

肠道病毒 71 型手足口病致神经系统发病机制的最新进展

高宁 党双锁 李梅

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)是导致手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)的主要病原体之一,作为一种嗜神经组织性病毒与引起 HFMD 婴幼儿严重的神经系统并发症密切相关。目前研究发现, EV71 感染后引发机体一系列改变,包括机体的免疫反应变化、细胞因子级联活化、神经细胞凋亡等。本文就 EV71 HFMD 患者机体发生神经系统病变机制的最新研究进展做简要介绍。

肠道病毒 71 型(EV71)属小 RNA 病毒科(picornaviridae)、肠道病毒属 A 组,是一种新型嗜神经组织性肠道病毒。1969 年 Schmidt 等^[1]首次从美国加利福尼亚州 1 例脑膜炎患儿的脑脊液、脑组织和粪便中分离得到 EV71, 1972 年确定为引起 HFMD 的常见病原体。EV71 感染引起的 HFMD 症状多数轻微,仅表现为皮疹或疱疹性咽峡炎,预后良好。然而,部分患者可引起重症感染,发生无菌性脑膜炎、脑干脑炎、脊髓灰质炎样麻痹、神经源性肺水肿等多种与神经系统相关的严重并发症,极少数病例甚至不出现皮疹等 HFMD 的典型症状^[2],往往预示着病情凶险,病情进展快,致死率及致死率高^[3]。EV71 被认为是继脊髓灰质炎病毒后最值得关注的嗜神经组织性肠道病毒,也被喻为“21 世纪的脊髓灰质炎”。

一、EV71 手足口病的流行病学特点

自 1969 年美国学者 Schmidt 等^[1]首次分离 EV71 以来,至今为止 EV71 感染已在全球引起 3 次大范围的暴发与流行。其在亚太地区呈逐年上升趋势,并发现更多的感染者出现严重的神经系统并发症。如 1997 年马来西亚暴发 EV71 HFMD,共有 2628 例患儿发病,其中 39 例为急性脊髓灰质炎样麻痹或无菌性脑膜炎,30 余例患儿死亡^[4];1998 年台湾 EV71 感染,共发生 129 106 例 HFMD 和红斑疹,其中 405 例发生严重的中枢神经系统感染,78 例患儿死亡,死亡原因主要为合并中枢神经系统感染^[5]。我国继 1981 年上海首例报道后,北京、天津、山东、福建、吉林等地均有 EV71 感染病例报道。2008 年 3 月 HFMD 在安徽省阜阳暴发并迅速蔓延到多个省份,当年全国共有 488 955 例 HFMD 患者,死亡 126 例^[6]。我国卫生部统计 2009 年 HFMD 发病 1 155 525 例,死亡 353 例,较 2008 年发病率提高 35%,病死率提高 80%;2010 年疫情来得更凶猛、更严重,累计报告病例就达 1,774,669 例,累计报告死亡病例 905 例,较 2009 年发病率提高 52.81%,病死率提高 54.89%^[7]。以上数据表明 EV71 HFMD 的发病率及重症发生率均呈逐年上升趋势,预防控制

形势十分严峻。因此,关注 EV71 嗜神经性和神经系统并发症尤为重要。

二、EV71 引发神经系统并发症的主要特点

根据 EV71 感染发生的临床特点,可分为 4 期:手足口病期,中枢神经系统感染期,呼吸循环衰竭期和恢复-后遗症期^[8]。现有报道中, EV71 感染的重症 HFMD 以中枢神经系统紊乱为主要特征,且多见于婴幼儿。EV71 主要通过诱导中枢神经组织炎症反应(脑炎、无菌性脑膜炎和脑干脑炎)而导致神经系统紊乱,其中病变最常见于大脑皮层、脑干和脊髓,而在小脑皮质、丘脑神经核、外周神经及自主神经节较少^[9]。神经组织病理学主要特征为血管周围套、大量水肿、噬神经细胞现象和小胶质细胞结节,类似于其他病毒引起的脑炎变化^[10]。EV71 抗原及 RNA 只在吞噬细胞和神经元突起可见,但未能检测到病毒包涵体^[9]。

