

段素琴,杨亚平,杨凤梅,等. 人柯萨奇 B2 病毒感染恒河猴模型的初步研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 52-60.
Duan SQ, Yang YP, Yang FM, et al. Preliminary study on the infection of rhesus monkeys by human coxsackie B2 virus [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 52-60.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12. 008

人柯萨奇 B2 病毒感染恒河猴模型的初步研究

段素琴[#],杨亚平[#],杨凤梅,李艳艳,刘 权,赵 远,马绍辉,和占龙^{*}

(中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明 650118)

【摘要】 目的 通过对人柯萨奇 B2 病毒经口腔感染恒河猴婴猴的感染特征进行初步分析研究,为人柯萨奇 B2 病毒恒河猴感染模型的建立提供实验方法及技术支持,为后续开展其感染机制、病理生理等研究奠定基础。**方法** 将柯萨奇 B2 病毒经口腔感染方式感染 3~4 月龄的恒河猴婴猴,观察记录恒河猴临床症、体温;采集血液检测生理生化指标;血样和疱疹检测病毒;疱疹组织进行病理检测。**结果** 恒河猴感染后 2~5 d 出现手、足、口疱疹;动物出现精神沉郁、活动及饮食量减少的情况;体温呈现稽留热曲线图;疱疹液和血样中都可检测到柯萨奇 B2 病毒;血常规检测出现白细胞减少、单核细胞增加、淋巴细胞数量减少、粒细胞数量增加、嗜酸性细胞增加、嗜碱性细胞减少的情况。血液生化检测发现肝功、肾功、心肌酶都发生了不同程度的升高;疱疹组织病理学显示恒河猴疱疹呈鳞状上皮增厚,表面角化过度,局部坏死伴炎细胞浸润,脓肿形成。**结论** 人柯萨奇 B2 病毒感染婴猴后出现一系列较为特征的手足口疱疹、临床症状、生理生化、病毒血症等情况,表明经口腔感染方式恒河猴婴猴可以成功构建柯萨奇 B2 病毒感染的动物模型,建立的相关检测方法和技术是可行的,为后续建立开展恒河猴柯萨奇 B2 病毒感染模型、发病机制研究、药物及疫苗的评价奠定了实验基础。

【关键词】 手足口病;人柯萨奇 B2 病毒;恒河猴模型;口服感染

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 12-0052-09

Preliminary study on the infection of rhesus monkeys by
human coxsackie B2 virus

DUAN Suqin[#], YANG Yaping[#], YANG Fengmei, LI Yanyan, LIU Quan, ZHAO Yuan, MA Shaohui, HE Zhanlong^{*}
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College,
Yunnan Key Laboratory of Major Infections Diseases Vaccine Development, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To provide experimental method and technical support for the establishment of a rhesus monkey model of human Coxsackie B2 virus infection for analyzing the infection characteristics of human Coxsackie B2 virus in rhesus monkey models. **Methods** Coxsackie B2 virus was inoculated orally to infect infant rhesus monkeys aged 3-4 months. The clinical symptoms, body weight and temperature of the rhesus monkeys were observed. Blood was collected to detect physiological and biochemical indexes. Virus titers were analyzed in the blood and herpes tissues. Herpes tissues were pathologically examined. **Results** Herpes appeared on the hands, feet and mouth 2-5 days after infection; animals showed

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-2-001);云南省科技创新人才计划(2015HC027);昆明市科技创新和服务能力提升计划重点项目(2016-2-R-07674);云南省重大科技专项(2017ZF020)。

【作者简介】 段素琴(1992—)女,研究生,研究方向:人手足口病病原动物模型的建立。E-mail:duansuqin129@163.com;

杨亚平(1992—)女,硕士生,主要研究方向:人手足口病病原动物模型的建立。E-mail:786590057@qq.com [#]共同第一作者

【通信作者】 和占龙(1972—)男,研究员,硕士生导师,研究方向:非人灵长类疾病模型建立及机制研究。E-mail:hzl@imbcams.com.cn

depression, decreased activity and diet intake. Coxsackie B2 virus was detected in the herpes and serum samples. Rhesus monkeys infected with the virus routinely developed leukopenia, and had increased numbers of monocytes, granulocytes, and eosinophils, but decreased numbers of lymphocytes and basophils. Blood biochemical tests showed that the liver function, kidney function, and myocardial enzymes were more or less increased. Herpes histopathology indicated that the tissues had squamous epithelial thickening, excessive surface hyperkeratosis, local necrosis with inflammatory cell infiltration, and abscess formation. **Conclusions** Characteristic effects of viral infection in infant monkeys including hand, foot and mouth herpes, clinical symptoms, physiological and biochemical impairments, and viremia, indicating that the rhesus monkeys were successfully infected with Coxsackie B2 virus orally. The established detection method and techniques used were feasible for this type of study and laid an experimental foundation for the subsequent establishment of a model of rhesus Coxsackie B2 virus infection for pathogenesis research and drug and vaccine evaluation.

