

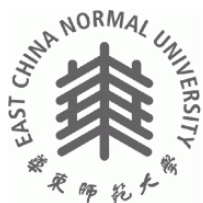
2020 届研究生博士学位论文

分类号: _____

学校代码: 10269

密 级: _____

学 号: 52171300053



華東師範大學

East China Normal University
博士学位论文
DOCTORAL DISSERTATION

论文题目: 朊蛋白在 H7N7-IAV 感染
中的作用及机制研究

院 系: 生命科学学院

专 业: 生态学

研究方向: 动物生态学

指导教师: 王天厚教授

学位申请人: 胡传霞

2020 年 5 月 20 日

Dissertation for doctoral degree in 2020

University Code: 10269

Student ID: 52171300053

East China Normal University

**Title: The Regulatory Functions and Mechanisms of Prion
Protein in H7N7-IAV infection**

Academy: School of Life Sciences

Major: Ecology

Direction: Animal Ecology

Advisor: Prof. Tianhou Wang

Student: Chuanxia Hu

May 20, 2020

编 号	BRDW-XBS-19-03
执行时间	2019.03-2019.06

聊城大学农学院 动物实验操作规程

题 目: 肌蛋白在 A 型流感病毒感染中的作用
和机制研究

起草人(签名): 胡传霞 2019年2月27日
审定人(签名): 高毅毅 2019年3月1日

实验动物伦理委员会

批准人: 李旭勇

2019年3月2日



华东师范大学学位论文原创性声明

郑重声明：本人呈交的学位论文《 朊蛋白在 H7N7-IAV 感染中的作用及机制研究 》，是在华东师范大学攻读硕士/博士（请勾选）学位期间，在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名： 胡传霞

日期： 2020年 5月25日

华东师范大学学位论文著作权使用声明

《 朊蛋白在 H7N7-IAV 感染中的作用及机制研究 》系本人在华东师范大学攻读学位期间在导师指导下完成的硕士/博士（请勾选）学位论文，本论文的著作权归本人所有。本人同意华东师范大学根据相关规定保留和使用此学位论文，并向主管部门和学校指定的相关机构送交学位论文的印刷版和电子版；允许学位论文进入华东师范大学图书馆及数据库被查阅、借阅；同意学校将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于（请勾选）

（ ）1. 经华东师范大学相关部门审查核定的“内部”或“涉密”学位论文*，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（☒）2. 不保密，适用上述授权。

导师签名 王天 本人签名 胡传霞

2020年 5月25日

* “涉密”学位论文应是已经华东师范大学学位评定委员会办公室或保密委员会审定过的学位论文（需附获批的《华东师范大学研究生申请学位论文“涉密”审批表》方为有效），未经上述部门审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权）。

胡传霞 博士学位论文答辩委员会成员名单

姓名	职称	单位	备注
王小明	教授	上海科技馆	主席
杜震宇	教授	华东师范大学	
姜晓东	教授	华东师范大学	
胡薇	教授	复旦大学	
崔杰	研究员	中国科学院上海巴斯德研究所	

摘要

甲型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 是有包膜的、负义、单链 RNA 病毒, 常引起季节性流感, 新型 IAV 具有引起流感大流行的潜在风险。IAV 首先通过病毒表面蛋白 HA 与细胞表面的唾液酸受体结合而侵入呼吸道或肺上皮细胞, 病毒感染的结果取决于病毒复制和宿主免疫反应之间的平衡。IAV 感染引起炎症反应的过度激活会导致促炎细胞因子的过度表达, 形成的“细胞因子风暴”被认为是 IAV 感染机体诱导肺部炎症和引起致病性的重要原因。正常细胞朊蛋白 (Normal Cellular Prion Protein, PrP^c) 是一种细胞表面膜糖蛋白, 在脑中表达最丰富, 肺次之。PrP^c 参与神经保护、免疫反应, 并在各种病毒感染中发挥调节作用。

最新研究表明 PrP^c 通过抗氧化应激能够发挥抗 IAV 病毒感染的作用, 其机制是通过 PrP^c N 末端 OR 区与 Cu²⁺ 结合, 进一步调节活性氧产生酶 (Superoxide Dismutase, SOD1) 的活性, 降低细胞内过量的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的产生, 抑制细胞凋亡, 保护小鼠免受 IAV 的致死性感染。然而, PrP^c 的非 OR 区 (除了 OR 区以外的功能域) 是不是也具有抗病毒感染的作用, 目前尚未有文献深入探讨。此外, PrP^c 能够在 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等免疫细胞, 以及 I 型、II 型肺泡上皮细胞和细支气管 Clara 细胞中表达, 因此 PrP^c 可能在肺部的免疫系统中扮演重要角色。IAV 感染肺上皮细胞, 直接或间接诱导炎性细胞因子产生, 但是 PrP^c 在 IAV 诱导的炎症反应中到底发挥哪些重要作用尚不清楚。

基于此, 本论文通过 PrP^c 两种基因敲除小鼠及 PrP^c 过表达质粒分别在体内和体外两个层次探讨其在 IAV 感染及炎症反应中的作用, 并借助 RNA-Seq 测序、差异基因表达谱的分析和验证, 进一步探讨其中的分子机制。主要研究内容和实验结果如下:

1. 从体内水平研究 PrP^c 对小鼠致病性的影响。首先利用 CRISPR/Cas9 技术构建两类 PrP^{-/-} 小鼠, 分别是朊蛋白全基因敲除小鼠 (119KO) 和朊蛋白 OR 区敲除小鼠 (120KO), 比较野生型小鼠 (WT) 与 PrP^{-/-} 基因敲除小鼠 (119KO 和 120KO) 在 H7N7-IAV 感染后 3、5、8、11 天时的临床症状和肺组织病理学变化。结果表

明,与 WT 小鼠相比,120KO 小鼠更容易感染 H7N7 病毒,即小鼠存活率降低,体重下降明显以及肺部病理损伤更严重;而 PrP^c 全基因敲小鼠(119KO)不易感染 H7N7 病毒,即临床症状及肺组织病理学变化均轻于野生型小鼠。因此,我们推测朊蛋白在病毒感染的过程中具有双重调节作用,即朊蛋白 OR 区可能具有抗流感病毒感染,保护机体,减轻机体损伤的作用,而 PrP^c 非 OR 区可能对于病毒感染具有促进作用。

2. 对病毒感染后 3、5、8、11 天的 120KO、119KO、WT 小鼠和生理盐水对照组小鼠的肺组织进行 RNA-seq 分析与 q-PCR 验证,进一步探讨 PrP^c 在 IAV 诱导炎症反应中的作用。结果表明,H7N7 感染小鼠肺后能够诱导大量细胞炎症因子表达,如 TLRs 通路基因(如 TLR4/7/3、MyD88、TAK1、IRF3)、干扰素(IFN α/β 和 IFN γ)、IL6、TNF α 、Nrf2 和两类趋化因子及其受体(CCL2/3/11 和受体 CCR2/3, CXCL2/3/10/11 和受体 CXCR3/4/6)。与野生型 WT 小鼠相比,大部分细胞因子和趋化因子在 120KO 小鼠中的表达量显著升高,而在 119KO 小鼠中显著降低。因此我们认为 OR 区能够抑制细胞因子和趋化因子在 H7N7 感染后的上调表达,在 IAV 感染诱导的炎症风暴中发挥保护作用;而 PrP^c 的非 OR 区可能促进了炎症因子上调表达,即增强 H7N7-IAV 感染诱导的炎症反应。综上所述,朊蛋白的不同功能域在 H7N7-IAV 感染小鼠的肺损伤及炎症反应中可能具有不同的调节作用。

3. 通过 PrP^c 过表达质粒转染小鼠肺上皮细胞(MLE-12),进一步验证 PrP^c 在流感病毒 H7N7 感染中的作用。结果表明,在 H7N7 侵染细胞后的不同时期,病毒与 PrP^c 互相作用的结果不同:感染早期(12h),病毒诱导 PrP^c 上调表达;感染 24h 后,PrP^c 的表达显著下降,并能持续下调病毒 M 基因的表达;感染 48h 后,PrP^c 的表达又开始升高。转染 24h 后,过表达的 PrP^c 诱导了 MLE-12 细胞中的 IFN- β 和 TLR3 显著上调,但当病毒感染后,过表达的 PrP^c 显著降低了 IFN- β 表达,升高了 TLR3 的表达,该结果与 120KO 小鼠中表达趋势一致。因此,在 IAV 感染过程中,PrP^c 对不同的细胞因子可能有不同的调节作用。

综上所述,本研究首次揭示了朊蛋白在 IAV 病毒感染诱导炎症反应中的作

用,为朊蛋白作为抗流感的分子靶标研究提供了重要依据。另外,我们也首次对朊蛋白不同功能域所发挥的作用进行了探讨,进一步拓展了对 PrP^c 生理功能的认识。

关键词: 朊蛋白、流感病毒、炎症反应、肺损伤、调节作用

Abstract

Influenza A virus (IAV) is an enveloped, negative sense, single-stranded RNA virus, which often causes seasonal epidemics, posing a potential risk for a new influenza pandemic. IAV first invades respiratory tract or lung epithelial cells via binding virus surface protein hemagglutinin (HA) to sialic acid receptor on cell surface. The result of infection depends on the balance between the virus replication and host immune response. Overactivation of inflammatory response caused by IAV will lead to overproduction of pro-inflammatory cytokines, as well as "cytokine storm". Several lines of evidence indicate that inflammatory response cytokines induced by IAV play a pivotal role in virus infection-induced lung injury and inflammation. The normal cellular prion protein, designated PrP^c, is a membrane glycoprotein expressed abundantly in brains and to a lesser extent in lungs and other tissues. PrP^c participates in neuroprotection, immune response and plays a complex regulatory role in various virus infections. A recent study indicated that PrP^c has a protective role against lethal infection with IAV. It was believed that PrP^c functions in combining the copper ions, and regulates the reactive oxygen species producing enzyme (SOD1) through the N-terminal OR region, thereby reducing excessive reactive oxygen species (ROS) in IAV-infected lungs, inhibiting cell apoptosis, eventually protecting them from lethal infection with IAV. However, whether the non-OR region (other regions of PrP^c) has the function of anti-virus infection remains to be studied. In addition, PrP^c is expressed in T lymphocytes, natural killer cells, macrophages and alveolar type I, type II epithelial cells and bronchiolar Clara cells. Therefore, PrP^c may play an important role in the immune system of the lung. However, the function of PrP^c in the inflammatory response induced by IAV remains largely unknown.

Based on this, this thesis intended to explore the role and the mechanism of PrP^c in in pathogenicity and inflammation of IAV infection *in vitro* and *in vivo* by two types of PrP^c knockout mice and PrP^c overexpression plasmid, and the molecular mechanism

was further discussed by RNA-Seq, differential genes expression analysis and verification. The content of the thesis could be briefly summarized as follows.

The first part, to explore the effect of PrP^c in the pathogenicity of mice post IAV infection *in vivo*. We constructed two types of PrP^c-deficient mice by CRISPR/Cas9 (119 KO mice with prion protein knocked out and 120 KO mice with N-terminal-OR region of PrP^c deleted). We then investigated the differences in clinical symptoms and lung histopathology between wild-type (WT) mice and 119KO/120KO mice at day 3, 5, 8 and 11 post H7N7-IAV infection. Compared with WT mice, 120 KO mice were more susceptible to H7N7, showed lower survival rate and more weight loss, accompanied with more severe lung damage. In contrast, 119 KO mice were less susceptible to H7N7 compared with WT mice. These results suggested that the OR region could play an important role for PrP^c to protect against lethal infection with H7N7-IAV in mice, while non-OR-domains of PrP^c might promote virus infection significantly. Therefore, we speculated that PrP^c could have double regulatory effects in the process of IAV infection.

The second part of this thesis was RNA-seq sequencing, differential gene expression profile analysis and *q*PCR were performed of 120KO, 119KO and WT mice lungs at day 3, 5, 8 and 11 post infection of H7N7 and equal saline. Analysis and *q*PCR results showed that cytokines TLRs pathways (TLR4/7, MyD88, TAK1, IRF3), interferons (IFN $\alpha/\beta/\gamma$), IL6, TNF α , Nrf2, CSF3 and chemokines CCL2/3/11 and receptors CCR2/3, CXCL2/3/10/11 and receptors CXCR3/4/6 and CX3CR1 were significantly up-regulated post infection of H7N7. The expression level of these cytokines and chemokines in 120KO mice were significantly higher than WT mice; while these genes in 119KO mice were significantly lower than in WT mice. Therefore, we believe that OR region could inhibit the up-regulation of cytokines and chemokines after H7N7 infection and played a protective role in inflammatory storms induced by IAV infection. However, the non-OR region of PrP^c might act in promoting up-

regulated of chemokines, as well as in enhancing the inflammatory response post H7N7 infection. That is, the prion protein might have a dual-regulatory effects on lung injury and inflammatory response in H7N7-IAV infection.

The third part of this thesis was transfection of overexpression PrP^c plasmid on mouse lung epithelial cells (MLE-12) *in vitro*, to further verify the role of PrP^c in influenza virus H7N7 infection on MLE-12. The qPCR results showed that at different stages after H7N7 infected cells, the interactions between virus particles and PrP^c were different. During the early stage, within 12h post H7N7 infection, the virus induced up-regulation of PrP^c on the basis of transfectio PrP^c overexpression plasmid. After 24h of virus infection, the expression of PrP^c decreased significantly and continuously down-regulated M gene. 48h post-infection, PrP^c recovered to its original expression level. Moreover, 24h post transfection of mo-PrP^c-pcDNA3.1, IFN- β and TLR3 were significantly up-regulated, and IFN- β expression level was significantly reduced but TLR3 expression level was obviously up-regulated after IAV infection. It was speculated that overexpressed PrP^c might have different regulatory effects on different cytokines during IAV infection.

Overall, it came a conclusion that PrP^c was involved in lung injury and inflammatory responses induced by H7N7-IAV in mice and MLE-12 cells for the first time. These data could be helpful for further understanding the the role of PrP^c in pathogenesis of RNA virus infection and suggest that PrP^c might be a novel target molecule for anti-influenza A virus therapeutics.

Keywords: *prion protein, influenza virus, inflammatory response, lung injury, regulating effect.*

目 录

第一章 绪论	1
1.1 甲型流感病毒概述.....	1
1.2 甲型流感病毒的致病机制研究进展.....	2
1.2.1 甲型流感病毒诱导的免疫应答与炎症反应.....	2
1.2.1.1 甲型流感病毒诱导的免疫应答.....	2
1.2.1.2 甲型流感病毒诱导的炎症反应.....	3
1.2.2 甲型流感病毒感染后参与调节的固有免疫信号通路.....	5
1.3 朊蛋白 PrP ^c 在病毒感染中的研究综述.....	7
1.3.1 朊蛋白的构象与朊蛋白病.....	8
1.3.2 朊蛋白的结构与生理功能.....	9
1.3.3 朊蛋白在病毒感染中的作用.....	12
1.3.4 朊蛋白在甲型流感病毒感染中的作用.....	14
1.4 本研究的科学问题, 研究内容与意义	16
1.4.1 科学问题.....	16
1.4.2 研究内容与技术路线.....	17
1.4.3 创新点与研究意义.....	18
第二章 PrP ^c 在 H7N7 亚型 IAV 诱导的小鼠炎症反应中的作用 ...	20
2.1 前言.....	20
2.2 实验材料与方法.....	21
2.2.1 实验毒株与小鼠.....	21
2.2.2 实验试剂、耗材与仪器.....	21
2.2.3 CRISPR/Cas9-PrP ^c ^{-/-} 小鼠的构建与鉴定	25
2.2.4 H7N7 感染小鼠诱导肺损伤模型的建立.....	29
2.2.5 H7N7 感染 PrP ^c ^{-/-} 小鼠后临床症状评价	30
2.2.6 H7N7 感染 PrP ^c ^{-/-} 小鼠后肺组织病理评价	30
2.3 实验结果	35
2.3.1 PrP ^c 缺失小鼠朊蛋白表达验证.....	36

2.3.2 H7N7 感染 PrP ^{-/-} 小鼠后临床症状评价结果	36
2.3.3 H7N7 感染 PrP ^{-/-} 小鼠后肺组织病理评价结果	39
2.4 讨论	43
2.5 小结	45
第三章 H7N7 感染小鼠肺的 RNA-seq 及差异基因表达谱分析及验证	47
3.1 前言.....	47
3.2 实验材料与方法.....	48
3.2.1 实验材料.....	48
3.2.2 技术路线与分析方法.....	49
3.2.3 差异表达基因的 q-PCR 验证.....	49
3.3 实验结果.....	54
3.3.1 肺转录组常规分析结果.....	54
3.3.2 肺转录组差异表达基因分析结果.....	55
3.3.3 肺转录组差异表达基因的 q-PCR 验证结果.....	66
3.4 讨论	80
3.5 小结	85
第四章 PrP^c 在 H7N7 感染 MLE-12 细胞诱导的炎症反应中的作用	87
4.1 前言.....	87
4.2 实验材料与方法.....	88
4.2.1 实验材料.....	88
4.2.2 实验方法.....	89
4.2.2.1 过表达质粒 moPrP ^c -pcDNA3.1(+)的构建.....	89
4.2.2.2 H7N7 感染 MLE-12 细胞	92
4.2.2.3 过表达质粒转染 MLE-12 细胞.....	94
4.2.2.4 H7N7 感染已转染 moPrP ^c -pcDNA3.1 的 MLE-12 细胞后检测 基因表达	95
4.3 实验结果	97
4.3.1 H7N7 感染细胞后 M 基因表达评价	97

4.3.2 moPrP-pcDNA3.1 转染细胞后基因表达评价	98
4.3.3 moPrP-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞后基因表达评价	100
4.4 讨论	103
4.5 小结	106
第五章 总结与展望	108
5.1 主要结论.....	108
5.2 后续研究建议.....	110
附录	112
附录 1.	112
附录 2	113
附录 3	114
附录 4	115
附录 5	116
附录 6	118
附录 7	120
附录 8	122
参考文献	124
科研成果	151
致谢	152

图表清单

图 1-1. IAV 感染上皮细胞和巨噬细胞产生的细胞因子.....	4
图 1-2. IAV 感染后调节的细胞内信号通路.....	7
图 1-3. 朊蛋白疾病发病机理的功能获得和功能丧失假说.....	9
图 1-4. PrP ^c 的结构示意图.....	10
图 1-5. PrP ^c 对IAV感染的抗氧化作用.....	15
图 1-6. PrP ^c 对IAV感染引起的细胞凋亡的保护作用的可能机制.....	15
图 1-7. 技术路线图.....	18
图 2-1. 小鼠 Prnp 基因敲除信息.....	26
图 2-2. Prnp 基因敲除小鼠 F0 和 F1 基因型鉴定电泳结果图.....	28
图 2-3. 小鼠鼻腔注射 H7N7 感染实验流程简图.....	30
图 2-4. PrP ^c 蛋白在 KO 小鼠和 WT 小鼠脑和肺组织中的表达验证.....	36
图 2-5. H7N7 感染后 120 KO/WT 小鼠存活率与体重随时间变化图.....	37
图 2-6. H7N7 感染后 119 KO/WT 小鼠存活率与体重随时间变化图.....	38
图 2-7. 小鼠感染 H7N7 后不同时间肺指数.....	39
图 2-8. 小鼠感染 H7N7 后不同时间肺匀浆 TCID ₅₀	40
图 2-9. H7N7 感染 120KO 和 120WT 小鼠后肺组织 H&E 染色图谱.....	41
图 2-10. H7N7 感染 119KO 和 119WT 小鼠后肺组织 H&E 染色图谱.....	42
图 3-1. 测序实验流程图	49
图 3-2. 样本相关系数聚类图.....	54
图 3-3. 感染 H7N7 3、5、8、11 天后差异表达基因 (DEGs) 分析.....	56
图 3-4. 差异表达基因 Venn 图	57
图 3-5. 炎症与免疫相关差异表达基因热图.....	59
图 3-6. 上下调基因 GO 功能注释柱形图.....	60
图 3-7. 差异表达基因 GO 功能富集柱状图 (119KOvs 119WT)	61
图 3-8. 差异表达基因 GO 功能富集柱状图 (120KOvs 120WT)	62
图 3-9. 差异表达基因 KEGG 通路富集柱状图 (119KOvs 119WT)	62

图 3-10. 差异表达基因 KEGG 通路富集柱状图 (120KOvs 120WT)	63
图 3-11. IPA 分析预测的信号通路热图.....	65
图 3-12. q-PCR 验证的差异表达基因热图.....	67
图 3-13. H7N7 感染 119KO/WT 和 120KO/WT 小鼠后不同时间 Pmp 基因的表达 变化图.....	68
图 3-14. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间 TLR4/TLR7 通路相关基因的 表达变化图	70
图 3-15. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间 TLR4/TLR7 通路相关基因的 表达变化图.....	71
图 3-16. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间 I 型、II 型干扰素及炎性细胞 因子的表达变化图.....	72
图 3-17. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间 I 型、II 型干扰素及炎性细胞 因子的表达变化图.....	73
图 3-18. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 TLR3 通路相关细胞因 子及其他细胞因子的表达变化图.....	74
图 3-19. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 TLR3 通路相关细胞因 子及其他细胞因子的表达变化.....	75
图 3-20. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CC 类趋化因子和 CC 类趋化因子受体基因的表达变化图	76
图 3-21. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CC 类趋化因子和 CC 类趋化因子受体基因的表达变化图.....	77
图 3-22. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CXC 类趋化因子和 CXC 类趋化因子受体基因的表达变化图	78
图 3-23. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CXC 类趋化因子和 CXC 类趋化因子受体基因的表达变化图.....	79
图 4-1. pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-EGFP 质粒图谱	88
图 4-2. H7N7 与 moPrP ^c -pcDNA3.1 干扰 MLE-12 基因表达实验流程图.....	96

图 4-3. H7N7 感染 MLE-12 细胞后 M 基因表达量变化的动态评价结果	98
图 4-4. 质粒 moPrP ^c -pcDNA3.1 与 pcDNA3.1-GFP 转染细胞效率评价	99
图 4-5. 过表达质粒 moPrP ^c -pcDNA3.1 转染 MLE-12 后不同时间点 Prnp 基因表达 变化.....	100
图 4-6. H7N7 感染 moPrP ^c -pcDNA3.1 转染的 MLE-12 后 Prnp、M 基因表达量变 化.....	101
图 4-7. moPrP ^c -pcDNA3.1 转染及 H7N7 感染干扰 MLE-12 的基因表达.....	102
表 2-1. PCR 反应体系与程序.....	27
表 2-2. 分离胶体系.....	33
表 2-3. 浓缩胶体系.....	33
表 3-1. RNA-seq 样本信息.....	48
表 3-2. 组织 RNA 逆转录体系与程序.....	50
表 3-3. 组织 RNA 逆转录体系与程序.....	51
表 3-4. q-PCR 引物序列.....	51
表 3-5. H7N7 感染后差异基因统计表.....	55
表 3-6. H7N7 感染后差异基因的 IPA 通路分析表.....	64
表 4-1. 小鼠 Prnp 基因扩增的 PCR 体系和程序.....	89
表 4-2. 双酶切体系和程序.....	90
表 4-3. 分子克隆的连接体系和程序.....	90
表 4-4. LB 培养基配方表.....	90
表 4-5. 菌落 PCR 的体系和程序.....	91
表 4-6. 细胞 RNA 逆转录的体系和程序.....	94
表 4-7. 转染试剂与 DNA 用量.....	95
表 4-8. 转染实验分组表.....	96

第一章 绪论

1.1 甲型流感病毒概述

随着全球化进程的快速发展,人与自然的交互变得更加频繁,我们面临新发和再发传染病的威胁也日益加剧,病毒的传播速度也大大加快。甲型流感病毒(Influenza A virus, IAV)可以突破种间屏障,对全球公共卫生构成了重大威胁。此外,IAV作为一种高度传染性的呼吸道病原体,导致了全球范围内的年度流行和偶尔的大流行。

IAV 是一种包膜病毒,在分类学上属于正黏病毒科(Orthomyxoviridae),流感病毒属(Influenza virus),为单股、负链、分节段 RNA 病毒(ss vRNA)。禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)属于甲型流感病毒,根据 AIV 对鸡的致病性可以将其分为高致病性禽流感病毒(Highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV)和低致病性禽流感病毒(Low pathogenic avian influenza virus, LPAIV)^[2,3]。野生水禽是 LPAIV 的自然宿主,LPAIV 感染家禽后可引起体重下降和产蛋量下降^[3]。HPAIV 在野生水禽/水鸟和陆生鸟类中可引起致命的爆发^[4,5],对鸟类的致死率高达 100%。甲型流感病毒根据其表面的糖蛋白血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)进行分型,有少数 IAV 亚型会在人类中传播和进化^[6],并导致季节性流感或偶发大流行^[7,8]。不同亚型及不同宿主来源的病毒之间发生的重组与变异,不仅加快了病毒的传播与扩散速度^[9,10],而且有可能产生新的病毒使其能够跨越物种屏障从鸟类传播到哺乳动物或人类,如 H5N1 和 H7N7 等^[11-17]。

在中国,每年因流感引起的呼吸系统疾病,造成死亡人数大概平均在 9 万人左右^[20],死亡率约为 0.1%。流感的破坏力如此巨大,部分原因在于流感病毒的变异速度极快,人们体内的抗体无法识别新的流行病毒株^[21]。甲型流感病毒感染通常会导致轻度自限性疾病,能够引起呼吸道传染病。症状从轻微到严重程度不等,有时甚至伴随危及生命的并发症,即使是年轻人、健康儿童和成人也无法避

免。轻微的症状通常包括发烧、咳嗽、喉咙痛、流鼻涕、肌肉或身体疼痛，头痛和疲劳，偶有伴随呕吐和腹泻^[22]。IAV 对患有基础疾病的个体，可能会导致健康状况的恶化，最终发展为病毒性肺炎、继发性细菌性肺炎甚至死亡等。

1.2 甲型流感病毒的致病机制研究进展

IAV 是人类主要的病原体之一。流感感染可以在没有任何亚临床症状的情况下传播，或在呼吸道出现感染，从而导致致命的后果。IAV 的感染始于病毒通过将病毒表面蛋白 HA 与 $\alpha 2,3$ -或 $\alpha 2,6$ -唾液酸受体(Sialic acid receptor, SA receptor)特异性结合而附着在气道或肺上皮细胞和肺泡巨噬细胞表面^[2,4]。IAV 病毒 RNA 进入细胞后，病毒利用宿主的细胞系统进行复制与增殖。机体可以通过免疫应答(immune response)防御和消除病原体(如病毒)的入侵、维持自我稳定。如果入侵体内的病原微生物突破了机体的免疫防护，可能会导致机体感染。下文将对机体免疫应答过程与分子机制逐一介绍。

1.2.1 甲型流感病毒诱导的免疫应答与炎症反应

1.2.1.1 甲型流感病毒诱导的免疫应答

宿主机体的免疫系统也有不同的防线来对抗病毒。通过细胞内的各种手段和机制对抗病毒，成为第一道防线即先天免疫。后天免疫也称为获得性免疫则组成第二道防线，当机体再次识别病毒时，会产生对应抗体，特异性识别抗原并中和病毒颗粒，将病毒包裹起来，从而阻止病毒对靶细胞的识别和结合。同时免疫系统还会启动杀伤细胞，清除被病毒感染的细胞。

先天免疫是抗病原体入侵的第一条也是最古老的防线。它通过编码模式识别受体^[5](Pattern recognition receptor, PRR)的不同家族识别病原体相关分子模式^[6](Pathogen associated molecular patterns, PAMP)以及内源性危险信号并产生快速、广泛的响应将感染组织和细胞调整为警报状态。然后分泌细胞因子(如干扰素 IFN)，上调邻近细胞中的促炎性细胞因子；分泌趋化因子来招募和激活细胞毒性

效应细胞和抗原递呈细胞^[7](antigen-presenting cells, APCs), 诱导感染细胞凋亡。

基于体液或者基于抗体的适应性免疫反应对于预防流感感染至关重要。适应性免疫取决于B细胞受体对抗原呈递细胞(APC)的特异性响应。体液免疫中的抗病毒反应被广泛研究, 使用B细胞 μ MT缺陷小鼠, 对于致死剂量的IAV感染, 抗体应答发挥了重要作用^[8]; 而将HA特异性抗体转移到严重的联合免疫缺陷(SCID)小鼠中可以保护这些动物免受致命的IAV感染^[8]。中和性抗体应答主要针对病毒颗粒表面的HA、NA或离子通道蛋白M2^[9], 抗体介导的免疫力可以维持数月甚至一生。1918年西班牙流感幸存者在90年后, 体内仍能检测到HA特异性B细胞^[9,10]。

先天免疫和获得性免疫都在病毒感染不久后被激活, 提供了抗感染的保护。先天免疫和后天免疫细胞的许多活动是由细胞因子协调的。适度的炎症反应可以防止疾病的进一步发展; 然而, 过度或失衡的免疫反应可能会导致细胞因子和趋化因子的过度产生, 加剧炎症的发生, 包括在感染部位中性粒细胞和单核细胞的过度募集^[1], 这最终可能损害肺组织, 降低呼吸能力, 并导致严重的疾病和死亡。

1.2.1.2 甲型流感病毒诱导的炎症反应

感染发生后, 感染部位附近的免疫细胞, 如巨噬细胞, 会被激活并分泌两类多肽物质——细胞因子和趋化因子^[11]。

细胞因子(cytokine)是先天免疫反应和适应性免疫的一部分, 是由多种细胞如淋巴细胞, 抗原递呈细胞, 上皮细胞等分泌的“低分子量的局部激素”^[12]。细胞因子可以分为4类, 包括具有抗病毒作用的干扰素(interferon, IFN); 具有免疫调节活性的因子, 包括白介素(interleukin, IL) 2/4/5/7/9/10/12、肿瘤坏死因子(tumor-necrosis factor, TNF)和 β 型转化生长因子(transforming growth factor, TGF β); 介导炎症活性的因子, 如IL-6/8/10, CXCL8等趋化因子; 具有造血生长活性的细胞因子, 如IL1/3、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)等^[11,13]。这些细胞因子参与并负责免疫细胞的活化、增殖和分化; 调节细胞存活、凋亡和炎症, 影响整个免疫系统的作用。细胞

因子需要与胞外受体结合才能发挥作用，在细胞间传递信息；不同因子相互促进产生叠加或协同效应，抑制产生拮抗效应，这些相互作用常常重叠交错^[14,15]。机体运用这一点来调控炎症反应，让其与感染的程度相匹配。当调控失调时，炎症反应也失调了，产生免疫紊乱。

趋化因子是由许多小分泌蛋白组成的大家族，由 40 多种趋化型细胞因子组成，可由多种细胞分泌，趋化因子作为免疫细胞的趋化剂发挥作用，控制白细胞在体内的迁移并招募促炎性细胞（嗜中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞、内皮细胞、嗜酸性粒细胞等）^[16]。趋化因子的生物学效应是通过与这些细胞表面的特异性 G 蛋白偶联受体结合，导致血管内皮细胞活化、促炎细胞通过血管迁移到炎症部位^[17]。根据趋化因子 N 端半胱氨酸的基序，它们由 CC 和 CXC (α 类)，XC (γ 类) 和 CX3C (δ 类) 趋化因子^[18,19] 四类组成，包括调节活化正常 T 细胞表达与分泌的因子 RANTES (CCL5 配体)，单核细胞趋化蛋白 (MCP) MCP-1、MCP-3，巨噬细胞炎性蛋白 1 α (MIP-1 α)，干扰素 γ 诱导蛋白 10 (IP-10) 和白介素 8 (IL-8)，促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和抗病毒细胞因子 IFN α/β ^[13]，图 1-1 展示了 IAV 感染上皮细胞和巨噬细胞诱导分泌的细胞因子。

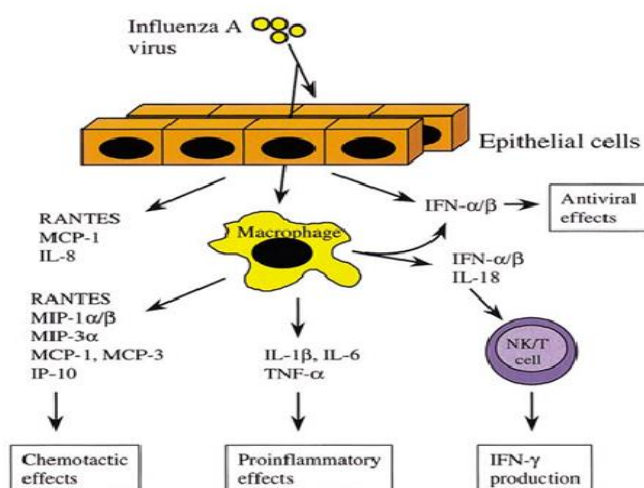


图 1-1. IAV 感染上皮细胞和巨噬细胞产生的细胞因子

Figure 1-1. Cytokines production in influenza A virus-infected epithelials and macrophages^[1].

