

侯婧涵,段素琴,徐鸿界,等.柯萨奇病毒 A 组 6 型和 B 组 1 型混合感染叙利亚金黄地鼠动物模型的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 30-40.

Hou JH, Duan SQ, Xu HJ, et al. Coinfection with coxsackievirus A6 and B1 in a Syrian hamster animal model [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 30-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.003

柯萨奇病毒 A 组 6 型和 B 组 1 型混合感染叙利亚金黄地鼠动物模型的实验研究

侯婧涵^{1,2*}, 段素琴^{1,2*}, 徐鸿界^{1,2}, 孙文亭^{1,2}, 李明学^{1,2}, 李艳艳^{1,2},
靳玮华^{1,2}, 陈丽雄^{1,2}, 刘 权^{1,2}, 赵 远^{1,2}, 杨凤梅^{1,2#}, 和占龙^{1,2#}

(1. 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; 2. 呼吸与共病全国重点实验室, 北京 100005)

【摘要】 目的 建立柯萨奇病毒 A 组 6 型 (coxsackievirus A6, CVA6) 和 B 组 1 型 (coxsackievirus B1, CVB1) 混合感染叙利亚金黄地鼠手足口病动物模型。**方法** 本研究将 24 只地鼠分为 CVA6 感染组、CVB1 感染组、CVA6 和 CVB1 混合感染组及对照组, 采取鼻腔滴注病毒液和 PBS 方式造模。监测记录 15 d 内临床指标、生理指标、排毒情况, 并在感染后第 7 天 (D7) 选取动物进行组织病理学和病毒抗原与核酸检测。**结果** 单独和混合感染的实验组地鼠均出现类似人类手足口病的临床症状; WBC、NEUT、LYMPH 结果提示病毒感染血象特征; 咽拭子、粪便、血液和组织中均能检测到两种病毒核酸; 粪便样品中能分离出两种病毒; 脑等组织出现病理损伤表现及 CVA6 和 CVB1 病毒抗原蛋白和核酸的阳性共定位。**结论** 经鼻腔同时滴注 CVA6 和 CVB1 混合液能够成功感染叙利亚金黄地鼠, 复制出类似人类手足口病的疱疹、造成病毒性心肌炎和脑炎病理损伤等, 结果显示混合感染组相较于单独感染组病情更为严重, 表现为临床症状加重、病毒复制增高以及组织病理损伤明显。本研究为开展人类肠道病毒混合感染基础和临床研究提供一定借鉴和参考。

【关键词】 叙利亚金黄地鼠; 混合感染; 动物模型; 柯萨奇病毒 A 组 6 型; 柯萨奇病毒 B 组 1 型; 手足口病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0030-11

Coinfection with coxsackievirus A6 and B1 in a Syrian hamster animal model

HOU Jinghan^{1,2*}, DUAN Suqin^{1,2*}, XU Hongjie^{1,2}, SUN Wenting^{1,2}, LI Mingxue^{1,2}, LI Yanyan^{1,2},
JIN Weihua^{1,2}, CHEN Lixiong^{1,2}, LIU Quan^{1,2}, ZHAO Yuan^{1,2}, YANG Fengmei^{1,2#}, HE Zhanlong^{1,2#}

【基金项目】 北京协和医学院中央高校基本科研业务费 (3332023079); 云南省基础研究专项-面上项目 (202401CF070048); 中国医学科学院医学生物学研究所所级重点科研专项 (2022IMBCAMS002)。

【作者简介】 侯婧涵 (1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: houjinghann@163.com
段素琴 (1992—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 疾病动物模型研究。E-mail: duansuqin129@163.com

* 共同第一作者

【通信作者】 杨凤梅 (1982—), 女, 博士, 副主任技师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: yangfenmei@imbcams.com.cn
和占龙 (1972—), 男, 博士, 研究员, 研究生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型建立及机制。

E-mail: hzl@imbcams.com.cn # 共同通信作者

- (1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China.
2. State Key Laboratory of Respiratory Health and Multimorbidity, Beijing 100005)

[Abstract] Objective To establish an animal model of hand, foot, and mouth disease (HFMD) in Syrian hamsters coinfectd with coxsackievirus A6 (CVA6) and coxsackievirus B1 (CVB1). **Methods** 42 Syrian hamsters were divided into a CVA6 infection group, CVB1 infection group, CVA6 and CVB1 coinfection group and control group. A HFMD model was established by nasal instillation of virus solution and phosphate-buffered saline. Clinical and physiological indicators and detoxification status were monitored and recorded for 15 d, and animals were selected on day 7(D7) after infection for histopathology and viral antigen and nucleic acid testing. **Results** Hamsters in the single-infection and coinfection groups showed clinical symptoms similar to human HFMD. White blood cell, neutrophil, and lymphocyte result were characteristic of viral infection. Both viral nucleic acids were detected in throat swabs, feces, blood, and tissues and both viruses were isolated from fecal samples. Pathological damage and positive co-localization of CVA6 and CVB1 viral antigen proteins and nucleic acids were found in brain and other tissues. **Conclusions** Nasal instillation of a CVA6 and CVB1 mixture can successfully coinfect Syrian hamsters, replicate herpes infection similar to human HFMD, and cause pathological viral myocarditis and encephalitis damage. The result showed that the coinfection group was more seriously affected than the single-infection group, with worse clinical symptoms, increased viral replication, and obvious tissue pathological damage. This study provides a reference for further basic and clinical research into human enterovirus coinfection.

