

EV71 可感染幼龄中缅树鼩

王文广, 黄晓燕, 徐娟, 孙晓梅, 代解杰*, 李琦涵*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所 全国医学灵长类研究中心, 云南 昆明 650118)

摘要: 树鼩是灵长类动物的近亲, 且具有体型小、繁殖周期短、饲养管理成本低等优点, 长期以来被认为有望替代灵长类动物用于人类疾病的动物模型研究。该文研究了肠道病毒 EV71 对幼年中缅树鼩的感染特点, 探索建立 EV71 感染树鼩动物模型及替代灵长类动物的可行性。实验分别采用灌胃、滴鼻和尾静脉注射 3 种方式, 感染 3 月龄树鼩, 定期观察动物临床症状和血常规变化和定期采集血液和粪便样品, 并使用中和抗体试验、reverse transcription-PCR (RT-PCR) 和 Real-Time PCR 等技术, 检测相关样品中和抗体效价、病毒核酸及载量变化。结合组织病理学检查, 分析感染病变特点。研究结果发现, 实验组树鼩体温在第 4 天前后开始升高, 白细胞、淋巴细胞也有类似趋势; 3 种攻毒方式均可检测到病毒载量, 峰值出现在第 10 天前后, 灌胃途径尤为明显, 血清的最大中和抗体效价为 1:16。感染 EV71 病毒的树鼩 2 周左右出现急性松弛性瘫痪, 大体解剖发现伴有尿潴留症状, 组织病理学检查发现在脑、肺、肠、脾脏、肾脏等部位发生病变。结果表明, EV71 病毒通过灌胃、滴鼻和静脉注射 3 种方式均可以感染中缅树鼩, 并使之出现神经系统及相关病变, 该实验为将来研究 EV71 感染树鼩致病机理、建立手足口病树鼩动物模型奠定了理论基础。

关键词: 手足口病; EV71; 中缅树鼩; 动物模型

中图分类号: Q95-33; R373; Q959.837 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2012)01-0007-07

Experimental studies on infant *Tupaia belangeri chineses* with EV71 infection

WANG Wen-Guang, HUANG Xiao-Yan, XU Juan, SUN Xiao-Mei, DAI Jie-Jie*, LI Qi-Han*

(The Medical Primate Research Center of China, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: *Tupaia belangeri* are small mammals with a squirrel-like appearance; they were formerly classified under the primates order despite the lack of derived features characteristic of primates. Given that *T. belangeri* are easy to raise, cheap to maintain, and have a small body size, a high reproductive rate, and close affinity to primates, these animals would be used as an alternative to primates in biomedical research. Three-month old *T. belangeri chineses* were infected with enterovirus 71 (EV71) via three different routes, namely, oral administration, nasal dripping, and tail intravenous injection, to study the infection in infant *T. belangeri* and find a feasible scheme to make them an ideal animal model of EV71 in place of primates. Daily activities were regularly observed, body temperatures were measured, and blood tests were conducted. Blood and fecal samples were regularly collected. The infection was examined via the neutralizing antibody test, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Real-Time PCR, and pathological analysis. The temperature, as well as the white blood cell count and the number of lymphocytes, increased four days after infection. Virus loads were determined in all three groups, and the peak appeared on, before, or after the tenth day, respectively. Thus, oral administration proved to be the best route. The highest serum antibody titer obtained was 1:16. Acute paralysis with urinary retention manifested after about two weeks, and pathological changes were observed in the brain, heart, lung, spleen, kidney, and other tissues. In conclusion, *T. belangeri chineses* can be infected with EV71 via oral administration, nasal dripping, and tail intravenous injection. Therefore, *T. belangeri* are potential EV71 animal models for further studies on the mechanism of pathogenesis or vaccine evaluation.

收稿日期: 2011-10-27; 接受日期: 2012-01-10

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目 (2009BAI83B02; 2011BAI15B01); 云南省科技基础条件平台建设计划项目(2006PT07-2); 国家“973”计划项目(2011CB504903); 国家自然科学基金(81171573); 云南省应用基础研究计划面上项目(2011FB116)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: djj@imbcams.com.cn; imbcams.lq@gmail.com

第一作者简介: 王文广, 男, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型研究; Email:windgone@imbcams.com.cn

Key words: Hand-foot-mouth disease; EV71 virus; *Tupaia belangeri chineses*; Animal model

