

牛弘璘,杨木,曹琳,等. EV71 通过 Caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 12-23.

Niu HL, Yang M, Cao L, et al. Enterovirus 71 induced skeletal muscle injury in BALB/c lactating mice via the caspase-1/interleukin-1 β signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 12-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.002

EV71 通过 Caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤

牛弘璘¹, 杨 木¹, 曹 琳⁴, 邹欣宏¹, 陈雨菲¹, 石国欣², 刘 蕾^{3*},
王柏欣^{3*}, 崔国利^{1,2*}

(1.佳木斯大学临床医学院,黑龙江 佳木斯 154007;2.佳木斯大学第一附属医院医学检验科,黑龙江 佳木斯 154007;
3.佳木斯大学基础医学院,黑龙江 佳木斯 154007;4.佳木斯国际旅行卫生保健中心(佳木斯海关口岸门诊部),
黑龙江 佳木斯 154000)

【摘要】 目的 观察 EV71 型肠道病毒(Enterovirus 71, EV71)诱导骨骼肌损伤的影响,探讨 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 诱导的骨骼肌损伤中的作用机制。**方法** 将 1 日龄 BALB/c 乳鼠随机分为 3 组,正常对照(normal control, NC)组 60 只、EV71 感染组 60 只、caspase-1 抑制剂(EV71+VX-765)组 15 只。正常对照组及 EV71 感染组各随机分为 5 d、7 d、10 d、14 d 4 个亚组,每亚组 15 只。将 25 mL/kg 的 EV71 病毒液,腹腔注射到 1 日龄 BALB/c 乳鼠体内,连续注射 3 d,建立 EV71 感染组模型。在病毒接种后 6 h 腹腔注射 caspase-1 抑制剂 VX-765 (20 mg/kg),连续 10 d 接种,直至取材,建立 caspase-1 抑制剂组模型。同时,正常对照组等体积注射含有 5% DMSO+10% PEG300 的生理盐水,6 h 后注射 2% 的细胞维持液。造模成功后,记录各组 BALB/c 乳鼠体质量和疾病评分,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察骨骼肌病理损伤,蛋白免疫印迹(Western blot)和免疫荧光(immunofluorescence, IF)检测肠道病毒 71 型病毒蛋白 1(Enterovirus 71 viral protein 1, EV71 VP-1)、前体胱天蛋白酶-1(pro-cysteine-dependent aspartate-specific protease-1, pro-caspase-1)、切割型胱天蛋白酶-1(cleaved cysteine-dependent aspartate-specific protease-1, cleaved-caspase-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白(Collagen type I, Collagen I)蛋白的表达。**结果** 与同时时间点正常对照组相比, EV71 感染组乳鼠体质量减轻,疾病评分升高; EV71 感染组乳鼠骨骼肌组织 HE 染色可见炎性细胞大量浸润、肌束断裂溶解,肌肉组织横截面积减少; Western blot 结果显示,与正常对照组相比, EV71 感染组乳鼠 5 d、7 d、10 d 骨骼肌组织匀浆中 EV71 VP-1、IL-1 β 、 α -SMA 和 Collagen I 水平均明显升高($P<0.001$); 与 EV71 感染组相比, EV71+VX-765 组乳鼠体质量升高及临床疾病评分降低($P<0.01$), Western blot 与免疫荧光结果一致显示, caspase-1 抑制剂可以显著降低 EV71 感染组乳鼠骨骼肌组织匀浆中 EV71 VP-1 蛋白表达($P<0.01$), 下调 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1、IL-1 β 和 Collagen I 蛋白水平($P<0.001$), 抑制 caspase-1 减弱了 EV71 病毒对 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤作用。**结论** EV71 可能通过激活 caspase-1/IL-1 信号通路诱导骨骼肌损伤。

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金(LH2023H004); 佳木斯大学“东极”研究团队(DJXSTD202405)。

[作者简介] 牛弘璘(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: EV71 病毒的发病机制。E-mail: m15965809764@163.com

[通信作者] 崔国利(1974—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 病毒发病机制及药物防治。E-mail: cuiguoli@jmsu.edu.cn

刘蕾(1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 病毒发病机制及药物防治。E-mail: liuleitianxue@163.com

王柏欣(1969—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤病毒的发病机制及防治研究。E-mail: wangbaixin@jmsu.edu.cn

* 共同通信作者

【关键词】 EV71; BALB/c 乳鼠; 炎症; caspase-1; 纤维化

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2025) 05-0012-12

Enterovirus 71 induced skeletal muscle injury in BALB/c lactating mice via the caspase-1/interleukin-1 β signaling pathway

NIU Honglin¹, YANG Mu¹, CAO Lin⁴, ZOU Xinhong¹, CHEN Yufei¹, SHI Guoxin², LIU Lei^{3*},
WANG Baixin^{3*}, CUI Guoli^{1,2*}

(1. Clinical Medicine Department, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China.

2. Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007.

3. Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007. 4. Jiamusi International Travel Health Care Center (Jiamusi Customs Port Outpatient Department), Jiamusi 154000)

【Abstract】 Objective To investigate the impact of enterovirus 71 (EV71) on skeletal muscle injury and explore its mechanism in relation to the caspase-1/interleukin (IL)-1 β signaling pathway in EV71-induced skeletal muscle damage. **Methods** One-day-old BALB/c suckling mice were divided randomly into three groups: normal control (NC) ($n=60$), EV71 infection model ($n=60$), and caspase-1 inhibitor (EV71+VX765) ($n=15$) groups. The NC and EV71 model groups were further subdivided into four subgroups (5, 7, 10, and 14 days) ($n=5$ mice per group). An EV71-infected model was established by intraperitoneal injection of 25×10^3 μ L/kg EV71 viral solution for 3 consecutive days. Mice in the caspase-1 inhibitor group received VX765 (20 mg/kg) intraperitoneally 6 hours post-viral inoculation, continued daily for 10 days until sample collection. Mice in the NC group received an equivalent volume of saline containing 5% dimethylsulfoxide and 10% PEG300, followed by 2% cell maintenance solution after 6 hours. Post-modeling body weight and clinical disease scores were recorded. Pathological skeletal muscle damage was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and expression levels of EV71 VP-1 (viral capsid protein), pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, IL-1 β , α -smooth muscle actin (SMA), and Collagen I were detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** Compared with the NC group at the same time points, mice in the EV71 model group exhibited reduced body weight, elevated disease scores, and skeletal muscle pathology characterized by inflammatory cell infiltration, myofiber dissolution, and decreased cross-sectional area (HE staining). Western blot showed significantly increased levels of EV71 VP-1, IL-1 β , α -SMA, and Collagen I in skeletal muscle homogenate from EV71 mice at 5, 7, and 10 days post-infection ($P<0.001$). In contrast, mice in the VX765 group showed improved body weight, reduced clinical scores ($P<0.01$), and significant downregulation of EV71 VP-1 ($P<0.01$), pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, IL-1 β , and Collagen I compared with the EV71 model group ($P<0.01$). These findings were confirmed by immunofluorescence, indicating that inhibition of caspase-1 alleviated EV71-induced skeletal muscle injury. **Conclusions** EV71 may induce skeletal muscle injury by activating the caspase-1/IL-1 β signaling pathway.

