



## 蜱传脑炎病毒跨过血脑屏障的体外实验

康晓平<sup>\*</sup>, 李裕昌, 吴晓燕, 魏婧靖, 郝淮杰, 姜涛<sup>\*</sup>

军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 病原微生物与生物安全国家重点实验室, 北京 100071

**摘要:**【目的】构建蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus, TBEV)跨血脑屏障研究的体外细胞模型, 研究 2 种不同细胞的 TBEV 培养物在病毒跨过血脑屏障中的主要差异, 从而为进一步 TBEV 跨血脑屏障的分子机制研究奠定基础。【方法】利用人脑微血管内皮细胞(Human brain microvascular endothelial cells, hCMEC/D3)构建体外血脑屏障的细胞模型。用 BHK-21 细胞中培养的蜱传脑炎病毒感染人脑微血管内皮细胞, 检测 TBEV 在 hCMEC/D3 中的复制增殖情况; 将 TBEV 加入体外血脑屏障模型的上层微孔中, 用实时荧光定量 PCR 和噬斑测定的方法检测跨过血脑屏障的病毒量; 将感染 TBEV 的人单核细胞加入血脑屏障模型的上层微孔中, 观察渗漏进下层孔中的淋巴细胞, 并用实时荧光定量 PCR 和噬斑测定的方法检测跨过血脑屏障的病毒量。利用伊文思蓝标记的白蛋白确定血脑屏障细胞的渗透率变化。【结果】实时荧光定量 PCR 和病毒滴度测定结果表明, TBEV 不能在 hCMEC/D3 细胞中复制增殖, 也不能直接跨过血脑屏障; 然而, 人单核细胞 THP-1 感染 TBEV 后, 尽管单核细胞不能直接携带 TBEV 跨过血脑屏障, 但 THP-1 中产生的病毒却能跨过血脑屏障模型进入下层孔中, 并引起血脑屏障渗透率的增高。【结论】单核细胞有助于 TBEV 跨过血脑屏障。

**关键词:** 蜱传脑炎病毒, 血脑屏障, 单核细胞

蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus, TBEV)属于黄病毒科黄病毒属, 单股负链 RNA 病毒, 主要通过蜱虫叮咬传播, 可引起重症脑炎和脑膜炎。TBEV 流行于多个地区, 包括中国北部、日本、俄罗斯及欧洲。TBEV 包括 3 种亚型: 远东亚型、西伯利亚亚型及欧洲亚型。3 个亚型中,

远东亚型感染性和致死率最高, 可达 25%。我国所流行的 TBEV 即为远东亚型<sup>[1-3]</sup>。

TBEV 首先通过蜱虫叮咬进入机体, 可在血液、脾、淋巴结、肾脏等多种器官中复制增殖, 并造成机能失调, 进而感染神经系统, 造成神经系统损伤。患者常出现严重的脑炎和脑膜炎症状, 即使

基金项目: 国家传染病重大专项(2018ZX10711001); 国家自然科学基金(81501789); 军队后勤科研项目(AWS15J006)

\*通信作者。姜涛, Tel: +86-10-66948610, E-mail: jiang\_tao@126.com; 康晓平, Tel: +86-10-66948610, E-mail: kangxiaoping@163.com

收稿日期: 2018-05-13; 修回日期: 2018-09-14; 网络出版日期: 2018-11-28

愈后, 患者也常出现严重的神经系统后遗症。在 TBEV 感染过程中, 病毒跨过血脑屏障进而侵入中枢神经系统, 是引发重症脑炎的关键环节<sup>[4-5]</sup>, 目前, TBEV 跨过血脑屏障的机制尚不清楚, 研究 TBEV 跨血脑屏障的机制, 对于阐释 TBEV 的感染机制, 研发有效的防治手段, 具有重要意义。

本研究利用人脑微血管内皮细胞, 构建了体外血脑屏障模型。首先研究了 TBEV 在人脑微血管中的复制增殖情况; 进而将 TBEV 加入体外血脑屏障模型上层微孔中, 通过检测下层孔中的病毒量, 确定 TBEV 是否可直接跨过血脑屏障; 进而将 TBEV 感染人单核细胞 THP-1, 将单核细胞携带的 TBEV 加入血脑屏障上层孔中, 通过检测下层孔中的病毒量, 确定 TBEV 是否可在免疫细胞的协助下跨过血脑屏障。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞及病毒株

