

王文广,匡德宣,李娜,等. CA16 感染树鼩肺成纤维细胞模型的建立及其受体 SCARB2 的表达[J].中国实验动物学报, 2019, 27(4):479 - 484.

Wang WG,Kuang DX,Li N, et al. Establishment of a tree shrew lung fibroblast model of CA16 infection and the expression of its receptor SCARB2 [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):479 - 484.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2019. 04. 009

CA16 感染树鼩肺成纤维细胞模型的建立 及其受体 SCARB2 的表达

王文广, 匡德宣, 李娜, 陆彩霞, 罕园园, 仝品芬, 孙晓梅, 代解杰 *

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心云南省重大传染病疫苗研发重点实验室;
中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队,昆明 650118)

【摘要】 目的 探讨建立 CA16 感染树鼩肺成纤维细胞(tree shrew lung fibroblasts,TSLF)实验模型的可行性。**方法** 用肠道病毒 CA16 感染 TSLF,以人肺成纤维细胞(KMB-17)作对照,镜下观察细胞病变情况,间接免疫荧光实验观察病毒蛋白和感染相关受体 SCARB2 蛋白的表达情况,探针法实时荧光定量 PCR 检测病毒载量,以 β -Actin 作内参染料法实时荧光定量 PCR 检测受体 SCARB2 基因的相对表达量,结合基因序列比对,分析其与感染的相关性。**结果** CA16 感染 TSLF,可引起明显的细胞病变,免疫荧光实验可见病毒和受体 SCARB2 蛋白,以 100TCID₅₀/10⁵ cells 的比例感染 TSLF 可在 48 h 左右病毒载量达到最高,SCARB2 基因有与感染相关的高表达,而其基因序列也与人有较高同源性。**结论** CA16 可感染 TSLF,树鼩 SCARB2 可参与感染。

【关键词】 CA16;树鼩肺成纤维细胞;感染;SCARB2

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0479-06

Establishment of a tree shrew lung fibroblast model of CA16 infection and the expression of its receptor SCARB2

WANG Wenguang, KUANG Dexuan, LI Na, LU Caixia, HAN Yuanyuan, TONG Pinfen, SUN Xiaomei, DAI Jiejie *

(Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; the Key Laboratory of Yunnan Province for Vaccine Development for Major Infectious Disease Control; Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 6500118, China)
Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of establishing an experimental model of tree shrew lung fibroblasts (TSLF) infected with CA16. **Methods** TSLF were infected with enterovirus CA16, and human lung fibroblasts (KMB-17) were used as controls. The cytopathic effects (CPE) were observed using an inverted microscope. The expression of viral protein and the SCARB2 receptor protein was observed by indirect immunofluorescence assay, and viral load was detected by TaqMan real-time PCR assay. Using β -actin as an internal reference, the relative expression of the SCARB2 gene was detected using SYBR Green real-time PCR, and its correlation with the infection process was analyzed along with the gene sequence alignment. **Results** CA16 infected TSLF and caused obvious CPE. The virus and SCARB2

【基金项目】 云南省应用基础研究面上项目(2018FB045);云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019);云南省重大科技专项(2017ZF007)。

Funded by Yunnan Province Applied Basic Research General Program(2018FB045), Yunnan Province Science and Technology Talent and Platform Program (2017HC019), and Yunnan Province Major Science and Technology Project (2017ZF007).

【作者简介】 王文广(1985—),男,助理研究员,研究方向:人类疾病动物模型。Email: windgoon@foxmail.com

【通信作者】 代解杰(1961—),男,研究员,研究方向:疾病动物模型研究。Email: dj@imbcams.com.cn

protein were observed by immunofluorescence assay. Under the infection rate of $100\text{TCID}_{50}/10^5$ cells, the viral load was highest 48 h after infection. The *SCARB2* gene had a high expression that was associated with infection, and its gene sequence also has a high homology with that of humans. **Conclusion** CA16 can infect TSLF and SCARB2 is related to the infection.

