

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.12.019

论著·临床研究

手足口病患儿 Th17、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的变化及意义

姜涛 李双杰 欧阳文献 谭艳芳 刘芙蓉 肖耿吉 唐莲 张慧

(湖南省儿童医院肝病中心, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 研究手足口病患儿外周血 Th17、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (CD4⁺CD25⁺Treg) 的变化。方法 以 89 例手足口病患儿为研究对象, 其中普通型 55 例, 重型 34 例, 另选取 30 例健康儿童为对照组; 采用流式细胞术检测各组外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞、Th17 细胞在 CD4⁺T 淋巴细胞中所占的比例; 采用 ELISA 法检测 IL-10、TGF- β 和 IL-17 在各组的表达水平。结果 与对照组相比, 重型和普通型手足口病患儿的 Th17 细胞、IL-17 水平均明显升高 (均 $P < 0.05$), 而 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞、IL-10、TGF- β 水平则显著下降 (均 $P < 0.05$), 且手足口病患儿外周血 Th17、IL-17 水平随病情严重而增高, 而 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞、IL-10、TGF- β 水平随病情严重而降低。结论 手足口病患儿外周血 Th17 细胞应答增强, 而 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞应答降低, Th17 细胞与 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例失衡可能手足口病发病机制中具有重要作用。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(12): 1113-1115]

[关键词] 手足口病; Th17 细胞; CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞; 儿童

Changes in Th17 and CD4⁺CD25⁺ Treg cells and their significance among children with hand, foot and mouth disease

JIANG Tao, LI Shuang-Jie, OUYANG Wen-Xian, TAN Yan-Fang, LIU Fu-Rong, XIAO Geng-Ji, TANG Lian, ZHANG Hui. Liver Disease Center, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Li S-J, Email: lesjie62@vip.sina.com)

Abstract: Objective To investigate the changes in peripheral blood Th17 and CD4⁺CD25⁺ regulatory T (Treg) cells and their significance among children with hand, foot and mouth disease (HFMD). **Methods** Eighty-nine children with HFMD, including 55 cases of common HFMD and 34 cases of severe HFMD, were included in the study; and 30 healthy children were selected as the control group. The percentages of Th17 and CD4⁺CD25⁺ Treg cells in CD4⁺ T cells in peripheral blood were determined by flow cytometry. The expression levels of interleukin (IL)-10, transforming growth factor- β (TGF- β), and IL-17 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the control group, the cases of common HFMD and severe HFMD had significantly increased levels of Th17 cells and IL-17 ($P < 0.05$) but significantly decreased levels of CD4⁺CD25⁺ Treg cells, IL-10, and TGF- β ($P < 0.05$). The severity of the HFMD was positively correlated with the levels of Th17 cells and IL-17 in peripheral blood but negatively correlated with the levels of CD4⁺CD25⁺ Treg cells, IL-10, and TGF- β . **Conclusions** Children with HFMD have increased response of Th17 cells but decreased response of CD4⁺CD25⁺ Treg cells in peripheral blood. Th17/CD4⁺CD25⁺ Treg cell imbalance may play an important role in the pathogenesis of HFMD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(12): 1113-1115]

Key words: Hand, foot and mouth disease; Th17 cell; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell; Child

手足口病是由多种肠道病毒引起的常见传染病, 常见病原体为肠道病毒 71 (EV71) 及柯萨奇病毒 A16 (Coxsackievirus A16) 型, 大多数手足口病呈良性经过, 预后良好。部分中枢神经系统受累严重者,

病情可于短时间内迅速进展, 发生肺水肿、肺出血以及循环衰竭等严重并发症, 病死率和致残率高^[1], 而目前人们对手足口病的发病机制知之甚少。调节性 T 细胞 (Treg)、辅助性 T 细胞 17 (Th17)

[收稿日期] 2013-06-05; [修回日期] 2013-07-06

[基金项目] 湖南省中医管理局项目 (201202)。

[作者简介] 姜涛, 女, 硕士研究生, 主治医师。

[通信作者] 李双杰, 主任医师。

作为最近发现的两种新淋巴细胞亚群,与自身免疫性疾病和感染性疾病的发生发展关系密切,成为近年来免疫学研究的热点^[2-3]。本文就89例手足口病患儿外周血Treg细胞、Th17细胞、IL-10、TGF- β 和IL-17的水平进行研究,探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2011年5~9月于我院感染科门诊就诊和住院的手足口病患儿89例为研究对象,其中普通型手足口病患儿55例,重型病例34例,年龄在1~5岁之间。所有患儿诊断符合卫生部《手足口病诊疗指南2010版》诊断标准^[4]。同期随机选择30例于本院儿科门诊行健康体检的儿童作为对照组,年龄在1~5岁之间,入选标准为肝、肾功能正常,乙肝、丙肝和EB病毒等血清学指标阴性,既往无过敏史,无自身免疫性疾病、肿瘤、免疫缺陷者,未使用激素和免疫抑制剂,近2周内无任何疾病和不适症状,无家族性疾病史及传染病史。

