



人 SCARB2 蛋白提高人肠道病毒 71 型对转基因小鼠的感染力

修晶辉¹, 刘江宁¹, 杨亚军¹, 夏咸柱^{2*}, 张连峰^{1*}

(1. 医学实验动物研究所, 中国医学科学院, 北京协和医学院比较医学中心, 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; 2. 军事医学科学院, 军事兽医研究所, 吉林省人畜共患病防治重点实验室, 吉林省长春市 130122)

【摘要】 目的 细胞实验证实人清道夫受体 B2(hSCARB2) 是人类 EV71 的受体, 本研究拟通过建立人 SCARB2 转基因小鼠, 建立感染能力更高的小鼠模型。方法 构建 CMV 启动子的 SCARB2 转基因表达载体, 通过显微注射法建立 C57BL/6J 背景的人 SCARB2 转基因小鼠, PCR 筛选阳性首建鼠。通过 Western Blot 和免疫组化检测目的蛋白在各组织中的表达。EV71 感染转基因小鼠后, 通过实时荧光定量 PCR 和免疫组化检测目的蛋白表达对病毒感染的促进效果。结果 人 SCARB2 蛋白主要在转基因小鼠的骨骼肌和脑组织中表达, 与野生型小鼠相比, 转基因小鼠组织中的病毒载量显著提高 4 到 5 倍。结论 人 SCARB2 的体内表达可促进 EV71 对转基因小鼠的感染, 该蛋白在体内具有 EV71 受体功能。

【关键词】 人肠道病毒 71 型; 人 SCARB2 蛋白; 转基因小鼠; 病毒受体

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 07-0016-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.004

Human SCARB2 enhanced the infection of human enterovirus 71 on transgenic mice

XIU Jing-hui¹, LIU Jiang-ning¹, YANG Ya-jun¹, XIA Xian-zhu^{2*}, ZHANG Lian-feng^{1*}

(1. 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; Beijing Union Medicine College, Beijing 100021, China;
2. Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Building 666, Changchun City, Jilin Province 130122, China)

【Abstract】 Objective Human SCARB2 was identified as the functional receptors of EV71 *in vitro*, so establish more higher infection ability transgenic mice by establishment of human SCARB2 transgenic mice in present study. **Methods** The transgenic vector was constructed by inserting the human SCARB2 gene under the CMV promoter and then were subjected to establish transgenic mice by microinjection. The genotype of transgenic line was identified by PCR and the expression level of target protein was detected by Western blot. Viral load in the tissues of transgenic mice was detected by immunohistochemical staining and quantitative real-time PCR. **Results** One line of transgenic mice in C57BL/6J

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(2012BA139B02) 和国家“重大新药创新”科技重大专项课题(课题编号 2011ZX09307-302)。

[作者简介] 修晶辉(1984年-), 女, 博士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: xiujinghui1984@163.com。

[通讯作者] 张连峰, E-mail: zhanglf@cnilas.org; 夏咸柱, Email: xia_xzhu@yahoo.com.cn。

background with high levels of SCARB2 expression in skeletal muscle and brain was identified. Upon infection with EV71, the virus burden of 4 to 5 times in muscle and brain of transgenic mice were significantly higher than that of wild type mice.

Conclusion hSCARB2 is a functional receptor of EV71 *in vivo*, as expression of it could promote the infection of EV71 on transgenic mice.

【Key words】 Human enterovirus 71; HSCARB2; Transgene mice; Viral receptors

人肠道病毒 71 型 (EV71) 是微核糖核酸病毒科肠病毒属肠病毒种 A 型 RNA 病毒^[1], 1969 年首次在加利福尼亚神经异常的病人体内分离并鉴定^[2]。EV71 被认为是婴幼儿手足口病 (HFMD) 的主要病原体之一^[3,4]。该病毒感染偶尔伴随严重的并发症, 包括脑干脑炎、无菌性脑膜炎、肺水肿或肺出血、急性弛缓性麻痹和心力衰竭^[5]。最近几十年, EV71 感染引起的手足口病疫情在世界范围内大爆发, 目前主要集中于亚太地区^[5-10]。中国大陆的 EV71 病毒感染始见于 1987 年冬季湖北省 HFMD 的流行, 自 1999 年以来, 我国广东、福建、上海、重庆等地区也报告了局部流行的 EV71 感染, 与 1998 年台湾地区报道 120 000 例爆发手足口病, 其中有 78 例死亡^[5]不同, 大陆 EV71 引起的 HFMD 和神经系统症状较轻。以往研究认为人脊髓和脑干是 EV71 感染的靶标^[8,11], 但其感染机制和致病机制尚不明确。