[Keywords] Syrian hamster; coinfection; animal model; coxsackievirus A6; coxsackievirus B1; hand, foot and mouth disease

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

柯萨奇病毒(Coxsackievirus, CAV)是小核糖核酸病毒科、肠道病毒属的一种肠道病毒(Enterovirus),根据其器官嗜性、器官损伤和抗原反应又分为柯萨奇病毒A组和柯萨奇病毒B组^[1]。柯萨奇病毒经呼吸道和消化道感染人体后可以引起发热、咽痛、厌食和手、足、口等特征性的部位出现皮疹或疱疹等临床症状,大多数患者的临床症状轻微,一般情况下均可自愈,少部分患者可发展为重症型,并发病毒性脑炎、病毒性心肌炎、神经源性肺水肿和急性弛缓性麻痹等严重病症,甚至会导致死亡^[2-5]。近年来,肠道病毒呈现CVA16、CVA6、CVA10、CVB1等交替流行趋势^[6]。相关文献报道,在手足口病患者的临床样本中可以检测到两种或两种以上的肠道病毒混合感染情况^[7-9]。但在临床工作中由于手足口病的自限性及分离和鉴定多种肠道病毒混合感染的复杂性等因素,对肠道病毒混合感染的致病机制及其引发疾病病程变化及转归、愈后的相关研究相对较少。

叙利亚金黄地鼠(Syrian hamster)属于啮齿目、地鼠科、地鼠属,目前在病毒、细菌和寄生虫

等感染模型研究中得到了广泛应用^[10-13]。已有研究显示,叙利亚金黄地鼠对EV71、柯萨奇病毒B1和柯萨奇病毒B3具有较强的易感性,能够较好地模拟人类手足口病的感染过程^[14-16]。但至今未见有柯萨奇病毒混合感染动物模型的相关报道,因此本研究采用叙利亚金黄地鼠进行柯萨奇病毒A组6型和柯萨奇B组1型混合感染动物模型构建,为深入开展肠道病毒混合感染是否会引起、或者加重出现一系列手足口、病毒性心肌炎、脑炎等病理和生理特征,为人类开展肠道病毒混合感染机制、疫苗、药物开发等研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

叙利亚金黄地鼠,雌性,3周龄,SPF级,体重为45~55 g,24只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011]。实验鼠饲养于中国医学科学院医学生物学研究所屏障动物实验设施[SYXK(滇)K2022-0006],利用独立

通风笼具(individual ventilated cages,IVC)系统保证组间隔离饲养,饲养期间保证 IVC 系统温度保持在 20~25 ℃,相对湿度保持在 50%~65%,提供 12 h 光照和 12 h 黑暗的昼夜光变化周期,并确保动物有充足的饲料和饮水。本动物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批准(DWSP202401011),按实验动物使用的 3R 原则进行实验设计及给予人道关怀。

1.1.2 毒株

CVA6 病毒(GeneBank 序列号:MN184852 (RYN-A1205))和 CVB1 毒株(GenBank 序列号:OP917846(7V3/YN/CHN/2019))由中国医学科学院医学生物学研究所马绍辉课题组惠赠,保存于本实验室。

1.1.3 细胞

人恶性横纹肌瘤细胞(rhabdomyosarcoma cell,RD cell)购自武汉赛维尔生物科技有限公司,由本科室保存,代次为 10 代,使用含 10%的胎牛血清,1% 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 MEM 培养基,在含 5% CO₂ 的 37 ℃ 培养箱中传代培养。该细胞用于 CVA6 的分离和扩增。

非洲绿猴肾细胞系(vero)细胞来于欧洲认证细胞培养物收藏中心(european collection of animal cell cultures,ECACC),由本科室保存于液氮中,代次为 143 代,该细胞使用含 10%的新生牛血清,1% 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 MEM 培养基,在含 5% CO₂ 的 37 ℃ 培养箱中传代培养。该细胞用于 CVB1 的分离和扩增。

1.2 主要试剂与仪器

MEM 培养基、6.6% NaHCO₃、3%谷氨酰胺、0.125%胰蛋白酶、4 % EDTA 1 mol/L 氢氧化钠

(中国医学科学院医学生物学研究所中心供应科提供);胎牛血清、新生牛血清(10270-106、C11995500BT,澳洲 Gibco);异丙醇、无水乙醇、三氯甲烷(1030019-01-01、1030001-04-01、2004007-01-01,西陇科学股份有限公司);4%多聚甲醛(143174,Biosharp);PrimeScript One Step RT-PCR Kit(RR064A,TaKaRa);无菌无酶水(R1600,北京索莱宝);异氟烷(R510-22-16,瑞沃德生命科技有限公司);RNA-蛋白共检测辅助试剂盒(323180,ACD);Anti-Coxsackievirus B1 Antibody(MAB944,Merck);Coxsackievirus A6 VP1 抗体(GTX132346, GeneTex);Anti-Coxsackie Adenovirus Receptor(ab100811, abcam);Mouse Kremen-1 Antibody(AF1647, R&D Systems);Goat Anti-Mouse IgG H&L(ab150117, abcam);Goat Anti-Rabbit IgG H&L(ab150080, abcam);Donkey Anti-Rabbit IgG H&L(ab150075, abcam);Donkey Anti-Goat IgG H&L(ab150129, abcam)。

生物安全柜(NU-437-600S,NUATR);离心机(D1524R,DALAB);PCR 仪(T100,Bio-Rad);全自动五类动物血细胞分析仪(XT-200i,希森美康);细胞计数仪(JIMBIO FIL,卓微生物科技有限公司);荧光定量 PCR 检测系统(CFX96Touch, Bio-Rad);荧光共聚焦显微镜(Leica SP8,Leica);电子体温计(DT-K111A,杭州华安医疗保健用品有限公司);电子天平(JEA1002,上海浦春计量仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及感染

实验将 24 只叙利亚金黄地鼠分为 4 组,每组 6 只,具体分组和感染方法如表 1 所示。

表 1 实验分组和攻毒剂量
Table 1 Experimental groups and challenge doses

组别 Groups	感染方式 Infection method	感染剂量 Infectious dose
CVA6 感染组 CVA6 infection group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	10 ⁶ CCID ₅₀ /mL 的 CVA6 病毒液 100 μL 10 ⁶ CCID ₅₀ /mL CVA6 virus solution 100 μL
CVB1 感染组 CVB1 infection group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	2×10 ⁶ CCID ₅₀ /mL 的 CVB1 病毒液 50 μL 2×10 ⁶ CCID ₅₀ /mL CVB1 virus solution 50 μL
CVA6 和 CVB1 混合感染组 CVA6 and CVB1 coinfection group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	10 ⁶ CCID ₅₀ /mL 的 CVA6 和 2×10 ⁶ CCID ₅₀ /mL 的 CVB1 等量混合病毒液 75 μL 10 ⁶ CCID ₅₀ /mL CVA6 virus solution and 2×10 ⁶ CCID ₅₀ /mL CVB1 virus solution were mixed equally, 75 μL
对照组 Control group	经鼻腔滴注 Drip through the nasal cavity	PBS 液 100 μL PBS solution 100 μL