【Keywords】 EV71; BALB/c suckling mice; inflammation; caspase-1; fibrosis

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

手足口病(hand, foot, and mouth disease, HFMD)是临床上常见的感染性疾病,3岁以下儿童发病率最高。尤其在亚太地区, EV71型病毒引发的 HFMD 频繁暴发,往往产生致命的神经毒性和其他并发症导致患儿死亡^[1]。1969年, EV71型病毒首次在美国加利福尼亚州发现并分

离,随后 EV71 在全国范围内传播,对公共卫生系统构成持续挑战^[2-4]。据统计,2024年5月,全国手足口病的报告病例数量同比增加了 150.11%,重症病例则增长了 47.06%^[3]。在 HFMD 的重症病例中,大部分病情危急的患儿都与 EV71 病毒的感染有着直接的关联^[4]。目前,除了糖皮质激

素外,没有有效和安全的方法来治疗严重的手足口病。因此,揭示其分子机制进而探索安全有效的治疗策对重症手足口病的治疗至关重要。

近年来,病毒引起骨骼肌损伤的研究已经成为热点领域。研究表明,EB 病毒可导致骨骼肌损伤,引起淋巴细胞浸润导致肌炎样改变^[5]。EV71 是一种嗜神经病毒,以往研究主要集中在 EV71 对神经元损伤及所导致的严重神经系统并发症,如无菌性脑膜炎、脑干脑炎、肺水肿、心肌炎等^[6-9],对其他症状关注相对较少。除此以外,研究人员还发现患儿感染后的恢复通常还伴有肢体无力和萎缩等后遗症^[10-13]。进一步探索发现, EV71 也可直接感染骨骼肌细胞,相较于肝、大脑和肾, EV71 病毒首先在骨骼肌中复制,并导致严重的肌炎和骨骼肌溶解。值得注意的是,某医院收治的 288 例重症和危重症手足口病患者中,有 16 例发生了急性弛缓性麻痹(AFP),表现为肌张力减弱、肌力下降和腱反射减弱或消失^[14-16]。因此,探究 EV71 诱导骨骼肌损伤及其发病机制,能够为临床手足口病的预防和治疗提供新思路。

Caspases 是一种半胱氨酸蛋白酶,可以募集和激活局部组织中的炎症细胞产生炎症反应。其中, caspase-1 的激活在 EV 病毒诱导的心、肺等部位的炎症和纤维化中具有重要作用^[17-18]。Caspase-1 具有促炎性,是 NLRP3 炎性小体的一种效应蛋白,通过对 pro-IL-1 β 等炎性因子前体的加工修饰,以促进其成熟、分泌^[19]。因此,本研究拟通过 caspase-1 阻断鼠 EV71 感染模型,探讨 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 感染骨骼肌损伤中的分子机制,为 caspase-1 作为 EV71 感染的抗病毒治疗靶点提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级成年 BALB/c 小鼠,雌性 40 只,雄性 20 只,体质量 18~20 g,实验前适应性饲养 10 d,按 2:1 比例随机将雌鼠与雄鼠合笼,每天查看有无阴栓待孕鼠生产,取 1~14 日龄 SPF 级 BALB/c 乳鼠,实验期间乳鼠与母鼠同笼。成年 BALB/c 小鼠购自长春市亿斯实验动物技术有限公司[SCXK(吉)2020-0002],饲养于佳木斯大

学动物实验中心[SYXK(黑)2021-018]。本研究中动物护理和使用程序严格按照《实验动物管理条例》(1988 年)和《中华人民共和国实验动物护理和使用指南》(2006 年)执行。动物实验经佳木斯大学实验动物福利与伦理管理委员会批准(jmsu-2023121401)。实验遵守 3R 原则。

1.1.2 病毒

EV71 病毒株(FY04-R5 C1-R4 20120518)由佳木斯大学病理生理学教研室保存。

1.2 主要试剂与仪器

VX-765 (selleckchem 公司, 273404-37-8); TGF- β (Santa cruz 公司, sc-36); IL-1 β (Santa cruz 公司, sc-1253); Collagen I (Santa cruz 公司, sc-25974); pro-caspase-1 抗体 (Santa cruz 公司, sc-56036); EV71 VP-1 抗体 (Abnova 公司, MAB1255-M08); cleaved-caspase-1 (Affinity 公司, AF4005); Masson 三色染色试剂(索莱宝公司, G1340); 488 标记山羊抗兔 IgG (碧云天生物公司, A0423); 488 标记山羊抗鼠 IgG (碧云天生物公司, A0428); CY3 标记山羊抗鼠 IgG (博士德生物公司, BA1031); CY3 标记山羊抗兔 IgG (博士德生物公司, BA1032); Triton X-100 (碧云天生物公司, ST1723); DAPI (博士德生物公司, AR1177)。激光共聚焦荧光显微镜(卡尔蔡司公司, LSM 900); 显微镜病理切片机(Leica 公司, RM2125 RTS); 全自动化学发光成像分析系统(Tanon 公司, 4600)。

1.3 实验方法

1.3.1 EV71 病毒制备

EV71 病毒被接种至 RD 细胞后,需使用 PBS 进行 3~4 次的洗涤操作,随后吸除 PBS 并继续对细胞进行培养。在显微镜下持续观察细胞形态变化,当细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)超过 80%时,收集病毒样本。通过 3 次冻融循环收集 EV71 病毒液,随后在 4℃、3000 r/min 的条件下离心 15 min。离心完成后,将上清液转移到 30 kDa 的超滤管里,然后在 4℃、6000 r/min 的条件下离心 30 min,以提取病毒浓缩液。最后,使用 0.22 μ m 的孔径滤膜来过滤病毒浓缩液,并对其进行分装储存。

1.3.2 EV71 毒力测定

通过测定 TCID₅₀ 值计算病毒滴度,将 RD 细胞接种在 96 孔板中长成单层细胞, EV71 病毒浓

缩液用含有 2% FBS 的维持液作 10 倍系列稀释加入 RD 细胞中,每一稀释浓度设 8 个复孔,同时设阴性对照,37 ℃ 培养 72 h,观察并记录 CPE,TCID₅₀ 是通过 Reed-Muench 方法根据 CPE 的百分比计算得出的。

1.3.3 动物分组与造模

取 1 日龄 BALB/c 乳鼠随机分为正常对照 (normal control, NC) 组 60 只、EV71 感染组 60 只、caspase-1 抑制剂 (EV71+VX-765) 组 15 只。将 EV71 病毒液 (通过 Reed-Muench 方法,计算出 EV71 的 TCID₅₀ 为 10^{-4.12}/mL) 25 mL/kg 腹腔注射到 1 日龄 BALB/c 乳鼠体内,连续注射 3 d,建立 EV71 感染鼠模型。在病毒接种后 6 h 腹腔注射 caspase-1 抑制剂 VX-765 (20 mg/kg),连续 10 d 接种,每天观察小鼠的精神状况、临床表现、体重变化及死亡情况,直至取材,建立 caspase-1 抑制剂组模型。同时,正常对照组等体积注射含有 5% DMSO+10% PEG300 的生理盐水,6 h 后注射 2% 的细胞维持液。

1.3.4 骨骼肌苏木素-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色

将骨骼肌固定后使用乙醇脱水、石蜡包埋、切片,经过 HE 染色或 Masson 染色后封片,光学显微镜下观察骨骼肌组织病理学变化。

1.3.5 Western blot 检测骨骼肌中相关蛋白

取骨骼肌组织研磨后加入裂解液,提取蛋白进行蛋白浓度测定,经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,加入一抗 cleaved-caspase-1 (兔单克隆抗体)、pro-caspase-1 (小鼠单克隆抗体)、IL-1β (小鼠单克隆抗体)、Collagen I (小鼠单克隆抗体)、EV71 VP-1 (兔单克隆抗体) (1:1000) 和 GAPDH 4 ℃ 孵育 12 h,加入二抗 (HRP 山羊抗鼠、HRP 山羊抗兔) (1:10 000) 室温孵育 1 h,避光加入曝光液,用凝胶成像系统计算灰度值并拍照,分析各组蛋白相对表达情况。

1.3.6 免疫荧光法检测蛋白表达

取已制备完成的石蜡切片,脱蜡、水化、盐酸乙醇灭活、抗原修复,5% BSA 封闭后加入一抗 (cleaved-caspase-1、pro-caspase-1、IL-1β、TGF-β、α-SMA、Collagen I、EV71 VP-1) 4 ℃ 孵育过夜, PBST 洗涤后添加对应种属的荧光二抗 37 ℃ 避光孵育 1 h, PBST 再次洗涤后添加 DAPI 染液,封片后在荧光显微镜下观察细胞染色情况。使用 Image J 1.54f 软件进行结果分析。

