

免疫球蛋白对 HFMD 合并 AFP 患儿的保护作用及机制*

李红梅¹,肖农²,陈玉霞²,刘 伟²

(1. 重庆市红十字会医院儿科 400020; 2. 重庆医科大学附属儿童医院神经康复科 400014)

[摘要] **目的** 研究静脉注射人血免疫球蛋白(IVIG)对手足口病(HFMD)合并急性弛缓性瘫痪(AFP)患儿的保护作用及免疫学机制。**方法** 受试者分为 HFMD 合并 AFP 免疫球蛋白治疗前组(治疗前组),免疫球蛋白治疗组(IVIG 组),无免疫球蛋白治疗组(无 IVIG 组)和健康对照组(对照组),各 30 例。采用手法肌力评定法(MMT)检测患儿肌力,采用生物素双抗原夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组血清抗神经节苷脂 M1(GM1)抗体、白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)。结果 IVIG 组较治疗前组和无 IVIG 组的肌力恢复明显。同时,抗 GM1 抗体、IL-6、IL-8、TNF- α 在 3 组 HFMD 合并 AFP 患儿中均较对照组高,而 IVIG 组抗 GM1 抗体、IL-6、IL-8、TNF- α 较治疗前组和无 IVIG 组显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** IVIG 对 HFMD 合并 AFP 患者有明显的治疗作用,其机制可能通过拮抗高水平抗 GM1 抗体、IL-6、IL-8、TNF- α 等细胞因子,实现免疫调节作用。

[关键词] 手足口病;免疫球蛋白;急性弛缓性瘫痪;细胞因子

[中图分类号] R725.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)13-1761-03

Protective effects of IVIG on hand foot and mouth disease complicating AFP and its mechanism*

Li Hongmei¹, Xiao Nong², Chen Yuxia², Liu Yi²

(1. Department of Paediatrics, Chongqing Red Cross Hospital, Chongqing 400020, China; 2. Department of Neurological Rehabilitation, Affiliated Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective effects of intravenous immunoglobulin (IVIG) on hand foot and mouth disease (HFMD) complicating acute flaccid paralysis (AFP), and to explore its immunological mechanism. **Methods** The subjects were divided into four groups in this study, including 30 cases of HFMD complicating AFP before IVIG treatment (before IVIG group), 30 cases of HFMD complicating AFP with IVIG treatment group (IVIG group), 30 cases of HFMD complicating AFP without IVIG treatment group (without IVIG group), and 30 healthy controls (normal control group). The manual muscle test (MMT) was carried out to detect the muscle strength, the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to test the expression of anti-GM1 antibody, IL-6, IL-8 and TNF- α . **Results** The muscle strength in the IVIG group was significantly improved when compared with that before IVIG and without IVIG groups. Moreover, the expressions of anti-GM1 antibody, IL-6, IL-8 and TNF- α in the IVIG group, before IVIG group and without IVIG group were increased when compared with those in the normal control group. Additionally, the expressions of anti-GM1 antibody, IL-6, IL-8 and TNF- α in the IVIG group were decreased compared with those in the before IVIG group and without IVIG groups ($P < 0.05$). **Conclusion** IVIG may play an important immune-related role in relieving symptoms in children with severe HFMD complicating AFP through inhibiting the high levels of the cytokines including anti-GM1 antibody, IL-6, IL-8 and TNF- α .

[Key words] hand, foot and mouth disease; immunoglobulin; acute flaccid paralysis; cytokine

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是肠道病毒引起的传染病,多发生于学龄前儿童,多数具有自限性。然而少数重症病例中,患儿可表现出严重的神经并发症,如急性弛缓性瘫痪(acute flaccid paralysis, AFP)^[1-2]。如果病情发展快,导致死亡。目前,治疗重症小儿 HFMD 缺乏特效药物^[3]。作者的前期研究发现 IVIG 治疗 HFMD 合并 AFP 患儿,具有减轻症状、缩短病程、改善预后的临床疗效^[4]。同时,多项研究报道 HFMD 合并 AFP 的发病可能与病毒的直接损伤和免疫性损伤有关,免疫异常参与了 HFMD 合并 AFP 的病理生理过程^[5-6]。重症 HFMD 常由 EV71 型肠道病毒感染所致,静脉注射人血免疫球蛋白(intravenous Immunoglobulin, IVIG)可作为重症肠道病毒感染的免疫治疗方法^[7]。然而 IVIG 治疗 HFMD 合并 AFP 的确切免疫学机制目前尚不清楚。本研究旨在探讨 IVIG 在 HFMD 合并 AFP 的作用及免疫学机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 8 月至 2014 年 9 月在重庆医科大学附属儿童医院和重庆市红十字会医院收治的 260 例 HFMD 患儿中选择 60 例(男 30 例,女 30 例)严重程度基本对等的 HFMD 合并 AFP 患儿及 30 例年龄、性别相当的健康儿童为研究对象,年龄在 2~6 岁,患儿均符合卫生部制定的《手足口病诊疗指南(2010 版)》^[8]和 AFP 诊断标准^[9]。同时均排除神经系统、免疫系统等基础疾病。拟给予 IVIG 治疗的患儿入院后 2 h 内(IVIG 治疗前)和注射 IVIG $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 后 24 h 内抽取血样,无 IVIG 治疗的患儿于常规治疗 5 d 后 24 h 内抽取血样。样本共分为 4 组,分别为治疗前组、IVIG 组、无 IVIG 治疗组和健康对照组。研究对象监护人签署知情同意书,所有研究均获重庆市红十字会医院医学研究伦理委员会审批同意。