[Keywords] hand foot and mouth disease; HFMD; human coxsackie B2 virus; rhesus monkey model; oral infection

近年来,手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)在亚太地区呈持续高发态势,中国大陆每年发病数超百万人,死亡近千人,已成为重要的公共卫生问题^[1]。HFMD 主要是由肠病毒 71 (Enterovirus 71, EV-71)、柯萨奇病毒 A16 (Coxsackie virus A16, CA16) 和柯萨奇病毒 A6 (Coxsackie virus A6, CA6) 引起的,但自 2008 年以来,其他的柯萨奇病毒例如 CV-B2、CV-B1 和 CV-B4 等在手足口病人也经常被检测并报道^[2-3]。

人类柯萨奇 B2 病毒 (Coxsackie virus B2, CV-B2), 是一类无包膜, 单股正链 RNA 病毒, 隶属人类肠道病毒 B 组。该病毒感染后可能会发生 HFMD、心肌炎、克山病和无菌的脑膜炎等疾病, 特别是小于 1 岁的婴幼儿由于免疫功能相对不足, 感染后病症较为严重^[4-6]。据报道, 我国早在 1995 年山东就爆发了 CV-B2 导致的病毒性脑膜炎的流行, 在各省都有流行的相关的报道, 并且台湾省于 1999、2002、2003 和 2006 年 CV-B2 的感染率均异常增高^[7-8]。

据报道 CV-B2 可以引发致命的心肌炎, 但到目前为止针对 CV-B2 病毒疫苗和药物的研究和相关的动物模型未见详细报道, 尤其是非人灵长类动物模型^[9]。本研究旨在选择与人最为接近的非人灵长类恒河猴婴猴作为实验模型进行人类柯萨奇 B2 病毒婴猴感染模型的初步研究, 为进一步研究该病毒引起 HFMD 的发病机制、病理生理、药物和疫苗的研发及评价等方面提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取普通级标准、背景清晰、3~4 月龄, 雄性 5 只恒河猴婴猴, 编号分别为 18001、18003、18005、

18007、18009, 实验前对所有动物进行 CV-B2 病毒中和抗体检测均为阴性, 体重 0.6~0.7 kg (误差不大于 10%), 来源于中国医学科学院医学生物学研究所灵长类中心 [SCXK (滇) K2015-0004]; 动物饲养于医学生物学研究所实验动物部 [SYXK (滇) K2015-0006], 光照 12 h/d, 温度 26℃~29℃, 湿度 40%~60%。实验前动物单笼隔离饲养适应两周, 每天饲喂 4 餐, 牛奶和蒸糕为主, 辅助适量水果, 自由饮水。本实验经中国医学科学院医学生物学研究所动物福利伦理委员会审查批准 (批号: DWSP201810002), 动物实验房符合相关标准, 实验期间按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

CV-B2 (RW41-2/YN/CHN/2012) 保存于中国医学科学院医学生物学研究所遗传室。

Takara PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (日本); Tiangen 2 × Taq PCR Mastermix (中国); 琼脂糖 (西班牙); Vivacell EcoDye DNA 染料核酸染料 (美国)。

Sysmex XT-2000i 血细胞仪 (日本希森美康); Mindray BS-2000 自动生化分析仪 (中国迈瑞); Motic 显微镜及成像系统 (中国); BioTeK 酶标仪 (美国伯乐); Thermo 低温高速离心机 (美国); Bio-Rad PCR system (美国); 立式高压灭菌锅 (SX-500, 日本 Tomy 公司); 制冰机 (IMS-200, 常熟雪科); 海尔冰箱 (BCD-215KMLM); 医用低温保存箱 (DW-25L262, 海尔); 移液枪 (Eppendorf, 德国); 枪头 (Axygen, 美国); 1.5 mL 离心管 (Axygen, 美国); 福尔马林 (茂业试剂, 中国); 止血干棉花 (中国); 手术器械 (中国); 肛式体温计 (中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物感染及样本采集

(1)结合人的肠道病毒的主要感染途径,参考Chen 等^[10]的 EV71 建模方式,按照每只动物经口腔感染滴定毒株 10⁶ TCID₅₀/mL 的 CV-B2。

(2)样本采集:于感染后第 0、1、2、3、4、5、7、11、14 天采集后肢静脉血,抗凝血 1 mL、非抗凝血 2 mL。采集感染后第 3 天的疱疹组织浸泡于 10% 福尔马林进行固定,并用无菌棉签蘸取疱疹液保存于-80℃ 冰箱中。

1.3.2 临床观察和记录

(1)第 0~14 天,每天观察 3 次动物临床症状,包括饮食量、活动度、精神状态、疱疹、排便情况等,并进行标准评分记录:正常-0;精神萎靡-1;弓背沉郁-2;活动减少-3;消瘦-4;四肢麻痹-5;濒死或死亡-6;饮食量减少-7;疱疹-8。

(2)第 0~14 天,每天早晨 9:00 测量肛拭体温。

1.3.3 指标检测

(一)血细胞检测和生化检测

取抗凝血 150 μL,按照操作说明测定血细胞。非抗凝血标本在 4℃ 静置半小时,待血清自然析出(无溶血现象),4℃,4000 r/min,离心 10 min,轻轻吸出血清至 1.5 mL 离心管中,及时对样品进行生化指标(肝功、肾功、心肌酶)的检测。

(二)血液和疱疹 PCR 的鉴定

1.针对 CV-B2 (RW41-2/YN/CHN/2012) 选择保守序列作为靶基因,通过 Primer Premier 5.0 软件设计两组巢式 PCR 的引物(见表 1),引物昆明硕勤技术有限公司合成。

2.用 TRIzol 法提取感染后的疱疹液和血液的 RNA,以提取的 RNA 作为模板,通过巢式 PCR 对血液和疱疹液中的病毒情况进行检测。首先,用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒进行 RT-PCR,反应体系为:PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 1 μL,2 × 1 Step Buffer 10 μL, RNA 模板 2 μL,F1 1 μL,R1 1 μL,ddH₂O 5 μL。反

