

C4 亚型人肠道病毒 71 型的小鼠肌肉适应株 对小鼠具有致死毒力

马春梅, 刘江宁

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 人肠道病毒 71 型(EV71)感染婴幼儿可导致手足口病, 偶尔伴有严重的并发症。建立 EV71 的小鼠模型是深入研究病毒感染的致病机制、进行疫苗和药物评价的基础。**方法** 将 EV71 的临床分离株在小鼠骨骼肌中进行系列传代, 得到了小鼠的肌肉适应株 MP10。使用 MP10 经腹腔注射感染 10 日龄 ICR 小鼠, 对感染小鼠的症状、病毒复制和病理进行了监测。**结果** 与临床分离株相比, MP10 对人横纹肌瘤细胞(rhabdomyosarcoma cell, RD 细胞)的感染力提高, 并且对小鼠的毒力增强, MP10 感染 10 日龄小鼠可导致其瘫痪和死亡。病毒主要在骨骼肌中复制, 并引发大面积的坏死性肌炎, 同时神经组织未观察到病变。病理分析发现: 感染小鼠体内与呼吸运动相关的肌肉均发生严重的坏死性肌炎, 推测此类肌肉的坏死会影响小鼠的呼吸功能, 从而成为导致小鼠死亡的因素之一。**结论** 建立了 C4 亚型 EV71 毒株感染 10 日龄 ICR 小鼠的模型, 该模型可作为研究 EV71 感染的致病机制、以及疫苗和药物评价的工具。

【关键词】 人肠道病毒 71 型; 肌肉适应株; 坏死性肌炎; 模型; 小鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0031-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2012. 005. 008

A Mouse-muscle-adapted Human Enterovirus 71 Strain of C4 Subgenotype Causes Lethal Symptoms in Mice

MA Chun-mei, LIU Jiang-ning

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory
Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration
of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish the mouse model for application in the study of pathogenesis of EV71 infection and evaluation of vaccines or drugs. **Methods** A mouse-adapted strain MP10 was generated by a series of passages of the parental EV71 strain in the skeletal muscle of mice. And then the symptoms, virus replication and pathological changes of tissues of infected-mice were monitored. **Results** Compared to the parental strain, MP10 showed enhanced infectivity in RD cells and virulence in mice, and MP10 infection caused paralysis and death in 10-day-old mice. Skeletal muscle was the main site for virus replication and showed extensive necrotizing myositis, whereas no lesions were observed in neurological tissues. The muscles associated with respirometric activity showed severe necrosis, which might

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务费(DWS200901)。

【作者简介】 马春梅(1981 -), 女, 主要从事实验动物病理与病理生理学研究。

【通讯作者】 刘江宁, ljn_zh03038@126.com。

have caused the infected mice to experience difficulty in breath and was thought to be the cause of death. **Conclusion** The 10-day-old mouse model for lethal EV71 infection was established and it would be useful for vaccine and drug evaluation.

【Key words】 Human enterovirus 71; Muscle-adaptation; Necrotizing myositis; Model; Mouse

人肠道病毒 71 型 (EV71) 属于微小 RNA 病毒科, 1969 年首次在加州发现, 随后于 1974 年由 Schimdit 等^[1, 2] 鉴定。EV71 主要感染 6 岁以下婴幼儿, 可导致手足口病, 绝大多数感染为自限性, 然而, 该病毒感染偶尔可导致致死性的并发症^[3, 4]。在过去的几十年中, EV71 曾经在世界范围内爆发, 近年来该疫情主要集中于亚太国家和地区, 每次疫情爆发均会有神经系统并发症报道, 并导致数十至数百的婴幼儿丧失生命^[5-7]。到目前为止, 尚无疫苗和特效药物来控制 EV71 疫情, 对于疫情的控制策略也仅限于公共卫生防护^[8]。

