文章编号:1000-5404(2014)13-1359-06

论著

肠道病毒71型诱导人脑微血管内皮细胞的凋亡

罗文英[1,2],吴显劲[1],彭 亮[3],何肖龙[2],张立科[2],张文炳[2],曹 虹[2] (524001 广东 湛江,广东医学院附属医院检验科[1];510515 广州,南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物学系[2];510260 广州,广州医科大学第二附属医院检验科[3])

[摘要] **目的** 探讨肠道病毒71型(enterovirus 71,EV71)诱导人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells,HBMECs)的凋亡及其相关机制。**方法** 流式细胞仪检测EV71能否诱导HBMECs的凋亡;免疫荧光方法观察EV71诱导HBMECs线粒体膜电位的改变情况;免疫印迹检测DJ-1蛋白在EV71感染HBMECs不同时间点的表达;酶联免疫方法检测EV71感染HBMECs不同时间点TNF-α、IL-10、IL-4的分泌情况。**结果** EV71感染HBMECs不同时间点的HBMECs的早期凋亡数与晚期凋亡、坏死细胞数具有显著差异($P<0.01$);随着感染时间延长,HBMECs早期凋亡数与晚期凋亡、坏死细胞数均有所增加,但以晚期凋亡、坏死细胞数增加更明显($P<0.01$)。与对照组相比,EV71感染HBMECs 8 h线粒体膜电位明显降低($P<0.01$);EV71感染HBMECs 16、24 h,DJ-1表达增强($P<0.05$)。EV71感染HBMECs不同时间点TNF-α、IL-10、IL-4的浓度具有明显差异($P<0.01$)。**结论** EV71能诱导HBMECs的凋亡以及改变线粒体膜通透性,EV71还能诱导HBMECs中DJ-1的表达改变和TNF-α、IL-10、IL-4的分泌改变。

[关键词] 肠道病毒71型;人脑微血管内皮细胞;凋亡;DJ-1;细胞因子
[中图法分类号] R322.124; R329.25; R373.25 [文献标志码] A

Enterovirus 71 induces apoptosis in human brain microvascular endothelial cells

Luo Wenying[1,2], Wu Xianjing[1], Peng Liang[3], He Xiaolong[2], Zhang Like[2], Zhang Wenbing[2], Cao Hong[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Guangdong Medical college, Zhanjiang, Guangdong Province, 524001; [2]Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [3]Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510260, China)

[**Abstract**] Objective To investigate whether enterovirus 71 (EV71) induces the apoptosis in human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) and the possible underlying mechanism. Methods The apoptosis of HBMECs was detected by flow cytometry after EV71 infection. The mitochondrial membrane potential of the infected HBMECs was detected by immunofluorescence staining. The expression of DJ-1 in the infected HBMECs was observed by Western blot analysis. Concentration of TNF-α, IL-4 and IL-10 in the supernatant of HBMECs was detected by ELISA. Results EV71 induced apoptosis in HBMECs in a time-dependent fashion ($P<0.01$). With the elapse of infection time, the numbers of terminal apoptosis cells and necrotic cells were increased significantly, compared with the cells at the early apoptosis ($P<0.01$). EV71 infected HBMECs resulted in significant decreased in the mitochondrial membrane potential in 8 h after infection than the control ($P<0.01$). Higher expression of DJ-1 protein was observed in 16 and 24 h after EV71 infection when compared with the control ($P<0.05$). Significant differences were found in the supernatant concentrations of TNF-α, IL-4, and IL-10 in EV71 infected HBMECs for different time periods ($P<0.01$). Conclusion EV71 induces the apoptosis and loss of $\Delta\psi m$ of HBMECs, and the expression of DJ-1 and the releases of TNF-α, IL-4, and IL-10 in HBMECs.

[**Key words**] enterovirus 71; human brain microvascular endothelial cells; apoptosis; DJ-1; cytokines

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81301478), the Grant from Dean of School of Public Health Fund of Southern Medical University (GW201201) and the Doctorial Staring Foundation of Guangdong Medical College (XB1325). Corresponding author: Cao Hong, Tel: 86-20-61648307, E-mail: gzhcao@smu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(81301478);南方医科大学公卫学院院长基金(GW201201);广东医学院博士启动课题(XB1325)
[通信作者] 曹 虹,电话:(020) 61648307,E-mail: gzhcao@smu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140513.0855.014.html(2014-05-13)