蜚传脑炎病毒森张株由军事医学研究院微生物流行病学研究所毒种库提供。人脑微血管内皮细胞 hCMEC/D3 由军事医学研究院微生物流行病学研究所提供, 细胞在常规条件下利用含 5% 胎牛血清 (FBS) 的 EBM-2 培养基进行培养。单核细胞 THP-1 由军事医学研究院微生物流行病学研究所细胞库提供, 细胞在常规条件下利用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 1640 培养基进行培养。

### 1.2 TBEV 的培养及空斑滴定

用含 10% FBS 的 DMEM 培养 BHK-21 细胞至铺面单层, TBEV 感染后培养液换为含 2% FBS 的 DMEM, 在 37 °C 二氧化碳培养箱中培养 3-4 d, 至细胞病变后, 收集上清, 用空斑试验进行病毒滴定。

空斑滴定实验的步骤如下: BHK-1 细胞传至 6 孔板内, 继续培养至 80%-90% 时用于感染。将待测病毒液用 2% FBS 的 DMEM 完全培养基将病毒作 10 倍稀释, 将病毒稀释液按 1 mL/孔感染六孔板内 BHK-1 细胞, 同时设置不加病毒液的阴性对照, 37 °C 吸附 1 h, 期间每隔 15 min 晃动六孔板; 待病毒吸附完成后, 移除病毒液, 将预热至 56 °C 的 2.5% 低熔点琼脂糖和 2×MEM 培养基等体积混匀, 按 2 mL/孔加入六孔板各孔; 室温放置 3-5 min, 待其凝固后, 置于 37 °C 培养箱继续培养。

然后培养 3 d 待细胞病变时进行蚀斑染色。将预热至 56 °C 的 2.5% 低熔点琼脂糖和 2×MEM 培养基等体积混匀, 加入 20% 中性红溶液, 按 1 mL/孔加入六孔板各孔; 室温静置 30 min; 待其凝固后, 置于 37 °C 培养箱继续培养。逐日观察中性红染色结果, 待六孔板中出现清晰可见的蚀斑时, 通过计算蚀斑数量计算病毒滴度。

### 1.3 hCMEC/D3 细胞的培养

首先用鼠胶原包被细胞培养瓶/培养板, 然后将 hCMEC/D3 细胞传至细胞培养瓶/培养板中培养。培养液为含 5% 胎牛血清 (FBS) 的 EBM-2 完全培养液。

### 1.4 体外血脑屏障模型的制备

在 24 孔细胞培养孔中放入 Transwell 装置 (孔径 5.0 μmol/L), 然后将 1×10<sup>5</sup> 个/mL 的 hCMEC/D3 细胞传至 Transwell 上层微孔中, 100 μL/孔, 下层微孔中加入细胞培养液。待细胞铺满单层, 然后将孔中培养液换为含 1% FBS 的 EBM-2 完全培养液, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 10-15 d, 待细胞长为完全致密的单层。然后用伊文思蓝染色法测定细胞的渗透率, 具体如下: 首先吸除上层孔中液体, 并用 PBS 冲洗 1 遍。然后在上层孔中加入 0.5%

伊文斯蓝溶液, 200  $\mu\text{L}$ /孔, 下层孔中换成 PBS, 1 mL/孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育, 分别在孵育 0、10、20、30、40、50 min 后, 取下层孔中液体, 加入酶联板中, 用化学发光酶联仪测定 620 nm 发光值。同时将 0.5%伊文斯蓝溶液进行对倍稀释, 读数, 作为标准对照。以时间为横坐标, 伊文思蓝荧光强度为纵坐标, 分别绘制对照组曲线和实验组曲线。分别计算出对照组曲线的斜率(mf)和实验组曲线的斜率(me)。然后根据以下公式计算血脑屏障的渗透率。 $1/PS=1/me-1/mf$ ;  $Pe=PS/s$ : transwell 微孔的底面积,  $Pe$ : 渗透率系数<sup>[6]</sup>。

