

手足口病患儿氧化应激指标及外周血淋巴细胞百分比检测结果分析

刘彦明 曹越 吴勤如 吴良银 何凤屏

基金项目: 韶关市卫生局基金资助项目(Y15037)

作者单位: 512026 韶关市, 粤北人民医院检验科(刘彦明 吴勤如 吴良银 何凤屏)

512026 韶关市, 韶关学院医学院医学技术系(曹越)

【摘要】 目的 探讨手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)患儿血清氧化应激指标水平变化及外周血淋巴细胞免疫分型检测的临床意义。方法 选择 2014 年 3 月至 2015 年 6 月于我院就诊的 218 例 HFMD 患儿, 其中普通 HFMD 患儿 122 例, 重症 HFMD 患儿 96 例, 同期选择我院 100 例健康体检儿童为健康对照组, 检测受试儿童血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)含量及外周血淋巴细胞免疫分型, 对检测结果进行统计学分析。结果 健康对照组、普通 HFMD 组、重症 HFMD 组患儿血清 MDA、SOD、ox-LDL 的检测结果显示均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。随着病情的加重, MDA、ox-LDL 水平呈升高趋势, SOD 水平呈下降趋势, 且各指标各组间两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。健康对照组、普通 HFMD 组、重症 HFMD 组外周血 Th 细胞、Ts 细胞、NK 细胞百分比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 而 B 细胞百分比各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着病情的加重, 外周血 Th 细胞、Ts 细胞、NK 细胞百分比呈现下降趋势, 且各指标组间两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。HFMD 患儿血清中 MDA、SOD 及 ox-LDL 的含量与外周血各淋巴细胞百分比均呈明显的正相关性 (r 均 > 0.700 , P 均 < 0.05)。结论 HFMD 患儿血清中 MDA、SOD、ox-LDL 的含量及外周血淋巴细胞百分比与 HFMD 病情的严重程度相关; 患儿血清中 MDA、SOD、ox-LDL 的含量和外周血 Th、Ts、NK 细胞百分比均有相关性。

【关键词】 手足口病; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 氧化型低密度脂蛋白; 淋巴细胞百分比

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.002

Oxidative stress and peripheral blood lymphocyte percentage analysis in HFMD children

LIU Yan-ming¹, CAO Yue², WU Qin-ru¹, et al. ¹Department of Clinical Laboratory, Yuebei People's Hospital, Shaoguan 512026, China ²Department of Medical Technology, Medical College of Shaoguan University, Shaoguan 512026, China

【Abstract】 **Objective** To explore the clinical significance of serum malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) levels and peripheral blood lymphocyte percentage changes in patients with hand-foot-and-mouth disease (HFMD). **Methods** 122 cases common (common HFMD group) and 96 cases severe (severe HFMD group) HFMD children and 100 cases healthy children in our hospital from March 2014 to June 2015 were collected. Serum MDA, SOD, ox-LDL levels and peripheral blood lymphocyte percentage were measured, and the results were analyzed statistically. **Results** There were statistical significance in the differences of MDA, SOD and ox-LDL levels among control group, common and severe HFMD group (P all < 0.05). The MDA and ox-LDL levels showed increasing trend, and SOD showed decrease trend along with pathogenetic condition development. There were statistical significance in the differences of MDA, SOD and ox-LDL levels between each two groups (P all < 0.05). There were statistical significance in the differences of Ts cell, Th cell and NK cell percentage among control group, common and severe HFMD group (P all < 0.01), except B cell. The Ts cell, Th cell and NK cell percentage showed decrease trend along with pathogenetic condition development. There were statistical significance in the differences of Ts cell, Th cell and NK cell percentage between each two groups (P all < 0.05). The correlation coefficient between peripheral blood lymphocyte percentages and serum levels of MDA, SOD, ox-LDL were all higher than 0.700 (P all < 0.05). **Conclusion** Serum MDA, SOD, ox-LDL levels and peripheral blood lymphocyte percentage are closely correlated with the progress of HFMD. Serum MDA, SOD and ox-LDL content have a cer-

tain correlation with the percentages of peripheral Th cell, Ts cell and NK cells.