手足口病是由肠道病毒引起的传染病, EV71 是手足口病的主要致病原之一, 可使患者并发中枢神经系统疾病和相关心肺功能衰竭等临床症状, 严重威胁世界各地婴幼儿的生命健康, 目前尚无有效药物或疫苗。建立合适的动物模型是深入基础研究和进行药物评价的关键之一。国内外已有 EV71 感染小鼠的报道, 先后建立了乳鼠(Lin et al, 2009) 和成年小鼠(Duo et al, 2009) 的感染模型, 但乳鼠个体过小, 不便操作且发病期太短; 成年小鼠不易感染, 无法满足药物或疫苗的评价工作需要。非人灵长类动物模型较有前景。Nagata et al (2004) 通过静脉注射建立了 EV71 感染猕猴的模型, 呈现与人脑炎类似的临床体征与神经病理。Liu et al (2011) 已成功使猕猴感染 EV71, 并建立了较为可行的动物模型评价标准。灵长类动物模型固然理想, 然而成本昂贵, 研究周期长, 动物伦理审查严格。树鼩作为一种新开发的实验动物, 进化上接近灵长类(Sargis, 2004), 生理代谢与人类有诸多相似之处, 具有较大的科研潜力, 再加上饲养方便、成本低廉, 具备建立理想动物模型的先天优势。近年来的研究成果表明, 树鼩对多种人类常见疾病具有再现的潜质, 人们已经较成功地建立了肝炎等多种病毒感染性疾病模型(Wang et al, 2010)。Wang et al (2011) 报道野生中缅树鼩携带有肠道病毒中的柯萨奇病毒, 提示树鼩可能对肠道病毒易感。本文研究了 EV71 对中缅树鼩的感染能力, 探索建立其动物模型的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 经人工繁育的 F1 代 3 月龄中缅树鼩 14 只, 雌雄各半, 体重 (120±20) g, 来自中国医学科学院医学研究所医学灵长类中心。

1.1.2 毒株 EV71 标准毒株(FY-23), 由中国医学科学院医学研究所病毒免疫室分离并馈赠。

Vero 细胞培养, 滴度测定为 8.5×10^8 TCID₅₀/mL。

1.1.3 仪器 动物血球分析仪 HEMAVET 950、欧姆龙 MC-140 电子体温计、日立台式离心机 CT15RE、MyCycler PCR 仪、CFX 96 实时定量 PCR 仪、ND-1000 微量紫外可见分光光度计和 Thermo 二氧化碳培养箱等仪器。

1.1.4 试剂 Minimum essential medium (MEM) 液体培养基、标准新生牛血清(兰州民海生物工程有限公司)、RNA 提取试剂 RNAiso Plus (大连宝生物:D9108A)、逆转录试剂 RT Master Mix (大连宝生物:DRR036A)、PCR 试剂 2 × GoldStar Taq MasterMix (北京康为世纪:CW0960) 和实时定量 PCR 试剂 GoldStar TaqMan Mixture(北京康为世纪:CW0932) 等试剂, 以及引物探针均由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 挑选 14 只三月龄健康树鼩, 雌雄各半。动物随机分组: 灌胃组、滴鼻组和静脉注射组, 每组 4 只, 雌雄各半, 另两只设对照组(表 1)。本方案经医学生物学研究所动物伦理委员会审核通过。

表 1 分组感染表

Tab. 1 *Tupaia belangeri* with EV71 infection in groups A-D

组别 Group	攻毒途径 Route of infections	感染剂量 Dose of infection (TCID ₅₀)	动物编号数量 Amount (No.)
A 灌胃 Oral administration		8.5×10^7	4(1~4 号)
B 滴鼻 Nasal dripping		8.5×10^7	4(5~8 号)
C 静脉注射 Tail intravenous injection		8.5×10^7	4(9~12 号)
D 对照 Control		—	2(13~14 号)

1.2.2 日常观察 攻毒后每天观察动物活动状况、精神状态, 以及饮食、大便等。每天 9:00 测量记录动物肛温, 保定动物待其处于平静状态, 使用欧姆龙 MC-140 电子体温计测量记录动物肛温。

1.2.3 血样采集 攻毒前采尾静脉血做本底, 攻毒后 3 d 1 次, 每次采集 0.6 mL。先分取 100 μL 血样用乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝做血常规检测, 其余分离血清-20 °C 冻存备用。

1.2.4 血常规检测 根据上述血样采集方案制备 EDTA-2Na 抗凝血, 按照动物血球分析仪 HEMAVET 950 操作说明进行血细胞的测定。

1.2.5 粪便采集 从攻毒前 1 d 开始, 每天 8:30 采集粪便, 取样 1~2 g。采集粪便用添加双抗(青霉素和链霉素)的磷酸盐缓冲液(PBS)混制成 20% 悬液, 冻融处理后离心取上清-20 °C 冻存备用。

1.2.6 抗体中和试验 待测血清样品统一 56 °C 灭活 30 min, 用 MEM 细胞培养液从 2 倍、4 倍系列

稀释到 32 倍。于 96 孔板中, 分别将各梯度稀释样品 50 μL , 与等体积 100TCID₅₀ 的 EV71 37 °C 中和 2 min, 平行 4 孔, 每块培养板均设血清、病毒和细胞对照, 加入 Vero 细胞悬液 100 μL , 细胞终浓度为 2×10^5 个/mL, 于 CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 7 d, 将能使 50% 细胞孔不产生病变的最高稀释度的倒数定为该血清的中和效价。每次试验均设病毒回滴试验, 且回滴结果在 32~320 TCID₅₀/孔时, 试验判为成立(Mao et al, 2010)。

