

· 论 著 ·

外周血不同 T 细胞亚群在 EV71 病毒感染手足口病患儿中的应用*

方代华¹, 刘 洋^{1#}, 孙浩森², 阎 红¹, 邓罗华¹

(江苏省徐州市儿童医院:1. 输血科;2. 感染科 221006)

摘要:目的 研究 T 细胞亚群 Th1、Th2、Th17 和 Treg 在肠道病毒 71(EV71)病毒感染的手足口病患儿中的变化。方法 收集了 35 例由 EV71 病毒引起的手足口病患儿和 12 例健康儿童作为健康对照组的外周血样本,将患儿分成轻症组和重症组,使用流式细胞术分析了 Th1、Th2、Th17 和 Treg 的比例。结果 35 例患儿中,16 例为轻症,19 例为重症。各组患儿的年龄和性别差异无统计学意义($P > 0.05$);轻症组和重症组患儿 Th1 细胞的比例[以中位数和四分位数 $M(P_{25}, P_{75})$ 形式表示,下同]分别为 10.65%(8.73%, 14.08%)、15.51%(13.47%, 18.31%),显著高于健康对照组[5.51%(3.61%, 8.61%)],且差异具有统计学意义($P < 0.05$);轻症组和重症组患儿 Th2 细胞的比例分别为 4.32%(2.60%, 5.32%)、3.87%(2.34%, 5.32%),与健康对照组比较[2.11%(1.02%, 5.11%)],差异无统计学意义($P > 0.05$)。轻症和重症者手足口病患儿的 Th17 比例分别为 8.32%(5.25%, 12.33%)、7.36%(5.05%, 11.9%),显著高于健康对照组[4.23%(2.44%, 6.22%)],且差异具有统计学意义($P < 0.05$);轻症组和重症组患儿 Treg 比例分别为 1.46%(0.31%, 2.73%)、1.59%(0.35%, 2.62%),与健康对照组[1.78%(0.31%, 2.77%)]比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 EV71 病毒感染的手足口病患儿的 Th1/Th2 和 Th17/Treg 比例发生变化,并且 Th1 和 Th17 细胞在该疾病的发生和机体抵抗中可能发挥着重要作用。

关键词:淋巴细胞亚群; 细胞因子; 手足口病; Th1; Th17

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.08.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)08-1026-03

The application of the peripheral T cell subsets in HFMD children with EV71 virus infection*

FANG Daihua¹, LIU Yang^{1#}, SUN Haomiao², YAN Hong¹, DENG Luohua¹

(1. Department of Blood Transfusion; 2. Department of Infectious, Xuzhou, Xuzhou

Children's Hospital, Jiangsu 221006, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of T cell subsets including Th1, Th2, Th17 and Treg in the hand, foot and mouth disease(HFMD) patients. Methods 35 EV71 induced HMFMD patients and 12 non-infectious children were included in this study. Patients were divided into mild symptoms group and severe symptoms group. The ratios of Th1, Th2, Th17 and Treg were analyzed by flow cytometry. Results Sixteen mild cases and 19 severe cases were included in the 35 patients. No statistical difference of children's age and sex were found among the groups($P > 0.05$). The proportion[$M(P_{25}, P_{75})$] of Th1 cells of mild and severe groups were 10.65%(8.73%, 14.08%) and 15.51%(13.47%, 18.31%), respectively, which were significantly higher than normal control group 5.51%(3.61%, 8.61%)($P < 0.05$). The proportion of Th2 cells of mild and severe groups were 4.32%(2.60%, 5.32%) and 3.87%(2.34%, 5.32%), no significant difference from control group 2.11%(1.02%, 5.11%)($P < 0.05$). The proportion of Th17 cells of mild and severe groups were 8.32%(5.25%, 12.33%)、7.36%(5.05%, 11.9%), significantly higher than that of normal control group 4.23%(2.44%, 6.22%)($P < 0.05$). The proportion of Treg cells of mild and severe groups were 1.46%(0.31%, 2.73%)、1.59%(0.35%, 2.62%), no significant difference from the control group 1.78%(0.31%, 2.77%)($P < 0.05$). Conclusion The Th1/Th2 and Th17/Treg ratios of HFMD patients with EV71 virus infection were changed, and the Th1 and Th17 cells may play an important role in the in the disease and body's resistance.

