



EV71 病毒感染动物模型研究进展

周舒雅, 范昌发, 王佑春

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 人肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71) 是引起手足口病的主要病毒之一,并可导致严重的神经系统疾病,近年随着发病率的升高,严重威胁了婴幼儿的生命健康。可感染 EV71 的动物模型是研究其致病机理、疫苗评价和药物研发等的重要工具,然而目前尚未建立有效的 EV71 感染标准化动物模型。本文将对不同物种的 EV71 病毒感染模型进行总结,并着重就利用基因修饰手段建立的 EV71 病毒感染模型进行讨论和展望。

【关键词】 EV71; 手足口病; 模型; 动物; 病毒驯化; 基因修饰

【中图分类号】 R 373. 2; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 10-0067-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2013. 010. 015

Advances in establishment of enterovirus 71 infection animal models

ZHOU Shu-ya, FAN Chang-fa, WANG You-chun

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Hand foot and mouth disease (HFMD) is caused by enterovirus family, in which enterovirus 71 (EV71) is the most common pathogen. Serious cases lead to neurological symptoms and even death, especially in infants. A good EV71 infection animal model will not only help to study the mechanism of pathogenesis, and will also become an effective tool for developing vaccines and treatments. Here we review the advances in establishment of animal models of EV71 infection in different species, and further focus on status and prospects of EV71 infection models established by genetical modification.

【Key words】 Enterovirus 71; EV71; Hand, foot and mouth disease (HFMD); Animal model; Virus adaption; Genetical modification

人肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71) 是手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)的主要病原之一,主要感染 5 岁以下儿童^[1],可引起神经系统感染导致无菌性脑膜炎、脑干脑炎,以及心肌炎、肺水肿等。自 1969 年首次在美国加利福尼亚发现 EV71 感染可导致神经症状后, EV71 已在世界范围内引起多次零星的爆发流行,包括澳大利亚、瑞典、美国、匈牙利、保加利亚、日本、马来西亚、新加坡、中国内陆和中国台湾等国家和地区^[2-4]。在

我国,自从 2008 年手足口病爆发以来,近年手足口病发病率呈上升趋势,其中重症和死亡病例多是由 EV71 感染引起, EV71 感染已成为严重的社会和公共卫生问题。为了给 EV71 的研究提供重要的支撑,研究人员已经尝试在啮齿类和非人灵长类等不同物种中建立 EV71 的感染模型。然而缺乏理想的 EV71 感染模型,尤其是神经毒力模型,是制约 EV71 致病机理研究和疫苗研发的重要障碍。因此,本文对目前已有的 EV71 感染动物模型进行综述,并对

【作者简介】 周舒雅(1984 -), 助理研究员, 主要研究方向: 基因工程动物。E-mail: zhousy@nifdc.org.cn。

【通讯作者】 范昌发(1970 -), 研究员, 主要研究方向: 模式动物。E-mail: fanchangfa@sohu.com。

未来可能实现标准化的 EV71 感染模型做出展望。

1 EV71 病毒流行病学

肠道病毒 EV71 引起的手足口病在环太平洋的亚洲地区呈周期性的频繁发生,例如中国、日本、新加坡均常有报道。手足口病与 20 多种病毒相关,其中 EV71 和 Cox(柯萨奇病毒) A16 是引起手足口病最常见的两种病毒,而相对于 Cox A16, EV71 引起的手足口病症状较重,且一般会引起严重的神经疾病症状,如脑炎等。

EV71 病毒呈全球性分布,在多个国家均有发生。神经感染专家 Tom Solomon 博士曾指出,“由 EV71 引起的死亡比禽流感更多,而 EV71 还没有像禽流感一样引起足够的重视。随着交流的增加, EV71 将会对整个世界造成威胁,然而,我们的卫生体系还没有为未来这一全球性的爆发做好应有的准备”^[1]。因此,在世界范围内 EV71 感染的预防都需要引起足够的重视。