在炎症早期,促炎性细胞因子发挥作用,细胞因子像信号弹一样,招募免疫细胞参与免疫反应,被激活的免疫细胞释放更多的细胞因子,并继续招募更多的细胞,产生更多细胞因子^[20,21]。由此可见,炎症反应是随着细胞因子信号的增强而不断放大的。值得注意的是,炎症是一把双刃剑。一方面,炎症反应可以清除病原,促进损伤组织细胞修复,维护机体环境;另一方面,免疫细胞在打击病原体的过程中,不具有特异性,释放的杀伤性物质也会损伤正常组织^[22]。促炎细胞因子和抗炎细胞因子同时在体内发挥作用,就有可能造成一种极度复杂的免疫功能紊乱。在加重炎症反应的同时,也会使得机体对病原体的识别和吞噬功能减弱,引起机体免疫防御能力下降^[23]。

针对IAV感染的炎症反应过度激活,诱导细胞因子/趋化因子的过度产生,即形成“炎症因子风暴”,这被认为是H5N1病毒和1918年大流行毒株致死性感染的根本原因^[24,25]。炎症风暴造成全身性的过度炎症反应之后,机体组织和细胞受到严重损害,炎症失控遍及全身,机体就如同浸泡在无数细胞因子、趋化因子、氧自由基、凝血因子、等炎症介质的海洋里面^[26]。下文对流感感染后不同固有免疫信号通路及其作用进行整理。

1.2.2 甲型流感病毒感染后参与调节的固有免疫信号通路

先天免疫系统通过宿主细胞对病毒的识别来检测IAV的感染,通过病毒感染过程中产生的PAMPs与PRRs的相互作用来进行。已有记录的PRR四大家族包括:Toll样蛋白受体(Toll like receptor, TLR);核苷酸寡聚域(nucleotide oligomerization domain, NOD)和富含亮氨酸的重复序列(Leucine-rich repeat containing, LRR)组成的NOD样蛋白受体(NLR);视黄酸/维甲酸诱导基因I(Retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)类解螺旋受体(Retinoic acid-inducible gene I-like receptors, RLRs)和I型干扰素信号(Type I interferon, IFN α/β)^[27]。病毒和细胞分子的这些相互作用会激活针对IAV感染的先天免疫,刺激促炎细胞因子的产生,募集免疫细胞到感染部位,激适应性免疫反应,最终清除IAV感染^[28]。

TLR家族是最具代表性的PRR家族,是PRR中研究时间最久、最透彻的家族

[29,30]。TLRs在质膜或细胞表面表达,可以结合各种病毒和微生物分子。对于流感病毒感染,TLR3(识别RNA病毒的双链RNA, dsRNA)^[31]和TLR7/8 (识别病毒单链RNA, ssRNA)被认为是与RNA病毒的识别有关^[32,33]。

最近,NLR家族作为先天性免疫效应分子成员的作用成为人们关注的焦点^[34]。类似于TLR,在被感染的细胞质内检测到广泛的PAMP,能够调控促炎细胞因子IL-1 β 和IL-6的分泌和释放。最近,研究表明NLR能够形成炎症小体,参与IAV免疫,如NLRP3 (NLR family, Pyrin domain containing protein 3),也称为NALP3/PYPAF3,在上皮细胞、单核细胞、巨噬细胞中表达,与ASC蛋白和caspase-1一起形成炎症体多蛋白复合物,激活炎症小体^[35],能够激活pro-IL-1 β 和IL-18和pro-IL-33,在IAV感染后通过这样的调节通路防止肺损伤和上皮坏死的发生^[36]。近年来,大量研究拓宽了我们对RLR激活和信号传导的理解。

干扰素IFN是免疫系统的重要组成部分之一,名字源于其干扰病毒复制的能力。目前,根据抗原结构和产生的活性,已经识别出I型和II型IFN。I型IFN主要在调节自然免疫中发挥作用,II型IFN主要协调细胞免疫。IFN γ 属于II型IFN,由淋巴细胞、巨噬细胞等分泌,具有多种功能。IFN α 和IFN β 属于I型IFN,分别由淋巴细胞和上皮细胞分泌。IFN α/β 是直接的抗病毒介质,并具有抗增殖和免疫调节活性^[16,37],通常在病毒感染后数小时内被诱导激活,可以上调趋化因子MCP-1、MCP-3和IP-10的表达,诱导单核细胞、巨噬细胞和Th1型细胞进一步募集到感染部位^[38]。IFN α/β 与被感染细胞和邻近细胞表面的共同受体(IFNAR)相互作用,通过多条级联反应信号通路诱导数百种基因(IFN刺激基因, ISGs)的转录,包括RIG-I、Mda5、IRF7、TLR3/7、STAT1^[39],以及抑制病毒复制的蛋白编码基因^[40]。此外,IFN自身通过正反馈回路触发诱导IFN表达的蛋白,如RIG-I、IKK3、STAT等的表达。而IFN刺激的基因ISGs通过各种机制抵消IAV的复制和传播^[39],暗示了ISG抗病毒反应的正反馈机制。其中一些通路在图1-2中展示。

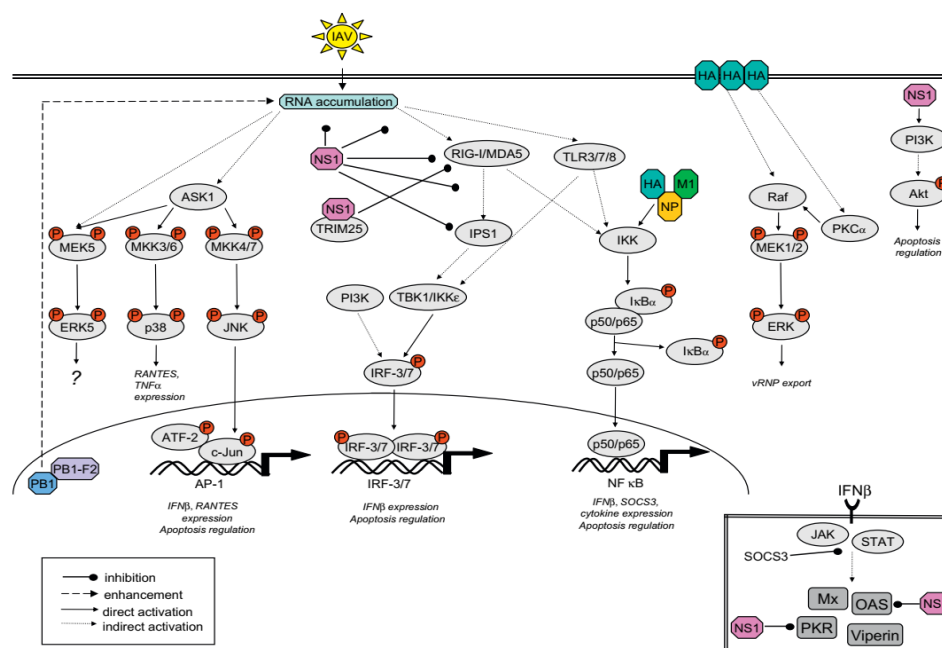


图 1-2. IAV 感染后调节的细胞内信号通路。

Figure 1-2. Schematic representation of intracellular signaling pathways regulated upon IAV infection^[8].

自 1918 年 20 世纪第一个有记录的流感大流行开始，流感病毒通过突变和重组而显示出高遗传和抗原多样性，逐步表现出适应哺乳动物宿主的重要变化^[41]。IAV 的分布广泛性和宿主多样性使它们能够适应包括人类在内的不同鸟类和哺乳动物宿主。近年来，已经出现新的 AIV 具有跨越动物-人的物种屏障并在人类中引起轻度或致命的并发症，存在形成新的更易感染人类的病毒亚型并在人群中传播的风险；随着 IAV 获得对目前可用的抗流感药物如病毒神经氨酸酶（NA）抑制剂的抵抗力，因此，寻找新的抗流感药物的靶分子变得尤为迫切。

1.3 朊蛋白 PrP^c 在病毒感染中的研究综述

正常细胞朊蛋白(PrP^c)是一种膜糖蛋白，在大脑中表达最丰富，尤其是神经元细胞；肺次之。正常构象 PrP^c 向淀粉样构象的转化是朊病毒疾病中的关键致病事件。PrP^c 转化为同工型淀粉样蛋白 PrP^{sc} 是朊蛋白疾病中的关键致病事件。研究表明，PrP^c 具有多种多样的生物调节功能，包括记忆和炎症反应；调节神经细胞、免疫细胞以及各种细胞的增殖、分化和程序性细胞凋亡的敏感性；调节多种信号转导途径的活性，包括 cAMP-蛋白激酶 A（Cyclic-AMP dependent protein

kinase A), 促分裂原激活的蛋白激酶 (mitogenactivated protein kinase, MAPK, 包括 ERK1/2、JNK1/2 和 p38 共 3 个家族) 等。

下文详细介绍近年来 PrP^c 病的构象与朊病毒病、结构、生理功能以及 PrP^c 在病毒诱导的机体免疫中的作用, 并探究 PrP^c 作为一种新的宿主靶分子进行抗病毒研究的可能性。

1.3.1 朊蛋白的构象与朊蛋白病

“Prion”——朊蛋白 (cellular prion protein), 一种仅由氨基酸构成的、不依赖于核酸的可自我复制的感染性蛋白因子, 具有致病性的形式为 PrP^{sc} (scrapie prion protein) 或 PrP^{res} 或 PrP^{*}。Creutzfeldt 和 Jacob 在 1920 年发现了一种迟发性的神经退行性疾病, 进展迅速并且症状严重^[42,43], 称之为“Creutzfeldt- Jacob”病, 由此命名为朊蛋白病。

朊蛋白病——传染性海绵状脑病 (Transmissible spongiform encephalopathies, TSE), 包括人类的 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD)、动物的瘙痒病 (Scrapie) 和牛海绵状脑病 (Bovine spongiform encephalopathy, BSE) 等, 无法治愈且始终致命, 是一种神经退行性疾病, 具有传染性^[44]、偶发性和可获得性^[45,46], 影响动物和人类。朊蛋白病由 PrP^c 的同型异构体 PrP^{sc} 聚集形成淀粉样聚集聚合物导致^[47], PrP^{sc} 的积累是导致神经病变的主要致病原因^[48]。PrP^c-PrP^{sc} 的转化是朊病毒产生的关键, 这点最终通过 PrnP 敲除动物对朊病毒的抗性和重组 PrP 形式产生“人工”朊病毒 (保留天然朊病毒的复制和感染性) 而得到证实^[49,50]。PrP^c 到 PrP^{sc} 的转变机制备受研究人员关注。

代替核酸, PrP^{sc} 蛋白质成为能够自我复制的病原体, 从根本上改变了“传染性”的概念^[51]。PrP^{sc} 是 PrP^c 的异常构象, 主要结构由 α 螺旋转变成 β 折叠^[52,53], PrP^{sc} 能够形成紧密的、不溶性、蛋白酶耐受的蛋白聚集体在脑中积累^[54], 并且对经典病原体灭活程序不敏感。PrP^{sc} 转化为 PrP^c 已经有几种模型和假说, 最基本的解释是感染过程中 PrP^{sc} 将 PrP^c 转化为 PrP^{sc} 并引起一些突变, 使得蛋白变得不稳定^[55], 后者的结合会使 PrP^c 继续转化, 导致 PrP^{sc} 进一步积累^[56,57] (见图 1-3)。

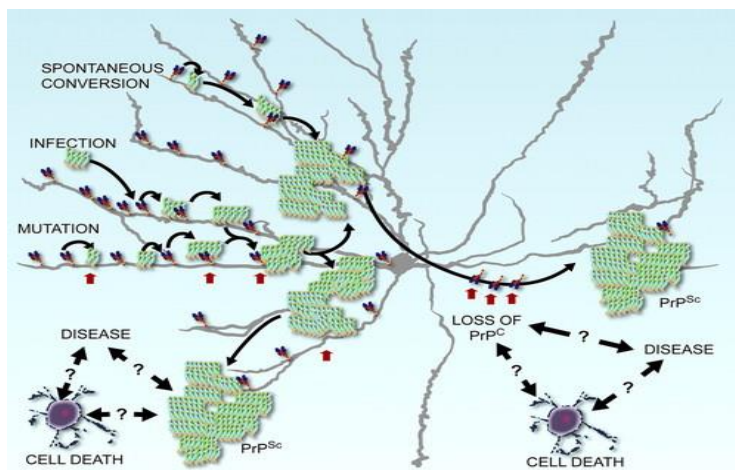


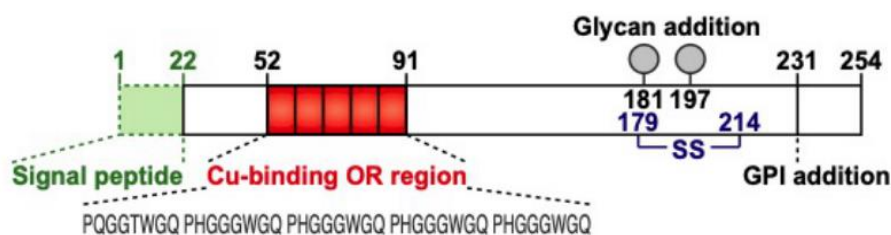
图 1-3. 朊蛋白疾病发病机理的功能获得和功能丧失假说

Figure 1-3. The gain- and loss-of-function hypothesis of prion disease pathogenesis.^[57]

这一假说同朊蛋白突变体的进展性和 *Prnp* 敲除小鼠对患瘙痒症羊脑提取物的抗感染性状一致^[57]。病原体（图 1-3 亮绿色）感染正常 PrP^c 蛋白（叉状）发生构像变化，而进入神经系统。异常异构体整合到 β 折叠构成的蛋白（不断增长的蓝色片状）中，破坏 α 螺旋结构。功能获得性假说的基本原则是 PrP^{Sc} 聚集会使神经元对程序性细胞凋亡敏感并诱发病毒性疾病^[58]。功能丧失假说则是， PrP^c 的丧失会导致细胞脆弱和病毒性疾病^[59]。两种假说并非互相排斥，但 PrP^{Sc} 积累、细胞凋亡和疾病发生之间的相互依赖性关系依然有待解决。

1.3.2 朊蛋白的结构与生理功能

朊蛋白编码基因 *prnp*，位于 20 号染色体，编码细胞蛋白质 PrP^c 。正常细胞朊蛋白和感染性朊蛋白的基因结构相同^[60,61]。 PrP^c 在所有哺乳动物物种中普遍存在，是由约 254 个氨基酸残基组成的蛋白，大小为 25-35kDa，属于通过糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定在细胞外膜上的膜糖蛋白，在神经和免疫系统的细胞中表达丰度高^[62]。朊蛋白结构见图 1-4。小鼠 PrP^c 蛋白主要有两个结构域组成，N 端结

图 1-4. PrP^c 的结构示意图Figure 1-4. Schematic diagram of PrP^c[61]. (SS: disulfide bound)

构域和 C 端结构域。N 端结构域高度灵活并且缺乏可识别的二级结构^[63]。PrP^c N 末端包含五个八肽重复序列（OR 区）^[64]，该区域可以通过组氨酸与 Cu²⁺ 的紧密结合^[65]；C 端结构域^[66]由三个 α 螺旋和两个短的反相平行的 β 折叠组成，并在螺旋之间包含两个 N 型糖基化位点和一个二硫键维持稳定^[67]。

氧化应激是细胞失调和死亡的主要原因之一。过量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)会过度氧化蛋白质、脂质和 DNA，导致细胞损伤、炎症和细胞凋亡^[68]。已经有研究提出，PrP^c 可能通过将结合的铜离子转移到酶上来调节抗氧化酶（如 Superoxide dismutase-1, SOD1）的活性，从而发挥抗氧化功能^[69]。有报道表明 Prnp^{-/-}小鼠易受缺血性脑损伤的影响，受伤脑部的氧化应激增强^[70]；而缺少 OR 区的 PrP 无法将 Prnp^{-/-}小鼠从缺血性脑损伤中拯救出来，说明 PrP^c 能够保护神经元免受缺血性损伤^[71]。也有报道称 PrP 缺失小鼠的心脏和肾脏易受到高氧化应激的缺血性损伤^[72,73]。还有研究证明 PrP^c 还可以通过调节去除过氧化氢酶和 p66^{shc} 的表达或活性来减少心脏中的 ROS 产生，并且可以保护心脏免受氧化损伤^[74]。以上研究表明 PrP^c 在非神经元组织中也可能具有保护功能，但是 PrP^c 保护功能的确切机制仍然难以捉摸。

几十年的发展及研究表明，作为一种脂筏锚定的膜糖蛋白，PrP^c 拥有 40 多种与之相互作用的分子，能够接收多种信号并向下级转导^[75]，因此其具有丰富的生理功能，包括参与细胞粘附、细胞增殖与分化、细胞存活与死亡、金属离子运输和跨膜信号传导等^[76,77]。PrP^c 参与肿瘤的形成^[78,79]，可以作为肿瘤的潜在分子标记物。PrP^{-/-}疾病动物模型研究表明，其通过 PI3K/Akt, Erk/Erk2-STAT1-caspase3/STI-1, mTOR/p-mTOR 等阻止神经细胞凋亡，阻止细胞自噬，起到神经保护、促进血管生成的作用^[80-82]。通过 cAMP/PKA/PI3k/Akt、Erk1/Erk2-STAT1-

caspase3/STI-1 细胞信号通路、p-IKK-NF- κ B-TNF α 级联信号通路等, PrP^c 参与肿瘤发生、神经保护与机体免疫^[83-86]。

PrP^c 可能在免疫系统的发育和维持以及特定的细胞免疫反应中起重要作用^[87,88], 目前对朊蛋白在免疫和炎症中的作用研究主要集中在神经退行性疾病方面。白介素 (IL-6) 或 NGF 诱导的 PC12 细胞的神经元样分化伴随着 PrP^c mRNA 表达的增加^[89]。不同的细胞类型对生长因子的反应不同。SK-N-SH 神经母细胞瘤细胞响应 IL-1 β , 肿瘤坏死因子 (TNF- α) 而上调 PrP^c mRNA, 而用干扰素 (IFN- γ) 处理后下调 PrP^c mRNA^[90]。相反, 在 IMR-32 神经母细胞瘤, U-373MG 星形细胞瘤或畸胎瘤来源的分化神经元中未检测到对这些细胞因子的反应^[91]。在神经母细胞瘤细胞中, 热休克会同时增加 PrP^c mRNA 和蛋白质以及 Hsp70^[92,93]。高压氧和低血糖均上调了 *Prnp*, 皮肤和胃肠道上皮的炎症都导致 PrP^c 的上调, 可能与 PrP^c 对氧化应激的反应有关^[94,95]。

最近有研究使用基因靶向策略将 *Prnp* 的开放阅读框 (ORF) 用选择标记代替, 小鼠表现出正常的早期发育, 并针对瘙痒病感染具有保护作用, 表明 PrP^c 是胚胎发育中不可或缺的蛋白质, 对于诱导朊蛋白病至关重要^[96]。对转基因 PrP^c 小鼠的研究说明朊蛋白直接参与了 Purkinje 神经的长期存活以及胶质细胞和 Schwann 细胞的髓鞘形成能力^[97]。PrP 106-126 多肽能够诱导星型胶质细胞增殖, 并具有 PrP^c 表达的依赖性^[98]; 而 PrP106-126 合成多肽则对表达 PrP^c 的神经元和神经元细胞有毒性^[99]。缺乏 PrP^c 的神经元前体细胞在无血清培养基会发生细胞凋亡, 通过 *Prnp* 转基因则可以避免凋亡^[100]。这些结果表明 PrP^c 在神经细胞凋亡和炎症反应中具有重要的抑制作用。

在幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 和牛结核杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 感染动物模型过程中转化生长因子 α (Transforming growth factor- α , TGF α) 和 IFN- γ 上调 PrP^c 的表达, 进而上调促炎症因子表达, 促进细胞凋亡^[101,102]。在这里 PrP^c 扮演促炎症因子的作用。LPS 感染过程中, PrP^c 的表达既受到血清中细胞因子 TGF β 和糖皮质激素的调节, 也受下丘脑-垂体-肾上腺的神经调节^[103]。同时在 LPS 感染的急性期, PrP^c 参与促炎症反应, 上调 TNF α 、IL1 β 、IL6、一氧化氮

合酶 2 (Nitric oxide synthase2, NOS2) 等细胞因子的水平;而在感染恢复期, PrP 则上调 IL10、精氨酸酶 1 (Arg1)、甘露糖受体 1 (Mrc1) 等抗炎症因子的水平, 表明 PrP^c 发挥的是抗炎症作用^[103,104]。IFN- γ 能够刺激人 CD14+pB 单核细胞中 PrP^c 的上调表达^[105]。TFN- α 和 IFN γ 能够诱导牛淋巴细胞过表达 PrP^c^[106]。也有数据表明, PrP^c 调节由 TLR2, TLR4 或 Fas 的配体诱导的周围炎症的各个方面, 但尚未确定 PrP^c 发挥作用的具体机制^[107,108]。PrP^c 调节免疫细胞对细胞因子的反应, 暗示了 PrP^c 在免疫系统中发挥着“双面性”或“多效性”的作用^[109,110], 朊蛋白的确切功能仍然有待阐明。

1.3.3 朊蛋白在病毒感染中的作用

细菌和病毒感染是细胞必须抵抗的生存压力, 基于此, 细胞已经形成能够特异性阻断病原体复制的宿主因子系统。PrP^c 在物种之间高度保守, 并在体外和体内参与各种重要的细胞过程。在过去的十年中, 许多报告表明 PrP^c 可以抑制不同病毒的复制, 说明 PrP^c 可能参与宿主的病毒防御途径^[111], 充当宿主细胞防御因子。

据报道, 原代胚胎成纤维细胞感染了脑心肌炎病毒 B (Encephalomyocarditis virus B, EMCV-B) 后会发生凋亡。在感染 EMCV-B 后, Prnp^{-/-}小鼠脑中神经元凋亡高于对照组 WT 小鼠, 被感染 Prnp^{-/-}小鼠脑中炎症细胞 (包括小胶质细胞) 浸润少于对照组^[44]; 而 Prnp^{+/+}小鼠中有更加强烈的脑部炎症, 炎性细胞浸润更多。同时, EMCV-B 在 Prnp^{-/-}感染小鼠和 WT 小鼠大脑中复制, 说明 PrP^c 可能通过激活针对这一病毒感染的脑部炎症反应, 减少感染小鼠大脑中的神经元凋亡, 但不影响病毒的复制^[44]。

也有研究表明 PrP^c 可能参与了神经营养性病毒 1 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 的潜在感染的预防。过表达 PrP^c 的转基因小鼠 (Tga20, PrP 的表达水平为 WT 的 10 倍) 对中枢和外周神经组织中 HSV-1 病毒株 SC16 的急性感染敏感, 表现出比对照组小鼠更高的死亡率 (70%-90% vs 20%-30%)^[112]。然而, 病毒在中枢和外周神经组织中的感染在过表达 PrP^c 小鼠中被显著抑制, 然而, PrP^c 表达的缺乏则有利于 HSV-

1潜伏期的建立^[112], PrP^{-/-}小鼠的外周和中枢神经系统中含有更高水平的潜伏病毒。并且病毒的复制则与PrP^c的过表达有关^[112], HSV在表达PrP^c的神经元组织中会更有效的进行复制。另有研究表明, 感染HSV-1病毒株后, PrP^{0/0}星形胶质细胞的自噬诱导程度低于WT星形胶质细胞, 表明PrP^c可能通过响应细胞应激而调节感染HSV-1后星形胶质细胞的自噬诱导^[113], 有助于保护被感染的细胞。进一步的数据表明, 朊蛋白介导的代谢途径导致HSV感染的神经元凋亡^[114]。然而, 在PrP^c过表达小鼠中HSV-1急性感染的增强和HSV-1潜伏感染的抑制是否可归因于HSV-1感染星形胶质细胞的自噬诱导程度更强, 这一点仍有待研究^[115]。

多项研究表明 PrP^c 通过限制不同病毒的复制来显示抗病毒特性, 特别是逆转录病毒, 例如鼠白血病病毒 (MuLV) 和 I 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) ^[111]。最近, Zinkernagel 研究小组观察到, 病毒免疫刺激后, 小鼠脾脏生发中心内源性鼠逆转录病毒 (IMERV-1) 的激活导致 PrP^c 的上调和对 IMERV-1 复制的相关特异性抑制^[116]。

PrP^c 表达的分析显示, 在感染 HIV-1 的人原代星形胶质细胞或感染 HCV 的人肝细胞中, PrP^c mRNA 表达上调, 这表明 PrP^c 上调可能对应于针对感染的细胞反应^[111]。已有研究表明人类 PrP^c 是一种核酸伴侣蛋白, 可在体外模拟 HIV-1 核衣壳蛋白 NCp7^[116]。NCp7 是 HIV-1 组装和复制所必需的病毒蛋白, 在 RNA 分子伴侣中起着关键作用^[117]。有趣的是, 当 293T 细胞共表达 PrP^c 时, HIV-1 病毒的产生和感染力大大降低^[118], 并且 PrP^c 被募集到 HIV 病毒体中, PrP^c 可能通过与基因组核糖核酸的结合来干扰 HIV-1 基因组核糖核酸的翻译^[116,119]。综上所述, PrP^c 与 HIV-1 核衣壳蛋白显示出重要的相似性, 并发现人细胞系中 PrP^c 的表达强烈降低了 HIV-1 的表达和病毒的产生。PrP^c 与 HIV-1 的病毒基因组 RNA 结合并对其翻译产生负面影响。这些数据表明 PrP^c 可能是 HIV-1 复制的调节剂^[111], PrP^c 沉默则会增强 HIV-1 目标细胞中的病毒复制, 已经发现位于 PrP^c 的非结构化 N 末端的基本结构域 24-KRPKP-28, 是该抑制作用的主要决定因素^[111]。

同时还有研究表明 PrP^c 可能参与预防柯萨奇病毒 B3 (Coxsackievirus B3, CVB-3), CVB-3 病毒可以在新生儿中枢神经系统引起严重感染^[120]。朊蛋白基因

缺失的小鼠海马原代细胞 (HpL3-4) 相较于 WT 细胞对 CVB3 病毒更敏感, 表现出快速和完全的细胞病变以及细胞凋亡^[120]。而向 Prnp 缺失细胞中转染 Prnp 基因后则会抑制 CVB-3 的复制, 细胞凋亡也得到抑制。这项研究提出了在 CVB3 感染期间 PrP^C 的两种可能的作用: 一种是 PrP^C 通过较高水平的 IFN 活性增加神经元的抗病毒活性; 另一种是 PrP^C 的缺失会刺激细胞凋亡信号通路。

朊蛋白可以通过细胞自主的方式在腺病毒 5 (Adenovirus 5) 感染过程中参与宿主的防御策略^[121]。腺病毒感染早期可以激活 Prnp 基因的转录以及 PrP^C 蛋白在细胞质和细胞膜中的积累, 这是细胞对腺病毒感染早期的特异性反应^[121]。而 PrP^C 的下调则会增强 Ad5 病毒的复制和表达, 说明 PrP^C 的表达又可以控制病毒的复制。PrP^C 还在脊髓灰质炎病毒 1 (Poliovirus-1) ^[122] 的感染中发挥保护作用。

综上所述, 尽管 PrP^C 表达对不同病毒的复制具有一定的抑制作用^[123], 但其作用的具体分子机制仍未得到证实。

1.3.4 朊蛋白在甲型流感病毒感染中的作用

2018 年 Sakaguchi 团队研究发现敲除 PrP^C 蛋白 OR 区小鼠更易受到 PR8, A/ Aichi/2/68 (H3N2), 和 A/WSN/33 (H1N1)-IAV 的感染, 受感染的 Prnp^{-/-}小鼠肺受到严重破坏, 炎性细胞的浸润度更高, ROS 产生酶 XO 的水平高于 WT 肺, 肺中 ROS 水平也上升, 而 PrP^C 转基因使 PrP^{-/-}小鼠免于 IAV 致死性感染^[124]。ROS 在 IAV 感染的细胞中引起氧化应激, 其引起的肺损伤发病机理中起着关键作用^[125-127]。以上研究表明 PrP^C 可以在降低 IAV 感染的小鼠肺中 ROS 的水平方面发挥抗氧化作用, 为小鼠抵抗 IAV 的致命感染提供一定的保护作用。并且敲除小鼠的肺中 Cu 含量和抗氧化酶 Cu/Zn 超氧化物歧化酶(SOD1)的活性都较低, 表明 PrP^C 的抗氧化活性可能是由于其通过调节 Cu 激活 SOD1 的功能发生的^[128] (见图 1-5)。

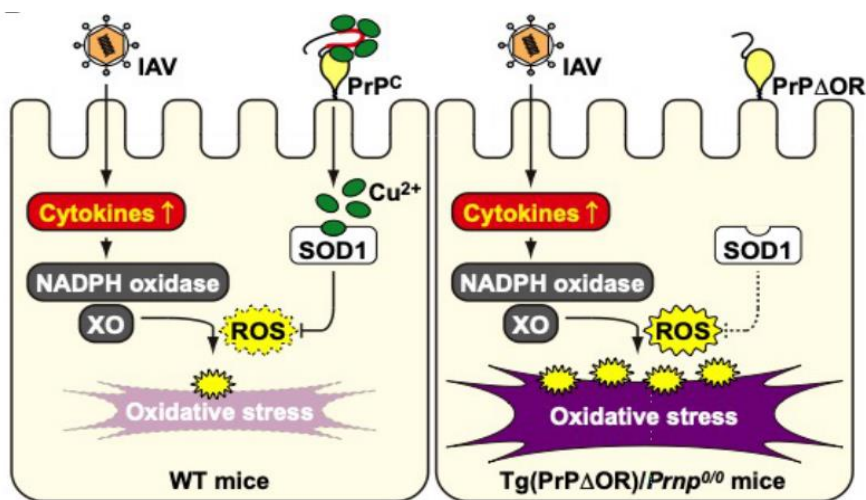


图1-5. PrP^c对IAV感染的抗氧化作用

Figure1-5. Anti-oxidative role of PrP^c against IAV infection^[128].

IAV 感染诱导炎性细胞因子的产生，导致 NADPH 氧化酶和 XO 的表达升高，最终导致 ROS 产生，引起氧化应激。PrP^c 的功能是通过转移结合到 OR 区的 Cu 离子通过调节 SOD1 来降低 ROS。但是，PrP^{ΔOR} 没有抗氧化活性，因为由于缺少 OR 区而无法与 Cu 离子结合，从而导致更高的 ROS 产生并最终导致更高的氧化应激。

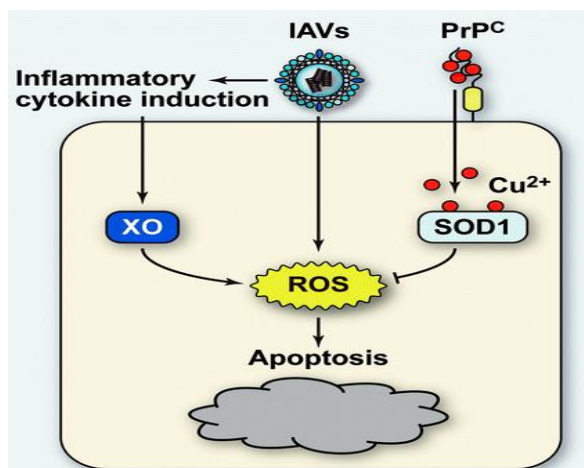


图1-6. PrP^c对IAV感染引起的细胞凋亡的保护作用的可能机制

Figure1-6. A possible mechanism for the protective role of PrP^c against IAV infection-induced apoptosis^[312].

另一方面, 由于缺乏 PrP^c, IAV 感染感染 Prnp^{0/0} 中 AT2 和 clara 肺上皮细胞无法充分抵抗氧化应激, 因此这些细胞相比于 WT 上皮细胞有更高凋亡, 从而引起更高的炎症反应, 最终导致小鼠死亡率更高^[124]。Sakaguchi 认为 PrP^c 通过影响肺上皮细胞的抗凋亡活性而不是直接影响肺中的病毒复制效率来发挥保护作用^[123,124]。具体作用机制是 Cu²⁺ 的氧化还原反应会产生 ROS^[129], 而 PrP^c 通过位于 N 末端 OR 区的组氨酸残基与 Cu²⁺ 结合^[130,131], 将 Cu²⁺ 结合到细胞表面, 上调 SOD1 的活性, 赋予了细胞抗氧化应激的能力, 进而降低 ROS 的产生, 抑制细胞的凋亡 (图 1-6)。然而, PrP^c 的抗氧化活性是否是其抗病毒感染的作用机制仍然有待研究^[132,133]。

1.4 本研究的科学问题, 研究内容与意义

1.4.1 科学问题

IAV 感染首先通过将病毒表面蛋白 HA 与细胞表面的唾液酸受体结合而使病毒侵入呼吸道或肺上皮细胞^[134], 随后病毒开始增殖并造成肺部感染。病毒感染的结果取决于病毒复制和宿主免疫反应之间的平衡^[135]。先天免疫系统通过病毒中的病原体相关分子模式 (PAMP) 与细胞模式识别受体 (PRR, 如 TLR、RLR 和 NLR) 的相互作用导致促炎性细胞因子的产生^[136], 将免疫细胞募集到感染部位, 激活针对 IAV 感染的免疫应答与炎症反应^[28,137]。然而, IAV 感染引起的炎症反应的过度激活会导致促炎细胞因子的过度产生, 即产生“细胞因子风暴”, 后者被认为是 H5N1 病毒和 1918 年大流行毒株致死性感染的根本原因^[24,25]; 也是 IAV 感染机体诱导肺部炎症和机体致病性的重要原因。

PrP^c 能够在 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞和肥大细胞等免疫细胞中表达, 因此 PrP^c 在免疫系统中具有重要的作用。PrP^c 在 IAV 诱导的炎症免疫反应或“炎症风暴”中是否发挥作用目前尚未有研究给出解读。另外, IAV 感染机体后攻击的主要靶器官是肺, PrP^c 在 I 型、II 型肺泡上皮细胞以及细支气管 Clara 细胞中均具有表达, 当流感病毒感染后, PrP^c 在肺部抵抗流感病毒感染中如何发

挥作用也有待于进一步的研究。

PrP^c 与各种病毒感染之间的相互作用愈加复杂,要充分阐明 PrP^c 在病毒感染中的功能,需要进一步研究和探索^[142]。关于朊蛋白 PrP^c 在 IAV 感染中的作用及作用机制的解读源于 2018 年发表的一篇文章,作者初步认为 PrP^c 通过抗氧化应激发挥抗病毒作用,具体是通过其 N 末端 OR 区 Cu²⁺ 结合活性调节活性氧产生酶 SOD1 的活性,从而降低过量 ROS 的产生,抑制细胞凋亡,保护小鼠免受 IAV 的致死性感染^[127]。然而,PrP^c 的抗氧化活性是否是其抗病毒感染的主要作用仍然有待研究^[138]。基于这些研究背景,我们提出以下两个科学问题:

(1) 前期研究表明 PrP^c 通过抗氧化应激发挥抗流感病毒的作用,那么 PrP^c 在流感病毒感染诱导的炎症反应中是否也具有重要的作用?其具体的作用机制?

(2) 由于朊蛋白的不同结构域可能发挥不同的生理功能。但是目前的研究更多的集中于氨基端的 OR 区,而对于其他功能域的功能知之甚少。那么 PrP^c 的不同结构域在 IAV 诱导炎症反应中发挥作用是否相同?

