

不同日龄乳鼠感染EV71毒株后组织免疫学特征实验研究

张 畅, 汤 萨, 宗 雪, 石有伟, 连 捷, 王云帆(北京大学首钢医院病理科, 北京 100144)

摘要: **目的** 探讨不同日龄乳鼠感染肠道病毒71型(EV71)后的组织病理表现、免疫细胞分布及细胞因子表达特征。**方法** 选取7、14、18及21日龄乳鼠, 经腹腔注射EV71 GD10-12株建立感染模型, 动态监测其存活率、体重变化及临床评分; 通过组织学检查观察骨髓、胸腺等免疫器官结构成熟度; 采用流式细胞术检测感染前后小肠组织中3型先天性淋巴细胞(ILC3s)及CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞等免疫细胞的比例与数量; 利用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测感染前后白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-22(IL-22)、白细胞介素-23(IL-23)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因的相对表达量。**结果** EV71感染后, 乳鼠死亡率随日龄增大显著降低($\chi^2=29.15$, $P<0.001$): 7日龄3天内全死, 14日龄4天内全死, 18日龄7天内全死, 21日龄无死亡。体重变化显示, 7~18日龄乳鼠体重增长停滞或死亡前下降, 21日龄乳鼠体重持续正常增长($F=73.82$, $P<0.001$); 临床评分显示, 7~18日龄乳鼠快速升至3~5分且严重阶段持续2~3天, 21日龄乳鼠仅升至1~2分, 感染后8天恢复至0分($F=4.633$, $P=0.017$)。组织学显示, 随日龄增长免疫器官逐渐成熟, 18~21日龄接近成年小鼠特征。免疫细胞检测显示, 7~21日龄小肠各免疫细胞(除NK细胞外)比例差异逐渐扩大: 与低日龄乳鼠比较, CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞比例显著升高, B细胞、DC细胞比例显著降低($F=38.861\sim847.276$, 均 $P<0.001$)。与同组感染前比较, 7~18日龄感染后ILC3s数量显著减少($t=5.828$ 、 5.854 、 4.611 , 均 $P<0.05$), 21日龄感染后ILC3s数量显著增加($t=-4.032$, $P=0.016$)。细胞因子检测显示, 感染前IL-1 β 、TNF- α 随日龄增加逐渐降低($F=264.322$ 、 104.483 , 均 $P<0.05$), IL-22、IL-23随日龄增加逐渐升高($F=176.101$ 、 180.815 , 均 $P<0.05$); 与同组感染前比较, 感染后7~21日龄IL-1 β ($t=-136.593\sim-12.890$)及14~21日龄TNF- α ($t=-38.505\sim-25.589$)均显著升高(均 $P<0.001$), 14~21日龄IL-22($t=36.316$ 、 15.083 、 8.778)及7~21日龄IL-23($t=5.362\sim74.642$)均显著降低(均 $P<0.001$)。**结论** 不同日龄乳鼠感染EV71后的组织免疫学特征存在显著差异, 乳鼠对EV71感染的抵抗力随日龄增长而增强, 该过程与免疫器官成熟、ILC3s动态调控及细胞因子网络平衡密切相关。

关键词: 肠道病毒71型毒株; 组织免疫学; 免疫细胞; 乳鼠日龄

中图分类号: R-332; R373.25; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)05-040-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.05.007

Experimental Study on Tissue Immunological Characteristics of Suckling Mice of Different Ages Infected with EV71 Strain

ZHANG Chang, TANG Sa, ZONG Xue, SHI Youwei, LIAN Jie, WANG Yunfan (Department of Pathology, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100144, China)

Abstract: **Objective** To investigate the histopathological manifestations, immune cell distribution and cytokine expression profiles in suckling mice of different ages following Enterovirus 71 (EV71) infection. **Methods** Suckling mice aged 7, 14, 18, and 21 days were selected to establish infection models by intraperitoneal injection with EV71 strain GD10-12. Survival rate, body weight changes, and clinical scores of the mice were dynamically monitored. Histological examination was performed to evaluate the structural maturity of immune organs such as bone marrow and thymus. Flow cytometry was used to detect the proportions and numbers of type 3 innate lymphoid cells (ILC3s), CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, and other immune cell subsets in the small intestine before and after infection. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to determine the relative expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-22 (IL-22), interleukin-23 (IL-23) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) before and after infection. **Results** After EV71 infection, mortality rates of suckling mice significantly decreased with increasing age ($\chi^2=29.15$, $P<0.001$): all 7-day-old mice died within 3 days, all 14-day-old mice died within 4 days, all 18-day-old mice died within 7 days, whereas no 21-day-old mice died. Body weight was arrested or declined before death in 7~18-day-old mice, while 21-day-old mice maintained normal weight gain ($F=73.82$, $P<0.001$). Clinical score in 7~18-day-old mice rapidly increased to 3~5 points and remained at severe levels for 2~3 days, whereas 21-day-old mice only reached scores of 1-2 and recovered to 0 by day 8 post-infection ($F=4.633$, $P=0.017$). Histological results revealed progressive maturation of immune organs

