

• 论 著 •

# CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞的反应质量在 EV71HFMD 病程发展中的作用\*

祖莹<sup>1</sup>, 李德发<sup>2△</sup>, 曹科<sup>2</sup>, 黄玉英<sup>3</sup>, 邓继宥<sup>1</sup>

(广东省深圳市儿童医院:1. 儿科研究所;2. 检验科 518026;

3. 安徽省蚌埠医学院医学检验系 233000)

**摘要:**目的 研究中国 EV71 感染手足口病(HFMD)中 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞的活化和第二信号的表达,探讨 EV71 感染的病程发展机制。方法 选取 48 例 EV71 HFMD 患儿分为轻症组、重症组(其中包括中枢神经病变组、中枢神经病变伴自主神经失调组、神经源性肺水肿组),应用流式细胞术检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞上 CD28 和 CD38 的表达水平,分析 CD8<sup>+</sup> T 细胞的质量水平在 EV71 感染病程发展中的作用。结果 CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> 细胞、活化分子 CD38 的表达轻症组与健康同龄对照组、重症各组比较增高明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞在 EV71 感染中的反应质量可能是病程发展的原因之一。

**关键词:**肠道病毒 A 型,人; CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞; CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> 细胞; CD38

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.014

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2011)20-2328-02

## The effects of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell responses quality on the disease progression in enterovirus 71 infection\*

Zu Ying<sup>1</sup>, Li Defa<sup>2△</sup>, Cao Ke<sup>2</sup>, Huang Yuying<sup>3</sup>, Deng Jikui<sup>1</sup>

(1. Institute of Pediatrics; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Children's Hospital, Guangdong 518026, China; 3. Bengbu Medical college, Anhui 233000, China)

**Abstract: Objective** To study the CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell activation and the expression of second signal in patients with EV71 infection, to explore the mechanism of EV71 infection progression. **Methods** The 48 children patients with EV71 HFMD were divided into mild group, severe group that included central nervous system lesions group, central nervous system lesions associated with autonomic nervous dysfunction group, neurogenic pulmonary edema group PE. The levels of CD28 and CD38 expression on CD8<sup>+</sup> T cells were detected with flow cytometry, the quality of CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed in the disease progression of EV71 infection. **Results** The CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> cells, the expression of CD38 activation molecule in mild group increased significantly compared with control group, severe groups, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Quality of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in the EV71 infection may be one of the reasons in the disease progression.

**Key words:** enterovirus A, human; CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells; CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> cells; CD38

手足口病(hand-foot-mouth Disease, HFMD)是全球性传染病,病原体以柯萨奇(coxsackie, Cox) A16 型和肠道病毒(enteric virus, EV)71 型为主。EV71 感染的 HFMD 临床症状往往重于 Cox A16 感染,但 EV71 感染在不同个体间临床表现也有较大差异,轻者可无明显全身症状,重者可出现脑干脑炎、神经源性肺水肿等严重并发症,病情进展快,极易引起死亡<sup>[1-4]</sup>。推测可能与 EV71 病毒毒力、载量及机体免疫功能相关。EV71 感染的发病机制尚未完全清楚,现有研究结果表明 EV71 感染造成的机体损害主要是细胞免疫反应而非体液免疫反应。

CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞对胞内病原体及在肿瘤细胞的应答中发挥了重要作用,其杀伤机制有多种,最主要的为释放毒性蛋白颗粒酶、穿孔素杀伤靶细胞,这机制对于宿主清除病毒及杀伤肿瘤细胞的防卫机制至关重要,其功能失调可导致多种疾病发生;但 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞释放毒性蛋白颗粒酶、穿孔素需在抗原刺激活化后才能表达<sup>[5]</sup>。近年来利用多参数流式细胞术对某些病毒感染后 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞的应答进行了数量和质量的研究,结果表明,CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞反应的质量是决定 T 细胞防御作用的关键因素<sup>[6]</sup>。但 EV71 感染中 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞的质量,如活化和第二信号的表达在 HFMD 疾病进程中的作用尚未见报道。本研究首次对中国

EV71 感染 HFMD CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞的活化分子 CD38 和 CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> T 细胞进行了研究,以初步探讨 EV71 感染的病程发展机制。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** EV71 感染 HFMD 患儿组 48 例:男 28 例,女 20 例;年龄 2~7 岁,平均 5 岁。根据临床表现分为:(1)轻症组 26 例,无并发症;(2)重症组 22 例[中枢神经系统病变组(CNSD) 6 例,合并脑炎、无菌性脑膜炎;中枢神经系统病变伴自主神经功能失调组(ANS D) 6 例,神经系统病变伴高血压、心率增快且后期可出现心动过缓、出冷汗、皮肤苍白湿冷、高血糖、尿潴留等;神经源性肺水肿组(PE) 10 例]。所有 EV71 感染患儿的诊断经 RT-PCR 定性法检测粪便 EV71 病毒核酸阳性而证实<sup>[7]</sup>。所有 EV71 感染患儿均按照肠道病毒(EV71)感染诊疗指南(2008 年版)进行诊治<sup>[8]</sup>。健康同龄对照组 60 例:男 30 例,女 30 例;年龄 2~8 岁,平均 5 岁。所有患儿既往均无反复感染等免疫低下及过敏性疾病史、过敏性疾病家族史。