1.4.2 研究内容与技术路线

根据文献调研与前期研究,我们做出假设,朊蛋白参与宿主抵抗甲型流感病毒的感染,并且通过调节不同的细胞因子,参与不同信号通路与侵入机体的病毒互相作用发挥抗病毒作用,具体研究内容及技术路线如下:

(1) 研究内容

为了探究 PrP^c 在 IAV 感染诱导炎症反应中的作用以其作用机制,本课题拟借助近交系小鼠模型 C57BL/6 小鼠与小鼠肺上皮细胞系 MLE-12 来研究体内和体外水平上 PrP^c 在 H7N7-IA 诱导的免疫应答和炎症中的作用。本研究主要内容

包括:

① 构建 Cas9-PrP^{-/-} 基因敲除小鼠,探究 PrP^{-/-} 对病毒诱导小鼠致病性的影响:首先利用 Cas9 技术构建 2 类 PrP^c 缺失小鼠(分别敲除朊蛋白使之表达完全缺失和仅 OR 区缺失);然后通过比较 WT 小鼠与 PrP^c 敲除小鼠在 H7N7 禽流感病毒感染后临床症状(包括体重和存活率)和肺组织病理学方面的改变,进一步探讨

朊蛋白或其 OR 区对 H7N7 病毒感染小鼠致病性的影响。

② 流感病毒感染 $\text{PrP}^{-/-}$ 基因敲除小鼠肺组织 RNA-seq 测序及差异基因表达谱分析：从病毒感染的小鼠肺中分离出等量 RNA，并将其与感染生理盐水的对照组小鼠相比，来进行转录组测序分析。从病毒感染小鼠肺引发复杂的宿主免疫反应网络，在 mRNA 水平上对不同基因型小鼠肺的差异基因表达谱的分析，探究 PrP^c 对 H7N7-AIV 感染小鼠诱导炎症反应及“炎症因子风暴”中的调节作用。

③ 体外 Prnp 过表达质粒转染小鼠肺上皮细胞进一步验证 PrP^c 在流感病毒感染中的作用：鉴于 IAV 首先通过小鼠肺上皮细胞侵入机体，我们在体外水平即 MLE-12 细胞系上，构建 Prnp 过表达质粒，研究在 H7N7 感染 MLE-12 细胞后诱导细胞因子表达变化的过程中，过表达的 Prnp 对病毒复制以及炎症因子表达调节作用。

(2) 技术路线

根据以上研究内容，本课题的技术路线图如下图 1-7。

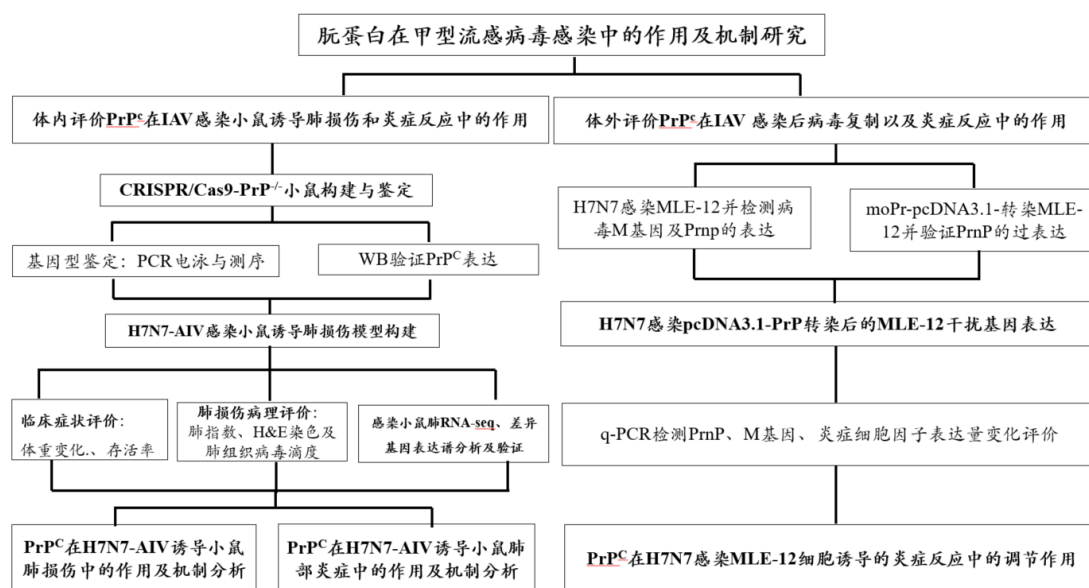


图 1-7. 技术路线图

Figure 1-7. Routemap.

1.4.3 创新点与研究意义

随着 IAV 耐药毒株的不断出现，引起了人们对这些的 IAVs 在人群中流行

的担忧^[139]。目前广泛使用的抗病毒药如 NA 抑制剂是靶向流感病毒 NA 基因，阻止子代的病毒颗粒在宿主细胞的复制和释放^[140]。靶向宿主分子的药物被认为不会诱导耐药性 IAVs 的产生，因此，针对 IAV 感染的宿主基因或蛋白开发抗流感药物具有潜在的重大意义。

正常细胞朊蛋白 (PrP^c) 的转变成为异常折叠的淀粉样蛋白 PrP^{sc} 会导致 PrP^{sc} 在大脑中积累，这是神经退行性疾病——朊蛋白病的致病机制。作为细胞膜糖蛋白，PrP^c 具有丰富的生理功能，能够参与细胞粘附、细胞增殖与分化、细胞存活与死亡、金属离子运输和跨膜信号传导、肿瘤发生、神经保护与机体免疫等。PrP^c 还通过不同的作用机制如调节感染细胞的自噬诱导、模拟病毒核衣壳参与病毒复制、抗氧化应激、激活脑细胞炎症反应等机制参与细胞应对不同病毒的感染，发挥保护作用。鉴于目前对于 PrP^c 在甲型流感病毒感染诱导的炎症反应中的作用及机制研究的空白，本研究利用 Cas9 技术构建 PrP^c 缺失小鼠和 Prnp 过表达质粒，分别从体内水平探究 H7N7 感染小鼠诱导肺损伤和炎症反应甚至“炎症因子风暴”中的作用；以及体外水平 (MLE-12 细胞) 探究 PrP^c 对 H7N7 感染后病毒复制以及炎症因子表达的调节作用。本研究能够帮助我们探讨朊蛋白是否具有抗 IAV 病毒感染的作用，以及了解其具体的作用机制。另外，为朊蛋白可能作为新的宿主分子靶标治疗流感提供新的思路。

另一方面本研究能够增加我们对 PrP^c 生理功能和作用机制的认识和理解。朊蛋白致病构象 PrP^{sc} 作为一种可自我复制并具有感染性的特殊蛋白质，有别于 DNA 和 RNA 病毒，探究正常细胞朊蛋白在单股负链 RNA 病毒——甲型流感病毒 IAV 感染小鼠和细胞中的作用及和作用机制有助于拓宽对 PrP^c 在 RNA 病毒感染中生理功能的解读。

第二章 PrP^c 在 H7N7 亚型 IAV 诱导的小鼠炎症反应中的作用

2.1 前言

PrP^C 是神经退行性疾病领域引发广泛关注的蛋白分子。2018 年日本德岛大学 Suehiro Sakaguchi 课题组通过转基因方法构建 PrP^c 基因敲除小鼠 (Tg(PrP^ΔOR)/Prnp^{0/0}) 模型, 证实朊蛋白通过铜离子结合区域 OR 区调节铜离子依赖的超氧化物歧化酶 SOD1 的表达, 最终在病毒感染中降低活性氧的产生, 对小鼠起到保护作用, 由此认为朊蛋白具有抵抗 IAV 的致命性感染。该课题组进行这样的机制解读, 是基于神经疾病领域几十年研究的积累, Cu²⁺/SOD1/ROS 机制是朊蛋白构象改变引起的神经退行性疾病的经典作用机制。而朊蛋白在 IAV 诱导的炎症反应中是否具有抗病毒作用以及具体的作用机制还有待研究。

禽流感病毒 (AIV) 变异速度快, 并且能够不断适应人体, 具有形成流感大流行的潜在可能, 给人类健康、公共卫生安全和经济社会发展带来了巨大挑战。H7N7 作为甲型禽流感病毒的一种, 曾出现过多次聚集性野鸟/禽类疫情, 并且 H7N7 亚型病毒能够直接感染人。小鼠模型被广泛用于确定流感病毒的毒力, 使用 H7N7 亚型毒株感染小鼠构建动物模型, 将有助于我们了解该亚型禽流感病毒的致病性和宿主感染甲型流感病毒后的免疫应答机制。本研究中我们使用 C57BL/6 近交系小鼠, 采用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术构建两种基因型小鼠, 即朊蛋白全基因敲除小鼠 (119KO) 和朊蛋白 OR 区敲除小鼠 (120KO)。然后构建 PrP^{-/-}小鼠感染 IAV 模型, 模拟肺部病毒感染、急性肺损伤以及“炎性”因子风暴, 探究 PrP^c 在 H7N7 感染小鼠后诱导的肺损伤中的作用, 以期为抗 IAV 研究和 PrP 的认识提供一定的数据支撑与科学依据。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验毒株与小鼠

(1) 病毒株

H7N7 亚型 IAV 病毒-A/common teal/Shanghai/CM1216/2018 由本实验室保存, 下文简称 CM1216。通过对病毒全基因组序列分析, 发现该毒株具有低致病性禽流感病毒特征, 并与韩国同时期野鸟体内分离到的毒株具有高度相似性 (99%以上)。小鼠致病性试验表明, CM1216 无需预先适应可直接感染小鼠, 引起小鼠明显的临床症状, 并且病毒可以在肺部有效感染, 使肺部具有典型的肺损伤病理特征。经鸡胚增殖病毒 CM1216-H7N7 及纯化, 并用 TCID₅₀ (Reed-Muench^[141]) 测定病毒滴度为 $10^{-7.318}/100\mu\text{l}$ 。

(2) 实验动物

C57BL/6 小鼠 (包括 119WT, 119KO, 120WT, 120KO 小鼠) 7-9 周龄, 体重 20-24g (同等周龄雌鼠较雄鼠轻 2g 左右), 雌雄各半。小鼠分笼正常饲养驯化。实验前和实验中小鼠均正常饮食。病毒感染实验及感染后小鼠饲养于聊城大学动物生物安全 2 级实验室 (ABSL-2), 病毒感染实验于生物安全柜中操作, 小鼠饲养于独立通风饲养笼具 (IVC)。

利用已有的 PrP^{-/-} (119KO、120KO) 小鼠, 各 6 雌 3 雄进行繁殖培育, 雌、雄鼠按照 2:1 配对合笼扩增, 每次合笼 3 组, 雌鼠受孕成功后分笼饲养。用 PCR 方法对新生小鼠趾甲或尾部组织做基因型鉴定, 分离纯合子小鼠进行后续实验, 杂合子雄鼠延续饲养用于保种繁殖。培育过程中不用于繁殖或者实验的杂合子小鼠进行脱颈或者二氧化碳窒息的安乐死处理。

2.2.2 实验试剂、耗材与仪器

(1) 实验试剂与耗材

病毒 RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit (74104, QIAGEN),

Superscript III 逆转录试剂盒 (18080051, Invitrogen),

PCR 试剂盒 (Takara),
SYBR Green PCR Kit (208054, QIAGEN),
胶回收试剂盒 (Promega, A9282),
Hind III/ BamH I (Takara),
T4-ligase (EL0012, 生工),
电泳缓冲液 TAE (生工, B548101),
胰蛋白胨 (LP00042, OXOID),
酵母提取物 (LP00021, OXOID),
琼脂糖 (N605, Amresco),
BSA (KC3038, Kingmorn),
NaCl 等固体盐类、醇类、氯仿、酸、碱试剂 (分析纯, 国药试剂),
E.coli (DH5 α , 生工), X-gal (B541006, 生工),
Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (P0006C, 碧云天),
丽春红染色液 (KC1084, Kingmorn),
TGX Stain-free FastCast Acrylamide Kit (1610185, Bio-Rad),
CAP, 3-环己基氨基丙烷磺酸 (1135406, Sigma),
ECL 特超敏化学发光试剂盒 (P10018AFT, 碧云天),
DMEM, DMEM/F-12 (HyClone,),
胎牛血清 FBS (044001A, Bioind),
100 $\times$ 双抗 (青霉素-链霉素, E607011, 生工),
链霉素 (A100382, 生工),
氨苄霉素 (A100339, 生工),
青霉素 (A600135-0025, BBI Life Sciences),
0.25%胰酶-EDTA (25200-072, Gibco),
二甲基亚砷 DMSO (D8370, Solarbio),
PBS (SH30256.01, Hyclone),
琼脂糖 (A505255, 生工),

CO₂ (上海气体有限公司),
乙醇 (无水、95%、75%), (国药),
10%多聚甲醛 (KA1418, Kingmorn),
病毒消毒粉 (Rely on),
组织包埋盒 (31050102W, CITOTEST),
脱脂奶粉 (232100, BD),
BSA (Fraction V, 碧云天),
冻存管(1.8mL, Nunc),
200 μ m 针头式过滤器 (F513151, 生工),
T25/T75 细胞培养瓶、6/12/96 孔板、5/10ml 移液管、PCR 管、EP 管 (Corning),
24 孔、96 孔板细胞板、96 孔 U 形板(Corning),
15ml/50ml 离心管、(滤芯)枪头 (Axygen),
封口膜 (PARAFILM),
石蜡切片粘附载玻片 (7105, Leica),
石蜡组织切片机刀片 (819, Leica),
玻璃器皿 (量筒、烧杯、蓝口瓶、广口瓶、棕色瓶等) (国药集团),
PVDF 膜 (0.2 μ m, 0.45 μ m, Immobilon),

(2) 实验仪器

不同量程微量移液器、多通道移液器 (Eppendorf、Gilson、Thermo),
ABI 7300、7500 实时荧光定量 q-PCR 仪 (ABI),
Biometra ProfessionalTRIO Thermocycler 、Veriti 96 Well Thermocycler (ABI),
微量分光光度计 (ND5000, Biotek),
热空气消毒箱 (GRX-9053A, 上海齐欣科学仪器有限公司),
电热恒温鼓风干燥箱 (DGG-9146A, 上海齐欣),
电热恒温水槽 (DK-8D, 上海齐欣),
台式恒温振荡器 (TCYQ, 太仓市实验设备厂),
单人单面净化工作台 (SW-CJ-1FD, 苏州净化),

摇床 (TS-1000, ORBITAL),
低温高速离心机 (Centrifuge 5424R, Eppendorf),
低温高速离心机 (Multifuge X1R, Thermo),
低速离心机 (LX-400 Centerifng Kylin-Bell, Eppendorf),
4°C冰箱 (SC-329GB, 海尔),
-20°C低温冰箱 (海尔),
-80°C超低温冰箱 (海尔; Thermo),
捞片机 (HI1210, Leica),
烤片机 (HI122, Leica),
手摇式切片机 (RM2235, Leica),
显微镜 (DM2500, Leica),
组织包埋一体机 (HistoCore Arcadia C, HistoCore Arcadiia H, Leica),
微波炉 (Galanz),
立式压力蒸汽灭菌器 (LDZF-50KB, Shenan),
通风柜 (SW-TFG12, 苏州净化),
pH 计 (Mettler toledo),
分析天平 (Mettler toledo),
电子天平 (YP202N, Hangping),
纯水仪 (Elix, Millipore),
GelDoc-It Imaging System (UVP),
多功能紫外线分析仪 (ZF1-I, 上海嘉鹏科技有限公司),
琼脂糖凝胶电泳槽 (HE-120, Tanon),
凝胶电泳电源 (EPS 300, Tanon),
Bead Mill Homogenizer 匀浆器 (BEAD RUPTOR ELITE, OMNI),
MULTISKAN Sky 酶标仪 (Thermo),
蛋白质免疫印迹电泳和转膜电源 (PowerPac Basic, Bio rad),
电泳槽 (Mini protcan tetra cell, Bio rad),

Amersham Imager 680 (GE Healthcare Bio-Sciences AB),
恒温湿细胞培养箱 (Thermo),
恒温循环水浴锅 (DK-8D, 上海一恒科技有限公司),
石蜡包埋机 (Lecia),
手动轮式切片机 (Lecia),
石蜡切片水浴锅 (Lecia),
石蜡切片 烘片机 (Lecia),
生物显微镜 (Lecia),
纯水仪 (Elix5, Millipore),
细胞计数板 (上海医用仪器有限公司),
细胞刮刀 (生工)。

2.2.3 CRISPR/Cas9-PrP^{c/-}小鼠的构建与鉴定

(1) 小鼠 Prnp 基因敲除

① Prnp 基因靶点的构建：目的是精确删除 C57BL/6 小鼠 Prnp 基因 OR 区（八肽重复区，51-90aa，图 2-1a。氨基酸序列为彩色标注），同时将删除区域前的 CCA 突变成 CCC，将删除区后的 GGA 突变成 GGG，编码的氨基酸不变，从而在删除位点引入一个 SmaI 酶切位点（见图 2-1b，黄色高亮序列为删除区域，原密码子为红色字体，突变后的密码子为绿色字体，见图 2-1c）。采用 CRISPR/Cas9 技术，设计、合成并筛选靶向目的基因 Prnp 的单向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) [142]。通过 CRISPR/9 技术，在待突变位点处设计靶点，同时设计一条删除 OR 区并带有点突变的寡聚片段 (CCA-CCC, GGA-GGG, 突变后的密码子为绿色字体，图 2-1c)，通过同源重组的方式获得删除 OR 区并含有 SmaI 酶切位点的小鼠。GuideRNA 信息见图 2-1d。

Figure 2-1. Information of knockout mouse *Prnp* gene.

(a), 彩色标注为 OR 区即八肽重复区的氨基酸徐磊, (b), 黄色高亮区域为删除区, 为编码 OR 区多肽的核苷酸序列, 两端红色字体为原始密码子, 蓝色高亮为起始密码子 AGG, (c), 为寡聚核苷酸片段, 绿色字体为突变后的密码子, (d) 为 guide RNA 序列。

②亲代雌性小鼠（C57BL/6）超数排卵：用马绒毛膜促性腺激素（Pregnant serum gonadotropin, PMSG）处理供体雌性小鼠诱导超数排卵，两天后注射人绒毛膜促性腺激素（Human chorionic gonadotropin, hCG），将雌鼠与雄鼠合笼交配。

③ 取受精卵，将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 显微共注射单细胞期大鼠胚胎的细胞质中，之后将注射的胚胎转移到假孕小鼠汇总，即胚胎移植。

④ **Founder 鼠鉴定**: F0 小鼠将于胚胎移植手术后 19-20 天左右出生, 小鼠出生约一周内剪脚趾提取 DNA 并通过 PCR 产物测序进行基因型鉴定。

⑤ F1 小鼠鉴定：待雄性 F0 小鼠到 7 周龄，雌性小鼠到 4 周龄，可分别与野生型小鼠杂交，通过种系传递建立突变株。子代小鼠出生一周内剪尾，提取 DNA，通过 PCR 产物测序鉴定子代小鼠基因型。如果 F1 中有阳性小鼠，则表明靶基因已经整合到生殖细胞，表明目标小鼠品系建立成功。

(2) 基因型鉴定

① 提取基因组 DNA

组织消化：小鼠出生 7 天内，剪取约 5mm 脚趾，置于 1.5mL RNase-free EP 管中，低速离心后加入 0.5mL 裂解液（配方：100mM Tris pH8.0, 5mM EDTA pH8.0, 0.5% SDS, NaCl 1.17g/100ml）、0.5ul 蛋白酶 K（浓度为 20mg/ml，溶解在 pH7.4, 20mM Tris 和 1mM CaCl₂ 中，用 50%甘油做缓冲液，以上试剂均来自 Sigma）。混匀后于 55℃水浴锅中消化过夜，随后保存在-20℃冰箱中。

DNA 提取：取出组织消化后的 EP 管，上下颠倒混匀，4℃ 1,2000rpm 离心 10min；移液器吸取上清 400ul 到加入新的 EP 管中，随后加入等体积苯酚/三氯甲烷，上下颠倒混匀，静置 3min 后，4℃ 1,2000rpm 离心 5min；随后吸取上清到新的 EP 管中（尽量精确吸取，不要吸到下层的苯酚或沉淀物），向上清中加入等体积的氯仿，上下颠倒混匀，稍微静置 3min 后，4℃ 1,2000rpm 离心 3min；吸取上清到新的 EP 管中，加入 1/10 体积的醋酸钠溶液和 2.5 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀，-20℃放置 30min；4℃ 1,2000rpm 离心 10min，弃上清，将 EP 管倒置约 10min 晾干以除去乙醇；等 EP 管干燥后，加入 30μL Rnase-free H₂O 溶解管底沉淀，随后检测 DNA 浓度，保存在-20℃冰箱。

② PCR

针对 Prnp 基因靶点位置设计 PCR 引物 Prnp-F1-TGGCGAACCTTGGCTACTG，Prnp-R1-GTGCTGCTTGATGGTGATATTGA，PCR 产物长度 557bp。普通 PCR 反应体系如下表 2-1，试剂盒来自 Takara。

表 2-1. PCR 反应体系与程序

Table 2-1. PCR reaction system and procedure

试剂	体积/μL	终浓度	反应程序 (30cycles)
cDNA	2.5	500ng/μl	94℃ 3min
Primer-Forward/Reverse	2.5	10μm	94℃ 30s
dNTP	5	2.5mM	TM 30s
10×buffer	5		72℃ 1kb/min
Easy-taq	0.5		72℃ 8min
补 ddH ₂ O 至	50		12℃ < 1h

③ 测序分析

PCR 产物直接测序（生工），电泳结果图可以观察到缺失或插入片段，割胶回收送测。将测序回来的序列通过 Chromas 查看是否单峰，采用 DNAMAN8.0 进行序列比对，分析基因型是野生型还是纯合子，以及是否为突变序列，突变序列为 437bp, WT 为 557bp。分为两种类型，一种是移码突变，编码氨基酸和翻译的蛋白质不同，称为完全突变，119type。序列为 GGAAGCCCTGGAGGCAACCGTTAC**CCAC**------(119)-----**GGAGGGGGGTACC** CATAATCAGTGGAACA，长度为 119bp；一种是同时点突变，翻译出的蛋白仅有 OR 区敲除，即部分敲除，称为 120type。序列为 GGGAAGCCCTGGAGGCAACCGTTAC**CCC**------(120)-----**GGGGGGGTACCC** ATAATCAGTGGAACAAGCCCA，长度为 120bp。

④ 结果鉴定

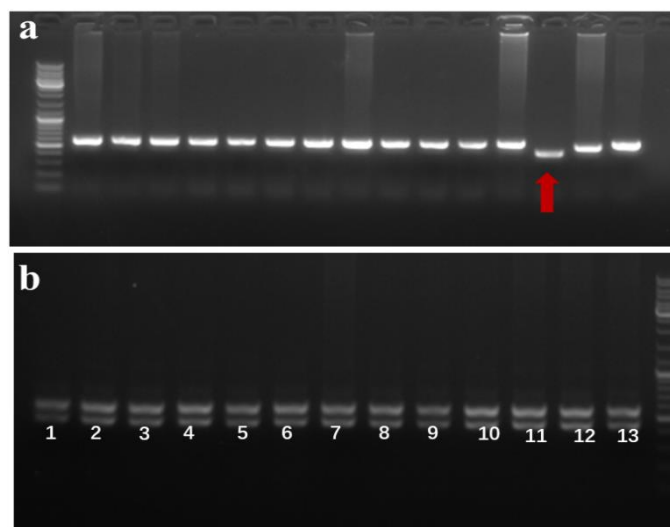


图 2-2. Prnp 基因敲除小鼠 F0 和 F1 基因型鉴定电泳结果图

Figure 2-2. Electrophoresis of F0 and F1 mice genotype identification of Prnp gene.

亲代小鼠 F₀，2017 年 3 月 22 日进行原核注射，2017 年 4 月 9 号小鼠出生，以图 2-2a 为电泳结果图，标记处为 Founder。F₀×WT 得到 F₁，2017 年 6 月 22 日，产 13 只小鼠，同样的方法进行基因型鉴定。电泳结果见图 2-2b。对下方的条带进行测序，得到结果 1-4 号，6-8 号为移码突变，是 119 type；5 号，9-13 号小鼠为同时点突变，是 120 type。由此，我们得到两种类型的 Prnp 基因敲除小

鼠，分别进行后续实验，以探究朊蛋白完全缺失和 OR 区对其在 IAV 感染中的生理功能的影响。

⑤子代小鼠自交获得纯合子，后续实验需要的小鼠数量较多时，繁殖 4-5 代后还需要与野生型小鼠杂交以保持小鼠性状稳定。分离纯合子小鼠进行后续实验，杂合子雄鼠延续饲养用于保种繁殖。对培育过程中不用于繁殖或者实验的杂合子小鼠脱颈或二氧化碳窒息的安乐死处理。

经由以上步骤，我们通过 CRISPR/Cas9 敲除 *Prnp* 基因获得了两种小鼠。OR 区缺失型 (120KO) 小鼠和移码突变型小鼠 (119KO)。随后建立 H7N7-IAV 诱导小鼠肺损伤和炎症模型，并对 WT 型和 *PrP^{-/-}* 小鼠的感染状况进行评价，为进一步探究 *PrP^c* 的作用机制提供一定理论基础。

2.2.4 H7N7 感染小鼠诱导肺损伤模型的建立

(1) H7N7 感染小鼠模型于 ABSL-2 实验动物中心进行。

(2) A 型流感病毒毒株 H7N7 (SPF 鸡胚增殖的尿囊液经 4°C，离心、0.22μm 滤膜过滤、1% 双抗 4°C 过夜处理)；无菌生理盐水 (高温高压灭菌处理，0.22μm 滤膜过滤)，用量 80μL-95μL/18g-24g ($10^{6.4}$ - $10^{7.3}$ TCID₅₀/18g-24g)。

(3) 选取同等数量、重量 (20-24g)、7-9 周龄的小鼠包括 119WT, 119KO, 120WT, 120KO 小鼠) 小鼠称重，确定病毒或生理盐水剂量，给药体系 80-100μl，乙醚麻醉小鼠，进入急促、高频呼吸状态后 10s，移液枪经软管枪头吸取病毒液后，缓慢滴鼻，根据小鼠呼吸频率进行滴注，滴注后小鼠自然苏醒。滴鼻给药同自然状态下病毒感染的部位和途径一致。

(4) 病毒/生理盐水感染小鼠后，在第 3、5、8、11 天后颈椎脱臼法处死小鼠，称重，取小鼠血样，及肺、脑组织，称量湿肺重量，检测小鼠肺、肺部相关细胞因子、趋化因子及病毒含量，检查肺水肿情况，出血点等肺部病变情况，以初步明确病毒感染情况，确认模型构建成功。实验流程简图见图 2-3。

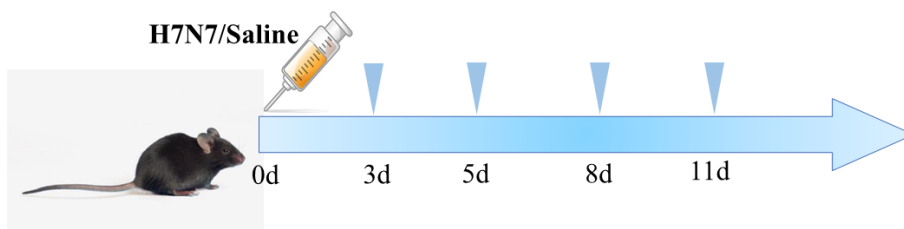


图 2-3.小鼠鼻腔注射 H7N7 感染实验流程简图

Figure 2-3. Schematic diagram of mice infection with H7N7

(5) 分组情况, 120WT 和 119WT 小鼠, 实验组和对照组各半, 随机分组, 每组雌雄各半, 感染后第 3、5、8、11 天取样, 每次取 6 只, 分别用于后续石蜡切片, 用于免疫组化、HE 染色 (1/4 组织), WB 检测蛋白水平变化, 组织匀浆液病毒含量检测 (均匀区 1/2 组织, 上述 3 项一起进行), 转录组测序 (1/4 组织), 每项实验均有 3 生物个体重复。

(6) 120KO, 119KO 小鼠, 实验组、对照组按需要分配, 随机分组, 雌雄各半, 攻毒后取样, 对照组每次取 3 只, 实验组取 6 只, 后续分析同上。

(7) 以上样品, 石蜡切片样本及时置于 4%多聚甲醛中, 其余样本迅速置于 -80℃或液氮中保存以维持样本活性待后续实验。

(8) 剩余小鼠留作观察。观察期结束后, 安乐死处理小鼠, 并按照 ABSL-2 实验室(二级动物生物安全实验室)规定进行消毒及灭菌处理。

2.2.5 H7N7 感染 PrP^{-/-}小鼠后临床症状评价

小鼠攻毒前和攻毒后每天测量体重 (g) 并统计, 直至感染后 14-15 天。称量体重; 记录死亡情况, 计算小鼠存活率 (存活小鼠数量/攻毒小鼠总数, 不含处死取样小鼠×100%) 统计。

2.2.6 H7N7 感染 PrP^{-/-}小鼠后肺组织病理评价

(1) 小鼠肺指数测定

病毒感染后的 3, 5, 8, 11 天分别取三只小鼠, 称量体重后解剖, 并计算肺指数, 即湿肺重量占体重的百分比 (wet lung/body weight of mice, g/g×100%)。

(2) 石蜡切片

采用 4%或 10%多聚甲醛（福尔马林）固定组织、石蜡切片以及 HE 染色。

石蜡切片的具体步骤如下：

① 肺组织放入加了 10 倍体积的 4%多聚甲醛的 10ml 离心管中，室温固定过夜；随后转入 4℃冰箱固定 2 天-7 天，确保组织形态完好以及固定透彻。

② 固定液换成 PBS，室温摇床低转速振荡 30min，重复一次。

③ 乙醇梯度脱水，30% 乙醇 30min，50% 乙醇 30min，75%乙醇 1h，85%乙醇 30min，95% 乙醇 30min，，无水乙醇 30min，重复一次。

④ 二甲苯透明，50%二甲苯（乙醇配制）15min，二甲苯 15min，二甲苯 15min 待组织透明完全又不至于过脆化。

⑤ 组织放入预热融化的纽扣石蜡（Lecia）中，65℃1h，换入新的石蜡，1h，重复一次。最后组织包埋盒（世泰）包埋，置于冰上降温至凝固。于-20℃保存。

⑥ 石蜡切片，厚度调整为 4μm，阳离子载玻片捞片，展片（40℃），58℃烤片，可过夜。降温后-20℃保存。

(3) 苏木精-伊红（hematoxylin-eosin staining, HE）染色。苏木精-伊红染色经过了时间的考验，成为组织学检测的标准染色剂，苏木精和伊红分别是碱性和酸性染料，而大多数细胞器和细胞外基质嗜酸性，细胞核、内质网和核糖体嗜碱性，因此可以分别染成红色和蓝色^[143]。

① 石蜡切片置于烘片机上 40℃烤片，30min-1h。

② 脱蜡复水，二甲苯（I）、（II）脱蜡各 10min，重复一次。依次移入无水乙醇（I）、（II），95%乙醇，85%乙醇，75%乙醇，30%乙醇各 5min，ddH₂O 中 5min。

③ 苏木精染色 3-5min， ddH₂O 冲洗 1-2min。

④ 1%盐酸乙醇分化 30s。

⑤ 1%氨水返蓝 30s，ddH₂O 洗 3min。

⑥ 30%、75%、85%、95%、无水乙醇（I）、（II）脱水各 5min，二甲苯透明（I）、（II）各 min。

⑦ 中性树胶封片，镜检。根据结果调整各步骤的时间已达到最佳效果。细

胞核呈蓝紫色，细胞质呈粉、红色，对比鲜明即可。

(4) 组织蛋白质提取

① 选用 RIPA 裂解液 I (Sangon Biotech) 进行蛋白提取。新鲜或保存在 -80°C 的组织取 0.1g 置于破碎管中，加入 1mL 溶液 A、1 μL 溶液 B 和 5 μL 溶液 C，以及 10 μL 蛋白酶抑制剂 (Roche)；破碎管中加入适量陶瓷破碎珠 (大珠子 10 颗，小珠子 15 颗)，置于匀浆器上破碎，5500r，20s，随后置于冰上降温 1min；重复 5-6 次，直至组织完全破碎，无明显组织块。

② 用移液器将匀浆液转移至 2mL EP 管，置于冰上静置 10min，在这期间每隔 2-3min 涡旋振荡，充分裂解组织。

③ 4°C ，1,2000rpm 离心 10min，移液器吸取上清即为蛋白。

④ 测定蛋白浓度并定量后；进行蛋白质变性，蛋白中加入对应量的 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，混匀后煮沸 10min，冷却到室温，即得到更加稳定的变性蛋白，保存在 -20°C 冰箱。

(5) 蛋白定量

选用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒，测定原理是，酸性条件下，考马斯亮蓝 G-250 染料与蛋白质的碱性疏水区和芳香氨基酸如精氨酸结合，溶液颜色由棕色变蓝，导致最大吸收峰从 465nm 转移到 595nm，蓝色化合物的颜色深浅与样品中的蛋白质浓度成正比。

① 配置蛋白标准品，用裂解液 (溶液 A) 稀释标准品 BSA (20mg/mL)。完全融化并混匀后使用。梯度稀释成 1.5、1.0、0.75、0.5、0.25、0.125mg/mL 的蛋白标准，充分混匀待用。

② 取 10 μL 不同浓度的蛋白标准加到 96 孔板中，3 重复，取 10 μL 样品 (一般稀释 10-50 倍后测量) 加到样品孔中，设置 3 重复，空白孔中加入裂解液 10 μL 。每孔中加入 200 μL 考马斯亮蓝染色液， 37°C 温度下孵育 15-30min，随后用酶标仪测定混合液在 A595nm 处的吸光度。

③ 绘制标准曲线 ($Y=0.4148 \times X^2 + 1.5801 \times X + 0.0097$, $R^2=0.9951$)，根据标准曲线和样品浓度与体积计算蛋白浓度。

(6) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

① 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。SDS-PAGE 是根据蛋白质分子量的不同而分离蛋白质的电泳成像方法。凝胶形成的原理是在加速剂 TEMED 和 APS 催化剂的作用下, 产生自由基, 引发单体丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合并发生交联形成三维网状结构, 具有分子筛效应。

② 清洗和组装玻璃板。将玻璃板充分清洗干净, 晾干。两块玻璃板叠放整齐, 下边缘对齐, 两边扣好固定在胶台上。

③ 配置分离胶, 12%分离胶, 1.5mm 玻璃板 (Bio-Rad), 四甲基乙二胺 (Tetramethyl-ethylene diamine, TEMED, Bio Rad), 过硫酸铵 (Ammonium Persulfate, APS, Bio rad)。配置好分离胶, 手动轻柔混匀。

表 2-2. 分离胶体系
Table 2-2. Resolver solution system

试剂	体积
Resolver A	3mL
Resolver B	3mL
TEMED	4 μ L
10% APS	40 μ L

④ 加入分离胶, 快速保证无气泡, 加至梳子下沿 1-2cm 处, 缓缓加入无水乙醇压胶, 使之成为一条水平直线。

⑤ 室温静置 30min-1h 凝胶, 倒掉乙醇, 吸水纸吸干玻璃板上的乙醇。

⑥ 配置浓缩胶。

表 2-3. 浓缩胶体系
Table 2-3. Stacker solution system

试剂	体积
Staker A	1.5 mL
Staker B	1.5 mL
TEMED	3 μ L
10% APS	15 μ L

⑦ 快速加入浓缩胶，随后插入相应厚度的梳子（1.5mm），避免气泡产生，室温静置 1h 凝胶。

⑧ 组装电泳槽。SDS-PAGE 胶凝固好，将胶板放在电源架上，固定在电泳槽中，加电泳缓冲液验漏，3-5min，保证电源架中（上槽）的缓冲液与电泳槽（下槽）中的缓冲液互不相通；轻轻拔掉梳子。

