



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R512.32

U D C 616.9

密 级 公开

# 硕士学位论文

**MLKL 介导的程序性坏死在 JE 中的作用  
及 MSC 治疗 JE 小鼠模型的效应与机制研究**

边培育

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 内科学(传染病)

研 究 方 向 日本脑炎病毒感染及干细胞治疗

指 导 教 师 贾战生教授(主任医师)

培 养 单 位 唐都医院传染科

二〇一七年五月

## 独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_

## 保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表学术论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：\_\_\_\_\_导师签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_

# 目 录

缩略语表 .....	1
中文摘要 .....	3
ABSTRACT .....	7
前 言 .....	12
文献回顾 .....	14
正 文 .....	29
第一部分 MLKL 介导的程序性坏死在 JE 中的作用 .....	29
1. 材料 .....	29
1.1 实验动物及细胞 .....	29
1.2 试剂 .....	29
1.3 实验耗材 .....	32
1.4 实验器材设备 .....	32
1.5 引物 .....	32
2. 方法 .....	33
2.1 JEV 制备及小鼠 JE 模型构建 .....	33
2.2 活体 PI 染色 .....	34
2.3 组织免疫荧光 .....	35
2.4 显微结构电镜及免疫电镜 .....	35
2.5 细胞免疫荧光 .....	35
2.6 Western-blot .....	36
2.7 qRT-PCR .....	36
2.8 ELISA .....	37
3. 结果 .....	37
3.1 JEV 病毒滴度测定及模型构建 .....	37
3.2 JEV 感染小鼠模型中，大量神经细胞发生坏死 .....	39
3.3 MLKL 介导的程序性坏死参与 JE 的发病 .....	40
3.4 JEV 感染诱导的程序性坏死主要发生在神经元 .....	42

3.5	MLKL 表达与 JEV 感染剂量相关	43
3.6	敲除 MLKL 减缓 JE 进程	45
3.7	JE 模型中阻断 MLKL 可减少炎症因子表达水平	47
4.	讨论	49
第二部分 MSC 移植治疗 JE 的效应及机制探讨		52
1.	材料	52
1.1	实验动物及细胞	52
1.2	试剂	52
1.3	实验耗材	54
1.4	仪器设备	54
1.5	引物	54
2.	方法	54
2.1	MSC 的分离培养鉴定	54
2.2	JEV 模型构建及 MSC 移植	56
2.3	组织学检测	56
2.4	细胞共培养及混合培养	56
2.5	流式细胞术	57
2.6	血脑屏障渗透性检测	58
2.7	qRT-PCR	58
2.8	Western-blot	58
3.	结果	58
3.1	MSC 分离鉴定	58
3.2	MSC 移植可缓解 JE 病情进展, 降低死亡率	59
3.3	MSC 移植减轻 JEV 感染导致的炎症反应	60
3.4	MSC 抑制小胶质细胞的过度活化并调控其 M1 向 M2 极化状态	62
3.5	MSC 抑制 JEV 感染神经元死亡	65
3.6	MSC 移植治疗降低血脑屏障的渗透性	67
3.7	MSC 抑制 JEV 病毒复制	68
4.	讨论	70
第三部分 Gas6-MSC 构建及对 JE 治疗效应的初步研究		73
1.	材料	73

1.1	实验动物及细胞 .....	73
1.2	试剂 .....	73
1.3	实验耗材 .....	74
1.4	仪器设备 .....	74
1.5	引物 .....	74
1.6	质粒 .....	74
2.	方法 .....	75
2.1	MSC 分离培养鉴定 .....	75
2.2	静脉移植后进入中枢神经系统的检测 .....	75
2.3	构建 pLenti-gas6-GZ 质粒 .....	76
2.4	制备 gas6-GZ 慢病毒 .....	77
2.5	Gas6 稳转 MSC 的建立及干性标志分子鉴定 .....	77
2.6	gas6-MSC 治疗 JE 模型的效应观察 .....	78
3.	结果 .....	78
3.1	JE 小鼠尾静脉注射的 MSC 可迁移至脑内 .....	78
3.2	pLenti-gas6-GZ 质粒的构建及鉴定 .....	79
3.3	gas6 慢病毒的包装和表达 .....	79
3.4	gas6-MSC 构建及鉴定 .....	80
3.5	gas6-MSC 移植 JE 小鼠模型预评估 .....	81
4.	讨论 .....	82
小	结 .....	84
参	考文 献 .....	85
个	人简 历及研 究成 果 .....	94
致	谢 .....	95

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
Ang1	angiopoietin-1	血管生成素 1
Arg1	arginase1	精氨酸酶 1
BBB	blood brain barrier	血脑屏障
BDNF	brain derived neurotrophic factor	脑源性神经营养因子
BMECs	brain microvascular endothelial cells	脑微血管内皮细胞
CCL-2	chemokine (C-C motif) ligand 2	趋化因子配体 2
CNS	central nervous system	中枢神经系统
CNTF	ciliary neurotrophic factor	睫状神经营养因子
DAMPs	damage associated molecule patterns	损伤相关分子模式
Fluc	firefly luciferase	萤火虫荧光素酶
Gas6	growth arrest-specific protein 6	生长停滞特异性蛋白
HCoV-OC43	Human Coronavirus OC43	人冠状病毒 OC43
HSV	Hepes Simple Virus	单纯疱疹病毒
IAV	Influenza A Virus	IAV
IFN	interferon	干扰素
IL-6	interleukin 6	白介素 6
iNOS	inducible nitric oxide synthase	诱导型 NO 合成酶
JE	Japanese Encephalitis	日本脑炎
JEV	Japanese Encephalitis Virus	日本脑炎病毒

KGF	keratinocyte growth factor	角质细胞生长因子
MCMV	Murine Cytomegalovirus	鼠巨细胞病毒
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1	单核细胞趋化因子 1
MLKL	mixed-lineage kinase domain-like protein	混合系列蛋白激酶样结构域
MSC	mesenchymal stem cells	间充质干细胞
NGF	nerve growth factor	神经生长因子
NSC	neuroal stem cells	神经干细胞
TAM receptor	Tyro3/Axl/Mer receptor tyrosine kinase	TAM 受体
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$	转化生长因子 $\beta$
TIMP3	tissue inhibitors of metalloproteases-3	组织金属蛋白酶抑制剂 3
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$	肿瘤坏死因子 $\alpha$
TSG6	tumor necrosis factor-stimulated gene-6	TNF 诱导基因蛋白 6
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
VV	Vaccinia Virus	痘苗病毒
ZO-1	zonula occludens-1	紧密连接蛋白

# MLKL 介导的程序性坏死在 JE 中的作用 及 MSC 治疗 JE 小鼠模型的效应与机制研究

硕 士 研 究 生 : 边 培 育<sup>1</sup>

导 师 : 贾 战 生 教 授<sup>1</sup>

辅 导 老 师 : 雷 迎 峰 副 教 授<sup>2</sup>

1 第四军医大学唐都医院传染科 西安 710038

2 第四军医大学基础部微生物学教研室 西安 710032

## 中文摘要

日本脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 又称流行性乙型脑炎, 是由日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 感染引起的急性中枢神经系统疾病, 具有较高的致死率和致残率。尽管 JEV 疫苗有比较理想的保护效应, 但根据 WHO 报道, 全球每年仍有约 6.8 万人感染发病, 其中有 20~30% 死亡, 幸存者中又有 30~50% 伴有严重的神经精神后遗症。JEV 以感染儿童为主, 而近年来老年人发病率呈现逐渐上升趋势。对于 JE 的治疗, 迄今尚无特异有效的方法, 仅能以对症支持治疗为主, 给患者和家庭带来极大的痛苦。JEV 具有嗜神经性, 既可直接引起神经元的损伤与死亡, 又可通过免疫病理反应损伤神经元细胞, 并诱导小胶质细胞的大量活化和炎症因子的产生, 进而加剧血脑屏障的破坏和免疫细胞的浸润。其中, 神经元的死亡、小胶质细胞的活化和炎症因子的大量释放可相互促进, 形成免疫病理损伤的恶性循环加重疾病的进展。因此, 深入研究 JEV 诱导神经元死亡的机制, 以及探索有效的免疫调控方式抑制过度的炎症反应对于 JEV 治疗新策略的开发具有重要意义。

神经元的死亡是 JE 发生发展的关键, 细胞凋亡和自噬均参与了 JEV 导致的神经元死亡, 但阻断凋亡和自噬不能完全抑制神经元的死亡, 提示神经元可发生其它形式的死亡。程序性坏死是一种特殊的细胞坏死方式, 主要由 TNF/ RIPK1 (receptor-



interacting protein kinase 1)/ RIPK3/ MLKL (mixed-lineage kinase domain-like protein) 信号通路调控。鉴于 TNF- $\alpha$  是 JEV 致病的重要炎症因子, JE 死亡患者脑组织中大量神经元发生坏死, 为此我们探讨了 MLKL 介导的程序性坏死是否参与 JE 进展。

过度免疫反应所导致的炎症损伤是 JE 的主要致病原因。抑制过度的炎症反应, 改善损伤微环境, 促进神经系统的再生修复是治疗 JE 的关键和挑战。骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSC) 是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞。MSC 因具有强大的免疫调节和靶向迁移能力而受到广泛关注。大量研究显示 MSC 可抑制过度的炎症反应, 维持机体免疫稳态; 同时可分泌多种生长因子和神经营养因子促进神经组织的再生修复; MSC 还可提高血管内皮细胞的稳定性, 减少血脑屏障的破坏。MSC 在多种中枢神经系统疾病模型中有着很好的治疗作用, 因此探索 MSC 在 JE 中的治疗作用意义重大。同时, 近年来研究发现生长停滞特异性蛋白 (growth arrest-specific protein 6, Gas6) 可调控小胶质细胞的活化, 调节脑血管内皮细胞功能, 参与血管重塑和血脑屏障完整性的维持, 并且它可改善少突胶质细胞的功能状态促进髓鞘的形成和组织功能修复。因此, 我们初步探讨了 MSC 及 gas6 基因修饰的 MSC 在 JE 治疗中的效应及机制。

本研究的主要实验方法及结果:

### 1. MLKL 介导的程序性坏死在 JEV 感染所致中枢神经系统炎症损伤中的作用

应用 C6/36 细胞扩增 JEV 并通过超高速离心浓缩病毒, 空斑形成实验测定病毒滴度为  $4 \times 10^8$  PFU/ml。采用 C57BL/6 小鼠(雌, 4~6 周龄), 通过腹腔注射途径感染 JEV ( $5 \times 10^7$  PFU/只) 构建小鼠 JE 模型, 观察神经行为学变化、结合脑组织内病毒 E 抗原染色及脑内 TNF- $\alpha$  水平进行 JE 模型鉴定。活体 PI (碘化丙啶) 染色联合电镜技术发现 JEV 感染模型中脑细胞坏死的发生。JEV 感染脑组织切片, 通过组织免疫荧光、免疫电镜检测到 JEV 感染后脑细胞 MLKL 表达水平显著升高且主要分布在细胞质, 并有向细胞膜募集趋势; MLKL 与 NeuN 共染结果显示 MLKL 介导的程序性坏死主要发生在神经元; 蛋白印迹结果显示 JEV 感染后脑组织内 MLKL 及磷酸化 MLKL (pMLKL) 蛋白水平明显升高; qRT-PCR 结果显示 JEV 感染可诱导脑组织 MLKL 表达且 MLKL 在症状严重的小鼠中表达水平更高。同时, 我们构建 Neuro2a 细胞的 JEV 体外感染模型, 并给以不同的 MOI 值和感染时间, qRT-PCR 及 western

blot 检测结果显示随着 JEV 感染时间及剂量的增加, MLKL 及 pMLKL 蛋白水平及 MLKL 的 mRNA 水平都随之增加。进一步, 我们使用 MLKL 敲除 (MLKL<sup>-/-</sup>) 小鼠及野生型 (WT) 小鼠进行攻毒实验, 结果发现, 与 WT 小鼠相比, MLKL<sup>-/-</sup>小鼠感染 JEV 后呈现出缓慢的病程进展和较低的炎症因子水平。

## 2. MSC 移植对于 JEV 感染所致炎症损伤的治疗作用

首先我们采用全骨髓贴壁法分离培养纯化小鼠骨髓 MSC, 通过表面标志分子检测和成脂成骨成软骨细胞三系体外诱导分化实验证实分离的 MSC 符合干细胞鉴定的国际标准。然后采用 8~10 周龄 BALB/c 小鼠构建 JE 模型, 并于感染后第 1, 3 天经尾静脉注射途径进行 MSC 移植, 并对各组小鼠状态变化进行观察记录及组织病理学检测, 结果显示 MSC 移植可降低 JEV 感染所致的死亡率, 改善临床症状, 缓解中枢神经系统的组织病理损伤和炎症反应。同时, 组织免疫荧光、流式细胞术、TUNEL 染色、血脑屏障渗透性检测和 qRT-PCR 等检测结果显示: 在 MSC 移植模型中脑组织 IBA1 表达下调即小胶质细胞活化程度下降; 脑组织 NeuN 表达增加, TUNEL 染色阳性比例下降; 血脑屏障的渗透性降低, 紧密连接蛋白 ZO-1 表达增加; 脑组织 E 抗原水平降低, 脑内病毒载量下降。进一步进行体外实验, 将 MSC 分别与 Neuro2a 细胞和 N9 细胞混合培养或 Transwell 共培养, 流式细胞术及 qRT-PCR 等检测结果显示: 与 MSC 共培养可提高 Neuro2a 细胞的存活率, 并调控小胶质细胞 M1 向 M2 极化状态的转变; 在共培养的条件下 MSC 可上调表达免疫调节因子 (如 TSG-6, TGF- $\beta$ )、干扰素 (如 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) 和干扰素诱导基因等; 当 MSC 与 JEV 感染的 Neuro2a 细胞进行混合培养或共培养时, JEV 的增殖被抑制。

## 3. 基因修饰 MSC 的构建及其功能作用的初步验证

采用慢病毒感染的方法, 构建并筛选获得 Fluc-MSC。JEV 感染 BALB/c 小鼠 (雌, 6-8 周龄) 后第 1、3 天经尾静脉途径进行 Fluc-MSC 移植, 同时以 PBS 静脉注射为对照组。第 6 天使用荧光素酶底物检测脑组织内 Fluc 的表达, 与对照组相比, Fluc-MSC 移植组小鼠脑组织中冷光值明显升高, 提示在 JE 模型中, 尾静脉移植的 MSC 可迁移至脑组织。同时, 分离扩增出完整的 gas6 基因片段, 构建 pLenti-gas6-GZ 载体, 并包装慢病毒。将其通过离心法感染 MSC 并用 zeocin 药物筛选出纯度较高的 gas6-MSC。进一步在 JEV 感染小鼠后第 1, 3 天分别进行 MSC、gas6-MSC 尾静

脉移植治疗。初步实验结果表明在 JE 模型中，与 MSC 相比，gas6-MSC 移植组显示出更高的存活率和改善的临床症状。

讨论与结论：JEV 是目前导致病毒性脑炎的主要原因，JE 具有极高的致死率和致残率。神经元的死亡和脑内过度免疫损伤是 JE 发生发展的关键，然而目前对于神经元死亡的具体机制以及有效的免疫调控治疗都缺乏足够的认识。本实验中，我们探索了 MLKL 介导的程序性坏死在 JE 中的作用以及 MSC 对于 JE 的免疫调控作用并初步探索 MSC 的优化治疗方案。我们得出以下结论，MLKL 介导的程序性坏死参与 JEV 感染所致的神经元死亡，抑制 MLKL 的表达可缓解疾病的进展和炎症因子水平；MSC 移植能缓解 JEV 感染所致的炎症损伤和死亡率，而且，在一定程度上，MSC 可以抑制 JEV 的增殖；同时我们成功构建了 gas6-MSC，初步证实 gas6-MSC 移植治疗能更有效地改善 JE 模型的生存率。本研究为深入理解 JEV 的致病机制，探索有效的治疗方法提供了实验基础。

**关键词：**日本脑炎病毒；神经系统炎症；程序性坏死；MLKL；骨髓间充质干细胞；免疫调控；Gas6

# **The role of MLKL mediated necroptosis in neuronal death and the therapeutic effect of MSC on neuroinflammation during JE in mouse models.**

Candidate for master: Bian Peiyu<sup>1</sup>

Supervisor: Prof. Jia Zhansheng<sup>1</sup>

Tutor: Prof. Lei Yingfeng<sup>2</sup>

1 Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, China.

2 Department of Microbiology, School of Preclinical Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China.

## **Abstract**

Japanese encephalitis (JE) caused by Japanese encephalitis virus (JEV) is the most prevalent type of viral encephalitis in Asia which is characterized by acute overwhelming inflammation in the brain with high incidence of disability and fatality. Although the development of JE vaccine has markedly reduced the incidence, more than 68000 cases of JEV infection are reported annually worldwide according to WHO, among which approximately 20- 30% are fatal and 30- 50% suffer from permanent neuropsychiatric sequelae. Children are more susceptible to JEV, while there is an increasing occurrence in the old population. There are currently no effective methods to eliminate the virus or to cure the neuroinflammation but life-sustaining treatment leading to thousands of people succumbing to the devastating illness and the survivors often suffering from permanent neurological deficits which is devastated to patients and their families. JEV is

neuro-invasive and neurons can be damaged by JEV directly and indirectly by inflammation mediated cytotoxicity. Meanwhile, JEV infection provokes microglia leading to increased activation of microglia accompanied with robust and uncontrolled production of pro-inflammatory cytokines as well as the breakdown of the blood brain barriers (BBB) followed by the invasion of inflammatory cells into the central nervous system (CNS). During JE, neuronal death, microglia activation and proinflammatory cytokines form the vicious cycle of inflammation in the CNS leading to progression and deterioration of JE. Thus, exploration of the mechanism of neuronal death as well as the effective treatment to inhibit the excessive neuroinflammation and damage is necessary.

It has been demonstrated that apoptosis and autophagy are involved in JE and inhibiting the neuronal death can alleviate the progression. Necroptosis as the special way of necrosis is a newly discovered programmed cell death. Contrast to unregulated accidental cell disintegration, necroptosis was regulated mainly through the axis of TNF/RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1) /RIPK3 /MLKL (mixed-lineage kinase domain-like protein). Meanwhile, TNF- $\alpha$  is one of the most important cytokines during JE accompanied with massive neuronal necrosis. Based on this, whether necroptosis is involved in the development of JE is worth exploring.

The overactivation of inflammation is the main cause of neuropathology during JE. Inhibiting the inflammation during the progression of JE has been shown to reduce neuronal death and promote neurogenesis. Mesenchymal stem cell (MSC) is characterized with self-renewal capacity and multiple differentiation and has the capacity of immunoregulation and migration into the injury site which has been used as the drug-delivery carriers in many diseases contributing to tissue regeneration and immune homeostasis. It has been reported that transplantation of MSC can up-regulate the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) and improve neurological recovery in many CNS diseases. MSC also controls local inflammation and maintains tissue homeostasis by enhancing the innate and adaptive immune response as well as regulating the activation and function of microglia. In addition, MSC regulates BBB integrity by promoting the expression of vascular

endothelial growth factor and angiogenesis. MSC has been reported therapeutically effective in many CNS diseases. The effect of MSC on JE is worth exploring. Meanwhile, growth arrest-specific protein 6 (Gas6) participates in the maintenance of homeostasis of CNS. Gas6 is an important immunoregulator which plays a great role in regulating the activation of glia and other immune cells during inflammation. Meanwhile, Gas6 regulates the function of vascular endothelial cells as well as vascular remodeling to keep the integrity of BBB. Moreover, Gas6 can improve the function of oligodendrocytes contributing to the myelination and recovery of CNS. In this experiment, the gas6 gene modified MSC was established successfully through lentiviral vector to combine the therapeutic effect of both MSC and Gas6 during JE.

The main procedures and results are presented here.

### **1. MLKL mediated necroptosis accelerated JE and death in mice**

JEV was propagated in the mosquito cell C6/36 and concentrated by extra-high speed centrifuge and titrated by plaque assay as  $4 \times 10^8$  PFU/ml. Then  $5 \times 10^7$  PFU JEV in 200  $\mu$ l PBS was injected into female C57BL/6 mice (4-6 w) intraperitoneally then neuroethology, JEV antigen and the level of TNF- $\alpha$  in the brain were tested to construct and identify the JE models. Propidium Iodide (PI) staining in vivo and electron microscopy were used to identify the necrosis in brains during JE. Immunohistochemistry combined with immune-electron microscopy of JEV infected mouse brains demonstrated that the expression of MLKL was increased in the cytoplasm and tended to localize along the cellular membrane after JEV infection. Western blot of the total protein in mouse brains showed that the protein level of MLKL and pMLKL was upregulated after JEV infection. And the qRT-PCR showed increased expression of MLKL in mRNA. Meanwhile, the level of MLKL in mRNA was correlated with the severity of JEV infected mice. In vitro, Neuro2a cells were infected with JEV, and the level of MLKL and pMLKL was detected by western blot. MLKL and pMLKL was increased as the increase of infection MOI and time. Then MLKL<sup>-/-</sup> mice and WT mice were used to constructed JE models. MLKL<sup>-/-</sup> mice showed alleviated progression of JE and decreased level of

inflammatory cytokines.

## **2. MSC alleviated JEV-induced neuroinflammation and mortality.**

The mouse bone marrow-derived MSC was isolated by the adhesive screening method and analyzed by flow cytometry and multi-differentiation evaluation. In vivo, 8- to 10-week-old mice were infected intraperitoneally with JEV and syngeneic bone marrow MSC was administered through the caudal vein at first and third day post infection (dpi). The mortality, body weight and behavior were monitored daily. Brains from each group were harvested at 6 dpi for hematoxylin–eosin staining, immunohistochemical observation, flow cytometric analysis, TUNEL staining, western-blot, qRT-PCR and BBB permeability assays. MSC treatment reduced JEV-induced mortality and improved the recovery from JE in our mouse models. The histopathological lesion and inflammatory cytokines in MSC treated mice were alleviated compared with JEV infected mice without MSC transplantation. The microglia activation and neuronal loss were significantly decreased in the MSC-treated group. The permeability of BBB was alleviated in MSC treated mice accompanied with increased expression of ZO-1. The viral load (VL) in the brains was also decreased in MSC treated mice. In vitro, coculture and mixed culture experiments of MSC with either microglia or neurons were performed and then the activation state of microglia and survival rate of neurons were tested 48 hours post infection. In coculture experiments, MSC reprogrammed M1-to-M2 switching in microglia and improved neurons survival. Additionally, the VL was decreased in Neuro2a cells in the presence of MSC accompanied by increased expression of immunoregulatory cytokines TSG-6 as well as TGF- $\beta$  and interferons including IFN- $\alpha/\beta$ .

## **3. Construction and identification of gas6-MSC**

In this part, lentivirus expressing Fluc was constructed then Fluc gene modified MSC was built. BALB/c mice (female, 6-8w) were infected with JEV and then Fluc-MSC was transplanted through vein at 1 and 3 dpi. At 6 dpi, Fluc in the brains was greatly increased after Fluc-MSC transplantation compared with control which

showed that MSC migrated into brain when injected through vein in JE models. Meanwhile, gas6 gene was amplified and pLenti-gas6-GFP-zeocin was constructed, then the gas6-lentivirus was packaged and concentrated. Gas6-MSC was built through infection and purified with zeocin screening. At 1 and 3 dpi, the JEV infected mice were transplanted with MSC, gas6-MSC respectively. The primary therapeutic effect of gas6-MSC on JE was evaluated. Compared with MSC, gas6-MSC treated group showed increased survival rate and alleviated symptoms.

In summary, JEV is the main pathogen of viral encephalitis with high disability and fatality. The neuronal death and neuroinflammation are the key pathogenesis of JE. Whereas, the mechanism of neuronal death and the treatment of inflammation in CNS caused by JEV infection are still unclear. In this study, the role of MLKL mediated necroptosis in JE and the effect of MSC on neuroinflammation during JE were researched. This study provided evidence for the participation of necroptosis in the pathogenesis of JEV infection. The deletion of MLKL alleviated the inflammation and progression of JE. Targeting necroptosis will hopefully lead to the development of novel therapeutic strategies for the treatment of JE. MSC treatment alleviated JEV induced inflammation and mortality in mice and at the same time inhibited the JEV proliferation to some extent. Meanwhile, gas6-MSC has greater improvement in the treatment of JE. Our study laid the foundation to the further exploration of the mechanism and treatment of JE.

**Key words:** Japanese encephalitis virus; neuroinflammation; necroptosis; MLKL; mesenchymal stem cells; immunomodulation; Gas6



# 前 言

日本脑炎病毒（Japanese encephalitis virus, JEV）即流行性乙型脑炎病毒，可引起严重的急性中枢神经系统传染病——日本脑炎（Japanese encephalitis, JE）。JE 患者以高热、抽搐、意识障碍为主要临床表现，高热、脑部炎症和脑水肿可诱发中枢性呼吸衰竭，是导致患者死亡的主要原因。JEV 主要流行于东亚、东南亚和南亚地区，我国是 JEV 的高流行区。近年来 JEV 流行区域呈不断扩大趋势，并在塞班岛、巴基斯坦和澳洲北部等非流行区出现<sup>[1]</sup>。由于 JEV 可通过血脑屏障进入中枢神经系统引起脑部炎症，儿童的血脑屏障发育不完善，故儿童患者多见。自上世纪 90 年代，JEV 疫苗的成功应用大大降低了 JE 的发病率，但由于各种原因儿童和老年 JE 患者仍然保持一定数量<sup>[2]</sup>。根据 WHO 报道，目前全球每年约 6.8 万人感染发病，其中约 1.5-2 万人死亡，幸存者中约 30~50% 伴有严重的神经精神后遗症，给社会及家庭带来沉重的负担<sup>[2]</sup>。迄今为止，对于 JE 的治疗尚无特异有效的抗病毒药物，临床治疗仅以对症支持治疗为主。因此，深入研究 JEV 致病机制，探索新型治疗策略具有十分重要的意义。

程序性坏死（necroptosis）是近年来发现的一种有序的、可调控的特殊的细胞坏死方式，坏死细胞可释放大量促炎因子和损伤相关分子模式（damage associated molecular patterns, DAMPs）<sup>[3]</sup>。在 JE 发生的过程中，JEV 可直接感染神经元并诱导其死亡，同时 JEV 感染可刺激胶质细胞活化并释放 TNF- $\alpha$  等炎症因子进一步介导神经元的死亡<sup>[4]</sup>。神经元的大量死亡是导致 JE 发生发展的关键，细胞凋亡和自噬均参与 JEV 感染所诱导的神经元死亡。但阻断凋亡或自噬并不能完全阻断神经元的死亡，提示还有其他细胞死亡方式参与 JEV 感染神经元的死亡<sup>[5]</sup>。JEV 感染患者尸检及动物模型解剖均显示脑组织发生大量变性坏死。在多种疾病动物模型和细胞模型中，TNF- $\alpha$  可通过 TNF/ TNFR/ RIPK1/ RIPK3/ MLKL 诱导细胞程序性坏死的发生<sup>[6]</sup>。TNF- $\alpha$  又是 JEV 感染过程中产生的主要炎症因子，而程序性坏死是否参与 JE 的发生发展尚未有报道。明确程序性坏死在 JE 中的作用，对于进一步理解神经元死亡的机制，有效干预炎症进展具有重要意义，同时也可能成为干预 JE 进展的潜

在治疗靶点。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的异质性成体干细胞。同时, MSC 具有定向迁移和免疫调节功能。近年来大量研究证实 MSC 可抑制过度的炎症反应并能靶向迁移至炎症损伤区发挥细胞替代治疗作用, 在多种疾病模型中发挥很好的治疗潜力。在创伤性脑损伤、实验性自身免疫性脑炎、脊髓侧索硬化等多种中枢神经系统疾病中, MSC 可穿过血脑屏障迁移至损伤区, 并能分泌多种免疫调节因子、神经营养因子和促血管生成因子改善局部微环境, 抑制炎症损伤, 提高血脑屏障完整性, 促进神经组织的修复<sup>[7]</sup>。脑组织炎症损伤是 JEV 的主要致病机制, 大量研究证实抗炎干预对于 JE 的治疗具有一定的效果。结合 JE 的炎症损伤机制和 MSC 的功能特性及其在多种中枢性神经系统疾病中的治疗效果, MSC 对于 JE 的治疗作用值得探索和研究。

近年来, 多项研究证实 MSC 能归巢至炎症损伤部位, MSC 也可穿过血脑屏障进入脑内。基于此, MSC 作为药物运输载体受到广泛关注。将目的蛋白分子的编码基因稳定修饰表达于 MSC, 其可迁移至病灶并持续分泌目的分子, 从而使其在病变部位内具有较高的浓度。譬如骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenic factor 4, BMP4) 修饰的 MSC 在大鼠脑肿瘤模型中展示出更好的治疗效果<sup>[8]</sup>; 胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 修饰的 MSC 在大鼠急性肾衰竭模型中能够更好地改善病情进展<sup>[9]</sup>。Gas6 蛋白具有免疫调控功能、血脑屏障完整性维持, 以及促进神经系统修复等特性。构建 Gas6 稳定表达的 MSC, 联合 MSC 和 Gas6 的生物学功能可能会进一步提高其治疗效果。

本研究主要包括 MLKL 介导的程序性坏死在 JE 中的作用, MSC 对 JE 的治疗作用及机制以及 gas6-MSC 的构建及初步功能验证三个部分。我们首次证实 MLKL 介导的程序性细胞坏死参与 JEV 感染所致的神经元死亡, 阻断 MLKL 可缓解炎症损伤, 延缓疾病的进展。MSC 尾静脉移植可改善 JEV 小鼠模型的生存率和临床进展, 缓解炎症损伤。我们构建了 Gas6 稳定表达的 MSC 并初步证实 gas6-MSC 在 JEV 感染小鼠模型中显示出更好的治疗效应。本研究为进一步研究 JE 的致病机制及治疗方法提供实验基础。

## 文献回顾

### 一、日本脑炎病毒

日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 是目前亚洲地区导致急性病毒性脑炎最主要的病原体<sup>[2]</sup>。JE 以急性高热, 抽搐和呼吸衰竭为主要临床表现, 具有极高的致死率和致残率<sup>[4]</sup>。疫苗的研发和使用大大降低了 JE 的发病率, 然而疫苗的保护率仅 80% 左右。近年来, JE 的发病率呈上升趋势, 其中中老年患者比例明显增加<sup>[10]</sup>。目前对于 JE 患者尚无有效的治疗方法, 只能以对症支持治疗为主<sup>[11]</sup>。

JEV 属黄病毒科黄病毒属, 为单股正链 RNA 病毒, 以库蚊叮咬传播为主, 具有明显的嗜神经性<sup>[5]</sup>。JEV 突破血脑屏障进入中枢神经系统后直接感染神经元, 使神经元损伤死亡并释放大量的促炎性细胞因子和损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) <sup>[12]</sup>。同时病毒本身及这些炎症产物可诱导胶质细胞尤其是小胶质细胞的大量活化, 活化的小胶质细胞可进一步分泌大量的炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  及趋化因子 CCL-2、MCP-1 等<sup>[13, 14]</sup>。而 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 等可再次诱导小胶质细胞及单核巨噬细胞的活化和炎症因子的释放; 同时 TNF- $\alpha$  可进一步诱导神经元的死亡和炎症因子的释放<sup>[15]</sup>; IFN- $\gamma$  可介导血管内皮的炎症损伤和血脑屏障的破坏<sup>[16]</sup>。而各种趋化因子的产生可导致单核巨噬细胞, 中性粒细胞的浸润加重脑组织炎症损伤<sup>[14]</sup>。神经元死亡、小胶质细胞活化、炎性细胞因子的大量释放和血脑屏障的破坏构成了神经元损伤的恶性循环, 加重 JE 的进展<sup>[17]</sup>。阻断炎症损伤的恶性循环, 调控适度有效的免疫应答对于疾病的控制及治疗尤为重要<sup>[18]</sup>。神经元死亡、小胶质细胞活化、血脑屏障破坏、外周免疫细胞浸润和炎症因子在 JE 中作用如图 1 所示, 现详述如下。

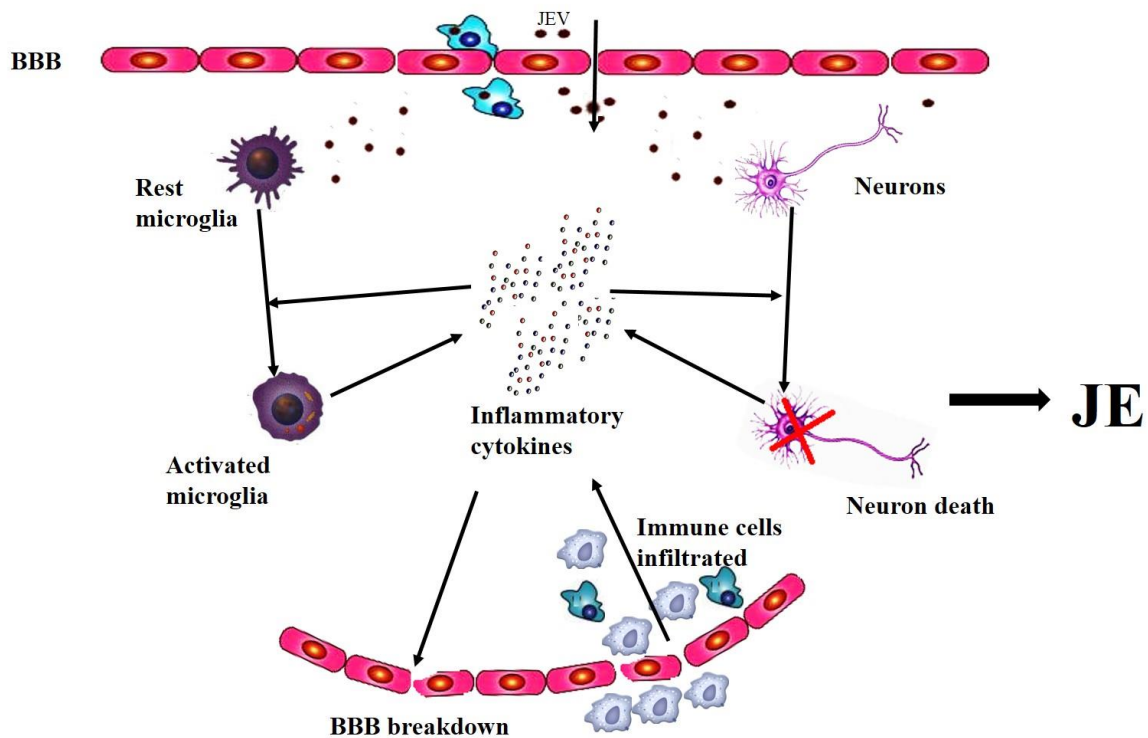


图-1 JEV 感染所致炎症损伤机制

Fig 1. The mechanism of JEV induced neuroinflammation.

