

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.12.010

· 论 著 ·

## EV71 手足口病患儿 CD8<sup>+</sup>T、NK 细胞穿孔素和颗粒酶 B 的变化

姜 涛, 欧阳文献, 谭艳芳, 李双杰

(湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410007)

**[摘要]** **目的** 探讨肠道病毒 71 型(EV71)手足口病患儿 CD8<sup>+</sup>T、NK 细胞穿孔素(PRF)和颗粒酶 B(GrzB)的变化。**方法** 选取某儿童医院 2017 年 5—7 月普通型、重型手足口病患儿(普通型组、重型组),健康儿童志愿者(正常对照组)各 30 例,采用流式细胞术测定外周血 CD8<sup>+</sup>T、NK 细胞 PRF 和 GrzB 的表达水平,比较各组差异。**结果** 与正常对照组相比,普通型组和重型组 EV71 手足口病患儿急性期两种细胞中 PRF 和 GrzB 的表达水平均升高,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。普通型组和重型组 EV71 手足口病恢复期患儿 CD8<sup>+</sup>T 细胞 PRF、GrzB 的表达水平较急性期明显下降,但仍高于正常对照组(均  $P < 0.05$ )。NK 细胞 PRF、GrzB 的表达水平:普通型组和重型组急性期比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );普通型组 EV71 手足口病恢复期患儿较急性期虽稍升高,但差异仍无统计学意义(均  $P > 0.05$ );重型组 EV71 手足口病恢复期患儿较急性期明显升高(均  $P < 0.05$ )。**结论** CD8<sup>+</sup>T、NK 细胞 PRF 和 GrzB 在 EV71 手足口病发病中起着一定作用。

**[关键词]** EV71;手足口病;穿孔素;颗粒酶 B

**[中图分类号]** R392.11 R725.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)12-1079-04

## Changes in perforin and granzyme B in CD8<sup>+</sup>T cells and NK cells in children with EV71 hand-foot-and-mouth disease

JIANG Tao, OUYANG Wen-xian, TAN Yan-fang, LI Shuang-jie (Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes in perforin (PRF) and granzyme B (GrzB) of CD8<sup>+</sup>T cells and NK cells in children with hand-foot-and-mouth disease (HFMD) caused by enterovirus 71 (EV71). **Methods** 30 children with common HFMD (common group), 30 with severe HFMD (severe group), and 30 healthy children volunteers (control group) in a hospital in May-July 2017 were selected, expression levels of PRF and GrzB in CD8<sup>+</sup>T cells and NK cells in peripheral blood were detected by flow cytometry, differences among three groups were compared. **Results** Compared with control group, expression levels of PRF and GrzB in two kinds of cells of children with common and severe EV71 HFMD at acute stage were significantly higher, difference were both significant (both  $P < 0.05$ ). Expression levels of PRF and GrzB in CD8<sup>+</sup>T cells of children with common and severe EV71 HFMD at convalescent stage were significantly lower than those at acute stage, but still higher than those in control group (both  $P < 0.05$ ). Expression levels of PRF and GrzB in NK cells: there was no significant difference between common group and severe group at acute stage (both  $P > 0.05$ ); compared with acute stage, at convalescent stage of common EV71 HFMD slightly increased, but difference was not statistically significant (both  $P > 0.05$ ); at convalescent stage of severe EV71 HFMD were significantly higher than that in the acute stage (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Perforin and granzyme B in CD8<sup>+</sup>T cells and NK cells play a role in the pathogenesis of EV71 HFMD.

