

• 综 述 •

肠道病毒 71 型与临床手足口病关系的研究进展*

张 胜¹, 王 杨^{1△}, 李凌佳²综述, 高 辉¹审校

(1. 昆明医科大学附属延安医院检验科 650051; 2. 昆明医科大学第一附属医院皮肤科 650032)

关键词: 肠道病毒 71 型; 手足口病; 实验室检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)12-1665-03

手足口病(HFMD)是一种常见的由肠道病毒引起的儿童感染性疾病,主要由柯萨奇病毒 A 型 16(CA16)和肠道病毒(EV)71 型感染引起。多数患者表现为一种轻微的自限性疾病,少数病例可迅速发展为致命性的中枢神经系统并发症,特别是由 EV71 引起的感染,而小于 3 岁的儿童是最容易发生 EV71 感染且中枢神经系统最易受累^[1-2]。常伴随脑干脑炎、无菌性脑膜炎、脑脊髓炎、小儿麻痹症样瘫痪、心肺衰竭,甚至导致死亡,且脑干脑炎恢复后的儿童可能遗留严重的神经病学方面的后遗症^[3]。现就 EV71 的生物学特性、致病机制及实验室检测进行总结。

1 EV71 分子生物学特性

1.1 EV71 分子特性 肠道病毒和柯萨奇病毒同属于小 RNA 病毒科肠道病毒属, EV71 是无包膜和突起的单股正链小 RNA 病毒,直径约 33~35 nm,病毒基因组长度大约为 7.5 kb。病原体由一个 60 个亚单位的二十面体的衣壳包绕病毒基因组 RNA 构成,它的基因组包含了一个开放阅读框(ORF),两端为 5' 和 3' 非编码区(UTR)。其中 5' 非编码区包含了一个涉及 RNA 复制的四叶式固定结构和一个指导病毒蛋白质翻译的内在核糖体进入位点(IRES)^[4-6],在 3'-UTR 的末端含有多聚腺苷酸尾巴,UTR 不仅可以保证病毒蛋白的正常表位,还可以维护病毒基因的稳定性,决定病毒的毒力^[7]。而开放阅读框编码一种 250×10³ 的多聚蛋白,包括 P1、P2 和 P3 三个区,组成病毒衣壳的结构蛋白(VP1、VP2、VP3 及 VP4)和参与病毒复制的 7 种非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C 及 3D)。其中 VP1 是最具致病性的也是最重要的一种结构蛋白,其变化是 EV71 免疫原性的主要决定因素,单个氨基酸的变化可以明显改变免疫反应和中和抗体反应的敏感性;且包含主要的中和表位,可以用于病毒的鉴定和进化分析^[8]。EV71 VP1 蛋白包含 297 个氨基酸,大小为 32×10³,具有“果冻卷”型的 β-桶状结构和疏水性口袋因子。分布于病毒表面的 VP1β 桶状结构区,存在一个深凹,被认为是 EV71 病毒的黏附位点,也被称为峡谷样结构^[9]。

1.2 EV71 的生物学亚型 EV71 被分为 3 种基因型,分别是 A、B 和 C,其中 B 和 C 划分为 B1-B5、C1-C5。而一个单独的 B0 基因亚型最近是在荷兰 1963~1967 年的回顾性分析中 EV71 毒株上得以确认。也有研究表明 EV71 C4 亚基因型应该归类为一种新的基因型 D 中。此外,突变和重组是 EV 进化过程中常见的现象, EV3D 聚合酶的失真是导致基因组复制过程中突变的主要原因,正是由于高发的突变率和重组率,为临床的治疗和疫苗的研制带来了困难。