Key words: lymphocyte subsets; cytokines; hand, foot and mouth disease; Th1; Th17

手足口病是一种常见于 5 岁以下儿童和婴儿的接触性病毒感染疾病,其肠道病毒 71(EV71)和柯萨奇病毒 A16(CA16)是手足口病患儿中最常见的致病病毒^[1]。一般来说,大部分的手足口病患儿表现出轻微的症状,而 EV71 病毒可能导致感染者严重的并发症,如脑干脑炎、肺水肿,甚至死亡^[2-3]。T 淋巴细胞是指一组密切参与细胞介导免疫的淋巴细胞^[4]。如今,这些细胞主要被分为 CD4⁺ T 细胞(包括 Th1、Th2、Th17 和调节性 T 细胞等)和 CD8⁺ T 细胞(包括 Tc1、Tc2 和 Tc17 等)。Th1 可以分泌 I 型细胞因子, Th2 分泌 II 型细胞因子。曾有研

究对 T 细胞亚群在 EV71 引起的手足口病中扮演的角色进行过探讨,发现 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞与手足口病的严重程度和活跃度有关^[5-6]。然而, T 细胞在手足口病的发病和进展中的确切作用仍然不是很明确,很少有研究对手足口病患儿 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的比例失衡进行探讨。本研究对 T 细胞的亚群包括 Th1、Th2、Th17 和 Treg 进行测定,探讨这些指标与儿童手足口病的相关关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 3 月至 2013 年 2 月在徐州市儿童医

* 基金项目:徐州市科技局资助项目(XZZD1368)。

作者简介:方代华,男,主任技师,主要从事细胞免疫学方向的研究; # 共同第一作者:刘洋,男,技师,主要从事细胞免疫学方向的研究。

院治疗的 35 例年龄在 0.5~5.4 岁的 EV71 感染手足口病患儿作为本研究的研究对象。手足口病的诊断根据原中国卫生部颁发的《手足口病诊疗指南(2008 年版)》。接受免疫治疗或经静脉注射免疫球蛋白的患儿被排除在本研究之外。年龄匹配且无感染的健康儿童被纳入作为健康对照组。本研究获得了每个患儿监护人的知情同意书,得到了徐州儿童医院伦理委员会批准。将出现中枢神经系统、循环系统和呼吸系统并发症的患儿列为重症组,其余手足口病患儿列为轻症组。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪型号为 BD FACSCanto II, 单克隆抗体和刺激阻断复合试剂(LEUKO ACTVTN GolgiPlug)均购自美国 BD 公司。使用的单克隆抗体包括胞外抗体: FITC-CD3、APC-CD8、FITC-CD4、PE-CD127 和 APC-CD25, 胞内抗体: FITC-IFN γ 、PE-IL-4 和 PerCP-Cy5.5-IL-17。细胞固定和破膜剂(FIX&PERM)购自 ADG 公司。

1.3 方法

1.3.1 样本采集 使用肝素钠抗凝真空采血管采集每位患儿和健康对照组儿童的外周血样本 3 mL, 12 h 内进行检测。另外,收集每个患儿的其他临床样本(如咽拭子标本、粪便等)用于检测 EV71 病毒。

1.3.2 实时反转录 PCR 实时反转录 PCR 被用来诊断 EV71 病毒感染。

1.3.3 流式细胞术分析 静脉采集到血液样本,使用 BD FACSCanto II 流式细胞仪进行流式细胞仪检测。Th1、Th2 和 Th17 处理过程:取 100 μ L 抗凝血与 100 μ L RPMI 1640 培养基混合,加入 BD LEUKO ACTVTN GolgiPlug,在 37 $^{\circ}$ C 活化培养 6 h。取 100 μ L 活化样本按说明书加入胞外抗体,室温避光染色 15 min,然后使用 ADG FIX&PERM 试剂盒进行固定和破膜。破膜最后一步加入胞内抗体,室温避光染色 15 min。PBS 洗涤细胞后上流式检测。Treg 处理过程:取 50 μ L 抗凝全血,按说明书加入抗体,室温避光染色 15 min,然后加入 1 mL 红细胞裂解液室温避光 15 min,最后 PBS 洗涤后上流式细胞仪检测。使用的胞外抗体: FITC-CD3、APC-CD8、FITC-

CD4、PE-CD127 和 APC-CD25,胞内抗体: FITC-IFN γ 、PE-IL-4 和 PerCP-Cy5.5-IL-17。分析软件为 FACSDiva,每个样本收集 10 000 个细胞,分析 Th1、Th2、Th17 占 Th(CD3 $^{+}$ /CD8 $^{-}$)细胞的比例, natural Treg 占 CD4 $^{+}$ T 细胞的比例。Th1、Th2、Th17 和 natural Treg 的标记分别为: CD3 $^{+}$ CD8 $^{-}$ IFN γ^{+} 、CD3 $^{+}$ CD8 $^{-}$ IL-4 $^{+}$ 、CD3 $^{+}$ CD8 $^{-}$ IL-17 $^{+}$ 和 CD4 $^{+}$ CD25 high CD127 low 。