自 1999 年以来,我国多个省市地区均报告局部流行的 EV71 感染,我国成为手足口病最频发的国家之一。2012 年,我国共发生手足口病 2168 737 例,死亡数 567 例,相较于 2011 年发病率上升 33.26%,死亡率上升 10.79%。其发病率位于丙类传染病之首,其中重症病例以 EV71 感染为主。虽然人群对 EV71 普遍易感,但以婴幼儿和低龄儿童感染为主,发病人群主要集中在 5 岁以下学龄前儿童^[2]。因此, EV71 感染为儿童的生命健康带来极大威胁。我国面临民生的紧迫需求,开发 EV71 病毒相关的疫苗和治疗手段的任务十分紧迫,而手足口病动物模型的建立将为疫苗和新药的开发提供必要的研究工具和检测手段。

2 通过 EV71 病毒驯化建立感染模型

2.1 小鼠模型

人类是 EV71 的唯一自然宿主。然而病毒经过在小鼠体内或细胞中的传代,引起衣壳蛋白中氨基酸的突变进化,从而可以增强其小鼠适应性和神经毒性^[3]。然而,驯化毒株仅对新生鼠致病性强,1 日龄小鼠感染后 11 d 致死率为 100%,随着日龄的增长死亡率大幅降低^[4],通过病毒驯化感染正常小鼠建立的最大周龄 EV71 模型是 2 周^[5]。目前,应用较为广泛的是利用 1~7 日龄的小鼠建立的 EV71 感染模型,通过静脉、髓内、腹腔等感染途径接种,

可出现病毒血症,并且可以致死,然而在中枢神经系统病毒滴度极低,不能模拟人类感染的临床表现^[6]。经过颅内接种,并分离神经毒性较高的病毒来传代的方式建立的 7 日龄小鼠模型,可以一定程度地模拟人类的中枢神经感染,在皮质区、丘脑、下丘脑等区域中检测到 EV71^[8, 11],然而我国的 C4 亚型并不能够获得相应的模拟神经感染的模型,因此需要进一步提高动物模型的敏感性。同时,这种方法由于使用 1~7 日龄乳鼠,给疫苗和药物试验掺入了诸多不确定因素,降低了稳定性。

2.2 非人灵长类模型

食蟹猴和恒河猴等非人灵长类在通过口服、皮下接种或脊髓、脑内接种等方式均可感染 EV71。通过髓内或者静脉接种 EV71,食蟹猴除了表现出病毒血症^[12, 13],还可出现震颤、共济失调和脑水肿等症状^[14]。也有研究尝试通过口服方式建立 EV71 感染的食蟹猴模型,血液中病毒滴度也见升高,并且经组化分析,脊髓、脑干、小脑皮层、齿状核和大脑中均有病毒抗原表达,证明了 EV71 对中枢神经系统的侵染^[15]。我国科研人员利用在本国常见的 EV71 亚型感染恒河猴建立感染模型也取得了一定进展,通过呼吸道感染和静脉或脑内感染等多种途径接种恒河猴,可出现病毒血症和中枢神经系统的病变^[16]。而且利用幼年恒河猴感染 EV71 病毒,也可出现与婴幼儿相似的手足口疱疹症状^[17]。

由此可见,非人灵长类是较好的 EV71 感染动物模型,但它仍缺乏心力衰竭和肺水肿的表现,而这些在 EV71 感染人类中正是重要的致死原因。而且由于非人灵长类模型的成本较高,其在 EV71 致病机理研究和疫苗评估中的应用受到限制。

3 通过基因修饰建立 EV71 病毒感染模型

3.1 免疫缺陷小鼠

非肥胖型糖尿病/重度联合免疫缺陷转基因小鼠(NOD/SCID)模型可以作为 EV71 病毒感染模型,由于其 NK 细胞活性较低,相较于正常小鼠可以更长时间感染 EV71 病毒^[18]。而 IFN 受体缺陷的幼龄 AG129 小鼠可以感染自然的 EV71 病毒^[19]。IFN 受体缺陷的 A129 小鼠(α/β -IFN 受体基因缺陷)和 AG129 小鼠($\alpha/\beta/\gamma$ -IFN 受体基因缺陷)传代驯化的 EV71 病毒毒株,可以感染 10 周龄的成年 AG129 和 A129 小鼠,并且多一种 IFN 受体缺陷的 AG129 小鼠对 EV71 驯化病毒的敏感性更高。这一研究将

