

肠道病毒 71 型感染所致手足口病神经系统并发症研究中采用的细胞系和小鼠模型

刘岩, 陈丽琴

内蒙古医科大学基础医学院法医学系, 呼和浩特 010059

摘要:手足口病在国内外已造成多次大流行, 并发神经系统损害者后果较重, 病死率较高。肠道病毒 71 型 (EV71) 是重症手足口病的主要病原体。为获得有效的药物及疫苗, 针对 EV71 的感染机制和致病性, 国内外学者采用体外培养细胞、实验动物等进行实验研究。本文就 EV71 感染所致手足口病神经系统损害的研究中所用离体细胞和小鼠模型作一综述, 以期为该领域的研究提供帮助。

关键词:肠道病毒 71 型; 手足口病; 神经系统并发症; 细胞系; 小鼠模型

In vitro and *in vivo* models for neurological complications in hand, foot and mouth disease caused by enterovirus 71 infection

LIU Yan, CHEN Li-Qin

Department of Forensic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China

Abstract: Enterovirus 71 (EV71) infection leads to hand, foot and mouth disease (HFMD) and neurological complications. It has caused many pandemics worldwide. In order to develop effective medicines and vaccines to treat HFMD caused by EV71, the researchers have been studying EV71 pathogenesis using susceptible cells and experimental animals. The *in vitro* and *in vivo* models are summarized in this paper.

Key words: Enterovirus 71; Hand, foot and mouth disease; Neurological complication; Cell line; Mouse model

手足口病是由肠道病毒引起的传染病, 多数温和, 具有自限性。主要症状表现为发热、手、足、臀部皮疹, 疱疹性咽峡炎等, 少数病例可发展为重症, 如脑炎、脑干脑炎、急性弛缓性麻痹、神经源性肺水肿, 遗留后遗症甚至死亡^[1]。目前公认的导致严重并发症的病原体是肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71)。临床资料显示, EV71 感染所致手足口病较其他肠道病毒进展速度更快, 可有高热、肢体运动失调、昏迷、抽搐等神经系统损害及呼吸、循环功能受损表现, 临床症状与体征十分吻合^[2]。

自 1969 年在美国加利福尼亚州中枢神经系统

疾病患儿粪便中首次分离到 EV71 以来^[3], EV71 所致手足口病在国内外广泛传播, 我国北京^[4]、台湾地区^[5]、广东^[6]、辽宁^[3]、山东^[7]、安徽^[8]等地, 以及日本^[9]、新加坡^[10]、越南^[11]、马来西亚^[12]、德国^[13]等国均发生过较大规模流行。EV71 有 3 个基因型别 (A、B、C), 包括 A1、A2, B1~B5 和 C1~C5 亚型^[9,11,13,14]。日本曾发现 A1 亚型, 与 20 世纪 70 年代欧洲引起脊髓灰质炎样瘫痪的病毒基因型接近, 随后在 1998~2003 年的手足口病病例中分离到 B5 亚型^[9]。2000 年 9~10 月新加坡手足口病流行期间, 在死亡病例阳性标本中均检测到 EV71^[10]。

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY13419)

通信作者: 陈丽琴

Corresponding author. CHEN Li-Qin, E-mail: lqchenyj@163.com

2005 年在越南南部暴发手足口病病例中发现 C5 亚型^[11]。2007 年法国手足口病流行的致死性病原体属 C2 亚型^[15]。我国最多见的是 C4 亚型^[8]。我国对 2008 年 5 月~2009 年 12 月 EV71 感染所致 1 065 000 例手足口病病例统计发现,其中 91.9% < 5 岁,发病高峰在 1 岁以下,男性多于女性;北京、天津、上海、浙江、海南为高发地区,4~8 月为高发月份,且城市高于农村^[16]。

