

徐英莉,郭姗姗,耿子涵,等. Cox A16 型手足口病 BALB/c 乳鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 316-322.
Xu YL, Guo SS, Geng ZH, et al. Establishment of a BALB/c sulking mouse model of coxsackievirus A16 infected hand, foot and mouth disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 316-322.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.006

Cox A16 型手足口病 BALB/c 乳鼠模型的建立

徐英莉,郭姗姗,耿子涵,庞博,周利润,王雅欣,崔晓兰,时宇静*

(中国中医科学院 中药研究所,北京 100700)

【摘要】 目的 建立 3 日龄 BALB/c 乳鼠 CoxA16 型手足口病动物模型,并进行免疫、病理学研究。**方法** 3 日龄 BALB/c 乳鼠腹腔注射感染 Cox A16 型毒株,测定其 50%致死剂量 (LD_{50}),观察其 14 d 内存活天数、临床症状打分。采用 $3LD_{50}$ 病毒攻毒,并观察其 14 d 内感染程度、体重变化、死亡数,计算平均存活天数、死亡率,至感染第 6 天发病达到高峰时取材,采用 CBA 法检测血清中 MCP-1、MIP-1 α 、G-CSF 含量,采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测后肢肌肉组织、心脏、脑、肠病毒载量,采用 HE 染色观察后肢肌肉、脑病理病变情况。**结果** Cox A16 毒株感染 3 日龄 BALB/c 乳鼠,出现活动减少、后肢麻痹瘫痪、体重减轻、死亡,其病毒毒力为每毫升 56 LD_{50} 。感染后 14 d 内,与正常对照组比较,模型组乳鼠生存天数、死亡率、临床感染评分、体重,均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。感染后 6 d,血清中 MCP-1、G-CSF 含量均显著性升高 ($P < 0.01$)。后肢肌肉组织、心脏、脑、肠病毒载量较正常组均显著升高 ($P < 0.01$),其中后肢肌肉组织病毒载量最高。HE 染色病理观察表明,后肢肌肉组织有大面积萎缩、炎症,脑组织神经细胞有不同程度的萎缩。**结论** 成功构建了 3 日龄 BALB/c 乳鼠 CoxA16 型手足口病动物模型,为 COX A16 型手足口病药物评价及机制研究奠定基础。

【关键词】 动物模型;柯萨奇病毒 A16 型;手足口病;BALB/c 乳鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 03-0316-07

Establishment of a BALB/c sulking mouse model of coxsackievirus A16 infected hand, foot and mouth disease

XU Yingli, GUO Shanshan, GENG Zihan, PANG Bo, ZHOU Lirun, WANG Yaxin, CUI Xiaolan, SHI Yujing*

(Institute of Chinese Medicine, Chinese Academy of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Corresponding author: SHI Yujing. E-mail:yjshi@icmm.ac.cn

【Abstract】 Objective To establish a HFMD BALB/c sulking mouse model infected by coxsackievirus A16, and evaluate immunological and pathological characteristics of this model. **Methods** In this study, 3-day-old BALB/c suckling mice were infected with 100 μ L coxsackievirus A16 via intraperitoneal injection. The survival rate, clinical score and the 50% lethal dose (LD_{50}) were monitored daily 14 days after infection. Challenge with the coxsackievirus A16 with a dose of $3LD_{50}$, 3-day-old BALB/c suckling mice were monitored daily the survival rate, clinical score and weight within 14 d. 6 d after infection, the concentration of MCP-1, MIP-1 and G-CSF in serum was determined by cytometric bead array (CBA) method; viral loads of the hind limb muscle, heart, brain, intestine were determined by the real-time RT-PCR; histological change of muscle and brain were determined. **Results** After different concentrations of virus infection, 3-day-old BALB/c suckling mice appeared inactivity, hind limb weakness, paralysis and even death, and the virulence of coxsackievirus A16 for 3-day-old BALB/c suckling mice was 56 LD_{50} /mL. Within 14 days after infection, compared with

