

# 多种肠道病毒引起手足口病细胞免疫功能比较

王宇婧 程邦宁

**摘要** 目的 探讨肠道病毒 71 型(EV71)、柯萨奇病毒 A16 型(CA16)、其他肠道病毒引起的手足口病(HFMD)患儿细胞免疫功能的不同。方法 收集 HFMD 患儿咽拭子或肛拭子标本,进行 EV71、CA16、EV 核酸检测,根据荧光 RT-PCR 法检测结果,分为 EV71 阳性组、CA16 阳性组、通用 EV 阳性组。应用流式细胞仪检测患儿外周血淋巴细胞亚群 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK、B 细胞百分率。结果 EV71 阳性组患儿 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T 细胞百分率明显低于 CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿( $P < 0.05$ ),CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T 细胞百分率差异无统计学意义;3 组患儿 CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分率差异无统计学意义;EV71 阳性组患儿 NK 细胞、B 细胞百分率明显高于 CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿( $P < 0.05$ ),CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿 NK 细胞、B 细胞百分率差异无统计学意义。结论 EV71 较 CA16 以及其他肠道病毒引起的 HFMD 患儿机体细胞免疫功能紊乱加重。

**关键词** 肠道病毒;手足口病;细胞免疫

**中图分类号** R 373.2; R 725.125

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)12-1836-03  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.027

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是以手、足、口多发疱疹为主要特征的一类自限性疾病,是由多种肠道病毒引起的全球儿童常见的急性传染性疾病<sup>[1]</sup>,多由非脊髓灰质炎肠道病毒属的柯萨奇病毒 A16 型(*Coxsackievirus*, CA16)、肠道病毒 71 型(*Enterovirus*, EV71)引起<sup>[2]</sup>,其中 EV71 是导致重症 HFMD 的主要病原体。多数患儿症状轻微,少数患儿可出现神经症状甚至死亡。病毒感染导致患儿细胞免疫功能改变继而引起一系列炎症反应。该研究旨在探讨不同肠道病毒感染对患儿细胞免疫功能改变的影响,以期对 HFMD 临床诊断、预后判

断提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2015 年 6~8 月于安徽省儿童医院收治的 HFMD 患儿,诊断标准符合卫生部颁布的《手足口病诊疗指南》(2010 年版)。并发结核、肿瘤或其他病毒感染性疾病或近期使用免疫抑制或增强剂的患儿未纳入本研究。入院患儿均采集咽拭子或肛拭子样本检测核酸,共有 138 例 HFMD 患儿纳入研究,其中男女比例 1.46:1,年龄 0.5~7.0(1.80±1.42)岁。本研究经我院伦理委员会批准。

**1.2 肠道病毒核酸检测** 患儿入院后无菌采集 3 d 内发病的咽拭子或肛拭子标本密封保存立即送检,按照中山大学达安基因股份有限公司提供的系列核酸提取试剂盒(PCR-荧光探针法)提取核酸,用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪检测肠道病毒 EV71 型核酸、CA16 型核酸、通用型(EV)核酸 3 种。结果分组依据:EV71 阳性组:EV71-RNA 阳性、CA16-RNA 阴性、EV-RNA 阳性;CA16 阳性组:EV71-RNA 阴性、CA16-RNA 阳性、EV-RNA 阳性;EV 阳性组:EV71-RNA 阴性、CA16-RNA 阴性、EV-RNA 阳性。

**1.3 淋巴细胞亚群检测** 选取 138 例患儿,采集外周静脉血 2 ml 加入 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管待测,取 100 μl 抗凝血加入流式细胞术专用管,加入由美国 Beckman Coulter 公司提供的相应荧光抗体 10 μl 染色混匀,包括 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK、B 细胞抗体。室温(约 25 °C)避光孵育 20 min,加入溶血素 500 μl 裂解红细胞,室温避光孵育 20 min 上机检测,检测仪器为 Beckman Coulter 公司提供的 FC500 流式细胞分析仪。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组样本比较采用方差分析,各组间两两比较采用 SNK- $q$  检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

**2.1 一般资料** EV71 阳性组、CA16 阳性组、EV 阳

2016-07-19 接收

基金项目:安徽省卫生和计划生育委员会科研计划项目(编号:14FR017)

作者单位:安徽医科大学儿科临床学院(安徽省儿童医院)检验科,合肥 230051

作者简介:王宇婧,女,硕士研究生;

程邦宁,男,副教授,主任技师,硕士生导师,责任作者, E-mail: pcbncbn@126.com

性组患儿平均年龄、性别等资料差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 资料有可比性。见表 1。

表 1 临床资料比较

项目	EV71 阳性组	CA16 阳性组	EV 阳性组	$F/\chi^2$ 值	P 值
	(n=58)	(n=28)	(n=52)		
性别(男/女 n)	32/26	17/11	23/29	2.342	0.310
年龄(岁 $\bar{x} \pm s$ )	2.09 $\pm$ 1.27	1.62 $\pm$ 1.02	1.65 $\pm$ 1.47	1.175	0.314