肠道病毒71型(enterovirus 71,EV71)属于小RNA病毒科肠道病毒属成员,是手足口病(hand-foot-mouth disease,HFMD)的主要病原体之一。EV71感染所引起的HFMD的临床症状与柯萨奇A16感染的临床表现一般较难区别,但EV71感染还能够引起脑干脑炎、无菌性脑膜炎和脊髓灰质炎样麻痹等多种与中枢神经系统(central nervous system,CNS)相关的疾病,严重时可危及生命[1-4]。至今,尚无有效的疫苗及治疗方法消除这种感染性疾病,主要是与其致病机制尚不清楚有关。因此,探明EV71感染CNS的致病机制对于防治EV71致CNS疾病至关重要。我们前期研究表明,EV71可以感染血脑屏障(blood brain barrier,BBB)重要构成成分之一的脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells,HBMECs),并在其中复制,但其相关机制尚不明确[5]。实验表明,病毒感染与细胞凋亡有着密切的联系[6]。研究证实EV71可以诱导内皮细胞的凋亡[7]。为了进一步探讨EV71感染HBMECs的相关机制,本研究采用来自于重症手足口病患者的EV71分离野毒株感染HBMECs,通过免疫荧光方法观察EV71诱导HBMECs线粒体膜电位的改变;流式细胞仪技术检测EV71能否导致HBMECs的凋亡;免疫印迹检测DJ-1蛋白在EV71感染HBMECs不同时间点的表达;酶联免疫方法检测EV71感染HBMECs不同时间点TNF-α、IL-10、IL-4的分泌情况。

1 材料与方法

1.1 材料

人脑微血管内皮细胞由黄胜和教授(美国南加州大学)惠赠,RD细胞由广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所提供,EV71毒株(KC122766)来自于临床诊断为重症手足口病患者的EV71分离鉴定毒株, Flurorescent Mounting Medium with DAPI(中杉金桥公司,北京),JC-1 Mitochondrial membrane potential assay kit(凯基生物公司,南京),Annexin V-FITC Cell apoptosis Detection Kit(博士德公司,武汉),DJ-1 rabbit anti-human polyclonal antibody(Santa公司,美国),人IL-10、IL-4、TNF-α均购自上海宝英生物科技有限公司。胎牛血清(HyClone公司,南美),高糖DMEM及其他细胞培养试剂均购自Gibco公司,化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病毒悬液的准备及病毒滴度的测定 采用RD细胞对EV71病毒增殖,采用含有10%胎牛血清的DMEC生长液增殖,80%~90%长成单层的RD细胞移去生长液,加入分离的病毒悬液,当有90%的细胞显示有细胞病变时,细胞团块和培养基被收集并冷冻3次,在1 000×g离心力下离心10 min,上清液采用0.22 μL过滤膜(Millipore bedford MA)过滤,分装冻存在-80 ℃备用,病毒滴度测定参考文献[8]。

1.2.2 HBMECs线粒体膜电位检测 参见文献[9-10]。HBMECs用(MOI=5)EV71或用含2% FBS的细胞维持液处理8 h,采用JC-1染色探针,荧光显微镜观察。JC-1在正常细胞内聚集在线粒体内形成多聚体呈红色荧光,而在凋亡细胞内,由于线粒体跨膜电位的破坏,不能聚集到线粒体内,以单体的形式存在于胞质内发绿色荧光,以荧光强度比值(多聚体/单体)表示线粒体膜电位水平。

1.2.3 Annexin V染色测定HBMECs凋亡 参见文献[9-10]。HBMECs采用(MOI=5)EV71分别感染1、8、16、24 h,对照组为0 h。收集细胞,采用Annexin V/PI染料染色,采用FACSCalibiir和CellQuest软件分析10 000个染色细胞,Annexin V(+)为凋亡细胞,其中$FITC^+PI^-$为早期凋亡(EA),$FITC^+PI^+$为晚期凋亡、坏死细胞(NA)。流式细胞仪分析凋亡细胞及自动得出凋亡细胞占分析总细胞数的百分比(凋亡指数),试验重复3次,取其平均值。

1.2.4 DJ-1蛋白免疫印迹分析 按照文献[11]操作步骤进行。HBMECs在100 mm直径细胞培养皿内培养,当达到80%~90%细胞融合时,细胞用MOI=5的EV71病毒悬液在37 ℃感染1、8、16、24 h,对照组用培养基模拟感染。收集细胞悬液提取蛋白进行免疫印迹实验,其中DJ-1一抗浓度为(1∶500)。DJ-1蛋白灰度值采用Quantity One软件进行分析,目的蛋白的灰度值除以内参tublin的灰度值以校正误差,所得结果代表某样品的DJ-1相对含量。