1.4 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 8.2 软件进行统计学分析,正态分布的连续变量以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组之间比较采用 *t* 检验,多组间的差异采用单因素方差分析 (ANOVA)。 *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

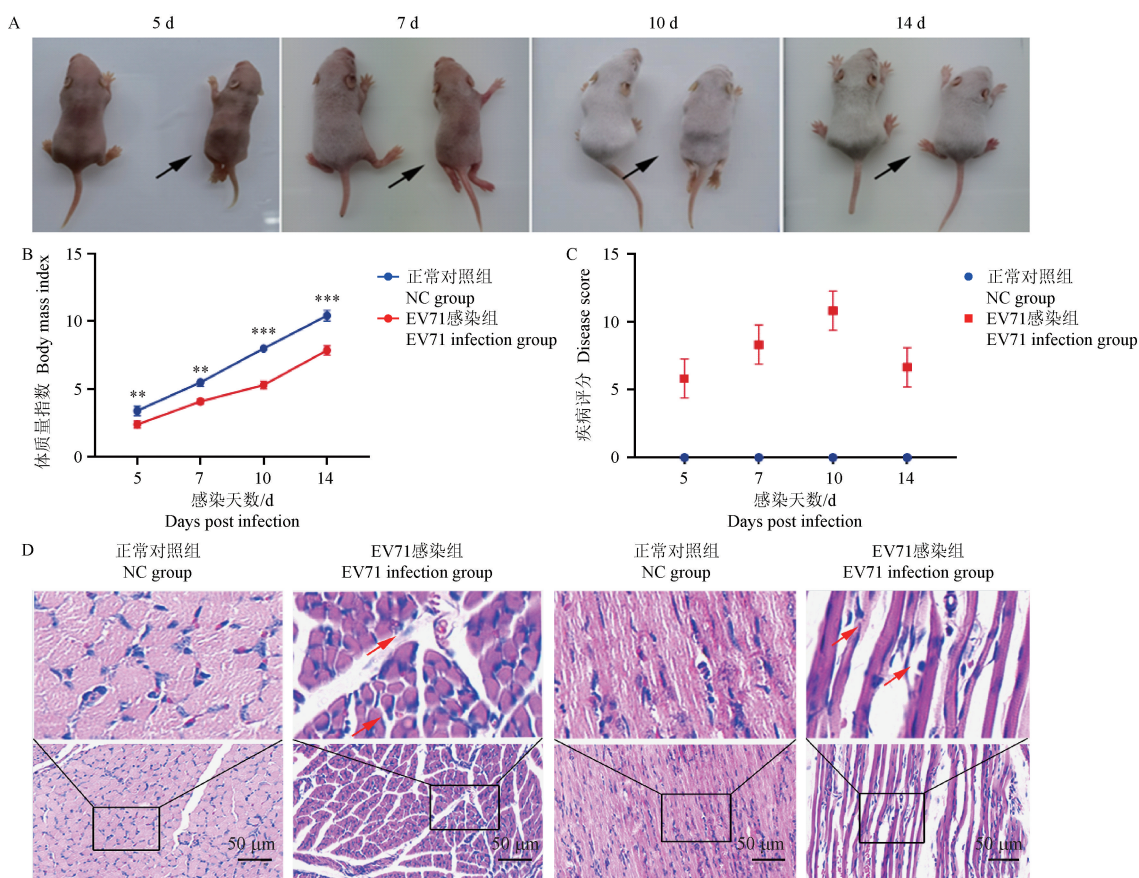
2 结果

2.1 EV71 感染 BALB/c 乳鼠模型的制备

正常对照组 BALB/c 乳鼠体质量稳定增长,皮毛顺滑;EV71 感染组 BALB/c 乳鼠自第 5 天出现身形瘦小、皮毛稀疏、体质量增长减缓和后肢瘫痪的表现 (图 1A)。比较 EV71 感染后 5 d、7 d、10 d 和 14 d 与同一时间点正常对照组 BALB/c 乳鼠的体质量和疾病评分,评分范围为 0~5 分,分数越高表示疾病严重程度越高 (0 分表示健康,5 分表示濒死状态或死亡)^[20]。结果显示,与同一时间点正常对照组相比, EV71 感染组 BALB/c 乳鼠的体质量增速减慢,体质量与正常对照相比下降 18%~30% (*P* < 0.001, 表 1),同时疾病评分增加 (图 1B~1C)。HE 染色后,观察到正常对照组乳鼠的骨骼肌结构完整,排列整齐,没有炎性细胞浸润的迹象;EV71 感染组乳鼠中,骨骼肌纤维排列紊乱,横截面积减少,可见到炎性细胞浸润并伴有充血 (图 1D)。EV71 感染乳鼠感染制备成功。

表 1 正常对照组和 EV71 感染组 BALB/c 乳鼠不同时间点的体质量 (*n* = 15)

Table 1 Body mass of BALB/c suckling mice in the normal group and EV71 model group at different time points (<i>n</i> = 15)				
组别 Groups	5 d	7 d	10 d	14 d
正常对照组 NC group	3.39±0.18	5.54±0.21	7.97±0.38	10.04±0.38
EV71 感染组 EV71 infection group	2.75±0.19	4.15±0.27	5.52±0.20	7.81±0.24
T	6.582	7.561	8.013	7.282
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



注:A:EV71 病毒感染引起 BALB/c 乳鼠外观形态学改变;B: BALB/c 乳鼠体重分析;C: BALB/c 乳鼠疾病评分分析;D: BALB/c 乳鼠骨骼肌病理切片。与正常对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 EV71 感染乳鼠一般情况

Note. A, EV71 infection induced morphological changes in the appearance of BALB/c suckling mice. B, Body mass analysis of BALB/c suckling mice. C, Clinical disease score analysis of BALB/c suckling mice. D, Pathological sections of skeletal muscle in BALB/c suckling mice. Compared with the NC group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 General situation of EV71 infected suckling mice

2.2 EV71 对 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤的影响

与同一时间点正常对照组相比, EV71 感染组 EV71 VP-1 蛋白在 5 d、7 d、10 d、14 d 水平明显升高($P<0.001$), 其中 EV71 VP-1 蛋白在 EV71 感染第 10 天表达最高(图 2)。EV71 感染后 5 d、7 d、10 d 与同一时间点正常对照组比, EV71 感染组促炎细胞因子 IL-1 β 和 α -SMA、细胞外基质 Collagen I 蛋白均明显升高($P<0.001$)(图 2)。然而, 与正常对照组第 14 天相比, EV71 感染组第 14 天细胞外基质 Collagen I 蛋白差异无统计学意义。