近年来手足口病暴发呈增多趋势,重症手足口病给患者家庭带来沉重的经济和精神负担。目前对 EV71 致病机制的研究及药物和疫苗的筛选仍处于实验阶段,而适宜的体外细胞及动物模型是开展各种实验的前提。本文总结了近年来常用的细胞系和小鼠模型,以期早日攻克手足口病提供一定的帮助。

1 体外细胞

1.1 肿瘤细胞

1.1.1 RD 细胞 即人横纹肌肉瘤细胞,常用于 EV71 的培养和分离。在提取单克隆抗体以区别临床上感染病毒种类的实验中,RD 细胞可作为 EV71 增殖的感染细胞^[17]。另外,RD 细胞对 EV71 高度易感,有研究者认为此系其表面存在人清道夫受体 B2(scavenger receptor B2, SCARB2)。Yamayoshi 等^[18]将 RD 细胞的染色体 DNA 转染至不易感染 EV71 的小鼠 L929 细胞,得到 2 个携带人类基因的单克隆细胞系 Ltr051 和 Ltr246。应用人微阵列基因分析及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增转化株的 SCARB2 等,发现转化株稳定表达人 SCARB2。用 EV71 的亚型 SK-EV006 感染 L-SCARB2 细胞(Ltr051、Ltr246)和 RD 细胞,48 h 后 2 种细胞即可出现病变;进一步用 EV71 的亚型 BrCr(基因型 A)、Nagoya(基因型 B)和 Isehara(基因型 C)感染 L-SCARB2 细胞,结果与 RD 细胞的易感性相似。这一结果表明,SCARB2 可参与多种 EV71 亚型导致的手足口病。EV71 对 L-SCARB2 细胞和 RD 细胞的感染可被 SCARB2 抗体以剂量依赖性方式抑制,证明 SCARB2 与 EV71 感染相关。RD 细胞还可用于体外抗 EV71 药物实验以评估药效,利巴韦林和普拉康纳利(pleconaril)均可有效提高 EV71 感染的 RD 细胞的存活能力,用药细胞极少出现细胞病变^[19]。

1.1.2 SF268 细胞 即人胶质母细胞瘤细胞。由于 EV71 易侵犯胶质细胞,参与感染细胞 DNA 断

裂、磷脂酰丝氨酸迁移等凋亡过程,SF268 细胞常用于此方面的研究。Shih 等^[20]将 SF268 细胞作为易感细胞,应用紫外线灭活 EV71、RNA 合成抑制剂及氯喹阻碍病毒脱衣壳等干预凋亡各相关阶段,观察到凋亡的发生继发于病毒吸附、入胞、脱衣壳等过程之后,感染细胞的凋亡主要在病毒蛋白合成和病毒复制阶段进行,病毒蛋白合成对凋亡的启动极其重要。

1.1.3 SK-N-MC 和 SK-N-SH 细胞 即人神经母细胞瘤细胞。Chang 等^[21]用 EV71 感染 SK-N-MC、SF268、RD、Vero 等细胞,研究神经细胞和非神经细胞被感染后的凋亡通路。EV71 可导致细胞 DNA 断裂、磷脂酰丝氨酸迁移,凋亡前细胞色素 C 从线粒体流入细胞质,启动 caspase-9 的活化过程,通过线粒体途径和 caspase-9 途径诱导神经细胞凋亡;而 caspase-8 的活化只在非神经细胞中存在。SK-N-SH 细胞系曾作为 EV71 的感染细胞用于牛乳铁传递蛋白的抗 EV71 测试,该乳铁蛋白可通过与 EV71 和宿主细胞相互作用诱导 I 型干扰素、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)等产生,抑制 EV71 感染,是治疗 EV71 所致手足口病的药物之一^[22]。

