

热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞和乳鼠的作用及其机制研究

常秀娟^{1,2}, 孙晓萍^{1,2}, 胡晗绯^{1,2}, 曹泽或^{1,2}, 周 军^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 考察热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞及乳鼠致手足口病模型的治疗作用及其机制。**方法** 体外模型采用 33 TCID₅₀ 和 25 TCID₅₀ EV71 感染 Vero 细胞, 建立细胞感染病毒模型; 采用乳鼠 ip EV71 病毒 100 μL/只的方法制备体内模型, 攻毒 2 h 后各组分别 ip 给予相应药物, 观察热毒宁注射液(2.60、1.30、0.65 g/kg)和阳性对照药利巴韦林(10 mg/kg)对乳鼠体质量、临床评分和肌肉组织中白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平及腿部肌肉病理改变的影响。**结果** 体外结果显示, 在 Vero 细胞模型上, 热毒宁注射液(生药 5.0 mg/mL)显著抑制 33 TCID₅₀ 和 25 TCID₅₀ EV71 引起的细胞病变; 体内实验结果显示, 与模型组比较, 高、中剂量热毒宁注射液可降低病毒感染乳鼠的临床评分, 提高乳鼠体质量, 改善乳鼠生存状态, 降低乳鼠肌肉组织中细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 水平($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 热毒宁注射液可显著改善肌肉组织病理学病变。**结论** 热毒宁注射液能够抑制 EV71 病毒导致的乳鼠死亡, 明显延长乳鼠的存活时间, 能够减轻病毒引起的临床症状, 缓解病毒引发的乳鼠生长抑制, 抑制 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 水平可能是其治疗手足口病的重要机制。

关键词: 热毒宁注射液; EV71; 白细胞介素-1β; 肿瘤坏死因子-α; 白细胞介素-6; 单核细胞趋化蛋白-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2097-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.018

Effect of Reduning Injection on Vero cells and suckling mice infected by EV71 virus and its mechanism

CHANG Xiu-juan^{1,2}, SUN Xiao-ping^{1,2}, HU Han-fei^{1,2}, CAO Ze-yu^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Reduning Injection on Vero cells and suckling mice infected by EV71 virus and its mechanism *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The anti-virus ability was exhibited in Vero cells which were infected by 33 TCID₅₀ and 25 TCID₅₀ titers of EV71 *in vitro*. Meanwhile, the antiviral activity *in vivo* was evaluated on suckling mice model, in which suckling mice were intraperitoneal injected with EV71 at 100 μL. After 2 h infection, Reduning Injection 2.60, 1.30, and 0.65 g/kg and ribavirin 10 mg/kg were followed for treatment. To further understand the antiviral effects of Reduning Injection, weigh of suckling mice, clinical symptoms, expression of IL-1β, IL-6, MCP-1, and TNF-α in skeletal muscle were recorded. Moreover, histological examination of skeletal muscle was examined. **Results** The results demonstrated that Reduning Injection 5.0 mg/mL could obviously inhibit Vero cells lesion induced by EV71 *in vitro*. Compared with the model group, suckling mouse model results showed the high and middle dose of Reduning Injection could reduce clinical manifestations scores, increase the weight and improve living conditions of model mice, decrease the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α, and MCP-1 in skeletal muscle of suckling mice ($P < 0.05$, 0.01). Histological damages in skeletal muscle were also alleviated with Reduning Injection treatment. **Conclusion** In a suckling mouse model, Reduning Injection can reduce mortality and obviously prolong the survival time of suckling mice caused by EV71 infection. It can alleviate clinical symptoms and growth inhibition caused by the EV71 virus. Inhibition of IL-1β, IL-6, TNF-α, and MCP-1 levels may be the important mechanism of Reduning Injection in the treatment of hand-foot-and-mouth disease.

