

手足口病儿童血浆 γ 干扰素诱导蛋白 10 的表达水平及临床意义

周 萍,刘正霞*

(南京医科大学第二附属医院老年医学研究室,江苏 南京 210003)

[摘要] 目的:探讨 γ 干扰素诱导蛋白 10 (interferon- γ inducible protein-10,IP-10) 在手足口病 (hand-foot-mouth disease, HFMD) 儿童血浆中的表达水平及临床意义。方法:选取 HFMD 患儿 74 例,根据是否伴有神经系统症状将患儿分为重症组和普通感染组;另选取 30 例体检儿童作为健康对照组。采用流式液相多重蛋白定量检测技术检测血浆中 IP-10 的表达量,同时检测分析淋巴细胞亚群比例、免疫球蛋白和血常规相关指标。比较各指标在健康对照组、HFMD 普通感染组及重症组中的差异;分析 IP-10 与皮疹出现天数及淋巴细胞各亚群比例之间的相关性。结果:HFMD 普通感染组及重症组患儿白细胞计数均增高,但和健康对照组相比无统计学差异。HFMD 普通感染组及重症组患儿 IP-10 蛋白表达均显著增加($P < 0.001$),重症组 IP-10 蛋白表达略低于普通感染组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。HFMD 普通感染组及重症组患儿 T 细胞比例显著降低($P < 0.001$),其中 $CD4^+$ T 淋巴细胞与 $CD8^+$ T 淋巴细胞亦显著降低($P < 0.05$)。相反,B 淋巴细胞比例显著增加($P < 0.001$)。HFMD 普通感染组、重症组与健康对照组相比,IgA 降低,IgG 增加,但无统计学差异($P > 0.05$)。HFMD 普通感染组患儿 IP-10 蛋白表达量与皮疹天数呈负相关($P < 0.05$),而重症组虽 IP-10 蛋白表达量与皮疹天数呈负相关,但无统计学意义。HFMD 重症组 IP-10 蛋白表达量与 T 淋巴细胞比例呈正相关,其中与 $CD4^+$ T 淋巴细胞的正相关有统计学意义($P < 0.01$)。结论:HFMD 患儿 T 淋巴细胞比例降低,B 淋巴细胞比例增加,IP-10 蛋白表达显著增加,与皮疹天数呈负相关。

[关键词] 手足口病;儿童;IP-10;淋巴细胞亚群

[中图分类号] R512.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-865-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150622

Expression and clinical significance of interferon- γ -inducible protein-10 in the plasma of children with hand-foot-mouth disease

Zhou Ping, Liu Zhengxia*

(Gerontology Research Center, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level and clinical significance of interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10) in the plasma of children with hand-foot-mouth disease (HFMD). **Methods:** Seventy-four children with hand-foot-mouth disease and 30 healthy controls were enrolled in this study. The infectious cases were divided into severe group and common group, respectively, according to whether patients were accompanied with nervous system symptoms. The flow cytometry technology was performed to detect IP-10 expression in plasma. Meanwhile, the lymphocyte subsets ratio, immunoglobulin and routine blood tests were also detected. The indicators were compared among the healthy controls, the general infection group and the severe group. The correlation among IP-10, rash days and lymphocyte subsets ratios were analyzed. **Results:** The number of white blood cell increased in the common HFMD group and the severe group, but had no statistical difference compared to the healthy controls. The expression of IP-10 significantly increased in the disease groups (both $P < 0.001$); however, the expression of IP-10 in the severe group was slightly lower than that of the common group of infection ($P > 0.05$). T lymphocyte cell ratio decreased significantly in both two disease groups ($P < 0.001$), in which the $CD4^+$ T lymphocyte cells and $CD8^+$ T lymphocyte cells also obviously reduced (both $P < 0.05$). On the contrary, B lymphocyte cell proportion increased remarkably ($P < 0.001$). The IgA increased while IgG reduced in the infectious groups compared with the healthy controls without statistical difference ($P > 0.05$). The skin rash days was negatively correlated with IP-10 expression, notably in the general infection group ($P < 0.05$), but was no statistical difference compared to the severe group. The proportion of $CD4^+$ T lymphocyte cells was significantly positively related to IP-10 expression in the severe group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of

[基金项目] 国家自然科学基金(81300999)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuzx0503@163.com

IP-10 and B lymphocyte cell ratio significantly increased and T lymphocyte cell ratio significantly decreased in children with HFMD, which were negatively correlated with skin rash days.

