

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000341

EV71 入侵人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞机制的初步研究

郭晓丽, 刘泉波, 张祯祯, 毛华伟

(重庆医科大学附属儿童医院感染科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:初步研究肠道病毒 71 型(enterovirus type 71, EV71)入侵人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的机制。**方法:**将临床 EV71 分离株接种于人横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞, 扩增和纯化病毒; MTT 法检测不同病毒胞吞途径阻断剂对 SK-N-SH 细胞生长抑制作用; 用特异性的化学阻断剂预处理靶细胞后, TaqMan real-time PCR 验证其对 EV71 mRNA 表达的影响。**结果:**RD 细胞能够成功扩增出 EV71 病毒, 病毒滴度为 1×10^5 TCID₅₀。随着药物浓度梯度的增加, SK-N-SH 细胞的生长增殖受到抑制。TaqMan 荧光定量 RT-PCR 结果显示氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ)能够抑制 EV71 mRNA 的表达($P < 0.05$), 制霉菌素(nystatin, NT)对其影响不大($P > 0.05$)。**结论:**初步推测 EV71 入侵 SK-N-SH 细胞是通过网格蛋白依赖性的内吞作用入胞。

【关键词】肠道病毒 71 型; 人神经母细胞瘤细胞; 网格蛋白; 内吞途径

【中图分类号】R373.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-13

Mechanism of enterovirus 71 entering into human neuroblastoma cells

Guo Xiaoli, Liu Quanbo, Zhang Zhenzhen, Mao Huawei

(Department of Infection, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To research the mechanism of enterovirus type 71 (EV71) entering into human neuroblastoma SK-N-SH cells.

作者介绍: 郭晓丽, Email: guoxiaoli912@sina.com,

研究方向: EV71 入侵易感宿主细胞机制的研究。

通信作者: 刘泉波, Email: Liuqb1223@sina.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2012jjA0160)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1506.006.html>
(2014-06-09)

Methods: The clinical EV71 isolates were inoculated from human rhabdomyosarcoma (RD) cells for amplifying and purifying virus. MTT assay was conducted to detect the effect of different virus endocytosis blockers on inhibition of SK-N-SH cells. The impact of target cells SK-N-SH on EV71 mRNA

[3] Rafael AI, Almeida A, Santos P, et al. A role for transforming growth factor-beta apoptotic signaling pathway in liver injury induced by ingestion of water contaminated with high levels of Cr(VI)[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 224(2): 163-173.

[4] Bifari F, Pacelli L, Krampera M. Immunological properties of embryonic and adult stem cells[J]. World J Stem Cells, 2010, 2(3): 50-60.

[5] Santa-Olalla J, Covarrubias L. Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon[J]. J Neurosci Res, 1995, 42(2): 172-183.

[6] Bithell A, Finch SE, Hornby MF, et al. Fibroblast growth factor 2 maintains the neurogenic capacity of embryonic neural progenitor cells in vitro but changes their neuronal subtype specification[J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2008, 26(6): 1565-1574.

[7] Vergaño-Vera E, Méndez-Gómez HR, Hurtado-Chong A, et al.

FGF-2 increases the expression of neurogenic genes and promotes the migration and differentiation of neurons derived from transplanted neural stem/progenitor cell[J]. Neuroscience, 2009, 162(1): 39-54.

[8] De Feo D, Merlini A, Laterza C, et al. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection[J]. Curr Opin Neurol, 2012, 25(3): 322-333.

[9] Deleyrolle LP, Rietze RL, Reynolds BA. The neurosphere assay, a method under scrutiny[J]. Acta Neuropsychiatrica, 2008, 20(1): 2-8.

[10] Hanington PC, Patten SA, Reaume LM, et al. Analysis of leukemia inhibitory factor and leukemia inhibitory factor receptor in embryonic and adult zebrafish (Danio rerio)[J]. Dev Biol, 2008, 314(2): 250-260.

[11] 刘建新, 郝晓柯, 王瑞安, 等. 白血病抑制因子对体外培养神经干细胞影响的试验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1248-1250.

(责任编辑: 冉明会)

expression was validated by TaqMan real-time PCR after treating by specific chemical blockers. **Results**: EV71 viruses were successfully amplified in RD cells and the virus titer was 1×10^5 TCID₅₀. With the increase of drug concentration gradient, the growth rate of SK-N-SH cell was inhibited. TaqMan real-time PCR showed that the expression of EV71 mRNA was inhibited by pretreatment of chlorpromazine (CPZ) ($P < 0.05$) and nystatin (NT) exerted little influence ($P > 0.05$). **Conclusion**: EV71 invading into SK-N-SH cells by clathrin-dependent endocytosis is initially speculated.

