

Toll 样受体 7 和 8 在 EV71 感染死亡病例脑及肺组织中的表达及意义

李斌¹ 马慧敏¹ 王晓雪¹ 李运千² 刘洪波³
洪炼哲¹ 李雄¹ 郑伟华¹ 欧维琳¹

(桂林医学院附属医院 1. 儿科; 2. 病理科; 3. 检验科, 广西 桂林 541001)

[摘要] **目的** 通过检测肠道病毒 71 型 (EV71) 重症感染死亡病例脑、肺组织中 Toll 样受体 (TLR) 7、8 的表达, 探讨 TLR7、8 的表达在 EV71 感染发病中的意义。**方法** 以 9 例因 EV71 感染死亡的儿童病例为研究对象 (EV71 组), 7 例因意外或非感染性疾病死亡的儿童病例作为对照。采集两组死亡病例尸检时的脑、肺组织, 应用免疫组化法检测两组肺和脑组织中 TLR7、8 的阳性表达; 采用积分光密度值 (IOD) 对 TLR7、8 的表达进行半定量分析。**结果** 免疫组化结果示 EV71 组 TLR7、8 在肺和脑组织中的表达呈强阳性, 其 IOD 值明显高于对照组 ($P<0.05$)。TLR7 和 TLR8 在 EV71 组的肺、脑组织中的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** TLR7、8 在 EV71 重症感染死亡病例的脑、肺组织中呈高表达状态, 提示 TLR7、8 可能参与了 EV71 重症感染患者脑及肺部损害的发病机制。**[中国当代儿科杂志, 2015, 17 (10): 1051-1055]**

[关键词] 肠道病毒 71 型; Toll 样受体 7; Toll 样受体 8; 尸检; 儿童

Expression and significance of toll-like receptors 7 and 8 in brain and lung tissues of death cases caused by EV71 infection

LI Bin, MA Hui-Min, WANG Xiao-Xue, LI Yun-Qian, LIU Hong-Bo, HONG Lian-Zhe, LI Xiong, ZHENG Wei-Hua, OU Wei-Lin. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China (Ou W-L, Email: ouweilin@163.com)

Abstract: Objective To study the significance of toll-like receptors (TLR) -7 and -8 in the pathogenesis of infection caused by Enterovirus type 71 (EV71) through measuring the expression of TLR7 and TLR8 in brain and lung tissues from the death cases caused by EV71 infection. **Methods** Nine children who died of EV71 infection (EV71 group) were selected as study subjects, and 7 children who died of accidents or non-infectious diseases were used as the control group. Brain and lung tissues from the death cases in both groups at autopsy were collected, and immunohistochemistry was applied to detect the expression of TLR7 and TLR8 in lung and brain tissues in both groups. Integrated optical density (IOD) was applied for semi-quantitative analysis of the expression of TLR7 and TLR8. **Results** Immunohistochemical results showed that the expression of TLR7 and TLR8 in lung and brain tissues was strongly positive in the EV71 group, and the IOD values in the EV71 group were also significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression of TLR7 and TLR8 between lung and brain tissues in the EV71 group ($P>0.05$). **Conclusions** TLR7 and TLR8 are highly expressed in lung and brain tissues from the patients who die of severe EV71 infection, suggesting that TLR7 and TLR8 may be involved in the pathogenesis of brain and lung damages caused by severe EV71 infection. **[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(10): 1051-1055]**

Key words: Enterovirus 71; Toll-like receptor 7; Toll-like receptor 8; Autopsy; Child