[Key words] hand-foot-mouth disease; children; IP-10; lymphocyte subsets

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 35(06): 865-869]

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)是一种常见的儿童传染病,又名发疹性水疱性口腔炎,多发生于5岁以下儿童,尤其以3岁以下儿童发病率最高^[1],可引起手、足、口腔等多部位疱疹,少数患儿可引起肺水肿、心肌炎、无菌性脑膜脑炎等不同并发症。导致HFMD的肠道病毒有20余种(型),其中最常见病毒为柯萨奇病毒A16型(CoxA16)和肠道病毒71型(EV71)^[2]。 γ 干扰素诱导蛋白10(interferon- γ inducible protein-10, IP-10)属于CXCL型趋化因子,由IFN- γ 诱导,可通过T淋巴细胞、巨噬细胞、内皮细胞和星形细胞等分泌产生,在不同炎症状态下发挥较大作用。IP-10水平与白细胞增多有关,但是目前尚不清楚这种趋化因子水平的高低与HFMD严重程度是否有关,国内尚无此方面的相关报道。本研究观察了HFMD患儿血浆IP-10水平及白细胞、免疫球蛋白、淋巴细胞亚群等免疫学指标变化,分析IP-10与皮疹天数以及淋巴细胞亚群的相关性,旨在为了解病情、疗效观察和预防并发症提供依据。

1 对象和方法

1.1 对象

选取2012年12月~2013年8月南京医科大学第二附属医院儿科收治住院的74例HFMD患者,年龄1~7岁,男43例,女31例,患儿主要依据《HFMD诊疗指南2012版》进行诊断,普通患儿44例,重症患儿30例。普通病例临床诊断标准:在流行季节发病,学龄前儿童和婴幼儿;发热伴手、足、口、臀皮疹。重型病例:除发热皮疹外,出现神经系统受累表现如嗜睡、谵妄、易惊、肢体抖动等症状。入选病例排除标准:伴有支气管肺炎、胃炎、川崎病等疾病。30例门诊体检儿童作为健康对照组,年龄2~7岁。皮疹天数指标为皮疹出现至入院IP-10检查时持续的总天数。

IP-10试剂(货号558280)由美国BD Biosciences公司提供,淋巴细胞亚群检测试剂(货号337166)为美国BD公司产品。采用美国BD公司FACS CantoII型号的流式细胞仪进行相关检测,并用相应软件分析结果,分别得出外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺56⁺细胞的百分数和血浆IP-10的定量结果。免

疫球蛋白采用德国西门子公司特定蛋白仪检测。五分类血细胞系统采用日本Sysmex公司的仪器检测。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞亚群检测

患者入院后24 h内抽取1 mL外周静脉血置于EDTA抗凝管,24 h内检测分析。取Falcon试管,分别依次加入20 μ L抗体及100 μ L抗凝全血,震荡混匀后室温避光孵育15 min,加入BD FACS lysing溶血素2 mL避光15 min,上机检测。血常规、免疫球蛋白检测均按照仪器和配套试剂的操作说明操作。

1.2.2 细胞因子检测

将采集的EDTA抗凝血在6 h内,3 000 r/min离心10 min,分离血浆,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存,避免反复冻融。采用BD公司流式液相多重蛋白定量检测技术(cytometric beads array, CBA)制作标准曲线和检测样本,步骤严格按照说明书操作,同时将试剂盒中set-up beads用FACSDiva软件进行BD CBA实验的模板设置,上机低速检测,最后将收集的数据导入FCAP Array v1.0.1软件计算得出定量结果。

