

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.12.010

论著·临床研究

手足口病患儿淋巴细胞亚群和免疫球蛋白及补体 C3、C4 水平分析

刘晓梅 崔振泽 景淑军 杨光

(大连市儿童医院呼吸科, 辽宁大连 116012)

[摘要] **目的** 分析淋巴细胞亚群、免疫球蛋白及补体 C3、C4 在手足口病患儿免疫状态评估中的临床应用价值。**方法** 选取 282 例手足口病患儿为手足口病组, 130 例健康儿童为健康对照组; 检测两组外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞、CD56⁺ 自然杀伤细胞比例, CD4⁺/CD8⁺、IgA、IgM、IgG 和补体 C3、C4 水平。**结果** 多因素分析显示, 手足口病组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞比例及补体 C3、C4 水平低于健康对照组 ($P<0.05$), CD56⁺ 自然杀伤细胞比例、IgG 水平高于健康对照组 ($P<0.05$)。单独效应分析显示, 0 岁~手足口病组 CD4⁺/CD8⁺ 高于健康对照组 ($P<0.05$); 0 岁~及 3 岁~的男性手足口病组 IgM 水平高于健康对照组 ($P<0.05$); 3 岁~男性及 0 岁~女性手足口病组 IgA 水平低于健康对照组 ($P<0.05$)。**结论** 手足口病患儿存在细胞免疫及体液免疫功能紊乱, 监测淋巴细胞亚群、免疫球蛋白水平可以为手足口病患儿的免疫状态评估提供实验室依据。**[中国当代儿科杂志, 2019, 21(12): 1203-1207]**

[关键词] 手足口病; 淋巴细胞亚群; 免疫球蛋白; 补体; 儿童

Levels of lymphocyte subsets, immunoglobulins, and complement C3 and C4 in children with hand-foot-mouth disease

LIU Xiao-Mei, CUI Zhen-Ze, JING Shu-Jun, YANG Guang. Department of Respiratory Medicine, Dalian Children's Hospital, Dalian, Liaoning 116012, China (Cui Z-Z, Email: dletyhxk2@126.com)

Abstract: Objective To study the clinical value of lymphocyte subsets, immunoglobulins, and complement C3 and C4 in the evaluation of immune status in children with hand-foot-mouth disease (HFMD). **Methods** A total of 282 children with HFMD were enrolled as the HFMD group, and 130 healthy children were enrolled as the healthy control group. The percentages of peripheral CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes, CD19⁺ B lymphocytes, and CD56⁺ natural killer cells were measured. The CD4⁺/CD8⁺ ratio was calculated. The levels of immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin G (IgG), and complement C3 and C4 were measured. **Results** The multivariate analysis showed that compared with the healthy control group, the HFMD group had significantly lower percentages of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes and levels of complement C3 and C4 ($P<0.05$), as well as significantly higher percentage of CD56⁺ natural killer cells and level of IgG ($P<0.05$). The individual effect analysis showed that the children aged 0-3 years in the HFMD group had a significantly higher CD4⁺/CD8⁺ ratio than the healthy control group ($P<0.05$); boys aged 0-3 and ≥ 3 years in the HFMD group had a significantly higher level of IgM than the healthy control group ($P<0.05$); boys aged ≥ 3 years and girls aged 0-3 years in the HFMD group had a significantly lower level of IgA than the healthy control group ($P<0.05$). **Conclusions** Cellular and humoral immunity disorders are observed in children with HFMD. The monitoring of lymphocyte subsets and immunoglobulin levels can provide a laboratory basis for immune status assessment in children with HFMD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(12): 1203-1207]

Key words: Hand-foot-and mouth disease; Lymphocyte subset; Immunoglobulin; Complement; Child