2009 年日本学者首次利用细胞实验鉴定了 EV71 的两种人受体蛋白^[12,13], 分别为 P 选择素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)^[13] 和人清道夫受体 B2 (SCARB2)。通过建立表达 PSGL-1 的转基因小鼠, 我们证实人 PSGL-1 有一定的促进 EV71 感染转基因小鼠的功能。为进一步在体内证实人 SCARB2 的受体功能, 以期改良现有的 EV71 感染小鼠模型, 我们通过建立表达人 SCARB2 基因的转基因小鼠, 在体内验证了该蛋白的受体功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器

硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, 简称 NC 膜) (Millipore, 美国), 小鼠抗 SCARB2 多克隆抗体 (Abnova, 德国), HRP-偶联的羊抗小鼠二抗 (Santa Cruz, 美国), HRP-偶联的 GAPDH 单克隆抗体 (康成生物, 中国), 倒置显微镜 (Nikon TS100, 日本), 分子克隆用限制性内切酶、连接酶、聚合酶均购自日本 Takara 公司, 荧光定量 PCR 仪 (Life

Technologies, 美国)。

1.1.2 实验动物

无特定病原体 (specific-pathogen free SPF) ICR 小鼠 6 周龄, 雌性, 体重 18 ~ 20g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2007-0001】, 在本实验室 SPF 动物房【SYXK(京)2009-0003】饲养。病毒感染实验在动物生物安全二级实验室内进行。所有实验操作程序均经过医学实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准 (批准号为 GC-09-2001)。

1.2 方法

1.2.1 SCARB2 表达载体的构建及转基因

pCMV6-XL5-h-SCARB2 质粒购自美国 Origene 公司 (Clone ID NM_002257)。EcoR I 和 Xho I 酶切回收 h-SCARB2 片段, 并克隆入 pCDNA3.1 (+) 质粒中巨细胞瘤病毒 (CMV) 启动子下游, 构建全身表达人 SCARB2 的载体。转基因载体经测序验证后, 用 Pvu I 将载体线性化, Sephadex G50 柱纯化。将 DNA 浓度调整至 5ng/μL, 用显微注射法将 DNA 注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 用 ICR 小鼠作假孕受体, 制备转基因小鼠 (TE2000U 显微注射仪)。

1.2.2 转基因小鼠鉴定

用碱裂解法提取转基因小鼠鼠尾基因组 DNA, 用 PCR 法对转基因小鼠进行基因型检测。所用引物为, h-SCARB2F: 5' TCAGCGACAATTACCAGC TC, h-SCARB2R: 5' GGAGCACACCATCACACATC (Invitrogen)。反应条件: 94℃ 预变性 3min; 94℃, 30s, 50℃, 30s, 72℃, 30s, 30 个循环。PCR 目的片段长度为 474bp。

1.2.3 逆转录 PCR (reverse-transcriptase PCR)

将 30mg 的转基因小鼠肌肉或脑组织加入 1mL TRIzol (Invitrogen) 中, 匀浆破碎, 提取总 RNA, 经 DNase 处理后, 使用 Fermentas 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA, 通过 PCR 扩增人 SCARB2 的 cDNA, 引物为 h-SCARB2F 和 h-SCARB2R。PCR 产物分别用电泳和测序验证。

1.2.4 感染实验及实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

21 日龄的转基因小鼠(TG) (n = 6) 和同窝阴性小鼠(NTG) (n = 6) 分别腹腔注射 2×10^6 TCID₅₀ 的 EV71MP10 型病毒体积为 200 μ L。所用毒株为中国大陆地区流行的 C4 亚型 EV71 毒株的小鼠适应株^[14], 毒株序列号为: HQ712020。