1.3 统计学方法

正态分布定量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布定量资料用四分位数[M(P₂₅~P₇₅)]表示。采用SPSS17.0统计软件对实验数据进行统计学分析,正态分布定量资料采用one way ANOVA检验,并进一步做Post Hoc Tests两两比较。非正态分布定量资料采用非参数Mann-Whitney U检验。正态分布资料采用Pearson相关性分析,非正态分布计数资料采用Spearman相关分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血细胞计数百分比检测结果比较

HFMD组白细胞计数增高,但和健康对照组相比无统计学差异。普通型HFMD感染组与健康对照组相比中性粒细胞比例显著增加($P < 0.05$),单核细胞比例显著增加($P < 0.001$),淋巴细胞比例显著降低($P < 0.001$)。重症感染组与健康对照组相比单核细胞比例亦显著增加($P < 0.001$),但中性粒细胞与淋巴细胞比例无明显差异($P > 0.05$,表1)。

表 1 HFMD 组与健康对照组外周血中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞检测结果比较

Table 1 Comparisons of neutrophils, monocyte and lymphocyte in the peripheral blood between the HFMD groups and the healthy controls ($\bar{x} \pm s$)

细胞类型	健康对照组	HFMD 组	
	(n=30)	普通型(n=44)	重症(n=30)
白细胞数($\times 10^9/L$)	7.39 \pm 1.84	8.70 \pm 3.52	8.58 \pm 3.45
中性粒细胞(%)	44.66 \pm 8.51	53.76 \pm 20.13*	47.86 \pm 23.04
单核细胞(%)	5.49 \pm 1.34	8.63 \pm 3.73**	7.65 \pm 2.78**
淋巴细胞(%)	49.19 \pm 9.08	35.97 \pm 17.59**	40.79 \pm 20.36

与健康对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

2.2 各组淋巴细胞亚群比例检测结果比较

HFMD 普通型及重症感染组与健康对照组相比,T 淋巴细胞比例均显著降低 ($P < 0.001$), 其中 $CD4^+$ T 淋巴细胞与 $CD8^+$ T 淋巴细胞亦显著降低($P < 0.05$)。相反,两组 B 淋巴细胞比例显著增加($P < 0.001$),NK 细胞比例增加, 但和对照组相比无统计学差异($P > 0.05$,表 2)。

表 2 HFMD 组与健康对照组 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞比例检测结果比较

Table 2 Comparisons of the percentage of T, B and NK cells between the HFMD groups and the healthy controls ($\bar{x} \pm s$)

淋巴细胞类型	健康对照组	HFMD 组	
	(n=30)	普通型(n=44)	重症(n=30)
T(%)	68.64 \pm 7.07	59.05 \pm 5.74***	57.66 \pm 9.0***
$CD4^+$ T(%)	39.21 \pm 7.27	34.02 \pm 5.36**	33.62 \pm 7.93**
$CD8^+$ T(%)	23.53 \pm 6.43	20.40 \pm 4.45*	20.03 \pm 4.91*
B(%)	18.74 \pm 5.13	25.40 \pm 7.03***	27.86 \pm 8.44***
NK(%)	10.65 \pm 7.33	13.73 \pm 7.29	12.65 \pm 5.71

与健康对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2.3 各组免疫球蛋白检测结果比较

HFMD 普通型及重症感染组与健康对照组相比,IgA 降低,IgG 增加, 但无统计学差异 (P 均 > 0.05)。重症感染组与健康对照组相比 IgM 显著增加 ($P = 0.034$);普通型 HFMD 感染组与健康对照组相比 IgM 亦增加,但无统计学差异($P > 0.05$,表 3)。

