

CoxA16 感染手足口病患儿免疫球蛋白, T 细胞亚群变化的研究

乔国昱¹, 何亚萍², 杜潘艳², 张国栋¹, 吴丽丽¹, 王振荣²

(1.唐山市协和医院检验科, 河北唐山 063000; 2.唐山市妇幼保健院检验科, 河北唐山 063000)

摘要: **目的** 检测CoxA16感染手足口病患儿血清免疫球蛋白、外周血T细胞亚群的变化, 探讨CoxA16引起手足口病的免疫学致病机制。**方法** 采用实时荧光PCR检测2013年5月~2014年5月咽拭子标本为CoxA16阳性患儿78例。按疾病严重程度分为重症病例组和普通病例组, 另选40例健康体检儿童为健康对照组。采用免疫比浊法检测血清IgM、IgA、IgG; 流式细胞仪测定T细胞亚群, 对检测结果进行比较。**结果** 重症病例组患儿血清IgM、IgA较普通病例组和健康对照组减少, 差异有统计学意义 ($t_{\text{IgM}}=3.614, 4.127$; $t_{\text{IgA}}=3.152, 3.873, P<0.05$), 普通病例组IgG含量高于重症病例组和健康对照组, 差异有统计学意义 ($t_{\text{IgG}}=2.951, 3.236, P<0.05$); 与普通病例组和健康正常对照组比较, 重症病例组T细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比例降低, CD8⁺比例升高, 差异有统计学意义 ($t_{\text{CD3}^+}=3.314, 4.247$; $t_{\text{CD4}^+}=3.124, 4.043$; $t_{\text{CD4}^+/\text{CD8}^+}=3.251, 3.867$; $t_{\text{CD8}^+}=3.326, 3.915, P<0.05$)。

结论 CoxA16病毒感染后, 患儿机体体液免疫受抑制, 细胞免疫功能降低, 可能与其致病机制有关。

关键词: 手足口病, 免疫球蛋白, T细胞亚群, CoxA16

Changes of serum immunoglobulins and peripheral blood T lymphocyte subsets in children with hand-foot-mouth disease caused by CoxA16

QIAO Guo-yu*, HE Ya-ping, DU Pan-yan, ZHANG Guo-dong, WU Li-li, WANG Zhen-rong

Department of Clinical Laboratory, Xiehe Hospital of Tangshan City, Tangshan, Hebei 063000, China

Abstract: Objective To investigate the immunological pathogenic mechanisms of Coxsackievirus A16 (CoxA16) by measuring the changes of serum immunoglobulins and peripheral blood T lymphocyte subsets in children with hand-foot-mouth disease (HFMD) caused by CoxA16. **Methods** Seventy-eight children with positive results in the detection of CoxA16 in throat swabs by real-time fluorescent PCR were recruited from May 2013 to May 2014. They were divided into severe case group and ordinary case group according to the severity of the disease, with 40 healthy children receiving physical examination in the same hospital during the same period serving as controls. Immunoglobulins were measured by immunoturbidimetry, and T lymphocyte subsets were detected by flow cytometry. **Results** Serum IgM and IgA in the children in the severe case group decreased remarkably when compared with those in the ordinary case group and the control group ($t_{\text{IgM}}=3.614, 4.127$; $t_{\text{IgA}}=3.152, 3.873$, all $P<0.05$).

However, IgG in the ordinary case group was significantly higher than that in the severe case group and the control group ($t_{\text{IgG}}=2.951, 3.236$, both $P<0.05$). The rates of T lymphocyte subsets CD^{3+} , CD^{4+} and $\text{CD}^{4+}/\text{CD}^{8+}$ in the severe case group were significantly lower than in the ordinary case group and the control group ($t_{\text{CD}^{3+}}=3.314, 4.247$; $t_{\text{CD}^{4+}}=3.124, 4.043$; $t_{\text{CD}^{4+}/\text{CD}^{8+}}=3.251, 3.867$; all $P<0.05$), while CD^{8+} was higher ($t_{\text{CD}^{8+}}=3.326, 3.915$, both $P<0.05$). **Conclusions** Cellular immunity and humoral immunity are inhibited in children infected with HFMD caused by CoxA16, which might be related to its pathogenic mechanism.