1.1.4 Caco-2 细胞 即人克隆结肠腺癌细胞。由于其起源于人肠细胞,在特殊培养条件下可分化为肠上皮细胞,且细胞培养技术较为成熟,因此广泛应用于体外实验研究。常与 SK-N-SH 细胞共同用于 EV71 的培养、分离和感染。有报道,在 SK-N-SH 和 Caco-2 细胞接种 EV71 的 4643 和 MP4 亚型,比较 2 种亚型在不同细胞中的生长速度,再将培养的病毒接种新生小鼠,从而选择小鼠敏感的 EV71 亚型用于中枢神经系统感染研究^[23]。

1.1.5 RD-18S 细胞 即克隆的人横纹肌肉瘤细胞。在手足口病流行地区,往往存在多种类型病毒,需用多种细胞如 RD-18S、Vero、HeLa、GL-37 等作为培养细胞进行病毒增殖,并用多种技术如中和抗体测定、反转录 PCR(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)扩增、核苷酸序列分析等测定病毒类型^[24]。

1.1.6 HeLa 细胞 即人宫颈癌细胞。细胞培养技术周期长且特异性较低,短期内难以用于临床诊断,因此 RT-PCR 是目前广泛采用的手足口病病毒基因扩增技术,在应用 RT-PCR 前需将临床提取的带有病毒的样本接种于易感细胞进行增殖,HeLa 细胞和 RD 细胞较为常用^[10]。

1.1.7 DLD-1 肠细胞 即人结直肠腺癌上皮细

胞。该细胞表面存在的唾液酸聚糖(sialylated glycan)是 EV71 的受体之一,与 EV71 结合能感染细胞,而唾液酸酶能抑制 EV71 的感染与复制。天然存在于人乳中的唾液酸偶联的抑制性多糖对 DLD-1 肠细胞的 EV71 感染也有明显降低作用,这为母乳喂养预防 EV71 感染提供了客观证据^[25]。

1.2 转基因细胞

1.2.1 3T3-SCARB2 细胞 随着 SCARB2 的发现,近年来有研究者将人 SCARB2 基因整合入 NTH3T3 小鼠成纤维细胞,获得 SCARB2 的转基因细胞。Lin 等^[26]用 EV71 感染包括 3T3-SCARB2 细胞在内的 3 种易感细胞,发现 EV71 衣壳蛋白的表达程度在 3T3-SCARB2 细胞最高,在 RD 细胞居中,在 Vero 细胞最低,从而证明了 SCARB2 转基因细胞的易感性。同时,还发现网格蛋白依赖的胞吞作用是 EV71 入胞的通路,这一通路需在 pH 值较低的内涵体酸化环境中进行。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 可干扰 EV71 入胞,这为 siRNA 成为治疗 EV71 感染的候选方法之一提供了证据。

1.2.2 Ltr051 细胞 即 SCARB2 转基因细胞。用 RD 细胞 DNA 转染小鼠 L929 细胞,获得携带人 SCARB2 基因的细胞系 Ltr051 和 Ltr246。EV71 感染 Ltr051、Ltr246 和 RD 细胞的实验证明,Ltr051 细胞较 Ltr246 细胞更易感,高效表达人 SCARB2 基因。研究表明,Ltr051 和 RD 细胞对 EV71 具有相似的易感性^[18]。这一研究成功建立了体外 SCARB2 动物细胞模型,从而使 Ltr051 鼠细胞能模拟人类细胞用于 EV71 感染机制的研究。

1.3 其他种类细胞

1.3.1 Vero 细胞 即非洲绿猴肾细胞。常将 EV71 接种于 Vero 细胞增殖,提取的 EV71 灭活后注入实验动物体内进行疫苗研究^[27,28]。另外,在 EV71 毒力和抗原性等研究中,Vero 细胞可用于病毒 RNA 转染载体及从感染动物组织中分离病毒^[29]。将 EV71 C4 亚型 Hn2 在 Vero 细胞中增殖,灭活后接种实验动物,行单克隆抗体测定,对制备抗 EV71 的免疫制剂有重要意义^[30]。

