

## EV71 型手足口病患儿外周血树突状细胞及 细胞因子产生的调节机制研究

高 勇<sup>1,2</sup> 徐元宏<sup>1</sup> 陈晓枫<sup>3</sup> 辛克峰<sup>3</sup> 袁子清<sup>3</sup> 郑美娟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨肠道病毒 EV71 型感染对树突状细胞 (DC) 成熟凋亡、DC 中信号传导通路激活、细胞因子释放的作用机制。方法 收集肠道病毒 EV71 型感染患儿 40 例, 分为 20 例轻症型组及 20 例重症型组, 正常对照组儿童 20 例。流式细胞仪检测各组儿童外周血 DC 表面标志分子 CD11c、CD86、CD80 和 CD83 表达的百分比; 采用 Western blot 法检测 DC 中 MAPK 信号传导通路分子磷酸化水平; ELISA 法检测同期血清中细胞因子的水平。结果 随着 EV71 感染程度的加深, 外周血 DC 中标志着细胞成熟的表面标志分子水平均有增加, CD83 及 CD80 尤为显著; MAPK 信号传导通路的活化程度逐渐加强; 细胞因子水平的表达显著升高。结论 EV71 感染可促进树突状细胞成熟凋亡、激活 MAPK 信号传导通路并增加细胞因子的释放, MAPK 信号传导通路在 EV71 感染的 DC 中发挥显著调控作用。

**关键词** 肠道病毒 EV71; 树突状细胞; MAPK 信号传导通路; 细胞因子

中图分类号 R 466.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0078-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.016

肠道病毒 71 型 (Enteroviruses71, EV71) 是儿童手足口病的主要致病病原体<sup>[1]</sup>, 其感染人数逐年上升。EV71 感染所致手足口病起病紧急、进展迅速<sup>[2]</sup> 轻度感染患儿预后良好, 重度感染患儿多伴随脑膜炎及神经源性肺水肿等并发症且致残致死率高<sup>[3]</sup>。目前针对该类手足口病尚未有确切安全的疫苗及特效药物, 故而患儿的早期诊断治疗显得尤为重要。研究<sup>[4]</sup>显示 EV71 可使感染患儿机体免疫系统紊乱, 并通过感染树突状细胞 (dendritic cells, DC) 导致细胞因子表达水平改变。目前国内外尚未有与检测 EV71 感染手足口病患者体内 DC 分泌的细胞因子及 DC 中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 信号传导通路调节等相关的研究。该研究通过分析被 EV71 感染后呈现出不同临床表现的儿童外周血中 DC 表面标志表达的百分比变化、DC 中 MAPK 信号传导通路激活状况及细胞因子水平变化情况, 以期对 EV71 型手足

2016-09-09 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2011A181)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学阜阳传染病临床学院, 阜阳市第二人民医院检验科, 阜阳 236015

<sup>3</sup> 安徽医科大学阜阳传染病临床学院, 阜阳市第二人民医院感染科, 阜阳 236015

作者简介: 高 勇, 男, 副主任技师, 硕士研究生;

徐元宏, 男, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xy-hong1964@163.com

chain ( $\alpha$ -MHC), cardiac troponin T (cTnT) and connexin-43 (Cx43) were analyzed through quantitative RT-PCR. Besides, the cardiac-specific proteins including  $\alpha$ -MHC, cTnT and CX43 were detected by immunofluorescence and Western blot. **Results** The mESCs in every group did differentiate into cardiomyocytes. The expression of Brachyury was substantially augmented by treatment with CHIR99021 and Wnt3a, showing a peak of expression at day 7. Similarly, CHIR99021 and Wnt3a dramatically increased the expression levels of Nkx2.5,  $\alpha$ -MHC, cTnT and Cx43 with the time of differentiation, with the expression of target genes in CHIR99021 group and Wnt3a group was greater than that in the control group and CHIR99021 group was higher than Wnt3a group at day 15 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Western blot analysis suggested that the expressions of  $\alpha$ -MHC, cTnT and CX43 in CHIR99021 group and Wnt3a group were greater than those in the control group, and CHIR99021 group was higher than Wnt3a group at day 15. **Conclusion** Both CHIR99021 and Wnt3a could improve cardiogenesis from mESCs through activate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway at the early stage of differentiation while the former is better than the latter.