1.2.5 TNF-α、IL-10、IL-4的检测 6孔板内HBMECs细胞同上分别采用MOI=5的EV71感染1、8、16、24 h,并设置对照组为0 h,收集不同时间点培养上清液各1 mL立即冻至-70 ℃备用。重复3次收集样本,细胞因子检测根据试剂盒标准操作规程进行,每个样本重复3次检测,取其平均值。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,检验水准$\alpha=0.05$。细胞凋亡数比较采用两个重复因素的方差分析,细胞因子数据比较采用单因素方差分析。相关统计图采用Origin绘图软件制作。

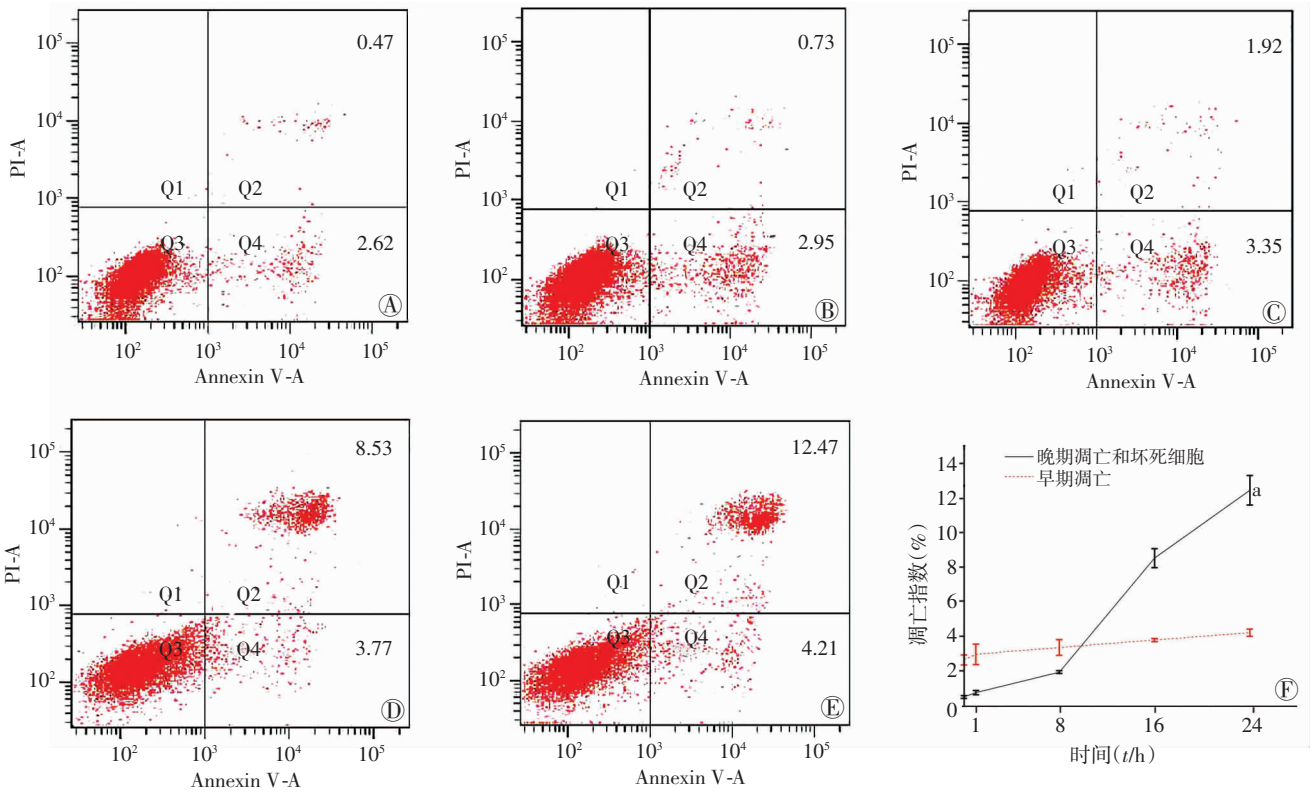
2 结果

2.1 EV71感染HBMECs致细胞凋亡

病毒作用1 h后,有3.68%的HBMECs Annexin V染色为阳性;Annexin V染色阳性比例随着时间延长逐渐升高,24 h后达到16.68%;未染毒HBMECs组,即对照组(0 h)比例较低(3.09%),见图1。不同时间点的HBMECs的早期凋亡数与晚期凋亡、坏死细胞数比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。随着感染时间延长,早期凋亡数与晚期凋亡、坏死细胞数均有所增加,但以晚期凋亡、坏死细胞数增加更明显($P<0.01$),见图1F。