2 EV71 引起 HFMD 的致病机制

2.1 EV71 的感染机制及过程 发病机制是一个复杂、多步

骤过程,病毒和受体的相互作用是激发感染的第一步^[10]。EV71 起初吸附在细胞表面的吸附因子上,随后进入细胞和受体相互作用, EV71 通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞与受体相互作用,细胞内病毒 RNA-dependent 翻译,多聚蛋白被 2A 和 3C 蛋白酶裂解为结构蛋白和非结构蛋白。非结构蛋白主要参与病毒核酸 RNA 正负链的合成,其中正链病毒 RNA 被包装成为衣壳前体,最终成为具有感染性的病毒颗粒^[11]。而 VP1 作为病毒结构蛋白,主要功能是协助病毒感染,结合细胞受体,参与吸附、穿入、脱壳等过程。目前的研究与其有关的有清道夫受体 B2(SCARB2)、选择素 P 糖蛋白配体 1(PSGL-1)、人膜联蛋白 II (Anx2) 和硫酸乙酰肝素类糖胺聚糖。其中 SCARB2 是主要表达于核内体及溶酶体膜的 III 型糖蛋白,分布于重症 HFMD 患者肺组织支气管上皮、细支气管上皮、炎症细胞及肺泡上皮细胞; PSGL-1 表达于骨髓细胞及受激后的 T 淋巴细胞,作为细胞黏附因子 P、E、L 高亲和性配体仅分布于重症 HFMD 患者肺组织炎症细胞,可能在重症 HFMD 的感染过程中具有一定作用^[9]。

2.2 EV71 致病机制与机体的反应 EV71 感染后通过病毒编码蛋白酶作用导致宿主蛋白翻译停止,诱导细胞发生凋亡。研究发现 EV71 可以通过几种机制阻断 I 型干扰素(IFN)的表达,比如降低细胞胞质内病毒 RNA 感受黑色素瘤分化相关基因 S(MDAS)减少 I 型 IFN 的表达而降低宿主抗病毒反应^[12]。相关文献研究数据显示, EV71 复制诱导细胞周期停止在 S 期,停在 S 期的细胞为 EV71 的感染提供了优越的条件,这一过程主要是由非结构蛋白 3D 介导引起,由此能更深一步理解 EV71 致病的机制。

目前已有研究者通过对原位 EV71 病毒 RNA 定位和详细的免疫病理分析发现,严重的感染者炎症细胞在不同的组织中的分布和分类不等,中枢神经系统伴有巨噬细胞和中性粒细胞浸润的 EV71 感染易导致神经系统病变;另外,在一项伴有脑膜脑炎中枢神经并发症的患者血清中炎症因子与严重程度相关性的病例对照研究中显示,白细胞介素(IL)-4、IL-6、IL-10、IFN-α 和 IFN-γ 明显升高,可能与 EV71 感染诱导的中枢病变相关^[13]。国内研究结果显示, IL-6 和 TNF-α 参与 EV71 感染所致的 HFMD 发病的病理、生理过程,并与疾病的严重程度有关^[14]。

3 EV71 实验室检测方法

EV 感染的检测和血清型鉴别传统方法是病毒分离和免疫荧光检测法(IFA),但是很耗时且需要特殊实验设备^[15]。传统 EV71 的检测最初是依赖病毒培养和鉴定及血清学诊断,但同样是耗时或是很高的假阳性率,现就 EV 不同检测方法比较如下。

* 基金项目:云南省应用基础研究项目(2014FB080)。

△ 通讯作者, E-mail: kathy7227@sina.com。

3.1 培养 病毒培养可以用粪便、咽喉拭子、水泡液体作为标本,粪便被认为是最适合的标本类型,因为它可以更长维持病毒存活,但是运输时间应该尽可能短。分离和培养病毒的传统诊断方法操作较为繁琐,且假阴性率较高,影响临床诊断和治疗。

3.2 免疫学检验诊断 中和和抗体检测,通过与特定血清型抗血清酸发生中和来识别相关血清型,空斑中和试验普遍应用于 EV71 中和和抗体检测。此外,ELISA IgM 检测已经应用于快速诊断,从感染后的第一周至数周都保持很高的敏感性^[6]。应用 ELISA 法检测血清 EV71 IgM 抗体对于现症感染的检查具有重要意义,其有可操作性强、简便快速、准确等优点,在实验室血清抗体检测中应用广泛,对于检测设备的要求不高,适合在基层医院推广。

3.3 分子生物学检测 目前,核酸检测成为 EV 病原学检测新的“金标准”,发挥出无可比拟的优势。其是基于 PCR 原理的一种更快捷、特异和敏感的检测和鉴别 EV 亚型的试验方法。常用的具有很高特异性和敏感性的用来检测 EV71 的包括反转录 PCR(RT-PCR)、实时定量反转录 PCR(qRT-PCR),其次还有内标多重荧光 RT-PCR、基因芯片技术等分子诊断技术方法^[16]。

