

# EV71 病毒对树鼩原代肾上皮细胞感染模型的建立

杨铭<sup>1</sup>, 胡晓星<sup>1</sup>, 王文广<sup>2</sup>, 张莉<sup>1</sup>, 董书维<sup>1</sup>, 冯悦<sup>1</sup>, 代解杰<sup>2\*</sup>, 夏雪山<sup>1\*</sup>

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所  
树鼩标准化研究与疾病动物模型创建省创新团队, 昆明 650118)

**【摘要】** 目的 建立 EV71 对树鼩原代肾细胞的感染模型。方法 胰蛋白酶消化法获得树鼩的原代肾细胞, 用 EV71 感染树鼩肾细胞, 测定 1、2、4、6 和 8 d 培养上清病毒滴度, 分别用 Western blot 和间接免疫荧光法检测细胞中 EV71 病毒 VP1 蛋白的表达, 以确定 EV71 病毒对树鼩原代肾细胞的感染性。结果 对分离得到的树鼩原代肾细胞进行传代纯化和形态鉴别, 建立以树鼩原代肾细胞为主的细胞培养。用 EV71 病毒感染树鼩原代肾细胞, 感染后 48 ~ 96 h 病毒滴度可达到  $1.3 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL, 说明 EV71 病毒可有效感染树鼩原代肾细胞并有效增殖。Western blot 检测发现, EV71 病毒 VP1 蛋白可在感染后 2 ~ 8 d 的树鼩原代肾细胞中有效检出, 间接免疫荧光法则在感染后 2 ~ 6 d 细胞的细胞质中检测到病毒 VP1 蛋白的分布。结论 在成功建立树鼩原代肾细胞培养的基础上, 确定了 EV71 病毒对树鼩原代肾细胞的感染性和病毒增殖特性, 初步建立了 EV71 树鼩原代肾细胞感染模型。

**【关键词】** 树鼩原代肾细胞; EV71; 病毒增殖; VP1 蛋白; 感染模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 02-0117-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.02.002

## Establishment of a EV71 virus infection model of tree shrew primary renal cells

YANG Ming<sup>1</sup>, HU Xiao-xing<sup>1</sup>, WANG Wen-guang<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, DONG Shu-wei<sup>1</sup>,  
FENG Yue<sup>1</sup>, DAI Jie-jie<sup>2\*</sup>, XIA Xue-shan<sup>1\*</sup>

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;  
2. Yunnan Provincial Innovation Group of Tree Shrew Standard Culture and Animal Model, Institute of Medical Biology,  
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118)

**【Abstract】 Objective** To establish an enterovirus 71 (EV71) infection model of tree shrew primary renal cells. **Methods** Tree shrew primary renal cells were obtained by trypsin digestion. After subculture and purification, EV71 virus was used to infect these primary cells. The culture supernatant of these EV71-infected cells was collected for virus titer detection at 1, 2, 4, 6 and 8 days post-infection. The cells were collected for detection of EV71 VP1 protein by Western blot assay. Furthermore, the expression and location of VP1 protein in the infected cells were detected by indirect immunofluorescence assay. Vero cells were taken as positive control to evaluate the infectivity of EV71 virus to tree shrew primary renal cells. **Results** Morphologically, the cultured cells were proved to be majorly consisted of the primary renal cells after subculture and purification. The obtained primary cells were infected by EV71 virus. The virus titer was up to  $1.3 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL during 48 - 96 h post-infection, proving that EV71 virus infected and proliferated in the tree shrew primary renal cells. Western blot showed that the viral VP1 protein was detected from infected primary cells at 2 to 8 d post infection. VP1 protein was also observed in the cytoplasm at 2 to 6 d post infection by indirect immunofluorescence. Compared with Vero cells, the infectivity of EV71 virus to tree shrew primary renal cells and its proliferation were confirmed. **Conclusions** Based on the successful establishment of cell culture of tree shrew primary renal cells, the infectivity to the obtained

[基金项目] 国家科技支撑计划项目子课题 (2014BAI01B01)。

[作者简介] 杨铭 (1991 -), 男, 硕士生, 研究方向: 病毒树鼩模型。E-mail: qjiangming@163.com

[通讯作者] 夏雪山, 教授, 研究方向: 分子病毒学。E-mail: oliverxia2000@aliyun.com;

代解杰, 研究员, 主要研究方向: 树鼩动物模型。E-mail: dj@imbcams.com.cn

cells and proliferation of EV71 virus in the cells are confirmed. The model of EV71 virus-infected tree shrew primary renal cells is initially established.

