

论著·临床研究

手足口病患儿外周血血管活性肠肽的表达

任劲松¹ 孙浩淼¹ 张雷² 林敬德² 文成³ 方代华⁴

(1. 徐州市儿童医院感染性疾病科, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州市疾病预防控制中心, 江苏 徐州 221000; 3. 徐州市儿童医院科教科, 江苏 徐州 221002; 4. 徐州市儿童医院检验科, 江苏 徐州 221002)

[摘要] **目的** 初步探讨手足口病患儿外周血血管活性肠肽的表达水平和意义。**方法** 根据病情将86例手足口病患儿分为1期组(19例)和2期组(67例)。采用ELISA法检测外周血血浆中血管活性肠肽、 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)浓度。流式细胞术检测CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T淋巴细胞亚群。RT-PCR法定性检测大便肠道病毒71型(EV71)-RNA。**结果** 2期组EV71-RNA阳性率明显高于1期组($P<0.05$); 2期组血清IgG、IgA、IgM、补体C3水平高于1期组($P<0.05$); 2期组外周血CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T淋巴细胞亚群比例低于1期组($P<0.05$); 2期组外周血B细胞比例高于1期组($P<0.05$); 2期组CD4⁺/CD8⁺比值低于1期组($P<0.05$); 2期组外周血血管活性肠肽浓度低于1期组($P<0.05$)。86例手足口病患儿外周血血管活性肠肽浓度与CD4⁺T淋巴细胞亚群比例以及CD4⁺/CD8⁺比值呈正相关(分别 $r=0.533$ 、 0.532 , $P<0.05$)。**结论** 血管活性肠肽可能是反映手足口病严重程度的重要标记物。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(11): 1106-1110]

[关键词] 血管活性肠肽; 手足口病; T淋巴细胞亚群; 儿童

Expression of vasoactive intestinal peptide in peripheral blood of children with hand, foot and mouth disease

REN Jin-Song, SUN Hao-Miao, ZHANG Lei, LIN Jing-De, WEN Cheng, FANG Dai-Hua. Department of Infectious Disease, Xuzhou Children's Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (Email: wamhm@163.com)

Abstract: Objective To investigate the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) in peripheral blood of children with hand, foot and mouth disease and its significance. **Methods** According to the condition of the disease, 86 children with hand, foot and mouth disease were classified into phase 1 group (19 children) and phase 2 group (67 children). ELISA was used to measure the concentrations of plasma VIP, interferon- γ (IFN- γ), and interleukin-4 (IL-4) in peripheral blood. Flow cytometry was used to measure CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocyte subsets. RT-PCR was used for qualitative detection of enterovirus 71 (EV71) RNA in stool. **Results** Compared with the phase 1 group, the phase 2 group had a significantly higher positive rate of EV71-RNA ($P<0.05$) and significantly higher serum levels of IgG, IgA, IgM, and C3 ($P<0.05$). The phase 2 group had significantly lower proportions of peripheral CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocyte subsets than the phase 1 group ($P<0.05$), as well as significantly lower proportion of peripheral B cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio than the phase 1 group ($P<0.05$). The phase 2 group also had a significantly lower concentration of VIP in peripheral blood than the phase 1 group ($P<0.05$). In the 86 children with hand, foot and mouth disease, the concentration of VIP in peripheral blood was positively correlated with the proportion of CD4⁺ T lymphocyte subset and CD4⁺/CD8⁺ ratio ($r=0.533$ and 0.532 respectively; $P<0.05$). **Conclusions** VIP may be an important marker of the severity of hand, foot and mouth disease. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(11): 1106-1110]

Key words: Vasoactive intestinal peptide; Hand, foot and mouth disease; T lymphocyte subset; Child

[收稿日期] 2016-05-25; [接受日期] 2016-07-21

[基金项目] 江苏省卫生厅预防医学课题(Y2013013); 徐州市科技指导性计划项目(XZZD1367)。

[作者简介] 任劲松, 男, 硕士, 主治医师。

血管活性肠肽 (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) 由 28 个氨基酸残基组成, 是一种非肾上腺素能非胆碱能神经递质, 在中枢神经系统和周围神经系统均可表达。VIP 因其强烈的舒血管活性而得名, 能够通过扩张血管、改善心肺脑等器官循环而发挥保护脏器的作用^[1]。近年来, VIP 在炎症反应中的作用越来越受到重视。研究证实, 在感染性疾病、炎症性疾病等疾病发病过程中, 内源性 VIP 往往表达不足, 使得炎症反应加重、疾病恶化, 加入外源性 VIP 可以有效减轻炎症反应和组织损伤^[2-4]。免疫炎症反应被认为在手足口病发病中发挥着重要作用, 但 VIP 在手足口病中的作用尚未见报道。本研究通过对手足口病患儿外周血浆 VIP 表达水平的研究, 探讨 VIP 在手足口病中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

