

· 临床研究 ·

不同程度手足口病患儿脑脊液及血清细胞因子的比较

胡笑月, 王艳萍, 王健彪, 井 森, 华 颖*

无锡市儿童医院神经内科, 江苏 无锡 214023

[摘要] 目的:探讨血清和脑脊液的几种细胞因子与手足口病的关系。方法:分别选取普通手足口病患儿、重症手足口病患儿和同期非中枢神经系统感染患儿各26例,应用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组患儿的血清细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-8、IL-12亚单位P40(IL-12P40)、IL-15、干扰素诱导蛋白(interferon-inducible protein, IP)-10和脑脊液细胞因子IL-8、IP-10水平,并分析细胞因子与病毒感染、病情轻重的关系及其在脑脊液与血液的分布。结果:①重症组血清IL-12P40、IL-15、IP-10水平较对照组显著升高,普通组血清IL-8、IP-10以及IL-12P40较对照组升高,血清IL-8、IP-10在重症组中较普通组减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);②手足口病重症组急性期,脑脊液IL-8、IP-10较对照组及恢复期均显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);③重症手足口病患儿中,EV71阳性患儿脑脊液IL-8浓度要高于EV71阴性的浓度,而血清结果相反,差异有统计学意义($P < 0.01$);④重症组急性期IL-8在脑脊液中的分布水平高于血清。结论:血清细胞因子IL-12P40、IL-15及脑脊液细胞因子IL-8、IP-10参与了重症病例的发病过程。

[关键词] 手足口病;细胞因子;肠道病毒71型

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2020)02-275-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20200227

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是一种广泛传播的传染病,近几年发病率逐年上升,已成为国家公共卫生的一大威胁。肠道病毒71(EV71)是一种与神经系统并发症有关的嗜神经病毒,是引起手足口病的主要病原体,特别是在重症及死亡病例中占有很高的比例^[1-2]。有研究表明手足口病的进展和细胞因子的介导有关,如白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、IL-10、IL-21等细胞因子的水平在疾病演变中均有显著的变化^[3-7]。了解病毒感染后宿主的免疫应答机制,对于重症病例的早期识别和治疗有着重要的意义。本研究通过分析52例手足口病患儿脑脊液及血清的细胞因子IL-8、干扰素诱导蛋白10(interferon-inducible protein-10, IP-10)等,探讨手足口病不同临床型(普通型、重症型)的细胞因子变化特点,为进一步研究奠定基础。

[基金项目] 无锡市医管中心联合攻关项目(YGZXL1323);无锡市科教强卫工程医学青年人才(QNRC021);江苏省医学创新团队(CXTDB2017016);无锡市医学发展学科(FZXK001)
*通信作者(Corresponding author), E-mail: huayingwxey@med-mail.com.cn

1 对象和方法

1.1 对象

选择2014年1月—2015年12月于无锡市儿童医院手足口病门诊就诊及住院治疗确诊为手足口病的52例患儿为研究对象,其中女20例,男32例;年龄为7个月~12岁,平均为2.8岁。根据手足口病诊断标准^[8],26例为重症组,出现神经系统受累表现,表现为精神差、呕吐、惊跳、肢体抖动、头痛,结合脑脊液检查诊断为脑炎,但未合并肺水肿、循环障碍等并发症,无死亡病例;另26例为普通病例,表现为发热,口腔黏膜出现疱疹,手、足及臀部出现丘疹、疱疹。选择同期于本院住院的26例疑为中枢神经系统感染的患儿为对照组,经检查脑脊液常规、生化无异常,最终临床诊断为血管神经性头痛、癔症、眩晕综合征。3组儿童的一般临床资料的比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究遵循本院伦理委员会制定的伦理学标准,得到批准,受试者监护人均知情,并为之签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

抽取患儿入院后或门诊首次接诊24 h内外周

静脉血 4 mL, 分离血清, 在入院 24 h 内对手足口病重症组、对照组患儿进行腰椎穿刺采集脑脊液标本 2 mL, 同时在入院第 8 天采集手足口病重症组患儿恢复期的脑脊液标本 2 mL, 置于 -80 °C 冰箱备检。同步采集手足口病患儿粪便样本, 采用实时荧光 RT-PCR 试剂盒(泰州江苏硕世生物科技有限公司)进行 EV-71 病毒核酸检测。