1.3.2 临床观察及样品采集

实验开始前对动物进行 7 d 的适应性饲养,于 D0 采集本底数据后,对地鼠进行双侧半量滴鼻攻毒,具体操作方法:一名操作人员对地鼠进行保定,将地鼠鼻孔上仰呈 45°的姿势,另一操作人员使用移液枪将各半量的病毒液滴注到各组地鼠的双侧鼻孔中,最后保持地鼠鼻孔上仰 45°的姿势 1~2 min,确定病毒液全部滴入鼻腔后再放回对应的饲养笼。病毒感染后每天观察动物精神状态、皮肤、口腔黏膜变化及行为学改变等临床情况,采集粪便样品用于病毒载量检测和病毒分离。感染后 D0、D1、D3、D5、D7、D9、D11、D13 和 D15 使用体温计和天平测量地鼠的肛门温度和体重数据;D0、D1、D2、D3、D4、D5、D6、D7、D8、D9、D10 和 D15 采集咽拭子进行病毒载量检测;D0、D4、D7、D10 和 D15 采集血液样本进行血常规和病毒血症检测。感染 D1~D7 每组的咽拭子、粪便、血液各有 6 个样本重复,于感染后 D7 每组分别随机选取 3 只动物进行安乐死,采集的心脏、肝、脾、肺、肾、胰、脑、脊髓和嗅球等组织样品一式两份,各 3 个重复的样本用于病毒载量检测和组织病理学和病毒抗原和核酸检测,感染 D8~D15 每组的咽拭子、粪便、血液各有 3 个样本重复。其中,在采集地鼠血液时采用异氟烷进行麻醉。采用注射 3 倍麻醉剂量的 1%戊巴比妥钠(150 mg/kg)的麻醉方式进行安乐死。

1.3.3 病毒载量测定

取咽拭子、粪便、血液以及组织研磨液提取 RNA,以 RNA 为模板,采用一步法逆转录实时定量聚合酶链式反应(real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)确定样品中病毒载量。设计的 CVA6 和 CVB1 的引物和 Taqman 探针由生工生物工程有限公司合成,引物序列信息

如表 2 所示。反应条件为:42 ℃ 5 min 反转录;95 ℃ 10 s 热启动;以 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s 为一个循环,在 60 ℃ 进行荧光检测,共进行 40 个循环。

1.3.4 粪便样品病毒培养

将 D0~D15 粪便样品过滤除菌后分别接种于 RD 和 Vero 细胞中,持续观察两种细胞的细胞病变情况并做好记录。

1.3.5 病理检测

采集心脏、肝、脾、肺、肾、胰、脑、脊髓和嗅球组织,使用 4%多聚甲醛固定,由武汉赛维尔生物科技有限公司进行苏木精-伊红(HE)病理染色。

1.3.6 含环状结构跨膜蛋白 1(kringle containing transmembrane protein 1, Kremen-1)受体和柯萨奇-腺病毒受体(adenovirus receptor, CAR)受体检测

采用免疫荧光(immunofluorescence, IF)方法对空白对照组的组织样本切片进行 Kremen-1 受体和 CAR 受体蛋白的检测。白片脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、羊抗 Kremen-1 受体以及兔抗 CAR 受体单克隆一抗 1:500 稀释后 4 ℃ 过夜孵育加驴抗羊和驴抗兔二抗、DAB 显色,封片。

1.3.7 病毒核酸及抗原检测

采用 IF 方法对组织样本切片进行 CVA6、CVB1 抗原的检测,采用 RNA 原位杂交(RNAscope *in situ* hybridization, RNAscope)方法对切片进行 CVA6 和 CVB1 核酸的检测,通过 RNAscope 多通道二代荧光与免疫荧光的联合使用检测 CVA6 和 CVB1 的病毒核酸和蛋白的共定位情况。其中,RNAscope 检测所使用的 CVA6 和 CVB1 的核酸探针由安迪生物科技(上海)有限公司所设计,分别靶向 CVA6(MF422553.1)的 2971~3936 区域序列和 CVB1(EU147493.1)的 32~

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

名称 Name	基因序列(5'-3') Gene sequence (5'-3')	长度/bp Length
CVA6-F	TACCACCGGGAGAAACGTCCACG	112
CVA6-R	CGGTCAGTTGCACTGTTACT	
CVA6-P	ROX-ACGTGAGAGCTTGGGTACCTAGACCCCTTC-BHQ	
CVB1-F	GGTGTCTACACAAAAGACGGGTG	139
CVB1-R	TGGGTCTTGTGTGAAATCTTGCC	
CVB1-P	FAM-CGCATGAGACTGCTTTGAGTGCCAGCG-BHQ	

6063 区域序列。RNAscope 与 IF 共检测实验步骤:白片脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、兔源抗 CVA6 单克隆一抗和鼠源抗 CVB1 多克隆一抗 1:200 稀释后 4℃ 过夜孵育、一抗后固定、蛋白酶处理、滴加反应梯度增强剂、多通道核酸荧光染色、滴加羊抗兔和羊抗鼠二抗、DAB 显色、使用中树脂封片。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据统计分析,数据统计结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