待细胞长至渗透率  $Pe<0.02$ , 证明该细胞生长已足够致密, 已达到血脑屏障研究的要求。

### 1.5 TBEV 对 hCMEC/D3 细胞的感染实验

hCMEC/D3 细胞传至 96 孔培养板中, 采用含 5% FBS 的 EBM-2 完全培养液于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养, 当细胞长至 80%–90%后用于病毒感染。将 TBEV 接种至铺满 hCMEC/D3 的 96 孔培养板中, 细胞计数后, 按照感染复数为 1 接种病毒, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 同时设未感染病毒的正常细胞对照。取感染后的不同时间点 2、4、6、12、24、48、72、96 h, 将细胞刮下, 吸取细胞及培养上清, 同时, 显微镜下观察照相。

### 1.6 TBEV 跨血脑屏障实验

分别收集在 BHK-21 细胞中培养的 TBE 病毒和感染 TBEV 的 THP-1 细胞, 进行跨血脑屏障研究。将感染复数为 1 的病毒液 100  $\mu\text{L}$  加入铺满 hCMEC/D3 细胞已符合血脑屏障模型的 Transwell 微孔中, 每组 3 个复孔, 于感染后的不同时间点 2、4、6、12、24、48、72、96、120 h 分别吸取下层孔中液体, 用空斑检测和荧光定量 PCR 方法进行病毒滴度测定<sup>[6-7]</sup>。

### 1.7 实时荧光定量 PCR 检测 TBEV 病毒核酸

将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。采用 PureLink RNA Mini Kit 试剂盒提取 RNA: 取 100  $\mu\text{L}$  上清, 加入 100  $\mu\text{L}$  含 1%  $\beta$ -巯基乙醇的 Lysis buffer, 于 EP 管中混匀, 再加入 100  $\mu\text{L}$  无水乙醇, 于振荡器上混匀振荡 10–15 s; 把以上混合物转移到柱子中(柱子最大容量为 700  $\mu\text{L}$ ), 12000 r/min 离心 15 s, 弃上清; 加入 700  $\mu\text{L}$  Wash Buffer I 到柱子中, 12000 r/min 离心 15 s, 弃上清, 并把柱子转移到一个新的接收管中; 加入 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer II 到柱子中, 12000 r/min 离心 15 s, 弃上清; 重复上一步骤 1 次; 12000 r/min 空管离心 1–2 min; 扔掉接收管, 换一个新的 EP 接收管; 加入 30–100  $\mu\text{L}$  RNase-free 水, 注意要垂直加入到柱子中央; 静置 1 min;  $\geq 12000$  r/min 离心 2 min; 扔掉柱子, EP 管中收集的液体即为提取的 DNA, 标记, 冻存于  $-70$   $^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

所用的荧光定量 PCR 上游引物 5'-GGGCGGT TCTTGTTCTCC-3', 下游引物 5'-ACACATCACCT CCTTGTCAGACT-3', 探针序列 5'-FAM-TGAGCC ACCATCACCCAGACACA-TAMRA-3'<sup>[8]</sup>, 用 TaKaRa 公司生产的 One step real time RT-PCR kit (DRR064A) 进行扩增, 具体扩增条件按说明书要求进行。

### 1.8 血脑屏障细胞渗透率变化测定

以伊文思蓝偶联的 BSA (Evens-BSA)作为指示剂, 通过检测 Evens-BSA 从上层孔中穿过脑微血管内皮细胞层进入下层孔中的百分比, 确定血脑屏障渗透率变化情况。在 TBEV 病毒加入 transwell 微孔中后, 分别在 1–3 d 后对未长细胞的 transwell 孔、正常细胞对照组、BHK-21 培养的

TBEV 组、THP-1 培养的 TBEV 组中的下层孔中收集培养液,测  $OD_{620}$  值确定血脑屏障细胞渗透率的变化。以未生长细胞的 transwell 孔作为空白组,渗透率为 100%, 未加病毒的细胞组作为对照组,实验组的渗透率变化计算公式如下:

$$\text{渗透率变化 (\%)} = \frac{(OD_{620} \text{ 试验组} - OD_{620} \text{ 对照组})}{(OD_{620} \text{ 空白组} - OD_{620} \text{ 对照组})} \times 100\%$$