基金项目: 北京大学首钢医院首颐医疗科技发展基金(项目编号: SGYYQ202404)。

作者简介: 张畅(1988-), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 肠道免疫微环境, E-mail: zhangchang0605@163.com。

通讯作者: 王云帆(1978-), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 消化系统肿瘤, E-mail: wangtaozyy@126.com。

with age, with 18-21-day-old mice displaying features close to those of adult mice. Immune cell profiling showed that the differences in the proportion of various immune cells in the small intestine of 7~21-day-old mice gradually expanded, except for NK cells: compared with younger suckling mice, the proportions of CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, and $\gamma \delta$ T cells were significantly increased, while the proportions of B cells and dendritic cells were significantly decreased ($F=38.861\sim847.276$, all $P<0.001$). Compared with pre-infection levels within the same age group, ILC3 levels significantly decreased after infection in 7~18-day-old mice ($t=5.828, 5.854$, and 4.611 , respectively; all $P<0.05$), but significantly increased in 21-day-old mice ($t=-4.032$, $P=0.016$). Cytokine detection showed that pre-infection expression of IL-1 β and TNF- α gradually decreased with age ($F=264.322, 104.483$, both $P<0.05$), whereas IL-22 and IL-23 gradually increased ($F=176.101, 180.815$, both $P<0.05$). After infection, IL-1 β levels in 7~21-day-old mice ($t=-136.593$ to -12.890) and TNF- α levels in 14~21-day-old mice ($t=-38.505 \sim -25.589$) were significantly increased (all $P<0.001$), while IL-22 levels in 14~21-day-old mice ($t=8.778 \sim 36.316$) and IL-23 levels in 7~21-day-old mice ($t=5.362\sim74.642$) were significantly decreased (all $P<0.001$). **Conclusions** Significant age-dependent differences in tissue immunological characteristics are observed in EV71-infected suckling mice. Resistance to EV71 infection increases with age, a process closely associated with immune organ maturation, dynamic regulation of ILC3s, and cytokine network balance.

Keywords: enterovirus 71 strain; tissue immunology; immune cells; age of suckling mice

肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)是手足口病(hand, foot, and mouth disease, HFMD)的主要病原体,在亚太地区婴幼儿群体中高发,常引发神经系统并发症甚至死亡,对公共卫生构成严重威胁^[1-2]。流行病学数据显示, EV71感染具有明确的年龄依赖性特征,婴幼儿为高发人群和重症主要受害者,而成人感染后多为轻症或无症状^[3],这提示宿主免疫系统发育成熟度可能是决定EV71感染结局的核心因素^[4]。乳鼠模型因免疫系统发育特征与人类婴儿具有一定相似性,已成为研究EV71致病机制及免疫应答的常用工具^[5-6]。先天性免疫作为抵御病原体入侵的第一道防线,其功能状态直接影响感染初期的病毒控制效果^[7-8]。3型先天性淋巴细胞(type3 innate lymphoid cells 3, ILC3s)作为黏膜免疫的关键效应细胞,在维持肠道屏障稳态、调控炎症反应及抗感染免疫中发挥重要作用^[9-10]。研究证实, ILC3s可通过分泌白细胞介素-22(interleukin-22, IL-22)等细胞因子促进上皮组织修复,增强宿主防御能力^[11]。但ILC3s在不同日龄乳鼠EV71感染中的数量变化、功能特征及感染结局的关联,仍需深入探索。基于此,本研究通过建立不同日龄乳鼠EV71感染模型,系统分析感染后组织病理、免疫细胞及细胞因子的动态变化,明确其组织免疫学特征,为EV71感染的年龄相关易感性机制及免疫干预策略研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 细胞与毒株:横纹肌瘤细胞(rhabdomyosarcoma cells, RD)用含10%(v/v)胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%(v/v)双抗(青霉素100 U/ml、链霉素100 μ g/ml)的Gibco DMEM培养基,在37℃、5%(v/v)CO₂培养箱中培养。EV71病毒株(GD10-12, GenBank登记号: KJ004559)突变株由中国医学科学院医学实验动物研究所保存, RD细胞传代过程严格遵

循《病原微生物实验室生物安全管理条例》及伦理与生物安全相关规定。

1.1.2 实验动物:SPF级BALB/c孕鼠(体质量26~35g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号: SCXK(京)2007-0001),在中国医学科学院医学实验动物研究中心饲养(12h暗/光循环, 21~25℃, 55%, 国医相对湿度),实验前适应性饲养10天,自由摄食饮水。乳鼠按自然出生窝分组,每窝5~7只,每笼饲养1只母鼠与其子代乳鼠,乳鼠自然哺乳。乳鼠经腹腔注射感染EV71病毒后,饲养于配备过滤系统的IVC笼舍内。所有动物感染实验均在动物生物安全二级实验室进行,实验结束后采用CO₂对乳鼠及母鼠实施安乐死,本试验已获中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所伦理委员会批准(批准号: BLL17011)。