根据 1.2.3 所述提取组织总 RNA 并制备 cDNA 后, 用文献所述引物和方法进行实时荧光定量 PCR^[14], GAPDH 作为内参。

1.2.5 Western Blot 鉴定人 SCARB2 蛋白表达

Western blot 用于分析转基因小鼠组织内人 SCARB2 蛋白的表达情况。分别提取转基因小鼠 F1 代肌肉和脑组织的总蛋白, 以同窝阴性小鼠作对照, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白转移至 NC 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭后, 用小鼠抗人 SCARB2 抗体(1:10000) 和 HRP-偶联的羊抗小鼠二抗(1:10000) 处理后显色, 以 HRP-偶联的 GAPDH 单克隆抗体作为内参。

1.2.6 免疫组化

将转基因小鼠和同窝阴性小鼠的肌肉和脑组织用 4% 福尔马林固定后, 脱水、石蜡包埋及切片, 使用小鼠抗人 SCARB2 的抗体或小鼠抗 EV71 VP1 蛋白的单抗作为一抗(1:10000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, HRP 标记的羊抗小鼠抗体作为二抗(1:5000 稀释, sigma) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 用 3-3' 二氨基联苯胺(3-3' diaminobenzidine, DAB) 显色^[18] 后, 光学显微镜观察。

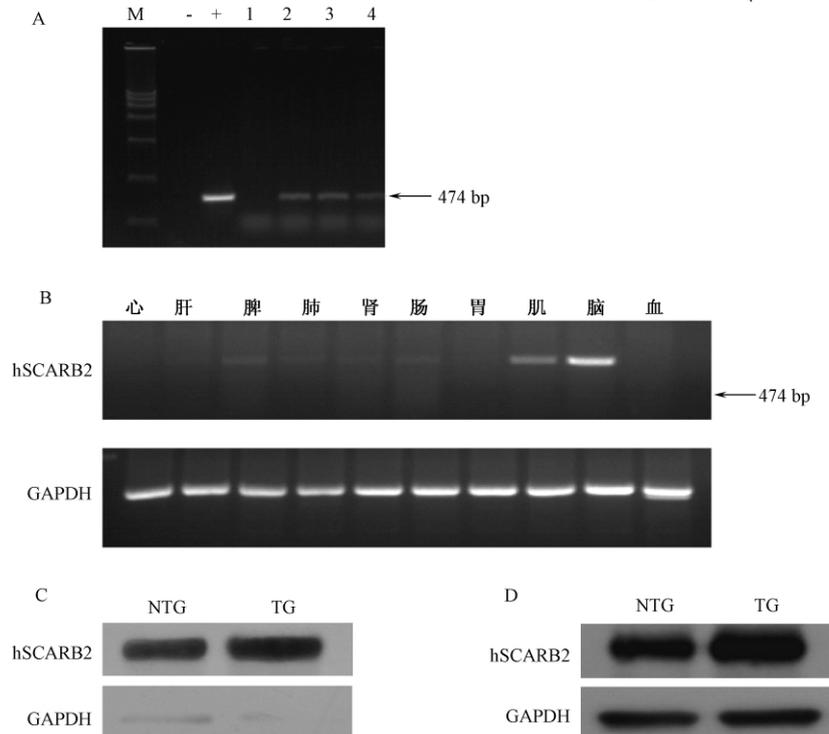
1.2.7 数据统计

所有实验数据以 Mean \pm S. E. M. 表示, 用 Student's t-tests 或 one-way ANOVA 分析处理数据, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 表达人 SCARB2 蛋白的转基因小鼠建立

经鼠尾 DNA PCR 对首建鼠的基因型进行鉴定, 得到阳性首建鼠 3 只(图 1A)。随后, 用逆转录



注: M: DNA 分子质量标准; 1-4: 首建鼠; NTG: 同窝阴性小鼠; TG: 转基因小鼠; A: PCR 鉴定阳性首建鼠; B: 逆转录 PCR 分析转基因小鼠组织内人 SCARB2 基因表达; C: Western Blot 分析人 SCARB2 蛋白在转基因小鼠脑组织中的表达, GAPDH 为内参; D: Western Blot 分析人 SCARB2 蛋白在转基因小鼠骨骼肌组织中的表达, GAPDH 为内参。

图 1 人 SCARB2 转基因小鼠的构建及鉴定

Note: M: DNA molecular weight standard; Lane 1-4: Transgenic mouse line; NTG: Negative littermates; TG: Transgenic mice; A: Transgenic mice lines identification by PCR using the tail genomic DNA as template; B: Reverse-transcriptase PCR analysis the human SCARB2 gene expression in tissues of Tg mice; C: Western blot detected the expression of human SCARB2 protein synthesis in brain of Tg mice; D: Western blot detected the expression of human SCARB2 protein synthesis in muscle of Tg mice. The data were normalized to GAPDH expression.