2.2 EV71感染HBMECs后线粒体膜电位变化

与对照组相比,EV71感染HBMECs 8 h后细胞红色荧光明显减弱,将红色荧光与绿色荧光融合后,绿色荧光明显比对照组强(图2),表明EV71感染HBMECs可造成线粒体膜电位的降低。采用IPP 6.0图像分析软件进一步分析得出荧光强度比值:对照组(1.001±0.020),EV71感染组(0.016±0.007),两组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。



A～E:EV71 感染 0、1、8、16、24 h HBMECs 凋亡情况;F:HBMECs 早期凋亡指数(Q4)与晚期凋亡和坏死细胞凋亡指数(Q2)的变化趋势
a: $P<0.01$,与早期凋亡指数比较

图 1　流式细胞仪检测 EV71 在不同时间点诱导 HBMECs 的凋亡情况

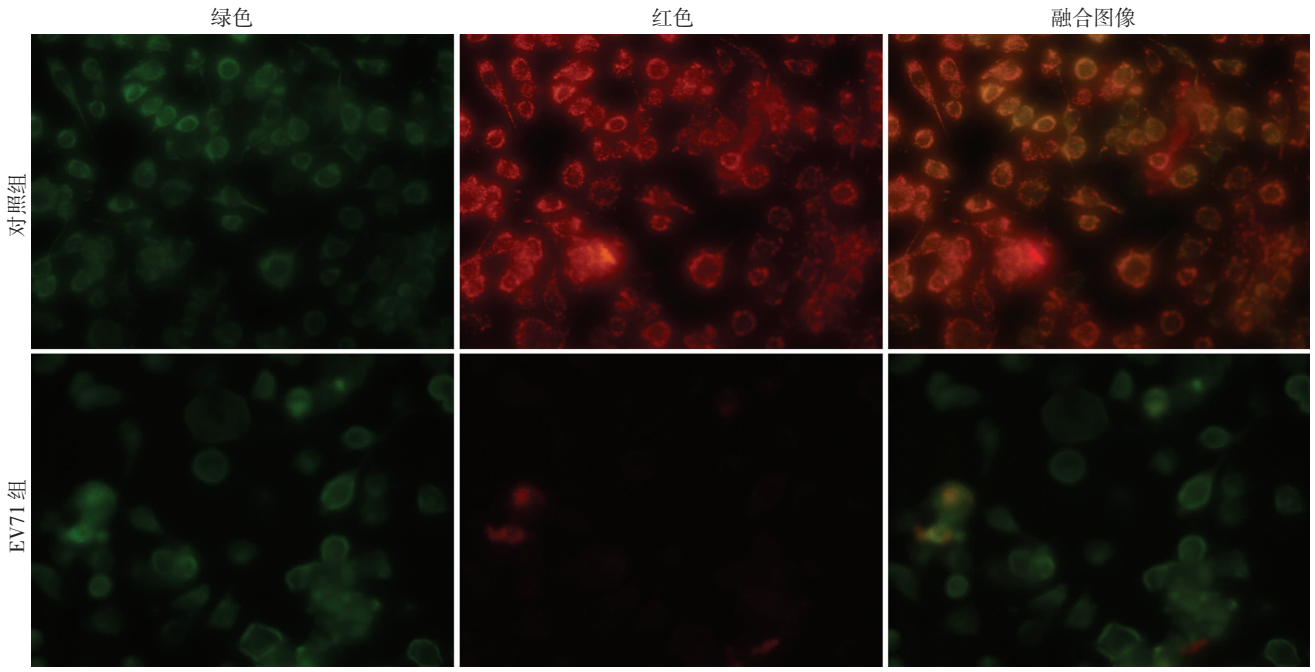


图 2　EV71 诱导 HBMECs 线粒体膜电位改变的荧光检测　(×200)

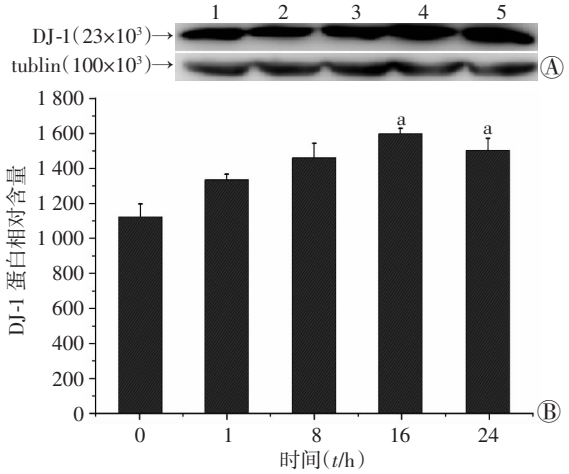
2.3　DJ-1 在 EV71 感染 HBMECs 不同时间点的表达

由图 3 可见,DJ-1 在 EV71 感染 HBMECs 16、24 h 时相对于未感染时(0 h)表达明显增强($P<0.05$),而内参 tublin 条带在不同时间点的表达量一致,这就排除了因上样量不一致而导致的假阳性结果。