**[Key words]** EV71; hand-foot-and-mouth disease; perforin; granzyme B

[Chin J Infect Control, 2018, 17(12): 1079-1082]

[收稿日期] 2018-03-01

[基金项目] 国家中医药管理局 2009 年公益性行业专项中医药传染病防治(200907001-3)

[作者简介] 姜涛(1983-),女(汉族),湖南省益阳市人,副主任医师,主要从事病毒感染和免疫研究。

[通信作者] 姜涛 E-mail:156095128@qq.com

手足口病主要由柯萨奇 A 组 16 型(CoxA16)、肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)<sup>[1]</sup>引起的急性出疹性传染病,大部分患儿预后良好,少数病例可出现脑干脑炎、脑膜炎、脑脊髓炎、急性迟缓性瘫痪、肺水肿、循环障碍甚至死亡<sup>[2]</sup>。EV 71 型手足口病可导致机体发生多种复杂的免疫功能变化<sup>[3]</sup>,且 EV71 患儿更容易出现急性肺水肿和中枢神经系统损伤,致死及致残率相对更高<sup>[4]</sup>。研究表明,手足口病的发病与病毒直接侵犯细胞、HLA-A2 宿主基因的易感性<sup>[5]</sup>、机体免疫功能的变化等有关<sup>[6]</sup>,而抗原提呈细胞处理抗原片段后激活 NK 细胞和 Tc 细胞,通过分泌颗粒酶穿孔素直接杀伤靶细胞<sup>[7]</sup>,在抗病毒中起着重要作用。故本研究采用流式细胞术检测 EV71 型手足口病患儿体内 CD8<sup>+</sup> T、NK 细胞中穿孔素(perforin, PRF)和颗粒酶 B(granzyme B, GrzB)的变化,为探索 EV71 型手足口病发病机制提供新的依据。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2017 年 5—7 月湖南省儿童医院感染科住院治疗的手足口病患儿 60 例,其中普通型手足口病患儿 30 例(普通型组),重型手足口病患儿 30 例(重型组),手足口病的诊断标准参照卫生部制定的《手足口病预防控制指南(2010 年版)》<sup>[8]</sup>,其诊断标准为:(1)轻型病例,手、足、口、臀部皮疹,伴或不伴发热。(2)重症病例,出现神经系统受累表现,如精神差、嗜睡、易惊、谵妄、头痛、呕吐、肢体抖动、肌阵挛、眼球震颤、共济失调、眼球运动障碍,无力或急性弛缓性麻痹,惊厥,可见脑膜刺激征,腱反射减弱或消失。且 EV71-IgM 阳性,排除其他肝炎病毒,EB 病毒等感染。同时选择本院体检的健康志愿者 30 例作为健康对照组,年龄 1~6 岁, EV-71 抗体阴性,无心、肝、肾、消化道病和神经等系统疾病及代谢异常史。

1.2 伦理和知情同意 研究经过本院伦理委员会审查并通过。所有研究对象在纳入研究前,均获得患儿监护人同意,并签署相关知情同意书。

### 1.3 材料与方法

1.3.1 主要试剂 PE/Cy 7 anti human CD56(Biolegend 公司), Cytotfix /CYTOPERM BUF KIT, CD3-PerCP 荧光单克隆抗体试剂和 CD8-FITC、hu perforin Alexa 647 Dta G9 和 hu Granzyme B PE MAB 均购自美国 BD 公司。

1.3.2 检测方法 流式细胞术检测 PRF 和 GrzB 表达水平:采集被研究者外周静脉血 2 mL,置于 EDTA 抗凝管中(12 h 内处理),采用人外周血淋巴细胞分离液分离单个核细胞(PBMC),加入以下表面抗体进行染色, anti-CD3-PerCP、anti-CD8-FITC、anti-CD56-APC (CD3 + CD8 + CTL 细胞、CD3-CD56 + NK 细胞)。常规固定、破膜、洗涤后加入 PE 标记的 PRF 或 GrzB 抗体,或其相应的同型抗体,室温下避光孵育 1 h 后洗涤,24 h 内上流式细胞仪(美国 BD 公司 FACS CANTOII 产品)进行分析,以 PRF 或 GrzB 阳性细胞率表示 PRF 或 GrzB 水平。

