

彭婉君,赵彬彬,武婧,等. 利用遗传多样性小鼠资源筛选 CA16 致病相关基因 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 180-186.

Peng WJ, Zhao BB, Wu J, et al. Screening of CA16 pathogenicity-related genes using Genetic Diversity Mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 180-186.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.02.005

利用遗传多样性小鼠资源筛选 CA16 致病相关基因

彭婉君,赵彬彬,武婧,陈鑫,牛栋,刘江宁*

(北京协和医学院比较医学中心 中国医学科学院医学实验动物研究所,
国家卫健委人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 柯萨奇病毒 A16 型 (Coxsackievirus A16, CA16) 是手足口病主要致病病原体之一,其致病机制尚未明确。本研究利用遗传多样性小鼠 (Genetic Diversity Mice) 筛选 CA16 致病相关基因,深入研究该病毒的致病机制。**方法** 选取 23 个遗传多样性小鼠品系为实验组,近交系 C57BL/6 小鼠为阴性对照组,均经腹腔感染 10^7 Copies CA16 病毒,取材血液和后肢骨骼肌样本,利用实时荧光定量 PCR 测定样本的病毒载量,之后利用 The Gene Mine 系统遗传学数据库分析感染数据,筛选获得 CA16 致病相关基因。**结果** 依据感染小鼠血液和肌肉中病毒拷贝数均高于 10^4 Copies/ $(\mu\text{L}/\text{mg})$ 的筛选标准,得到 7 个对 CA16 易感的遗传多样性小鼠品系,且这些小鼠的骨骼肌组织表现出显著的病理损伤;同时基于 The Gene Mine 专业数据库的相应数据分析,发现小鼠 3 号及 4 号染色体与 CA16 致病最为相关,并最终筛选到 16 个可能与 CA16 致病相关的基因。**结论** 遗传多样性小鼠资源为 CA16 致病相关基因研究提供新思路。

【关键词】 柯萨奇病毒 A16 型;遗传多样性小鼠;致病相关基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0180-07

Screening of CA16 pathogenicity-related genes using Genetic Diversity Mice

PENG Wanjun, ZHAO Binbin, WU Jing, CHEN Xin, NIU Dong, LIU Jiangning*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, National Health Commission; Beijing 100021, China)

Corresponding author: LIU Jiangning. E-mail: ljn_zb03038@126.com

【Abstract】 Objective Coxsackievirus A16 (CA16) is the main pathogenic pathogen of hand, foot and mouth disease (HFMD), but its pathogenic mechanism remains unclear. In this study, Genetic Diversity Mice were used to screen the pathogenic genes of CA16 and to explore the pathogenic mechanism. **Methods** Twenty-three strains of Genetic Diversity Mice were selected as the experimental group and C57BL/6 mice were used as the control group. Both groups were challenged with 10^7 copies of CA16 by intraperitoneal injection. Blood and hind limb skeletal muscle were collected, and the viral load was detected by real-time quantitative PCR. Then, the GeneMine systems genetics database was used to analyze data of infection and to screen CA16 pathogenicity-related genes. **Results** Seven mouse strains and 16 genes associated with CA16 were screened from the infection data of Genetic Diversity Mice. For all seven Genetic Diversity Mice strains, the viral loads in blood and muscles tissue were all $>10^4$ Copie/ $(\mu\text{L}/\text{mg})$ and skeletal muscle showed significant

【基金项目】 中国医学科学院创新工程 (2016-12M-2-006); 国家科技重大专项“重大新药开发” (2016ZX09101120-006)。

Funded by Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences (2016-12M-2-006), and National Major Scientific and Technological Special Project for “Significant New Drugs Development” (2016ZX09101120-006).

【作者简介】 彭婉君 (1995—) 女, 硕士研究生, 专业: 病原生物学。Email: pwj199509@163.com

【通信作者】 刘江宁 (1981—) 男, 副研究员, 硕士生导师。研究方向: 肠道病毒的病原生物学及比较医学。Email: ljn_zb03038@126.com

pathological damage. Based on The GeneMine database, the pathogenicity-related genes were mainly distributed in chromosomes 3 and 4. **Conclusions** Genetic Diversity Mice resources provide a new method for the study of CA16 pathogenicity-related genes.