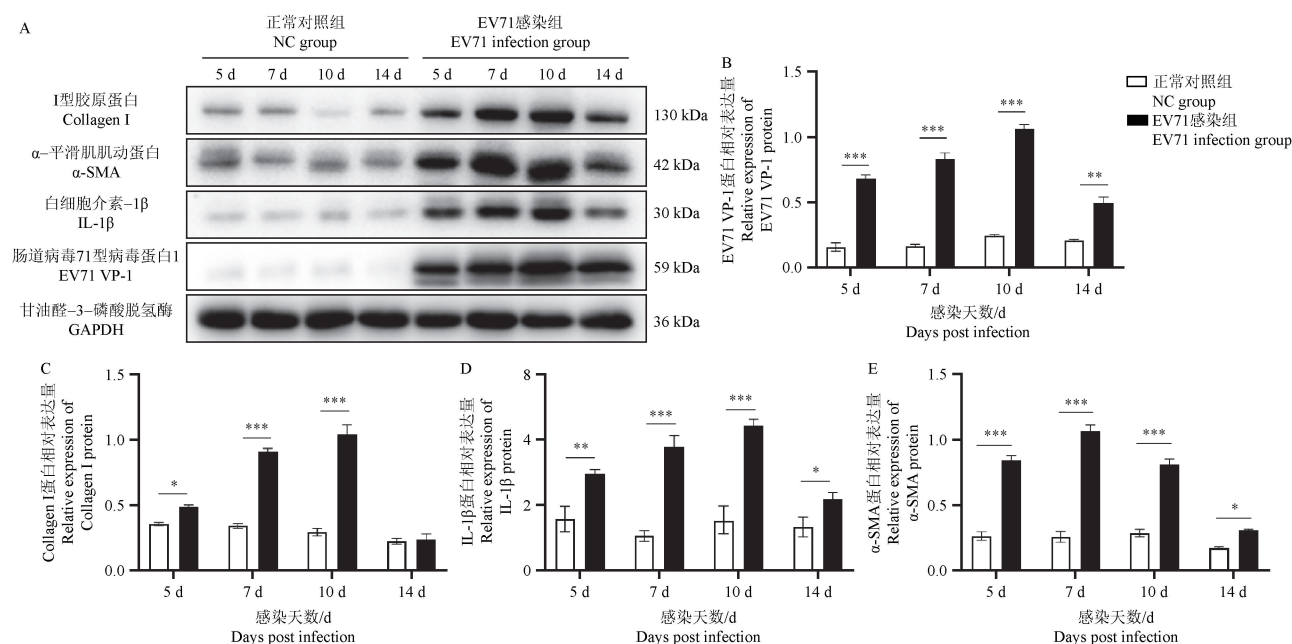
2.3 EV71 激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路

Western blot 检测结果显示, 与正常对照组相

比, EV71 感染组 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白水平明显升高($P<0.001$, 图 3)。使用 caspase-1 抑制剂 VX-765 后, EV71+VX-765 组骨骼肌组织匀浆中 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白水平较 EV71 感染组明显降低($P<0.001$)。与免疫荧光检测结果相一致($P<0.01$, 图 4)。表明 EV71 能够激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路。

2.4 阻断 caspase-1/IL-1 β 信号通路降低感染组乳鼠骨骼肌 TGF- β 、 α -SMA、Collagen I 的表达

由图 5 可见, 免疫荧光结果显示, 正常对照组中 EV71 VP-1 表达极低, 而 EV71 感染组骨骼肌中 EV71 VP-1 表达较高($P<0.001$), 且和正常对照组比, EV71 感染组 TGF- β 、 α -SMA 和 Collagen I

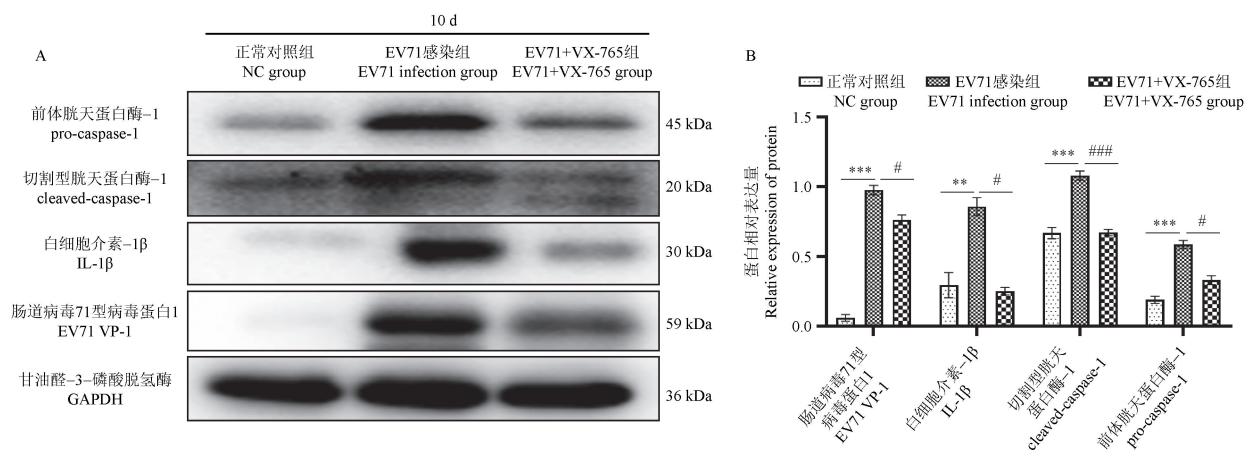


注:A:Western blot 检测骨骼肌样本中 EV71 VP-1、IL-1β、α-SMA、Collagen I 蛋白质水平;B~E:半定量分析表明 EV71 VP-1、Collagen I、IL-β 和 α-SMA 蛋白质变化。与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 EV71 对 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤的影响

Note. A, Western blot analysis of protein levels of EV71 VP-1, IL-1β, α-SMA, and Collagen I in skeletal muscle samples. B, Semi-quantitative analysis revealed significant changes in EV71 VP-1, Collagen I, IL-β and α-SMA protein expression. Compared with NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Effect of EV71 on skeletal muscle damage in BALB/c suckling mice

