, P = 0.000$)。

另外,肺水肿是重症 HFMD 患者死亡的主要原因。大量尸检和组织病理学研究证明 EV 71 引起的肺水肿是继发于急性中枢神经系统损伤后发生的神经源性肺水肿^[3],又称为脑源性肺水肿、中枢性肺水肿等。在除外心、肺源性疾病,无误吸、过快过量输液时,当发现呼吸频率进行性加快,氧合指数(PaO_2/FiO_2)呈进行性下降时,应想到神经源性肺水肿发生。当 $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ 可确诊。高血糖、白细胞增多、急性弛缓性瘫痪是发生肺水肿的高危因素,尤其应重视高血糖。有研究认为高血糖是发生肺水肿最有意义的预测指标。

二、EV 71 基因特征及变异性

EV 71 是小 RNA 病毒科,病毒粒子的衣壳由 60 个亚单位构成,后者由 4 种

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972603)

作者单位:518020 深圳市,广东省深圳市第三人民医院

通讯作者:刘映霞,Email:yingxialiu@hotmail.com

衣壳蛋白(VP1~VP4)拼装成五聚体样结构,抗原决定簇基本上位于VP1~VP3上^[4]。病毒衣壳与病毒毒力有关,而由891个核苷酸组成的VP1是EV71疫苗的主要靶蛋白^[5]。

过去30年全球分子流行病学调查发现,根据衣壳蛋白VP1全基因序列基因差异,可将EV71分为A、B、C三个基因型。近年也有基于5'-NTR或VP4基因序列的差异进行分子流行病学研究^[6,7],除基因A型原型株外,进一步确定了11个基因亚型,分别为B1-5、C1-4、C-U1、C-U2。在各次HFMD暴发流行中EV71基因型的变化有如下特点:EV71具高突变特性,病毒基因组重组和突变可以促进病毒在人群中流行;在同一国家或地区每年引起流行的基因亚型可能不同。1998年在台湾流行的主要为基因型C,2000年流行主要为基因型B,两型均可引起重症或死亡;在世界范围内,同一时期在不同地区流行的基因亚型往往是相同或相近的。提示不断反复的EV71暴发,可能是新产生的EV71基因变异株在世界范围内传播的结果;近年在日本、台湾地区和中国大陆多次暴发流行中,报道较多的亚型为C2、C3、C4;尽管不断有B、C基因型的亚型出现,但目前仍未明确与EV71重症及致死病例相关的独特基因亚型。在亚太地区因EV71感染死亡病例中已分离出至少4个亚型:B3、B4、B5、C2。

三、EV71所致神经损伤机制及病理

1. 病毒直接作用所致炎症:EV71最早在小肠复制,通过血流进入各器官组织。EV71感染新生鼠模型显示^[8],EV71抗原在感染后先后从小肠(6 h)、胸髓(24 h)、颈髓(50 h)、脑干(78 h)中检测到。从死亡患者尸检发现,脑干和脊髓存在广泛炎性细胞浸润,以灰质部分为甚。炎症改变主要表现为:(1)血管周围白细胞聚集,以单核细胞浸润为主;(2)噬神经性的灰质前角运动神经元退变和坏死;(3)出现明显的小神经胶质细胞结节性增生。病毒直接侵入脑干和脊髓导致损伤的最直接证据是从死亡患者脑和脊髓标本中分离出病毒^[9]。但对于那些从软瘫中恢复的重症患者,究竟是病毒直接侵入脊髓导致损伤,还是感染后免疫反应导致的脱髓鞘改变,尚不清楚。

2. 免疫损伤:感染者的T细胞如果表达CTLA-4抗原,可以诱导对EV71特异的细胞免疫反应而导致神经系统血管变态反应和组织炎症病变,有研究^[10]认为T细胞CTLA-4抗原表达应作为重症发生的预测指标。炎性细胞因子IL-6、IL-1 β 、IL-10、IL-13和IFN- γ 等可能参与脑干脑炎及肺水肿的发生。