### 1. 神经元的死亡

神经元对于炎症因子和毒性物质的刺激十分敏感，在损伤因素作用下神经元可发生死亡，包括凋亡、程序性坏死和自噬等<sup>[19]</sup>。JEV 感染过程中，神经元的大量损伤和死亡是导致 JE 发病和后遗症发生的主要原因<sup>[20]</sup>。病毒感染可直接诱导神经元的死亡。而病毒尚未感染的神经元也可在炎症因子的作用下发生死亡。JEV 可诱导小胶质细胞和星形细胞产生 IL-1 $\beta$ 、IL-18，而它们又参与胶质细胞活化和神经元的死亡<sup>[21]</sup>。活化的小胶质细胞也可释放诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）、环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, Cox-2)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、TNF- $\alpha$  等诱导神经元的死亡<sup>[22]</sup>。多种细胞死亡方式参与 JEV 感染过程中神经元的死亡，包括凋亡、自噬和坏死。JEV 既可通过内质网应激导致病毒感染细胞发生凋亡<sup>[23]</sup>。同时炎症因子如 TNF- $\alpha$  也可通过 TNFR-1/TRADD 通路诱导非病毒感染细胞发生凋亡<sup>[24]</sup>。细胞自噬也参与 JEV 感染诱导细胞死亡的发生。早期自噬作为一种宿主的防御机制，有利于抑制细胞内病毒的扩增，并参与病毒蛋白的降解<sup>[25]</sup>。然而也有实验报道自噬可能与病毒复制和细胞的死亡存在正相关<sup>[26]</sup>。已有研究报道，针对凋亡或自噬的干预可影响 JE 的发展，但并不能抑制疾病的进展，这提示

其他类型的细胞死亡方式参与神经元的死亡<sup>[24, 27]</sup>。

## 2. 小胶质细胞的大量活化

小胶质细胞(microglia)是定居于中枢神经系统的巨噬细胞,是脑组织中最重要免疫细胞<sup>[28]</sup>。在不同的环境条件下,小胶质细胞可呈现出不同的功能状态。如在 LPS+IFN- $\gamma$  刺激下,小胶质细胞可产生大量的氧化代谢物和炎症因子,介导细胞毒作用和炎症损伤,呈现经典活化的 M1 型小胶质细胞<sup>[29]</sup>;而在 IL-4 作用下,小胶质细胞又可产生大量免疫调节因子,如 IL-10 和 TGF- $\beta$  等,能抑制过度的炎症反应,促进组织再生修复,呈 M2 型活化<sup>[30]</sup>。调控小胶质细胞的活化状态,对于维持中枢神经系统功能具有重要意义<sup>[31]</sup>。小胶质细胞可通过 TLRs 和 RIG-I 识别 JEV 并发生活化<sup>[32]</sup>。同时,损伤的神经元释放的大量炎症因子和趋化因子如 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-6、CCL-2 等也可活化小胶质细胞<sup>[33]</sup>。活化的小胶质细胞可清除或杀伤 JEV,但过度激活的小胶质细胞会引起神经元的损伤加重疾病进展。这种损伤主要体现在,一方面活化的小胶质细胞可释放大量的促炎性细胞因子包括 IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等介导炎症损伤<sup>[33]</sup>;另一方面活化的小胶质细胞可释放大量具有神经元毒性的物质如谷氨酸盐等介导神经元的死亡<sup>[34]</sup>。

## 3. 血脑屏障的破坏

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)由脑微血管内皮细胞、细胞间紧密连接、基底膜及星形胶质细胞足突等构成<sup>[35]</sup>。BBB 是中枢神经系统的物理屏障,正常生理情况下 BBB 对大分子物质具有选择性通透作用,能阻止有害物质进入,从而维持 CNS 的稳定<sup>[36]</sup>。在病理情况时, BBB 紧密连接蛋白如 zonula occludens (ZO-1)、occludin 等表达下调,从而使 BBB 完整性破坏、渗透性增加,大分子物质及炎症细胞能够进入 CNS,引起脑组织的炎症损伤<sup>[37]</sup>。多种嗜神经性病毒感染均可引起 BBB 的破坏<sup>[38]</sup>。一方面,病毒可通过感染脑微血管内皮细胞破坏紧密连接蛋白导致血管内皮屏障的破坏<sup>[39]</sup>;另一方面,病毒感染神经细胞后可引起炎性细胞因子和趋化因子的大量产生如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-8、IL-1 $\beta$  等,间接导致 BBB 的破坏<sup>[40]</sup>。在 JEV 感染过程,病毒需要通过 BBB 进入 CNS。幼儿由于 BBB 尚未发育成熟,JEV 感染后更容易进入 CNS,故低龄儿童感染 JEV 后往往具有更高的发病率和更严重的临床症状。对于 BBB 已经发育成熟的患者,JEV 初次进入 CNS 的途径尚未完全明确。有研究报道 JEV 可通过脑微血管内皮细胞的胞饮和胞吞作用或直接感染脑微血管

内皮细胞进入 CNS<sup>[41]</sup>。同时，也有研究认为 JEV 可感染并储存于单核细胞并通过单核细胞穿越 BBB 潜入 CNS<sup>[41]</sup>。进入 CNS 的 JEV 可通过感染神经元或激活胶质细胞，引起脑内炎症反应。在炎症因子的作用下，内皮细胞损伤、紧密连接蛋白降解会加重 BBB 的破坏，进一步引起病毒颗粒的进入<sup>[40]</sup>。同时脑内大量产生的炎症因子和趋化因子可招募更多的炎症细胞进入 CNS，加重炎症损伤<sup>[42]</sup>。

#### 4. 外周免疫细胞的浸润

神经系统再生功能十分有限，并且对于炎症反应十分敏感。生理条件下，CNS 处于“免疫豁免”状态，这对于维持脑组织稳态具有重要意义<sup>[43]</sup>。嗜神经性尤其是神经毒性病原体感染时可穿过 BBB，引起脑组织炎症反应并伴有巨噬细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、NKT 细胞、树突状细胞等免疫细胞的浸润<sup>[44]</sup>。免疫细胞的浸润对于 CNS 的免疫防御具有重要意义，但大量炎症细胞的进入和促炎性细胞因子的产生又可破坏 BBB，引起更多病毒的侵入和神经元的炎症损伤。JE 发生过程中，在趋化因子和黏附分子参与下，单个核细胞可募集至 CNS 并在多种因素的调控作用下分化成巨噬细胞和树突状细胞。浸润的炎症细胞又可进一步分泌 CCL-2 等趋化因子招募更多炎症细胞浸润。浸润的免疫细胞能够加速病毒的清除，但是过度活化的单核细胞可分泌 TNF- $\alpha$ 、NO、金属蛋白酶（MMPs）等导致组织损伤和 BBB 的破坏<sup>[45]</sup>。有研究报道，浸润的单核细胞在多种复杂因素的作用下可呈现不同的亚型，包括 CD11b<sup>+</sup>ly-6C<sup>hi</sup> 和 CD11b<sup>+</sup>ly-6C<sup>lo</sup>，前者可进一步分化成经典的 M1 型巨噬细胞，加重炎症反应和组织损伤，而后者可向 M2 型巨噬细胞分化，有利于机体免疫防御功能的发挥和组织功能修复<sup>[43]</sup>。阻断炎症细胞的大量浸润以及调控浸润细胞的表型功能对于抑制中枢炎症损伤具有重要意义。

#### 5. 炎症因子

JEV 感染过程中，促炎因子和趋化因子的大量产生可引起脑组织炎症损伤，加重病情进展。JEV 刺激活化的小胶质细胞可产生 iNOS、环氧合酶 2（Cox-2）、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 等炎症因子<sup>[46]</sup>；活化的星形胶质细胞可产生活性氧（ROS）介导氧化应激损伤，同时还可分泌 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-8 等炎症因子<sup>[47]</sup>。浸润的炎症细胞如单个核细胞也可分泌大量的促炎性细胞因子和趋化因子加重炎症反应<sup>[48]</sup>。损伤死亡的神经元可释放大量的炎症因子和炎症介质进一步诱导胶质细胞的活化<sup>[44]</sup>。大量细胞因子和炎症介质的产生可引起 BBB 的破坏和神经元的死亡，

形成炎症因子风暴和免疫损伤的恶性循环。TNF- $\alpha$  的大量产生是 JE 的主要特征之一，TNF- $\alpha$  可通过 TNFR 启动神经元的死亡；TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  可进一步活化胶质细胞释放趋化因子如 CCL-2 招募炎症细胞的浸润<sup>[47]</sup>。JEV 感染诱导产生的 IFN- $\gamma$  可损伤血管内皮细胞的完整性介导 BBB 的破坏<sup>[49]</sup>。活化的胶质细胞可产生 IL-18, IL-1 $\beta$  并进一步诱导胶质细胞的活化和神经元的死亡<sup>[21, 50]</sup>。抑制炎症因子的大量产生，阻断炎症损伤的恶性循环是 JE 治疗的关键。

在 JE 的治疗方面，目前临床治疗只能以对症支持治疗为主，重症患者死亡率极高，幸存者常常留有持久性的神经精神后遗症，故特异的抗病毒药物及有效的免疫调控治疗十分迫切和必要。中和性抗体的制备以及基因工程抗体的研发有望在 JE 的治疗中发挥较好的治疗效果，但目前该研究仍在初级阶段，其治疗效果尤其是其 BBB 穿透能力和晚期治疗效果及对预后的改善有待进一步证实。针对 JEV 的抗病毒治疗药物，目前尚未取得重大突破。抑制过度的炎症反应是 JE 治疗的另一策略，如 TNF- $\alpha$  中和性抗体依那普利（Etanercept）、IFN- $\gamma$  的单克隆抗体、二甲胺四环素（Minocycline）等可在一定程度上抑制过度的炎症反应、缓解脑组织炎症损伤和疾病进展<sup>[11, 49, 51]</sup>。此外，JEV 感染可破坏脑组织海马区神经前体细胞和神经干细胞，导致神经系统修复障碍和神经系统后遗症的产生，促进神经系统修复减少后遗症的发生也是 JE 治疗的一个重点<sup>[52]</sup>。

## 二、程序性坏死（necroptosis）

以往认为坏死和凋亡是细胞死亡的两种主要方式。凋亡是一种有序的伴有凋亡小体生成的细胞降解过程，而坏死是被动的细胞死亡过程，是细胞膜不受调控的崩解碎裂和细胞内容物的大量释放。程序性坏死是近年发现的一种特殊的细胞坏死，是一种可调控的细胞死亡方式。程序性坏死的发生是由 RIPK1/ RIPK3/ MLKL 或 RIPK1 非依赖性 RIPK3/ MLKL 轴调控的<sup>[6]</sup>。多种刺激信号可使 RIPK1/ RIPK3 发生磷酸化，经典途径的程序性坏死是通过 TNF/ TNFR1 通路使 RIPK1 磷酸化形成 RIPK1/ RIPK3/ MLKL 程序性坏死小体（necrosome），最终导致 MLKL 磷酸化，介导细胞的死亡<sup>[53]</sup>。随着研究的不断深入，多种程序性坏死的激活信号不断被发现，如 FASL 与 FAS 结合，TRAIL 与 TRAILR 结合以及 polyI C、dsRNA、vRNA 等刺激 TLR3、TLR4 信号通路等均可使 RIPK1 磷酸化，形成程序性坏死小体<sup>[54]</sup>；另外，多种因素可通过 RIPK1 非依赖性途径激活程序性坏死。如通过 ZBP1（Z-DNA

binding protein 1 也叫 DNA-dependent activator of IFN regulatory factors DAI) 直接招募并使 RIPK3 发生磷酸化启动细胞程序性坏死<sup>[55]</sup>。磷酸化的 RIPK3 可募集 MLKL 并使之发生磷酸化。磷酸化的 MLKL (pMLKL) 是程序性坏死的执行分子, pMLKL 可迁移至细胞膜, 并通过招募  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  通道或在细胞膜上形成孔道使细胞发生崩解破裂死亡<sup>[56, 57]</sup>。

### 1. 程序性坏死与炎症

炎症、细胞应激、损伤、感染等均可诱导细胞死亡的发生, 在一定条件下细胞的死亡可激活并进一步加重炎症反应。一方面, 细胞的死亡可导致组织屏障的破坏和病原体或炎症细胞的侵入引起炎症反应。另一方面, 细胞死亡后细胞内容物如损伤相关分子模式分子 (DAMPs) 的释放可加重炎症损伤<sup>[6]</sup>。细胞凋亡过程中, 细胞发生有序的降解并形成凋亡小体, 不产生或仅产生少量的 DAMPs, 引起程度较轻的炎症反应。细胞发生程序性坏死的过程中, 细胞膜可发生崩解并伴有 DAMPs 的大量释放, 引起强烈的炎症反应<sup>[6]</sup>。程序性坏死参与多种疾病的发生发展<sup>[58]</sup>。在多种消化系统疾病如溃疡性结肠炎、Crohn's 病、酒精性肝病、非酒精性肝硬化等均伴有细胞程序性坏死的发生, 抑制细胞程序性坏死可缓解炎症损伤和疾病进展<sup>[59, 60]</sup>。在多种皮肤疾病中, 细胞程序性坏死可介导角质细胞和上皮细胞的死亡, 引起炎症损伤和皮肤黏膜屏障的破坏<sup>[61]</sup>。多种 CNS 疾病中, 脑组织细胞可发生程序性坏死, 并且崩解坏死的细胞可释放大量的 DAMPs 激活并加重炎症损伤, 引起更为严重的二次损伤<sup>[62]</sup>。譬如在脊髓侧索硬化发生过程中,  $\text{TNF-}\alpha$  可通过  $\text{TNFR}/\text{RIPK1}/\text{RIPK3}/\text{MLKL}$  激活程序性坏死引起轴突的退行性变<sup>[63, 64]</sup>。在创伤性脑损伤、脊髓损伤、脑缺血缺氧性损伤模型中均伴有细胞程序性坏死的发生, 阻断细胞程序性坏死可成为 CNS 疾病的潜在干预靶点<sup>[65-67]</sup>。

### 2. 程序性坏死与病毒感染

目前多项研究报道, 程序性坏死参与病毒感染与炎症的发生。在病毒感染过程中, 程序性坏死的主要作用及其对机体的影响主要集中在两个方面。一方面细胞死亡作为机体一种免疫防御机制, 病毒感染细胞的死亡可破坏病毒的增殖场所, 并可诱导炎症反应, 介导病原体的清除<sup>[68]</sup>; 另一发面, 细胞程序性坏死可引起 DAMPs 的大量释放, 导致组织的免疫损伤 (如图 2 所示)。尤其是对于再生功能较弱, 对炎症反应敏感的部位, 程序性坏死的发生可引起严重的组织损伤<sup>[69]</sup>。



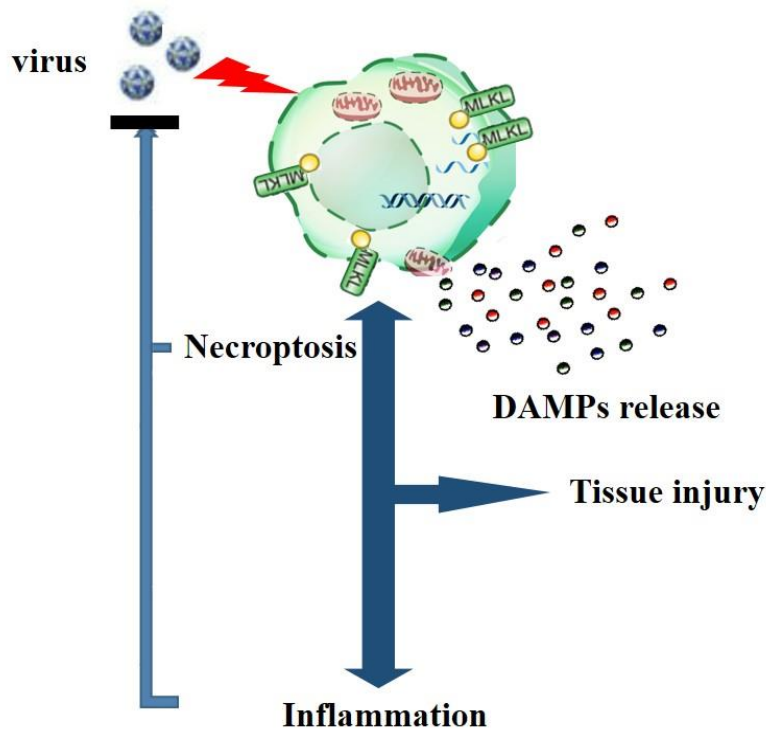


图 2. 程序性坏死在病毒感染中的作用

Fig 2. The roles of necroptosis in virus infection

在某些病毒感染过程中，细胞程序性坏死作为细胞的一种“自杀式”防御机制，可抑制病毒的增殖并控制感染。这方面的研究主要包括痘苗病毒（vaccinia virus, VV）、单纯疱疹病毒（herpes simple virus, HSV）、鼠巨细胞病毒（murine cytomegalovirus, MCMV）等<sup>[70, 71]</sup>。

### 2.1 痘苗病毒(VV)

VV 含有 SPI-2 (B13R)基因，其编码的 B13R 可结合并抑制细胞凋亡酶如 caspase8 等，从而抑制感染细胞发生凋亡<sup>[72]</sup>。VV 感染的细胞可通过 TNF 诱导的 RIPK1/ RIPK3/ MLKL 途径发生程序性坏死，清除病毒感染细胞<sup>[73]</sup>。RIPK3<sup>-/-</sup>小鼠感染 VV 后，细胞损伤减轻，机体病毒载量却显著升高。而在野生型小鼠中，细胞程序性坏死的发生可抑制病毒的扩增，但伴有严重的组织病理损伤。VV 主要感染机体上皮细胞，角化细胞并且能直接损伤细胞，但这类细胞具有较强的增殖和再生能力。因此，在 VV 感染后，机体细胞可通过程序性坏死清除病毒复制场所，而后上皮细胞可进行增殖并再生修复损伤的组织<sup>[74]</sup>。

### 2.2 鼠巨细胞病毒(MSMV)

MSMV 感染的细胞可通过 DAI(ZBP1)-RIPK3-MLKL 轴发生程序性坏死<sup>[75]</sup>。

MSMV 可通过编码凋亡酶抑制剂 vICA (viral inhibitor of caspase activation) 抑制 caspase 8 的活性和细胞凋亡, 同时, 还可编码 vIRA (viral inhibitor of RIP activation) 抑制 RIPK1 的活化<sup>[55, 76]</sup>。与野生型相比, DAI 或 RIPK3 敲除的细胞和小鼠发生 MSMV 感染时, 细胞坏死和病理损伤明显缓解, 但病毒增殖显著增加<sup>[77]</sup>。

### 2.3 单纯疱疹病毒 (HSV)

在小鼠模型中, RIPK1/RIPK3 可识别结合 HSV 蛋白 ICP6 的 RHIM (homotypic interaction motif) 结构域, 启动感染细胞发生程序性坏死, 从而清除病毒感染, 故野生小鼠感染 HSV 后无发病表现。而 RIPK3 敲除鼠感染 HSV 后可出现较高的病毒载量和病死率<sup>[78]</sup>。由此可见, 在 HSV 感染过程中, 程序性坏死是小鼠的一种免疫防御机制。人体细胞因不能识别 HSV ICP6 蛋白, 不能启动程序性坏死, 故 HSV 感染人体后可引起病毒持续性感染<sup>[79]</sup>。

然而在重要组织部位的病毒感染如脑组织、肺组织等, 细胞程序性坏死可引起更为严重的炎症反应和继发性组织损伤<sup>[6]</sup>。目前报道的病毒感染有: 嗜神经性病毒感染和高致病性流感病毒感染。

### 2.4 流感病毒 (IAV)

IAV 感染引起支气管肺泡上皮细胞的裂解死亡, 肺泡内皮屏障的破坏和通透性增加, 引起急性肺损伤。宿主蛋白 DAI 可识别流感 IAV 蛋白 NP 和 PBI 并募集 RIPK3 启动细胞死亡。病毒感染细胞的死亡可使 IAV 失去增殖场所, 使得未装配成熟的病毒失去活性从而抑制病毒增殖<sup>[80]</sup>。然而细胞程序性坏死本身可破坏肺泡上皮的完整性, 同时坏死细胞可释放大量 DAMPs 加重组织炎症损伤, 破坏肺功能。在 IAV 感染过程中, DAI 敲除小鼠组织损伤较野生小鼠明显缓解, 并且具有较高的存活率<sup>[80]</sup>。

### 2.5 人冠状病毒 OC43 (HCoV-OC43)

HCoV-OC43 感染可侵袭中枢神经系统, 并具有一定的神经元嗜性和神经毒性。HCoV-OC43 感染可诱导神经细胞的死亡, 参与脑组织病理损伤。HCoV-OC43 感染神经元可诱导 RIPK1、RIPK3 的表达, 启动程序性坏死。研究发现, 与野生型 HCoV-OC43 相比, 含有两个 s 糖蛋白位点突变的病毒 (Roc/Us183-241) 感染细胞后可诱导细胞产生更高水平的 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 表达, 即能引起更为严重的程序性坏死。二者分别感染小鼠模型后, 突变病毒具有更高的神经侵袭性, 引起更严重的脑组织炎症损伤和更高的死亡率<sup>[81]</sup>。可以看出, 在 HCoV-OC43 感染 CNS

的过程中，程序性坏死在一定程度上能抑制病毒的增殖，然而发生程序性坏死的细胞可释放大量的 DAMPs 和促炎性因子，进而加重脑组织炎症反应和神经退行性病变，导致更为严重的神经功能障碍<sup>[81]</sup>。

### 三、 间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSC）

间充质干细胞是一类异质性细胞，最早于 1974 年由 Friedenstein 首次在兔骨髓中分离鉴定。随后脐带，脂肪等多种组织中均被证实含有 MSC。MSC 属成体干细胞，能够在体外贴壁生长，并具有自我复制能力和多向分化潜能<sup>[82]</sup>。MSC 可在一定条件下分化为骨细胞、软骨细胞、肝细胞样细胞、神经样细胞等，具有细胞替代治疗的作用<sup>[83]</sup>。MSC 具有一定的定向迁移功能，能定向迁移至炎症损伤区。MSC 具有分泌及调节免疫应答等生物学特性，可改善损伤微环境，促进组织的修复和再生，在多种疾病模型尤其是 CNS 疾病中具有治疗作用<sup>[84]</sup>。如图 2 所示，MSC 在 CNS 疾病的治疗中发挥多重功能作用。现就 MSC 生物学功能及在 CNS 疾病中的应用详述如下。

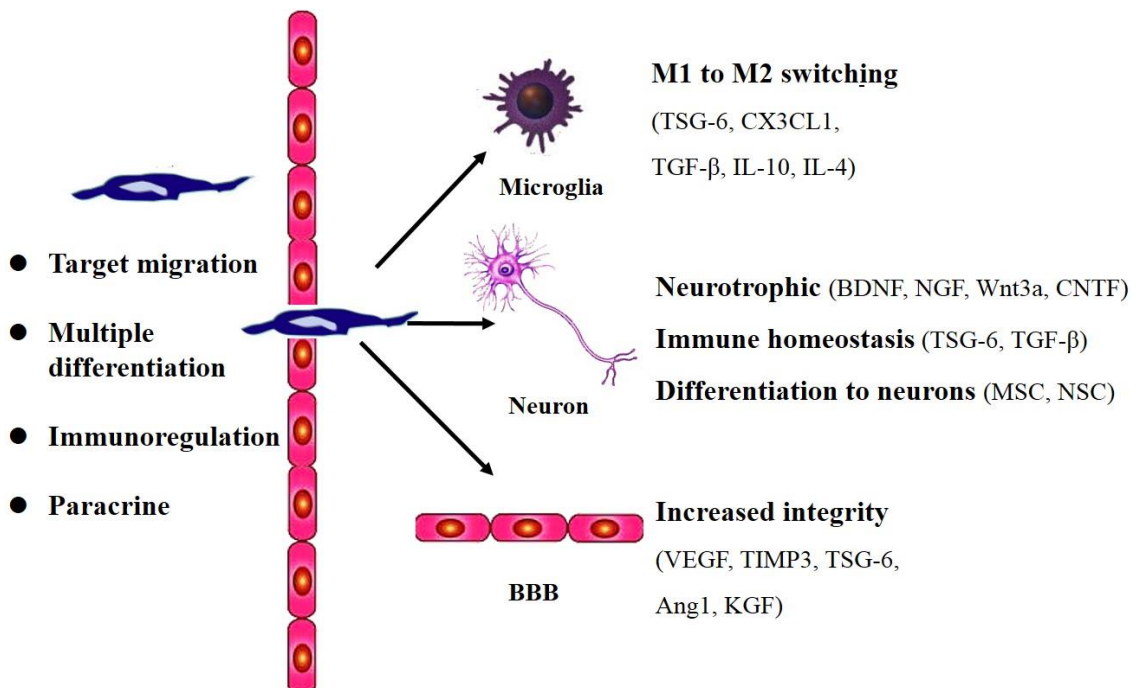


图 3. MSC 在 CNS 疾病中的治疗作用

Fig 3. The function of MSC in the treatment of CNS diseases

#### 1. MSC 的生物学特性

##### 1.1 MSC 的多向分化潜能

间充质干细胞在一定的诱导环境下可定向分化成靶细胞具有替代治疗的作用。

MSC 可在体内外特定诱导环境下分化成骨细胞、软骨细胞,在多种骨缺陷性疾病中具有治疗潜能,是骨组织工程研究的种子细胞<sup>[85]</sup>。MSC 可在肝脏研磨液或特定细胞因子等不同因素作用下分化成肝细胞样细胞;在肝衰竭等肝病模型中,部分尾静脉移植的 MSC 也可分化为肝细胞样细胞<sup>[86]</sup>。一些研究报道指出 MSC 还可诱导分化为内皮样细胞、心肌样细胞和神经样细胞等<sup>[87]</sup>。

### 1.2 MSC 的定向迁移特性

MSC 表面表达一定水平的趋化因子受体,具有较强归巢能力。MSC 可穿过 BBB 进入 CNS 炎症部位<sup>[88]</sup>。同时, MSC 可靶向肿瘤部位。已有实验报道过表达促凋亡基因或生长抑制基因的 MSC 能迁移至肿瘤部位,抑制肿瘤生长<sup>[89, 90]</sup>。这提示其强大的迁移功能在药物靶向输送中具有重要的应用价值。

### 1.3 MSC 的免疫调节特性

MSC 与组织微环境相互作用,并通过识别内环境免疫状态,发挥不同的免疫调控功能。MSC 的免疫调控功能呈现出高度可塑性<sup>[91]</sup>。在不同状态下, MSC 可呈现出促炎(MSC1)或抗炎表型(MSC2),并且能通过调节固有免疫和适应性免疫,实现免疫稳态<sup>[92, 93]</sup>。MSC 能抑制过度的免疫反应,减轻炎症损伤。譬如在移植排斥反应、自身免疫性疾病和创伤性脑损伤疾病等模型中, MSC 可分泌 IL-10、TGF- $\beta$ 、TSG6、前列腺素 E2 (prostaglandin E2) 等细胞因子参与免疫调节<sup>[91]</sup>。MSC 可通过调控巨噬细胞/小胶质细胞的活化及极化状态、NK 细胞的活化状态、树突状细胞的活化状态参与调节固有免疫应答<sup>[94-96]</sup>;同时 MSC 可通过调控 T 细胞向效应性 T 细胞和调节性 T 细胞的分化,以及 B 细胞的活化增殖和浆细胞分化参与适应性免疫应答<sup>[97, 98]</sup>。MSC 可通过旁分泌方式,分泌多种免疫调控因子抑制组织炎症损伤<sup>[99]</sup>。在创伤性脑损伤、脑出血等动物模型中, MSC 可在 TNF- $\alpha$  诱导下产生 TSG-6,而 TSG-6 可抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化,降低炎症因子的产生。同时 TSG-6 可调控小胶质细胞的活化状态,重塑小胶质细胞向 M2 极化<sup>[95]</sup>。MSC 能合成释放 CX3CL1 并通过 CX3CL1/CX3CR1 抑制小胶质细胞 iNOS、TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达,促进小胶质细胞 M2 极化<sup>[100]</sup>。在脑缺血损伤模型中,移植的 MSC 可通过分泌 TGF- $\beta$  抑制中枢神经系统 MCP-1 的产生和炎症细胞的浸润,另外 IL-10、IL-4 等抗炎性细胞因子也参与调控炎症反应<sup>[101]</sup>。MSC 也可增强机体免疫防御功能,清除入侵的病原体。机体免疫功能低下时, MSC 可呈 MSC1 型,并促进免疫细胞活化,增强机体的免

疫功能。同时, MSC 也可通过发挥固有免疫的作用, 参与抵御病原体入侵。如 MSC 可分泌抗菌肽 (antimicrobial peptide LL-37)、防御素 (beta-defensin-2) 清除细菌感染; 同时在病毒感染过程中, MSC 可分泌 I 型干扰素发挥抗病毒作用<sup>[102-104]</sup>。

#### 1.4 MSC 的分泌功能

MSC 通过分泌多种细胞因子, 参与免疫调控。同时 MSC 可分泌多种营养因子和生长因子改善局部损伤微环境, 促进内源性前体细胞的分化。在肝脏疾病模型中, MSC 能分泌肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、Delta-like ligand 4 (DLL4) 等促进肝细胞或肝前体细胞的再生, 促进肝组织修复<sup>[105]</sup>; 在神经系统疾病中, MSC 可分泌脑源性生长因子 (BDNF)、神经生长因子 (NGF)、Wnt3a、睫状节神经营养因子 (CNTF) 等, 促进损伤脑组织的修复; MSC 还可通过与血管内皮细胞相互作用并分泌多种血管内皮生长因子促进微血管再生, 对于维持内皮屏障的稳定性具有重要作用, 如 MSC 分泌基质金属酶抑制剂 (TIMP3)、TSG-6 等以维持血脑屏障的完整性<sup>[7]</sup>; 分泌血管生成素 1 (angiopoietin-1)、角化细胞生长因子 (KGF) 等提高肺泡内皮细胞功能, 减轻肺损伤<sup>[106]</sup>。MSC 可分泌抗菌肽 LL-37、 $\beta$ 2-防御素等发挥抗细菌作用。此外, 最近研究发现 MSC 还可分泌细胞外微泡 (extracellular vesicles, EVs) 如外泌体和微囊泡 (microvesicles, MV)。MSC 来源的 EVs 内富含细胞因子、生长因子、信号肽、mRNAs 和 miRNAs 等, 在多种 CNS 疾病、自身免疫性疾病、感染性疾病中具有一定的治疗作用<sup>[101]</sup>。

### 2. MSC 在 CNS 疾病中的治疗作用

MSC 可通过 BBB 进入 CNS, 在 CNS 疾病的治疗中已经显示出了巨大潜力。

#### 2.1 MSC 治疗脑卒中

脑卒中是严重威胁人类生命健康的主要心脑血管疾病之一, 具有极高的致死率和致残率。脑组织的缺血性或出血性损伤及继发性炎症损伤是其主要致病机制。局灶性脑梗死产生的 DAMPs 可激活局部免疫细胞产生炎症介质, 导致炎性细胞的浸润和适应性免疫应答的激活。局灶部位适度活化的免疫反应可促进组织的修复和再生, 但失控的免疫反应可介导神经毒性及胶质瘢痕的生成阻碍, 从而影响后期神经组织的再生和可塑性。同时, 脑卒中发生后, 下丘脑-垂体-肾上腺轴的抑制可导致全身处于免疫抑制状态, 可引起继发性感染。急早期溶栓治疗 (小于 4.5 h) 是目前主要的脑卒中治疗手段, 但后期神经组织的修复对于患者生活质量的提高十分重

要。目前, MSC 移植在多种脑卒中的动物模型研究中显示出较好的治疗效果<sup>[107]</sup>。MSC 可通过动脉、静脉、脑室和蛛网膜下等多种途径进行移植, 其中血管途径移植的 MSC 可通过归巢作用进入损伤区并弥散分布, 具有较高的安全性。MRI 技术及免疫荧光示踪技术显示 MSC 经静脉移植 48h 后可进入脑组织损伤区。在脑卒中发生后不同时期进行细胞移植可能具有不同的治疗机制。早期移植, MSC 可抑制过度的免疫反应, 降低炎症毒性作用, 有利于发挥神经保护作用。而在后期, MSC 移植则在神经组织的修复过程中发挥主要作用。在脑卒中急性期, 胶质细胞的活化及损伤区募集可参与胶质瘢痕的形成阻碍轴突的再生修复。MSC 可通过调控星形细胞、小胶质细胞和树突状细胞改善组织可塑性从而促进轴突的再生。此外, MSC 还可分泌多种生长因子和营养因子促进血管再生修复。体外及在体实验均证实 MSC 可分化为神经样细胞具有一定的细胞替代功能<sup>[108]</sup>。Doepfner 等报道 MSC 还可通过旁分泌作用促进内源性神经干细胞的分化, 促进损伤组织的修复, 改善后遗症<sup>[109]</sup>。

## 2.2 MSC 治疗多发性硬化 (MS)

MS 是 CNS 发生的慢性退行性病变, 属于自身免疫性疾病。MS 以神经元脱髓鞘病变及不同程度的轴突损伤为特点, 可出现不同程度的肢体功能障碍和神经系统缺陷, 肢体僵硬或瘫痪。目前, MS 的发病机制尚未完全明确, 其中自身免疫性 T 细胞的异常活化在神经元轴突多发性髓鞘损伤中起着重要作用<sup>[110]</sup>。最近, MSC 在 MS 中的治疗作用在基础和临床研究中都取得一定进展。在 MS 动物模型中, MSC 移植可降低促炎性细胞因子如 IFN- $\gamma$ 、IL-17、TNF- $\alpha$  等表达, 同时能提高调节性 T 细胞(Treg)的数量和功能, 促进 Th2 型细胞因子的产生, 降低 Th1 型和 Th17 型细胞因子水平。MSC 也可分泌 IL-10、PEG2、TGF- $\beta$  等抑炎性细胞因子从而改善损伤区的炎症微环境。此外, MSC 移植可激活少突胶质细胞的前体细胞增加少突胶质细胞的数量, 提高髓鞘再生能力; 可调控星形胶质细胞的活化减少胶质瘢痕的生成<sup>[111]</sup>。MSC 还可分泌抗氧化分子如超氧歧化酶等减少神经元的氧化损伤, 也可通过分泌多种神经营养因子和生长因子促进脑组织的再生修复<sup>[112]</sup>。

## 2.3 MSC 治疗外伤性脑损伤

CNS 具有极其重要的生理功能和十分有限的再生能力, 因此创伤性脑损伤常常会引起严重的症状和后遗症。脑外伤后可导致脑组织的直接损伤包括神经细胞和神经纤维的损伤, 以及 BBB 的破坏。随后, 脑组织可发生继发性损伤, 包括细胞毒

性、氧化应激、脑水肿和炎症反应。在这个过程中，早期损伤的脑细胞可释放 DAMPs 及氧化应激产物，募集炎细胞浸润，促进小胶质细胞活化和炎症因子的释放，引起局部炎症反应，加重损伤范围并可累及周围未受损的神经细胞，形成脑组织损伤的级联放大效应。同时，星形细胞可活化增生，形成胶质瘢痕。胶质瘢痕区域是恢复期神经组织再生修复的障碍，也可引起一系列神经后遗症。最近在动物模型中，MSC 移植可促进脑组织再生和神经系统功能恢复<sup>[113]</sup>。MSC 移植可抑制继发性炎症反应，降低氧化应激反应，改善局部微环境从而抑制神经元死亡，减轻创伤后继发性脑组织损伤。移植的 MSC 通过合成并分泌 VEGF、TIM3 等促进微血管再生，提高血脑屏障完整性<sup>[114]</sup>。同时，MSC 可分泌多种细胞因子促进神经组织的自我修复，可激活内源性神经前体细胞分化成神经细胞。MSC 本身也可分化成神经样细胞，从而有利于神经系统的再生修复。移植的 MSC 可调控星形胶质细胞的活化，减少胶质瘢痕的形成<sup>[101]</sup>。