【Keywords】 Coxsackievirus A16; Genetic Diversity Mice; pathogenicity-related genes

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

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)自 2008 年在中国大陆大规模爆发以来,已成为一种经常流行的病毒性传染病,多发于婴幼儿及 5 岁以下儿童。大部分患儿一周内能痊愈,轻症表现为手足口部位出现疱疹及斑丘疹;但也有少数患儿可迅速发展为严重的神经系统并发症,如急性弛缓性麻痹、无菌性脑炎、脑脊髓炎、暴发性神经性肺水肿等,病死率较高^[1-2]。柯萨奇病毒 A16 型(Coxsackievirus A16, CA16)是手足口病的主要致病病原之一,与肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)经常交替或同时在中国大陆地区传播,引发严峻的公共卫生问题^[3]。随着 EV71 疫苗的面世, EV71 的流行已得到一定的控制,而 CA16 的传播仍是手足口防控的重点,研究其感染、致病机制和开发特异性疫苗、药物是重中之重^[4]。

CA16 与 EV71 一样,都属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(*Enterovirus* genus)人肠病毒 A 种(*human enterovirus*, HEV-A),是一种单链 RNA 病毒^[5-6]。虽然 CA16 与 EV71 具有相似的形态和基因组构成,但这两种病毒引起的手足口病的临床表现和发病机制存在一定差异^[7]。目前研究发现了 EV71 和 CA16 共同的病毒受体类致病相关基因 SCARB2^[8-9] 和 PSGL-1^[10]。近期有研究者发现 CA16 病毒可通过 miR-1303 靶向基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP)进而调节血脑屏障的通透性,导致中枢神经系统的病理改变^[11]。其感染诱导的自噬也可通过抑制 TLR7 信号通路,阻碍 I 型干扰素的产生,最终导致 CA16 在宿主细胞中成功复制^[12]。此外,研究人员还发现维生素 D 受体(Vitamin D receptor, VDR)高表达可抑制 CA16 感染^[13-14]。但迄今为止 CA16 病毒明确的致病机制仍尚未阐明,还需进一步研究。病毒作用机制的研究离不开合适的动物模型,目前 CA16 感染的动物模型主要为单一遗传背景的小鼠、树鼯、以及恒河猴等非人灵长类^[15]。灵长类动物实验成本过高,实验周期较长,无法大规模应用。小鼠体型小、繁殖快,是理想的实验动物,但现有的 CA16 小鼠模型无法完全模拟人体自然感染病毒产生的临床表现,且

模型采用乳鼠,可用于感染研究的周期太短,其免疫系统发育不成熟,限制了该模型在研究 CA16 致病机理中的应用。而遗传多样性小鼠资源(Genetic Diversity Mice, GD Mice)的出现,可部分弥补现有小鼠模型的缺陷。

为了模拟人群的基因多样性,进行复杂性状相关研究,复杂性状联盟(complex trait community, CTC)设计建立了遗传多样性小鼠资源库,将其发展成为一种适用于研究复杂性状或复杂病因疾病的研究工具。遗传多样性小鼠来源于 8 个亲本品系,分别是 A/J、C57BL/6J、NZO/H1Lj、129S1Sv/ImJ、CAST/EiJ、NOD/ShiLj、PWK/PhJ 和 WSB/EiJ;目前经过 8 个亲本品系之间的杂交已获得了数百种品系,每种品系都携带有 8 个原始亲本的遗传信息,覆盖了 90% 的小鼠遗传多样性。由于遗传多样性小鼠具有清晰的遗传背景、分散的遗传位点和丰富的遗传多样性,可模拟多基因疾病,因此被应用于传染性疾病、肿瘤等人类复杂性疾病的人群易感性及预后研究,并取得突破性进展^[16-18]。此外,利用 GD 小鼠的实验设计简单,实验步骤简便,与经典的遗传学分析比较,利用 GD 小鼠进行遗传易感性分析具有明显的优势^[16]。本研究工作利用遗传多样性小鼠这一新型资源库,从新的角度来筛选与 CA16 致病相关的基因,同时也获得新的 CA16 感染的候选模型动物。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 4 ~ 6 周龄的遗传多样性小鼠 96 只,雌雄各半, 23 个品系,体重约为 20 g,由中国医学科学院医学实验动物研究所北方中心【SCXK(京)2014-0011】提供。SPF 级 4 ~ 6 周龄 C57BL/6 小鼠 6 只,雌雄各半,体重约 20 g,购于北京华阜康实验动物技术有限公司【SCXK(京)2014-0008】;本实验得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管理委员会的批准(批准号:LJN18001),于中国医学科学院医学实验动物研究所动物生物安全二级实验室(ABSL-2)中进行实验。实验所用 CA16