Key words: Reduning Injection; EV71; interleukin-1β; tumor necrosis factor-α; interleukin-6; monocyte chemotactic protein-1

收稿日期: 2017-12-25

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台(2013ZX09402203)

作者简介: 常秀娟(1981—), 女, 硕士, 中级工程师, 副主任中药师, 研究方向为药理毒理学。Tel: (0518)81152299 E-mail: cxj045@163.com

*通信作者: 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: kanionlunwen@163.net

手足口病是由多种肠道病毒引起,以婴幼儿发病为主的常见传染病,可引起发热和手、足、口腔等部位的疱疹为主要特征。少数重症感染者还可引起脑炎、无菌性脑膜炎、脑干脑炎、脊髓炎等神经系统组织的病变,甚至出现死亡。Enterovirus 71 (EV71) 属细小 RNA 病毒科肠道病毒属病毒,是导致手足口病的主要病原体之一^[1-2],可导致较高的死亡率和神经源性并发症^[3-4]。自 2008 年以来我国手足口病每年都出现大面积爆发,发病率居高不下,每年都有死亡病例出现,2009—2011 年的 3 年时间内江苏省 EV71 和柯萨奇病毒 A16 型 (CoxA16) 在普通感染中的比例分别为 43.49% 和 37.07%, 在严重的情况下,比例分别为 80.82% 和 5.96%, 危重病例和死亡病例多由 EV71 感染所致^[5-6], 因此迫切需要寻找有效的治疗药物。本研究通过 EV71 感染乳鼠致手足口病模型,综合考察热毒宁注射液对感染手足口病毒乳鼠的保护作用及其可能的作用机制,为临床治疗手足口病提供参考。

1 材料

1.1 药物

热毒宁注射液,由江苏康缘药业股份有限公司提供,每瓶 10 mL (相当于生药 26 g),批号 120204;利巴韦林注射液,购自徐州莱恩药业有限公司,批号 1211061。

1.2 细胞与病毒

非洲绿猴肾细胞 (Vero),由中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫学研究室提供。取传代次数为 130~145 的细胞用于实验。

人肠道病毒 71 型 (human enterovirus 71 strain BJ09/07, EV71, GenBank: JQ319054.1) 由中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究室提供,病毒临用前用 M199 培养基 (含 2.5% 胎牛血清) 稀释至 33 TCID₅₀ 或 25 TCID₅₀。

1.3 试剂与仪器

M199 培养基, Hyclone 公司; 胎牛血清, Gibco 公司; MTS 细胞增殖定量检测试剂盒, Promega 公司; Multiskan FC 微孔板读数仪, Thermo Scientific 公司; CK40-F200 倒置显微镜, Olympus 公司; MCO-15AC 二氧化碳培养箱, Forma Scientific 公司; NU-440-600E 生物安全柜, NUAIR 公司; Bio-Plex200 悬浮芯片系统 (Cat.#171-304070M, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 动物

5 日龄 ICR 乳鼠, 体质量 2.8~3.5 g, 购自扬州

大学比较医学中心, 合格证号 SCXK (苏) 2012-0004; 饲养在温度 (21±1) °C 和 52% 左右湿度控制的标准动物房内。每天 12 h 的明暗循环, 自由进食、进水。动物实验过程的所有操作均按照根据中国科技部 2006 年颁布的《关于善待动物的指导性意见》进行。

2 方法

2.1 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞的保护作用

前期研究表明热毒宁注射液对 Vero 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为生药 12.38 mg/mL^[7]。本实验热毒宁注射液设置质量浓度为 5.0、4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0 mg/mL, 每个质量浓度设 4 个复孔, EV71 病毒设置 2 个梯度分别为 33 TCID₅₀、25 TCID₅₀。将 Vero 细胞按每孔 1×10⁴ 个、100 μL 接种 96 孔板, 每孔加热毒宁注射液和 EV71 病毒液分别 50 μL, 每孔含 2.5% 胎牛血清。对照组加无血清培养基 100 μL, 模型组加 EV71 病毒液和无血清培养基各 50 μL。细胞在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 3 d 后, 按照 MTS 细胞增殖定量检测试剂盒说明书测定 490 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 以对照组实测 A 值为 100%, 计算各给药组的细胞存活率。