【Key words】 Hand-foot-and-mouth disease; Malondialdehyde; Superoxide dismutase; Oxidized low density lipoprotein; Lymphocyte percentage

手足口病 (hand-foot-and-mouth disease, HFMD) 是由肠道病毒引起的急性传染病, 以柯萨奇病毒 A 组 16 型 (coxsachievirus A16, CoxA16) 及肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 等多见。该病传染性强、发病快, 近年来重症病例和死亡病例的报道逐渐增多。根据 2008 年至 2011 年广东省韶关市 HFMD 流行病学调查报告分析发现, 死亡病例均为 EV71 型, 并且出现了毒株转变的情况。部分病例早期症状轻微但病情发展迅速, 给重症 HFMD 患儿的救治带来了较大的困难^[1-3]。相关研究^[4]发现, 肠道病毒感染可以导致红细胞的氧化应激损伤和免疫功能损伤。国内外研究^[5-7]发现, 重型 HFMD 患儿病程中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞两个亚群凋亡率与患儿病程中心肺、神经及循环系统衰竭高度相关。丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 广泛应用于氧化损伤的检测^[8]。本文研究从 HFMD 患儿的氧化应激损伤和早期免疫损伤研究出发, 通过检测 HFMD 患儿的血清脂质过氧化指标 MDA、SOD、ox-LDL 以及外周血淋巴细胞比例来分析其与 HFMD 病情发生发展的相关性, 现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2014 年 3 月至 2015 年 6 月于我院就诊的 HFMD 患儿 218 例, 均经 PCR 荧光探针法检测确诊。根据临床表现分为普通 HFMD 组和重症 HFMD 组, 其中普通 HFMD 患儿 122 例, 男 88 例, 女 34 例, 平均年龄 (3.9±0.8) 岁, 重症 HFMD 患儿 96 例, 男 66 例, 女 30 例, 平均年龄 (3.5±0.7) 岁。普通 HFMD 判断标准: 急性起病, 潜伏期平均 3-5 d, 发热, 口腔黏膜出现散在疱疹, 手足臀部出现斑丘疹、疱疹, 疱疹周围有炎性红晕, 疱内液体较少, 多在 1 w 内痊愈, 预后良好。重症 HFMD 判断标准: 患儿病情进展迅速, 发病 1-5 d 左右出现脑膜炎、脑炎 (以脑干脑炎最为凶险)、脑脊髓炎、肺水肿、循环障碍等严重并发症。另选择我院儿保科健康体检合格的正常儿童 100 例为健康对照组, 男 80 例, 女 20 例, 平均年龄 (4.1±0.5) 岁。三组受检儿童间性别比例和年龄差异经平衡性检验, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法 采集受试儿童空腹静脉血检测 MDA、SOD、ox-LDL 水平及淋巴细胞免疫分型。MDA 检测采用硫代巴比妥酸法, SOD 检测采用黄嘌呤氧化酶法, 以上两种试剂盒均购于南京建成生物技术公司。ox-LDL 检测采用酶联免疫法, 试剂盒购于美国 Trinity biotech 公司。外周血淋巴细胞免疫分型检测采用 BD MultiTEST 淋巴细胞亚群分析试剂盒处理后, 上 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测分析, 所有检测均严格按照操作说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间计量资料的比较采用方差分析, HFMD 患儿血清 MDA、SOD、ox-LDL 水平与外周血各淋巴细胞百分比的相关性分析采用 Pearson 相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 健康对照组、普通 HFMD 组、重症 HFMD 组受检儿童血清中 MDA、SOD、ox-LDL 的检测 健康对照组、普通 HFMD 组、重症 HFMD 组患儿血清中 MDA、SOD、ox-LDL 的检测结果显示均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。随着病情的加重血清中 MDA、ox-LDL 检测结果呈升高趋势, SOD 检测结果呈下降趋势, 且各指标组间两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 见表 1。

2.2 健康对照组、普通 HFMD 组、重症 HFMD 组受检儿童外周血淋巴细胞百分比检测结果 健康对照组、普通 HFMD 组、重症 HFMD 组外周血 Th 细胞、Ts 细胞、NK 细胞百分比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 而 B 细胞百分比各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着病情的加重, 外周血 Th 细胞、Ts 细胞、NK 细胞百分比均呈现下降趋势, 且各指标各组间两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 见表 2。

2.3 HFMD 患儿血清 MDA、SOD、ox-LDL 含量与外周血各淋巴细胞百分比的相关性分析 如表 3 所示, HFMD 患儿血清 MDA、SOD、ox-LDL 含量与外周血各淋巴细胞百分比均呈正相关性 (r 均 > 0.700 , P 均 < 0.05)。

3 讨论

2008 年 5 月卫生部将 HFMD 纳入法定传染病

表 1 健康对照组、普通 HFMD 组及重症 HFMD 组受检儿童血清中 MDA、SOD、ox-LDL 的检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD(10^3 nU/L)	ox-LDL(mg/L)
健康对照组	100	85.01 \pm 0.56	148.50 \pm 34.60	0.79 \pm 0.28
普通 HFMD 组	122	5.62 \pm 0.99*	110.50 \pm 24.80*	1.35 \pm 0.36*
重症 HFMD 组	96	10.57 \pm 1.60**	89.64 \pm 17.80**	2.38 \pm 0.48**
F 值	-	16.75	26.92	13.86
P 值	-	0.008	0.000	0.002