【Key words】enterovirus 71; human neuroblastoma cells; clathrin; endocytosis

肠道病毒 71 型 (enterovirus type 71, EV71) 是小 RNA 病毒科肠道病毒属成员, 是引起手足口病的主要病原体之一。自 1969 年首次从加利福尼亚患有中枢神经系统疾病的患儿的大便中分离得到 EV71 病毒^[1], 其感染已在世界许多国家中引起数次爆发与流行^[2-4], 并成为一项重要的公共卫生事件。最新流行病学资料显示 EV71 主要引起重症和死亡病例, 致死原因主要为重症脑干脑炎及神经源性肺水肿^[5-6]。目前针对手足口病无特效抗病毒药, 国内外对 EV71 入侵神经细胞的机制尚不清楚, 故本研究将利用神经组织来源的人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞, 针对不同胞吞途径特异性的化学阻断剂探讨 EV71 病毒入侵易感宿主细胞的机制, 为临床抗病毒治疗及疫苗的研发开辟新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

EV71、人横纹肌肉瘤细胞 (rhabdomyosarcoma, RD) 由重庆市疾病预防控制中心微生物检测所 (病毒检测实验室) 提供; 人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞由重庆医科大学附属儿童医院儿研所组织细胞培养室提供; DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco), 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、噻唑蓝 MTT (Amresco), 盐酸氯丙嗪注射液 (chlorpromazine, CPZ) 购自上海禾丰制药有限公司 (1 ml:25 mg), 制霉菌素 100 mg (Nystatin, NT) (Sigma), 病毒 RNApure Virus Kit (病毒 RNA 提取试剂盒) 购自北京康为世纪生物科技有限公司, 逆转录酶 PrimeScript[®] RT reagent Kit (TARAKA), 高纯总 RNA 快速提取试剂盒、Taq PCR MasterMixDNA 聚合酶 (北京百泰克生物技术有限公司), RealMasterMix (probe) (天根生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RD、SK-N-SH 细胞在含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 完全培养基中培养, 5% CO₂、37℃ 孵箱中进行细胞常规传代培养。

1.2.2 病毒培养 取处于对数生长期、生长良好的 RD 细胞以 1×10^5 个/孔分别接种于 2 个 6 孔板, 待每孔细胞贴壁生长长满 60%~70%, 换液, 每孔将 2 ml DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 换为 1 600 μ l DMEM 培养基 (含 2% 胎牛血清), 然后接种纯病毒液 400 μ l; 另一个 6 孔板做阴性对照组, 每孔加 2 ml 含 2% 胎牛血清 DMEM 培养基, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 观察细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)。待 CPE 达约 +++ (50%~75%) 时收获病毒, 将增殖后的病毒悬液反复冻融 3 次, 然后在 4℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 分装后储存在 -80℃ 备用。

1.2.3 病毒滴度测定 采用半数细胞培养物感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 方法检测肠道病毒 EV71 滴度^[7]。细胞接种密度为 1×10^4 个/孔, 取病毒稀释液 100 μ l, 每一稀释度接种 8 个孔, 同时设正常细胞对照孔, 结果按 Kaber 法计算病毒滴度。

1.2.4 RT-PCR 检测 EV71 病毒核酸表达 按照康为世纪病毒 RNA 提取试剂盒说明书提取病毒 RNA, 采用异硫氰酸胍/酚一步法提取阴性对照 (未加病毒) 细胞总 RNA 并合成 cDNA 模板, 同时设阳性对照和纯水试剂对照。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增引物序列: EV71-F: 5'-GCAGCCCCAAAA-GAACTTCAC-3', EV71-R: 5'-ATTTCAGCAGCTTGAGTGC-3' (226 bp)^[8]。反应条件: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 32 个循环, 72℃ 延伸 10 min。反应结束后 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳 (时间 45 min, 电压 120 V), Quantity-one 凝胶成像仪观察结果。

1.2.5 细胞增殖活性的测定 采用 MTT 法检测不同浓度的药物对细胞增殖的影响^[9]。用酶联免疫检测仪于 570 nm 波长处测定各孔吸光度 (absorbance, A) 值。实验重复 3 次。计算不同药物浓度下肿瘤细胞生长抑制率 = $(1 - \text{加药组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。应用 GraphPad Prism5 软件计算药物半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration of a substance, IC₅₀)。