1.2 仪器与试剂 DMEM培养基、胰酶、双抗(Gibco, 美国); 10%(v/v)福尔马林组织固定液(北京索莱宝科技有限公司); 苏木精-伊红染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司); CD4、CD8、Lin⁻、ROR γ t、NKp46、IL-22、IL-23、IL-1 β 、TNF- α 抗体(Thermo Fisher, 美国); ScanScope病理切片显微镜扫描系统(Aperio、Leica Biosystems, 德国); BD LSRFortessa流式细胞仪(BD Biosciences, 美国); Excelsior ES石蜡包埋机(Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 病毒扩增与浓缩:将EV71病毒接种于RD细胞,在含2%(v/v)FBS的DMEM培养基中培养,当细胞病变效应超过80%时收集培养上清。经12 800 r/min离心4 h浓缩病毒,用无钙镁PBS重悬沉淀,震荡溶解后分装,测定TCID₅₀, -80℃保存备用。

1.3.2 动物模型建立与分组:

①乳鼠分组:按自然出生窝分为7日龄、14日龄、18日龄及21日龄组,每组4窝(每窝5~7只),其中2

窝作为感染前组(不进行感染),2窝作为感染组(进行EV71感染)。每组感染前和感染后各取3只乳鼠用于组织病理取材,3只用于免疫细胞流式检测,3只用于RNA PCR验证检测,剩余乳鼠用于一般情况观察。

②乳鼠毒株筛选:按自然出生窝分组,7日龄、

14日乳鼠每组感染一株病毒,连续传代5代,观察乳鼠临床表现及生存率变化,筛选致病力增强的毒株。

③乳鼠毒株注射剂量:采用筛选出的高致病力毒株感染各日龄乳鼠,感染方式为腹腔注射,根据乳鼠发育情况确定毒株剂量和体积。见表1。

表 1 不同日龄乳鼠毒株注射剂量			
乳鼠日龄 (天)	乳鼠预估平均体重 (g)	攻毒剂量	攻毒体积 (μl)
7	1.63	$3.26 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$	45
14	7.46	$14.92 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$	200
18	9.25	$18.50 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$	280
21	10.59	$21.18 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$	315

1.3.3 一般情况观察:毒株感染当天记为0天,连续10天每日称量乳鼠体重,记录临床症状及死亡率。临床症状评分标准:无症状为0分,竖毛为1分,虚弱且后肢活动不便为2分,单后肢瘫痪为3分,双后肢瘫痪为4分,死亡为5分。

1.3.4 组织学分析:感染前每组处死3只乳鼠,取后肢胫骨、胸腺、脾脏、小肠及肠系膜淋巴结,放入10%(v/v)福尔马林溶液中固定过夜,经石蜡包埋、切片及苏木精-伊红(H&E)染色后,显微镜下观察其组织形态。

1.3.5 小肠免疫细胞分析:感染前每组处死3只乳鼠,取小肠制作成单细胞悬液,采用流式细胞术检测免疫细胞比例,检测细胞及对应表面分子标记为:B细胞(CD19⁺)、αβT细胞(CD3⁺、CD4⁺/CD8⁺)、γδT细胞(CD3⁺、TCRγδ⁺)、DC细胞(CD86⁺、CD11c⁺)、NK细胞(CD49b⁺(DX5))。

1.3.6 EV71感染前后进行ILC3s检测:感染前和感染后3天每组处死3只乳鼠,取小肠制备单细胞悬

液,以Lin⁻、RORrt⁺、NKp46⁺为ILC3s表面分子标记,经抗体染色后流式细胞仪分析。

1.3.7 细胞因子基因表达检测:采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)进行检测,感染前和感染后3天每组处死3只乳鼠,取10mg小肠组织,加入350μl buffer RLT与70%乙醇混合液,离心柱纯化后用35μl无RNA酶水洗脱获得RNA提取液。以8μl总RNA为模板,加入1μl 50ng/μl random hexamers及1μl 10mM dNTP mix,65℃反应5min后快速冷却,加入cDNA合成mix,依次在25℃反应10min、50℃反应50min,85℃反应5min终止,合成cDNA。PCR反应体系(总体积20μl)含10μl SYBR Premix Ex Taq II、0.8μl正向引物、0.8μl反向引物、2μl模板cDNA及6.4μl无核酸酶水,在Q7实时荧光定量PCR仪上进行扩增(95℃ 30s,95℃ 5s,60℃ 30s,共35个循环,最后95℃ 15s)。采2^{-ΔΔCt}法计算目标基因相对表达量。引物序列见表2。

表 2 PCR 引物序列		
基因	正向引物	反向引物
IL-1β	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
TNF-α	5'-TCTTCTCATTCTGCTGTGG-3'	5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'
IL-22	5'-TTGTGCGATCTCTGATGGCT-3'	5'-CCAGCATAAAGGTGCGOTTG-3'
IL-23A-1	5'-CAAAGGATCCGCCAAGGTCT-3'	5'-CTTGCCCTTCACGCAAAACA-3'
IL-23A-2	5'-GCTGTGCCTAGGAGTAGCAG-3'	5'-CAGACCTTGGCGGATCCTTT-3'