2.2 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染乳鼠的治疗作用^[8-9]

2.2.1 分组、造模与给药 将 6 窝乳鼠按窝随机分为 6 组, 每组 10 只, 即热毒宁注射液高、中、低剂量 (2.60、1.30、0.65 g/kg) 组, 利巴韦林注射液 (10 mg/kg) 组, 模型组和对照组 ip 等量生理盐水。造模: 将乳鼠 ip EV71 病毒 (1×10⁶ TCID₅₀), 每只 0.1 mL, 对照组以 0.1 mL 生理盐水替代。攻毒后 2 h, 对各组乳鼠进行 ip 给药, 0.1 mL/只, 对照组和模型组以 0.1 mL 生理盐水替代, 连续给药 13 d。

2.2.2 大体观察 每天观察各组乳鼠生存情况, 记录乳鼠体质量和临床分值。临床评分标准^[10]: 0 分, 正常; 1 分, 行为异常、离群; 2 分, 竖毛、易激、烦躁; 3 分, 上肢麻痹; 4 分, 下肢瘫痪、共济失调; 5 分, 濒死; 6 分, 死亡。

2.2.3 肌肉组织匀浆液检测白细胞介素-1β (IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 末次给药 1 h 后处死乳鼠, 取大腿肌肉组织 40 mg 加生理盐水 0.4 mL 玻

璃匀浆管进行匀浆，匀浆液 4 000 r/min 离心后取上清，采用 Bio-Plex200 悬浮芯片系统检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平。

2.2.4 肌肉组织形态学观察 各组动物处死后迅速取肌肉组织 10% 甲醛固定，常规 HE 染色，光镜下观察各组乳鼠肌肉组织病理学变化。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件分析，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用方差分析，*t* 检验进行显著性分析。

3 结果

3.1 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞的影响

结果表明，热毒宁注射液具有抑制 EV71 病毒增殖、缓解细胞病变的作用。EV71 病毒剂量为 33 TCID₅₀ 时，热毒宁注射液生药 5.0 mg/mL 可显著提高 Vero 细胞存活率达 66.40% ($P < 0.05$)；病毒剂量为 25 TCID₅₀ 时，热毒宁注射液生药 5.0 mg/mL 可显著提高 Vero 细胞存活率达 72.55% ($P < 0.01$)。热毒宁注射液其他剂量对细胞存活率有不同程度改善作用，表明该药体外对 EV71 病毒具有明显抑制作用。结果见图 1。