1.2.6 TaqMan real-time PCR 检测 EV71 感染水平变化。

1.2.6.1 EV71 感染靶细胞 SK-N-SH 将 SK-N-SH 细胞分 2 组接种于 24 孔板, 每孔细胞数 2×10^5 个, 每孔 1 ml, 待细胞融合度达到 80% 时, 以病毒 (1×10^5 TCID₅₀) 感染靶细胞组为实验组, 同时设立不加病毒的空白对照组。病毒感染 24 h 后分别提取各组细胞总 RNA, 并反转录为 cDNA。

1.2.6.2 不同内吞途径阻断剂阻断 EV71 病毒入侵 取 24 孔板,每孔加 SK-N-SH 细胞 2×10^5 个。待细胞贴壁生长长满 80%~90% 时给予药物干预:实验分为 3 组,有空白组、CPZ 处理组、NT 处理组。CPZ 处理组药物浓度梯度设为 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$; NT 处理组给予 10、15、20 $\mu\text{g/ml}$ 的药物;将未加药物设为空白组。各组分别预处理 SK-N-SH 细胞 1 h,然后 EV71 病毒株 (1×10^5 TCID₅₀) 感染靶细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h 后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基清洗细胞 3 次,最后细胞培养在含有阻断剂的相应的培养基中。24 h 后,去掉上清液,收集细胞, TaqMan real-time PCR 验证不同内吞途径阻断剂处理后 EV71 mRNA 的表达。

1.2.6.3 TaqMan real-time PCR 法检测 EV71 mRNA 表达 从 GeneBank 中下载 EV71 核酸序列 (GQ994989.1、GQ994990.1、GQ994991.1)^[10],进行保守性分析,根据 TaqMan 引物探针设计原则,利用软件设计扩增引物和 TaqMan 探针,由上海英俊生物技术公司合成,序列如下:EV71-F:5'-CGCGCAAATGCGTGTAGAAA-3', EV71-R:5'-GGCTCCAGGTGGCACAAAC-3' (133 bp), EV71-探针:FAM-ACATGCGCTTTGATG-MGB。反应体系 10 μl :TIANGEN Real Master Mix 5 μl ,上下游引物各 0.3 μl ,探针 0.3 μl ,Probe Enhance solution 0.5 μl ,cDNA 模板 1 μl 补双蒸水到 10 μl ;反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 循环 40 次,荧光检测在 60 $^{\circ}\text{C}$,选用 FAM 通道在 ABI Step-One 荧光定量 PCR 仪上检测荧光。标准曲线的建立:将已知 EV71 mRNA 基因拷贝数的定量标准品 10 倍倍比稀释,以标准模板绘制标准曲线,以此定量未知模板的浓度。EV71 定量标准品由上海英俊生物技术公司合成,质粒拷贝数为 1.49×10^{10} 拷贝/ μl 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件分析实验结果,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组均数比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐组间两两比较采用 LSD- t 法,若方差不齐,采用 Tamhane's T^2 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 EV71 使 RD 细胞出现显著的细胞病变效应

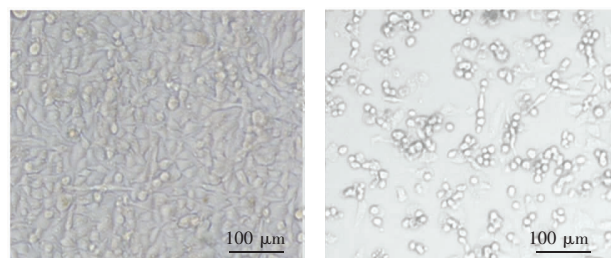
利用 RD 细胞进行 EV71 扩增,在病毒感染 RD 细胞 24 h 后,接种的 6 个孔均发生细胞病变表现为细胞折光性增强,细胞变圆皱缩。而阴性对照组细胞状态良好,无 CPE 出现。PCR 电泳结果显示在 226 bp 处可见 2 条清晰的条带,阴性对照组和空白试剂对照组未显示条带,证实 EV71 感染 RD 细胞可以成功扩增出肠道病毒 71 型。病毒滴度测定结果为 1×10^5 TCID₅₀,见图 1、图 2。

2.2 SK-N-SH 细胞易感于肠道病毒 71 型

实验组 TaqMan real-time PCR 结果显示 EV71 可以高效感染靶细胞 SK-N-SH 细胞,空白组 EV71 表达少 ($P=0.012$) (图 3)。