**Key words** CHIR99021; Wnt3a; mouse embryonic stem cells; cardiomyocytes

口病的早期诊断与重症患者预防治疗提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 病例收集及样本采集** 收集阜阳市第二人民医院感染科和应急科 2015 年 6 月~2016 年 4 月确诊的 EV71 感染手足口住院患儿 40 例,包括轻症型组(20 例)及重症型组(20 例),作为感染组,其中各组年龄:7 个月~5 岁,  $(1.84 \pm 1.10)$  岁,男女比例约为 1:1;另收集体检中心 20 例健康儿童作为正常对照组(平均年龄和男女比例与感染组一致)。所有患者临床诊断符合卫生部《手足口病诊疗指南(2010 年版)》及《肠道病毒 71 型(EV71)感染重症病例临床救治专家共识(2011 年版)》,该院对于感染组中轻症型即普通型 EV71 感染手足口患者诊断依据:EV71 型病毒 RNA 阳性或 EV71 中和抗体有 4 倍以上的升高,临床上有发热伴手、足、口、臀部皮疹,部分病例可无发热;重症型病例(包括危重型患者)诊断依据:普通型患者出现持续高热(体温在 39℃ 以上),外周血 WBC  $>15 \times 10^9/L$ (排除其他感染因素),易惊、呕吐等神经系统表现,血糖升高等情况之一者<sup>[5]</sup>。所有对象于入院当日或次日早晨空腹分别用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管和含促凝剂的真空采血管各采集外周血 2 ml 备用。

**1.2 主要试剂** 红细胞裂解液、Western blot 及 IP 裂解液均购自上海碧云天生物科技有限公司;荧光素标记的小鼠抗人单克隆抗体 HU CD80-PE (100T)、HU CD86-FITC (100T)、HU CD83-APC (100T)、HU CD11c-PerCP-Cy 5.5 (50T) 及阴性对照鼠抗人 PE-IgG1 抗体均购自美国 BD Pharmingen 上海公司;PBS 缓冲液由安徽医科大学第一附属医院检验科提供;白介素(interleukin, IL)-6、IL12/P70 及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) ELISA 检测试剂盒购自美国 Raybiotech 广州公司;MAPK 信号通路磷酸化蛋白检测试剂盒购自美国 Cell signaling 上海生物科技有限公司,其中包括小鼠抗人磷酸化 p38 MAPK (phosphorylated p38 MAPK, p-p38) 抗体、小鼠抗人磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)、小鼠抗人磷酸化的细胞外信号调节蛋白激酶 1/2 (extracellular signal regulated protein kinases 1/2, p-ERK1/2) 抗体;GAPDH 抗体及 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 第二抗体购自上海碧云天生物科技有限公司。

**1.3 DC 分离** 用 PBS 清洗外周血 2 次,用红细胞

裂解液裂解去除红细胞,离心获得单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。

**1.4 流式细胞术检测 DC 表面标志物** 取感染组及对照组已分离的 DC,分别用荧光抗体染色标记。取制备好的感染组细胞悬液加入 3 支试管中,每管加入 100  $\mu$ l,分别加入 CD83-APC + CD11c-PerCP-Cy、CD86-FITC + CD11c-PerCP-Cy、CD80-PE 抗体,阴性对照组加入 PE 标记的鼠抗人 IgG1 抗体 4℃ 避光孵育 30 min,洗涤细胞 2 次 400  $\mu$ l 流式缓冲液再悬细胞后上机检测。采用美国 BD 公司 FACS Calibur 仪器及试剂检测阳性细胞百分比,对单核细胞进行表面标志分析,根据免疫表型分析结果比较两组 DC 成熟度。

**1.5 Western blot 法检测信号传导通路蛋白** 用 Western blot 法检测细胞中 p-p38 MAPK、p-JNK、p-ERK1/2 蛋白表达情况。相同方法获取 PBMC,用 Western blot 及 IP 细胞裂解液裂解细胞并提取蛋白质。50  $\mu$ g 蛋白质经 120 g/L SDS-PAGE 电泳分离蛋白质后,电转移至 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 p-p38 抗体、p-JNK 抗体、p-ERK1/2 抗体(均为 1:1 000 稀释) 4℃ 孵育过夜,0.1% TBST 洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 第二抗体(1:1 000 稀释),室温孵育 2 h 再洗膜后,加入化学发光液,压片暗室曝光,分析蛋白磷酸化水平,以研究 MAPK 信号传导通路活化情况。

