

EV71 脑炎患儿血清和脑脊液血管内皮细胞生长因子和血管细胞粘附分子-1 检测的意义

王海萍, 陈秀丽, 李光乾, 周朱瑛

杭州市儿童医院, 浙江 杭州 310014

摘要: **目的** 探讨 EV71 脑炎患儿血清和脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)水平的变化及其临床意义。

方法 根据临床表现将患儿分为普通病例组、重症病例组(再分为重型组和危重型组)。并设立对照组。应用双抗体夹心 ELISA 法检测各组患儿血清和 CSF 中 VEGF 和可溶性血管细胞粘附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)的水平。

结果 普通病例组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平与对照组差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。重症病例组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平均显著高于普通病例组和对照组, 差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。危重型组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平均显著高于重型组, 差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 且二组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平均显著高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。重症病例组急性期血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 含量均显著高于恢复期和对照组, 差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。重症病例组血清与 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 均呈正相关($r=0.587, 0.648$, 均 $P<0.01$); 普通病例组、对照组血清与 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 均无相关性。

结论 VEGF、VCAM-1 可能参与 EV71 脑炎的发病机制, 对 EV71 脑炎的病情严重性评估及预后判断有一定意义。

关键词: EV71 脑炎; 血管内皮细胞生长因子; 血管细胞粘附分子-1; 儿童

中图分类号: R512.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)03-0287-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.03.009

Significance of detection of vascular endothelial growth factor and vascular cell adhesion molecule-1 in serum and cerebrospinal fluid of children with EV71 encephalitis

WANG Hai-ping, CHEN Xiu-li, LI Guang-qian, ZHOU Zhu-ying

Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

Corresponding author: LI Guang-qian, E-mail: lgqwz@aliyun.com

Abstract: **Objective** To explore the changes of vascular endothelial growth factor(VEGF) and vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) in serum and cerebrospinal fluid(CSF) and their clinical values in children with EV71 encephalitis. **Methods**

According to the clinical manifestations, children patients were divided into ordinary case group and severe case group (which were subdivided into heavy type group and critical type group). A control group was set. The concentrations of VEGF and sVCAM-1 in serum and CSF of each patient of each group were detected by double antibody sandwich ELISA method. **Results** The levels of

VEGF and sVCAM-1 in serum and CSF were not significantly different between the ordinary case group and control group (both $P>0.05$), but significantly higher in the severe case group than the ordinary case group and control group (all $P<0.01$), in the critical type group than the heavy type group ($P<0.01$ or $P<0.05$), in the critical type group and heavy type group than the control group ($P<0.01$ or $P<0.05$), as well as in the acute phase of severe case group than in the recovery phase and than the control group (all $P<0.01$). Serum and CSF VEGF, sVCAM-1 were positively correlated in the severe case group ($r=0.587, r=0.648$, both $P<0.01$), while there were not significant correlations in the ordinary case group and control group. **Conclusions** VEGF and VCAM-1 may participate in the pathogenesis of EV71 encephalitis. Detection of the two parameters may be helpful to evaluating the severity and prognosis of EV71 encephalitis.

Key words: EV71 encephalitis; vascular endothelial growth factor (VEGF); vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1); children

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2011KYA130); 杭州市科技发展计划项目(20110833B18)

作者简介:王海萍(1979-), 硕士, 主治医师, 研究方向: 小儿神经系统疾病。

通信作者:李光乾, E-mail: lgqwz@aliyun.com。

重症手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)多系肠道病毒 71 型(EV71)感染所致,可引发神经源性肺水肿、肺出血,进而发展为以呼吸衰竭为主的全身多脏器功能障碍综合征,病死率极高^[1-2]。但目前其发病机制尚不明确。近年来的研究发现,病毒性脑炎发病的一个主要机制是血管内皮细胞的损伤,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对血管内皮细胞具有特异性,血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)主要在血管内皮细胞表达。为探讨 VEGF、VCAM-1 与 EV71 脑炎发病的关系以及其对 EV71 脑炎病情严重性及预后判断的价值,本研究应用 ELISA 方法检测了 EV71 脑炎患儿血清和脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中 VEGF、VCAM-1 的水平,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 临床病例来源与分组

1.1.1 临床病例来源 所有病例来自于 2012 年 3 月-2013 年 10 月在杭州市儿童医院住院的手足口病患儿,共 70 例,且病原学检测结果确定为 EV71 感染。确诊 EV71 感染的病原学检测方法(至少有一项检测结果为阳性):①采集肛拭子或咽拭子标本经 RT-PCR 检测结果为 EV71 核酸阳性(检测试剂由杭州新景生物试剂开发有限公司提供,生产批号 20130509);②急性期血清或 CSF 标本经 ELISA 法检测结果为 EV71 glum 阳性(检测试剂盒由北京万泰生物药业股份有限公司提供,生产批号 EI20130503)。确诊 EV71 感染的病原学检测由本院检验科人员完成。选择儿外科同期住院的非神经系统疾病手术患儿作为对照组。