1.2.7 EV71 核酸检测 1) 应用 RNAiso Plus (TaKaRa:D9108A) 等试剂分别提取血清和粪便上清中总 RNA, 使用 RT Master Mix 逆转录为 cDNA。

2) 常规 PCR: 以逆转录的 cDNA 为模板, 反应体系和反应条件按照北京康为世纪的 2×GoldStar Taq MasterMix 试剂盒进行操作, 根据 EV71 FY-23 (GenBank:EU812515) 基因序列保守区设计引物。上游引物 EV71-S(2369-2388) : 5'-GCAGCCAAAGAACCTCAC-3'; 下游引物 EV71-A(2 576-2 595): 5'-ATTCAGCAGCTTGGAG TGC-3'; PCR 产物长度 226 bp。

3) Real-time PCR: 同样以逆转录的 cDNA 为模板, 标准品定量稀释梯度为 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 拷贝/ μL , 反应体系和反应条件按北京康为世纪的 GoldStar TaqMan Mixture 试剂盒进行操作, 根据 EV71 FY-23 (GenBank:EU812515) 基因序列保守区设计引物探针。上游引物 EV71-F(2 828-2 848): 5'-CGCTTGACGCAGAGTTCACT-3'; 下游引物 EV71-R (2 877-2 897): 5'-TTGGAGCAATTGTGGAG CGA-3'; 探针 EV71-P(2 849-2 870): 5'-FAM-TTGTT GCGTGCACACCCACCG-BHQ1-3'。

1.2.8 组织病理学检查 出现急症动物及时处死解剖, 取出脑、肺、心、肠、脾、肾等相关组织器官, 中性福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋, 2 μm 切片, 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 光镜下观察组织病理学变化。

2 结 果

2.1 临床观察

实验组树鼩在攻毒后 3 d 开始出现黑褐色稀便, 1 周左右开始出现活动异常, 饮食下降, 跳跃活动减少。体温监测显示, 3 组树鼩均在第 4 天前后开始上升, 第 6 天前后达到最高, 之后开始回落到正常水平(图 1)。2 周后大于半数树鼩先后出现急性松弛

性瘫痪, 蜷缩萎靡, 树鼩后腿松弛拖拉, 不能正常活动, 靠前腿拖行, 精神极度萎靡, 眼眶下陷, 双目呆滞。半数树鼩于 18 d 前后死亡, 其中观察到灌胃组的 4 号树鼩嘴角和前掌出现小疱疹(图 2)。

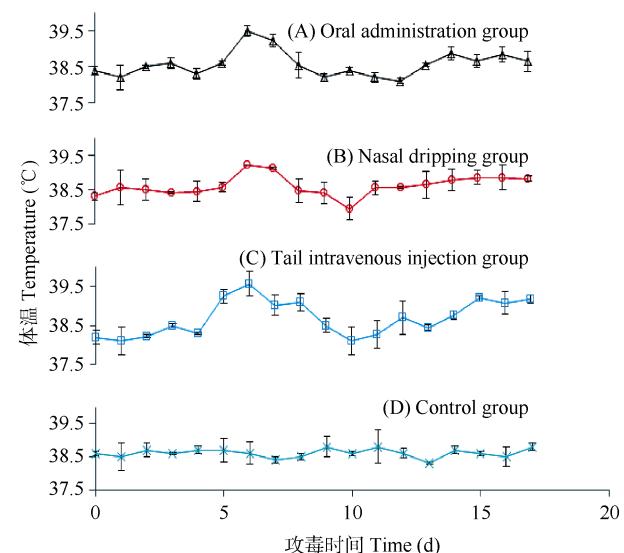


图 1 EV71 感染树鼩体温变化趋势
Fig. 1 Changes in the body temperature of EV71 infected *Tupaia belangeri*

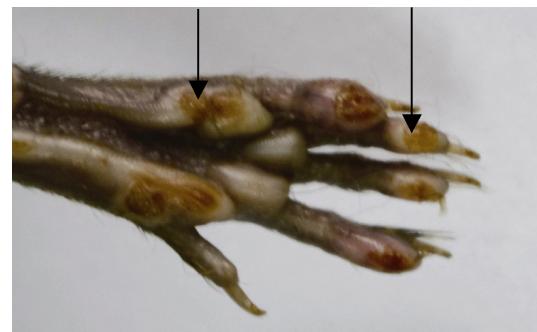


图 2 EV71 感染树鼩脚掌出现的小疱疹
Fig. 2 Small herpes in palm of EV71 infected *Tupaia belangeri*

2.2 血常规检测

血常规检测结果显示, 与对照组相比, 实验组树鼩白细胞(WBC)均呈现一个升降波动, 波动发生在第 5 天到第 15 天之间, 淋巴细胞(LYM)有相似的变化趋势(图 3、图 4)。