【Keywords】 CA16; tree shrew lung fibroblasts; Infection; SCARB2

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肠道病毒 EV71 (enterovirus 71, EV71) 和 CA16 (coxsackie virus A16, CA16) 是引起手足口病的主要病原体, 随着 EV71 疫苗的上市和对 EV71 型手足口病的有效控制, 人们不得不将焦点转向 CA16, 因为单价 EV71 疫苗尚不能交叉保护抗 CA16 感染, 而针对 CA16 研究的相对滞后使得全面控制手足口病流行的计划受阻。实际上, CA16 早先就曾在世界范围内引发手足口病的大规模流行^[1-4]。我国的一些流行病学调查显示, 在近年来日益增加的手足口病致死病例和爆发事件中, 多半是由肠道病毒 71 型和 CA16 型交替传播或同时传播引起的^[5-11], 并且有证据表明, CA16 感染也可以导致严重的中枢神经系统并发症和死亡^[12]。

因此, 加快 CA16 的基础研究和药物疫苗开发是已经成为当前手足口病防控工作的新重心, 而合适的动物模型是支撑研发工作的关键。现已报道的 CA16 动物模型中^[13-15], 啮齿类的乳鼠和新生小鼠等因其感染年龄偏低、发病周期过短等不足限制其深入应用, 非人灵长类的婴猴模型虽然病程和病症较为理想, 但其实验成本过高而无法广为应用, 尚需开发更为合适的动物模型。另有研究发现 CA16 可经呼吸道感染 2 月龄树鼩, 使之表现出一系列与人相似的症状, 并可检测到病毒血症和病理变化^[16]。在此基础上, 本研究拟通过 CA16 对树鼩肺成纤维细胞 (tree shrew lung fibroblasts, TSLF) 的感染实验, 就其感染特性进行定性与定量研究, 结合 CA16 受体 SCARB2 的表达情况和基因同源性分析结果, 探讨建立其细胞感染模型的可行性, 以期 CA16 感染机制研究或者药物筛选提供一种新的细胞平台和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒

TSLF, 人胚肺二倍体成纤维细胞 (KMB-17), 柯萨奇病毒 A 组 16 型 (CA16) 均来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 其中 TSLF

由本实验室分离保存, CA16 病毒由 KMB-17 细胞培养获得, 滴度为 $8.5 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

1.1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基 (HyClone, 美国), 胎牛血清 (BI, 美国), 0.25% 胰蛋白酶溶液 (HyClone, 美国), 双抗 (HyClone, 美国), 抗 CA16 抗体 (Millipore, 美国), 山羊抗小鼠 IgG H&L-Alexa Fluor® 647 (Abcam, 英国), 抗 Scarb2 抗体 (GeneTex, 美国), 山羊抗兔 IgG H&L-Alexa Fluor® 488 (Abcam, 英国), RNAiso Plus (Takara, 日本), One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (RR064 A, Takara, 日本), One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (RR096 A, Takara, 日本)。

CFX 96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), Eclipse 倒置荧光显微镜 (Nikon, 日本), 二氧化碳培养箱 (Thermo, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 感染实验

将状态良好的 TSLF 制成密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液, 按照 2 mL/孔的量进行六孔板布板, 待基本形成细胞单层 (90% 左右长满), 吸弃培养液, PBS 冲洗细胞单层 1 次, 每孔加 100TCID_{50} 的 CA16 病毒液 1 mL, 孵育 1 h, 吸弃病毒液, 添加无血清的 DMEM 培养液 2 mL, 以 KMB-17 细胞作对照进行同样处理, 持续培养并定期观察细胞病变情况。

1.2.2 CA16 病毒蛋白和受体 SCARB2 蛋白的免疫荧光检测

为同时观察病毒蛋白和相关受体的表达情况, 间接免疫荧光鉴定实验设计为双染, 即其中 CA16 抗体和其二抗均为鼠源, 且二抗为红色荧光标记; 受体 SCARB2 抗体和其二抗均为兔源, 且二抗为绿色荧光标记。具体操作如下: 使用 4% (质量体积比) 的多聚甲醛溶液固定细胞 20 min; 加 PBS 置于水平摇床上清洗 2 min, 反复 3 次; 0.5% (质量体积比) 的 Triton-X100 穿孔 15 min; 同上操作 PBS 清洗 3 次, 山羊血清封闭液封闭 30 min; PBS 清洗 3 次, 双染组同时加入 1% BSA (质量体积比) 稀释的抗