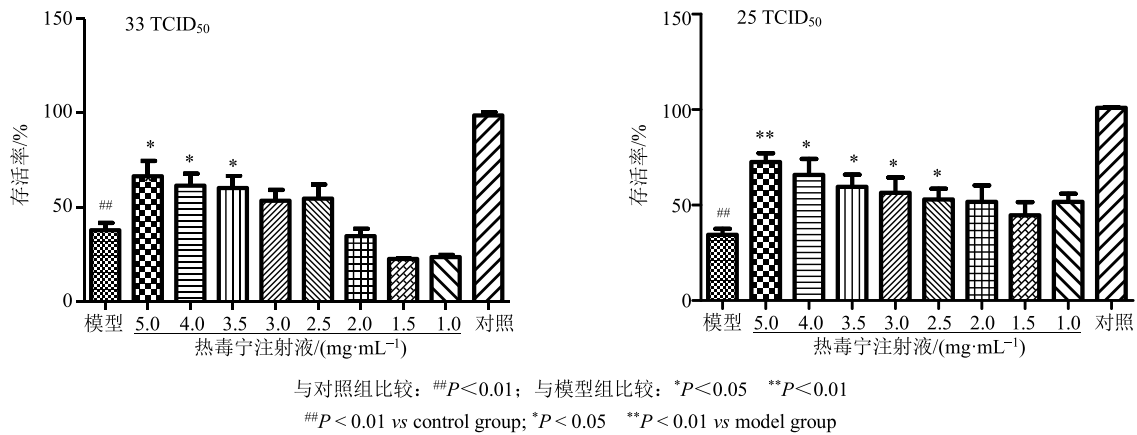


图 1 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effect of Reduning Injection on survival rate of Vero cells infected by EV71 virus ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染乳鼠的影响

3.2.1 对 EV71 病毒感染乳鼠体质量、临床评分及生存情况的影响 结果显示，对照组，模型组，利巴韦林组，热毒宁注射液高、中、低剂量组乳鼠死亡率分别为 0、100%、50%、30%、50%、50%，3 个剂量热毒宁注射液均能够抑制 1×10^6 TCID₅₀ EV71 病毒导致的乳鼠死亡；对照组，模型组，利巴韦林组，热毒宁注射液高、中、低剂量组乳鼠的存活时间分别为 (13.0 \pm 0.0)、(7.8 \pm 0.8)、(10.8 \pm 2.4)、(12.1 \pm 1.5)、(11.8 \pm 1.4)、(11.3 \pm 1.9) d，与对照组比较，模型组乳鼠的存活时间显著缩短 ($P < 0.01$)，与模型组比较，各给药组乳鼠的存活时间显著延长 ($P < 0.01$)；热毒宁注射液还能够减轻病毒引起的临床症状 ($P < 0.05$)，缓解病毒引发的乳鼠生长抑制即体质量减轻。结果见图 2。

3.2.2 对 EV71 病毒感染乳鼠肌肉组织中细胞因子的影响 模型组乳鼠肌肉组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平明显升高，与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)；高、中剂量热毒宁注射

液均能够抑制乳鼠肌肉组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平的升高 ($P < 0.05$)；利巴韦林注射液可降低乳鼠肌肉组织中 TNF- α 和 MCP-1 水平 ($P < 0.05$)，对 IL-1 β 和 IL-6 无明显抑制作用。结果见表 1。

3.2.3 对 EV71 病毒感染乳鼠肌肉组织形态学的影响 模型组主要病理改变为肌细胞变性、坏死，局部有炎细胞浸润和明显的钙化等病变，热毒宁注射液高剂量和中剂量组乳鼠肌肉病变与模型组相似，程度明显减轻，肌细胞无明显变性、坏死，轻度萎缩，有轻度或轻微炎细胞浸润，无钙盐沉积，局部有轻微纤维组织增生。表明热毒宁注射液有抗 EV71 病毒的作用，不同剂量组对肌肉病变均有减轻作用。结果见图 3。

4 讨论

目前国内外尚无有效药物用于手足口病的治疗和预防，临床大多采用对症治疗，对于 EV71 感染的药物主要还是抗病毒类的药物如利巴韦林、阿昔洛韦等，危重患者同时辅以对症治疗，中药通过抑制炎症和调节免疫来治疗危重症患者，多与化学药