【基金项目】 重大新药创制科技重大专项资金资助(2019ZX09721001-005-001), 抗流感中药药效评价(ZZ13-035-09)。
Funded by Major Science and Technology Project for Significant New Drugs Creation(2019ZX09721001-005-001), Evaluation of the Efficacy of Anti-influenza Chinese Medicine(ZZ13-035-09)。
【作者简介】 徐英莉(1996—),女,硕士研究生,研究方向:中药抗菌、抗病毒药效评价及机理。Email:1300042271@qq.com
【通信作者】 时宇静,副研究员,女,研究方向:中药抗病毒作用机理。Email:yjshi@icmm.ac.cn

the control group, there were significant differences in the survival days, mortality, clinical score, and body weight of suckling mice in the model group ($P < 0.01$). 6 d post infection, the concentrations of MCP-1 and G-CSF in serum are significantly increased ($P < 0.01$) compared with the control group. The viral loads of hindlimb muscle, heart, brain and intestine was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$), and the viral loads of hindlimb muscle was the highest. Pathological change showed that there were large area of atrophy and inflammation in the hind limbs muscle and atrophy in the nerve cells of the brain. **Conclusions** A CoxA16 infected 3-day-old BALB/c suckling mouse model was successfully established, which can serve for medicine evaluation and mechanism.

【Keywords】 animal model; Cocksackievirus A16; hand, foot and mouth disease; BALB/c

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

柯萨奇病毒 A16 型是引起手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)的主要病原体之一^[1]。COXA16 型手足口病感染可以引发手、足、口腔疱疹,少数重症患者可以引发神经系统病变,甚至死亡^[2]。目前尚无有效的疫苗和特效药物,构建具有典型临床症状的动物模型是药效及疫苗评价方法的重要环节之一。

目前已建立较为完备的 EV71 感染动物模型,包括 BALB/c^[3]、ICR^[4] 乳鼠模型、恒河猴模型等^[5],而 COX A16 感染动物模型仍需完善。目前已建立通过颅内注射 COX A16 感染 1 日龄 BALB/c 模型^[6]、1 日龄 ICR 乳鼠模型^[7]以及树鼯模型、猕猴模型等。而已建立的 BALB/c 乳鼠模型,尚未进行深入的免疫、病理学研究。

本实验借鉴本组 EV71 型手足口病 3 日龄 BALB/c 乳鼠模型^[8-9],经腹腔注射建立 COXA16 型手足口病 3 日龄 BALB/c 乳鼠模型,并进行临床症状、体重变化观测,组织病毒载量、趋化因子含量、组织病理病变等指标检测,建立了较完整的 COXA16 型 3 日龄 BALB/c 乳鼠模型,为药物评价及疫苗研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

遗传背景清楚,3 日龄,SPF 级,BALB/c 乳鼠 65 只(整窝鼠,每窝 5 只),购于维通利华生物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。饲养于中国中医科学院中药研究所 ABSL-2 实验室 IVC 饲养系统【SYXK(京)2019-0003】。昼夜各半循环照明,湿度 50%,温度控制在 22 ~ 25℃,饲喂普通维持饲料。所有操作符合中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会要求(审批号:2020D030)。

1.1.2 细胞

非洲绿猴肾细胞(Vero),购于北京北纳创联生物技术研究院(编号:BNCC337868)。肠道病毒 Cox A16 株购于清华大学生命科学院,经本实验室常规传代、保存。

1.1.3 主要试剂与仪器

柯萨奇病毒 16 型(CA16)核酸测定试剂盒(QR-0439-02, Liferiver);核酸提取试剂盒(Z-ME-0010, Liferiver);BD Cytometric Bead Array(CBA) Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit(558266, BD)、Mouse G-CSF Flex Set(560152, BD)、Mouse MCP-1 Flex Set(558342, BD)、Mouse MIP-1 α Flex Set(558449, BD)。DMEM(26418007, Gibco);胎牛血清(35081003, Gibco);PBS(26318001, Gibco);胰酶(06519005, Gibco);生物安全柜(批号:A2 型 MSC1.2, Thermo Scientific);倒置显微镜(OLMPUS CKX41, OLMPUS);CO₂ 培养箱(Thermo-371, Thermo Scientific);流式细胞仪(BD FACSCelesta, 美国 BD);PCR 仪(QuantStudio 5)。