⑨ 上样。样品稀释至 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ， $10\mu\text{L}$ 长枪头缓慢上样，避免冲散样品。边上泳道加入等体积 Marker（Bio-rad，161-0374）和上样缓冲液。

⑩ 电泳。接通电泳，电泳槽外周加冰袋降温。浓缩胶，85V，30min；分离胶 180V，45-50min。待样品中的溴酚蓝条带跑至底端时，停止电泳，关闭电源。取下胶板。回收电泳缓冲液。

（7）蛋白质免疫印迹（Western Blotting）

① SDS-PAGE 见上一步骤。

② 转膜，提前准备好 PVDF 膜（Bio-rad，0.22/0.45 μm 根据目的蛋白大小选用不同孔径的膜），做好标记，并置于甲醇溶液中浸泡 1min 去极化，甲醇用完回收。

③ 将 SDS-PAGE 胶缓慢拆下，注意正反面，做好标记。

④ 将海绵，双层滤纸、转膜夹置于乐扣盒中，倒入转膜缓冲液，充分浸透并赶走气泡，按照转膜夹白色面→海绵→滤纸→PVDF 膜→胶→滤纸→海绵→转膜夹黑色面的顺序层层铺好，并确保无气泡。

⑤ 将上述“三明治”结构放入转膜槽中，放入冰盒降温，加入足量预冷的转膜缓冲液，电泳转膜。确认好正负极，110V 恒压转膜，33-45min，时间根据蛋白大小决定。

⑥ 转膜结束，先退出程序，再关闭电源。根据蛋白大小和位置，拆下并切割 PVDF 膜。放入 5mL 封闭液（5%脱脂奶粉+1%BSA， $1\times\text{TBST}$ 稀释）中室温封闭 1-2h。

⑦ 孵一抗。弃封闭液， $1\times\text{TBST}$ 摇床洗涤 3 次，5min 每次。一抗用封闭液配置（3F:10，1:1000；NP，Abclone，1:300；内参 β -actin mAb (5B7)，Bio-dragon，

B1029, 1:2000), 将膜放入孵育盒中, 加入 2-3mL 一抗, 室温摇床孵育 2h 或 4°C 过夜孵育。

⑧ 孵二抗。回收一抗, 1×TBST 摇床洗涤 4 次, 每次 5min, 配置二抗 (NP 二抗, 羊抗兔, Abclone, 1:2000 稀释; 其余二抗, 羊抗鼠, Biodragon, 货号 BF03001, 1:1500 稀释) 室温孵育 2h。

⑨ 回收二抗, 1×TBST 摇床洗涤 4 次, 每次 5min。ECL 显色液 (Kingmorn, KC3069) 显色。原理是 ECL 显色液是 HRP 的催化底物, 被 HRP 催化产生化学发光反应。显色液现配现用, 避光条件下, 加在膜上, 混匀孵育 30s-1min。

⑩ GEA6000 呈像并拍照。

⑪ 实验结果处理分析。WB 图片用 Image J 处理, 数据分析和制图用 GraphpadPrism 8.0 和 Adobe Illustrator 完成。数值为均值 $\text{mean} \pm \text{SD}$, $N=3\sim 25$, 采用 *Student's T* 检验, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

2.3 实验结果

综合文献调研和前期研究, 我们构建了两种不同突变类型的 Cas9-PrP^{-/-}小鼠, 背景是 C57BL/6 品系, 获得了两种基因型突变小鼠, 119 KO 是 Prnp 基因移码突变, 为完全突变, 即 PrP^c 蛋白表达完全缺失; 120 KO 是部分突变, PrP^c 蛋白的 N 端八肽重复区即 OR 区不表达。针对朊蛋白的两种缺失类型, 我们用 H7N7 亚型禽流感病毒 (A/common teal/Shanghai/CM1216/2018, $10^{-7.318}/100\mu\text{L}$) 滴鼻途径分别感染 119KO/120KO 小鼠与 WT 小鼠 (用量 $80\mu\text{L}/18\text{g}\sim 95\mu\text{L}/24\text{g}$), 每天记录体重、小鼠死亡情况, 在感染病毒后 3、5、8、11 天取样并统计相应参数。从死亡率、体重变化临床指标和肺组织病理损伤方面初步探究 PrP^c 在 H7N7 感染小鼠中的作用。

2.3.1 PrP^c 缺失小鼠朊蛋白表达验证

Prnp 基因缺陷小鼠（C57BL/6 背景）的鉴定，通过对 Prnp 基因测序和基因型鉴定（电泳结果见图 2-2）以及蛋白质免疫印迹（Western blot）鉴定（图 2-4）确认。从图 2-2 中我们可以看到两种基因型小鼠的 Prnp 基因 PCR 产物电泳的结果，说明两种小鼠 Prnp 基因突变后，DNA 大小的差异。图 2-4 说明同样的上样量条件下，相较于肺，小鼠脑中 PrP^c 蛋白表达量更高，因此验证 PrP^c 蛋白的缺失与否，从脑中蛋白的表达情况可以看到更明显的区别。相对于野生型小鼠，120KO 脑的 PrP^c 蛋白在 30-35kDa 的位置缺失表达，缺失部分为 OR 区；而 119KO 脑中则完全不表达。因此，我们成功获得了两种朊蛋白缺失小鼠的基因型，为我们后续实验奠定基础。

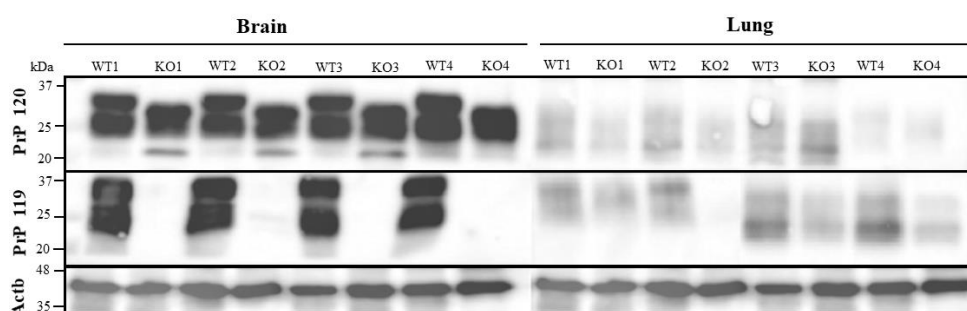


图 2-4. PrP^c 蛋白在 KO 小鼠和 WT 小鼠脑和肺组织中的表达验证

Figure 2-4. PrP^c is expressed in brains and lungs from WT and KO mice.

图中为 120KO、120WT、119KO、119WT 小鼠脑和肺中 PrP^c 的表达验证，n=4，抗体为 PrP 的抗体 3F:10，内参为 β -actin。

2.3.2 H7N7 感染 PrP^{-/-}小鼠后临床症状评价结果

存活率是能够反映 H7N7 病毒感染小鼠致病性严重程度的参数，我们记录了攻毒后小鼠的存活率变化趋势。总体来看，攻毒 5 天后，120 WT 小鼠存活率在 70%左右，120 KO 小鼠的存活率则降为 50%左右；随后，野生型小鼠的存活率在第 9 天降到最低，为 60%左右，而敲除鼠存活率则一直降低，直到 11 天降为 24%（图 2-5c）。120KO OR 区缺失小鼠的存活率一直明显低于 WT 小鼠，即

敲除 PrP^c 蛋白 OR 区之后,小鼠的死亡率高于 WT。以上结果表明敲除朊蛋白 N 端 OR 区后,小鼠更易于感染 H7N7 病毒。

将小鼠雌性和雄性分别来看,图 2-5 (a、b),120 KO 和 WT 雄鼠在感染后 7 天内存活率没有明显分别,随着感染时间的持续延长,120 WT 雄鼠的存活率维持不变,120 KO 雄鼠的死亡率持续增高,存活率持续走低,直到第 11 天降至 22%左右。对雌鼠而言,KO♀鼠存活率一直低于 WT♀,WT♀鼠在第 8 天达到最低存活率,为 60%,KO♀则在感染后第 5 天降至最低,为 32%左右。综合所述,同种基因型雌鼠和雄鼠在感染病毒后的存活率随时间变化,存活率和病程长短稍有不同,但是无显著差异,均为基因敲除鼠的存活率低于野生型小鼠。这跟同周龄雌鼠一般体重都较雄鼠轻,并且存活率跟小鼠个体的状态有关。因此我们认为,在 H7N7 病毒感染小鼠后两周内,小鼠存活率的变化没有性别依赖性。

病毒感染后小鼠体重随时间的变化趋势如图 2-5 (d-f) 所示,与存活率趋势一致,KO 和 WT 小鼠体重都在第 5-7 天达到最低值,随后恢复,并且 120 KO 小鼠体重一直低于 WT 小鼠,体重减轻程度更严重,并且也无性别依赖性。说明感染 H7N7 后,120 KO 小鼠减重更多,机体受到的影响更大。推测朊蛋白 OR 区可能对小鼠抗病毒 H7N7 感染具有保护作用。

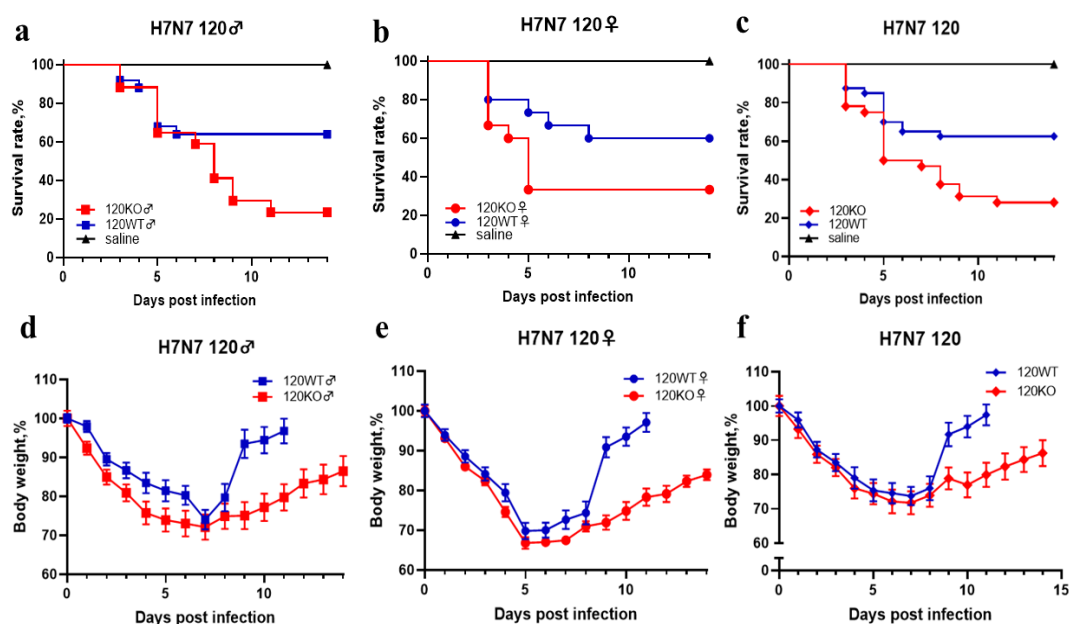


图 2-5. H7N7 感染后 120 KO/WT 小鼠存活率与体重随时间变化图

Figure 2-5. Survival rate and body weight of 120 KO/WT mice post H7N7 infection.

图 2-5 (a) 为 120♂小鼠存活率随时间变化图, 120KO♂, n=17; 120WT♂, n=25; (b) 为 120♀小鼠存活率随时间变化图 120KO♀, n=15; 120WT♀, n=15; (c) 为 H7N7 感染后, 120KO 和 WT 小鼠存活率随时间变化图, 120KO, n=32, 120WT, n=40; (d) 为 120♂小鼠体重随时间变化图; (e) 为 120♀小鼠存活率随时间变化图; (f) 为 H7N7 感染后, 120KO 和 WT 小鼠体重随时间变化图。

由图 2-6c 可知, 119KO 小鼠存活率明显高于 WT 小鼠。随着感染时间的延长, 119KO 组小鼠存活率最后维持在 40%, 而 WT 小鼠存活率逐渐降低到 20% 以下。因此, 119 野生型小鼠死亡率更高, 并且这一趋势也不存在性别依赖性(图 2-6, a, b)。小鼠体重随时间的变化趋势如图 2-6 (d-f) 与存活率趋势一致, KO 和 WT 小鼠体重都在第 5-8 天达到最低值, 并且无性别依赖性。以上结果表明 PRNP 基因移码突变后, 119 KO 小鼠减重更少, 相对于野生型小鼠具有一定的抗病毒感染的能力, 因此 PrP^c 蛋白缺失表达的小鼠对 H7N7 具有抗病毒感染的能力。

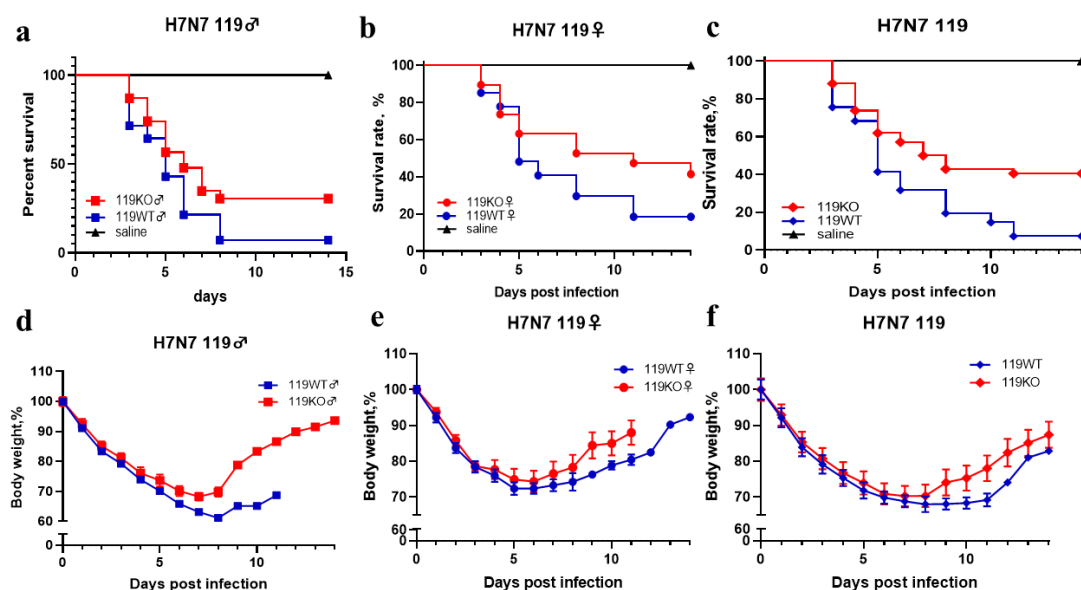


图 2-6. H7N7 感染后 119 KO/WT 小鼠存活率与体重随时间变化图

Figure 2-6. Survival rate and body weight of 119 KO/WT mice post H7N7 infection.

(a) 为 119♂小鼠存活率随时间变化图, 119KO♂, n=23; 120WT♂, n=14; (b) 为 119♀小鼠存活率随时间变化图 119KO♀, n=19; 119WT♀, n=27; (c) 为 H7N7 感染后 119KO 和 WT 小鼠存活率随时间变化图, 119KO, n=42, 119WT, n=41; (d) 为 119♂小鼠体重随时间变化图; (e) 为 119♀小鼠存活率随时间变化图; (f) 为 H7N7 感染后 119KO 和 WT 小鼠体重随时间变化图。

综合以上, H7N7-LPAIV 感染后, PrP^c N 端八肽重复区多肽 (OR 区) 缺失能降低小鼠的存活率及体重的下降程度; 而完整的 PrP^c 缺失则提高了小鼠的存活率及体重的下降程度。因此, 在小鼠感染 H7N7-AIV 的致病过程中, PrP^c 蛋白可能双重调节作用, 即 PrP^c N 端八肽重复区多肽可能具有降低 H7N7-IAV 对小鼠的致病性, 起到保护小鼠免受感染的作用; 而非 OR 区可能具有促进甲型流感病毒感染的作用。

2.3.3 H7N7 感染 PrP^{-/-}小鼠后肺组织病理评价结果

(1) 肺指数和肺匀浆病毒滴度

肺指数 (lung index=lung/body weight×100) 表征肺质量在小鼠体重中的占比。根据肺感染后的肝样实变程度、炎症细胞和渗出液多、全肺重量大的相关性, 及小鼠体重与肺重的关系等因素^[144], 选用肺指数来反映病毒感染对肺部的影响。我们选取攻毒后第 3、5、8、11 天取样, 并称其肺重量, 得到结果如图 2-7。由图 2-7 可知, 病毒感染后 3-11 天, 120KO 小鼠肺指数均高于 WT 小鼠, 说明 120KO 小鼠肺实变程度更大一些, 但不同天数之间, KO 肺指数无显著差别, 说明感染病毒后 3-11 天, 小鼠肺水肿、肺组织病变都比较严重, 并且肺病变的严重状况没有逆转。相反, 119KO 小鼠的肺指数在每个时间点都小于 WT 小鼠, 说明 119KO 小鼠肺实变都小于野生型小鼠。这一结果同存活率和体重变化一致, 表明 120KO 小鼠感染 H7NN7-IAV 后死亡率更高的同时, 并且肺组织病变和肺水肿程度更高, 而 119KO 小鼠则相反。

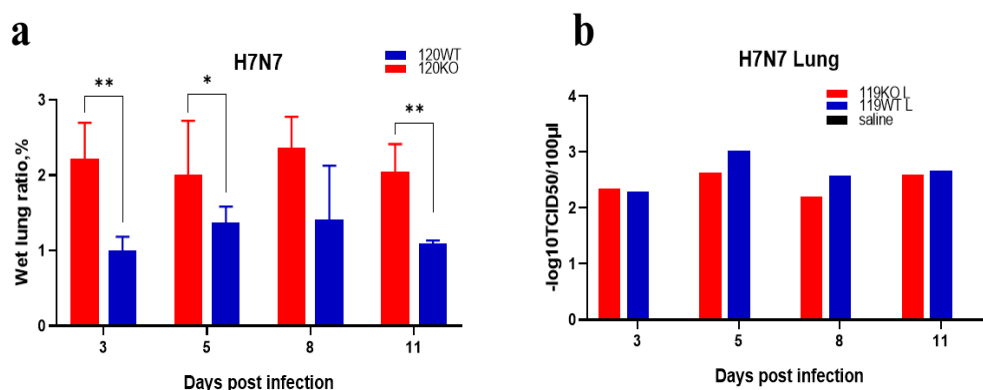


图 2-7. 小鼠感染 H7N7 后不同时间肺指数

Figure 2-7. Lung index of mice post infection.

(a) 为 120KO 与 WT 小鼠在感染 H7N7 后 3、5、8、11 天的湿肺指数 ($\text{g/g} \times 100$)，(b) 为 119KO 与 WT 小鼠在感染 H7N7 后 3、5、8、11 天的湿肺指数 ($\text{g/g} \times 100$)。

肺组织破碎、匀浆后，经过滤除去大颗粒组织块和细胞团，以及双抗 (P/S) 处理排除细菌污染，随后在 96 孔板中培养的 MDCK 细胞上接种肺匀浆，采用 TCID₅₀ 方法检测肺匀浆中的有效病毒含量。结果见图 2-8。由图可知，120KO 和 119KO 肺匀浆病毒滴度同各自 WT 相比，没有显著区别。

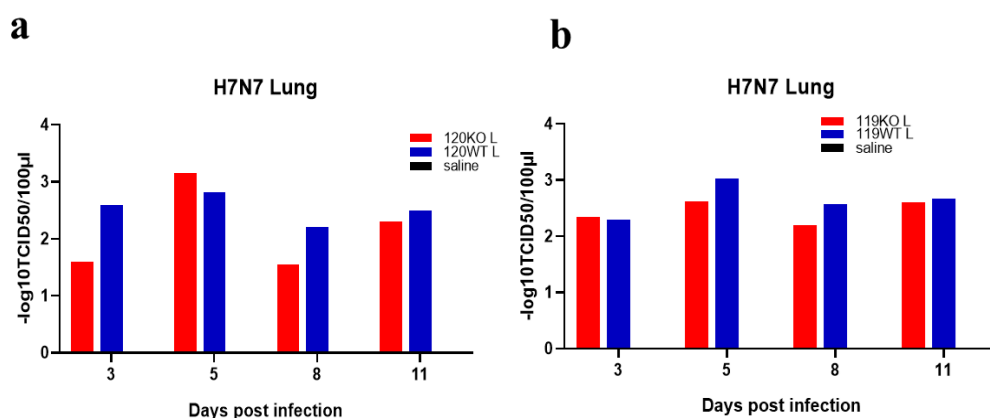
图 2-8. 小鼠感染 H7N7 后不同时间肺匀浆 TCID₅₀

Figure 2-8. Lung titers of mice post infection.

(a) 为 120KO 与 WT 小鼠在感染 H7N7 后 3、5、8、11 天的肺匀浆病毒滴度；(b) 为 119KO 与 WT 小鼠在感染 H7N7 后 3、5、8、11 天的肺匀浆病毒滴度。

(2) H7N7 感染小鼠后肺组织 HE 染色结果

图 2-9 和 2-10 为 HE 染色图谱，用来表征不同基因型小鼠的肺组织病理变化。图 2-9 为 120KO 小鼠和 120WT 小鼠感染 H7N7-AIV 后 3、5、8、11 天的肺组织 HE 染色图谱。感染后 3 天可以看到 120KO 小鼠肺炎性细胞渗出，集合在肺泡腔中；第五天肺部病理稍微加重，有较多中性粒细胞、免疫细胞等浸润和渗出、脱落，伴随非常明显的出血；到第 8 天出血加重，炎性细胞脱落有所减轻；到 11 天依然可见肺泡扩张和出血点，并保留水肿。对比来看，120WT 小鼠在感染 3 天后发现少量免疫细胞渗漏；第 5 天有明显出血和较多炎性细胞

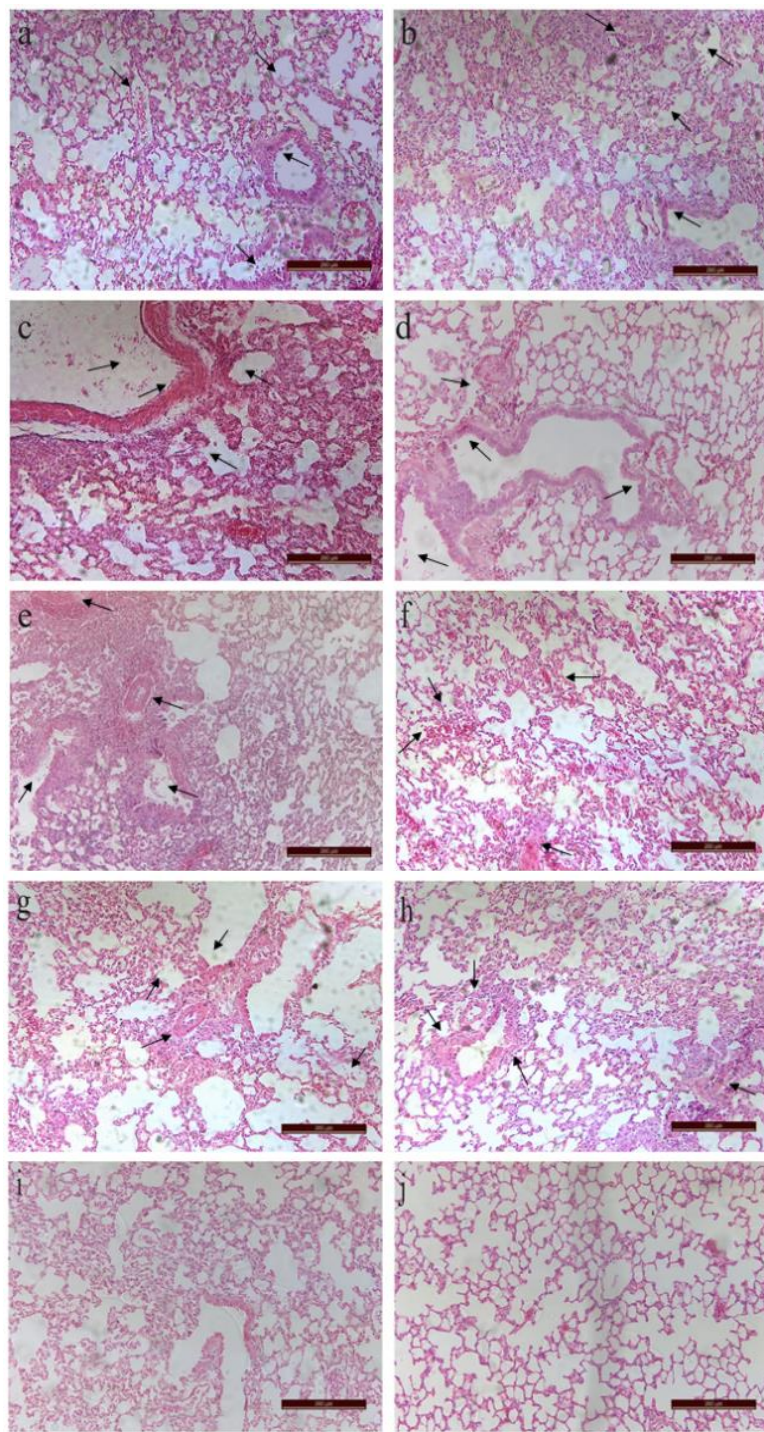


图 2-9. H7N7 感染 120KO 和 120WT 小鼠后肺组织 H&E 染色图谱

Figure 2-9. The histopathology of 120KO and 120 WT mice lung post H7N7 infection shown by HE staining.

图 (a)、(c)、(e)、(g) 表示 H7N7 感染 120KO 小鼠后 3、5、8、11 天肺组织病理切片的 HE 染色图谱, 图 (i) 为 120KO 小鼠的阴性对照 (生理盐水) 组; 图 (b)、(d)、(f)、(h) 表示 H7N7 感染 120WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺组织病理切片的 HE 染色图谱, 图 (j) 为 120WT 小鼠阴性对照 (生理盐水) 组。箭头标注处为出血点、炎性细胞浸润和脱落位点。

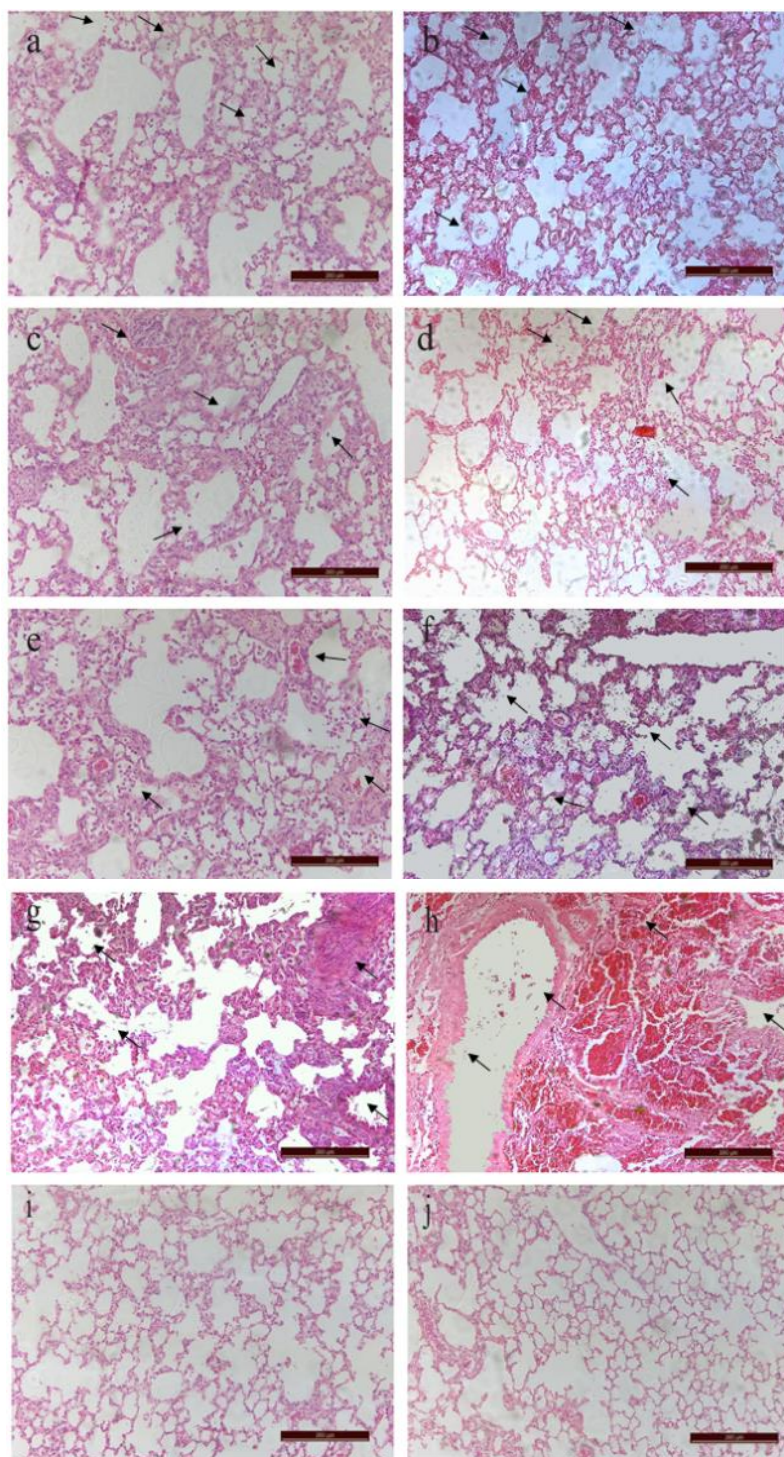


图 2-10. H7N7 感染 119KO 和 119WT 小鼠后肺组织 H&E 染色图谱

Figure 2-10. The histopathology of 119KO and 119 WT mice lung post H7N7 infection shown by HE staining.