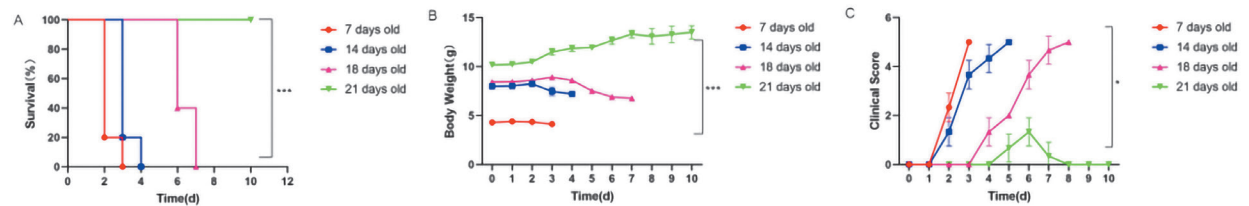
1.4 统计学分析 采用SPSS 27.0统计软件处理数据,GraphPad Prism 9.5软件绘图。计量资料符合正态分布以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用Tukey HSD法;同一日龄组感染前后数据比较采用配对t检验。生存数据采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,组间差异通过Log-rank检验分析。RT-qPCR数据采用2^{-ΔΔCt}法计算目标基因相对表达

量,经正态性检验后进行组间比较。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同日龄乳鼠感染EV71后一般情况 EV71感染后,乳鼠生存状态呈显著年龄依赖性(图1A):7日龄3天内全死,14日龄4天内全死,18日龄7天内全死,21日龄无死亡($\chi^2=29.15, P<0.001$)。体重变化显示(图1B):7~18日龄乳鼠体重增长停滞或死亡前下降,21

日龄乳鼠体重持续正常增长($F=73.82, P<0.001$)。临床评分结果显示(图1C):7日龄快速升至5分,14日龄3~5分持续2天,18日龄3~5分持续3天,21日龄仅升至1~2分,感染后8天恢复至0分($F=4.633, P=0.017$)。



A. 生存率; B. 体重变化; C. 临床评分; 与21日龄相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图1 EV71 感染后不同日龄乳鼠存活率、体重变化及临床评分动态监测

2.2 不同日龄乳鼠免疫器官组织学特征 随日龄增长,乳鼠免疫器官结构逐渐成熟:骨髓细胞密度及巨核细胞数量增加,18日龄时接近成年个体;胸腺皮质与髓质分界逐渐清晰,14日龄形成完整髓质;脾脏动脉周围淋巴鞘与脾小结边界逐渐成熟,髓外造血逐渐减少,21日龄脾小结边缘区清晰,但未出现成熟生发中心;小肠黏膜下淋巴小结从单个发展为集合淋巴小结,21日龄出现类生发中心结构;淋巴结14日龄后出现明显淋巴小结,18~21日龄接近成熟但无生发中心形成。

2.3 不同日龄乳鼠小肠免疫细胞分布特征 见表3。

随日龄增长,乳鼠小肠免疫细胞比例呈阶段性变化:7~14日龄阶段:与7日龄乳鼠比较,14日龄CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞比例显著升高(均 $P<0.01$),B细胞、NK细胞比例差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。14~21日龄阶段:除NK细胞比例仍无显著变化外,其余免疫细胞比例差异逐渐扩大:与14日龄比较,18日龄CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、DC细胞比例显著升高,B细胞比例显著降低(均 $P<0.001$);与18日龄比较,21日龄CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞比例进一步显著升高,B细胞、DC细胞比例显著降低,差异具有统计学意义(均 $P<0.001$)。

表3 不同日龄乳鼠小肠各免疫细胞占CD45 ⁺ 细胞群比例(% , $\bar{x} \pm s, n=3$)						
免疫细胞	7日龄	14日龄	18日龄	21日龄	<i>F</i>	<i>P</i>
CD4 ⁺ T细胞	2.65 ± 0.05	4.20 ± 0.28 ^a	4.99 ± 0.20 ^{ab}	7.14 ± 0.16 ^{abc}	204.873	< 0.001
CD8 ⁺ T细胞	1.75 ± 0.08	4.69 ± 0.16 ^a	5.43 ± 0.16 ^{ab}	14.39 ± 0.49 ^{abc}	833.088	< 0.001
$\gamma\delta$ T细胞	1.99 ± 0.16	3.37 ± 0.13 ^a	6.46 ± 0.16 ^{ab}	10.95 ± 0.29 ^{abc}	847.276	< 0.001
B细胞	1.56 ± 0.12	1.69 ± 0.10	1.05 ± 0.13 ^{ab}	0.67 ± 0.06 ^{abc}	38.861	< 0.001
DC细胞	1.84 ± 0.08	1.04 ± 0.08 ^a	2.08 ± 0.12 ^b	1.13 ± 0.16 ^{ac}	39.318	< 0.001
NK细胞	0.14 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.18 ± 0.02	1.489	0.289

注: a. 与7日龄比较, t_{CD4^+T} 细胞=9.439、19.660、46.393, t_{CD8^+T} 细胞=28.466、16.838、44.096, $t_{\gamma\delta T}$ 细胞=11.594、34.216、46.856, t_{DC} 细胞=-12.247、-6.875, 均 $P<0.05$; b. 与14日龄比较, t_{CD4^+T} 细胞=3.977、15.790, t_{CD8^+T} 细胞=3.180、32.594, $t_{\gamma\delta T}$ 细胞=25.961、41.311, t_{B} 细胞=-6.759、-15.149, t_{DC} 细胞=12.490, 均 $P<0.05$; c. 与18日龄比较, t_{CD4^+T} 细胞=14.539, t_{CD8^+T} 细胞=25.275, $t_{\gamma\delta T}$ 细胞=23.480, t_{B} 细胞=-4.597, t_{DC} 细胞=-8.277, 均 $P<0.05$ 。