1.2 方法

1.2.1 病毒毒力测定

将 Vero 细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μ L, 1×10^4 个细胞/孔。在长至单层的 Vero 细胞的培养板中,分别加入用培养液做 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 连续 10 倍稀释的 CoxA16 株病毒,每孔 100 μ L,设 4 个复孔。将细胞培养板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,每日于倒置显微镜下观察。按照 Reed-Muench 法计算 50% 细胞毒性浓度(TCID₅₀)。细胞的病变判断依据为:(-)为细胞生长正常,无病变;(±)为细胞病变少于整个单层细胞的 10%;(+)为细胞病变约占整个单层细胞的 25%以下;(++)为细胞病变约占整个单层细胞的 50%以下;(+++)为细胞病变约占整个单层细胞的 75%以下;(+++++)为细胞病变约占整个单层细胞的 75%以上。

3 日龄,SPF 级 BALB/c 乳鼠,经腹腔注射 10^0 、

10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 倍比稀释的 Cox A16 株病毒, 每只 100 μL, 同时设置正常对照组。记录各组死亡情况及感染程度打分, 共观察 14 d。感染程度分级标准见表 1^[7]:

表 1 症状打分表
Table 1 Clinical score table

打分 Score	临床症状 Clinical symptoms
0	健康 Health
1	后肢力量减弱 Hind limb weakened
2	弓背、竖毛、消瘦、活动减少等 Arched back, vertical hair, wasting, less physically
3	单侧后肢麻痹或瘫痪 Unilateral hind limb paralysis
4	双侧后肢麻痹或瘫痪 Bilateral hind limb paralysis
5	濒死或死亡 Moribund and death

1.2.2 动物感染实验

3 日龄, SPF 级, BALB/c 乳鼠每组 10 只, 腹腔注射 3 LD₅₀ Cox A16 株病毒 100 μL, 于感染后第 6 天, 分别取血清、后肢肌肉、脑组织、心脏组织、肠组织。

1.2.3 CBA 法测血清中趋化因子含量

按照 BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit 及 Mouse MCP-1 Flex Set、Mouse MIP-1β Flex Set、Mouse G-CSF Flex Set 说明书进行血清中 MIP-1β、MIP-1α、G-CSF 浓度测定。将标准品 (2500 pg/mL) 进行 2 倍梯度稀释 (共 9 个稀释度), 同时设阴性对照; 向装有 50 μL 标准品及待测样品的 EP 管中加入 50 μL 捕获珠混悬液, 轻轻吹打混匀, 室温避光孵育 1 h。加入配置的检测抗体, 轻轻吹打混匀, 室温避光孵育 1 h。每个 EP 管中加入 1 mL 洗涤缓冲液, 200 g 室温离心 5 min, 弃去上清。用 300 μL 洗涤缓冲液重悬, 充分混匀后上机检测。采用 BD FACSDiva 8.0.1.1 分析各样品中趋化因子含量。

1.2.4 后肢肌肉病毒载量测定

精称每只后肢肌肉组织、心脏、脑、肠 20 mg, 加入 1000 μL 生理盐水, 于冰上研磨为匀浆。按照 Liferiver 核酸提取试剂说明书的方法, 提取 RNA。进一步采用柯萨奇病毒 16 型 (A16) 核酸测定试剂盒进行实时荧光 PCR 反应。反应条件为 50℃ × 30 min; 95℃ × 10 min; 95℃ × 15 s → 55℃ × 40 s, 循环 45 次; 单点荧光检测 55℃, 反应体系 15 μL。使用

Sequence Detection System 软件分析 PCR 过程各检测样本的 Ct (Threshold of cycle) 值, 采用 ΔΔCt 法计算病毒的相对表达量。

1.2.5 病理检测

后肢肌肉组织、脑组织使用 5% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 切片, HE 染色, 中性树胶封片。光学显微镜下进行病理检查。

后肢肌肉组织镜下判断标准: “-”: 肌肉组织未见有肌组织断裂、萎缩, 间质未见有炎症细胞浸润, 组织未见有水肿等变化。“+”: 肌肉组织未见有明显断裂、萎缩, 间质未见水肿, 未见有明显炎症细胞渗出, 组织细胞有成群聚集, 不明显。