[收稿日期] 2015-05-14; [接受日期] 2015-07-29

[基金项目] 国家自然科学基金 (81360248); 广西自然科学基金 (2014GXNSFAA118171)。

[作者简介] 李斌, 男, 硕士研究生。

[通信作者] 欧维琳, 女, 主任医师, 教授。

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是一种主要由肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒A16型(coxsackievirus A16, CA16)感染引起的好发于婴幼儿的传染病^[1]。重症病例可累及中枢神经系统、呼吸系统和循环系统,出现脑干脑炎等并发症^[2-3],导致病人死亡。本课题组既往研究表明,重症EV71严重感染病例存在着炎症反应综合征的临床表现^[4]。有研究报道, EV71感染单核细胞可致Toll样受体(toll like receptor, TLR)2、7、8表达上调^[5],但尚无体内试验的报道。为探索TLR7、8是否参与EV71感染病人的炎症反应综合征,本研究对EV71重症感染死亡病例脑和肺组织切片中TLR7、8的表达状况进行了研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年3月至2012年11月来自桂林市各县市级医院因EV71感染死亡并于本院病理科尸检的9例患儿为研究对象。所有死亡病例都具有手足口病的临床表现,同时均经RT-PCR法在肛拭子中检测到EV71病毒核酸,符合卫生部《肠道病毒EV71感染诊疗指南(2008年版)》确诊标准^[6]。对照组为同期我院非感染死亡儿童病例7例,其中外伤后失血性休克死亡儿童4例,先天性心脏病死亡儿童3例(猝死2例,术后死亡1例),均未合并感染性疾病。本课题经桂林医学院附属医院伦理委员会审核批准,所有死亡患儿家属均已签署尸检知情同意书。

1.2 实验主要试剂

兔抗人TLR7单克隆抗体和兔抗人TLR8单克隆抗体(北京博奥森公司),羊抗鼠/兔快速免疫组化MaxVision™检测试剂盒及DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。

1.3 免疫组化

尸检取肺、脑组织,中性甲醛固定,石蜡包埋,3 μm切片常规脱蜡。每例标本取3张切片,每连续切5片取一张。免疫组化SP法染色步骤严格按照抗体说明书所附的免疫组化操作流程进行。用已知的阳性组织做阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

Olympus正置荧光显微镜下随机选取5个不重叠的高倍镜(×400)视野,免疫组化阳性结果(细胞核或细胞质中出现棕黄色颗粒)的判定标准为:

(1)阳性细胞的百分比:<1%计0分;1%~10%计1分;10%~30%计2分;31%~60%计3分;>60%计4分。(2)阳性细胞的染色强弱得分:基本不着色计0分;淡黄色计1分;黄色或棕褐色计2分;深棕色计3分。(1)+(2)即为标本的免疫组化阳性表达水平评分:0~1分为阴性(-),2~3分为弱阳性(+),4~5分为阳性(2+),6~7分为强阳性(3+)。所有切片均由课题组内的一位病理科副主任医师和一位硕士研究生在不了解患者临床资料的情况下独立观察判断,对独立判断不一致的病例再共同进行观察。

1.5 图像处理分析

每张切片随机选取5个高倍镜视野拍照,采用Image Pro Plus version 6.0(IPP)图像分析软件,测定阳性信号积分光密度值(integrated optical density, IOD),对免疫组化结果进行半定量分析。

1.6 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件包对实验数据进行统计学分析。非正态分布计量资料采用中位数(四分位间距)[$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]表示,两个独立样本的比较采用Mann-Whitney *U*检验;EV71组内不同因子在相同组织中的表达比较采用配对样本比较的Wilcoxon符号秩检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR7在肺和脑组织中的表达

TLR7在EV71组和对照组肺、脑组织中均有阳性表达。肺组织中TLR7的阳性表达位于单核-巨噬细胞、淋巴细胞胞浆,部分中性粒细胞也有阳性表达,部分支气管壁上皮细胞、少数肺泡上皮细胞亦显阳性。TLR7在EV71组肺组织中呈强阳性表达,在对照组肺组织中呈弱阳性到阳性表达。脑组织中TLR7的阳性表达主要在神经细胞、小胶质细胞以及部分淋巴细胞的胞浆。TLR7在EV71组脑组织中呈强阳性表达,在对照组脑组织中呈弱阳性表达(图1)。EV71组及对照组肺及

脑组织 TLR7 IOD 值见表 1, EV71 组 TLR7 在肺和脑组织中均呈强阳性高表达状态, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P=0.001$)。