注: *与健康对照组比较, $P_{\text{普通 HFMD 组}} = 0.002, 0.000, 0.006$; $P_{\text{重症 HFMD 组}} = 0.005, 0.000, 0.006$; # 与普通 HFMD 组比较, $P = 0.004, 0.000, 0.008$

表 2 健康对照组、普通 HFMD 组及重症 HFMD 组受检儿童外周血淋巴细胞百分比检测结果比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	例数	Th 细胞	Ts 细胞	NK 细胞	B 细胞
健康对照组	100	35.60 \pm 5.60	26.05 \pm 3.10	12.88 \pm 3.16	18.58 \pm 5.25
普通 HFMD 组	122	22.55 \pm 6.22*	21.65 \pm 4.35*	7.98 \pm 2.48*	43.92 \pm 10.50
重症 HFMD 组	96	13.60 \pm 4.11**	9.90 \pm 3.60**	5.20 \pm 1.60**	42.36 \pm 10.68
F 值	-	20.25	28.52	23.36	2.02
P 值	-	0.005	0.000	0.002	0.86

注: *与健康对照组比较, $P_{\text{普通 HFMD 组}} = 0.023, 0.002, 0.036$; $P_{\text{重症 HFMD 组}} = 0.026, 0.000, 0.003$; # 与普通 HFMD 组比较, $P = 0.015, 0.001, 0.026$

表 3 HFMD 患儿血清 MDA、SOD、ox-LDL 含量与外周血各淋巴细胞百分比相关系数 r 值

指标	Th 细胞	Ts 细胞	NK 细胞
MDA	0.925	0.868	0.862
SOD	0.902	0.924	0.784
ox-LDL	0.895	0.935	0.702

管理后, 我院一直把该病列为重点监测对象。HFMD 是由肠道病毒感染引起的一种急性传染性疾病, 以 EV71 型和 CoxA16 型为主。根据我省、市疾病预防控制中心流行病学分析, 我市的 HFMD 感染主要是以 EV71 型为主。早期发现的普通病例治疗效果好、预后好。但一些没有能够及时发现的重症病例是导致 HFMD 患儿死亡的主要原因^[4,5]。

本文研究结果显示, 健康对照组、普通 HFMD 组和重症 HFMD 组间血清 MDA、ox-LDL 及 SOD 水平差异均有统计学意义(P 均 < 0.05), 且随着 HFMD 病情的加重, 血清 MDA、ox-LDL 含量升高、SOD 含量下降, 且各组间两两比较, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05), 这说明肠道病毒感染后随着病情的加重脂质氧化损伤随之增加, 机体抗氧化损伤能力减弱, 同时提示 HFMD 患儿体内存在明显的氧化应激损伤。上述研究结果与相关研究^[4]结果肠道病毒感染可以导致细胞的氧化应激损伤相一致。

本文研究结果显示, 健康对照组、普通 HFMD 组和重症 HFMD 组间外周血 Th 细胞、Ts 细胞、NK

细胞百分比差异均有统计学意义(P 均 < 0.05), 且随着 HFMD 病情的加重, 外周血 Th 细胞、Ts 细胞、NK 细胞百分比呈下降趋势, 各组间两两比较, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。提示 HFMD 患儿机体的细胞免疫功能受抑制, 且与病情的严重程度相关。上述结果与 Lui 等^[9]报道的重症 HFMD 患儿的 CD4⁺、CD8⁺T 细胞损伤严重的结果相一致。

经 Pearson 相关性分析结果显示, HFMD 患儿血清 MDA、SOD、ox-LDL 水平与外周血 Th、Ts、NK 细胞百分比之间均呈明显的正相关性 (r 均 > 0.700 , P 均 < 0.05), 进一步说明 HFMD 患儿体内存在明显的氧化应激损伤及免疫功能损伤, 二者均与 HFMD 患儿病情严重程度相关。相关性分析结果提示二者可能互为影响因素, 影响 HFMD 患儿病程的发生发展, 目前国内外尚未见相关报道。

Zhu 等^[4]研究认为肠道病毒 CoxA16 型感染可以导致红细胞的氧化应激损伤和免疫功能损伤; Ou 等^[10]研究发现肠道病毒 EV71 型感染和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏有关系, 而该酶的缺乏直接影响到机体的氧化还原平衡; Wang 等^[11]研究发现抗氧化应激损伤治疗可以有效地阻滞重症 HFMD 患儿的疾病进程, 本文研究结果对以上研究发现有好的补充作用。

综上所述, 血清 MDA、SOD、ox-LDL 指标的检测在临床可以用于评估 HFMD 的严重程度, 并为早期应用氧自由基清除剂用于预防 HFMD 患儿氧化

应激损伤提供理论支持。另外,早期的外周血淋巴细胞免疫分型的检测可以有助于监控、预警重症病例的产生。因此,早期对 HFMD 患儿进行氧化应激指标及外周血淋巴细胞分型的检测,有助于该患儿的诊断、治疗及预后评估。

4 参考文献

1 孙立梅,邓爱萍,康敏,等. 2009-2010 年广东省手足口病流行特征分析. 华南预防医学, 2011, 37:9-13.