应条件为:50℃ 逆转录 30 min,94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,34 个循环后再 72℃ 延伸 7 min。其次,进行二次 PCR,反应体系为:2×Taq PCR Mastermix 12.5 μL,F2 1 μL,R2 1 μL,RT-PCR 产物 2 μL,ddH₂O 8.5 μL。反应条件为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,34 个循环后再 72℃ 延伸 5 min。最后,取 5 μL 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,根据 DNA marker (DL 2000,TaKaRa)、阳性对照、阴性对照判定结果,用凝胶成像系统观察条带大小并拍照。PCR 阳性扩增片段送昆明硕勤测序公司进行测序,通过与 Genbank 中 CV-B2 序列(RW41-2/YN/CHN/2012)进行比对以确定 PCR 检测结果的准确性。

(三)组织病理将固定好的疱疹组织及时送昆明金裕医学检验中心进行制片,HE 染色(hematoxylin-eosin staining),病理结果利用全自动病理图文系统进行扫描观察。

1.4 统计学分析

利用 SPSS 统计学软件,对数据计算均值,以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)进行相关数据分析。

本实验设计考虑实验猴的伦理及研究成本等因素,设计为实验前后对照方案,动物的体温、血细胞、生化检测指标均采取实验前、实验后数据。

2 结果

经口腔方式(消化道)感染恒河猴婴猴后出现体温升高,手、足、口、生殖器等部位出现疱疹,血象、心肌酶、肝功能和肾功能的改变,结合 RT-PCR 和病理结果可以确定恒河猴婴猴感染 CV-B2 后出现了典型的手足口病的症状。

2.1 临床观察记录

恒河猴婴猴感染 CV-B2 后,每天对其进行临床症状观察,体温呈现不规则热型,低热(38℃~39℃之间),感染第 2、7、14 天略有上升(见图 1);在感染初期并没有发生明显的起伏变化,排便均正常。在感染

表 1 CV-B2 的特异性引物
Table 1 Specific primers for CV-B2

引物 Primers	序列(5'-3') Sequences	片段长度 (bp) Product length
F1 (1-20) *	5'- TTTAAACAGCCTGTGGGTTG-3'	2355
R1 (2336-2355)	5'- AGTGCATCAGCTGCTGCTAT-3'	
F2(399-420)	5'- CGCTTCAATACTGACATGGTGT-3'	397
R2 (776-795)	5'- CTTAGGCTGGTTTCGTGTGC-3'	

注:“*”表示括号中的数字显示对应于 CV-B2 (RW41-2/YN/CHN/2012) 的整个基因组的引物的位置。
Note. “*”Numbers in the parentheses show the positions of the primers corresponding to the entire genome of the CV-B2 (RW41-2/YN/CHN/2012).

第 2 天起 5 只实验猴均出现活动减少、精神低迷、饮
食量减少等现象,未出现四肢麻痹和死亡;在感染第
2 天开始,每只猴子均在不同时间点、不同部位出现
手、足、口部疱疹,所有猴子咽部均出现约 2~3 mm 大
小的灰白色疱疹,周围有红晕,伴有充血情况,疱疹症
状在 3~5 d 不等全部消退(见图 2 和表 2)。

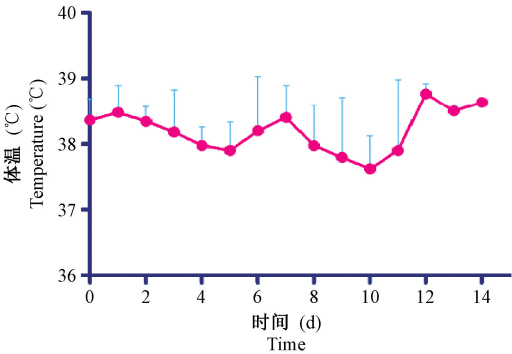


图 1 恒河猴感染 CV-B2 体温变化情况
Figure 1 Changes in body temperature of the
rhesus monkeys infected with CV-B2