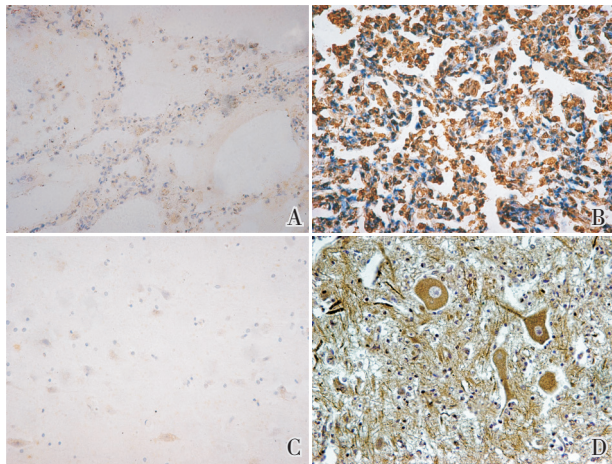


图 1 TLR7 在肺和脑组织中的表达 (IHC, $\times 400$)

A: 对照组肺组织; B: EV71 组肺组织; C: 对照组脑组织; D: EV71 组脑组织。TLR7 在 EV71 组肺、脑组织中呈强阳性表达, 而在对照组肺、脑组织中呈弱阳性至阳性表达。棕黄色颗粒系 TLR7 阳性表达细胞。

表 1 TLR7 在肺和脑组织中的表达 IOD 值

[P_{50} (P_{25} , P_{75})]

组别	例数	肺组织	脑组织
对照组	7	21 898(10 599, 30 571)	21 208(16 051, 28 653)
EV71 组	9	191 180(114 599, 286 383)	75 492(54 885, 83 895)
Z 值		-3.334	-3.334
P 值		0.001	0.001

2.2 TLR8 在肺和脑组织中的表达

TLR8 在 EV71 组和对照组肺、脑组织中均有阳性表达。肺组织中 TLR8 的阳性表达主要位于炎症细胞的胞浆部分, 呈棕色到棕褐色不等, 少许支气管壁肺泡上皮细胞也显阳性着色。TLR8 在 EV71 组肺组织中呈强阳性表达, 在对照组肺组织中呈弱阳性到阳性表达。脑组织中 TLR8 的阳性表达主要表现在神经细胞、胶质细胞以及部分淋巴细胞的胞浆, 呈棕黄色到棕褐色不等。TLR8 在 EV71 组脑组织中呈强阳性表达, 在对照组脑组织中呈弱阳性到阳性表达 (图 2)。EV71 组及对照组肺及脑组织 TLR8 IOD 值见表 2, EV71 组 TLR8 在肺和脑组织中均呈强阳性高表达状态, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P=0.001$)。

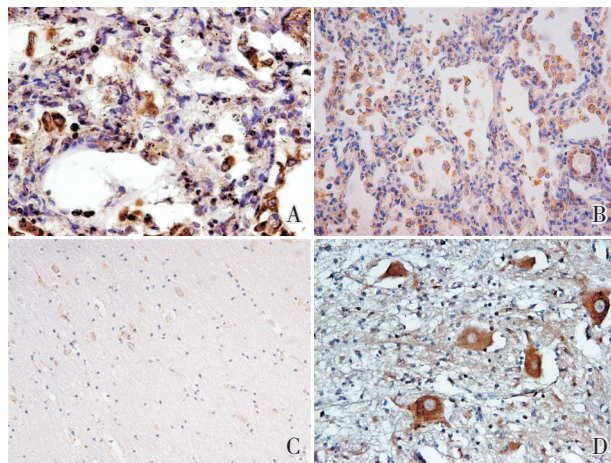


图 2 TLR8 在肺和脑组织中的表达 (IHC, $\times 400$)

A: 对照组肺组织; B: EV71 组肺组织; C: 对照组脑组织; D: EV71 组脑组织。TLR8 在 EV71 组肺、脑组织中呈强阳性表达, 而在对照组肺、脑组织中呈弱阳性至阳性表达。棕黄色颗粒系 TLR8 阳性表达细胞。

表 2 TLR8 在肺和脑组织中的表达 IOD 值

[P_{50} (P_{25} , P_{75})]