Key words: Hand-foot-mouth disease (HFMD); Coxsackievirus A16(CoxA16); Immunoglobulin; T lymphocyte subset

手足口病是一种以手、足皮肤水泡样皮疹和口腔黏膜溃疡性疱疹为主要症状的急性传染病，主要病原体为柯萨奇病毒A组16型（CoxA16）和肠道病毒71型（EV71）^{〔1〕}。对手足口病流行的研究表明，EV71感染率高于CoxA16,但CoxA16感染率也处于较高水平^{〔2〕}。目前认为，机体感染手足口病后的发病机理和免疫学机制尚不十分清楚。本研究通过测定CoxA16感染手足口病患儿血清中免疫球蛋白IgM、IgA、IgG的含量，外周血T细胞亚群水平变化，探讨CoxA16感染手足口病可能的致病机制，为临床治疗提供有价值的依据。

1 资料与方法

1.1研究对象 选取2013年5月-2014年5月在唐山市协和医院住院经PCR检测咽拭子CoxA16阳性患儿78例，根据卫生部公布的《手足口病诊治方案》2010版^{〔3〕}诊断标准，分为重症病例组（37例，其中男18例，女19例），普通病例组（41例，其中男21例，女20例），年龄0.7-9岁，平均年龄（ 3.11 ± 1.34 ）岁。另选同期健康体检儿童40例为正常对照组(男、女各20例)，年龄1-10岁，平均年龄（ 3.62 ± 1.47 ）岁。

1.2试剂和仪器 SLAN实时荧光RT-PCR扩增仪（上海宏石医疗器械有限公司，试剂购自中山大学达安基因股份有限公司；DXC-800全自动生化分析仪及配套试剂（美国贝克曼库尔特公司）；EPICS XL流式细胞仪及配套试剂（美国贝克曼库尔特公司）。

1.3 方法 真空管采集空腹静脉血 3ml，3000r/min 离心 10min，分离血清,另采集 EDTA-K₂ 抗凝血 1ml。去除黄疸、溶血、乳糜血标本。用 DXC-800 全自动生化分析仪检测血清免疫球蛋白，EPICS XL 流式细胞仪检测外周血 T 细胞亚群，并于检测前、中期放置质控品，以保证检测结果的准确性。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件计算各组数据的均值和标准差，以（ $\bar{x} \pm S$ ）表示。各组

间均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 t 检验， $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CoxA16 感染手足口病患儿血清免疫球蛋白含量测定结果 与普通组、健康对照组比较，重症组血清 IgM、IgA 减少，差异有统计学意义 ($t_{\text{IgM}}=3.614, 4.127$; $t_{\text{IgA}}=3.152, 3.873, P<0.05$); 普通组血清 IgG 高于重症组，差异有统计学意义 ($t_{\text{IgG}}=2.951, P<0.05$)，普通组 IgG 含量高于健康对照组，差异有统计学意义 ($t_{\text{IgG}}=3.236, P<0.05$)，见表 1。

三组免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 结果比较 (g/l, $\bar{x} \pm S$)

组别	n	IgG	IgA	IgM
重症组	37	9.08±3.81	0.38±0.23	1.09±0.38
普通组	41	11.02±4.25 ^a	0.61±0.28 ^a	1.21±0.41 ^a
对照组	40	8.63±3.64 ^c	0.63±0.24 ^b	1.23±0.37 ^b
<i>F</i>		4.235	4.157	3.983
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注：重症组与普通组比较，^a $p<0.05$ ；重症组与对照组比较，^b $p<0.05$ ；普通组与对照组比，^c $p<0.05$ 较。