1.2 肌力检测 采用手法肌力评定法检测患儿肌力。按照肌力的情况分为 0~5 级。

1.3 样本收集及细胞因子测定 各组样本抽取静脉血 3 mL, 2 000 r/min 离心 8 min, 分离血清标本保存于 -80 °C 备用。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中抗 GM1 抗体、白细胞介素 (IL)-6、IL-8 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平, 操作步骤严格按照说明书进行。IL-6、IL-8 和 TNF- α 试剂盒购于南京建成生物工程研究所, 抗 GM1 抗体试剂盒购于上海研吉生物有限公司。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计分析, 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 4 组间比较用单因素方差分析, 两独立样本均数比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IVIG 促进 HFMD 合并 AFP 患儿患肢肌力恢复 手法肌力评定法检测各组 HFMD 合并 AFP 患儿患肢肌力结果显

示, IVIG 组患肢肌力级数较治疗前组和无 IVIG 组显著提高 ($P<0.05$), 见表 1。以上提示, IVIG 治疗是缓解 HFMD 合并 AFP 患儿主要症状的有效方法。

表 1 HFMD 合并 AFP 患儿患肢肌力比较 [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级
治疗前组	30	26(86.67)	4(13.33)	0	0	0	0
IVIG 组	30	7(23.33) ^a	16(53.33) ^a	7(23.33)	0	0	0
无 IVIG 组	30	19(63.33) ^b	8(26.67)	3(10.00)	0	0	0

^a $P<0.05$, 与治疗前组比较; ^b $P<0.05$, 与无 IVIG 组比较。

2.2 免疫学相关细胞因子变化 ELISA 结果显示在各组 HFMD 合并 AFP 患儿免疫学相关细胞因子抗 GM1 抗体、IL-6、IL-8 和 TNF- α 均较健康对照组增高 ($P<0.05$)。然而, IVIG 组抗 GM1 抗体、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的水平均较治疗前组和无 IVIG 组减低 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 各组 HFMD 合并 AFP 患儿细胞因子变化的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	抗 GM1 抗体(A)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
治疗前组	30	1.14 \pm 0.22 ^a	137.58 \pm 22.75 ^a	123.84 \pm 19.29 ^a	127.53 \pm 28.59 ^a
IVIG 组	30	0.77 \pm 0.25 ^{abc}	106.68 \pm 26.91 ^{abc}	117.43 \pm 21.76 ^{abc}	94.64 \pm 27.45 ^{abc}
无 IVIG 组	30	1.12 \pm 0.21 ^a	129.03 \pm 24.15 ^a	121.96 \pm 20.47 ^a	115.91 \pm 26.37 ^a
健康对照组	30	0.53 \pm 0.16 ^b	74.86 \pm 20.57 ^b	80.57 \pm 18.85 ^b	74.86 \pm 25.64 ^b

^a: $P<0.01$, 与健康对照组比较; ^b: $P<0.01$, 与治疗前组比较; ^c: $P<0.05$, 与无 IVIG 组比较。

3 讨论

目前 HFMD 合并 AFP 无特效抗病毒治疗方法, 缺乏有效的治疗手段。IVIG 是从健康人血清中提取的混合的正常多克隆 IgG, 包含有多反应性天然抗体, 针对异型抗原的抗体, 能中和毒素, 调节炎性介质的产生, 改善机体内环境^[10]。其机制主要通过以下 3 种途径发挥作用^[11]: (1) IVIG 含有针对病毒自身的中和抗体, 可以直接作用于病毒, 使其失去感染性^[12]; (2) 其 IgG Fc 段具有免疫调节作用, 能竞争性中和 Fc 受体, 通过 Fc 段唾液酸化, 诱导抗炎反应^[13]; (3) IVIG 含有针对 IL-6、IL-8、干扰素等细胞因子的抗体^[14]。在我们的前期研究中发现, IVIG 可缓解 HFMD 合并 AFP 患者临床症状, 缩短病程^[4]。本研究进一步发现, IVIG 治疗后的 HFMD 合并 AFP 患者患肢肌力级数较治疗前组和无 IVIG 组显著提高。由此提示, IVIG 是治疗 HFMD 合并 AFP 的一个有效药物。然而, IVIG 治疗 HFMD 合并 AFP 的具体机制如何, 值得进一步研究。

