

· 综述 ·

# EV71 和 CA16 型手足口病动物模型及其病毒感染特点分析

姚荣妹<sup>1,2</sup>, 毛鑫<sup>1</sup>, 曲天歌<sup>3</sup>, 郭姗姗<sup>1</sup>, 包蕾<sup>1</sup>, 鲍岩岩<sup>1</sup>, 崔晓兰<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 华北理工大学 中医学院, 河北 唐山 063210;  
3. 北京中医药大学 基础医学院, 北京 100029)

**[摘要]** 手足口病(HFMD)是由肠道病毒引起的儿童常见传染病,发病率高,可引发肺水肿、心肌炎、无菌性脑膜炎等致命性并发症,严重威胁着患儿的健康。目前该病相关病毒的致病机制、致病病毒不同基因型之间的关系、药效学评价方法、药物抗病毒机制等核心问题尚不明确,而构建具有人类染毒模拟表现的动物模型是解决以上问题的关键。国内外研究人员建立了多种不同动物种属、品系的 HFMD 动物模型,以肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(CA16)最常见,应用也最为广泛。EV71 与 CA16 同属小核糖核酸病毒科肠道病毒属肠道病毒 A 型,两者在病原学、感染和复制特征、感染导致的临床症状和免疫反应有相似的方面,但引发的 HFMD 动物模型在易感年龄,感染方法,表现出的神经毒性、临床症状及体征、组织器官损伤程度等也有明显不同的方面,因此,研究者应根据实际需要选择和建立合适的动物模型,这对于研究结果的可靠性具有重要意义。本文通过梳理感染 EV71 和 CA16 病毒建立的不同物种 HFMD 动物模型,分类阐述各模型的种属品系、病毒株类型、感染方法、病毒感染特点,深入研究 EV71 及 CA16 感染诱发的 HFMD 特点及其感染所导致的临床症状差异,整体评价小鼠、树鼩及非人灵长类 3 类动物模型各自的优缺点,以期为相关研究提供参考。

**[关键词]** 手足口病; 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A16 型; 动物模型; 病毒感染特点

**[中图分类号]** G353.11; R373.2; R272 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0172-92

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20190841

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190102.1411.018.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-04 9:25

## Animal Models of EV71 and CA16 Hand-foot-mouth Disease and Characteristics of Viral Infection

YAO Rong-mei<sup>1,2</sup>, MAO Xin<sup>1</sup>, QU Tian-ge<sup>3</sup>, GUO Shan-shan<sup>1</sup>, BAO Lei<sup>1</sup>, BAO Yan-yan<sup>1</sup>, CUI Xiao-lan<sup>1\*</sup>

(1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*  
2. *College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Sciences and Technology, Tangshan 063210, China;*  
3. *School of Basic Medicine Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*)

**[Abstract]** Hand-foot-mouth disease (HFMD) is a common infectious disease caused by enterovirus in children. It has a high incidence and can cause fatal complications such as pulmonary edema, myocarditis and aseptic meningitis, seriously threatening the health of children. At present, some core problems such as the pathogenesis of disease, the relationship between different genotypes of pathogenic viruses, the pharmacodynamic evaluation methods, and the antiviral mechanism of drugs are still unclear. The construction of disease animal models with simulation performance of human exposure is the key to solve the above problems. Researchers both at home and abroad have established a variety of animal models for HFMD, of which enterovirus 71 (EV71) and coxsackievirus A16 (CA16) are most common and most widely used. Both EV71 and CA16 are enterovirus A in

**[收稿日期]** 20181008(012)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZDXK-03)

**[第一作者]** 姚荣妹,在读博士,讲师,从事中药抗菌及抗病毒药效评价及机制研究,E-mail:471268167@qq.com

**[通信作者]** \* 崔晓兰,研究员,博士生导师,从事中药抗菌及抗病毒药效评价及机制研究,E-mail:cuixiaolan2812@126.com

picornavirus family, so they have similarities in terms of pathogenicity, infection and replication characteristics, clinical symptoms caused by infection and immune response, but also have significant differences in age of susceptibility, method of infection, as well as neurotoxicity, clinical symptoms and signs, and degree of tissue and organ damage. Therefore, researchers shall select and establish proper animal models based on actual conditions, which is critical to the reliability of the results. In this paper, the different types of HFMD animal models established by EV71 and CA16 viruses were reviewed, especially on the species strains, virus strain types, infection methods, and characteristics of viral infections in each model, and the characteristics and clinical symptoms of HFMD induced by EV71 and CA16 were also investigated to provide reference for related research.