2.3 高浓度的氯丙嗪、制霉菌素会抑制 SK-N-SH 细胞的生长

结果显示,不同浓度的 CPZ、NT 作用 SK-N-SH 细胞 1 h 后,随着药物浓度的增加细胞出现明显的增殖抑制趋势。与对照组相比,80 $\mu\text{mol/L}$ CPZ,40、80 $\mu\text{g/ml}$ 的 NT 对 SK-N-SH 细胞均有明显的抑制作用,差别均有统计学意义 ($P=0.001$, $P=0.022$, $P=0.000$) (图 4)。应用 Graphpad Prism5 软件得出 CPZ 和 NT 的 IC₅₀ 分别为 45 $\mu\text{mol/L}$, 51 $\mu\text{g/ml}$ 。

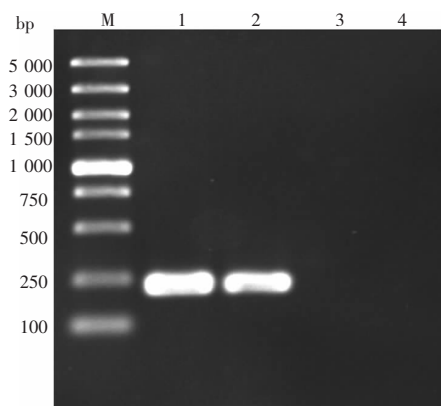


正常 RD 细胞

出现 CPE 的 RD 细胞

图 1 EV71 病毒感染 RD 细胞 24 h 后的 CPE (100 $\times$)

Fig.1 CPE of EV71 infecting RD cells after 24 h (100 $\times$)



M. DL5000; 1. 重庆市疾病预防控制中心已分离重庆 EV71 株阳性对照; 2. 感染组 RD 细胞; 3. 阴性对照; 4. 纯水对照

图 2 RT-PCR 检测 EV71 病毒核酸表达

Fig.2 Expression of EV71 viral nucleic acid detected by RT-PCR

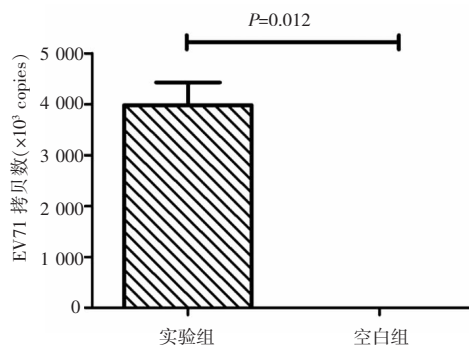
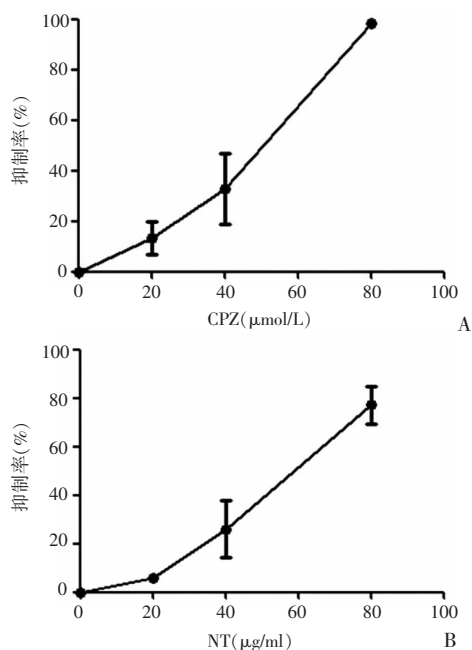