2.4　TNF-α、IL-10、IL-4 在 EV71 感染 HBMECs 不同时间点的分泌情况

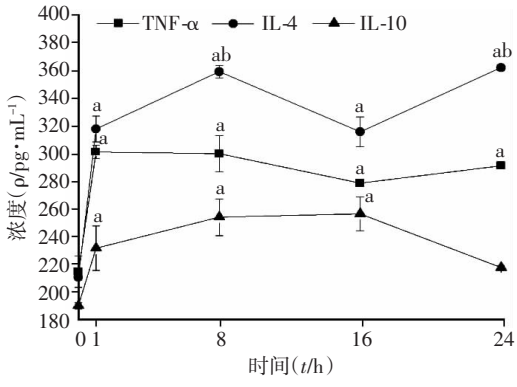
TNF-α、IL-10、IL-4 在 EV71 感染 HBMECs 不同时间点分泌水平见图 4,TNF-α、IL-10、IL-4 在 EV71 感染 HBMECs 0、1、8、16、24 h 不同时间点的分泌水平均明显不同($P<0.01$)。IL-4

浓度在EV71感染HBMECs 1、8、16、24 h时均显著高于0 h（$P<0.01$），1 h与16 h相比差异无统计学意义（$P=0.776$）；8 h时IL-4浓度相对于0、1、16 h差异有统计学意义（$P<0.01$），与24 h相比差异无统计学意义（$P=0.669$）。IL-10浓度在EV71感染HBMECs 24 h时（217.37±1.34）pg/mL高于未感染时（189.69±2.23）pg/mL，但差异无统计学意义（$P=0.062$）；1、8、16、24 h各时间点IL-10浓度差异无统计学意义（$P>0.05$），但1、8、16 h相对于未感染时（0 h）差异均有统计学意义（$P<0.01$）。TNF-α浓度在EV71感染HBMECs 1、8、16、24 h各时间点差异无统计学意义（$P>0.05$），与未感染时（0 h）比较差异均有统计学意义（$P<0.01$）。以IL-4整体分泌水平最高。



A：免疫印迹检测结果　1～5：EV71感染HBMECs 0、1、8、16、24 h；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，与0 h（未感染时）比较

图3　免疫印迹检测DJ-1在EV71感染HBMECs不同时间点的表达



a：$P<0.01$，与0 h（未感染时）比较；b：$P<0.01$，与1 h比较

图4　ELISA检测EV71诱导HBMECs在不同时间点IL-10、IL-4和TNF-α的分泌水平

3　讨论

2008年中国内地发生了亚太地区有史以来规模最大的以EV71为优势毒株的手足口病大流行，相继，众多城市爆发了以EV71为优势毒株的手足口病流行[12-13]。EV71首先在咽和肠道淋巴组织进行繁殖扩增，然后通过形成病毒血症进行扩散，最终侵犯脑膜、脊髓和皮肤等靶器官[14]。然而，EV71如何从起始复制位点（肠道）进入到CNS不是很清楚。EV71可通过外周神经沿逆轴突方式感染CNS或通过血运途径穿BBB感染CNS[15-16]，那么EV71究竟以何种方式穿BBB是我们想探讨的问题。我们前期研究证实EV71能感染BBB主要组分之一HBMECs，Chen等[15]研究证实EV71能通过激活Abl-Cdk5信号通路触发神经细胞的凋亡。本研究进一步探讨EV71能否诱导HBMECs凋亡以明确EV71感染HBMECs的相关机制。