2.4 不同日龄乳鼠感染EV71前后小肠ILC3s数量情况 见表4。随日龄增加,乳鼠感染EV71前和感染后小肠ILC3s数量均上升,差异具有统计学意义($F=150.283, 216.176$, 均 $P<0.001$)。同一日龄组比较,

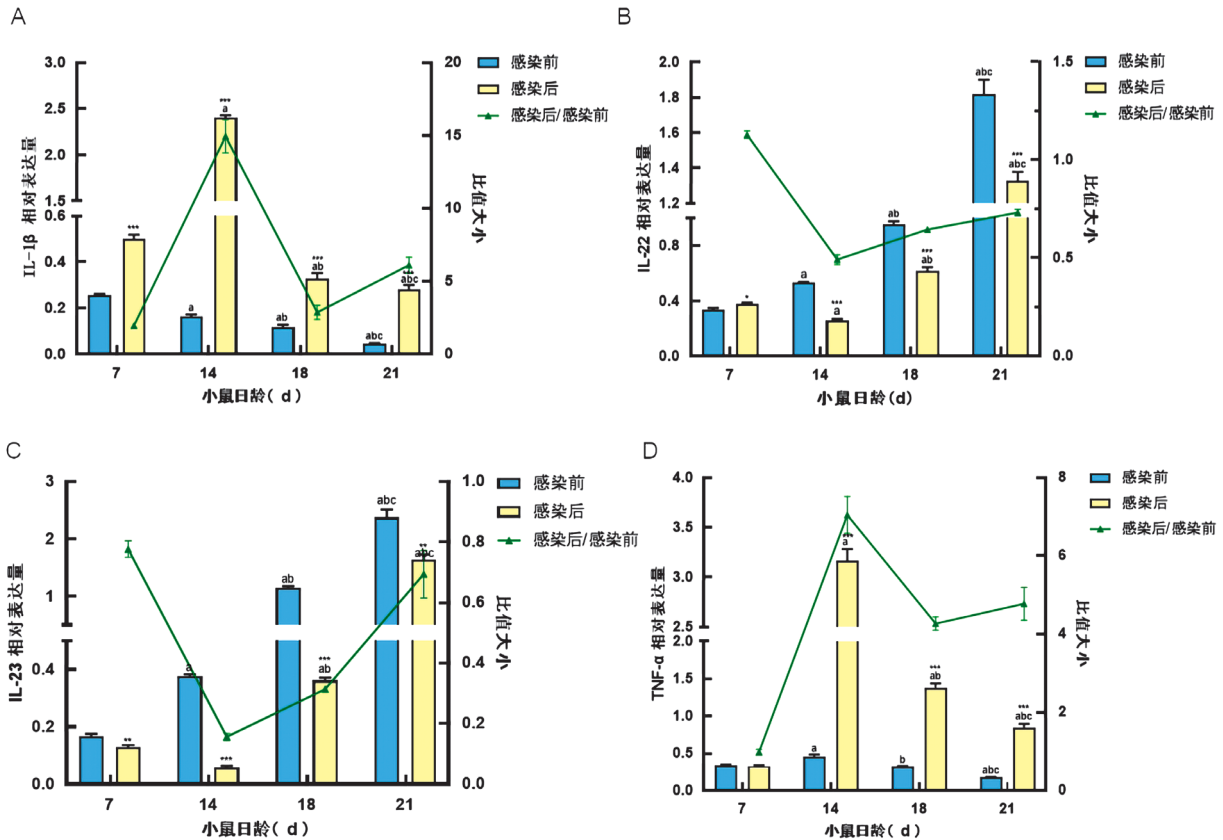
7~18日龄乳鼠感染后ILC3s数量较感染前显著减少,21日龄乳鼠感染后ILC3s数量较感染前显著增加,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)。

表4 不同日龄乳鼠感染EV71前后小肠ILCs细胞比例(% , $\bar{x} \pm s, n=3$)				
乳鼠日龄(天)	感染前	感染后	<i>t</i>	<i>P</i>
7	5.47 ± 0.32	3.72 ± 0.41	5.828	0.004
14	11.60 ± 0.70 ^a	8.57 ± 0.56 ^a	5.854	0.004
18	46.11 ± 2.98 ^{ab}	35.53 ± 2.63 ^{ab}	4.611	0.010
21	49.53 ± 2.63 ^{ab}	58.77 ± 4.12 ^{abc}	-4.032	0.016

注: a. 与7日龄比较, $t_{感染前}$ =13.795、21.591、23.486, $t_{感染后}$ =12.104、20.699、23.029, 均 $P<0.05$; b. 与14日龄比较, $t_{感染前}$ =18.305、19.527, $t_{感染后}$ =17.366、20.912, 均 $P<0.05$; c. 与18日龄比较, $t_{感染后}$ =8.235, $P<0.01$ 。