2.4 各组 IP-10 蛋白表达情况

HFMD 两组与健康对照组相比,IP-10 蛋白表达均显著增加($P < 0.001$)。重症组 IP-10 蛋白表达略低于普通感染组,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

2.5 IP-10 与皮疹天数相关性分析

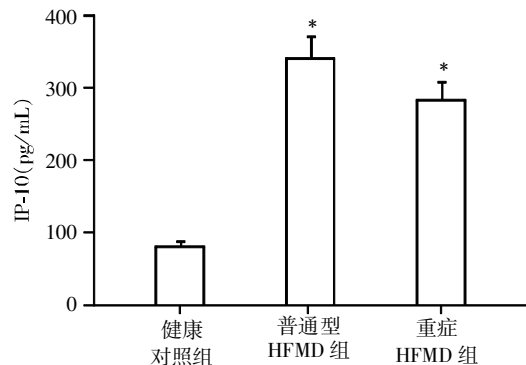
Spearman 相关性分析显示,普通型 HFMD 患儿 IP-10 蛋白表达量与皮疹天数呈现明显负相关,其相关性有统计学意义($P < 0.05$),而重症感染组虽与

表 3 HFMD 组与健康对照组免疫球蛋白 IgA、IgM 和 IgG 结果比较

Table 3 Comparisons of the IgA, IgM and IgG between the HFMD groups and the healthy controls [M(P₂₅~P₇₅)]

指标	健康对照组(n=30)	HFMD 组	
		普通型(n=44)	重症(n=30)
IgA	0.57(0.39~0.79)	0.39(0.31~0.77)	0.50(0.36~0.70)
IgM	0.93(0.74~1.17)	1.01(0.79~1.48)	1.11(0.90~1.43)*
IgG	7.24(6.05~8.60)	7.14(6.21~9.24)	7.30(6.18~8.88)

与健康对照组相比,* $P < 0.05$ 。



与健康对照组比较,* $P < 0.001$ 。

图 1 HFMD 普通组、重症组与健康对照组 IP-10 结果比较
Figure 1 Comparisons of the expression of IP-10 among the HFMD common, severe groups and the healthy controls

皮疹天数呈负性相关,但无统计学意义(图 2)。

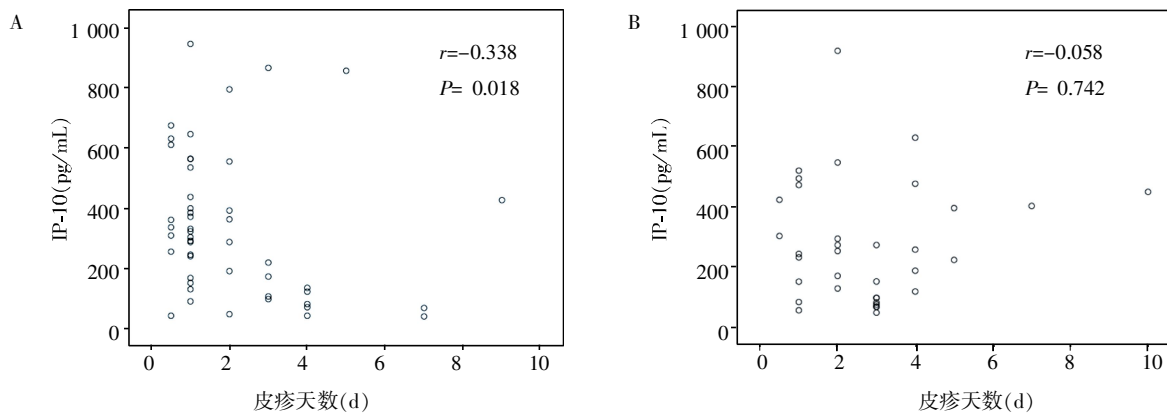
2.6 IP-10 与淋巴细胞亚群相关性分析

Pearson 相关性分析显示,重症 HFMD 患儿 IP-10 蛋白表达量与 T 细胞比例呈正相关,其中与 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例的正相关有统计学意义($P < 0.01$),余相关性均无统计学意义($P > 0.05$,表 4)。