[ **Key words** ] hand-foot-mouth disease; enterovirus 71; coxsackie virus A16; animal models; characteristics of virus infection

手足口病(HFMD)是由肠道病毒引起一种儿童常见传染病,多见于5岁以下婴幼儿<sup>[1-2]</sup>。HFMD是全球性疾病,在中国、日本、新加坡等亚太地区呈高发态势<sup>[3-6]</sup>,2018年6月中国疾病预防控制中心数据显示,我国HFMD病例数和死亡病例数均高居丙类传染病首位<sup>[7]</sup>。HFMD发病机制,病毒与宿主之间的相互关系,病毒不同基因型别、变异株与致病性之间的关系等诸多问题目前尚不清楚,制约其发展的一个最主要原因是缺乏适宜的动物模型来开展相关研究。近年来,国内外许多学者根据引发HFMD病原体的生理特性,建立了不同种类动物模型,但因其尚无明确的分类及应用标准,无法得到充分合理的运用。各类动物模型在感染过程中虽然具有类似的病毒复制模式,但选用的感染病毒株不同,其在机体内诱发的疾病呈现出不同的临床特征,甚至在发病机制上也具有差异性<sup>[10]</sup>,研究者进行实验设计时应重点关注以上问题。

柯萨奇病毒A16型(CA16)和肠道病毒71型(EV71)是HFMD最主要的病原体<sup>[11-12]</sup>,二者也是用来制备动物模型的主要病毒。目前HFMD动物模型种类繁多,但每种模型只能展现人类疾病病理特征或临床特点的某一方面,本课题组用EV71感染BALB/c小鼠建立的小鼠模型,虽表现出较强的神经毒性,但未出现类似人类儿童手、足、口、咽喉部疱疹症状<sup>[13-14]</sup>,EV71临床分离株感染猕猴时表现出较低的神经系统毒性,但体温升高明显,口腔黏膜及四肢出现典型的囊泡<sup>[15]</sup>。因此,研究者应根据自身实验目的选择适宜的动物模型,才能保证实验结果准确可靠。本文通过梳理感染EV71和CA16病毒建立HFMD动物模型的动物种属品系、病毒株类型、感染方法及剂量、病毒感染特点及应用,深入研究这两种病毒感染诱发的疾病特点及其所导致的临床症状差异,以为实验中动物模型的选择提供

参考,从而为该病发病机制、新药和疫苗开发等后续研究奠定基础。

## 1 EV71 动物模型

**1.1 BALB/c 小鼠模型** 郭姗姗等<sup>[13-14]</sup>使用EV71 H株感染3日龄BALB/c乳鼠,采用腹腔注射病毒液方式进行感染,结果乳鼠均出现肢体麻痹或瘫痪症状,检测后发现病毒侵染可造成严重的坏死性肌炎。王辉强等<sup>[16]</sup>将含EV71-M5株的病毒液通过腹腔注射方式感染12日龄BALB/c小鼠,成功建立了2周龄BALB/c小鼠手足口病模型。经毒株感染3d后的乳鼠可表现出较为明显发病症状,可见体质量降低、松毛、自主活动减少、精神萎靡等,感染7d后,乳鼠后肢出现麻痹或瘫痪,小鼠的肝、脾、肺、肾、后肢肌肉、脑中均检测到病毒,以肌肉中的病毒载量最高。Chumakov等<sup>[17]</sup>将澳大利亚临床分离株在BALB/c小鼠颅内扶强,将扶强后HEV71-26M病毒株感染1~2日龄BALB/c乳鼠,结果动物出现严重的致死症状,检测后发现骨骼肌是该感染病毒的主要脱氧核糖核酸(DNA)复制位点,病毒侵染导致了严重的坏死性肌炎。宋楠楠等<sup>[18]</sup>将20例患儿粪便标本中分离得到的6株EV71(C4亚型)病毒接种至1日龄BALB/c小鼠,发现均可感染小鼠并致病,重者出现松弛型麻痹并死亡,轻者出现震颤、麻痹但可恢复至正常。其中JN200804株症状较重,小鼠脑组织和骨骼肌可观察到细胞空泡变性、淋巴细胞浸润等病理变化。

**1.2 ICR 小鼠模型** ICR小鼠模型应用较为广泛的是利用1~7日龄小鼠建立EV71感染模型,通过口腔、髓内、腹腔等感染途径接种,可出现病毒血症,并且可以致死,一般不能模拟人类感染的临床表现<sup>[19]</sup>。CHEN等<sup>[20]</sup>利用HEV71 4643株经口腔途径感染1日龄ICR小鼠,2d后小鼠出现皮肤病变,4~7d后出现后肢麻痹,7~9d后死亡,苏木素-

伊红(HE)染色后发现乳鼠脑部有大量淋巴细胞浸润。随后,WANG等<sup>[21]</sup>将上述毒株在1日龄ICR小鼠颅内进行4次传代扶强后,得到MP4菌株,扶强后的毒株同样通过口腔途径感染感染7日龄ICR小鼠,3~4d后小鼠出现后肢麻痹或瘫痪,严重者四肢均出现瘫痪,在5~9d内死亡,病毒的主要DNA复制位点在肌肉、脊髓、脑及小肠中,病理报告显示染毒后小鼠脑干与脊髓中神经元消失和凋亡,四肢肌肉出现了大面积坏死。WU等<sup>[22]</sup>将EV71 neu毒株在非洲绿猴肾细胞(Vero)中进行传代得到YN<sub>3</sub>毒株,将其通过腹腔注射病毒液的方式感染新生ICR小鼠,该病毒表现出较高的毒力,可致乳鼠后肢麻痹或瘫痪,严重者四肢皆瘫痪,最终死亡。管晨等<sup>[23]</sup>将 $1.25 \times 10^7$ 半数组织细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)的EV71 BJ09/07毒株腹腔注射7日龄ICR乳鼠,建立了较为稳定的重症HFMD感染模型,乳鼠发病率100%,生存率稳定在25%~35%。朵建英等<sup>[24]</sup>用小鼠传代株EV71-MMP4腹腔注射方式感染ICR1日龄乳鼠,该模型表现出较亲代毒株更好的小鼠易感性及细胞毒性,在脑、肺、骨骼肌与小肠中均检测到了病毒复制,并且在骨骼肌中有EV71病毒特异分布。ICR小鼠模型一般在中枢神经系统病毒滴度较低,但Ong等<sup>[25]</sup>通过髓内接种EV71神经毒性较高的临床分离株(AY207648)的方式,建立了7日龄ICR小鼠模型,该模型在皮质区、丘脑、下丘脑等区域中检测到EV71,可以一定程度地模拟人类的中枢神经感染。