2.3 中和抗体试验

抗体中和试验结果显示树鼩血清中存在 EV71 抗体(表 2), 最早出现在感染 EV71 后第 3 天, 其中静脉注射组中 9 号动物于第 12 天出现最高效价 1:16, 各实验组均有抗体检出, 在攻毒 3 周后仍然可以检测到中和抗体。

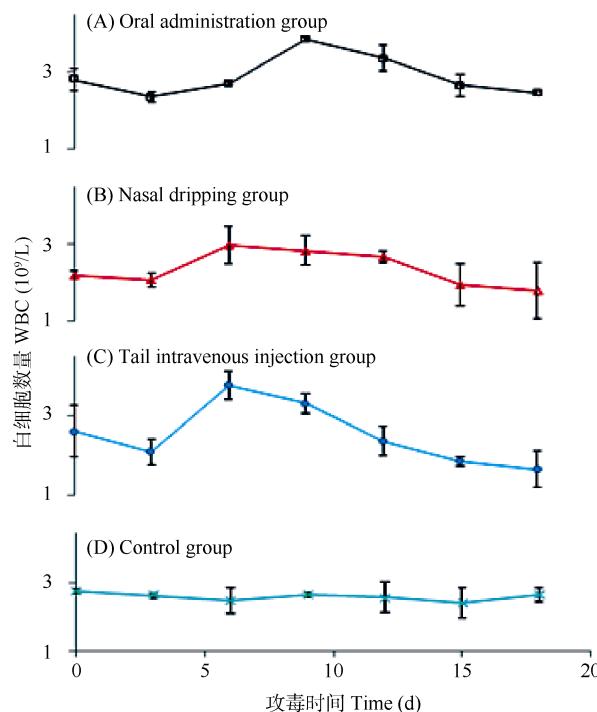


图 3 EV71 感染树鼩白细胞变化趋势

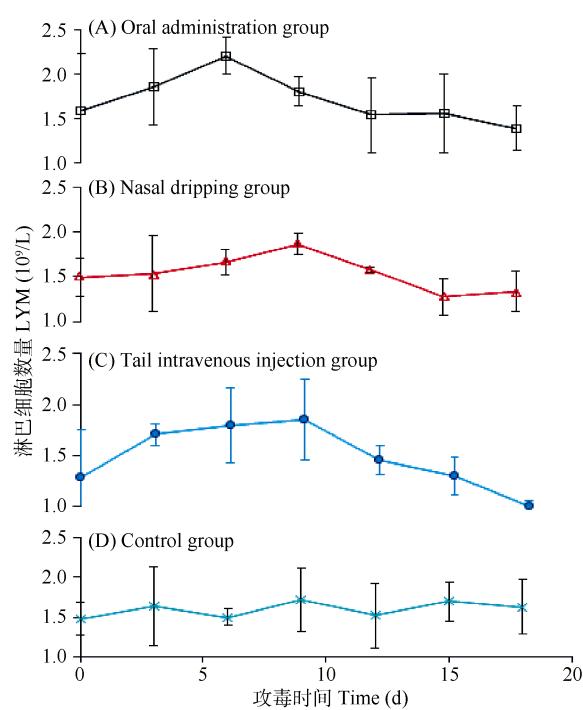
Fig. 3 Changes in the WBC of EV71 infected *Tupaia belangeri*

图 4 EV71 感染树鼩淋巴细胞变化趋势

Fig. 4 Changes in the LYM of EV71 infected *Tupaia belangeri*

表 2 EV71 感染树鼩的中和抗体检测结果
Tab. 2 Neutralizing antibody of EV71 infected in *Tupaia belangeri*

攻毒天数 Days	A 灌胃组 Oral administration group				B 滴鼻组 Nasal dripping group				C 静脉注射组 Tail intravenous injection group			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
d0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
d3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
d6	0	4	0	2	0	2	4	0	4	2	5.6	2
d9	2	2	2	2	0	2.8	4	0	4	2	8	0
d12	2	2	2	4	2	4	2	2	16	2	4	2
d15	0	0	4	2	2	2	0	0	8	0	0	0
d18	2	0	0	2	2	2	0	2	4	0	2	0

2.4 核酸检测

2.4.1 普通 PCR 检测 EV71 RNA。普通 PCR 产物大小为 226 bp, 其中血清样品检测到阳性的有灌胃组 2、3、4 号, 滴鼻组 6 号和静脉注射组的 9、11 号(图 5a); 粪便样品实验组全部检测到阳性(图 5b); 对 4 号树鼩疱疹部位用棉拭子取样, 核酸检测到阳性(图 5c), 其中 0 为阳性对照, ①、②分别检自树鼩嘴角和脚掌部位。