病毒为 Shzh05-1 毒株 (NCBI Accession number: 262658), 储存病毒载量为 10^8 copies/mL。

1.1.2 主要试剂与仪器

低温高速离心机 (BECKMAN, 美国), 普通 PCR 仪 (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, 美国); 超低温冰箱 (三洋, 日本); Nano-Zoomer S60 荧光切片扫描仪 (日本); 实时荧光定量 PCR 仪 QuantStudio™ 3 (ABI, 美国) 等。cDNA 反转录试剂盒 (Thermo

Scientific, 美国); Trizol 试剂 (Life Technologies, 美国); 10% 福尔马林中性固定液 (索莱宝, 中国); 实时荧光定量检测染料 (Takara, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 分组

实验组: 23 个品系的遗传多样性小鼠 (表 1); 阴性对照组: C57BL/6J 小鼠 (Negative Control, NC); 空白对照组: C57BL/6J 小鼠 (Blank)。

表 1 实验动物组别

Table 1 Experimental Animal Groups

分组 Groups	品系 Strains	感染途径/剂量 Infection Route/Dose
遗传多样性小鼠 Genetic Diversity Mice	DAVIS, BOM, POH, FIM, DONNELL, YID, GIG, 129S, LIV, FEW, LAM, LOD, TOFU, PIPING, LUV, C57BL/6J, LOT, CIS, KAV, SAT, BEM, NOD, SHE	腹腔注射/ 100 μ L 病毒 Intraperitoneal/ 100 μ L virus
阴性对照组 Negative Control	C57BL/6J	腹腔注射/ 100 μ L 病毒 Intraperitoneal/ 100 μ L virus
空白对照组 Blank	C57BL/6J	腹腔注射/ 100 μ L 磷酸缓冲盐溶液 Intraperitoneal/ 100 μ L PBS

1.2.2 动物感染

4 ~ 6 周龄实验组小鼠及阴性对照组以腹腔注射方式感染 100 μ L 10^8 Copies/ μ L CA16 Shzh05-1 毒株, 空白对照组小鼠腹腔注射 100 μ L PBS。

1.2.3 样本采集

感染 3 d 后, 采用内眦静脉丛处取血方式获得血液样本, 每只取样约 100 μ L, 并置于 1 mL TRIzol 裂解液中, 用于后续核酸提取和病毒载量的检测; 小鼠采用脱颈椎处死, 之后取后肢骨骼肌, 一份置于 10% 福尔马林固定液中用于后续病理检测; 一份液氮速冻, 用于核酸提取和病毒载量检测。

1.2.4 血液和组织样本的核酸提取以及病毒载量检测

血液及肌肉组织采用 TRIzol 法提取 RNA, 之后用反转录试剂盒将 RNA 反转为 cDNA, 并采用染料法进行实时荧光定量 PCR 测定样本中 CA16 病毒的核酸拷贝数。

1.2.5 组织病理检测

将后肢骨骼肌于 10% 福尔马林中固定 72 h, 经梯度酒精脱水后将其包埋在石蜡中, 切片得到的石蜡切片厚度为 5 μ m, 随后进行苏木精-伊红 (HE) 染色, 最后在光学显微镜下观察组织病理变化。

1.3 统计学分析

实验数据用 GraphPad Prism 6 统计软件进行统计分析; 各组数据间的统计学差异采用 *t*-test 进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 实验结果

