

## 蜱传脑炎病毒对人单核细胞的致病性

魏婧靖<sup>1,2</sup>, 康晓平<sup>2</sup>, 李裕昌<sup>2</sup>, 吴晓燕<sup>2</sup>, 张雨<sup>2</sup>, 杨银辉<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>解放军总医院, 北京 100853

<sup>2</sup>军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

**摘要:** 【目的】确定蜱传脑炎病毒 (Tick-born encephalitis virus, TBEV) 对人单核细胞的感染性及其复制增殖的影响。【方法】用蜱传脑炎病毒感染单核细胞 THP-1, 观察细胞病变情况。取不同时间点的细胞培养上清, 测定病毒滴度, 并用 Real Time RT-PCR 方法检测病毒核酸; 用流式细胞法检测细胞感染率, 以确定 TBEV 在 THP-1 细胞中的复制增殖情况; 同时进行细胞活力检测, 以确定 TBEV 感染后 THP-1 细胞的变化。【结果】TBEV 病毒感染 THP-1 细胞后, 可进行复制增殖, 流式细胞法可检测到细胞内的病毒, 感染病毒后的单核细胞活力显著降低。【结论】TBEV 可在单核细胞 THP-1 中复制增殖, 并可造成细胞活力的显著降低, 提示单核细胞可能在 TBEV 感染机体并扩散至各组织器官过程中发挥了重要作用。

**关键词:** 蜱传脑炎病毒, 单核细胞, 致病性

**中图分类号:** S852      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1221-05

蜱传脑炎病毒 (Tick-born encephalitis virus, TBEV) 也称为森林脑炎病毒, 属黄病毒科 (Flaviridae) 黄病毒属 (Flaviviruses), 分为 3 个亚型: 欧洲型、西伯利亚型和远东型。我国流行的病毒株为远东亚型, 在 3 个型别中毒力最强, 所引起的临床症状最重, 可造成严重的中枢神经系统损伤, 并可产生后遗症, 病死率可达 20% - 25%, 主要分布于东北的长白山、大小兴安岭地区, 云南、新疆等地。此病是一种以侵主的自然疫源性急袭中枢神经系统为性传染病, 潜伏期为 8 - 14 天。起病时先有发热、头痛、恶心、呕吐、神志往往不清, 并有颈项强直及上肢肌肉迟缓型瘫痪或麻痹, 随后出现颈部、肩部和上肢肌肉瘫痪, 表现为头无力抬起, 肩下垂、两手无力而摇摆等。恢复期较长, 约半数患者留有不同程度的

后遗症<sup>[1-3]</sup>。

蜱传脑炎病毒主要通过蜱虫叮咬而感染人体, 并能迅速进入血流, 在外周血管中繁殖, 出现第一次病毒血症期, 然后病毒扩散到脉管组织如肝、脾和肌肉, 在这些部位进一步复制并加重病毒血症。在蜱传脑炎 (Tick-born encephalitis, TBE) 患者感染的急性期, 可从血液分离获得 TBEV。外周血是 TBEV 复制、扩散的重要场所, 又是免疫细胞含量最为丰富的场所, 在 TBEV 感染的早期, 免疫细胞可能对 TBEV 的复制及侵袭发挥了重要作用。

单核细胞在血液中含有较高, 在不同组织器官中广泛分布, 并在先天及特异免疫反应中均发挥重要功能。已有研究表明, 多种黄病毒属成员如日本乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、西尼

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81171663); 国家传染病重大专项 (2013zx10004606)

\* 通信作者。Tel: +86-10-66948471; E-mail: yyh428@sina.com

**作者简介:** 魏婧靖 (1987 -), 女, 山西省长治市人, 硕士研究生, 主要从事病毒致病机理研究, E-mail: wj\_weijing123@sina.com

**收稿日期:** 2013-03-13; **修回日期:** 2013-04-28

罗病毒 (West Nile virus, WNV) 等可直接感染单核细胞及巨噬细胞, 可随单核细胞在血液中的迁徙扩散至机体肾、肝等组织器官, 并造成机体严重的免疫病理损伤<sup>[4-5]</sup>。

体内试验表明, JEV 及 TBEV 感染的小鼠, 可检测到脑内病毒滴度的增高, 并伴随单核细胞浸润及脑内炎症反应<sup>[6-7]</sup>。提示单核细胞在病毒感染过程中发挥了重要作用。目前, TBEV 对免疫细胞的感染性尚未有系统的研究报道。从单核细胞着手, 研究 TBEV 在免疫细胞中的复制增殖特性, 对于研究 TBEV 的感染及致病机制, 具有重要的价值。