2.4.2 Real-Time PCR 检测 EV71 RNA。图 6~图 9 显示检测血清和粪便样品中的病毒载量变化: 血清样品灌胃组 2、3、4 号, 滴鼻组 6 号, 静脉注射组 9、

11 号检测到载量变化; 粪便样品各实验组都检测到病毒载量, 载量变化整体呈先升后降趋势。

2.5 病理学检查

组织病理学检查结果(图 10)显示实验组树鼩的脑部出现组织变性坏死、水肿、胶质细胞增生。肺部出现肺水肿、慢性炎细胞浸润、局部纤维组织增生等病理变化。心脏出现心肌组织充血、局部间隙有炎细胞聚集。肠道壁变薄脱落、黏膜上皮细胞缺损坏死、局部黏膜息肉样增生。脾脏充血、玻璃样变、脾窦扩张等。肾脏局部皮质充血、肾小球旁有中性粒细胞浸润。

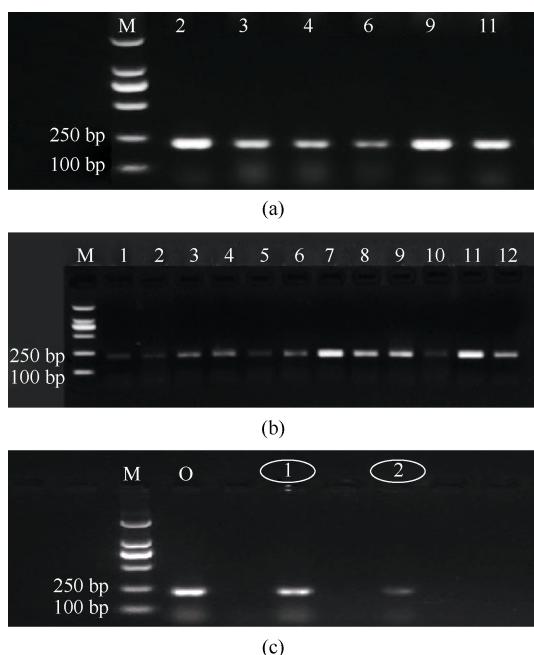


图 5 感染树鼩 EV71 RNA 的检测

Fig. 5 EV71 RNA of infected *Tupaia belangeri*

a) 血清样品; b) 粪便样品; c) 4号树鼩疱疹部位试子。

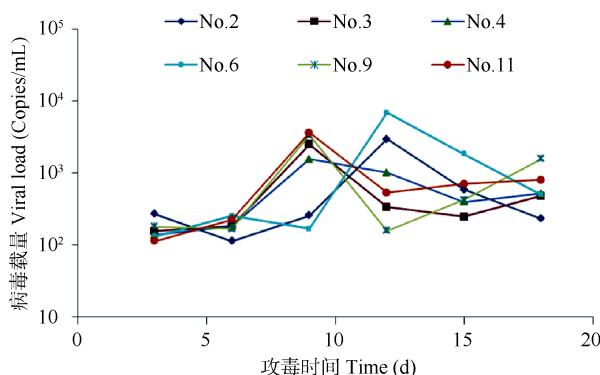
a) Serum; b) Feces; c) Herpes swab from No. 4 *Tupaia belangeri*.

图 6 感染树鼩血清中病毒载量的变化

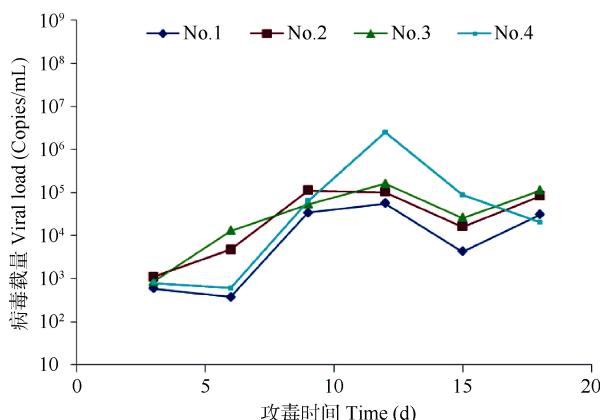
Fig. 6 Changes in the viral load from the serum of EV71 infected *Tupaia belangeri*

图 7 灌胃 EV71 感染树鼩粪便样品载量变化

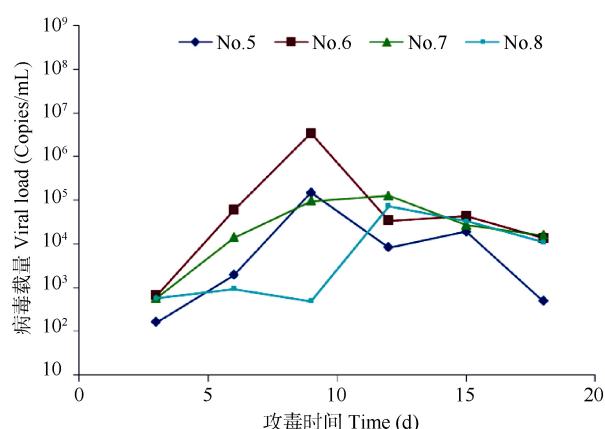
Fig. 7 Changes in the fecal viral load of EV71 infected *Tupaia belangeri* (Oral administration group)