1.2 方法

1.2.1 Th17、CD4⁺CD25⁺Treg细胞百分率的检测
空腹采集各组儿童静脉血2 mL,肝素抗凝,分别加入PE-Cy5标记的鼠抗人CD4单抗, FITC标记的鼠抗人CD25抗体和IL-17抗体(所有抗体均购自北京四正柏生物科技有限公司)处理,上流式细胞仪检测各组外周血中CD4⁺CD25⁺Treg细胞占CD4⁺T淋巴细胞百分率及Th17细胞在CD4⁺T淋巴细胞中所占的比率。

1.2.2 血清细胞因子检测
采用双抗体夹心ELISA法测定各组儿童外周血IL-10、TGF- β 和IL-17水平,所有检测试剂盒均购自北京四正柏生物科技有限公司,按说明书进行操作;每样本设3个复孔,酶测试仪于450 nm处读数。

1.3 统计学分析

应用SPSS 16.0统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血Th17、CD4⁺CD25⁺Treg细胞表达的比较

与对照组相比,普通型与重型手足口病患儿外周血Th17细胞水平均明显升高(均 $P<0.05$),

以重型组升高尤为明显;而普通型与重型手足口病患儿外周血CD4⁺CD25⁺Treg细胞水平较对照组则明显下降(均 $P<0.05$),亦以重型组降低最为明显。见表1。

表1 各组外周血Th17、CD4⁺CD25⁺Treg细胞表达的比较
($\bar{x}\pm s$, %)

组别	例数	Th17/CD4 ⁺ T	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg/CD4 ⁺ T
对照组	30	3.2 $\pm$ 0.4	10.9 $\pm$ 0.4
普通组	55	4.4 $\pm$ 0.7 ^a	8.7 $\pm$ 0.3 ^a
重型组	34	5.6 $\pm$ 0.6 ^{a,b}	6.5 $\pm$ 0.7 ^{a,b}
F 值		124.11	698.4
P 值		<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与普通组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组外周血IL-10、TGF- β 和IL-17水平的比较

与对照组相比,普通型与重型手足口病患儿外周血IL-17水平均明显升高(均 $P<0.05$),以重型组升高尤为明显;而普通型与重型手足口病患儿外周血IL-10、TGF- β 水平较对照组则明显下降(均 $P<0.05$),亦以重型组降低最为明显。见表2。

表2 各组外周血IL-10、TGF- β 和IL-17水平的比较
($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	例数	IL-10	TGF- β	IL-17
对照组	30	44 $\pm$ 19	14316 $\pm$ 4613	6.6 $\pm$ 6.9
普通组	55	21 $\pm$ 5 ^a	1316 $\pm$ 809 ^a	9.5 $\pm$ 2.5 ^a
重型组	34	8 $\pm$ 7 ^{a,b}	554 $\pm$ 306 ^{a,b}	13.0 $\pm$ 6.0 ^{a,b}
F 值		91.08	351.71	13.17
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与普通组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

人群对肠道病毒普遍易感,人接触肠道病毒后,隐性感染比例大,大多数成人已经通过隐性感染获得相应的抗体,在少数成人手足口病患者个案报道中,多有免疫功能低下^[5-6]。而EV71等病毒感染亦可引起机体免疫功能紊乱,研究证实,手足口病病毒可影响机体免疫应答多个环节,病毒可侵犯免疫系统,破坏淋巴结和脾脏等免疫器官^[7],直接感染淋巴细胞^[8],导致人白细胞DR抗原(HLA-DR)表达减少,影响机体的细胞免疫功能^[9]和体液免疫功能^[10],因此,免疫异常是手足口病发病的关键机制。

近年来,CD4⁺T细胞的两个新亚型Th17和

Treg 细胞是研究热点。Th17 细胞的标志性细胞因子 IL-17 是一种重要的炎症介质,可诱导其他炎症细胞因子(如 IL-6、TNF)、趋化因子 9(如 MCP-1、MIP-2)和基质金属蛋白酶的表达,引起炎症细胞浸润和组织损伤。同时 IL-17 可通过粒细胞集落刺激因子和 IL-8 参与中性粒细胞的增殖、成熟和趋化,并能促进树突细胞成熟,在感染或损伤早期可有效介导促炎症反应^[11]。与 Th17 细胞不同的是, Treg 细胞是一类具有免疫抑制作用的 T 细胞亚群,可通过细胞接触机制或细胞因子抑制抗原提呈细胞或 T 细胞的活化,调控免疫应答的强度,减轻对机体组织的损伤,大量研究认为 Treg 在各种不同的感染性疾病中主要通过细胞因子 IL-10 或 TGF- β 调节免疫反应^[12-13]。Treg 细胞与 Th17 细胞的分化和功能相互抑制, Th17 细胞与 Treg 细胞的平衡对维持免疫内环境的稳定起重要作用,而 Th17 和 Treg 细胞平衡失调与多种病毒感染的发病机制有关^[14-15]。