3.3.1 RT-PCR 技术 目前临床诊断 EV71 感染最为常用的方法之一,其可对 VP1 基因进行扩增和核酸测序,以 VP1 蛋白作为目标检测抗原,对低载量水平的 RNA 可以测定,常用来对 EV 这种 RNA 病毒感染进行诊断和血清型鉴定。但与 qRT-PCR 相比,其灵敏度和特异度都不够高,且操作繁琐,测定周期长,具有较高的假阳性率及假阴性率,对临床的诊断和治疗均具有一定的影响,导致其在临床的应用价值不断下降。此外,因其需要先进的设备和昂贵的试剂,很难应用于发展中国家或是现场流行病学调查。

3.3.2 qRT-PCR 简化了传统的分子诊断过程,提高了灵敏度和特异度,有效地避免了交叉污染和手工操作误差,达到了对检测的各个反应时段的实时监测、定量,被认为是目前检测 EV71 及 EV、CA16 的首选方法。

3.3.3 其他检测方法 一种快速、可靠、经济、有效的核酸扩增分子检测方法——环介导等温扩增法在 2000 年首次建立^[8],与 RT-PCR 相比,具有更高的灵敏度和特异度,操作简便快捷,具有广阔的应用前景。此外,有研究显示已成功发现了基于基因检测的高通量二代测序方法可以直接对临床标本进行 EV71 全基因组测序,以对病毒变异和进化提供重要的认识依据^[17]。目前还成功发展和验证了一种敏感的自动化多通路一次性检测实时 RT-PCR 方法来检测 EV,对 HFMD 的临床管理和暴发流行疫情控制有重要作用^[18]。

3.4 联合检测 相关文献报道 RT-PCR 与 IgM 联合检测可以提高 EV71 感染引起的严重 HFMD 早期诊断检测率,所以在临床上被强烈推荐^[19],此外,如白细胞(WBC)、降钙素原(PCT)、IL-6、丙氨酸氨基转移酶(ALT)等项目联合检测在 HFMD 的早期诊断中的临床价值及有效性也得到了认可^[20]。

4 小 结

虽然近年来对 HFMD 的临床研究不断深入,但 EV71 基因型变异,以及其易与其他不同亚型的交叉感染给 HFMD 的临床的诊疗不断带来新的挑战。随着分子生物学技术的不断发展,相信在不久的将来, EV71 的实验室检测可以达到精准医学水平,并能更加成熟地应用于临床,在 HFMD 的个体化防治中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Chen ZR, Sun HP, Yan YD, et al. Epidemiological profiles of hand, foot, and mouth disease, including meteorological factors, in Suzhou, China[J]. Arch Virol, 2015, 160(1): 315-321.
- [2] Li L, Yin HZ, An ZJ, et al. Considerations for developing an immunization strategy with enterovirus 71 vaccine[J]. Vaccine, 2015, 33(4): 1107-1112.
- [3] Puenpa J, Mauleekoonphairoj J, Linsuwanon P, et al. Prevalence and characterization of enterovirus infections among pediatric patients with hand foot mouth disease, herpangina and influenza like illness in Thailand, 2012[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98888.
- [4] Wang Y, Yang B, Zhai Y, et al. Peptidyl aldehyde NK-1, 8k suppresses enterovirus 71 and enterovirus 68 infection by targeting protease 3C[J]. Antimicrob Agents Chem, 2015, 59(5): 2636-2646.
- [5] Song Y, Cheng X, Yang XX, et al. Early growth response-1 facilitates enterovirus 71 replication by direct binding to the virul genome RNA[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015, 62(1): 36-46.
- [6] Leong SY, Ong BK, Chu JJ. The role of misshapen NCK-related kinase(MINK), a novel Ste20 family kinase, in the IRES-Mediated protein translation of human enterovirus 71[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(3): e1004686.
- [7] 徐树红, 黄波, 段晓培. 手足口病临床研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(24): 146-148.
- [8] Sarma N. Hand, foot, and mouth disease: Current scenario and Indian perspective[J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2013, 79(2): 165-175.
- [9] 张志勤, 项国仕, 黄孝天. 肠道病毒 71 型 VP1 蛋白研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(4): 377-379.
- [10] Lin, Shih. Cell and tissue tropism of enterovirus 71 and other enteroviruses infections[J]. J Biomed Sci, 2014, 21(1): 18.
- [11] Chee WT, Jeffrey KF, I-Ching S, et al. Recent developments in antiviral agents against enterovirus 71 infection[J]. J Biomed Sci, 2014, 21(1): 14.
- [12] Kuo RL, Lin YH, Wang RY, et al. Proteomics analysis of EV71-Infected cells reveals the involvement of host protein NEDD4L in EV71 replication[J]. J Proteome Res, 2015, 14(4): 1818-1830.
- [13] Yu P, Gao ZF, Zong YY, et al. Distribution of enterovirus 71 RNA in inflammatory cells infiltrating different tissues in fatal cases of hand, foot, and mouth disease[J]. Arch Virol, 2015, 160(1): 81-90.
- [14] 刘松, 贾德兴, 冯静, 等. EV71 感染手足口病患儿血清 IL-6、TNF- α 水平的检测及临床意义[J]. 辽宁医学院学报, 2015, 36(2): 32-34.
- [15] Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection[J]. J Path, 2015, 235(2): 217-228.
- [16] Lei XY, Wen HL, Li Z, et al. Performance of reversed transcription loop-mediated isothermal amplification tech-