除病毒自身、宿主和环境因素与 EV71 的易感性和临床神经系统并发症密切相关外,患儿年龄是 EV71 感染致重症或死亡病例的最显著高危因素,尤其是 3 岁以下的婴幼儿^[8]。此外,研究证实 HLA-A33 是亚洲人较白种人多发的易感因素,并且 HLA-A2 也可能是心肺衰竭相关因素^[11]。细胞毒 T 淋巴细胞抗原 4(cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, CTLA-4)是一种表达于宿主淋巴细胞表面与免疫信号传递有关的配体蛋白分子,在与 B7 结合后能负调节 T 细胞的活化,参与机体对病原体感染的细胞免疫过程。采用组织病理学、免疫组织化学法、RT-PCR 法检测中枢神经系统有关细胞包括神经元、神经元突起以及相关炎症细胞所表达的 EV71 抗原。对 EV71 感染的脑炎患者行超声和核磁共振(MRI)检查均显示中枢神经系统皮质和灰质均发生广泛炎症^[12]。根据疾病的不同临床症状和严重程度,通过 MRI 扫描受损部位发现主要涉及延髓、脑桥、中脑及小脑核。EV71 感染死亡病例主要是神经性肺水肿或肺出血^[3],炎症仅见于脊髓和大脑区域,而在心、肺组织未检测到 EV71 病毒颗粒或炎症表现。

急性弛缓性麻痹(acute flaccid paralysis, AFP)是 EV71 感染和其诱发脑脊髓炎的重要并发症之一,其中 2%~10% 的 EV71 感染并发脑脊髓炎患者可进展为 AFP, MRI 显示引起麻痹位点主要取决病灶是否位于脊髓前角和脊神经根。研究表明 EV71 导致麻痹程度较脊髓灰质炎病毒所致 AFP 轻,并且单侧 AFP 可逆转,双侧 AFP 和双侧前角病变则多遗留运动障碍^[6]。EV71 合并肺衰竭恢复后,约 60% 患者有肌无力、肌萎缩等后遗症。因此, EV71 感染引发的神经源性肺水肿可能与患者康复后后遗症的严重程度有关。

三、EV71 引发重症并发症相关免疫应答

近年来,诸多研究证实 EV71 感染后机体的免疫反应变化与 EV71 所致重症并发症密切相关。EV71 引发重症并发

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.021

作者单位:710004 西安市,西安交通大学医学院第二附属医院感染科

通讯作者:党双锁, Email:dang212@126.com

症中多表现为神经源性肺水肿 (neurogenic pulmonary oedema, NPE), NPE 在起病第 1~3 d 突然发生心动过速、呼吸困难、发绀和休克, 病情凶险, 预后不佳; 组织病理学检查结果提示属于神经源性而非炎症性, 但具体机制尚不清楚。Lin 等^[13] 发现 EV71 感染者常见特征为血清中 NK 细胞、CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 淋巴细胞数量显著下降, 前致炎细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平均高于仅合并脑炎患者; 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平在健康人群和仅合并脑炎患儿之间无显著差异, 提示这 3 种前致炎因子与 EV71 感染合并肺水肿的发生有一定关系。Wang 等^[14] 也证明肺水肿患者血清中 T 淋巴细胞相关细胞因子 IL-10、IL-13 和 IFN- γ 水平升高, 且脑脊液中 IL-6、IFN- β 和 IFN- γ 也升高, 并且脑脊液中 IL-6 水平升高在中枢神经系统感染早期与肺水肿发生有密切关系, 由此可以将血清 IL-6 水平作为一项重要的判断临床预后指标。另外, 合并脑干脑炎及肺水肿患者血清中免疫因子和趋化因子如 IL-8、IFN- γ 诱导蛋白 (interferon- γ inducible protein, IP-10)、单核细胞趋化蛋白 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 和 IFN- γ 诱生的单核因子 (monokine induced by IFN- γ , MIG) 均高于仅中枢神经系统受累患者; 同时出现脑干脑炎及肺水肿患者脑脊液中 IP-10、IL-8 水平显著高于正常对照组, 以上提示 EV71 感染引发肺水肿源于中枢神经系统病变^[15]。