1.3.2 THP-1 细胞 即人单核细胞。Han^[31]等将不同浓度的静脉注射丙种球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG) 与 EV71 混合孵育后感染 THP-1 细胞,发现高浓度 IVIG 抑制 EV71 感染,而低浓度 IVIG 增加感染。这种剂量对感染程度的影响支持了抗体依赖性增强 (antibody-dependent en-

hancement, ADE) 假说,可协助指导抗 EV71 药物的制备。

1.3.3 Jurkat T 细胞 即人急性 T 细胞白血病细胞株。近年来,P 选择素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1) 与 SCARB2 成为备受关注的 EV71 细胞受体,因为 Jurkat T 细胞表面存在 PSGL-1 受体,与 EV71 结合能进入细胞,可用于研究 PSGL-1 介导的 EV71 感染^[32,33]。

1.3.4 GL-37 细胞 即克隆的非洲绿猴肾细胞。曾用于甲型肝炎病毒的分离。在应用 Vero 细胞难以分离 EV71 的手足口病流行地区,GL-37 细胞可用于病毒培养^[24]。

1.3.5 巨噬细胞 最近研究发现,巨噬细胞对 EV71 具有吞噬、抑制复制等作用。将取自美国癌症研究所 (Institute of Cancer Research, ICR) 成年小鼠的巨噬细胞体外培养,接种 EV71,结果显示病毒滴度逐渐下降, RNA 复制减缓,而接种 EV71 的 RD 细胞中病毒滴度明显上升。免疫荧光检测发现,病毒抗原主要集中分布于巨噬细胞的溶酶体^[34],这一发现使人们对 EV71 感染后机体的免疫机制有了进一步了解。

2 小鼠模型

2.1 新生小鼠

有研究表明,小鼠对 EV71 的敏感性随年龄增长而降低,甚至消失。1 日龄小鼠对 EV71 敏感性最高^[35],因此新生幼鼠应用得最多,且常用于神经系统并发症实验。Chen 等^[36]用 1 日龄 ICR 小鼠建立口腔 EV71 感染模型,动态观察其 VP1 抗原在小鼠组织及器官中分布的变化。感染 6 h 可在肠组织检出,24 h 在胸段脊髓观察到,50 h 病毒上行至颈髓,78 h 至脑干,表明 EV71 在幼鼠中的感染是沿神经系统路径扩散的。不同种系的幼鼠感染后亦较快出现神经系统症状,如用 1 日龄昆明小鼠建立的二次感染模型,初次感染无毒力病毒后的无症状幼鼠在第 2 次感染后可并发肢体瘫痪、角弓反张等神经系统症状,死亡率明显升高^[30]。另外,小鼠对 EV71 亚型 MP4 敏感,给 1 日龄 ICR 小鼠腹腔注射半数致死量 MP4 和 EV71 另一亚型 4643,感染 MP4 的小鼠死亡速度快,并引起中枢神经系统症状^[23]。灭活疫苗实验中,给 2 日龄 BALB/c 小鼠腹腔注射半数致死量 EV71 亚型 Hn2,24 h 后再以不同稀释浓度的灭活 EV71-Hn2 制备的疫苗给予免疫,可诱导小鼠产生多种单克隆抗体,监测小鼠的存

活率并进行体外中和抗体测定,从而筛选出对小鼠保护作用最强的 4E8 单克隆抗体^[30]。

2.2 成年小鼠

已有用成年雌性 BALB/c 小鼠进行 EV71 VP1 基因疫苗^[37]和 EV71 灭活疫苗实验成功的报道^[30]。最近发现,用重组 EV71 C4 亚型的病毒样微粒(virus-like particle, VLP)被动免疫成年母鼠,可激发免疫应答并诱导产生中和抗体,使新生幼鼠免受 EV71 致死性感染^[38]。将 EV71 VP1 蛋白在毕赤酵母表达,获得的重组 VP1 可有效诱导 BALB/c 小鼠产生抗 VP1 抗体,将其产生的抗血清接种于新生小鼠能产生保护效能。该重组 VP1 具有较高的免疫原性并能使小鼠抗病毒能力增强,是候选疫苗之一^[39]。类似地,以长双歧杆菌为载体也获得重组 VP1,通过口腔黏膜免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,小鼠对 EV71 的免疫应答明显提高并产生抗体;在小鼠怀孕后继续接种该疫苗,可降低新生小鼠的感染率^[40]。这类经口腔给药的疫苗避免了注射带来的痛苦,是一个新的接种途径。