**【Key words】** Tree shrew, primary renal cells; EV71 virus; Virus proliferation; Protein VP1; Infection model

Corresponding author: XIA Xue-shan, E-mail: oliverxia2000@aliyun.com; DAI Jie-jie, E-mail: djji@imbcams.com.cn

人肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 是导致人手足口病的主要病原体之一, 主要感染人群为 5 岁以下的婴、幼儿, 重症感染可引发严重的中枢神经系统和心肺系统并发症, 严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。目前, 尽管已有可预防 EV71 感染的疫苗上市, 仍需要建立合适的手足口病动物模型, 用于病毒感染后致病机制研究和药物研发。现有的 EV71 感染动物模型主要为幼龄小鼠或乳鼠、免疫缺陷小鼠, 以及非人灵长类的食蟹猴、恒河猴<sup>[2, 8]</sup>。

树鼩 (*Tupaia belangeri*, tree shrew) 是一种属于攀鼩目的小型哺乳动物, 主要分布于南亚, 东南亚以及中国的西南地区。作为一种与灵长类亲缘关系较近的新型实验动物<sup>[3-5]</sup>, 其体型较小、繁殖周期短、成本较低以及在生理解剖方面和灵长类高度相似等特点, 现已被用于建立了多种人类病毒性疾病的动物模型<sup>[6]</sup>, 如甲型肝炎病毒 (HAV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎 (HCV) 和单纯疱疹病毒 (HSV) 等<sup>[7]</sup>。2012 年, 王文广等<sup>[8]</sup>发现 EV71 能够感染幼龄中緬树鼩, 在手掌、口鼻除出现水泡等典型的手足口病症状, 初步证实树鼩可以作为 EV71 手足口病的疾病动物模型。

在建立病毒感染动物活体模型的同时, 建立合适的动物感染细胞模型, 对于 EV71 感染与致病机制的深入研究, 以及体外药物筛选与评价都至关重要。目前, 与 EV71 相关的体外感染及其机制的深入研究都以细胞系作为主要工具, 在与活体机能更为相似的原代细胞上开展的研究较少报道。本研究在 EV71 可以感染树鼩活体, 认为树鼩可以作为 EV71 病毒感染模型的基础上, 分离培养树鼩的原代肾细胞, 确定 EV71 病毒对其感染与增殖特性, 探索建立 EV71 感染树鼩原代肾细胞模型, 并为建立 EV71 感染树鼩手足口病模型提供必要的佐证。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与 EV71 病毒株

经人工繁育的清洁级, 4 月龄 F1 代雄性中緬树鼩 1 只, 体重 145 g, 由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK(滇)2013-0001】繁育。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料, 饲养和实验操作在昆明理工大学实验动物中心。

EV71 标准株 (2010FJLY008), 来自中国典型培养物保藏中心, 以 Vero 细胞进行培养, 测定其滴度为  $1.1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL。

### 1.2 树鼩原代肾上皮细胞的培养与鉴定

树鼩腹腔注射苯巴比妥进行麻醉, 解剖取出双侧肾脏, 用含青链霉素的 D-Hank's 清洗 3 次, 去除肾蒂及包膜, 用眼科剪将其剪成 1 mm<sup>3</sup> 左右的颗粒状, 转移至含 0.25% 的胰蛋白酶消化液中, 37℃ 孵育 1 h, 每隔 10 min 振荡 30 s。消化 1 h 后用 100 目的网筛过滤, 去除组织块后加入完全培养基 (10% FBS + 90% RPMI 1640) 中和胰酶, 1000 r/min 离心 15 min 离心洗涤 3 次, 获得树鼩原代肾细胞。用含有 5 ng/mL 表皮生长因子 (EGF, 购自 Pepro Tech) 的 RPMI 1640 完全培养基 (10% FBS + 90% RPMI 1640), 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养细胞, 每 2 d 换一次培养基, 并根据细胞生长状况进行胰酶消化传代。