#### 四、 Gas6 (growth arrest specific gene 6) 蛋白

Gas6 蛋白是血浆中依赖维生素 K 蛋白家族的一个成员，是细胞膜上受体酪氨酸激酶 (RTK3) 家族成员 TAM 的配体，广泛表达于多种器官和细胞。Gas6 蛋白通过与 TAM 受体结合发挥作用。TAM 受体主要包括 Tyro3、Axl、MerTK 三种。Tyro3 主要在胚胎期高表达，Axl 和 MerTK 广泛表达于成年期的神经元、小胶质细胞、少突胶质细胞、内皮细胞及血管平滑肌细胞<sup>[115]</sup>。Gas6 蛋白可参与细胞的吞噬、信号转导、增殖及凋亡等生物学过程，而且在机体炎症反应、内环境稳态维持等过程中具有重要作用<sup>[116]</sup>。

Gas6/ TAM 信号通路在 CNS 的病理生理过程中发挥着重要作用，主要体现在以下几个方面（如图 4 所示）。

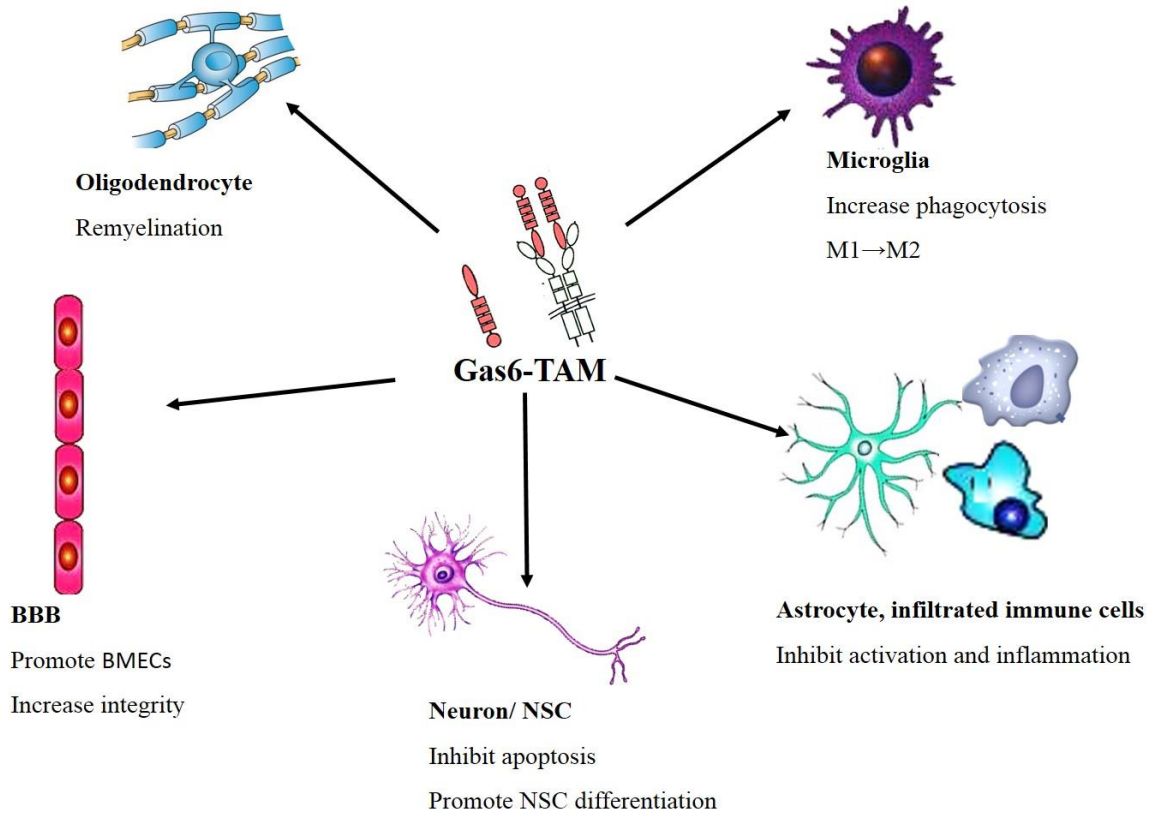


图 4. Gas6 蛋白在中枢神经系统中的生物学功能特性

Fig 4. The function of Gas6 protein in CNS

1. **促进髓鞘形成** Gas6 蛋白可促进少突胶质细胞的存活，促进髓鞘形成；调控小胶质细胞的活化状态(呈 M2 极化状态)，增强小胶质细胞和巨噬细胞的吞噬功能，促进髓鞘碎片的清除和组织修复<sup>[117]</sup>。

2. **维持 BBB 完整性** TAM 受体尤其是 Tyro3 和 Axl 广泛表达于微血管内皮细胞和血管平滑肌细胞。Gas6/TAM 信号通路的受损可降低微血管完整性及内皮细胞间黏附，导致 BBB 的完整性破坏<sup>[118]</sup>。

3. **抑制炎症反应** 三种 TAM 受体均广泛表达于小胶质细胞和星形胶质细胞，生理状态下，TAM 受体活化可增强小胶质细胞的吞噬功能，清除凋亡或衰老的神经细胞，维持内环境的动态平衡<sup>[119]</sup>。病理条件下，Gas6/TAM 通路可负性调控其活化，抑制促炎性细胞因子的产生。同时 Gas6/TAM 还可通过调控树突状细胞等抗原提呈细胞的功能及活化状态参与调控外周免疫应答<sup>[120]</sup>。

4. **促进神经细胞再生** 神经干细胞广泛表达 TAM 家族的三种受体，Gas6 蛋白通过与 TAM 结合发挥内源性营养支持功能促进神经干细胞的存活、增殖和分化<sup>[121]</sup>。对于海马区神经干细胞的再生和分化有着重要的作用。



Gas6/ TAM 信号通路的异常导致 CNS 疾病的发生发展。在 MS 发生过程中, Gas6/ TAM 信号受损使得髓鞘生成障碍, 可导致脱髓鞘病变<sup>[122]</sup>。在西尼罗病毒( West Nile Virus, WNV) 感染过程中, Jonathan 等发现 Gas6/TAM 信号的阻断, 可使得病毒更早地出现在 CNS, 造成脑内更高的病毒载量和更高的致死率。外源性 Gas6 蛋白的补充可发挥治疗作用<sup>[118]</sup>。在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型中, 持续性脑内注射重组 Gas6 蛋白可降低炎症因子水平, 缓解过度的炎症损伤, 同时还可以促进少突胶质细胞前体细胞的成熟和髓鞘的再生, 维持轴突的完整性和功能的发挥, 具有很好的治疗效果<sup>[123]</sup>。

# 正文

## 第一部分 MLKL 介导的程序性坏死在 JE 中的作用

程序性坏死是一种特殊的细胞坏死方式。以往认为，细胞坏死是不受调控的被动性的细胞死亡。而程序性坏死是受 RIPK1/ RIPK3/ MLKL 轴以及非经典途径的 RIPK3/ MLKL 轴调控的有序的细胞死亡过程。同时，与凋亡不同，程序性坏死是细胞膜的崩解和细胞内容物的释放，伴有大量 DAMPs 释放，常常会引起严重的炎症反应。TNF- $\alpha$  是程序性坏死最常见的诱导因子之一，而同时 TNF- $\alpha$  也是 JEV 感染过程中最主要的炎症因子之一。而且 JEV 感染往往会引起脑组织细胞的大量坏死，因此程序性坏死在 JE 中的作用值得探讨。在本部分试验，我们通过一系列在体实验及体外实验证实 JE 病程中程序性坏死的发生及其与病毒感染的关系；同时采用 MLKL 基因敲除鼠构建 JEV 感染模型，证实阻断程序性坏死可减轻早期炎症反应，缓解病情进展。本实验为进一步明确 JEV 致病机制奠定基础。

### 1. 材料

#### 1.1 实验动物及细胞

- A. MLKL<sup>+/-</sup> C57BL/6 小鼠由厦门大学韩家淮教授惠赠。
- B. 野生型 C57BL/6 小鼠（4-6 周）购自第四军医大学实验动物中心。
- C. C6/36 细胞系，由第四军医大学微生物教研室保存。
- D. BHK 细胞系，由第四军医大学微生物教研室保存。
- E. 神经母细胞瘤细胞系 Neuro2a 购自 ADCC。

#### 1.2 试剂

##### 1.2.1 商品化试剂

- A. 培养基：RPMI-1640，高糖 DMEM，DMEM 粉购自 Gibco 公司。

B. 血清：新生牛血清购自四季青公司，胎牛血清购自 Gibco 公司。

C. 抗体：所用抗体（见表 1-1）。

表 1-1 所用抗体

Table. 1-1 antibodies used in this experiment

Antibodies	Hosts	Dilutions	Sources
Anti-MLKL	Rat	IHC 1:800 WB 1:500	Millipore, Billerica, MA, USA
Anti-NeuN	Rabbit	IHC 1:900	Abcam England
Anti-JEV	Mouse	IHC 1:100	China
Anti- $\beta$ -actin	Mouse	WB 1:1000	Proteintech China
Anti-pMLKL	Rabbit	WB 1:800	Abcam England
FITC-anti-mouse IgG	Rabbit	IHC 1:200	Proteintech China
Cy3-anti-rabbit IgG	Donkey	IHC 1:200	Proteintech China
Cy3-anti-mouse IgG	Goat	IHC 1:200	Proteintech China
FITC-anti-rat IgG	Donkey	IHC 1:200	Proteintech China
DyLight 680-anti-rabbit IgG	Goat	WB 1:10000	BD USA New Jersey
DyLight 680-anti-rat IgG	Goat	WB 1:10000	BD USA New Jersey
DyLight 800-anti-mouse IgG	Goat	WB 1:10000	BD USA New Jersey

D. 碘化丙啶（Propidium Iodide, PI），DAPI 购自 Sigma 公司。

E. ELISA 试剂盒（IL-1 $\beta$ ，CCL-2，IFN- $\gamma$  和 TNF-a）购自 AMEKO 公司。

F. 4%多聚甲醛，戊二醛，丙三醇（甘油），甲醇，牛血清白蛋白(BSA)，蔗糖，甲基纤维素，戊巴比妥钠等购自上海生工。

G. ExTaq 酶，DNA marker，核酸染料，反转录酶 PrimeScript RT reagent Kit，荧光定量 PCR 酶 SYBRGreen Real-Time PCR Master Mix 购自 Takara 公司。

H. BCA 蛋白定量试剂盒，蛋白 Marker 购自 Thermo 公司。

I. Western 配胶试剂盒, RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 试剂盒购自碧云天公司。

J. 青霉素链霉素溶液 (双抗) 购自 Gibco 公司。

K. RNA 快速提取试剂盒 购自中国先锋公司。

### 1.2.2 实验室配制试剂

A. PBS 试剂: 一般先按 1L 10×PBS 配制, 包括 NaCl 80 g, KCl 2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.7 g, pH=7.4, 定容 1 L, 室温保存。在使用时去离子水稀释至 1×PBS, 细胞用 PBS 缓冲液高压灭菌后-4℃保存。

#### B. Western-blot 相关试剂

a) 5×SDS-PAGE 电泳缓冲液: Tris 15.1 g, Glycine 94.0 g, SDS 5.0 g 去离子水溶解并定容至 1 L。在使用时去离子水稀释至 1×。

b) 膜转移缓冲液: Glycine 2.9g, Tris 5.8g, SDS 0.37g。去离子水溶解并定容 800 ml, 使用前加入 200 ml 甲醇溶液。

c) 封闭液: 100 ml 1×PBS 中加入 3 g BSA。

#### C. 免疫荧光相关试剂

a) 透膜液: 冰甲醇

b) 封闭液: 0.75 g BSA, 75 μl Triton X-100, 23.75 ml 1×PBS, 定容至 25 ml。

c) 一抗稀释液: 9.99 ml 1×PBS, 10 μl Triton X-100, 0.1 g BSA, 定容至 10 ml。

d) 封片剂: 50% 甘油, 50% PBS 室温保存。

#### D. 核酸电泳相关试剂

a) TAE 溶液: 一般先配制 50×TAE 母液, 包括 Tris 242 g、Na<sub>2</sub>EDTA•2H<sub>2</sub>O 37.2 g、醋酸 57.1 ml, 定容至 1L, 室温保存。在使用时用去离子水稀释至 1×为工作液。

b) 1.2% 琼脂糖凝胶: 琼脂糖粉剂 3.6 g, 1×TAE 溶液 300 ml, 混匀后微波炉加热溶解后, 按比例加入核酸染料后混匀, 室温保存。

#### E. 组织 DNA 快速提取液

a) 提取液 A: NaOH 25 mM, EDTA 0.2 mM ddH<sub>2</sub>O 溶解。

b) 提取液 B: Tris-HCl 40 mM, pH=5.5 ddH<sub>2</sub>O 溶解。

#### F. 甲基纤维素覆盖物 (100 ml)

- a)4%甲基纤维素，50 ml： 2 g 甲基纤维素加入 50 ml 去离子水后高压灭菌。
- b)4×DMEM，25 ml： 按 DMEM 粉剂说明书配制，超净台内 0.22 μm 滤器过滤除菌后储存于 4℃。
- c)无菌去离子水 23 ml，胎牛血清 2 ml。

在超净台内使用前将上述液体混匀，调整 pH 值为 7.0 左右。

**G.** 结晶紫染液：母液 20 ml，0.85% NaCl 75 ml，40% 甲醛溶液 5 ml，定容至 100 ml。

**H.** 10 mg/ml PI： 100 mg PI 溶于 10 ml 0.9% NaCl，0.22 μm 滤器过滤后分装于无菌 EP 管，4℃ 保存备用。

### 1.3 实验耗材

T75 培养瓶、6 孔板、24 孔板购自 Corning 公司。载玻片、盖玻片、封口膜、PVDF 膜、细胞刮刀等耗材购自上海生工。0.22 μm 滤器购自 Millipore 公司。

### 1.4 实验器材设备

孵箱：Thermo 公司；蛋白质电泳仪：BioRad 公司；全波长微量酶标仪：BioTek 公司；离心机：Beckman 公司；荧光显微镜：OLYMPUS 公司；冰冻切片机，石蜡切片机：第四军医大学病理学教研室提供；电镜及相关设备：第四军医大学神经生物学教研室提供；激光共聚焦显微镜：第四军医大学解剖学教研室提供。

### 1.5 引物

本实验涉及的引物由上海生工合成。序列见表 1-2：

表 1-2 引物序列

Table 1-2 Primer sequences

JEV	F: AGACAAGCAGATCAACCACCATT	R: CCCTCCAATAGAGCCAAAGTCC
TNF-α	F: CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT	R: ACG TGG GCT ACA GGC TTG TCA
IFN-γ	F: GGCCATCAGCAACATAAGCGT	R: TGGGTTGTTGACCTCAAACCTTGGC
CCL-2	F: CAA GAA GGA ATG GGT CCA GA	R: GCT GAA GAC CTT AGG GCA GA
β-Actin	F: TGACGGGGTCACCCACACTG	R: AAGCTGTAGCCGCGCTCGGT
IL-1β	F: TCCAAGAAAGGACGAACATTCG	R: TGAGGACATCTCCCACGTCAA.
MLKL	F: GGATTGCCCTGAGTTGTTGC	R: AACCGCAGACAGTCTCTCCA

## 2. 方法

### 2.1 JEV 制备及小鼠 JE 模型构建

#### 2.1.1 JEV 扩增浓缩及滴度测定

- 1) **C6/36 细胞系复苏, 培养及传代:** 液氮罐取出细胞后置于 39℃ 水浴锅迅速融化, 用预热 RPMI 1640 洗涤 1 次后加入完全培养基 (含 10% 新生牛血清、1% 双抗的 RPMI 1640 培养基)。培养瓶采用封口膜密封, 置于 28℃ CO<sub>2</sub> 孵箱培养。细胞铺满瓶底约 90~100% 后, 用细胞刮刀刮落细胞进行传代。
- 2) **病毒感染扩增:** T75 培养瓶内 C6/36 细胞密度达 75-80% 时, 按 MOI=0.1 加入 3-4ml JEV 病毒液进行感染。最初 2 小时为吸附过程(37℃ 细胞培养箱), 每 15 min 轻轻摇动培养瓶使病毒充分接触细胞, 吸附之后加入约 10ml 2% 新生牛血清+1% 双抗 RPMI 1640 培养基后置于 CO<sub>2</sub> 孵箱并继续培养, 24h 后弃去旧培养基及病毒液, 再加入新鲜的含 2% 新生牛血清+1% 双抗的 RPMI 1640, 约 5-7 天后可见明显细胞病变: 细胞变圆、部分细胞融合呈条索状并连接成片。收集病毒上清, 离心 (9000 g, 30 min, 4℃) 后去除细胞碎片制备病毒悬液。
- 3) **病毒浓缩:** 将上述制备的病毒悬液超高速离心 (4℃, 150000g, 4 h) 后, 可见离心管底部少许白色沉淀。弃净上清后, 按原始病毒液的 1/100 加入 PBS 重悬病毒沉淀。充分重悬混匀后经 0.22 μm 滤器过滤除菌。分装后冻于 -80℃ 备用。
- 4) **空斑形成实验滴定病毒:** 常规方法培养 BHK 细胞, 培养基为 10% FBS+1% 双抗 DMEM。胰酶消化细胞后按 2×10<sup>5</sup> 每孔接种于 6 孔板。培养过夜后。将待测病毒液用无血清 DMEM 液以 10 倍进行倍比稀释, 分别制备 10<sup>-1</sup>-10<sup>-8</sup> 稀释倍数的病毒液。弃去 6 孔板中培养基, 用 PBS 洗涤 2 遍后, 将 10<sup>-4</sup>-10<sup>-8</sup> 倍稀释的病毒液 0.5 ml 分别加入上述 6 孔板中, 每个稀释度 2 个复孔并标记。置于 37℃ 孵箱吸附 1 h 后, 吸弃病毒液并用 PBS 轻柔洗涤 2 遍后, 加入 4 ml 4% 甲基纤维素上层覆盖物。之后在 37℃ 孵箱继续培养, 5-7 天后, 吸弃上层覆盖物, 用 PBS 轻柔洗涤直至上层覆盖物残渣洗涤干净, 加入约 1 ml 结晶紫染液, 室温 15 min 后自来水轻柔冲洗直至流出的液体变透明。选取空斑数约为 50 个左右的板子进行空斑数目计数, 并利用如下方法计算病毒滴度。PFU/ml=稀释倍数×(孔 1+孔 2)/2/0.5 ml。

## 2.1.2 小鼠 JE 模型构建及鉴定

### 1) MLKL 基因敲除鼠繁殖及鉴定

MLKL<sup>+/-</sup> C57BL/6 小鼠饲养于第四军医大学实验动物中心。繁殖后代剪取趾尖组织进行标记。

a) 组织 DNA 提取：剪取趾尖并置于 1.5 ml EP 管并做好标记。加入 200  $\mu$ l DNA 提取 A 液 98 $^{\circ}$ C 热浴 1 h，取出后加入 B 液 200  $\mu$ l 并充分混匀，10000 g 离心 3 min，上清里即含有组织基因组。

b) PCR 扩增 MLKL 基因片段并进行核酸电泳鉴定：鉴定用引物分别为 F, 5'-AGCCC AAAGAGGCAGCACAAATC-3'; R, 5'-AAACTTCCAAATATGGGACTTCTTG -3'。PCR 反应体系 25  $\mu$ l: 2 $\times$ taq 酶 12.5  $\mu$ l; 上下游引物各 1  $\mu$ l; 待测样品 2  $\mu$ l; ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ l。反应条件：95 $^{\circ}$ C 5 min; (95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s)  $\times$ 32 循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min; 12 $^{\circ}$ C hold。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖胶核酸电泳鉴定。若扩增产物只有约 500 pb 位置处的条带则为野生型，仅在 450 bp 位置处有条带则代表 MLKL 基因敲除小鼠，出现两条不同位置的条带则为杂合子。

### 2) JEV 感染小鼠模型构建

腹腔注射途径感染小鼠：5 $\times$ 10<sup>7</sup> PFU/200 $\mu$ l JEV，对照组 200  $\mu$ l PBS。注射当天记为 d<sub>0</sub>。

脑内注射途径感染小鼠：2% 戊巴比妥钠麻醉小鼠（5  $\mu$ l/g 体重）后，采用立体定位仪固定并使用微量注射仪行右侧脑皮质下 2 mm 处进行注射，注射量 2  $\mu$ l，50 PFU。对照组注射 2  $\mu$ l PBS。

## 2.2 活体 PI 染色

在小鼠感染 JEV 后第 5 天（5 dpi），按 20 mg/kg 体重腹腔注射 PI 溶液。1 h 后麻醉，先用 50 ml PBS 进行心脏灌注，再用 25 ml 4% 多聚甲醛（PFA）固定，之后用眼科剪、镊子完整剥离脑组织。脑组织取出后避光，置于 4% PFA 固定 4 h，用 30% 蔗糖脱水直至脑组织沉入瓶底，约 48 h。充分脱水后，使用冰冻切片机采用贴片法进行组织切片，厚度约 10  $\mu$ m。切片置于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。染色前取出，室温放置 2~4 h，PBS 洗涤 3 遍，10 min/次。用 4% PFA 固定 30 min，PBS 洗涤 3 遍。晾干后，用 DAPI (100 ng/ml, PBS 稀释) 溶液衬染细胞核 15 min。PBS 洗涤 3 遍，晾

干后封片。最后用荧光显微镜进行观察采图。

### 2.3 组织免疫荧光

同上述方法制备脑组织切片，固定后置于封闭液中室温封闭 1 h 后，PBS 洗涤 3 遍，晾干后滴加一抗(抗 JEV 单克隆抗体 2H4，大鼠抗小鼠 MLKL，兔抗小鼠 NeuN)，室温孵育 16 h。PBS 洗涤 3 遍。晾干后加入相应二抗(FITC-anti-mouse IgG; Cy3-anti-rabbit IgG; Cy3-anti-mouse IgG; FITC-anti-rat IgG)，室温孵育 2 h 后，洗涤 3 遍，晾干后 DAPI 衬核，15 min，洗涤晾干封片。在荧光显微镜下观察采图。MLKL 与 NeuN 以及 MLKL 与 JEV 共染时，用激光共聚焦显微镜采图。

### 2.4 显微结构电镜及免疫电镜

1) **显微结构电镜**：在 5 dpi，小鼠麻醉后心脏灌注 (PBS 50 ml)，并用含 0.05% 戊二醛的 4% PFA 灌注固定 30 min。剥离脑组织后分别切取数个脑皮质区约 1 mm<sup>3</sup> 大小组织块浸泡于戊二醛 4 d，PB 溶液冲洗液三遍，每遍 15 min；4℃避光，1% 锇酸固定 1.5 h，PB 液冲洗遍 3 遍；乙醇梯度脱水，依次按 50%、70%、80%、90%、95%、100% (100%乙醇脱水 3 遍)，每次 10 min；环氧树脂包埋，修块，制备超薄切片约 70-80 nm。之后用 JEM-1230 电子显微镜观察，采图。

2) **免疫电镜**：在 5 dpi，小鼠麻醉后心脏灌注 (PBS 50 ml)，并用含 0.05% 戊二醛的 4% PFA 灌注固定 30 min。完整剥离脑组织后，置于 4% PFA 后固定 3 h。在震动切片机行冠状位切片，厚度为 50 μm。PBS 洗涤 3 遍，组织片置于 30% 蔗糖脱水约 6 h。室温封闭 4 h (封闭液 PBS 含 5% BSA，5% 羊血清)。PBS 洗涤 3 遍后，将组织片置于含有抗 MLKL 抗体的孵育槽中，4℃孵育 24 h。充分洗涤后，加入 1.4 nm 金颗粒标记的抗大鼠 IgG 抗体，室温孵育过夜。洗涤 3 遍后，2% 戊二醛固定 45 min。洗涤后，避光进行银加强 (HQ Silver Kit) 15 min。锇酸加强固定 (1 张切片加 100 ul 3% 锇酸与 0.2 M PB 的 1: 1 混合溶液，4℃密闭 1 h)。乙醇梯度脱水，依次按 50%、70%、80%、90%、95%、100% (100%乙醇脱水 3 遍)，每次 10 min。环氧树脂包埋，选取观察视野，修块，制备超薄切片约 70-80 nm，电子染色。之后用 JEM-1230 电子显微镜观察，采图。

### 2.5 细胞免疫荧光

Neuro2a 细胞采用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基。将 Neuro2a 细胞



以  $6 \times 10^4$ /孔接种于含有高压灭菌的玻璃小圆片的 24 孔板内，过夜培养。吸弃陈旧培养基，用 PBS 洗涤 2 遍后，以  $6 \times 10^4$  PFU /500  $\mu$ l DMEM 进行病毒感染 (MOI=1)。对照组每孔加入 500  $\mu$ l DMEM。37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后吸弃上清，加入新鲜的培养基。病毒感染 24 h 后，吸弃培养基，PBS 洗涤 3 遍。加入 4% PFA 固定 30 min。冰甲醇透膜 2 min。室温封闭 1 h。抗 MLKL 及 JEV 一抗及二抗的孵育同 2.3。最后用荧光显微镜进行观察、采图。

## 2.6 Western-blot

组织蛋白的提取：5 dpi，小鼠麻醉后 PBS (50 ml)心脏灌注，剥离出脑组织并进行匀浆。取出约 10  $\mu$ l 匀浆液加入 100  $\mu$ l RIPA 裂解液（按比例加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂），冰上裂解 30 min，4 $^{\circ}$ C 13000 g 离心 30 min，收集上清。

细胞蛋白的提取：Neuro2a 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板，培养过夜。分别以不同的 MOI 值用病毒感染细胞，并在不同的感染时间点收集细胞。吸弃培养基，PBS 洗涤 3 遍后弃尽液体，每孔加入 100  $\mu$ l RIPA 裂解液（按比例加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂），置于冰上反应 15 min，细胞刮刀刮净细胞碎片并将裂解液转移至 EP 管，冰上裂解 15 min 后，4 $^{\circ}$ C 13000 g 离心 30 min，收集上清。

两种样品均采用 BCA 法蛋白定量，上样前用 RIPA 裂解液将样品浓度调平。加入 5 $\times$ 上样缓冲液，沸水煮 10 min 后离心 6000 g，10 min。收集上清进行蛋白质电泳。样品上样量为 30  $\mu$ g/孔。经 12% SDS-page 胶分离（120 V，15 min；160 V，55 min）后转移至 PVDF 膜（100 V，1 h）。3% BSA 封闭 1 h 后，孵育一抗（抗 MLKL, pMLKL）4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗膜 3 遍，10 min/遍。避光孵育相应的红外二抗，室温 2 h。洗膜 3 遍，10 min/遍，使用 Odyssey 红外扫描仪检测并收集结果。

## 2.7 qRT-PCR

组织样品 RNA 的提取：根据相应的感染时间点，小鼠麻醉，PBS (50 ml)心脏灌注后剥离出脑组织，取组织匀浆液约 100  $\mu$ l 进行 RNA 提取。具体方法按照 RNA 快速提取试剂盒说明书进行。

细胞样品 RNA 的提取：细胞处理后，吸弃培养基，PBS 洗涤 3 遍后弃去液体。按照 RNA 快速提取试剂盒说明书进行，全程应避免 RNA 污染或降解。

提取 RNA 之后，用全波长微量酶标仪测定浓度。首先反转录制备 cDNA，反

应体系为：RNA 500  $\mu\text{g}$ ，反转录酶  $5\times\text{mix}$  2  $\mu\text{l}$ ，ddH<sub>2</sub>O 补足 10  $\mu\text{l}$ 。反应条件：37 $^{\circ}\text{C}$  30 min，85 $^{\circ}\text{C}$  5 s，4 $^{\circ}\text{C}$  hold。以获得的 cDNA 为模板，进行实时荧光定量 PCR，3 个复孔。qPCR 反应体系(20  $\mu\text{l}$ )：SYBR taq 酶 (2 $\times$ ) 10  $\mu\text{l}$ ，上下游引物各 1  $\mu\text{l}$ ，模板 1  $\mu\text{l}$ ，ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{l}$ 。加样时需避光，加样混匀后离心，置于实时 PCR 仪测定。反应条件：25 $^{\circ}\text{C}$  30 s，95 $^{\circ}\text{C}$  10 min，(95 $^{\circ}\text{C}$  5 s，60 $^{\circ}\text{C}$  30 s) 40 循环，95 $^{\circ}\text{C}$  15 s，55 $^{\circ}\text{C}$  30 s，95 $^{\circ}\text{C}$  15 s，4 $^{\circ}\text{C}$  hold。结果分析时，CT 值由内参  $\beta$ -actin 标准化。

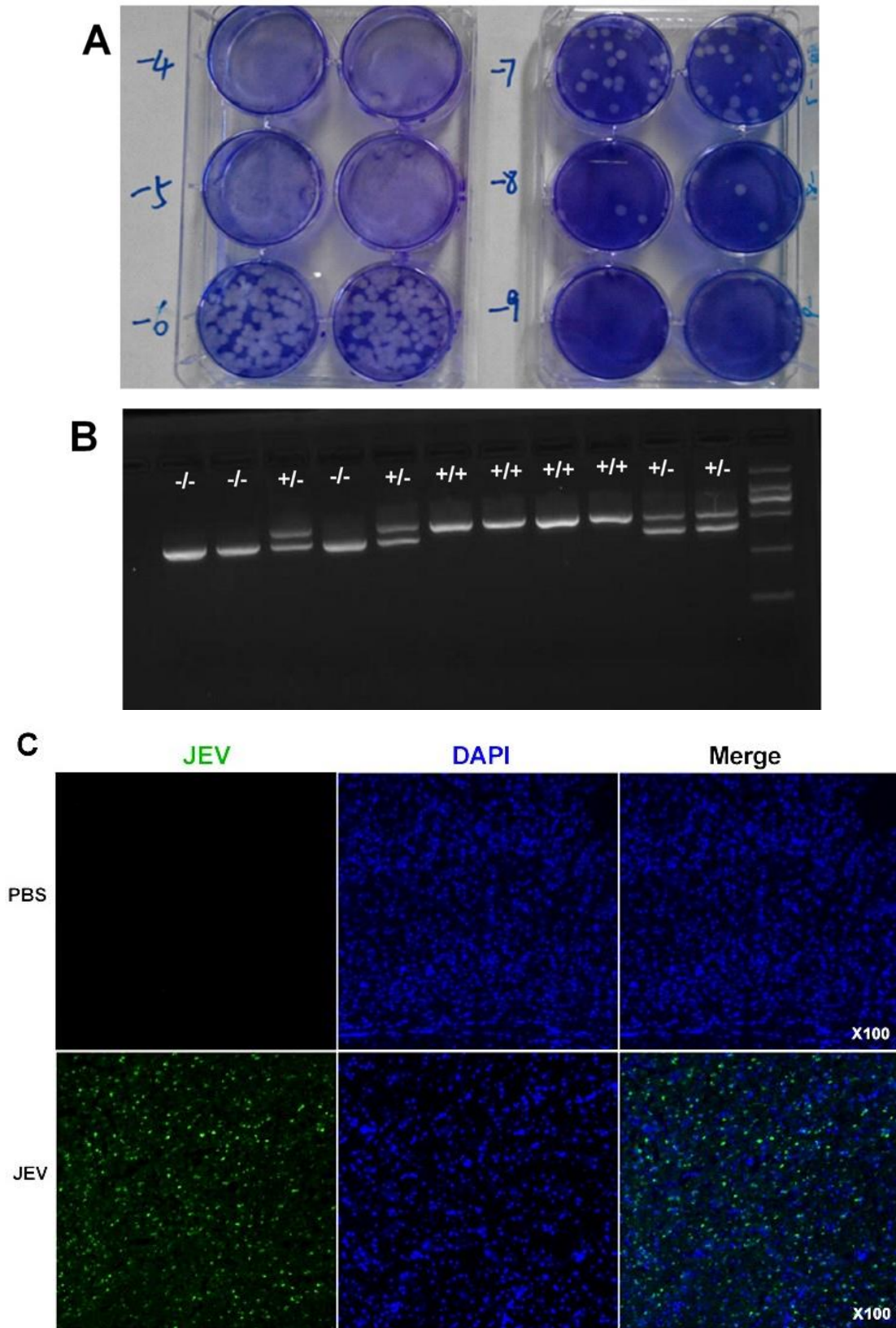
## 2.8 ELISA

在 5 dpi，小鼠麻醉后，眼球采血并收集血液于 1.5 ml EP 管中。室温静置 20 min 待血液自然凝固后，3000 rpm 离心 20 min，收集上清进行 ELISA 检测。按照 ELISA 试剂盒说明书进行标准品的稀释及标准曲线的绘制。依次加入待测样品和标准品，以及生物素标记的二抗和酶标试剂，37 $^{\circ}\text{C}$  60 min 孵育。洗液洗涤 5 次，1 min/次，拍干洗液后，加入显色液显色 15 min，加终止液。在酶标检测仪中测 OD<sub>450nm</sub> 值，根据绘制的标准曲线计算出待测样品浓度。

## 3. 结果

### 3.1 成功制备 JEV，构建 JE 小鼠模型

在 JEV 大量扩增并超速离心浓缩后，利用空斑形成实验测定 JEV 病毒滴度，约为：4 $\times 10^8$  PFU/ml (图 1-1-A)。MLKL<sup>+/-</sup>与 MLKL<sup>+/-</sup>小鼠杂交后子代小鼠提取组织 DNA 进行基因分型测定，获得 MLKL<sup>-/-</sup>敲除鼠(见图 1-1-B)。野生小鼠按照每只 5 $\times 10^7$  PFU/200  $\mu\text{l}$  剂量腹腔注射 JEV，在 5 dpi 取脑组织进行免疫荧光检测，与 PBS 对照组相比，JEV 感染小鼠的脑组织中明显可见绿色荧光 (见图 1-1-C)，证实 JE 模型构建成功。并且随着 JEV 的感染，脑组织内主要炎症因子 TNF- $\alpha$  表达也逐渐增加 (见图 1-1E) 与文献报道一致。



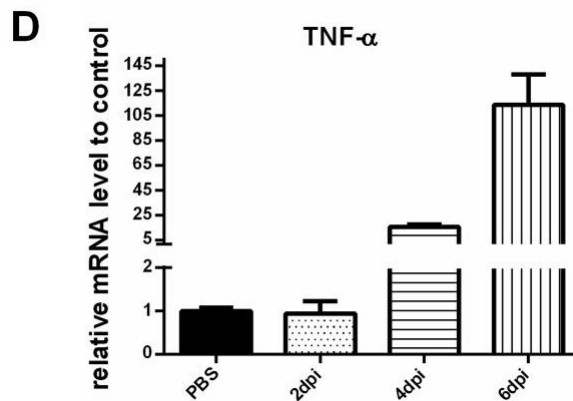


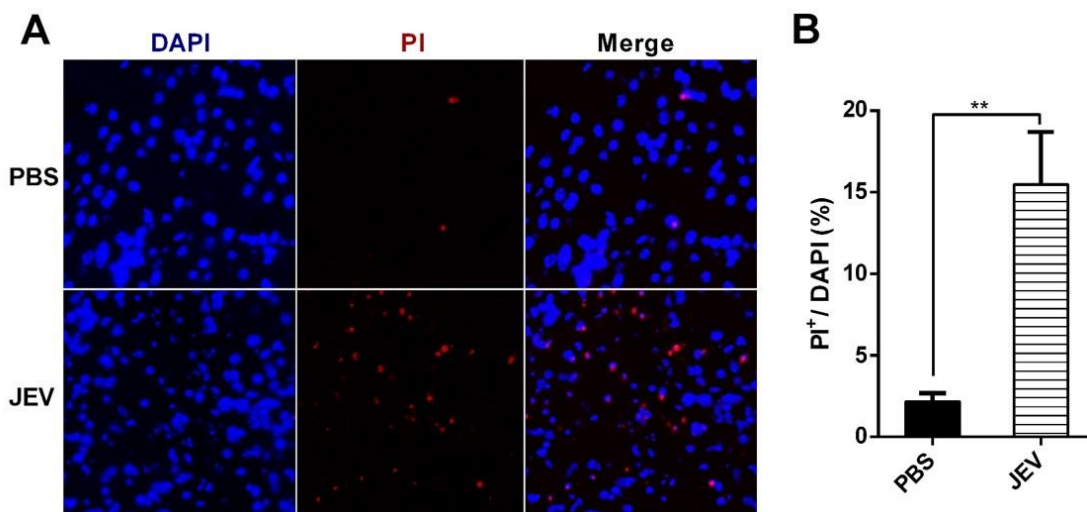
图 1-1 病毒滴度测定,  $MLKL^{-/-}$ 小鼠及 JEV 模型鉴定

Fig. 1-1 Virus titration,  $MLKL^{-/-}$  mice identification and construction of JE models.

