

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.011

## IL-6 和 IL-13 与 EV71 型肠道病毒感染手足口病患者发病的相关性

陈 清

(湖北省武汉市医疗救治中心感染科 430000)

**[摘要]** **目的** 观察肠道病毒 71 型(EV71)感染手足口病(HFMD)患者血清白细胞介素(IL)-6 和 IL-13 水平变化情况及其临床意义,并对血清 IL-6 和 IL-13 细胞来源进行初步的探讨。**方法** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定 HFMD 患者和健康对照血清中 IL-6 和 IL-13 水平,比较不同严重程度的 HFMD 患者血清中 IL-6 和 IL-13 水平,并同时检测 HFMD 患者治疗后血清 IL-6 和 IL-13 水平变化情况。流式细胞术(FCM)分析外周血单个核细胞(PBMC)中单核细胞分泌 IL-6 和 T 细胞分泌 IL-13 的情况。EV71 病毒感染健康人单核细胞和 T 细胞后,FCM 检测单核细胞分泌 IL-6 和 T 细胞分泌 IL-13 变化情况。**结果** EV71 感染 HFMD 患者血清 IL-6 和 IL-13 水平分别为(79.63±29.45)pg/mL 和(36.45±15.13)pg/mL,健康对照组血清 IL-6 和 IL-13 水平分别为(27.26±7.82)pg/mL 和(13.46±3.14)pg/mL, HFMD 患者血清 IL-6 和 IL-13 水平显著高于健康对照者( $P<0.01$ ),同时,随着 HFMD 患者疾病严重程度增加,血清 IL-6 和 IL-13 水平亦逐渐升高( $P<0.01$ )。治疗后 HFMD 患者血清中 IL-6 和 IL-13 水平分别为(48.23±23.14)pg/mL 和(23.25±9.63)pg/mL,与治疗前相比显著降低( $P<0.01$ )。HFMD 患者外周血单核细胞分泌 IL-6 水平和 T 细胞分泌 IL-13 的水平与健康对照者相比显著升高;EV71 病毒感染健康人单核细胞和 T 细胞后单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 能力显著升高。**结论** EV71 病毒可能时通过促进单核细胞分泌 IL-6 和 T 细胞分泌 IL-13,致使血清 IL-6 和 IL-13 水平升高,从而参与 HFMD 的发生和发展。

**[关键词]** 手足口病;白细胞介素-6;白细胞介素-13;肠道病毒 71 型

**[中图分类号]** R725.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)26-3634-03

## Enterovirus 71 infection induced HFMD related to IL-6 and IL-13 level

Chen Qing

(Infections Department, Wuhan Medical Treatment Center, Hubei 430000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the clinical significance of interleukin (IL)-6 and IL-13 levels in serum of hand, foot, and mouth disease (HFMD) caused by enterovirus 71, and carries on the preliminary discussion on serum IL-6 and IL-13 cell origin. **Methods** Serum levels of IL-6 and IL-13 in HFMD and healthy control were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), serum IL-6 and IL-13 levels among different severity of HFMD were compared. Serum IL-6 and IL-13 levels in HFMD after treatment were also detected. The secretion of IL-6 by monocyte and the secretion of IL-13 by T cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were detected by Flow Cytometry (FCM). Monocyte and T cells from health individual were treated with EV71, and the secretion of IL-6 by monocyte and the secretion of IL-13 by T cells were detected by FCM too. **Results** Serum levels of IL-6 and IL-13 were (79.63±29.45) pg/mL and (36.45±15.13) pg/mL respectively in HFMD, and serum levels of IL-6 and IL-13 were (27.26±7.82) pg/mL and (13.46±3.14) pg/mL respectively in health control, serum IL-6 and IL-13 levels in HFMD were significantly higher than that of healthy subjects ( $P<0.01$ ), and the mean serum IL-6 and IL-13 levels of HFMD were increased with the severity of the disease ( $P<0.01$ ). After treatment, serum levels of IL-6 and IL-13 were (48.23±23.14) pg/mL and (23.25±9.63) pg/mL respectively, when compared with before treatment, serum levels of IL-6 and IL-13 were significantly decreased ( $P<0.01$ ). The secretion ability of IL-6 by monocyte and the secretion of IL-13 by T cells in HFMD were significantly higher than that of healthy subjects. After infection by EV71, the secretion ability of IL-6 by monocyte and the secretion of IL-13 by T cells were significantly increased. **Conclusion** Infection of EV71 probably by increase the secretion ability of IL-6 by monocyte and the secretion of IL-13 by T cells, resulted in elevated of serum IL-6 and IL-13 levels, which involved in the occurrence and development of HFMD.