图 (a)、(c)、(e)、(g) 表示 H7N7 感染 119KO 小鼠后 3、5、8、11 天肺组织病理切片的 HE 染色图谱, (i) 为 119KO 小鼠的阴性对照 (生理盐水) 组; (b)、(d)、(f)、(h) 表示 H7N7 感染 119WT 后 3、5、8、11 天小鼠后肺组织病理切片的 HE 染色图谱, (j) 为 119WT 小鼠阴性对照 (生理盐水) 组。箭头标注处为出血点、炎性细胞浸润和脱落位点。

渗出及脱落；第 8 天出血点减少，炎性细胞渗出明显；11 天可见出血，细胞渗出减少。横向对比图 2-9 (a) 与 (b)、(c) 与 (d)、(e) 与 (f)、(g) 与 (h)，整体来看，120KO 小鼠的肺部病理比 120WT 小鼠略微严重，说明敲除朊蛋白 OR 区 (120KO) 后可能会诱导小鼠略为严重的肺部病理。

图 2-10 表明 119KO 小鼠和 119WT 小鼠感染 H7N7 病毒不同时间点的肺组织病理变化。由图可知，119KO 和 119WT 小鼠感染病毒 3 天后肺部都发生明显的炎性细胞脱落、浸润，WT 组还伴随明显出血；第 5 天和第 8 天 KO 组出血点稍有增多，WT 组在第 5 天维持不变，第 8 天细胞浸润和渗漏增多，范围变大；感染 11 天，两组切片依然有细胞渗出、脱落和出血。总体上看，在感染 H7N7 不同时间 119WT 小鼠肺的水肿和病理情况比 119KO 小鼠严重。

从图 2-9 和 2-10 我们可以得知，感染 H7N7-AIV 后不同时间点小鼠肺均有不同程度的肺组织炎性细胞浸润、渗出、出血、肺泡扩张和水肿。总体的病理趋势是 120KO 的肺损伤程度高于 120WT 小鼠；而 119KO 小鼠的肺病变弱于 119WT 小鼠。

2.4 讨论

本研究中我们使用近交系小鼠模型来探讨 PrP^c 在 H7N7 病毒诱导免疫应答和炎症中的作用，这可以帮助我们更好的理解病毒与宿主以及宿主因子 PrP^c 之间的复杂相互作用以及对病毒感染结果的影响，更好的了解病毒并制定适当的干预策略，同时增加对 PrP 的生理功能的认识。

本章研究中我们通过比对 PrP^c 不同基因敲除型小鼠对 H7N7 禽流感病毒感染后存活率、体重、肺指数、感染后肺中的病毒滴度及肺部的组织病理学变化，发现这两种基因敲除小鼠对 H7N7 禽流感病毒的感染表现出不同的临床症状及肺损伤程度。其中 OR 区缺失小鼠 (120KO) 对 H7N7-IAV 高度敏感，我们推测朊蛋白 OR 区可能对小鼠抗病毒 H7N7 感染具有保护作用。这与 Chida 等人的研究结果一致，感染 H1N1-LPIAV 后，小鼠表现出严重的体重减轻和比较早的平均死亡时间^[124]。而 Prnp 基因移码突变后，PrP^c 蛋白完全缺失表达的小鼠相对于 WT

小鼠则对 H7N7 具有抗病毒感染的能力。我们推测以下两种情况可能导致了这样的实验结果：

(1) H7N7-IAV 感染肺组织，引发炎症反应，大量的免疫细胞和渗出液在肺部积累，影响肺的正常功能。病毒感染期间细胞和组织发生炎性细胞浸润、炎性物质渗出以及血管内皮细胞脱落、肺泡壁增厚等细胞和组织损伤会进一步加重肺功能失调，危害小鼠机体健康，导致小鼠发病甚至死亡。其中，病毒感染诱导小鼠肺组织和细胞的过度炎症部分归因于促炎性细胞因子的应答升高（细胞因子风暴）^[145]，例如，人们广泛认为细胞因子风暴是 HPAIV-H5N1 的严重病理并最终导致死亡的主要原因^[146]。细胞因子的多种功能可能使它们影响宿主的存活，促进淋巴细胞活化和肺组织的浸润，并发挥直接的抗病毒作用；但是，失调的细胞因子的分泌和活化则可能变的过度 and 有害^[147]。PrP^c 蛋白在病毒感染诱导机体的炎症与免疫反应中扮演重要角色，它可能在炎症反应信号通路的上游发挥作用，诱导下游细胞因子和炎性介质的级联反应^[308]，当 PrP^c 缺失后，减弱了小鼠对 H7N7 感染后的过度炎症应答，因此体重损失和死亡率会低于正常小鼠。

(2) 在朊蛋白功能区中，存在一段结构域在 IAV 感染中发挥与 OR 区相反的调节作用，能够增强病毒的感染，促进小鼠的致病性和肺损伤，加重肺部炎症反应和肺部组织病理学变化。由此，PrP^c 蛋白在小鼠感染 H7N7-AIV 的过程中，可能发挥多重的调节作用，并且 PrP^c 蛋白的不同功能域有不同的作用，有待于今后进一步的研究。

两组基因敲除 KO 组与野生型 WT 组小鼠相比，肺指数变化趋势与小鼠存活率和体重变化趋势一致，但感染后 3-11 天，两种基因敲除小鼠 KO 组的肺指数之间均无显著差别，说明 H7N7 病毒感染对小鼠肺部的损伤比较严重，但被感染小鼠 120KO/WT 和 119KO/WT 肺组织匀浆的病毒效价都比较低，并且两种 KO 组和 WT 组均没有显著差异。但是 H7N7 病毒感染小鼠的致病性相对较高，我们推测，肺匀浆中的病毒滴度普遍较低可能同 MDCK 细胞对肺匀浆液中病毒的敏感度有关，也可能是 H7N7 病毒的特征导致了这一实验结果。HPAIV-H7N71 意大利株在小鼠感染过程中表现出高毒力表型，但是受感染小鼠肺中的复制并不高

效^[148]。类似的,在肺内皮细胞中,H7N9病毒也能够有效的引发感染,但没有检测到释放的传染性病毒颗粒^[146]。H5N1感染小鼠也有类似的报道,与肺中严重且广泛的组织病理学变化相反,在肺中仅发现少量散布的上皮细胞带有病毒^[149]。由于这种对比是出乎意料的,因此认为病毒对呼吸道上皮细胞的直接损伤不太可能引起如此严重的病理变化,细胞因子和趋化因子的过度诱导可能参与了H5N1流感的发病机制^[149]。Junji Chidada的研究也发现IAV/PR8感染同品系小鼠后Prnp^{-/-}肺的病毒载量也仅略高于肺,他们推测PrP^c可能通过caspase3在肺上皮细胞中的抗凋亡活性而不是直接影响病毒复制效率来发挥保护作用^[123,128]。Sakaguchi在2020年的一篇综述文章中提出PrP^c可能通过其在肺上皮细胞中的抗凋亡活性而不是直接影响肺中的病毒复制效率来发挥其对IAV感染的保护作用^[123,128]。组织病理学研究表明感染600 PFU的神经嗜性病毒EMCV-B的野生型小鼠比Prnp基因缺失小鼠表现出更严重的炎性细胞浸润,并伴有海马周围小胶质细胞更高的活化,但两种小鼠的脑病毒滴度之间没有差异^[44]。说明在PrP^c表达水平不同的小鼠体内,针对IAV病毒感染,PrP^c并没有通过影响病毒在感染组织中的滴度来发挥调节作用。也可能类似于HSV-1^[112]感染,肺组织中存在潜伏感染,此时病毒没有发生有效复制,可能在肺匀浆多次在小鼠体内传代后,会增强致病性或病毒效价。

2.5 小结

本章利用CRISPR/Cas9基因敲除技术构建Prnp两种缺失类型的小鼠(部分缺失型120KO和完全缺失型119KO),随后建立H7N7-AIV感染小鼠诱导肺损伤和炎症反应的动物模型,从小鼠生存曲线、体重变化曲线、感染后不同时间的肺指数、肺匀浆病毒效价以及肺组织病理变化等参数研究PrP^c蛋白在甲型流感病毒诱导的肺损伤和炎症中是否发挥作用以及发挥怎样的调节作用。初步得到实验结果如下:

(1) 敲除朊蛋白N端OR区后,小鼠更易于感染H7N7病毒,体重损失和死亡率更高,致病性更严重。我们推测PrP^cOR区对小鼠抗病毒H7N7感染具有

保护作用。

(2) PrP^c 蛋白完全缺失后小鼠临床参数相较于 WT 小鼠好, 伴随着更少的体重损失, 更高的存活率、肺指数低以及肺部病理损伤较小。说明完全缺失朊蛋白后的小鼠具有抗病毒感染的能力, 与 OR 区缺失结果相反。推测 PrP^c 可能具有影响小鼠对 IAV 的免疫应答和炎症反应的作用, 即非 OR 区具有显著的促炎症作用, 导致小鼠对 IAV 感染产生更高的致病性。这表明朊蛋白在病毒感染的过程中具有双重的调节作用或 PrP^c 不同功能域具有不同的炎症和免疫调节作用。

(3) 感染病毒后, 小鼠机体损伤与肺损伤程度可能与 H7N7-AIV 病毒对小鼠的致病性密切相关, PrP^c 可能不直接影响病毒复制效率来发挥其对 IAV 感染的调节作用。

第三章 H7N7 感染小鼠肺的 RNA-seq 及差异基因表达谱分析及验证

3.1 前言

转录组可用于对任何细菌、病毒或病原体及其他疾病进行基因组分析。基于 NGS 的 RNA-seq 基因表达技术, 从高水平的转录组数据中识别出与特定性状相关的 DEGs 或转录本^[150], 已经成为研究病毒与宿主之间相互作用的重要工具。通过在不同条件下对同一宿主的 mRNA 的差异分析来获得宿主在不同条件下差异变化的基因, 从而可以在被感染的宿主 mRNA 水平上鉴定不同条件下的 DEGs, 阐明宿主与病毒之间的相互作用关系^[151]。病毒在感染宿主过程中, 与宿主互作的本质和复杂性等大部分都可以通过宿主基因转录变化谱来解析, 可以筛选到与病毒复制等过程相关的关键候选基因^[152]。

上一章体内实验的研究结果表明, PrP^c参与并调节H7N7-IAV诱导的小鼠机体损伤与肺病理变化, 并且PrP^c蛋白的NH2端OR区在H7N7-IAV感染小鼠诱导高度致病性的过程中发挥保护作用, 能够减轻病毒造成的小鼠体重的损失程度并降低死亡率, 减弱肺部水肿、炎症细胞浸润和凋亡等肺部病变情况; 而完全敲除朊蛋白则导致相反的结果。因此, PrP^c在IAV感染小鼠并致病的过程中, 可能不同结构域发挥不同的功能, 并且与病毒和宿主免疫和炎症应答具有直接的关系。为了进一步理解这两种不同基因敲除小鼠对H7N7流感病毒致病性的不同, 我们希望借助转录组测序和基因表达分析及q-PCR验证来进一步对这一实验结果进行解读, 即研究炎症和免疫相关信号通路受到的调节以及这些调节作用随感染时间的变化, 探究Prnp在复杂的差异表达基因作用网络中的作用将有助于我们理解病毒感染宿主致病性和对炎症的影响范围, 增加我们对IAV致病机制的理解, 也能够为我们探究PrP^c在病毒感染中的作用和机制提供一定的数据支撑。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 实验材料

实验用毒株 H7N7 和实验动物信息同 2.2.1。

测序前准备，各个基因型的小鼠 120KO 和 120WT 小鼠和 119KO、119WT 小鼠，分别鼻腔滴注病毒和等体积的生理盐水作为对照，感染后 3、5、8、11 天，每种类型中取 4 只小鼠收集肺，总共 80 只小鼠。新鲜的肺组织获取后迅速放入液氮中，待测序前提取 RNA 并测量浓度（单个样品 RNA 总量不少于 5 μ g，微量分光光度计 Thermo NanoDrop 2000）、构建 cDNA 文库等。测序样品信息见表 3-1，并且经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，RNA 总量和浓度都满足测序和建库要求。

表 3-1. RNA-seq 样本信息

Table 3-1. Samples information for RNA-seq.

样本名称/肺组织	浓度(ng/ μ L)	纯度(OD260/280)/(OD260/230)
H7d11_119KO	267.8	1.99/1.79
H7d11_119WT	159.9	2.01/1.53
H7d11_120KO	356.1	2.08/1.62
H7d11_120WT	175.0	1.94/1.01
H7d3_119KO	130.4	2.01/1.49
H7d3_119WT	148.5	2.01/1.49
H7d3_120KO	131.2	2.00/1.37
H7d3_120WT	145.0	2.02/1.40
H7d5_119KO	171.9	2.01/1.58
H7d5_119WT	225.7	2.03/1.63
H7d5_120KO	160.9	2.03/1.36
H7d5_120WT	287.4	2.06/1.72
H7d8_119KO	161.5	1.98/1.83
H7d8_119WT	244.1	2.05/1.49
H7d8_120KO	284.6	2.06/1.67
H7d8_120WT	301.7	2.04/1.75
Saline_119KO	135.8	1.95/1.36
Saline_119WT	109.5	1.90/1.58
Saline_120KO	159.3	2.00/1.52
Saline_120WT	131.3	2.00/1.55

3.2.2 技术路线与分析方法

小鼠肺 mRNA 测序交由元莘生物。以下简要介绍技术路线与分析方法。

(1) 操作流程如下简图 3-1。

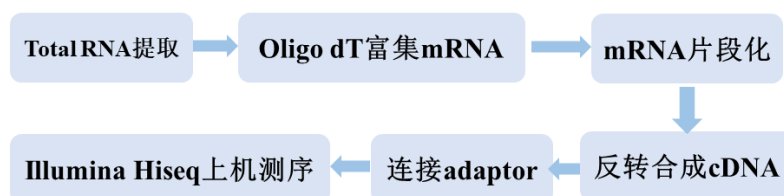


图 3-1. 测序实验流程图

Figure3-1. Flow diagram of mRNA-sequencing.

(2) 数据处理与分析

对测序得到的数据进行处理，包括测序数据质量评估^[153]；测序数据质量剪切；参考序列比对分析（Genome Reference Consortium,GRC)^[154]；测序文库质量评估；样品间的相关性分析；样本表达量主成分分析（Principal component analysis, PCA）；差异基因可视化分析（Differentially expressed genes, DEGs）。随后根据我们的研究目的，对差异基因进行聚类、富集和预测分析，本章研究内容我们关注感染病毒后的小鼠肺在不同时间，120KO 与 120WT 组、119KO 与 119WT 组以及感染后同一时间点 120KO 与 119KO 小鼠的差异基因表达以及这些差异表达基因聚类的生物学功能和信号通路。

3.2.3 差异表达基因的 q-PCR 验证

(1) 采用 Trizol 法提取小鼠肺组织 RNA。具体步骤如下：

① 新鲜小鼠肺组织,按照 0.1g 组织加入 1mL Trizol 的比例(组织量多的话,可以多几个破碎管最后混合在一起),置于 RNase-free 的破碎管中,每管加入 25 颗陶瓷珠(大珠子 10 颗,小珠子 15 颗),置于匀浆器上破碎,5500r, 20s,随后置于冰上降温 1min;重复 5-6 次,直至组织完全破碎,无可见大颗粒状组织。

② 4℃, 12000rpm 离心 5min。

③ 弃顶层脂肪物质和底层沉淀，每加入 200 μ L 氯仿，手动颠倒混匀，手动振荡 15s，静置 2-10min。本步骤氯仿能够使有机相中的蛋白质和无机相中的 RNA 迅速分离，RNA 进入水相。

④ 4℃，1,2000rpm 离心 15min。

⑤ 取上清至新的 RNase-freeEP 管中，注意不要吸取到中间层；每管内加入 500 μ L 异丙醇，轻轻上下颠倒混匀，室温静置 10min，沉淀 RNA。

⑥ 4℃，1,2000rpm 离心 10min。

⑦ 弃上清，每管加 1mL 预冷的 75%乙醇，轻轻洗涤沉淀，温和振荡，悬浮沉淀。

⑧ 4℃，8000rpm 离心 5min，弃上清。

⑨ 充分晾干 EP 管，每管加 35 μ L RNase-free H₂O 溶解，4℃暂存待用。

⑩ 微量分光光度计 ND5000(北京百泰克)测量 RNA 浓度和纯度 A260/280。

(2) 逆转录

采用逆转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 6210A(TaKaRa)，以小鼠肺 RNA 为模板进行逆转录合成 cDNA。反应体系如下表 3-2。

表 3-2. 组织 RNA 逆转录体系与程序

Table 3-2. Reverse transcription system and procedure of tissue RNA.

试剂	体积/ μ L	终浓度	反应程序 (30cycles)
RNA	5-8	100ng	65°C 5min On ice
dNTP Mixture	1	10mM	
Oligo dT Primer	1	10 μ M	
PrimeScript II buffer	4		30°C 10min 45°C 50min 95°C 5min 4°C ∞
RNase Inhibitor	0.5	40U/ μ l	
PrimeScript II RTase	1	200U/ μ l	
RNase H ₂ O	4.5		

(3) 采用实时荧光定量 q-PCR 方法验证差异表达基因 (DEGs) mRNA 表达水平的变化。根据 QuantiNova SYBR Green PCR Kit 试剂盒 (QIAGEN) 说明建立以下反应体系如下表 3-3。

表 3-3. q-PCR 体系与程序

Table 3-3. q-PCR system and procedure.

试剂	体积/ μL	终浓度	反 应 体 系 (30cycles)	
cDNA	1-2	100ng	40 $\times$	95 $^{\circ}\text{C}$ 30s
2 $\times$ SYBR Green master Mix	10	10mM		95 $^{\circ}\text{C}$ 5s
Rox Dye	2.0			60 $^{\circ}\text{C}$ 27s
Primer-F	1.4			65 $^{\circ}\text{C}$ 5min
Primer-R	1.4			95 $^{\circ}\text{C}$ 15s
RNase H ₂ O	补至 20			60 $^{\circ}\text{C}$ 20s
				95 $^{\circ}\text{C}$ 15s
				60 $^{\circ}\text{C}$ 15s

对实验结果用 Sequence Detector System software(Life Technologies)软件进行分析, 再利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 统计方法, Excel, Sigmaplot, Adobe Illustrator 等软件进行数据分析来比较各基因 mRNA 在 H7N7 感染后 3、5、8、11 天相对于对照组(生理盐水)的相对表达量变化。q-PCR 检测 DEGs 的引物序列见表 3-4。

表 3-4. q-PCR 引物序列

Table 3-4. Primers sequences for q-PCR.

目的基因	引物序列 (5'-3')	扩增长度 (bp)
β -actin	F: AACCTAAGGCCAACCGTGAAAAG	241
	R: TCATGAGGTAGTCTGTCAG	
Prnp	F: TCCACTTCGGCAATGACTGG	311
	R: GAAGTTTTCGCCCTTGGTGG	
TLR3	F: GCTCATTCTCCCTTGCTCAC	165
	R: CCCGAAAACATCCTTCTCAA	
TLR4	F: TCAGAGCCGTTGGTGTATCTT	115
	R: CCTCAGCAGGGACTTCTCAA	
TLR7	F: GGGTCCAAAGCCAATGTG	192
	R: TGTTAGATTCTCCTTCGTGATG	
MyD88	F: CGATTATCTACAGAGCAAGGAATG	144
	R: ATAGTGATGAACCGCAGGATAC	
TRAF6	F: AGGAATCACTTGGCACGACACTTG	194
	R: TGGTCCTGTCTTACTAGGCGACTC	

TAK1	F: ATTCCACAGATACCAATGGCTC R: TGTAGTAACAATGCGATTTCGG	233
IRF3	F: CTACACCCCGGGGAAGGATA R: GAGAGGCACCCAGATGTACG	182
IRF7	F: CCTCTGCTTTCTAGTGATGCCG R: CGTAAACACGGTCTTGCTCCTG	124
Nrf2	F: GCTCCTATGCGTGAATCCCAATG R: GGGCGGCGACTTTATTCTTACCT	292
MAVS	F: GAATCCAGGTAGACGAAAGCC R: GCCTACTACGGTACAGCATCAC	180
NLRP3	F: AGCCTTCCAGGATCCTCTTC R: CTTGGGCAGCAGTTTCTTTC	152
Wnt3a	F: AGGACAAGTATGACAGTGCC R: AACACAGTGGCATTCTCCC	296
SOCS1	F: CACTCACTTCCGCACCTTCC R: CAGCCGGTCAGATCTGGAAG	488
SOCS3	F: CTCAAGACCTTCAGCTCCAA R: TTCTCATAGGAGTCCAGGTG	554
TREM2	F: ACCCACCTCCATTCTTCTCC R: GGGTCCAGTGAGGATCTGAA	82
TREML2	F: CACCTGTGGTGTGTCGTA R: CCTTCTGAACCCACTGGAAA	233
NF- κ B p65	F: ATTCTGACCTTGCCTATCTAC R: TCCAGTCTCCGAGTGAAG	181
IL-1 α	F: ATGTATGCCTACTCGTCGGG R: TGAGTTTTGGTGTTTCTGGC	139
IL-1 β	F: TCCTTGTGCAAGTGTCTGAAGC R: ATGAGTGATACTGCCTGCCTGA	226
IL-6	F: GACTGATGCTGGTGACAACC R: AGACAGGTCTGTTGGGAGTG	260
IL-33	F: GGTGTGGATGGGAAGAAGCTG R: GAGGACTTTTTGTGAAGGACG	155

IFN α	F: ATGGCTAGGCTCTGTGCTTT R: CTCTTGTTCCCTGAGGTTAT	107
IFN β	F: TGGGTGGAATGAGACTATTGTTG R: CTCCCACGTCAATCTTTCCTC	109
IFN γ	F: GCAAGCTTATGAACGCTACACACTGCAT R: CTGGATCCTCAGCAGCGACTCCTTTTCC	133
TGF β	F: GACTCTCCACCTGCAAGACC R: GACTGGCGAGCCTTAGTTTG	168
TNF α	F: CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	175
CSF3	F: ATGGCTCAACTTTCTGCCCAG R: CTGACAGTGACCAGGGGAAC	147
CXCL2	F: CAGAAGTCATAGCCACTCTCAAG R: CTTTCCAGGTCAGTTAGCCTT	187
CXCL3	F: CTGTCAGTGCCTGAACACCC R: TTGACCATCCTTGAGAGTGGC	121
CXCL10	F: ATTTTCTGCCTCATCCTGCT R: TGATTTC AAGCTTCCCTATGGC	264
CXCL11	F: CTGCTCAAGGCTTCCTTATGTT R: CCTTTGTCGTTTATGAGCCTTC	167
CXCR3	F: AACAGCACCTCTCCCTACGA R: AAGGCCCTGCATAGAAGTT	353
CXCR4	F: TAGGATCTTCCTGCCCACCAT R: TGACCAGGATCACCAATCCA	77
CXCR6	F: GAGTCAGCTCTGTACGATGGG R: TCCTTGAACCTT TAGGAAGCGTTT	101
CCL2	F: TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA R: GCATTAGCTTCAGATTACGGGT	121
CCL3	F: GCCCTTGCTGTTCTTCTCTGT R: GGCATT CAGTTCCAGGTCAGT	258
CCL11	F: CAGATGCACCCTGAAAGCCATA R: TGCTTTGTGGCATCCTGGAC	96

CCR2	F: ATCCACGGCATACTATCAACATC R: TCGTAGTCATACGGTGTGGTG	89
CCR3	F: CCCGTACAACCTGGTTCTCC R: AAAGAGCCGAAGGTGTTTCC	187
CX3CR1	F: CCTGTTATTTGGGCGACATT R: ACGCCCAGACTAATGGTGAC	400

3.3 实验结果

3.3.1 肺转录组常规分析结果

(1) 原始数据统计结构表见附录 1 和读长 (reads) 与参考基因组比对结果统计表见附录 2。表明测序质量较高, 数据可靠, 可用于后续转录组数据分析。

(2) 基因表达量分布图见附录 3。说明所有样品的基因表达分布相对一致。

(3) 样本相关系数聚类图见图 3-2。如图所示, 同一个时间点的样品, 生物学重复之间的组内相关性强, 而相邻样本之间相关性弱, 说明每个时间点的样本之间测序数据相对一致, 而不同样本之间的数据可明显区分, 表明样本之间没有交叉污染。从图中看, 感染后不同时间点 3-11 天样本相关性较强, 生理盐水组 (saline) 相关性较强, 因此说明, 本实验的对照组和实验组设计合理, 数据可信。

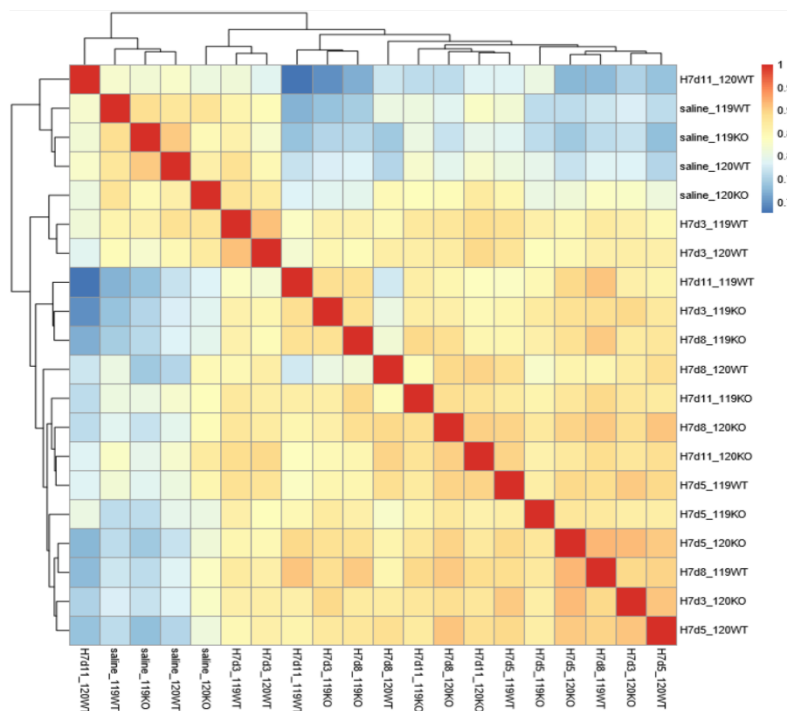


图 3-2. 样本相关系数聚类图

Figure 3-2. Correlation coefficient clustering of samples.

图中颜色与相关性系数 r^2 (r, Pearson's correlation coefficient) 有关, 红色表示高数值, 蓝色表示低数值, 颜色从红到蓝, 数值越高表示相关性越高。

(4) 样本主成分分析结果见附录 4。

3.3.2 肺转录组差异表达基因分析结果

(1) 差异基因统计分析。根据分组, 将差异表达基因两两比较后统计各组的差异基因数目以及上调和下调表达的基因数目, 见表 3-5。

表 3-5. H7N7 感染后差异基因统计表

Table 3-5. Statistics of DEGs at day3, 5, 8, 11 post H7N7 infection.

groupA vs group B	total genes	total DEGs	up	dowm
control 119KO vs d3 119KO	15194	1332	842	489
control 119KO vs d5 119KO	15801	1214	653	560
control 119KO vs d8 119KO	15536	1276	561	714
control 119KO vs d11 119KO	15782	1837	950	886
control 119WT vs d3 119WT	16230	2379	1181	1197
control 119WT vs d5 119WT	16165	1446	824	621
control 119WT vs d8 119WT	15754	1097	662	434
control 119WT vs d11 119WT	15409	1221	739	481
119KO d3 vs d3 119WT	15635	2967	1056	1910
119KO d5 vs d5 119WT	16397	829	380	448
119KO d8 vs d8 119WT	16019	817	388	428
119KO d11 vs d11 119WT	15743	2630	1902	727
control 120KO vs d3 120KO	16114	2409	1274	1134
control 120KO vs d5 120KO	16044	1997	1075	921
control 120KO vs d8 120KO	16219	2725	1265	1459
control 120KO vs d11 120KO	16234	2031	1074	956
control 120WT vs d3 120WT	16103	2396	1374	1021
control 120WT vs d5 120WT	15857	1202	597	604
control 120WT vs d8 120WT	16070	1095	464	630
control 120WT vs d11 120WT	16540	1758	463	1294

120KO d3 vs d3 120WT	16157	2116	1033	1082
120KO d5 vs d5 120WT	16283	811	280	530
120KO d8 vs d8 120WT	16496	1056	432	623
120KO d11 vs d11 120WT	16338	2206	818	1387

由表 3-2 可知, 每组总的基因数目没有显著差异, 保持在 15,400-16,500 个基因之间, 但是差异表达基因 (DEGs) 数量有较大区别, 并且上调和下调基因数量也随着变化。这些差异基因的变化反应了感染后不同时间点基因数量的不同, 可能和感染后不同时间免疫和炎症反应的变化相关。与各自的对照组相比, 感染后 3、5、8、11 天 DEGs 中上调、下调基因数量的不同我们整理在下图 3-3 中。从图 3-3(a-c)可见, 感染病毒后 119KO 小鼠和 120KO 小鼠与各自生理盐水组相比, 上调、下调基因数目不同, 并且变化趋势也不同。119KO 的 DEGs 明显少于 WT, 120KO 则相反, DEGs 分子水平的变化趋势同小鼠体重等变化趋势一致。

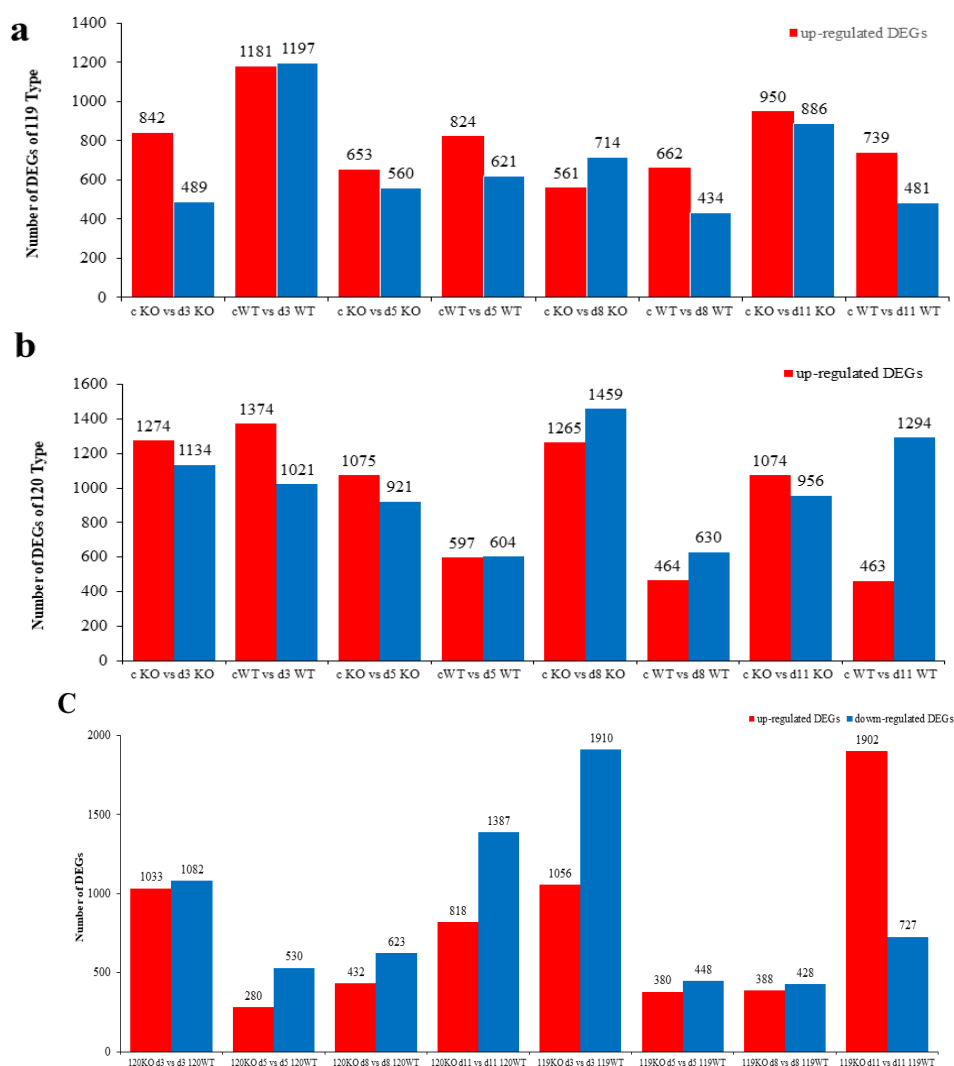


图 3-3. 感染 H7N7 3、5、8、11 天后差异表达基因 (DEGs) 统计图

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Figure 3-3. Summary of DEGs at day3, 5, 8, 11 post H7N7 infection.

(a) 为感染 H7N7 3、5、8、11 天后小鼠肺转录组的 DEGs, 119KO 与 control 119KO 相比, 119WT 与 control 119WT 相比不同时间点的上下调基因数目; (b) 为感染 H7N7 3、5、8、11 天后小鼠肺转录组的 DEGs, 120KO 与 control 120KO 相比, 120WT 与 control 120WT 相比不同时间点的上下调基因数目。(c) 为 120KO 与 120WT 相比, 119KO 与 119WT 相比, 感染 H7N7 3、5、8、11 天后小鼠肺转录组的 DEGs 的上下调基因数目。

利用差异基因 Venn 图^[155], 能够更为直观的展示不同组差异基因的共同之处, 根据图 3-4 (a-c), control 119KO vs d3/d5/d8/d11 119KO 不同时间点的 DEGs 中有 568 个共同的差异基因, 119WT 组的则有 635 个差异基因, 这两组 Venn 图中的差异基因中又有 319 个 (图中未展示)。而图 3-4 (d-f), control 120KO vs d3/d5/d8/d11 120KO 不同时间点的 DEGs 中有 698 个共同的差异基因, 120WT 组则有 292 个差异基因。

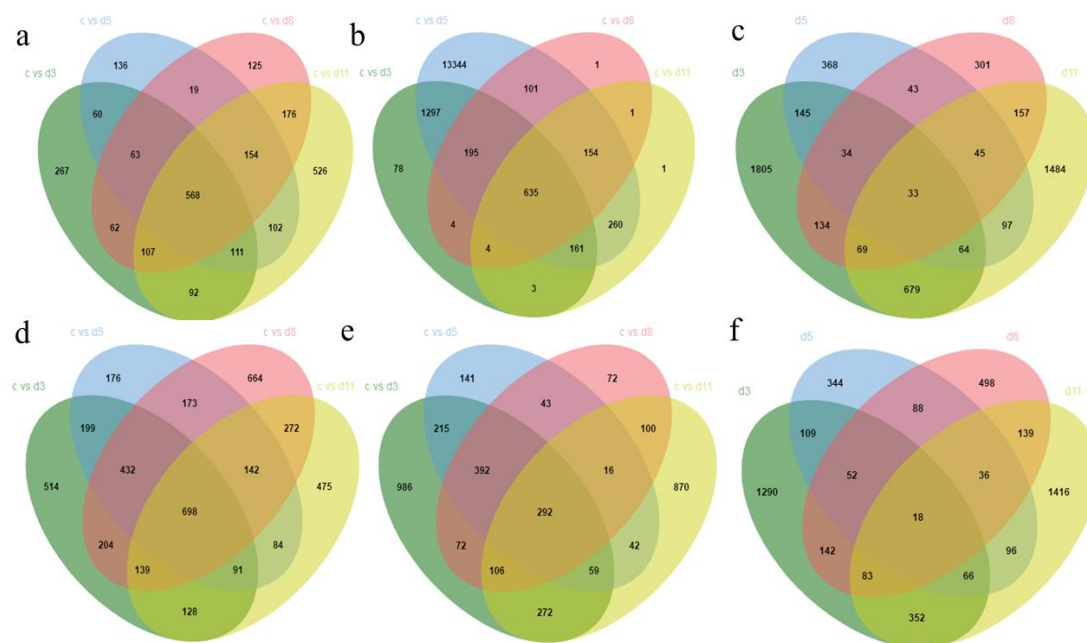


图 3-4. 差异表达基因 Venn 图

Figure 3-4. DEGs Venn diagram.