入选标准: (1) 2015 年 4~9 月确诊为手足口病在徐州市儿童医院住院治疗且既往无基础疾病的患儿; (2) 入院时在病程 3 d 以内; (3) 诊断标准符合《手足口病诊疗指南(2010年版)》(简称指南)和《肠道病毒 71 型(EV71)感染重症病例临床救治专家共识》(简称共识)^[5-6]; (4) 为排除年龄因素对机体免疫的影响, 入选患儿年龄均在 1~3 岁之间。同时排除合并其他疾病或近期有免疫调节剂使用史的患儿。

共纳入 86 例患儿, 其中男 52 例, 女 34 例, 年龄范围 1~3 岁, 平均年龄 2.1 ± 0.7 岁。根据临床分期分为 1 期组和 2 期组。1 期组 (19 例, 其中男 13 例, 女 6 例): 为《指南》所指的普通病例, 同时参照《共识》定义的第 1 期即手足口出疹期诊断标准。入组患儿均表现有不同程度的发热, 手、足、口、臀等部位有斑丘疹、丘疹或小疱疹。2 期组 (67 例, 其中男 39 例, 女 28 例): 为《指南》所指的重症重型病例, 同时参照《共识》定义的第 2 期即神经系统受累期诊断标准。患儿脑脊液检查均示 $WBC > 20 \times 10^6/L$, 脑脊液中葡萄糖、蛋白质、氯化物均在正常范围。临床上除有 1 期表现外, 还有不同程度的精神差、嗜睡、易惊、头痛、呕吐、烦躁、肢体抖动、急性肢体无力、颈项强直等脑膜炎、脑炎、脊髓灰质炎样综合征、

脑脊髓炎症状体征。1 期组与 2 期组之间年龄比较差别无统计学意义 (1.8 ± 0.6 岁 vs 2.2 ± 0.7 岁, $P > 0.05$), 组间性别差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组患儿治疗方案均遵照《指南》《共识》的相关规定, 1 期患儿均在 1 周内治愈出院, 2 期患儿均在 2 周内治愈出院, 所有患儿均无后遗症发生。

1.2 血浆 VIP 等指标的检测

所有研究对象在入院的第 1~2 天采集 1 mL 外周静脉血, 肝素钠抗凝。使用酶联免疫吸附试验法检测 VIP、 γ -干扰素 (IFN- γ) 和白细胞介素-4 (IL-4) 水平 (美国 Cloud-Clone 公司), 检测方法严格按照说明书进行。采用 7080 型全自动生化分析仪 (日本东芝) 进行血 IgG、IgA、IgM、补体 C3、C4 浓度检测; 采用 FACSCanto II 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 进行 $CD3^+$ T、 $CD4^+$ T、 $CD8^+$ T、NK、B 淋巴细胞亚群百分比检测; 采用 RT-PCR 法进行大便 EV71-RNA 定性检测。

本研究中进行腰椎穿刺的患儿临床均怀疑有神经系统感染, 操作之前签署家属知情同意书。本研究已取得徐州市儿童医院伦理委员会批准。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。正态分布的定量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布数据经对数转换 (\log_{10}) 后以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料采用卡方检验。组间样本均数比较采用独立样本 t 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1 期和 2 期患儿一般资料以及临床指标的比较