2.1 CA16 病毒在感染小鼠体内扩增情况

本研究采用的 Shzh05-1 毒株在小鼠模型中临床症状主要为肌肉损伤, 为检测病毒在感染小鼠体内的复制扩增情况, 在小鼠感染 CA16 病毒 3 d 后取血液及后肢骨骼肌组织, 经实时荧光定量 PCR 法测定其中的病毒载量。本实验室前期研究发现, 成年 C57BL/6J 小鼠对 CA16 病毒不易感, 感染后可迅速清除体内病毒, 因此将其设置为阴性对照。对血液中病毒载量进行分析 (图 1A), 发现品系 DAVIS 血液内病毒载量最高可达 10^8 Copies/ μ L, 对照组病毒载量仅有 10^2 Copies/ μ L。将与阴性对照组病毒拷贝数有显著性差异的遗传多样性小鼠品系归为易感品系, 发现 DAVIS、BOM、POH、FIM、YID 这五个品系更为易感。由于实验用毒株的嗜肌性, 骨骼肌检测到的病毒载量 (图 1B) 普遍高于血液, 大多为 10^5 Copies/mg, 品系 FIM 病毒载量最高可达 10^8 Copies/mg, 阴性对照组为 10^3 Copies/mg。血液中病毒载量高的 5 个品系的骨骼肌病毒载量均高于 10^4 Copies/mg, 与血液结果相匹配。而有 2 个品系虽然在血液中病毒载量呈较低水平, 但在骨骼肌中病毒载量与对照组相比存在显著性差异, 也将其列为易感品系, 为 FEW、LAM (图 1C)。

综上所述, 不同品系的遗传多样性小鼠对 CA16 病毒感染的易感性存在明显差异, 分析共筛选出 7 个易感品系, 分别为 DAVIS、BOM、POH、FIM、YID、FEW 和 LAM。