EV71 可感染的小鼠模型延长至 10 周。然而,尽管能够利用这种模型研究疫苗接种后的体液免疫反应等,IFN 受体缺陷小鼠还是不能够模拟人类 EV71 感染后的神经和心肺重症^[20]。

3.2 EV71 感染受体基因修饰小鼠

向小鼠体内导入人类的 EV71 病毒受体将是获得高效模仿人类 EV71 感染的小鼠模型的有效手段。目前,日本两个研究组分别在 2009 年报道了 EV71 病毒的两种受体,包括 P-选择素糖蛋白配体 1 (PSGL-1)^[21] 和清道夫受体 B2 (SCARB2)^[22]。其中,PSGL-1 分布于淋巴细胞表面,介导 SK-EV006 和 C7/Osaka 等 EV71 毒株的感染,并引起淋巴细胞释放炎症细胞因子;而 SCARB2 广泛分布与上皮细胞合成纤维细胞,因此这种受体更有可能与 EV71 感染的神经趋向相关。两个研究组均提供了强有力的证据表明这两种分子是 EV71 的受体,并参与 EV71 的感染:(1) SCARB2 和 PSGL-1 都可以与 EV71 结合;(2) 分别转入了 SCARB2 和 PSGL-1 的小鼠细胞易于被 EV71 感染;(3) SCARB2 和 PSGL-1 的抗体均可以阻止 EV71 的感染^[21-23]。

在建立动物模型之前,建立导入受体基因的细胞模型能够更好地验证受体,同时有助于研究受体介导病毒的机制。台湾科研人员建立的 SCARB2 细胞模型证明它对 EV71 的受体作用是通过网格蛋白介导并且 pH 依赖的胞吞途径实现的^[24]。也有研究在小鼠 L 细胞中分别表达两种人类的 EV71 受体基因 SCARB2 和 PSGL1,分析比较两者功能,发现表达 SCARB2 细胞的感染效率要远高于 PSGL1,主要原因是两者虽然都对 EV71 的侵入起到介导作用,然而 SCARB2 还能够支持 EV71 病毒的内在化和脱外包被等^[25]。

近期,台湾研究组获得表达人类 EV71 受体基因 hSCARB2 的转基因(Tg)小鼠。首次报道了能够感染自然 EV71 病毒的动物模型,并且表现出与人类相似的手足口疱疹症状以及中枢神经系统的病变。hSCARB2 Tg 小鼠优于传统的依赖病毒驯化的 EV71 感染模型,对自然的 EV71 病毒敏感,从而能够更好地模拟 EV71 在人类中的感染。而不同于 EV71 病毒感染人类后的嗜神经性,hSCARB2 Tg 小鼠表现为中枢神经系统和外周组织(肌肉、消化道和皮肤)的双病理嗜性(bi-pathological tropism)^[26]。本实验室也通过基因打靶方式分别建立表达 hSCARB2 和 hPSGL-1 两种 EV71 受体分子的小鼠模