1.1.2 临床病例分组 参照国家卫生部公开发布的《手足口病诊疗指南(2010 年版)》^[3]及《肠道病毒 71 型(EV71)感染重症病例临床救治专家共识(2011 年版)》^[4]诊断标准,将手足口病患儿分为 EV71 感染普通病例组和 EV71 感染重症病例组,其中 EV71 感染重症病例组又分为重型组和危重型组。①EV71 感染普通病例组:24 例,男 13 例,女 11 例,年龄(1.9±1.1)岁,平均病程 8 d(7~10 d);其中 8 例患儿有惊跳,2 例患儿有肢体抖动,3 例患儿有惊厥,3 例患儿有呕吐。选择入院时疑为手足口病并发中枢神经系统损害,经 CSF 常规、生化检查无异常,脑电图以及影像学检查正常,排除了中枢神经系统损害的手足口病普通病例。②EV71 感染重症病例组:46 例,男 30 例,女 16 例,年龄(2.8±1.7)岁,平均病程 12 d(6~15 d)。其中重型组 31 例,男 21 例,女 10 例,年龄(3.0±2.0)岁;31 例

中 18 例患儿有惊跳,16 例患儿有肢体抖动,1 例患儿有嗜睡,1 例患儿有惊厥,16 例患儿有呕吐。危重型组 15 例,男 9 例,女 6 例,年龄(2.5±1.1)岁;其中 11 例患儿有惊跳,12 例患儿有肢体抖动,11 例患儿有嗜睡,1 例患儿有惊厥,9 例患儿有呕吐。③对照组:21 例,男 11 例,女 10 例,年龄(2.3±0.9)岁。各组患儿在入院时性别、年龄、病程对比,差异无统计学意义。

1.2 标本的采集与测定方法 各组病例于入院 24 h 内抽取静脉血 3~4 ml 和 CSF 2 ml(对照组于手术当日行腰麻时抽取 CSF),CSF 标本另送检常规、生化及细菌培养(对照组只做 CSF 常规和生化)。重症病例组患儿于 10~14 d 进行了第 2 次静脉血和 CSF 采集,每一相对应的静脉血和 CSF 标本的采集时间相差不超过 1 d;将静脉血低温离心取上清液,将血清及 CSF 置于 EP 管中存于-70℃冰箱中待检。剔除溶血标本。采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清及 CSF 中 VEGF 及 VCAM-1 的含量,检测试剂均购自美国 eBioscience 公司(VEGF 批号 83403011;VCAM-1 批号 XY-1362)。操作由专业人员严格按药盒说明书进行。

1.3 统计学方法 所有数据均采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)对多组数据进行统计学分析,组间两两比较采用 LSD 法进行;采用 spearman 检验分析数据的相关性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重症病例组、普通病例组、对照组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 的含量比较 各组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平比较显示,重症病例组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平均显著高于普通病例组和对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);普通病例组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平与对照组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 重症病例组、普通病例组、对照组血清和脑脊液中 VEGF、sVCAM-1 的含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清		脑脊液	
		VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)	VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)
重症病例组	46	745.22±169.17 ^a	2 055.68±348.64 ^a	86.83±15.16 ^a	185.24±34.94 ^a
普通病例组	24	481.70±129.64 ^{bc}	1 613.35±267.65 ^{bc}	57.05±15.17 ^{bc}	155.48±33.68 ^{bc}
对照组	21	475.63±116.70	1 591.06±273.51	56.45±15.02	156.38±28.93

续表 1

组别	n	血清		脑脊液	
		VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)	VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)
F 值		37.26	24.394	46.307	9.061
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,a P <0.01, b P >0.05;与重症病例组比较,c P <0.01。

2.2 重型组、危重型组、对照组血清和脑脊液中 VEGF、sVCAM-1 的含量比较 各组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平比较显示,危重型组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平均显著高于重型组,差异有统计学意义(均 P <0.01 或 P <0.05);危重型组和重型组二组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义(P <0.01 或 P <0.05)。见表 2。

表 2 重型组、危重型组、对照组血清和脑脊液中 VEGF、sVCAM-1 的含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血清		脑脊液	
		VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)	VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)
重型组	31	712.37±168.80 ^{ac}	1 983.49±346.90 ^{ac}	82.18±13.02 ^{ad}	178.11±32.33 ^{bc}
危重型组	15	807.06±156.29 ^a	2 191.58±318.51 ^a	95.60±15.38 ^a	198.65±36.66 ^a
对照组	21	475.63±116.70	1 591.06±273.51	56.45±15.02	156.38±28.93
F 值		25.298	17.870	38.499	8.025
P 值		0.000	0.000	0.000	0.001