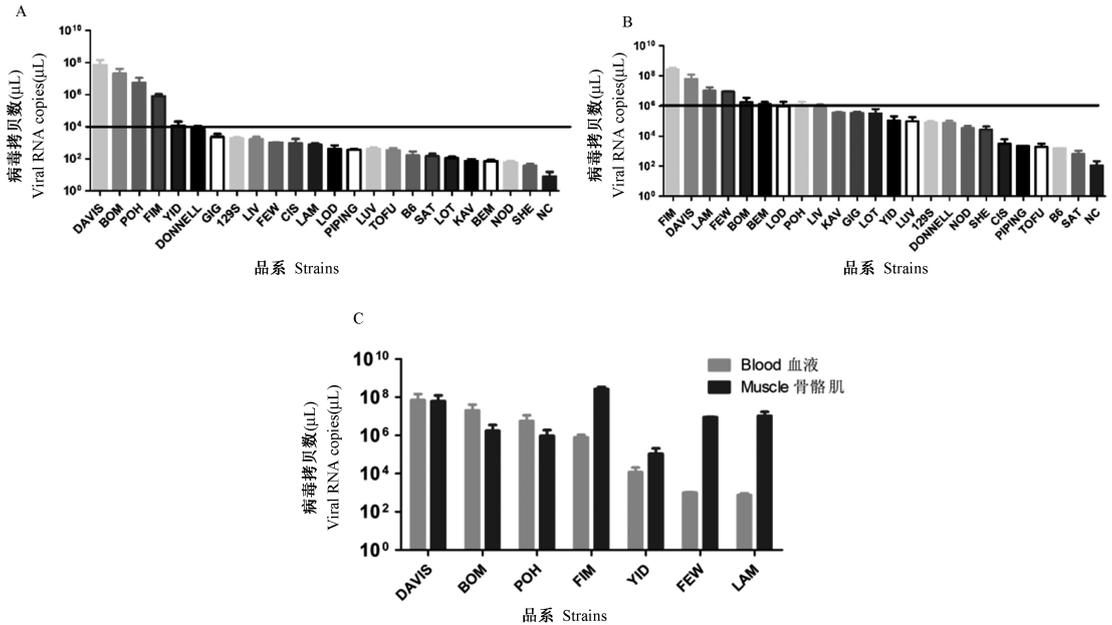
2.2 CA16 感染导致遗传多样性小鼠的组织病理变化

如图 2A 易感品系 FEW 所示,遗传多样性小鼠在 CA16 病毒感染 3 d 后,取后肢骨骼肌进行病理组织检测,发现易感品系的小鼠后肢肌肉发生明显病理损伤,主要表现为:局灶性细胞变性坏死,间质水肿,炎症细胞浸润等。图 2B 为不易感品系 LOD 小鼠肌肉病理表现,损伤较轻,仅有少数炎症细胞浸润。图 2C 为正常肌肉组织,来自空白对照组 C57BL/6J。对比可知,易感品系小鼠病理症状较为严重,而不易感

品系小鼠损伤较轻,这与病毒扩增数据相一致。

2.3 The Gene Mine 数据库筛选 CA16 易感相关基因

The Gene Mine 数据库可分析表型与基因型之间的关系,筛选表型相关基因,专用于遗传多样性小鼠研究^[19-20]。以 CA16 感染的血液病毒载量数据为表型,筛选与之相关的基因位点。分析结果如图 3A 所示,横坐标为小鼠 20 对染色体,纵坐标 LOD 为 *P* 值对数值,LOD 值越高,表明统计学差异越大,相关性越显著。从图可知,CA16 感染致病相关基



注:A:23 个品系遗传多样性小鼠感染 CA16 3 d 后血液病毒载量。B:23 个品系遗传多样性小鼠感染 CA16 3 d 后骨骼肌病毒载量。C:易感品系小鼠感染 CA16 3 d 后血液及肌肉病毒载量。 $n = 4 \sim 6$, 实验组与阴性对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 不同品系遗传多样性小鼠感染 CA16 血液及骨骼肌病毒载量

Note. A, Blood viral load in 23 genetically diverse strains of mice infected with CA16 for 3 d. B, Muscle viral load in 23 genetically diverse strains of mice infected with CA16 for 3 d. C, Viral load in blood and muscle of mice infected with CA16 for 3 d. $n = 4 \sim 6$, Compared between the experimental group and the negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 1 Viral load in blood and skeletal muscle of genetically diverse mice infected with CA16

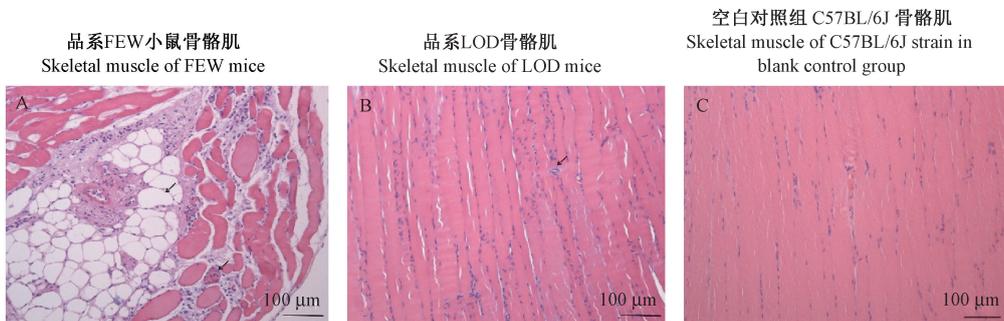


图 2 遗传多样性小鼠肌肉组织病理分析(HE 染色, 标尺 = 100 μm)