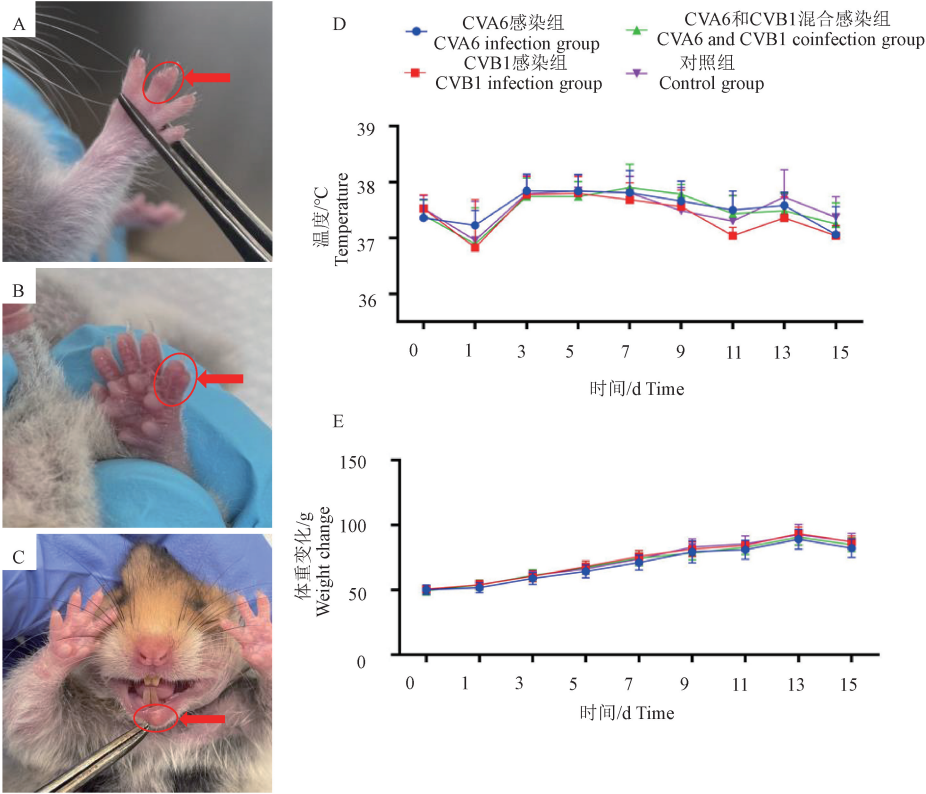
2.1 临床症状

从攻毒 D2 起,CVA6 和 CVB1 混合感染组动物的手足及口唇部陆续出现疱疹(图 1A~1C)。疱疹发生初期皮肤黏膜表面轻微红肿;随后出现明显红斑或疱疹,疱疹内有少量脓液;之后 2~5 d 逐渐消退结痂。CVA6 和 CVB1 混合感染组和对

照组相比体温、体重无明显变化趋势(图 1D~1E),且未见明显的行为学改变。

2.2 血常规指标

对动物血液样品进行血常规检测发现,CVA6 和 CVB1 混合感染组白细胞(white blood cell,WBC)在 D10 出现显著增加,最高达到 $19.65\times 10^9/L$ 。CVA6 和 CVB1 混合感染组中性粒细胞(neutrophil granulocyte,NEUT)在感染后 D4 出现小高峰,均值达到 $3.13\times 10^9/L$,且要高于 CVA6 感染组($1.65\times 10^9/L$)、CVB1 感染组($2.71\times 10^9/L$)和 PBS 对照组($2.55\times 10^9/L$)。CVA6 和 CVB1 混合感染组中淋巴细胞(lymphocyte,LYMPH)则在感染后 D4 和 D10 均表现为增高的趋势,表现为在感染后 D4 比 CVA6 感染组和 CVB1 感染组平均高 $0.73\times 10^9/L$,感染后 D10 比 CVA6 感染组和 CVB1 感染组平均高 $0.76\times 10^9/L$ 。结果显示 CVA6 和 CVB1 混合感染组地鼠表现出明显的病毒感染的血象特征(图 2)。

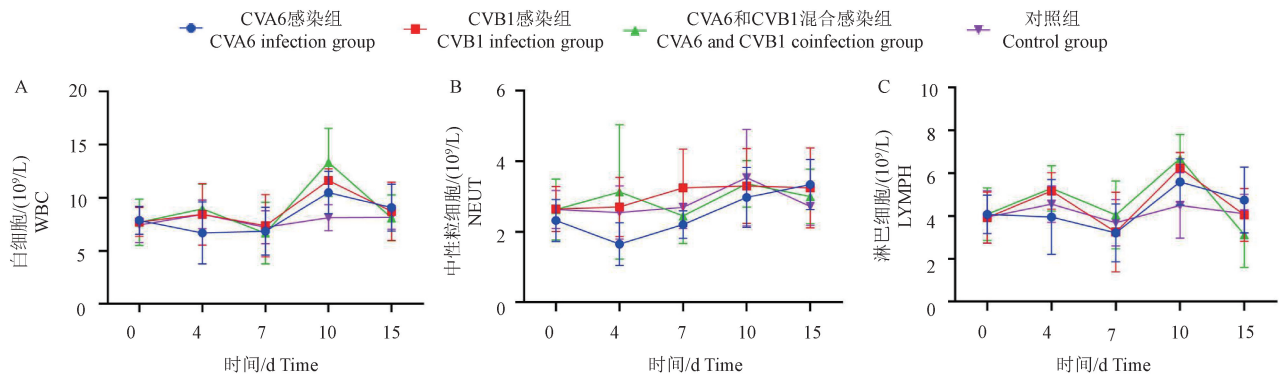


注:A:手部疱疹;B:足部疱疹;C:口部疱疹;D:体温;E:体重。

图 1 临床症状

Note. A, Herpes on hands. B, Herpes on feet. C, Herpes on mouth. D, Body temperature. E, Body weight.

Figure 1 Clinical symptoms



注:A:白细胞计数;B:中性粒细胞;C:淋巴细胞。

图 2 血常规检测结果

Note. A, White blood cell count. B, Neutrophil granulocyte. C, Lymphocyte.

Figure 2 Blood routine test results

2.3 病毒载量

CVA6 和 CVB1 混合感染组的咽拭子在 D2~D7 均检测到 CVA6 病毒,载量总体呈现先升高后降低的趋势,在 D3 出现第 1 次排毒高峰 ($10^{6.6}$ copies/200 μ L),随后逐渐降低,于 D7 出现第 2 次排毒高峰 ($10^{5.6}$ copies/200 μ L)。咽拭子中 D3~D7 均检测到 CVB1 的病毒载量,载量总体呈现先升高后降低的趋势,在 D3 出现第 1 次排毒小高峰 ($10^{5.3}$ copies/200 μ L),随后逐渐降低,于 D6 出现第 2 次排毒高峰 ($10^{5.9}$ copies/200 μ L)。与 CVA6 感染组和 CVB1 感染组的动物相比,CVA6 和 CVB1 混合感染组的咽拭子排毒高峰提前,且载量增加 (图 3A)。

CVA6 和 CVB1 混合感染组的粪便在 D1~D8 均检测到 CVA6 病毒,与 CVA6 感染组 (D1~D7) 相比排毒周期延长。且总体呈现先升高后降低的趋势,两次排毒高峰分别于 D1 和 D6 达到 $10^{6.7}$ copies/100 mg 和 $10^{6.6}$ copies/100 mg。粪便中 D1~D7 均检测到 CVB1 病毒,载量总体呈现先升高后降低的趋势,但在 D6 和 D7,比 CVB1 感染组地鼠的排毒量平均增高了 $10^{1.7}$ copies/100 mg 和 $10^{0.74}$ copies/100 mg。CVA6 和 CVB1 混合感染组与 CVA6 感染组和 CVB1 感染组相比,出现更长的排毒周期和更高的排毒量 (图 3B)。