### 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂及仪器** 抗 CD28-FITC 抗体、抗 CD38-PE 抗体、抗 CD8-PC5 抗体、抗 CD3-ECD 抗体、流式抗体及相应同型对照均购于美国 Beckman Coulter 公司。流式细胞仪为美国 Beckman coulter 公司产品,型号 Epics-XL4。

\* 基金项目:深圳市科技局医疗卫生类科技计划项目资助(200902109)。 △ 通讯作者, E-mail: lidefa1972@163.com。

**1.2.2 流式细胞术检测 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞亚群及活化 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞** 取两个流式细胞管,每管取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血 100  $\mu$ L,以 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞群设门,检测管加入各 20  $\mu$ L CD28-FITC、CD38-PE、CD3-ECD、CD8-PC5,对照管加入各 20  $\mu$ L IgG-FITC、IgG-PE、CD3-ECD、CD8-PC5,室温避光孵育 15 min,加入免洗溶血素 500  $\mu$ L,室温避光孵育 15 min,加入磷酸缓冲液(PBS)500  $\mu$ L,采用流式细胞仪检测;全部数据经 EXPOS32 ADC 软件获取和分析。

**1.3 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS13.0 统计软件进行分析,多组样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义;两两比较采用单

因素方差分析(LSD法检测,Dunnett/T3检测),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 EV71 轻症组患儿 CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> 细胞亚群检测结果** CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> 细胞亚群百分比轻症组与健康同龄对照组比较增高明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),健康同龄对照组分别与重症各组比较增高明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),轻症组分别与重症各组比较明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );重症组中 CNSD 组、ANSD 组、PE 组相互之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表 1,图 1。

表 1 EV71 轻症组患儿 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T 细胞细胞亚群及活化 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞检测结果

检测指标	健康同龄对照组	轻症组	重症组		
			CNSD 组	ANSD 组	PE 组
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> T 细胞/淋巴细胞(%)	13.22	16.44	10.16	9.21	9.15
CD38 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 细胞/CD8 <sup>+</sup> T 细胞(%)	69.01	88.75	59.45	51.24	48.56

**2.2 EV71 轻症组患儿活化 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的表达** 活化分子 CD38 在 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的表达百分比健康同龄对照组分别与重症各组比较明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );轻症组与健康同龄对照组比较明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );轻症组分别与重症各组比较明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );重症组中 CNSD 组、ANSD 组、PE 组相互之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表 1,图 1。

细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞和抗病毒特异性抗体通过减少组织中的病毒载量降低 EV71 病毒的致死性。杜伯雨等<sup>[10]</sup> 研究发现 EV71 病毒感染对机体免疫功能的影响是多方面的,不仅在数量上使参与免疫应答的 T 细胞减少,同时它能引起 T 细胞分泌细胞因子的能力降低,从而在功能上使参与免疫应答的 T 细胞失能。本实验将 EV71 感染 HFMD 患儿根据病情轻重分为轻症组、重症组(CNSD、ANSD、PE),通过研究 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> 细胞毒 T 细胞和 CD38 在 CD8<sup>+</sup> T 细胞上的表达,观察 EV71 感染患儿 CD8<sup>+</sup> 细胞的细胞反应质量变化。

CD28 是 T 细胞正常激活所必需的第二信号,属于免疫蛋白超基因家族的相关糖蛋白,在大多数 T 细胞上表达,主要作用是启动并保持 T 细胞应答<sup>[11]</sup>。CD8<sup>+</sup> T 细胞根据 CD28 的表达与否分为细胞毒 T 细胞(CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>)和抑制性 T 细胞(CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>),两者分别是淋巴细胞中重要的杀伤效应细胞和免疫调节细胞;细胞毒 T 细胞通过排粒作用释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒性物质,溶解靶细胞,同时它还可能通过释放一些细胞因子诱导细胞的凋亡。

CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> 细胞毒 T 细胞必须在抗原刺激活化后,才能表达释放细胞毒性蛋白质杀伤感染靶细胞。CD38 是单链 II 型跨膜糖蛋白,相对分子质量为 45 000,共 300 个氨基酸,具有许多复杂而又独特的生物学特性及功能,主要表达在活化的淋巴细胞和未成熟的造血细胞,其分布取决于细胞的激活状况<sup>[12]</sup>。国内外研究表明,CD38 分子通过对激活信号的转导,促进 T 细胞的激活,因而 CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> 可作为细胞活化标志。