根据原代肾细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶的敏感度差异以及细胞贴壁的时间不同, 对分离得到的原代肾细胞进行纯化, 经 2 次传代培养即可获得较纯的肾细胞。用角蛋白 18 (CK18) 抗体 (Abcam 公司) 和荧光二抗 (goat anti-mouse FITC) 对树鼩肾细胞进行免疫荧光检测, 确定肾上细胞的比例与纯度。

### 1.3 EV71 病毒感染树鼩原代肾细胞与病毒增殖情况测定

按感染复数为 0.1 (MOI = 0.1) 的 EV71 病毒感染 Vero 细胞, 维持培养至 36 h 时收取培养上清, 为用于感染树鼩原代肾细胞的 EV71 病毒液。以感染复数为 2 (MOI = 2) 的 EV71 病毒接种原代树鼩肾细胞, 同时设 Vero 细胞作为阳性对照, 在培养箱中孵育 2 h 后去除上清, 使用 PBS 洗 6 次, 以最后一次洗液作为 0 d 对照。

用完全培养基培养感染病毒的细胞, 每 12 h 收集一次病毒上清, 提取上清中的核酸, 一步法 RT-PCR 检测病毒核酸 (TaKaRa One-Step RT-PCR Kit), 上游引物 VP1-F2: GCCTATATAATAGCACTAGCG-GCAG, 下游引物 VP1-R2: TTGACC ACTCTAAAGT-TACCCACAT, 扩增片段为 507 bp)。TaqMan 荧光定量 PCR 法检测上清中的病毒载量 (TaKaRa One-Step PrimeScript RT-PCR Kit), 上游引物: EvF1 (474-493 bp)-TGGAGCCCCTAAGCCAGATT, 下游引物 EvR1

(577 - 596 bp)-CTCGCAGGTGACATGAATGG, 探针序列为: TaqMan Probe (504 - 528 bp): CCTTG-CATGGCAAACCGCCACTAAC。

#### 1.4 EV71 病毒滴度检测

将 Vero 细胞以  $5 \times 10^3$  的密度接种到 96 孔板中, 取收获病毒上清 50  $\mu$ L, 用无血清的 DMEM 培养基进行 10 倍梯度稀释, 每个梯度设 4 个复孔。将稀释好的病毒接种到长成致密单层的 Vero 细胞中, 每孔 100  $\mu$ L, 正常细胞对照组中仅加入细胞培养液, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h, 弃去孵育液, 加入含 2.5% FBS 的 DMEM 培养基维持液, 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 显微镜下观察细胞病变 (CPE), 直至 CPE 不再增加时 (6 ~ 7 d), 按照 Reed- Muench 法计算病毒滴度 (TCID<sub>50</sub>/mL)。

#### 1.5 树鼯原代肾细胞中 EV71 VP1 的表达检测

Western blot 检测 EV71 VP1 蛋白。感染后 1、2、4、6 d 和 8 d 收集的树鼯原代肾细胞, 及病毒感染与不感染 Vero 细胞, 用 RIPA 裂解液 (购自北京碧云天生物技术) 提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白