1.4 统计方法 应用 SPSS 18.0 软件处理数据,所得数据均采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CD8<sup>+</sup> T 细胞 PRF、GrzB 的变化 与正常对照组相比,普通型组和重型组 EV71 手足口病患儿急性期 CD8<sup>+</sup> T 细胞 PRF、GrzB 的表达水平均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。普通型组和重型组 EV71 手足口病恢复期患儿 CD8<sup>+</sup> T 细胞 PRF、GrzB 的表达水平较急性期明显下降,但仍高于正常组( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 普通型组和重型组 EV71 型手足口病患儿体内 CD8<sup>+</sup> T 细胞 PRF、GrzB 的变化

Table 1 Changes in PRF and GrzB in CD8<sup>+</sup> T cells in children with common and severe EV71 HFMD

组别		PRF	GrzB
普通型组( $n = 30$ )	急性期	23.71 ± 7.36 <sup>a</sup>	89.39 ± 5.72 <sup>a</sup>
	恢复期	7.52 ± 1.67 <sup>ab</sup>	71.54 ± 8.77 <sup>ab</sup>
重型组( $n = 30$ )	急性期	19.92 ± 5.57 <sup>a</sup>	79.29 ± 16.33 <sup>a</sup>
	恢复期	5.75 ± 1.39 <sup>ab</sup>	65.97 ± 5.79 <sup>ab</sup>
正常对照组( $n = 30$ )		3.20 ± 2.03	37.21 ± 6.14
	$F_1$	120.014	204.302
	$F_2$	173.788	429.492
	$F_3$	197.104	123.144
	$P_1, P_2, P_3$	0.000	0.000

$F_1$ : 正常对照组、普通型组急性期、重型组急性期比较;  $F_2$ : 正常组、普通型组急性期、普通型组恢复期比较;  $F_3$ : 正常对照组、重型组急性期、重型组恢复期比较。a: 与正常对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); b: 同一组恢复期与急性期相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )

### 2.2 NK 细胞 PRF、GrzB 的变化 与正常对照组

相比,普通型组和重型组 EV71 手足口病患儿急性期 NK 细胞 PRF、GrzB 的表达水平均升高,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。EV71 手足口病患儿急性期 NK 细胞 PRF、GrzB 的表达水平:普通型组和重型组比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。普通型组 EV71 手足口病恢复期患儿 NK 细胞中 PRF、GrzB 的表达水平较急性期虽稍升高,但差异仍无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。重型组 EV71 手足口病恢复期患儿 NK 细胞中 PRF、GrzB 的表达水平较急性期明显升高(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

**表 2** 普通型组和重型组 EV71 型手足口病患儿体内 NK 细胞 PRF、GrzB 的变化

**Table 2** Changes in PRF and GrzB in NK cells in children with common and severe EV71 HFMD

组别		PRF	GrzB
普通型组 ( $n = 30$ )	急性期	70.97 ± 5.80 <sup>a</sup>	79.02 ± 8.60 <sup>a</sup>
	恢复期	75.59 ± 5.90 <sup>a</sup>	83.89 ± 6.9 <sup>a</sup>
重型组 ( $n = 30$ )	急性期	71.13 ± 10.06 <sup>a</sup>	76.11 ± 8.98 <sup>a</sup>
	恢复期	87.62 ± 7.52 <sup>ab</sup>	92.42 ± 7.86 <sup>ab</sup>
正常对照组 ( $n = 30$ )		55.52 ± 13.77	56.59 ± 13.40
$F_1$		22.319	40.059
$F_2$		38.576	63.098
$F_3$		66.769	89.964
$P_1, P_2, P_3$		0.000	0.000

$F_1$ : 正常对照组、普通型组急性期、重型组急性期比较;  $F_2$ : 正常对照组、普通型组急性期、普通型组恢复期比较;  $F_3$ : 正常对照组、重型组急性期、重型组恢复期比较。a: 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); b: 同一组恢复期与急性期相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