研究发现, 重症 HFMD, 尤其 EV71 感染的 HFMD, 其发病机制可能与病毒的直接侵犯和免疫性损伤有关, 失调的炎症反应和免疫异常参与了重症 HFMD 患儿的病理过程^[5-6]。Chen 等^[15]在小鼠实验研究中发现瘫痪的病因机制同脊髓灰质炎相似, EV71 可以沿神经传导, 病毒首先于脊髓低位节段特别是前角出现并迅速增加, 之后逐渐扩散至脊髓高位节段和脑组织。同时, 有研究发现一些 HFMD 合并 AFP 患儿的神经传导速度结果异常, 提示 HFMD 合并 AFP 存在周围神经损害。以上提示 HFMD 合并 AFP 可能与病毒引起的自身免疫反应有关。因此, 免疫异常可能是 HFMD 合并 AFP 的重要机制之一。

近年来, 随着抗神经节苷脂抗体参与免疫介导的周围神经疾病如急性吉兰-巴雷综合征、多灶运动神经病、慢性炎性脱髓鞘性多发周围神经病等疾病的研究逐渐不断深入, 其在免疫介导的神经疾病中的作用引起关注^[16]。神经节苷脂种类很多, 主

要根据其糖基结合唾液酸分子的数目及部位进行分类, 含一个分子唾液酸称为 GM, 含 2、3、4 个唾液酸分子分别为 GD、GT 和 GQ; 又根据所含己糖的数目和种类分为 GM1、GM2、GM3、GM4, 其中 GM1 是神经膜最丰富的神经节苷脂之一^[17]。GM1 参与的免疫异常可能在 IVIG 治疗 HFMD 合并 AFP 中发挥作用。

本研究结果显示, 抗 GM1 抗体在 HFMD 合并 AFP 患者中显著增高, 而给予 IVIG 治疗, 其浓度组较治疗前和无 IVIG 治疗组显著下调, 提示 IVIG 可拮抗 HFMD 合并 AFP 患儿高水平抗 GM1 抗体, 调节免疫异常。神经节苷脂广泛分布于全身各组织细胞膜的外表面, 以神经系统含量最丰富, 由碳水化合物和脂质组成的酸性糖酯, 参与神经细胞膜的构成, 并维持其稳定性, 对细胞新陈代谢及营养有重要意义。正常情况下, 神经节苷脂不受免疫系统的攻击; 当感染、炎性损伤等各种刺激下, 造神经节苷脂抗原成分暴露, 体内不依赖 T 细胞的 B 淋巴细胞即产生抗神经节苷脂的自身抗体, 同时激活补体, 形成免疫复合物并诱导炎性细胞因子的产生, 最终导致神经轴索及髓鞘的病变^[18]。

外周血细胞因子检测显示, IL-6、IL-8、TNF- α 在 HFMD 合并 AFP 患者中较对照组显著增高, 而给予 IVIG 治疗, 其浓度组较治疗前和无 IVIG 治疗组呈同步减低。有研究报道 IL-6、IL-8、TNF- α 均由活化的免疫细胞释放的介质, 可直接启动炎症反应过程或通过刺激其他促炎症因子的大量释放间接启动炎症反应过程, 能够导致组织、器官的炎症损伤甚至衰竭、组织坏死, 在细胞因子网络中起“核心”作用^[19-20], 本研究表明 IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子参与 HFMD 合并 AFP 的发生发展, IVIG 的治疗作用可能通过抑制 IL-6、IL-8、TNF- α 等细胞因子实现。

抗 GM1 抗体、IL-6、IL-8 和 TNF- α 细胞因子的增加是参与 HFMD 合并 AFP 患儿的发病的重要原因, IVIG 对 HFMD

合并 AFP 患儿的治疗作用可能是通过降低免疫学相关细胞因子 GM1 抗体、IL-6、IL-8 和 TNF- α 细胞因子的表达发挥作用。

综上所述,IVIG 可部分恢复 HFMD 合并 AFP 患儿患肢肌力,其机制可能通过拮抗 GM1、IL-6、IL-8、TNF- α 等重要炎症因子,从而调节自身免疫应答,促进疾病缓解。