1.4 统计学处理 使用 SPSS18.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析(ANOVA)比较组内差异;对于不符合正态分布的数据采用中位值(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]的形式表示,使用非参数秩和检验(Kruskal-Wallis)分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组一般资料比较 35 例患儿包含 16 例轻症和 19 例重症,年龄和性别与健康对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 3 组 Th1、Th2 及 Th1/Th2 比例的变化 轻症组和重症组患儿 Th1 细胞的比例分别为 10.65% (8.73%, 14.08%) 和 15.51% (13.47%, 18.31%),显著高于健康对照组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。轻症组和重症组患儿 Th2 细胞的比例分别为 4.32% (2.60%, 5.32%) 和 3.87% (2.34%, 5.32%),与健康对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。而轻症患儿和重症患儿之间的 Th1/Th2 比例差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 3 组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	男/女(n/n)	年龄(岁)	体质量(kg)
轻症组	16	5/11	3.4 \pm 0.5	16.2 \pm 1.6
重症组	19	5/14	3.1 \pm 0.4	16.4 \pm 1.9
健康对照组	12	5/7	3.5 \pm 0.7	15.6 \pm 2.1

表 2 3 组 Th1、Th2 及 Th1/Th2、Th17/Treg 比例的变化[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]

组别	n	Th1	Th2	Th1/Th2	Th17	Treg	Th17/Treg
轻症组	16	10.65(8.73,14.08)*	4.32(2.60,5.32)	2.91(2.70,4.02)	8.32(5.25,12.33)*	1.46(0.31,2.73)	5.34(4.37,8.72)*
重症组	19	15.51(13.47,18.31)*	3.87(2.34,5.32)	3.46(2.93,5.51)	7.36(5.05,11.90)*	1.59(0.35,2.62)	4.66(4.55,9.06)*
健康对照组	12	5.51(3.61,8.61)	2.11(1.02,5.11)	2.49(1.71,3.62)	4.23(2.44,6.22)	1.78(0.31,2.77)	2.38(2.11,7.25)
P		0.003	0.258	0.001	0.022	0.491	0.006

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 3 组 Th17、Treg 及 Th17/Treg 比例变化 轻症和重症组手足口病患儿的 Th17 比例分别为 8.32% (5.25%, 12.33%)、7.36% (5.05%, 11.9%),显著高于健康对照组 4.23% (2.44%, 6.22%),且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。轻症组和重症组患儿 Treg 比例分别为 1.46% (0.31%, 2.73%)、1.59% (0.35%, 2.62%),与健康对照组 1.78% (0.31%, 2.77%)之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。手足口病患儿 Th17/Treg 比例分别为 5.34 (4.37, 8.72) 和 4.66 (4.55, 9.06),显著高于健康对照组 2.38(2.11, 7.25),且差异具有统计学意义($P > 0.05$)。这些结果说明手足口病患儿 Th17/Treg 比例出现了异常。见表 2。

3 讨 论

EV71 感染导致的主要疾病是手足口病,该病毒可以引起机体免疫紊乱,表达导致手足口症状的细胞因子^[2]。EV71 感染的严重程度与患儿的免疫功能状态密切相关^[6]。轻症患儿处于一般免疫反应状态,而重症患儿则出现代偿性免疫应答或者混合多种免疫反应^[7]。越来越多的研究开始集中到 EV71 感染和免疫系统上^[6-9]。例如, EV71 感染会下调 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达,从而影响到疾病的进程^[10]。由 Th1 细胞分泌的因子包括白细胞介素-2(IL-2)、IFN- γ 和肿瘤坏死因子- β (TNF- β),可以驱动免疫应答、激活并促进毒性 T

细胞的的增长,并能抑制炎症反应和缓解超敏反应^[11]。虽然没有直接研究证实 Th1 在手足口病的作用,但 Th1 表达的细胞因子在手足口病的发病机制中发挥重要作用是被公认的。本研究中,与健康对照相比,手足口患儿的 Th1 水平显著提高,尤其是那些有严重的症状患儿。研究结果可以提供间接证据来证实 Th1 在患儿手足口病的发病机制中所扮角色。