**1.6 ELISA 法定量检测血清中细胞因子水平** 收集感染组及对照组的静脉血,离心取血清,采用 ELISA 双抗体夹心法对外周血中细胞因子 IL6、IL12/P70 及 TNF $\alpha$  进行定量检测。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件分析实验数据,计量资料采用单样本 K-S 检验方法分析,符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用 Student's *t*-test 的分析方法  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EV71 感染对 DC 成熟的影响** EV71 感染后患儿外周血 DC 表面标志物流式细胞仪检测结果及散点图分别见表 1、图 1。与对照组比较, EV71 感染后 CD80、CD83 及 CD86 在 DC 上表达的百分比随着感染程度的加重而增加。其中 CD11c、CD86 在 DC 上表达的百分比虽有增加,但与对照组比较差异无统计学意义;而 CD80 上升幅度较小, CD83 上升幅

度尤为明显 ,CD80、CD83 百分比与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (图 2)。说明 EV71 感染可诱导 DC 趋向成熟。

表 1 不同组之间 DC 表面标志物检测结果比较 (%  $n = 20 \bar{x} \pm s$ )

组别	CD11c	CD80	CD83	CD86
重症感染	1.89 ± 0.89	1.64 ± 0.88* #	2.04 ± 1.35* #	1.87 ± 0.82
轻度感染	1.81 ± 0.80	1.11 ± 0.80	1.41 ± 0.63*	1.49 ± 0.86
对照	1.76 ± 0.95	0.96 ± 0.83	0.82 ± 0.55	1.32 ± 0.98

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与轻症感染组比较: #  $P < 0.05$

2.2 EV71 感染后信号传导通路活化情况 将标本中 p-p38 MAPK、p-JNK、p-ERK1/2 蛋白质表达量与对应 GAPDH 相除,得到相对表达量。感染组及对照组儿童 DC 中蛋白磷酸化水平的检测结果见图 3。统计结果显示 ,p-p38 MAPK、p-JNK、p-ERK1/2 蛋白表达量均随着感染程度加深而增大。

2.3 细胞因子表达水平 EV71 感染患儿血清中细胞因子检测结果显示:IL6 及 IL12/P70 表达水平随

着感染程度的加重而表现为上升趋势,其中 IL6 变化明显,三组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),IL12 略有升高,三组间比较差异无统计学意义;TNF $\alpha$  表达水平随着感染程度的加重呈现先升高后降低的趋势,三组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2、图 4。

表 2 不同组之间细胞因子定量检测结果比较 (ng/L  $n = 20 \bar{x} \pm s$ )

组别	IL6	IL12/P70	TNF $\alpha$
重症感染	16.89 ± 3.20* #	29.80 ± 13.30	212.54 ± 62.08* #
轻度感染	12.86 ± 2.86*	26.44 ± 8.16	245.41 ± 54.07*
对照	7.88 ± 2.12	23.95 ± 8.39	137.63 ± 23.50

与对照组相比: \*  $P < 0.05$ ; 与轻症感染组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