2.2 CoxA16 感染手足口病患儿外周血 T 淋巴细胞亚群测定结果 与普通组和健康对照组比较，重症组外周血 T 细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比例减低，差异有统计学意义 ($t_{\text{CD3}^+}=3.314, 4.247$; $t_{\text{CD4}^+}=3.124, 4.043$; $t_{\text{CD4}^+/\text{CD8}^+}=3.251, 3.867, P<0.05$); CD8⁺比例增高，差异有统计学意义($t_{\text{CD8}^+}=3.326, 3.915, P<0.05$)。普通组与对照组比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

三组 T 淋巴细胞亚群表达阳性细胞比较 (%， $\bar{x} \pm S$)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
重症组	37	35.67±13.32	22.92±8.96	19.05±9.14	1.03±0.37
普通组	41	46.71±14.29 ^a	30.27±9.22 ^a	15.11±9.06 ^a	1.28±0.41 ^a
对照组	40	48.34±13.94 ^b	31.01±9.13 ^b	14.83±8.97 ^b	1.29±0.38 ^b
<i>F</i>		5.695	6.132	5.168	3.288
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：重症组与普通组比较，^a $p<0.05$ ；重症组与对照组比较，^b $p<0.05$ 。

3.讨论

手足口病是由肠道病毒引起的传染病，好发于5岁以下婴幼儿及儿童。多数患儿症状较轻，少数重症患儿可引起病毒性心肌炎、脑膜脑炎^[4]，严重者可造成神经元性肺水肿^[5]等致命

性并发症。目前，国内外学者从不同角度对手足口病进行了研究，但对其发病机制和致病机理都没有得出一个明确的结论。我们通过观察患儿机体免疫球蛋白、T细胞亚群的变化，来探讨手足口病患儿机体的体液免疫、细胞免疫情况，以及手足口病的发病机制。

免疫球蛋白是化学结构与抗体相似或具有抗体活性的球蛋白，是介导体液免疫应答的重要效应分子。IgM是机体发育中合成和分泌最早的免疫球蛋白，结合抗原能力强，免疫调理、激活补体及凝聚作用也明显高于其它免疫球蛋白。IgA在机体含量较低，在病毒感染时起到吞噬调理、中和毒素等多种生物学效应。研究表明，血清IgA含量越低，预示病情越严重^[6]。IgG主要由脾、淋巴结中的浆细胞合成，半衰期最长、含量最高的免疫球蛋白，可与中性粒细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞等细胞表面的FcR受体结合，发挥抗体依赖细胞介导的细胞毒作用（ADCC）和调理吞噬作用。免疫球蛋白的基因可进行“二次重排”，经类别转换后的B细胞分化的浆细胞，可分泌IgG、IgA或IgE类抗体^[7]。由于免疫球蛋白的类别转换，使IgG产生晚于IgM，但在机体抗病毒感染、免疫防护中发挥重要作用。

我们的研究结果显示，CoxA16感染重症组患儿血清IgM、IgA与普通组和正常对照组比较明显减少，这与农少云等^[8]报道的结果相似。可能是由于IgM在初次体液免疫应答出现最早，半衰期短，血中含量在很短时期内消失。当手足口病发生时，CoxA16病毒对其抑制和进一步消耗。IgA的减少可能由于婴幼儿时期机体呼吸系统粘膜合成、分泌sIgA能力弱，预防感染能力降低。同时我们观察到普通组IgG含量明显高于重症组和健康对照组。究其原因，B细胞需经过类别转换成为浆细胞后才可分泌IgG，这就造成体液免疫应答时IgG产生晚于IgM，致使CoxA16感染后IgG受到抑制作用也相对较晚；而重症组患儿机体更要中和大量病毒，引起IgG大量消耗而低于普通组，表现为体液免疫功能紊乱，从而引起疾病的发生、发展。

研究表明，T淋巴细胞亚群在机体的细胞免疫方面发挥着重要的免疫调节和免疫作用。宿主的细胞免疫功能，尤其是CoxA16特异性的CD8⁺T细胞反应和CD4⁺T细胞反应对CoxA16病毒的清除和疾病的转归有着重要的影响。