本研究以我国流行的 TBEV 森张株为研究对象, 观察 TBEV 在单核细胞中的复制增殖情况, 探讨单核细胞在 TBEV 的机体内传播过程中所起的作用。研究证实, TBEV 不仅可感染人单核细胞, 而且可在细胞内复制增殖, 并造成单核细胞活力降低, 表明单核细胞可能在 TBEV 的致病过程中起重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒和细胞:** 蜚传脑炎病毒森张株, 本室保存; 单核细胞 THP-1, 本室保存; 利用含 10% 胎牛血清的 1640 进行培养<sup>[8]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** PureLink RNA Mini Kit 试剂盒购自 Invitrogen 公司; One-step PrimeScript RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司产品; TBEV 的特异性单抗 2B5 由本室自制; FITC-羊抗鼠 IgG 购自 Solarbio 公司; CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 购自 Promega 公司。

### 1.2 病毒在 THP-1 细胞中的复制增殖

将 THP-1 细胞接种 24 孔细胞培养板, 待细胞铺满单层后, 将 TBEV 适当稀释并感染 THP-1 细胞, 使感染复数为 0.1。同时设未感染病毒的正常细胞对照。逐日观察细胞形态并于感染后的不同时间点吸取细胞培养上清 (2 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d), 测定病毒增殖情况<sup>[9]</sup>。将上清 10 倍系列稀释后, 加入到 BHK-21 细胞铺满单层的 96 孔细胞培养板中, 吸附 1h 后, 补加维持液, 逐日观察 BHK-21 细胞病变情况, 计算病毒滴度 (TCID<sub>50</sub>)。

### 1.3 Real-time RT-PCR 方法检测病毒核酸

将 THP-1 细胞感染病毒后不同时间点的细胞

培养上清进行 RNA 提取, 同时提取已知滴度的 TBEV 核酸 ( $1 \times 10^6$  PFU/ML), 作为核酸标准品, 以绘制标准曲线。进行 Real-time RT-PCR 检测, 引物及探针序列为: 上游引物 5'-GGGCGGTTCTTGTCTCC-3', 下游引物 5'-ACACATCACCTCCTTGTTCAGACT-3', 探针序列 5'-FAM-TGAGCCACCATCACCCAGACACATAMRA-3'<sup>[10]</sup>, 扩增条件为: 42℃ 反应 5 min 进行反转录, 95℃ 加热 10 s 以灭活反转录酶, 然后进行 PCR 扩增 (95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火/延伸 20 s, 反应 40 个循环)。利用 LightCycler Software 对扩增结果进行绝对定量分析, 绘制标准曲线并分析待测样品中的病毒核酸。

### 1.4 流式细胞法检测感染细胞内的病毒

将 THP-1 细胞接种病毒 1 d 后, 进行免疫荧光染色, 用 PBS 洗涤 1 次后, 加入 TBEV 的特异性单抗 2B5 (10 μg/mL), 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 加入 FITC-羊抗鼠 IgG, 37℃ 孵育 1 h, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 多聚甲醛, 4℃ 过夜进行固定, 离心后重悬在 PBS 中, 进行流式细胞仪检测<sup>[11]</sup>。

### 1.5 MTS 法检测感染病毒后细胞活力

将 THP-1 细胞接种 96 孔细胞培养板, 将 TBEV 适当稀释并感染 THP-1 细胞, 使感染复数为 0.1。同时设未感染病毒的正常细胞对照。感染后的不同时间点 (2 h、4 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d) 加入 MTS, 37℃ 孵育 2 h, 酶标仪 620 nm 读取 OD 值<sup>[12]</sup>。

### 1.6 数据分析

采用统计分析方法中的 t 检验进行数据分析

## 2 结果和分析

### 2.1 病毒在细胞中的复制增殖

病毒的复制增殖结果如图 1 所示。结果表明, 在感染病毒后 1 d, 病毒滴度即达到  $1 \times 10^8$  /mL, 随后, 病毒滴度随着时间的延长而显著增高, 感染后第 2 天, 达到峰值  $5.62 \times 10^8$  /mL。