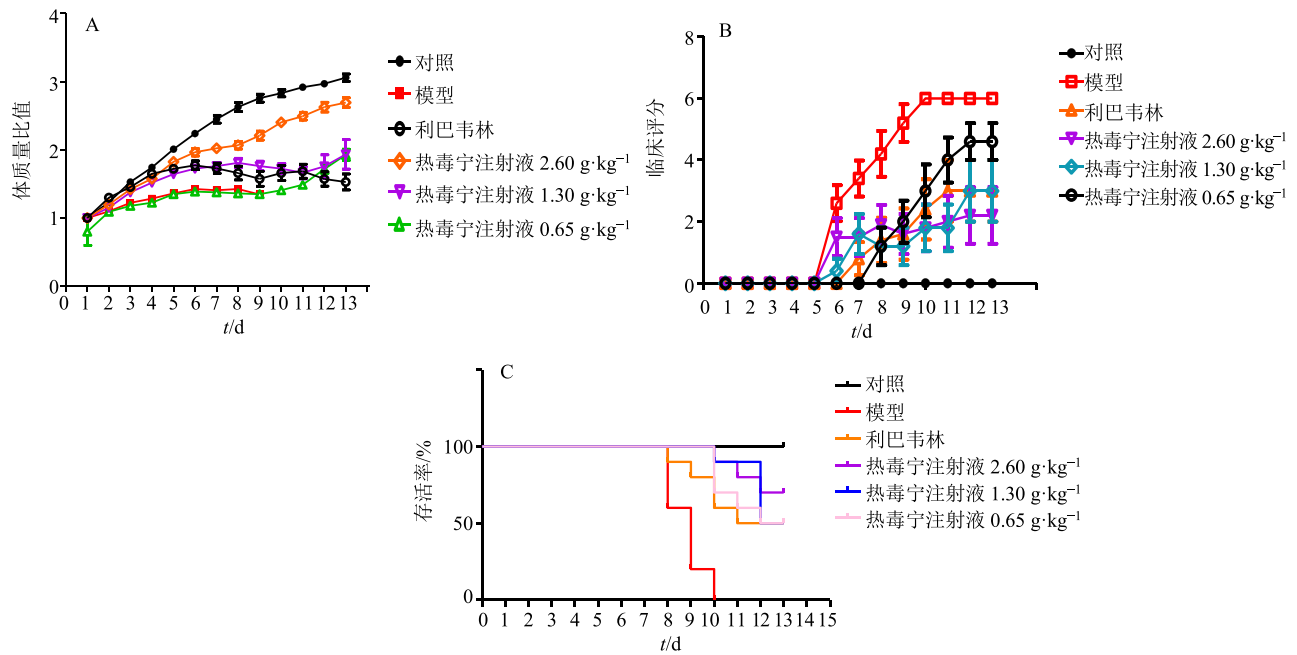


图 2 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染乳鼠体质量 (A)、临床评分 (B) 和生存率 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of Reduning Injection on body weight (A), clinical scores (B), and survival rate (C) of suckling mice infected by EV71 virus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 1 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染乳鼠肌肉组织中细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Reduning Injection on cytokine level in muscle tissue of suckling mice infected by EV71 virus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	MCP-1/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	5.69 ± 1.71	10.91 ± 7.74	25.78 ± 7.56	32.68 ± 22.61
模型	—	24.21 ± 9.22 ^{△△}	80.55 ± 83.87 [△]	47.82 ± 12.07 ^{△△}	1 096.72 ± 437.96 ^{△△}
利巴韦林	0.01	16.41 ± 7.37	29.22 ± 26.09	35.83 ± 13.15*	691.34 ± 310.45*
热毒宁注射液	2.60	14.57 ± 9.39*	22.72 ± 24.17*	32.52 ± 15.02*	723.45 ± 306.93*
	1.30	15.27 ± 8.34*	24.03 ± 26.00*	39.73 ± 11.55	754.44 ± 257.36*
	0.65	20.92 ± 6.51	31.02 ± 35.29	46.63 ± 19.29	937.08 ± 759.15

和对照组比较: [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01; 与模型组比较: *P < 0.05

[△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01 vs control group; *P < 0.05 vs model group