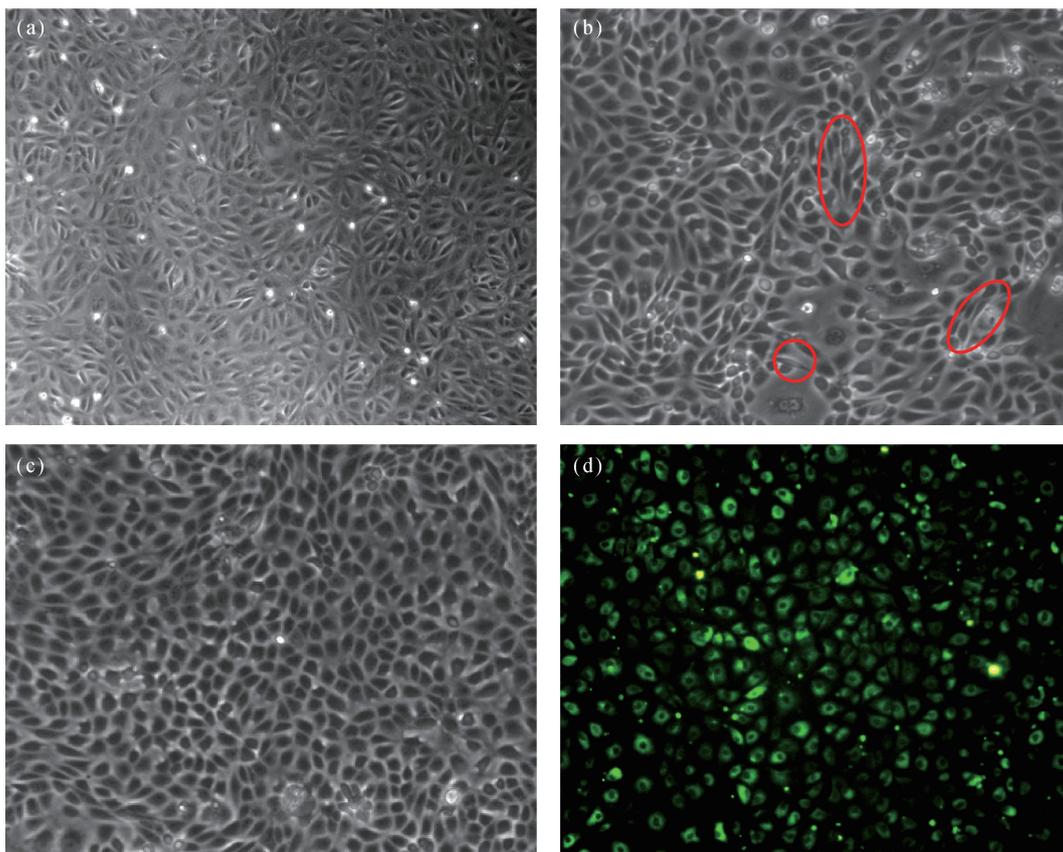
定量后, 按上样量为 20  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后用 anti-mouse VP1 一抗和 HRP 二抗 (Abcam) 进行细胞中 EV71 VP1 蛋白检测。

间接免疫荧光检测 EV71 VP1 蛋白在树鼯肾细胞中的表达。甲醇固定细胞病毒感染后 1、2、4 d 和 6 d 的树鼯原代肾上皮细胞, 经 anti-mouse VP1 一抗和 goat anti-mouse FITC 二抗 (Abcam) 标记, 荧光显微镜下检测被感染细胞中 VP1 蛋白的分布情况。

## 2 结果

### 2.1 树鼯原代肾细胞的分离培养及鉴定

用优化的培养条件对分离得到的树鼯原代肾细胞进行培养至第 4 天, 可显微观察到细胞形态呈现出不规则多边形, 细胞间界限和轮廓较为清晰 (图 1-a), 细胞生长与增殖状况良好。传代纯化传至第 2 代时, 培养细胞中存在较少的成纤维细胞 (图 b 中红色圈所示) 已几乎不见 (图 c), 角蛋白 CK18 抗体进行免疫荧光鉴定发现, 大多细胞呈现出特异性绿色荧光, 树鼯原代肾细胞的纯度达 90% 以上 (图 1d)。



注: 红圈部分表示纤维细胞。

图 1 树鼯原代肾上皮细胞的培养、纯化及鉴定 (10 $\times$ 10)

Note. The red circles represent the fibrocytes.

Fig. 1 Culture, purification and identification of the primary renal epithelial cells from tree shrew

## 2.2 树鼯原代肾细胞培养与细胞增殖

对树鼯原代肾细胞维持培养至 17 d, 通过 MTT 法测定其细胞活力, 绘制树鼯原代肾细胞增殖曲线 (图 2), 同时设 Vero 细胞作为对照进行比较。在优化培养条件下, 树鼯原代肾细胞可有效增殖, 线性增殖可至第 10 天达到细胞增殖平台期。培养前期树鼯原代肾细胞的增殖能力基本等同于 Vero 细胞系, 培养至 11 ~ 17 d 的过程中, 树鼯原代肾细胞增殖能力相比 Vero 细胞逐渐下降, 至 15 d 开始明显下降, 表明 15 d 以后树鼯原代肾细胞开始凋亡。