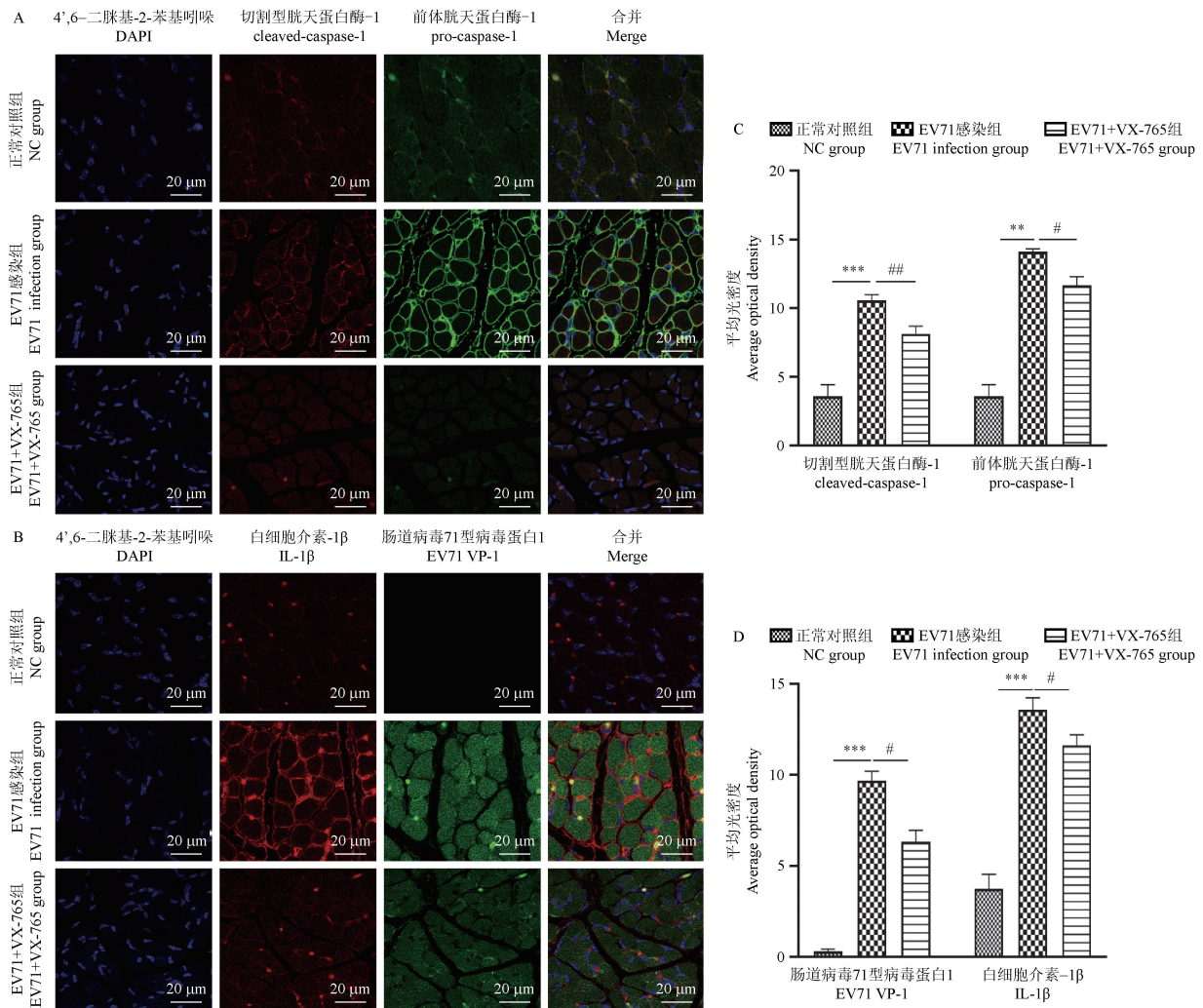


注:A:Western blot 检测 BALB/c 乳鼠骨骼肌组织匀浆中 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白质表达;B:半定量分析表明 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白质变化。与正常对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 EV71 感染组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。

图3 Western blot 检测 BALB/c 乳鼠骨骼肌组织 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白水平

Note. A, Western blot analysis of protein expression levels of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β in skeletal muscle tissue homogenates from BALB/c suckling mice. B, Semi-quantitative analysis revealed dynamic changes in the expression of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β proteins. Compared with the NC group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Western blot analysis of protein levels of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β in skeletal muscle tissue from BALB/c suckling mice



注:A:免疫荧光共定位分析 pro-caspase-1 与 cleaved-caspase-1 在骨骼肌组织中的表达;B:免疫荧光共定位分析 EV71 VP-1 与 IL-1β 在骨骼肌组织中的表达;C:pro-caspase-1 与 cleaved-caspase-1 的相对荧光强度;D:EV71 VP-1 与 IL-1β 的相对荧光强度。与正常对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 EV71 感染组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 免疫荧光检测 BALB/c 乳鼠骨骼肌组织 EV71 VP-1、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1β 蛋白水平

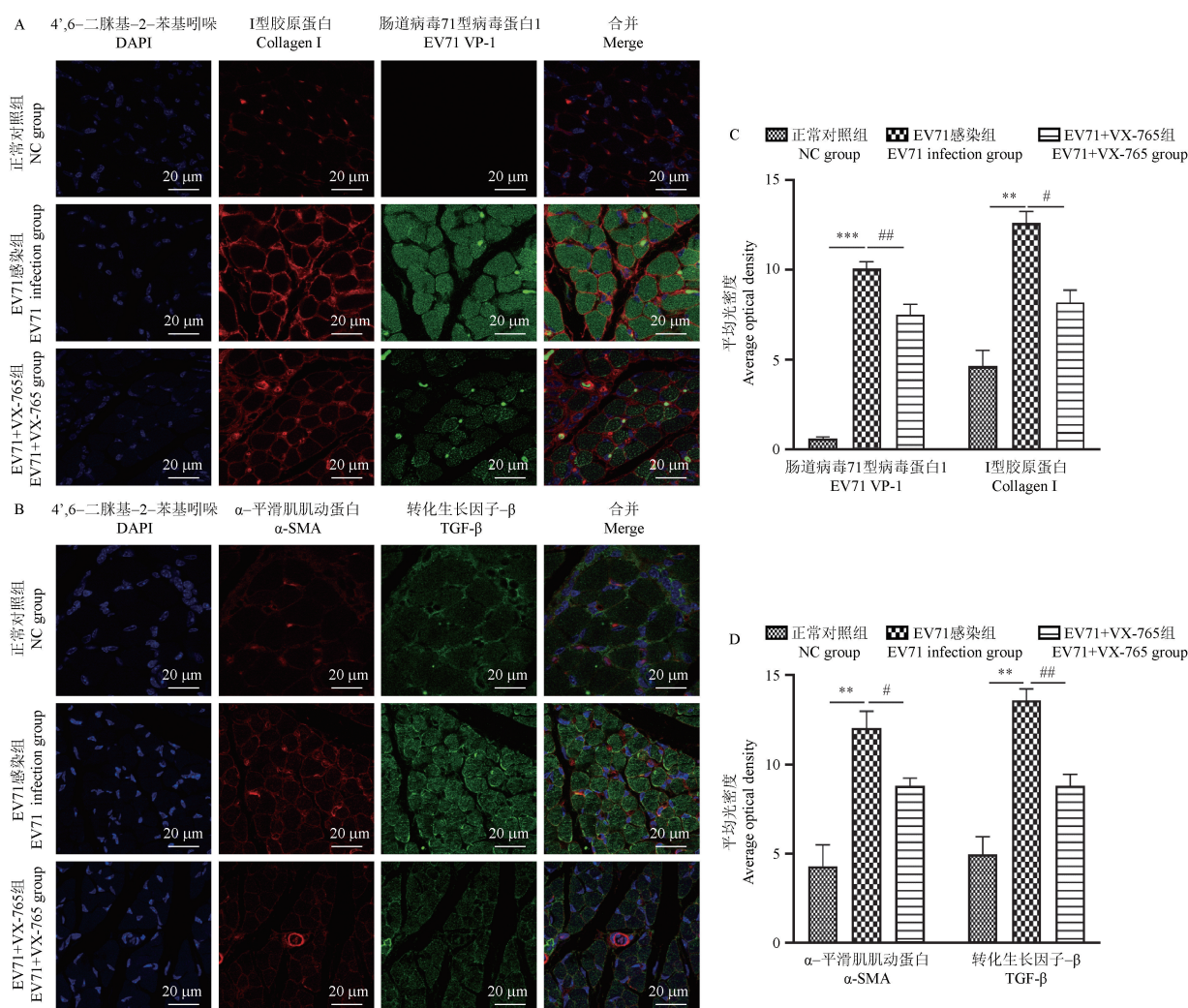
Note. A, Immunofluorescence co-localization analysis of pro-caspase-1 and cleaved-caspase-1 in skeletal muscle tissues. B, Immunofluorescence co-localization analysis of EV71 VP-1 and IL-1β in skeletal muscle tissues. C, Relative fluorescence intensity quantification of pro-caspase-1 and cleaved-caspase-1 across experimental groups. D, Relative fluorescence intensity quantification of EV71 VP-1 and IL-1β across experimental groups. Compared with the NC group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Immunofluorescence analysis of protein levels of EV71 VP-1, pro-caspase-1, cleaved-caspase-1, and IL-1β in skeletal muscle tissue from BALB/c suckling mice

表达均升高 ($P < 0.01$)。使用 caspase-1 抑制剂 (VX-765) 后, EV71 VP-1 和 TGF-β 的表达显著下调 ($P < 0.01$)。Western blot (图 6) 与免疫荧光结果一致, 与正常对照组相比, EV71 感染可以促进 α-SMA、Collagen I 的生成和释放 ($P < 0.01$), 使用 VX-765 治疗可以显著减少 EV71 感染组骨骼肌组织匀浆中 α-SMA 和 Collagen I 的高表达 ($P < 0.01$)。

2.5 阻断 Caspase-1/IL-1β 信号通路对骨骼肌病理变化的影响

观察阻断 caspase-1 对 EV71 诱导的 BALB/c 乳鼠骨骼肌炎症和纤维化的治疗作用, 评估 BALB/c 乳鼠体质量、疾病评分、病理骨骼肌组织变化。组织病理学评价显示, EV71 诱导的感染组骨骼肌结构紊乱、炎症细胞浸润、横纹肌断裂均较对照组严重 (图 7A)。胶原沉积是骨骼肌纤