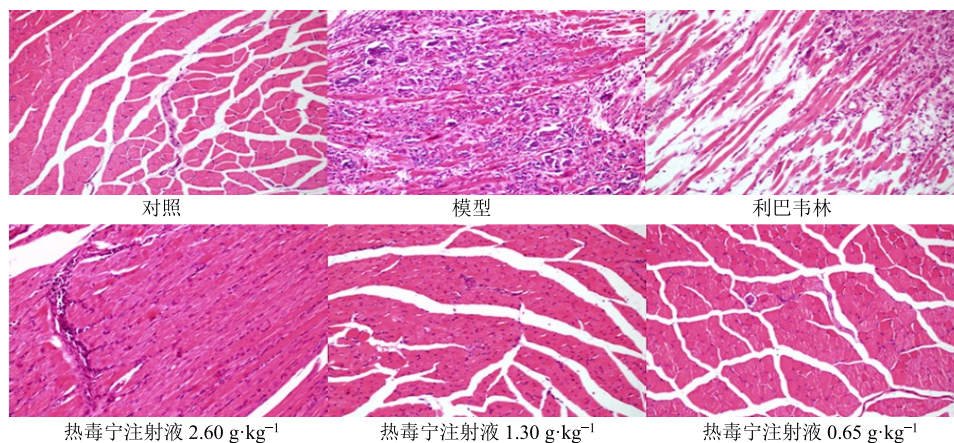


图 3 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染乳鼠肌肉组织形态学的影响 (HE 染色)

Fig. 3 Effects of Reduning Injection on muscle pathology of suckling mice infected by EV71 virus (HE staining)

联合应用于临床,能取得痊愈、缩短疗程、降低并发症和病死率等效果^[11-12]。热毒宁注射液是由青蒿、金银花、栀子组成的现代中药制剂,具有清热、解毒、疏风功效,临床上主要用于治疗上呼吸道感染、急性支气管炎等,研究发现热毒宁注射液对流感病毒 H1N1、柯萨奇病毒 3、单纯疱疹病毒 HSV、肠道病毒 71 型等均有抑制作用^[13-16]。

临床报道表明, EV71 感染后,机体内环境中(外周血以及脑脊液)发生了大量细胞因子和趋化因子的动员或抑制,包括 γ 干扰素 (IFN- γ)、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-4 等在内的众多因子均发生了显著变化^[17-19]。MCP-1 可由炎性细胞及组织细胞共同分泌,如单核巨噬细胞、肥大细胞、内皮细胞^[20]等。当 EV71 侵入人体后,为清除病毒机体发生免疫应答,单核细胞、粒细胞等免疫细胞分泌 MCP-1 增多, MCP-1 通过趋化单核细胞,上调单核细胞黏附分子的表达,进而促进分泌 IL-1、IL-6 在内的多种细胞因子,促使嗜碱性粒细胞对组胺的释放,对炎症反应也起调节作用,随着 EV71 感染越严重, MCP-1 水平越高,对免疫细胞的趋化作用越强,进一步刺激下游炎症因子的释放增多,加重全身炎症反应^[21]。很多研究报道在感染者血液和脑脊液中发现 IL-1、IL-6、IL-10 和 IFN- γ 以及 TNF- α 水平升高,尤其是在合并脑炎和肺水肿的 EV71 感染者中,发现脑脊液 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的水平显著升高^[22-24]。

中药复方多靶点的特点是其抗病毒作用的重要优势,在治疗手足口病的临床应用中发挥了重要作用,本研究体外实验采用 Vero 细胞感染 EV71 病毒模型,结果表明热毒宁注射液具有抗 EV71 病毒活性作用。体内实验采用 EV71 病毒感染乳鼠的模型来观察热毒宁注射液对手足口病模型的治疗作用,结果表明热毒宁注射液高、中剂量可明显减轻乳鼠的感染症状,提高乳鼠体质量,降低死亡率,并降低肌肉组织中 MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的量,改善肌肉组织病理学变化。综上所述,热毒宁注射液具有抗 EV71 病毒活性作用,可明显减轻 EV71 感染乳鼠的感染症状,提高乳鼠体质量,降低死亡率,有效减少炎症因子损伤,为临床用于手足口病的治疗提供依据。

参考文献

[1] Bible J M, Pantelidis P, Chan P K, *et al.* Genetic evolution of enterovirus 71: Epidemiological and

pathological implications [J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(6): 371-379.