1 期组和 2 期组分别有 18 例和 61 例患儿进行了 EV71-RNA 的检测, 结果显示 2 期患儿 EV71-RNA 阳性率明显高于 1 期 [22% (4/18) vs 80% (49/61), $\chi^2 = 21.252$, $P < 0.001$]。2 期组患儿血清 IgG、IgA、IgM、补体 C3 水平高于 1 期组 ($P < 0.05$); 两组间补体 C4 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。2 期组外周血 $CD3^+$ T、 $CD4^+$ T、 $CD8^+$ T 淋巴细胞亚群比例低于 1 期组 ($P < 0.05$); 2 期组外周血 B 细胞比例高于 1 期组 ($P < 0.05$); 2 期组 $CD4^+/CD8^+$ 比值低于 1 期组 ($P < 0.05$); 两组 NK 细胞比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 1 期组和 2 期组免疫指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	体液免疫					细胞免疫					
		IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	补体 C3 (g/L)	补体 C4 (g/L)	CD3 ⁺ T (%)	CD4 ⁺ T (%)	CD8 ⁺ T (%)	B 细胞 (%)	NK 细胞 (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值
1 期	19	6.5 ± 1.3	0.42 ± 0.21	1.2 ± 0.4	1.21 ± 0.17	0.26 ± 0.07	62 ± 10	33 ± 7	26 ± 6	25 ± 7	12 ± 7	1.4 ± 0.4
2 期	67	9.9 ± 5.4	0.61 ± 0.35	1.6 ± 0.4	1.32 ± 0.13	0.30 ± 0.09	47 ± 10	22 ± 7	21 ± 5	36 ± 10	15 ± 6	1.2 ± 0.4
<i>t</i> 值		4.172	2.926	4.705	2.993	1.573	5.648	5.760	3.533	4.754	1.741	2.479
<i>P</i> 值		<0.001	0.005	<0.001	0.004	0.119	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.085	0.015

2.2 1 期和 2 期患儿血浆 VIP、IFN- γ 和 IL-4 水平的比较

2 期组外周血血浆 VIP 浓度低于 1 期组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；两组间 Th1 细胞因子 IFN- γ 、Th2 细胞因子 IL-4 以及 IFN- γ /IL-4 比值比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 2。

表 2 1 期组和 2 期组血浆 VIP、IFN- γ 、IL-4 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VIP (log, pg/mL)	IFN- γ (log, pg/mL)	IL-4 (log, pg/mL)	IFN- γ /IL-4 比值
1 期	19	1.74 ± 0.38	1.9 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.5
2 期	67	1.52 ± 0.28	2.0 ± 0.5	1.2 ± 0.3	1.7 ± 0.5
<i>t</i> 值		2.350	0.992	0.899	1.507
<i>P</i> 值		0.007	0.324	0.371	0.136

EV71-RNA 阳性组与 EV71-RNA 阴性组之间血浆 VIP、IFN- γ 、IL-4 浓度和 IFN- γ /IL-4 比值比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 3。

表 3 EV71-RNA 阳性和阴性组血浆 VIP、IFN- γ 、IL-4 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VIP (log, pg/mL)	IFN- γ (log, pg/mL)	IL-4 (log, pg/mL)	IFN- γ /IL-4 比值
EV71 阳性	53	1.53 ± 0.34	2.1 ± 0.6	1.2 ± 0.4	1.8 ± 0.6
EV71 阴性	26	1.64 ± 0.30	2.0 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.4
<i>t</i> 值		1.465	0.565	0.467	0.911
<i>P</i> 值		0.147	0.573	0.642	0.365

2.3 VIP 与细胞免疫的相关性分析

86 例手足口病患儿外周血 VIP 浓度与 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群比例呈正相关 ($r = 0.533$,

$P < 0.05$)，见图 1；与 CD4⁺/CD8⁺ 比值亦呈正相关 ($r = 0.532$, $P < 0.05$)，见图 2；与 CD3⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞比例、IFN- γ 、IL-4 水平及 IFN- γ /IL-4 比值均无显著相关性 (分别 $r = 0.131$, $P = 0.229$; $r = -0.063$, $P = 0.562$; $r = 0.124$, $P = 0.256$; $r = 0.052$, $P = 0.637$; $r = 0.023$, $P = 0.833$)。