2.2 血细胞和生化变化情况

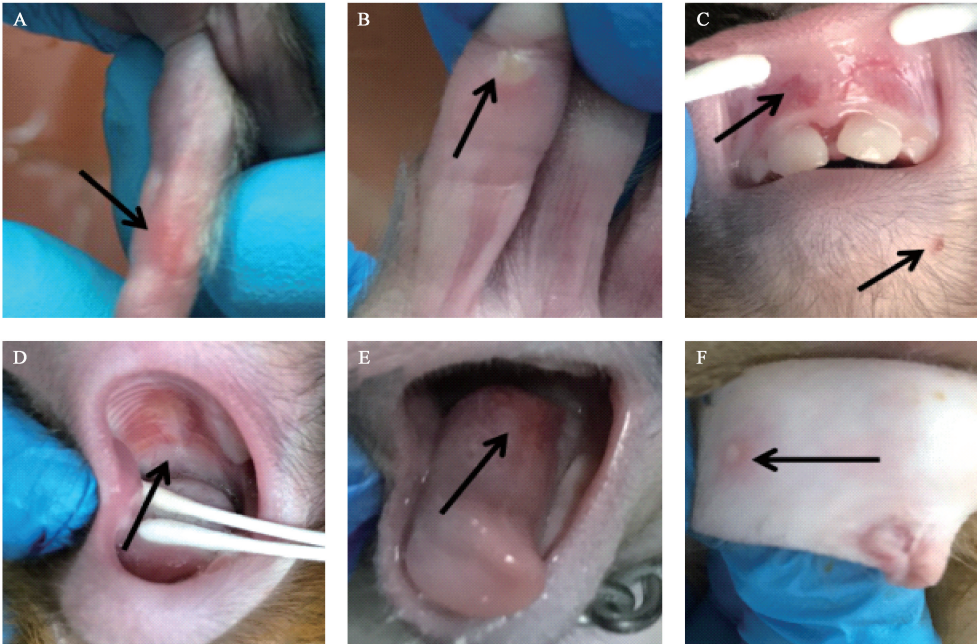
2.2.1 血细胞指标

感染 CV-B2 后恒河猴婴儿白细胞数从第 1 天
开始呈现出下降的趋势,第 3 天回升,之后趋于平稳

(见图 3A);单核细胞在第 1 天升高,然后下降,第 4
天开始上升恢复到正常水平(见图 3B);淋巴细胞
数在感染后第 1 天急剧下降,一直持续到第 4 天达
到最低点,第 5 天开始上升恢复到正常水平(见图
3C);嗜酸性粒细胞总体趋于上升趋势,在第 1 天和
第 11 天出现急剧升高现象(见图 3D);嗜碱性粒细
胞感染后第 1 天出现急剧的下降,持续至 11 d 逐步
回升(见图 3E);中性粒细胞则总体处于上升趋势
(见图 3F)。

2.2.2 生化指标

对恒河猴婴儿的血清进行生化检测,发现心肌
酶、肝功、肾功都发生了相应的改变,心肌酶乳酸脱
氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶
(CKMB)呈现上升趋势,在第 3 天、第 5 天和第 7 天
出现明显的升高(见图 4A、4B、4C)。丙氨酸氨基转
移酶(ALT)、白球比(A/G)、球蛋白(GLB)、总蛋白
(TP)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)发生不同程
度的增高(见图 4D、4E、4F、4G、4H),在第 7 天均出
现最高峰值。血清尿素(UREA)在第 5 天最高,随
后逐渐下降(见图 4I);血清肌酐(CREA)在感染后
第 1 天起急剧增高,一直持续到第 14 天仍然处于较
高水平(见图 4J)。



注:A:感染后手掌疱疹;B:感染后足掌疱疹;C:感染后唇部、牙龈疱疹破溃;D:感染后咽部红肿,充血;E:
感染后舌根部溃疡;F:感染后生殖器(阴囊)疱疹。

图 2 恒河猴感染 CV-B2 的疱疹情况

Note. A, Palmella herpes after infection. B, Palmar herpes after infection. C, lip and gingival herpes after
infection. D, Pharyngeal redness and congestion after infection. E, Tongue root ulcer after infection. F, Genital
infection, scrotal herpes.