2.5 不同日龄乳鼠感染EV71前后细胞因子表达变化 见图2。感染前, IL-1 β 、TNF- α 随日龄增加逐渐降低($F=264.322$ 、 104.483 、均 $P<0.001$), IL-22、IL-23随日龄增加逐渐升高($F=176.101$ 、 180.815 、均 $P<0.001$)。感染后, 7日龄乳鼠TNF- α 与感染前相比差异无显著统计学差异($t=-0.520$, $P=0.631$), IL-22较感染前略微升高($t=-4.220$, $P=0.013$); 其余各日龄组细胞因子均呈显著日龄依赖性差异: 7~21日龄IL-1 β ($t=-22.841$, -136.593 , -12.890 , -23.456)

及14~21日龄TNF- α ($t=-38.505$, -31.634 , -25.589) 表达量均较感染前显著升高(均 $P<0.001$), 且14日龄达到峰值; 14~21日龄IL-22($t=36.316$, 15.083 , 8.778)及7~21日龄IL-23($t=5.362$, 74.642 , 48.492 , 7.507)表达量均较感染前显著降低(均 $P<0.05$), 且14日龄降至谷值。与14日龄相比, 18~21日龄IL-1 β 、TNF- α 表达量显著降低($F=264.322$, 946.372 , 均 $P<0.001$); IL-22、IL-23表达量显著升高($F=660.106$, 567.682 , 均 $P<0.001$)。



A: IL-1 β , B: IL-22, C: IL-23, D: TNF- α . * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图2 不同日龄乳鼠感染EV71前后细胞因子相对表达量变化

3 讨论

EV71作为婴幼儿手足口病重症化的首要病原体,其年龄依赖性易感性已成为临床防控重点,但目前缺乏特异性免疫干预手段^[12-13]。本研究通过建立不同日龄乳鼠EV71感染模型,系统分析免疫器官发育、免疫细胞分布及细胞因子表达的动态变化,阐明了日龄对乳鼠EV71感染免疫应答的调控机制,为EV71感染的年龄相关易感性研究提供了实验依据。

免疫器官发育成熟度是宿主抵御病原体感染的结构基础,其形态与功能特征直接决定免疫应答启动效率^[14]。本研究组织学结果显示,18~21日龄乳鼠骨髓、胸腺、脾脏及肠道淋巴组织已接近成年小鼠特征,这与该日龄组感染后无死亡、临床症状轻微的表型一致。免疫细胞检测进一步发现,14~21日龄乳

鼠小肠中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞及 $\gamma\delta$ T细胞比例随日龄显著升高,提示T细胞亚群的成熟与增殖可能是大龄乳鼠抵抗力增强的重要原因^[15]。这一结果与宋雅伟^[4]报道的EV71感染患儿外周血T淋巴细胞亚群紊乱与病情严重程度正相关的结论相符,进一步验证了免疫细胞亚群检测在EV71感染评估中的临床意义。

肠道黏膜作为EV71感染的初始入侵部位,其局部固有免疫应答的及时性与有效性直接决定感染进展^[8,16]。ILC3s作为肠道黏膜固有免疫的核心效应细胞,通过分泌IL-22等保护性细胞因子维持上皮屏障完整性,是黏膜抗感染的关键靶点^[6,11]。本研究流式结果显示,7~18日龄乳鼠感染后ILC3s数量显著减少,21日龄乳鼠感染后ILC3s数量反而增加,揭示了

ILC3s在年龄相关抵抗力中的作用: 幼龄乳鼠免疫系统尚未成熟, 感染后ILC3s可能因病毒诱导的凋亡或功能耗竭而减少, 导致肠道屏障防御功能受损, 病毒易扩散并引发重症; 而大龄乳鼠ILC3s可通过增殖活化增强黏膜免疫应答, 形成抗病毒防御壁垒, 这与既往研究中ILC3s在肠道病毒感染中的保护作用结论一致^[17-18]。

细胞因子网络平衡是免疫应答高效发挥的关键, 促炎因子与保护性因子表达失衡是感染性疾病重症化的重要机制^[5,19]。本研究RT-qPCR结果显示, 乳鼠感染前IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子随日龄增加而降低, IL-22、IL-23等保护性因子随日龄增加而升高, 反映了免疫系统从过度应激到精准调控的发育轨迹^[20]。感染后, 7~14日龄乳鼠呈现促炎因子亢进、保护性因子抑制的失衡状态, 与ILC3s数量减少形成恶性循环, 这可能是幼龄乳鼠重症化的核心机制^[21]; 而18~21日龄乳鼠促炎因子下降、保护性因子回升, 与ILC3s增殖活化形成协同效应, 体现了成熟免疫系统对感染的精准调控能力^[22]。IL-1 β /IL-22比值在感染后呈现显著年龄差异, 幼龄组比值显著高于大龄组, 该比值可能成为比单一细胞因子更可靠的重症评估指标, 为EV71感染的病情分级提供了新方向。