“++”: 肌肉组织有不同程度断裂, 肌组织有肿胀, 间质有炎症细胞渗出, 并有少量瘀血。“+++”: 肌肉组织有明显断裂、萎缩, 肌间质有大量炎症细胞渗出, 水肿明显, 小血管有瘀血; 肌肉间质有大量细胞聚集, 无规律。“++++”: 肌肉组织大面积断裂、水肿, 间质炎症。病理学检查镜下判断标准: “-”: 乳鼠脑组织未见有瘀血, 细胞未见增生。“+”: 乳鼠脑组织脑膜有轻度瘀血, 局部性。“++”: 乳鼠脑组织局部有瘀血, 细胞增生。“+++”: 乳鼠脑组织有大片状脑膜缺损, 组织脱落, 并有局部脑膜瘀血。“++++”: 乳鼠脑组织大面积组织细胞软化, 脑膜损伤、瘀血。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 26.0 进行分析, 计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 正态分布等方差资料采用 LSD 检验, 若方差不齐时采用 Kruskal-Wallis test 检验。等级资料采用 Mann-Whitney 检验。P < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 Cox A16 毒力测定

分别用 Vero 细胞及 3 日龄 BALB/c 乳鼠测定其毒力, 经 Reed-Muench 法计算, TCID₅₀ = 10^{-4.5}。如图 1A 所示, 3 日龄 BALB/c 乳鼠病毒注射剂量与临床症状打分正相关。用病毒原液攻毒, 第 4 天动物全部后肢瘫痪、死亡。用 1 × 10⁻¹ 稀释度病毒量攻毒, 第 3 天开始出现临床症状, 第 11 天完全死亡。随病毒量减少, 1 × 10⁻²、1 × 10⁻³ 稀释度动物临床评分降低 (见图 1B)。经 Reed-Muench 法计算 COXA16 对 3 日龄 BALB/c 乳鼠模型毒力为每毫升 56 LD₅₀。

2.2 乳鼠生存曲线、临床得分及体重变化

3 日龄 BALB/c 乳鼠模型经腹腔注射 3 LD₅₀ CoxA16 株后,11 d 内模型组死亡率为 100%(见图 2 A),其感染程度积分(见图 2B)、死亡率、生存天数与正常对照组比较均具有显著性差异($P < 0.01$)。模型组感染 6 d 后,出现后肢瘫痪,精神萎靡,体重持续减轻(见图 2C),甚至死亡(见图 2D)。

2.3 趋化因子的检测

对感染 6 d 后 CoxA16 株 3 日龄 BALB/c 乳鼠血清中趋化因子采用 CBA 法进行检测,模型组乳鼠 MCP-1、G-CSF 含量均显著性升高($P < 0.01$)(见图 3)。

2.4 病毒载量

对 3 日龄 BALB/c 乳鼠感染 CoxA16 株 5 d 后,乳鼠后肢肌肉组织、心脏、脑、肠进行 RT-PCR 病毒载量测定,病毒载量均显著升高($P < 0.01$),表明 CoxA16 株感染 BALB/c 乳鼠,并在其体内进行了有

效的复制和增殖,其中后肢肌肉病毒载量最高,心脏次之(见图 4)。

2.5 病理检测

对感染 6 d 后 CoxA16 株 3 日龄 BALB/c 乳鼠后肢肌肉组织、脑组织进行 HE 染色。正常对照组乳鼠肌肉组织结构正常,病变评分为 0.00。模型对照组乳鼠肌肉组织有大面积萎缩、断裂,间质肿胀,炎症细胞渗出,大量细胞聚集,间质并有瘀血等病理变化,组织病变评分为 3.20,病变程度明显($P < 0.01$)。

正常对照组乳鼠脑组织、脑膜结构正常,病变评分为 0.00。模型对照组乳鼠脑组织、脑膜有局限性缺损,组织脱落,细胞局限性增生,局部有瘀血。乳鼠脑组织间质有大面积神经细胞软化区,各级神经细胞有不同程度的萎缩,脑组织并有局限性缺损,组织病变评分为 2.70,病变具有显著性差异($P < 0.01$)(见表 2,图 5)。