(A) 不同感染剂量空斑实验测定JEV滴度; (B) 组织DNA经PCR核酸电泳鉴定, 敲除鼠 $-/-$ , 杂合子 $+/-$ , 野生型 $+/+$ ; (C) 脑组织切片的JEV抗原染色, PBS: 对照组; JEV: 病毒感染组; (D)随着 JEV感染, 脑组织内TNF- $\alpha$ 表达逐渐增加 (n=3)。

### 3.2 JEV 感染小鼠模型中, 大量神经细胞发生坏死

既往研究证实 JEV 感染可直接诱导神经细胞死亡也可通过炎症反应引起神经元死亡。在 JEV 感染死亡患者尸检结果发现大量坏死灶的存在。为了检测本实验建立的 JE 模型中是否存在神经细胞坏死, 我们进行 PI 活体染色和电镜检测。结果发现, 在 5dpi, JEV 感染组脑组织中 PI 染色阳性细胞量明显高于对照组 (见图 1-2A, B)。超微结构显示, JEV 感染组的脑细胞可呈典型坏死表现: 染色质固缩、线粒体水肿、细胞膜崩解 (见图 1-2C)。



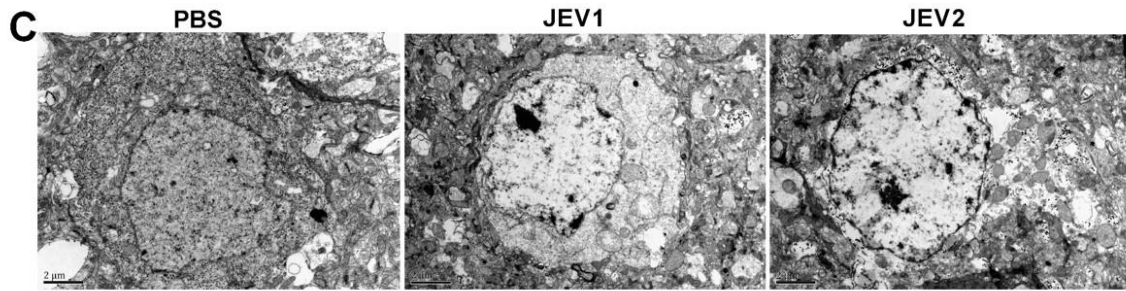


图 1-2 JEV 感染小鼠模型中，大量神经细胞坏死

Fig. 1-2 Nerve cells undergo necrosis during JE in mice model

(A) The representative images of PI staining of brain sections from PBS or JEV administrated mice (200 $\times$ ). (B) The intensity of PI positively stained cells of each group were analyzed with Image J. (Data represents mean  $\pm$  SEM. PBS = 2, JEV = 3; 3 sections per mouse, 5 fields per section, \*\*P < 0.01). (C) Micrographs of normal and JEV infected mouse brain cells. In PBS group, the morphology of brain cells. In JEV infected mice, most of brain cells showed classical necrotic morphology with clumps of chromatin, swollen mitochondria and plasma membrane disintegration (PBS = 1, JEV = 2).

### 3.3 MLKL 介导的程序性坏死参与 JE 的发病

程序性坏死是近年来发现的一种新的细胞坏死方式，pMLKL 是程序性坏死的执行分子。MLKL 磷酸化后可转移至细胞膜并介导细胞膜的崩解。为证实程序性坏死是否参与 JEV 感染所诱导的细胞坏死，我们检测了小鼠脑组织中 MLKL 的表达情况。脑组织免疫荧光结果显示，JEV 感染组脑组织细胞胞质区 MLKL 染色明显，而对照组 MLKL 染色不明显（图 1-3A）。免疫电镜显示 JEV 感染组脑细胞胞质区金颗粒聚集并且有沿细胞膜分布趋势（图 1-3B），提示 MLKL 生成并转移至细胞膜介导细胞发生程序性坏死。Western-blot 结果证实，JEV 感染组脑组织 MLKL 及 pMLKL 表达水平明显高于对照组（图 1-3C）。同时，JEV 感染组脑组织 MLKL 的 mRNA 水平也明显高于非感染组（图 1-3D），而且 MLKL 的 mRNA 表达水平在临床症状严重的小鼠脑组织中表达更高（图 1-3E）。可以看出，JE 模型中存在 MLKL 介导的程序性坏死。

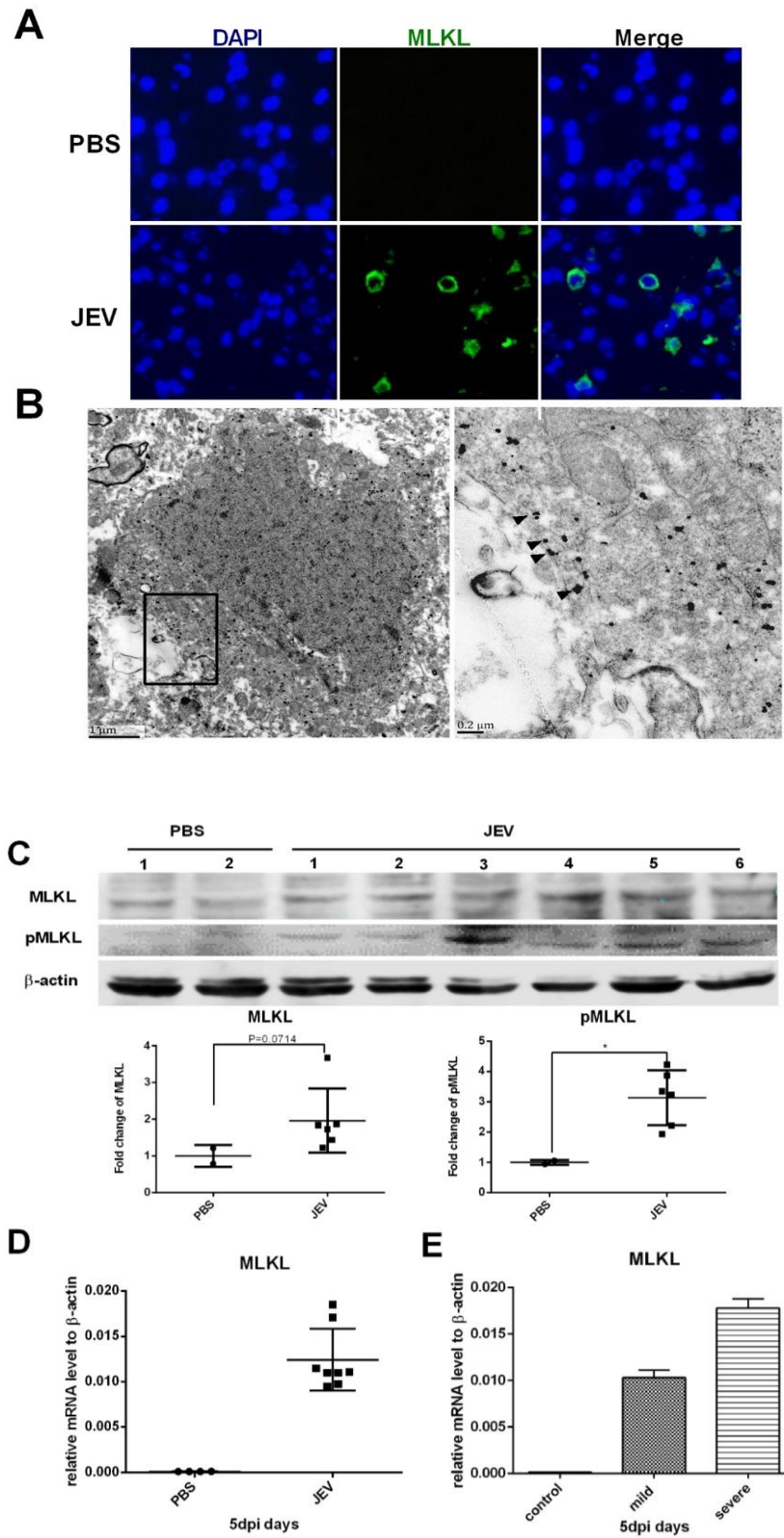


图 1-3 MLKL 介导的程序性坏死参与 JE 的发病

Fig. 1-3 MLKL Mediated Necroptosis Is Involved in JE

(A) The immunocytochemistry of MLKL in the brain sections of PBS or JEV administered mice (x400). (B) Immuno-electron microscopic study of MLKL. The right panels show magnified regions of the boxed areas. Arrows showed the membrane localization of MLKL. (C) Western-blotting (upper) and quantitation (down) of protein MLKL and pMLKL in PBS or JEV administrated group. (PBS = 2, JEV = 6, \*P < 0.05). (D) The relative level of mRNA MLKL in PBS or JEV treated mice brain via qRT-PCR at 5 dpi. The data represents the relative mRNA level normalized with  $\beta$ -actin (PBS = 4, JEV = 8). (E) The level of mRNA MLKL was higher in mice with severe clinical symptoms in wild mice (control n=3, mild n=3, severe n=3).

### 3.4 JEV 感染诱导的程序性坏死主要发生在神经元

大量神经元的死亡是 JE 的主要病理损伤之一。为检测程序性坏死是否发生在神经元，在 5dpi，进行脑组织取材和 MLKL 与 NeuN（神经元标志分子）双染。结果显示升高的 MLKL 表达主要发生在 NeuN 阳性细胞，即脑组织内细胞程序性坏死主要发生在神经元（图 1-4A）。同时，JEV 和 MLKL 的双染显示，MLKL 增强表达主要发生于 JEV 阳性细胞（图 1-4B）。这提示 JEV 可能诱导神经元中 MLKL 的表达，进而导致其程序性坏死。

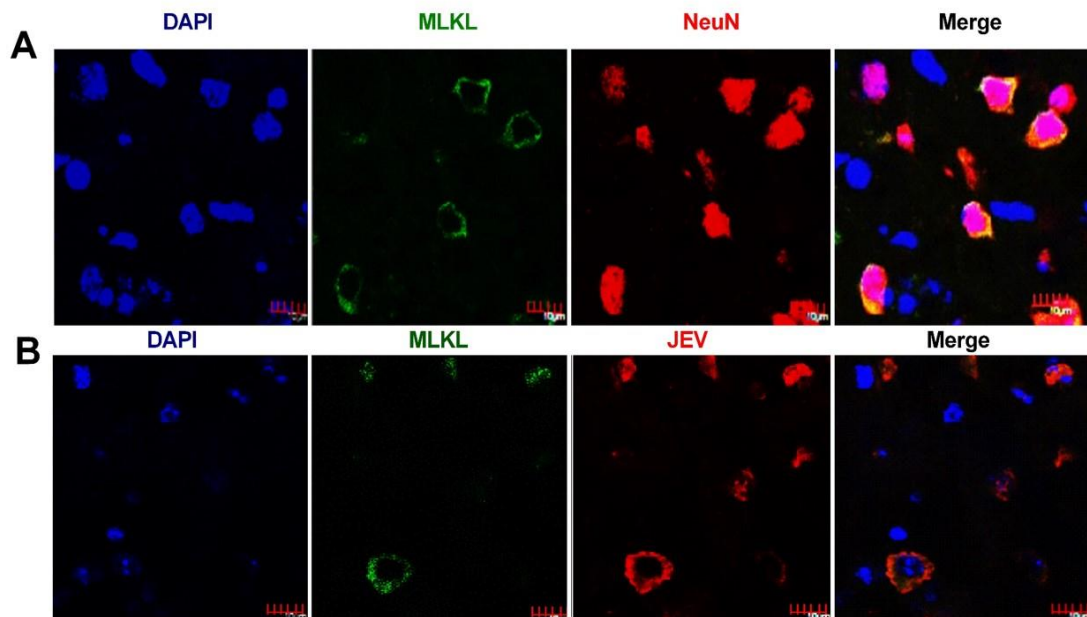


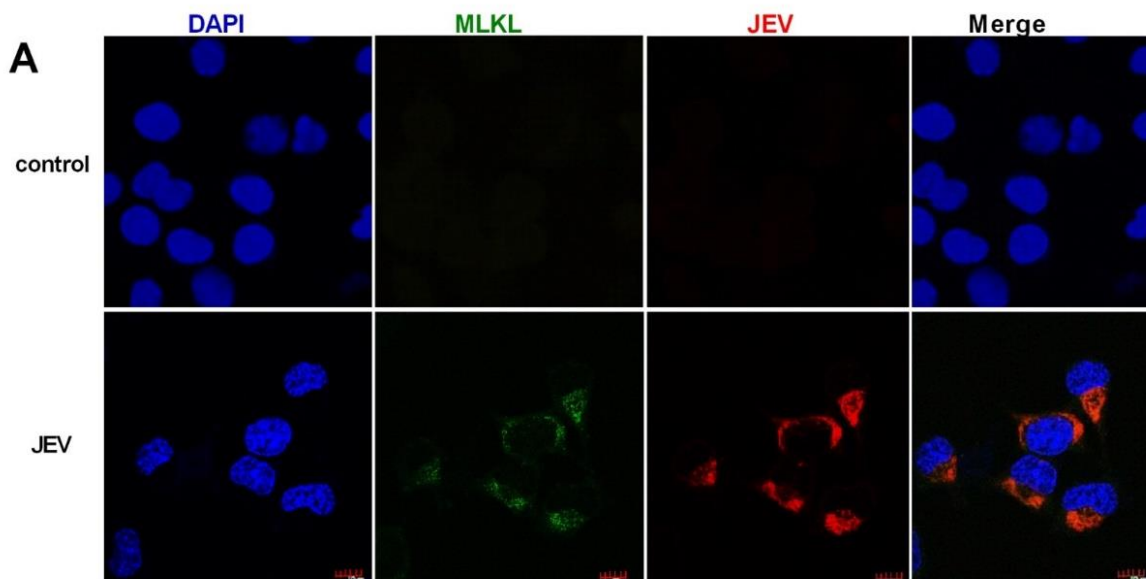
图 1-4 JEV 感染诱导的程序性坏死主要发生在神经元

Fig. 1-4 Necroptosis of Neurons after JEV Infection

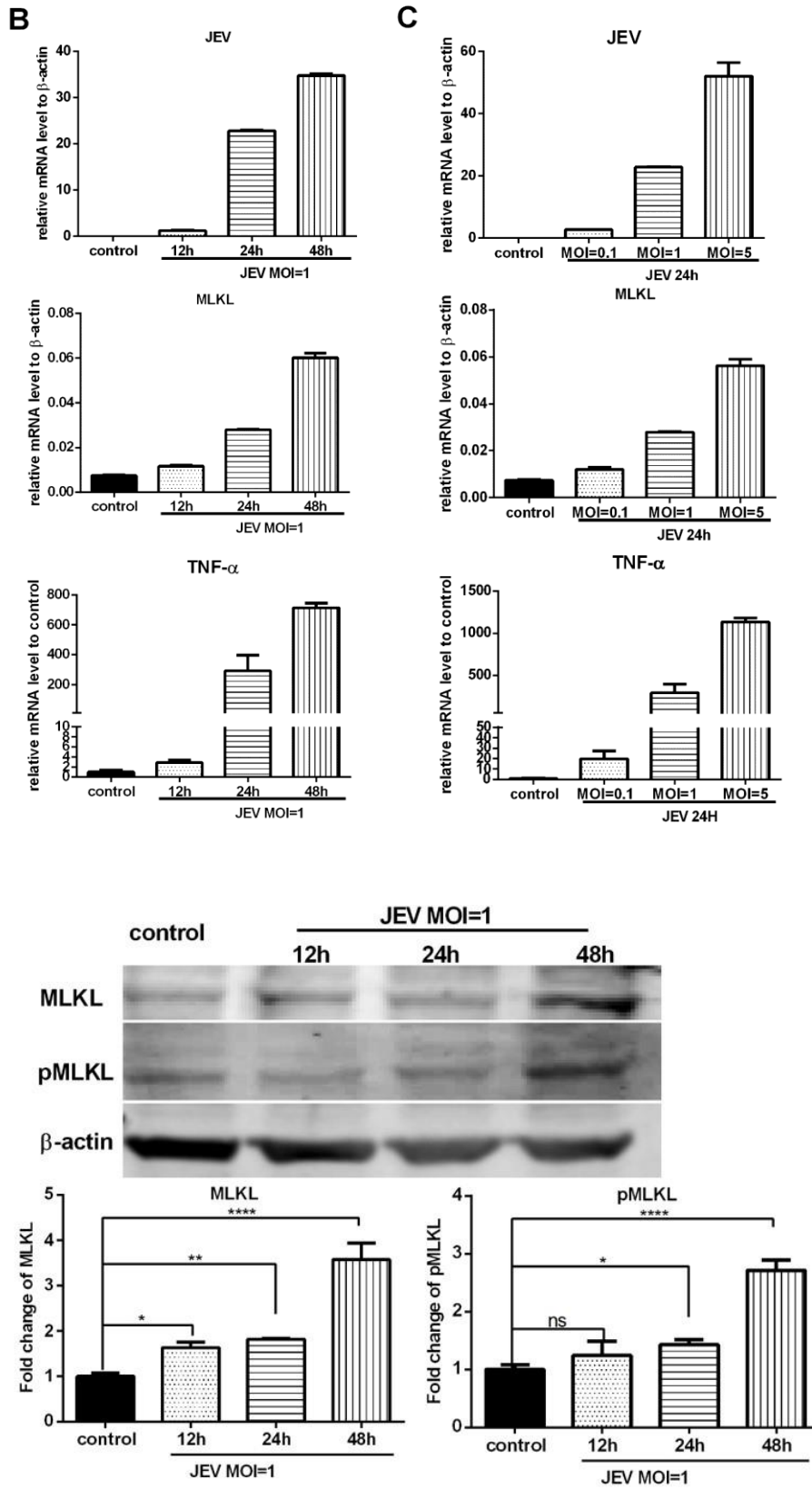
(A) Double-immunostaining of MLKL (green) and NeuN (red) in JEV infected mice. The results were acquired by confocal laser scanning microscope. (B) Double-immunostaining of MLKL (green) and JEV (red) in JEV infected mice.

### 3.5 MLKL 表达与 JEV 感染剂量相关

为进一步验证 JEV 感染可诱导 MLKL 表达及程序性坏死的发生, 我们检测了不同病毒滴度和不同感染时间对于 MLKL 表达的影响。鉴于 JEV 诱导的程序性坏死主要发生于神经元, 我们采用神经母细胞瘤细胞系 Neuro2a 细胞作为神经元模型进行体外实验。与对照组相比, JEV 感染 Neuro2a 后 MLKL 表达明显升高, 同时 MLKL 表达主要发生在 JEV 阳性细胞 (图 1-5A), 与脑组织组织 MLKL 与 JEV 双染结果一致。以 JEV MOI=1 感染 Neuro2a 细胞后, 在感染后 12、24、48h 进行测定。结果显示, JEV 拷贝数随感染时间延长逐渐增加, 同时 MLKL, TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平呈递增趋势 (图 1-5B)。WB 结果显示, 细胞内 MLKL 和 pMLKL 表达水平也逐渐增加 (图 1-5D)。以不同的 MOI 值感染 Neuro2a 细胞 24h 后, 随着 MOI 值的增加, 病毒拷贝数增加, MLKL, TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平增加 (图 1-5C), 同时细胞内 MLKL 及 pMLKL 的表达水平也随病毒感染剂量的增加而增加 (图 1-5E)。这说明 JEV 可促进神经元细胞内 MLKL 表达及程序性坏死的发生。







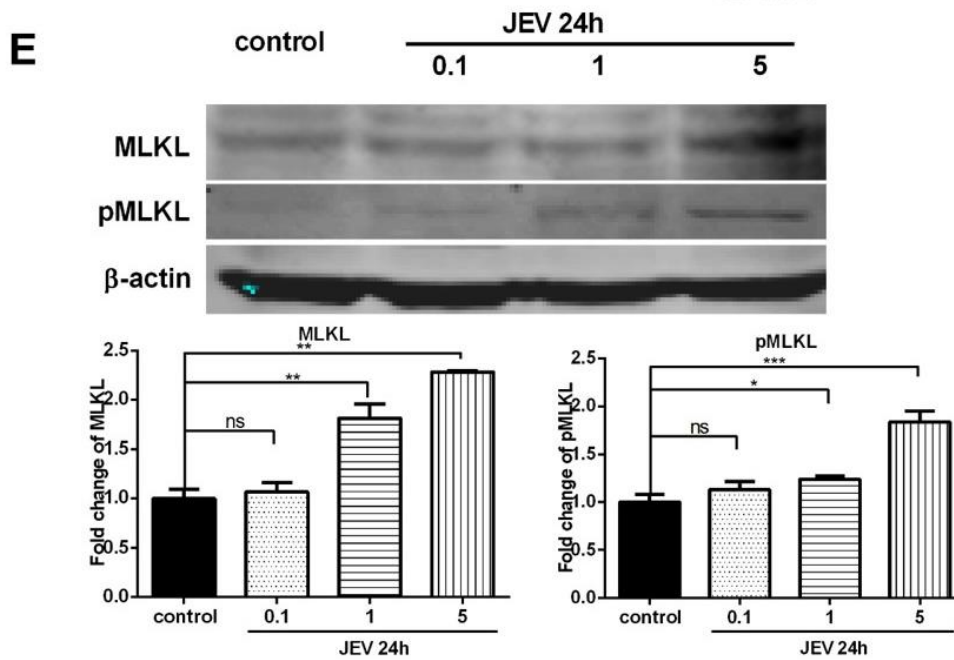


图 1-5. MLKL 表达与 JEV 感染剂量相关

Fig. 1-5 The Expression of MLKL Is Upregulated in Neurons Infected with JEV

(A) Double-immunostaining of MLKL (green) and JEV (red) in Neuro2a cells treated with DMEM (top) and infected with JEV MOI = 1, 24 h (bottom). (B) Neuro2a cells were infected with JEV at MOI = 1. And 12, 24, 48 h later, cells were collected for RNA extraction and the viral copies and level of mRNA MLKL, TNF- $\alpha$  were tested through qRT-PCR. (C) Neuro2a cells were infected with JEV at MOI = 0.1, 1, 5 respectively. And 24 h later, cells were collected for RNA extraction and the viral copies and level of mRNA MLKL, TNF- $\alpha$  were tested through qRT-PCR. (D) Neuro2a cells were infected with JEV at MOI = 1. And 12, 24, 48 h later, cells were collected for total protein extraction and MLKL and pMLKL were tested through western-blot. (E) Neuro2a cells were infected with JEV at MOI = 0.1, 1, 5 respectively. And 24 h later, cells were collected for total protein extraction and MLKL and pMLKL were tested through western-blot. The data represents the mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 and \*\*\*\*P < 0.0001

### 3.6 敲除 MLKL 减缓 JE 进程

为探索 MLKL 在 JE 进展中的作用, 我们采用 MLKL 敲除鼠及野生型小鼠构建 JEV 感染模型。分别注射病毒后, 每天记录小鼠的体重, 行为学评分(见表 1-3)及死亡情况。结果显示, JEV 感染 MLKL<sup>-/-</sup>小鼠与 WT 小鼠组间的死亡率无显著差异, 但 MLKL<sup>-/-</sup>小鼠组体重下降速度、发病时间及行为学症状都较 WT 小鼠缓慢。这提示, 在 JEV 感染小鼠模型中, 敲除 MLKL 可缓解 JE 的病情进展。

表 1-3 行为学评分标准  
Table 1-3 the scoring criteria of behavior

行为表现	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分
竖毛	—	+	+	+	+	+
运动受限	—	—	+	+	+	+
肢体僵硬	—	—	—	+	+	+
后肢瘫痪	—	—	—	—	+	+
肌肉抽搐 震颤	—	—	—	—	偶有震颤	抽搐甚至 死亡

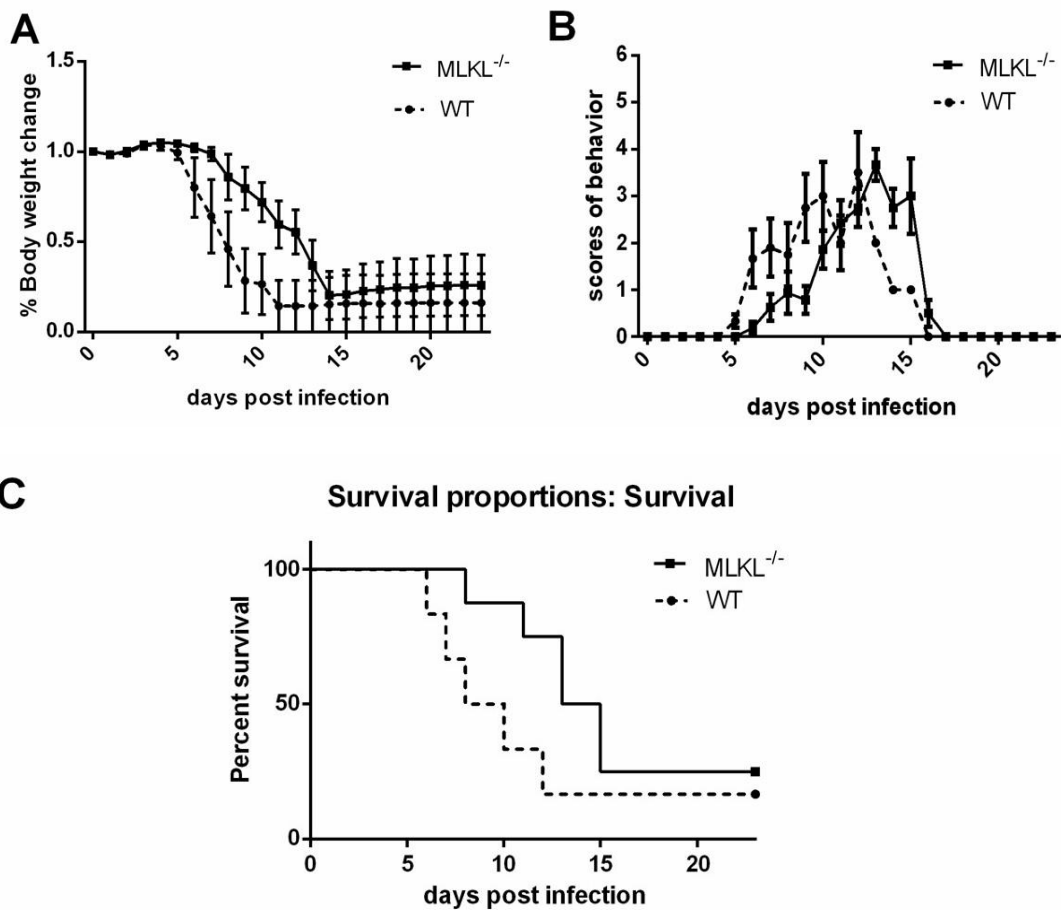


图 1-6 MLKL 敲除缓解 JE 发病进程

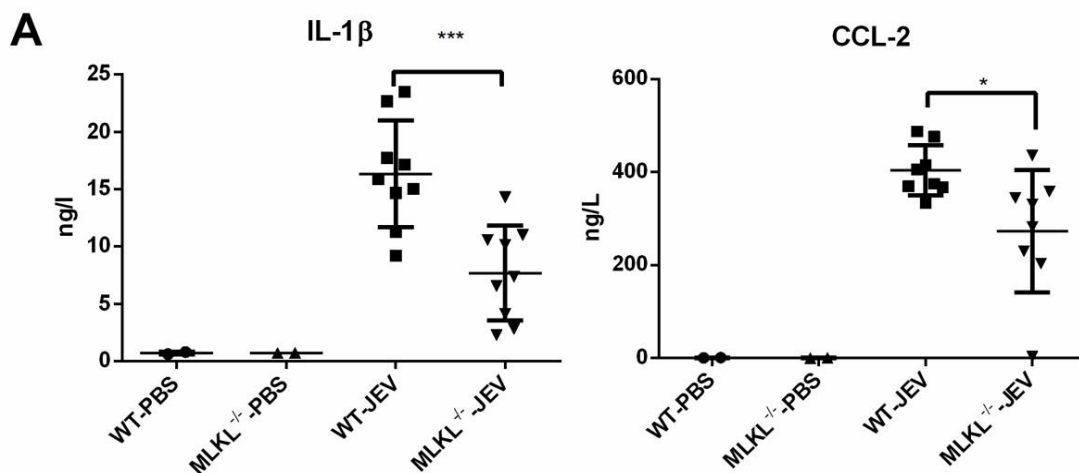
Fig. 1-6 MLKL Deleted Mice Show Alleviated Progression of JE

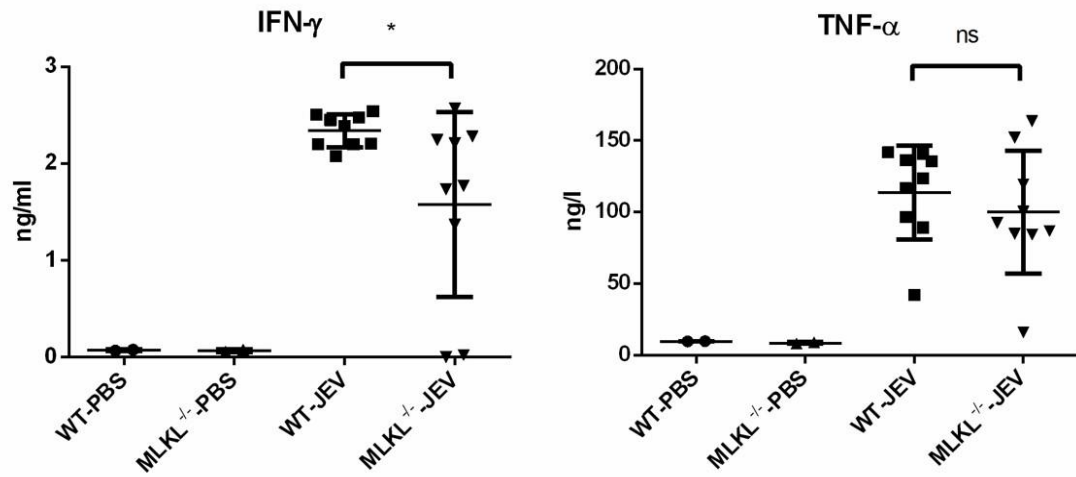
(A) The weight of each mouse was measured and recorded at 16: 30–17: 00 (the data represents the

mean  $\pm$  SD). (B) The behavior score was recorded twice every day according to the scoring criteria. (C) The death and survival of mice in each group was recorded and the data was analyzed and shown as Kaplan–Meier survival curves. The body weight, behavior scores and survival rate were recorded daily from 0 dpi to 23 dpi when the survivals were completely stable (WT = 12, MLKL<sup>-/-</sup> = 16).

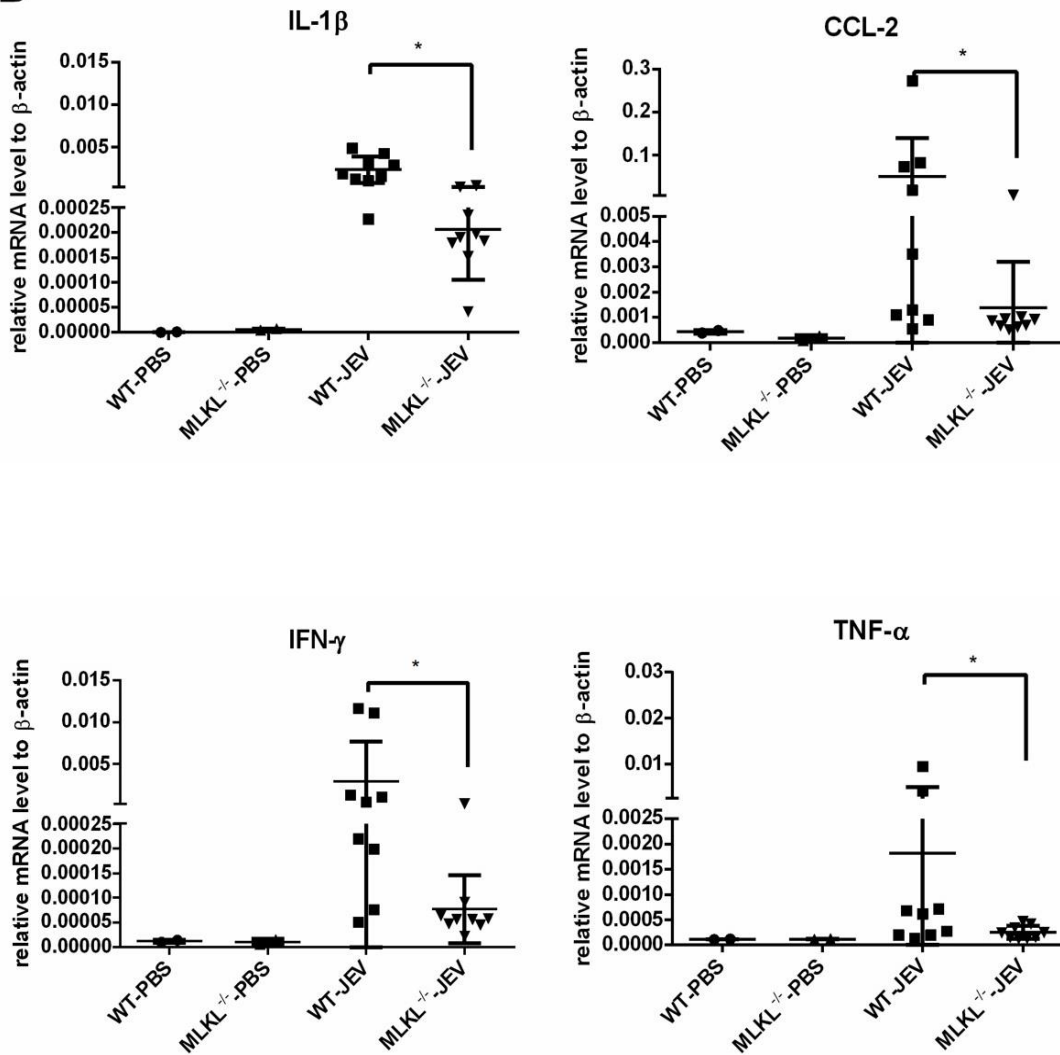
### 3.7 JE 模型中阻断 MLKL 可减少炎症因子表达水平

细胞发生程序性坏死后释放大量的 DAMPs, 后者可激活并加重炎症反应。为探索 JEV 感染 MLKL<sup>-/-</sup>小鼠和 WT 小鼠早期外周血和脑组织中炎症因子表达水平变化, 我们在 5 dpi 检测了多种炎症因子的表达情况。与 WT 小鼠相比, MLKL<sup>-/-</sup>小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、CCL-2、IFN- $\gamma$  水平明显降低, TNF- $\alpha$  的平均水平也出现降低(图 1-7A); MLKL<sup>-/-</sup>小鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CCL-2、IFN- $\gamma$  表达水平降低, 具有统计学意义。这提示, 在 JEV 感染早期, MLKL<sup>-/-</sup>小鼠呈较低水平的炎症因子表达, 这可能是 JEV 感染后 MLKL<sup>-/-</sup>小鼠病情进展较 WT 小鼠缓慢的原因。同时, 为检验降低的炎症反应对于病毒增殖的影响, 我们检测了脑组织内病毒拷贝数, 发现腹腔注射第 5 天, 两组小鼠脑内病毒量并无显著差异(图 1-7C)。即 MLKL 敲除阻断程序性坏死后第 5 天并不会因炎症反应的下降导致病毒迅速扩增。进一步, 经脑内注射途径建立 JEV 感染模型, 在感染后第 2、4、6 天, 我们检测了两组小鼠脑内病毒载量, 发现其增殖速度并无显著差异(图 1-7D)。故, 在 JEV 感染小鼠发病死亡的过程中, 阻断 MLKL 介导的程序性坏死不会引起脑内病毒的大量增殖。





**B**



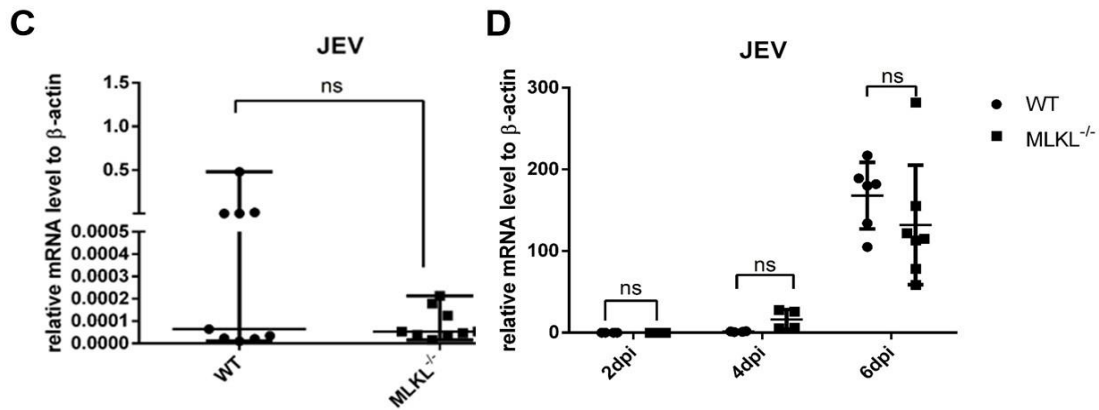


图 1-7 JE 模型中阻断 MLKL 可减少炎症因子表达水平

**Fig.1-7 MLKL Deleted Mice Show Decreased Inflammatory Cytokines during JEV Infection**

(A) The level of IL-1 $\beta$ , CCL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  in the serum of WT or MLKL $^{-/-}$  mice was detected by ELISA assay kit (WT-PBS = 2, MLKL $^{-/-}$ -PBS = 2, WT-JEV = 9, MLKL $^{-/-}$ -PBS = 9). (B) The expression of IL-1 $\beta$ , CCL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  in the brain of WT or MLKL $^{-/-}$  mice was detected by qRT-PCR (WT-PBS = 2, MLKL $^{-/-}$ -PBS = 2, WT-JEV = 9, MLKL $^{-/-}$ -PBS = 9, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001). (C) The relative viral load in the brain of WT or MLKL $^{-/-}$  mice were detected by qRT-PCR at 5 dpi after administration with JEV 5x10<sup>7</sup>PFU/20g in 200 $\mu$ l PBS intraperitoneally. (WT-JEV=9, MLKL $^{-/-}$ -JEV=9). (D) At 2, 4, 6 dpi, the relative viral load in the brains of WT or MLKL $^{-/-}$  mice by qRT-PCR after injection 50 PFU JEV into the brains. (2dpi WT-JEV=4, MLKL $^{-/-}$ -JEV=4; 4 dpi WT-JEV=4, MLKL $^{-/-}$ -JEV=4; 6dpi WT-JEV=6, MLKL $^{-/-}$ -JEV=7).