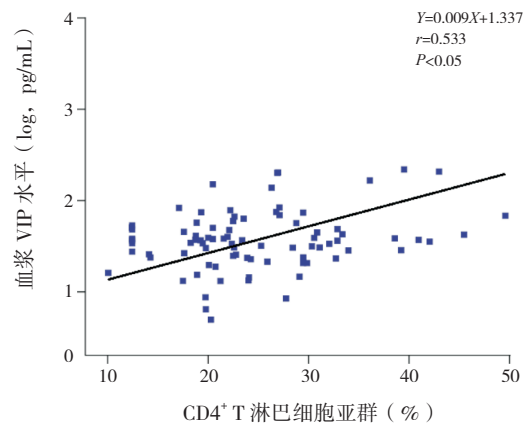


图 1 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群与血浆 VIP 水平的相关性

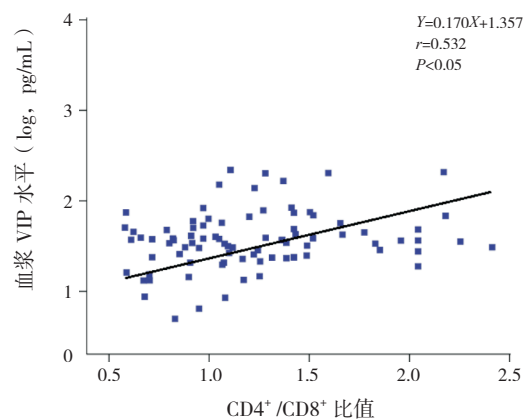


图 2 CD4⁺/CD8⁺ 比值与血浆 VIP 水平的相关性

3 讨论

手足口病是一种急性肠道传染病, 3 岁以下小儿多见。手足口病主要病原包括 EV71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型。其中 EV71 具有强嗜神经性, 是重症手足口病的最常见病原, 本研究也证实重症手足口病患者 EV71-RNA 阳性率明显高于普通手足口病。EV71 致手足口病的第 1 期(手足口出疹期)和第 2 期(中枢神经系统受累期)临床最为多见, 积极治疗后一般预后较好。第 3 期(心肺衰竭前期)和第 4 期(心肺衰竭期)病情较为凶险, 致死、致残率高。早期识别第 2 期病例并阻断其向第 3、4 期进展有重要的临床意义, 因此找到能反映手足口病严重程度的指标十分必要。

研究表明, EV71 侵犯脑干后形成的“儿茶酚胺风暴”所导致的神经源性肺水肿、肺出血以及呼吸循环衰竭是手足口病的主要死亡原因^[7]。但是, 越来越多的研究表明手足口病发病过程中免疫炎症反应也发挥了重要作用^[8-9]。Chen 等^[10]研究发现 EV71 可直接感染 T 淋巴细胞并激活 FasL 的表达, 诱导其凋亡; 而付丹等^[11]研究发现 EV71 感染可致 CD14⁺ 单核细胞 HLA-DR 表达下降, 造成 T 淋巴细胞失能。本研究发现 2 期手足口病患者外周血 B 淋巴细胞亚群以及补体 C3、IgG、IgA、IgM 等体液免疫指标较 1 期增高, 而 2 期组 CD3⁺ T、CD4⁺ T、CD8⁺ T 淋巴细胞亚群比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值等细胞免疫指标均低于 1 期组, 与既往研究报道一致^[12-13]。这些结果提示重症手足口病发病与免疫失衡有关, 监测这些指标有助于判断手足口病病情。但这些指标较多且需要综合分析, 淋巴细胞亚群分析还需要贵重仪器且不同实验条件下差异性较大, 因此实用性较差。

VIP 是一种神经肽, 同时也是一种免疫因子, 参与多种炎症反应, 被认为是反映炎症性疾病严重程度和预后的重要标记^[14]。本研究证实 2 期手足口病患者外周血浆 VIP 浓度低于 1 期, 提示 VIP 与手足口病有关。本研究未发现 EV71-RNA 阳性组和阴性组 VIP 表达的差异, 提示 VIP 表达的变化与 EV71 感染无直接相关性。因此, 以上结果提示血浆 VIP 水平主要反映手足口病严重程度。外周血 VIP 主要来源于神经系统, 2 期患儿血浆 VIP 浓度的下降提示神经系统受损, 因此, VIP 水平的

监测还有助于判断临床分期。

CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值是反映机体免疫状态的重要指标, CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 比值的下降更能提示机体清除病毒能力下降, 手足口病有进一步加重趋势^[15]。本研究发现手足口病患者血浆 VIP 浓度与 CD4⁺ T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值呈正相关, 进一步提示 VIP 在手足口病严重程度中的指示作用。这种相关性可能与 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞表达的 VIP 受体差异性有关。VIP 受体包括 VPAC1、VPAC2 和 PAC1, 其中 VPAC2 抗增殖作用最为明显。VPAC2 水平在活化的 T 细胞表达较高, 且 CD4⁺ T 细胞表达高于 CD8⁺ T 细胞, 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞甚至不表达 VPAC2。国外研究表明, 活化的 T 细胞在加入 VIP 后 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞均减少, 其中 CD4⁺ T 细胞减少更为明显, 使得 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降^[16-17]。动物实验表明, 通过阻断 VIP/VPAC 信号通路, 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞可降低表达 PD-1 等抑制分子, 而对 CD4⁺ T 上 PD-1 表达无明显影响^[18-19]。因此虽然重症手足口病患者外周血 VIP 降低, 但是在相同的低 VIP 的微环境下, 表达更多抗增殖受体 VPAC2 的活化 CD4⁺ T 细胞受到抑制作用更为明显, 而低表达甚至不表达 VPAC2 的 CD8⁺ T 细胞的增殖能力影响不大^[20]。以上结果提示 VIP 不仅是反映手足口病病情的重要指标, 还参与手足口病炎症反应过程。