- [2] Cao L, Mao F, Pang Z, Yi Y, *et al.* Protective effect of enterovirus-71 (EV71) virus-like particle vaccine against lethal EV71 infection in a neonatal mouse model [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2473-2480.
- [3] Xu J, Qian Y, Wang S, *et al.* EV71: An emerging infectious disease vaccine target in the Far East? [J]. *Vaccine*, 2010, 28(20): 3516-3521.
- [4] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, *et al.* Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778-790.
- [5] 王辉强, 蒋建东, 李玉环. 应用 2 周龄 BALB/c 小鼠建立 EV71 动物模型 [J]. 药学学报, 2013, 48(3): 343-346.
- [6] Xing W, Liao Q, Viboud C, *et al.* H and, foot, and mouth disease in China, 2008-12: An epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(4): 308-318.
- [7] 曹泽戎, 常秀娟, 赵忠鹏, 等. 热毒宁注射液抗 A16 型柯萨奇病毒的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1450-1455.
- [8] 朵建英, 王卫, 佟巍, 等. 肠道病毒 71 型 (EV71) 对 ICR 小鼠的感染 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(5): 41-46.
- [9] Premanand B, Kiener T K, Meng T, *et al.* Induction of protective immune responses against EV71 in mice by baculovirus encoding a novel expression cassette for capsid protein VP1 [J]. *Antiviral Res*, 2012, 95(3): 311-315.
- [10] Li Z H, Li C M, Ling P, *et al.* Ribavirin reduces mortality in enterovirus 71-infected mice by decreasing viral replication [J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(6): 854-857.
- [11] 李保强. 手足口病的药物治疗进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2011, 19(6): 1064-1065.
- [12] 郭姗姗, 马雪萍, 潘昕, 等. 复方一枝蒿颗粒对防治手足口病的体内药效学研究 [J]. 中国药物警戒, 2014, 11(7): 385-389.
- [13] 王振中, 鲍琳琳, 孙兰, 等. 热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒作用机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 90-93.
- [14] 李秀惠, 李双杰, 温韬, 等. 热毒宁注射液治疗重型手足口病的临床疗效评价 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 362-365.
- [15] 陈敏, 乐汉娥, 冯静. 热毒宁注射液治疗肠道病毒 71 型感染重症手足口病的临床研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(17): 4231-4233.
- [16] 葛雯, 李海波, 于洋, 等. 热毒宁注射液化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 1027-1036.

- [17] 王丽春, 廖 芸, 王晶晶, 等. 白细胞介素-6 对肠道病毒 71 型感染乳鼠致病理损伤的促进作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(6): 761-769.
- [18] Griffiths M J, Ooi M H, Wong S C, *et al.* In enterovirus 71 encephalitis with cardio respiratory compromise, elevated interleukin 1 beta, interleukin 1 receptor antagonist, and granulocyte colony-stimulating factor levels are markers of poor prognosis [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(6): 881-892.
- [19] Caine E A, Partidos C D, Santangelo J D, *et al.* Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59501.
- [20] Shin H S, Yoo I H, Kim Y J, *et al.* MKP1 regulates the induction of MCP1 by *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin in human epithelial cells [J]. *Mol Cells*, 2010, 30(3): 263-270.
- [21] 魏婷婷. 炎症因子在重症 EV71 型手足口病的临床意义研究 [D]. 长沙: 南华大学儿科学院, 2015.
- [22] 李侗曾, 梁连春. 白细胞介素 6 在 EV71 相关手足口病中的作用 [J]. 医学综述, 2014, 20(8): 1440-1442.
- [23] 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.
- [24] Ong K C, Badmanathan M, Devi S, *et al.* Pathologic characterization of a murine model of human enterovirus 71 encephalomyelitis [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67(6): 532-542.