#### 4. 讨论

在 JEV 感染过程中，神经元的死亡是神经系统炎症损伤和疾病进展的关键因素。病毒可直接导致神经元的死亡，病毒感染激活的炎症反应也可间接引起神经元的死亡。细胞凋亡和自噬参与 JEV 感染过程中脑细胞的死亡，阻断凋亡和自噬的发生可在一定程度上改变疾病进展，但并不能完全抑制神经元的死亡。大量研究报道程序性坏死作为一种可调控的细胞坏死方式参与多种 CNS 疾病的发生，而其在 JE 中的作用尚未有报道。pMLKL 是细胞程序性坏死的执行分子。本实验中，我们首次证实 MLKL 介导的程序性坏死参与 JE 的发病机理，且 MLKL 表达量与 JEV 感染小鼠模型的临床症状的严重程度相关。通过构建 MLKL 敲除鼠 JEV 感染模型，我们发现，在 JEV 感染后，尽管与野生型小鼠相比，MLKL $^{-/-}$ 小鼠最终的生存率并无显著改善，但 JE 的发病进展和早期的炎症反应明显缓解。JE 属于临床急症，延

缓临床进展可为其治疗和恢复争取时间。因此对细胞程序性坏死在 JE 中的作用及具体机制的研究有着重要意义。

多种途径可激活细胞程序性坏死，目前研究较多的为 TNF/ TNFR/ RIPK1/ RIPK3/ MLKL 通路及 RIPK1 非依赖性 DAI/ RIPK3/ MLKL 轴。MLKL 磷酸化后形成多聚化，由细胞质转移到细胞膜和细胞器膜上，并在这些膜结构中形成通透性孔道介导细胞膜的崩解破裂<sup>[124]</sup>。目前，程序性坏死的检测方法包括典型的坏死细胞结构形态、MLKL 表达、pMLKL 表达水平等，其中，pMLKL 是程序性坏死发生的标志性分子<sup>[125]</sup>。本实验中，我们通过电镜检测细胞的超微结构证实 JEV 感染引起的脑炎中存在细胞坏死；通过免疫电镜检测到在 JEV 感染脑组织中 MLKL 沿细胞膜募集；同时，体内外实验证实在 JEV 感染过程中 MLKL 及 pMLKL 的表达增加。由此证实 JEV 感染可诱导神经元发生程序性坏死。

病毒感染的细胞发生程序性坏死后，未成熟的病毒颗粒因失去宿主细胞的支持而失活，因此细胞程序性坏死在一定程度上可限制病毒的增殖。例如在 HSV-1、IAV 感染过程中，阻断程序性坏死虽然能降低炎症反应和细胞死亡率，但可促进病毒的增殖<sup>[126, 127]</sup>。然而，也有研究报道，在 IAV 感染过程中，虽然细胞程序性坏死在一定程度上抑制病毒的增殖，但是肺泡上皮细胞等细胞的大量坏死可引起强烈的炎症反应，加重组织损伤，而阻断程序性坏死可缓解组织损伤和疾病进展<sup>[128]</sup>。因此，在病毒感染性疾病中，以干预细胞程序性坏死作为治疗手段时，如何平衡炎症反应和病毒增殖之间的关系是一个需要考虑的问题。Kuriakose 等报道，在 IAV 感染过程中，在感染后第 6 天，程序性坏死阻断的小鼠肺组织内病毒载量才逐渐高于野生型小鼠而在此过程中大量野生小鼠因 IAV 诱导的过度炎症损伤而死亡<sup>[128]</sup>。而在我们的实验过程中，在 JEV 感染后，与 WT 小鼠组相比，MLKL<sup>-/-</sup>小鼠脑组织中炎症因子水平明显降低、生存率得到改善，而两组小鼠脑内病毒载量没有显著差异。

与细胞凋亡不同，程序性坏死的发生伴有细胞膜的崩解和细胞内容物的释放。细胞凋亡时，细胞皱缩形成凋亡小体，不伴有或仅伴有少量内容物的释放；而细胞发生程序性坏死后释放大量的 DAMPs，诱发严重的炎症反应<sup>[124]</sup>。尤其在 CNS，DAMPs 及炎症因子的释放可产生严重的神经毒性<sup>[129]</sup>。DAMPs 的释放可进一步活化小胶质细胞释放大量的炎症因子和趋化因子，可导致 BBB 的破坏和炎症细胞的浸润，加重炎症反应，进一步介导神经元的死亡，形成免疫损伤的恶性循环，导致

疾病的进展<sup>[124]</sup>。抑制程序性坏死的发生可减轻组织的炎症损伤，譬如在脑外伤、多发性硬化等 CNS 疾病中，阻断细胞程序性坏死后均延缓了疾病的进展。JEV 感染所引起的脑组织炎症损伤是 JE 发生发展的主要原因，而不是病毒本身的直接作用。因此，抑制炎症反应是 JE 治疗干预的关键。我们的实验发现，与 WT 小鼠相比，MLKL<sup>-/-</sup>小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、CCL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  表达水平降低，而且 MLKL<sup>-/-</sup>小鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CCL-2、IFN- $\gamma$  表达水平也出现降低。可以看出，在 JEV 感染引起的脑炎中阻断细胞程序性坏死后减缓的疾病进程与机体炎症因子水平下降有密切关系。在 JEV 感染细胞和动物模型中，TNF- $\alpha$  是重要的炎症介质之一，TNF- $\alpha$  的大量产生也被认为在 JE 病情进展中发挥重要作用<sup>[130]</sup>。最近发现，TNF- $\alpha$  是经典程序性坏死的诱导分子之一<sup>[131]</sup>。在 JE 中，TNF- $\alpha$  很有可能参与诱导 MLKL 磷酸化和细胞程序性坏死的发生。在试验中我们发现 JEV 感染可导致 MLKL 的转录和表达水平升高，同时 MLKL 表达升高的细胞主要发生于 JEV 感染的神经元。我们推测 JEV 感染本身可能促进 MLKL 的表达，而其他因素如 TNF- $\alpha$  等则可能参与启动 MLKL 的磷酸化和程序性坏死的执行。其中详细的分子调控机制仍在研究之中。

以上表明，程序性坏死参与 JEV 感染所致的神经元死亡及炎症损伤。阻断 MLKL 介导的程序性坏死可降低 JEV 感染的炎症因子水平和缓解疾病进展。因此，干预程序性坏死可有望成为 JE 治疗的新策略之一。



## 第二部分 MSC 移植治疗 JE 的效应及机制探讨

MSC 是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞。MSC 以其强大的免疫调节功能在多种感染性疾病及炎症性疾病中发挥着治疗作用。MSC 具有靶向迁移功能，可穿过 BBB 进入 CNS 并在多种 CNS 疾病中发挥着治疗作用。在多种 CNS 疾病模型中，移植的 MSC 可抑制小胶质细胞的过度活化，并调控其向 M2 极化；产生 TGF- $\beta$ ，TSG-6 等抑制过度的炎症反应，改善损伤微环境；分泌一系列神经营养因子，促进神经系统的再生修复和神经干细胞的分化；同时还可通过产生 VEGF，Ang1 等提高 BBB 的完整性并通过产生 TIMP3 等抑制 BBB 的破坏。过度的炎症反应是 JE 的主要致病原因，基于 MSC 的生物学功能，MSC 对于 JE 模型的治疗作用值得探讨。在本部分实验，我们构建 JEV 感染小鼠模型，并于感染后第 1，3 天进行 MSC 移植。MSC 移植治疗组，小鼠的生存率提高，炎症损伤缓解。同时，移植治疗组小鼠脑组织小胶质细胞活化减轻，神经元存活率增加，BBB 完整性提高并且脑内病毒载量下降，证实 MSC 对于 JE 小鼠模型的治疗效应。本部分实验为探索有效的免疫调控方法，提高 JE 的治疗效果奠定实验基础。

### 1. 材料

#### 1.1 实验动物及细胞

BALB/c 小鼠 (雌，4-6 周，8-10 周) 购自实验动物中心。

细胞：小胶质细胞系 N9 和神经母细胞瘤细胞系 Neuro2a 购自 ADCC。

#### 1.2 试剂

##### 1.2.1 购买试剂

- 1) 培养基：低糖 DMEM (L-DMEM)，RPMI-1640，高糖 DMEM 购自 Gibco 公司。
- 2) 胎牛血清购自 Gibco 公司。
- 3) 抗体：见表 2-1。

表 2-1 所用抗体

Table. 2-1 Antibodies used in this experiment.

Antibodies	Hosts	Dilutions	Sources
Anti-IBA-1	Goat	IHC 1:500	Abcam England
Anti-NeuN	Rabbit	IHC 1:900	Abcam England
Anti-JEV	Mouse	IHC 1:100	China
Anti-ZO-1	Rabbit	IHC 1:100	Proteintech China
Anti-caspase3p17	Rabbit	WB 1:1000	Millipore USA Massachusetts
Anti-BCL-2	Rabbit	WB 1:500	Proteintech China
Anti- $\beta$ -actin	Mouse	WB 1:1000	Proteintech China
PE-anti-CD44	Rat	FCM 1:100	BD USA New Jersey
FITC-anti-Sca-1	Rat	FCM 1:100	BD USA New Jersey
FITC-anti-CD45	Rat	FCM 1:100	BD USA New Jersey
PE-anti-I-A/I-E	Rat	FCM 1:100	BD USA New Jersey
FITC-anti-CD34	Rat	FCM 1:100	BD USA New Jersey
FITE-anti-F4/80	Rat	FCM 1:100	Biolegend USA California
PE-anti-MR	Rat	FCM 1:100	Biolegend USA California
APC-anti-iNOS	Rat	FCM 1:100	Biolegend USA California
AF-488-anti-rabbit IgG	donkey	IHC1:200	Proteintech China
Cy3-anti-goat IgG	donkey	IHC1:200	Proteintech China
AF-488-anti-mouse IgG	rabbit	IHC1:200	Proteintech China
DyLight 800-anti-Mouse IgG	goat	WB 1:10000	BD USA New Jersey
DyLight 680-anti-rabbit IgG	goat	WB 1:10000	BD USA New Jersey

- 4) 体外成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞诱导分化试剂盒购自中国 Cyagen 公司。
- 5) TUNEL 试剂盒 (In Situ Cell Death Detection Kit) 购自 Roche 公司。
- 6) 伊文诗蓝 (EB) 购自 Sigma 公司。
- 7) Annexin V-FITC Apoptosis Kit 购自 BD 公司。

### 1.2.2 配制试剂

与第一部分相同。

### 1.3 实验耗材

Transwell 6 孔板 (3.0  $\mu\text{m}$ ) 购自 Corning 公司; 1ml 无菌注射器, 匀浆器等购自上海生工。

### 1.4 仪器设备

流式细胞仪: BD 公司; PCR 仪: Roche 公司等。

### 1.5 引物

本实验涉及的引物为上海生工合成。序列见表 2-2:

表 2-2 引物序列

Table 2-2 Primer sequences

JEV	F: AGACAAGCAGATCAACCACCATT	R: CCCTCCAATAGAGCCAAAGTCC
TNF- $\alpha$	F: CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT	R: ACG TGG GCT ACA GGC TTG TCA
IFN- $\gamma$	F: GGCCATCAGCAACATAAGCGT	R: TGGGTTGTTGACCTCAAACCTGGC
IFN- $\alpha$	F:TCC TGA ACC TCT TCA CAT CAA A	R: ACA GGC TTG CAG GTC ATT GAG
IFN- $\beta$	F: CTCCACCACAGCCCTCTC	R: CATCTTCTCCGTCATCTCCATAG
TGF- $\beta$	F: ATCCTCAAGTTGCACCCTTAICT	R: AAAGAGCCTTCGGTGGATTGC
TSG-6	F: GGCTGGCAGATACAAGCTCA	R: TCAAATTCACATACGGCCTTGG
iNOS	F: CCCTTCAATGGTTGGTACATGG	R: ACATTGATCTCCGTGACAGCC
CD86	F: TTGTGTGTGTTCTGGAAACGGAG	R: AACTTAGAGGCTGTTGCTGGG
CD206	F: TCTTTGCCTTTCCAGTCTCC	R: TGACACCCAGCGGAATTTTC
Arg1	F: GAACACGGCAGTGGCTTTAAC	R: TGCTTAGCTCTGTCTGCTTTGC
CCL-2	F: CAA GAA GGA ATG GGT CCA GA	R: GCT GAA GAC CTT AGG GCA GA
$\beta$ -Actin	F: TGACGGGGTCACCCACACTG	R: AAGCTGTAGCCGCGCTCGGT

## 2. 方法

### 2.1 MSC 的分离培养鉴定

#### A. MSC 分离培养

采用全骨髓贴壁法分离 MSC。首先采用颈椎脱臼法处死 BALB/c 小鼠 (雌, 4~6 周), 75% 酒精浸泡消毒 5 min 后, 置于超净台无菌器械解剖剥离出股骨及胫骨 (冰

上操作), 置于冷 PBS 中。然后剪去骨髓, 用含 10% FBS 和 1% 双抗的 L-DMEM 冲洗骨髓直至发白。再轻柔吹散骨髓细胞团块, 以 1000 rpm 5 min 离心后, 重悬细胞沉淀并接种于 T25 细胞培养瓶, 37°C 细胞孵箱培养。24 h 后全换液, 以后每 3 天换液一次。待细胞密度达 95% 左右进行胰酶消化、传代培养, 取第 5~8 代细胞进行鉴定并用于后续实验。

## B. MSC 表面分子鉴定

根据文献报道, 利用流式细胞术分析 MSC 细胞表面的阳性表达分子(大于 95%) CD44、Sca-1; 阴性表达分子(小于 5%) CD45、CD34 和 I-A/I-E。MSC 悬液用洗液(含 2% FBS 的 PBS)洗涤 2 遍后, 以 100  $\mu$ l 洗液重悬细胞, 每管加入 1  $\mu$ l 相应直标抗体, 4°C 孵育 40 min。洗涤 2 遍后, 以 550  $\mu$ l 洗液重悬细胞并经细胞筛过滤后上机检测。

## C. 诱导分化鉴定:

a) **体外成脂肪细胞:** 诱导分化培养基 A 液: 基础培养基 35 ml, 胎牛血清 4 ml, 双抗 400  $\mu$ l, 谷氨酰胺 400  $\mu$ l, 胰岛素 80  $\mu$ l, IBMX 40  $\mu$ l, 罗格列酮 40  $\mu$ l, 地塞米松 40  $\mu$ l; 诱导分化培养基 B 液: 基础培养基 35 ml, 胎牛血清 4 ml, 双抗 400  $\mu$ l, 谷氨酰胺 400  $\mu$ l, 胰岛素 80  $\mu$ l。取第 8 代 MSC 以  $2 \times 10^5$  接种于 6 孔板, 密度达 100% 以上后弃去陈旧培养基加入 A 液每孔 2 ml, 诱导 3 天后换成 B 液 2 ml 培养 24 h, 换回 A 液进行诱导, 交替换液 5 次后, 采用 B 液(每 3 天换液)维持 7 天。可见脂滴变大变圆。吸弃培养基, PBS 洗涤 3 遍后, 加入 4% PFA 固定 30 min, PBS 洗涤 2 遍后, 加入油红 O 染液染色 30 min, 洗涤后普通显微镜观察采图。

b) **成骨细胞诱导:** 诱导培养基: 基础培养基 35 ml, 胎牛血清 4 ml, 双抗 400  $\mu$ l, 谷氨酰胺 400  $\mu$ l, 抗坏血酸 80  $\mu$ l,  $\beta$ -甘油磷酸钠 80  $\mu$ l, 地塞米松 4  $\mu$ l。第 8 代 MSC 以  $2 \times 10^5$  接种于 6 孔板, 细胞密度达 60-70% 时, 吸弃陈旧培养基, 加入诱导培养基 2 ml, 以后每 3 天换液, 诱导 3 周左右, 吸弃培养基, PBS 洗涤 3 遍后, 4% PFA 固定 30 min。每孔加入茜素红 1 ml, 作用 5 min 后, 吸弃染液, PBS 洗涤 3 遍后, 普通显微镜下观察采图。

c) **成软骨细胞诱导:** 诱导培养基: 基础培养基 19.4 ml, 地塞米松 2  $\mu$ l, 抗坏血酸 60  $\mu$ l, ITS 200  $\mu$ l, 丙酮酸钠 20  $\mu$ l, 脯氨酸 20  $\mu$ l, 使用前按 100:1 加入 TGF- $\beta$ 3。收

集第 8 代 MSC，离心后，用成骨诱导培养基重悬细胞，密度  $2 \times 10^7/\text{ml}$ ，以  $5 \mu\text{l}$  体积滴入 24 孔板底部，每孔约 3-5 个液滴，放入细胞培养箱并静置约 30 min 后，轻柔加入约 1 ml 诱导培养基，避免将细胞滴荡起。每 3 天换液，可见细胞呈团状生长。诱导培养约 3 周。吸弃培养基，轻柔洗涤 2 遍后，加入 4% PFA 固定 30 min，洗涤 3 遍后，加入阿新蓝溶液染色 30 min，洗涤后普通显微镜下观察采图。

## 2.2 JEV 模型构建及 MSC 移植

JEV 模型构建同第一部分。取 5~8 代 MSC 制备成细胞悬液，离心后细胞沉淀用 PBS 重悬，过 200 目滤网制备成单细胞悬液，计数并调整细胞浓度至  $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ 。将小鼠分为两组，每组 18 只，移植组尾静脉注射  $200 \mu\text{l}$  单细胞悬液，对照组尾静脉注射  $200 \mu\text{l}$  PBS。移植分为 2 次进行，分别在 1、3 dpi 进行细胞移植。

## 2.3 组织学检测

### A. HE 染色

小鼠麻醉后灌注、剥离脑组织，用 4% PFA 固定 4 h，之后冠状位切取脑组织块放进标本框进一步固定、脱水，然后行石蜡切片。按如下步骤进行 HE 染色：纯二甲苯脱蜡，酒精脱二甲苯，梯度脱酒精后，苏木精染色约 15 min，自来水冲洗使切片变蓝（约 15 min），褪色漂洗后酒精脱水，0.5% 伊红乙醇液复染 2 min 左右。最后用无水乙醇洗去多余染色液，进一步脱水透明后用中性树胶封存。在普通显微镜下观察采图。

### B. 脑组织 TUNEL 染色

使用 In Situ Cell Death Detection Kit， $50 \mu\text{l}$  Enzyme solution 与  $450 \mu\text{l}$  Lable solution 混合均匀配制成工作液。脑组织切片 4% PFA 固定 30 min，PBS 洗涤 3 遍后，晾干，每个组织片滴加  $50 \mu\text{l}$  工作液；直接滴加  $50 \mu\text{l}$  lable solution 作为阴性对照。37℃ 避光孵育 1 h，PBS 洗涤 3 遍。并用 DAPI 衬染细胞核后进行封片，荧光显微镜观察并采图。

### C. 组织免疫荧光

见第一部分。

## 2.4 细胞共培养及混合培养

## A. Transwell 共培养

Neuro2a 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔接种于 transwell 6 孔板的下室，MSC 以  $1 \times 10^5$ /孔接种于上室，并分别培养过夜。JEV 以 MOI=1 感染 Neuro2a 细胞（具体步骤同第一部分），吸附 1 h 后，吸弃旧病毒上清，加入新鲜培养基，并放入相应的种有 MSC 的上室或仅含有培养基的上室进行共培养。48h 后，分别检测下室 Neuro2a 细胞存活率及病毒载量；以及检测上室 MSC 的免疫调节分子（TGF- $\beta$ ，TSG6）表达水平。

## B. 混合培养

Neuro2a 细胞与 MSC 混合培养：将 Neuro2a 细胞以  $2 \times 10^5$  接种于 6 孔板，MSC 消化后用高糖 DMEM 培养基重悬后，以 10 倍梯度的细胞量（ $200-2 \times 10^5$ ）分别加入上述 6 孔板中。过夜培养后，以 MOI=1 进行病毒感染，48 h 后收集细胞，检测病毒拷贝数。同时，将 Neuro2a 细胞以  $2 \times 10^5$  接种于 6 孔板，MSC 消化处理用高糖 DMEM 培养基重悬后，以  $2 \times 10^4$  分别加入上述 6 孔板中，培养过夜后以 MOI=0.1 感染细胞，感染后 24、48、72、96 h 收集细胞，提取 RNA 后检测 JEV RNA 表达水平。

N9 细胞与 MSC 混合培养：将 N9 细胞以  $2 \times 10^5$  接种于 6 孔板，分别加入  $2 \times 10^4$  MSC。过夜培养后，以 MOI=5 进行 JEV 感染。48 h 后收集细胞，流式细胞术检测 N9 细胞极化状态的变化。

## 2.5 流式细胞术

### A. N9 细胞极化状态检测流式细胞术

收集细胞后洗涤 2 遍，以 100  $\mu$ l 洗液重悬后，加入 FITC-anti-F4/80，PE-anti-MR (CD206) 抗体各 1  $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C 孵育 40 min。洗涤 3 遍，5 min/遍。再加入透膜液 1 ml/管，5 min/次，1000 rpm 离心 3 次。然后加入 APC-anti-iNOS 抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育 40 min，洗涤 3 遍后用 600  $\mu$ l 洗液重悬，滤网过滤后上机检测。

### B. 脑组织细胞流式

在 6 dpi，各组小鼠颈椎脱臼处死后，75%酒精浸泡消毒 5 min。安全柜内分离脑组织，并于 200 目细胞筛网中加入含 10% FBS 的 1640 培养基研磨，收集细胞悬液，洗涤 2 遍后，余同 N9 细胞处理及上机测定。

### C. Annexin-V/PI 染色

收集 Neuro2a 细胞后,洗涤 2 遍。100  $\mu$ l 1 $\times$ Binding Buffer 重悬。Annexin V-FITC 5  $\mu$ l, PI 染液 5  $\mu$ l, 混匀, 避光、室温反应 15 min。洗涤后以 550  $\mu$ l 缓冲液重悬后上机检测。

### 2.6 血脑屏障渗透性检测

小鼠腹腔中注射 2% EB 溶液 400  $\mu$ l, 1 h 后 2% 戊巴比妥麻醉, 100 ml PBS 心脏灌注。剥离出脑组织, 观察脑组织颜色外观并拍照。脑内 EB 定量: 脑组织称重后加入 1 ml PBS 充分匀浆后加入 1 ml 100% TCA 充分混匀(大于 2 min), 然后 4 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 6000 rpm 离心 30 min, 收集上清, 上机测定上清 OD<sub>620nm</sub>。以梯度稀释 EB 制作浓度吸光度值标准曲线, 以此计算脑组织 EB 含量 ng/g。

### 2.7 qRT-PCR

见第一部分。

### 2.8 Western-blot

见第一部分。

## 3. 结果

### 3.1 MSC 的分离培养鉴定

采用全骨髓贴壁法分离培养 MSC, 经连续换液除去未贴壁细胞, 逐渐得到较纯的 MSC。第 5-8 代 MSC 呈形态均一的梭形, 当铺满时细胞密集排列可呈漩涡状(图 2-1A)。流式细胞术检测其阳性标志分子 Sca-1、CD44 阳性率大于 95% (图 2-1B); 阴性标志分子 CD34、CD45、I-A/I-E 阳性率小于 5% (图 2-1C), 均符合干细胞鉴定标准。体外诱导培养可使 MSC 分化为脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞(图 2-1D)。这提示已成功制备了符合标准的 MSC。

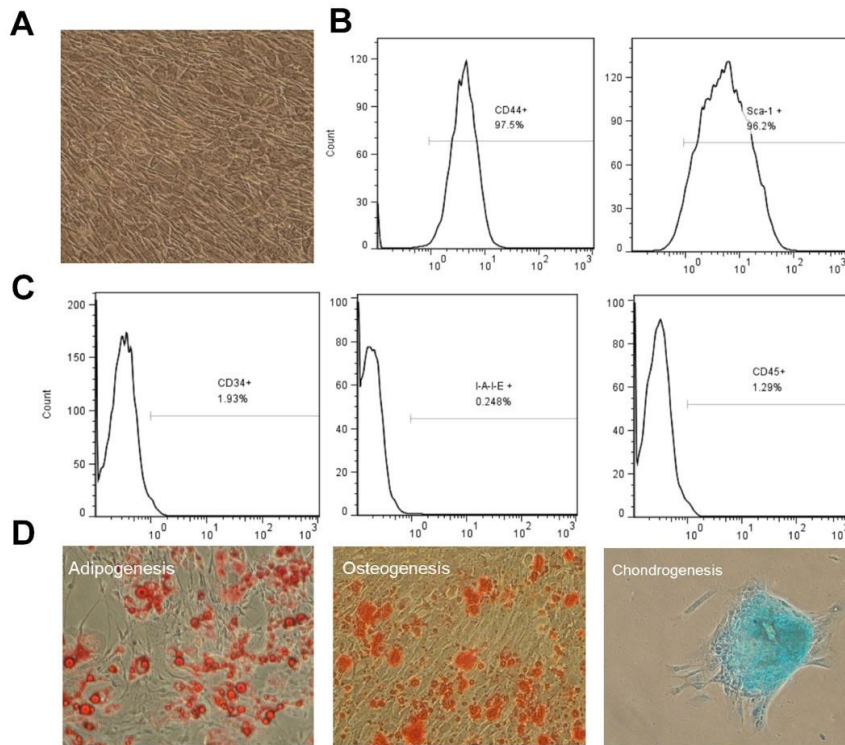


图 2-1 MSC 表面分子标志及分化特征的鉴定

Fig. 2-1 Characterization of mouse MSC

(A) The typical spindle-shape morphology of MSC. (B), (C), Analysis of the surface makers on MSC by flow cytometry. (D).Differentiation of MSC into adipocytes, osteocytes and chondrocytes

### 3.2 MSC 移植可缓解 JE 病情进展，降低死亡率

在多种细菌和病毒感染引起的炎症损伤中，MSC 移植可减轻组织炎症反应。JE 以中枢神经系统的炎症反应为主要特点。为观察 MSC 对 JE 病情进展的作用，我们构建了 JEV 感染模型，并在 1、3 dpi 分别进行尾静脉移植 MSC。之后每天观察、测量并记录各组小鼠的行为学、体重变化及死亡率。结果显示，未进行 MSC 移植的 JEV 感染小鼠，在感染后第三天开始出现发病的典型表现，最初为竖毛，体重下降，逐渐发展为行动迟缓，肢体僵硬，蜷缩，重者可出现后肢瘫痪，抽搐直至死亡。而 MSC 移植组较少出现上述严重表现，大部分小鼠出现体重下降，轻度竖毛后未进一步恶化而逐渐恢复（图 2-2）。这提示在 JE 小鼠模型中，MSC 移植可缓解病情进展并降低死亡率。



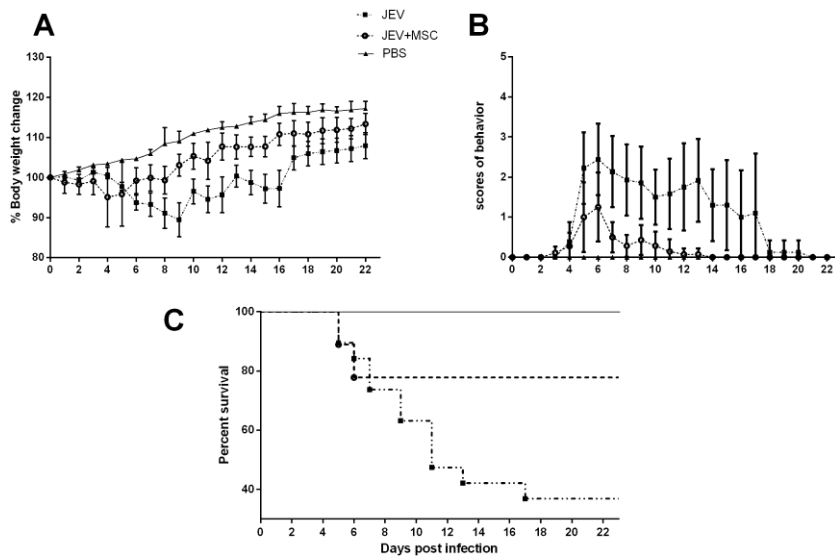


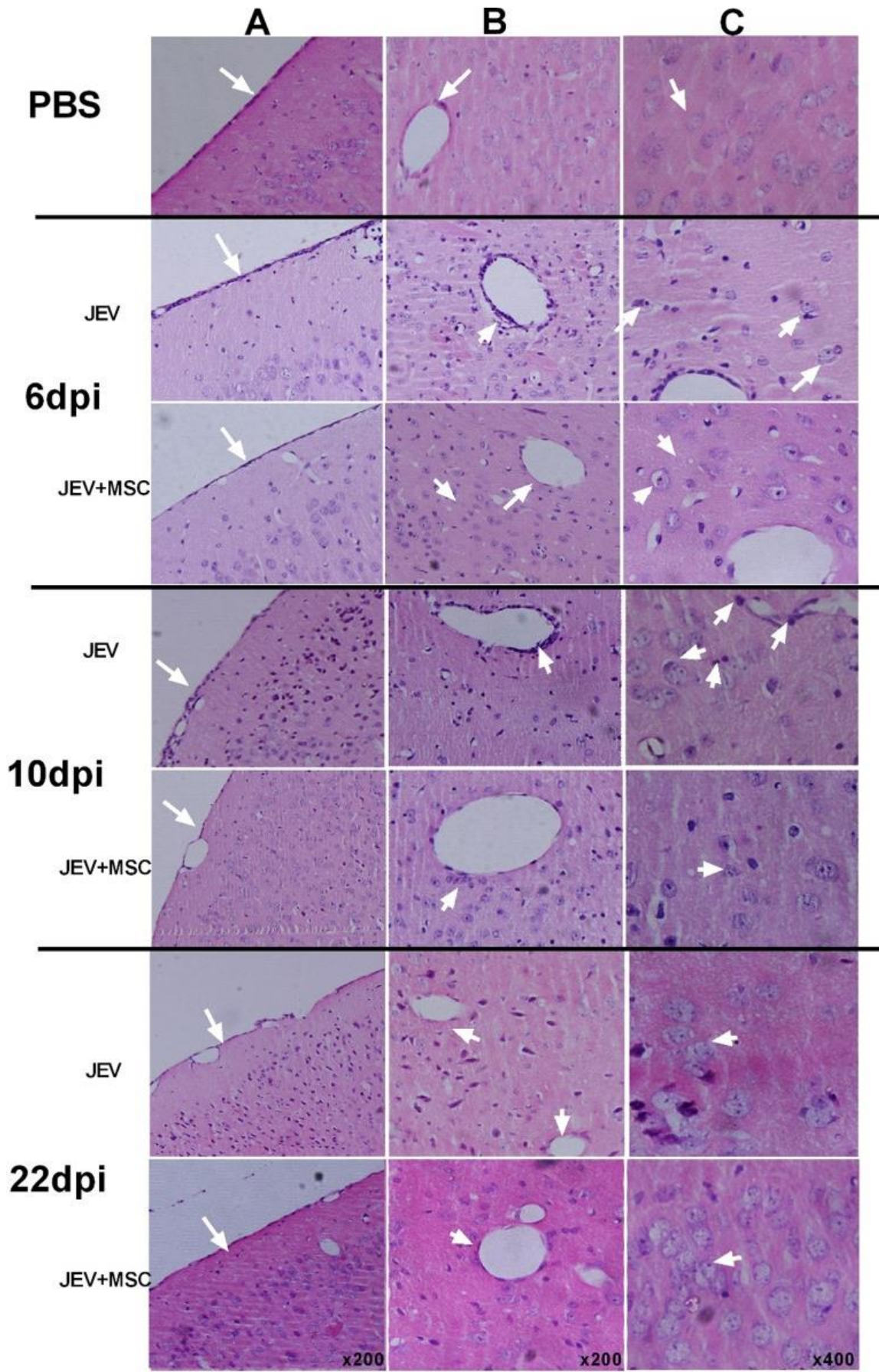
图 2-2 MSC 移植缓解 JE 病情进展，降低死亡率

Fig. 2-2 MSC treatment protects mice from JEV infection-induced lethality

(A) The weight of the mice in each group was recorded between 16:30-17:00 daily for 22 days until all the groups were completely stable (PBS=7, JEV=18, JEV+MSC=18). (B) The behavior scores were monitored and recorded twice a day according to the scoring criteria; the data are presented as the mean  $\pm$  95% CI. (C) The death and survival of the mice were recorded every day and then analyzed and presented as Kaplan–Meier survival curves.