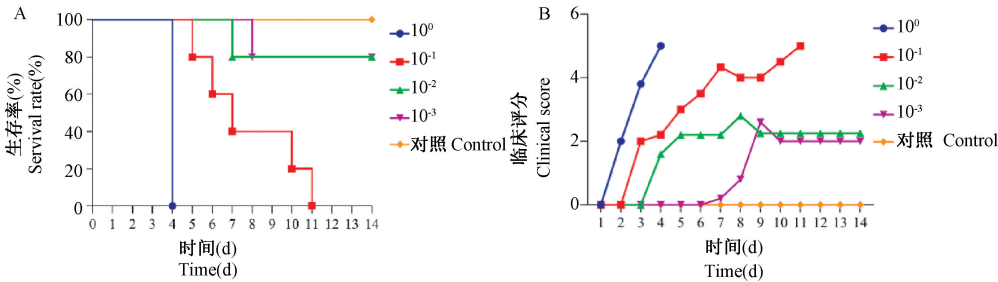
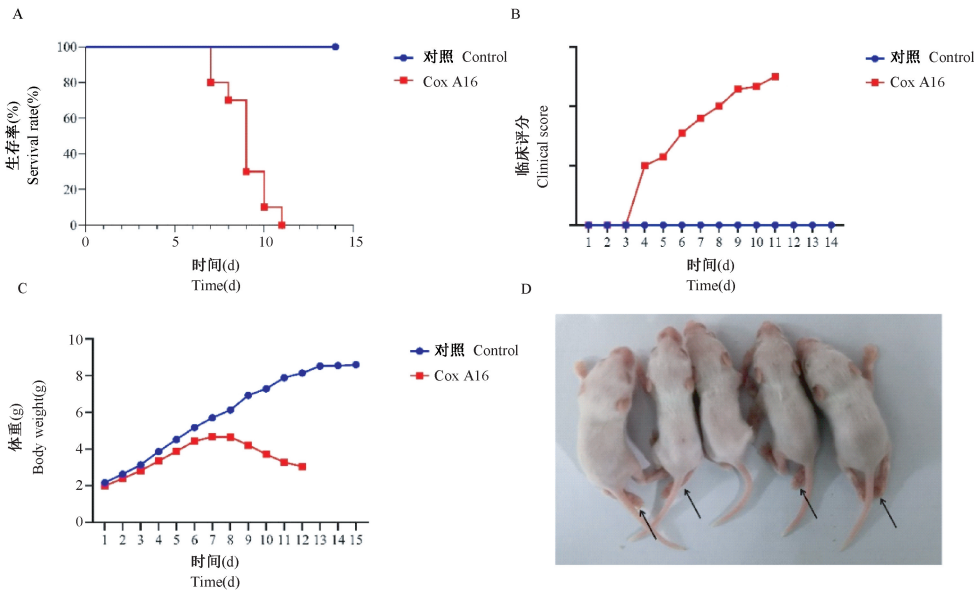


图 1 3 日龄 BALB/c 乳鼠感染 COX A16 生存率及临床症状打分

Figure 1 Survival rate and clinical score of 3 days old BALB/c sulking mice infected COX A16



注:A:生存曲线;B:临床症状打分;C:体质量变化;D:乳鼠典型症状后肢瘫痪

图 2 CoxA16 型手足口病模型的构建

Note.A. Survival rate. B. Clinical score. C. Weight. D. Typical effected symptom of sulking mice; hind limb paralysis.