图 8 滴鼻 EV71 感染树鼩粪便样品载量变化

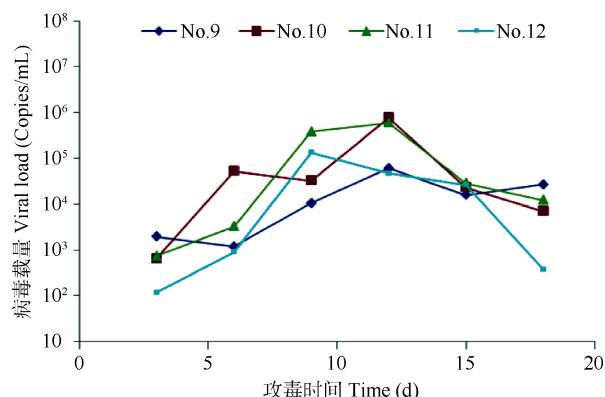
Fig. 8 Changes in the fecal viral load of EV71 infected *Tupaia belangeri* (Nasal dripping group)

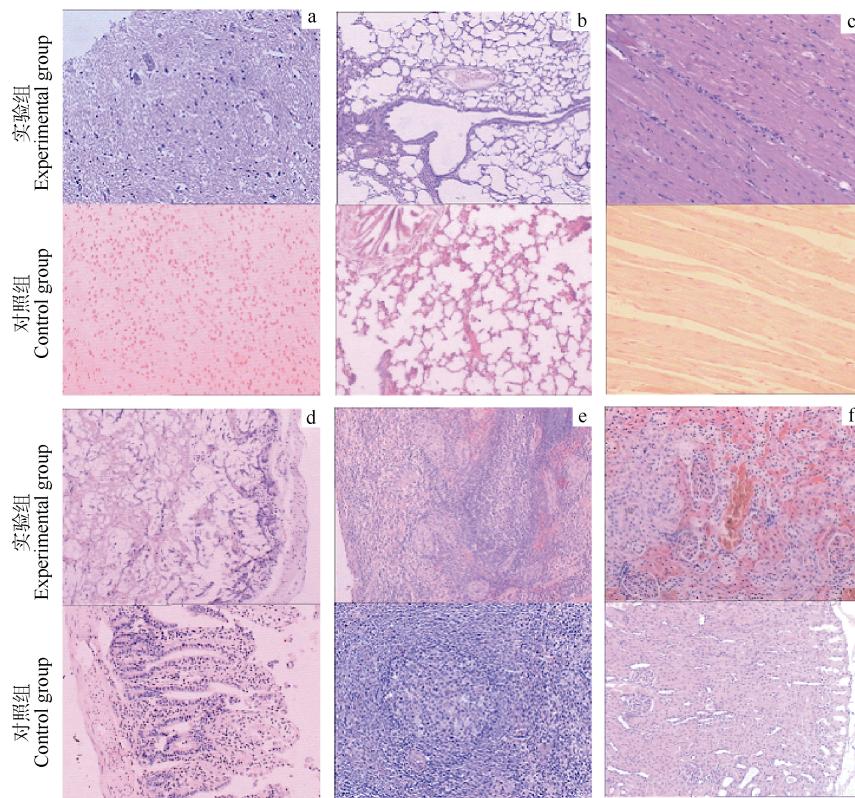
图 9 静脉注射 EV71 感染树鼩粪便样品载量变化

Fig. 9 Changes in the fecal viral load of EV71 infected *Tupaia belangeri* (Tail intravenous injection group)

3 讨 论

EV71 危害婴、幼儿健康的关键在于对中枢神经系统的破坏, 继而诱发肺水肿、心肺衰竭等重症, 甚至危及生命。本研究通过 3 种不同途径感染树鼩, 诱发了急性松弛型瘫痪、树鼩活动能力丧失, 精神低迷、眼眶内陷等症状, 与 Chen et al(2004)建立的 EV71 口服感染乳鼠模型症状相吻合; 而 Nagata et al(2002)通过椎管注射方式建立的食蟹猴模型也出现一系列与人体临床症状相近的神经系统症状, 如震颤、运动失调、脊髓灰质炎样麻痹等。另外, 我们通过树鼩大体解剖发现的尿潴留现象也与一些 EV71 重症患者的临床表现一致。

我们建立的树鼩模型组织病理学检查结果(图 10)显示树鼩的脑部出现组织变性坏死、水肿, 提示 EV71 病毒可能已经侵害树鼩的中枢神经系统。Dong et al(2010)通过静脉注射和呼吸道感染两种途径建立猕猴模型, 也出现类似的中枢神经系统病

图 10 EV71 感染树鼩的组织病理变化(HE, $\times 100$)Fig. 10 Pathological changes in the tissues of *Tupaia belangeri* infected with EV71 (HE, $\times 100$)

a) 脑; b) 肺; c) 心; d) 肠; e) 脾; f) 肾。

a) Brain; b) Lung; c) Heart; d) Intestine; e) Spleen; f) Kidney.