CA16 一抗(1:500)和抗 SCARB2 一抗(1:200),各自单染对照,4℃过夜;PBS 清洗 3 次,分别加入用 PBS 按 1:500 稀释的羊抗鼠(红色荧光)和羊抗兔二抗(绿色荧光),37℃避光孵育 1 h;暗光环境中, PBS 清洗 3 次,滴加 DAPI 染核,避光孵育 2 min; PBS 清洗 3 次,在荧光显微镜下进行观察。

1. 2. 3 病毒载量的检测

将 TSLF 按 5×10⁴/孔布置 24 孔板,待细胞贴壁基本形成单层,以 PBS 冲洗后按 100 TCID₅₀ 每孔接种 CA16 病毒 0.05 mL,无血清 DMEM 培养,实验组按照时间点 2、4、6、8、10、12、18、24、48、72 h 收样,每个时间点样品均设置复孔,设置空白对照。用 RNAiso Plus 提取 RNA,按 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit(RR064 A) 试剂盒说明进行 real-time RT-PCR 操作,根据不同时间点病毒的载量绘制增殖曲线。定量标准品稀释梯度为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴ 拷贝/μL,引物探针根据 CA16 基因序列保守区设计:

CA16-F:5'-GTGACAAGAACCTCATTG-3'
CA16-R:5'-GAGCATATCCCATCAAATC-3'
CA16-P: 5'-(FAM) TGTGAACCATCACTCC
ACGC(BHQ1)-3'。

1. 2. 4 受体 SCARB2 基因相对表达量的检测

以 1. 2. 3 中各个时间点样品所提取的 RNA 为模板,以树鼩 β-actin 作为内参,按照 One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit(RR096 A) 说明进行 real-time RT-PCR 操作,均一化后的基因表达水平以 2^{-ΔΔCq} 计。反应中所使用的引物根据 NCBI 上公布的树鼩 β-actin 和 SCARB2 相关序列设计如下:

β-actin-F:5'-CGGGAAATTGTGCGTGACAT-3'
β-actin-R:5'-AGATTCCATGCCCAGGAAAGA-3'
SCARB2-F:5'-CCCTACATCATCATGGCGCT-3'
SCARB2-R:5'-CAGGCGATGGTTAGGTTTCGT-3'