### 3.3 MSC 移植减轻 JEV 感染导致的炎症反应

为检测 MSC 移植组与非移植组脑组织炎症损伤的差异，分别于感染后第 6、10、22 天取材行组织 HE 染色。在 6、10 dpi，非移植组呈现出明显的炎症反应，包括脑膜炎细胞浸润、血管套现象、组织炎细胞浸润及嗜神经现象。MSC 移植组炎症反应明显减轻，炎细胞浸润、血管套现象缓解、神经元损伤减少。在 22 dpi，存活小鼠 JE 症状缓解甚至消失，脑组织炎症反应消退（见图 2-3A, B, C）。因在第 6 天与第 10 天脑组织炎症程度相似，且在第 6 天 MSC 移植组与非移植组开始出现不同的临床表现，故我们在第 6 天行组织取材进行炎症分子表达水平的测定。可见，在 6 dpi 脑组织中主要炎症因子表达水平如 CCL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  在 JEV 感染组明显升高，而 MSC 移植组的炎症因子表达水平下降（见图 2-3D）。在体外共培养实验中，MSC 与 JEV 感染 Neuro2a 细胞共培养后，MSC 中免疫调节因子 TSG-6、TGF- $\beta$  表达水平明显升高（见图 2-3E），提示 MSC 可通过分泌免疫抑制分子缓解 JE 的炎症损伤。



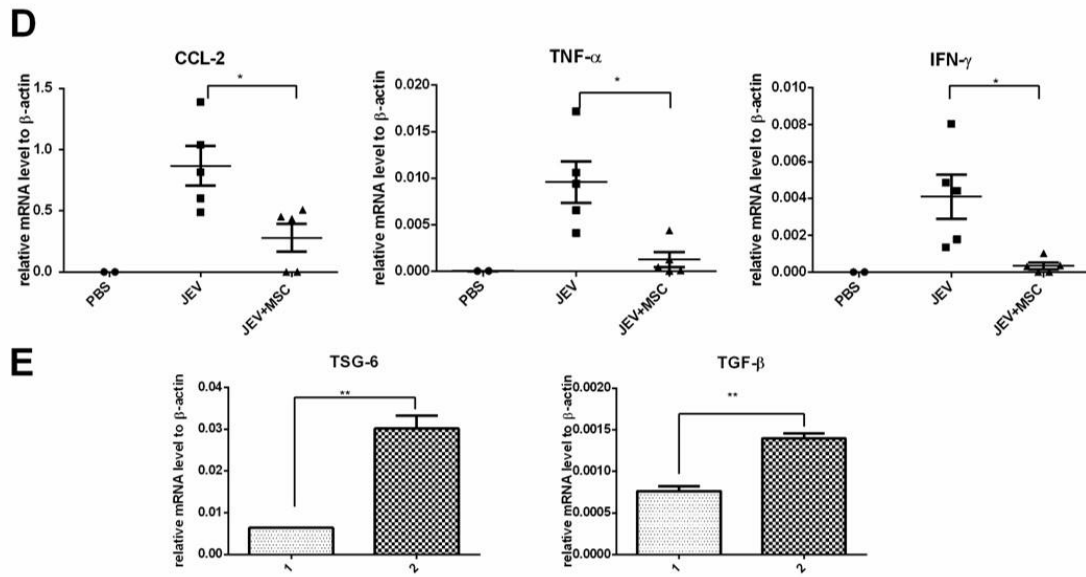


图 2-3 MSC 移植减轻 JEV 感染诱导的炎症损伤

Fig. 2-3 MSC transplantation attenuates the JEV-induced inflammation in mouse brain

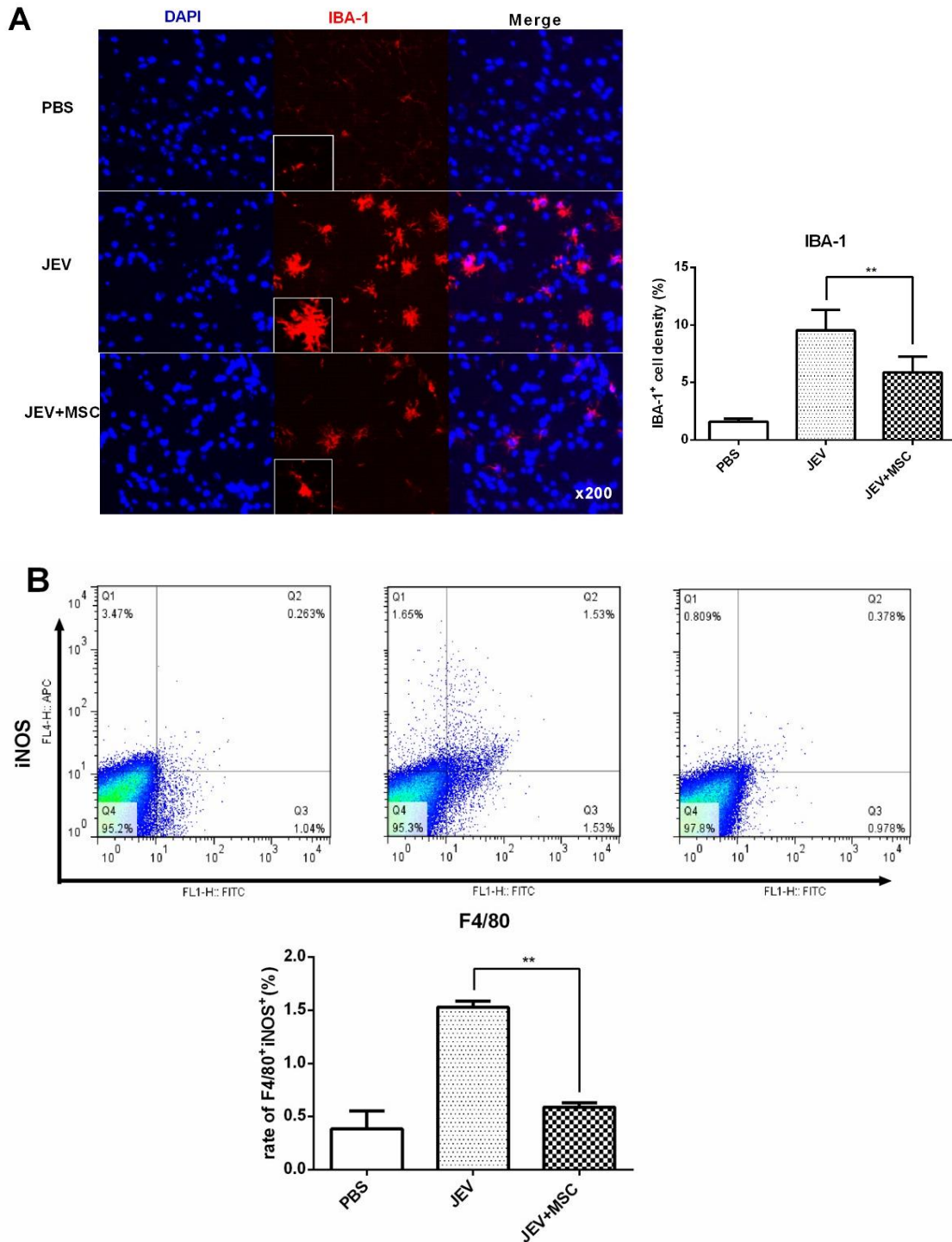
(A) Severe meningitis in JEV-infected mice as indicated by arrows at 6, 10 dpi and disappeared at 22 dpi. (B) Perivascular cuffing with inflammatory cell infiltration. (C) Representative neurons as indicated by arrows (PBS=3, JEV=6, JEV+MSC=6). (D) The expression of the inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and CCL-2 in the brains from JEV-infected mice and the MSC treatment group at 6 dpi (PBS=2, JEV=5, JEV+MSC=5). (E) The expression of TSG-6 and TGF- $\beta$  in MSC was increased when cocultured with JEV-infected Neuro2a cells via transwells (1. MSC; 2. MSC cocultured with JEV-infected Neuro2a cells). The data represent the mean  $\pm$  SEM for 3 independent experiments).

### 3.4 MSC 抑制小胶质细胞的过度活化并调控其 M1 向 M2 极化状态

小胶质细胞的过度活化是 JE 发病中加重脑组织炎症损伤的主要原因之一。鉴于 MSC 移植后 JEV 感染小鼠脑组织的炎症水平明显降低，为此我们进一步检测小胶质细胞的活化状态。结果显示，JEV 感染后脑组织 IBA-1 (小胶质细胞活化标志分子) 的表达水平在非移植组明显增加，而其在 MSC 移植组中表达水平下调 (图 4-1A)。同时，流式细胞术检测发现非移植组脑组织中 F4/80<sup>+</sup> iNOS<sup>+</sup> 细胞群比例增加，提示 JEV 感染可刺激小胶质细胞活化并呈经典 M1 型极化，而 MSC 移植后 M1 型活化减少 (图 4-1B)。这提示 MSC 移植可抑制小胶质细胞 M1 型活化极化。

已有文献报道 MSC 可调控小胶质细胞极化类型，诱导小胶质细胞由 M1 型 (经典型，促炎型，CD86<sup>+</sup> iNOS<sup>+</sup>) 向 M2 型 (相对活化型，抑炎型，Arg1<sup>+</sup> MR<sup>+</sup>) 转化。为此我们通过体外实验，进一步探索 MSC 对 JEV 感染诱导的小胶质细胞活化类型

的调控作用。将 MSC 与小胶质细胞以 1: 10 混合培养，以 MOI=5 感染 JEV，48h 后收集细胞行流式检测。结果显示，与 MSC 混合培养组 F4/80<sup>+</sup>MR<sup>+</sup>细胞比例增加，而 F4/80<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup>细胞比例减少。同时，与 MSC 混合培养组 N9 细胞 CD86 和 iNOS 表达水平降低，而 Arg1 和 MR (CD206) 表达水平上调，这提示通过混合培养，MSC 可调控 N9 细胞向 M2 型极化。



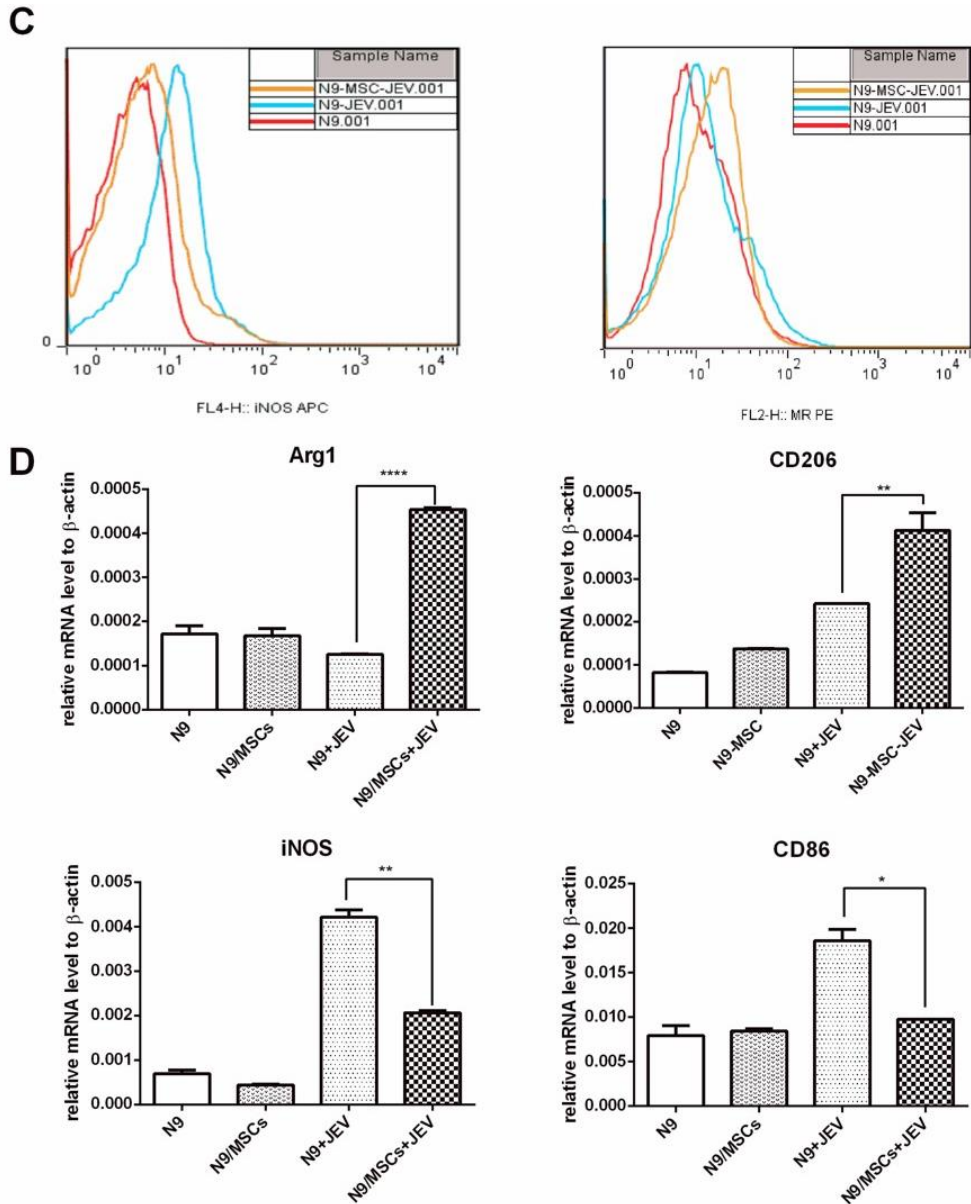


图 2-4 MSCs 抑制小胶质细胞过度活化并调控小胶质细胞 M1 向 M2 极化状态

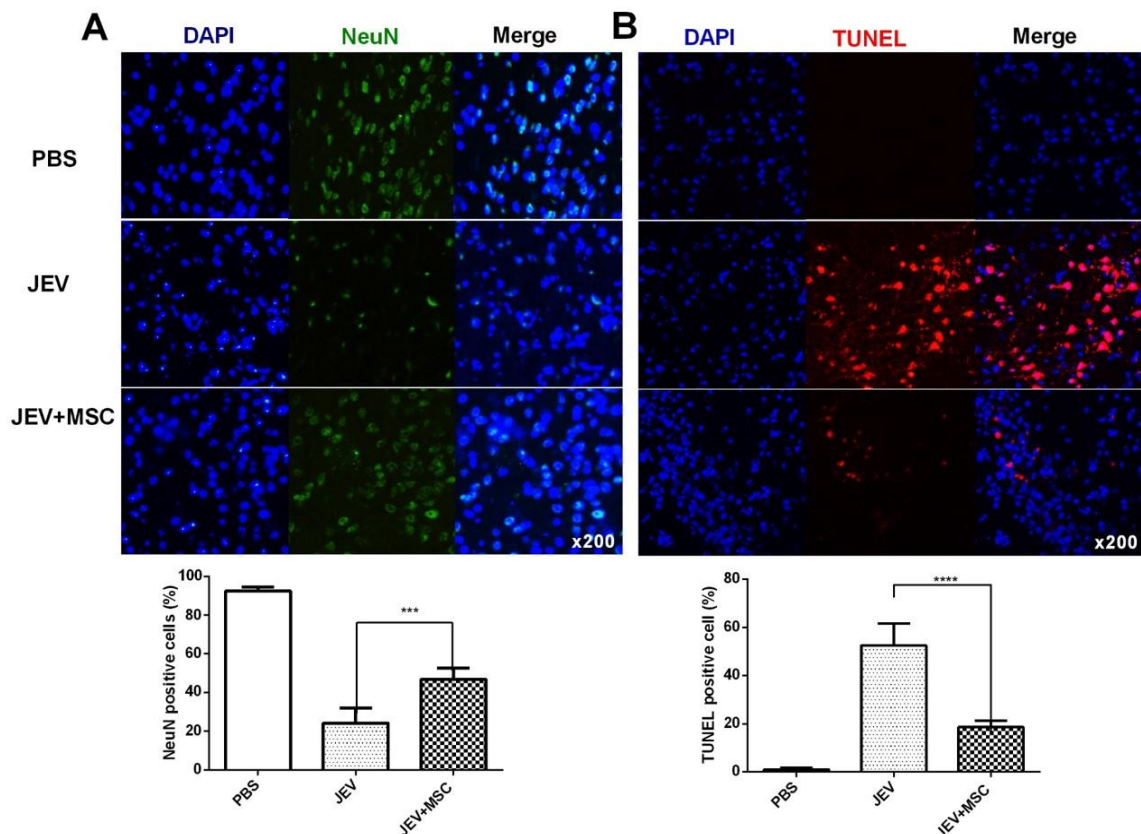
Fig. 2-4 MSC transplantation inhibits the activation of microglia and regulates the M1-to-M2-like phenotypic switching

(A) The activation of microglia was detected by anti-IBA-1 antibody with the boxed areas indicating a higher magnification (left) and the intensity of IBA<sup>+</sup> cell of each group was analyzed with Image J (right) (PBS=3, JEV=6, JEV+MSCs=6, 3 sections per animal; 5 fields per section). (B) Total brain tissue was harvested, and the percentage of F4/80<sup>+</sup> iNOS<sup>+</sup> cells (left) was calculated; the mean of the percentage (right) of M1 macrophages from each group was summarized (PBS=2, JEV=3, JEV+MSC=3). (C) The expression levels of the M1 marker iNOS and the M2 marker MR (CD206) were analyzed by Flow Jo. (D) The expression levels of Arg1 and CD206 as well as iNOS and CD86 in

N9 and N9-MSCs cultures either with or without JEV infected with JEV was detected by qRT-PCR. The data represent the mean  $\pm$ SEM for 3 independent experiments.

### 3.5 MSC 抑制 JEV 感染神经元死亡

在 JE 发生发展中,促炎因子的大量释放、炎细胞的浸润可导致神经元损伤和死亡。为检测 MSC 是否能够抑制 JEV 感染神经元的死亡,我们进一步检测了移植组与非移植组神经元的存活率差异。结果显示, MSC 移植组中脑组织 NeuN (神经元标志分子) 阳性细胞比例明显较对照组增加 (图 2-5A)。同时, TUNEL 染色显示非移植组中存在大量神经细胞死亡,而 MSC 移植组细胞死亡数量下降 (图 2-5B)。此外,与非移植组相比,脑组织中活化形式的凋亡酶 Caspase3p17 在 MSC 移植后降低,而凋亡抑制分子 BCL-2 表达水平上调 (图 2-5C)。为检测在 JEV 感染过程中 MSC 能否直接抑制神经元的死亡,我们将 Neuro2a 细胞和 MSC 通过 transwell 共培养以验证 MSC 能否通过分泌细胞因子或其他分子直接提高 Neuro2a 细胞的存活率。JEV 以 MOI=1 感染 Neuro2a 细胞,48h 后,行 annexin V/PI 染色及流式检测,结果显示,与 MSC 共培养组 Neuro2a 细胞的存活率高于对照组 (图 2-5D)。这提示 MSC 可直接抑制 JEV 感染引起的神经元死亡。



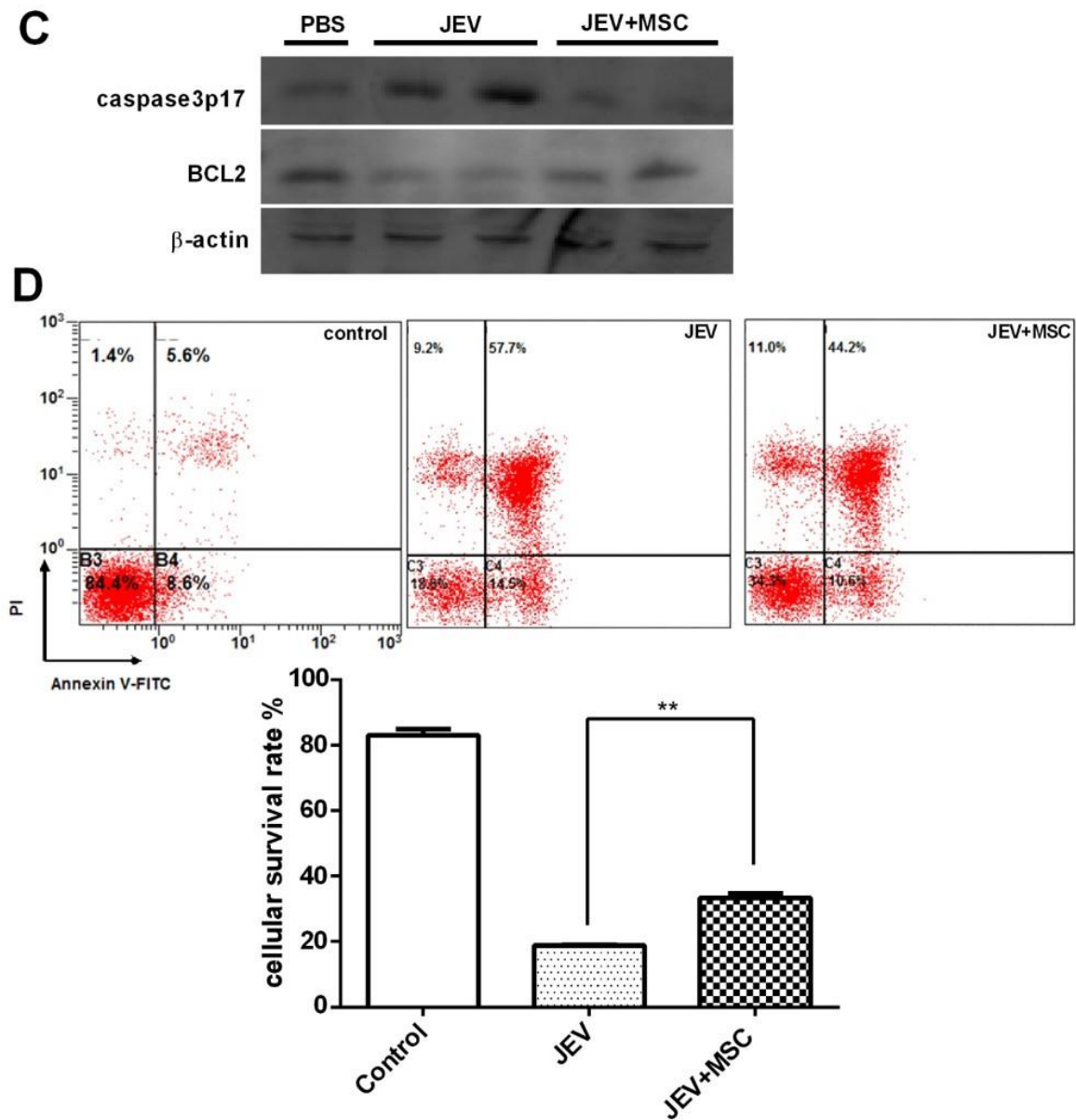


图 2-5 MSC 降低神经元的死亡率

Fig. 2-5 MSC reduce neuronal death in vivo and in vitro

(A) The survival rate of neurons was detected with anti-NeuN antibody staining. (B) The TUNEL assay was performed to detect neuronal apoptosis, and the sections from each group were analyzed with ImageJ. (PBS=3, JEV=6, JEV+MSC=6; 3 sections per mouse, 5 fields per section). (C) The total protein of whole brain tissue was extracted, and the expression levels of the active caspase-3 subunit P17 (caspase-3 p17) and BCL2 in the brains of each group were detected by western blot (PBS=1, JEV=2, JEV+MSC=2). (D) Neuro2a cells were cultured via transwells either with or without MSCs and were infected with JEV at MOI=1. After 48 hours, annexin V/PI staining was performed, and the mean of the survival rate was summarized from 3 independent experiments.

### 3.6 MSC 移植治疗降低血脑屏障的渗透性

在多种中枢神经系统疾病模型中, MSC 可通过分泌 TIMP3、TSG-6 等多种分子参与提高血脑屏障的完整性。在 JEV 感染过程中, 脑组织炎症反应和 JEV 直接作用均可导致血脑屏障的破坏。为验证 MSC 移植治疗对血脑屏障的影响, 我们采用 EB 染料检测血脑屏障的完整性。结果显示, 非移植组中脑组织因 EB 染料滞留出现着色, 而 MSC 移植组的脑组织外观颜色与对照组相似 (图 1-6A)。进一步定量测量脑组织 EB 染料的残留量, 非移植组 EB 含量明显高于对照组, 而 MSC 移植组 EB 含量降低 (图 1-6B)。脑组织紧密连接蛋白 ZO-1 染色结果显示, MSC 移植组 ZO-1 含量较对照组升高 (图 1-6C, D)。这提示 MSC 移植可减轻血脑屏障的破坏。

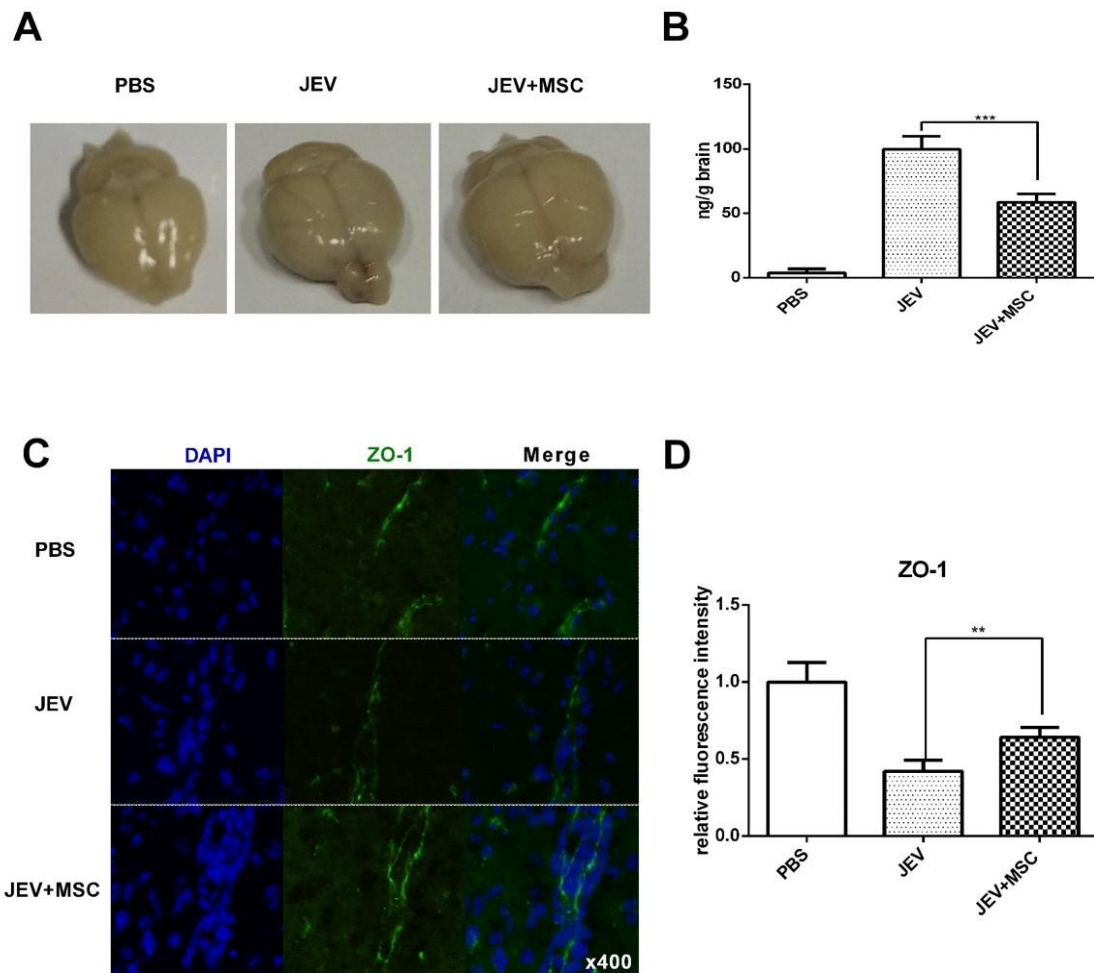


图 2-6 MSC 移植治疗降低血脑屏障的渗透性

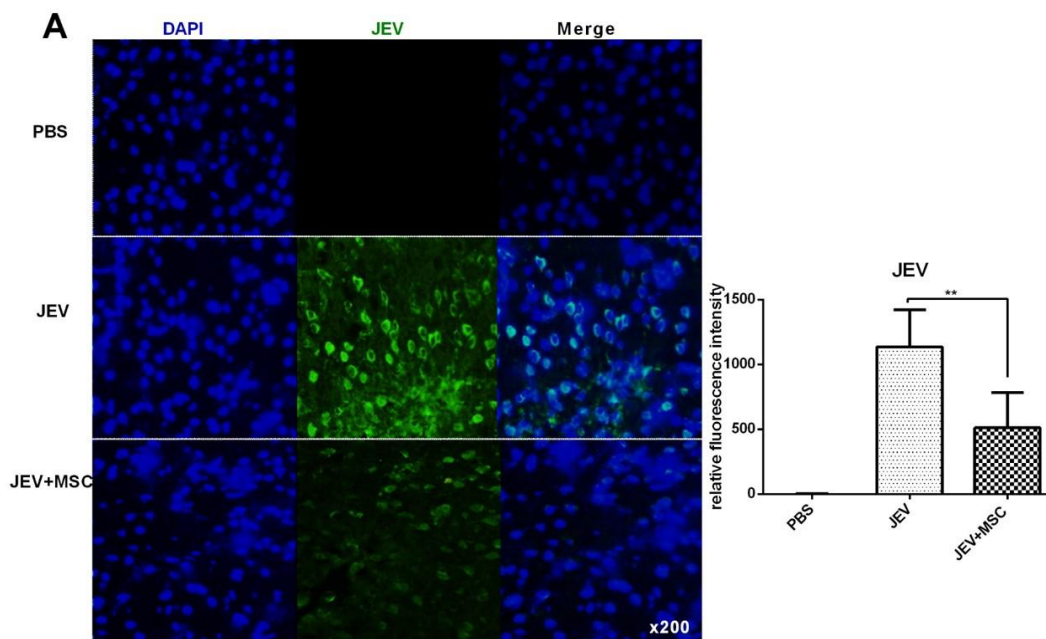
Fig. 2-6 MSC transplantation alleviates virus-induced disintegration of the BBB and improves the expression of ZO-1 in the mouse brain



(A) BBB permeability was evaluated by the uptake of Evans blue dye assay (EB), and the brains were removed and photographed. These pictures show extravasated EB staining of the whole brain at 6 dpi. (B) The absorbance of EB in the brain was measured at 620 nm using a spectrophotometer and recorded as nanograms of dye per gram of brain tissue (PBS=2, JEV=3, JEV+MSC=3). (C) The expression of the tight junction protein zonula occludens-1 (ZO-1). (D) The fluorescence intensity of ZO-1 staining was analyzed using ImageJ (PBS=3, JEV=6, JEV+MSC=6, 3 sections per mouse and 5 fields per section).

### 3.7 MSC 抑制 JEV 病毒复制

尽管 MSC 可抑制炎症反应改善脑组织微环境，但 JEV 感染早期适度的炎症反应有利于病毒的清除，那么降低的炎症反应是否会导致脑组织 JEV 的大量增殖有待验证。为此我们检测了移植组和非移植组的小鼠脑组织内 JEV E 蛋白的表达量和病毒拷贝数。结果显示，MSC 移植后脑组织内病毒载量不但没有增加反而出现降低（图 2-7A, B）。同时，我们在体外实验中以不同浓度的 MSC 与 Neuro2a 细胞混合培养，以 MOI=1 的 JEV 感染 Neuro2a 细胞，随着共培养 MSC 数量的增加，病毒载量逐渐降低（图 2-7C 左）。而且，MSC 共培养可降低 JEV 在 Neuro2a 细胞中的增殖速率（图 2-7C 右）。Neuro2a 细胞通过 transwell 与 MSC 共培养后，其病毒载量也出现降低（图 2-7D 左）。同时我们发现 MSC 中 IFN- $\beta$ 、IFN- $\alpha$  水平在与 JEV 感染的 Neuro2a 细胞共培养后明显升高（图 2-7D 右）。这提示 MSC 可能通过分泌 IFN- $\beta$ 、IFN- $\alpha$  抑制 JEV 增殖。



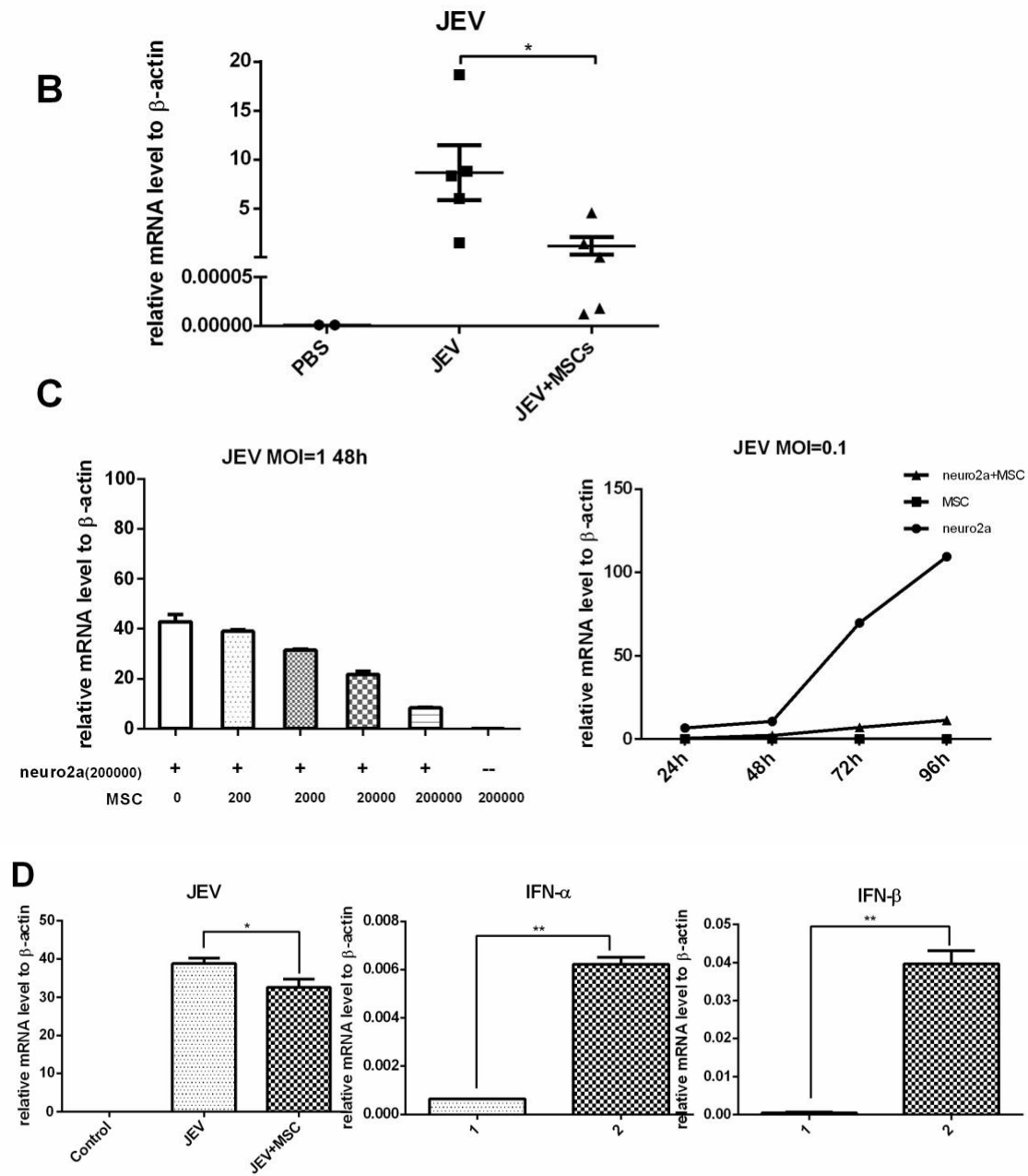


图 2-7 MSC 抑制 JEV 病毒复制

Fig. 2-7 MSC prevent JEV propagation via interferon expression

(A) The viral load of JEV in the brain was assessed by detecting E protein through immunofluorescence, and the fluorescence intensity was analyzed using Image J (PBS=3, JEV=6, JEV+MSC=6, 3 sections per mouse and 5 fields per section). (B) The viral load of JEV was tested by qRT-PCR (PBS=2, JEV=5, JEV+MSC=5) at 6 dpi. (C) Neuro2a cells cocultured with different numbers of MSCs and infected with JEV (left panel) and Neuro2a cells cocultured with MSCs for different time (right panel) were harvested and viral titer was determined by qRT-PCR. (D) Neuro2a cells were cocultured with MSCs by transwell system at a ratio of 10:1, and Neuro2a cells were

infected with JEV at MOI=1. The Neuro2a cells and MSCs were harvested 48 hours later, and the viral copy number in Neuro2a cells and the expression of IFN- $\beta$  and IFN- $\alpha$  in MSCs were detected by qRT-PCR. The data represent the mean  $\pm$ SEM for 3 independent experiments.