## 2 结果和分析

### 2.1 TBEV 不能在 hCMEC/D3 细胞中复制增殖

TBEV 直接感染 hCMEC/D3 细胞, 感染后的不同时间点吸取细胞及培养上清, 提取 RNA 后, 进行 RT-PCR 检测, 结果如图 1 所示。同时, 显微镜下观察照相, 结果如图 2 所示。在感染后的不同时间点, 虽检测到了病毒核酸的存在, 但未检测到明显的病毒核酸复制增殖; 显微镜观察, 与正常细胞组相同, TBEV 感染后, hCMEC/D3 没有出现细胞病变现象, 结果表明 TBEV 不能感染 hCMEC/D3 细胞, 也不能在 hCMEC/D3 细胞中复制增殖。

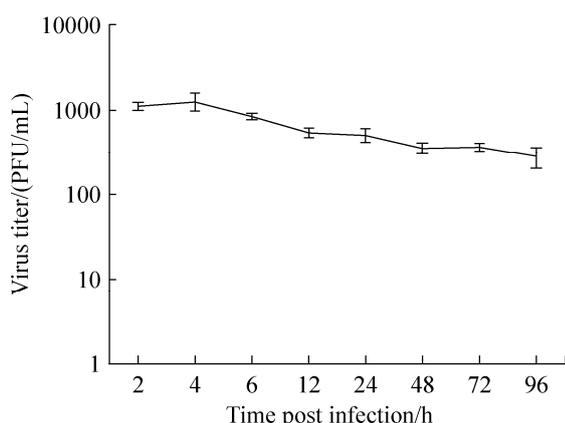


图 1. TBEV 在 hCMEC/D3 细胞中的增殖动力学  
Figure 1. Proliferation kinetics of TBEV in hCMEC/D3 cells.

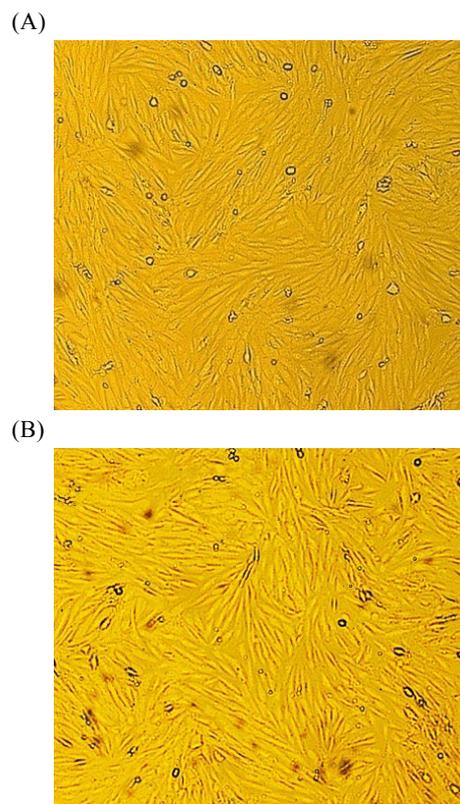


图 2. TBEV 感染 hCMEC/D3 细胞 3 d 后的显微镜观察

Figure 2. Observation of hCMEC/D3 cells 3 days post infection of TBEV using microscope. A: Normal cells; B: Cells infected with TBEV.

### 2.2 BHK-21 培养的 TBEV 不能跨过体外血脑屏障模型

TBEV 感染接种至 transwell 微孔的 hCMEC/D3 细胞, 感染后的不同时间点吸取下层孔中液体, 提取 RNA 后, 进行 RT-PCR 检测, 结果如图 3-A 所示, 在下层孔中检测到了病毒核酸, 但随着时间的变化, 未检测到明显的病毒核酸增多。表明有少量病毒的核酸片段穿过了 hCMEC/D3 细胞之间的微小缝隙, 进入到了下层孔中。为了确定是否有活病毒穿过血脑屏障进入下层孔中, 本研究进一步用空斑检测方法检测下层孔中的病毒滴度。与正常细胞组相同, 感染 TBEV 组没有出现