CD3⁺代表外周血中成熟T细胞总数，与TCR $\alpha\beta$ 结合构成T细胞识别抗原和转导信号的单位，通过此转导信号单位使T细胞活化。CD4⁺T细胞为辅助性T细胞（helper T cell, Th），可促进B细胞产生免疫球蛋白，对控制病毒复制具有重要意义^[9]。CD8⁺细胞是细胞毒性T细胞（cytotoxic T cell, CTL或Tc）或抑制性T细胞Ts（suppressor T cell, Ts），可介导对靶细胞的细胞毒作用，抑制免疫应答的活化阶段^[7]。CD4⁺、CD8⁺细胞两者相互制约、相互诱导，组成T细胞网络，起着重要的调节作用。而CD4⁺/CD8⁺比值能很好的反应机体免疫系统的稳定性。小儿免疫功能不完善，受到细菌、病毒的感染时，T细胞亚群的数量、功能发生异常，导致

机体免疫紊乱,产生病理变化。本实验发现,手足口病重症组外周血CD3⁺、CD4⁺百分率及CD4⁺/CD8⁺比值较普通组和对照组减低,而CD8⁺百分率则高于普通组和对照组。此与刘虹^[10]的研究结果一致。这提示重症感染时,大量CoxA16病毒侵入机体,打破了T细胞亚群CD4⁺、CD8⁺间维持的平衡,破坏了人体免疫系统内环境的稳定,表现为CD4⁺/CD8⁺比值降低,机体免疫功能随之降低^[11]。

综上所述, CoxA16感染时,出现CD4⁺比例减少,致使Th₁/Th₂细胞失衡,向Th₂方向漂移,进而使生成Th₁细胞数量减少,从而使其减弱了诱导B细胞的增殖、分化,减少合成Ig; Th₂细胞数量增多, CD8⁺细胞比例升高,产生的抑制性免疫应答作用增强,拮抗了CD4⁺细胞介导的免疫应答,造成CoxA16病毒复制增强。同时CD8⁺CTL活性增强,参与识别并杀伤被CoxA16病毒感染的靶细胞。由此可见, CoxA16病毒感染后,患儿体液免疫应答受抑制,细胞免疫功能降低,可能与其致病机制和免疫学损伤有关。

参考文献:

- [1]Puenpa J, Theamboonlers A, Korkong S, et al. Molecular characterization and complete genome analysis of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 from children with hand, foot and mouth disease in Thailand during 2008-2011[J]. Arch Virol, 2011, 156: 2007-2013.
- [2]刘业英, 田斌, 叶文, 等. 314例手足口病患者病原体检测结果报告[J]. 实用预防医学, 2010, 17(8): 1666-1667.
- [3]中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010年版)[OL]. [2012-04-16]. <http://www.moh.gov.cn/mohyzs/s3586/201004/46884.shtml>.
- [4] Oberste MS, Peñaranda S, Maher K, et al. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 6): 1597-1607.
- [5]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.
- [6]Ruggeri FM, Johansen K, Basile G, et al. Antirotavirus immunoglobulin A neutralizes virus in vitro after transcytosis through epithelial cell and protects infant mice from diarrhea[J]. J Virol. 1998, 72(4): 2708-2714.
- [7]吕世静. 临床免疫学检验[M]. 1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 22-23.
- [8]农少云, 梁娟英, 杨晓泉, 等. 手足口病患儿外周血T淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测的意义[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(11): 1287-1288.
- [9]冯鹰, 符林春, 张奉学. AIDS鼠模型最新免疫学进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2005, 33(2): 87-88.
- [10]刘虹, 王春妍. 手足口病患儿免疫功能临床分析[J]. 天津医科大学学报, 2009, 15(3): 503-504.
- [11]黄小琪. 反复呼吸道感染患儿T细胞亚群及免疫球蛋白的研究[J]. 广西医学, 2007,

29(12):1896.

基金项目：河北省唐山市科技局计划指导项目（编号111302074b）

作者简介：乔国昱（1973-），男，硕士研究生，副主任技师，主要从事分子生物学及血液学
检验

Tel: 18032552212

E-mail: qiaoguoyu1973@sina.com