付丹等^[9]对 46 例 EV71 型感染患儿的研究发现, Treg 细胞比例、转录因子 Foxp3 mRNA 及诱导因子 TGF- β 血浓度随病情加重而降低,而 Th17 细胞比例、IL-17A 血浓度、转录因子 ROR- γ mRNA 及诱导因子 IL-6 血浓度随病情加重而升高。蔡莉芬等^[16]的研究亦表明, EV71 感染手足口病患儿 Treg 细胞数量降低, TGF- β 浓度降低,而 Th17 细胞增高,血清 IL-17A 测定亦显示同样趋势,由此可见, EV71 感染可导致 Th17 细胞与 Treg 细胞失衡,但是目前其具体机制仍不清楚。本研究显示重型和普通型手足口病患儿外周血 Th17 细胞、IL-17 水平明显升高;而重型和普通型手足口病患儿外周血 Treg 细胞、IL-10、TGF- β 水平明显下降,与上述文献报道一致。且手足口病病情的严重程度与 Th17 细胞和 IL-17 水平呈正相关,与 Treg 细胞、IL-10、TGF- β 水平呈负相关。由此可见,手足口病患儿存在 Treg/Th17 的失衡,患儿病情越重,这种失衡就越大,机体的抗病毒免疫反应被有效地激活,从而有利于机体清除病毒,但同时也对机体造成了严重的组织损伤,甚至出现致命的免疫病理损伤。

综上所述,手足口病患儿外周血 Th17 细胞应答增强,而 Treg 细胞应答降低,外周血 Th17/Treg 比例失衡可能在手足口病发病机制中具有重要作

用,可以为手足口病的诊治提供新的手段。

[参 考 文 献]

- [1] Chan KP, Goh KT, Chong CY, Teo ES, Lau G, Ling AE. Epidemic hand foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(1): 78-85.
- [2] 王维维, 沈茜. Th17 细胞和 Treg 细胞的细胞因子调节网络[J]. 生命的化学, 2010, 30(2): 269-273.
- [3] 张蓝方, 郝云良. Th17 细胞和 Treg 细胞与某些疾病关系的研究进展[J]. 临床血液学杂志, 2011, 24(3): 189-192.
- [4] 手足口病诊疗指南 2010 年版[S]. 卫生部, 2010.
- [5] Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, et al. Acute encephalitis caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71 in adult[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(5): 828-830.
- [6] Legay F, Leveque N, Gacouin A, Tattevin P, Bouet J, Thomas R, et al. Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(7): 1084-1085.
- [7] 蒙国照, 李美琼, 李运千, 王绪明, 陈秋月, 韦华生. 危重型手足口病 3 尸检临床病理分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(1): 48-55.
- [8] Wang SM, Lei HY, Huang KJ, Wu JM, Wang JR, Yu CK, 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.
- [9] 付丹, 李成荣, 何颜霞, 祖莹, 操德智, 王国兵, 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.
- [10] 李振华, 周涛. 手足口病患儿体液免疫功能与病情转归的关系[J]. 中国中西医结合儿科学, 2010, 2(6): 510-512.
- [11] 赵丽, 马雄, 邱德凯. Th17 细胞 / 调节性 T 细胞平衡与自身免疫性肝病[J]. 胃肠病学, 2009, 14(4): 230-232.
- [12] Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients[J]. J Clin Invest, 2000, 105(9): 1317-1325.
- [13] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683-765.
- [14] 吴敏泉, 罗艳, 何艳, 李靖, 郑煜煌, 姚运海. HIV 感染者 Th17 和 Treg 细胞的变化及意义[J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10(4): 252-255.
- [15] 谭艳芳, 于四景, 王婕, 李双杰. Treg/Th17 平衡在巨细胞病毒感染发病机制中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(6): 649-651.
- [16] 蔡莉芬, 孙梅花, 王立静, 高慧萍, 宁更献, 李树娟, 等. EV71 感染手足口病患儿外周血检测 Treg 细胞、Th17 细胞、TGF- β 、IL-17A 的临床意义[J]. 河北医药, 2011, 33(8): 1143-1144.

(本文编辑: 万静)