型,期望能够获得更好地模拟人类感染的动物模型。

4 展望

理想的 EV71 感染模型应符合以下因素:(1) 对 EV71 病毒敏感—EV71 能够侵入,并在体内复制,具有嗜神经性;(2) 感染后能够模拟出典型的 EV71 感染人后的症状—主要表现在中枢神经系统症状,包括脑炎、心力衰竭和肺水肿等;(3) 对病毒敏感性的性状稳定可遗传。而目前通过 EV71 病毒驯化而建立的感染模型尚不能够满足致病机制研究、新药和疫苗研发等领域对动物模型标准化的需求。普通动物由于缺乏感染受体而不能被 EV71 感染,而目前已发表的两种 EV71 人类受体基因已在细胞水平被证明,而且通过原核注射转入 SCARB2 受体后建立的转基因小鼠模型已被证明能够更好地模拟 EV71 在人类中的感染,并且其感染特性具有可遗传性,从而能够获得更稳定的实验结果。相较于非人灵长类模型的高成本和资源有限等问题,转基因模型也具有较大的优势。因此,结合转基因、基因敲入等技术,有可能获得理想的 EV71 小鼠感染模型。相信随着不同受体基因修饰动物模型的建立和构建方式改进,能够建立更理想的 EV71 感染模型,为疫苗和药物临床前评估,以及 EV71 免疫学发病机制的研究提供标准化模型。

参考文献:

- [1] Huang CC, Liu CC, Chang YC, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection [J]. N Engl J Med, 1999. 341(13): 936-942.
- [2] Qiu J. Enterovirus 71 infection: a new threat to global public health? [J]. Lancet Neurol, 2008. 7(10): 868-869.
- [3] Lee MS, Lin TY, Chiang PS, et al. An investigation of epidemic enterovirus 71 infection in Taiwan, 2008: clinical, virologic, and serologic features [J]. Pediatr Infect Dis J, 2010. 29(11): p. 1030-4.
- [4] Fujimoto, T, Chikahira M, Yoshida S, et al. Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot, and mouth disease in Japan during the summer of 2000: detection and molecular epidemiology of enterovirus 71 [J]. Microbiol Immunol, 2002. 46(9): 621-627.
- [5] Chan LG, Parashar UD, Lye MS, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group [J]. Clin Infect Dis, 2000. 31(3): 678-683.
- [6] Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working

- Group [1]. N Engl J Med, 1999. 341(13): 929–935.
- [7] 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.
- [8] Foo DG, Alonso S, Chow VT, et al. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide [J]. Microbes Infect, 2007. 9(11): 1299–1306.
- [9] 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.
- [10] Chen CS, Yao YC, Lin SC, et al. Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice [J]. J Virol, 2007. 81(17): 8996–9003.
- [11] 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.
- [12] Arita M, Shimizu H, Nagata N, et al. Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys [J]. J Gen Virol, 2005. 86(Pt 5): 1391–1401.
- [13] Hashimoto I, Hagiwara K, 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.
- [14] Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, et al. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation [J]. J Gen Virol, 2004. 85(Pt 10): 2981–2989.
- [15] Hashimoto I, A. Hagiwara A. Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1982. 8(2): 149–156.
- [16] Zhang Y, Cui W, Liu L, et al. Pathogenesis study of enterovirus 71 infection in rhesus monkeys [J]. Lab Invest, 2011. 91(9): 1337–1350.
- [17] 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.
- [18] Arita M, Ami Y, Wakita T, et al. Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model [J]. J Virol, 2008. 82(4): 1787–1797.
- [19] Khong WX, Yan B, Yeo H, et al. A non-mouse-adapted enterovirus 71 (EV71) strain exhibits neurotropism, causing neurological manifestations in a novel mouse model of EV71 infection [J]. J Virol, 2012. 86(4): 2121–2131.
- [20] Caine EA, Partidos CD, Santangelo JD, et al. Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice [J]. PLoS One, 2013. 8(3): e59501.
- [21] Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71 [J]. Nat Med, 2009. 15(7): 794–797.
- [22] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71 [J]. Nat Med, 2009. 15(7): 798–801.
- [23] Patel KP, Bergelson JM. Receptors identified for hand, foot and mouth virus [J]. Nat Med, 2009. 15(7): 728–729.
- [24] Lin YW, Lin H-Y, Tsou Y-L, et al. Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71 [J]. PLoS One, 2012. 7(1): e30507.
- [25] Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, et al. Functional comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71 [J]. J Virol, 2013. 87(6): 3335–3347.
- [26] Lin YW, Yu S-L, Shao H-Y, et al. Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71 [J]. PLoS One, 2013. 8(2): e57591.

(修回日期) 2013-07-28