**2.2 受试患儿淋巴细胞亚群检测结果比较** EV71 阳性组患儿 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T 细胞百分率明显低于 CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿 ( $P < 0.05$ ), CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T 细胞百分率差异无统计学意义; 3 组患儿 CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分率差异无统计学意义; EV71 阳性组患儿 NK 细胞、B 细胞百分率明显高于 CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿 ( $P < 0.05$ ), CA16 阳性组和 EV 阳性组患儿 NK 细胞、B 细胞百分率差异无统计学意义。见表 2。

表 2 受试患儿淋巴细胞亚群检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	EV71 阳性组	CA16 阳性组	EV 阳性组	F 值
	(n=58)	(n=28)	(n=52)	
CD3 <sup>+</sup> T (%)	58.67 $\pm$ 5.64	71.87 $\pm$ 7.29*	73.81 $\pm$ 8.09*	32.813
CD4 <sup>+</sup> T (%)	27.74 $\pm$ 5.63	38.31 $\pm$ 9.14*	40.76 $\pm$ 8.56*	20.705
CD8 <sup>+</sup> T (%)	23.56 $\pm$ 6.08	27.81 $\pm$ 5.51	27.45 $\pm$ 7.99	2.455
CD4 <sup>+</sup> T/CD8 <sup>+</sup> T	1.29 $\pm$ 0.52	1.46 $\pm$ 0.61	1.67 $\pm$ 0.76	2.174
NK 细胞 (%)	15.46 $\pm$ 7.17	10.87 $\pm$ 5.83*	7.32 $\pm$ 3.71*	12.110
B 细胞 (%)	17.66 $\pm$ 7.17	7.57 $\pm$ 5.83*	11.10 $\pm$ 3.71*	10.256

与 EV71 阳性组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

HFMD 是由多种肠道病毒引起的儿童常见传染病, 多数病例症状轻微, 有自限性, 预后良好, 少数病例可引起脑膜炎、脑膜脑炎、肺水肿等并发症, 严重者导致死亡。HFMD 多由 CA16、EV71 病毒感染引起, 也可由其他肠道病毒引起, 研究<sup>[3]</sup>表明 EV71 病毒具有嗜神经性, 是引起重症病例的主要病原体。研究<sup>[4]</sup>显示 EV71 或 CA16 感染机体后引起的交叉免疫保护不能阻止另一型肠道病毒再次感染机体。

淋巴细胞是机体重要的免疫细胞群, 末梢淋巴细胞分化为 T、NK、B 细胞等亚群, 各亚群细胞间比例的平衡, 稳定维持机体正常免疫功能<sup>[5]</sup>。CD4<sup>+</sup>T 细胞可以促进其他免疫细胞增殖、分化发挥效应, 并且调节免疫细胞间的相互作用。CD8<sup>+</sup>T 细胞可通过分泌穿孔素、颗粒酶直接杀伤靶细胞, 也可通过分泌细胞因子发挥细胞毒作用。NK 细胞是重要的固有免疫细胞, 在感染早期即可杀伤病毒感染细胞。

B 细胞分化成浆细胞后通过分泌免疫球蛋白起到抗病毒作用, 同时可提呈抗原激活 T 细胞。病毒入侵机体后, 引起淋巴细胞亚群数量和功能异常, 继而导致机体免疫功能紊乱。

EV71 作为强致病性病毒, 是导致 HFMD 患儿死亡的主要病原体。研究<sup>[6]</sup>表明 2010 ~ 2014 年上海地区重症 HFMD 患儿 EV71 检出率为 73.08% ~ 88.09%, 死亡病例中 EV71 检出率为 100%。研究<sup>[7]</sup>显示 EV71 可能直接通过凋亡 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 细胞而抑制细胞免疫反应。本研究表明 EV71 阳性组患儿外周血 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T 细胞百分率明显低于其他两组, 而 NK、B 细胞百分率则明显高于其他两组, 细胞免疫功能进一步失调, 这可能导致 EV71 较 CA16 以及其他肠道病毒具有更强的致病性。EV71 阳性组 CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T 细胞百分率显著降低表明与其他肠道病毒相比, EV71 感染能更大程度地引起 T 淋巴细胞比例失衡从而导致机体细胞免疫进一步失调。CD4<sup>+</sup>T 细胞作为辅助性 T 细胞, 通过分泌一系列细胞因子等活性物质促进机体炎症反应, EV71 感染后通过凋亡 CD4<sup>+</sup>T 细胞从而抑制其发挥作用。本研究中各组 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分率差异无统计学意义, 可能是由于处在感染早期, 固有免疫发挥主要效应, NK 细胞作为固有免疫应答的主要承担者, 在 EV71 阳性组中比例明显升高。同时 EV71 阳性组 B 细胞比例显著升高表明机体体液免疫功能激活。