EV71 的动物模型是进行病毒感染的致病机制研究、疫苗和治疗策略研究的基础。依据 EV71 衣壳蛋白 VP1 的基因序列, EV71 分为三种基因型: A, B 和 C 型, 包括 A, B1-B5 和 C1-C5 共 11 种亚型^[9]。目前已经成功建立了 B3 和 C2 亚型 EV71 毒株感染 7 日龄以上小鼠的模型^[10-12]。譬如 C2 亚型的小鼠适应毒株可经灌胃途径感染 7 日龄小鼠, 导致后肢瘫痪, 并于 5~9 d 内死亡。随后, Ong 等建立了 B3 亚型毒株的小鼠模型, 病毒感染两周龄小鼠后会导致类似于人类中枢神经系统疾病的致死性并发症。应用这些模型, 学者们评价了一系列的疫苗和药物, 包括灭活病毒, 病毒颗粒类似物, VP1 亚单位疫苗和利巴韦林等, 动物实验表明这些预防和治疗措施均具有一定的效果^[8]。

C4 亚型 EV71 毒株是中国大陆地区的主要流行毒株, 该亚型毒株引发的数次疫情引起了社会的广泛关注^[13]。然而由于缺乏理想的动物模型, 针对该亚型毒株的疫苗和药物研究较少。Chang 等^[14] 对 2 日龄的 BLAB/c 小鼠感染 C4 亚型的 EV71 毒株, 发现可导致小鼠死亡, 但是, 由于所使用小鼠的年龄过小、免疫系统不成熟、不易操作等因素, 限制了该模型的应用。虽然 Liu 等^[15] 建立了 C4 亚型 EV71 毒株的恒河猴模型, 但是感染动物并没有表现出致死性症状, 而且动物费用的昂贵限制了该模型在大规模药物筛选中的应用。

在报道的动物模型中, 多使用了嗜神经性的 EV71 毒株^[10]。然而, 在绝大多数情况下, EV71 感染并不导致神经系统损伤^[16], 而针对非神经系统损伤

的 EV71 模型却鲜见报道。为了建立 EV71 的 7 日龄以上小鼠模型, 我们将从无神经症状病人体内分离的 C4 亚型 EV71 毒株在小鼠体内表达, 随后利用小鼠适应株建立了小鼠模型, 并对病毒在小鼠体内的复制和致病机制进行了研究。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

病毒的培养在人横纹肌瘤细胞 (RD) 中进行, RD 细胞用含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基培养。EV71 毒株于 2008 年分离自阜阳一位 2 岁的感染病人的拭子样本, 该病人表现为手足口病、呕吐和发热, 并于 5 d 后痊愈。拭子样本采集于发病 2 d 后, 并在 RD 细胞中进行病毒分离, 病毒经 3 轮纯化后, 测序鉴定为 EV71, 命名为 FY0805 [GenBank: HQ882182]。为制备 EV71 的小鼠适应株, 将 5×10^7 TCID₅₀ 的 EV71 经腹腔注射感染 1 组 10 日龄 ICR 小鼠 (北京华阜康科技股份有限公司 SCXK [京 2009-0007])。感染 3 d 后取小鼠的后腿骨骼肌置于 DMEM 中 (20% wt/vol), 随后进行组织匀浆, 取 200 μ L 匀浆上清直接感染第 2 轮的动物, 方法同上。第 10 轮的组织匀浆用空斑法纯化, 纯化的病毒命名为 MP10 [GenBank: HQ712020]。病毒储存液滴度为 1×10^9 TCID₅₀/mL。

1.2 病毒滴度及一步法生长曲线测定

病毒滴定在 RD 细胞中进行, 参照 Reed & Muench 的方法计算 TCID₅₀^[17]。RD 细胞接种到 96 孔板中 (10^4 个细胞/孔), 过夜培养后接种 100 μ L 以 10 倍梯度稀释的病毒悬液, 观察 5 d, 记录。

FY0805 和 MP10 的生长曲线参照文献进行^[11]。RD 细胞在 96 孔板中过夜培养, 随后分别接种两种病毒悬液 (病毒用含 2% FBS 的 DMEM 培养基稀释), 剂量为 10^3 TCID₅₀ ~ 10^4 病毒 RNA 拷贝。每 8 h 采集培养基上清 (持续 3 d), 用于分析病毒拷贝数。

1.3 动物感染

实验用小鼠均由北京协和医学院比较医学中心提供, 实验动物操作均经实验动物管理和使用委员会批准 (GC-09-2077)。每组小鼠 6 只, 经腹腔注射感染病毒, 剂量为 2×10^6 TCID₅₀/g 体重。对照组小