CVA6 和 CVB1 混合感染组在 D4 的血液中,均检测到这两种病毒的核酸,CVA6 病毒载量为 $10^{3.1}$ copies/200 μ L, CVB1 病毒载量为 $10^{5.0}$ copies/200 μ L (图 3C),提示感染后出现了典型的

病毒血症。

CVA6 和 CVB1 混合感染组在 D7 组织中肺、脑、脊髓和嗅球中检测到 CVA6 的病毒核酸;D7 组织中的心脏、肝、脾、肺、肾和脑组织等均能检测到 CVB1 病毒核酸,在嗅球中病毒载量最高 ($10^{10.7}$ copies/100 mg) (图 3D)。

2.4 粪便细胞病变效应

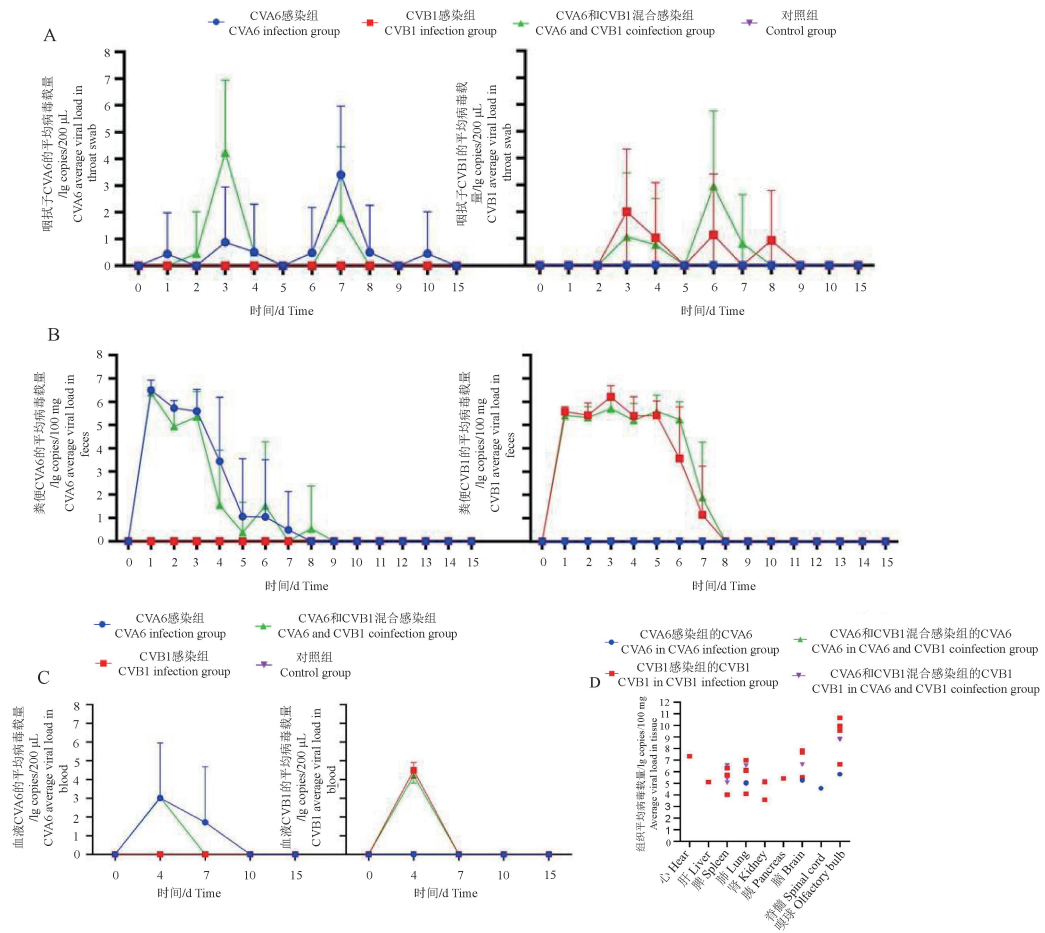
CVA6 和 CVB1 混合感染地鼠后,为验证感染过程中排出病毒是否为活病毒,将粪样的过滤除菌上清液分别接种于用于 CVA6 的分离和扩增的 RD 细胞和用于 CVB1 的分离和扩增的 Vero 细胞,观察其病变效应。发现 CVA6 和 CVB1 混合感染组细胞的粪便样本在 RD 和 Vero 细胞上均出现了细胞病变,且病变孔数明显多于单独感染组 (图 4)。证明在 CVA6 和 CVB1 混合感染组动物的排出粪便样品均可以分离出这两种病毒,且排毒量要大于单独感染的情况。

2.5 组织学检查

CVA6 和 CVB1 混合感染组的心脏组织可见大面积心外膜中度水肿,结缔组织排列稀疏,伴多量淋巴细胞浸润,可见大面积钙化灶,显示严重的损伤,表现出明显的病毒性心肌炎的病理特征。脑组织和嗅球组织中可见大量神经元固缩,形态不规则,胞核胞质分界不清,嗜碱性增强,多量小胶质细胞浸润,多量神经细胞变性,胞质疏松淡染。与 CVA6 感染组和 CVB1 感染组相比,表现更明显的病毒性脑炎的病理变化 (图 5)。

2.6 病毒核酸及抗原检测

对 D7 的地鼠组织样本切片进行了免疫荧光



注:A:咽拭子;B:粪便;C:血液;D:组织。

图3 咽拭子、粪便、血液和组织的病毒载量

Note. A, Throat swab. B, Feces. C, Blood. D, Tissue.