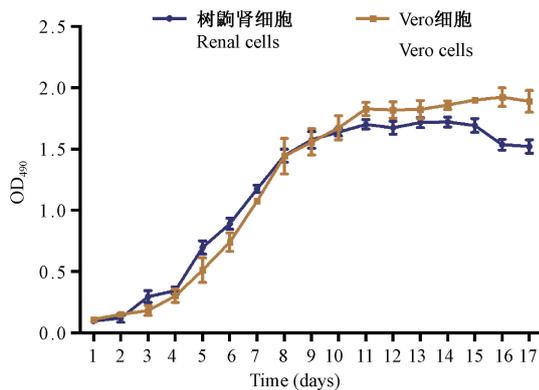


图 2 树鼯原代肾细胞和 Vero 细胞培养增殖特性

Fig. 2 Proliferation of primary renal cells of tree shrew and Vero cells

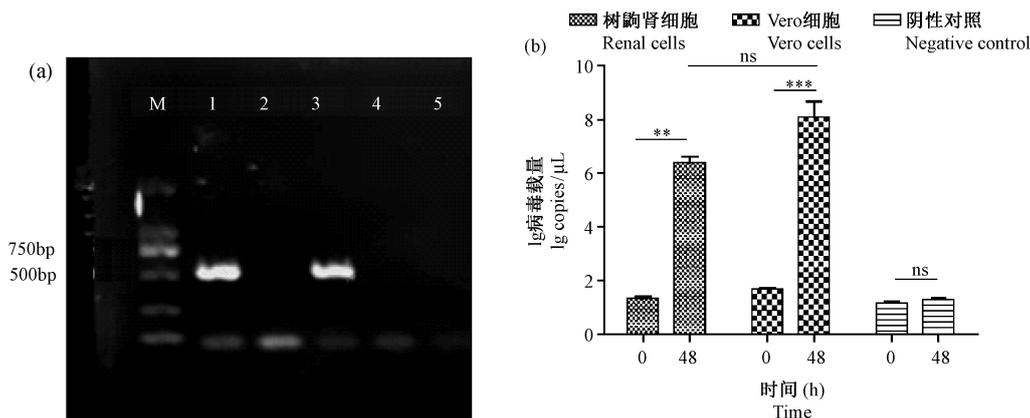
## 2.3 EV71 感染树鼯原代肾细胞与病毒增殖

Vero 细胞接种 EV71 病毒后, 培养 36 h 收取细

胞上清, 经测定上清中病毒滴度为  $1.1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL。用培养得到的 EV71 病毒感染树鼯原代肾细胞和 Vero 细胞, 最后一道洗液及感染 48 h 的培养上清, 提取病毒核酸进行 RT-PCR 检测。如图 3-a 所示, Vero 细胞和树鼯原代肾细胞的培养上清中都能检测到 EV71 的特异性目的条带, 大小为 507 bp, 而洗液及阴性对照均未扩增出目的条带。

用实验室建立的荧光定量 PCR (TaqMan 探针法) 法检测培养上清中的 EV71 病毒载量, 感染树鼯原代肾细胞培养上清中病毒载量为  $10^6$  copies/ $\mu$ L, 远高于洗液中残留的病毒量, 但明显低于阳性 Vero 细胞产生的病毒量 (图 3-b)。据此结果, 可初步确定 EV71 可以感染树鼯原代肾细胞并有效增殖。

以最适感染复数的 EV71 病毒接种树鼯原代肾细胞, 每隔 12 h 收取培养上清测定病毒载量和滴度, 绘制 EV71 在树鼯原代肾上皮细胞中的增殖曲线 (图 4)。根据病毒在树鼯原代肾细胞增殖曲线知, 病毒感染树鼯原代肾上皮细胞 48 h 内, 上清中病毒载量与病毒滴度呈线性升高的趋势, 48 ~ 96 h 上清中病毒随着培养时间的延长缓慢上升, 在 96 h 达到高峰, 然后病毒载量仍可维持较高水平, 但病毒滴度显著下降。通过观察细胞形态发现, 病毒感染 96 h 时细胞已经开始凋亡, 至 192 h (8 d) 时细胞几乎完全脱落。EV71 感染树鼯原代肾细胞后的 48 ~ 96 h 期间病毒滴度最大, 达到  $1.3 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL, 进一步说明 EV71 病毒能够感染树鼯原代肾细胞并



注: (a) M. DL2000 Marker; 1. Vero 细胞感染后培养上清; 2. Vero 细胞洗液; 3. 树鼯原代肾细胞感染后培养上清; 4. 树鼯原代肾细胞洗液; 5. 未感染树鼯肾细胞培养上清。 (b) 0 h 为洗液; ns 为差异无显著性; \*\* 表示  $P < 0.01$ , \*\*\* 表示  $P < 0.001$ , 差异有显著性。

图 3 EV71 感染树鼯原代肾细胞和 Vero 细胞上清中病毒核酸检测

Note. (a): M. DL2000 marker; 1, the culture supernatant of Vero cells after infection; 2, supernatant of the Vero cell after infection; 3, the culture supernatant of tree shrew primary renal cells after infection; 4, wash solution of the tree shrew primary renal cells; 5, cell culture supernatant of the tree shrew primary renal cells was not infected. (b): 0h is wash solution; ns represents non-significant differences; \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  indicate significant differences.