鼠注射 RD 细胞上清,与感染小鼠隔离饲养。感染动物的观察周期为 14d,包括临床症状、体重和死亡率,并在不同的时间点对小鼠安乐取材。临床症状的评分标准如下:0,无症状;1,竖毛;2,后肢行动迟缓;3,后肢单侧瘫痪;4,后肢全部瘫痪;5,死亡。

1.4 病毒拷贝数测定

感染小鼠组织内的病毒拷贝数用荧光定量 RT-PCR 测定(qRT-PCR)^[18]。取 100 μ L 细胞培养物或 30 mg 组织用 TRIzol 法提取总 RNA。提取的 RNA 用随机引物反转录成 cDNA,随后 cDNA 作为模板进行荧光定量 PCR,引物序列为:EV71-S1 (5'-AGATAGGGTGGCAGATGTAATTGAAAG -3') 和 EV71-A1 (5'-TAGCATTTGATGATGCTCCAATTCAG -3'),扩增区域对应于 FY0805 基因组中的 2462-2635。反应体系为 20 μ L (QIAGEN QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit),反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。应用 Roche LightCycler3.5 来分析 DNA 双螺旋中插入的 SYBR 荧光染料量。FY0805 基因组中的 2462-2635 区域的 PCR 片段用做 qRT-PCR 的标准品,标准品 10 倍稀释成 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μ L,并用来制作分析病毒 RNA 拷贝数的标准曲线。测定结果用 GAPDH 校正。

1.5 病理分析

每组实验取 6 只小鼠用于病理分析。动物麻醉后取材,组织立即用 10% 的福尔马林溶液固定 48 h。取组织的不同部位进行石蜡包埋,切片,并进行 hematoxylin-eosin 染色(HE)。每只动物的不同组织各取 10 个切片进行双盲评价。骨骼肌的病理参照以下三个指标进行分级:炎症、肌纤维变性和坏死性肌炎。

1.6 免疫组化

感染小鼠组织内的病毒抗原用免疫组化的方法检测。福尔马林固定的组织切片按照文献进行操作。鼠抗 EV71 VP1 蛋白的单抗用作免疫组化的一抗(Millipore,1:200 稀释),切片随后用 PBS 洗涤 3 次,用 HRP 标记的羊抗鼠二抗(1:5000 稀释)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。切片最终用 DAB 显色后在显微镜下观察。

1.7 序列分析

病毒提取 RNA 后,反转录为 cDNA,随后分别用 oligo(dT) 引物或 EV71 特异引物扩增基因组片段^[19],分别对不同的兼并片段测序后得到 FY0805 和 MP10 毒株的全序列。用 DNAMAN 6.0 软件进行多

序列比对。

1.8 数据处理

所有的数据均为实验结果的平均值 $\pm$ SD。不同均值间的显著性差异用 Duncan's 多重范围检验中的单因素分析功能分析(ANOVA),生存率用 Kaplan-Meier 测验分析。 $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果

2.1 EV71 肌肉适应株 MP10 对 RD 细胞的感染力提高

将 EV71 临床分离株 FY0805 对不同来源人细胞系的感染力进行了分析(人横纹肌瘤细胞 RD 和人神经母细胞瘤 SHSY5Y),CPE 观察和 qRT-PCR 分析结果均显示:RD 细胞对 FY0805 的感染敏感,SHSY5Y 细胞对 FY0805 不敏感(数据未显示),这表明 FY0805 为肌肉嗜性的 EV71 毒株。将 FY0805 在小鼠的骨骼肌中进行适应,得到的适应株命名为 MP10(毒株于第 10 轮适应后筛选得到)。首先,比较了 MP10 和 FY0805 对 RD 细胞的感染力,当相同滴度的两种病毒分别感染 RD 时(10^4 TCID₅₀/mL),MP10 的复制能力明显高于 FY0805(图 1A,感染 24 h 后,MP10 的 RNA 拷贝数是 FY0805 的约 100 倍),并且 MP10 感染时细胞病变发生较早(图 1B,MP10 感染组的 CPE 在感染后 24 h 发生)。该结果表明 MP10 在人肌肉细胞系中的复制能力高于临床分离株 FY0805。