Figure 3 Viral load in throat swabs, stool, blood and tissues

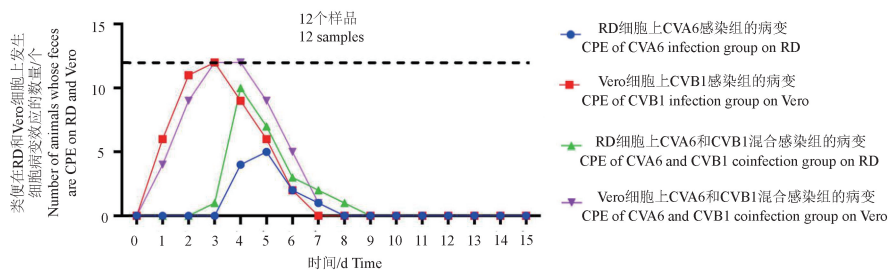


图4 粪便样品在细胞病变效应的数量

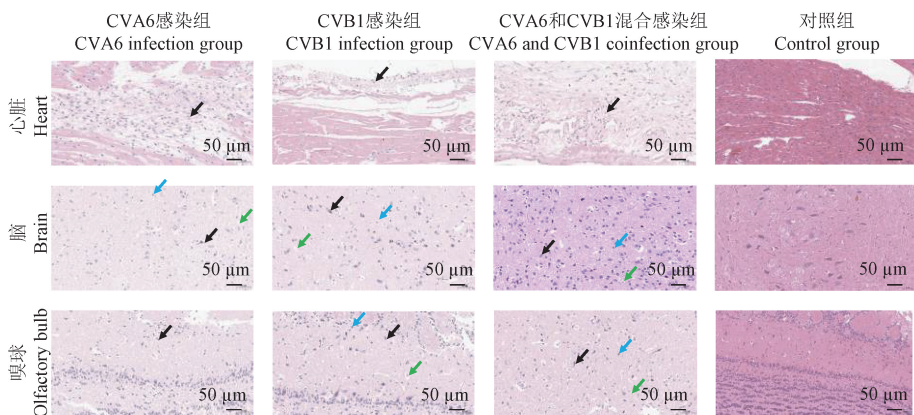
Figure 4 Number of cytopathic effects in fecal samples

和 RNAscope 共染色 (图 6), 以脑组织为例, 可见 CVA6 和 CVB1 混合感染组地鼠组织表现出两种病毒的抗原蛋白和核酸的共定位, CVA6 和 CVB1 的核酸信号呈红色和黄色的小点状分布, CVA6 和 CVB1 的抗原蛋白信号呈紫红色和绿色并围绕细胞核成片状分布, 且抗原信号可以定位在细胞

核外的共同区域。

2.7 Kremen-1 受体和 CAR 受体检测

对地鼠空白的组织样本切片进行 Kremen-1 受体和 CAR 受体的免疫荧光检测发现能观察到受体的共定位, 证实叙利亚金黄地鼠的脑等组织中有感染 CVA6 和 CVB1 肠道病毒的受体 (图 7)。

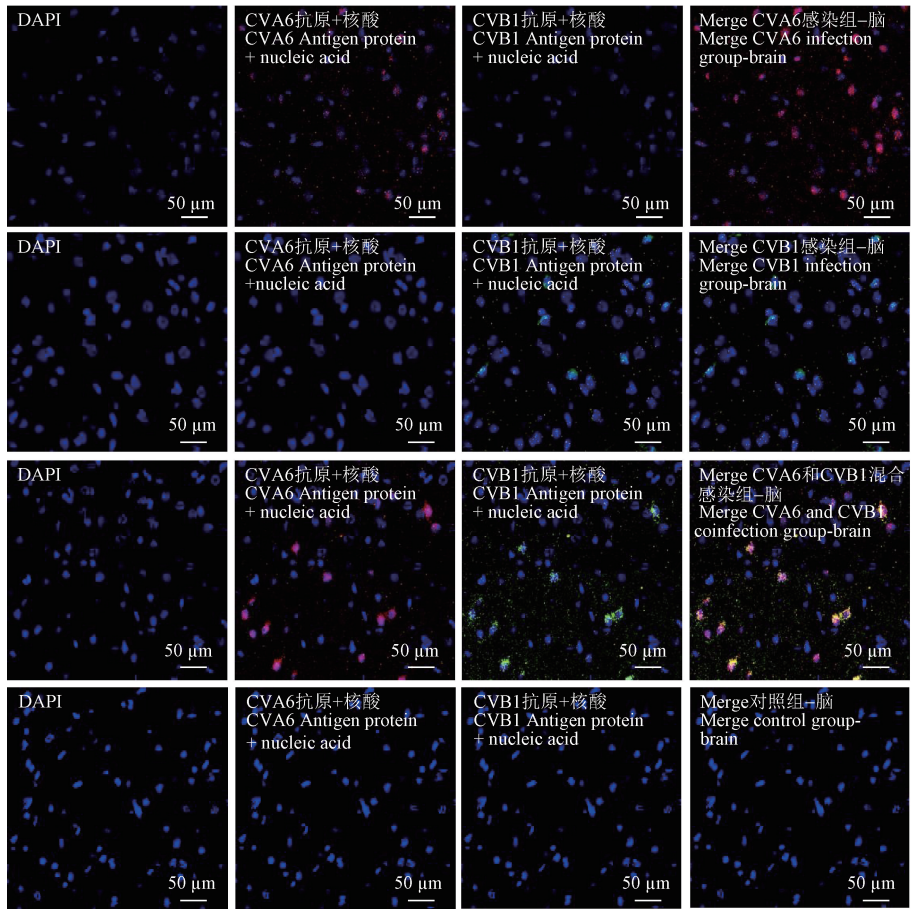


注:心脏:淋巴细胞浸润(黑色箭头);脑和嗅球:嗜碱性增强(黑色箭头),小胶质细胞浸润(蓝色箭头),胞质疏松淡染(绿色箭头)。

图 5 心脏、脑、嗅球组织 HE 染色结果

Note. Heart, Lymphocyte infiltration (black arrow). Brain and olfactory bulb, Increased basophilia (black arrow), microglial infiltration (blue arrow), loose and lightl staining of cytoplasm (green arrow).

Figure 5 HE staining results of heart, brain and olfactory bulb

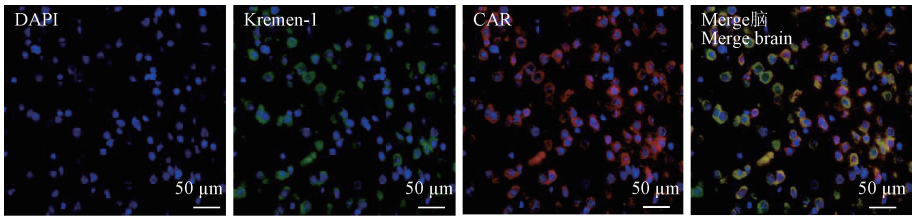


注:以脑组织为例,紫红色荧光代表 CVA6 抗原蛋白;红色荧光代表 CVA6 核酸;绿色荧光代表 CVB1 抗原蛋白;黄色荧光代表 CVB1 核酸。

图 6 脑组织 CVA6 和 CVB1 核酸及抗原共定位

Note. Taking brain tissue as an example, purple-red fluorecence represents CVA6 antigen protein. Red fluorecence represents CVA6 nucleic acid. Green fluorecence represents CVB1 antigen protein. Yellow fluorecence represents CVB1 nucleic acid.