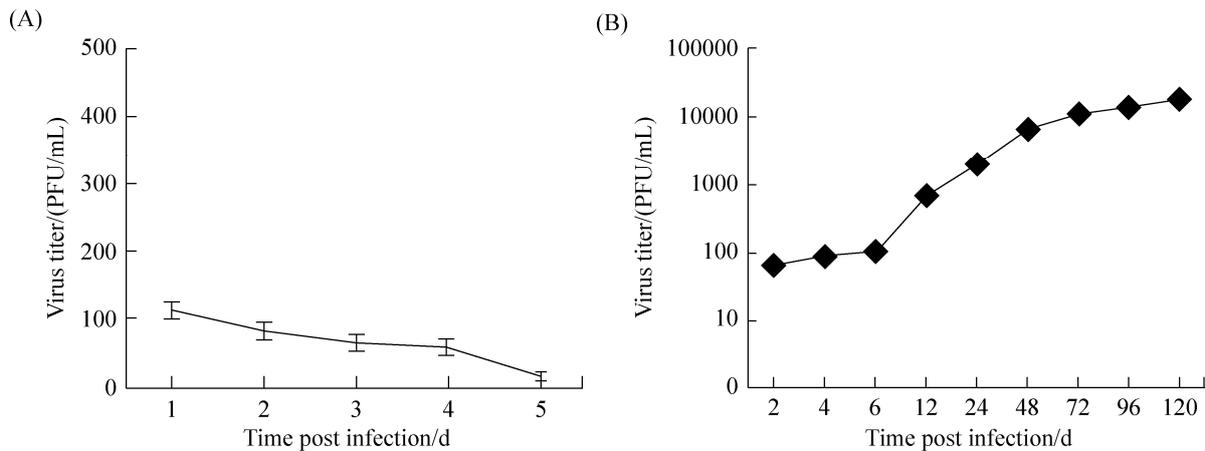


图 3. TBEV 跨过血脑屏障的病毒滴度测定

Figure 3. Detection of TBEV transmitted across the *vitro* blood brain barrier. A: TBEV cultured from BHK-21 cells; B: TBEV cultured from THP-1 cells.

病毒蚀斑现象;CPE 观察也发现,感染 TBEV 组中, BHK-21 细胞未出现病变现象,表明 TBEV 未通过致密的 hCMEC/D3 细胞层进入下层孔中(图 4-B)。

### 2.3 THP-1 细胞中培养的 TBEV 可跨过体外血脑屏障模型

TBEV 感染 THP-1 细胞 24 h 后,收集 THP-1 细胞,加入铺满 hCMEC/D3 细胞已符合血脑屏障模型的 Transwell 微孔中,  $10^3$  细胞/孔,感染后的不同时间点,观察单核细胞的渗漏情况,但未观测到有单核细胞渗透入下层孔中;并于感染后 2、

4、6、12、24、48、72、96、120 h,分别吸取下层孔中液体,提取 RNA,进行 RT-PCR 检测。结果如图 5 所示,感染病毒后 12 h,可在下层孔中检测到病毒核酸显著增多,随着时间的变化,病毒核酸也逐渐增加(图 3-B)。

为了验证下层孔中检测到的是否为活病毒,采用 CPE 观察实验验证,将 TBEV+THP-1 细胞组和正常 THP-1 细胞组,各组在 1-4 d 取下层孔中液体作 10 倍梯度稀释,感染 BHK-21 细胞,观察细胞病变情况。由于 CPE 观察实验分析了各



图 4. 跨过体外血脑屏障的 TBEV 引起的病变效应观察

Figure 4. Visualization of the cytopathology effect caused by TBEV transmitted across the *vitro* blood brain barrier. A: Normal cells; B: Cells infected with TBEV from BHK-21; C: Cells infected with TBEV from THP-1.

时间点不同稀释度的样品, 结果较多, 此处只列出其中两组作比较, 如图 4-C 所示, 与正常细胞组相比, 病毒组中, BHK-21 细胞变圆脱落, 出现了明显的细胞病变现象, 空斑检测结果表明, 至感染后第 4 天, 下层孔中的病毒滴度可达到  $7 \times 10^2$  PFU/mL, 表明 THP-1 细胞中培养的 TBEV 可穿过 hCMEC/D3 致密细胞层(图 5)。但下层孔中未观测到单核细胞, 表明单核细胞不能直接携带 TBEV 跨过血脑屏障。

## 2.4 TBEV 跨血脑屏障过程中可引起细胞渗透率变化

为了确定在 TBEV 跨血脑屏障过程中血脑屏障细胞渗透率的变化, 本研究以伊文思蓝偶联的 BSA 作为指示剂, 通过检测 Evens-BSA 从上层孔中穿过脑微血管内皮细胞层进入下层孔中的百分比, 确定血脑屏障渗透率变化情况。结果如图 6 所示。来自 BHK-21 细胞的 TBEV 培养上清未引起细胞渗透率发生明显变化, 而感染 TBEV 的 THP-1 细胞组, 感染 3 d 后, 细胞的渗透率已增高 50%, 至第 4 天, 细胞渗透率已增高 90%。表明