Figure 2 Herpes infection in the rhesus monkeys infected with CV-B2

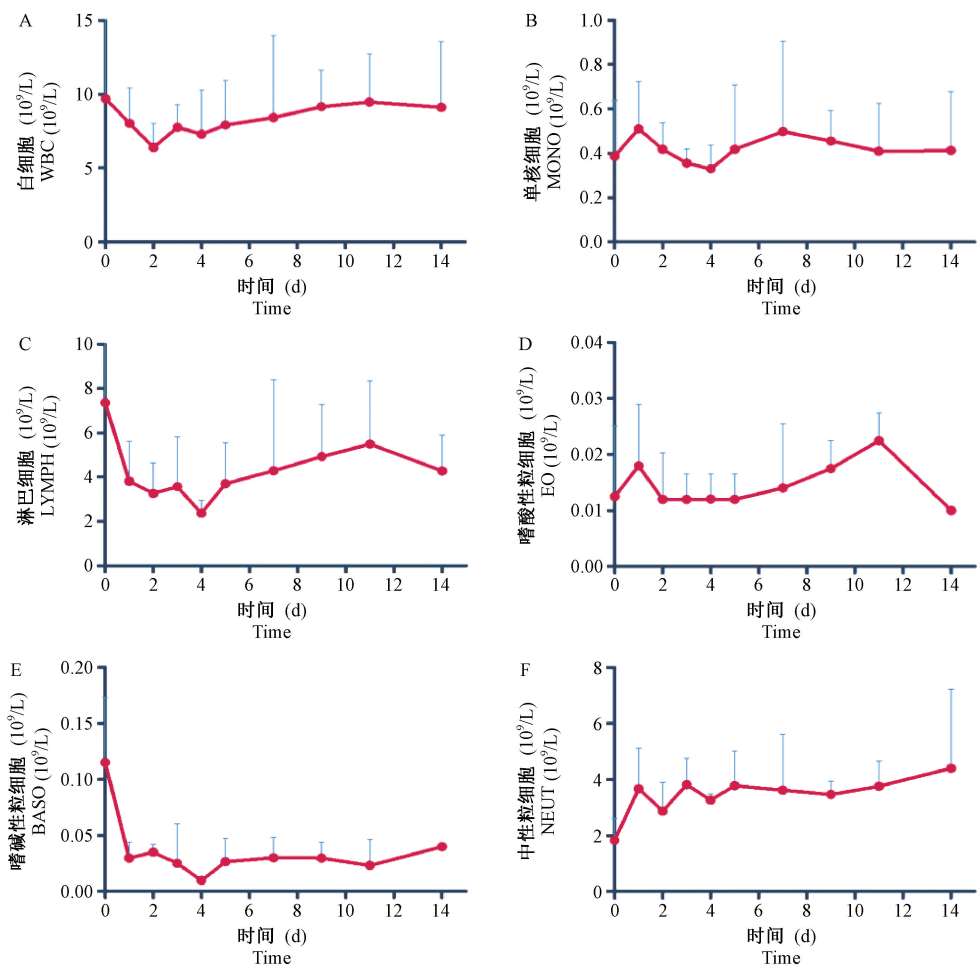
表 2 恒河猴感染 CV-B2 的临床症状

Table 2 Clinical symptoms of the infant rhesus monkeys infected with CV-B2

时间 Time	5 只恒河猴编号 Number of the 5 rhesus monkeys				
	18001	18003	18005	18007	187009
0 d	0	0	0	0	0
1 d	0	0	0	0	0
2 d	1/3/8	1/3/7/8	1/3/7/8	1/3/8	1/3
3 d	1/2/3/8	1/2/3/8	1/2/3	1/3/8	1/2/3
4 d	1/2/3/7	1/2/3/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7/8
5 d	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7/8	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7/8
6 d	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7
7 d	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7
8 d	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7
9 d	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7
10 d	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7
11 d	1/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4/7	1/2/3/4	1/2/3/4
12 d	1/3/4/7	1/4	1/4	1/3/4/7	1/2/3/4
13 d	4	1/3/4	1/4	1/3/4	1/3/4
14 d	1/3	0	1	1	1

注:正常-0; 精神萎靡-1;弓背沉郁-2;活动减少-3;消瘦-4; 四肢麻痹-5; 濒死或死亡-6; 饮水量减少-7; 疱疹-8。

Note. 0, normal; 1, apathetic; 2, back of a bow and depression; 3, decreased activity; 4, emaciation; 5, limb paralysis; 6, agony or death; 7, decreased diet intake; 8, herpes.

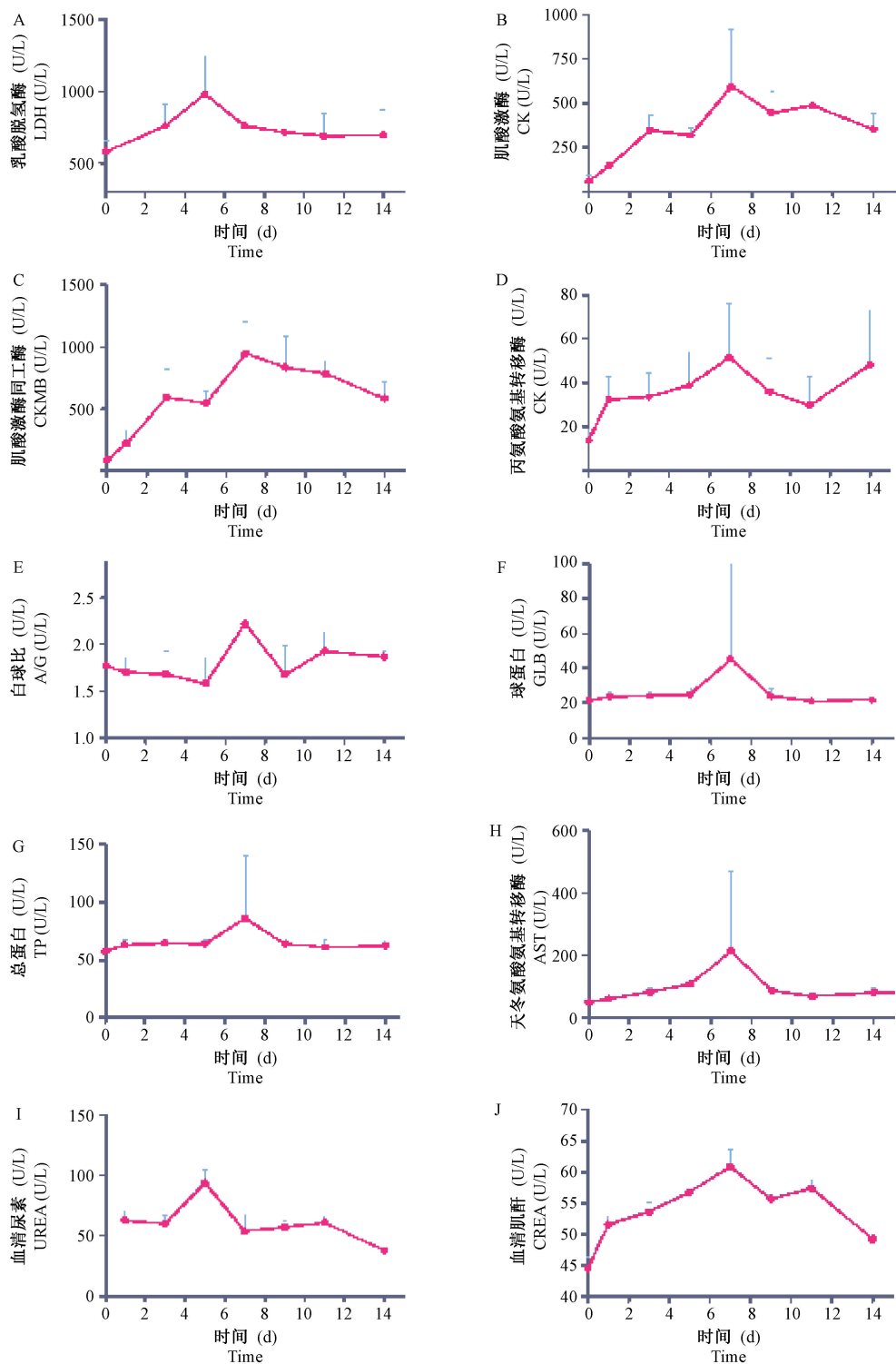


注:A:白细胞 WBC;B:单核细胞 MOMO;C:淋巴细胞 LYMPH;D:嗜酸性粒细胞 EO;E:嗜碱性粒细胞 BASO;F:中性粒细胞 NEUT。

图 3 恒河猴感染 CV-B2 后的血细胞的变化情况

Note. A, white blood cell WBC. B, monocyte MOMO. C, lymphocyte LYMPH. D, eosinophilic EO. E, basophil BASO. F, neutrophil NEUT.