图 (a) 为 control 119KO vs d3 119KO、control 119KO vs d5 119KO、control 119KO vs d8 119KO、control 119KO vs d11 119KO 的差异基因 Venn 图, control 119KO 为生理盐水组, d3/d5/d8/d11 119KO 分别为感染病毒 3、5、8、11 天后的样本。

图 (b) 为 control 119WT vs d3 119WT、control 119WT vs d5 119WT、control 119WT vs d8 119WT、control 119WT vs d11 119WT 的差异基因 Venn 图, control 119WT 为生理盐水组, d3/d5/d8/d11 119WT 分别为感染病毒 3、5、8、11 天后的样本。(c) 为 d3 119KO vs d3 119WT、d5 119KO vs d5 119WT、d8 119KO vs d8 119WT、d11 119KO vs d11 119WT 的差异基因 Venn 图, 为 119KO 攻毒组与 119WT 攻毒组在感染病毒 3、5、8、11 天后的 DEGs Venn 图。

图 (d) 为 control 120KO vs d3 120KO、control 120KO vs d5 120KO、control 120KO vs d8 120KO、control 120KO vs d11 120KO 的差异基因 Venn 图, control 120KO 为生理盐水组, d3/d5/d8/d11 120KO 分别为感染病毒 3、5、8、11 天后的样本。(e) 为 control 120WT vs d3 120WT、control 120WT vs d5 120WT、control 120WT vs d8 120WT、control 120WT vs d11 120WT 的差异基因 Venn 图, control 120WT 为生理盐水组, d3/d5/d8/d11 120WT 分别为感染病毒 3、5、8、11 天后的样本。(f) 为 d3 120KO vs d3 120WT、d5 120KO vs d5 120WT、d8 120KO vs d8 120WT、d11 120KO vs d11 120WT 的差异基因 Venn 图, 为 120KO 攻毒组与 120WT 攻毒组在感染病毒 3、5、8、11 天后的 DEGs Venn 图。Venn 图由 jvenn 绘制。

取这两组 Venn 图中与炎症及免疫相关的 DEGs (共 109 个) 做热图 (如图 3-5) 观察差异表达基因在病毒感染后不同时间表达量的变化模式。从图中可以看到, 与免疫和炎症相关的有 Toll 样受体基因 (TLR1/3/4/6/7/8/9/13)、干扰素调节基因 (IRF1/3/4/7)、核转录因子 (NF- κ B1/2)、髓样分化因子 (MyD88)、白介素家族 (IL1 α / β /6/11/33/10 α /10 β /17 等) 基因、肿瘤坏死因子 (TNF/TNFAIP2/TNFAIP6/TNFAIP813/TNFSF18)、趋化因子 (CCL1/2/3/11/12/17/20/21 α /22 和 CXCL2/3/10/11/12/13/14/16 等)、趋化因子受体 (CXCR2/3/4/6、CCR1/2/5/7/8/9 等)、线粒体抗病毒信号蛋白 (MAVs)、核因子 E2 相关因子 (Nrf2)、髓样细胞触发受体 2 (Trem2)、髓细胞触发受体样蛋白 2 (Trem12)、Wnt2 β /3 α /4/5 β /7 α /7 β /Wnt7 α /7 β /10 α /10 β /11、细胞信号抑制因子 SOCS1 和 SOCS3、干扰素 γ 受体 2 (IFN γ r2)、干扰素 γ (IFN γ)、干扰素刺激应答基因 (ISG15 和 ISG 20)、转化生长因子受体 (TGF β r2、TGF β r3 和 TGF β r31)、转化生长因子 1 (TGF β 1)、转化生长因子受体相关蛋白 1 (TGF β rap1)、集落刺激因子 2 受体 β (CSF2r β 1 和 CSF2r β 2)、集落刺激因子 1 受体 (CSF 1r)、集落刺激因子 1 (CSF1)、和 Prnp 等。病毒感染后, KO 组与 WT 组小鼠肺中这些差异表达基因的表达量变化有待于后续的实验验证。

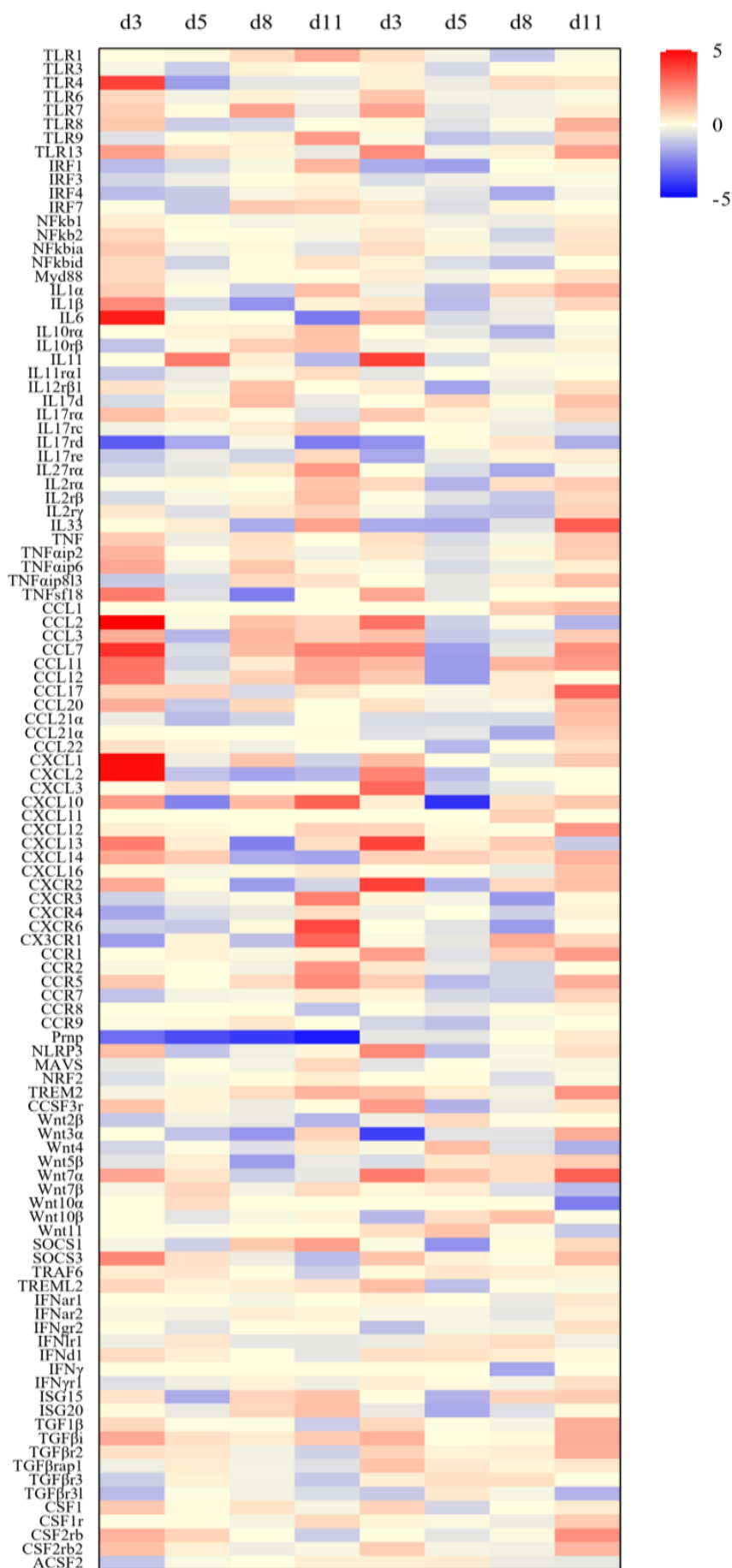


图 3-5. 炎症与免疫相关差异表达基因热图。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Figure 3-5. Heatmap of DEGs related to inflammation and Immunity.

图中每列为一个样本，每行表示一个基因，共 109 个差异表达基因。图中红色表示基因在该组样本中表达量的相对多少 ($\log_2FC(KO/WT)$)，红色表示该基因在样本中 KO 相对于 WT 表达量上调，颜色越深上调越显著，蓝色表示表达量下调。左边 4 列从左到右为 d3 119KO vs d3 119WT、d5 119KO vs d5 119WT、d8 119KO vs d8 119WT、d11 119KO vs d11 119WT，右边 4 列为 d3 120KO vs d3 120WT、d5 120KO vs d5 120WT、d8 120KO vs d8 120WT、d11 120KO vs d11 120WT。

(2) DEGs 基因 GO 功能注释和 GO 功能富集分析

将差异基因表达模式相同或者相近的基因聚集成类，得到差异表达基因 (DEGs) 模式聚类图，进一步识别具有相似功能或参与同一代谢、信号通路的基因。用 GO(Gene Ontology) 用 GO(Gene Ontology) 来注释差异表达基因和基因产物^[156]。对两两分组的差异表达基因的注释进行统计，以一个样本为对照，绘

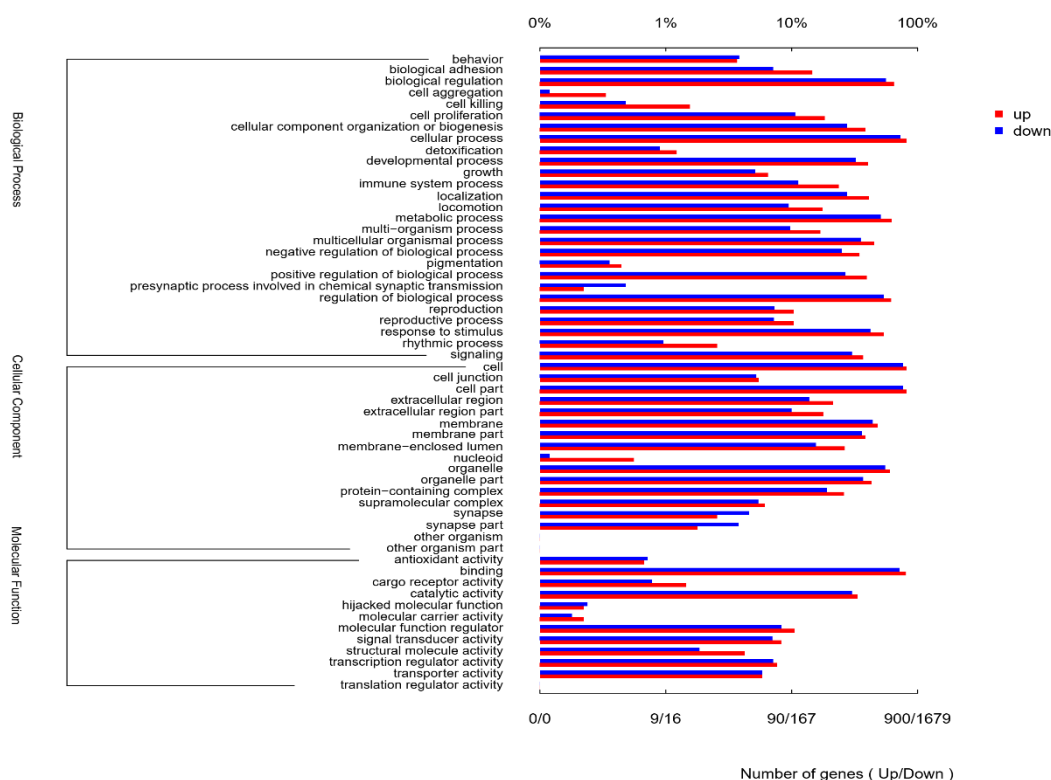


图 3-6. 上下调基因 GO 功能注释柱形图

Figure 3-6. GO annotations of Differentially expressed genes.

图为 d3 119KOvs d3 119WT 的 DEGs GO 注释图，横坐标为注释到某 GO term 的基因个数，上方横坐标表示注释到该 GO term 的基因数占 GO 注释基因总数的比例（基因和 GOterm 是多对多的关系）；纵坐标表示 GO 的详细分类，代表 GO 的三个二级分类，分别为生物过程 (Biological Process)、细胞组分 (Cellular Component)、分子功能 (Molecular Function)；红色柱形代表上调基因，蓝色柱形代表下调基因。

制上调、下调基因的 GO 注释柱形图^[157]。例如图 3-6 为 d3 119KOvs d3 119WT 的差异基因 GO 注释图，其他两两分组的 DEGs 的 GO 注释图见附录 5。

差异基因 GO 功能富集分析研究 DEGs 在 Gene Ontology 中的分布状况以阐明实验中样本差异在基因功能上的体现。通过将全部基因作为背景列表，差异基因列表作为从背景列表中筛选出来的候选列表，采用 Fisher 精确检验，使用 Bonferroni、Holm Sidak 和 false discovery rate 4 种多重检验方法对 p 值进行校正来控制计算的假阳性率。通常当 p 值 (fdr) ≤ 0.05 时，认为此 GO 功能存在显著富集情况。得到 DEGs 功能富集分析柱状图如图 3-7 (d3 119KO vs d3119WT) 和图 3-8 (d3 120KO vs d3 120WT) 以及附录 6。从炎症和免疫的角度来看，不同组之间的功能富集分析发现显著富集到的 GO terms 主要有免疫过程(immune system process)，免疫应答(immune response)，对干扰素的应答(response to interferon- β/γ)，固有免疫反应(innate immune response)，对病毒的响应 (response to virus/defense response to virus)，响应趋化因子(response to cytokine/cellular response to cytokine stimulus)，免疫系统的调节(positive regulation of immune system process)，细胞表面受体信号通路(cell surface receptor signaling pathway)，信号转导的调节(regulation of signal transduction)，细胞交流调节(regulation of cell communication)，信号通路调节(regulation of signaling)等过程。

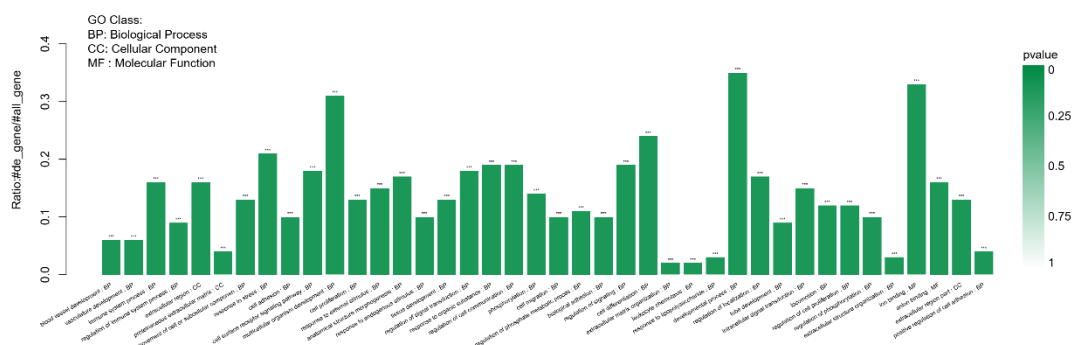


图 3-7. 差异表达基因 GO 功能富集柱状图 (d3 119KOvs d3 119WT)。

Figure 3-7. GO terms of functional enrichment DEGs (d3 119KOvs d3 119WT).

图为 d3 119KOvs d3 119WT 的 DEGs GO 富集柱状图，图中为不同时间富集最显著的前 40 个 GO terms，横坐标为名称和分类，纵坐标为 GO term，柱高为富集率 (Sample Number/Background Number)，颜色为 fdr 显著性，颜色越深富集越显著，fdr < 0.001 的标记为***，fdr < 0.01 的标记为**，fdr < 0.05 的标记为*，右侧颜色梯度表示 fdr 大小。

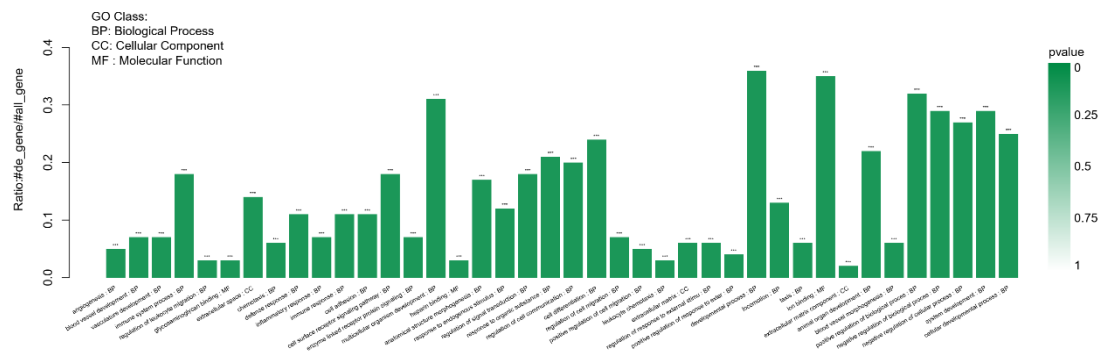


图 3-8. 差异表达基因 GO 功能富集柱状图 (d3 120KOvs d3 120WT)。

Figure 3-8. GO terms of functional enrichment DEGs (120KOvs 120WT).

图为 d3 120KOvs d3 120WT 的 DEGs GO 富集柱状图，图中为不同时间富集最显著的前 40 个 GO terms，横坐标为名称和分类，纵坐标为 GO term，柱高为富集率 (Sample Number/Background Number)，颜色为 FDR 显著性，颜色越深富集越显著， $\text{fdr} < 0.001$ 的标记为***， $\text{fdr} < 0.01$ 的标记为**， $\text{fdr} < 0.05$ 的标记为*，右侧颜色梯度表示 fdr 大小。

(3) DEGs 基因的 KEGG 通路注释和通路富集分析

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)是系统分析基因功能、基因组信息的数据库，是有关 Pathway 的主要公共数据库^[158]，由于 KEGG 主要提供代谢途径查询、代谢分析和代谢网络研究，本研究主要关注流感感染小鼠后肺组织的损伤与免疫调节，因此不再展示 KEGG 注释通路图。通过 KEGG 通路富集分析能够确定 DEGs 参与的主要生化代谢途径和信号转导途径。使用 Fisher 精确检验和 BH (FDR) 方法进行多重校验校正的 P 值 0.05 为阈值，得到 DEGs 中最显著富集的 KEGG 通路图，图 3-9 为 d3119KOvs d3119WT 和图 3-10 为 d3 120KOvs d3 120WT 的 DEGs KEGG 富集柱状图，其余分组的 DEGs KEGG 富集柱状图见附录 7。

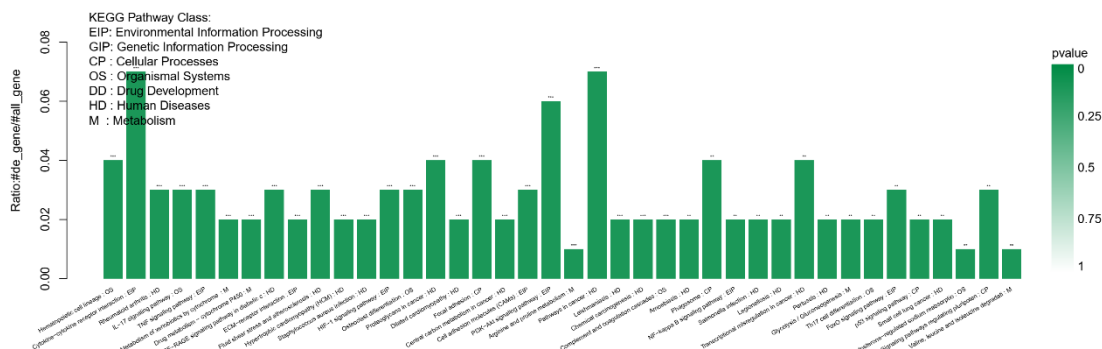


图 3-9. 差异表达基因 KEGG 通路富集柱状图 (d3 119KOvs d3 119WT)

Figure 3-9. KEGG pathways of enrichment DEGs (d3 119KOvs d3 119WT) .

图为 d3 119KOvs d3 119WT 的 DEGs KEGG 富集柱状图,图中为富集最显著的前 40 个 KEGG terms, 横坐标为名称和分类, 纵坐标为 KEGG term, 柱高为富集率 (Sample Number/Background Number), 颜色为 fdr 的显著性, 颜色越深富集越显著, fdr<0.001 的标记为***, fdr<0.01 的标记为**, fdr<0.05 的标记为*, 右侧颜色梯度表示 fdr 大小。

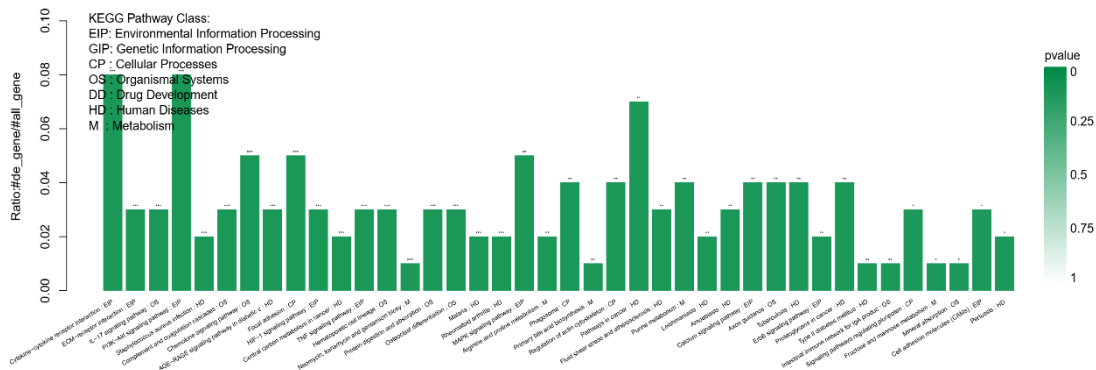


图 3-10. 差异表达基因 KEGG 通路富集柱状图 (d3 120KOvs d3 120WT)

Figure 3-10. KEGG pathways of enrichment DEGs (d3 120KOvs d3 120WT).

图为 d3 120KOvs d3 120WT 的 DEGs KEGG 富集柱状图,图中为富集最显著的前 40 个 KEGG terms, 横坐标为名称和分类, 纵坐标为 KEGG term, 柱高为富集率 (Sample Number/Background Number), 颜色为 fdr 显著性, 颜色越深富集越显著, fdr<0.001 的标记为***, fdr<0.01 的标记为**, fdr<0.05 的标记为*, 右侧颜色梯度表示 fdr 大小。

KEGG 富集分析显著的通路主要包括, 细胞因子-细胞因子受体互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction), 磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphoinositide-3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB, 也称 Akt) 信号通路, 白介素-17 (Interleukin, IL-17) 信号通路, 趋化因子信号 (Chemokine signaling pathway) 通路, 朊蛋白病 (Prion diseases), 肿瘤坏死因子信号通路 (Tumor necrosis factor, TNF signaling pathway), Toll 样受体信号通路 (Toll like receptor, TLR signaling pathway), NOD 样受体信号通路 (nucleotide oligomerization domain, NOD-like receptor, NLR signaling pathway), 维甲酸诱导基因 I 样受体信号通路 (Retinoic acid-inducible gene I-like receptors, RIG-I-like 受体, RLRs), 丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK signaling pathway), 甲型流感病毒相关通路, NF- κ B 信号通路, 趋化因子受体信号通路 (chemokine receptors

signaling pathway, 包括 CXCR、CCR、CR 和 CX3CR 亚家族), 酪氨酸激酶-转录因子 STAT 信号通路 (Janus-kinase-Signal transducer and activator of transduction, Jak-STAT signaling pathway), 环磷酸鸟苷和其依赖性蛋白激酶信号通路(cGMP, cyclic guanosine monophosphate, cGMP-dependent protein kinase, PKG; cGMP-PKG 信号通路), 钙离子信号通路 (Calcium signal transduction pathway) 等。这些通路在不同感染时间的差异表达中均被显著富集, 说明它们在病毒感染中发挥重要作用, 是影响病毒感染或者作出应答的重要候选通路和基因。

(4) DEGs 基因的 IPA 通路富集分析

为了进一步研究这些差异表达基因参与的信号通路以及通路上调、下调变化, 我们运用 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 预测 DEGs 参与的信号通路分析。将 119KOvs119WT 和 120KOvs120WT 在感染病毒后 3、5、8、11 天中的所有 DEGs ID 号及其表达量的倍率变化上传至 IPA 数据库中, 通过基于 Ingenuity Knowledge Base 的知识体系, 按照检验方法 (Activation z-score 和 p-value) 的排序, 得到上调表达和下调表达的信号通路 (见表 3-6), 差异显著 ($-2 > Z \text{ score} > 2$) 的信号通路 (图 3-11)。

表 3-6. H7N7 感染后差异表达基因的 IPA 通路分析

Table 3-6. IPA analysis of DEGs at day 3, 5, 8, 11 post H7N7 infection.

KO vs WT	Up regulated pathways ($-2 > Z \text{ score} > 2$)	Down regulated pathways ($-2 > Z \text{ score} > 2$)	Total pathways
119 d3	18	36	301
119 d5	1	8	364
119 d8	2	11	424
119 d11	37	10	552
120 3	31	10	543
120d5	1	16	426
120 8	4	20	452
120 11	13	36	519

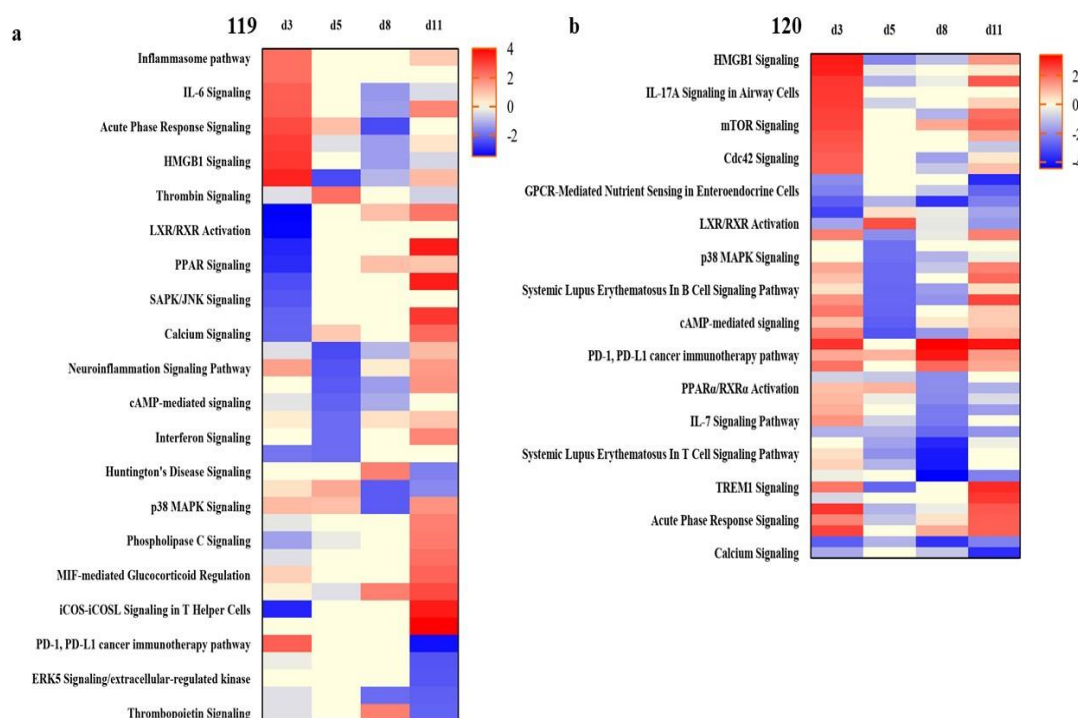


Figure 3-11. Heatmap of significantly regulated pathways in IPA analysis.

图 3-11. IPA 分析中随时间变化差异显著的信号通路热图。

图 a 为 119KOvs 119WT 在 H7N7 病毒感染后第 3、5、8、11 天时 $-2 > Z \text{ score} > 2$ 的信号通路；图 b 为 120KOvs 120WT 在 H7N7 病毒感染后第 3、5、8、11 天时 $-2 > Z \text{ score} > 2$ 的信号通路。图中每行表示一条信号通路，每列表示一组样本，红色表示通路上调表达，蓝色表示通路下调表达，颜色深浅用 $\log(p\text{-value})$ 表示。

从表 3-6 得知，病毒感染后表达差异显著的信号通路在第 3 天和第 11 天数量最多。这与前面 DEGs 在感染后不同时间的数量分布一致。图 3-11 表明在感染后 3 天和 11 天上调和下调表达的通路较 5 天和 8 天多。其中，119KO 相对于 119WT 在感染后不同天数上调表达的炎症与免疫相关通路主要有 TREM1 通路（TREM1 signaling）、IL-6 通路、Toll 样受体信号通路（Toll-like receptors signaling）、炎症小体信号通路（Inflammation pathway）、iNOS 信号通路、凝血酶信号通路（Thrombin signaling）、蛋白激酶 C 信号通路（PKC Signaling）、活化 T 细胞核因子（Nuclear factor of activated T cells, NFAT）调节免疫反应的通路、MIF 介导的糖皮质激素的调节、肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂（Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, TWEAK）信号通路；下调表达的信号通路主要有

C-Jun 氨基末端激酶/应激活化蛋白激酶信号通路 (SAPK/JNK signaling)、钙离子信号通路、干扰素信号通路、IL-7 信号通路、STAT3 信号通路、p38MAPK 信号通路、ERK5 胞外信号通路、Nrf2 介导的氧化应激信号通路。而 120KO 相对于 120WT 在感染后不同天数上调表达的炎症与免疫相关通路主要有 TGF- β 信号通路、IL-8 通路、IL-17 α 通路、mTOR 通路、ERK5 通路、干扰素通路、PAK 通路、TREM1 通路、PI3K/AKT 通路和 Toll 样受体通路；下调表达的信号通路主要有钙离子信号通路、PRRs 通路、p38MAPK 通路、PKC 通路、NAFT 通路、IL-7 通路、氧化磷酸化通路等。

3.3.3 肺转录组差异表达基因的 q-PCR 验证结果

为了更加清楚的了解 DEGs 在感染后的表达变化和其可能参与的信号通路，我们采用 q-PCR 验证差异表达基因在 mRNA 水平上表达量随时间的变化，根据图 3-5 和通路富集分析获得的数据，我们检测了 109 个基因，最后获得 38 个 DEGs 的 q-PCR 结果。q-PCR 结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算得到基因的相对表达量 (Fold change, FC)，随后我们用 $\log_2 FC$ (119KO/119WT) 和 $\log_2 FC$ (120KO/120WT) 做热图，总体上展示差异表达基因在病毒感染后 mRNA 水平上随时间的变化趋势。见图 3-12。

由 q-PCR 结果我们知道，大部分基因如 *Prnp*、TNF- α 、IRF3、IFN- β 、TREM2、CCCL2、CXCL2、CCR2、CXCR4 等在病毒感染后的不同时间，相对于生理盐水组显著上调表达。从图 3-12 我们得到，以上基因在 119KO 中的表达水平低于 119WT，而在 120KO 中的相对表达量则高于 120WT。另外，我们发现 SOCS3、TLR3、IRF7、TRAF6 和 TREML2 则是相反的情况，119KO 中的表达量高于 119WT，而 120KO 中的表达量则低于 120WT。

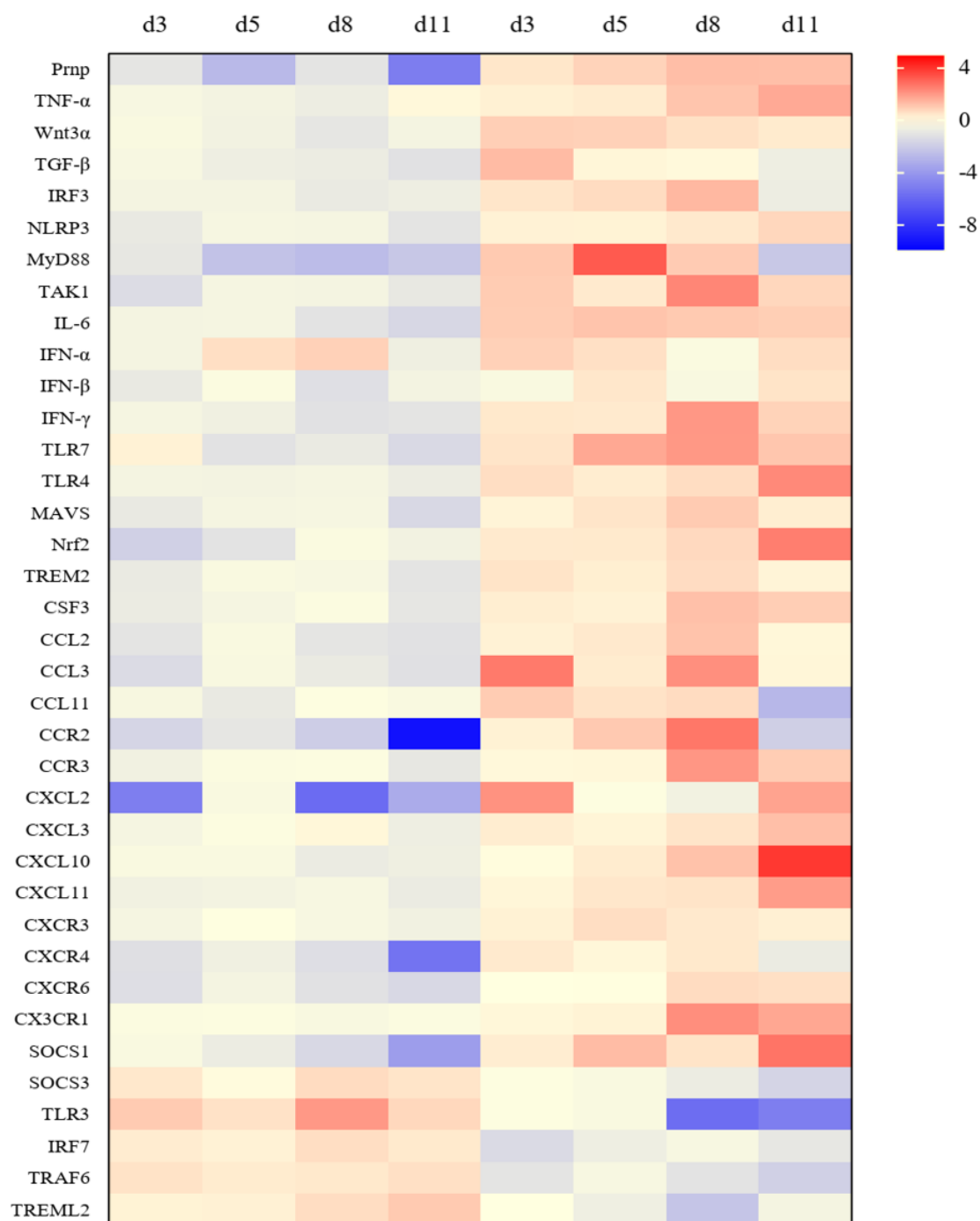


图 3-12. q-PCR 验证的差异表达基因热图

Figure 3-12. Heatmap of DEGs by q-PCR.

图中每行表示一个基因，每列表示一组样本，颜色深浅用 $\log_2FC(KO/WT)$ 表示。FC 为 q-PCR 结果的 Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 值)。红色表示该基因的相对表达量在感染后不同时间 KO 高于 WT，颜色越深说明差异越显著，蓝色表示 KO 表达量低于 WT，颜色越深说明差异越显著。左边 4 列从左至右分别为 d3 119KO/d3 119WT、d5 119KO /d5 119WT、d8 119KO /d8 119WT、d11 119KO /d11 119WT，右边 4 列为 d3 120KO/d3 120WT、d5 120KO/d5 120WT、d8 120KO/120WT、d11 120KO/d11 120WT。

各个基因在 119KO 和 119WT 小鼠肺中相对表达水平随时间的变化,即病毒感染后上调表达的基因在 119KO 中相对于 119WT 的变化,120KO 中相对于 120WT 的变化,以及病毒感染后下调表达的基因见下图。

(1) 病毒感染后小鼠肺中 *Prnp* 的表达验证结果。见图 3-13。

图 3-13 表明病毒感染小鼠后的不同时间,完全缺失小鼠(119KO)肺中的 *Prnp* 表达量显著低于野生型小鼠,基本与阴性对照组(119KO 滴鼻注射生理盐水)表达水平一致。而 WT 小鼠感染病毒后,肺中 *Prnp* 均显著高于对照组,并且 *Prnp* 在感染后随时间延长而升高,到 8 天达到最高,到 11 天又降低。OR 区缺失小鼠(120KO)与 WT 小鼠肺中 *Prnp* 在感染病毒后均显著上调表达,并且,在每一个时间点,120KO 小鼠肺中 *Prnp* 均显著高于 WT 小鼠。在感染后的 3、5、8 天 120KO 小鼠肺中 *Prnp* 表达水平都较高,第 11 天出现明显下降。

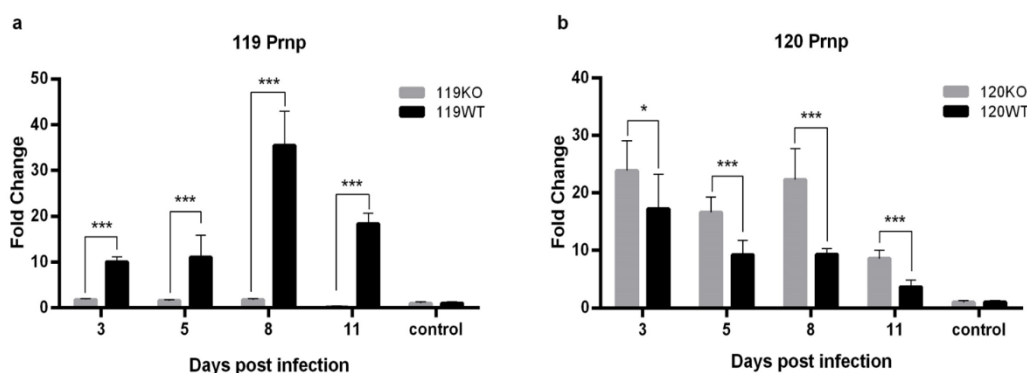


图 3-13. H7N7 感染 119KO/WT 和 120KO/WT 小鼠后不同时间 *Prnp* 基因的表达变化。

Figure 3-13. Gene expression of *Prnp* in mice lung at different time post infection of H7N7.