**[Key words]** hand, foot and mouth disease; interleukin-6; interleukin-13; enterovirus 71

手足口病(hand, foot, and mouth disease, HFMD)是儿童常见传染病(主要发生在 5 岁以下儿童),典型的特征是口痛、厌食、低热、手、足、口腔等部位出现小疱疹或小溃疡, HFMD 于 1957 首次在新西兰报道<sup>[1]</sup>。可引起 HFMD 的病毒包括柯萨奇病毒 A16(coxsackievirus A16, CVA16)和肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)<sup>[2]</sup>。其中 CVA16 所致的 HFMD 并发症发生率一般低,结局都较好<sup>[3]</sup>。而 EV71 所致的 HFMD 多出现较为严重的神经系统并发症<sup>[4-6]</sup>。已知 EV71 是一种具有高度嗜神经性的正义单链 RNA 病毒,属于小 RNA 病毒科,肠

道病毒属<sup>[7-9]</sup>,在一般情况下, EV71 感染主要是引起儿童 HFMD 和疱疹性咽峡炎<sup>[10]</sup>。越来越多的证据表明,促炎和抗炎细胞因子可能在 EV71 所致 HFMD 发生中发挥关键的作用。目前关于白细胞介素(interleukin, IL)-6 和 IL-13 在 EV71 所致 HFMD 发生中的作用还很少有研究报道。据此,本研究收集 2013 年 1~12 月在本院住院且确诊为 EV71 感染的 HFMD 患者 30 例,观察 HFMD 患者血清 IL-6 和 IL-13 水平变化情况及其临床意义,并对血清 IL-6 和 IL-13 细胞来源进行初步的探讨,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据“重症 EV71 感染疾病的临床治疗专家共识”收集 2013 年 1~12 月在本院住院且确诊为 EV71 感染的 HFMD 30 例,其中临床 II 期(神经系统受累)10 例、III 期(早期心肺衰竭)10 例、IV 期(心肺衰竭)10 例。EV71 感染 HFMD 的诊断标准:中国卫生部 2010 年公布的“手足口病治疗指南”和“粪便 EV71 病毒”测试呈阳性<sup>[11]</sup>。患者入院即抽血获取血清,并在疾病康复时再次抽血获取血清。同时收集同期入院健康体检者血清 10 例,其中男、女各 5 例,年龄(26.25±11.83)岁。其中 II、III 期和 IV 期患者男女比例及年龄差异均无统计学意义,具有可比性,详情见表 1。

表 1 3 组 HFMD 患者临床特征比较

项目	II 期	III 期	IV 期
男/女(n/n)	5/5	4/6	5/5
年龄(岁)	27.34±10.38	24.93±11.02	26.25±12.38

1.2 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 IL-6、IL-13 IL-6 和 IL-13 试剂盒均购自 R&D 公司,严格按照说明书要求操作如下:将血清样品和标准品 100 μL 加入孔中,另留出空白对照孔,用封板膜封住反应孔,37℃ 孵育 90 min;每孔加入 250 μL 洗涤液,震荡 1 min/次洗板,共 4 次;加入配制好的生物素化抗体工作液 100 μL 孔,37℃ 孵育 60 min;洗板 4 次;加入酶结合物工作液 100 μL 孔,37℃ 孵育 30 min;洗板 4 次;加入显色剂 100 μL/well,避光,37℃ 孵育 10~20 min;加入终止液 100 μL/well,短暂震荡混匀后立即测量 OD450 值。