Figure 3 Changes in blood cells of the infant rhesus monkeys infected with CV-B2



注:A:乳酸脱氢酶 LDH;B:肌酸激酶 CK;C:肌酸激酶同工酶 CKMB;D:丙氨酸氨基转移酶 ALT;E:白球比 A/G;F:球蛋白 GLB;G:总蛋白 TP;H:天门冬氨酸氨基转移酶 AST;I:血清尿素 UREA;J:血清肌酐 CREA。

图4 恒河猴婴猴感染 CV-B2 后的血清生化变化

Note. A, LDH. B, CK. C, CKMB. D, ALT. E, A/G ratio. F, GLB. G, TP. H, AST. I, UREA. J, CREA.

Figure 4 Changes in serum biochemistry of the infant rhesus monkeys infected with CV-B2

2.3 血液和疱疹 PCR 的检测结果

琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 产物,扩增产物 400 bp,扩增条带见图 5。经纯化测序,单向测序得 400 bp 序列,该序列与 CV-B2 病毒序列完全一致。

2.4 病理观察结果

感染后第 5 天的疱疹组织通过镜检可以看到疱疹呈鳞状上皮增厚,表面角化过度,局部坏死伴炎细胞浸润,脓肿形成(见图 6)。

3 讨论

手足口病病毒感染动物模型主要包括小鼠、乳

鼠、免疫缺陷小鼠、受体基因修饰小鼠、树鼯和非人灵长类动物等^[11],主要研究集中在 EV-A71, CV-A16, CV-A6 和 CVA10 病原体,引起神经损伤、后肢麻痹以及呼吸道受累等症状^[12-16]。但是柯萨奇 B 病毒主要引起心脏、胰腺、肝、肾等组织器官的病变,不同的临床 CV-B 分离株与 CAR 均有明显的相互作用^[17-18]。早有报道显示,大于 90% 的 CV-B 感染发生在婴儿、儿童和青少年中,因此,建立敏感的新生儿 CV-B 感染的动物模型对于发病机制的研究至关重要^[19]。有研究者利用 3~4 周龄的 C3H/He J 小鼠先后进行了 CV-B3 和 CV-B5 的感染,发现 CV-

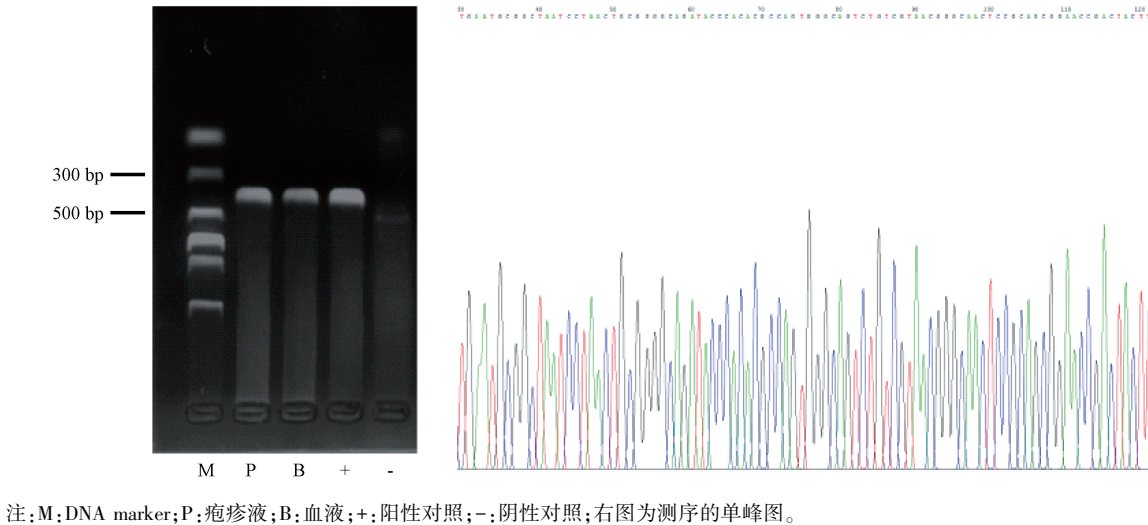
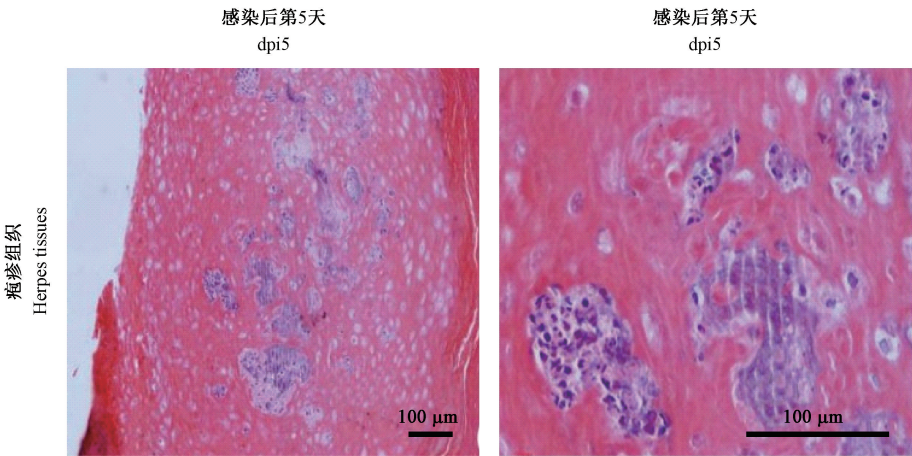


图 5 恒河猴婴猴感染 CV-B2 后血液疱疹检测结果

Note. M, DNA marker; P, herpes liquid; B, blood; +, positive control; -, negative control; right picture is a single peak of sequencing.