采用标记了FITC的Annexin V作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。PI是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI能够透过细胞膜与细胞核结合呈现红色。将Annexin V与PI匹配使用，可以将凋亡早期的细胞和凋亡晚期的细胞以及死细胞区分开来。本研究通过Annexin V染色发现EV71感染HBMECs不同时间点凋亡率差异有统计学意义（$P<0.01$）；随着感染时间延长，早期凋亡与晚期凋亡和坏死细胞数均有所增加，但以坏死细胞增加更明显（$P<0.01$）；说明EV71能诱导HBMECs凋亡，随着感染事件延长，以晚期凋亡和细胞坏死为主，EV71可能通过诱导HBMECs的早期凋亡，但最终以引起晚期凋亡和细胞坏死而导致HBMECs功能障碍从而穿BBB感染CNS。研究发现线粒体对细胞凋亡具有调控作用，线粒体结构和功能障碍是各种刺激因素诱导细胞凋亡的中心事件，并由此导致线粒体内凋亡诱发因子的释放，参与对细胞凋亡的调控。线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，$\Delta\psi m$）降低是凋亡的早期事件，发生在DNA断裂之前，致细胞质中合成的线粒体蛋白质成熟的缺陷、翻译的停止、氧化磷酸化形式的解偶联，标志着细胞走向死亡的不归点。JC-1是一种广泛用于检测$\Delta\Psi m$的理想荧光探针，可以非常方便地通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化，常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。本研究采用JC-1荧光探针对HBMECs线粒体膜电位进行了检测。结果发现，EV71感染HBMECs 8 h后EV71组细胞绿色荧光明显增强，红色荧光明显减弱，线粒体膜电位明显下降，说明EV71感染HBMECs早期通过启动线粒体通路而促使HBMECs的凋亡，线粒体可能是EV71诱导HBMECs凋亡的一个重要靶点，其信号通路有待于进一步研究。

人DJ-1基因属于保守的DJ-1/Thj/PfpI家族，位于染色体1p36.2～p36.3，全长约24 000 bp。研究证实DJ-1是癌基因，其转录产物功能复杂，参与多种细胞活动，与受精作用、雄激素受体信号调节、氧化应激

以及细胞凋亡的调节有关。DJ-1 能够保持线粒体复合物 I 的活性、降低线粒体内 ROS,维持线粒体膜电位及线粒体正常形态[17-18]。本研究采用免疫印迹技术发现 EV71 感染 HBMECs 不同时间点均有 DJ-1 的表达,DJ-1 在 EV71 感染 HBMECs 16、24 h 表达相对于对照组明显增强($P<0.05$),从而提示 DJ-1 可能参与了 EV71 诱导 HBMECs 的凋亡调控,DJ-1 表达的增强提示 EV71 感染 HBMECs 后期可能主要以坏死为主、凋亡为辅,它可能对 EV71 穿 BBB 感染 CNS 的诊断与治疗有重要作用,未来也许可以作为药物靶标。后期也许可以采用 RNA 干扰技术沉默 DJ-1 基因的表达或对 DJ-1 蛋白的信号转导通路进行研究,就能进一步明确 DJ-1 在 EV71 感染 HBMECs 凋亡中的作用机制。

已有报道细胞因子在 EV71 感染中扮演着至关重要的角色[19-22]。Wei 等[23]报道 IL-2、IL-4、IL-10、IFNγ、GM-CSF 和 TNF-α 的血清水平高低与 HFMD 严重程度有关,但这些报道通常不确定,识别潜在的标记物特异性不够,难以支持早期的临床干预,所以急需寻找特异性的早期治疗的分子靶标。本研究采用 ELISA 方法对 EV71 感染 HBMECs 不同时间点的 TNF-α、IL-4、IL-10 的分泌水平进行了检测。TNF-α 是一种重要的促炎症性细胞因子,由活化的单核细胞和巨噬细胞产生。TNF-α 参与全身炎症反应,可通过生成及释放 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8 等炎性因子引起炎症反应[19]。TNF-α 在 EV71 感染 HBMECs 1 h 相对于模拟感染分泌迅速增高($P>0.05$),随后在 8、16 h 逐渐下降,在 24 h 又分泌增多,鉴于其分泌水平在 EV71 感染 HBMECs 不同时间点与未感染组间的差异,说明其参与了 EV71 感染 HBMECs 的发病过程,可能通过炎症反应促进血脑屏障通透性增加从而导致 EV71 感染 CNS 的发生。IL-4 是 T 细胞来源的细胞因子,是一种重要的抑炎因子。大量研究资料证实 IL-4 能抑制单核巨噬细胞产生 IL-1β 和 TNF-α,能下调活化的单核巨噬细胞分泌氧自由基的能力[20-21]。本研究显示,IL-4 在 EV71 感染 HBMECs 1 h 迅速增高,在 8 h 时逐渐升高,16 h 降低,随后在 24 h 时又呈升高趋势。IL-10 由活化的单核-巨噬细胞、淋巴细胞分泌,它能抑制细胞因子的生成,具有多方面的抗炎效应以及较强的免疫抑制作用。IL-10 在 EV71 感染 HBMECs 1、8、16、24 h 各时间点 IL-10 浓度没有显著差异($P>0.05$),相对于未感染时(0 h)浓度有显著差异($P<0.01$),IL-10 相对于为感染时的增高,可能是一种炎症的应激反应,但以 IL-10 整体分泌水平最低,所以推测较低水平的 IL-10,可能促进了“炎症状态”的发展,从而失去了 IL-10 对 EV71 入侵 HBEMC 的保护作用,而导致血脑屏障功能受损,促进 EV71 感染患者 CNS。在本研究中,细胞培养上清液中 TNF-α、IL-4 及 IL-10 分泌水平在 EV71 感染 HBMECs 不同时间点中与未感染组间的差异支持 EV71 感染 HBMECs 是一种“炎症状态”的假说,说明 EV71 感染 HBMECs 可能与诸多炎症细胞因子或 DJ-1 的表达相关,或许因为 DJ-1 的表达改变或者促炎症因子和抗炎因子的表达处于失衡状态,EV71 感染 HBMECs 便发生。EV71 穿 BBB 感染 CNS 可能不是单一事件,而是许多因素的综合事件,进一步探讨这些细胞因子的 mRNA 水平以及蛋白水平的变化有助于明确其相关机制,另外抑制或提高相关细胞因子的表达可能有助于防治 EV71 中枢神经系统感染。