组别	例数	肺组织	脑组织
对照组	7	19 461(10 431, 25 313)	20 583(16 219, 30 911)
EV71 组	9	179 467(109 741, 288 702)	68 678(49 628, 78 750)
Z 值		-3.334	-3.334
P 值		0.001	0.001

2.3 TLRs 在 EV71 组肺和脑组织中的表达

TLR7、8 在 EV71 组的肺组织中均呈强阳性表达, 二者的 IOD 值差异无统计学意义 ($P=0.066$)。TLR7、8 高表达于 EV71 感染后的脑组织中, 二者的 IOD 值差异亦无统计学意义 ($P=0.110$)。见表 3。

表 3 TLR7、8 在 EV71 组肺和脑组织中的表达比较

[P_{50} (P_{25} , P_{75})]

组别	例数	肺组织	脑组织
TLR7	9	191 180(114 599, 286 383)	75 492(54 885, 83 895)
TLR8	9	179 467(109 741, 288 702)	68 678(49 628, 78 750)
Z 值		-1.836	-1.599
P 值		0.066	0.110

3 讨论

EV71 是导致手足口病最主要的病毒, 2008~2009 年国家传染病信息管理数据显示轻症手足口病 EV71 阳性率为 52.6%, 重症者阳性率为

83.5%，死亡患者阳性率为96.1%^[7]。EV71属于单股正链小RNA病毒，是小核糖核酸病毒科肠道病毒属的成员。危重型手足口病的临床特征符合全身炎症反应综合征（systemic inflammatory response syndrome, SIRS）的4个诊断指标，EV71脑干脑炎合并肺水肿患儿的全身炎症反应往往伴随着异常大量的IL10、IL13、INF- α 和IFN- γ 产生^[8-11]。越来越多的研究表明重症EV71感染合并肺水肿患儿，既有促炎因子IL-1、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 释放增加，也有抗炎因子IL-10、IL-13分泌亢进及CD3⁺、CD4⁺T淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK）等细胞免疫的抑制^[12-14]。TLRs是一类重要的模式识别受体，在人类有10种，即TLR1~10^[15]。在TLRs家族中识别病毒的主要有TLR2、TLR3、TLR4、TLR7/8、TLR9等。TLR7/8主要识别ssRNA病毒，TLR3识别dsRNA病毒，TLR9识别病毒的染色体基因CPG DNA序列，TLR2和TLR4也涉及病毒包膜糖蛋白的识别^[16-18]。已知鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、柯萨奇病毒、禽流感病毒在不同的细胞通过上调TLRs表达诱导促炎因子产生，启动抗病毒免疫或炎症反应^[19-22]。在EV71感染中，TLRs同样也能启动抗病毒免疫。Gong等^[5]研究发现，分别用活的EV71病毒体外感染、紫外线灭活的EV71处理巨噬细胞，均可以使得TLR2、TLR7和TLR8 mRNA的表达上调，还可以诱导巨噬细胞释放前炎症细胞因子IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 。认为EV71感染时，巨噬细胞通过TLRs激活，诱导产生大量促炎因子，参与EV71感染炎症反应的病理过程。

本研究发现TLR7、8在EV71感染后的肺组织中的阳性表达均显著高于正常对照组中的肺组织。TLR7、8在EV71组脑组织中的阳性表达均明显高于对照组脑组织，推测TLR7、8在EV71感染后的中枢神经系统及肺部病变中具有促进作用，可能与EV71感染所致手足口病的发病机制关系密切，但其具体机制如何，仍需进一步探讨其下游信号传导分子。

因本课题研究资源仅限尸体解剖肺、脑组织蜡块，实验方法及所测因子尚不够全面，故研究存在一定的局限性，我们下一步将从Toll样受体介导的炎症信号通路的角度，体外单核细胞株模拟感染、患者血原代单核细胞分离培养及干预等