注:A:免疫荧光共定位分析 EV71 VP-1 与 Collagen I 在骨骼肌组织中的表达;B:免疫荧光共定位分析 α-SMA 与 TGF-β 在骨骼肌组织中的表达;C:EV71 VP-1 与 Collagen I 的相对荧光强度;D:α-SMA 与 TGF-β 的相对荧光强度。与正常对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 EV71 感染组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

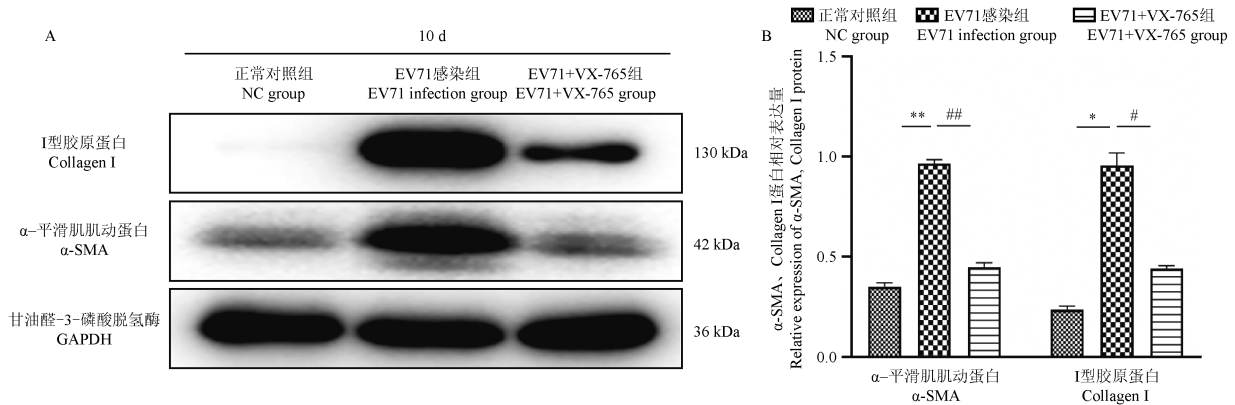
图 5 免疫荧光检测阻断 caspase-1/IL-1β 信号通路可抑制 EV71 感染乳鼠骨骼肌 TGF-β、α-SMA、Collagen I 的表达

Note. A, Immunofluorescence co-localization analysis of EV71 VP-1 and Collagen I in skeletal muscle tissues. B, Immunofluorescence co-localization analysis of α-SMA and TGF-β in skeletal muscle tissues. C, Relative fluorescence intensity quantification of EV71 VP-1 and Collagen I across experimental groups. D, Relative fluorescence intensity quantification of α-SMA and TGF-β across experimental groups. Compared with the NC group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 5 Immunofluorescence analysis confirmed that pharmacological blockade of the caspase-1/IL-1β signaling pathway significantly suppresses the expression of fibrosis-associated markers, including TGF-β, α-SMA and Collagen I in the skeletal muscle of EV71-infected suckling mice

维化的典型征象。对骨骼肌组织进行 Masson 染色。胶原纤维 Masson 染色显示大的蓝色纤维条纹。结果显示,感染组的蓝色纤维明显增加,阻断 caspase-1/IL-1 信号通路可缓解 EV71 诱导的骨骼肌组织的上述变化(图 7B)。研究发现, EV71 诱导感染组乳鼠的体质量明显低于正常对

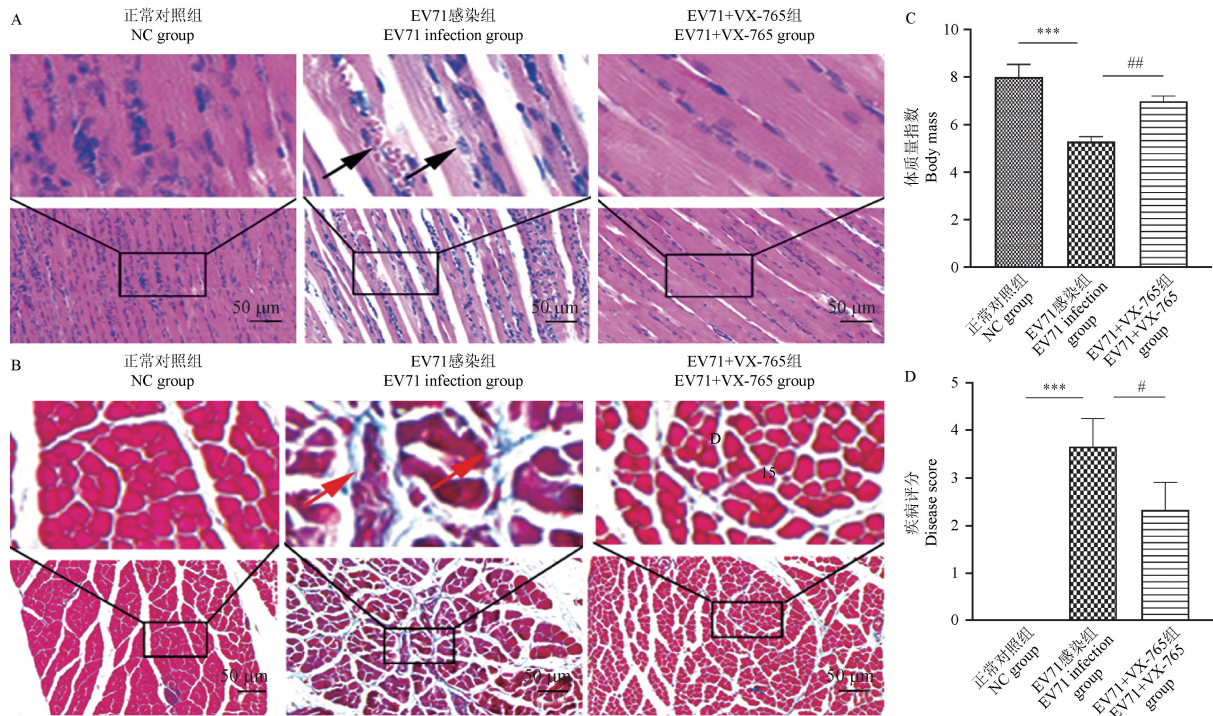
照组($P<0.001$),阻断 caspase-1 可以减轻 EV71 引起的体质量下降($P<0.01$,图 7C)。此外,对各组 BALB/c 乳鼠进行疾病评分分析,发现 EV71 诱导的感染组乳鼠疾病评分比正常对照组明显升高($P<0.001$),阻断 caspase-1 可以降低 EV71 引起的疾病评分的上调($P<0.05$,图 7D)。



注:A;Western blot 检测骨骼肌样本中 α-SMA 和 Collagen I 蛋白质水平;B;半定量分析表明 α-SMA 和 Collagen I 蛋白质变化。与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 EV71 感染组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 Western blot 检测阻断 caspase-1/IL-1 β 信号通路可抑制 EV71 感染乳鼠骨骼肌 α-SMA、Collagen I 的表达
Note. A, Western blot analysis of protein levels of α-SMA and Collagen I in skeletal muscle samples. B, Semi-quantitative analysis revealed significant changes in α-SMA and Collagen I protein expression. Compared with the NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the EV71 infection group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Western blot analysis demonstrated that blockade of the caspase-1/IL-1 β signaling pathway significantly suppresses the expression of α-SMA and Collagen I in the skeletal muscle of EV71-infected suckling mice



注:A;BALB/c 乳鼠骨骼肌病理学变化矢状切面;B;BALB/c 乳鼠骨骼肌 Masson 染色;C;BALB/c 乳鼠疾病体质量分析;D;BALB/c 乳鼠疾病评分分析。与正常对照组相比, *** $P < 0.001$;与 EV71 感染组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 7 阻断 Caspase-1/IL-1 β 信号通路对骨骼肌病理变化的影响