本实验结果显示,CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> 细胞、活化分子 CD38 在 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的表达百分比轻症组分别与重症各组比较增高明显,重症各组相互之间无差异;提示 EV71 感染可导致机体产生复杂的免疫学变化。首先 EV71 感染轻症组 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞的细胞反应质量良好,反映出轻症组患者处于免疫细胞异常激活状态;这可能由于病毒复制与细胞激活相互促进,病毒复制不断产生抗原,刺激 CD8 细胞,使之处于激活状态,有利于病毒在体内的清除。其次重症各组 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞的反应质量与轻症组比较明显降低,其降低的机制仍不清楚,推测的可能的原因是病毒载量大幅度增加,病毒大量高水平复制所产生的过量抗原使机体免疫细胞无法反应和(下转第 2333 页)

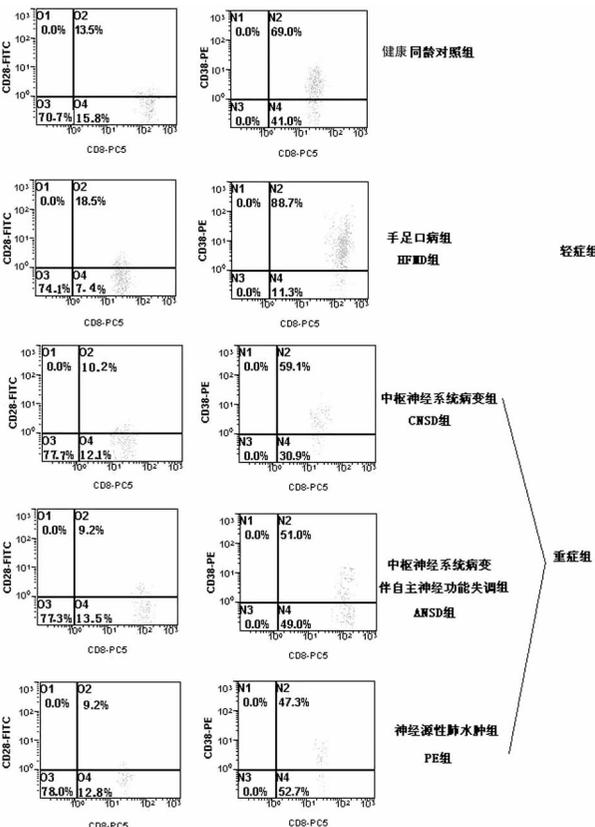


图 1 EV71 HFMD 患儿 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T 细胞细胞亚群及活化 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞流式示意图

**3 讨论**

Lin 等<sup>[9]</sup> 研究表明在 EV71 感染的 CNSD 小鼠模型中的 B

中 CEA、CYFRA21-1、NSE 和 SF 与对照组相比均明显升高,且越是晚期其含量越高。在三项和四项联合检测时其阳性率表达明显高于单项检测,尤以四项联合检测时为优,总的阳性率可达 81.6%,其中对肺鳞癌的阳性率可高达 91.3%。另外除 NSE 外其他三项标志物都对肝转移有较高的线性相关关系,在所有转移的脏器中,肝转移对标志物的影响最大,其次就是骨转移,有研究报道肺癌发生骨转移的概率高达 60% 以上<sup>[20]</sup>,本研究显示骨转移与 CYFRA21-1、SF 均有较好的直线相关关系,故检测这些肿瘤标志物对判断是否发生骨转移提供了可靠依据。本研究中其他一些因素如肺转移、淋巴转移、脑转移等因素按纳入标准未能进入变量方程,也可能与有些病例较少有一定的关系,需今后更进一步积累病例,作更深入的研究。

参考文献

[1] 邹小农. 中国肺癌流行病学[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(12):881-883.  
 [2] 李春海. 加强肿瘤生物学标志的研究和评价[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(1):6-8.  
 [3] Ando S, Kimura H, Iwai N, et al. The significance of tumour markers as an indication for mediastinoscopy in non-small cell lung cancer[J]. Respiratory, 2003, 8(2): 163-167.  
 [4] 王阳. 电化学发光免疫分析技术检测 3 种肿瘤标志物对肺癌的诊断意义[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(3):294-296.  
 [5] 吴健民. 对肿瘤标志物的再认识[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1):11-13.  
 [6] 万文徽. 肿瘤标志临床应用与研究进展[M]. 2 版. 北京:北京大学医学出版社, 2005:9-15.  
 [7] 朱明风, 温赤君, 朱翠英. 肺癌患者 CYFRA21-1、CEA、NSE、CA50 联合的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2005, 18(6):449-451.  
 [8] Plavec G, Ninkovic M, Kozlovacki G, et al. Tumor maker sinpleu-