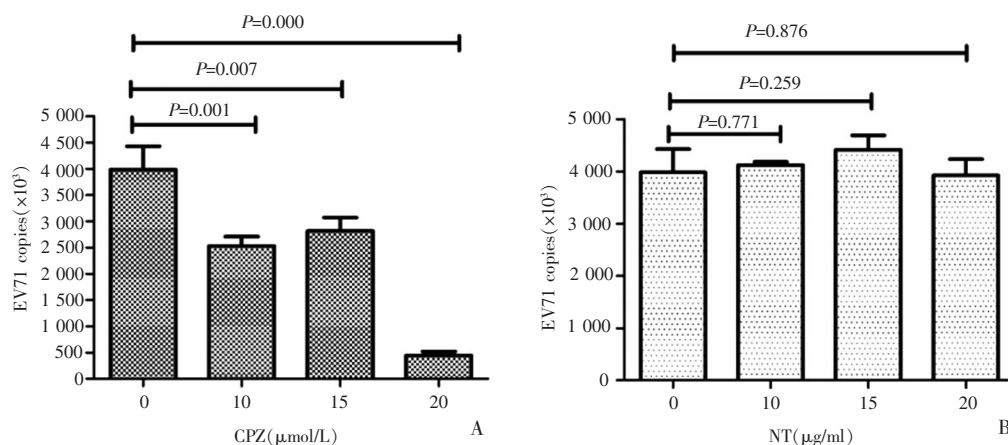
图 3 TaqMan real-time PCR 检测 EV71 感染 SK-N-SH 细胞 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.3 Infection of EV71 on SK-N-SH cells detected by TaqMan real-time PCR ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图 4 不同药物对 SK-N-SH 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.4 Effect of drugs with different concentrations on SK-N-SH cells mutiplication ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4 CPZ 使 EV71 核酸表达水平下降, NT 不影响 EV71 mRNA 表达

TaqMan real-time PCR 结果表明,不同浓度的 CPZ 作用于人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞,24 h 后发现细胞内 EV71 mRNA 表达水平下降。随着 CPZ 阻断剂浓度梯度的增大,胞内 EV71 核酸表达呈剂量依赖性的减少,分别是 10 μmol/L 组 ($2\,527.944 \pm 312.197, P=0.001$)、15 μmol/L ($2\,816.506 \pm 438.908, P=0.007$)、20 μmol/L ($442.365 \pm 129.13, P=0.000$) 明显低于对照组 ($3\,982.492 \pm 770.909$)。20 μmol/L 的 CPZ 使肠道病毒 71 型胞内基因的拷贝数几乎下降 10 倍多。而 NT 无抑制作用,甚至高浓度的 NT (20 μg/ml) 不影响 EV71 感染 SK-N-SH 细胞 ($3\,923.998 \pm 542.086, P=0.876$) (图 5)。提示

图 5 TaqMan real-time PCR 检测 EV71 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.5 Expression of EV71 mRNA detected by TaqMan real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

氯丙嗪抑制 EV71 感染神经细胞是通过网格蛋白依赖性的内吞途径实现,并呈浓度依赖性。

3 讨论

病毒入胞过程是病毒进入宿主细胞并启动其生活周期的第一步,病毒主要通过 2 种方式完成这一过程:一种是直接穿过细胞质膜;另一种是利用胞吞作用入胞。已知的胞吞途径包括网格蛋白依赖型内吞、小窝蛋白依赖型内吞、巨胞饮以及网格蛋白小窝蛋白非依赖型内吞。当今国内外对病毒入胞机制研究甚多,疱疹性口炎病毒、登革热病毒 (dengue virus, DV) 是利用网格蛋白依赖性的内吞途径入胞^[11-12],乙肝病毒、猿猴空泡病毒 40、多瘤病毒则是采用另一小窝蛋白胞吞作用^[13-14]。有研究发现,一些药物例如胆固醇抽提剂制霉菌素、甲基-β-环糊精处理易感细胞可以抑制病毒感染^[15-16]。Peng 等^[12]在研究 DV 入胞机制时发现,使用 5 μg/ml 氯丙嗪能使 DV 的滴度下降 65%。因此在细胞甚至整个器官组织水平上,利用特异性化学阻断剂的方法深入了解病毒与宿主相互作用的机制,对病毒感染的有效预防和治疗有着重要意义。

EV71 是引起重症手足口病最主要的病原,常引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎等多种与神经系统相关的严重疾病导致死亡,继脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV) 后, EV71 又是另一重要的神经毒性肠道病毒^[17]。我国自 2008 年 3 月在安徽阜阳发生 EV71 大规模的爆发疫情并出现多名患儿死亡,全国多个城市相继出现手足口病的暴发或流行^[4]。前期研究表明,科萨奇病毒 B 型、PV 都是通过

小窝蛋白介导入胞^[15,18],EV71 作为肠道病毒属成员之一是否以同样的机制入侵靶细胞尚未明确。本研究证实 EV71 入侵神经细胞是通过网格蛋白依赖性的胞吞作用入胞,不仅为研究 EV71 病毒的致病机制提供了线索,而且提示不同的病毒入胞途径不同。另外,引起手足口病最常见为科萨奇病毒 A16 型和肠道病毒 71 型,但柯萨奇病毒 A16 感染在临床上较少表现出严重的中枢神经系统症状。因此对 EV71 感染神经系统损伤的发病机制进行深入探讨,不仅有助于深化病毒对神经系统致病机理的认识,还为解释 EV71 和柯萨奇病毒 A16 感染的不同临床表现提供了有力的证据。