2 康怀雄,梁晶,黄辉. 韶关市 2008-2011 年手足口病流行病学特征分析. 微生物学免疫学进展, 2012, 40: 54-57.

3 翟凯齐,张丽娜,高巍,等. 血清 S100 蛋白及 NSE 联合检测在手足口病脑损伤诊断中的临床价值. 实用检验医师杂志, 2015, 7: 173-176.

4 Zhu G, Zheng Y, Zhang L, et al. Coxsackievirus A16 infection triggers apoptosis in RD cells by inducing ER stress. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441: 856-861.

5 王跃生,张敬,李小芹,等. 手足口病患儿细胞免疫与凋亡的临床研究. 河南职工医学院学报, 2013, 4: 423-425.

6 Deng L, Jia HL, Liu CW, et al. Proteomic analysis of extremely se-

vere hand, foot and mouth disease infected by enterovirus 71. BMC Infect Dis, 2013, 13: 383-389.

7 Zhang Y, Yang E, Pu J, et al. The gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells from EV71-infected rhesus infants and the significance in viral pathogenesis. PLoS One, 2014, 9: e83766.

8 赵红霞. 手足口病患儿红细胞免疫功能与脂质过氧化关系的探讨. 放射免疫学杂志, 2010, 23: 343-344.

9 Lui YL, Tan TL, Woo WH, et al. Enterovirus71 (EV71) utilise host microRNAs to mediate host immune system enhancing survival during infection. PLoS One, 2014, 9: e102997.

10 Ou JB, Zhang CM, Fu SM, et al. Relationship between G6PD deficiency and hand-foot-mouth disease induced by enterovirus 71. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2013, 15: 751-755.

11 Wang B, Xi X, Lei X, et al. Enterovirus 71 protease 2Apro targets MAVS to inhibit anti-viral type I interferon responses. PLoS Pathog, 2013, 9: e1003231.

(收稿日期: 2015-09-15)

(本文编辑: 陈淑莲)

(上接第 250 页)

9 周世媛,周继莘,王莉娜,等. MTHFR 基因多态性与法洛四联症的相关性研究. 山东医药, 2012, 52: 1-3.

10 Lee CN, Su YN, Cheng WF, et al. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation with congenital heart diseases. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005, 84: 1134-1140.

11 van Beynum IM, Kapusta L, den Heijer M, et al. Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects; effect modification by periconceptional folate supplementation. Eur Heart J, 2006, 27: 981-987.

12 Wu X, Yang K, Tang X. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for preeclampsia: a meta-analysis. J Assist Reprod Genet, 2015, 32: 797-805.

13 Salimi S, Saravani M, Yaghmaei M, et al. The early-onset preeclampsia is associated with MTHFR and FVL polymorphisms. Arch Gynecol Obstet, 2015, 291: 1303-1312.

14 王增芳,王增艳,王萍萍,等. MTHFR C667T 多态性与先兆子痫易感性的荟萃分析. 医学综述, 2010, 16: 2059-2062.

15 Shekari M, Sobti RC, Kordi Tamandani DM, et al. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) condon (677) and methionine synthase (MS) condon (2756) on risk of cervical carcinogenesis in North Indian population. Arch Gynecol Obstet, 2008, 278: 517-524.

16 Zhu J, Wu L, Kohlmeier M, et al. Association between MTHFR

C677T, MTHFR A1298C and MS A2756G polymorphisms and risk of cervical intraepithelial neoplasia II/III and cervical cancer: a meta-analysis. Mol Med Rep, 2013, 8: 919-927.

17 Botezatu A, Socolov D, Iancu IV, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. J Cell Mol Med, 2013, 17: 543-549.

18 Zoodma M, Nolte IM, Schipper M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. Hum Genet, 2005, 116: 247-254.

19 杨帆,周裕林,江雨,等. MTHFR 基因多态性与宫颈癌发病的相关性研究. 中华妇幼保健, 2013, 26: 4087-4089.

20 戚其玮,张红岩,于美英,等. MTHFR 基因多态性与多囊卵巢综合征的相关性研究. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32: 400-404.

21 Fu LY, Dai LM, Li XG, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism with polycystic ovary syndrome risk: a systematic review and meta-analysis update. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 172: 56-61.

22 Lee YH, Song GG. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and MTHFR 677C/T polymorphisms and susceptibility to polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 175: 8-14.

(收稿日期: 2015-11-15)

(本文编辑: 李霖)