2.2 MP10 感染导致 10 日龄小鼠的致死性症状

为了建立小鼠模型,我们对 10 日龄的 ICR 小鼠经腹腔注射感染 MP10。感染 MP10 可导致小鼠后肢瘫痪和死亡,症状包括体重下降、弓背竖毛和瘫痪(彩插 5 图 2A,B 和 D),同时,自感染后第 4 天起,小鼠无法睁开眼睛,垂死状态的小鼠胸部剧烈起伏,并于 5~10 d 内死亡(彩插 5 图 2C)。

qRT-PCR 检测表明 MP10 主要在 10 日龄小鼠的骨骼肌中复制,并在第 3~5 天达到最高峰(108.6 病毒 RNA 拷贝/mg),感染后第 9 天依然有较高的病毒 RNA 存在(彩插 5 图 3A)。此外,感染后 1~5 d 内,可从外周血中检测到一定水平的病毒 RNA 拷贝。而其它组织,包括神经组织中病毒 RNA 拷贝数较低($< 10^4$ /mg)。

2.3 肌肉病变是 MP10 感染小鼠死亡的主要原因

为了确定小鼠感染 MP10 后的死亡原因,我们分别收集感染后不同时间段(感染后第 1、3、5、7、9 天)

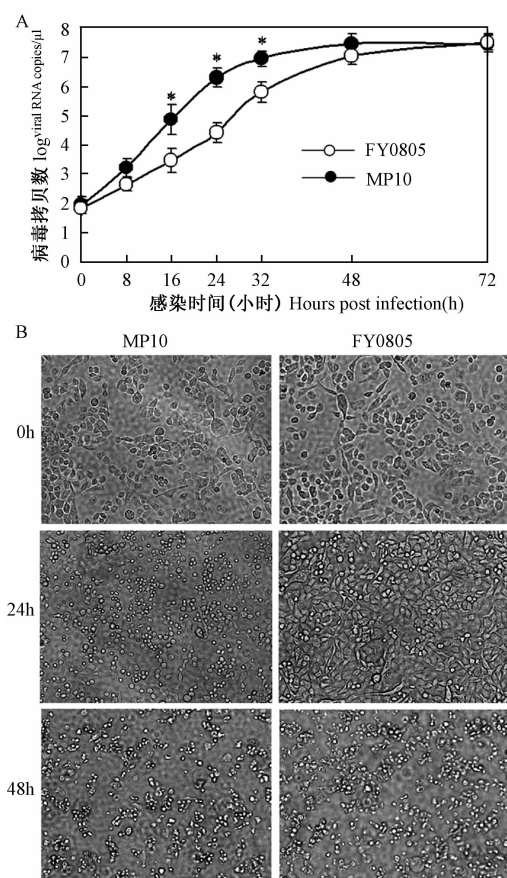


图1 MP10 对 RD 细胞的毒力比 FY0805 增高

Fig. 1 MP10 showed enhanced virulence in RD cells than the parental strain FY0805

MP10 和 FY0805 分别感染 RD 细胞,对培养上清中的病毒 RNA 拷贝 (A) 和 CPE (B) 进行 72 小时的监测。* $P < 0.05$

MP10 or FY0805 were inoculated into RD cells, and the viral RNA copies in the supernatant (A) and CPE (B) were monitored for 72 hrs. * $P < 0.05$

的小鼠(1 日龄和 10 日龄 ICR 小鼠, $n = 6$)的主要脏器,包括大脑、小脑、脑干、脊髓、肺、心脏、肝脏、脾、小肠和肾脏进行病理和免疫组化分析。结果在这些组织中均未发现明显的病变和病毒抗原分布(结果未显示)。这表明不同于报道的嗜神经毒株感染导致的动物病变结果^[10, 20], MP10 感染不导致小鼠神经组织的典型病变。

在尸检中发现,与 FY0805 感染组和对照组相比,MP10 感染的小鼠骨骼肌在第 4 天后呈白色。随后对骨骼肌进行了病理和免疫组化分析,结果发现,感染第 3~9 天之间均可在骨骼肌内发现大量的病毒分布(彩插 5 图 3B)。并且,在此期间内,小鼠的骨骼肌呈现明显的病变,包括炎细胞浸润、肌纤维变性和严重的坏死性肌炎(彩插 5 图 3B)。