EV71 是一种新型肠道病毒, 自 1969 年首次被分离鉴定后, 1973 年才被认为与手足口病相关。EV71 引起的手口足病以重型多见, 3 岁男性患儿为主<sup>[9]</sup>, 夏秋季节好发<sup>[10]</sup>。近几十年来, EV71 在全球连续暴发, 威胁到儿童的健康和生命<sup>[11]</sup>。

EV71 感染后可致机体极其复杂的免疫功能变化, 出现固有、细胞和体液免疫功能紊乱, 与疾病的进展及严重程度有关。而机体对病毒的有效识别和清除依赖于天然免疫和获得性免疫的相互补充和协作, 作为固有免疫的主要细胞 NK 细胞, 是机体免疫防御系统的第一道防线。研究<sup>[12]</sup>表明, EV71 感染导致外周血 NK 细胞数目显著减少, 功能减弱甚至缺陷, 从而加快病程的发展。另外, 细胞免疫在抗病毒中亦起到关键作用。EV71 感染后, 缺乏 CD4<sup>+</sup> 或

CD8<sup>+</sup> T 细胞的小鼠发生了更严重的疾病<sup>[13]</sup>。与正常对照组相比, 手足口病患儿总 T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞数量减少, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值降低, 表明 EV71 感染导致患儿细胞免疫功能紊乱, 重症病例尤为明显<sup>[3, 14-15]</sup>。由此可见, CD8<sup>+</sup> T 细胞和 NK 细胞在机体抗 EV71 中起着重要作用。

CD8<sup>+</sup> T 细胞和 NK 细胞中有两个主要的细胞杀伤机制, 一个是 Th 细胞表明抗原 Fas 配体 L (Fas L) 和 Fas 靶细胞表面抗原的相互作用<sup>[16]</sup>。另一个是颗粒胞外分泌通路, PRF 以及其他介质从细胞内释放出来后, 与靶细胞膜结合, 并嵌入膜内, 形成一个中空的多聚体, 导致膜的完整性受损, 水分子、离子以及其他的小分子进入靶细胞内, 使细胞内渗透压改变而造成细胞死亡<sup>[17]</sup>。颗粒酶在 PRF 协同作用下通过颗粒胞吐作用 (granule exocytosis) 释放进入靶细胞之间形成的免疫突触中, 然后进入靶细胞的细胞质, 并在细胞核聚集, 诱导一种叫天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspases) 的非依赖性细胞死亡, 迅速清除细胞内的病原体和有病变的细胞<sup>[18]</sup>。研究表明, PFN 基因敲除小鼠感染流感病毒 A 后, 肺内病毒大量繁殖, 病毒清除时间延长, NK 和 CTL 杀伤活性显著降低, 提示 PFN 在控制流感病毒感染中起着重要作用<sup>[19]</sup>, PRF 表达的不足, 与 HBV 感染慢性化<sup>[19]</sup> 和 HIV<sup>[20]</sup> 感染相关。由此可见, PRF 及 GrzB 介导的细胞杀伤及细胞毒性作用在病毒感染等疾病中起着重要作用。而目前尚未见 PRF 及 GrzB 在 EV71 手足口病中作用的研究。

本研究中, 60 例手足口病患儿, 经积极抗病毒和对症支持等治疗后, 均痊愈出院。普通型和重型手足口病患儿体内 CD8<sup>+</sup> T 和 NK 细胞中 PRF、GrzB 的水平明显升高, 机体抗病毒作用的增强, 有利于病情恢复, 而重型手足口病患儿体内 CD8<sup>+</sup> T 细胞 PRF 及 GrzB 有所升高, 但低于普通型手足口病患儿, 由于机体抵抗病毒能力不足, 导致病毒大量复制及扩散, 免疫细胞持续活化, 大量炎症因子释放, 加重机体组织损伤, 从而导致患儿病情加重。随着患儿病情恢复, 普通型和重型手足口病患儿体内, CD8<sup>+</sup> T 细胞中 PRF 及 GrzB 的水平有所下降, 但仍高于正常组; NK 细胞中 PRF、GrzB: 重型组恢复期较急性期明显升高, 而在普通对照组中无差异, 由此可见, CD8<sup>+</sup> T 和 NK 细胞在机体恢复期起到持续抗病毒作用, 有助于病情的恢复, 尤其是 NK 细胞 PRF、GrzB 水平的升高, 在重型手足口病患儿恢复期中起着重要作用。

