

EV71 感染手足口病患儿血清炎性细胞因子及免疫球蛋白水平的变化及意义

陆许贞 王柯尹 孙丹凤

摘要 **目的** 观察肠道病毒 71 型(EV71)感染手足口病(HFMD)患儿血清细胞因子及免疫球蛋白水平变化,探讨炎症及免疫学机制在手足口病发病中的意义。**方法** 选择 2015 年 6 月~2016 年 8 月收治的 65 例 EV71 感染 HFMD 患儿为观察组,65 例健康儿童为对照组。酶联免疫吸附试验法(ELISA 法)检测血清中 IL-6、IL-8、TNF- α 水平,免疫散射比浊法检测血清 IgA、IgG、IgM 水平。**结果** 与对照组相比,观察组血清 IL-6、IL-8 及 TNF- α 水平显著升高(t 值分别为 7.94、6.87、9.56, $P < 0.01$),血清免疫球蛋白 IgA、IgG 及 IgM 水平也有上升,差异有统计学意义(t 值分别为 6.71、7.96、8.39, $P < 0.01$)。**结论** 炎性细胞因子和免疫失衡在手足口病中的发生、发展中发挥重要作用,观察 IL-6、IL-8、TNF- α 、IgA、IgG 及 IgM 水平的动态变化对判定 HFMD 病情和疾病防治具有一定的临床应用价值。

关键词 肠道病毒 71 型 手足口病 细胞因子 免疫球蛋白

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.029

Changes and Significance of Serum Levels of Inflammatory Cytokines and Immunoglobulin in Children with Hand-foot-and-mouth Disease Infected by EV71. Lu Xuzhen, Wang Keyin, Sun Danfeng. The First Hospital of Jiaxing, Zhejiang 314000, China

Abstract **Objective** Observe the changes of cytokine and immunoglobulin in children with Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) infected by Enterovirus 71 (EV71), to explore the significance of inflammation and immunological mechanisms. **Methods** A total of 65 cases of children with HFMD by EV71 were taken as the observation group, and 65 cases of healthy children were as the control group in June 2015 - August 2016. The serum levels of IL-6, IL-8, TNF- α were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the levels of IgA, IgG, IgM were detected by immune scattering turbidimetric. **Results** Compared with control group, the levels of IL-6, IL-8 and TNF- α in observation group were significantly increased ($t = 7.94, 6.87, 9.56, P < 0.01$), the levels of IgA, IgG and IgM also increased, differences were statistically significant ($t = 6.71, 7.96, 8.39, P < 0.01$). **Conclusion** The inflammatory cytokines and immune imbalance in the development of HFMD play an important role, observe the dynamic changes of IL-6, IL-8, TNF- α , IgA, IgG and IgM levels has certain clinical application value in preventing and judging the state of HFMD.

Key words Enterovirus 71; Hand-foot-and-mouth disease; Cytokines; Immunoglobulin

手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)属于急性肠道传染病,是由多种肠道病毒感染引起,其中以肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 16(coxsackievirus 16, CoxA16)最为常见,多发生于婴幼儿,普通病例表现为发热、口腔溃疡,手、足、臀等部位出现散在斑丘疹,重症者可诱发如无菌性脑膜炎、脑干脑炎、肺水肿、心肌炎等并发症,病情发展快,传染性高,严重威胁儿童的生命健康,已成为我国儿童致死率较高的传染性疾病之一^[1-4]。近年来,各国研究者对 HFMD 发病机制及

危险因素的研究逐渐增多,有报道提示炎性因子及免疫学机制在 HFMD 中发挥一定作用^[5]。本研究对 65 例 HFMD 患儿血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、IgA、IgG 及 IgM 的水平进行分析,探讨炎性细胞因子及免疫学因素在 HFMD 中的临床意义,并为 HFMD 的早期诊断、治疗和预防提供依据,现报道如下。

资料与方法

1. 一般资料:选取 2015 年 6 月~2016 年 8 月嘉兴市第一医院收治的 EV71 感染 HFMD 患儿共 65 例设为观察组,其中,男性 30 例,女性 35 例,普通病例 48 例,重症病例 17 例,患儿年龄范围 1~4 岁,平均年龄 2.03 ± 0.78 岁,住院时间 2~5 天,平均住院时间 3.03 ± 0.8 天。(1)纳入标准:病例均符合我国国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)颁布的《手足

基金项目:浙江省嘉兴市科技计划项目(2016BY28006)

作者单位:314000 嘉兴市第一医院感染科

通讯作者:王柯尹,电子信箱:511710789@qq.com

口病诊疗指南(2010 年版)》临床诊断标准^[6],均经 RT-PCR 法检测血清 EV71 病毒核酸阳性。(2)排除标准:①心、肝、脑、肺、肾等重要脏器疾病病史;②先天性疾病或遗传性疾病;③明确诊断的出疹性疾病,如丘疹性荨麻疹、幼儿急疹、风疹、不典型麻疹、水痘等。将同期在嘉兴市妇幼保健院体检的健康儿童 65 例设为对照组,体检结果均正常,其中男性 33 例,女性 32 例,患儿年龄 1~4 岁,平均年龄 2.16 ± 0.86 岁。观察组和对照组性别构成、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