由于小鼠感染后第 5 天开始表现出呼吸急促加重等濒死症状,我们检测了小鼠体内与呼吸运动相关的肌肉是否受到病毒复制的影响,结果发现小鼠的膈肌、肋间肌和胸锁乳突肌从第 3 天开始发生严重的病变(50%~70% 的肌肉坏死),并且肌肉内分布大量的病毒抗原(彩插 6 图 4A)。同时,尸检时发现,濒死状态时小鼠的肺颜色红于对照小鼠(彩插 6 图 4B)。因此推测小鼠感染病毒后,与呼吸运动相关肌肉的功能丧失导致了呼吸困难,从而引发肺充血,这可能是 MP10 感染小鼠的死因之一。

2.4 临床分离株与小鼠适应株的序列比较

对 MP10 的全序列进行了测定,并用 DNAMAN 软件对其编码的氨基酸序列进行了分析,适应过程中突变的核苷酸位点和相应的氨基酸突变位点列于表 1 中。MP10 发生了 5 个核苷酸突变,其中 2 个核苷酸导致 2 个氨基酸变异,推测这些位点的突变与 MP10 对小鼠毒力的增高相关。

表 1 MP10 核苷酸与氨基酸的突变位点

Tab. 1 Nucleotide changes and amino acid substitutions in mouse-adapted EV71 strain MP10

Nucleotide 核苷酸			Amino acid 氨基酸			码区中位置
位置	FY0805	MP10	位置	FY0805	MP10	Position in CDS
1425	A	G	228	E	G	VP2
3169	G	C			NC	VP1
4114	C	T			NC	2C
4417	T	C			NC	2C
5675	G	A	1645	A	T	3C

注: NC: 未发生改变

Note: NC: no change

3 讨论

在本研究中,我们通过将 EV71 临床分离株在小鼠骨骼肌中进行适应,得到了一株 EV71 的小鼠适应株,MP10。与临床分离株相比,MP10 对肌肉细胞和小鼠的毒力均明显增高,且 MP10 感染能导致 10 日龄小鼠死亡。与 2 日龄的小鼠模型相比,10 日龄小鼠模型更适合于药物、疫苗和免疫学研究。

EV71 被认为是世界范围内继脊髓灰质炎病毒后最重要的嗜神经毒株,病毒侵染神经系统被认为是 EV71 感染导致的严重并发症的原因^[21]。然而,绝大多数的 EV71 感染均为自限性,它们并不引发神经症状^[22]。EV71 的临床分离株 FY0805 属于 C4 亚型,它可以感染 RD 细胞,但是不感染人神经细胞 SHSY5Y(图 1)。并且,另外分离自自限性病人的 3 株 C4 亚型 EV71 株同样感染肌肉细胞而不感染神经

细胞(数据未显示),这表明嗜肌肉型的 EV71 株在 C4 亚型中普遍存在。

EV71 感染病人的严重并发症包括无菌性脑炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样迟缓性麻痹,而神经源性的肺水肿和肺出血是死亡的主要原因^[3, 23]。然而,报道的 EV71 动物模型可以模拟后肢瘫痪症状,但却很少见肺水肿和肺出血^[10, 24]。通过将 FY0805 在小鼠肌肉中进行适应,我们建立了可以发生致死性感染的小鼠模型。该模型中的严重症状包括体重下降、弓背竖毛和瘫痪(图 2),这些症状与报道的利用 C2 或 B3 亚型 EV71 建立的小鼠模型症状相同^[10-12, 20]。EV71 感染病人或动物的致死性并发症主要由嗜神经性病毒导致的神经系统损伤引起^[4, 24]。在动物模型中发现, EV71 感染猴和小鼠均会导致显著的神经元变性凋亡和神经系统的炎细胞浸润,而这推测是瘫痪和死亡的主要原因^[20, 25]。然而, Chua 等^[11]指出 EV71 感染小鼠的瘫痪是由坏死性肌炎导致,并非是神经组织病变。本研究中发现, MP10 主要在骨骼肌中复制,并引发骨骼肌的严重病变(图 3),而未在神经组织发现病变。因此,我们推测 EV71 感染小鼠后的坏死性肌炎导致了肌肉瘫痪,而与呼吸功能相关的肌肉瘫痪会导致呼吸功能衰竭,进而死亡,但不排除其它致死原因。