2.3 免疫缺陷小鼠

免疫缺陷小鼠,如 AG129 小鼠,是一种缺乏 I 型和 II 型干扰素受体的小鼠,对非小鼠适应性 EV71 易感。有研究报道,将非小鼠适应性 EV71 通过腹腔注射或口腔感染 2 周龄 AG129 小鼠,结果均出现致死性神经系统疾病,这可用于 EV71 感染发病机制研究及疫苗、药物实验^[41]。最近有人用 A129 小鼠(缺乏 α 和 β 干扰素受体)和 AG129 小鼠(缺乏 α 、 β 和 γ 干扰素受体)筛选小鼠敏感的 EV71 B2 亚型,结果 AG129 小鼠在出现四肢瘫痪、眼刺激、平衡丧失等神经系统症状后死亡,而 A129 小鼠对这种 EV71 具有抗病能力,提示 γ 干扰素受体似乎对 EV71 有一定抵抗力。给 AG129 小鼠注射不同稀释浓度的灭活 EV71 疫苗,小鼠产生不同程度的抗感染保护作用并存活^[28]。该实验虽获得预期结果,但这类小鼠模型并不能较完善地模拟人类 EV71 感染的临床表现,因此结果不能直接用于人类。

2.4 转基因小鼠

已成功培育出 PSGL-1 转基因小鼠,可用于探讨 EV71 受体 PSGL-1 是否在小鼠中起作用从而复制与人类相似的疾病,以及是否对 EV71 感染有促进作用。结果表明,PSGL-1 转基因小鼠感染 EV71 后,疾病的严重程度并没有增加^[42]。Yamayoshi 等^[43]通过实验鉴定了人 SCARB2 与 EV71 结合的

功能区域,认为 SCARB2 表面 142~204 位氨基酸(对应的编码区是外显子 4)可能是其与病毒结合的核心区域,曾设想将人 SCARB2 外显子 4 替换入小鼠的相应区域,建立一个新的小鼠易感模型。受此启发,最近有研究者将携带人 SCARB2 基因的质粒导入 C57BL/6 小鼠胚胎,建立人 SCARB2 转基因小鼠。研究者对此类小鼠进行一系列研究:给新生幼鼠皮下接种 E59 和 N2838(均为 EV71 B4 亚型),小鼠出现皮疹病损,与人类幼儿所患手足口病的特征性皮疹一致,感染 6 d 后出现中枢神经系统样疾病;而年龄稍长的小鼠(2 周龄以上)感染后疾病较轻并最终痊愈,这与人类手足口病随年龄增长而下降一致。用低剂量 5746(EV71 C2 亚型)感染转基因小鼠,结果全部死亡;中剂量 5746 感染后,转基因鼠较非转基因鼠死亡更迅速。用 N3340(EV71 C4 亚型)感染新生小鼠,也导致严重的中枢神经系统疾病并死亡,而对对照组非转基因小鼠对 N3340 敏感性较低^[44]。

3 讨论

为探索 EV71 的致病性及防治措施,国内外学者进行了大量研究。近年来有研究者认为,EV71 是通过与受体结合进入细胞的,由于 EV71 型别不同,受体也有多种,目前发现的受体主要有 SCARB2、PSGL-1、唾液酸聚糖、硫酸乙酰肝素黏多糖^[25,32,45,46]。通过阻断 EV71 通过受体入胞的通路,可降低感染。由于囊泡运输和成熟、信号转导、肌动蛋白聚合等过程是 EV71 进入细胞所必需的,所以可通过沉默囊泡和内涵体转运基因等方法降低 EV71 的感染力^[47]。分子生物学研究发现 EV71 染色体编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,此种聚合酶是病毒复制的关键,也是研制抗病毒药物的靶点之一^[48]。