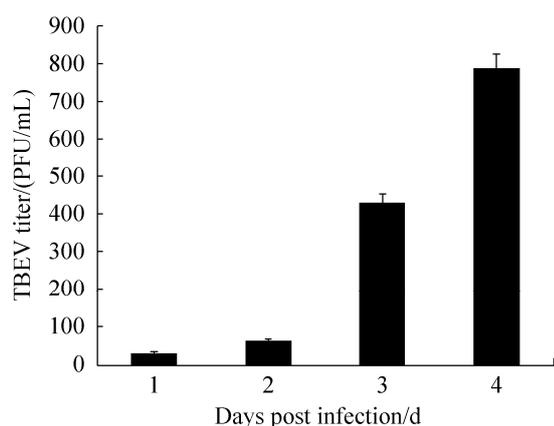


图 5. 噬斑检测跨过血脑屏障的 TBEV 滴度

Figure 5. TBEV titer transmitting across the BBB by plaque assay.

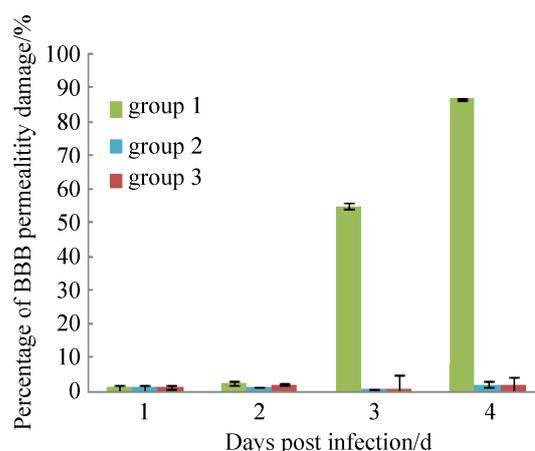


图 6. 血脑屏障渗透率变化

Figure 6. Permeability damage of BBB. Group 1: THP-1 cells infected with TBEV; Group 2: TBEV group; Group 3: Normal cells.

THP-1 细胞感染 TBEV 后, 培养上清可造成血脑屏障渗透率的增高, 从而利于病毒跨过血脑屏障进入中枢神经系统中。

## 3 讨论

病毒在感染机体过程中, 跨过血脑屏障是进入中枢神经系统从而引发重症感染的关键环节。病毒进入中枢神经系统的途径, 通常包括以下 3 种<sup>[9-12]</sup>: (1) 受体介导的跨细胞途径。病毒通过与细胞表面受体结合进入内皮细胞, 并在内皮细胞中复制增殖, 进而侵入 CNS。如西尼罗病毒、日本乙型脑炎等病原体。(2) 通过内皮细胞间隙进入 CNS。机体在受到感染过程中, 免疫系统可分泌多种免疫因子, 从而发挥免疫保护作用, 但过度的免疫反应则可造成免疫系统的损伤<sup>[13]</sup>。如 IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  等先天免疫相关因子可促进金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的产生, 而 MMPs 的高表达可造成内皮细胞细胞间紧密连接蛋白的降解, 从而造成血脑屏障通透性的增高,

病原体可从细胞间隙进入 CNS。(3) 免疫细胞介导的木马机制。病原体通过感染免疫细胞而进入 CNS, 如李斯特菌、HIV 等。已有研究表明李斯特菌、日本乙型脑炎病毒(JEV)可直接感染单核细胞及巨噬细胞, 并可由单核细胞携带进入中枢神经系统<sup>[14-15]</sup>。

目前对病毒跨血脑屏障研究, 通常采用体外模型进行研究。将人脑微血管内皮细胞培养在含有上下两层微孔的装置中, 待细胞长成致密的单细胞层、渗透率足够低时, 进行病毒跨血脑屏障实验。通过检测病毒的复制增殖、血脑屏障细胞层渗透率的变化、跨膜病毒的滴度, 确定病毒的跨膜途径及机制。