1.2.2 细胞因子检测

血清细胞因子 IL-8、IL-12 亚单位 P40 (IL-12P40)、IL-15、IP-10, 脑脊液急性期和恢复期细胞因子 IL-8、IP-10 采用酶联免疫吸附试验(ELISA 法), 检测试剂盒购自美国 R & D 公司, 操作严格按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 进行数据分析, 非正态分布的计量资料以中位数 [$M(Q_{25} \sim Q_{75})$] 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney 检验, 配对样本比较采用 Wilcoxon

on 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。相关分析用 Spearman 相关分析。计数资料采用卡方检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒检测

52 例中有 26 例为 EV71 阳性, 其中重症组 17 例 (65.4%), 普通患儿组 9 例 (34.6%), 二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组患儿血清细胞因子水平比较

各组血清细胞因子水平情况比较见表 1。重症组 IL-12P40、IL-15、IP-10 水平较对照组均显著升高, 差异均有统计学意义; 普通组 IL-8、IP-10 以及 IL-12P40 也较对照组升高, 差异有统计学意义; IL-12P40、IL-15 在重症组中较普通组升高明显, 但 IL-8、IP-10 在重症组却较普通组减少, 差异均有统计学意义; IL-8 的浓度在重症组和对对照组中无明显

表 1 各组血清 4 种细胞因子的比较 [pg/mL, $M(Q_{25} \sim Q_{75})$]

细胞因子	对照组 (n=26)	重症组 (n=26)	普通组 (n=26)	P 值
IL-12P40	2.09(2.09~14.02)	72.85(6.16~111.46)**	10.05(2.09~21.14)***	<0.01
IL-15	0.87(0.87~0.87)	4.77(0.87~14.65)**	0.87(0.87~1.50)##	<0.01
IL-8	10.44(5.60~92.40)	8.71(6.52~15.29)	1 290.5(603.02~4 079.75)**#	<0.01
IP-10	46.36(14.33~82.17)	82.34(51.79~149.97)*	169.53(109.65~238.17)**#	<0.01

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与重症组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

差异。

2.3 各组患儿脑脊液细胞因子水平比较

各组脑脊液细胞因子水平情况比较见表 2。可见在手足口病重症组急性期, IL-8、IP-10 较对照组及恢复期均显著增高, 差异有统计学意义, 而这 2 种细胞因子在疾病恢复期与对照组相比并无显著差异。IL-8 在重症组急性期血清和脑脊液中的分布有显著差异 [8.71 pg/mL (6.52~15.29 pg/mL) vs. 557.74 pg/mL (174.41~1 208.24 pg/mL), $P < 0.01$]。

2.4 EV71 病毒阳性与炎症因子表达

26 例重症手足口病患儿中, EV71 病毒核酸的阳性患儿急性期脑脊液 IL-8 浓度要高于 EV71 阴性患儿的浓度, 而 EV71 阳性患儿血清 IL-8 浓度则低于 EV71 阴性患儿的浓度, 差异有统计学意义 ($P <$

0.01, 图 1)。

3 讨论

手足口病危重症甚至可出现死亡^[9]。重症进展迅猛, 但其早期症状隐匿, 容易延误诊治, 当疾病进入第 II 期, 及时采取各种治疗措施阻断疾病进一步进展尤为重要, 故早期识别重症病例、及时进行脑脊液检查尤为重要。机体受病毒感染后, 免疫功能的紊乱是重症手足口病的病因之一, 细胞因子的激活及其在发病机制中的作用很早就受到重视, 同时手足口病病情的进展是多个细胞因子共同参与、相互作用的结果, 需要联合多个预测因子提高诊疗的准确性。本研究同时检测血清和脑脊液的细胞因子的表达, 更全面地了解细胞因子在疾病发展中

表 2 各组脑脊液 2 种细胞因子的比较 [pg/mL, $M(Q_{25} \sim Q_{75})$]

细胞因子	对照组 (n=26)	重症组急性期 (n=26)	重症组恢复期 (n=26)	P 值
IL-8	55.35(31.97~133.03)	557.74(174.41~1 208.24)*	62.93(45.60~95.25)#	<0.01
IP-10	68.00(15.89~213.88)	1 758.11(1022.26~5107.58)*	199.02(173.93~355.74)#	<0.01