3 讨论

HFMD 肠道病毒感染机体后,可激活体液免疫和细胞免疫,导致机体发生多种复杂的免疫功能变化,出现细胞免疫和体液免疫的功能紊乱^[3-4]。患者外周血 $CD3^+$ 和 $CD4^+$ 细胞数量减少提示细胞免疫呈现抑制状态^[5]。人体内的免疫球蛋白在抗感染方面发挥重要的体液免疫调节作用^[6]。本研究结果中 HFMD 患儿 B 淋巴细胞比例显著增高,IgG 及 IgM 表达增加,T 淋巴细胞比例降低,提示 HFMD 病毒感染后特异性体液免疫发挥了重要作用。

加强对 HFMD 患儿的临床监测,早期诊断,早期治疗,可以有效预防 HFMD 患儿发展成重症^[7-8]。本研究发现 HFMD 患儿外周血中 IP-10 蛋白表达与对照组相比明显增加。IP-10 又名趋化因子 CXCL10,属于



A: 普通型 HFMD 组; B: 重症 HFMD 组。

图 2 IP-10 与皮疹天数相关性分析

Figure 2 Correlation analysis between IP-10 and rash days

表 4 IP-10 与淋巴细胞亚群相关性分析

Table 4 Correlation analysis between IP-10 and lymphocyte subpopulation

相关性分析	普通型手足口病		重症型手足口病	
	r 值	P 值	r 值	P 值
IP-10 与 T 细胞比例	-0.296	0.068	0.369	0.059
IP-10 与 CD4 ⁺ T 细胞比例	-0.219	0.180	0.522	0.005
IP-10 与 CD8 ⁺ T 细胞比例	-0.111	0.500	-0.133	0.508
IP-10 与 B 细胞比例	0.145	0.378	-0.295	0.135
IP-10 与 NK 细胞比例	0.026	0.877	-0.069	0.732

CXC 类趋化因子家族, 1985 年首次发现, 经 IFN- γ 诱导产生, 由 T 细胞、巨噬细胞、内皮细胞和星形细胞等分泌, CXCR3 是 IP-10 唯一受体^[9]。在炎症反应中, 趋化因子通过两种方式介导免疫。一是直接作用, 趋化因子能选择性地诱导白细胞表达整合素, 释放细胞因子, 并诱导内皮细胞表达黏附分子, 使更多的炎症细胞聚集在炎症部位, 引起炎症反应; 二是间接作用, 通过进一步诱导基质细胞, 如巨噬细胞、胶质细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞等产生各种趋化因子, 从而发生级联效应, 吸引更多炎症细胞到病灶处, 引起更严重组织损害。IP-10 与靶细胞 CXCR3 结合后, 通过一系列信号转导途径介导免疫细胞的迁移、活化, 而活化的免疫细胞则通过细胞表面受体结合各种抗原, 启动细胞内信号转导, 诱导大量相关细胞因子表达, 启动细胞因子级联反应, 从而激活特异性免疫应答系统^[10-11]。本研究中 HFMD 患儿单核细胞及 NK 细胞比例增加, 与 IP-10 蛋白表达增加相符合。研究发现重症感染组白细胞计数、中性粒细胞、单核细胞及 T 淋巴细胞比例均略低于普通感染组; B 淋巴细胞比例、IgA 及 IgM 水平则略高于普通感染组, 提示重

症感染组患儿特异性体液免疫发挥了更加重要的作用。重症感染组 IP-10 蛋白表达略低于普通感染组, 但无统计学差异, 提示 IP-10 蛋白表达量与神经系统症状无相关性。