综上所述, EV71 手足口病患儿体内免疫功能紊乱, 重型 EV71 手足口病患儿的免疫功能紊乱更加明显, 早期检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 PRF、GrzB 水平, 或许可作为判断疾病严重程度的临床指标。本课题由于时间及客观因素并未收集到危重型手足口病病例, 无法全面了解其在 EV71 手足口病中的作用, 有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Wu JS, Zhao N, Pan H, et al. Patterns of polymorphism and divergence in the VP1 gene of enterovirus 71 circulating in the Asia-Pacific region between 1994 and 2013[J]. *J Virol Methods*, 2013, 193(2): 713-728.
- [2] 王经伟, 孙中运. 手足口病患儿外周血淋巴细胞亚群及血清 IL-6、IL-10 变化的研究[J]. *天津医药*, 2012, 40(9): 928-930.
- [3] 陈大字, 覃培棚, 郑敏. 儿童手足口病免疫球蛋白与 T 淋巴细胞亚群的表达与价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(7): 928-929.
- [4] 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.
- [5] 谢金纯, 林广裕, 陆学东, 等. 手足口病患儿血清细胞因子水平及其与病情的相关性[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(10): 756-759.
- [6] 王宇婧, 程邦宁. 肠道病毒 EV71 手足口病病原学及免疫功能改变研究现状[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(2): 127-131.
- [7] 何维. *医学免疫学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 152, 187-193.
- [8] 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.
- [9] 李阳桦, 陈艳伟, 吴疆, 等. 2010-2014 年北京市 0-14 岁儿童法定报告病毒性出疹性疾病发病特征分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2015, 22(4): 246-249.
- [10] 肖金玲, 刘嘉. 北京市海淀区温泉镇 2011-2013 年手足口病病例流行病学特征[J]. *国际病毒学杂志*, 2015, 22(z1): 62-63.
- [11] Shih SR, Stollar V, Li ML. Host factors in enterovirus 71 replication[J]. *J Virol*, 2011, 85(19): 9658-9666.
- [12] Xie J, Jiao Y, Qiu Z, et al. Significant elevation of B cells at the acute stage in enterovirus 71-infected children with central nervous system involvement[J]. *Stand J Infect Dis*, 2010, 42(11-12): 931-935.
- [13] 尹程程, 李保胜, 蔡青, 等. EV71 感染对免疫系统影响的研究进展[J]. *国际病毒学杂志*, 2016, 23(3): 215-218.
- [14] 曾慧慧, 顾燕, 段雪飞, 等. 手足口病患儿外周血 T 淋巴细胞亚群的临床研究[J]. *中华传染病杂志*, 2010, 28(2): 82-85.
- [15] Khong WX, Foo DG, Trasti SL, et al. Sustained high levels of interleukin-6 contribute to the pathogenesis of enterovirus 71 in neonate mouse model[J]. *J Virol*, 2011, 85(7): 3067-3076.
- [16] Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 917-924.
- [17] Laforge M, Bidere N, Carmona S, et al. Apoptotic death concurrent with CD3 stimulation in primary human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes: a role for endogenous granzyme B[J]. *J Immunol*, 2006, 176(7): 3966-3977.
- [18] Qin HY, Mukherjee R, Lee-Chan E, et al. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity[J]. *Int Immunol*, 2006, 18(7): 1001-1015.
- [19] 郑纪山, 顾海涛, 张锦海. 穿孔素/颗粒酶与病毒感染[J]. *传染病信息*, 2010, 23(1): 61-63.
- [20] 孙俊. 中医药与 HIV/AIDS 感染中的穿孔素研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2013, 34(12): 82-83.

(本文编辑: 左双燕)