3. 干扰影响神经细胞功能的酶活性:Yeo等^[5]应用酵母双杂交分析、免疫共沉淀反应和间接免疫荧光共焦显微镜等技术证实了VP1和人体3种蛋白鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase, ODC)、GTAR和表达于脑组织的KIAA0697具有较强的亲和力。VP1与ODC1相互作用后,干扰多胺生物合成、EV71感染细胞的生长和增殖。VP1和GTAR的相互作用可以干扰某些神经细胞黏附分子活性。这可能和EV71所致的神经系统并发症如急性软瘫和脑炎的发生有关。

4. 神经源性肺水肿机制:中枢神经系统损伤致交感神经兴奋,肺血管痉挛性

收缩及肺毛细血管通透性增加是造成神经源性肺水肿的主要因素^[3]。

四、实验室诊断

1. 病毒分离:常用的分离方法有细胞接种和乳鼠接种。样本可取自患者粪便、疱疹液、脑脊液及尸解取脊髓、脑组织及肌肉组织。标本均需接种到横纹肌瘤细胞(RD)和HEp-2(来源于人喉癌上皮细胞)两种细胞系,联合使用上述两种或更多细胞(如Vero细胞)有助于分离到更多的肠道病毒。最新研究^[11]示EV 71可感染微血管内皮细胞系(HMEC-1 cell)并诱导其凋亡。病毒分离的缺点是繁杂费时,无法满足病毒流行期间同时处理大量样本的需要。

2. 血清学检测:手足口病抗体检测的最常用方法目前仍是中和实验,该方法精确且具有型特异性。如果检测急性期患者血清中特异性IgM抗体阳性,或急性期与恢复期血清(病后1个月左右)IgG抗体有4倍以上升高,可为实验室诊断病例。

3. 分子生物学检测:(1)PCR技术:近年来PCR技术已成为诊断肠道病毒感染最常用的一种方法,其优点是快速、方便及敏感性高。PCR测序技术则可用于EV 71病毒基因分型,可行大规模分子流行病学调查。目前主要引物设计是以VP1保守序列为模板,也有以5'-NTR或VP4基因序列为模板设计引物。本院在1个月内检测312例患者,EV 71阳性率依次为粪便(25.6%)、咽拭子(7.7%),在疱疹液和脑脊液中尚未检测到EV 71阳性,后者阳性率低可能与送检标本数少有关;(2)异源双链核酸泳动分析(heteroduplex mobility analysis,HMA):以EV 71的5'-NTR为模板进行RT-PCR扩增,应用HMA分析扩增产物。优点是通过比较异源双链核酸的泳动模式和核酸序列,准确分析感染病毒是否同一基因型,是否存在变异及变异的程度^[12]。也可应用HMA研究流行期间病毒准种及优势株的变化;(3)RT-PCR联合芯片技术:芯片技术克服了血清学方法常不能同时准确进行多个病毒分型的缺点。Chen等^[13]应用RT-PCR联合芯片技术检测144例HFMD标本,再应用real-time PCR分析,然后由中和实验证实。发现RT-PCR联合芯片技术对EV 71和CA 16的诊断准确率分别高达92.0%和95.8%。这一高度敏感的芯片基础的检测有望不久在临床使用。

五、抗病毒治疗

目前对于EV 71尚无特效的抗病毒药物,但近年来在体内外对可能的抗EV 71因子进行了一些研究。

1. I型干扰素(IFN α):poly(I:C)是IFN诱导剂,在实验鼠感染EV 71前12 h注射10 ~ 100 μ g poly(I:C),能显著改善感染鼠生存率并降低病毒载量,其作用与血清中IFN α 浓度、树突状细胞量、主要组织相容性复合物II类分子及脾脏中IFN α 浓度呈正相关。分别于感染前6 h、感染后12 h以I型干扰素中和抗体处理后,感染鼠的死亡率和病毒载量较对照组明显增高。体内外研究进一步发现IFN α A对EV 71有直接保护效应。提示I型干扰素在控制EV 71感染和病毒复制中起重要作用^[14]。