2. 仪器与试剂:TNF- α 、IL-6 试剂盒购自美国 Genzyme 公司;IMMAGE800 全自动特定蛋白分析仪,试剂为仪器厂家配套试剂。

3. 方法:抽取两组患儿清晨空腹外周静脉血,分离血清,-80℃冰箱保存待测。酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清 IL-6、IL-8、TNF- α :按试剂盒提供的浓度稀释标准品,分别设空白孔、标准孔、待测样品孔,空白孔不加样品及酶标试剂,加样将样品加于酶标板孔底部,轻轻摇晃混匀,用封板膜封板后 37℃温育 30min,洗涤后每孔加入酶标试剂,空白孔除外,充分混匀,37℃避光温 30min,每孔加入显色液,37℃避光显色 15min,加入终止液终止反应,以空白孔调零,酶标仪 450nm 波长依序测量各孔吸光度(A 值),绘制标准曲线,计算检测样品检测物浓度。免疫比浊法检测血清 IgA、IgG、IgM:操作严格按照试剂盒说明书进行。

4. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

正常对照组血清 IL-6、IL-8 及 TNF- α 低表达,观察组表达量显著增加(表 1)。观察组血清中免疫球蛋白 IgA、IgG 及 IgM 水平较对照组均显著升高,组间比较,差异有统计学意义(表 2)。

表 1 两组患儿血清 IL-6、IL-8、TNF- α 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	IL-6	IL-8	TNF- α
观察组	22.39 $\pm$ 3.38	36.74 $\pm$ 7.42	49.50 $\pm$ 9.12
正常对照组	18.11 $\pm$ 1.92	29.95 $\pm$ 2.89	36.37 $\pm$ 6.24
t	7.94	6.87	9.56
P	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 两组患儿血清 IgA、IgG 及 IgM 水平 ($\bar{x} \pm s$, g/L)

组别	IgA	IgG	IgM
观察组	2.38 $\pm$ 0.47	10.01 $\pm$ 1.48	2.28 $\pm$ 0.39
正常对照组	1.82 $\pm$ 0.24	8.49 $\pm$ 0.41	1.56 $\pm$ 0.26
t	6.71	7.96	8.39
P	<0.01	<0.01	<0.01

讨 论

HFMD 分布极为广泛,四季均可发病,但以夏季和初秋多见^[7],该病传染途径复杂,可通过密切接触及被唾液、疱疹液等污染的物品间接接触传播,传染性强、传播速度快,不同病原类型感染后缺乏交叉保护力,成人大多已通过隐性感染获得相应抗体,因此,5 岁以下的儿童极易引起流行或暴发^[8]。HFMD 大部分有自限性,病程较短,部分患儿可合并系统性并发症,尤其是 EV71 感染患者,出现脑源性肺水肿等,病死率高^[9]。

目前,HFMD 的发病机制尚未十分明确,发病原因主要认为与肠道病毒感染相关,但近年来研究逐渐表明 HFMD 的发生、发展还与体内过度的炎症及免疫反应相关^[10]。细胞因子是由免疫原等刺激诱导一类具有广泛生物学活性的低分子蛋白质,可通过结合相应受体调节细胞生长、分化,调控免疫应答。研究发现,HFMD 患儿血清及体液中存在 IL-6、IL-8、TNF- α 等炎性细胞因子过表达现象,IL-6 是炎症反应急性期合成中重要的细胞因子,它可与 TNF- α 共同刺激 B 细胞分化,促进 T 淋巴细胞活化^[11,12]。Khong 等^[13]发现 IL-6 在 EV71 感染的新生鼠血清中表达量明显升高,且与组织炎性反应密切相关。IL-8 来源于单核细胞,可激活和趋化中性粒细胞,使其释放溶酶体酶和超氧化物等活性物质,造成组织损伤。有研究认为炎性细胞因子及细胞免疫应答是 EV71 感染后引发合并症的关键环节,大量炎性介质的释放,使血管通透性增强,渗透增加,有利于病毒穿过血脑屏障,并促使肺水肿的发生,促炎因子的升高可能是病情进展恶化的重要标志^[14,15]。本研究结果显示观察组血清炎性因子 IL-6、IL-8、TNF- α 明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 HFMD 患儿存在 IL-6、IL-8、TNF- α 等炎性细胞因子的大量释放,对中性粒细胞及巨噬细胞等与免疫功能相关的细胞有着激活功能,激起局部炎症反应,推测其在手足口病的发生、发展中起重要作用,细胞因子水平越高,病情越重,检测炎性细胞因子可作为 HFMD 评估病情和预后判断的辅助指标,抑