多层次多方面进行研究。争取为EV71感染所致手足口病的临床诊治工作提供更多的理论及实验室依据，为获得更多更有效的治疗措施开拓新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Zhu J, Luo Z, Wang J, et al. Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56318.
- [2] 刘忠强, 李熙鸿, 王慧卿, 等. 重症手足口病患儿合并心肺功能衰竭的危险因素及治疗体会[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(8): 589-592.
- [3] Zhang J, Sun J, Chang Z, et al. Characterization of hand, foot, and mouth disease in China between 2008 and 2009[J]. Biomed Environ Sci, 2011, 24(3): 214-221.
- [4] Jiang M, Wei D, Ou WL, et al. Autopsy findings in children with hand, foot, and mouth disease[J]. Nengl J med, 2012, 367(1): 91-92.
- [5] 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: 224.
- [6] 中华人民共和国卫生部办公室. 肠道病毒(EV71)感染诊疗指南(2008年版)[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(6): 551-552.
- [7] Zhang J, Sun J, Chang Z, et al. Characterization of hand, foot, and mouth disease in China between 2008 and 2009[J]. Biomed Environ Sci, 2011, 24(3): 214-221.
- [8] Wang SM, Lei HY, Huang KJ, et al. Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema[J]. J Infect Dis, 2003, 188(4): 564-570.
- [9] Denizot M, Neal JW, Gasque P. Encephalitis due to emerging viruses: CNS innate immunity and potential therapeutic targets[J]. J Infect, 2012, 65(1): 1-16.
- [10] Chen LC, Shyu HW, Chen SH, et al. Enterovirus 71 infection induces Fas ligand expression and apoptosis of Jurkat cells[J]. J Med Virol, 2006, 78(6): 780-786.
- [11] Chen Z, Li R, Xie Z, 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.
- [12] 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.
- [13] Wu J, Cui D, Yang X, et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in children with hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus 71 infection[J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 651872.
- [14] Li W, Teng G, Tong H, et al. Study on risk factors for severe hand, foot and mouth disease in China[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87603.
- [15] Jouhi L, Renkonen S, Atula T, et al. Different toll-like receptor expression patterns in progression toward cancer[J]. Front

- Immunol, 2014, 5: 638.
- [16] Lu X, Xu Q, Bu X, et al. Relationship between expression of toll-like receptors 2/4 in dendritic cells and chronic hepatitis B virus infection[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(9): 6048-6055.
- [17] Dhanasekaran S, Biswas M, Vignesh AR, et al. Toll-like receptor responses to Peste des petits ruminants virus in goats and water buffalo[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111609.
- [18] Ohto U, Shibata T, Tanji H, et al. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9[J]. Nature, 2015, 520(7549): 702-705.
- [19] Triantafilou K, Orthopoulos G, Vakakis E, et al. Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent[J]. Cell Microbiol, 2005, 7(8): 1117-1126.
- [20] Triantafilou K, Vakakis E, Orthopoulos G, et al. TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(8): 2416-2423.
- [21] Xu J, Yang Y, Wang C, et al. Rotavirus and coxsackievirus infection activated different profiles of toll-like receptors and chemokines in intestinal epithelial cells[J]. Inflamm Res, 2009, 58(9): 585-592.
- [22] Barjesteh N, Behboudi S, Brisbin JT, et al. TLR ligands induce antiviral responses in chicken macrophages[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105713.
- (本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2015 年《中国当代儿科杂志》征稿征订启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊), 中国科学引文数据库(CSCD)核心库期刊, 北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM) 及世界卫生组织西太平洋地区医学索引(WPRIM) 收录期刊, 同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 并被《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重, 反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国内外儿科研究及动态、论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究和病例分析)、临床经验、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊, 每月 15 日出版, 向国内外公开发行人。2014 年起本刊改为全彩版, 版面编排、设计更加美观。欢迎全国各高等医学院校, 各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位, 各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 20 元, 全年 240 元。邮发代号: 国内 42-188; 国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统, 免审稿费, 审稿周期 3~6 周。欲浏览本刊或投稿, 请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部, 邮编 410008

电话: 0731-84327402; 传真: 0731-84327922; Email: ddek7402@163.com; 网址: [http:// www.cjcp.org](http://www.cjcp.org)

中国当代儿科杂志编辑部

2015 年 5 月 20 日