2. 乳铁传递蛋白(LF):LF的抗EV 71病毒活性也在体内外得到了证实^[15]。牛LF能保护RD和成神经细胞瘤细胞(SK-N-SH)免于EV 71感染,在感染前、感染时和感染后30分钟均能发挥抗病毒作用。其机制是LF能与靶细胞和EV 71 VP1蛋白结合,并诱导靶细胞表达IFN α ,抑制EV 71诱导的IL-6产生。在动物实验中,LF治疗鼠能避免产生EV 71感染所诱发的致命神经系统并发症。

3. RNA干扰:合成靶向EV 71保守区段3'-UTR、2C、3C或3D的小干扰RNA(siRNAs),转染RD细胞后,能显著减轻EV 71病毒RNA水平和蛋白水平,这种抑制病毒作用呈剂量依赖性并至少可持续48 h^[16]。动物实验也证实了siRNAs治疗鼠EV 71病毒复制水平降低,可防止软瘫发生甚至能保护幼鼠免于EV 71感染^[17],提示siRNAs可能是一个很有前途的抗病毒治疗因子。最新研究显示靶向EV 71 3D(pol)区的合成29-mer shRNAs有更强的抗病毒效应^[18]。在较上述siRNAs浓度低10倍的情况下,shRNAs仍能取得相同但更持久的抗病毒效应。

六、疫苗的发展

一种疫苗的好坏,除安全性得到保证外,决定于其刺激机体体液和细胞免疫功能的能力及对病毒感染的保护作用。EV 71 VP1蛋白是主要的病毒中和决定因子,它直接决定病毒的抗原性,因而成为疫苗设计的主要靶蛋白。Chiu等^[19]研究显示,面对致命量EV 71感染的情况下,50%~60% VP1免疫新生鼠得以存活,但对照组无一幸免。提示发展高效疫苗在预防发病和防止神经系统严重并发症产生方面的重要性。其中含VP1 208~222氨基酸位点的肽段被认为是诱导特异性中和抗体反应的优势抗原表位^[20]。VP1 145~159氨基酸位点肽段因能强有力诱导EV 71阳性个体CD4⁺T细胞增殖,后者还能产生高水平的IL-2和IFN γ ,也被认为是设计亚单位疫苗的优势选择之一^[21]。更有最新研究显示保留完整EV 71病毒样粒子结构疫苗的保护效果高达89%,大大高于灭活疫苗^[22],为高效疫苗的发展提供了进一步的实验依据。

在保证安全性、有效性的情况下,口服疫苗因其方便性成为目前研究的热点。Chen等^[23]建立了在 α -乳白蛋白启动子和 α -酪蛋白前导序列控制下产EV 71 VP1衣壳蛋白的转基因动物系统。转基因鼠分泌表达高水平重组VP1蛋白的乳汁,经VP1转基因乳汁喂养的子代鼠能产生特异针对EV 71的中和抗体。这一研究提示,含EV 71 VP1的乳汁有潜力开发为一种口服疫苗。除乳汁外,VP1转基因西红柿水果也被研究作为口服疫苗^[24],经VP1转基因西红柿喂养的BALB/c鼠血清中不仅产生针对EV 71的中和抗体,而且出现脾细胞增殖反应,这为VP1口服疫苗能刺激机体细胞和体液两种免疫反应提供了进一步证据。

但无论是哪种疫苗,都还需要进行更多的动物实验后,才能进入临床试验阶段,而真正用于人体的预防,还有待时日。制备疫苗的主要障碍是缺乏客观检测疫苗免疫原性和效果的合适动物模型。