制炎性细胞因子的形成和释放可作为预防和治疗 HFMD 的有效方法。

正常人体可通过免疫系统启动防御机制,有效识别和防御外界病原微生物,如细菌、病毒等入侵,处理体内损伤、死亡及病毒感染细胞,而血清免疫球蛋白是参与机体体液免疫的主要抗体,包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。IgA、IgG 可增强巨噬细胞及 NK 细胞的吞噬作用,IgM 能激活补体系统,产生 C3、C4 等补体增强机体免疫功能。婴幼儿及低龄儿童群体免疫系统发育不够成熟,免疫球蛋白的生产及储备都较少,免疫系统功能尚欠完善,易并发 EV71 感染。国内外研究显示 EV71 相关病毒感染可致机体免疫功能紊乱,但对于免疫应答在重型 EV71 相关 HFMD 发病机制中的作用尚未明确^[16]。有报道提出部分并发肺水肿的手足口病患儿应用静脉免疫球蛋白进行抗炎治疗有效,提示手足口病并发肺水肿与患儿机体免疫反应有关^[17,18]。Höffman 等^[19]指出免疫球蛋白含有高亲和性中和抗体,可通过直接减少细胞黏附分子或调节 T 细胞影响 IL-1、IL-6 和 TNF- α 等细胞因子的合成,对自身免疫性脑脊髓炎产生影响。本研究显示,观察组血清中炎性细胞因子 IL-6、IL-8、TNF- α 和免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 水平均高于对照组,表明机体内存在炎症反应及体液免疫功能紊乱的现象,推测炎性细胞因子及免疫球蛋白与 HFMD 三者之间存在密切联系,但其具体关系目前尚不十分清楚。

综上所述,HFMD 患儿存在 IL-6、IL-8、TNF- α 等炎性细胞因子以及免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 的大量释放,炎症及免疫反应参与了 HFMD 的病理生理过程,在其发病机制中可能起到重要作用,联合监测手足口病患儿血清炎性细胞因子及免疫球蛋白水平,不仅可以反映机体的免疫功能及评估病情的严重程度,同时对早期治疗和预后提供重要指导作用,具有良好的临床应用价值。

参考文献

- Iwai M, Masaki A, Hasegawa S, *et al.* Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007 [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(4): 254-259
- Chong CY, Chan KP, Shah VA, *et al.* Hand, foot and mouth disease in Singapore: a comparison of fatal and non-fatal cases [J]. *Acta Paediatr*, 2003, 92(10): 1163-1169
- 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
- Zhu F, Xu W, Xia J, *et al.* Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China [J]. *New Engl J Med*, 2014, 370(9): 818-828
- Zhang SY, Xu MY, Xu HM, *et al.* Immunologic characterization of cytokine responses to enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infection in children [J]. *Medicine*; Baltimore, 2015, 94(27): 1137-1142
- 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 年版) [J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(24): 1473-1475
- Linsuwanon P, Puenpa J, Huang SW, *et al.* Epidemiology and seroepidemiology of human enterovirus 71 among Thai populations [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(1): 16-28
- Horsley E, Just E, Torres C, *et al.* Enterovirus 71 outbreak in Northern Sydney, 2013: case series and initial response [J]. *J Paediatr Child Health*, 2014, 50(7): 525-530
- Ventarola D, Bordone L, Silverberg N. Update on hand-foot-and-mouth disease [J]. *Clin Dermatol*, 2015, 33(3): 340-346
- 周艳, 徐元宏. 手足口病患儿血清细胞因子与免疫球蛋白水平检测和分析 [J]. 临床输血与检验, 2011, 13(1): 27-29
- Andoh A, Bamba S, Fujiao S, *et al.* Fibroblast growth factor-2 stimulates interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar cells [J]. *Pancreas*, 2004, 29(4): 278-283
- 程红球, 黄彩华, 刘卫东, 等. 丙种球蛋白对手足口病患者血循环中炎症细胞因子水平的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 546-548
- Khong WX, Foo DG, Trasti SL, *et al.* Sustained high levels of interleukin-6 contribute to the pathogenesis of enterovirus 71 in a neonate mouse model [J]. *J Virol*, 2011, 85(7): 3067-3076
- Wang SM, Lei HY, Huang KJ, *et al.* Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema [J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(4): 564-570
- Huang SW, Lee YP, Hung YT, *et al.* Exogenous interleukin-6, interleukin-13, and interferon- γ provoke pulmonary abnormality with mild edema in enterovirus 71-infected mice [J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 147-155
- 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 [J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(11): 829-834
- Ooi MH, Wong SC, Podin Y, *et al.* Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(5): 646-656
- Ooi MH, Wong SC, Mohan A, *et al.* Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot, and mouth disease in Sarawak [J]. *Bmc Infect Dis*, 2009, 9(1): 3-14
- Höffman JN, Fertmann JM, Vollmar B, *et al.* Immunoglobulin M-enriched human intravenous immunoglobulins reduce leukocyte-endothelial cell interactions and attenuate microvascular perfusion failure in normotensive endotoxemia [J]. *Shock*, 2008, 29(1): 133-139

(收稿日期: 2016-10-06)

(修回日期: 2016-10-25)