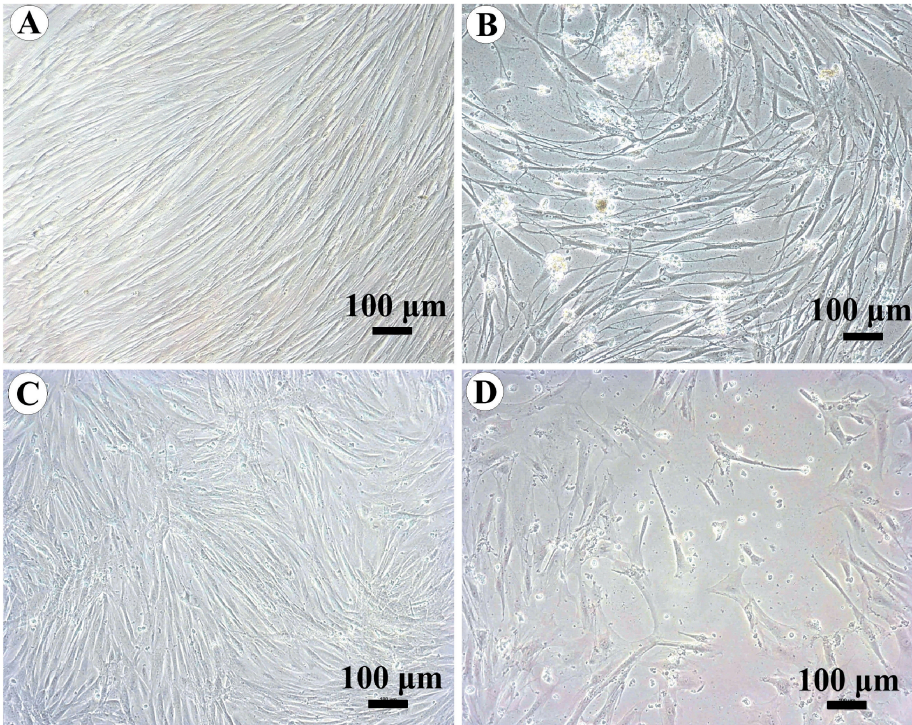
1. 2. 5 SCARB2 基因序列同源性分析

利用 NCBI 的 BLAST 工具对树鼩 SCARB2 基因进行同源性分析,利用 MEGA7 软件构建相关物种的系统进化树。

2 结果

2.1 CA16 感染 TSLF 的显微镜观察

CA16 病毒接种 TSLF 后,定期进行显微镜观察,在感染后 12 h,可见部分细胞变圆脱落;24 h 后,普遍可见细胞解体,游离或成团(见图 1);48 h



注:A;KMB-17 细胞对照;B;CA16 感染 KMB-17(24 h);C;TSLF 细胞对照;D; CA16 感染 TSLF(24 h)。
图 1 TSLF 感染 CA16 后 24 h 的形态
Note. A, KMB-17 control. B, KMB-17 infected with CA16(24 h). C, TSLF control. D, TSLF infected with CA16(24 h).
Figure 1 Morphology of TSLF after 24 hours of infection with CA16

后半数以上面积细胞死亡,72 h 后完整形态的细胞仅有少数可见。TSLF 感染 CA16 的细胞病变情况与 KMB-17 相似,初步观察结果表明 CA16 可感染 TSLF。

2.2 CA16 蛋白和受体 SCARB2 蛋白的免疫荧光观察

在初步观察到 CA16 可引起 TSLF 细胞病变的基础上,通过间接免疫荧光实验对病毒蛋白进行再确认,同时也对感染相关受体 SCARB2 蛋白的表达

情况进行检测,其中双染实验对 CA16 蛋白进行红色荧光标记,对 SCARB2 蛋白进行绿色荧光标记。在荧光显微镜下观察 CA16 感染细胞 24 h 的结果如图 2 所示,红色荧光区域代表 CA16 病毒蛋白,主要存在于细胞质中,少量分布于细胞外,这就再次确认 CA16 可感染 TSLF;同时,可见 TSLF 细胞普遍呈现绿色,表明 SCARB2 受体在 CA16 感染 TSLF 过程中有较多表达,很可能参与了 CA16 的感染进程。