Figure 2 Establishment of HFMD model infected CoxA 16 in mouse

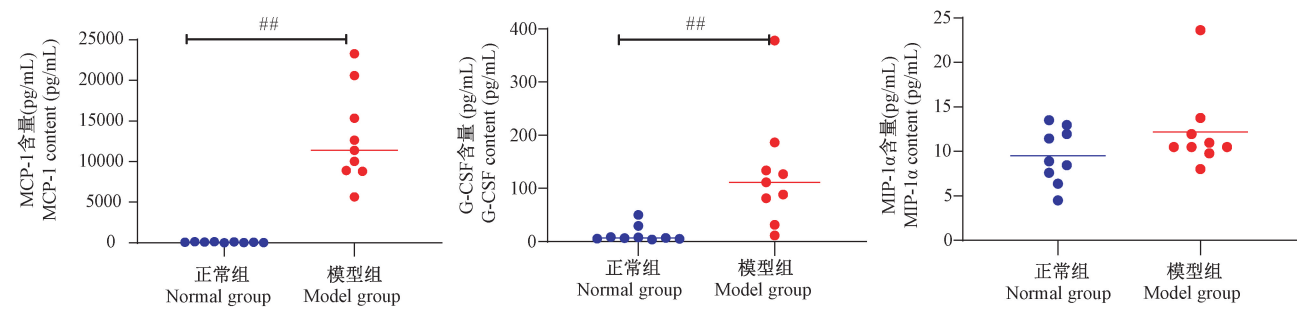


图 3 CoxA16 株感染 BALB/c 乳鼠趋化因子含量

Figure 3 Chemokine content of mice infected with Cox A16

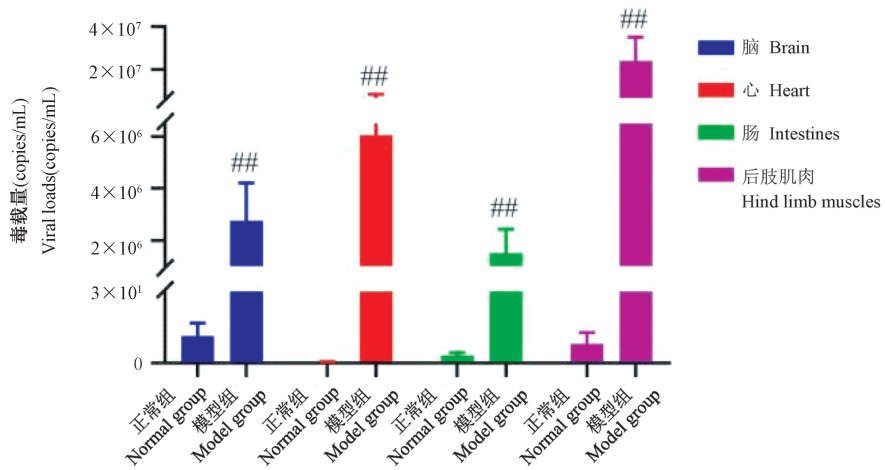


图 4 CoxA16 株感染 BALB/c 乳鼠组织病毒载量

Figure 4 Viral loads in tissue of BALB/c sulking mice

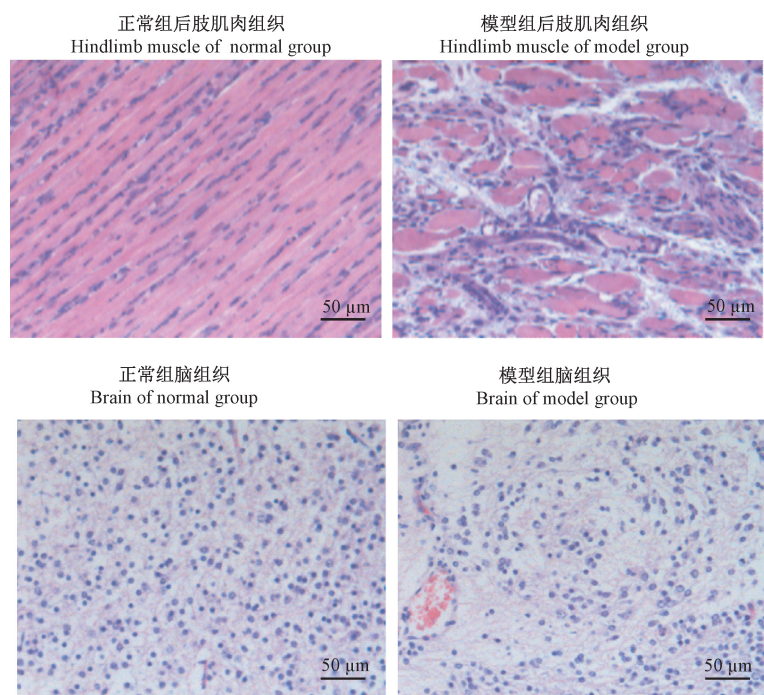


图 5 后肢肌肉组织、脑组织病理变化

Figure 5 Pathological changes of hindlimb muscle and brain

表 2 CoxA16 株感染 BALB/c 乳鼠后肢肌肉组织、脑组织病理分级

Table 2 Pathological grade of hindlimb muscle and brain of BALB/c sulking mice infected with Cox A16