[收稿日期] 2019-08-21; [接受日期] 2019-10-15

[作者简介] 刘晓梅, 女, 硕士, 副主任医师。

[通信作者] 崔振泽, 男, 主任医师。Email: dletyhxk2@126.com。

手足口病是由肠道病毒感染引起的一种儿童常见传染病,以发热和手、足、口腔、臀部等部位的皮疹或疱疹为主要临床表现。重症病例可出现神经源性肺水肿、肺出血、心肌炎、无菌性脑膜炎及脑膜炎,甚至死亡。5岁以下儿童多发。手足口病是全球性疾病,我国发病率为37.01/10万~205.06/10万,病死率在6.46/10万~51.00/10万^[1]。国内关于手足口病患儿免疫功能水平的研究显示,手足口病患儿存在免疫功能紊乱,重症患儿免疫功能紊乱程度更为显著^[2-3]。但多数研究局限于单一细胞免疫或体液免疫的研究,且例数较少,没有全面分析手足口病患儿的免疫功能水平,以及年龄、性别等因素对免疫功能的影响^[4-5]。本文通过对大连市儿童医院2018年6~9月收治的282例手足口病患儿进行外周血淋巴细胞亚群和免疫球蛋白及补体测定,了解手足口病患儿细胞和体液免疫状况,探讨免疫功能在手足口病发生发展中的作用,为临床选择合理的治疗方案提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年6~9月大连市儿童医院收治的282例手足口病患儿为手足口病组,所有患儿均符合《手足口病诊疗指南(2018年版)》中手足口病的诊断标准^[1],且排除合并其他基础疾病,其中男179例,女103例,平均年龄 2.6 ± 1.9 岁,0岁~197例,3岁~73例, ≥ 6 岁12例。同时,选取健康体检儿童130例为健康对照组,其中男79例,女51例,平均年龄 2.4 ± 1.6 岁,0岁~91例,3岁~30例, ≥ 6 岁9例。两组之间年龄($t=0.801$, $P=0.419$)、性别构成比($\chi^2=0.278$, $P=0.598$)、各年龄段构成比($\chi^2=1.524$, $P=0.460$)差异均无统计学意义。

所有研究对象均得到其监护人知情同意,且本研究获得大连市儿童医院医学伦理委员会批准。

1.2 淋巴细胞亚群检测方法

手足口病组患儿均在急性期(发病3d内)、健康儿童于体检当天采集外周静脉血2mL,EDTA抗凝,送医院检验中心进行检测。淋巴细胞

亚群检测采用Mindray公司的BriCyte E6流式细胞仪检测,分别得出CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD56⁺淋巴细胞比例及CD4⁺/CD8⁺比值。

1.3 免疫球蛋白检测方法

手足口病组患儿均在急性期(发病3d内)、健康儿童于体检当天空腹采集外周静脉血2mL,肝素抗凝,送医院检验中心进行检测。采用比浊法检测IgG、IgM、IgA及补体C3、C4水平,仪器为西门子BNII全自动蛋白分析仪,试剂为原装配套产品。

1.4 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行数据处理。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。非正态分布计量资料以中位数(四分位数间距) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,两组间比较采用Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验。计数资料以例数及百分比(%)表示。对于CD3⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD56⁺、IgG及C3等正态分布计量资料使用一般线性模型进行多因素分析;对于CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、IgM及IgA等非正态分布计量资料使用广义线性模型进行多因素分析,并对原始数据进行Gamma变换,使用对数函数作为链接函数以提高数据拟合度。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞免疫结果比较

手足口病组CD3⁺、CD4⁺及CD8⁺T淋巴细胞比例低于健康对照组($P < 0.05$),CD19⁺B淋巴细胞与CD56⁺自然杀伤细胞比例高于健康对照组($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

2.2 体液免疫及补体情况比较

手足口病组IgM与IgG水平高于健康对照组,C3与C4水平低于健康对照组($P < 0.05$),IgA水平在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表1 手足口病组和健康对照组细胞免疫指标比较

组别	例数	CD3 ⁺ ($\bar{x} \pm s, \%$)	CD4 ⁺ [$M(P_{25}, P_{75}), \%$]	CD8 ⁺ ($\bar{x} \pm s, \%$)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ [$M(P_{25}, P_{75})$]	CD19 ⁺ ($\bar{x} \pm s, \%$)	CD56 ⁺ ($\bar{x} \pm s, \%$)
健康对照组	130	69 ± 7	41.35(37.24, 46.12)	26 ± 5	1.64(1.35, 2.07)	17.6 ± 3.0	10 ± 4
手足口病组	282	52 ± 9	28.70(24.08, 34.01)	19 ± 7	1.62(1.21, 2.27)	18.4 ± 5.6	18 ± 7
<i>t/Z</i> 值		20.297	-13.272	12.995	-0.111	-2.027	-13.430
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.912	0.043	<0.001