Note. A, Sagittal section of skeletal muscle pathological changes in BALB/c suckling mice. B, BALB/c suckling mouse skeletal muscle Masson staining. C, Disease weight analysis of BALB/c suckling rats. D, Disease score analysis of BALB/c suckling rats. Compared with the NC group, *** $P < 0.001$. Compared with the EV71 infection group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 7 Effect of blockade of caspase-1/IL-1 β signaling pathway on pathological changes in skeletal muscle

3 讨论

上述试验结果表明, EV71 病毒通过激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导骨骼肌持续的炎症损伤和骨骼肌纤维化因子表达上调, 最终导致小鼠骨骼肌损伤(图 8)。本文基于以往对 EV71 感染随时间变化规律文献的研究^[21], 将 BALB/c 乳鼠分成 5 d、7 d、10 d、14 d 4 个时间点进行观察。结果发现, EV71 感染组 BALB/c 乳鼠自第 5 天开始毛发稀疏、体质量增长减缓、双后肢麻痹瘫痪、疾病评分增加, 且在 EV71 感染后第 10 天损伤严重; HE 染色发现, 与正常对照组相比, EV71 感染组骨骼肌纤维排列紊乱, 横纹肌溶解, 横截面积减少, 可见炎症细胞浸润及充血。EV71 VP-1 蛋白是最主要的衣壳蛋白, 具有重要的细胞受体结合位点及最多型的特异性中和位点, 直接决定病毒的抗原性^[22-23]。Western blot 检测结果显示, 与正常对照组相比, EV71 感染组 EV71 VP-1 蛋白水平明显升高。值得注意的是, EV71 VP-1 蛋白含量在 EV71 感染组 5~10 d 逐渐升高, EV71

感染组 BALB/c 乳鼠肌肉组织中病毒载量在第 10 天达到最高, 提示 EV71 病毒载量随时间对应增加, 并在骨骼肌中大量复制。

骨骼肌损伤表现为肌纤维的部分撕裂甚至是完全断裂触发炎症反应, 且对受累肌肉的功能产生显著影响^[24]。炎症反应中免疫细胞诱导多种继发性促炎细胞因子 IL-1 β 、TGF- β 1 等异常增高^[25-26]。IL-1 β 是一种重要的促炎细胞因子, TGF- β 是调控骨骼肌纤维化的核心分子, 不仅可以上调间质细胞标志物 α -SMA 与细胞外基质 Collagen 的表达, 还可以促进成肌细胞横向分化为肌成纤维细胞^[27-31]。本研究结果表明, IL-1 β 在正常对照组骨骼肌组织匀浆中表达很少, 但在 EV71 感染后的第 5、7、10 天, IL-1 β 蛋白水平明显升高, 在第 10 天达到峰值。这些结果提示 EV71 感染可以上调促炎细胞因子 IL-1 β 的表达, 造成骨骼肌炎症损伤。然而 EV71 诱导骨骼肌炎症损伤是否会伴随纤维化因子的上调目前尚不清楚。因此, 本研究进一步检测各时间点 α -SMA、细胞外基质 Collagen I 蛋白水平, 结果表明, 相较于正

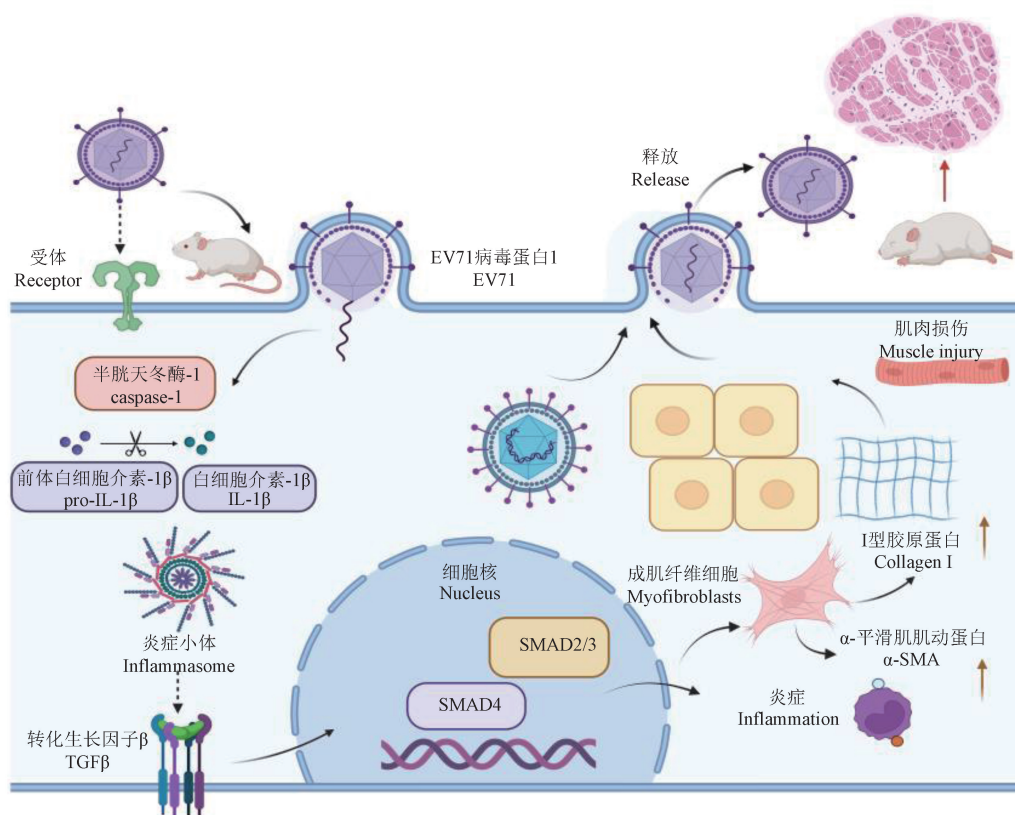


图 8 caspase-1/IL-1 β 信号通路对骨骼肌病理损伤的机制图

Figure 8 Mechanism diagram of pathological injury of skeletal muscle induced by caspase-1/IL-1 β signaling pathway

常对照组同一时间点, EV71 感染组 α -SMA、Collagen I 蛋白水平明显升高, 因此, 推测 EV71 诱导骨骼肌产生肌炎引起炎性细胞因子上调, 可能进一步导致肌成纤维细胞过度活化增殖并产生大量胶原。

Caspase-1 信号通路在各种器官纤维化过程中起重要作用^[32-34], EV71 3D 蛋白通过直接结合 NLRP3 刺激 NLRP3 炎性体的激活^[35]。NLRP3 炎性小体激活后, caspase-1 和 IL-1 β 的分泌增加, 导致肌成纤维细胞合成大量胶原进而引起心肌纤维化样改变^[36]。因此, 为了探讨 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 诱导骨骼肌损伤过程中的作用, 本研究通过给予 caspase-1 抑制剂 (VX-765) 进行干预, 发现与免疫荧光检测结果一致, EV71+VX-765 组 BALB/c 乳鼠较骨骼肌组织匀浆中 pro-caspase-1、cleaved-caspase-1、IL-1 β 、 α -SMA、Collagen I 等蛋白水平较 EV71 感染组明显降低, 提示 VX-765 可以逆转 EV71 导致的 caspase-1、IL-1 β 等炎症因子的表达, 减轻骨骼肌炎症损伤, 临床症状及也得到了改善。这些结果均表明 EV71 可以通过激活 caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导骨骼肌持续的炎症损伤和骨骼肌纤维化因子的上调, 证实了 caspase-1/IL-1 β 信号通路在 EV71 诱导骨骼肌损伤中的重要作用, 见图 8。

综上所述, EV71 能够诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌局部出现促炎因子浸润, 肌纤维断裂, 促炎细胞因子和细胞外基质蛋白表达上调。抑制 caspase-1/IL-1 β 信号通路对 EV71 诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤具有一定的保护作用, 能够降低促炎因子分泌, 改善 EV71 诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌炎症反应, 从而减少纤维化因子的分泌。因此, EV71 可能通过 caspase-1/IL-1 β 信号通路诱导 BALB/c 乳鼠骨骼肌损伤, caspase-1/IL-1 β 信号通路可以作为一个新的靶点为临床手足口病的诊疗思路和药物研发提供新方向。但是 EV71 感染儿童引起手足口病机制复杂, 减轻 EV71 感染乳鼠的骨骼肌损伤过程中是否有其他通路参与仍需进一步研究。

参考文献:

[1] CARDOSA M J, PERERA D, BROWN B A, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and

recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(4): 461-468.