变。我们还发现在实验树鼩肺部出现水肿、慢性炎细胞浸润、局部纤维组织增生等症状, 这些与 Liu et al(2011)的EV71型手足口病肺组织病理学研究基本一致, 支持了EV71可引发神经性肺水肿等并发症的论断(Xu et al, 2008)。实验树鼩心脏出现心肌充血、局部间隙有炎细胞聚集, 这些变化提示病变树鼩可能有心脏功能受损。肠道病毒首要侵害部位就是肠道, 本实验中树鼩肠道壁变薄脱落、黏膜上皮细胞缺损坏死、局部黏膜息肉样增生等症状也恰恰符合了肠道病毒的感染特性。在实验树鼩的肾脏局部发现皮质充血、肾小球旁有中性粒细胞浸润。另外, 感染EV71的树鼩也出现了与人类似的手足口疱疹。

我们的实验树鼩在感染EV71病毒后出现了与人类似的体温上升现象, 与 Liu et al(2011)建立的猕猴模型一致。血常规白细胞和淋巴细胞的变化也与人的病症相符, 在经过一次上升之后开始下降, 并且有低于正常水平的趋势。中和试验也检测到了抗体的产生(表2), 树鼩产生的抗体可以中和EV71。本实验结果显示, 部分树鼩在感染EV71后3周左右体内仍有抗体存在, 说明树鼩对人的EV71毒株有相当的感染适应性, 可在药物或疫苗评价等研究

中发挥积极有效的作用。另外, 可能由于树鼩个体差异等因素使得抗体的产生并没有表现一致的规律性, 而中和抗体效价比乳鼠模型较低(Arita et al, 2007), 可能是物种差异等所致。从免疫学角度来看, 如果制备树鼩专用的ELISA检测试剂盒, 将会丰富检测指标和提高检测效率。我们主要采用分子生物学手段检测树鼩感染病毒的状况, 其中Real-time PCR可以精确检测病毒在树鼩体内的载量变化, 可以看出病毒在树鼩体内复制10 d前后出现峰值, 之后有所下降。树鼩2周前后发病, 重病者18 d左右死亡, 从感染病毒到发病的时间与猕猴模型(Liu et al, 2011)比较接近。总的看来, 以上的这一整套检测方案切实可行, 这为树鼩模型的建立评价奠定了基础。

EV71作为肠道病毒自然感染途径有消化道和呼吸道(Chen et al, 2010)。在动物建模方法上, 先后有人经由口服和鼻腔途径成功感染小鼠(Lin et al, 2009)、猕猴(Liu et al, 2011)。本研究将EV71通过灌胃、滴鼻和静脉注射3种途径感染树鼩, 在血液和粪便样品中均检测到病毒载量。静脉注射在很多病毒感染中都可以普遍实现, 但非自然感染途径; 而滴鼻和灌胃更符合EV71自然感染的特点, 其中

灌胃略胜一筹, 感染方法证实可行。我们的实验结果证实, 树鼩可通过灌胃或滴鼻等自然感染途径来建立其动物模型。本实验发病树鼩的临床表现、感染周期以及病理病变等感染特性说明, 树鼩模型比小鼠模型更接近人的发病情况, 而与猕猴动物模型相比, 树鼩具有体型小、实验周期短、便于饲养管理且成本低廉等优越性, 可望替代灵长类动物用于人类手足口疾病的发生、发展机理及预防和治疗的研究。本次试验半数动物最终发病死亡, 提示需要研究攻毒最适剂量。另外, 我们还将研究不同年龄树鼩的感染能力, 从而找到最适年龄的树鼩做模型研究。如果能从树鼩体内不同器官组织分离并鉴定出病毒, 继而进行传代感染适应, 通过人工繁殖技术培育对EV71敏感的携带病毒的树鼩种群, 将对开展手足口疾病的动物模型建立、药物筛选和疫苗评价具有长远的科学意义和应用价值。

通过本研究, 我们成功建立了中缅树鼩感染EV71的动物模型。通过对该动物模型的系统研究, 我们拟定了EV71感染中缅树鼩动物模型的评价指

标: 1)动物临床表现: 潜伏期一般5 d左右。体温升高, 活动减少, 饮食下降, 粪便稀黑; 树鼩嘴脚部位可见疱疹, 重症出现急性松弛型瘫痪, 或伴有尿潴留, 部分急症可致死亡。2)实验室检测结果: 血常规可见白细胞、淋巴细胞水平升高, 血清中可检测到抗EV71中和抗体, 血清和粪便中可检测到病毒核酸, rReal-time PCR可监测血液、粪便等样品中病毒载量变化。3)病理学变化: 可见心、脑、肺、肠、肾、脾等部位病变, 如表现有脑组织坏死、水肿, 肺水肿、炎细胞浸润, 心肌充血、伴有炎症, 肠壁脱落、黏膜上皮细胞坏死, 肾脾充血炎症等。我们的这些研究成果相信将为以后建立成熟的EV71动物模型提供科学依据, 为深入了解EV71的致病机理和开发有效的药物疫苗构建科研平台, 同时这对树鼩资源在生物医学领域的开发利用也具有很大的现实意义。