表2 手足口病组和健康对照组体液免疫指标比较 (g/L)

组别	例数	IgM [$M(P_{25}, P_{75})$]	IgG ($\bar{x} \pm s$)	IgA [$M(P_{25}, P_{75})$]	C3 ($\bar{x} \pm s$)	C4 [$M(P_{25}, P_{75})$]
健康对照组	130	0.91(0.75, 1.23)	7.0 ± 2.1	0.53(0.28, 0.88)	1.09 ± 0.14	0.30(0.26, 0.34)
手足口病组	282	1.10(0.90, 1.38)	7.6 ± 4.9	0.44(0.29, 0.66)	0.94 ± 0.20	0.26(0.22, 0.31)
<i>t/Z</i> 值		-3.888	-2.700	-1.734	8.534	-4.620
<i>P</i> 值		<0.001	0.007	0.083	<0.001	<0.001

2.3 免疫学指标多因素分析

单因素分析显示手足口病组和健康对照组大部分免疫学指标差异均具有统计学意义,同时,考虑年龄、性别等变量可能对部分免疫学指标产生影响。因此以各免疫学指标为因变量,以研究对象组别为自变量,以性别及年龄为协变量建立多因素分析模型,从而排除性别、年龄因素对结果可能造成的混杂效应。

2.3.1 细胞免疫多因素分析 调整性别、年龄影响后,手足口病组 CD3⁺ ($F=338.366$,

$P<0.001$)、CD4⁺ ($\chi^2=29.416$, $P<0.001$) 及 CD8⁺ ($F=128.751$, $P<0.001$) T 细胞比例低于健康对照组;手足口病组 CD56⁺ 自然杀伤细胞比例高于健康对照组 ($F=120.637$, $P<0.001$);两组 CD19⁺ B 淋巴细胞比例差异无统计学意义 ($F=2.802$, $P>0.05$)。而对于 CD4⁺/CD8⁺, 组别与年龄存在一阶交互效应 ($\chi^2=6.685$, $P<0.05$), 因此进行单独效应分析,结果显示,0岁~手足口病组 CD4⁺/CD8⁺ 比值高于健康对照组 ($P<0.01$), 见表3。

表3 调整年龄因素后手足口病组和健康对照组 CD4⁺/CD8⁺ 比较

组别	例数	0岁~		3岁~		≥6岁	
		边际均数	标准误	边际均数	标准误	边际均数	标准误
健康对照组	130	1.74	0.08	1.60	0.12	1.70	0.23
手足口病组	282	2.02	0.06	1.49	0.07	1.40	0.17
χ^2 值		7.928		0.581		1.167	
<i>P</i> 值		0.005		0.446		0.280	

2.3.2 体液免疫及补体多因素分析 调整性别、年龄影响后,手足口病组 IgG 水平高于健康对照组 ($F=10.309$, $P<0.001$); C3 ($F=55.445$, $P<0.001$)、C4 ($\chi^2=6.554$, $P<0.05$) 水平低于健康对照组。但对于 IgM、IgA, 组别、性别与年龄间存

在二阶交互效应,因此进行单独效应分析,结果显示,0岁~与3岁~男性手足口病组 IgM 水平高于健康对照组 ($P<0.05$), 3岁~男性手足口病组 IgA 水平低于健康对照组 ($P<0.05$), 0岁~女性手足口病组 IgA 水平低于健康对照组 ($P<0.01$), 见表4。

表4 调整年龄因素与性别因素后手足口病组与健康对照组 IgM 及 IgA 比较 (g/L)

指标	性别	年龄(岁)	健康对照组 (n=130)		手足口病组 (n=282)		χ^2 值	P 值
			边际均数	标准误	边际均数	标准误		
IgM	男性	0~	0.86	0.07	1.08	0.06	6.324	0.012
		3~	0.94	0.14	4.37	0.38	71.582	<0.001
		≥ 6	1.17	0.32	1.12	0.26	0.015	0.903
	女性	0~	1.10	0.11	1.18	0.08	0.341	0.559
		3~	1.18	0.20	1.29	0.16	0.201	0.654
		≥ 6	1.44	0.44	1.70	0.46	0.164	0.686
IgA	男性	0~	0.39	0.02	0.42	0.01	1.272	0.259
		3~	1.08	0.12	0.74	0.05	6.483	0.011
		≥ 6	1.11	0.24	1.09	0.20	0.004	0.950
	女性	0~	0.49	0.04	0.36	0.02	7.899	0.005
		3~	0.83	0.11	0.77	0.72	0.209	0.647
		≥ 6	1.37	0.32	1.05	0.22	0.647	0.421