DC 是人体内最强大的抗原递呈细胞,依据刺激 T 细胞增殖能力及发育分化阶段的不同分为未成熟 DC 和成熟 DC,未成熟 DC 的主要功能为摄取加工

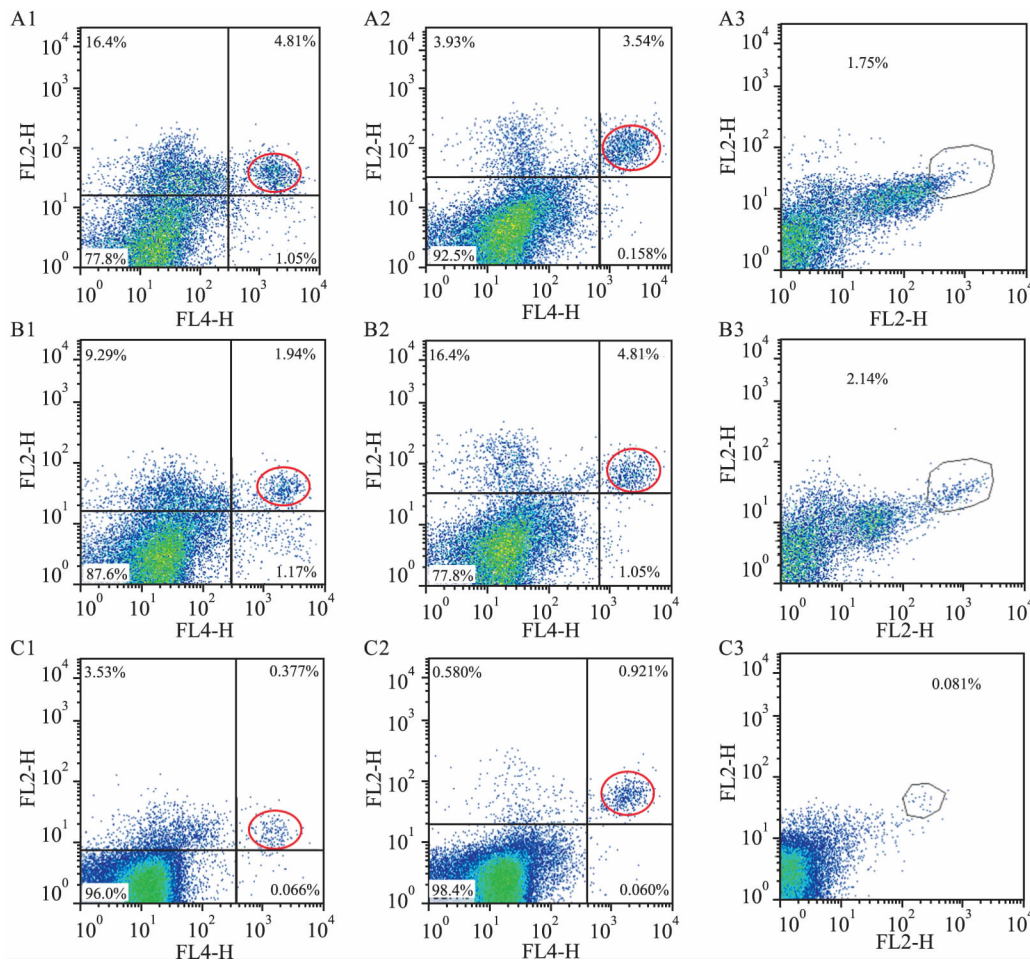


图 1 EV71 感染患儿的 DC 表面标志物流式细胞仪检测散点图

A: 重症感染组; B: 轻症感染组; C: 对照组; 1: CD83; 2: CD86; 3: CD80

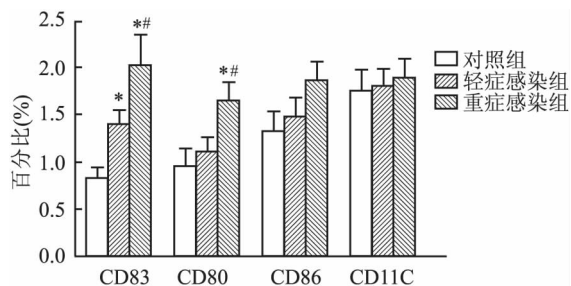


图2 外周血 DCs 表面标志物百分比  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与轻症感染组比较: #  $P < 0.05$

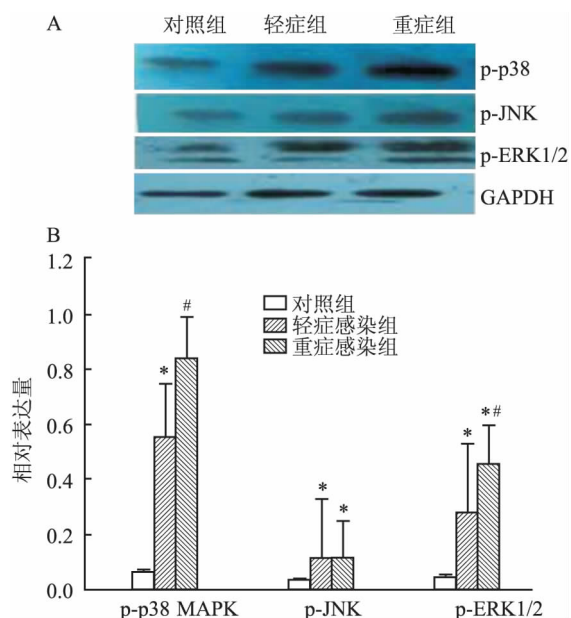


图3 Western blot 法检测外周血 p-p38 MAPK、  
p-JNK、p-ERK1/2 磷酸化水平变化  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与轻症感染组比较: #  $P < 0.05$