nique detecting EV71: A systematic review with meta-analysis[J]. Biosci Trends, 2014, 8(2): 75-83.

- [17] van Tan L, Tuyen NT, Thanh TT, et al. A generic assay for whole-genome amplification and deep sequencing of enterovirus A71[J]. J Virol Methods, 2015, 215(1): 30-36.
- [18] Tran TT, Nguyen TA, Nguyen TT, et al. Validation and utilization of an internally controlled multiplex Real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of enteroviruses and enterovirus A71 associated with hand foot and

mouth disease[J]. Virol J, 2015, 12(1): 85.

- [19] Wang Y, Zou G, Xia AM, et al. Enterovirus 71 infection in children with hand, foot, and mouth disease in Shanghai, China: epidemiology, clinical feature and diagnosis [J]. Virol J, 2015, 12(1): 83.
- [20] 黄伟, 李芹, 官升灿, 等. 组合检测指标在手足口病早期诊断中的价值[J]. 临床荟萃, 2015, 30(7): 785-788.

(收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-03-18)

• 综 述 •

肺结核合并糖尿病临床特点分析

张 艺 综述, 杜先智 审核

(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科 400000)

关键词: 肺结核; 糖尿病; 结核分枝杆菌

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 12. 027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)12-1667-03

自结核分枝杆菌被发现至今,人类对于结核病的治疗已有了较系统、规范化的共识。但由于流动人口骤增、耐药结核分枝杆菌的蔓延、结核分枝杆菌与艾滋病病毒的双重感染等客观原因,目前结核病疫情仍较严峻^[1]。由于经济、社会的不断发展,人口老龄化、不良生活习惯等因素的影响,2型糖尿病发病率正呈快速上升趋势^[2]。结核分枝杆菌在免疫低下人群中才易发展为结核病,而糖尿病患者由于体内多项代谢紊乱对人体免疫功能造成影响,增加了其感染结核的风险。研究显示,糖尿病患者中肺结核的发生率较健康人要高4~6倍^[3],且两病合并后病情恶化、抗结核治疗失败、死亡及复发等不良结局均成倍增加^[4]。两病并存互相影响病程发展、治疗转归等特点,引起了相关研究者的共同关注,本文就两者相互关系,临床表现特点,治疗转归及防治等几个方面进行综述。

1 肺结核与糖尿病的相互作用

肺结核和糖尿病作为慢性疾病,对机体免疫及营养均有较大影响,当两者合并存在时,两者相互产生消极作用,促使病情难以控制,甚至恶性循环。在有关肺结核合并糖尿病发病机制的研究中普遍认为二者有共同的病理生理学基础,并直接或间接影响两病的发展及疗效,其主要表现在如下几个方面。