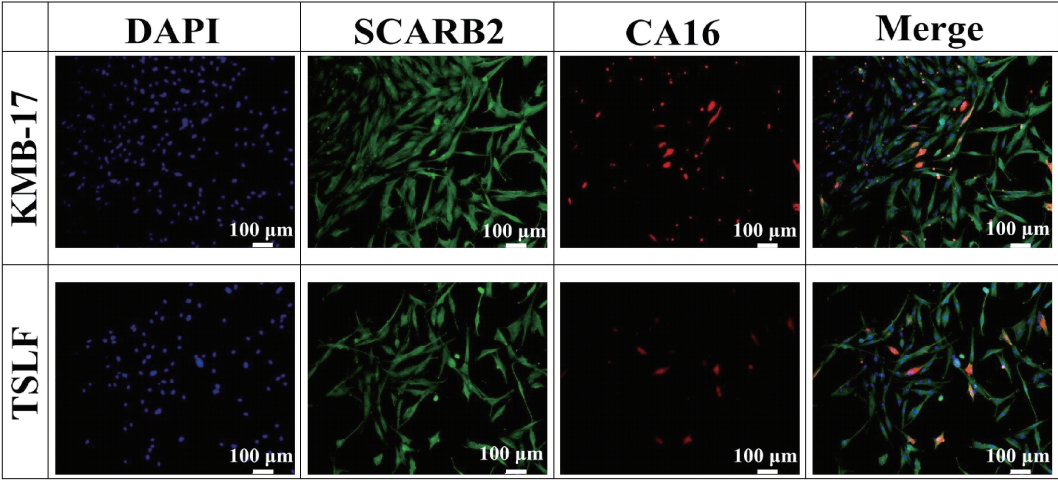


图 2 CA16 病毒蛋白和受体 SCARB2 蛋白的免疫荧光观察
Figure 2 Immunofluorescence observation of CA16 protein and receptor SCARB2 protein

2.3 CA16 病毒载量和受体 SCARB2 基因表达情况

在对 CA16 病毒感染 TSLF 的情况进行定性观察后,再通过实时荧光定量 PCR 进行定量分析。以 100 TCID₅₀/10⁵ cells 的接种密度,CA16 感染 TSLF 后的病毒载量变化如图 3 所示,病毒经过短暂的适应,在 24 h 内病毒基本呈线性增殖,之后增殖趋于缓慢,48 h 达到最高值 9.59×10⁵ copies/mL,此后 24 h 并未出现较大变化。

此前免疫荧光实验观察到 CA16 感染 TSLF 过程中有受体 SCARB2 蛋白的普遍存在,通过相对荧光定量 PCR 对其基因表达情况进行检测,如图 3 所示,SCARB2 基因表达水平有伴随感染进程增高的趋势,前 18 h 基因表达比较活跃,8 h 出现一次小高峰,18 h 出现第二次高峰,而在 24 h 之后则基本维持一个相对较低的表达水平,结合病毒增殖曲线,可以看到在每次受体表达高峰之后都有病毒载量的快速升高,提示 SCARB2 与 CA16 的感染相关。

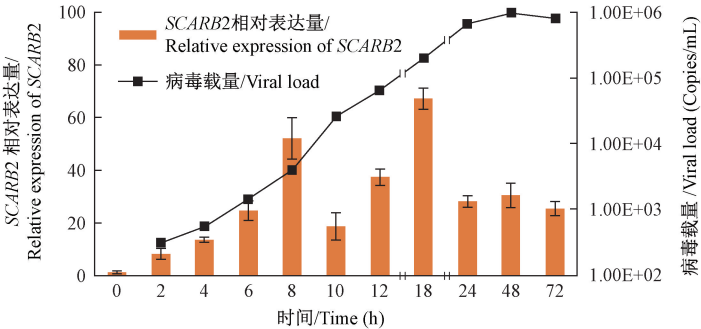


图 3 CA16 增殖曲线和受体 SCARB2 基因相对表达量
Figure 3 Proliferation curve of CA16 and relative expression of receptor SCARB2 gene

2.4 SCARB2 基因序列的同源性分析

利用 NCBI 的在线 BLAST 功能,对树鼩SCARB2 基因预测序列 (XM_006142962.3) 进行比对,结果发现其与人和非人灵长类具有较高的同源性,其中和人 (AK313016.1)、食蟹猴 (NM_001284776.1)、猕猴 (XM_001096458.3)、绿猴 (XM_007998945.1)、土拨鼠 (XM_027939796.1)、裸鼯鼠 (XM_

004848034.2)、小鼠 (BC029073.1) 的同源性分别为 88.69%、87.27%、87.22%、87.15%、85.35%、82.87%、82.25%。选取不同物种的多个 SCARB2 序列利用 mega7 软件进行系统进化树构建,结果如图 4 所示,树鼩与食蟹猴及人的遗传距离最为接近,和啮齿类等动物相距较远。