**1.3 免疫缺陷小鼠模型** 免疫缺陷小鼠模型典型特点是相较于正常小鼠可以更长时间感染EV71病毒。Arita等<sup>[26]</sup>建立了非肥胖型糖尿病/重度联合免疫缺陷转基因小鼠(NOD/SCID)合并手足口病模型。将EV71毒株在NOD/SCID小鼠颅内传代扶强,以分离到小鼠适应株EV71-2876a,通过静脉注射方式感染3~4周龄的小鼠,有明显的神经系统病变,表现为后肢瘫痪,由于NOD/SCID小鼠抗肠道病毒EV71产生免疫缺陷,动物感染时间可延长至1个月以上。同样,Caine等<sup>[27]</sup>将EV71病毒株B2亚型传代驯化后,通过腹腔注射方式感染10周龄的成年IFN受体缺陷的A129小鼠( $\alpha/\beta$ -IFN受体基因缺陷)和AG129小鼠( $\alpha/\beta/\gamma$ -IFN受体基因缺陷),成功建立了手足口免疫缺陷小鼠模型,将EV71可感染的小鼠模型时间延长至10周。IFN受体缺陷小鼠可以用于研究疫苗接种后的体液免疫反应,并不能够模拟人类EV71感染后的神经和心肺重症。

Khong等<sup>[28]</sup>发现,2周大小的免疫缺陷AG129小鼠缺乏I型和II型干扰素受体可通过腹腔内注射和口服接种途径感染非小鼠适应的EV71菌株。受感染的小鼠在死亡前表现出进行性肢体瘫痪。病毒的传播依赖于接种途径,但最终导致病毒在动物的中枢神经系统积累,表明病毒具有明显的向神经性,组织病理学检查显示肢体肌肉、脑干和前角区域有大量损伤。观察结果显示幼龄的AG129小鼠在感染非小鼠适应的EV71毒株时可表现出脊髓灰质炎样神经发病机制。

**1.4 中缅树鼩模型** 树鼩是近年来建立和发展起来的新型病毒性动物模型<sup>[29-32]</sup>。王新兴等<sup>[33]</sup>发现野生中缅树鼩携带有肠道病毒中的柯萨奇病毒,认为树鼩可能对肠道病毒易感,有望成为新的手足口病动物模型。随后该研究团队利用EV71 FY-23株通过灌胃、滴鼻及静脉注射3种方式感染3月龄中缅树鼩均成功制备了手足口病模型,感染后树鼩出现类似人类的神经系统及相关病变<sup>[34]</sup>。感染4d后,树鼩出现发热症状,白细胞和淋巴细胞升高;感染7d左右,自主活动减少,精神萎靡;感染10d后,3种感染方式血清和粪便中均可检测到EV71抗体;感染14d后,多数树鼩先后出现蜷缩萎靡,半侧或双侧后腿松弛拖拉,急性松弛性瘫痪,靠前腿拖行等症状;感染18d前后,半数树鼩死亡,其中有些树鼩嘴角和前掌出现疱疹样病变,病理学检查发现在心、肺、肠、脾、肾等部位出现组织变性坏死、水肿、炎性细胞浸润等病理变化。研究结果显示,树鼩手足口病模型的发病症状、疾病周期以及病理病变等感染特性比小鼠模型更接近人类手足口病的病理与病程。

### 1.5 非人灵长类模型

**1.5.1 猕猴模型** 口腔途径感染EV71病毒并不能使猕猴产生神经系统病变,猕猴多使用椎管或静脉注射方式接种EV71制备手足口病猕猴模型,通过这两种方式复制的猕猴模型表现出了病毒血症、四肢麻痹震颤、共济失调和脑水肿等似人类手足口病的病变情况<sup>[35]</sup>。DONG等<sup>[36]</sup>应用C4型毒株FY-23K-B和BrCr株(A型)感染3~3.5岁的猕猴,建立了EV71猕猴模型,研究发现通过静脉注射和呼吸道感染2种途径,均能引起猕猴中枢神经系统和呼吸系统的病理改变和体温升高,其中主要病理改变为肺气肿、肺出血相关的脊髓胸椎和颈椎段的神经元损伤和大量炎性细胞浸润,以及与肺泡和支气管损伤相关的炎性细胞浸润现象。Nagata等<sup>[37]</sup>