目前针对 EV71 的候选药物有牛乳铁传递蛋白^[22]、I 型干扰素^[49]、普拉康纳利^[19]、siRNA^[26]等,疫苗种类主要有灭活疫苗^[30]、重组 EV71 VP1 壳粒蛋白^[39]、重组 EV71 VLP^[38]等。这些药物和疫苗在体外细胞和动物实验中均显示了良好效果。近年来 EV71 灭活疫苗已进入临床试验阶段,受试者接种后中和抗体增高、T 细胞反应增强,有显著的免疫效应^[50]。然而应用药物和疫苗的对象将是广大儿童,所以必须考虑药物和疫苗的安全性及远期作用,因此在与 EV71 所致手足口病的斗争中还有漫长的路要走。

参考文献

- [1] Wang SM, Liu CC. Enterovirus 71: epidemiology, pathogenesis and management [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009, 7 (6):735-742.
- [2] Xu W, Liu CF, Yan L, Li JJ, Wang LJ, Qi Y, Cheng RB, Xiong XY. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications [J]. *Virology*, 2012, 9: 8.
- [3] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. *J Infect Dis*, 1974, 129 (3):304-309.
- [4] Cao ZD, Zeng DJ, Wang QY, Zheng XL, Wang FY. An epidemiological analysis of the Beijing 2008 hand-foot-mouth epidemic [J]. *Chin Sci Bull*, 2010, 55(12): 1142-1149.
- [5] Wang SM, Ho TS, Lin HC, Lei HY, Wang JR, Liu CC. Reemerging of enterovirus 71 in Taiwan: the age impact on disease severity [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(6): 1219-1224.
- [6] De W, Changwen K, Wei L, Monagin C, Jin Y, Cong M, Hanri Z, Jun S. A large outbreak of hand, foot and mouth disease caused by EV71 and CAV16 in Guangdong, China, 2009 [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(6): 945-953.
- [7] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, Yan DM, Zhu SL, Wang DY, Ji F, Wang XJ, Gao YJ, Chen L, An HQ, Li DX, Wang SW, Xu AQ, Wang ZJ, Xu WB. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China [J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(4): 262-267.
- [8] Zhang Y, Zhu Z, Yang W, Ren J, Tan X, Wang Y, Mao N, Xu S, Zhu S, Cui A, Zhang Y, Yan D, Li Q, Dong X, Zhang J, Zhao Y, Wan J, Feng Z, Sun J, Wang S, Li D, Xu W. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang City of China [J]. *Virology*, 2010, 7:94.
- [9] Mizuta K, Abiko C, Murata T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Sanjoh K, Sakamoto M, Hongo S, Murayama S, Hayasaka K. Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan, between 1998 and 2003 [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12): 6171-6175.
- [10] Singh S, Chow VT, Phoon MC, Chan KP, Poh CL. Direct detection of enterovirus 71 (EV71) in clinical specimens from a hand, foot, and mouth disease outbreak in Singapore by reverse transcription-PCR with universal enterovirus and EV71-specific primers [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(8): 2823-2827.
- [11] Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK, Tien NT, Thuong TC, How OM, Cardosa MJ, McMinn PC. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(11): 1733-1741.