综上, 本研究证实乳鼠对EV71感染的抵抗力随日龄增长而增强, 其机制与免疫器官成熟度、ILC3s动态调控及细胞因子网络平衡密切相关。ILC3s比例、IL-1 β /IL-22比值等指标有望成为EV71感染重症风险评估的潜在免疫标志物, 为临床早期干预提供参考。但本研究仍存在一定局限性: 首先, 本研究未纳入ILC1s、ILC2s等其他固有免疫细胞的检测, 未能全面解析肠道固有免疫网络的调控作用; 其次, 未深入验证ILC3s与IL-22等的调控通路。后续研究需聚焦临床样本验证与调控通路解析, 进一步完善EV71感染的免疫检验体系与靶向干预策略, 为婴幼儿重症防控提供更坚实的理论实验支撑。

参考文献:

- [1] HAO J, ZHANG X, HU R, et al. Metabolomics combined with network pharmacology reveals a role for astragaloside IV in inhibiting enterovirus 71 replication via PI3K-AKT signaling[J]. *Journal of translational medicine*, 2024, 22(1): 555.
- [2] BELLO A M, ROSHORM Y M. Recent progress and advances towards developing enterovirus 71 vaccines for effective protection against human hand, foot and mouth disease (HFMD)[J]. *Biologicals*, 2022, 79: 1-9.
- [3] TIAN X, YUAN M, LI L, et al. Enterovirus 71 induces mitophagy via PINK1/Parkin signaling pathway to promote viral replication[J]. *FASEB Journal*, 2025, 39(10): e70659.
- [4] 宋雅伟. T淋巴细胞亚群、炎症因子在感染EV71的手足口病患儿病情评估中的应用[J]. *现代诊断与治疗*, 2024, 35(13): 1992-1994.
- [5] SONG Y W. Application of T lymphocyte subsets and inflammatory factors in disease severity assessment of children with hand, foot, and mouth disease infected with EV71[J]. *Modern Diagnosis & Treatment*, 2024, 35(13): 1992-1994.
- [6] ZOU Z Z, LIU J Y, LI F, et al. Animal models for enterovirus 71: mechanisms, immunity, and applications[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2025, 21(1): 2523109.
- [7] CHEN D Y, WU J, ZHANG F, et al. Trained immunity of intestinal tuft cells during infancy enhances host defense against enteroviral infections in mice[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2024, 16(10): 2516-2538.
- [8] YAMAGUCHI H L, YAMAGUCHI Y, PEEVA E. Role of Innate immunity in allergic contact dermatitis: an update[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(16): 12975.
- [9] 李晓刚, 邓巧妮, 王军焕, 等. 儿童哮喘患者外周血ILC2细胞和Th2型细胞相关因子水平变化及与临床相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(6): 72-77.
- [10] LI X G, DENG Q N, WANG J H, et al. Changes of ILC2 cells and Th2 cell related factors in peripheral blood of children with asthma and their clinical relevance[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(6): 72-77.
- [11] 羊璐, 马菁昌, 刘懿天, 等. CD226在小鼠小肠3型固有淋巴样细胞(ILC3)中的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2024, 40(1): 1-6.
- [12] YANG L, MA J C, LIU Y T, et al. Expression of CD226 in the small intestinal group 3 innate lymphoid cells(ILC3)in mice[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2024, 40(1): 1-6.
- [13] 徐峥, 于明凯, 张峰波, 等. 3型固有淋巴细胞在慢性炎症性疾病中的作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(9): 2006-2010, 后插2.
- [14] XU Z, YU M K, ZHANG F B, et al. Role of type-3 innate lymphoid cell in chronic inflammatory diseases[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2024, 40(9): 2006-2010, 后插2.
- [15] 谢慧欣, 郭赟, 钟豪杰, 等. III型固有淋巴细胞在炎症性疾病中的作用[J]. *生理学报*, 2022, 74(2): 265-275.
- [16] XIE H X, GUO Y, ZHONG H J, et al. Emerging pathogenic role of group 3 innate lymphoid cells in inflammatory diseases[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2022, 74(2): 265-275.
- [17] LI H, YAO Y F, CHEN Y, et al. TRAF3IP3 is cleaved by EV71 3C protease and exhibits antiviral activity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 914971.
- [18] Yi Z, PEI S, SUO W, et al. Epidemiological characteristics, routine laboratory diagnosis, clinical signs and risk factors for hand, foot and mouth disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *PloS One*, 2022, 17(4): e267716.
- [19] 董源敏, 陆楠, 张彩. EV71病毒固有免疫逃逸机制的研究进展[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2021, 41(6): 493-500.