- [2] SCHMIDT N J, LENNETTE E H, HO H H. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. *J Infect Dis*, 1974, 129(3): 304-309.
- [3] 陆步来, 秦颖, 刘凤凤, 等. 2024 年 6 月中国需关注的突发公共卫生事件风险评估 [J]. *疾病监测*, 2024, 39(6): 673-676.
- LU B L, QIN Y, LIU F F, et al. Risk assessment of public health emergencies concerned in China, June 2024 [J]. *Dis Surveillance*, 2024, 39(6): 673-676.
- [4] 朱其荣, 王川林, 刘娇, 等. EV71 型重症手足口病患儿的临床特征及危险因素的相关性分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(25): 67-73.
- ZHU Q R, WANG C L, LIU J, et al. Clinical features of children with type EV71 severe hand, foot and mouth disease and correlation analysis of risk factors [J]. *China J Mod Med*, 2017, 27(25): 67-73.
- [5] KOBAYASHI N, MITSUI T, OGAWA Y, et al. A rare case of chronic active Epstein-Barr virus (EBV) infection accompanied by the infiltration of EBV-infected CD8⁺ T cells into the muscle [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 40(3): e171-e175.
- [6] KOMATSU H, SHIMIZU Y, TAKEUCHI Y, et al. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection [J]. *Pediatr Neurol*, 1999, 20(1): 17-23.
- [7] XIAO X, QI J, LEI X, et al. Interactions Between Enteroviruses and the Inflammasome: New Insights Into Viral Pathogenesis [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 321.
- [8] CHOOI W H, WINANT O, ZENG Y, et al. Enterovirus-A71 preferentially infects and replicates in human motor neurons, inducing neurodegeneration by ferroptosis [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13(1): 2382235.
- [9] YANG F, ZHANG N, CHEN Y, et al. Role of Non-Coding RNA in Neurological Complications Associated With Enterovirus 71 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 873304.
- [10] KOU Z, JIA J, LIU X, et al. Epidemiological characteristics and spatial-temporal clusters of hand, foot, and mouth disease in Qingdao City, China, 2013-2018 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0233914.
- [11] ESPOSITO S, PRINCIPI N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(3): 391-398.
- [12] PENG Y, HE W, ZHENG Z, et al. Factors related to the mortality risk of severe hand, foot, and mouth diseases (HFMD): a 5-year hospital-based survey in Guangxi, Southern China [J]. *BMC Infect Dis*, 2023, 23(1): 144.

- [13] CHANG L Y, HUANG L M, GAU S S, et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection [J]. N Engl J Med, 2007, 356(12): 1226–1234.
- [14] YU P, GAO Z, ZONG Y, et al. Histopathological features and distribution of EV71 antigens and SCARB2 in human fatal cases and a mouse model of enterovirus 71 infection [J]. Virus Res, 2014, 189: 121–132.
- [15] ZHANG H, SONG Z, ZOU J, et al. An infectious clone of enterovirus 71(EV71) that is capable of infecting neonatal immune competent mice without adaptive mutations [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 427–438.
- [16] CHEN C Y, CHANG Y C, HUANG C C, et al. Acute flaccid paralysis in infants and young children with enterovirus 71 infection: MR imaging findings and clinical correlates [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2001, 22(1): 200–205.
- [17] CAMPBELL G R, TO R K, HANNA J, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway [J]. iScience, 2021, 24(4): 102295.
- [18] MITEVA K, PAPPRITZ K, SOSNOWSKI M, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit NLRP3 inflammasome activation in a model of Coxsackievirus B3-induced inflammatory cardiomyopathy [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2820.
- [19] 樊懿萱, 王心威, 李军梅, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路探索小鼠急性肺损伤动态时间模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 423–434.
- FAN Y X, WANG X W, LI J M, et al. Establishment of a dynamic model of acute lung injury in mice based on the NLRP3/Caspase-1/gasdermin D signaling pyroptosis pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 423–434.
- [20] 李怡沅, 陈恒, 苗瑞雪, 等. EV71 不同临床株的新生小鼠毒力研究 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 335–342.
- LI Y Y, CHEN H, MIAO R X, et al. Virulence of enterovirus 71 in infected neonatal mouse models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 335–342.
- [21] JIN Y, SUN T, ZHOU G, et al. Pathogenesis study of enterovirus 71 using a novel human SCARB2 knock-In mouse model [J]. mSphere, 2021, 6(2): e01048–e01068.
- [22] WANG H, LI Y. Recent progress on functional genomics research of enterovirus 71 [J]. Virol Sin, 2019, 34(1): 9–21.
- [23] PLEVKA P, PERERA R, CARDOSA J, et al. Crystal structure of human enterovirus 71 [J]. Science, 2012, 336(6086): 1274.
- [24] GAUDENZIO N, SIBILANO R, MARICHAL T, et al. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies [J]. J Clin Invest, 2016, 126(10): 3981–3998.
- [25] MIGLIORINI P, ITALIANI P, PRATESI F, et al. The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases [J]. Autoimmun Rev, 2020, 19(9): 102617.
- [26] BONNIAUD P, MARGETTS P J, ASK K, et al. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis [J]. J Immunol, 2005, 175(8): 5390–5395.
- [27] DOLIVO D, WEATHERS P, DOMINKO T. Artemisinin and artemisinin derivatives as anti-fibrotic therapeutics [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(2): 322–339.
- [28] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 37–55.
- [29] SÁNCHEZ-DUFFHUES G, GARCÍA DE VINUESA A, VAN DE POL V, et al. Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2 [J]. J Pathol, 2019, 247(3): 333–346.
- [30] LI Y, FOSTER W, DEASY B M, et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis [J]. Am J Pathol, 2004, 164(3): 1007–1019.
- [31] 李开杨, 吴小梅, 黄敬, 等. 天然产物调控 TGF-β1/Smad 通路治疗肝纤维化研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(10): 1320–1331.
- LI K Y, WU X M, HUANG J, et al. Progress of research into natural products that regulate TGF-β1/Smad pathway for the treatment of hepatic fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(10): 1320–1331.
- [32] HE X, MEKASHA S, MAVROGIORGOS N, et al. Inflammation and fibrosis during *Chlamydia pneumoniae* infection is regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC inflammasome [J]. J Immunol, 2010, 184(10): 5743–5754.
- [33] NAM S A, KIM W Y, KIM J W, et al. Autophagy attenuates tubulointerstitial fibrosis through regulating transforming growth factor-β and NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 78.
- [34] MULAY S R. Multifactorial functions of the inflammasome component NLRP3 in pathogenesis of chronic kidney diseases [J]. Kidney Int, 2019, 96(1): 58–66.
- [35] WANG W, XIAO F, WAN P, et al. EV71 3D protein binds with NLRP3 and enhances the assembly of inflammasome complex [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(1): e1006123.
- [36] LI P L. Cardiovascular pathobiology of inflammasomes: inflammatory machinery and beyond [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(13): 1079–1083.