- [12] Chan LG, Parashar UD, Lye MS, Ong FG, Zaki SR, Alexander JP, Ho KK, Han LL, Pallansch MA, Suleiman AB, Jegathesan M, Anderson LJ. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group [J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 31(3):678-683.
- [13] Rabenau HF, Richter M, Doerr HW. Hand foot and mouth disease: seroprevalence of coxsackie A16 and enterovirus 71 in Germany [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2010, 199(1): 45-51.
- [14] Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, Miyamura T. Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000 [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(2):253-263.
- [15] Vallet S, Legrand Quillien MC, Dailland T, Podeur G, Gouriou S, Schuffenecker I, Payan C, Marcocelles P. Fatal case of enterovirus 71 infection, France, 2007 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(11): 1837-1840.
- [16] Zhu Q, Hao Y, Ma J, Yu S, Wang Y. Surveillance of hand, foot, and mouth disease in Mainland China (2008-2009) [J]. *Biomed Environ Sci*, 2011, 24(4): 349-356.
- [17] Kiener TK, Jia Q, Lim XF, He F, Meng T, Chow VT, Kwang J. Characterization and specificity of the linear epitope of the enterovirus 71 VP2 protein [J]. *Virology*, 2012, 9: 55.
- [18] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71 [J]. *Nat Med*, 2009, 15(7): 798-801.
- [19] Zhang G, Zhou F, Gu B, Ding C, Feng D, Xie F, Wang J, Zhang C, Cao Q, Deng Y, Hu W, Yao K. In vitro and in vivo evaluation of ribavirin and pleconaril antiviral activity against enterovirus 71 infection [J]. *Arch Virol*, 2012, 157(4):669-679.
- [20] Shih SR, Weng KF, Stollar V, Li ML. Viral protein synthesis is required for enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells [J]. *J Neurovirol*, 2008, 14(1): 53-61.
- [21] Chang SC, Lin JY, Lo LY, Li ML, Shih SR. Diverse apoptotic pathways in enterovirus 71-infected cells [J]. *J Neurovirol*, 2004, 10(6): 338-349.
- [22] Weng TY, Chen LC, Shyu HW, Chen SH, Wang JR, Yu CK, Lei HY, Yeh TM. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection by binding to VP1 protein and host cells [J]. *Antiviral Res*, 2005, 67(1):31-37.
- [23] Wang YF, Chou CT, Lei HY, Liu CC, Wang SM, Yan JJ, Su IJ, Wang JR, Yeh TM, Chen SH, Yu CK. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection [J]. *Virology*, 2004, 78(15): 7916-7924.
- [24] Fijimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebira H, Hasegawa A, Totsuka A, Nishio O. Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot, and mouth disease in Japan during the summer of 2000: detection and molecular