ral effusion sinbronchogenic carcinoma and tuberculosis[J]. Vojnosanit Pregl, 2002, 59(1):23.  
 [9] Foa P, Fornier M, Miceli R, et al. Tumour markers CEA, NSE SCC, TPA and CYFRA21-1 in respectablenon. smalllung cancer[J]. Anti-cancer Res, 1999, 19(4c):3613-3618.  
 [10] 鲁君艳, 谭爱国, 姜志刚. 血清肿瘤标志物在肺癌诊疗中的应用[J]. 中国医师杂志, 2001, 3(11):831-833  
 [11] 刘坚, 李祥. 肿瘤标志物联检在肺癌诊断中的价值[J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17(6):447-448.  
 [12] Varzim GME. Cyfra21, T PS and SCC in squamous cell carcion larynx[J]. An Otorrinlaringol Ibero Am, 2003, 30(5):467-479.  
 [13] Lagarde A, Forqach T, Naqy D, et al. Diagnostic sensitivity of three tumor markers in non-small cell lung cancer: a pilot study [J]. Nud Med Rev Cent East Eur, 2003, 3(2):139-142.  
 [14] Pastor A, Menendez R, Cremades MJ, et al. Diagnostic value of SCC, CEA and CYFRA21-1 in lung cancer. A Bayesian analysis [J]. Eur Respir, 1997, 10(3):603-609.  
 [15] 陈飞鹏, 郭勇坚. 34 例肺癌患者胸腔积液神经元特异性烯醇化酶测定[J], 新医学, 2001, 32(6):3452-3461.  
 [16] 李振甲, 韩春生, 王建勋, 实用放射免疫学[M]. 北京:科学技术文献出版社, 1989:417-419.  
 [17] 李桂彩, 陈德平, 肖静坤. 电化学发光免疫法与放射免疫法测定血清铁蛋白的评价[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(6):853-855.  
 [18] 钱洪流, 王三锡. 铁蛋白及其与肿瘤的关系[J]. 中华病理学杂志, 2000, 19(2):155.  
 [19] 张丽萍, 李风华, 江艳, 等. 电化学发光法联合检测细胞角蛋白 19 片段、神经元特异性烯醇化酶、癌胚抗原在肺癌诊断中的应用价值[J]. 新医学, 2006, 37(6):374-376.  
 [20] 高丽莉, 胡义德, 张青, 等. 核素骨显像诊断肺癌骨转移的临床价值[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(19):2004-2006.

(收稿日期:2011-08-09)

(上接第 2329 页)

活化, 出现克隆无能的状态。

综上所述, EV71 感染引起的免疫学改变极其复杂, 导致重症的发病机制仍不完全清楚, EV71 感染的病情轻重与 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞反应质量有关, 可能是疾病病程发展的原因之一, 对其机制的进一步研究对于 EV71 感染的免疫调控治疗具有一定的意义。

参考文献

[1] Chang LY, Tsao KC, Hsia SH, et al. Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan[J]. JAMA, 2004, 291(2):222-227.  
 [2] Mao LX, Wu B, Bao WX, et al. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease and genotype characterization of Enterovirus 71 in Jiangsu, China[J]. J Clin Virol, 2010, 49(2):100-104.  
 [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):3516-3521.  
 [4] Chang, LY, Huang LM, Gau SS, et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection[J]. N Engl J Med, 2007, 356(12):1226-1234.  
 [5] Graubert TA, Ley TJ. How do lymphocytes kill tumor cell? [J].

Clin Cancer Res, 1997, 2(5):785-789.  
 [6] Precopio ML, Betts MR, Parrino J, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8<sup>+</sup> T cell response[J]. J Exp Med, 2007, 204(6):1405-1416.  
 [7] 杨晓红, 庄宇, 代宏剑, 等. 实时荧光定量 PCR 检测儿童手足口病肠道病毒 EV71[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11):1337.  
 [8] 卫生部办公厅. 肠道病毒(EV71)感染诊疗指南(2008 年版)[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(6):551-552.  
 [9] Lin YW, Chang KC, Kao CM, et al. Lymphocyte and antibody responses reduce enterovirus 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads[J]. J Virol, 2009, 83(13):6477-6483.  
 [10] 杜伯雨, 白璐, 沈岩, 等. 肠道病毒 EV71 感染对 T 细胞免疫功能影响的研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(8):50-53.  
 [11] Rudd CE, Taylor A, Schneider H, et al. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction [J]. Immunol Rev, 2009, 229(1):12-26.  
 [12] Partida-Sanchez S, Rivero-Nava L, Shi G, et al. CD38: an ecto-enzyme at the crossroads of innate and adaptive immune responses [J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 590:171-183.

(收稿日期:2011-05-10)