研究发现 EV71 入侵 RD 细胞是通过网格蛋白的入胞途径^[19-20],而 EV71 入侵人类 T 细胞淋巴株是通过小窝蛋白依赖性的内吞作用^[14],但 EV71 病毒入侵神经细胞机制尚不明确。本实验采用不同病毒内吞途径化学阻断剂预处理靶细胞,观察其对 EV71 入侵神经细胞的阻断效果。结果显示网格蛋白阻断剂氯丙嗪使 EV71 分泌下降约 10 倍多,而小窝蛋白阻断剂制霉菌素无抑制作用,且氯丙嗪对 EV71 的阻断作用呈剂量依赖性。这一结果证实,EV71 感染神经细胞是通过网格蛋白依赖性的内吞途径实现。同时说明不同的病毒采用不同的入胞模式,而同一病毒针对不同的宿主细胞可能采用不同的入侵途径,即多数情况下病毒的内吞途径决定病毒亲组织性,并且与发病机理有关。

本实验用 RD 细胞能够成功扩增出肠道病毒 EV71 型,并且验证 EV71 可能是通过网格蛋白依赖性的内吞途径入侵神经细胞。但是 EV71 病毒致病机制复杂,有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Yi L, Lu J, Kung HF, et al. The virology and developments toward control of human enterovirus 71[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37(4): 313-327.
- [3] Emily J Bek, Peter C McMinn. Recent advances in research on human enterovirus 71[J]. *Future Virology*, 2010, 5(4): 453-468.
- [4] 刘丽艳, 朱启镛. 肠道病毒 71 型分子生物学研究进展[J]. *微生物*

与感染, 2010, 5(1): 57-60.

- [5] 卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 年版)[M]. 2010.
- [6] 葛艳玲, 夏爱梅, 姚玮蕾, 等. 2010 年至 2011 年上海地区儿童手足口病肠道病毒 EV71 感染的流行病学[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(4): 200-203.
- [7] Nadgir SV, Hensler HR, Knowlton ER, et al. Fifty percent tissue culture infective dose assay for determining the titer of infectious human herpesvirus 8[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1931-1934.
- [8] 中国疾病预防控制中心. 手足口病实验室手册[M]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2008: 13-14.
- [9] 崔向荣, 朱静, 田杰, 等. STAT3 过度表达和激活对骨髓间充质干细胞瘤样转化的作用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(3): 328-331.
- [10] 蔡丽君, 王均, 许红梅, 等. 重庆地区 2009 年手足口病病原分离鉴定及病毒基因组特征[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(15): 1589-1593.
- [11] Cureton DK, Massol RH, Whelan SP, et al. The Length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis[J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(9): e1001127.
- [12] Peng T, Wang JL, Chen W, et al. Entry of dengue virus serotype 2 into ECV304 cells depends on clathrin-dependent endocytosis, but not on caveolae-dependent endocytosis[J]. *Can J Microbiol*, 2009, 55(2): 139-145.
- [13] Macovei A, Radulescu C, Lazar C, et al. Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells[J]. *J Virol*, 2009, 84(1): 243-253.
- [14] Lin HY, Yang YT, Yu SL, et al. Caveolar endocytosis is required for human PSGL-1-mediated enterovirus 71 infection[J]. *J Virol*, 2013, 87(16): 9064-9076.
- [15] Coyne CB, Kim KS, Bergelson JM. Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2[J]. *EMBO J*, 2007, 26(17): 4016-4028.
- [16] Yousuf MA, Zhou X, Mukherjee S, et al. Caveolin-1 associated adenovirus entry into human corneal cells[J]. *PLoS one*, 2013, 8(10): e77462.
- [17] Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, et al. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(11): 1097-1105.
- [18] Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions[J]. *Cell*, 2006, 124(1): 119-131.
- [19] Lin YW, Lin HY, Tsou YL, et al. Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30507.
- [20] Hussain KM, Leong KL, Ng MM, et al. The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the Infectious entry of human enterovirus 71[J]. *J Biol Chem*, 2010, 286(1): 309-321.

(责任编辑: 关蕴良)