1.3 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)获取 无菌采集的抗凝血按 1:1 的比例缓缓加入已预加淋巴细胞分离液的 15 mL 离心管中,800×g 离心 15 min;滴管吸取白膜层,加入装有 10 mL 无血清 RPMI 1640 培养基的 15 mL 离心管中,600×g 离心 10 min;细胞沉淀以 10 mL 无血清 RPMI 1640 培养基重悬,400×g 离心 8 min;再用 1 mL RPMI-1640 完全培养基(10% FBS,200 IU/mL rhIL-2)将细胞沉淀重悬,台盼蓝染色计数后制备成浓度为 2×10<sup>6</sup> 个/mL 的细胞悬液。

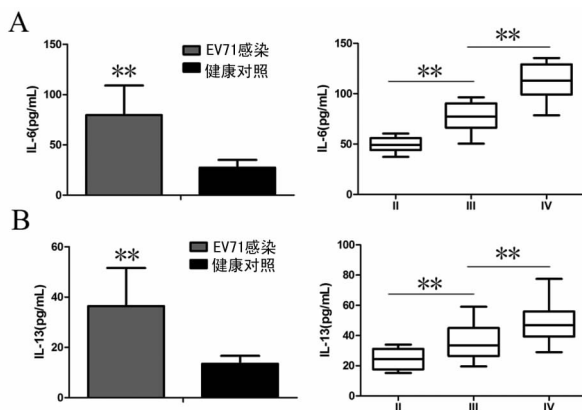
1.4 IL-6 和 IL-13 检测方法 无菌分选获取的外周血单个核细胞置于 24 孔板中,于 24 孔板中加入 100 ng/mL PMA 和 1 μg/mL 离子霉素(Ionomycin)刺激 1 h,随后加入高尔基体阻断剂继续孵育 5 h;收集细胞,先进性细胞表面分子 CD14 和 CD3 染色,后加入 0.5 mL 细胞膜固定透化液重悬细胞,室温避光 30 min;以透化液洗涤细胞 2 次后加入相应荧光抗体(IL-6 和 IL-13),室温避光 30 min;以透化液洗涤细胞 2 次,细胞重悬于 0.2 mL 1%多聚甲醛固定液中待流式细胞仪检测。

1.5 EV71 感染单核细胞和 T 细胞方法 病毒培养与效价测定方法参见文献报道<sup>[12]</sup>,EV71 病毒以感染的病毒数目与细胞数目的比值(multiplicity of infection, MOI)=5 的条件感染 1×10<sup>7</sup> 的 PBMC 细胞。

1.6 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,以 t 检验或 ANOVA 检验的方法对数据进行统计分析。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IL-6 和 IL-13 水平分析 如图 1 所示,EV71 感染手足口病患者血清 IL-6 和 IL-13 水平显著高于健康对照组(P<0.01),且随着疾病严重程度增加,血清 IL-6 和 IL-13 水平亦逐渐升高(P<0.01)。



A: 血清 IL-6 水平检测及其与临床分期相关性;B: 血清 IL-13 水平检测及其与临床分期相关性。

图 1 ELISA 法检测血清 IL-6 和 IL-13 水平及其与临床分期相关性分析

2.2 治疗后患者血清 IL-6 和 IL-13 水平检测 如图 2 所示,治疗后患者血清 IL-6 和 IL-13 水平分别为(48.23±23.14)pg/mL 和(23.25±9.63)pg/mL,与治疗前的(79.63±29.45)pg/mL 和(36.45±15.13)pg/mL 相比显著降低(P<0.01)。

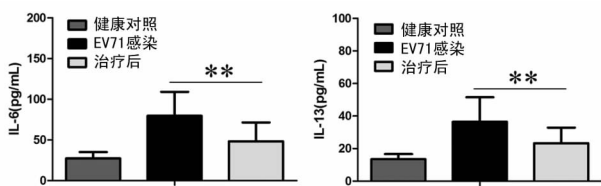


图 2 ELISA 法检测治疗后患者血清 IL-6 和 IL-13 水平

2.3 单核细胞分泌 IL-6 和 T 细胞分泌 IL-13 能力检测 HFMD 外周血单核细胞分泌 IL-6 水平和 T 细胞分泌 IL-13 的水平与健康对照组相比显著升高。