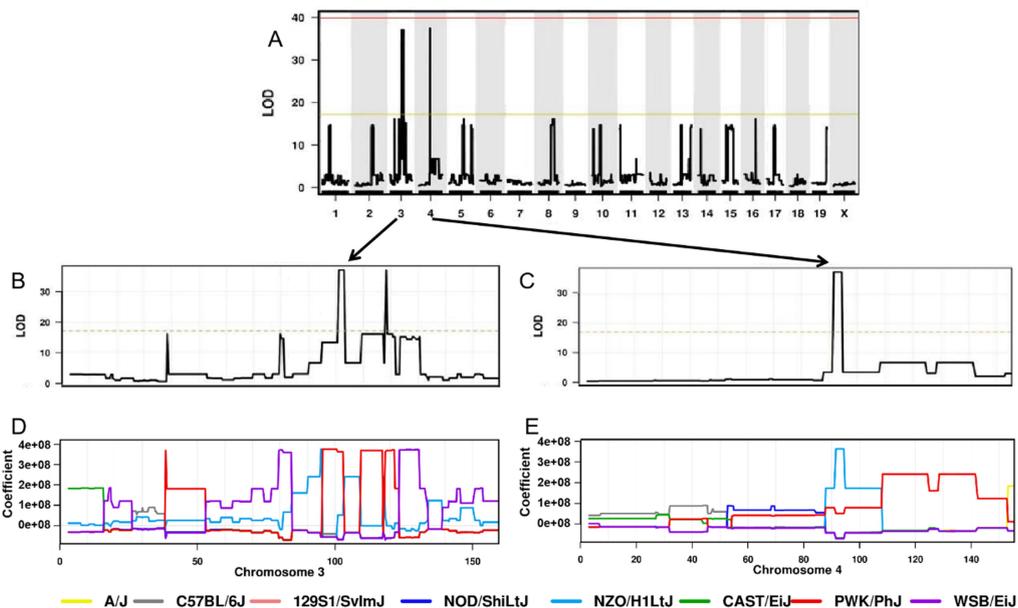
Figure 2 Pathological analysis of muscle tissue in genetically diverse mice(HE staining, Bar = 100 μm)

因主要分布于 3 号及 4 号染色体。进一步对 3 号及 4 号染色体进行分析,发现了三段核苷酸序列具有高 LOD 值(图 3B、C),即 CA16 致病相关基因主要分布于这三段核苷酸序列。图 3D、3E 则表明了这些基因与亲本品系的相关性,相关性越高则数值越大。由图可知 3 号染色体上的主效应基因与亲本 WSB/EiJ 相关性最低,与 PWK/PhJ 相关性最高;4 号染色体上的主效应基因与 WSB/EiJ 相关性最低亲本,NZO/H1LtiJ 相关性最高。

与此同时,The Gene Mine 数据库给出了 16 个与 CA16 病毒感染相关基因(表 2)。经过生物学功能分类,发现:转运相关基因 5 个,分别为 Slc22a15、

Casq2、Dennd2c、Syt6 和 Atp1a1,其功能主要与钠钾钙离子转运相关;细胞生长相关基因 4 个,分别为 Sycp1、Bcas2、Ngf 和 Mab2113;免疫相关基因 2 个,为白细胞分化抗原 Cd2 和黏附因子 Igsf3,二者均为重要的免疫细胞表面功能分子,在机体对外界病毒感染进行免疫应答反应过程中发挥重要作用;转录调控相关基因 2 个,为 Csde1、Nr1h5;代谢相关基因 2 个,为 Dpyd、Ampd1;癌症相关基因 tusc1。

综上所述,利用 The Gene Mine 数据库进行数据分析发现 CA16 致病相关主效应基因集中于小鼠 3 号及 4 号染色体,并从中筛选出 16 个候选基因,为后续 CA16 致病机制研究提供基础。



注:A:CA16 易感基因在 20 对染色体中分布图。B:3 号染色体峰值放大图。C:4 号染色体峰值放大图。D:3 号染色体基因亲本相关性图。E:4 号染色体基因亲本相关性图。

图 3 The Gene Mine MugaQTL 遗传分析图

Note. A, Distribution of CA16 susceptibility gene in 20 pairs of chromosomes. B, Peak magnification of chromosome 3. C, Peak magnification of chromosome 4. D, Parental correlation diagram of chromosome 3. E, Parental correlation diagram of chromosome 4.