Figure 5 Blood herpes test results after the infant rhesus monkeys infected with CV-B2



注:图为恒河猴婴猴在感染 CVB2 第 5 天后的疱疹组织的 HE 染色结果。

图 6 恒河猴婴猴感染 CV-B2 后的疱疹的病理改变(HE 染色)

Note:The picture shows the results of the herpes tissue HE staining of infant rhesus monkeys at 5 days after infection with CVB2.

Figure 6 Pathological changes of herpes in the infant rhesus monkeys after CV-B2 infection(HE staining)

B3 感染可导致小鼠出现胰腺炎和心肌炎,而 CV-B5 感染只引起胰腺炎^[20]。Zhong 等^[21]用 CV-B5 感染 3~4 周龄 BALB/c 小鼠,发现小鼠在感染 6 d 后出现了间质性肺炎和心肌炎。Dong 等^[22]发现 CV-B4 在小鼠模型上可以发生皮质视神经水肿以及心肌炎的症状。最新报道的韩国 Hong 等^[23]利用 CV-B2/04/279 建立的小鼠心肌炎和胰腺炎模型,该模型小鼠感染采用人工注射的方法,这种方式与经呼吸道和消化道等自然感染过程具有一定差别,因此对该病毒感染评价方面会存在一些差异。非人灵长类作为高等模式动物,能够感染肠道病毒的 EV71 和 CA16,至今非人灵长类的 CV-B2 模型尚未有报道^[24]。

本实验通过 CV-B2 经口腔感染方式感染恒河猴婴猴,感染后恒河猴出现 WBC 降低,中性粒细胞升高,提示为病毒的感染,结合文献报道中性粒细胞升高可作为诊断重症手足口病患儿的的一个参考指标,中性粒细胞的增高可能与机体特异性免疫(细胞与体液)功能较低、非特异性免疫炎症反应代偿性增强有关。淋巴细胞的减少可能是因为 CV-B2 直接或者间接诱导细胞凋亡,并且凋亡对机体免疫反应产生抑制作用。CV-B2 感染机体后,单核细胞相应的增加来吞噬病毒,紧接着将所携带的抗原决定簇转交给淋巴细胞,诱导淋巴细胞的特异性免疫反应进而促进免疫应答的发生。研究结果中的嗜酸性粒细胞的升高提示启动了病毒感染的炎症反应,释放了炎性颗粒中的内容物,引起组织损伤。

通过对手足口病婴幼儿患者实验室检测发现心肌酶谱的活性变化和持续时间与心肌细胞坏死程度呈正相关,手足口病病程中动态监测心肌酶的指标是有价值的^[25]。恒河猴感染 CV-B2 后 LDH、CK 升高表明不同程度的心肌损害,而 CK-MB 是心肌特异性同工酶,在心肌细胞中含量最高,正常血清中含量极微,当心肌细胞受损时释放入血,故对判断心肌损害具有高度特异性,因此 CKMB 升高提示心肌的受损^[26],因此我们预测在恒河猴婴猴感染的早期就出现了心肌的损伤情况。

20 世纪初,就有相关报道指出 CV-B2 与肝衰竭的相关性。众所周知,ALT、AST 是人体内广泛分布的酶,主要存在于肝脏、心脏组织细胞中,当这些组织发生病变时,该酶活力增多,表明在感染 CV-B2 后肝细胞受损,细胞膜通透性增加,胞浆内的 ALT、AST 释放入血,导致血清浓度可升高。恒河猴感染

第 7 天 GLB 升高,可能是机体对抗病毒感染持续产生球蛋白发挥免疫作用。TP 和 GLB 水平表现出相同的变化趋势,这可能是二者与 CV-B2 病毒感染后机体代谢增加有关。多项临床研究表明使用丙种球蛋白治疗手足口病可以改善症状,加快恢复^[27-28]。Lin 等^[29]人的研究也表明使用高剂量的丙种球蛋白治疗重症手足口病效果很好。而 A/G 在第七天同时发生增高,说明发生感染之后出现了肝脏的合成功能的异常。同时 CREA、UREA 的改变,同时使肾脏功能受到损伤并也可能发生了一定的病变。

通过 RT-PCR 方法检测血液和疱疹液中病毒,同时疱疹组织出现鳞状上皮增厚,局部坏死伴炎细胞浸润,脓肿形成等病理改变,可以确定引起恒河猴婴猴出现一系列临床症状的病原体为 CV-B2,并出现病毒血症的发生。

因此经口腔方式(消化道)感染恒河猴婴猴后出现体温升高,手、足、口、生殖器等部位出现疱疹,血象、心肌酶、肝功能和肾功能的改变,结合 RT-PCR 和病理结果可以确定恒河猴婴猴感染 CV-B2 后出现了典型的手足口病的症状和多器官的损伤。