2.4 EV71 病毒可诱导 IL-6 和 IL-13 分泌 EV71 病毒处理健康人单核细胞和 T 细胞后单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 能力显著升高。

3 讨论

IL-6 是一种重要的促炎性细胞因子,当机体受到病原体感染或出现炎症时,IL-6 表达水平会出现显著的升高。同时以往的研究表明,EV71 感染的小鼠会出现短暂的 IL-6、IL-10 和 IFN-γ 水平升高<sup>[13]</sup>。EV71 感染可大大增加 IL-6 的释放,IL-6 抗体治疗后,小鼠表现为组织损伤程度、病毒载量和 B 细胞活化水平降低<sup>[14]</sup>。提示,IL-6 在 EV71 感染 HFMD 发病过程中具有一定的作用。本研究结果显示,HFMD 患者血清 IL-6 水平显著高于健康对照组,同时,随着 HFMD 患者疾病严重程度增加,血清 IL-6 水平亦逐渐升高。该结果与 Zhang 等<sup>[15]</sup>通过比较 99 例 EV71 感染 HFMD 患者和 19 例健康人血清 IL-6 水平,发现的 EV71 感染 HFMD 患者血清 IL-6 水平显著升高结果相一致。IL-13 是一种由 T 细胞分泌的细胞因子,具有潜在的抗炎活性和抑制单核细胞和巨噬细胞细胞毒活性的作用<sup>[16-17]</sup>。研究显示,EV71 感染引起的肺水肿患者具有较高水平的 IL-13 分泌<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,HFMD 患者血清 IL-13 水平显著高于健康对照组,同时,随着 HFMD 患者疾病严重程度增加,血清 IL-13 水平亦逐渐升高。提示,IL-13 在 EV71 感染 HFMD 发病过程中具有一定的作用。据此,本研究的上述结果提示,IL-6 和 IL-13 均在 EV71 感染 HFMD 发病过程中具有一定的作用。

文献报道,血清中 IL-6 主要由单核细胞分泌,而 IL-13 主要由淋巴细胞分泌,据此,作者检测了手足口病患者和健康人外周血单核细胞分泌 IL-6 和 T 细胞分泌 IL-13 的情况,结果发现,手足口病患者外周血单核细胞分泌 IL-6 水平和 T 细胞分泌 IL-13 的水平与健康对照相比显著升高( $P < 0.01$ )。提示,手足口病患者血清中异常升高的 IL-6 和 IL-13 水平可能是因为单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 能力升高所致。为了解释单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 能力升高是否为 EV71 病毒感染所致,本研究采用 EV71 病毒处理健康人单核细胞和 T 细胞,结果发现, EV71 病毒可导致健康人单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 能力升高。据此,上述结果提示, EV71 病毒感染可通过上调单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 的能力,进而导致手足口病的发生。文献报道, EV71 感染后 T 淋巴细胞瘤 Jurkat 细胞分泌子 IL-2、IFN- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-10 的能力下降<sup>[12]</sup>,这一结果与本研究结果存在矛盾之处。推测可能的原因是本研究采用的是新鲜分离的单核细胞和 T 细胞,而文献中采用的是淋巴瘤细胞,而瘤变的细胞功能本身就会出现异常的改变,同时实验环境的不同也会导致不同结果的出现,据此可能使得本研究结果与文献报道不同。

综上所述,本研究结果初步提示 EV71 病毒可能时通过促进单核细胞分泌 IL-6 和 T 细胞分泌 IL-13,致使血清 IL-6 和 IL-13 水平升高,从而参与 HFMD 的发生和发展。研究显示, EV71 感染后所引发的机体免疫功能紊乱、细胞炎症因子异常级联活化等一系列改变均与 Toll 样受体(toll like receptor, TLR)密切相关<sup>[19-21]</sup>。然而,在手足口病患者中, EV71 病毒感染所致单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 能力升高是否与 TLR 相关,以及 EV71 病毒感染所致单核细胞和 T 细胞分泌 IL-6 和 IL-13 能力升高的机制还有待进一步的深入研究。