通过椎管注射的方式,将 5 种 EV71 的临床分离株分别注入 5~13 岁雌性猕猴体内后,猕猴四肢均出现了迟缓性麻痹、震颤、共济失调甚至瘫痪等神经系统症状,免疫组化结果显示脊髓、脑干、小脑皮层、齿状核、大脑都有病毒的复制。Nagata 等<sup>[38]</sup>通过静脉注射病毒液的方式成功建立了 6~17 岁雌性猕猴手足口病模型,染毒猕猴仅表现出了肢体的麻痹震颤、共济失调和脑水肿症状,但没有发生肺水肿、循环障碍、心衰之类的神经源性并发症。也有研究人员通过口腔途径建立 EV71 感染的猕猴模型,检测后发现,猕猴血液中病毒滴度也会升高,脊髓、脑干、小脑皮层、齿状核和大脑中均有 EV71 病毒抗原的表达,说明肠道病毒 EV71 对中枢神经系统也有不同程度的侵袭<sup>[39]</sup>,但多数 EV71 病毒的临床分离株对猕猴进行感染时均表现出较低的中枢神经系统毒性<sup>[40]</sup>。

**1.5.2 恒河猴模型** 恒河猴通过口服、静脉接种或脊髓、脑内接种等方式均可感染 EV71。Chumakov 等<sup>[41]</sup>以保加利亚临床分离株感染恒河猴,染毒猴神经系统出现类似于人类脊髓灰质炎的病变症状,表现为肢体麻痹及瘫痪。我国科研人员将本国常见的 EV71 亚型通过呼吸道感染、静脉、脑内感染等多种途径感染恒河猴,发现 EV71 病毒通过不同途径接种,能够靶向和损伤中枢神经系统,引发神经毒性和临床神经病理症状及体征<sup>[42]</sup>,说明恒河猴模型不仅可以用于研究 EV71 病毒感染的基本发病机制,还可以用于检查中枢神经系统的神经病变和相关器官的病理变化等临床特征。此外,研究人员还发现幼年恒河猴感染 EV71 病毒后可出现类似人类儿童的手、足、口、咽喉部疱疹症状<sup>[43]</sup>。EV71 病毒建立的 HFMD 动物模型见表 1。

表 1 EV71 病毒建立的 HFMD 动物模型概览(2001—2018 年)

Table 1 Animal models of HFMD infected with EV71 virus (2001—2018)

动物种属品系	病毒株类型	感染方法	感染特点	参考文献
BALB/c 小鼠	EV71 H 株	3 日龄乳鼠,腹腔注射病毒液进行感染	引发乳鼠肢体麻痹或瘫痪,病毒侵染可引发严重的坏死性肌炎	[13-14]
	EV71-M5 株	2 周龄鼠,腹腔注射病毒液进行感染	引发后肢的无力或瘫痪,肝、脾、肺、肾、后肢肌肉、脑中均可检测到病毒,以肌肉当中病毒载量最高	[16]
	HEV71-26M 株	1~2 日龄乳鼠,腹腔注射病毒液感染	出现严重的致死症状,骨骼肌是该感染病毒的主要 DNA 复制位点,可引发严重的坏死性肌炎	[17]
	EV71 临床分离株	1 日龄乳鼠,腹腔注射病毒液进行感染	重者出现松弛型麻痹并死亡,脑、骨骼肌出现细胞空泡变性、淋巴细胞浸润;轻者出现震颤、麻痹但可恢复至正常	[18]
ICR 小鼠	HEV71 4643 株	1 日龄乳鼠,口腔途径进行感染	2 d 小鼠出现皮肤病变,4~7 d 出现后肢麻痹,7~9 d 后死亡,乳鼠脑部有大量淋巴细胞浸润	[20]
	EV71 MP4 株	7 日龄乳鼠,口腔途径进行感染	3~4 d 小鼠出现后肢或四肢麻痹、瘫痪,在 5~9 d 内死亡,HE 染色后四肢肌肉出现大面积坏死	[21]
	EV71-YN <sub>3</sub> 株	1~2 日龄乳鼠,腹腔注射病毒感染	毒力强,神经系统毒性尤为显著,可致乳鼠后肢麻痹或瘫痪,严重者四肢皆瘫痪	[22]
	EV71 BJ09/07 株	7 日龄小鼠,腹腔注射病毒感染	较为稳定的重症手足口感染模型,乳鼠发病率 100%,生存率稳定在 25%~35%	[23]
	EV71-MMP4 株	1 日龄乳鼠,腹腔注射病毒感染	表现出较好的小鼠易感性、细胞毒性,感染后小鼠骨骼肌有 EV71 病毒特异分布	[24]
	EV71-AY207648	7 日龄乳鼠,髓内注射病毒感染	在皮质区、丘脑、下丘脑等区域中检测到 EV71,可以一定程度地模拟人类的中枢神经感染	[25]
免疫缺陷小鼠	EV71-2876a 株	3~4 周龄 NOD/SCID 小鼠,静脉注射感染	动物感染时间可延长至 1 个月以上,有明显的神经系统病变,表现为后肢瘫痪	[26]
	EV71 毒株 B2 亚型	10 周龄, A129 小鼠、AG129 小鼠,静脉注射感染	动物感染时间延长至 10 周,可用于研究疫苗接种后的体液免疫反应,不能够模拟人类 EV71 感染后的神经和心肺重症	[27]
	非小鼠适应性 EV71 毒株	2 周龄, AG129 小鼠,腹腔注射、口腔途径感染	可以感染非小鼠适应性 EV71 毒株,小鼠在死亡前表现出进行性肢体瘫痪,病毒具有明显的向神经性,表现出脊髓灰质炎样神经发病机制	[28]