致谢:感谢医学生物学研究所病毒免疫室赵树栋等老师提供EV71病毒株以及在病毒培养技术方面给予的帮助。

参考文献:

- Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzuki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H. 2007. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype ashowed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys[J]. *J Virol*, 81(17): 9386-9395.
- Chen GQ, Shao RB, Wang HY, Chen YH. 2010. Research progress on pathogen and pathogenic molecular mechanisms of enterovirus 71[J]. *Prog Mod Biomed*, 10(19): 3795-3797. [陈国清, 邵荣标, 王海燕, 陈玉宏. 2010. 肠道病毒EV71病原学以及致病分子机制的研究进展. 现代生物医学进展, 10(19): 3795-3797.]
- Chen YC, Yu CK, Wang YF, Liu CC, Su JJ, Lei HY. 2004. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement[J]. *J Gen Virol*, 85(1): 69-77.
- Dong C, Wang J, Liu L, Zhao H, Shi H, Zhang Y, Jiang L, Li Q. 2010. Optimized development of a candidate strain of inactivated EV71 vaccine and analysis of its immunogenicity in rhesus monkeys[J]. *Hum Vaccin*, 6(12): 1028-37.
- Duo JY, Wang W, Tong W, Cong Z, Jiang H, Xu WB, Wei Q, Qin C. 2009. Experimental studies on ICR mice with EV71 infection[J]. *Chn J CompMed*, 19(5): 41-46. [朵建英, 王卫, 佟巍, 丛喆, 蒋虹, 许文波, 魏强, 秦川. 2009. 肠道病毒71型(EV71)对ICR小鼠的感染. 中国比较医学杂志, 19(5): 41-46.]
- Lin YW, Chang KC, Kao CM, et al. Chang SP, Tung YY, Chen SH. 2009. Lymphocyte and antibody responses reduce enterovirus 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads[J]. *J Virol*, 83(13): 6477-6483.
- Liu LD, Zhao HL, Zhang Y, Wang JJ, Che YC, Dong CH, Zhang XM, Na RX, Shi HJ, Jiang L, Wang LC, Xie ZP, Cui PF, Xiong XL, Liao Y, Zhao SD, Gao JH, Tang DH, Li QH. 2011. Neonatal rhesus monkey is a potential animal model for studying pathogenesis of EV71 infection[J]. *Virology*, 412(1): 91-100.
- Liu WW, Liu ZJ, Wang X, Cui W. 2011. The pathology study of lung in hand, foot and mouth disease which is caused by enterovirus 71[J]. *J Jining Med College*, 34(2): 93-95. [刘伟伟, 刘增甲, 王旭, 崔文. 2011. EV71型手足口病肺组织病理学研究. 济宁医学院学报, 34(2): 93-95.]
- Mao QY, He P, Yu X, Li N, Hao CS, Gao Q, Dong CH, Liang ZR, Li FX, Shen XL, Wang ZJ. 2010. Laboratory evaluation of method for determination of neutralizing antibody against human enterovirus 71[J]. *Chn J Biol*, 23(8): 885-888. [毛群颖, 何鹏, 于祥, 李楠, 郝春生, 高强, 董承红, 梁争论, 李凤翔, 沈心亮, 王军志. 2010. 人肠道病毒71型中和抗体检测方法的实验室评价. 中国生物制品学杂志, 23(8): 885-888.]
- Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzuki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H. 2004. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation[J]. *J Gen Virol*, 85(10): 2981-2989.
- Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzuki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T. 2002. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71[J]. *J Med Virol*, 67(2): 207-216.
- Sargsi EJ. 2004. New views on tree shrews: the role of tupaiids in primate supraordinal relationships[J]. *Evol Anthropol*, 13(2): 56-66.
- Xu RF, Li TT, Feng XY, Zhang H, Song B, Liu C, Xu L. 2008. Therapeutic effect of hyper oxygenated solution on acute lung injury induced by oleic acid[J]. *Eur Surg Res*, 41(1): 37-43.
- Wang XJ, Yang C, Su JJ. 2010. Development of application of tree shrew in experimental medical research[J]. *Chn J Comp Med*, 20(2): 67-70. [王晓娟, 杨春, 苏建家. 树鼩在医学实验研究中的新进展. 中国比较医学杂志, 20(2): 67-70.]
- Wang XX, Li JX, Wang WG, Sun XM, He CY, Dai JJ. 2011. Preliminary investigation of viruses to the wild tree shrews[J]. *Zool Res*, 32(1): 66-69. [王新兴, 李婧潇, 王文广, 孙晓梅, 何春艳, 代解杰. 2011. 野生中缅树鼩病毒携带情况的初步调查. 动物学研究, 32(1): 66-69.]