3 讨论

手足口病是儿科常见传染病之一。多数患儿临床症状轻微，少数病例病情进展迅速，可出现脑炎、脑膜炎、肺水肿、循环障碍等重型、危重型表现，甚至死亡。目前手足口病发病机制还未完全阐明^[6-7]。研究认为，机体感染EV后，启动细胞免疫和体液免疫，发挥免疫监视、免疫应答、免疫自稳与防御病毒感染的作用^[8]。手足口病发病与机体免疫功能受抑制存在关联性，特别是细胞免疫功能的抑制^[9]。T淋巴细胞和NK细胞是机体抵御病毒感染的主要参与者^[10-11]。

T淋巴细胞亚群是机体内细胞免疫功能的重要指标，其中CD3⁺T细胞是细胞免疫主要活性细胞，当CD3⁺T细胞水平下降，说明患儿体内T细胞活化功能受到抑制；CD4⁺T细胞能促进B细胞、T细胞和其他免疫细胞的增殖和分化，促进细胞免疫功能；CD8⁺T细胞属于抑制性T细胞，在细胞免疫过程中主要发挥负向调节作用。当T细胞亚群数量和功能出现异常时，就会导致免疫紊乱并进一步使机体产生病理变化^[12-13]。而CD56⁺自然杀伤细胞可直接杀灭病毒感染的细胞，是机体防御病毒感染的第一道防线。本研究结果显示，手足口病患儿CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞比例均明显降低，与周亚兵等^[3]、孙广超等^[4]、石瑛等^[14]研究一致，提示手足口病患儿存在细胞免疫功能降低；而CD56⁺自然杀伤细胞比例增高，说明尽管患儿细胞免疫功能相对较低，但仍积极对病毒感染进行反应。而庄帝钱^[15]研究显示，重症手足口

病患儿，随病情的加重，患儿外周血自然杀伤细胞比例逐渐降低，提示重症手足口病患儿存在更为严重的细胞免疫紊乱。本研究中，手足口病组CD19⁺B细胞比例高于健康对照组，与石瑛等^[14]研究一致，但调整了年龄和性别的影响后，与健康对照组比较，差异无统计学意义。而CD4⁺/CD8⁺在手足口病组与健康对照组差异无统计学意义，但调整了年龄和性别后提示在0~3岁手足口病组高于健康对照组。故关于CD19⁺B细胞及CD4⁺/CD8⁺在手足口病患儿中的水平情况，有待进一步研究。

免疫球蛋白是介导体液免疫的重要效应分子。其中IgM是感染早期产生的免疫球蛋白，在机体免疫防御特别是早期应答中发挥重要作用。IgG是机体抗感染主力部队，具有活化补体功能，是机体再次免疫应答中主要抗体^[16]。IgA在黏膜表面阻止微生物附着形成菌落，防止病原体和毒素进入细胞。本研究单因素分析结果显示，手足口病组IgM与IgG明显高于健康对照组，与吴俊峰等^[17]研究一致，提示急性感染期患儿体液免疫被激活，产生抗体中和病毒，防止疾病进一步发展。而IgA明显低于健康对照组，与翟慢慢等^[18]研究一致，提示手足口病患儿抵御病原体入侵能力降低，导致疾病发生。进一步多因素分析显示，性别和年龄因素对体液免疫的各个指标存在一定的影响，故临床判定患儿体液免疫情况时，需考虑年龄和性别因素，特别是年龄因素。

C3、C4作为重要补体成分，通过多个补体激活途径参与机体的免疫应答，参与抗感染的早期

防御。本研究结果显示,手足口病组患儿 C3、C4 水平明显低于健康对照组,与孙裕平等^[5]、翟慢慢等^[18]研究一致,提示手足口病患儿 C3、C4 通过补体激活途径参与调理吞噬靶细胞、清除免疫复合物、促进炎症反应而被大量消耗。且孙裕平等^[5]研究提示,病情越重,补体消耗越明显。