Fig. 3 Detection of the EV71-infected primary renal cells of tree shrew and Vero cells

有效增殖。

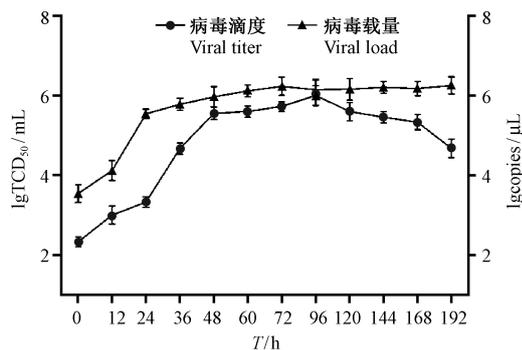


图 4 EV71 在树鼩原代肾细胞中的增殖曲线

Fig. 4 Proliferation curves of EV71 virus in the primary renal cells of tree shrew

#### 2.4 EV71 感染树鼩原代肾细胞中 VP1 蛋白表达

EV71 感染树鼩原代肾细胞后不同时间收集感染上清与细胞, Western blot 法检测被感染细胞内的病毒蛋白 VP1。如图 5 所示, 在感染后的第 1 天, 未能检测到 VP1 蛋白, 而在感染后 2 ~ 8 d 内均能够

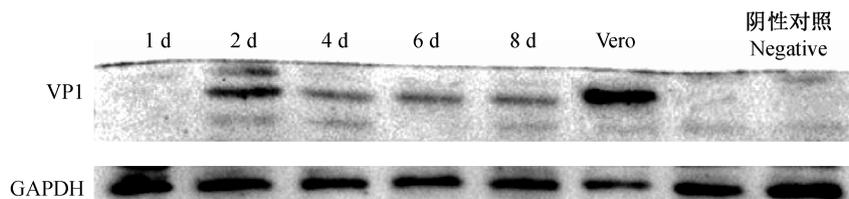


图 5 Western blot 检测 EV71 VP1 蛋白在树鼩原代肾上皮细胞中的表达

Fig. 5 Expression of EV71 VP1 protein in the tree shrew primary renal cells detected by Western blot

### 3 讨论

当前 EV71 感染的动物模型研究主要是以幼龄、免疫缺陷或基因修饰小鼠以及恒河猴作为对象, 但小鼠在遗传和亲缘关系上与人相对较远, 而非人灵长类的恒河猴成本较高。树鼩作为一种低等灵长类动物, 因其与人类的亲缘关系较近、成本低、繁育周期短等优点, 现已被运用于人类相关重大疾病的研究<sup>[7,9,10]</sup>。在王文广等<sup>[8]</sup>关于幼龄树鼩能够感染 EV71 的实验基础上, 本实验采用树鼩的原代肾上皮细胞进行 EV71 体外感染特性的研究。对于原代肾上皮细胞的分离培养已有文献报道, 而本实验采用的是张丽娇等<sup>[11]</sup>报道的胰酶消化法来获取树鼩的原代肾上皮细胞, 通过优化培养条件得到了较纯的树鼩原代肾上皮细胞, 并通过角蛋白 CK18 鉴定<sup>[12,13]</sup>。通过比较 Vero 细胞系和树鼩原代肾上皮细胞的生长特性, 发现树鼩原代肾上皮细胞和 Vero 细胞在 15 d 以内可由对数生长期至平台期, 并能在对数期维持一定的生长活力,

检测到特异性 VP1 蛋白条带。阳性对照 Vero 细胞在被感染后第 2 天的 VP1 蛋白最明显, 然后 4 ~ 8 d 时处于同一水平, 较第 2 天弱一些。未感染的树鼩原代肾上皮细胞 (negative) 未检测到 VP1 蛋白。