- genetics & Chromatin, 2025, 18(1): 5.
- [13] LI J W, CHENG X Z, HUANG D G, et al. Six2 regulates the malignant progression and 5-FU resistance of hepatocellular carcinoma through the PI3K/AKT/mTOR pathway and DNMT1/E-cadherin methylation mechanism[J]. Neoplasma, 2024, 71(5): 451-462.
- [14] HAN B, YAO F. Alcohol and hepatocellular carcinoma[J]. Clinics in Liver Disease, 2024, 28(4): 633-646.
- [15] ZHONG B Y, FAN W Z, GUAN J J, et al. Combination locoregional and systemic therapies in hepatocellular carcinoma[J]. Lancet Gastroenterology Hepatology, 2025, 10(4): 369-386.
- [16] SHA M, LI X H, LIU Y, et al. Comparative chemical characters of *Pseudostellaria heterophylla* from geographical origins of China[J]. Chinese Herbal Medicines, 2023, 15(3): 439-446.
- [17] YANG Y, WEN L, JIANG Z Z, et al. Chemical properties, preparation, and pharmaceutical effects of cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*[J]. Molecules, 2025, 30(12): 2521-2540.
- [18] GUI Y, WU H, FAN H. *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax, a traditional folk medicine, ameliorates colorectal cancer by remodeling the tumor immune microenvironment [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2025, 342: 119362.
- [19] PU Y W, ZHU J M, XU J, et al. Antitumor effect of a polysaccharide from *Pseudostellaria heterophylla* through reversing tumor-associated macrophages phenotype[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 220: 816-826.
- [20] LI H, WANG S Y, YANG Z S, et al. Advances in *Pseudostellaria heterophylla* research: current status and future directions[J]. Molecules, 2025, 30(17): 3656.
- [21] ZHOU L Y, HE L Y, LIU C H, et al. Liver cancer stem cell dissemination and metastasis: uncovering the role of NRCAM in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2023, 42(1): 311.
- [22] CHEN J S, ZHANG H X, XIU C Y, et al. METTL3 promotes pancreatic cancer proliferation and stemness by increasing stability of ID2 mRNA in a m6A-dependent manner[J]. Cancer Letters, 2023, 565: 216222.
- [23] YAN L, GENG Q, CAO Z W, et al. Insights into DNMT1 and programmed cell death in diseases[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 168: 115753.
- [24] QIN S K, CHEN H H, TIAN C C, et al. NS1-mediated DNMT1 degradation regulates human bocavirus 1 replication and RNA processing[J]. PLOS Pathogens, 2024, 20(11): e1012682.
- [25] ZHU B, CHEN J J, FENG Y, et al. DNMT1-induced miR-378a-3p silencing promotes angiogenesis via the NF- κ B signaling pathway by targeting TRAF1 in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2021, 40(1): 352.
- [26] CHEN M K, FANG Y, LIANG M N, et al. The activation of mTOR signalling modulates DNA methylation by enhancing DNMT1 translation in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Translational Medicine, 2023, 21(1): 276.
- [27] LI K J, NING T, WANG H, et al. Nanosecond pulsed electric fields enhance mesenchymal stem cells differentiation via DNMT1-regulated OCT4/NANOG gene expression[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2020, 11(1): 308.
- [28] YU Y, LU X H, YAN Y, et al. The lncRNA KIF9-AS1 accelerates hepatocellular carcinoma growth by recruiting DNMT1 to promote RAI2 DNA methylation[J]. Journal of Oncology, 2022, 2022: 3888798.
- 收稿日期: 2025-10-22
修回日期: 2025-12-14

(上接第45页)

- DONG Y M, LU N, ZHANG C. Advances in innate immune evasion strategies of enterovirus 71[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2021, 41(6): 493-500.
- [15] 许兆杰, 吴京学, 王娇, 等. 大连地区健康成年人外周血T淋巴细胞15种免疫表型分析研究[J]. 现代检验医学杂志, 2025, 40(1): 1-6, 12.
- XU Z J, WU J X, WANG J, et al. Analysis of 15 immunophenotypes of peripheral blood T lymphocytes in Dalian area[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2025, 40(1): 1-6, 12.
- [16] WANG C, HUANG M H, GUO B Y, et al. Severe enterovirus A71 infection is associated with dysfunction of T cell immune response and alleviated by Astragaloside A[J]. Virologica Sinica, 2025, 40(3): 451-461.
- [17] WANG P T Q, KLJAVIN N, NGUYEN T T T, et al. Adrenergic nerves regulate intestinal regeneration through IL-22 signaling from type 3 innate lymphoid cells[J]. Cell Stem Cell, 2023, 30(9): 1166-1178, e8.
- [18] ZHANG H Y, SONG Z G, ZOU J Y, et al. An infectious clone of enterovirus 71(EV71) that is capable of infecting neonatal immune competent mice without adaptive mutations[J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 427-438.
- [19] 张颖, 秦红, 刘凤霞, 等. 手足口病患儿血清LTB4和COX2水平表达与疾病严重程度及预后的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(5): 143-147.
- ZHANG Y, QIN H, LIU F X, et al. Correlation between serum LTB4 and COX2 levels expression and disease severity, prognosis in children with hand, foot and mouth disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(5): 143-147.
- [20] ZHANG W J, HUANG Z G, HUANG M Y, et al. Predicting severe enterovirus 71-infected hand, foot, and mouth disease: cytokines and chemokines[J]. Mediators of Inflammation, 2020, 2020: 9273241.
- [21] ZHANG C, TANG S, ZONG X, et al. Anti-IL-22 neutralizing antibodies decrease inflammation lesions and reduce mortality in enterovirus 71-infected mice[J]. Cellular and Molecular Biology, 2023, 69(15): 254-258.
- [22] DONG Y M, LIU J, LU N, et al. Enterovirus 71 antagonizes antiviral effects of type III interferon and evades the clearance of intestinal intraepithelial lymphocytes[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 806084.
- 收稿日期: 2025-10-11
修回日期: 2026-02-03