综上所述,手足口病患儿细胞免疫功能低下,体液免疫紊乱。儿童免疫功能水平,与年龄和性别因素相关,特别是体液免疫。通过淋巴细胞亚群和免疫球蛋白及补体的检测可了解患儿免疫功能状态,结合年龄、性别等因素综合判断,进而指导临床作出及时有效的治疗方案。

因本院实验室条件有限,未能进行 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的绝对计数检测,且研究期间,无手足口病重症患儿,故未对疾病的严重程度进行分组比较,以及样本量有限,希望在以后研究中进一步完善。

【参 考 文 献】

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 手足口病诊疗指南(2018年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2018, 11(3): 161-166.
- [2] 任劲松, 孙浩森, 尹力扬, 等. EV71 型手足口病患儿外周血淋巴细胞亚群与血小板相关性研究[J]. 医学综述, 2016, 22(22): 4486-4489.
- [3] 周亚兵, 吴敏, 沈袁恒, 等. 小儿重症手足口病的细胞免疫和体液免疫临床特征研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(12): 1163-1165.
- [4] 孙广超, 曾华松. 手足口病患儿 CD3⁺CD4⁺ 与 CD3⁺CD8⁺ 淋巴细胞百分率 hs-CRP 水平变化[J]. 河北医学, 2019, 25(4): 572-575.
- [5] 孙裕平, 马少春, 蒋玉红, 等. 血清免疫球蛋白、补体在手足口病患儿中的改变及其临床意义[J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(5): 554-556.
- [6] Shao P, Wu X, Li H, et al. Clinical significance of inflammatory cytokine and chemokine expression in hand, foot and mouth disease[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5): 2859-2866.
- [7] Yang J, Yang C, Guo N, et al. Type I interferons triggered through the Toll-like receptor 3-TRIF pathway control Coxsackievirus A16 infection in young mice[J]. J Virol, 2015, 89(21): 10860-10867.
- [8] Ye N, Gong X, Pang LL, et al. Cytokine responses and correlations thereof with clinical profiles in children with enterovirus 71 infections[J]. BMC Infect Dis, 2015, 15: 225.
- [9] 利幸芝, 吴曙粤, 谢庆玲. 重症手足口病细胞免疫功能变化的系统评价[J]. 中国临床新医学, 2018, 11(7): 654-660.
- [10] 符青松, 黄循斌. 外周血 T 淋巴细胞亚群在 EV71 型手足口病患者病情判断中的价值[J]. 中国医药导报, 2016, 13(4): 113-116.
- [11] 许红梅, 潘招军. 肠道病毒 71 型感染所致儿童手足口病与天然免疫细胞的研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(22): 1681-1686.
- [12] Yee PTI, Poh CL. T cell immunity to enterovirus 71 infection in humans and implications for vaccine development[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(11): 1143-1152.
- [13] Lin YL, Chow YH, Huang LM, et al. A CpG-adjuvanted intranasal enterovirus 71 vaccine elicits mucosal and systemic immune responses and protects human SCARB2-transgenic mice against lethal challenge[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10713.
- [14] 石瑛, 任静静, 王云凤, 等. 肠道病毒 71 型感染手足口病患儿免疫学相关指标变化与临床应用价值[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(22): 1741-1743.
- [15] 庄帝钱. 肠道病毒 EV71 感染手足口病患儿外周血淋巴细胞 Fas、FasL 表达水平的研究[J]. 临床医学工程, 2018, 25(8): 1025-1026.
- [16] 曹雪涛, 何维. 医学免疫学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 78-81.
- [17] 吴俊峰, 卓志强, 赵国荣. 儿童手足口病 754 例体液免疫功能变化分析[J]. 中国中西医结合儿科学, 2013, 5(1): 43-44.
- [18] 翟慢慢, 周崇臣, 宋继军, 等. 手足口病患儿免疫球蛋白及补体 C3、C4 检测及意义[J]. 临床输血与检验, 2018, 20(2): 180-181.

(本文编辑: 王颖)