图(a)为 H7N7 滴鼻感染 119KO 与 WT 小鼠后不同时间肺中 *Prnp* 基因在 mRNA 水平的表达变化;图(b)为 H7N7 滴鼻感染 120KO 与 WT 小鼠后不同时间肺中 *Prnp* 基因在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测,统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。* 表示与两组之间的统计学差异, $*P < 0.05$ 表示两组 *Prnp* 基因表达差异显著; $***P < 0.001$ 表示两组相比 *Prnp* 基因表达差异极显著。

(2) 病毒感染诱导小鼠肺中 TLR4/TLR7 信号通路基因上调表达的验证结果(见图 3-14 和图 3-15), TLR4/7 通路效应基因干扰素 $\alpha/\beta/\gamma$ 和促炎性细胞因子(见图 3-16 和图 3-17);其他炎性细胞因子以及负调节作用的 SOCS3 和 TLR3 通路相关因子。

从图 3-14 可以看到病毒感染小鼠肺后 3、5、8、11 天，诱导 TLR4 和 TLR7 信号通路相关基因 TLR4、TLR7、MyD88、MAVs、TAK1、IRF3、Wnt3a、TGF β 在 119KO 和 WT 小鼠肺中显著上调表达，并且这些基因在 WT 小鼠肺中的 mRNA 水平普遍显著高于 119KO 小鼠。WT 小鼠肺中的这些基因基本在感染后第 8 天表达量达到最高（如 MyD88、MAVs、TAK1、IRF3、TGF β ）。图 3-15 表明病毒感染后不同时间，病毒诱导这些基因在 120KO 和 WT 小鼠肺中显著上调表达。有趣的是，与 119KO 小鼠相反，这些基因在 120KO 小鼠肺中的表达水平显著高于 WT 组。这些基因分别在感染后的 3（Wnt3a 和 TGF β ）、5（MyD88 和 IRF3）、8（MAVs 和 TAK1）、11（TLR4 和 TLR7）天时表达量达到最高。

图 3-16 展示了 TLR4 和 TLR7 信号通路调节的下游信号分子 I 型干扰素（IFN α/β ）和 II 型干扰素（IFN γ ）以及 IL6、TNF α 和模式识别受体 NLRP3 在病毒感染后较对照组均显著上调表达，并且 119WT 小鼠肺中的表达水平显著高于 WT 组。同时，我们发现，TLR4 和 TLR7 通路中的关键转录因子 NF- κ B 下游的信号分子 IL-1 α 、IL-1 β 以及 IL-33 相对于对照组均下调表达（图中未展示）。图 3-17 则展示了相反的结果，感染后的不同时间点，120KO 组小鼠肺中的干扰素、IL6、TNF α 和 NLRP3 的表达量均显著高于 WT 小鼠。

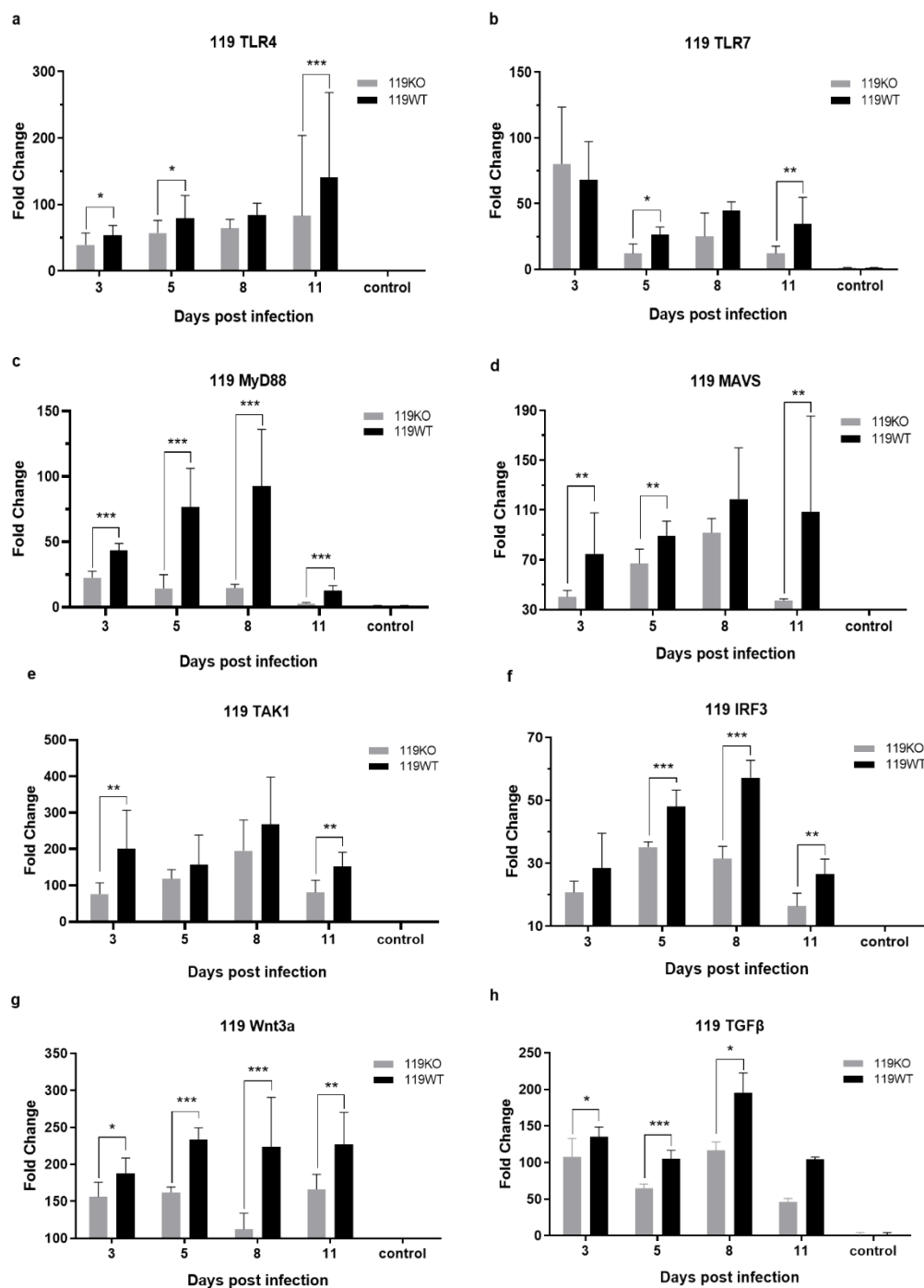


图 3-14. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间 TLR4/TLR7 通路相关基因的表达变化。

Figure 3-14. Gene expression of genes in TLR4/TLR7 signaling pathway in 119KO and WT mice lung at different time post infection of H7N7.

图 a-h 分别为 H7N7 滴鼻感染 119KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中基因 TLR4、TLR7、MyD88、MAVs、TAK1、IRF3、Wnt3a、TGFβ 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ， $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ； $***P < 0.001$ 。

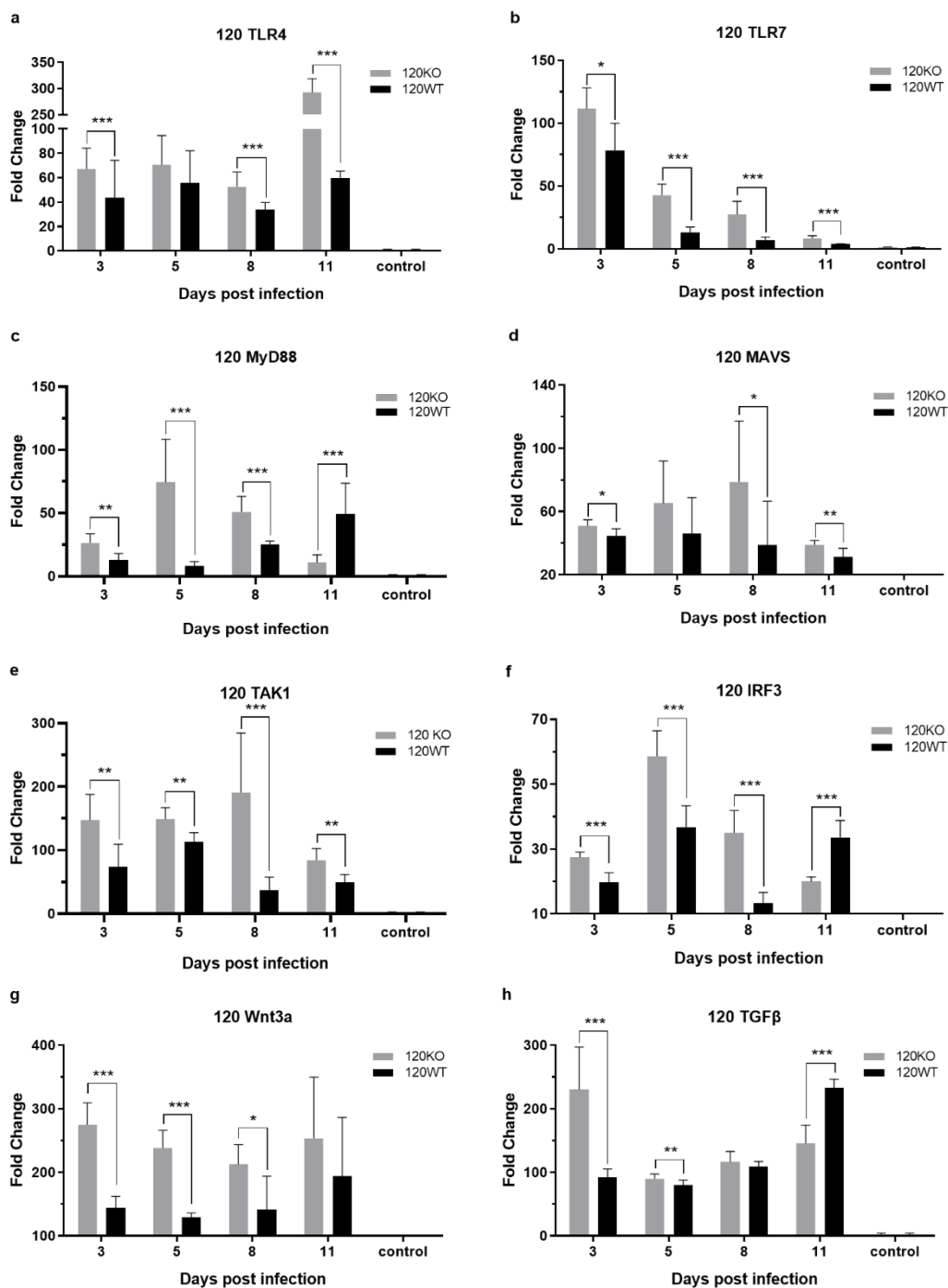


图 3-15. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间 TLR4/TLR7 通路相关基因的表达变化。

Figure 3-15. Gene expression of genes in TLR4/TLR7 signaling pathway in 120KO and WT mice lung at different time post infection of H7N7.

图 a-h 分别为 H7N7 滴鼻感染 120KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中基因 TLR4、TLR7、MyD88、MAVs、TAK1、IRF3、Wnt3a、TGFβ 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ， $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ； $***P < 0.001$ 。

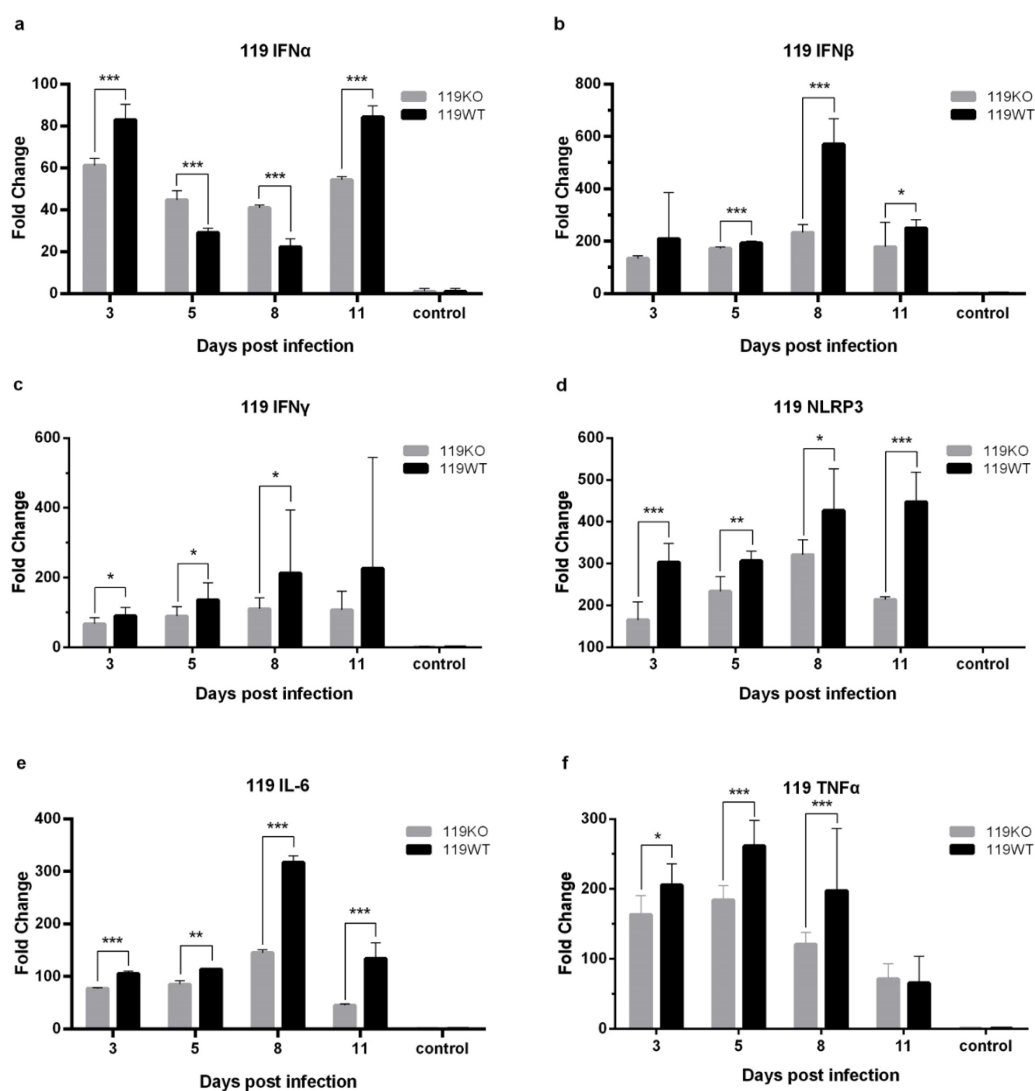


图 3-16. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间 I 型、II 型干扰素及炎症细胞因子的表达变化。

Figure 3-16. Expression of type I and II interferons and pro-inflammatory cytokines in 119KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-f 分别为 H7N7 滴鼻感染 119KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中 I 型干扰素基因 IFN α/β 、II 型干扰素 IFN γ 和促炎细胞因子 IL-6、TNF α 以及 NLRP3 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ， $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ； $***P < 0.001$ 。

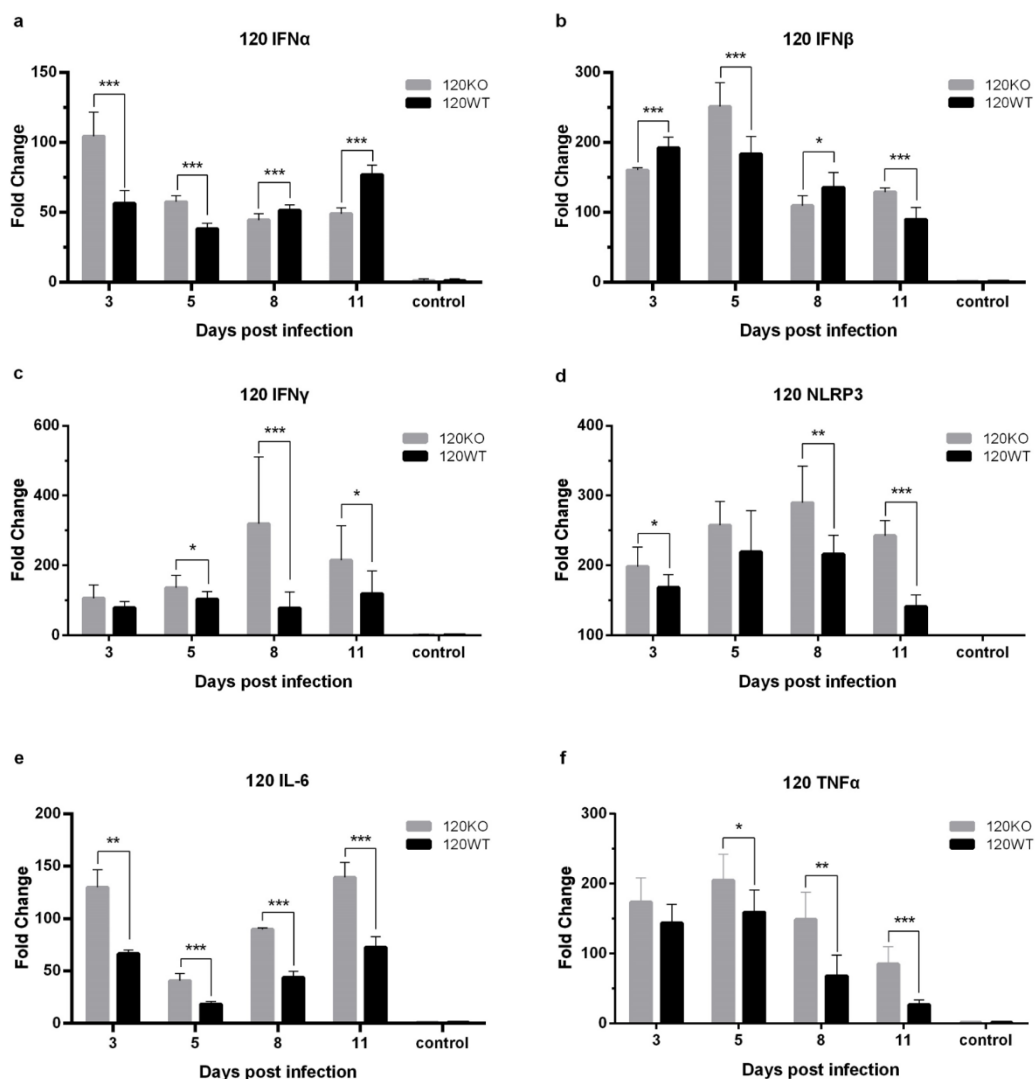


图 3-17. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间 I 型、II 型干扰素及炎性细胞因子的表达变化。

Figure 3-17. Expression of type I and II interferons and pro-inflammatory cytokines in 120KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-f 分别为 H7N7 滴鼻感染 120KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中 I 型干扰素基因 IFN α/β 、II 型干扰素 IFN γ 和促炎细胞因子 IL-6、TNF α 以及 NLRP3 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ， $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ； $***P < 0.001$ 。

图 3-18 和 3-19 分别是病毒感染 119KO 与 WT 以及 120KO 与 WT 小鼠肺中炎性细胞因子 Nrf2、CSF3 和 TREM2 和炎症反应负调节因子 SOCS3 以及 Trem12 以及 TLR3 信号通路中的相关基因 TLR3、TRAF6 与 IRF7。值得注意的是，病毒感染后上调表达的这些分子中，Nrf2、CSF3 和 TREM2 在 119KO 的表达显著低

于 119WT, 在 120KO 中则显著高于 WT 组; 而 SOCS3、Trem12、TLR3、TRAF6 与 IRF7 则呈现相反的趋势, 在 119KO 中的表达量显著高于 WT, 以及在 120KO 中的表达量显著低于 WT。

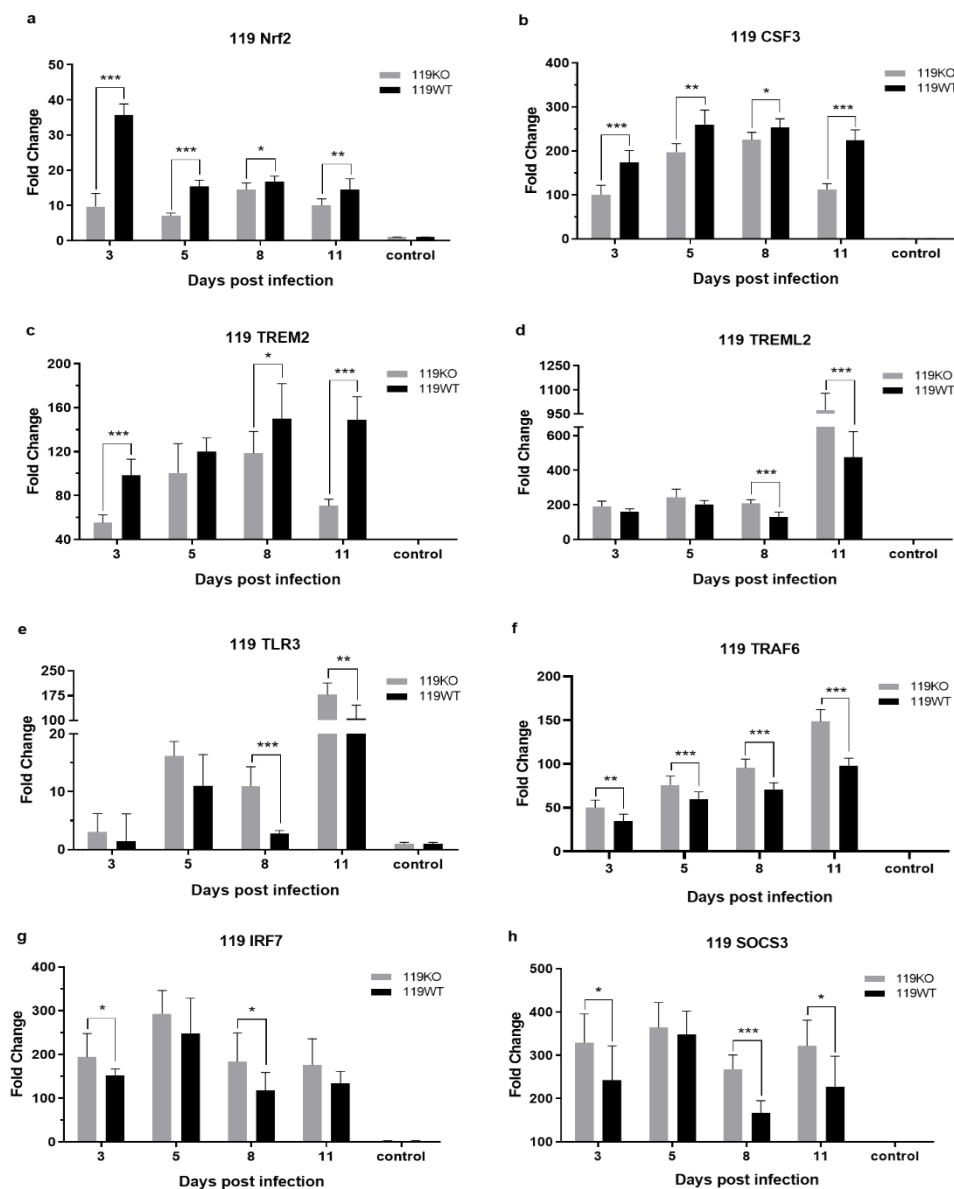


图 3-18. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 TLR3 通路相关细胞因子及其他细胞因子的表达变化。

Figure 3-18. Expression of cytokines of TLR3 signaling pathway and other cytokines in 119KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-c 为 H7N7 滴鼻感染 119KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中促炎细胞因子 Nrf2、CSF3 和 TREM2 在 mRNA 水平的相对表达量变化; d-h 为 TLR3 通路相关基因 TLR3、TRAF6、IRF7 与 TREML2、SOCS3 负调节细胞因子在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测, 统计方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。* 表示与两组之间的统计学差异显著性, 分别表示 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ 。

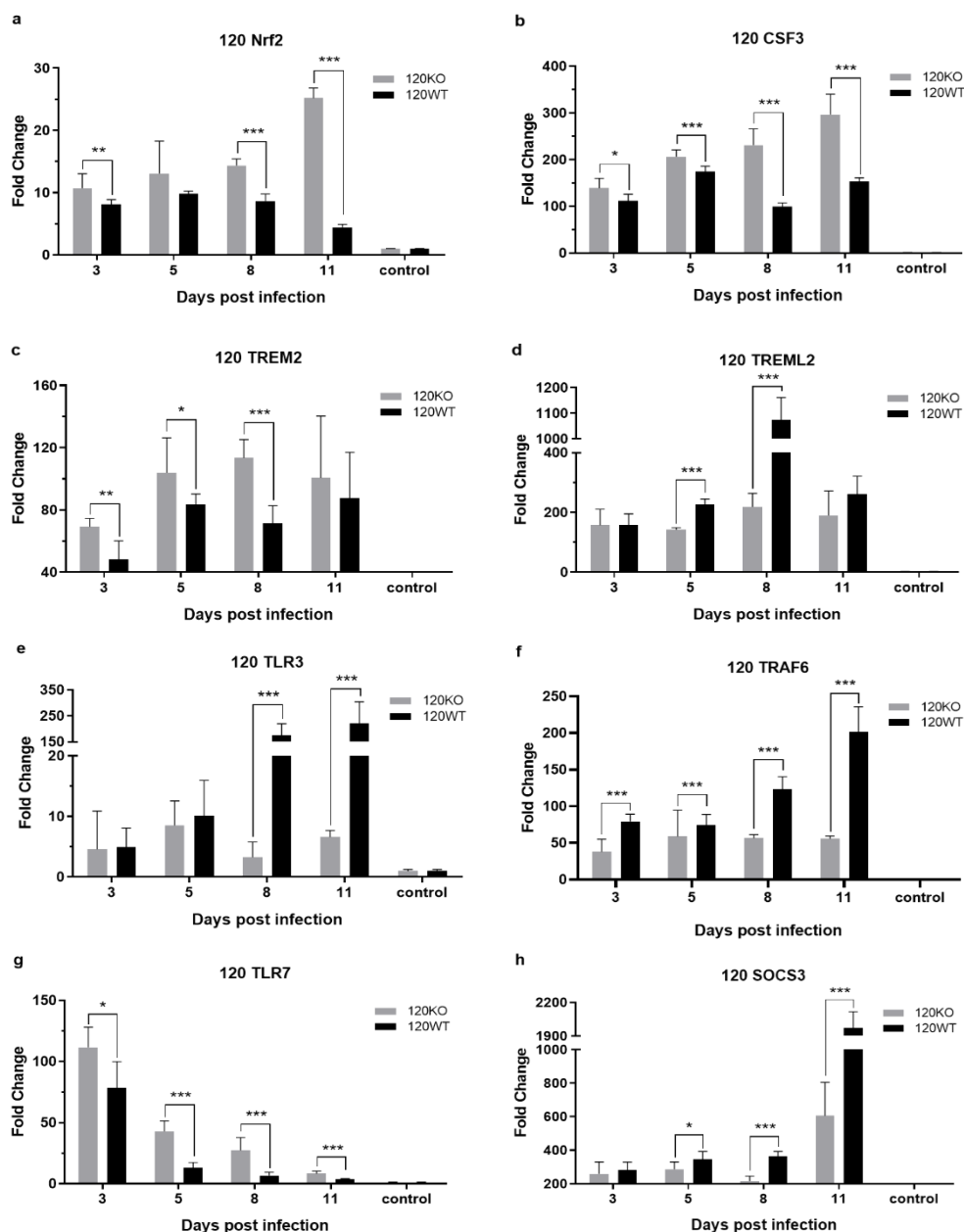


图 3-19. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 TLR3 通路相关细胞因子及其他细胞因子的表达变化。

Figure 3-19. Expression of cytokines of TLR3 signaling pathway and other cytokines in 120KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-c 为 H7N7 滴鼻感染 120KO 与 WT 小鼠 3、5、8、11 天后肺中促炎细胞因子 Nrf2、CSF3 和 TREM2 在 mRNA 水平的相对表达量变化；d-h 为 TLR3 通路相关基因 TLR3、TRAF6、IRF7 与 TREM1、SOCS3 负调节细胞因子在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ 。

(3) 病毒感染诱导小鼠肺中趋化因子及其受体的 q-PCR 验证结果

图 3-20 和 3-21 分别是病毒感染 119KO 与 WT 以及 120KO 与 WT 小鼠肺后 CC 类趋化因子 CCL2、CCL3、CCL11 和此类趋化因子受体 CCR2 和 CCR3 基因的表达变化。其中，这些分子在 119KO 中的表达水平都显著低于 119WT，而在 120KO 中的表达水平则显著高于 WT。

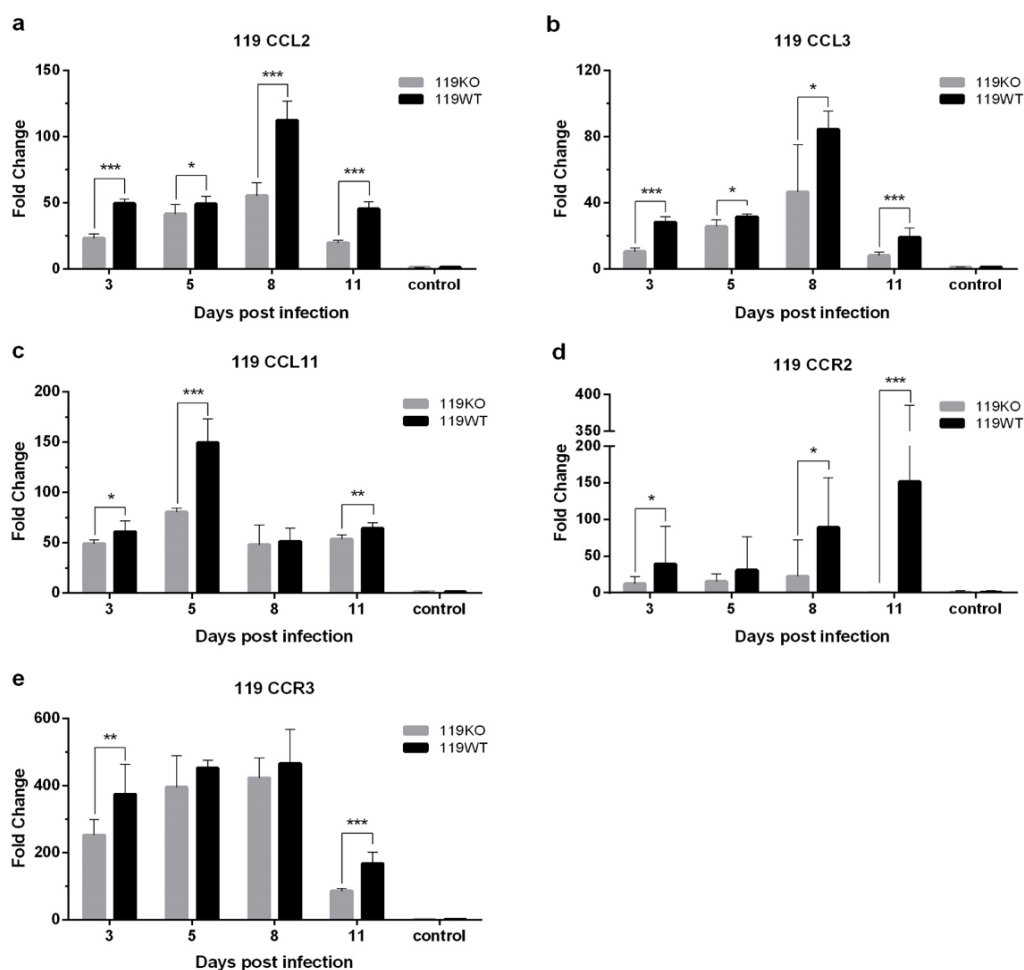


图 3-20. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CC 类趋化因子和 CC 类趋化因子受体基因的表达变化。

Figure 3-20. Expression of CC chemokines and receptors of CC chemokines in 119KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-e 为 H7N7 滴鼻感染 119KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中 CC 类趋化因子 CCL2、CCL3、CCL11 和 CC 类趋化因子受体 CCR2、CCR3 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, mean $\pm$ SD。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P<0.05$, $**P<0.01$; $***P<0.001$ 。