与 Li 等^[21]的研究结果相似, 本研究未发现血清 IFN- γ 、IL-4 水平在 1 期和 2 期的组间差异, 也未发现这些指标与 VIP 之间相关性, 提示 Th1/Th2 平衡理论可能不适用于解释重症手足口病的发病机制。

总之, 本研究显示, VIP 是反映手足口病严重程度的重要标志, 并可能通过影响 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞亚群而不是 Th1/Th2 平衡机制参与手足口病的发病。

[参 考 文 献]

- [1] Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(1): 25-39.
- [2] Fraccaroli L, Grasso E, Hauk V, et al. Defects in the vasoactive intestinal peptide (VIP)/VPAC system during early stages of the placental-maternal leucocyte interaction impair the maternal

- tolerogenic response[J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 170(3): 310-320.
- [3] Padua D, Vu JP, Germano PM, et al. The role of neuropeptides in mouse models of colitis[J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 59(2): 203-210.
- [4] 徐梁, 张育才, 王斐, 等. 血管活性肠肽和甲泼尼龙对内毒素性休克大鼠肠道 Toll 样受体 mRNA 表达的影响 [J]. *中国小儿急救医学*, 2013, 20(2): 149-152.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 刘映霞. 重视 EV71 重症手足口病发病机制及防治对策的研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2013, 27(6): 401-402.
- [8] Li H, Li S, Zheng J, et al. Cerebrospinal fluid Th1/Th2 cytokine profiles in children with enterovirus 71-associated meningoencephalitis [J]. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(3): 152-159.
- [9] 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.
- [10] Chen LC, Shyu HW, Chen SH, et al. Enterovirus 71 infection induces Fas ligand expression and apoptosis of Jurkat cells[J]. *J Med Virol*, 2006, 78(6): 780-786.
- [11] 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.
- [12] 姜涛, 李双杰, 欧阳文献, 等. 手足口病患儿 Th17、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的变化及意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(12): 1113-1115.
- [13] 陆国平, 朱启镛. 肠道病毒 71 型感染所致危重症手足口病诊治中的一些思考 [J]. *中华儿科杂志*, 2012, 50(4): 244-248.
- [14] Martínez C, Ortiz AM, Juarranz Y, et al. Serum levels of vasoactive intestinal peptide as a prognostic marker in early arthritis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85248.
- [15] 袁圣福, 李洁, 祝伟宏. 肠道病毒 71 感染手足口病患儿外周血 T 淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(12): 3112-3114.
- [16] Delgado M, Abad C, Martinez C, et al. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease[J]. *Nat Med*, 2001, 7(5): 563-568.
- [17] Vomhof-DeKrey EE, Haring JS, Dorsam GP. Vasoactive intestinal peptide receptor 1 is downregulated during expansion of antigen-specific CD8 T cells following primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections[J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 234(1-2): 40-48.
- [18] Li JM, Darlak KA, Southerland L, et al. VIPhyb, an antagonist of vasoactive intestinal peptide receptor, enhances cellular antiviral immunity in murine cytomegalovirus infected mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63381.
- [19] Li JM, Hossain MS, Southerland L, et al. Pharmacological inhibition of VIP signaling enhances antiviral immunity and improves survival in murine cytomegalovirus-infected allogeneic bone marrow transplant recipients[J]. *Blood*, 2013, 121(12): 2347-2351.
- [20] Ipp H, Nkambule BB, Reid TD, et al. CD4⁺ T cells in HIV infection show increased levels of expression of a receptor for vasoactive intestinal peptide, VPAC2[J]. *Immunol Res*, 2014, 60(1): 11-15.
- [21] 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.

(本文编辑: 邓芳明)