### 2.2 病毒核酸检测

采用 Real-time RT-PCR 方法检测单核细胞内病毒核酸, 结果如图 2 所示。从图中可看出, 在感染病毒 2 d 后, 病毒核酸显著增高。

### 2.3 流式细胞术检测病毒

采用流式细胞仪检测细胞内病毒, 结果如图 3

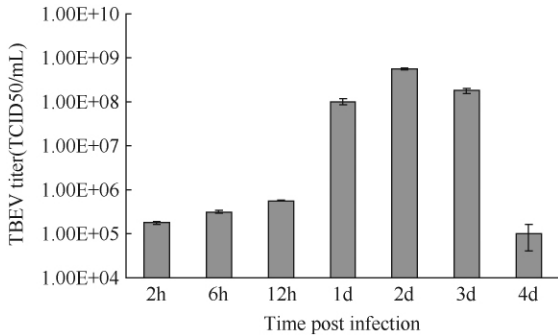


图 1. TBEV 感染 THP-1 细胞后不同时间点的病毒滴度测定

Figure 1. TBEV titres at different time points after inoculating to THP-1 cells.

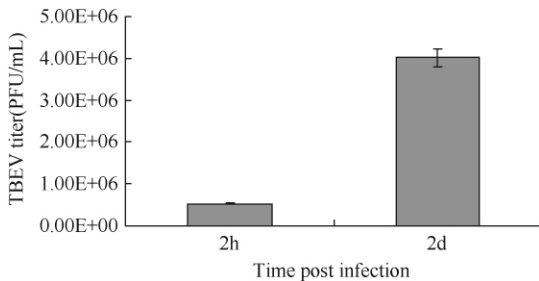


图 2. TBEV 感染 THP-1 细胞后不同时间点的病毒滴度

Figure 2. TBEV titres at different time points after inoculating to THP-1 cells.

所示。从图中可看出,在感染病毒 1 d 后,即可检测到 31.5% 的细胞有 FITC 荧光信号,表明检测到细胞内的病毒。

## 2.4 THP-1 细胞感染病毒后的活力检测

采用 MTS 法检测细胞活力,结果如图 4 所示,结果表明,在感染初期,感染病毒的 THP-1 细胞与正常细胞的细胞数差异不显著(统计分析,  $t$  检验  $P > 0.05$ ),直到第 5d,感染病毒的 THP-1 细胞数明显减少,有显著差异(统计分析,  $t$  检验  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

蜚传脑炎病毒是一种嗜神经的病毒,可引起严重的中枢神经系统损伤,对我国所流行的东亚型森林脑炎病毒株进行病原学及致病机理研究,具有重要的科学价值和临床意义<sup>[13]</sup>。

在脑炎病毒感染过程中,病毒突破血脑屏障进入中枢神经系统是引发严重脑炎的关键环节。目

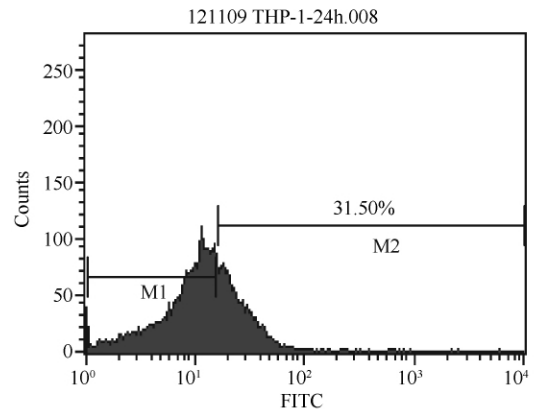
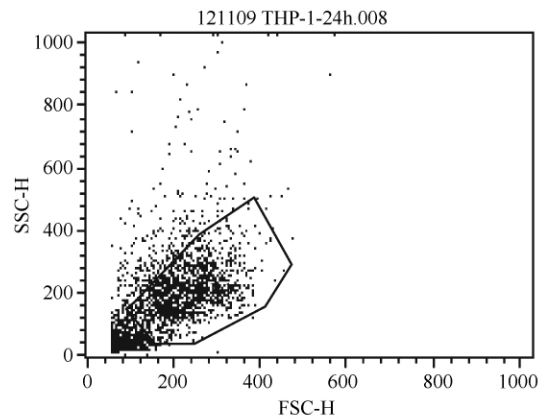


图 3. TBEV 感染 THP-1 细胞的流式细胞检测

Figure 3. FACS detection of THP-1 infected with TBEV.

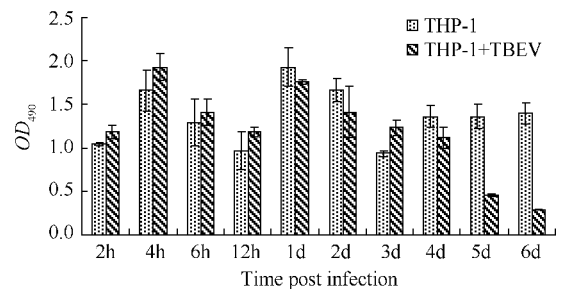


图 4. TBEV 感染 THP-1 细胞后不同时间点的 OD 值

Figure 4. OD values at different time points after inoculating THP-1 cells with TBEV.