Figure 6 Co-localization of CVA6 and CVB1 nucleic acids and antigens in brain tissue



注:以脑组织为例,绿色荧光代表 Kremen-1 受体;红色荧光代表 CAR 受体。

图 7 叙利亚金黄地鼠脑组织 Kremen-1 受体和 CAR 受体共定位

Note. Taking brain tissue as an example, green fluouescence represents Kremen-1 receptors. Red fluouescence represents CAR receptors.

Figure 7 Co-localization of Kremen-1 receptor and CAR receptor in Syrian hamster brain tissue

3 讨论

肠道病毒可以通过消化道、呼吸道等途径感染患者^[17-18],引起手足口等多部位皮肤黏膜出现疱疹,部分患者可能还伴有病毒性脑炎、心肌炎、肝炎、弛缓性麻痹、过敏性紫癜、腹膜炎、I 型糖尿病等严重并发症。目前已有多种构建成功的肠道病毒动物模型,如本课题组前期已成功构建 CVA6、CVB1、CVB2、CVB3 恒河猴婴猴动物模型和 CVB1、CVB3 叙利亚金黄地鼠模型等,但尚未见肠道病毒混合感染的动物模型相关报道,因此本研究通过构建 CVA6 和 CVB1 混合感染叙利亚金黄地鼠模型,对临床变化、排毒周期、血液生理、组织病理改变等进行检测,从病原学、病理生理、疾病发生和发展过程等方面进行了系统性的分析,实验结果显示经鼻腔滴注感染实验地鼠表现出了与人类手足口病相似的临床指标,以及病毒性心肌炎和病毒性脑炎相似的病理损伤。且 CVA6 和 CVB1 混合感染组在临床症状、病毒复制和组织病理损伤等方面反映病情更为复杂的变化,因此开展和构建 CVA6 和 CVB1 肠道病毒混合感染叙利亚金黄地鼠的动物模型工作具有重要意义。

3.1 临床表现

本研究经临床观察发现,CVA6 和 CVB1 混合感染组地鼠手足及口唇部出现了疱疹,这与儿童手足口病的临床疱疹症状相似。PHYU 等^[19]在构建 EV71 感染 2 周龄叙利亚金黄地鼠时观察到口和足出现肉眼可见的皮肤损伤,本研究出现的疱疹更典型,且手足口上均有疱疹。另外,本次实验发现动物体温整体上无明显变化,这与王辉等^[20]研究发现 439 例手足口病患儿约 50%存在

不发热现象的结果类似。

3.2 病毒载量

本次实验在动物的咽、粪便、血液及多组织研磨液中均检测出两种病毒核酸,与李咏洁等^[15]和张伟^[16]构建的 CVB1 和 CVB3 感染叙利亚金黄地鼠的动物模型中病毒载量的检测结果相一致,但排毒周期相对较短,这可能是由本次实验动物攻毒剂量较低引起的差异。在 2009 版的手足口病预防控制指南中指出手足口病病程一般为 7~10 d,在卢展鹏等^[21]调查的一起东莞市肠道病毒暴发疫情中也发现其病程最短为 2 d,最长为 7 d,中位数为 4 d,提示本次实验的攻毒剂量和病程发展更符合人类感染手足口病的真实发病情况。本次实验与李咏洁等^[15]和张伟^[16]构建的 CVB1 和 CVB3 感染叙利亚金黄地鼠动物模型的嗅球部都检测到较高的病毒载量和较严重的组织病理损伤,进一步佐证了人类重症手足口病引起病毒性脑炎的病毒感染及入侵途径,即肠道病毒可以通过呼吸道黏膜经嗅神经和嗅球入侵脑部引起病毒性脑炎。

3.3 临床血液指标

本次实验对 D0、D4、D7、D10 和 D15 采集的血液样品进行动态血常规监测,结果显示感染组动物 WBC、NEUT 和 LYMPH 相较对照组有增高的趋势,这与李咏洁等^[15]构建的 CVB1 感染叙利亚金黄地鼠的动物模型中感染后 D7 血常规检测发现滴鼻组动物的 LYMPH 和 NEUT 明显增加的结果一致的,结果也表现出显著的病毒感染血象变化,且 CVA6 和 CVB1 混合感染组的血常规指标相较于单独感染组变化趋势更大,进一步提示着病毒的混合感染可能对地鼠造成了更为严重的感染炎症反应。

3.4 组织学检测

有研究表明,肠道病毒可通过血脑屏障和外周神经等途径侵入中枢神经系统后引发神经并发症肠道病毒性脑炎,也可通过感染心肌细胞进而引发造成心肌局灶性或弥漫性病变的病毒性心肌炎^[22]。此次研究的组织病理检测结果也显示感染组的心脏和脑等组织中均存在病理损伤,且相较于单独感染组,CVA6 和 CVB1 混合感染组存在更为严重的炎性病理损伤。在此基础上,对动物感染后 D7 的组织切片进行 CVA6 和 CVB1 抗原和核酸的共定位,结果发现 CVA6 和 CVB1 混合感染组的组织上同时定位到病毒的核酸和病毒的抗原蛋白,为病毒的靶向组织器官感染情况提供了可视化结果线索,表明肠道病毒感染后引起的多器官、多组织噬性和损伤表现。

与肠道病毒受体有关的研究证实 CVA6 的受体是 Kremen-1,CVB1 的受体是 CAR 和衰变加速因子(decay accelerating factor,DAF)^[23-26]。本次实验对叙利亚金黄地鼠组织进行 Kremen-1 受体和 CAR 受体的免疫荧光检测,发现地鼠的脑组织等能观察到两个受体的共定位,证实叙利亚金黄地鼠具有感染这两种肠道病毒的受体基础,进一步提示了柯萨奇病毒对脑组织的损伤倾向以及柯萨奇病毒感染的临床重症病例并发无菌性脑膜炎的原因。

综上所述,本研究成功构建出肠道病毒混合感染模型,表现出人类手足口病的疱疹病变特征,以及病毒性脑炎和心肌炎的病理损伤,CVA6 和 CVB1 混合感染组的临床症状更为明显,病毒复制更为活跃,提示混合感染的两种病毒可能互相促进病毒感染进程,本次实验结果将为后续开展相关疾病的混合感染的模型构建、发病机制、病理和生理等研究等提供一定借鉴和参考。

参考文献:

[1] SIN J, MANGALE V, THIENPHRAPA W, et al. Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis [J]. *Virology*, 2015, 484: 288-304.