综上所述, EV71 较 CA16 以及其他肠道病毒更易导致患儿 T 细胞凋亡, 使细胞免疫功能损坏, 引起细胞免疫功能紊乱, 这可能与 EV71 易致重症 HFMD 有关。通过检测患儿外周血淋巴细胞亚群比例变化, 并结合病原学诊断, 能对判断疾病的严重程度以及预后起到一定的指导作用。临床上在对症治疗的同时通过改善免疫功能治疗 HFMD 也是行之有效的方法。

### 参考文献

- [1] Wu W, Xu W B, Chen L, et al. Molecular identification and analysis of human enteroviruses isolated from healthy children in Shenzhen, China from 2010 to 2011 [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e64889.
- [2] Zhu Z, Zhu S, Guo X, et al. Retrospective seroepidemiology indicated that human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulated widely in central and southern China before large-scale outbreaks from 2008 [J]. Virol J, 2010, 7: 300.
- [3] Xu J, Qian Y, Wang S, et al. EV71: an emerging infectious disease vaccine target in the Far East? [J] Vaccine, 2010, 28(20): 3516-21.

## 组织结构声学定量技术与瞬时弹性成像评价肝纤维化的比较

姚莉, 郑慧, 万颖, 陈娜, 周旺

**摘要** 目的 评估组织结构声学定量技术(ASQ)对于肝纤维化病理分期的诊断效能,对比分析ASQ与瞬时弹性成像(Fibroscan)诊断肝纤维化病理分期的价值。方法 收集慢性乙肝患者111例,同时行ASQ、Fibroscan及肝脏病理穿刺活组织检查。对比ASQ定量参数红蓝曲线下面积比(FD Ratio)、Fibroscan肝弹性模量与肝纤维化病理分期的相关系数,绘制并分析肝纤维化病理分期的ROC曲线。结果 FD Ratio与肝纤维化病理分期的相关性( $r_s = 0.659$ )低于Fibroscan弹性模量( $r_s = 0.777$ ),差异有统计学意义。ASQ与

Fibroscan诊断肝纤维化病理分期 $S \geq 2$ 、 $S = 4$ 的ROC曲线下面积分别为0.705(95% CI: 0.611 ~ 0.788)与0.817(95% CI: 0.733 ~ 0.884),0.709(95% CI: 0.615 ~ 0.791)与0.920(95% CI: 0.853 ~ 0.963),差异无统计学意义。组织结构声学定量技术诊断肝纤维化( $S \geq 2$ )、肝硬化( $S = 4$ )的最佳截断值分别为0.21(敏感度76%、特异度74%)、0.38(敏感度77%、特异度88%)。结论 ASQ作为一种新兴的超声新技术,对肝纤维化病理分期有一定的诊断价值,FD Ratio可作为无创性ASQ的有效参数,对慢性乙型肝炎患者的病情进行随访及评估。ASQ对肝纤维化病理分期的评估效能与Fibroscan相当,而ASQ能够与常规超声系统相结合,具有较好的临床应用前景。

**关键词** 组织结构声学定量技术; 瞬时弹性成像; 肝纤维化; 慢性乙型肝炎

中图分类号 R 512.6; R 445.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1838-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.028

2016-06-02 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号: KJ2013A166)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院超声科, 合肥 230022

作者简介: 姚莉,女,硕士研究生;

郑慧,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhenghuiyafyck@163.com

[4] 宋建,都鹏飞,程邦宁. 合肥市0~14岁人群柯萨奇病毒A组16型和肠道病毒71型的感染状况调查[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(7): 1013-5.

[5] 袁圣福,李洁,祝伟宏. 肠道病毒71感染手足口病患儿外周血T淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(12): 3112-4.

[6] 葛艳玲,郑雅旭,潘浩,等. 2010至2014年上海地区儿童手足口病的流行病学监测[J]. 中华儿科学杂志, 2015, 53(9): 676-83.

[7] 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): 829-34.

## Cellular immunity function comparison of hand foot and mouth disease caused by multiple intestinal viruses

Wang Yujing, Cheng Bangning

(Dept of Clinical Laboratory, Pediatric Clinical Institute of Anhui Medical University, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei 230051)

**Abstract Objective** To investigate the difference of cellular immunity in children with HFMD caused by multiple viruses of EV71, CA16 and other intestinal viruses. **Methods** Collected throat swab or anal swab specimens from children with HFMD, and detected RNA of EV71, CA16 and EV. Patients were divided into three groups, including EV71 positive group, CA16 positive group and EV positive group according to the results of RT-PCR detection. Detected the percentage of lymphocyte subsets CD3<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, NK and B cell of peripheral blood by flow cytometry. **Results** The CD3<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T cell percentage of EV71 positive group was significantly lower than other two groups ( $P < 0.05$ ), the CD3<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T cell percentage between CA16 positive group and EV positive group was not obviously different. The ratio of CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T cell percentage was not obviously different among these three groups. Meanwhile, the percentage of NK, B cell of EV71 positive group was significantly higher than other two groups ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference of NK, B cell percentage between CA16 positive group and EV positive group. **Conclusion** EV71 can cause severer dysfunction of cellular immunity rather than CA16 or other intestinal viruses.

**Key words** intestinal virus; hand foot and mouth disease; cellular immunity