前,TBEV 进入中枢神经系统的机制尚不明确,JEV 及 WNV 的研究表明,单核细胞在病毒感染中枢神经系统及造成脑部病理损伤过程中发挥了重要作用。JEV 不能在红细胞、粒细胞及淋巴细胞等免疫细胞中复制,但可在单核细胞中增殖<sup>[4]</sup>。小鼠感染 JEV 后脑内可出现巨噬细胞的活化及携带病毒的单核细胞浸润,并伴随炎症因子表达的上调<sup>[6]</sup>。

Guido M 等<sup>[5]</sup>取 WNV 病人组织样本作为研究对象,发现 WNV 不仅可直接感染神经元细胞,并可直接感染星型细胞及单核细胞,诱导神经炎症相关分子的基因表达上调,从而造成神经炎症反应。Kelsey Roe 等<sup>[14]</sup>在小鼠体内的试验也发现,WNV 开始进入中枢神经系统,并不改变血脑屏障的完整性,随着 WNV 在中枢神经系统中复制增殖,引起严重的炎症反应,包括基质金属蛋白酶类和细胞因子的产生,导致血脑屏障破坏,进而观察到脑中出现单核细胞浸润现象,因此推测在 WNV 感染中枢神经系统过程中,浸润的免疫细胞可携带大量 WNV 进入中枢神经系统,造成脑部进一步的病理损伤。

TBEV 和 WNV、JEV 同为黄病毒属成员,已有研究表明免疫细胞在 TBEV 复制及侵袭中也发挥了重要作用<sup>[15]</sup>。Labuda M 等发现 TBEV 可以感染兰格汉斯细胞,这是一种未成熟的树突状细胞,它在天然屏障皮肤皮层中识别病毒颗粒<sup>[16-17]</sup>。巨噬细胞也是 TBEV 的易感细胞,而且 TBEV 的感染可以促使巨噬细胞的产物 NO 活性增加和某些炎症因子如 TNF- $\alpha$  分泌的增加,而 NO 可间接抑制病毒的复制增殖<sup>[18-20]</sup>。Daniel 等<sup>[7]</sup>发现 TBEV 感染引起鼠致死性脑炎,在血脑屏障破坏过程中,同样可观察到脑中淋巴细胞浸润及病毒量扩增。

TBEV 对单核细胞的感染性及其在单核细胞中的复制增殖情况尚未有系统的研究报道。本研究旨在从 TBEV 对单核细胞致病性的研究着手,探索单核细胞在 TBEV 感染过程中的重要作用。在后续的科研工作中,将对 T 细胞、B 细胞、中性粒细胞等其他免疫细胞在 TBEV 感染过程中的作用进行探讨。

本研究选取我国所流行的蜱传脑炎病毒森张株感染单核细胞 THP-1,通过病毒滴度测定、Real-time RT-PCR、流式细胞法、细胞活力测定等方法证实,蜱传脑炎病毒可在单核细胞 THP-1 中复制增殖,感染后第 2 天,达到峰值  $5.62 \times 10^8$  /mL,而且可造成单核细胞的细胞活力降低,表明单核细胞可作为 TBEV 培养的易感细胞,同时提示 TBEV 的感染及在机体内的传播可能与单核细胞有关,TBEV 进入血液后,可能通过单核细胞的携带进入肝、肾、神经系统等各器官,从而引起了严重的脏器损伤及脑炎症状。尤其在 TBEV 感染中枢神经系统过程中,病毒是否通过单核细胞携带跨过血脑屏障,进入中枢神经系统,值得进一步的深入研究。