组别 Groups	只数 Number	病变分级 Grade of lesions					均值 Average
		-	+	++	+++	++++	
后肢肌肉组织正常组 Hindlimb muscle of normal group	10	10	0	0	0	0	0.00
后肢肌肉组织模型组 Hindlimb muscle of model group	10	0	0	1	6	3	3.20 ^{##}
脑组织正常组 Brain of normal group	10	10	0	0	0	0	0.00
脑组织模型组 Brain of model group	10	0	0	4	5	1	2.70 ^{##}

3 讨论

柯萨奇 A16 病毒是手足口病的主要致病病原,其感染也可引起严重心肌炎、急性心力衰竭,甚至死亡。然而其致病机制研究有限,疫苗及特效药亟待研发,合适的动物模型是药物评价、疫苗研发及机制研究必要基础。BALB/c 乳鼠对肠道病毒敏感,已有较多 EV71 感染模型研究,且 BALB/c 乳鼠的生长周期较短、遗传背景明确、伦理问题少,便于操作。

目前,3 日龄 Cox A16 BALB/c 模型免疫学及致病性研究国内尚未见报道。本实验经腹腔感染建立了 Cox A16 株感染 3 日龄 BALB/c 乳鼠模型。本模型可以引发乳鼠后肢麻痹、瘫痪,体重降低,死亡。引发后肢肌肉组织坏死性肌炎,产生大面积萎缩、断裂,间质肿胀,后肢肌肉及脑组织病变显著,该动物模型与 Cox A16 型手足口病临床表现基本一致。与任庆杰等^[10] 11 日龄 C57BL/6J 乳鼠模型仅为脑组织轻微淋巴细胞浸润的病理表现相比,本实验 3 日龄 BALB/c 乳鼠脑组织病变较为严重。脑膜有局限性缺损,局部有瘀血;间质有大面积神经细胞软化区,各级神经细胞有不同程度的萎缩,与重症 HFMD 患儿伴有中枢神经损害的临床表现具有一致性^[11]。乳鼠感染 Cox A16 株 6 d 后,RT-PCR 实验表明 Cox A16 各组织病毒载量与正常对照组比较均有显著性升高,病毒具有广泛的组织嗜性,其中后肢肌肉组织、心肌组织较高,病毒入侵后肢肌肉组织及心肌组织并造成损伤。临床 HFMD 患儿出现心率失常,心肌酶谱异常,与临床患儿症状一致^[12-13]。在乳鼠模型建立中,在操作前应注意用医用酒精喷洒手套,操作后需用医用酒精轻轻擦拭乳鼠,避免母鼠咬伤乳鼠。

Cox A16 感染后 6 d 后,模型组乳鼠血清中 MCP-1、G-CSF 与正常对照组相比均显著性提高 ($P < 0.01$)。中性粒细胞在手足口病致病过程、炎症形成中发挥主导作用,大量趋化因子进入局部组织,引发炎症效应,形成炎症风暴的级联点^[10]。G-CSF 是调动中性粒细胞的重要因子,与手足口病严重程度呈正相关^[14],MIP-1 α 为趋化因子 CC 家族成员,可以趋化中性粒细胞,激发炎症因子释放,加重炎症反应,可在炎症早期作为药效评价指标之一^[15]。

综上所述,本实验成功建立了 Cox A16 型 3 日龄 BALB/c 乳鼠模型,进行了免疫、病理、病毒学研究,完善了 Cox A16 现有的动物模型,为药物评价及筛选奠定基础。

参 考 文 献 (References)

[1] 陈月, 许红梅. 柯萨奇病毒 A16 型感染引起手足口病的研究进展 [J]. 儿科药杂志, 2020, 26(1): 53-56.
Chen Y, Xu HM. Research progress of hand, foot and mouth disease caused by Coxsackie virus A16 infection [J]. J Pediatric Pharm, 2020, 26(1): 53-56.

[2] 隋美丽, 李懿, 刘新奎, 等. 手足口病流行病学、病原学及重症化机制的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(1): 92-98.
Sui ML, Li Y, Liu XK, et al. Research progress on the epidemiology, etiology and severity of hand-foot-mouth disease [J]. J Path Biol, 2017, 12(1): 92-98.