明确EV 71的分子致病机制;确定EV 71受体;开发有效的抗病毒药物;制备有效疫苗进行预防等问题需进一步重点关注。

参 考 文 献

- 1 刘映霞, 谢靖婧, 刘威龙, 等. 轻型和重型手足口病的临床和实验室特征分析. 中华实验与临床病毒学杂志, 2008, 22: 475-477.
- 2 李建明, 谢靖婧, 胡毅文, 等. 手足口病的临床特征及中枢神经系统并发症高危因素分析. 中国小儿急救医学, 2009, 16: 142-144.
- 3 Chan LG, Parashar UD, Lye MS, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group. Clin Infect Dis, 2000, 31: 678-683.
- 4 金奇主编. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001. 606-613.
- 5 Yeo WM, Chow VT. The VP1 structural protein of enterovirus 71 interacts with human ornithine decarboxylase and gene trap ankyrin repeat. Microb Pathog, 2007, 42: 129-137.
- 6 Hsu BM, Chen CH, Wan MT. Genetic diversity of epidemic enterovirus 71 strains recovered from clinical and environmental samples in Taiwan. Virus Res, 2007, 126: 69-75.
- 7 Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of enterovirus 71 associated with hand, foot and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. Pediatr Infect Dis J, 2006, 25: 691-694.
- 8 Chen YC, Yu CK, Wang YF, et al. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. J Gen Virol, 2004, 85: 69-77.
- 9 Chen CY, Chang YC, Huang CC, et al. Acute flaccid paralysis in infants and young children with enterovirus 71 infection: MR imaging findings and clinical correlates. AJNR Am J Neuroradiol, 2001, 22: 200-205.
- 10 Yang KD, Yang MY, Li CC, et al. Altered cellular but not humoral reactions in children with complicated enterovirus 71 infections in Taiwan. J Infect Dis, 2001, 183: 850-856.
- 11 Yeh TM. Human endothelial cell activation and apoptosis induced by enterovirus 71 infection. J Med Virol, 2004, 74: 597-603.
- 12 Clancy LE, Craig ME, White PA, et al. Human enterovirus isolates from an outbreak typed using heteroduplex mobility analysis. J Med Virol, 2005, 76: 215-222.
- 13 Chen TC, Chen GW, Hsiung CA, et al. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16. J Clin Microbiol, 2006, 44: 2212-2219.
- 14 Liu ML, Lee YP, Wang YF, et al. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. J Gen Virol, 2005, 86: 3263-3269.
- 15 Weng TY, Chen LC, Shyu HW, et al. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection by binding to VP1 protein and host cells. Antiviral Res, 2005, 67: 31-37.
- 16 Sim AC, Luhur A, Tan TM, et al. RNA interference against enterovirus 71 infection. Virology, 2005, 341: 72-79.
- 17 Tan EL, Tan TM, Tak Kwong Chow V, et al. Inhibition of enterovirus 71 in virus-infected mice by RNA interference. Mol Ther, 2007, 15: 1931-1938.
- 18 Tan EL, Tan TM, Chow VT, et al. Enhanced potency and efficacy of 29-mer shRNAs in inhibition of Enterovirus 71. Antiviral Res, 2007, 74: 9-15.
- 19 Chiu CH, Chu C, He CC, et al. Protection of neonatal mice from lethal enterovirus 71 infection by maternal immunization with attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing VP1 of enterovirus 71. Microbes Infect, 2006, 8: 1671-1678.
- 20 Foo DG, Alonso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides. Virus Res, 2007, 125: 61-68.
- 21 Foo DG, Macary PA, Alonso S, et al. Identification of Human CD4 T-cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71. Viral Immunol, 2008, 21: 215-224.
- 22 Chung YC, Ho MS, Wu JC, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. Vaccine, 2008, 26: 1855-1862.
- 23 Chen HL, Huang JY, Chu TW, et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice: A potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection. Vaccine, 2008, 26: 2882-2889.
- 24 Chen HF, Chang MH, Chiang BL, et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. Vaccine, 2006, 24: 2944-2951.

(收稿日期: 2008-06-24)

(本文编辑: 孙荣华)

刘映霞, 周伯平. 肠道病毒 71 相关性手足口病新进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2010, 4(1): 71-75.