总之,本研究结果显示 EV71 能诱导 HBMECs 早期线粒体膜通透性改变和早期凋亡,随着感染事件延长,主要以晚期凋亡和细胞坏死为主;另外我们还证实 EV71 可以诱导 HBMECs 中 DJ-1 蛋白的表达改变;EV71 感染 HBMECs 与炎症细胞因子相关。后期进行动物实验以及进一步对相关信号通路进行研究很有必要。

参考文献:

[1] Yang Y, Wang H, Gong E, *et al*. Neuropathology in 2 cases of fatal enterovirus type 71 infection from a recent epidemic in the People's Republic of China: a histopathologic, immunohistochemical, and reverse transcription polymerase chain reaction study[J]. Hum Pathol, 2009, 40(9): 1288-1295.

[2] Wang S M, Lei H Y, Huang K J, *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.

[3] Ryu WS, Kang B, Hong J, *et al*. Enterovirus 71 infection with central nervous system involvement, South Korea[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(11): 1764-1766.

[4] Nolan M A, Craig M E, Lahra M M, *et al*. Survival after pulmonary edema due to enterovirus 71 encephalitis[J]. Neurology, 2003, 60(10): 1651-1656.

[5] 罗文英, 赵卫, 彭亮, 等. 肠道病毒 71 型感染人脑微血管内皮细胞的初步研究[J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(3): 240-245.

[6] 李卫中. 病毒感染与靶细胞凋亡[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2013, 15(3): 15-16.

[7] Liang C C, Sun M J, Lei H Y, *et al*. Human endothelial cell activation and apoptosis induced by enterovirus 71 infection[J]. J Med Virol, 2004, 74(4): 597-603.

[8] Huang S C, Chang C L, Wang P S, *et al*. Enterovirus 71-induced autophagy detected *in vitro* and *in vivo* promotes viral replication[J]. J Med Virol, 2009, 81(7): 1241-1252.

[9] 罗文英. 肠道病毒 71 型感染人脑微血管内皮细胞的机制研究[D]. 广州: 南方医科大学博士论文, 2012.

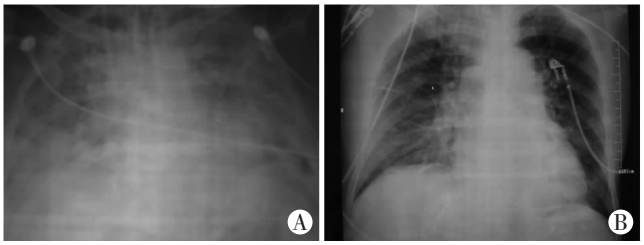
[10] 罗文英, 赵卫, 曹虹, 等. 肠道病毒 71 型感染人脑微血管内皮细胞的比较蛋白质组学研究[C]//新发传染病研究热点研讨会论文集. 广州: 广东省预防医学会医学病毒学专业委员会、广东省免疫学会, 2012: 11-17.