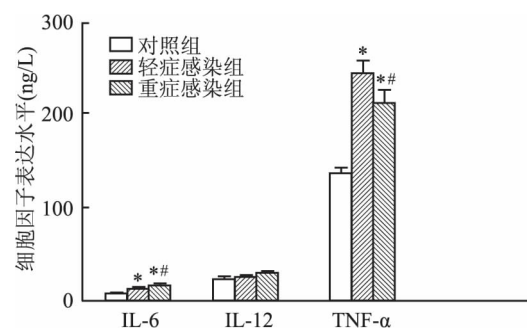


图4 血清中细胞因子表达水平变化  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与轻症感染组比较: #  $P < 0.05$

抗原以及随体内循环系统迁移,成熟 DC 负责递呈抗原以刺激 T 细胞增殖并激活免疫系统<sup>[6]</sup>。CD83 作为成熟 DC 特有的表面标志,通常被用来识别和分离成熟 DC; CD86、CD80、CD11c 也是成熟 DC 表

达的重要共刺激因子,其表达量的上调也意味着 DC 的成熟程度的加深<sup>[7]</sup>。国内对于 EV71 感染后外周血中 DC 表达的共刺激因子的水平有所研究,如李维春等<sup>[8]</sup>观察了手足口病患儿外周血中 CD80 和 CD86 的水平变化。Shi et al<sup>[9]</sup>研究显示 EV71 型病毒感染后 MEK/ERK 信号通路在不成熟 DC 的复制中起到重要作用,研究表明 CD86、CD80、CD83 的水平在感染后表达百分率升高,而对于国外还很少有报道。本研究中,通过流式细胞术对 EV71 感染后的患儿外周血中 DC 的表面标志物的表达百分比进行了分析,在 EV71 感染组各标志物的表达水平均高于对照组,CD83、CD80 的上调表现地尤为显著,推测 EV71 的感染对 DC 的成熟起到了明显的促进作用。成熟 DC 在激活机体免疫系统的同时分泌各种细胞因子,参与免疫应答并发挥免疫调节作用<sup>[10]</sup>。在儿童感染 EV71 病毒患上手足口病时外周血中的一些炎症因子会升高如 IL-4、IL-12 和 IL-18<sup>[11]</sup>。彭宏君等<sup>[12]</sup>发现 EV71 感染可以促进 DC 成熟、提高体外培养 DC 活性并增强细胞因子表达量。Lin et al<sup>[13]</sup>在体外实验进一步证明 EV71 病毒感染可增加 DC 活性,并促进 DC 释放细胞因子。以上研究均证明了 EV71 感染儿童使其患上手足口病后会通过成熟的 DC 激活机体分泌一些炎症细胞因子,本实验通过 ELISA 法检测了 EV71 不同感染程度组患儿外周血中 IL-6、IL-12 以及 TNF- $\alpha$  分泌量。结果显示感染组 IL-6、IL-12/P70 的表达水平明显比对照组高,在感染组中重症组 IL-6、IL-12/P70 均比轻症组的表达水平高,而 TNF $\alpha$  在感染初期表达水平较高,而在重度感染时反而出现降低的现象。炎症因子的增加又可继续刺激 DC 成熟,成熟 DC 可能对 EV71 繁殖有抑制作用<sup>[14]</sup>。而重度感染时 TNF $\alpha$  表达量的下降推测是由于此时 DC 成熟程度较高,对 TNF $\alpha$  产生了负反馈而导致。

p38MAPK 信号转导通路参与介导 DC 的成熟及凋亡<sup>[15]</sup>。宿主细胞凋亡在病毒感染发病过程中起重要作用。p-p38 MAPK、p-JNK、p-ERK1/2 这 3 种蛋白质均为该信号传导通路的重要节点,其含量的上调表明此信号传导通路被激活。Western blot 法检测患儿外周血中这 3 种关键蛋白表达的含量有何变化,p-p38 MAPK 蛋白在感染 EV71 病毒后呈现显著的表达量增高的趋势,其次是 p-ERK1/2 蛋白,而 p-JNK 蛋白表达量变化不明显,研究表明此信号传导通路参与介导的促进细胞凋亡信号在增强。MAPK 信号传导通路在 EV71 感染 DC 过程中起到

促进细胞凋亡,有利于正向调节 DC 释放细胞因子。目前在临床上很少检测患者外周血中的细胞因子,从本实验中可以看出测定患者外周血中的细胞因子对于临床控制患者病情有一定的辅助作用。

综上所述, EV71 感染可促进 DC 成熟凋亡、激活 MAPK 信号传导通路并分泌细胞因子, MAPK 信号传导通路在 EV71 感染的 DC 中发挥显著调控作用。相关机制的研究可以为疫苗及治疗药物的制备提供新的突破点。