续表 1

动物种属品系	病毒株类型	感染方法	感染特点	参考文献
中缅甸树鼩	EV71 FY-23 株	3 月龄,灌胃、滴鼻、静脉注射均可感染	出现与人类类似的神经系统及相关病变,有些树鼩嘴角和前掌出现疱疹样病变	[34]
猕猴	C4 型 FY-23K-B, BrCr 株	3~3.5 岁猕猴,静脉、呼吸道途径感染	均能引起中枢神经、呼吸系统明显的病理改变,表现为肺气肿、肺出血、神经元损伤、炎性细胞浸润	[36]
	EV71 临床分离株	5~13 岁雄性猕猴,椎管注射方式感染	出现迟缓性麻痹、震颤、共济失调、瘫痪等神经系统症状,脊髓、脑干、小脑皮层、齿状核、大脑都有病毒的复制	[37]
	EV71 Brer 株	6~17 岁雌性猕猴,静脉注射方式感染	仅出现肢体的麻痹震颤、共济失调和脑水肿症状,不发生肺水肿、循环障碍、心衰之类的神经源性并发症	[38]
	EV71 临床分离株	1.8~3.8 kg 猕猴,皮下注射方式感染	侵袭中枢神经系统,血液中病毒滴度升高,脊髓、脑干、小脑皮层、齿状核和大脑中均有 EV71 抗原的表达	[39]
恒河猴	EV71 临床分离株	经 4~5 次静脉注射途径感染	神经系统出现类似于人类脊髓灰质炎的病变症状,表现为肢体麻痹及瘫痪	[41]
	EV71 FY-23 株	3~3.5 岁,颅内、静脉、呼吸道感染	EV71 病毒可通过不同途径接种,能够靶向和损伤中枢神经系统,引发神经毒性和临床神经病理症状及体征	[42]
	EV71 FY-23 株	新生猴,静脉、呼吸道、肠道感染	幼年恒河猴感染 EV71 病毒后可出现类似人类儿童的手、足、口、咽喉部疱疹症状	[43]

## 2 CA16 动物模型

**2.1 小鼠模型** 任庆杰等<sup>[44]</sup>通过 1 日龄 C57BL/6J 乳母鼠驯化得到稳定的致死 11 日龄小鼠适应株 CA16-TS, CA16-TS 株可致小鼠后肢麻痹和严重的肌肉坏死,随后体质量逐渐降低至死亡,研究人员对小鼠后肢肌肉、脑等组织进行检测后发现脑、后肢肌肉等组织中都有较高病毒载量, CA16-TS 没有表现出强的神经嗜性,而是表现出更强的肌肉侵入性和毒性。MAO 等<sup>[45]</sup>将 CV-A16 临床分离株 BJCA08/CA16 通过脑内注射方式感染 1 日龄 ICR 乳鼠制备手足口病模型,被感染鼠出现身体消瘦,下肢瘫痪,甚至全身肌肉麻痹、死亡,经病理学及免疫组化检查后发现,该临床株对肌肉组织有较强的趋向性,极易导致骨骼肌和心肌严重坏死。CoxA16 所致的小鼠手足口病模型,动物行为上均表现出明显的共济失调、肢体瘫痪、精神萎靡等症状,这与目前的小鼠适应株一致。李景良<sup>[46]</sup>将 CA16 CC024 病毒通过颅腔注射的方式对 1 日龄的小鼠进行感染,结果攻毒的乳鼠在第 3 天出现 4 级临床症状,4 级乳鼠的临床症状为肢体麻痹,被感染乳鼠后肢肌肉、脊柱肌肉纤维断裂,肺组织损伤和充血。免疫组织化学分析结果表明在肌肉组织和肺部有大量的病毒抗原,对肺部组织有明显的特异趋向性。

**2.2 树鼩模型** 李建平<sup>[47-48]</sup>采用呼吸道途径感染树鼩,使用微量注射器将适量滴度的 CA16 G20

病毒液 50  $\mu$ L 以喷雾状注入鼻腔,检测后发现树鼩的类便、咽拭子、血液和多个器官和组织中均有病毒体存在,定期观察树鼩临床症状,进行血常规变化,相关样品免疫细胞变化,病毒核酸及载量变化及组织病理学等检查,证实幼龄树鼩可被病毒感染,临床表现、感染周期和病理变化与人感染后症状类似。