#### 参考文献

- [1] Robinson CR, Doane FW, Rhodes AJ. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem; Toronto, summer 1957; isolation of group A Coxsackie virus[J]. Can Med Assoc J, 1958, 79(3): 615-621.
- [2] Zhu Z, Zhu S, Guo X, et al. Retrospective seroepidemiology indicated that human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulated widely in central and southern China before large-scale outbreaks from 2008[J]. Virol J, 2010, 7(1): 300.
- [3] Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998[J]. Pediatr Infect Dis J, 1999, 18(12): 1092-1096.
- [4] Chen F, Li JJ, Liu T, et al. Clinical and neuroimaging features of enterovirus 71 related acute flaccid paralysis in patients with hand-foot-mouth disease[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(1): 68-72.
- [5] Chua KB, Kasri AR. Hand Foot and Mouth Disease Due to Enterovirus 71 in Malaysia[J]. Virol Sin, 2011, 26(4): 221-228.
- [6] Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, et al. Clinical features, diagnosis and management of human enterovirus 71 infection[J]. Lancet Neurol, 2010, 9(11): 1097-1105.
- [7] Lu J, He YQ, Yi LN, et al. Viral kinetics of Enterovirus 71 in human habdomyosarcoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(36): 4135-4142.
- [8] Yi L, He Y, Chen Y, et al. Potent inhibition of human enterovirus 71 replication by type I interferon sub-types[J]. Antiviral Therapy, 2011, 16(1): 51-58.
- [9] Liao CC, Liou AT, Chang YS, et al. Immunodeficient mouse models with different disease profiles by in vivo infection with the same clinical isolate of enterovirus 71[J]. J Virol, 2014, 88(21): 12485-12499.
- [10] Huang SW, Lee YP, Hung YT, et al. Exogenous interleukin-6, interleukin-13, and interferon-gamma provoke pulmonary abnormality with mild edema in enterovirus 71-infected mice[J]. Respir Res, 2011(12): 147.
- [11] 蔡榕, 郭岚峰. EV71 所致重症手足口病患儿的临床分析及其预防控制措施[J]. 现代预防医学, 2011, 38(22): 4618-4619.
- [12] 杜伯雨, 白璐, 沈岩, 等. 肠道病毒 EV71 感染对 T 细胞免疫功能影响研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(8): 50-53.
- [13] Huang SW, Lee YP, Hung YT, et al. Exogenous interleukin-6, interleukin-13, and interferon- $\gamma$  provoke pulmonary abnormality with mild edema in enterovirus 71-infected mice[J]. Respir Res, 2011, 6(12): 147.
- [14] Khong WX, Foo DG, Trasti SL, et al. Sustained high levels of interleukin-6 contribute to the pathogenesis of enterovirus 71 in a neonate mouse model[J]. J Virol, 2011, 85(7): 3067-3076.
- [15] Zhang Y, Liu H, Wang L, et al. Comparative study of the cytokine/chemokine response in children with differing disease severity in enterovirus 71-induced hand, foot, and mouth disease[J]. PLoS One, 2013, 8: e67430.
- [16] Minty A, Chalon P, Derocq JM, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses[J]. Nature, 1993, 362(6417): 248-250.
- [17] De Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 102(5): 165-169.
- [18] Chen ZF, Li RQ, Xie ZC, et al. IL-6, IL-10 and IL-13 are associated with pathogenesis in children with Enterovirus 71 infection[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2718-2723.
- [19] 马慧敏, 欧维琳. Toll 样受体在 EV71 感染发病机制中的作用[J]. 华夏医学, 2014, 27(4): 132-135.
- [20] 景志忠, 何小兵, 房永祥, 等. 病毒感染对宿主 TLRs 模式识别与免疫应答信号的影响[J]. 病毒学报, 2012, 28(4): 453-461.
- [21] Triantafilou K, Vakakis E, Richer EA, et al. Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic proinflammatory immune response[J]. Virulence, 2011, 2(1): 22-29.