### 参考文献

- [1] Lui Y L, Tan T L, Timms P, et al. Elucidating the host-pathogen interaction between human colorectal cells and invading Enterovirus 71 using transcriptomics profiling [J]. *FEBS Open Bio* 2014, 4: 426-31.
- [2] 谭斌, 王建华, 周明军, 等. 铜仁地区肠道病毒 EV71 基因分型与体液免疫水平关系的研究 [J]. *中国免疫学杂志* 2015, 31: 1250-6.
- [3] Koroleva G A, Lukashev A N, Khudiakova L V, et al. Encephalomyelitis caused by enterovirus type 71 in children [J]. *Vopr Virologii*, 2010, 55(6): 4-10.
- [4] Zeng M, El Khatib N F, Tu S, et al. Seroepidemiology of Enterovirus 71 infection prior to the 2011 season in children in Shanghai [J]. *J Clin Virol*, 2012, 53(4): 285-9.
- [5] 高勇, 韩明峰, 李秀勇, 等. 阜阳市 2011 年手足口病实验室检测的结果分析 [J]. *检验医学* 2013 28(9): 796-800.
- [6] 王赛, 周国华. 树突状细胞发育及迁移机制的研究进展 [J]. *临床消化病杂志* 2015 27(6): 389-91.
- [7] 刘秀红, 付萍. 树突状细胞表面标志及功能研究进展 [J]. *皮肤病与性病* 2009 31(3): 22-4.
- [8] 李维春, 武荣, 周艳, 等. 手足口病患儿外周血共刺激分子 CD80, CD86 的变化观察 [J]. *中华全科医学* ISTIC, 2013, 11(1): 129.
- [9] Shi W, Hou X, Peng H, et al. MEK/ERK signaling pathway is required for enterovirus 71 replication in immature dendritic cells [J]. *Virology*, 2014, 11(1): 1-13.
- [10] Mogensen T H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses [J]. *Clin Microbiol Rev* 2009, 22(2): 240-73.
- [11] 李宏波, 吴志刚, 徐爱芳. 重症手足口病患儿外周血炎症细胞因子表达与临床意义 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(19): 4371-4.
- [12] 彭宏君, 侯雪玲, 李祥, 等. 肠道病毒 71 型体外感染人树突状细胞后启动免疫应答反应的研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志* 2014 28(2): 114-6.
- [13] Lin Y W, Wang S W, Tung Y Y, et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234(10): 1166-73.
- [14] Nakagawa S, Ohtani T, Mizuashi M, et al. P38 mitogen-activated protein kinase mediates dual role of ultraviolet B radiation in induction of maturation and apoptosis of monocyte-derived dendritic cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(2): 361-70.
- [15] Shi W, Hou X, Li X, et al. Differential gene expressions of the MAPK signaling pathway in enterovirus 71-infected rhabdomyosarcoma cells [J]. *Braz J Infect Dis*, 2013, 17(4): 410-7.

## On regulatory mechanisms of inflammatory cytokines and dendritic cell of HFMD infected with intestinal virus EV71

Gao Yong<sup>1,2</sup>, Xu Yuanhong<sup>1</sup>, Chen Xiaofeng<sup>3</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Clinical Laboratory, Fuyang Second People's Hospital, Fuyang Infectious Disease Clinical College, Anhui Medical University, Fuyang 236015, <sup>3</sup>Dept of Infectious Diseases, Fuyang 236015)

**Abstract Objective** To study maturation, apoptosis, signal pathway and inflammatory cytokines of dendritic cell when infected with intestinal virus EV71. **Methods** Patients were divided into three groups according to the degree of infection: the control group ( $n=20$ ), the mild group ( $n=20$ ) and the severe group ( $n=20$ ). The percentage of CD11c, CD86, CD80 and CD83 expression in peripheral blood DC were detected by flow cytometry; the phosphorylation of MAPK signal transduction pathway in DC was detected by Western blot; the serum levels of cytokines were measured by ELISA. **Results** With the increase of the EV71 infection severity, percentage of the marker molecule that marks the surface of cells maturing in peripheral blood DC increased, especially CD83 and CD80. The activation of MAPK signal transduction pathway gradually increased; the expression of cytokine level were significantly increased. **Conclusion** EV71 infection can promote dendritic cell maturation and cytokine secretion

**Key words** intestinal virus enterovirus71; dendritic cells; MAPK signaling pathway; cytokines