**2.3 恒河猴模型** 王晶晶<sup>[49]</sup>以 CA16 临床分离株经鼻腔感染恒河猴成年猴(4~5 岁),幼猴(8~10 月龄),婴猴(1~3 月龄)建立了不同年龄段手足口病动物模型,发现幼猴、婴猴出现了与人手足口病患者相似的口腔黏膜、咽喉、手足部疱疹以及发热症状;对其血液样品检测后发现白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )出现了一过性的升高,病毒滴度明显升高;免疫组化结果显示多个器官均能检测出较高的病毒拷贝数,尤以淋巴系统、肺部、支气管病毒表达抗原较多;各系统主要组织器官病理学观察后发现,CA16 仅造成恒河猴肺、淋巴等组织器官较轻的损伤,只见少量炎症细胞浸润,而其他脏器未见明显病变,在口唇及皮肤疱疹中仅见一小部分嗜酸性细胞,即使多次重复染毒,也未能诱导高滴度的病毒中和抗体反应。CA16 恒河猴模型所表现出来的病变症状与该研究团队建立的 EV71 感染恒河猴婴猴模型染毒后轻症病变极其相似。以上研究从感染模型角度证明了 CA16 病毒引发的手足口

疾病致病机制有与 EV71 病毒不同,CA16 一般诱发轻症的手足口动物模型,与其诱导的免疫反应较弱有关。

**2.4 猕猴模型** WANG 等<sup>[50]</sup>利用肠道病毒 CA16 G20 经鼻腔灌流感染 6~8 个月的猕猴,成功建立猕猴手足口疾病模型,研究显示 12 只猕猴均表现出与体温升高相关的典型口腔黏膜和肢体小泡,所有动物的外周血在病毒攻毒后 3~9 d 内出现病毒血症

高峰,在这些动物的咽喉拭子和粪便样本中也发现了同样的病毒峰值。进一步组织病理学检测发现动物大多数器官和组织未见病变,仅有轻微炎症细胞聚集在一些呼吸道的淋巴结,但绝大多数器官,尤其是淋巴结、甲状腺、胸肌、气管和食道都发现了病毒的增殖。此外,这些猕猴外周血中单核细胞和自然杀伤细胞的比例增加。CA16 病毒建立的 HFMD 动物模型概况见表 2。

表 2 CA16 病毒建立的 HFMD 动物模型概览(2012—2018 年)

Table 2 Animal models of HFMD infected with CA16 virus (2012—2018)

动物种属品系	病毒株类型	感染方法	感染特点	参考文献
C57BL/6J 小鼠	CA16-TS 株	1 日龄乳鼠,腹腔注射病毒液感染	可引发后肢麻痹、严重的肌肉坏死,未表现出强的神经嗜性,却表现出更强的肌肉侵入性和毒性	[44]
ICR 小鼠	CA16-BJCA 08/CA16	1 日龄乳鼠,脑内注射病毒液感染	对肌肉组织有较强的趋向性,极易导致骨骼肌和心肌严重坏死	[45]
	CA16 CC024	1 日龄乳鼠,颅腔注射病毒液感染	引发肢体麻痹症状,表现为后肢肌肉、脊柱肌肉纤维断裂,肺组织损伤和充血,对肺和肌肉有明显的特异趋向性	[46]
树鼩	CA16 G20 株	2 月龄,鼻腔喷入病毒液方式进行感染	临床表现、感染周期和病理变化与人感染后症状类似,粪便、咽喉拭子、血液和多个器官和组织中均有病毒体存在	[47-48]
恒河猴	CA16 临床分离株	4~5 岁成年猴,经鼻腔以喷雾形式感染	所有临床症状均不明显,也无手足口部的疱疹,间隔 60 d 后重复感染时,成年恒河猴不会出现手足口临床症状	[49]
	CA16 临床分离株	8~10 月幼猴,经鼻腔以喷雾形式感染	出现与人类 HFMD 相似的临床症状,具体表现为体温升高、四肢及口唇部的疱疹,对组织器官损伤较轻	[49]
	CA16 临床分离株	1~3 月龄婴猴,经鼻腔以喷雾形式感染	出现与人类 HFMD 相似的临床症状,表现为体温升高、四肢及口唇部的疱疹,婴猴模型临床症状较幼猴模型严重,表现在体温升高及出现疱疹的动物数量上	[49]
猕猴	CA16 G20 株	6~8 月龄,经鼻腔以喷雾形式感染	表现出与人类 HFMD 相似的临床表现,体温升高、典型的口腔黏膜和肢体囊泡,染毒 3~9 d 见病毒血症高峰,对组织器官损伤轻	[50]

### 3 展望

疾病动物模型是现代生物医学研究中极为重要的实验方法和手段,是许多重大疾病开展发病机制研究、预防及诊断标志物发现、药物筛选和药效评价、疫苗开发等不可或缺的研究资源<sup>[51-53]</sup>。在 HFMD 致病机制尚不完全明确的情况下,构建具有人类染毒模拟表现的动物模型是研究本病最好的一条途径。近年来,国内外研究人员根据 HFMD 2 种最常见病原体 EV71,CA16 的特性建立了多种不同动物种属、品系的动物模型,这些模型各具特点。小鼠模型是目前应用最广泛的 HFMD 动物模型,高效快速,成本低廉且易获得,但个体过小、发病期太短,建立模型多采用颅内、腹腔注射的方式,与人体自然感染病毒存在较大差异,模型仅仅模拟手足口病