Figure 3 The Gene Mine MugaQTL genetic analysis map

表 2 CA16 感染致病相关基因列表

Table 2 Genes related to CA16 pathogenicity

类别 Category	基因名称 Gene Name
代谢相关类 Metabolic related genes	Dpyd、Ampd1
转运相关类 Transport related genes	Slc22a15、Casq2、Dennd2c、Syt6、Atp1a1
细胞生长相关类 Cell related genes	Sycp1、Bcas2、Ngf、Mab2113
转录调控类 Transcription regulation related genes	Csde1、Nr1h5
癌症相关类 Cancer related genes	tusc1
免疫相关类 Immune related genes	Cd2、Igsf3

3 讨论

柯萨奇 A16 病毒是手足口病的主要致病病原,与 EV71 病毒成为近年来我国手足口病流行的主导病毒^[21],其感染也可引起严重心肌炎、急性心力衰竭,甚至死亡^[22]。传染性疾病在人群中的临床表现存在个体差异性,因此通过单一遗传背景的小鼠已无法建立有效的动物模型复制人类疾病。遗传多样性小鼠以其更加丰富的性状差异与遗传多样性,成为一种研究复杂性状疾病的新型资源,是探究

CA16 致病相关基因的理想研究对象。

本研究共感染了 23 个品系的遗传多样性小鼠,不同品系对 CA16 病毒感染表现出不同易感性,从中我们筛选出 7 种易感品系,分别为 DAVIS、BOM、POH、FIM、YID、FEW 和 LAM。易感品系小鼠感染病毒后病毒在体内大量扩增,后肢骨骼肌表现出明显病理损伤。在本实验室前期发表文章中,不同品系遗传多样性小鼠对 EV71 病毒感染同样存在不同易感性,易感品系与 CA16 比较发现存在 5 个重叠品系,分别为 DAVIS、BOM、POH、FEW、LAM,其主效应基因均与亲本 WSB/EiJ 相关性最低^[20]。之前研究发现 CA16 与 EV71 感染在体内复制、病理损伤等方面极为相似,目前 EV71 与 CA16 共感染还未有疫苗或针对性药物,该发现将会为手足口病病毒共感染模型建立提供前期基础。

此外,通过 The Gene Mine 数据库分析,高效快速的筛选出 16 个 CA16 致病相关基因,分别为免疫相关类、代谢相关类、转运相关类、细胞生长相关类、转录调控相关类和癌症相关类。免疫反应是机体抵御外界微生物入侵的主要道防线,免疫相关类基因也是本研究的关注重点。Cd2 (CD2 antigen) 是目前研究较为透彻 T 细胞表面抗原,主要由 T 细胞及自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 表达,可与 LFA-3 (CD58) 和 CD48 结合使 T 细胞活化,在适应性免疫中发挥较为重要的作用^[23-25]。Igsf3 (immunoglobulin superfamily member 3) 属于免疫球蛋白超家族^[26]。目前研究发现这种膜蛋白,可能具有黏附因子特性,为免疫细胞应答提供活化或抑制信号,具体功能还需深入研究。除此之外,转运相关类基因在候选基因中占较大比重,可通过建立基因敲除小鼠模型进一步深入研究该类基因在 CA16 感染中的作用。

综上所述,本研究通过遗传多样性小鼠资源筛选出 7 个 CA16 感染易感品系,16 个感染致病相关基因,为 CA16 病毒致病机制研究与新型动物模型的建立提供新的思路。其中 Cd2 与 Igsf3 基因可能与 CA16 感染密切相关,下一步将进一步验证这些候选基因,通过建立基因敲除小鼠模型,进一步研究该基因在病毒感染中的具体功能与 CA16 病毒的致病机制。

参 考 文 献 (References)

[1] 杨芳,于石成,张菊英,等. 2008-2011 年我国大陆地区重症手足口病流行特征分析[J]. 疾病监测, 2013, 28(11): 888-893.

Yang F, Yu SC, Zhang JY, et al. Epidemiology of severe hand foot and mouth disease in the mainland of China, 2008-2011 [J]. *Dis Surveillance*, 2013, 28(11):888-893.

[2] Wang Y, Feng Z, Yang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility [J]. *Epidemiology*, 2011, 22(6): 781-792.

[3] Yin DQ, Wang CB, Wang CB, 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.

[4] Mao QY, Wang Y, Bian L, et al. EV71 vaccine, a new tool to control outbreaks of hand, foot and mouth disease (HFMD) [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 15(5): 599-606.

[5] Mao Q, Wang Y, Yao X, et al. Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(2): 360-367.

[6] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification [J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 1941-1948.