注:与对照组比,a P <0.01, b P <0.05;与中枢神经功能障碍组比,c P <0.05, d P <0.01。

2.3 重症病例组急性期、恢复期与对照组血清和脑脊液中 VEGF、sVCAM-1 的含量比较 重症病例组急性期血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 含量均显著高于恢复期和对照组,差异有统计学意义(均 P <0.01),但恢复期血清和 VEGF、sVCAM-1 含量稍高于对照组,但差异无统计学意义(均 P >0.05)。见表 3。

表 3 重症病例组急性期、恢复期与对照组血清和脑脊液中 VEGF、sVCAM-1 的含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血清		脑脊液	
		VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)	VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)
重症病例组急性期	32	745.22±169.17 ^{ac}	2 055.68±348.64 ^{ac}	86.83±15.16 ^{ac}	185.24±34.94 ^{ac}
重症病例组恢复期	32	457.36±140.55 ^b	1 554.94±360.24 ^b	54.77±12.15 ^b	138.84±37.26 ^b

续表 3

组别	n	血清		脑脊液	
		VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)	VEGF(pg/ml)	sVCAM-1(ng/ml)
对照组	21	475.63±116.70	1 591.06±273.51	56.45±15.02	156.38±28.93
F 值		51.491	29.672	73.701	21.770
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比,a P <0.01, b P >0.05;与恢复期比,c P <0.01。

2.4 重症病例组、普通病例组和对照组血清与脑脊液中 VEGF、sVCAM-1 的相关性分析 重症病例组血清与 CSF 中 sVCAM-1 呈正相关($r=0.648, P<0.01$),普通病例组、对照组血清与 CSF sVCAM-1 无相关性;重症病例组血清与 CSF 中 VEGF 呈正相关($r=0.587, P<0.01$),普通病例组、对照组血清与 CSF VEGF 无相关性;各组血清、CSF 中 sVCAM-1 与 VEGF 均无相关性。

3 讨论

HFMD 的最常见致病原为柯萨奇病毒 A 组 16 型病毒(CA16)和 EV71^[1]。EV71 感染病例常并发中枢神经系统(CNS)损伤,特别是脑干脑炎等,病情进展迅速、病死率高^[5]。因此,在诊疗 HFMD 时,应密切注意患儿有无 CNS 并发症;且早期诊断及正确评估脑损伤的严重程度十分重要。同时了解 EV71 感染患儿脑损伤的机制,可为指导临床诊治及预后评估提供依据。

血管内皮细胞损伤是病毒性脑炎发病的一个主要机制。病毒感染时血源性炎症细胞必须经过血脑屏障(BBB)后才能到达脑组织。VEGF 是血管内皮细胞的特异性肝素结合生长因子,有较强的促进血管内皮细胞分裂并增殖的作用。研究表明,VEGF 与受体结合后可表现出明显的血管腔化和增加血管的通透性作用,是目前已知的增加血管通透性最强物质之一^[6]。VCAM-1 是免疫球蛋白的一种,主要能够在血管的内皮细胞内表达;一般来说,非活化内皮细胞有低至正常的 VCAM-1 表达,当受到细胞因子(如 IL-1、TNF- α 、IL-13)和细胞外基质分子的诱导时 VCAM-1 表达增强^[7]。颅内感染的早期,病毒引发宿主的炎症反应,炎症细胞和血小板等除产生 VEGF^[8]外,还释放多种细胞因子,如 TNF、IL-1、血小板活化生长因子等。一方面这些细胞因子通过增强 VEGF 的生成及表达引起血管通透性增高;另一方面 VEGF 与这些细胞因子的复杂相互作用促发、促进机体的炎症反应。脑缺血再灌注后 VCAM-1 表达增高,使白细胞与血管内皮细胞间的黏附增强;Silva NM 等^[9]研究发现,在 C57BL/6

小鼠弓形虫脑炎的严重程度与脑组织较高 VCAM-1、ALCAM 的表达和 BBB 通透性增加有关。所以 VEGF 与 VCAM-1 的变化能够说明血管内皮细胞的情况,从而间接的反映脑炎的严重程度,可以应用于临床的检查。

本研究结果显示,重症病例组血清和 CSF 中 VEGF、sVCAM-1 水平均显著高于普通病例组和对照组,而且与疾病的严重性相关,表明 VEGF、VCAM-1 在 EV71 脑炎发病中起重要作用。本研究同时显示,重症病例危重型组患儿血清和 CSF 中 VEGF、VCAM-1 水平也明显高于重症病例重组,且重症病例组恢复期血清和 CSF 中 VEGF 及 VCAM-1 的水平明显下降,提示这两个指标在一定程度上反映了疾病的严重程度及预后。杨风华等^[10]的研究显示,病脑 CSF 中 VEGF 与 VCAM-1 水平有明显相关性,提示 VEGF 和 VCAM-1 可能共同参与病脑的发病过程。但本研究结果未显示血清和 CSF 中 VEGF 与 VCAM-1 有明显相关性,这提示 VEGF 和 VCAM-1 在参与 EV71 脑炎的发病过程中,不一定与普通病脑的发病过程等同;也可能是标本检测数不够多,需多中心大样本检测。因此,为更好地阐明 VEGF 及 VCAM-1 在 EV71 脑炎血管发病机制中的作用,尚需继续扩大样本数量及临床、影像学、脑电图等的对照分析研究。