基于以上研究的成果,我们认为该模型选取的动物年龄适当、感染方式、样本选取和检测方法和技术是可行的,其所有结果均反映了一个较为完整的病毒感染过程,能够复制和再现相应模型的临床、病原、病理及实验室检测情况,该研究结果为后续利用恒河猴感染建立 CV-B2 手足口病模型,开展致病机制、病理学、免疫学以及药物和疫苗的研发和评价等积累了资料、奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Aswathyraj, S, Arunkumar, G, Alidjinou, E. K, et al. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy [J]. Med Microbiol Immunol, 205 (5): 397-407.
- [2] Zhang J, Zhang H, Zhao Y, et al. Molecular characterization of a new human coxsackievirus B2 associated with severe hand-foot-mouth disease in Yunnan Province of China in 2012 [J]. Arch Virol, 2017, 162(1): 307-311.
- [3] Zhang T, Du J, Xue Y, et al. Epidemics and frequent recombination within species in outbreaks of human enterovirus B-Associated hand, foot and mouth disease in Shandong China in 2010 and 2011 [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67157.
- [4] Pallansch MA, Oberste MS. Enteroviruses and parechoviruses [J]. Clin Virol Manual, 2009: 225-252.
- [5] Kapsenberg JG. Picornaviridae: The Enteroviruses (Polioviruses,

- Coxsackieviruses, Echoviruses) [M]// Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice. 1988; 490-530.
- [6] Sojka M, Wsolova L, Petrovičova A. Coxsackieviral infections involved in aseptic meningitis; a study in Slovakia from 2005 to 2009 [J]. *Euro Surveill*, 2011, 16(30): 19927.
 - [7] 邱厚兴, 赵崇华, 王守军. 滕州市暴发流行柯萨奇 B2 病毒性脑炎 242 例分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 1997, 18(1): 58-59.
 - [8] Huang HW, Chen YS, Chen JY, et al. Phylodynamic reconstruction of the spatiotemporal transmission and demographic history of coxsackievirus B2 [J]. *BMC Bioinformatics*, 2015, 16(1): 302.
 - [9] Gaaloul I, Riabi S, Harrath R, et al. Sudden unexpected death related to enterovirus myocarditis: histopathology, immunohistochemistry and molecular pathology diagnosis at post-mortem [J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1): 212.
 - [10] 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(1): 69-77.
 - [11] 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.
 - [12] 董兆鹏, 张振杰, 杨雷英, 等. 肠道病毒 71 型 (EV-A71) 感染 ICR 小鼠模型的建立 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(6): 671-682.
 - [13] Huang L, Liu X, Li JL, et al. Comparative pathogenicity of Coxsackievirus A16 circulating and noncirculating strains in vitro and in a neonatal mouse model [J]. *Braz J Med Biol Res*, 48(5): 420-426.
 - [14] Mao Q, Wang Y, Gao R, et al. A neonatal mouse model of coxsackievirus A16 for vaccine evaluation [J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 11967-11976.
 - [15] Zhang Z, Dong Z, Li J, et al. Protective efficacies of formaldehyde-inactivated whole-virus vaccine and antivirals in a murine model of coxsackievirus A10 infection [J]. *J Virol*, 2017, 91(13): e00333.
 - [16] Zhang Z, Dong Z, Wei Q, et al. A neonatal murine model of Coxsackievirus A6 infection for evaluation of antiviral and vaccine efficacy [J]. *J Virol*, 2017, 91(9): e02450.
 - [17] Wallot MA, Metzger-Boddien C, Auth M, et al. Acute liver failure associated with Coxsackie virus B2 infection in a neonate [J]. *Eur J Pediatr*, 2004, 163(2): 116-117.
 - [18] Riabi S, Harrath R, Gaaloul I, et al. Study of Coxsackie B viruses interactions with Coxsackie Adenovirus receptor and Decay-Accelerating Factor using Human CaCo-2 cell line [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(1): 50.
 - [19] Romero JR. Pediatric group B coxsackievirus infections [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 323(323): 223-239.
 - [20] Moon MS, Joo CH, Hwang IS, et al. Distribution of viral RNA in mouse tissues during acute phase of coxsackie-virus B5 infection [J]. *Intervirology*, 2005, 48(2-3): 153-160.
 - [21] Zhong Q, Yang Z, Liu Y, et al. Antiviral activity of Arbidol against Coxsackie virus B5 in vitro and in vivo [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(4): 601-607.
 - [22] Dong ZP, Wang Q, Zhang ZJ, et al. Murine model of acute myocarditis and edema of cerebral cortical neurons induced by Coxsackievirus B4 [J]. *Zool Res*, 2018, 39(1): 52-57.
 - [23] Hong J, Kang B, Yeo S, et al. Pathogenesis of coxsackievirus B2 in mice; characterization of clinical isolates of the coxsackievirus B2 from patients with myocarditis and aseptic meningitis in Korea [J]. *J Vet Sci*, 2017, 18(4): 457-464.
 - [24] 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.
 - [25] 范雨娟, 霍宏蕾, 梁连春. 238 例手足口病患儿血细胞及心肌酶谱动态检测及临床意义 [J]. *北京医学*, 2012, 34(6): 462-465.
 - [26] 刘远志, 李侗曾, 于飞, 等. 32 例甲型 H1N1 流感危重患者心肌酶谱结果分析 [J]. *中国预防医学杂志*, 2010, 11(9): 943-944.
 - [27] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(10): a016295.
 - [28] Chen Z, Li R, Xie Z, et al. IL-6, IL-10 and IL-13 are associated with pathogenesis in children with Enterovirus 71 infection [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9): 2718-2723.
 - [29] Lin TY, Chang LY, Huang YC, et al. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections; implications for early recognition and therapy [J]. *Acta Paediatr*, 2002, 91(6): 632-635.

[收稿日期] 2018-12-26