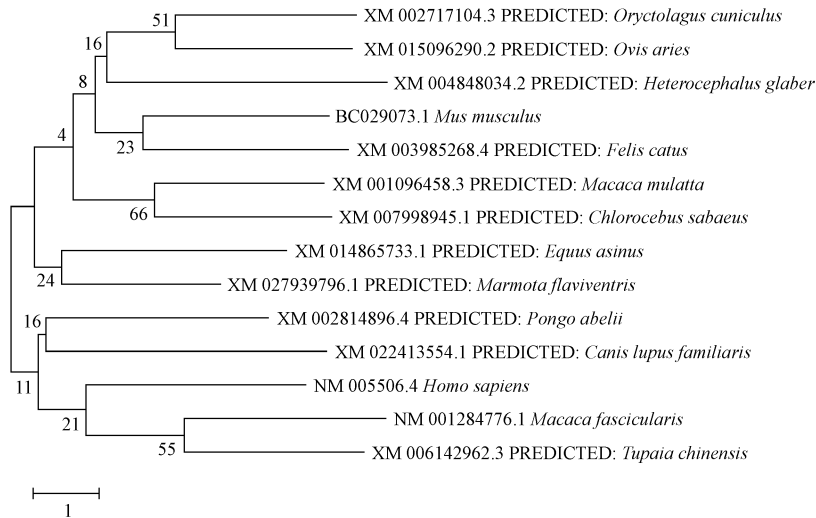


图 4 SCARB2 基因在不同物种的系统进化树
Figure 4 Phylogenetic tree of SCARB2 gene in different species

3 讨论

啮齿类动物较早和较多的应用于 CA16 的研究^[13-14],比较成功的有通过脑内或腹腔接种的乳鼠^[13]、新生小鼠^[13]以及腹腔注射的 21 d 内沙鼠^[17],均能表现出一定的症状,但由于接种年龄、感染方式以及物种差异等因素的影响,无法完全复制 CA16 的病程和病理变化,也就限制了此类动物模型的深入应用。非人灵长类动物模型亦有报道^[15],CA16 经呼吸道感染猕猴,可观察到手足口部疱疹和发热症状,可在血液和多种组织中检测到病毒载量,但其中和抗体反应和病理变化较弱,加之动物成本较高,在 CA16 的基础研究中尚不能广为应用。除了啮齿类和非人灵长类动物模型外,新型实验动物树鼩也被用于肠道病毒相关研究,先后有人成功建立了 EV71 感染树鼩的体内^[18]和体外模型^[19],最近有研究发现树鼩对 CA16 具有易感性^[16],将 CA16 通过呼吸道感染 2 月龄树鼩,发现感染后 4~7 d,树鼩的体温和血中性粒细胞/单核细胞百分比均升高,在其粪便和包括中枢神经系统在内的多种组织中检测到高载量病毒,同时在其肺、肾

等组织中也发现细胞损伤和炎性细胞浸润等病变,提示树鼩可用来建立 CA16 感染的动物模型。本研究实验发现,CA16 感染可引起 TSLF 出现变圆、脱落和裂解等细胞病变;免疫荧光实验可见 CA16 病毒蛋白的表达;根据实时荧光定量 PCR 数据可绘制出病毒增殖曲线,定性与定量数据均表明 CA16 可感染 TSLF,这与 CA16 体内感染可致树鼩肺组织损伤的结果一致,基本确定建立该细胞感染模型是可行的。多项研究证明^[20-21],清道夫受体 b 亚类成员 2 (SCARB2)是 CA16 的受体,树鼩的 SCARB2 受体基因序列与人具有较高的同源性(88.69%),其进化关系比啮齿类更接近于人和非人灵长类。本研究通过免疫荧光双染实验同时观察到 CA16 病毒蛋白和 SCARB2 受体蛋白的分布,而且检测到受体基因表达水平与病毒增殖相关,基本确定树鼩的 SCARB2 参与 CA16 感染,支持 CA16 感染树鼩的模型的建立,同时也提示了树鼩对人肠道病毒易感的理论依据和先天优势。当然,SCARB2 仅仅是报道的 CA16 受体之一,如何介导感染进程尚需进一步验证,此外,还有哪些受体以及如何参与还需开展更多的实验研究。

参 考 文 献 (References)

- [收稿日期] 2019-03-28