本研究首先进行了 TBEV 感染 hCMEC/D3 细胞的实验, 结果表明 TBEV 不能在 hCMEC/D3 细胞内复制增殖。进而利用人脑微血管内皮细胞 hCMEC/D3 制备了体外血脑屏障模型。同样 TBEV 无法跨过由 hCMEC/D3 细胞组成的体外血脑屏障模型。

TBEV 可在多种靶细胞中复制增殖, 包括神经细胞、肾细胞、淋巴细胞等<sup>[5,8,16-18]</sup>。本课题组在前期工作中, 检测到 TBEV 可在单核细胞中复制增殖, 于感染后 1 d, 即有 30% 以上的 THP-1 细胞感染病毒, 并且细胞的生长活性保持良好<sup>[16]</sup>。为了进一步探索 TBEV 是否可由淋巴细胞携带跨过血脑屏障, 本研究取 TBEV 感染 1 d 后的 THP-1 细胞进行跨血脑屏障实验, 结果表明, 虽然单核细胞未进入下层孔中, 但却有大量病毒跨过血脑屏障, 并且可造成血脑屏障渗透率的增高。表明单核细胞对于 TBEV 跨过血脑屏障, 可发挥重要作用。

淋巴细胞感染病毒后, 常会出现细胞因子风

暴<sup>[13,19]</sup>。在前期工作中, 本课题组收集了多例 TBEV 感染病人的脑脊液临床样本, 检测到在 TBEV 病人脑脊液中出现 IL-6、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 的高表达, 且 MMP-9 的表达升高与病人疾病的严重程度密切相关<sup>[20]</sup>。MMP-9 是一种与血脑屏障密切相关的因子, 其高表达可造成内皮细胞细胞间紧密连接蛋白的降解, 从而造成血脑屏障通透性的增高。本研究检测到单核细胞并未直接携带 TBEV 跨过血脑屏障, TBEV 是伴随血脑屏障的破坏进入下层孔中。推测单核细胞感染 TBEV 后, 其产生的某些因子造成了血脑屏障渗透率的增高。在下一步工作中, 本研究拟进一步研究 THP-1 感染病毒后所分泌的细胞因子及 MMP-9 等分子的表达变化, 及与血脑屏障渗透率变化之间的关系, 这对于揭示 TBEV 跨血脑屏障的分子机制, 将具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus—a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 2009, 90(8): 1781–1794.
- [2] Kreil TR, Burger I, Bachmann M, Fraiss S, Eibl MM. Antibodies protect mice against challenge with tick-borne encephalitis virus (TBEV)-infected macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*, 1997, 110(3): 358–361.
- [3] Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, Suzuki R, Gould EA, Takashima I, Koike S. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology*, 2009, 390(1): 139–150.
- [4] Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection*, 2011, 13(1): 1–9.
- [5] Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2010, 8(4):