免疫荧光法检测 EV71 感染树鼩原代肾细胞后 VP1 蛋白在细胞内表达情况。观察发现, 在感染后的第 1 天, 并未检测到明显的用于标记 VP1 蛋白的绿色荧光反应, 而只能见到 DAPI 复染细胞核的蓝色荧光, 说明病毒还未发生明显的复制活动。从感染后第 2 天开始至第 6 天均能检测到明显的绿色荧光, 主要围绕在细胞核的外周质中, 说明 EV71 的 VP1 蛋白主要表达于被感染细胞的细胞质中, 这一现象和 EV71 感染 Vero 细胞 (4 d) 后的现象相同, 标记 VP1 蛋白的绿色荧光分布于细胞核周围的胞质中。未感染的树鼩原代肾上皮细胞未检测到绿色荧光, 只能见到 DAPI 复染的细胞核。

WB 检测与免疫荧光观察结果均表明, EV71 病毒能够感染树鼩原代肾细胞, 并且在细胞内有效增殖, VP1 蛋白主要存在于细胞质中。

由此说明树鼩原代肾上皮细胞能够充分满足体外 EV71 感染实验的条件。

通过 EV71 对树鼩原代肾上皮细胞和 Vero 细胞感染 48 h 后的核酸以及培养上清病毒载量的测定, 结果是在感染树鼩原代肾上皮细胞的培养上清中能明显检测到了病毒的扩增条带, 这和阳性对照的 Vero 细胞结果一致。并且再测定两种细胞培养上清中的病毒载量时发现没有存在显著性的差异, 且都要明显地高于 0 h 的洗液, 初步确立了 EV71 能够较好地感染树鼩原代肾上皮细胞, 并且病毒能够在细胞内进行复制过程。为了进一步确定 EV71 在被感染细胞内的感染和复制活动, 本研究通过 Western blot 和免疫荧光分别检测了细胞内的 EV71 病毒蛋白 VP1 和定位情况。比较树鼩原代肾上皮细胞和 Vero 细胞的结果, 其能够证明和 Vero 细胞一样, 在经 EV71 感染 2 d 后开始, 此后在不同时间段均能检测到 VP1 蛋白的持续存在, 这和免疫荧光的检测结果相吻合, 说明 EV71 在感染树鼩原代肾上皮细胞后的 6 ~ 8 d 内,