Th2 细胞分泌的细胞因子白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)、白细胞介素-10(IL-10)和白细胞介素-13(IL-13)等与 B 细胞的增殖和成熟密切相关,即与体液免疫相关。先前的研究发现 EV71 引起的手足口病患儿体内 IL-10 和 IL-13 表达水平增高^[12-13]。然而这些研究仅提供了免疫介质发生改变的证据,而且它们的方法各不相同。有些研究对 Th2 的细胞因子进行了分析,但是采用的方法不能直接反映出 Th2 在体内的状况^[14]。本研究分析了轻症组、重症患儿组和健康对照组的 Th2 细胞的情况。轻症和重症组的比例分别为 4.32% (2.60%, 5.32%) 和 3.87 (2.34%, 5.32%)。未发现两组患儿与健康对照组的 Th2 比例差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。基于此,推测 Th1 细胞而非 TH2 细胞在 EV71 引起的手足口病发展和机体抵抗过程中起着重要的作用。

Th1/Th2 比例已经被用来表示动物模型或人体内的免疫状态^[15]。本研究发现,手足口患儿体内 Th1/Th2 比例高于健康对照儿童。然而,轻症组和重症组手足口患儿的 Th1/Th2 比例没有显著性的差异。因此,有理由相信还有别的 T 细胞亚群可能参与了手足口病的病理过程。有研究发现, Th17 细胞的比例高于健康对照组,意味着 Th17 可能介导了手足口病的病理过程^[16],表明 Th17 细胞的免疫应答可能参与了 EV71 感染的手足口病的病理过程。基于此,本研究检测了 EV71 感染的手足口病患儿和健康对照组儿童体内 Treg 和 Th17 的水平变化。研究发现,与健康对照组相比手足口患儿的 Th17/Treg 比例显著增高。这说明 Treg 和 Th17 与 V71 感染的手足口病的病理过程密切相关。与 Th17 细胞表现出的显著升高不同, Treg 在患儿体内的水平与健康对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此, Th17/Treg 比例的变化主要是由 Th17 细胞所引起,这进一步确定了 Th17 细胞在 EV71 感染的手足口病病理发生中起着作用。这需要未来的研究对 Th17 与手足口病发病关联的确切机制进行揭示。

综上所述,研究结果显示了 T 细胞亚群、Th1/Th2 和 Th17/Treg 比例在手足口疾病中的变化。确定了 Th1 细胞而非 Th2 细胞在 EV71 引起的手足口病发展和机体抵抗过程中起着重要的作用。还显示了 Th17/Treg 的比例失衡是由于 Th17 细胞的变化所致,且 Th17 间接或直接参与了手足口病的免疫反应过程。

参考文献

[1] 李亮汪,史智扬,潘浩,等.江苏省手足口病病原阳性检出率相关因素及病原学特征[J].南京医科大学学报(自然科学版),2010,30(1):122-127.

[2] Chen KT, Chang HL, Wang ST, et al. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005[J]. Pediatrics, 2007, 120(2): e244-252

[3] 王英何,赵俊伟,王世文. 2008-2010 年全国报告手足口病死亡水平及死亡病例分析[J]. 疾病监测, 2011, 26(6): 424-426.

[4] Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, et al. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. [J]. Nature, 2003, 421(6925): 852-856.

[5] 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.

[6] Weng KF, Chen LL, Huang PN, et al. Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection[J]. Microbes Infect, 2010, 12(7): 505-510.

[7] 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.

[8] Tung WS, Bakar SA, Sekawi Z, et al. DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice[J]. Genet Vaccines Ther, 2007, 5(6): 1-13.

[9] 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.

[10] Wang SM, Lei HY, Huang MC, et al. Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis[J]. J Clin Virol, 2006, 37(1): 47-52.

[11] Kim JJ, Yang JS, Manson KH, et al. Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccination in rhesus macaques through the use of IL-2, IFN- γ , or IL-4 gene adjuvants[J]. Vaccine, 2001, 19(17): 2496-2505.

[12] Zhang Y, Liu H, Wang L, et al. Comparative study of the cytokine/chemokine response in children with differing disease severity in enterovirus 71-induced hand, foot, and mouth disease[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67430.

[13] Chen Z, Li R, Xie Z, et al. IL-6, IL-10 and IL-13 are associated with pathogenesis in children with Enterovirus 71 infection[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2718.

[14] Lauw FN, ten-Hove T, Dekkers PEP, et al. Reduced Th1, but not Th2, cytokine production by lymphocytes after in vivo exposure of healthy subjects to endotoxin[J]. Infect Immun, 2000, 68(3): 1014-1018.

[15] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity [J]. Nat Med, 2002, 8(6): 567-573.

[16] Li S, Cai C, Feng J, et al. Peripheral T lymphocyte subset imbalances in children with enterovirus 71-induced hand, foot and mouth disease[J]. Virus Res, 2014, 180: 84-91.