某一个或某几个临床症状,无法满足深入研究的需要。非人灵长类动物模型最接近人体的自然感染病程,是较为理想的 HFMD 动物模型,但实验成本高,研究周期长,不适合进行大规模筛选研究,限制了相关的研究工作。树鼩是近些年新研发的 HFMD 动物模型,体型小、繁殖周期短、饲养成本低,树鼩模型的发病症状、疾病周期以及病理病变等感染特性比小鼠模型更接近人类 HFMD 的病理与病程,被认为有望替代非人灵长类动物用于人类疾病的动物模型研究<sup>[54-55]</sup>。

手足口病致病病毒基因型不同,感染动物种属品系不同,感染途径及剂量不同,各动物模型的临床表现、感染周期以及组织器官病理病变等亦不同<sup>[56-57]</sup>,可能与各病原体在机体内感染过程、感染

机制及其在机体中诱发的固有免疫和适应性免疫过程的差异有关<sup>[58-62]</sup>。因此,研究者应当根据各模型的特点以及实际需要选择适当动物模型,以保证研究结果的可靠性。目前尚无与人类手足口病发病机制完全相同的成熟动物模型,相信随着研究的深入,会有更多接近人自然感染病程的手足口疾病模型被“复制”出来,这些模型的发展将更好地了解 HFMD 的感染途径,洞察新的分子机制,为 HFMD 致病机制、致病病毒不同基因型间的关系、药效学评价方法及药物抗病毒核心机制等方面研究奠定基础。

[参考文献]

[1] 王绚,许静,徐进,等.热毒宁注射液治疗手足口病的系统评价[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(19):171-176.

[2] 中华人民共和国卫生部.国卫办医函[2018]327号.手足口病诊疗指南(2018年版)[S].2018:2.

[3] 孙立珍.手足口病流行病学特征及相关危险因素分析[J].湖南师范大学学报:医学版,2018,15(5):39-41.

[4] CHEN G, WU J, WANG J, et al. Epidemiological characteristics and influential factors of hand, foot and mouth disease (hfmd) reinfection in children in anhui province [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 144 (1): 153-160.

[5] Yoshitomi H, Ashizuka Y, Ichihara S, et al. Molecular epidemiology of coxsackievirus A6 derived from hand, foot, and mouth disease in Fukuoka between 2013 and 2017[J]. *J Med Virol*, 2018, 90(11):1712-1719.

[6] Chia M Y, Chiang P S, Chung W Y, et al. Epidemiology of enterovirus 71 infections in Taiwan [J]. *Pediatr Neonatol*, 2014, 55(4):243-249.

[7] 2018年6月全国法定传染病疫情概况[EB/OL]. 2018-06-30[2018-09-11]. <http://www.nhfdc.gov.cn>.

[8] Shea Y F, Chan C Y, Hung I F, et al. Hand, foot and mouth disease in an immunocompetent adult due to Coxsackievirus A6[J]. *Hong Kong Med J*, 2013, 19(3):262-264.

[9] LI M, YANG X L, GUAN C, et al. Andrographolide sulfonate reduces mortality in enterovirus 71 infected mice by modulating immunity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55(1):142-150.

[10] ZHOU S, LIU Q, WU X, et al. A safe and sensitive enterovirus A71 infection model based on human SCARB2 knock-in mice[J]. *Vaccine*, 2016, 34(24):2729-2736.

[11] YIN D Q, WANG C B, WANG C B, et al. Epidemiology

characteristics of human coxsackievirus A16 and enterovirus 71 circulating in Linyi, China, from 2009 to 2017[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2018, 71(6):470-473.

[12] 曹泽曦,谢雪,牛莹,等.热毒宁注射液组分抗 CoxA16 和 EV71 病毒活性研究[J].中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14):106-110.

[13] 郭姗姗,金亚宏,王意忠,等.疏风解毒颗粒防治手足口病的体内药效学研究[J].中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):206-209.

[14] 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药效学研究[J].中国药物警戒, 2014, 11(7):385-389.

[15] ZHAO T, ZHANG Z X, ZHANG Y, et al. Dynamic interaction of enterovirus 71 and dendritic cells in infected neonatal rhesus macaques[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, doi:10.3389/fcimb.2017.00171.

[16] 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].药学学报, 2013, 48(3):343-346.

[17] 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.

[18] 宋楠楠,张颖,李鹏,等. EV71 临床分离株 BALB/c 小鼠致病特点分析[J].山东大学学报:医学版, 2012, 50(8):35-39, 45.

[19] CHEN C S, YAO Y C, LIN S C, et al. Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice[J]. *J Virol*, 2007, 81(17):8996-9003.

[20] CHEN Y C, YU C K, WANG Y F, et al. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt1):69-77.

[21] WANG Y F, CHOU C T, LEI H Y, et al. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection[J]. *J Virol*, 2004, 78(15):7916-7924.

[22] WU C N, LIN Y C, FAN C, et al. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus[J]. *Vaccine*, 2001, 20(5):895-904.