## 参考文献

- [1] Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection*, 2010, 13: 1-9.
- [2] Mao L, Zhao J, Xu X, Sun S. Progress in studies on forest encephalitis. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2002, 15 (2): 105-107. (in Chinese)  
毛丽君, 赵金垣, 徐希娴, 孙淑云. 森林脑炎研究进展. *中国工业医学杂志*, 2002, 15 (2): 105-107.
- [3] Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitisvirus-a review of anemerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 2009, 90: 1781-1794.
- [4] Yang KD, Yeh WT, Chen RF, Chuon HL, Tsai HP, Yao CW, Shaio MF. A model to studyneurotropismand persistency ofJapaneseencephalitis virus infection in humanneur- oblastoma cells and leukocytes. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 635-642.
- [5] Marle GV, Antony J, Ostermann H, Dunham C, Hunt T, Halliday W, Maingat F, Urbanows-ki MD, Hobman T, Peeling J, Power C. West nile virus-induced neuroinflammation: Glial infection and capsid protein-mediated neurovirulence. *Journal of Virology*, 2007, 81 (20): 10933-10949.
- [6] Gupta N, Lomashb V, Rao PL. Expression profile of Japanese encephalitis virus induced neuroinflammationand its implication in disease severity. *Journal of Clinical Virology*, 2010, 49: 4-10.
- [7] Růžek D, Salát J, Sunit KS, Kopecky J. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8 + T-cells. *PLoS One*, 2011, 4 (6): e20472.
- [8] Endo S, Toyoda Y, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Stimulation of human monocytic THP-1 cells by metabolic activati on of hepatotoxic drugs. *Drug Metab Pharmacokin*, 2012, 27 (6): 621-630.
- [9] 杜平. 医用实验病毒学. 上海: 人民军医出版社, 1985: 123.
- [10] Michaela S, Pascal C. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*, 2003, 27: 136-145.
- [11] Jacobberger J, Fogelman D, Lehman JM. Analysis of intracellular antigens by flow cytometry. *Cytometry*, 1986, 7: 356.
- [12] Negri M, Botelho C, Silva SJ. An in vitro evaluation of candida trapicalis infectivity using human cell monolayers. *Microbiology*, 2011, 60: 1270-1275.
- [13] Ma X, Peng W, Gao X. Progress in studies on forest encephalitis. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20 (2):

- 190-192. (in Chinese)  
马新英, 彭文明, 高轩. 森林脑炎研究进展. 病毒学报, 2004, 20 (2) : 190-192.
- [14] Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B, Vivek R. Nerurkar and Saguna Verma. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *Journal of General Virology*, 2012, 93 : 1193-1203.
- [15] Dörnböckera B, Dobler G, Spiegela M, Hufert FT. Tick-borne encephalitis virus and the immuneresponse of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2010, 8 : 213-222.
- [16] Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 1996, 219 (2) : 357-366.
- [17] Cerovic V, McDonald V, Nassar MA, Paulin SM, Macpherson GG, Milling W. New insights into the roles of dendritic cells in intestinal immunity and tolerance. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2008, 272 : 33-105.
- [18] Kreil TR, Burger I, Bachmann M, Fraiss S, Eibl MM. Antibodies protect mice against challenge with tick-borne encephalitis virus (TBEV)-infected macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 1997, 110 (3) : 358-361.
- [19] Ahantarig A, Ruzek D, Vancova M, Janowitz A, St'astna H, Tesarova M. Tick-borne encephalitis virus infection of cultured mouse macrophages. *Intervirology*, 2009, 52 (5) : 283-290.
- [20] Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6 (3) : 173-182.

## Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus to monocytes

Jingjing Wei<sup>1,2</sup>, Xiaoping Kang<sup>2</sup>, Yuchang Li<sup>2</sup>, Xiaoyan Wu<sup>2</sup>, Yu Zhang<sup>2</sup>,  
Yinhui Yang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> PLA General Hospital, Beijing 100853, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus (TBEV) to monocytes and its proliferation characteristics. [Methods] After being infected with TBEV, the cytopathic effect of monocyte cell line THP-1 was observed and viral titers were evaluated. Cell culture supernatants at different time points after infection were collected and the nucleic acids of TBE virus and the infection percentage were tested by using Real-time RT-PCR and fluorescence-activated cell sorting (FACS); the survival rate of THP-1 after TBEV infection was detected by Dimethylthiazol-carboxymethoxy-p-henyl-Sulfophenyl-2H-tetrazolium inner salt (MTS). [Results] Real-time RT-PCR and cytopathic assay both demonstrated that TBE virus could replicate in monocytes. The virus particles could be detected and visualized by FACS. In addition, monocyte viability was significantly decreased 5 days after infection with TBEV. [Conclusion] TBEV can efficiently replicate and proliferate in THP-1 cells, indicating that monocytes may play an important role in the process of TBEV spreading to various tissues and organs after infection.

**Keywords:** Tick-borne encephalitis virus, monocyte, pathogenicity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171663) and by the National Key Research Special Foundation of China (2013zx10004606)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-66948471; E-mail: yyh428@sina.com

Received: 13 March 2013 / Revised: 28 April 2013