临床上应用一种被动免疫治疗-静脉注射免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG), 即通过转移大量抗体中和患者体内各种病原体。研究显示 EV71 感染合并肺水肿患者经 IVIG 治疗后, 血清中 IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 和 IFN- γ 水平显著下降, 由此表明以上细胞因子在肺水肿发病过程中起到一定作用, IVIG 治疗对 EV71 感染引起的早期肺水肿有一定的疗效^[16]。

四、EV71 引发神经系统并发症的机制

1. EV71 感染诱导宿主免疫反应: EV71 合并脑炎患者可诱导中枢神经系统各级水平的炎性反应, Wong 等^[9] 通过尸检检测到中枢系统 EV71 RNA 和抗原阳性得以证明。上述研究探讨 EV71 诱导中枢神经系统并发症的机制, 表明前致炎细胞因子与神经源性肺水肿可能存在一定关系, 且 EV71 感染免疫细胞引起大量前炎症细胞因子释放进而促进疾病的重症化。培养 EV71 感染的人 T 细胞株 (Jurkat)、巨噬细胞株 (THP-1) 和外周血单核细胞时, 可诱导这些免疫细胞株产生前炎症因子如 TNF- α 、巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 等。EV71 感染人树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 后, 通过 DCs 特异性细胞间黏附分子-3 捕获非整合素 (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin, DC-SIGN) 通路刺激 DCs 释放前炎症因子 IL-6、IL-12 和 TNF- α ^[17]。该研究发现 NF- κ B 激活可能为 EV71 感染产生前致炎因子另外通路的标志, 如介导调节产生 IFN- β 、TNF- α , 故激活 NF- κ B 可能与炎症发生有一定关系。血管细胞黏附分子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 是促进中性粒细胞或淋巴细胞与血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 结合的因子, 中性粒细胞与 VSMC 相互作用在 EV71 感染过程炎症和免疫反应发生中起一定作用^[18]。EV71 感染通过激活

PDGFR、PI3K/Akt、p38 MAPK、JNK 和 NF- κ B 通路诱导表达 VCAM-1; 相反, 通过 VCAM-1 抑制剂可降低 EV71 诱导中性粒细胞与 VSMC 的结合力。最近研究发现 EV71 感染的 SN-K-MC 细胞中 COX-2 表达升高, 并且 COX-2、PGE2 代谢产物能促进 EV71 在神经细胞中的复制^[19], 可见 COX-2 信号转导通路可作为 EV71 感染所致神经系统并发症的发病机制通路之一。

2. EV71 感染诱导神经细胞凋亡: Chang 等^[20] 证实 EV71 感染后可见神经细胞凋亡, 形态学上主要表现为 DNA 裂解、凋亡小体的形成。EV71 感染神经细胞发生凋亡标志为早期凋亡、磷脂酰丝氨酸从内侧易位到外侧质膜小叶。细胞凋亡为防止病毒子代产生和传播的病毒防御保护机制。为明确 EV71 感染所致神经细胞凋亡的具体激活途径, Chang 等通过观察 EV71 感染细胞内 caspases 的表达, 发现由活化和裂解 caspases-9 介导的线粒体途径被认为是 EV71 诱导神经细胞凋亡的主要途径。细胞色素 C 从线粒体内外溢到细胞浆, 随后被 caspases-9 裂解, 这一过程也被认为是诱导神经细胞凋亡的途径之一。细胞周期依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase 5, Cdk5) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白, 能够在不同分化阶段的神经细胞上表达, 又是神经细胞受到毒性刺激的信号感受器。Abl 激活 Cdk5 激酶使 Cdk5-Y15 磷酸化 (Cdk5-pY15) 诱发神经细胞凋亡^[21]。Chen 等^[22] 证实激活 Cdk5 是 EV71 感染诱发神经细胞凋亡必不可少的, 同时也证实了 EV71 激发 Abl-Cdk5 信号是一种亲神经细胞凋亡通路。在 EV71 感染成角质细胞瘤株 (SF268) 研究中证实, 病毒蛋白合成是 EV71 诱导凋亡的关键阶段, 其中 EV71 3C 蛋白酶是诱导感染神经细胞发生凋亡的因子^[23]。