[23] 管晨,李敏,任杰庆,等.穿心莲内酯通过抗炎和调节免疫提高 EV71 感染小鼠的生存率[J].免疫学杂志, 2013, 29(9):737-744.

[24] 朵建英,王卫,马春梅,等. EV71 小鼠适应株制备及体内感染特点[J].中国实验动物学报, 2010, 18(5):383-389, 355.

[25] Ong K C, 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.
- [26] 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.
- [27] Caine E A, Partidos C D, Santangelo J D, et al. Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice [J]. *PLoS One*, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0059501.
- [28] Khong W X, 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.
- [29] 周风梅, 李润峰, 袁兵, 等. 树鼩应用于病毒感染性疾病动物模型的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(6):115-120.
- [30] 郑永唐, 姚永刚, 徐林. 树鼩基础生物学与疾病模型[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2014:148.
- [31] FENG Y, FENG Y M, LU C, et al. Tree shrew, a potential animal model for hepatitis C, supports the infection and replication of HCV *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(8):2069-2078.
- [32] LI L, LI Z, WANG E, et al. Herpes simplex virus 1 infection of tree shrews differs from that of mice in the severity of acute infection and viral transcription in the peripheral nervous system [J]. *J Virol*, 2015, 90(2):790-804.
- [33] 王新兴, 李婧潇, 王文广, 等. 野生中缅鼩病毒携带情况的初步调查[J]. *动物学研究*, 2011, 32(1):66-69.
- [34] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩[J]. *动物学研究*, 2012, 33(1):7-13.
- [35] 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(Pt5):1391-1401.
- [36] DONG C H, WANG J J, LIU L D, et al. Optimized development of a candidate strain of inactivated EV71 vaccine and analysis of its immunogenicity in rhesus monkeys [J]. *Hum Vaccin*, 2010, 6(12):1028-1037.
- [37] 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.
- [38] 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(10):2981-2989.
- [39] 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.
- [40] Hashimoto I, Hagiwara A. Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71; a model for human infection [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010, 8(2):149-156.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] MAO Q Y, WANG Y P, GAO R, et al. A neonatal mouse model of coxsackievirus A16 for vaccine evaluation [J]. *J Virol*, 2012, 86(22):1196-1206.
- [46] 李景良. 重组柯萨奇 A16 病毒致病机理及候选疫苗对动物模型致死性保护机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [47] 李建平. 柯萨奇病毒 A 组 16 型感染幼龄树鼩的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [48] LI J P, LIAO Y, ZHANG Y, et al. Experimental infection of tree shrews (*tupaia belangeri*) with Coxsackie virus A16 [J]. *Zool Res*, 2014, 35(6):485-491.
- [49] 王晶晶. CA16 感染恒河猴模型以及相关病原和免疫学特性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [50] WANG J J, ZHANG Y, ZHANG X L, et al. Pathologic and immunologic characteristics of coxsackievirus A16 infection in rhesus macaques [J]. *Virology*, 2017, doi: 10.1016/j.virol.2016.10.031.
- [51] 薛丽香, 张凤珠, 孙瑞娟, 等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望 [J]. *中国科学*, 2014, 44(9):851-861.
- [52] 江虎军, 冯锋, 董尔丹. 模式动物与人类疾病的动物模型 [J]. *生命科学*, 2011, 23(3):234-238.
- [53] 张连峰, 崔韶. 国内外实验动物模型概览 [J]. *科技导*

- 报, 2017, 35(24):27-31.
- [54] 周舒雅, 范昌发, 王佑春. EV71 病毒感染动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10):67-70.
- [55] 赵杰, 张国梁. 肠道病毒 71 型感染动物模型研究进展[J]. 安徽医学, 2012, 33(9):1249-1251.
- [56] 张连峰, 秦川. 常见和新发传染病动物模型[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012:64-73.
- [57] 宋杰, 胡雅洁, 董少忠. EV71 和 CA16 研究进展综述[J]. 生命科学, 2018, 30(3):241-247.
- [58] WANG J J, QI S D, ZHANG X L, et al. Coxsackievirus A 16 infection does not interfere with the specific immune response induced by an enterovirus 71 inactivated vaccine in rhesus monkeys[J]. *Vaccine*, 2014, 32(35):4436-4442.
- [59] 胡雅洁, 宋杰, 汤贝贝, 等. EV71 与 CA16 感染恒河猴 CD1c<sup>+</sup> DC 诱导 IFN-I 产生途径及 Th 细胞分化相关分子的比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, doi:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2017.01.006.
- [60] ZHANG W, ZHANG L, WU Z Y, et al. Differential interferon pathway gene expression patterns in rhabdomyosarcoma cells during enterovirus 71 or coxsackievirus A16 infection[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447(3):550-555.
- [61] SONG J, HU Y J, HU Y G, et al. Global gene expression analysis of peripheral blood mononuclear cells in rhesus monkey infants with CA16 infection-induced HFMD[J]. *Virus Res*, 2016, 214:1-10.
- [62] Nassef C, Ziemer C, Morrell D S. Hand-foot-and-mouth disease; a new look at a classic viral rash[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2015, 27(4):486-491.

[责任编辑 孙丛丛]