参考文献

- [1] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(1): 91-107.
- [2] Pérez-Vélez CM, Anderson MS, Robinson CC, et al. Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a diagnostic challenge [J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(8): 950-957.
- [3] 杨秀亭. 重症手足口病分组监护治疗 90 例分析[J]. 中国实用医药, 2011, 6(13): 69-70.
- [4] 李红梅. 免疫球蛋白治疗手足口病合并迟缓性瘫痪的临床疗效[J]. 中国药房, 2014, 25(22): 2059-2060.
- [5] 张海瑛, 韩宜姚. EV71 感染手足口病患儿细胞及体液免疫功能研究[J]. 中国现代医生, 2013, 51(9): 28-30.
- [6] 付丹, 李成荣, 何颜. 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.
- [7] Wang SM, Liu CC. Enterovirus 71: Epidemiology, pathogenesis and management [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7(6): 735-742.
- [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] Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD. Harrison's principles of internal medicine [M]. 2 ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1994: 128.
- [10] Wang SM, Lei HY, Huang MC, et al. Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis[J]. J Clin Virol, 2006, 37(1): 47-52.
- [11] 曹瑞源, 韩剑峰, 秦鄂德等. 重症手足口病免疫球蛋白治

疗的机理探讨[J]. 生物工程学报, 2011, 27(5): 712-716.

- [12] Cao R, Han J, Deng Y, et al. Presence of high-titer neutralizing antibodies against enterovirus 71 in intravenous immunoglobulin manufactured from Chinese donors [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(1): 125-126.
- [13] Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation [J]. Science, 2006, 313(5787): 670-673.
- [14] Wang SM, Ho TS, Shen CF, et al. Enterovirus 71, one virus and many stories [J]. Pediatr Neonatol, 2008, 49(4): 113-115.
- [15] Chen CS, Yao YC, Lin HY, et al. Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice [J]. J Virol, 2007, 81(17): 8996-9003.
- [16] Yuki N, Watanabe H, Nakajima T, et al. IVIG blocks complement deposition mediated by anti-GM1 antibodies in multifocal motor neuropathy [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011, 82(1): 87-91.
- [17] 吴小坤, 冯加纯, 邓晖. 吉兰-巴雷综合征相关抗神经节苷脂抗体研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(12): 1133-1135.
- [18] Shahrizaila N, Yuki N. The role of immunotherapy in Guillain-Barre' syndrome: understanding the mechanism of action [J]. Expert Opin. Pharmacother, 2011, 12(10): 1551-1560.
- [19] Gong X, Zhou J, Zhu W, et al. Excessive proinflammatory cytokine and chemokine responses of human monocyte-derived macrophages to enterovirus 71 infection [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12(15): 224.
- [20] 李维春, 武荣, 张克昌, 等. 不同病情手足口病患儿血清 IL-1 β 、IL-10 和 TNF- α 水平观察[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(3): 524-525.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2016-01-03)

(上接第 1760 页)

- [4] 高素颖, 颜应琳, 李芳, 等. 河北省任丘市老年居民颈动脉粥样硬化危险因素分析[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(11): 1127-1132.
- [5] 李国娟, 陈宏, 于化鹏, 等. 初诊 2 型糖尿病并急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化的影响因素[J]. 广东医学, 2015(5): 746-748.
- [6] Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis[J]. N Engl J Med, 1998, 339(20): 1415-1425.
- [7] 杨欣. 颈动脉粥样硬化危险因素及意义的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(2): 239-241.
- [8] 袁英, 常富业, 黄曼维, 等. 多重危险因素干预与老年颈动脉粥样硬化斑块关系的研究[J]. 中华老年医学杂志, 2013, 32(10): 1051-1054.
- [9] 罗蓉, 周怡, 吴秀山. 高血压患者颈动脉粥样硬化的危险因素[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(11): 2628-2630.

- [10] 赖杰. 25 羟维生素 D3 与 2 型糖尿病患者颈动脉内膜中层厚度的相关性研究[J]. 中国心血管病研究, 2014, 12(5): 465-469.
- [11] 祖源, 王琪, 张丽丽, 等. 维生素 D 与心血管疾病[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(11): 1021-1023.
- [12] 汪南平, 王新风, 邓秀玲. 维生素 D 在心血管疾病中的作用[J]. 生理科学进展, 2013, 44(3): 223-226.
- [13] 骆莹莹, 姚树桐, 王大新, 等. 氧化应激在动脉粥样硬化发生发展中作用的研究新进展[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2013, 21(1): 46-50.
- [14] 杨丽珍, 张国刚. 氧化应激与动脉粥样硬化[J]. 医学与哲学, 2013, 34(10): 54-56, 84.
- [15] 郑振, 李勤, 李世云. 不同维生素 D 制剂对育龄女性血清甲状旁腺激素及总抗氧化能力的影响[J]. 中华临床营养杂志, 2014, 22(5): 312.

(收稿日期: 2015-11-17 修回日期: 2015-12-19)