参考文献

[1] 刘艳芹,庞保东,田庆玲,等. 青岛市 2010-2011 年手足口病重症

病例临床特征分析[J]. 现代预防医学,2014,41(6):1010-1014.

- [2] Edmond M, Wong C, Chuang SK. Evaluation of sentinel surveillance system for monitoring hand, foot and mouth disease in Hong Kong[J]. Public Health, 2011, 125(11):777-783.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 年版)[J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(24):1473-1475.
- [4] 卫生部手足口病临床专家组. 肠道病毒 71 型(EV71)感染重症病例临床救治专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(9):675-678.
- [5] 姜琴, 刘兴莉, 曾冬生, 等. 肠道病毒 71 型脑炎神经元特异性烯醇化酶 S-100 β 变化及其临床意义分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2012, 27(8):612-614.
- [6] 林建生, 彭维林, 潘万贵, 等. 手足口病合并脑炎患儿病情进展危险因素的分析及患儿血清、脑脊液中 VEGF 和 VCAM-1 的水平测定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(9):666-672.
- [7] Wang L, Shirure VS, Burdick MM, et al. UVB-irradiation regulates VLA-4-mediated melanoma cell adhesion to endothelial VCAM-1 under flow conditions [J]. Mol Carcinog, 2011, 50(1):58-65.
- [8] 江毅卿, 周灵芳, 李卫玲, 等. 血管内皮细胞生长因子基因多态性与病毒性脑膜炎易感性关系[J]. 中国预防医学杂志, 2012, 13(4):271-274.
- [9] Silva NM, Manzan RM, Carneiro WP, et al. Toxoplasma gondii; the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability [J]. Exp Parasitol, 2010, 126(2):167-177.
- [10] 杨风华, 王华, 张俊梅, 等. 病毒性脑炎患儿脑脊液中 VEGF、VCAM-1 变化及其意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3):285-289.

收稿日期:2016-08-27

(接 279 页)

也是 HACCP 思想在家庭食品安全方面的运用,即鉴别、评价和控制对食品安全至关重要的危害。当然,由于个人生活及家庭的独立性和自主性,研究者仅是对家庭食品制作过程中存在更高食品安全风险的环节进行鉴别和评价。要想真正控制家庭食品安全风险,还需要更多的健康促进和健康教育手段,需要社会、政府及个人的共同关注和努力。

参考文献

- [1] The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published [J]. Euro Surveill, 2013, 18(15):20449.
- [2] 崔燕, 梁效成. 2011-2013 年甘肃省食源性疾病暴发事件分析[J]. 疾病预防控制通报, 2015, 30(1):76-78.
- [3] 朱小波, 田美娜, 陈磊, 等. 2009-2011 年河北省食源性疾病暴发特点分析及控制策略[J]. 医学动物防制, 2014, 30(7):763-766.
- [4] Redmond EC, Griffith CJ. The importance of hygiene in the domestic kitchen: implications for preparation and storage of food and infant formula[J]. Perspect Public Health, 2009, 129(2):69-76.

- [5] Cody MM, Hogue MA. Results of the home food safety-It's in Your Hands 2002 survey: comparisons to the 1999 benchmark survey and Health People 2010 food safety behaviors objective[J]. J Am Diet Assoc, 2003, 103(9):1115-1125.
- [6] 毛雪丹. 2003-2008 年中国细菌性食源性疾病流行病学特征及疾病负担研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 流行病与卫生统计学, 2010:26.
- [7] US Department of Health and Human Services. Keep food safe [EB/OL]. (2016-04-01) [2016-08-01]. <http://www.foodsafety.gov/keep/index.html>.
- [8] Redmond EC, Griffith CJ. The importance of hygiene in the domestic kitchen: implications for preparation and storage of food and infant formula[J]. Perspect Public Health, 2009, 129(2):69-76.
- [9] Henley SC, Stein SE, Quinlan JJ. Identification of unique food handling practices that could represent food safety risks for minority consumers[J]. J Food Prot, 2012, 75(11):2050-2054.
- [10] 郭生豫, 胡瑞芳, 冯伟, 等. HACCP 应用于高校食堂卫生管理的探讨[J]. 实用预防医学, 2013, 20(9):1097-1099.

收稿日期:2016-10-21