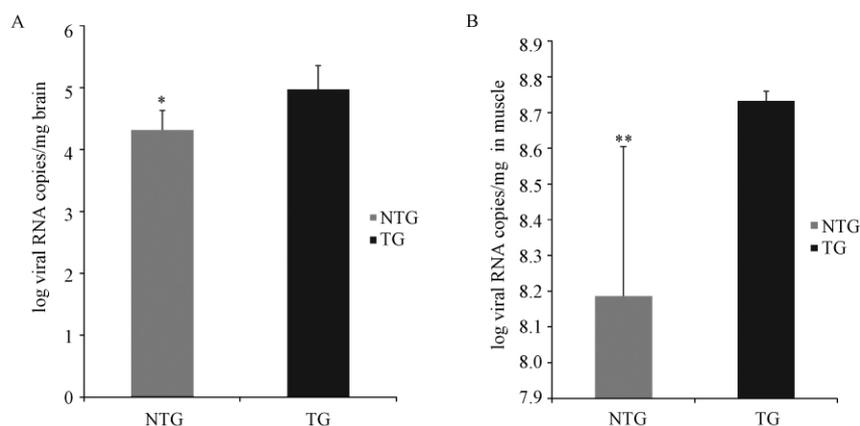
Fig. 1 Establishment and identification of the transgenic mice expressing human SCARB2

PCR 分析了首建鼠 F1 代组织中目的基因的表达情况,发现人 SCARB2 主要在转基因小鼠的骨骼肌和脑组织中表达(图 1B)。随后,分别用 Western Blot 和免疫组化分析了人 SCARB2 蛋白在脑和骨骼肌组织中的表达情况。由于人 SCARB2 与小鼠 SCARB2 同源性较高,存在抗体交叉结合现象。Western Blot 发现转基因小鼠脑和骨骼肌组织中 SCARB2 蛋白表达量高于同窝阴性(图 1C ~ D)。免疫组化发现 SCARB2 蛋白主要分布于转基因小鼠的骨骼肌和脑组织中(图 2A ~ B,彩插 3),该结果表明成功建立了脑和肌肉组织表达人 SCARB2 蛋白的转基因小鼠。

2.2 SCARB2 促进 EV71 感染转基因幼鼠

为研究表达人 SCARB2 对 EV71 感染转基因小鼠的促进作用。我们分别用 MP10 毒株感染不同年龄段的小鼠,发现两周龄以下的转基因小鼠和野生型小鼠在感染病毒后,会于 10 天内死亡,肌肉组织

内病毒载量超过 10^8 copy/mg,转基因小鼠与野生型小鼠在病毒复制方面差别不大。因此,我们用 MP10 毒株分别感染了 21 日龄的转基因小鼠和野生型小鼠,主要研究了表达人 SCARB2 受体组织内的病毒复制情况。发现在感染后 3 天(病毒复制的最高峰)转基因小鼠骨骼肌和脑中 EV71 的拷贝数显著高于同窝阴性小鼠(图 3A ~ B),随后,用免疫组化研究了组织内的病毒分布情况。EV71 抗原主要分布于转基因小鼠的脑组织中,而野生型小鼠脑组织中未检测到病毒抗原(图 4A,彩插 3)。转基因小鼠骨骼肌组织内均分布着大量的 EV71 抗原,与和野生型小鼠比两者间差异明显(图 4B,彩插 3)。表明表达人 SCARB2 可促进 EV71 对转基因小鼠组织的感染,证实该蛋白在体内可发挥 EV71 受体的功能。



注: A: EV71 感染小鼠 3 天后脑中病毒载量。B: EV71 感染小鼠 3 天后肌肉中病毒载量。* $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.001$ 。

图 3 EV71 感染转基因小鼠

Note: A: viral load of brain of E71 infected mice at 3 days post infection. B: viral load of muscle of E71 infected mice at 3 days post infection. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$.