## 4. 讨论

近年来, MSC 以其免疫调节、多向分化、营养支持、定向迁移等功能在多种疾病的基础研究和临床实验中取得巨大进展<sup>[82]</sup>。多项研究证实 MSC 在 CNS 疾病和病毒感染性疾病中均有着良好的治疗效果<sup>[132]</sup>。在 CNS 疾病中, MSC 可通过抑制脑组织炎症反应并分泌多种神经营养因子促进神经系统的修复<sup>[133]</sup>。在 MSC 治疗病毒感染性疾病方面, 已有研究表明外源性 MSC 移植能降低流感病毒所致的急性肺损伤<sup>[106, 134]</sup>。本研究首次在小鼠模型上证实 MSC 移植可以缓解 JE 的进展, 并降低死亡率。

本部分实验中, 我们采用 8~10 周 BALB/c 小鼠构建 JE 模型, 这也是大家公认的 JE 动物模型之一。BALB/c 小鼠经腹腔注射途径感染 JEV 后可表现出典型的神经元损伤症状和病理变化。此外, 8~10 周的小鼠在行尾静脉移植时更易于操作。在预实验中进行 MSC 尾静脉移植时, 我们发现 MSC 数量超过  $5 \times 10^5$  时小鼠容易发生栓塞死亡, 因此在实验中每次进行 MSC 移植的细胞数量为  $5 \times 10^5$ , 避免小鼠意外死亡。为了保证体内移植 MSC 的细胞量, 在感染后第 1、3 天分别进行尾静脉移植。鉴于我们主要关注 MSC 移植治疗对于 JEV 感染所致急性炎症损伤的治疗作用, 故取材检测均在感染后第 6 天进行。关于 MSC 的多向分化潜能及其对海马区神经干细胞的营养支持作用, 以及 MSC 治疗后对 JE 后遗症改善的作用将是我们后续研究的重点。

在本研究中, 我们首先验证了 MSC 移植对于 JE 疾病进展和存活率的影响, MSC 移植组小鼠的临床症状和存活率都显著改善。脑组织 HE 染色进一步证实了 MSC 对 JE 病理损伤的改善。MSC 移植后脑组织炎症水平、小胶质细胞活化、神经元死亡情况及血脑屏障的渗透性都明显降低。这与 MSC 在治疗其它 CNS 疾病中的作用机制基本一致。

过度的炎症反应是 JE 的主要致病机制, 降低炎症反应可以减少神经元的死亡, 并促进神经组织修复<sup>[135]</sup>。然而, 在病毒感染性疾病中适度的免疫和炎症反应对于早期病毒的清除具有重要作用。因此, 维持适度的免疫反应而又不引起过度的炎症

损对于 CNS 病毒感染的治疗至关重要。如何平衡免疫保护与免疫病理损伤是病毒感染性疾病治疗的一个难点。近些年来, 多项研究发现 MSC 具有强大的免疫调节能力, 在多种自身免疫性疾病和感染性疾病中发挥着积极的治疗作用, 而且它的免疫调节功能具有高度可塑性<sup>[136]</sup>。在机体不同免疫状态中, MSC 可呈现出不同的表型发挥促炎或抗炎的作用。在本实验中, 我们发现在 JEV 感染引起脑炎的急性期, MSC 治疗明显减轻了脑组织的炎症水平。对于感染初期, MSC 是否可增强机体的免疫防御功能以加速病毒的清除, 以及 MSC 对于 JEV 感染机体的免疫状态的动态调控作用也值得进一步探索。

小胶质细胞的大量活化是导致 JE 炎症损伤的重要原因<sup>[137]</sup>。小胶质细胞活化可释放 TNF- $\alpha$  等炎症因子导致神经元的损伤, 形成炎症因子风暴。抑制小胶质细胞的过度活化是控制 JE 炎症损伤的关键。有研究证实, MSC 可抑制小胶质细胞的过度活化, 并调控小胶质细胞 M1 (经典活化, 促炎) -M2 (相对活化, 抑炎, 促再生) 极化状态<sup>[138]</sup>。在本实验中, 与非移植组相比, MSC 移植组小鼠脑组织内小胶质细胞的活化明显下降。同时, 体外实验中我们发现, JEV 感染可诱导小胶质细胞的活化并向 M1 型极化。当 MSC 与 N9 细胞共培养时, N9 细胞的 M1 极化比例下降, 并呈现 M2 型极化趋势。这与之前关于 MSC 对小胶质细胞调控作用的报道一致。小胶质细胞 M2 型极化能抑制脑组织炎症反应, 促进神经系统的功能修复, 是 MSC 发挥治疗作用的主要机制之一。

在 MSC 神经保护作用方面。MSC 移植后能通过免疫调控作用抑制过度的炎症反应, 改善局部微环境, 减少神经元的炎症损伤和死亡。另外, MSC 也可分泌多种神经营养因子和生长因子, 提高神经元的存活率<sup>[133]</sup>。体外实验, 通过与 MSC 共培养, 我们发现 MSC 可显著提高神经母细胞瘤细胞系 Neruo2a 的存活率; 同时通过与 JEV 感染 Neruo2a 细胞共培养, MSC 的 TSG-6, TGF- $\beta$  等免疫调控因子的表达水平显著升高。在 JEV 感染过程中, 血脑屏障的破坏和脑组织炎症反应相互促进, 进而加重疾病进展。有研究报道, MSC 可分泌 Ang1、KGF 等减轻内皮细胞损伤同时还可分泌 TIM3 等抑制血脑屏障的破坏<sup>[106, 139]</sup>。本实验中, 与非移植组相比, MSC 移植组血脑屏障的完整性提高, 其机制可能涉及两个方面, 一方面缓解的炎症反应可改善血脑屏障的完整性。另一方面, MSC 可直接通过分泌一系列生长因子提高血管内皮细胞的功能状态。

值得指出的是，在试验中我们发现，MSC 移植组脑组织内病毒载量也较非移植组降低。一方面可能是 MSC 移植可改善机体的免疫状态，提高血脑屏障的完整性和中枢神经系统免疫防御功能，进而减少病毒的进入同时加速脑内病毒的清除。另外，我们通过体外实验证实，MSC 可分泌 I 型干扰素直接抑制病毒的复制。MSC 与 Neuro2a 细胞共培养或混合培养时，均可抑制 JEV 的扩增。Neuro2a 细胞与不同数量的 MSC 混合培养时，JEV 载量随 MSC 数量的增加而逐渐降低，呈现出明显的“剂-效关系”。与 JEV 感染的 Neuro2a 细胞共培养或 JEV 直接刺激均可诱导 MSC 表达高水平的 I 型干扰素和抗病毒相关的干扰素调节基因。这些提示，MSC 具有一定的抗病毒作用，其具体机制需要进一步探讨。

综上所述，在本实验中，通过体内外实验，我们首次证实 MSC 尾静脉移植可明显改善 JEV 感染小鼠的疾病进展和炎症损伤，提高生存率。为今后进一步研究 MSC 对 JE 感染的治疗作用奠定基础。

## 第三部分 Gas6-MSc 构建及对 JE 治疗效应的初步研究

MSc 具有靶向迁移功能。近年来,大量文献报道,对 MSc 进行基因修饰可以实现靶基因的定向表达并提高 MSc 的治疗作用。综合文献报道, Gas6 蛋白对于 CNS 免疫稳态的维持,髓鞘的生成以及神经组织的再生修复有着重要的作用。同时, Gas6 蛋白对于 BBB 完整性的维持也有着重要作用。在西尼罗病毒感染中, Gas6/ TAM 通路受损可导致 BBB 功能下降,病毒更容易进入 CNS,引起严重的感染损伤。故本实验,我们构建 gas6 基因修饰的 MSc,以期提高脑内 Gas6 浓度,增强 MSc 的生物学功能和治疗效应。

### 1. 材料

#### 1.1 实验动物及细胞

BALB/c 小鼠 (雌, 4~6 周, 6~8 周)购自实验动物中心。

HEK293T 细胞由本实验室保存。

#### 1.2 试剂

##### A. 购买试剂

- 1) 培养基,血清同第二部分。
- 2) 抗体 FITC-anti-SCA-1, PE-anti-CD44, FITC-anti-CD34, FITC-anti-CD45, PE-anti-I-A/I-E 荧光标记抗体购自 BD 公司;羊抗鼠 gas6 购自 Santa 公司; FITC 标记的驴抗羊 IgG 购自康为试剂公司。
- 3) 限制性内切酶 Mlu I、BamH I、Bgl II, 连接酶 Solution I、DNA marker, 反转录酶, Taq 酶购自 TaKaRa 公司; 高效率 SuperScript™ RT 反转录酶购自 invitrogen 公司; Q5 超保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司
- 4) 蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉购自 Oxiod 公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司。

5) 双荧光素酶检测试剂盒购自 GBT 公司; polybrene、zeocin、blasticidin 购自 Sigma 公司。

#### B. 配制试剂

- 1) **2×YT培养基**: 蛋白胨4 g、酵母粉2.5 g、NaCl 1.25 g, 加入去离子水溶解并定容至250 ml, 2N KOH调节pH值至7.0。高压灭菌后4℃保存。
- 2) **2×YT培养板**: 蛋白胨 4 g、酵母粉2.5 g、NaCl 1.25 g、琼脂粉3 g加入去离子水溶解并定容至250 ml, 2N KOH调节pH值至7.0后高压灭菌, 待温度降至40℃左右加入抗生素混匀后倒入培养皿, 凝固后于4℃保存。
- 3) **1000×氨苄青素**: 氨苄青霉素1 g, 去离子水溶解并定容至10 ml, 0.22 μm滤器过滤后1 ml/支分装, 于-20℃保存。
- 4) **4×PEG8000病毒沉淀液**: PEG8000 70 g, NaCl 23.4 g, 加入去离子水并定容至250 ml。高压灭菌后于4℃保存, 使用前充分摇匀。

### 1.3 实验耗材

同第一和第二部分。

### 1.4 仪器设备

同第一和第二部分。

### 1.5 引物

引物由上海生工合成 (表 3-1)

表 3-1 引物序列  
Table 3-1 primer sequence

GAS6	F: 5'-CGCCCTGGGCACTGCGCTTC-3'	R: 5'-CACACCTCCTCCACGCACTC-3'
β-Actin	F: 5'-GACGGCCAGGTCATCACTAT-3'	R: 5'-CGGATGTCA ACGTCA CACTT-3'

### 1.6 质粒

pLenti-Fluc-blasticidin 质粒由生化教研室赵晶教授馈赠。

pLenti-CD40L-GFP-zeocin (pLenti-CD40L-GZ) 载体由本实验室构建。

psPAX2 和 pMD2.G 包装质粒由本实验室保存。

## 2. 方法

### 2.1 MSC 分离培养鉴定

方法同第二部分。

### 2.2 静脉移植后，CNS 内外源性 MSC 的检测

#### A. Fluc 慢病毒的制备及滴度测定

首先将 pLenti-Fluc-blasticidin、psPAX2、pMD2.G 质粒分别转化感受态 stlb3 后，挑单克隆、转接、质粒大提、浓度测定，冻存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。待 HEK293T 细胞密度达 70%~80%左右时，将  $9\ \mu\text{g}$  pLenti-Fluc-blasticidin， $6\ \mu\text{g}$  psPAX2， $3\ \mu\text{g}$  pMD2.G 加入无血清 DMEM 中，再加入  $72\ \mu\text{l}$  MAX 转染试剂室温孵育 15 min 之后将混合物滴加在细胞平皿中。分别于转染后 48 h、72 h 收集慢病毒上清，3000 rpm 离心 20 min 去除细胞碎片。病毒上清与  $4\times\text{PEG8000}$  按 3: 1 混合后  $4^{\circ}\text{C}$  摇床过夜充分结合后，以 10000 rpm/min 离心 30 min 弃尽上清后按 100: 1 加入 L-DMEM 重悬病毒沉淀，分装冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。将病毒液按梯度稀释后，分别感染 HEK293T 细胞，72h 后裂解细胞，加入荧光素酶底物溶液，测定发光度值以评估病毒滴度及感染效率。

#### B. Fluc 慢病毒感染 MSC 及稳定表达细胞的筛选

将 P3 代 MSC 接种于六孔板，待细胞密度达 50~60%左右，用 PBS 洗涤细胞 2 遍，病毒液与 polybrene 以 1000: 1 混合后加入六孔板中，每孔 1.5~2 ml。离心法感染 2 h ( $37^{\circ}\text{C}$ ，2000 g/min) 后，吸弃陈旧病毒液后，加入新鲜的培养基。4 h 后，吸弃旧培养基，用 1ml 新鲜的培养基洗涤 3 遍，除去细胞碎片，加入 2 ml 新鲜的培养基放入孵箱继续培养。72h 后加入  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  blasticidin 加压筛选，逐渐去除未转染细胞，每 3 天一次换液（含有 blasticidin）。大约一周后，细胞生长趋于稳定。收集稳定表达 Fluc 的细胞裂解后加入底物检测发光度值，以评价细胞内 Fluc 表达量。

#### C. MSC 细胞迁移至脑内的评价

按照第二部分方法建立 JE 小鼠模型。在 1、3 dpi 行 Fluc-MSC 或 PBS 尾静脉移植（每组 7 只），于 6 dpi 取脑组织。按照荧光素酶检测试剂盒说明，将脑组织于  $4^{\circ}\text{C}$  匀浆后，每组分别取  $10\ \mu\text{l}$  于 EP 管，加入  $100\ \mu\text{l}$  细胞裂解液( $10\times\text{cell lysis buffer}$  与 ddH<sub>2</sub>O 按 1: 9 混匀)后，冰上裂解 5 min 后充分震荡混匀，重复 5 次后  $4^{\circ}\text{C}$  离心



10 min (10000 g/min)。吸取 10  $\mu$ l 上清分别加入含有 10  $\mu$ l 底物 EP 管，吹吸混匀 3 次后，检测发光度值。

## 2.3 构建 pLenti-gas6-GZ 质粒

### A. Gas6 基因片段的扩增

根据 GenBank 上小鼠的 gas6 基因序列 (NM\_019521) 进行设计扩增引物并交由公司合成: F (Bgl II) 5'-GACGCAGATCTCTCGCCATGCCGCCACCGCCCGGG CCC-3' R (Mlu I) 5'-AACGCGTGGGGGTGGCATGCTCCACAGGCGGGCAG-3'。提取小鼠 MSC 总 RNA, 用 SuperScript™ RT 系统反转录合成 cDNA。采用 Q5 超保真型 DNA 聚合酶行 PCR 扩增 gas6 基因片段, 25  $\mu$ l 反应体系: 5 $\times$ Q5 Rection buffer 5  $\mu$ l; 10mM dNTPs 0.5  $\mu$ l; 10  $\mu$ M Forward primer 1.25  $\mu$ l; 10 $\mu$ M Reverse Primer 1.25  $\mu$ l; Template DNA 5  $\mu$ l; Polymerase 0.25  $\mu$ l; 5 $\times$ Q5 High GC enhancer 5  $\mu$ l; Nuclease-free water 6.75  $\mu$ l。反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 30 s; (98 $^{\circ}$ C 10 s, 63 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s)  $\times$ 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min; 4 $^{\circ}$ C hold。PCR 产物进行核酸电泳, 按照胶回收试剂盒说明书回收目的条带。

### B. pLenti-gas6-GZ 质粒构建

- a) 酶切 合成的 gas6 基因片段进行双酶切, 酶切体系: gas6 30  $\mu$ l, Bgl II 1.5  $\mu$ l, Mlu I 1.5 $\mu$ l, 10 $\times$ Buffer H 5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ l ; 37 $^{\circ}$ C, 2 h。同时 pLenti-CD40L-GZ 载体行双酶切, 酶切体系: pLenti-CD40l-GZ 4  $\mu$ l, BamH I 1.5  $\mu$ l, Mlu I 1.5  $\mu$ l, 10 $\times$ Buffer K 5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 38  $\mu$ l; 37 $^{\circ}$ C, 2 h。酶切产物行核酸电泳并回收目的条带。
- b) 连接 将上述胶回收产物按照如下连接体系进行连接: pLenti-GZ 1.5  $\mu$ l、gas6 3.5  $\mu$ l、Solution I 5  $\mu$ l, 置于 16 $^{\circ}$ C 反应 2 h。
- c) 转化, 涂板 取出-80 $^{\circ}$ C冻存的 Stlb3 感受态 (约 100  $\mu$ l 分装) 在冰上溶解, 加入上述 10  $\mu$ l 连接产物充分混匀后, 冰浴 30 min (间断震荡摇匀), 再加入约 890  $\mu$ l 2 $\times$ YT, 37 $^{\circ}$ C摇床摇 1.5 h (210 rpm) 后 3000 rpm 离心 3 min, 200  $\mu$ l 2 $\times$ YT 重悬沉淀后均匀涂氨苄抗性的 L-琼脂平板。置于 37 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养过夜。
- d) 挑单克隆, 鉴定 次日挑取单个菌落转接到含 1 $\times$ 氨苄青霉素的 5 ml LB 培养基中, 按 250 rpm 振摇过夜, 37 $^{\circ}$ C。集菌后进行质粒小提并行 PCR 鉴定, 阳性者进行

测序，并冻存菌液。待测序结果比对正确者大量摇菌，集菌后行质粒大提，质粒浓度测定后于-20℃保存。

## 2.4 制备 gas6-GZ 慢病毒

- A. 细胞培养** 常规培养 HEK 293T 细胞，在转染前一天接种于 T75 培养瓶，次日密度约达 70-80%时，弃去培养基，PBS 洗涤一遍后加入 5 ml DMEM，37℃孵箱饥饿处理 30 min。
- B. 转染** 首先在离心管中配置 A 和 B， A: 9 μg Gas6 质粒，6μg psPAX2，3 μg pMD2.G 加入 500 μl DMEM 中混匀，静置 5 min。B: Max 转染试剂 72 μl 加入 500 μl DMEM 混匀后静置 5 min。然后将 A 与 B 充分混匀室温静置 15 min 后加入上述处理的 HEK 293T 细胞。转染 4 h 后弃去质粒-转染制剂复合物，再加入 10 ml 含 10% FBS 的 DMEM 继续培养。待转染 12 h 后荧光显微镜下可见绿色荧光。弃去陈旧培养基，加入新鲜的培养基继续培养。分别于 48 h，72 h 收集病毒上清。
- C. 病毒浓缩与表达鉴定** 将上述收获的病毒上清在 4℃离心 30 min (6000 rpm)后以除去细胞碎片，病毒上清与 4×PEG8000 按 3: 1 混合在 4℃摇床过夜充分结合，行 10000 rpm 离心 30 min，弃净离心上清后按 100: 1 加入 DMEM 重悬病毒沉淀，分装冻存于-80℃。将重悬病毒液梯度稀释后感染 HEK 293T，根据稀释倍数和荧光阳性细胞比例评估病毒滴度。同时，将感染后 HEK 297T 细胞接种于小圆片，贴壁后进行免疫荧光检测 Gas6 蛋白表达情况。

## 2.5 gas6 基因修饰 MSC 的建立及干性标志分子鉴定

取第三代 MSC 接种于 6 孔板，密度达 50-60%左右，PBS 洗涤细胞 2 遍，病毒液与 polybrene 以 1000: 1(终浓度 10 μg/ml)混合后加入六孔板，每孔 1.5-2 ml。离心法感染 2 h (37℃，2000 g/min)后，吸弃陈旧病毒液后，加入新鲜的培养基。4h 后，吸弃旧培养基，1 ml 新鲜的培养基洗涤 3 遍，除去细胞碎片，加 2 ml 新鲜的培养基，放入孵箱继续培养。48h 后，荧光显微镜下 GFP 阳性细胞约 20%，用含 zeocin (500 μg/ml)的 10%FBS 的 L-DMEM 筛选三周，阳性率可达 80-90%继续维持培养。将上述细胞与正常细胞收集后分别行流式细胞术检测 GFP 阳性细胞比例，同时进行 PE-anti-I-A/I-E，PE-anti-CD44 染色，行流式细胞术检测表达情况。

## 2.6 gas6-MSc 治疗 JE 模型的效应观察

按照第二部分方法,采用 6-8 周龄 BALB/c 小鼠构建 JEV 感染模型,对照组腹腔注射 PBS (PBS=3),在感染后第 1,3 天分别行尾静脉注射 MSC (JEV+MSC=9),gas6-MSc (JEV+gas6-MSc=9)及 PBS (JEV=4),每天观察记录每组小鼠体重变化,记录行为学评分及死亡率。

## 3. 结果

### 3.1 在 JE 小鼠模型中,尾静脉注射的 MSC 可迁移至脑内

为检测在 JE 模型中尾静脉移植的 MSC 能否迁移至脑内,我们构建了 Fluc 基因修饰的 MSC (Fluc-MSc)。结果显示,Fluc-MSc 可表达荧光素酶,其与底物荧光素钾盐作用后发光值为对照组的数十万倍(见图 3-1A)。于 1,3 dpi 进行 Fluc-MSc 尾静脉注射,在 6 dpi 麻醉小鼠后灌注取材,脑组织匀浆后分别检测对照组和 Fluc-MSc 移植组的发光值。结果显示移植组脑组织的发光度值明显高于对照组(见图 3-1B),这提示在 JE 模型中,经尾静脉注射的 MSC 可进入中枢神经系统。

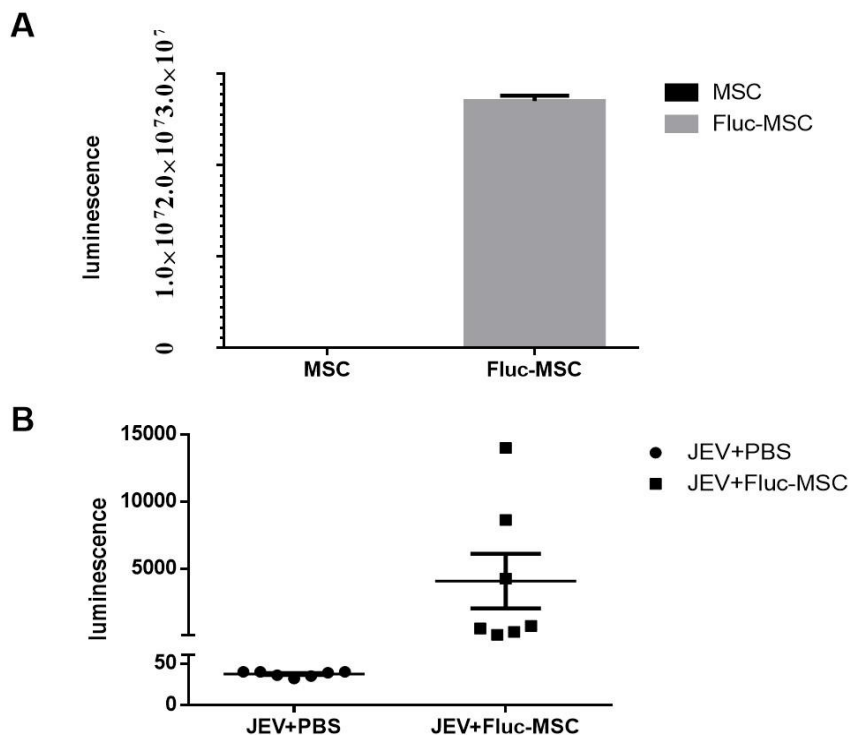


图 3-1 脑组织内荧光素酶活性检测

Fig. 3-1 Analysis of luciferase activity in the brain

(A) Fluc-MSc荧光素酶活性显著升高；(B) Fluc-MSc尾静脉移植组脑组织荧光素酶活性显著高于对照组（每组n=7）。

### 3.2 pLenti-gas6-GZ 质粒的构建及鉴定

MSC 总 RNA 提取后进行反转录和扩增，扩增产物进行琼脂糖核酸电泳得到目的片段（图 3-2A）。将目的片段与载体分别双酶切后胶回收酶切产物（图 3-2B, C）。进行连接转化，菌落 PCR 初步鉴定获得阳性菌株（图 3-2D）。公司测序结果显示所构建质粒含有完整的目的基因片段（图 3-2E）。

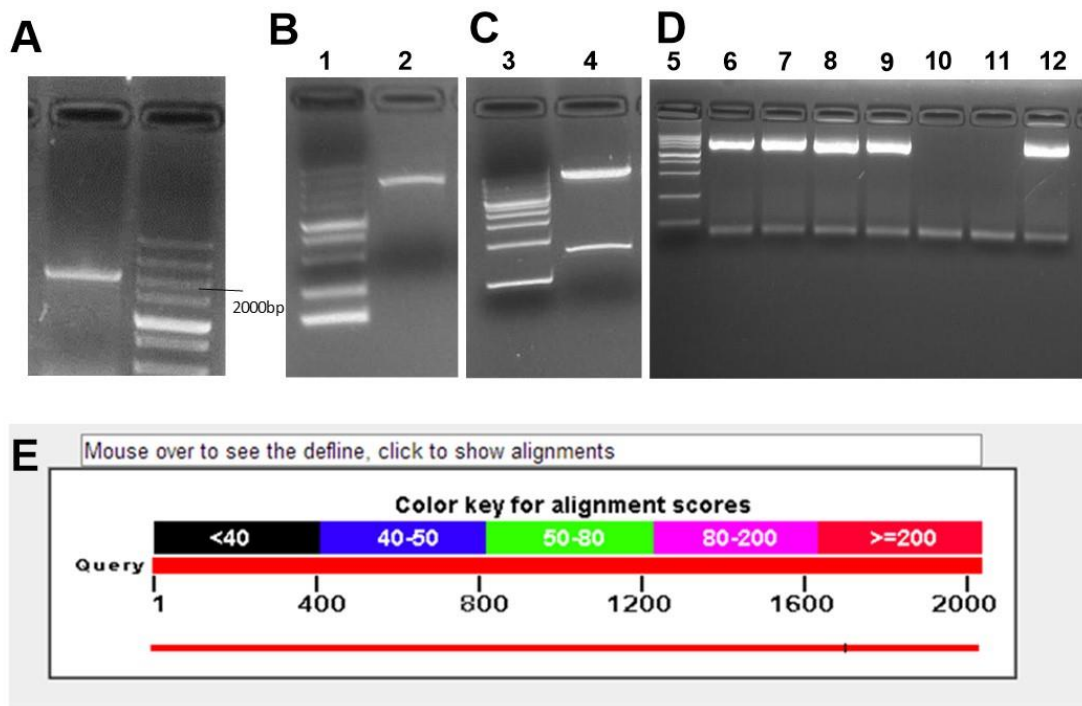


图 3-2 pLenti-gas6-GZ 质粒的成功构建

Fig. 3-2 The construction of pLenti-gas6-GZ

(A) gas-6 基因片段；(B) gas6 基因片断酶切产物鉴定 (1.Marker； 2.酶切产物)；(C) pLenti-gas6-GZ 双酶切产物鉴定 (3. Marker； 4.酶切产物)；(D) 菌液 PCR 扩增鉴定 (5. Marker； 6. 7. 8. 9. 12 阳性菌株)；(E) 测序结果比对

### 3.3 gas6 慢病毒的包装和表达

将浓缩的 gas6 慢病毒感染 HEK293T 细胞后，在感染后 48h GFP<sup>+</sup> 细胞可达 60% 以上（图 3-3A, B, C）。同时，gas6 基因表达水平（图 3-3D）和 Gas6 蛋白表达（图 3-3E, F）都显著升高。

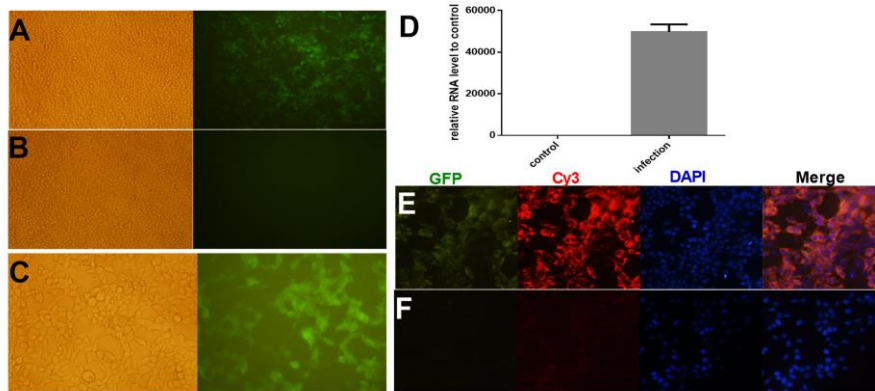


图 3-3 gas6 慢病毒的鉴定结果

Fig. 3-3 The identification of gas6 expressing lentivirus

(A) 慢病毒感染细胞后48h, 免疫荧光照片 ( $\times 100$ ); (B) 对照组免疫荧光照片 ( $\times 100$ ); (C) 400倍放大后细胞表达情况荧光照片; (D) 感染48h后, 慢病毒感染组细胞gas-6表达水平较对照组明显升高; (E) 感染后48h, GFP阳性细胞同时出现GAS-6蛋白高表达; (F) 对照组细胞无GFP及GAS6蛋白明显表达。

### 3.4 gas6-MSC 构建及鉴定

离心法感染 MSC 后, 经过药物筛选纯化得到纯度较高的 GFP<sup>+</sup>MSC (图 3-4A)。停止药物筛选后进行 MSC 传代培养。流式检测 GFP 阳性细胞可达 90% (图 3-4B), 即得到纯度较高的 gas6-MSC。MSC 表面标志分子的流式检测结果显示阳性分子 CD44 达 99.5% (图 3-4C), 阴性分子 I-A/I-E 仅 1.95% (图 3-4D), 符合干细胞鉴定标准。

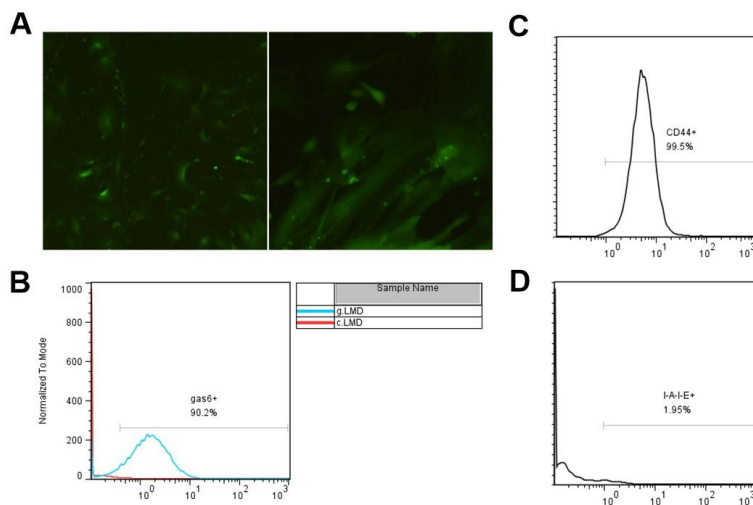


图 3-4 gas6-MSC 的构建及鉴定

Fig. 3-4 The Construction and identification of gas6-MSC

(A) 慢病毒感染后MSC绿色荧光(左100×, 右400×); (B) Gas6-MSC阳性率达90%;  
(C) gas6-MSC的 CD44阳性率大于95%; (D) gas6- MSC的I-A/I-E阳性率小于5%。

### 3.5 gas6-MSC 移植 JE 小鼠模型预评估

鉴于 Gas6 蛋白在中枢神经系统免疫反应调控、血脑屏障完整性维持, 脑组织再生修复等方面的作用, 我们检测了 JEV 感染后 gas6 表达水平与脑内病毒载量的关系。结果显示, JEV 病毒拷贝数与 gas6 表达水平呈负相关(图 3-5A)。将 gas6-MSC、MSC 分别尾静脉移植 JE 小鼠模型, 结果显示: 与 MSC 移植组相比, gas6-MSC 移植组体重(图 3-5B), 行为学评分(图 3-5C)及生存率(图 3-5D)获得一定程度的改善。这些结果提示在 JE 模型中 gas6-MSC 具有更好的治疗效应。

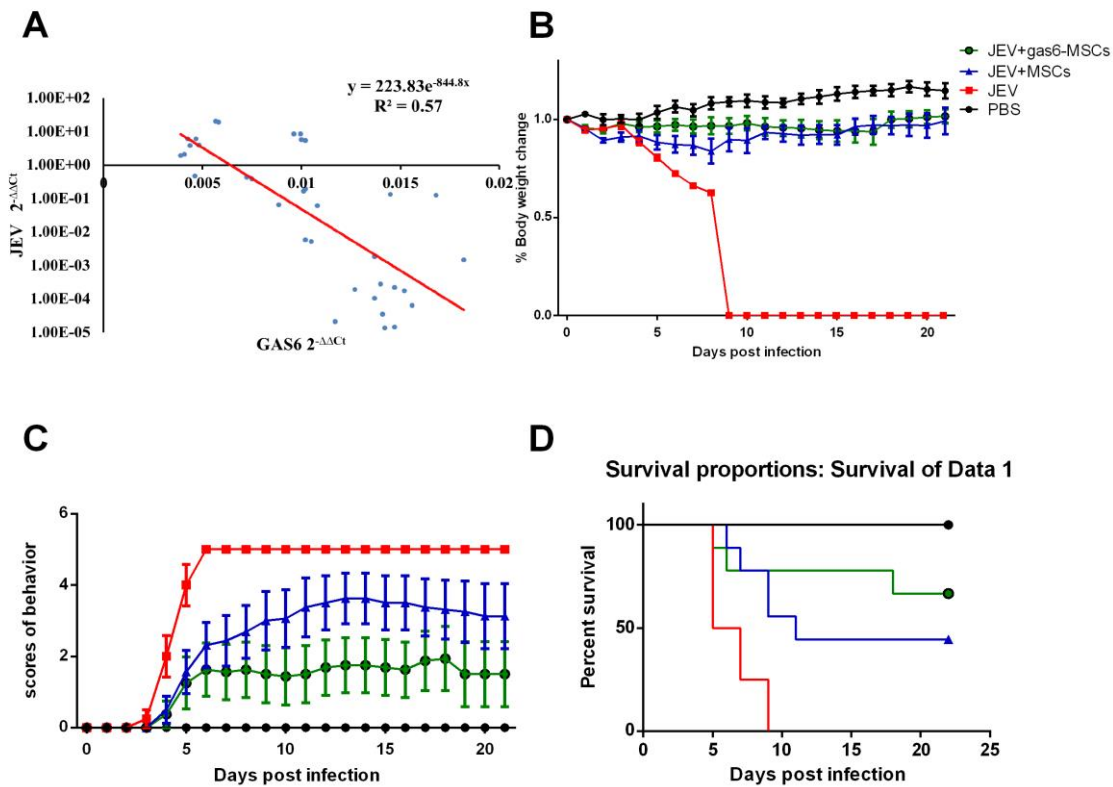


图 3-5 Gas6-MSC 治疗 JE 的初步效应评价

Fig. 3-5 Pre-evaluation of gas6-MSC in the treatment of JEV infected mice

(A) 小鼠JEV腹腔注射感染后脑组织内gas6及JEV相对表达水平(qRT-PCR)相关性分析(n=18);  
(B) Gas6-MSC, MSC移植及对照组JEV感染小鼠模型后, 各组小鼠体重变化(PBS=3, JEV=4, JEV+MSC=9, JEV+gas6-MSC=9); (C) Gas6-MSC, MSC移植及对照组JEV感染小鼠模型后, 各组小鼠行为学评分; (D) Gas6-MSC, MSC及对照组移植JEV感染小鼠模型后, 各组小鼠生存率变化。