[3] 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]. 药学报, 2013, 48(3): 343-346.
Wang HQ, Jiang JD, Li YH. Establishing an animal model of EV71 with BALB/c mice aged 2 weeks [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48(3): 343-346.

[4] Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria [J]. Arch Virol, 1979, 60(3-4): 329-340.

[5] Liu L, Zhao H, Zhang Y, et al. Neonatal rhesus monkey is a

- potential animal model for studying pathogenesis of EV71 infection [J]. *Virology*, 2011, 412(1): 91–100.
- [6] Zhang Z, Dong Z, Wei Q, et al. A neonatal murine model of coxsackievirus A6 infection for evaluation of antiviral and vaccine efficacy [J]. *J Virol*, 2017, 91(9): e02450–e02466.
- [7] Mao Q, Wang Y, Gao R, et al. A neonatal mouse model of coxsackievirus A16 for vaccine evaluation [J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 11967–11976.
- [8] 姚荣妹, 毛鑫, 曲天歌, 等. 小儿热速清糖浆防治手足口病的体内外药效学研究 [J]. *病毒学报*, 2019, 35(3): 440–445.
- Yao RM, Mao X, Qu TG, et al. *In vivo* and *in vitro* pharmacodynamics study of Xiaoreresuqing syrup in preventing and treating hand, foot and mouth disease [J]. *Chin J Virol*, 2019, 35(3): 440–445.
- [9] 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外药效学研究 [J]. *中国药物警戒*, 2014, 11(7): 385–389.
- Guo SS, Ma XP, Pan X, et al. *In vivo* and *in vitro* pharmacodynamics study of compound Yizhihao Granules on the prevention and treatment of hand, foot and mouth disease [J]. *Chin J Pharm*, 2014, 11(7): 385–389.
- [10] 任庆杰, 李敏, 杨晓岚, 等. Cox.A16 型手足口病乳鼠动物模型的建立及免疫、病理特征 [J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(11): 1685–1690.
- Ren QJ, Li Min, Yang XL, et al. Establishment of a suckling mouse model of Cox.A16 hand, foot and mouth disease and its immune and pathological characteristics [J]. *Chin J Vet Sci*, 2013, 33(11): 1685–1690.
- [11] 汪伟, 曾春野. 手足口病并发病毒性脑炎患儿 65 例临床分析 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2011, 36(8): 844–846.
- Wang W, Zeng CY. Clinical analysis of 65 children with hand-foot-mouth disease complicated with toxic encephalitis [J]. *J Bengbu Med College*, 2011, 36(8): 844–846.
- [12] 张卫文, 刘继艳, 曹原, 等. 手足口病不同类型患儿心功能及预后的临床分析 [J]. *河南预防医学杂志*, 2018, 29(2): 89–93.
- Zhang WW, Liu JY, Cao Y, et al. Clinical analysis of cardiac function and prognosis in children with different types of hand-foot-mouth disease [J]. *Henan J Prev Med*, 2018, 29(2): 89–93.
- [13] 袁丽君. 玉丹荣心丸治疗手足口病并心肌损害患儿的疗效分析 [J]. *中国医药科学*, 2013, 3(13): 73–74.
- Yuan LJ. Efficacy analysis of Yudan Rongxin Pills in treating children with hand-foot-mouth disease and myocardial damage [J]. *Chin Med Sci J*, 2013, 3(13): 73–74.
- [14] 徐庆雷, 王洪建, 杨晓红. 血清 GM-CSF、IGF-II、TNF- α 、hs-CRP 水平在手足口病患者治疗前后的变化及临床意义 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(12): 3536–3537.
- Xu QL, Wang HJ, Yang XH. The changes and clinical significance of serum GM-CSF, IGF-II, TNF- α , hs-CRP levels before and after treatment in children with hand-foot-mouth disease [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 20(12): 3536–3537.
- [15] 刘晨旭, 王茜, 张一听, 等. 解毒护肝汤对药物性肝损伤大鼠 MIP-2 和 MIP-1 β 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(18): 57–64.
- Liu CX, Wang Q, Zhang YX, et al. Effects of Jieduhugan Decoction on the expression of MIP-2 and MIP-1 β protein in rats with drug-induced liver injury [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(18): 57–64.

[收稿日期] 2020-12-06