3. EV71 感染宿主细胞的受体: 肠道病毒受体在不同组织细胞上的分布差异性为病毒对人体组织器官嗜性倾向的分子基础。神经特异多聚嘧啶核苷酸序列结合蛋白 (PTBP) 是脊髓灰质炎病毒神经嗜性的有力证据^[24]。EV71 的受体主要表达于白细胞、树突状细胞、呼吸道和胃肠道细胞^[25]。有研究发现唾液酸酶处理过的肠细胞 DLD-1 可降低 20 倍以上的 EV71 感染, EV71 由唾液酸聚糖为受体感染肠细胞 DLD-1, 而于天然母体中获取的唾液酸半乳糖能够阻止 EV71 感染肠细胞 DLD-1^[26]; II 型清道夫受体 (scavenger receptor class B 2, SCAR B2) 可以同时作为 EV71 和 Cox16 感染增殖及促进细胞病变的受体^[27]; 人 P-选择素糖蛋白配体 (human P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1, CD162) 作为 EV71 感染的受体, PSGL-1 阳性表达的淋巴细胞在其细胞嗜性和发病过程中起到一定作用^[28]。

EV71 感染人体细胞可能与神经膜上的某些免疫球蛋白超家族 (IgSF) 有关, 通过受体-病毒抗原结合方式感染宿主神经细胞, 继而致神经细胞病变受损。Wang 等^[29] 采用 EV71 脑炎毒株 4643 于体外感染神经元细胞、神经胶质细胞和咽喉部黏膜细胞 3 种 EV71 靶细胞系, 结果显示 EV71 感染可导致上述 3 种细胞发生病变和神经元生长因子受体 (neuron growth factor receptor, NGFR) 特征性表达上调, 其中以神经元细胞最为显著, 提示 NGFR 可能是 EV71 的神经嗜性受体。

五、结论

综上所述, EV71 具有的神经毒性作用可引发感染者严重并发症, 其发生机制可能通过诱发机体细胞免疫发生改变, 如 T 淋巴细胞数量显著下降, 刺激患者致炎细胞因子水平的提高, 诱发神经细胞凋亡及通过受体-病毒抗原结合方式等因素导致机体发生严重的神经系统并发症等。为此, 建立一种合适的动物模型有助于明确 EV71 相关性神经病学发病机制有着重要的意义。近年来, 有学者用短尾猴和小鼠作为研究 EV71 相关神经系统疾病的模型, 但人与动物在病毒复制位点上存在一定差异。因此有效而理想的动物模型有待进一步建立。

目前关于 EV71 HFMD 的治疗尚无有效的抗 EV71 药物, 临床上只能对症处理。此外, 在预防方面, 更无有效疫苗可用。针对目前 HFMD 防控的严峻形势, 加强对其发生机制的研究及疫苗的研发迫在眉睫。