[11] Wen R W, Yu Y C, Shun M Y, *et al*. Phosphorylation of PI3K/Akt

and MAPK/ERK in an early entry step of enterovirus 71[J]. Life Sciences, 2005(78): 82-90.
[12] 万俊峰, 朱理业, 刘红, 等. 阜阳市手足口病(EV71感染)疫情流行病学分析[J]. 安徽医学, 2008, 29(4): 344-345.
[13] 何清懿, 陈伟华, 朱维明, 等. 郴州市2010年手足口病流行病学特征及病原学监测分析[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(17): 83-87.
[14] 郑焕英. 人肠道病毒感染及其研究进展[C]//新发和再发传染病防治热点研讨会. 广州: 广东省预防医学会医学病毒学专业委员会, 2010: 50-53.
[15] Chen C S, Yao Y C, Lin S C, *et al*. Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice[J]. J Clin Virol, 2007, 81(17): 8996-9003.
[16] Wang Y F, Chou C T, Lei H Y, *et al*. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection[J]. J Virol, 2004, 78(15): 7916-7924.
[17] Canet-Aviles R, Wilson M A, Miller D W, *et al*. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(24): 9103-9108.
[18] Taira T, Saito Y, Niki T, *et al*. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death[J]. EMBO Rep, 2004, 5(2): 213-218.
[19] Abe Y, Horiuchi A, Miyake M, *et al*. Anti-cytokine nature of natural human immunoglobulin: one possible mechanism of the clinical effect of intravenous immunoglobulin therapy[J]. Immunol Rev, 1994, 139: 5-19.
[20] Lin T Y, Chang L Y, Huang Y C, *et al*. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections: implications for early recognition and therapy[J]. Acta Paediatr, 2002, 91(6): 632-635.
[21] Lin T Y, Hsia S H, Huang Y C, *et al*. Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system[J]. Clin Infect Dis, 2003, 36(3): 269-274.
[22] Wang S M, Lei H Y, Su L Y, *et al*. Cerebrospinal fluid cytokines in enterovirus 71 brain stem encephalitis and echovirus meningitis infections of varying severity[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(7): 677-682.
[23] 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, 29(1): e87603.

(**收稿**:2014-03-22;**修回**:2014-04-27)
(编辑 王 红)

(上接1358页)



A:治疗前;B:治疗后

图1 肾移植术后卡氏肺孢子虫肺炎患者体外膜肺氧合治疗前后X线表现

2 讨论

PCP发病隐匿,病程进展快,临床症状不典型,在肾移植患者中发病率为2%~11%,病死率为27%~49%[3]。肾移植术后感染卡氏肺孢子虫(pneumocystis carinii, PC)的患者,平均3~6 d便会出现明显的PCP症状,其主要症状为干咳和进行性呼吸困难,可伴或不伴发热。

PCP的影像学表现根据病程的进展呈现为一种动态变化的过程。发病初期,肺门周围下肺后、内基底段受累,随着病程进展,逐渐向上肺蔓延。两肺受累可不平衡,同一患者也可有多种不同表现,主要包括毛玻璃样影、斑片影等,若累及全肺段、肺叶或全非,则可出现实变[4]。

PCP初期应加强抗感染治疗,足量应用对应抗生素,为后期治疗争取时间;若病情进展迅速,应使用呼吸机辅助呼吸;器官移植后患者应及时调整免疫抑制剂用量[5]。若患者存在严重低氧血症,则可使用呼吸机辅助通气。本例患者在积极应用呼吸机辅助通气后,呼吸衰竭症状并未好转,经应用ECMO技术支持患者心肺功能,积极治疗后好转,随访2个月无后遗症表现,肾功能正常。

本例患者积极应用ECMO技术,为患者后续治疗争取了宝贵的救治机会,证明了ECMO在救治重症ARDS患者中的价值。同时,对于器官移植术后大量应用免疫抑制剂的患者,必须警惕机会性感染的发生,术后3~6个月为PCP的高发期,若患者出现呼吸道症状,应高度怀疑PCP的发生。对于病程进展迅速,且在呼吸机不能完全纠正呼吸衰竭的患者,可积极应用ECMO进行肺功能支持,为后续治疗争取时间。

参考文献:

[1] Lamy M, Eberhart R C, Fallat R J, *et al*. Effects of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) on pulmonary hemodynamics, gas exchange and prognose[J]. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1975, 21: 188-198.
[2] Phipps L M, Chen S C, Kable K, *et al*. Nosocomial Pneumocystis jirovecii pneumonia: lessons from a cluster in kidney transplant recipients[J]. Transplantation, 2011, 92(12): 1327-1334.
[3] Martin S I, Fishman J A, AST Infectious Diseases Community of Practice. Pneumocystis pneumonia in solid organ transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2009, 9(Suppl 4): S227-S233.
[4] Datta D, Ali S A, Henken E M, *et al*. Pneumocystis carinii pneumonia: the time course of clinical and radiographic improvement[J]. Chest, 2003, 124(5): 1820-1823.
[5] Sileri P, Pursell K J, Coady N T, *et al*. A standardized protocol for the treatment of severe pneumonia in kidney transplant recipients[J]. Clin Transplant, 2002, 16(6): 450-454.

(**收稿**:2014-02-26;**修回**:2014-04-17)
(编辑 邓强庭)