[7] Song J, Hu Y, Zheng H, et al. Comparative analysis of putative novel microRNA expression profiles induced by enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections in human umbilical vein endothelial cells using high-throughput sequencing [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 73: 401-410.

[8] Li X, Fan P, Jin J. Establishment of cell lines with increased susceptibility to EV71/CA16 by stable overexpression of SCARB2 [J]. *Virol J*, 2013, 10: 250.

[9] 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.

[10] Nishimura Y, Shimajima 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.

[11] Song J, Hu Y, Li H, et al. miR-1303 regulates BBB permeability and promotes CNS lesions following CA16 infections by directly targeting MMP9 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 155-170.

[12] Song J, Hu Y, Li J, et al. Suppression of the toll-like receptor 7-dependent type I interferon production pathway by autophagy resulting from enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections facilitates their replication [J]. *Arch Virol*, 2018, 163(1): 135-144.

[13] Qu M, Di S, Zhang S, et al. Vitamin D receptor protects glioblastoma A172 cells against Coxsackievirus A16 infection induced cell death in the pathogenesis of hand, foot, and mouth disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(2): 952-956.

[14] Li YP, Wang MQ, Deng HL, et al. Association of polymorphisms in the vitamin D receptor gene with susceptibility to and severity of hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A16 [J]. *J Med Virol*, 92(3): 271-278.

- [15] 姚荣妹, 毛鑫, 曲天歌, 等. EV71 和 CA16 型手足口病动物模型及其病毒感染特点分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 172-180.
Yao RM, Mao X, Qu TG, et al. Animal models of EV71 and CA16 hand-foot-mouth disease and characteristics of viral infection [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2019, 25(08): 172-180
- [16] 杜朋, 陈孟毅, 李程程, 等. 复杂性状遗传 CC 小鼠与精准医学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(8): 30-35.
Du P, Chen MY, Li CC, et al. Collaborative Cross mice and precision medicine [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(8): 30-35.
- [17] 孔琪, 夏霞宇, 秦川. 复杂性状遗传 CC 小鼠信息资源及研究应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7): 11-14, 73.
Kong Q, Xia XY, Qin C. The Collaborative Cross mice resource information and application [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(7): 11-14, 73.
- [18] 李克娟, 高苒. 复杂性状遗传 CC 小鼠-肿瘤研究新平台 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(8): 25-29.
Li KJ, Gao R. Collaborative Cross mice as a novel platform in cancer research [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(8): 25-29.
- [19] Morahan G, Balmer L, Monley D. Establishment of "The Gene Mine": a resource for rapid identification of complex trait genes [J]. Mamm Genome, 2008, 19(6): 390-393.
- [20] 陈鑫, 赵彬彬, 武婧, 等. 通过遗传多样性小鼠筛选 EV71 致病相关基因 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 8-13+44.
Chen X, Zhao BB, Wu J, et al. Screening of EV71 pathogenicity-related genes using genetic diversity mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 8-13, 44.
- [21] Zhao K, Han X, Wang GJ, et al. Circulating coxsackievirus A16 identified as recombinant type A human enterovirus, China [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(8): 1537-1540.
- [22] Wang CY, Li Lu F, Wu MH, et al. Fatal coxsackievirus A16 infection [J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(3): 275-276.
- [23] Zaru R, Cameron TO, Stern LJ, et al. Cutting edge: TCR engagement and triggering in the absence of large-scale molecular segregation at the T cell-APC contact site [J]. J Immunol, 2002, 168(9): 4287-4291.
- [24] Brown MH, Boles K, Anton van der MP, et al. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48 [J]. J Exp Med, 1998, 188(11): 2083-2090.
- [25] Fraser HI, Howlett S, Clark J, et al. Ptpn22 and Cd2 variations are associated with altered protein expression and susceptibility to type 1 diabetes in nonobese diabetic mice [J]. J Immunol, 2015, 195(10): 4841-4852.
- [26] Usardi A, Iyer K, Sigoillot SM, et al. The immunoglobulin-like superfamily member IGSF3 is a developmentally regulated protein that controls neuronal morphogenesis [J]. Dev Neurobiol, 2017, 77(1): 75-92.

[收稿日期] 2019-12-27