参 考 文 献

- Schmidt NJ, EH Lennette, HH Ho, et al. Apparently new enterovirus isolated from patients with disease of central nervous-dystem. *J Infect Dis*, 1974, 129(3):304-309.
- Chong CY, Chan KP, Shah VA, et al. Hand, foot and mouth disease in Singapore: a comparison of fatal and non-fatal cases. *Acta Paediatr*, 2003, 92(10):1163-1169.
- Huang CC, Liu CC, Chang YC, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *New Engl J Med*, 1999, 341(13):936-942.
- Shimizu H, Utama A, Yoshii K, et al. Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998. *Jpn J Infect Dis*, 1999, 52(1):12-15.
- Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med*, 1999, 341(13):929-935.
- Yang F, Ren LL, Xiong ZH, et al. Enterovirus 71 Outbreak in the People's Republic of China in 2008. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(7):2351-2352.
- 中华人民共和国卫生部. 2010 年全国法定传染病疫情概况. [2011-02-10]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohjbyfkzj/s3578/201102/50646.htm>.
- Chang LY, Lin TY, Hsu KH, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet*, 1999, 354(9191):1682-1686.
- Wong KT, Munisamy B, Ong KC, et al. The distribution of inflammation and virus in human enterovirus 71 encephalomyelitis suggests possible viral spread by neural pathways. *J Neuropath Exp Neur*, 2008, 67(2):162-169.
- German AC, Myint KSA, Mai NTH, et al. A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model. *T Roy Soc Trop Med H*, 2006, 100(12):1135-1145.
- Chang LY, Chang IS, Chen WJ, et al. HLA-A33 Is Associated with susceptibility to Enterovirus 71 infection. *Pediatrics*, 2008, 122(6):1271-1276.
- Verboon-Macielek MA, Groenendaal F, Cowan F, et al. White matter damage in neonatal enterovirus meningoencephalitis. *Neurology*, 2006, 66(8):1267-1269.
- Lin TY, Chang LY, Huang YC, et al. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections: implications for early recognition and therapy. *Acta Paediatr*, 2002, 91(6):632-635.
- 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 Infect Dis*, 2003, 188(4):564-570.
- Wang SM, Lei HY, Yu CK, et al. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated Brainstem encephalitis. *J Infect Dis*, 2008, 198(7):1002-1006.
- Wang SM, Lei HY, Su LY, et al. Cerebrospinal fluid cytokines in enterovirus 71 brain stem encephalitis and echovirus meningitis infections of varying severity. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(7):677-682.
- Lin YW, Wang SW, Tung YY, et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp Biol Med*, 2009, 234(10):1166-1173.
- Tung WH, Hsieh HL, Yang CM, et al. EV71 induces VCAM-1 expression via PDGF receptor, PI3-K/Akt, p38 MAPK, JNK and NF-kappa B in vascular smooth muscle cells. *Cell signal*, 2007, 19(10):2127-2137.
- Tung WH, Hsieh HL, Yang CM. Enterovirus 71 induces COX-2 expression via MAPKs, NF-kappa B, and AP-1 in SK-N-SH cells: role of PGE(2) in viral replication. *Cell signal*, 2010, 22(2):234-246.
- Chang SC, Lin JY, Lo LYC, et al. Diverse apoptotic pathways in enterovirus 71-infected cells. *J Neurovirol*, 2004, 10(6):338-349.
- Lin H, Lin TY, Juang JL, et al. Abl deregulates Cdk5 kinase activity and subcellular localization in Drosophila neurodegeneration. *Cell Death Differ*, 2007, 14(3):607-615.
- Chen TC, Lai YK, Yu CK, et al. Enterovirus 71 triggering of neuronal apoptosis through activation of Abl-Cdk5 signalling. *Cell Microbiol*, 2007, 9(11):2676-2688.
- Shih SR, Weng KF, Stollar V, et al. Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells. *J Neurovirol*, 2008, 14(1):53-61.
- Guest S, Pilipenko E, Sharma K, et al. Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *J Virol*, 2004, 78(20):11097-11107.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11):778-790.
- Yang B, Chuang H, Yang KD. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virology*, 2009, 6:141.
- Yamayoshi S, Yamashita Y, Li JF, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med*, 2009, 15(7):798-801.
- Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med*, 2009, 15(7):794-797.
- Wang SM, Chen IC, Su LY, et al. Enterovirus 71 infection of monocytes with antibody-dependent enhancement. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(10):1517-1523.

(收稿日期:2011-05-03)

(本文编辑:孙荣华)

高宁, 党双锁, 李梅. 肠道病毒 71 型手足口病致神经系统发病机制的最新进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(2):162-164.