## 4. 讨论

多项研究表明 MSC 具有向受损部位迁移的趋势（归巢效应），但在病毒性脑炎中 MSC 能否穿过血脑屏障还不清楚。在本实验中，我们首先将稳定表达萤火虫荧光素酶（Fluc）的基因片段经慢病毒感染的方式转入 MSC，成功构建了表达 Fluc 的 MSC。将 Fluc-MSC 经尾静脉移植 JE 小鼠模型后，通过检测脑组织内 Fluc 的表达情况来判断外源性 MSC 的存在。正常情况下，小鼠机体组织不表达 Fluc，因此该种检测方法的假阳性率较低。在实验初，我们尝试应用活体成像技术直接进行 Fluc-MSC 的示踪，但是由于萤光素酶底物难以进入 CNS 以及颅骨对于生物发光的阻挡和屏蔽，活体成像的效果并不满意。因此，在 6 dpi 进行灌注后脑组织取材直接检测脑组织内荧光素酶的表达情况。正常情况下脑组织内无 Fluc 的存在，因此加入底物后其发光度值极低。而在尾静脉移植 Fluc-MSC 后，脑组织匀浆液加入底物后其发光度值显著升高。这提示，在 JEV 感染小鼠模型中，尾静脉移植的 Fluc-MSC 可以进入 CNS 而且在脑组织内具有表达功能。

目前，如何通过血脑屏障将治疗药物靶向输送至中枢神经系统以提高脑组织的药物浓度也是 JE 及多种中枢神经系统疾病治疗的一个难点。脑内注射虽然可以提高局部药物浓度，但作为一种有创的治疗方式，临床重症患者很难耐受。鉴于 MSC 可通过血脑屏障进入 CNS，具有良好的归巢能力，因此将表达治疗蛋白的编码基因转入 MSC，基因修饰的 MSC 可进入脑组织存活并稳定表达靶蛋白，能够发挥治疗效应。目前，在肿瘤、肾损伤等多种疾病模型中已经证实以 MSC 作为药物靶向运输的载体可发挥积极的治疗作用<sup>[9, 140, 141]</sup>。基因修饰的 MSC 也被应用于多种中枢神经系统疾病的研究。譬如在脑胶质瘤模型中，骨形态形成蛋白 4（BMP4）修饰的 MSC 可靶向肿瘤部位并显著延长小鼠生存率<sup>[8]</sup>。在小鼠实验性自身免疫性脑炎模型中，静脉移植选择素和 IL-10 基因修饰的 MSC 可明显降低炎症细胞的浸润，促进髓鞘的再生，其治疗效果优于单独 MSC 治疗作用<sup>[142]</sup>。此外，在帕金森、创伤性脑损伤等多种中枢神经系统疾病中，基因修饰的 MSC 均显示出更好的治疗效果<sup>[143, 144]</sup>。

Gas6 蛋白可通过 TAM 受体参与调控细胞的增殖和凋亡，巨噬细胞的吞噬功能，多种免疫细胞的活化状态及细胞信号转导。在机体免疫反应，内环境稳定及组织修

复等生物学过程中发挥着重要作用。TAM 受体广泛表达于 CNS。Gas6 蛋白通过与 TAM 受体识别结合在 CNS 的病理生理过程中发挥着重要作用。Gas6 蛋白可增强小胶质细胞的吞噬功能，促进细胞碎片及有害物质的清除，并且可调控小胶质细胞及其它免疫细胞的活化状态，抑制炎症反应。Gas6 可促进少突胶质细胞的存活，促进髓鞘的生成。Gas6 可作用于血管内皮细胞和血管平滑肌细胞，对于 BBB 完整性的维持具有重要作用。Gas6 还可作用于海马区的神经干细胞，促进脑组织的再生和修复。

Gas6/TAM 信号通路的异常可导致 CNS 疾病的发生<sup>[145, 146]</sup>。Gas6/TAM 信号异常可导致髓鞘病变，参与 MS 的发生；也可导致 BBB 渗透性的增加。在西尼罗病毒感染过程中，Jonathan 等发现 GAS6/TAM 信号的阻断，BBB 完整性受损，病毒更容易进入 CNS，导致更严重的脑组织损伤。而 JEV 与西尼罗病毒均属黄病毒属，都可进入 CNS 引起脑组织炎症。因此我们推测 Gas6 也可影响 JEV 感染所致的 CNS 炎症损伤。而且，前期我们也发现脑组织 gas6 的表达水平与脑组织内 JEV 的病毒载量呈负相关趋势。其中的一个原因可能是由于 gas6 表达水平较低，BBB 的完整性较差，JEV 更容易进入 CNS。

最近研究发现在一些 CNS 炎症性疾病中，持续性脑内注射重组 Gas6 蛋白可促进神经组织的再生修复，改善疾病的进展。譬如在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型中，持续性脑内注射重组 Gas6 可缓解过度的炎症反应，降低炎症因子的水平，同时还可以促进少突胶质细胞前体细胞的成熟和髓鞘的再生，缓解疾病进展<sup>[123]</sup>。

然而，脑内注射的有创性及药物在脑内的持续时间仍是需要解决的问题。为此在本实验中我们构建了稳定表达 gas6 的 MSC。在我们的实验中发现，与 MSC 组相比，gas6-MSC 尾静脉移植治疗组能更有效地提高 JEV 感染小鼠的生存率，改善其行为学表现，其中具体的分子机制正在研究之中。

综上所述，我们成功构建了 gas6 修饰的 MSC，其可稳定表达 Gas6 蛋白。在 JE 模型中，与单纯 MSC 治疗相比采用 MSC 靶向输送 gas6 至中枢神经系统可进一步改善 JE 小鼠的行为学变化和生存率。



## 小 结

JEV 感染可诱导神经元发生 MLKL 介导的程序性坏死：在成功建立了 JE 小鼠模型的基础上，发现：JEV 感染可诱导神经元 MLKL 表达，且 MLKL 有向细胞膜募集趋势；JEV 感染组织及细胞后 MLKL、磷酸化 MLKL 的蛋白水平及 MLKL 的 mRNA 水平均升高，且其表达水平与病毒感染剂量及时间呈正相关；JEV 感染后，WT 小鼠与 MLKL<sup>-/-</sup>小鼠之间的最终生存率并无显著差异，但与 WT 小鼠相比，MLKL<sup>-/-</sup>小鼠的病情进展及体重下降速度都明显缓解，而且与 MLKL<sup>-/-</sup>小鼠脑组织及血清中主要炎症因子水平都明显低于 WT 小鼠。

MSC 移植可缓解 JEV 感染小鼠模型的病情进展、降低死亡率：利用全骨髓贴壁法分离培养 MSC 并行表面分子及诱导分化实验进行验证；在 JEV 感染后第 1、3 天经尾静脉途径进行 MSC 移植，发现：MSC 移植治疗可缓解 JE 病情进展，降低死亡率；MSC 移植可缓解组织损伤，降低炎症因子水平；MSC 移植可抑制小胶质细胞的活化及 M1 极化；MSC 移植组脑组织神经元死亡率降低，同时 BBB 完整性提高；体外混合培养 MSC 可重塑小胶质细胞向 M2 极化；MSC 与 Neuro2a 细胞共培养可提高 Neuro2a 细胞的存活率，抑制 JEV 增殖，同时 MSC 可表达高水平的免疫调节因子和 I 类干扰素。

gas6 基因修饰的 MSC 具有更好的治疗 JE 的生物学效应：在构建 Fluc 基因修饰的 MSC 和 gas6 基因修饰 MSC 的基础上，发现：在 JE 模型中，尾静脉移植的 MSC 可穿过血脑屏障进入 CNS；gas6-MSC 移植治疗组显示出更缓慢的病情进展及体重下降速度，gas6-MSC 移植组具有更高的存活率。

本研究首次证实程序性坏死参与 JE 的发生，并加重早期炎症反应和疾病进展。过度的炎症反应是 JEV 的主要致病原因，MSC 具有强大的免疫调节功能。在 JE 小鼠模型中，尾静脉移植的 MSC 可进入 CNS 并能抑制炎症损伤，缓解疾病进展。对 MSC 进行基因修饰，可提高其生物学功能，优化治疗效果。本研究为进一步了解 JEV 的致病机制，探索有效的治疗方法奠定基础。

## 参考文献

- [1] Boucher A, Herrmann J L, Morand P, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016[J]. *Med Mal Infect*, 2017.
- [2] Wang H, Liang G. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, 11: 435-448.
- [3] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation[J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 311-320.
- [4] Salimi H, Cain M D, Klein R S. Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis[J]. *Neurotherapeutics*, 2016.
- [5] Misra U K, Kalita J. Overview: Japanese encephalitis[J]. *Progress in Neurobiology*, 2010, 91(2): 108-120.
- [6] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation[J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 311-320.
- [7] Tanna T, Sachan V. Mesenchymal stem cells: potential in treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2014, 9(6): 513-521.
- [8] Mangraviti A, Tzeng S Y, Gullotti D, et al. Non-virally engineered human adipose mesenchymal stem cells produce BMP4, target brain tumors, and extend survival[J]. *Biomaterials*, 2016, 100: 53-66.
- [9] Liu P, Feng Y, Dong D, et al. Enhanced renoprotective effect of IGF-1 modified human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on gentamicin-induced acute kidney injury[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20287.
- [10] Hegde N R, Gore M M. Japanese encephalitis vaccines: Immunogenicity, protective efficacy, effectiveness, and impact on the burden of disease[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017: 1-18.
- [11] Ye J, Jiang R, Cui M, et al. Etanercept reduces neuroinflammation and lethality in mouse model of Japanese encephalitis[Z]. 2014: 210, 875-889.
- [12] German A C, Myint K S, Mai N T, et al. A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006, 100(12): 1135-1145.
- [13] Das S, Mishra M K, Ghosh J, et al. Japanese Encephalitis Virus infection induces IL-18 and IL-1 $\beta$  in microglia and astrocytes: Correlation with in vitro cytokine responsiveness of glial cells and subsequent neuronal death[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2008, 195(1-2): 60-72.
- [14] Winter P M, Dung N M, Loan H T, et al. Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis[J]. *J Infect Dis*, 2004, 190(9): 1618-1626.
- [15] Shastri A, Bonifati D M, Kishore U. Innate Immunity and Neuroinflammation[J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013: 1-19.
- [16] Li F, Wang Y, Yu L, et al. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(10): 5602-5614.
- [17] Ghoshal A, Das S, Ghosh S, et al. Proinflammatory mediators released by activated microglia

- induces neuronal death in Japanese encephalitis[J]. *Glia*, 2007, 55(5): 483-496.
- [18] Savarin C, Bergmann C C. Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(4): 472-479.
- [19] Pfisterer U, Khodosevich K. Neuronal survival in the brain: neuron type-specific mechanisms[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2643.
- [20] Myint K S, Kipar A, Jarman R G, et al. Neuropathogenesis of Japanese encephalitis in a primate model[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(8): e2980.
- [21] Das S, Mishra M K, Ghosh J, et al. Japanese Encephalitis Virus infection induces IL-18 and IL-1beta in microglia and astrocytes: correlation with in vitro cytokine responsiveness of glial cells and subsequent neuronal death[J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 195(1-2): 60-72.
- [22] Thongtan T, Thepparit C, Smith D R. The involvement of microglial cells in Japanese encephalitis infections[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 890586.
- [23] Su H L, Liao C L, Lin Y L. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response[J]. *J Virol*, 2002, 76(9): 4162-4171.
- [24] Swarup V, Das S, Ghosh S, et al. Tumor necrosis factor receptor-1-induced neuronal death by TRADD contributes to the pathogenesis of Japanese encephalitis[J]. *J Neurochem*, 2007, 103(2): 771-783.
- [25] Sharma M, Bhattacharyya S, Nain M, et al. Japanese encephalitis virus replication is negatively regulated by autophagy and occurs on LC3-I- and EDEM1-containing membranes[J]. *Autophagy*, 2014, 10(9): 1637-1651.
- [26] Jin R, Zhu W, Cao S, et al. Japanese encephalitis virus activates autophagy as a viral immune evasion strategy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52909.
- [27] Li J K, Liang J J, Liao C L, et al. Autophagy is involved in the early step of Japanese encephalitis virus infection[J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(2): 159-168.
- [28] Kreutzberg G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS[J]. *Trends Neurosci*, 1996, 19(8): 312-318.
- [29] Orihuela R, Mcpherson C A, Harry G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-665.
- [30] Tanaka T, Murakami K, Bando Y, et al. Interferon regulatory factor 7 participates in the M1-like microglial polarization switch[J]. *Glia*, 2015, 63(4): 595-610.
- [31] Miron V E, Boyd A, Zhao J W, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(9): 1211-1218.
- [32] Jiang R, Ye J, Zhu B, et al. Roles of TLR3 and RIG-I in mediating the inflammatory response in mouse microglia following Japanese encephalitis virus infection[J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 787023.
- [33] Chen C J, Ou Y C, Lin S Y, et al. Glial activation involvement in neuronal death by Japanese encephalitis virus infection[J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 4): 1028-1037.
- [34] Chen C J, Ou Y C, Chang C Y, et al. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF-alpha signaling and contributes to neuronal death[J]. *Glia*, 2012, 60(3): 487-501.
- [35] Lawrenson J G, Ghabriel M N, Reid A R, et al. Differential expression of an endothelial barrier antigen between the CNS and the PNS[J]. *J Anat*, 1995, 186 ( Pt 1): 217-221.
- [36] Kim J H, Kim J H, Park J A, et al. Blood-neural barrier: intercellular communication at

- glio-vascular interface[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(4): 339-345.
- [37] Gloor S M, Wachtel M, Bolliger M F, et al. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier[J]. *Brain Research Reviews*, 2001, 36(2-3): 258-264.
- [38] Spindler K R, Hsu T. Viral disruption of the blood-brain barrier[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(6): 282-290.
- [39] Chang C Y, Li J R, Chen W Y, et al. Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-Infected astrocytes[J]. *Glia*, 2015: 10-1002.
- [40] Li F, Wang Y, Yu L, et al. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(10): 5602-5614.
- [41] Liu T, Liang L, Wang C, et al. The blood-brain barrier in the cerebrum is the initial site for the Japanese encephalitis virus entering the central nervous system[J]. *Journal of Neurovirology*, 2008, 14(6): 514-521.
- [42] Shirai K, Hayasaka D, Kitaura K, et al. Qualitative differences in brain-infiltrating T cells are associated with a fatal outcome in mice infected with Japanese encephalitis virus[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(3): 765-775.
- [43] Kim J H, Choi J Y, Kim S B, et al. CD11c(hi) Dendritic Cells Regulate Ly-6C(hi) Monocyte Differentiation to Preserve Immune-privileged CNS in Lethal Neuroinflammation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17548.
- [44] Chen C J, Chen J H, Chen S Y, et al. Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection[J]. *J Virol*, 2004, 78(22): 12107-12119.
- [45] German A C, Myint K S, Mai N T, et al. A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006, 100(12): 1135-1145.
- [46] Ghoshal A, Das S, Ghosh S, et al. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis[J]. *Glia*, 2007, 55(5): 483-496.
- [47] Chen C J, Ou Y C, Chang C Y, et al. TNF-alpha and IL-1beta mediate Japanese encephalitis virus-induced RANTES gene expression in astrocytes[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(2): 234-242.
- [48] Misra U K, Srivastava R, Kalita J, et al. Sequential changes in serum cytokines and chemokines in a rat model of Japanese encephalitis[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2010, 17(6): 411-416.
- [49] Li F, Wang Y, Yu L, et al. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(10): 5602-5614.
- [50] Kaushik D K, Gupta M, Kumawat K L, et al. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32270.
- [51] Mishra M K, Basu A. Minocycline neuroprotects, reduces microglial activation, inhibits caspase 3 induction, and viral replication following Japanese encephalitis[J]. *J Neurochem*, 2008, 105(5): 1582-1595.
- [52] Mukherjee S, Singh N, Sengupta N, et al. Japanese encephalitis virus induces human neural stem/progenitor cell death by elevating GRP78, PHB and hnRNPC through ER stress[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2556.
- [53] Silke J, Rickard J A, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation[Z]. 2015: 16, 689-697.

- [54] Zhang D W, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis[J]. *Science*, 2009, 325(5938): 332-336.
- [55] Upton J W, Kaiser W J, Mocarski E S. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA[J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 11(3): 290-297.
- [56] Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(1): 133-146.
- [57] Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, et al. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(4): 971-981.
- [58] Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014, 35: 14-23.
- [59] Gunther C, Neumann H, Neurath M F, et al. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium[J]. *Gut*, 2013, 62(7): 1062-1071.
- [60] Saeed W K, Jun D W. Necroptosis: an emerging type of cell death in liver diseases[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(35): 12526-12532.
- [61] Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, et al. RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis[J]. *Nature*, 2014, 513(7516): 90-94.
- [62] Liu T, Bao Y H, Wang Y, et al. The role of necroptosis in neurosurgical diseases[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2015, 48(4): 292-298.
- [63] Morrice J R, Gregory-Evans C Y, Shaw C A. Necroptosis in amyotrophic lateral sclerosis and other neurological disorders[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863(2): 347-353.
- [64] Ito Y, Ofengeim D, Najafov A, et al. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS[J]. *Science*, 2016, 353(6299): 603-608.
- [65] Liu M, Wu W, Li H, et al. Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice[J]. *J Spinal Cord Med*, 2015, 38(6): 745-753.
- [66] Vieira M, Fernandes J, Carreto L, et al. Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 68: 26-36.
- [67] Su X, Wang H, Kang D, et al. Necrostatin-1 ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury in mice through inhibiting RIP1/RIP3 pathway[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(4): 643-650.
- [68] Mocarski E S, Guo H, Kaiser W J. Necroptosis: The Trojan horse in cell autonomous antiviral host defense[J]. *Virology*, 2015, 479-480: 160-166.
- [69] Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko D V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance[J]. *Immunity*, 2013, 38(2): 209-223.
- [70] Sridharan H, Upton J W. Programmed necrosis in microbial pathogenesis[J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(4): 199-207.
- [71] Kaiser W J, Upton J W, Mocarski E S. Viral modulation of programmed necrosis[J]. *Curr Opin Virol*, 2013, 3(3): 296-306.
- [72] Dobbelstein M, Shenk T. Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product[J]. *J Virol*, 1996, 70(9): 6479-6485.
- [73] Chan F K, Luz N F, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 79-106.

- [74] He Y, Fisher R, Chowdhury S, et al. Vaccinia virus induces rapid necrosis in keratinocytes by a STAT3-dependent mechanism[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113690.
- [75] Chien H, Dix R D. Evidence for multiple cell death pathways during development of experimental cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression: apoptosis, necroptosis, and pyroptosis[J]. J Virol, 2012, 86(20): 10961-10978.
- [76] Upton J W, Kaiser W J, Mocarski E S. Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1[J]. J Biol Chem, 2008, 283(25): 16966-16970.
- [77] Daley-Bauer L P, Roback L, Crosby L N, et al. Mouse cytomegalovirus M36 and M45 death suppressors cooperate to prevent inflammation resulting from antiviral programmed cell death pathways[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017.
- [78] Huang Z, Wu S, Liang Y, et al. RIP1/RIP3 Binding to HSV-1 ICP6 Initiates Necroptosis to Restrict Virus Propagation in Mice[Z]. 2015: 17, 229-242.
- [79] Guo H, Omoto S, Harris P A, et al. Herpes simplex virus suppresses necroptosis in human cells[J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(2): 243-251.
- [80] Kuriakose T, Si M M, Malireddi R, et al. ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways[J]. 2016.
- [81] Meessen-Pinard M, Le Coupanec A, Desforges M, et al. Pivotal Role of Receptor-Interacting Protein Kinase 1 and Mixed Lineage Kinase Domain-Like in Neuronal Cell Death Induced by the Human Neuroinvasive Coronavirus OC43[J]. J Virol, 2017, 91(1).
- [82] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing[J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2739-2749.
- [83] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [84] Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives[Z]. 2014: 23, 1045-1059.
- [85] Rohban R, Pieber T R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 5173732.
- [86] Mohsin S, Shams S, Ali N G, et al. Enhanced hepatic differentiation of mesenchymal stem cells after pretreatment with injured liver tissue[J]. Differentiation, 2011, 81(1): 42-48.
- [87] Wu Y, Chen L, Scott P G, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis[J]. Stem Cells, 2007, 25(10): 2648-2659.
- [88] Leibacher J, Henschler R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7: 7.
- [89] Cai Y, Xi Y, Cao Z, et al. Dual targeting and enhanced cytotoxicity to HER2-overexpressing tumors by immunoapoptin-armed mesenchymal stem cells[J]. Cancer Lett, 2016, 381(1): 104-112.
- [90] Yang X, Du J, Xu X, et al. IFN- $\gamma$ -Secreting-Mesenchymal Stem Cells Exert an Antitumor Effect In Vivo via the TRAIL Pathway[J]. Journal of Immunology Research, 2014, 2014: 1-9.
- [91] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. Nat Immunol, 2014, 15(11): 1009-1016.
- [92] Bernardo M E, Fibbe W E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation[J].

- Cell Stem Cell, 2013, 13(4): 392-402.
- [93] Waterman R S, Tomchuck S L, Henkle S L, et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10088.
- [94] Jung Y J, Ju S Y, Yoo E S, et al. MSC-DC interactions: MSC inhibit maturation and migration of BM-derived DC[J]. Cytotherapy, 2007, 9(5): 451-458.
- [95] Liu Y, Zhang R, Yan K, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of BV2 microglial cells through TSG-6[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 135.
- [96] Qu M, Cui J, Zhu J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress NK cell recruitment and activation in PolyI:C-induced liver injury[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015.
- [97] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions[J]. Blood, 2006, 107(1): 367-372.
- [98] Burr S P, Dazzi F, Garden O A. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance?[J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91(1): 12-18.
- [99] Drago D, Cossetti C, Iraci N, et al. The stem cell secretome and its role in brain repair[J]. Biochimie, 2013, 95(12): 2271-2285.
- [100] Giunti D, Parodi B, Usai C, et al. Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1[J]. Stem Cells, 2012, 30(9): 2044-2053.
- [101] Yang Y, Ye Y, Su X, et al. MSCs-Derived Exosomes and Neuroinflammation, Neurogenesis and Therapy of Traumatic Brain Injury[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 55.
- [102] Sung D K, Chang Y S, Sung S I, et al. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against Escherichia coli is mediated by secretion of beta-defensin-2 via toll-like receptor 4 signalling[Z]. 2015n/a-n/a.
- [103] Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37[J]. Stem Cells, 2010, 28(12): 2229-2238.
- [104] Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin M N, et al. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype[J]. The Journal of Immunology, 2009, 182(12): 7963-7973.
- [105] Shi D, Zhang J, Zhou Q, et al. Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs[J]. Gut, 2016.
- [106] Chan M C W, Kuok D I T, Leung C Y H, et al. Human mesenchymal stromal cells reduce influenza A H5N1-associated acute lung injury in vitro and in vivo[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(13): 3621-3626.
- [107] Maria F A, Bersano A, Lisini D, et al. Mesenchymal Stem Cells for Ischemic Stroke: Progress and Possibilities[J]. Curr Med Chem, 2016, 23(16): 1598-1608.
- [108] Dulamea A O. The potential use of mesenchymal stem cells in stroke therapy—From bench to bedside[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2015, 352(1-2): 1-11.
- [109] Doeppner T R, Hermann D M. Mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke: progress and possibilities[J]. Stem Cells Cloning, 2010, 3: 157-163.
- [110] Peresedova A V, Zavalishin I A. [Compensatory mechanisms in multiple sclerosis(review)][J].

- Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2013, 113(2 Pt 2): 17-22.
- [111] Gharibi T, Ahmadi M, Seyfizadeh N, et al. Immunomodulatory characteristics of mesenchymal stem cells and their role in the treatment of Multiple Sclerosis[J]. Cellular Immunology, 2015, 293(2): 113-121.
- [112] Gharibi T, Ahmadi M, Seyfizadeh N, et al. Immunomodulatory characteristics of mesenchymal stem cells and their role in the treatment of Multiple Sclerosis[J]. Cellular Immunology, 2015, 293(2): 113-121.
- [113] Hasan A, Deeb G, Rahal R, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury[J]. Frontiers in Neurology, 2017, 8.
- [114] Pati S, Muthuraju S, Hadi R A, et al. Neurogenic plasticity of mesenchymal stem cell, an alluring cellular replacement for traumatic brain injury[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2016, 11(2): 149-157.
- [115] Fourgeaud L, Traves P G, Tufail Y, et al. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology[J]. Nature, 2016, 532(7598): 240-244.
- [116] Fernandez-Fernandez L, Bellido-Martin L, Garcia D F P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation[J]. Thromb Haemost, 2008, 100(4): 604-610.
- [117] Binder M D, Kilpatrick T J. TAM Receptor Signalling and Demyelination[J]. Neurosignals, 2009, 17(4): 277-287.
- [118] Miner J J, Daniels B P, Shrestha B, et al. The TAM receptor Mertk protects against neuroinvasive viral infection by maintaining blood-brain barrier integrity[J]. Nat Med, 2015, 21(12): 1464-1472.
- [119] Rothlin C V, Carrera-Silva E A, Bosurgi L, et al. TAM receptor signaling in immune homeostasis[J]. Annu Rev Immunol, 2015, 33: 355-391.
- [120] van der Meer J H, van der Poll T, van T V C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis[J]. Blood, 2014, 123(16): 2460-2469.
- [121] Ji R, Meng L, Li Q, et al. TAM receptor deficiency affects adult hippocampal neurogenesis[J]. Metabolic Brain Disease, 2015, 30(3): 633-644.
- [122] Bellan M, Pirisi M, Sainaghi P P. The Gas6/TAM System and Multiple Sclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11).
- [123] Gruber R C, Ray A K, Johndrow C T, et al. Targeted GAS6 delivery to the CNS protects axons from damage during experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neurosci, 2014, 34(49): 16320-16335.
- [124] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation[J]. Nature, 2015, 517(7534): 311-320.
- [125] Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, et al. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 35: 2-13.
- [126] Huang Z, Wu S Q, Liang Y, et al. RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice[J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(2): 229-242.
- [127] Nogusa S, Thapa R J, Dillon C P, et al. RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus[J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(1): 13-24.
- [128] Kuriakose T, Man S M, Malireddi R K, et al. ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus



- triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways[J]. *Sci Immunol*, 2016, 1(2).
- [129] Neumann H. The immunological microenvironment in the CNS: implications on neuronal cell death and survival[J]. *J Neural Transm Suppl*, 2000, 59: 59-68.
- [130] Swarup V, Ghosh J, Das S, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain mediated neuronal death contributes to the glial activation and subsequent neuroinflammation in Japanese encephalitis[J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(7): 1310-1321.
- [131] Wang Y, Huang Z H, Li Y J, et al. Dynamic quantitative proteomics characterization of TNF-alpha-induced necroptosis[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(12): 1438-1446.
- [132] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease[Z]. 2008: 8, 726-736.
- [133] Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, et al. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair?[J]. *Nature Neuroscience*, 2012, 15(8): 1078-1087.
- [134] Li Y, Xu J, Shi W, et al. Mesenchymal stromal cell treatment prevents H9N2 avian influenza virus-induced acute lung injury in mice[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 159.
- [135] Das S, Dutta K, Kumawat K L, et al. Abrogated inflammatory response promotes neurogenesis in a murine model of Japanese encephalitis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17225.
- [136] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(11): 1009-1016.
- [137] Jiang R, Ye J, Zhu B, et al. Roles of TLR3 and RIG-I in Mediating the Inflammatory Response in Mouse Microglia following Japanese Encephalitis Virus Infection[J]. *Journal of Immunology Research*, 2014, 2014: 1-11.
- [138] Hegyi B, Kőrnyei Z, Ferenczi S, et al. Regulation of Mouse Microglia Activation and Effector Functions by Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2014, 23(21): 2600-2612.
- [139] Menge T, Zhao Y, Zhao J, et al. Mesenchymal Stem Cells Regulate Blood-Brain Barrier Integrity Through TIMP3 Release After Traumatic Brain Injury[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(161): 150r-161r.
- [140] Sage E K, Thakrar R M, Janes S M. Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(11): 1435-1445.
- [141] Lathrop M J, Sage E K, Macura S L, et al. Antitumor effects of TRAIL-expressing mesenchymal stromal cells in a mouse xenograft model of human mesothelioma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(1): 44-54.
- [142] Liao W, Pham V, Liu L, et al. Mesenchymal stem cells engineered to express selectin ligands and IL-10 exert enhanced therapeutic efficacy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Biomaterials*, 2016, 77: 87-97.
- [143] Hoban D B, Howard L, Dowd E. GDNF-secreting mesenchymal stem cells provide localized neuroprotection in an inflammation-driven rat model of Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2015, 303: 402-411.
- [144] Wang Z, Wang Y, Wang Z, et al. Engineered mesenchymal stem cells with enhanced tropism and paracrine secretion of cytokines and growth factors to treat traumatic brain injury[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(2): 456-467.
- [145] Binder M D, Cate H S, Prieto A L, et al. Gas6 deficiency increases oligodendrocyte loss and

microglial activation in response to cuprizone-induced demyelination[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(20): 5195-5206.

[146] Rothlin C V, Lemke G. TAM receptor signaling and autoimmune disease[J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(6): 740-746.

## 个人简历及研究成果

边培育，女，26岁，汉族，河南商丘人，专业方向：内科学（传染病学）。

个人简历： 2009.8-2014.6： 第四军医大学 临床医学专业 本科

2014.8-至今： 第四军医大学 传染病学 硕士

### 发表论文：

1. **Bian Peiyu**, Ye Chuantao...Lei Yingfeng, Jia Zhansheng. Mesenchymal stem cells alleviate Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and mortality. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1), 38. (IF= 4.504)
2. **Bian Peiyu**, Zheng Xuyang... Jia Zhansheng, Lei Yingfeng. MLKL Mediated Necroptosis Accelerates JEV-Induced Neuroinflammation in Mice. *Front Microbiol*, 2017, 8: 303. (IF=4.165)
3. Xu-Yang Z, **Pei-Yu B (co-first)**, Chuan-Tao Y, et al. Interferon-Induced Transmembrane Protein 3 Inhibits Hantaan Virus Infection, and Its Single Nucleotide Polymorphism rs12252 Influences the Severity of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Front Immunol*, 2016, 7: 535. (IF= 5.695)
4. 边培育, 叶传涛, 贾战生, 雷迎峰等. gas6 基因修饰小鼠骨髓间充质干细胞的构建及鉴定. *生物技术通讯*, 2016, (06): 763~768
5. 边培育, 雷迎峰, 叶传涛, 贾战生. 间充质干细胞免疫调控作用可塑性的研究进展. *微生物学免疫学进展*, 2016, (06): 89~92
6. 叶传涛, 边培育, 翁代慧, 等. 丙型肝炎病毒河北株 E2 蛋白胞外核心区的真核表达及应用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, (06): 746~749
7. 郑煦暘, 叶传涛, 赵洁茹, 边培育, 张颖, 贾战生. 肾综合征出血热患者血浆分泌体固有免疫相关长链非编码 RNA 含量测定及临床意义. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, (11): 1522~1526
8. 叶传涛, 赵洁茹, 郑煦阳, 边培育, 贾战生等. 西安及周边地区 HCV 基因型构成分析. *临床肝胆病杂志*, 2016, (06): 1165~1166

## 致 谢

时光荏苒。从2014年进入实验室时的懵懂无知到如今的硕士生涯结束，我收获了良师益友，收获了知识，收获了思考，更收获了成长。感谢三年来那些指引我前进的老师同学，感谢永远支持我的父母兄长，感谢那个未曾放弃的自己以及那些曾经帮助我的人。

首先，感谢我的导师贾战生教授，感谢他在学习，生活中对我的指导和帮助。作为科研道路的启蒙者，贾战生教授将我带入传染病学的领域，使我认识到了科研的魅力和探索的永无止境。教授严谨治学，和善待人，是我学习的榜样。教授丰富的医学知识和高尚的人文素养，是我今后的标杆。教授开阔的视野和开创性的科研思维更值得我学习。在以后的工作学习中，我将谨记教授的教诲和指导，善于思考，提高自己，不断进步。

同时，感谢我的辅导老师雷迎峰副教授。感谢雷老师对我课题，实验和论文写作的悉心指导和督促。雷老师严谨的科研态度和平易近人的处事风格向我展示了一个真正的科研工作者的素养，更是我学习的榜样。在课题开展过程中，遇到难题瓶颈，雷老师总是带领我们剖析原因，积极寻找解决的办法，使我在实验过程中更有信心和希望。雷老师对科研的追求和对科学问题的探索更深深激起我对科研的兴趣。

感谢传染科实验室张颖副教授对我工作学习的关心帮助和指导，感谢连建奇教授，黄长彤教授，郝春秋教授等对我课题的建议和鼓励。感谢我的师兄叶传涛博士，郑煦暘博士以及师姐周云博士，赵洁茹，李梦苑硕士对我学习科研的帮助。感谢范超师兄，申焕君师姐，秦源，张沛欣实验师对我实验的建议和帮助。感谢科室刘娜秘书在培养过程及答辩过程中的指导和帮助。

感谢微生物教研室张芳琳教授，徐志凯教授，吴兴安教授以及王媛老师，姚敏博士，杨敬老师，张亮老师等给予的帮助和指导。感谢叶伟博士，韩佩君博士，董阳超博士，马宏伟硕士等在实验过程中给予我的热心帮助和建议。感谢林华，简莹莹，慕荐荐，高欢，范丽芳等实验员的帮助。

感谢厦门大学韩家淮教授和吴剑锋博士的对于基因敲除鼠的无私馈赠和帮助。

感谢第四军医大学实验动物中心赵勇老师，解剖教研室白杨博士，神经生物学教研室樊洪博士，西京麻醉科才延辉博士，西京神经内科杨佳蕾博士，口腔医院李蓓博士，隋秉东博士对我实验操作的指导和建议。

感谢所有帮助过我的人。