- epidemiology of enterovirus 71 [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(9): 621-627.
- [25] Yang B, Chuang H, Yang KD. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells [J]. *Virology*, 2009, 6:141.
- [26] Lin YW, Lin HY, Tsou YL, Chitra E, Hsiao KN, Shao HY, Liu CC, Sia C, Chong P, Chow YH. Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30507.
- [27] Liang Y, Zhou X, Yang E, Pu J, Che Y, Wang J, Ma N, Liu L, Ding D, Tang D, Sheng D, Yang L, Zhao H, Dong C, Li Q. Analysis of the Th1/Th2 reaction in the immune response induced by EV71 inactivated vaccine in neonatal rhesus monkeys [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32 (5): 1048-1058.
- [28] Caine EA, Partidos CD, Santangelo JD, Osorio JE. Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59501.
- [29] Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzuki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys [J]. *J Virol*, 2007, 81(17): 9386-9395.
- [30] Chang GH, Luo YJ, Wu XY, Si BY, Lin L, Zhu QY. Monoclonal antibody induced with inactivated EV71-Hn2 virus protects mice against lethal EV71-Hn2 virus infection [J]. *Virology*, 2010, 7: 106.
- [31] Han JF, Cao RY, Deng YQ, Tian X, Jiang T, Qin ED, Qin CF. Antibody dependent enhancement infection of enterovirus 71 in vitro and in vivo [J]. *Virology*, 2011, 8: 106.
- [32] Nishimura Y, Shimozima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71 [J]. *Nat Med*, 2009, 15(7): 794-797.
- [33] Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(11): e1001174.
- [34] Liu J, Li X, Fan X, Ma C, Qin C, Zhang L. Adoptive transfer of macrophages from adult mice reduces mortality in mice infected with human enterovirus 71 [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(2):387-397.
- [35] Yu CK, Chen CC, Chen CL, Wang JR, Liu CC, Yan JJ, Su IJ. Neutralizing antibody provided protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice [J]. *J Biomed Sci*, 2000, 7(6): 523-528.
- [36] Chen YC, Yu CK, Wang YF, Liu CC, Su IJ, Lei HY. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 1): 69-77.
- [37] Tung WS, Bakar SA, Sekawi Z, Rosli R. DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice [J]. *Genet Vaccines Ther*, 2007, 5: 6.
- [38] Ku Z, Ye X, Huang X, Cai Y, Liu Q, Li Y, Su Z, Huang Z. Neutralizing antibodies induced by recombinant virus-like particles of enterovirus 71 genotype C4 inhibit infection at pre- and post-attachment steps [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57601.
- [39] Wang M, Jiang S, Wang Y. Recombinant VP1 protein expressed in *Pichia pastoris* induces protective immune responses against EV71 in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(1): 387-393.
- [40] Yu Z, Huang Z, Sao C, Huang Y, Zhang F, Ma G, Chen Z, Zeng Z, Qiwen D, Zeng W. Oral immunization of mice using *Bifidobacterium longum* expressing VP1 protein from enterovirus 71 [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(5): 1071-1077.
- [41] Khong WX, Yan B, Yeo H, Tan EL, Lee JJ, Ng JK, Chow VT, Alonso S. A non-mouse-adapted enterovirus 71 (EV71) strain exhibits neurotropism, causing neurological manifestations in a novel mouse model of EV71 infection [J]. *J Virol*, 2012, 86(4): 2121-2131.
- [42] Liu J, Dong W, Quan X, Ma C, Qin C, Zhang L. Transgenic expression of human P-selectin glycoprotein ligand-1 is not sufficient for enterovirus 71 infection in mice [J]. *Arch Virol*, 2012, 157(3): 539-543.
- [43] Yamayoshi S, Koike S. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection [J]. *J Virol*, 2011, 85(10): 4937-4946.
- [44] Lin YW, Yu SL, Shao HY, Lin HY, Liu CC, Hsiao KN, Chitra E, Tsou YL, Chang HW, Sia C, Chong P, Chow YH. Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71 [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (2): e57591.
- [45] Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Scavenger receptor B2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases [J]. *Front Microbiol*, 2012, 3: 32.
- [46] Tan CW, Poh CL, Sam IC, Chan YF. Enterovirus 71 uses cell surface heparan sulfate glycosaminoglycan as an attachment receptor [J]. *J Virol*, 2013, 87(1): 611-620.
- [47] Hussain KM, Leong KL, Ng MM, Chu JJ. The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(1): 309-321.
- [48] Wu Y, Lou Z, Miao Y, Yu Y, Dong H, Peng W, Bartlam M, Li X, Rao Z. Structures of EV71 RNA-dependent RNA polymerase in complex with substrate and analogue provide a drug target against the hand-foot-and-mouth disease pandemic in China [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(5): 491-500.
- [49] Liu ML, Lee YP, Wang YF, Lei HY, Liu CC, Wang SM, Su IJ, Wang JR, Yeh TM, Chen SH, Yu CK. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86 (Pt 12):3263-3269.
- [50] Liu L, Zhang Y, Wang J, Zhao H, Jiang L, Che Y, Shi H, Li R, Mo Z, Huang T, Liang Z, Mao Q, Wang L, Dong C, Liao Y, Guo L, Yang E, Pu J, Yue L, Zhou Z, Li Q. Study of the integrated immune response induced by an inactivated EV71 vaccine [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54451.