IP-10 是早期炎症因子, 在炎症过程中参与调节细胞的募集和活化, 控制炎症细胞因子的活动性^[12]。研究中发现普通型 HFMD 患儿 IP-10 蛋白表达量与皮疹天数呈现明显负相关, 其相关性有统计学意义, 提示病毒感染早期, IP-10 大量表达, 介导机体免疫应答。而随着病程延长, 病毒逐渐被清除, IP-10 表达降低。不同的是, 重症感染组虽与皮疹天数呈负相关, 但无统计学意义, 可能与病毒感染亚型不同有关。普通型 HFMD 患儿 IP-10 蛋白表达量与 T 淋巴细胞比例呈负相关, 其相关性无统计学意义; 而重症 HFMD 患儿 IP-10 蛋白表达量与 T 淋巴细胞比例呈正相关, 其中与 CD4⁺ T 细胞的正相关有显著统计学意义, 提示当病毒感染出现神经系统受累时其细胞免疫状态不同于普通型 HFMD, 其具体机制有待进一步研究。HFMD 病毒感染后, 一方面病毒蛋白可直接诱导 IP-10 表达; 另一方面, 病毒蛋白通过诱导机体产生 Th1 型细胞因子, 间接诱导趋化因子表达。在急性期, 如果机体不能清除病毒, 病毒蛋白不断刺激机体产生炎症趋化因子。肠道病毒感染肠上皮细胞刺激 Th1 细胞通过自分泌和旁分泌产生 IFN- γ , 而肠上皮细胞受 IFN- γ 诱导使得炎症局部 IP-10 表达增强^[9], 由于炎症部位肠上皮细胞损伤坏死, 导致血循环中 IP-10 增加, 提示通过检测血浆 IP-10 浓度可间接反映 HFMD 炎症损害程度^[13]。

综上所述, 本研究证实 HFMD 患者血浆中 IP-10 浓度明显增高, 该研究为 HFMD 的诊断治疗提供了参考。本研究的不足是没有鉴定感染病例的病毒亚

型,今后将进一步深入研究不同病毒亚型感染下的 IP-10 生物学功能及表达调控。

[参考文献]

- [1] Liu MY, Liu W, Luo J, et al. Characterization of an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Nanchang, China in 2010[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25287
- [2] Liu N, Xie J, Qiu X, et al. An atypical winter outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with human enterovirus 71, 2010[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1): 123
- [3] 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
- [4] Zhang X, Wang H, Ding S, et al. Prevalence of enteroviruses in children with and without hand, foot, and mouth disease in China[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(1): 606
- [5] 山浩明, 张琴, 张兰芳. 全身炎症反应综合征患儿淋巴亚群的变化[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 32(1): 96-97
- [6] 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
- [7] 石小花, 胡静, 喻文亮, 等. 648 例手足口病回顾性分析[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(1): 87-91
- [8] 汤奋扬, 嵇红, 李亮等. 儿童手足口病重症病例影响因素的病例对照研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(1): 123-126, 128
- [9] Chang MX, Sun BJ, Nie P. The first non-mammalian CXCR3 in a teleost fish: gene and expression in blood cells and central nervous system in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Mol Immunol, 2007, 44(6): 1123-1134
- [10] Pacheco-Rodriguez G, Moss J. The role of chemokines in migration of metastatic-like lymphangioliomyomatosis cells[J]. Crit Rev Immunol, 2010, 30(4): 387-394
- [11] Lima XT, Oliveira RT, Braga FG, et al. Circulating levels of chemokines in psoriasis[J]. Autoimmunity, 2014[Epub ahead of print]
- [12] Hoermannsperger G, Clavel T, Hoffmann M, et al. Post-translational inhibition of IP-10 secretion in IEC by probiotic bacteria: impact on chronic inflammation[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4365
- [13] Chi C, Sun Q, Wang S, et al. Robust antiviral responses to enterovirus 71 infection in human intestinal epithelial cells[J]. Virus Res, 2013, 176(1-2): 53-60

[收稿日期] 2014-09-15

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。