1.1 代谢营养紊乱 糖尿病患者体内存在多种代谢紊乱,其中糖代谢失调被认为是促进结核病发生的主要机制。组织内糖浓度升高,形成的酸性环境会减弱组织抵抗力,致免疫功能下降,使结核分枝杆菌繁殖生长得到有利条件。肺结核作为消耗性疾病,可通过影响胰腺功能及胰岛素受体功能调节,反过来作用于血糖,使糖尿病患者血糖易波动,胰岛素抵抗明显。糖尿病患者葡萄糖利用障碍,需依靠分解大量脂肪而供应机体能量,对肺结核合并糖尿病患者与单纯肺结核患者的对照研究显示,前者高胆固醇血症和高三酰甘油血症的发生率明显高于后者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而体内三酰甘油、酮体等脂肪分解产物的增加,更为结核分枝杆菌的生长、繁殖提供了良好的培养基^[5-6]。除了糖、脂代谢紊乱以外,肺结核及糖尿病患者体内普遍存在蛋白质缺乏。尤其在糖尿病患者中,蛋白质合成功能减弱,蛋白质合成减少,导致机体产生白细胞介素(IL)-2、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等减少,使机体对结核分枝杆菌的抵抗力下降,增加结核病患病风险。

1.2 免疫机制 机体对结核分枝杆菌免疫主要是细胞免疫,

其中巨噬细胞发挥重要作用,巨噬细胞发挥胞内抗结核分枝杆菌的效能与维生素的正常水平密切相关。在维生素中,特别是维生素A(VA)、维生素D(VD)较为重要,前者具有免疫促进作用,并通过调节细胞代谢和功能等影响能量代谢;后者和巨噬细胞受体结合后诱导抗微生物多肽表达,继而对胞内结核分枝杆菌产生抑制、杀灭作用;研究显示,肺结核患者及糖尿病患者的VA及VD水平低于健康人群平均值,而两者的缺乏使得呼吸道黏膜上皮抵抗力降低,T淋巴细胞功能受损,CD4⁺/CD8⁺降低,免疫功能低下,更利于结核分枝杆菌的侵入^[7]。

1.3 药物作用 抗结核药物是治疗肺结核的主要武器,但其中一部分药物如异烟肼、利福平对糖代谢或降糖药有一定影响,促使糖代谢受损并可能向糖尿病发展,且会促使肝脏分泌较多药酶,加速降糖药物的代谢与排泄,可使原本就有糖尿病的患者血糖难以控制,增加糖尿病酮症酸中毒等急性并发症发生率。在抗结核药物当中,最常出现的不良反应为肝功能受损。有研究报道,肺结核合并糖尿病患者使用一线抗结核药物化疗过程中出现肝功能损伤概率明显高于单纯肺结核患者^[8],差异有统计学意义($P < 0.05$)。这可能是由于两病合并加重了免疫力下降,使机体很难快速有效地对肝脏病变组织进行有效修复,且糖尿病患者多合并多脏器功能减退,使抗结核药物呈缓慢代谢状态,一定程度上增加了药物在血液中的浓度,致使肝损伤概率上升。这一研究结果对抗结核治疗的疗程及药物选择造成困难。

2 临床表现

肺结核合并糖尿病其高危发病年龄为40~60岁。肺结核患者中有10%~20%合并糖尿病,而糖尿病先于肺结核发生者占两者合并总数的70%~85%,且男性多于女性^[9]。调查显示,糖尿病合并肺结核患者,病情较轻者其起始临床表现与单纯肺结核具有较大相似之处,两者无明显差异^[10]。胡爱花等^[11]的研究也表明,既往无糖尿病或肺结核病史的新发两病合并患者,以不明原因低热、咳嗽、咳痰、乏力、盗汗而就诊者多见,糖尿病典型的“多饮、多尿、多食及消瘦”,即“三多一少”症状并不明显,显性症状是结核病,在入院治疗肺结核时才进一步筛查出糖尿病。Wang等^[12]的多项对照研究结果指出,两病合并患者与单纯肺结核患者相比,前者咯血、感染、形成空洞及痰菌阳性发生率均明显高于后者。糖尿病先于肺结核发病者,