- 213–222.
- [6] Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B, Nerurkar VR, Verma S. 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(6): 1193–1203.
- [7] Al-Obaidi MMJ, Bahadoran A, Har LS, Mui WS, Rajarajeswaran J, Zandi K, Manikam R, Sekaran SD. Japanese encephalitis virus disrupts blood-brain barrier and modulates apoptosis proteins in THBMEC cells. *Virus Research*, 2017, 233: 17–28.
- [8] Růžek D, Vancová M, Tesařová M, Ahantarig A, Kopecký J, Grubhoffer L. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of General Virology*, 2009, 90(7): 1649–1658.
- [9] Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J, Nuttall PA. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 1996, 219(2): 357–366.
- [10] Cerovic V, McDonald V, Nassar MA, Paulin SM, MacPherson GG, Milling SWF. New insights into the roles of dendritic cells in intestinal immunity and tolerance. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2008, 272: 33–105.
- [11] Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(3): 173–182.
- [12] Gupta N, Lomash V, Rao PVL. Expression profile of Japanese encephalitis virus induced neuroinflammation and its implication in disease severity. *Journal of Clinical Virology*, 2010, 49(1): 4–10.
- [13] Grygorczuk S, Parczewski M, Świerzbńska R, Czupryna P, Moniuszko A, Dunaj J, Kondrusik M, Pancewicz S. The increased concentration of macrophage migration inhibitory factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis. *Journal of Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 126.
- [14] Michalicová A, Bhide K, Bhide M, Kováč A. How viruses infiltrate the central nervous system. *Acta Virologica*, 2017, 61(4): 393–400.
- [15] Yang KD, Yeh WT, Chen RF, Chuon HL, Tsai HP, Yao CW, Shaio MF. A model to study neurotropism and persistency of Japanese encephalitis virus infection in human neuroblastoma cells and leukocytes. *Journal of General Virology*, 2004, 85(3): 635–642.
- [16] Wei JJ, Kang XP, Li YC, Wu XY, Zhang Y, Yang YH. Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus to monocytes. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1221–1225. (in Chinese)  
魏婧婧, 康晓平, 李裕昌, 吴晓燕, 张雨, 杨银辉. 蜱传脑炎病毒对人单核细胞的致病性. *微生物学报*, 2013, 53(11): 1221–1225.
- [17] Wei JJ, Li YC, Wu XY, Si BY, Zhang Y, Li J, Hu Y, Zhu QY, Yang YH, Kang XP. Studying the pathogenicity of TBEV to human neuroblastoma tumor cells. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2012, 32(5): 415–418. (in Chinese)  
魏婧婧, 李裕昌, 吴晓燕, 司炳银, 张雨, 李靖, 户义, 祝庆余, 杨银辉, 康晓平. TBEV 对人神经细胞致病性的实验研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2012, 32(5): 415–418.
- [18] Ahantarig A, Růžek D, Vancová M, Janowitz A, Št'astná H, Tesařová M, Grubhoffer L. Tick-borne encephalitis virus infection of cultured mouse macrophages. *Intervirology*, 2009, 52(5): 283–290.
- [19] van Marle G, Antony J, Ostermann H, Dunham C, Hunt T, Halliday W, Maingat F, Urbanowski 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.
- [20] Kang XP, Li YC, Wei JJ, Zhang Y, Bian C, Wang K, Wu XY, Hu Y, Li J, Yang YH. Elevation of matrix metalloproteinase-9 level in cerebrospinal fluid of tick-borne encephalitis patients is associated with IgG extravasation and disease severity. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e77427.

## ***In vitro* experiment for tick borne encephalitis virus transmitting across the blood brain barrier**

Xiaoping Kang<sup>\*</sup>, Yuchang Li, Xiaoyan Wu, Jingjing Wei, Huaijie Hao, Tao Jiang<sup>\*</sup>

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Science, Beijing 100071, China

**Abstract:** [Objective] To understand the route and mechanism of tick borne encephalitis virus transmitting across the blood brain barrier, we established an *in vitro* blood brain barrier model, and studied the difference of the virus cultured from two different cell lines for transmitting across the blood brain barrier. [Methods] We used human brain microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) to establish the *vitro* blood brain barrier model. First, we detected the infection and replication of tick borne encephalitis virus in hCMEC/D3 using real time PCR and plaque assay. Then, we conducted the transmitting assay by adding tick borne encephalitis virus into the transwell inserts of the blood brain barrier model and detected virus titer leaking from the upper inserts into the bottom wells using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and plaque assay. Meanwhile, we added the THP-1 cells infected with tick borne encephalitis virus into the transwell inserts and observed the bottom wells under the optical microscope to confirm if the monocyte THP-1 could leak across the *vitro* blood brain barrier. The virus titer leaked into bottom wells were detected by using qRT-PCR and plaque assay. The permeability change of blood brain barrier at different time post infection was tested by using Bovine Serum Albumin conjugated evens blue. [Results] We found that no replication of tick borne encephalitis virus in hCMEC/D3 cells, and tick borne encephalitis virus cultured in BHK-21 was unable to transmigrate across the blood brain barrier directly. However, the monocyte cell line THP-1 infected with tick borne encephalitis virus could cause its transmitting across the blood brain barrier and increase the permeability of the blood brain barrier, though THP-1 did not transmit across the *vitro* blood brain barrier directly. [Conclusion] Tick borne encephalitis virus can transmigrate across the blood brain barrier in assistance of monocyte THP-1 cells.

**Keywords:** tick-borne encephalitis virus, blood brain barrier, monocyte

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Major Project (2018ZX10711001), by the National Natural Science Foundation of China (81501789) and by the Army Scientific Research Project (AWS15J006)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tao Jiang, Tel: +86-10-66948610, E-mail: jiang\_tao@126.com; Xiaoping Kang, Tel: +86-10-66948610, E-mail: kangxiaoping@163.com

Received: 13 May 2018; Revised: 14 September 2018; Published online: 28 November 2018