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与急性期比较, # $P < 0.01$ 。

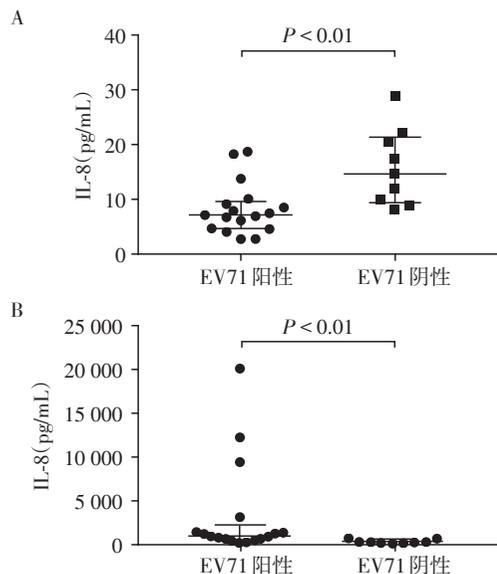


图1 手足口病重症组患儿EV71检出结果与外周血(A)及脑脊液(B)炎症因子IL-8表达差异

的作用。

本组中血清IL-12P40、IL-15浓度在重症病例组中较对照组显著升高,与以往研究结果相同^[10],同时其在重症病例组中的表达较普通组也显著升高,提示与病情轻重有关,对预测重症病例有一定的意义。

IL-8、IP-10是本研究的重点。IL-8是由巨噬细胞和其他细胞类型,如上皮细胞和内皮细胞产生的一种中性粒细胞趋化因子,其对白细胞特别是脑组织的中性粒细胞有特异性的、强烈的趋化和激活作用,另一方面还可改变血管通透性^[11]。IP-10也具有强大的趋化炎性细胞的能力,促进多种细胞因子的释放,疾病发生时IP-10的早期表达可以吸引聚集T淋巴细胞进入中枢神经系统,参与病毒的清除^[12]。Zhang等^[13]报道手足口病的极重症组(脑炎合并肺水肿)、轻症组(未合并脑炎)中血清IP-10浓度较对照组升高,极重症组和重症组中IL-8较对照组升高,但在轻症、重症和极重症组中差异均无统计学差异。李宏波等^[14]研究提示血清IL-8和IP-10在重症组(合并脑炎、重症合并脑炎和肺水肿)的表达较轻症组和对照组都有升高。而在另外一些研究中^[15],血清IL-8因子呈现出相反的趋势,手足口病组(包括重症和普通病例)的血清IL-8浓度低于正常对照组2倍。在本研究中普通手足口病患儿血清IL-8、IP-10的浓度较对照组有显著升高,提示这2种趋化因子也参与了手足口病的炎症反应,但是其在重症组表达却低于普通组,以IL-8(普通组中的数值变异度与以往研究相似^[13,16],考虑与疾病和检测方法有关)尤为明显,二者相差逾百倍,有别于既往的研

究。几项研究的结果不尽相同,考虑与样本的差异、采样的时间、分组的标准及检测手段等方面不一致有关,同时也提示了手足口病发病机制的复杂,细胞因子的表达受到多种因素的影响。国外学者也发现了这些结果的不一致,归结于细胞因子的功能冗余性^[18],本研究后续也从多个角度对重症组中血清IL-8下调进行探讨。

本研究同时比较了重症组和对照组脑脊液中IP-10、IL-8的表达水平,结果表明,重症组急性期中IL-8和IP-10的水平显著高于对照组,与文献报道一致^[16]。在临床实践中发现手足口病脑炎的脑脊液白细胞数通常都是升高的,只有脑脊液中的IP-10和IL-8水平与白细胞计数、中性粒细胞分类计数显著相关^[17],故可以证实IL-8、IP-10在手足口病合并脑炎的发病中起着举足轻重的作用。本研究所有重症患儿均予人免疫球蛋白治疗,重症组恢复期IL-8及IP-10的脑脊液浓度较急性期降低了约10倍,这一现象也与文献报道相符合^[16],提示人免疫球蛋白可抑制这2种趋化因子的表达。

本研究中重症患儿的急性期脑脊液IL-8浓度显著高于血清浓度,也是与既往研究相符的^[13]。结合本研究重症病例中血清IL-8表达较普通病例也有下降,推测其原因可能是IL-8引起血脑屏障通透性增加,IL-8通过某些转运机制或直接通过血脑屏障进入脑脊液,同时也趋化了大量白细胞的进入,引起了免疫损伤,但是该推测还需要进一步实验证实。