Fig.3 EV71 infect transgenic mice

3 讨论

目前报道的人 EV71 受体有两种,分别是 PSGL-1^[13,16]和 SCARB2^[15],细胞实验表明:EV71 通过分别与这两个受体结合而侵入组织细胞的。PSGL-1 的受体效果曾经在体内得到初步证实^[19]。SCARB2 在许多组织中表达,有 N 末端和 C 末端两个跨膜区参与膜运输。前期研究证实:A, B 和 C3 种亚型的 EV71 均可使用 SCARB2 作为受体,在 EV71 不易感的细胞系中表达人 SCARB2 受体时可以促进 EV71 感染并引发细胞病变^[15,17]。

小鼠模型是进行 EV71 感染与致病机制、药物和疫苗研究的基本工具,而目前报道的小鼠模型主要使用两周龄以下的小鼠,限制了其在基础研究中的应用。通过表达人的 EV71 病毒受体,进而提高转基因小鼠对病毒的敏感性,有望建立接近成年小鼠的动物模型。本研究通过将 CMV 启动子驱动的人 SCARB2 基因插入小鼠基因组中,成功构建了转基因小鼠。人 SCARB2 基因在小鼠的肌肉和脑组织中均高表达。随后,通过实时荧光定量 PCR 和免疫组化证实目的蛋白表达可促进病毒对小鼠的感染和复制能力,经体内试验证实了目的蛋白的受体功

能。同时, EV71 的转基因小鼠模型可作为研究 SCARB2 蛋白在上述两个组织生理和/或病理过程中的生物学功能的模型工具。

(本文图 2, 图 4 见彩插 3)

参考文献:

- [1] Racaniello, V. R. Picornaviridae: the viruses and their replication, ch24. In D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. Fields virology, 2007. 1: 795 – 838.
- [2] 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: 304 – 309.
- [3] Ho M: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks [J]. Microbiol Immunol Infect 2000, 33: 205 – 216.
- [4] Blomberg, J. Lycke E, Ahlfors K, et al. New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and/or hand, foot, and mouth disease[J]. Lancet ii: 1974, 112 (Letter) .
- [5] Hagiwara, A., I. Tagaya, and T. Yoneyama. Epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection. Intervirology 1978, 9: 60 – 63.
- [6] Lin KH, Hwang KP, Ke GM, et al. Evolution of EV71 genogroup in Taiwan from 1998 to 2005: an emerging of subgenogroup C4 of EV71 [J]. Med Virol 2006, 78: 254 – 262.
- [7] Li CC, Yang MY, Chen RF, et al. Clinical manifestations and laboratory assessment in an enterovirus 71 outbreak in southern Taiwan[J]. Scand J Infect Dis 2002, 34: 104 – 109.
- [8] Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, et al. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000 [J]. Clin Microbiol 2002, 40: 10 – 15.
- [9] Yan JJ, Wang JR, Liu CC, et al. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998: a comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis [J]. Clin Virol 2000, 17: 13 – 22.
- [10] Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group [J]. N Engl J Med 1999, 341: 929 – 935.
- [11] Chen LC, Shyu HW, Chen SH, et al. Enterovirus 71 infection induces Fas ligand expression and apoptosis of Jurkat cells [J]. Med Virol 2006, 78: 780 – 786.
- [12] Lum LC, Wong KT, Lam SK, et al. Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis [J]. Pediatr 1998, 133: 795 – 798.
- [13] Nishimura Y, Shimajima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71 [J]. Nat Med 2009, 15: 794 – 797.
- [14] 马春梅, 刘江宁. C4 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 [J]. 中国比较医学杂志. 2012(05) .
- [15] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71 [J]. Nat Med 2009, 15: 798 – 801.
- [16] Miyamura, K., Nishimura, Y., Abo, M., et al. Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells express-in human P-selectin glycoprotein ligand-1 [J]. Gen. Virol. 2011 92, 287 – 291.
- [17] Yamayoshi S, Koike S. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection [J]. Virol 2011 85: 4937 – 4946.
- [18] 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 2010, 7: 47.
- [19] Jiangning Liu, Wei Dong, Xiongzi Quanet, et al. Transgenic expression of human P-selectin glycoprotein ligand-1 is not sufficient for enterovirus 71 infection in mice [J]. Arch Virol. 2012, 157(3) : 539-43. doi: 10.1007/s00705-011-1198-2.

(修回日期) 2013-05-24