在以前的研究中发现, EV71 的 5' UTR 核苷酸序列变异、VP2, VP1 和 2C 区的氨基酸序列变异与病毒对小鼠的毒力增高相关^[11, 14, 20], Chua 等^[11]证明 VP1 蛋白中的 G145→E 单一突变足以使 B3 亚型 EV71 毒株对小鼠的毒力增高。这些结果表明: EV71 在小鼠体内适应过程中毒力的增强可能与不同蛋白的氨基酸突变和非翻译区的核苷酸突变相关,病毒在小鼠体内的毒力增高和适应是一个复杂的过程,涉及到许多因素,诸如病毒进入、复制、组装和诱导宿主细胞的凋亡等。通过序列分析,我们发现小鼠适应株包含数个核苷酸和氨基酸突变,推测该突变与病毒对小鼠独立的增高相关性较大。

参考文献:

- [1] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. J Infect Dis, 1974, 129(3):304-309.
- [2] Brown BA, Pallansch, M. A. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus [J]. Virus Res, 199, 39(2-3):195-205.
- [3] Fu YC, Chi CS, Jan SL, et al. Pulmonary edema of enterovirus 71 encephalomyelitis is associated with left ventricular failure: implications for treatment [J]. Pediatr Pulmonol, 2003, 35(4):263-268.
- [4] McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, et al. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia [J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(2):236-242.
- [5] AbuBakar S, Sam IC, Yusof J, et al. Enterovirus 71 outbreak, Brunei [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(1):79-82.
- [6] Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(4):461-468.
- [7] Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997 ~ 2000 [J]. Arch Virol, 2003, 148(7):1369-1385.
- [8] Lee MS, Chang LY. Development of enterovirus 71 vaccines [J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(2):149-156.
- [9] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998 [J]. J Virol, 1999, 73(12):9969-9975.
- [10] Chen YC, Yu CK, Wang YF, et al. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement [J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 1):69-77.
- [11] Chua BH, Phuektes P, Sanders SA, et al. The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71 [J]. J Gen Virol 2008, 89(Pt 7):1622-1632.
- [12] Ong KC, 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.
- [13] Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8):3835-3839.
- [14] Chang GH, Lin L, Luo YJ, et al. Sequence analysis of six enterovirus 71 strains with different virulences in humans [J]. Virus Res, 2010, 151(1):66-73.
- [15] Liu L ZH, Zhang Y, Wang J, et al. Neonatal rhesus monkey is a potential animal model for studying pathogenesis of EV71 infection [J]. Virology, 2011, 412:91-100.
- [16] Ang LW, Koh BK, Chan KP, et al. Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001 ~ 2007 [J]. Ann Acad Med Singapore, 2009, 38(2):106-112.
- [17] Reed LJM, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. Am J Hyg, 1938, 27:493-497.
- [18] Liu JN, Wang W, Duo JY, et al. Combined peptides of human enterovirus 71 protect against virus infection in mice [J]. Vaccine, 2010, 28(46):7444-7451.
- [19] Jia CS, Liu JN, Li WB, et al. The cross-reactivity of the enterovirus 71 to human brain tissue and identification of the cross-reactivity related fragments [J]. Virol J, 2010, 7:47.
- [20] Wang YF, Chou CT, Lei HY, et al. A mouse-adapted enterovirus

- 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection [J]. J Virol, 2004, 78(15):7916-7924.
- [21] Weng KF, Chen LL, Huang PN, et al. Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection [J]. Microbes Infect, 2010, 12(7):505-510.
- [22] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China [J]. J Clin Virol, 2009, 44(4):262-267.
- [23] Lo WT, Wang CC, Chu ML. Pulmonary oedema, encephalitis and retroauricular vesicular rash in a 9-month-old infant. Enterovirus 71 infection complicated by pulmonary oedema and encephalitis [J]. Eur J Pediatr, 2002, 161(4):239-241.
- [24] Nagata N, Shimizu H, Ami Y, et al. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71 [J]. J Med Virol, 2002, 67(2):207-216.
- [25] Hashimoto I, Hagiwara A, Kodama H. Neurovirulence in cynomolgus monkeys of enterovirus 71 isolated from a patient with hand, foot and mouth disease [J]. Arch Virol, 1978, 56(3):257-261.
- [修回日期]2012-02-15