本研究比较了重症病例中EV71病毒与IL-8的关系,在EV71阳性的患儿中,急性期脑脊液IL-8表达高于EV71阴性的患儿,在血清中则呈现了相反的结果。在一项新加坡和马来西亚的研究中^[18],也有类似的发现,血清IL-8的表达在EV71感染的患儿中甚至低于正常对照组,考虑与病毒感染有关,因为同样的肠道病毒——脊髓灰质炎病毒可抑制IL-8的分泌^[19]。

综上,促炎因子IL-12P40、IL-15等在手足口病的发病及病情进展中发挥了重要作用,如果其值显著升高,需警惕重症可能。趋化因子IL-8、IP-10在手足口病脑炎的发病过程中十分重要,如遇到有神经系统累及,而血清IL-8升高不明显,特别是EV71感染的患儿,应警惕为重症病例,需及时进行脑脊液检查。当然如果要明确血清IL-8的预测价值,未来需要更大样本的研究来证实。

[参考文献]

[1] ZHAO Y Y, JIN H, ZHANG X F, et al. Case-fatality of

- hand, foot and mouth disease associated with EV71: A systematic review and meta-analysis [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(14): 1-9
- [2] VAN DSSM G, GERRIT K, HETTY V E, et al. Prediction of protection against Asian Enterovirus 71 outbreak strains by cross-neutralizing capacity of serum from dutch donors, The Netherlands [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(9): 1562-1569
- [3] 郭青青, 冉飞, 钟龙青, 等. 肠道病毒71型感染手足口病患儿童白细胞介素-21水平变化及其作用机制[J]. *中华传染病杂志*, 2018, 36(3): 176-178
- [4] 李梅, 李亚萍, 邓慧玲, 等. EV71感染手足口病严重程度与IL-6、IL-1 β 基因多态性的相关性研究[J]. *中国儿童保健杂志*, 2018, 26(11): 1228-1232
- [5] 孙春艳, 徐书珍, 张定荣, 等. 手足口病患儿童早期抗炎-促炎机制及免疫功能变化的研究[J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2014, 10(5): 658-661
- [6] HAN J, WANG Y, GAN X, et al. Serum cytokine profiles of children with human enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease [J]. *J Med Virol*, 2014, 86(8): 1377-1385
- [7] LEE J Y, SON M, KANG J H, et al. Serum interleukin-6 levels as an indicator of aseptic meningitis among children with enterovirus 71-induced hand, foot and mouth disease [J]. *Postgrad Med*, 2018, 130(2): 258-263
- [8] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2013年版)[S]. 2013: 1-5
- [9] 李鹏, 葛森, 王聪霞, 等. 2008—2014年中国大陆手足口病的时空变化规律[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(3): 380-385
- [10] JABRI B, ABADIE V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15: 771-783
- [11] WANG W, LI W, YANG X, et al. Interleukin-8 is elevated in severe hand, foot, and mouth disease [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2014, 8(1): 94-100
- [12] 周萍, 刘正霞. 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[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(6): 865-869
- [13] 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
- [14] 李宏波, 吴志刚, 徐爱芳. 重症手足口病患儿童外周血炎症细胞因子表达与临床意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 19: 4371-4374
- [15] ZENG M, ZHENG X Y, WEI R C, et al. The cytokine and chemokine profiles in patients with hand, foot and mouth disease of different severities in Shanghai, China, 2010 [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(12): e2599
- [16] JINLING L, SHUXIAN L, CHUNYAN C, et al. Cerebrospinal fluid chemokine patterns in children with enterovirus 71-related encephalitis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1658
- [17] YE N, GONG X, PANG L L, et al. Cytokine responses and correlations thereof with clinical profiles in children with enterovirus 71 infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 225
- [18] TEO F M S, NYO M, WONG A A, et al. Cytokine and chemokine profiling in patients with hand, foot and mouth disease in Singapore and Malaysia [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4087
- [19] DODD DA, GIDDINGS T H, JR KIRKEGAARD K, et al. Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection [J]. *J Virol*, 2001, 75(17): 8158-8165

[收稿日期] 2019-01-17