[2] NOOR A, KRILOV L R. Enterovirus infections [J]. *Pediatr Rev*, 2016, 37(12): 505-515.

[3] XU W, LIU C F, YAN L, et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and

mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications [J]. *Virol J*, 2012, 9: 8.

[4] HUANG H I, SHIH S R. Neurotropic enterovirus infections in the central nervous system [J]. *Viruses*, 2015, 7(11): 6051-6066.

[5] NAYAK G, BHUYAN S K, BHUYAN R, et al. Global emergence of enterovirus 71: a systematic review [J]. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*, 2022, 11(1): 78.

[6] FU X, WAN Z, LI Y, et al. National epidemiology and evolutionary history of four hand, foot and mouth disease-related enteroviruses in China from 2008 to 2016 [J]. *Virol Sin*, 2020, 35(1): 21-33.

[7] 梁勇彪, 屈雅川, 曹荣, 等. 手足口病毒感染病毒分布及感染趋势评估 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(22): 5485-5487.

LIANG Y B, QU Y C, CAO Q, et al. Viral infections in children with hand-foot-mouth disease and trend of infections [J]. *Chin J Nosocomiology*, 2013, 23(22): 5485-5487.

[8] 张伟, 王玉光, 杨朝晖, 等. 肠道病毒 71 型与柯萨奇 A 组 16 型混合感染致手足口病并发中枢神经系统感染临床分析 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14(29): 3341-3343, 3346.

ZHANG W, WANG Y G, YANG Z H, et al. Severe hand-foot-and-mouth disease caused by mixed infection of enterovirus 71 and Coxsackie A16 [J]. *Chin Gen Pract*, 2011, 14(29): 3341-3343, 3346.

[9] GUO W, XU D, CONG S, et al. Co-infection and enterovirus B: post EV-A71 mass vaccination scenario in China [J]. *BMC Infect Dis*, 2022, 22(1): 671.

[10] MIAO J, CHARD L S, WANG Z, et al. Syrian Hamster as an animal model for the study on infectious diseases [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2329.

[11] WARNER B M, SAFRONETZ D, KOBINGER G P. Syrian hamsters as a small animal model for emerging infectious diseases: advances in immunologic methods [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 972: 87-101.

[12] CARVALHO L M, DE BRITO R C F, GUSMÃO M R, et al. Establishment of monoclonal antibodies to evaluate the cellular immunity in a hamster model of L infantum infection [J]. *Parasite Immunol*, 2021, 43(4): e12823.

[13] HSU C J, LIN W C, CHOU Y C, et al. Dynamic changes of the blood chemistry in Syrian hamsters post-acute COVID-19 [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(1): e0236221.

[14] SVYATCHENKO V A, LEGOSTAEV S S, LUTKOVSKIY R Y, et al. Coxsackievirus A7 and enterovirus A71 significantly reduce SARS-CoV-2 infection in cell and animal models [J]. *Viruses*, 2024, 16(6): 909.

[15] 李咏洁, 张伟, 杨凤梅, 等. 柯萨奇病毒 B 组 1 型感染叙利亚金黄地鼠动物模型建立 [J]. *中国比较医学杂志*,

2023, 33(4): 50-56.

LI Y J, ZHANG W, YANG F M, et al. Establishment of an animal model of Cocksackievirus B1 infecting Syrian golden hamster [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 50-56.

[16] 张伟. 柯萨奇 B 组 3 型病毒动物模型的建立 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.

ZHANG W. Establishment of animal model of Cocksackie B virus type 3 [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2022.

[17] WELLS A I, COYNE C B. Enteroviruses: a gut-wrenching game of entry, detection, and evasion [J]. Viruses, 2019, 11(5): 460.

[18] 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.

[19] PHYU W K, ONG K C, WONG K T. A consistent orally-infected Hamster model for enterovirus A71 encephalomyelitis demonstrates squamous lesions in the paws, skin and oral cavity reminiscent of hand-foot-and-mouth disease [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147463.

[20] 王辉, 黄水平, 陈民, 等. 439 例手足口病临床流行病学特征分析 [J]. 徐州医学院学报, 2010, 30(4): 250-252.

WANG H, HUANG S P, CHEN M, et al. Analysis of the clinical epidemiological characteristics of 439 cases of hand-foot-mouth disease [J]. Acta Acad Med Xuzhou, 2010, 30(4): 250-252.

[21] 卢展鹏, 黄振宇, 张泽武, 等. 1 起由 Cox A2 等肠道病毒引起的发热暴发疫情的流行病学调查分析 [J]. 华南预防医学, 2015, 41(1): 51-53.

LU Z P, HUANG Z Y, ZHANG Z W, et al. Epidemiological investigation and analysis of an outbreak of fever caused by enteroviruses such as Cox A2 [J]. South China J Prev Med, 2015, 41(1): 51-53.

[22] XING J, WANG K, WANG G, et al. Recent advances in enterovirus A71 pathogenesis: a focus on fatal human enterovirus A71 infection [J]. Arch Virol, 2022, 167(12): 2483-2501.

[23] 李奇, 陈祥鹏, 谢正德. 肠道病毒受体的研究进展 [J]. 病毒学报, 2022, 38(5): 1206-1213.

LI Q, CHEN X P, XIE Z D. Research progress on enterovirus receptors [J]. Chin J Virol, 2022, 38(5): 1206-1213.

[24] STARING J, VAN DEN HENGEL L G, RAABEN M, et al. KREMEN1 is a host entry receptor for a major group of enteroviruses [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(5): 636-643.

[25] CUI Y, PENG R, SONG H, et al. Molecular basis of Cocksackievirus A10 entry using the two-in-one attachment and uncoating receptor KRM1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(31): 18711-18718.

[26] BERGELSON J M, CUNNINGHAM J A, DROGUETT G, et al. Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5 [J]. Science, 1997, 275(5304): 1320-1323.

[收稿日期] 2024-07-22