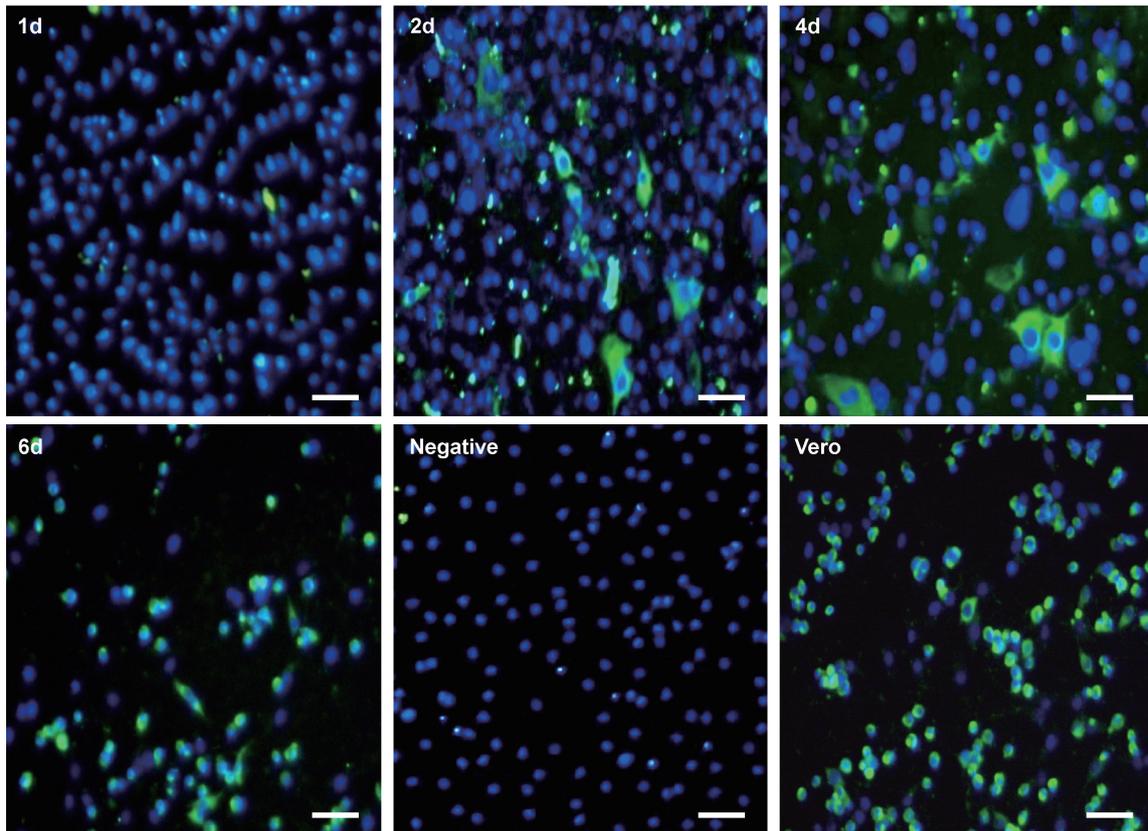


图 6 免疫荧光检测 EV71 VP1 在树鼯原代肾上皮细胞中的表达 (10 × 10)

Fig. 6 Immunofluorescence detection of EV71 VP1 protein in the tree shrew primary renal cells

病毒可持续存在并活动。

通过本研究,我们成功分离并优化了树鼯原代肾上皮细胞的培养条件,得到较纯且生长状态良好的原代肾上皮细胞,进而成功建立了 EV71 的树鼯体外细胞感染模型。在进行树鼯的原代肾上皮细胞感染后,通过系统地评价其感染特性,根据被感染细胞中病毒的核酸和蛋白层面检测结果,均能够证明 EV71 可以感染树鼯体外的原代肾上皮细胞,其特征和 Vero 细胞相符。以上这些研究成果能够为后继进一步深入的研究 EV71 的体外感染机制奠定基础。同时, EV71 对树鼯体外感染模型的建立为将来细胞层面的药物筛选提供了平台,进而也为树鼯活体感染模型的研究提供必要的依据。

#### 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, 13: 936 - 942.
- [ 2 ] 周舒雅, 范昌发, 王佑春. EV71 病毒感染动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学研究*, 2013, 23: 67 - 70.
- [ 3 ] Sargis EJ. New views on tree shrews; the role of tupaiids in primate supraordinal relationships [J]. *Evol Athropol*, 2004, 13: 56 - 66.
- [ 4 ] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree

shrew, a rising model animal genetically related to primates [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1426.

- [ 5 ] 许凌, 范宇, 蒋学龙, 等. 树鼯进化分类地位的分子证据 [J]. *动物学研究*, 2013, 34: 70 - 76.
- [ 6 ] 徐林, 张云, 梁斌, 等. 树鼯实验动物和人类疾病的树鼯模型研究概述 [J]. *动物学研究*, 2013, 34: 59 - 69.
- [ 7 ] 殷安国, 匡德宣, 李晓飞, 等. 树鼯模型在人类病毒性疾病研究中的应用进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22: 86 - 89.
- [ 8 ] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼯 [J]. *动物学研究*, 2012, 33: 7 - 3.
- [ 9 ] Barth H, Cerino R, Aruri M, et al. Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary Tupaia hepatocytes [J]. *J Virol*, 2005, 79: 5774 - 5785.
- [ 10 ] 黄晓燕, 徐娟, 孙晓梅, 等. 树鼯在人类疾病动物模型中应用研究进展 [J]. *实验动物学*, 2013, 30: 59 - 64.
- [ 11 ] 张丽娇, 田园僮, 丁亦男, 等. 小鼠肾细胞分离培养方法的改良 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, 7: 145 - 146.
- [ 12 ] Cartier N, Lacave R, Vallet V, et al. Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene [J]. *J Cell Sci*, 1993, 104: 695 - 704.
- [ 13 ] Mattila P M, Nietosvaara Y A, Ustinov J K, et al. Antigen expression in different parenchymal cell types of rat kidney and heart [J]. *Kidney Int*, 1989, 36: 228 - 233.

[ 收稿日期 ] 2016 - 12 - 08