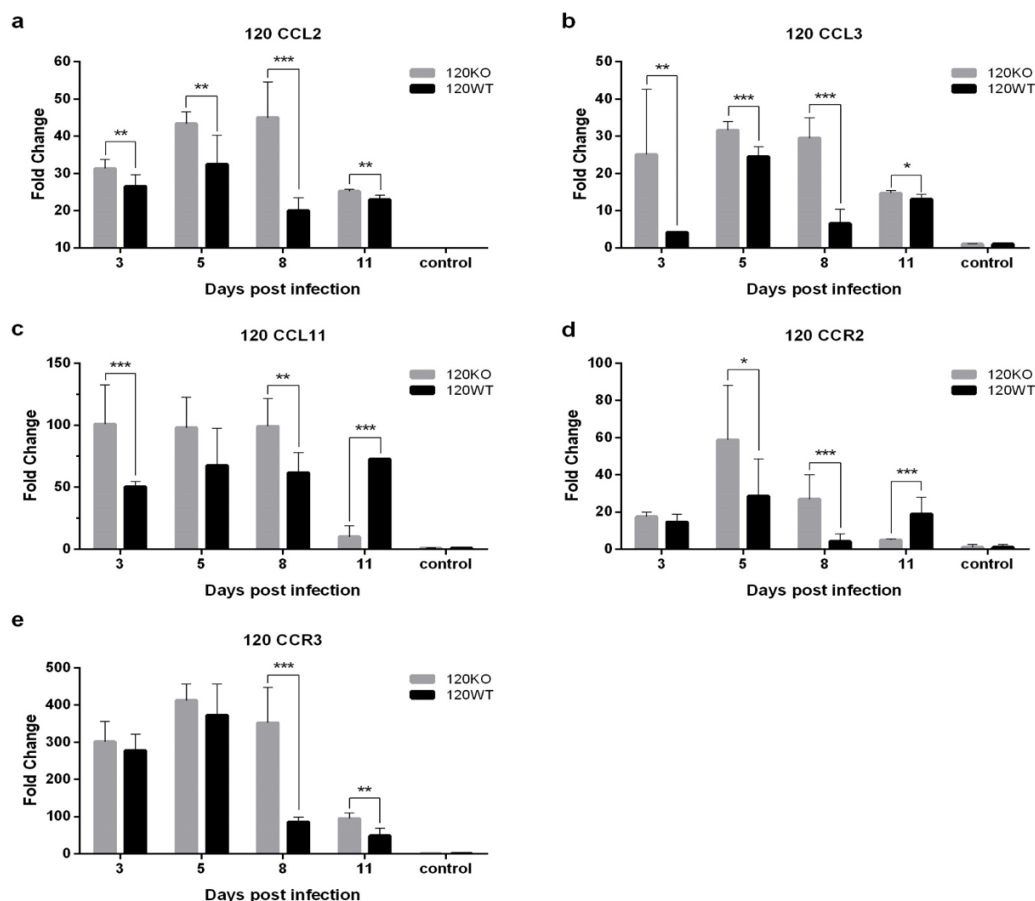


图 3-21. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CC 类趋化因子和 CC 类趋化因子受体基因的表达变化。

Figure 3-21. Expression of CC chemokines and receptors of CC chemokines in 120KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-e 为 H7N7 滴鼻感染 120KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中 CC 类趋化因子 CCL2、CCL3、CCL11 和 CC 类趋化因子受体 CCR2、CCR3 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ，mean $\pm$ SD。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ； $***P<0.001$ 。

图 3-22 和 3-23 分别是病毒感染 119KO 与 WT 以及 120KO 与 WT 小鼠肺后 CXCL 类趋化因子 CXCL2、CXCL3、CXCL10、CXCL11 和此类趋化因子受体 CXCR3、CXCR4 和 CXCR6 以及 CX3C 类趋化因子受体 CX3CR1 基因的表达变化情况。这些分子在 119KO 中的表达水平显著低于 119WT，而在 120KO 中的表达水平则显著高于 WT。其中，CXCL2 基因在感染后 5、8 天表达量降低，并低于对照组。

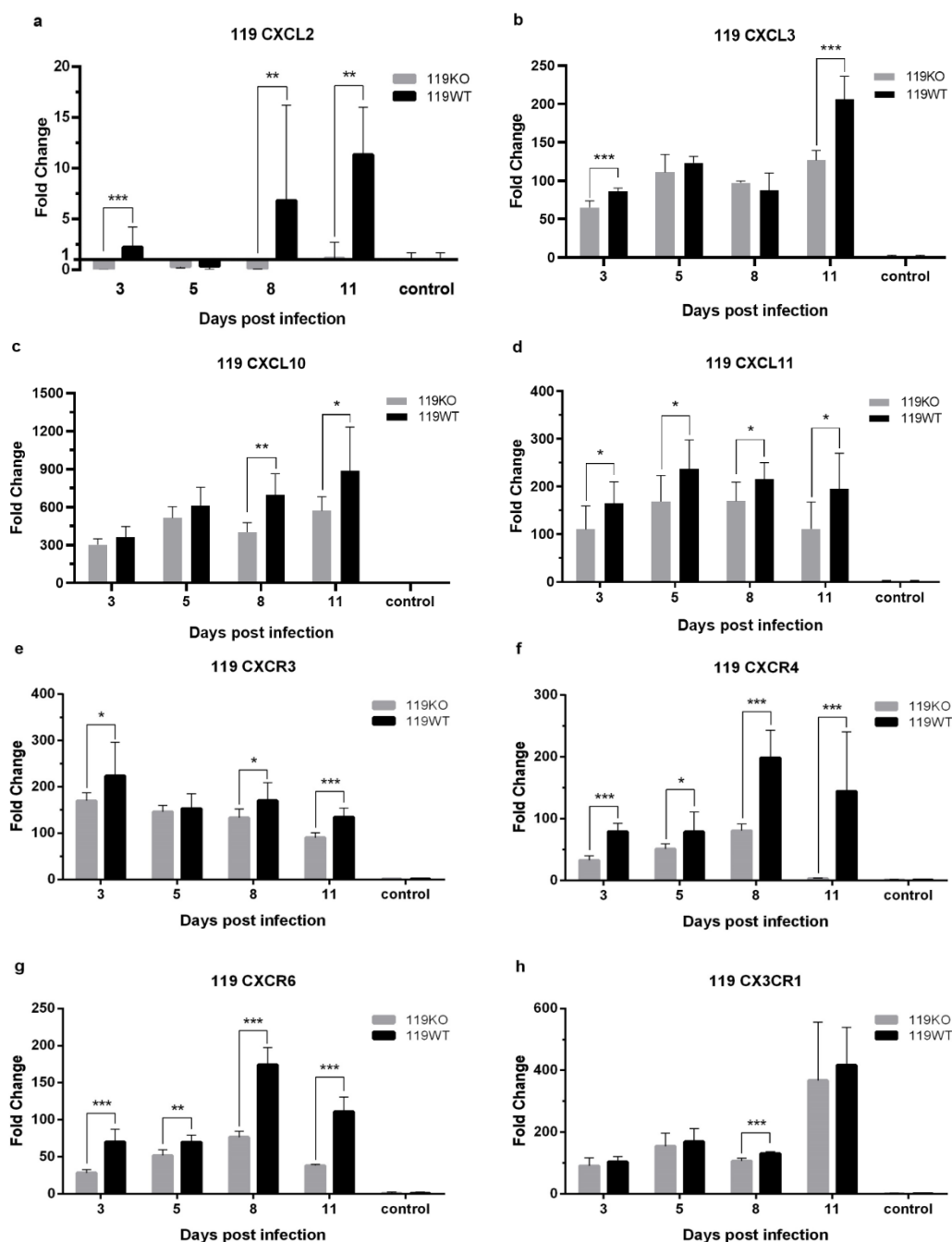


图 3-22. H7N7 感染 119KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CXC 类趋化因子和 CXC 类趋化因子受体基因的表达变化。

Figure 3-22. Expression of CXC chemokines and receptors of CXC chemokines in 119KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-h 为 H7N7 滴鼻感染 119KO 与 WT 小鼠 3、5、8、11 天后肺中 CXC 类趋化因子 CXCL2、CXCL3、CXCL10、CXCL11 和 CXC 类趋化因子受体 CXCR3、CXCR4、CXCR6 和 CX3CR1 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, mean $\pm$ SD。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $*P<0.05$, $**P<0.01$; $***P<0.001$ 。

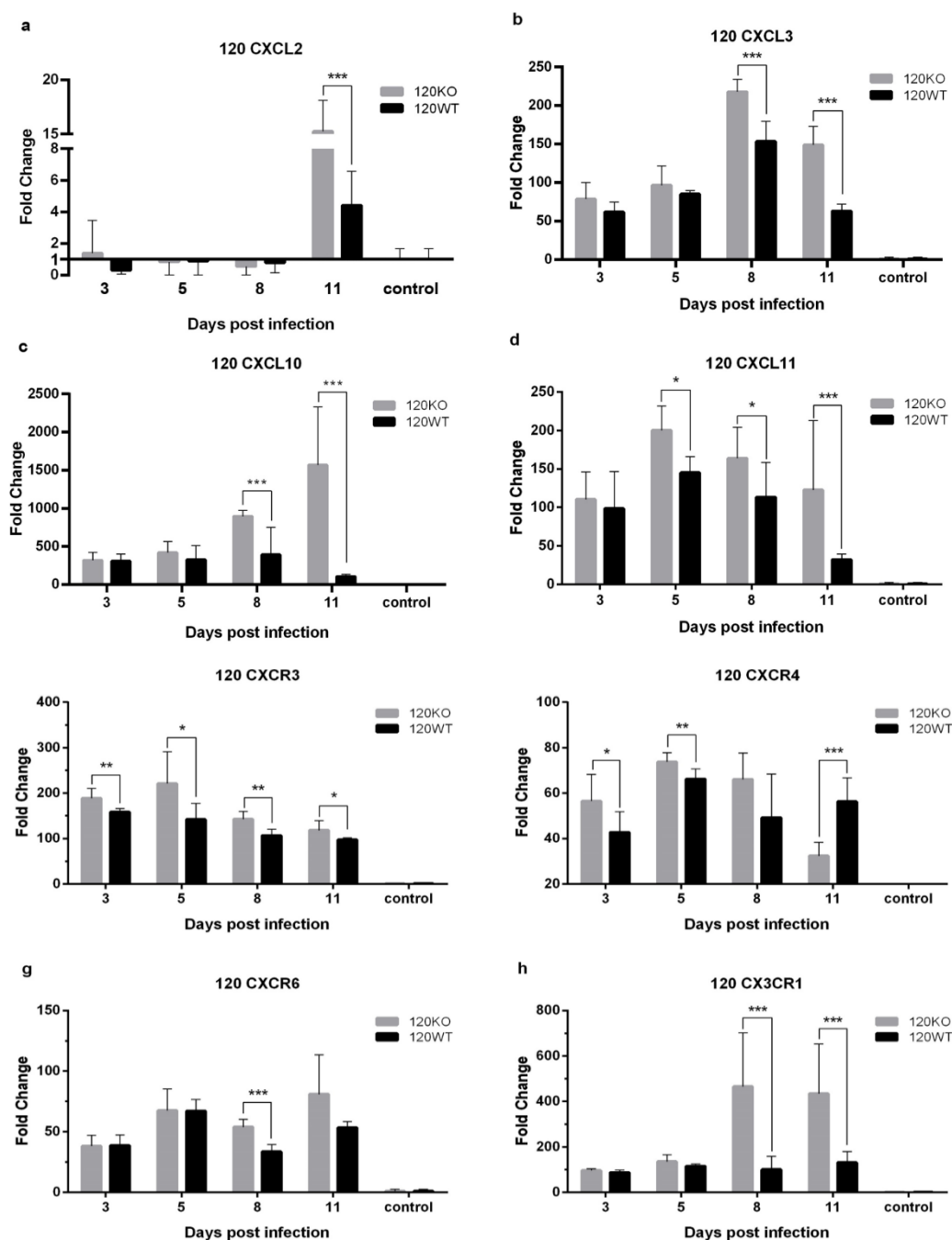


图 3-23. H7N7 感染 120KO 和 WT 小鼠后不同时间诱导的 CXC 类趋化因子和 CXC 类趋化因子受体基因的表达变化。

Figure 3-23. Expression of CXC chemokines and receptors of CXC chemokines in 120KO and WT mice lung at different time post H7N7 infection.

图 a-h 为 H7N7 滴鼻感染 120KO 与 WT 小鼠后 3、5、8、11 天肺中 CXC 类趋化因子 CXCL2、CXCL3、CXCL10、CXCL11 和 CXC 类趋化因子受体 CXCR3、CXCR4、CXCR6 和 CX3CR1 在 mRNA 水平的相对表达量变化。由 q-PCR 检测，统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, mean $\pm$ SD。* 表示与两组之间的统计学差异显著性，分别表示 $P < 0.05$, $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ 。

3.4 讨论

转录组 (Transcriptome) 狭义上指细胞中转录出来的所有 mRNA 的总和^[159]。细胞或组织的转录组学反映了其执行的生物学过程。分子生物学中的一个基本问题是细胞和组织在基因表达上如何不同以及这些差异是如何形成特定的生物学功能的^[160]。RNA-seq (deep sequencing of RNAs) 被用于定量基因和异构体的表达^[161-164], 具体过程包括样本的所有 RNA (或 polyA+RNAs) 被随机片段化、反转录、连接到衔接子上, 然后进行测序, 从每个基因衍生的序列 reads 估计基因的表达水平^[165], 是转录组分析的强大工具^[166]。转录组分析可以帮助阐明宿主与病原体的相互作用以及宿主的免疫机制, 如对猪外周血单个核细胞转录组分析, 显示猪瘟疫病毒 CSFV 通过诱导 USP18 分子的上调表达, 抑制 IFN-I 通路, 从而逃避天然免疫防御, 进而促进自身复制^[167]。RNA-seq 可以揭示牛磺酸丁酸酯诱导的表观基因组调控机制^[168]。并且能够解析出差异表达基因中的上调和下调基因以及基因之间的互相作用关系^[169]。

有研究发现, 高致病性 IAV 感染过程中促炎细胞因子的异常且不受控制的增加与 IAV 感染导致很高的死亡率相关^[170]。肺部差异基因表达谱能够在一定程度上反应并解释小鼠感染病毒后致病性的差异。本章对 H7N7 感染小鼠肺的转录组数据分析、筛选获得差异表达基因, 对这些基因进行注释、聚类、GO/KEGG 聚集分析以及 IPA 通路预测后获得 109 个炎症与免疫相关的差异表达基因。这些基因分别参与 DNA 合成、调节细胞生长^[171]; 响应炎性细胞因子的刺激^[172,173]; 调节细胞内外的信号传导^[174]; 调节组织损伤与炎症^[175]; 调节对病毒的识别和宿主对病毒的适应性; 调节病毒复制^[176]以及宿主病毒因子发挥抗病毒作用^[177]等。随后我们通过 q-PCR 方法获得 38 个 DEGs 的验证结果, 以下从细胞因子和趋化因子两方面分别展开讨论。

首先, 有意思的是, *Prnp* 与其它炎性基因在病毒感染后均显著上调表达, 并且随时间变化呈现不同的表达差异。119KO 组即 *Prnp* 基因完全敲除组小鼠肺中的 *Prnp* 缺失表达, 并不随时间延长产生变化。再次验证了 *Prnp* 完全敲除在小鼠肺中的表达。其次, 除 *Trem12*、*TLR3*、*TRAF6*、*IRF7*、*SOCS3* 基因外, *Prnp* 与

其他细胞因子和趋化因子在 119KO 中的表达水平显著低于 119WT 组小鼠肺；而在 120KO 中的表达量则显著高于 WT。Prnp 完全缺失小鼠（119KO）和 OR 区缺失小鼠（120KO）表现炎性基因表达的不同调节作用，从细胞因子水平表明 PrP^c 的 OR 区以及非 OR 区在 IAV-H7N7 感染小鼠诱导炎症反应中发挥不同的作用。进一步验证了 OR 区具有抑制病毒诱导的细胞因子上调，即抑制病毒诱导的炎症反应。而完全缺失 PrP^c（119KO，同时缺失 OR 区和非 OR 区）则有助于减弱 IAV 诱导的炎症反应，说明 PrP^c 的非 OR 区可能发挥促进炎症因子上调表达，促进炎症反应，加重了对小鼠的肺损伤程度和致病性。

研究表明小鼠肺上皮细胞感染 H7N7 病毒后导致大量病毒释放，伴随细胞死亡与细胞坏死，之后肺内皮细胞容易被感染，产生高水平的细胞因子和趋化因子，升高的炎性细胞因子和趋化因子可以将淋巴细胞募集到肺中，促进对病毒清除。类似于 H5N1 和 H7N9^[176]，炎症因子风暴或炎症因子的过度诱导会导致淋巴细胞浸润和肺部炎症及损伤，导致肺炎和急性肺损伤，可能是 AIV 如 H5N1, H5N2, H9N2, H1N1 等诱导宿主发病的一个重要因素^[178]。甲型流感病毒通过感染哺乳动物呼吸道系统如肺和支气管等诱导肺损伤及并发症致病，基因组分析表明 H1N1 流感病毒诱导的宿主免疫和细胞死亡应答增加^[179]；H5N1 病毒感染初期 RIG-I 样受体信号转导通路中的基因显著上调，导致 IFN 信号转导抑制子的表达，进而导致后期宿主抗病毒感染机制的激活^[180]。Li 等研究团队发现 H9N2-AIV 会引起肠道菌群失调、损伤和肠粘膜炎症性损害，并且发现肠上皮细胞中的炎性细胞因子 IFN- γ 、IL-22 和 IFN- α 和 IL-17A 的 mRNA 显著上调^[181]。

与上述研究相似的是，本章研究表明 H7N7 感染小鼠肺后能够诱导一系列细胞因子显著上调表达，包括 PRRs 如 TLR4、TLR7 和 NLRP3，其他细胞因子如 MyD88、MAVs、TAK1、IRF3、Wnt3a、TGF β 、I 型干扰素（IFN α/β ）和 II 型干扰素（IFN γ ）、IL6、TNF α 、Nrf2、CSF3、TREM2 以及 SOCS3、Trem12、TLR3、TRAF6 与 IRF7。有趣的是，除 SOCS3、Trem12、TLR3、TRAF6 与 IRF7 外，其他细胞因子在 OR 区缺失后，表达量显著高于 WT 小鼠，说明 OR 区能够抑制细胞因子在 H7N7 感染后的上调表达，在 IAV 感染诱导的炎症风暴中发挥保护作

用；另一方面，在 PrP^c 完全缺失（同时缺失 OR 区和非 OR 区）后，这些细胞因子相对于 WT 显著上调表达，而 OR 区发挥抑制细胞因子的上调表达，因此我们推测，PrP^c 的非 OR 区可能具有促进细胞因子上调表达的作用，即促进或增强 H7N7-IAV 感染诱导的炎症反应。

SOCS3、Trem12、TLR3、TRAF6 与 IRF7 这 5 个细胞因子在 H7N7 感染后均显著上调表达，但在 119KO 与 WT 以及 120KO 与 WT 小鼠肺中的表达差异与其它细胞因子相反，说明这些细胞因子在 H7N7 感染诱导 OR 区缺失和 PrP^c 完全缺失的小鼠肺的中可能发挥负向调节炎症反应的作用。病毒感染机体启动有效的免疫反应后，必须及时对其进行负调控，以减少对宿主形成更大损害和细胞因子风暴。因此，病毒感染后对炎症反应的负调节作用对机体维持免疫和炎症反应的平衡非常重要。

本研究中，病毒感染后激活先天免疫系统与炎症反应，通过病毒感染产生 PAMP 与 PRRs 结合发挥作用。其中 TLR7 识别 ssRNA、TLR3 识别 dsRNA、TLR4 识别病毒感染中并发或继发的细菌脂多糖（LPS）以及能够形成炎症小体的 NLRP3^[182]。根据与不同接头蛋白的结合，可以将 TLRs 分成两类：一类是髓样分化因子 88(MyD88)依赖型 TLR 信号通路，主要诱导促炎细胞因子的产生，另一类是 TIR 结构域接头蛋白(TRIF)依赖型信号通路，会激活 I 型 IFN 的反应^[183, 184]。其中 TLR7 的配体激活 MyD88 依赖型 TLR 信号通路，TLR3 的配体激活 TRIF 依赖型 TLR 信号通路，而 TLR4 兼有以上两种信号通路^[182]。MyD88 依赖型 TLR 信号通路以 TIR 配体蛋白(TIRAP)和衔接蛋白 MyD88 招募 IL-1 受体蛋白激酶 1(IRAK1)并与之结合，随后 IRAK4 使 IRAK1 磷酸化。磷酸化的 IRAK1 与 TNF 受体相关因子 3(TRAF3)结合^[185, 186]。MyD88 还可以激活线粒体抗病毒信号接头蛋白（MAVs），MAVs 与 TRAF 会招募 TRAF3 来活化 IRF3^[187]。同时 TRAF3 与 TGF β 激酶(TAK1)结合蛋白 1(TAB1)、TAB2、TAK1 结合形成复合体进一步激活 TAK1，TLR7/MyD88/TRAF3/IRF3/TAK1 信号途径能够很强烈的激活 I 型干扰素表达^[188]。TRIF 依赖型 TLR 信号通路通过 TRIF 相关配体分子(TRAM)激活 TRAF6^[189]，随后激活 IKKs、NF- κ B 激活剂(TANK)结合激酶 1(TBK1)复合

物,引起干扰素调节因子 3(IRF3)或 IRF7 磷酸化,随后诱导 I 型 IFN 活化^[188,190]。抗病毒先天免疫反应的标志是 I 型干扰素和炎性细胞因子的产生。干扰素途径能够诱导大量的炎性细胞因子(如 TNF- α 、IL-6、CCL2、CCL3 和 CCL10 等)和干扰素刺激基因(ISGs,包括 TLR7、IRF3、IRF7 等数百种基因)的产生^[191]。这些分子不仅通过抑制病毒复制、装配和聚集来迅速控制病毒感染,而且在激活适应性免疫系统以及清除病毒方面发挥至关重要重要的作用^[192]。

TLR4 识别革兰氏阴性菌的 LPS 或者宿主自身的配体蛋白如热休克蛋白等后,会发生二聚化,二聚化的 TLR4 能够组成型的激活下游信号通路。二聚化的 TLR4 会招募 TRAM,后者会招募接头蛋白 TRIF,激活 I 型干扰素的产生^[193]。在缺失 TRAF 的小鼠中,I 型干扰素的产生被大大削弱^[194]。TLRs 信号通路诱导多种细胞因子和趋化因子表达,如 IFN α/β 、IL-6、TNF α 和 TGF β ;介导炎症活性的 MCP-1、CXCL8 等趋化因子、CSF 等,协调机体应对 IAV 感染的早期反应,也为后续激活适应性免疫打下基础。

另外,模式识别受体 NLRPL3 与配体蛋白和半胱天冬酶 caspase1 或 caspase11 形成炎症小体,激活下游白介素分子(pro-IL-1 α/β 和 IL-18 和 pro-IL-33),调节病毒诱导的肺损伤和上皮细胞的凋亡与坏^[195]。NLRP3 诱导的炎症小体在检测和清除细菌感染以及病毒并发的细菌感染中起着重要作用^[196]。

与细胞因子的调节趋势相似,本章研究还表明 H7N7 感染小鼠肺后能够诱导 CC 类和 CXC 类趋化因子其受体显著上调表达,包括 CCL2、CCL3、CCL11 和受体 CCR2 和 CCR3, CXCL2、CXCL3、CXCL10、CXCL11 和受体 CXCR3、CXCR4 和 CXCR6 以及 CX3CR1 分子。这些趋化因子在 OR 区缺失小鼠中表达量显著高于 WT 小鼠,说明 OR 区能够抑制趋化因子在 H7N7 感染后的上调表达,在 IAV 感染诱导的炎症风暴中发挥保护作用;另一方面,在 PrP^c 完全缺失(同时缺失 OR 区和非 OR 区)后,这些趋化因子相对于 WT 显著上调表达。因此我们推测,PrP^c 的非 OR 区可能具有促进趋化因子上调表达的作用,即促进或增强 H7N7-IAV 感染诱导的炎症反应。

IAV 感染机体的过程中,趋化因子(CCL2、CCL3、CCL11 和 CCR3)能够

被细胞因子（TLRs 和 TNF 等）诱导激活，介导单核细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞到炎症部位，参与炎症反应^[197]；参与 T 淋巴细胞募集到炎症部位（CXCL10、CXCL11）^[198]，并能被 IFN γ 诱导。CCR2 和 CCR3 还能够在肥大细胞的募集和活化中发挥重要作用^[199]；CXCL2/3/10/11 能够介导中性粒细胞的趋化，并激活该细胞参与炎症与免疫反应。趋化因子和趋化因子受体（属于 G 蛋白偶联受体）结合，激活 G 蛋白，随后激活磷脂酶 C（PLC），后者将磷脂酰肌醇（4,5）-二磷酸（PIP2）分裂成两个第二信使分子，磷脂酰肌醇（IP3）和二酰基甘油（DAG），分别激活 PKC 和活化细胞内钙离子信号，从而促发细胞内的 MAPK、PI3K/JNK、整合素信号通路等信号级联反应^[200-202]。以上趋化因子以及细胞因子参与的信号通路对应了前述 KEGG 富集和 IPA 预测的通路。

先前的研究表明，人流感病毒感染巨噬细胞，诱导 TNF- α 、IFN α/β 、趋化因子 RANTES、MIP-1 α/β 、MCP-1、MCP-3 和 IL8、IL18、IL19 的释放^[203]。也有研究表明，IL-6 和趋化因子 CCL-2/MCP-1、CCL-4/MIP-1 β 、CXCL-8/IL-8、CXCL-9/MIG、和 CXCL10/IP-10 与人类 H1N1 和 H3N2 病毒的致病性相关，这些趋化因子也与死亡率相关^[1]。在肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞等最初被甲流感病毒感染后，少量中性粒细胞和大量血液单核细胞/巨噬细胞被募集到受感染的部位。随着病毒在上皮细胞中继续复制，感染扩散到巨噬细胞^[204]。在被感染的巨噬细胞中激活一系列炎症性 CC 趋化因子 CCL2、CCL3、CCL5、CCL11 和干扰素 γ （IFN γ ）反应性趋化因子 CXCL1、CXCL8、CXCL9 和 CXCL10^[138,205-207]。然而，它们可能对被感染的宿主有害，导致炎症和组织病理^[208,209]。CCL3、CCL5、CXCL10 可能通过诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的活化和迁移至流感感染部位而对肺病理产生影响^[210,211]，不受控制的促炎性细胞因子产生可能导致炎症部位发病。

以上分析说明朊蛋白在炎症反应中可能发挥重要作用并且可能具有双重的调节功能，这在很多病毒感染机体其他器官或组织的过程中也得到证实^[44,111-113,116,121,122,124]。到目前为止，仅有一篇文章研究了 PrP^c 在 IAV-H1N1 和 H3N2 感染中的作用，发现朊蛋白通过减少感染 IAV 的小鼠肺中的活性氧，帮助小鼠抵抗病毒的感染，并且认为 PrP^c 通过调节肺中的 Cu 含量激活抗氧化酶 Cu/Zn 超氧化

物歧化酶 SOD1 这一经典的神经调节通路来发挥抗氧化活性^[124]。由于这篇报道对 PrP^c 蛋白结合 Cu 离子活性的研究不足 (PrP^c 的 C 端也具有 Cu 结合活性)^[121], 并且该文章是从氧化应激的角度探讨 PrP^c 参与抗流感感染的作用^[1213], 而忽略了 IAV 感染诱导致病或致命的重要因素——“炎症风暴”方面的影响。本章研究认为 PrP^c 的 OR 区能够抑制趋化因子在 H7N7 感染后的上调表达, 在 IAV 感染诱导的炎症风暴中发挥保护作用; 而非 OR 区可能具有促进趋化因子上调表达的作用, 即促进或增强 H7N7-IAV 感染诱导的炎症反应。PrP^c 可能通过调节 TLR7/TLR4/TLR3-MyD88-MAVs/TRAF3-IRF3-TAK1-IFN α/β 等众多细胞因子以及趋化因子的表达水平来发挥双重调节作用。

3.5 小结

为了深入了解 PrP^c 在 H7N7 感染小鼠中的作用和机制, 我们比较了感染 H7N7-AIV 3、5、8、11 天后, 120KO 和 WT 小鼠以及 119KO 和 WT 的小鼠肺组织 (n=3~5) 转录组差异基因表达谱, 并采用 q-PCR 对炎症与免疫相关的细胞因子和趋化因子进行验证。我们发现 H7N7 感染小鼠肺后能够诱导细胞因子 TLR4、TLR7、NLRP3、MyD88、MAVs、TAK1、IRF3、Wnt3a、TGF β 、I 型干扰素 (IFN α/β) 和 II 型干扰素 (IFN γ)、IL6、TNF α 、Nrf2、CSF3、TREM2 以及 SOCS3、Trem12、TLR3、TRAF6 与 IRF7 和趋化因子包括 CCL2、CCL3、CCL11 和受体 CCR2 和 CCR3, CXCL2、CXCL3、CXCL10、CXCL11 和受体 CXCR3、CXCR4 和 CXCR6 以及 CX3CR1 分子。这些细胞因子和趋化因子在 OR 区缺失小鼠中表达量显著高于 WT 小鼠, 而在 PrP^c 完全缺失 (同时缺失 OR 区和非 OR 区) 后, 这些趋化因子相对于 WT 显著下调表达。因此我们认为 OR 区能够抑制细胞因子和趋化因子在 H7N7 感染后的上调表达, 在 IAV 感染诱导的炎症风暴中发挥保护作用; 而 PrP^c 的非 OR 区可能具有促进趋化因子上调表达的作用, 即促进或增强 H7N7-IAV 感染诱导的炎症反应。即朊蛋白在 H7N7-IAV 感染的小鼠肺损伤及炎症反应中具有双重调节作用。并且, 我们推测, PrP^c 可能通过调节 TLR7/TLR4/TLR3-MyD88-MAVs/TRAF3-IRF3-TAK1-IFN α/β 等众多细胞因子以及趋化因子的表达

水平来发挥双重调节作用。

宿主对 IAV 病毒感染的响应取决于病毒与宿主因子和肺微环境之间的相互作用^[170]，以及细胞类型和感染细胞的分化水平^[214]，因此，对 PrP^c 在 IAV 感染小鼠诱导的炎症反应中的调节作用机制包括其对其他炎症因子的调节作用需要进一步在细胞水平进行研究与分析。

第四章 PrP^c 在 H7N7 感染 MLE-12 细胞诱导的炎症反应中的作用

4.1 前言

甲型流感病毒感染宿主后, 主要引起肺损伤、肺部炎症等呼吸系统疾病, 严重时甚至引起急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。IAV 病毒主要感染小鼠肺泡巨噬细胞、呼吸道上皮细胞和肺泡上皮细胞, 这些细胞被病毒感染后招募巨噬细胞等其他细胞种群, 通过产生和释放诸如 IFN 的介质来形成促炎环境, 从而提高病毒的清除效率和改善疾病进展^[215,216]。上皮细胞是流感病毒感染的主要目标细胞研究显示肺泡上皮细胞和巨噬细胞通过增强炎症反应和免疫病理反应, 从而在 IAV 感染后诱导肺损伤中起重要作用^[217,218]。IAV 感染后肺泡上皮细胞屏障的功能和结构受损会导致肺水肿, 并诱导组织和细胞的先天免疫应答和适应性免疫应答^[219]。

体内实验的结果表明 H7N7-IAV 感染小鼠后, 小鼠存活率和体重大幅降低, 在肺中引起广泛且严重的组织病理变化; 但肺组织匀浆的病毒滴度很小, 并且 PrP^c 缺失小鼠与 WT 小鼠没有显著差别。根据这种出乎意外的对比, 我们认为病毒对肺泡上皮细胞、内皮细胞和肺组织的直接病毒损伤不太可能引起如此严重的病理损伤和致病性。结合第三章的差异基因表达谱分析, 我们推测可能是细胞因子和趋化因子的过度诱导参与了病毒对小鼠的致病机制, 并且前期实验数据表明这些炎性介质的表达变化可能受到 PrP^c 的调节。细胞水平上也有类似的细胞因子表达谱, IAV 感染细胞后诱导炎性细胞因子 IFN- β 、IL-6、RANTES、IL-12 和 IP-10 的高表达^[220], 肺泡巨噬细胞和肺泡上皮细胞是促炎性细胞因子的重要来源^[215,215]。病毒 (如高致病性 H5N1 和 2009 年流感大流行病毒 H1N1) 感染期间细胞因子的过度产生会导致肺损伤^[218,221,222]。机体应对流感病毒感染的机制错综复杂, 体内水平研究需要考虑的因素太多, 小鼠肺上皮细胞 (MLE-12) 是研究甲型流感病毒感染常用的细胞系之一^[223-225]。并且 PrP^c 能够在肺泡上皮细胞 AT1/2 和细支气管 Clara 上皮细胞中表达^[226,227]。

我们在体外水平上首先构建 AIV-H7N7 感染已转染 PrP^c 过表达质粒 mo-PrP^c-

pcDNA3.1 的 MLE-12 细胞，验证并观察 PrP^c 过表达对 H7N7 感染 MLE-12 的影响，及对病毒感染的调节作用，探究细胞水平上朊蛋白在 A 型流感病毒感染小鼠肺上皮细胞 MLE-12 的过程中发挥的作用。

4.2 实验材料与方法

4.2.1 实验材料

(1) 实验毒株与细胞

实验毒株 H7N7-CM2016，具体信息见 2.2.1。

小鼠肺上皮细胞 (murine lung epithelial cell line, MLE-12, Shanghai Suer Technology)。

质粒: moPrP^c-pcDNA3.1(+), 原核抗性氨苄青霉素(Ampicillin), 真核筛选标记新霉素 (Neomycin/G418), 强启动子 CMV 来调控外源基因表达。moPrP^c-pcDNA3.1(+)和 pcDNA3.1-GFP 载体结构见图 4-1。

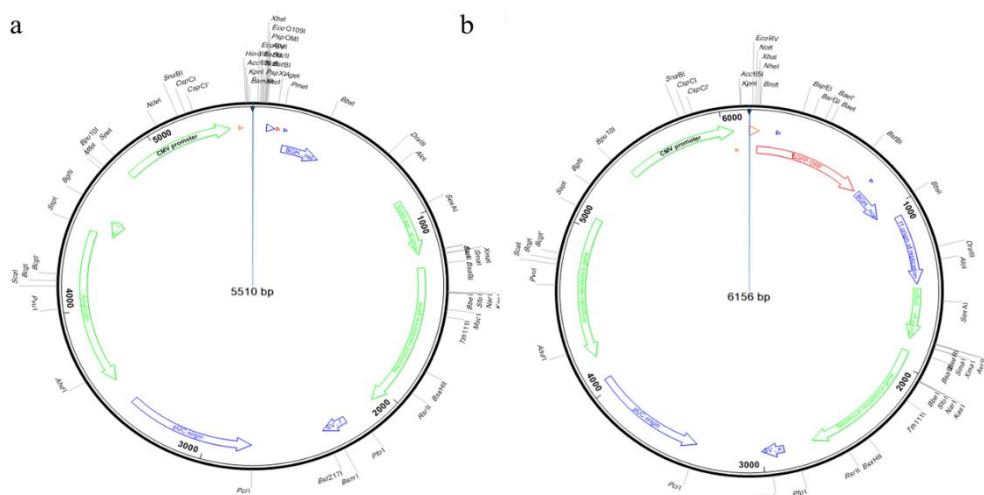


图 4-1. pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-EGFP 质粒图谱

Figure 4-1. pcDNA3.1 and pcDNA3.1-EGFP cloning vectors.

图 (a) 为 moPrP^c-pcDNA3.1(+)质粒图谱，图 (b) 为 pcDNA3.1-GFP 质粒图谱。

(2) 实验试剂与耗材

转染试剂为 GP-transfect-Mate(180718, 吉玛生物); Lipo-2000 Transfection

reagent (Thermo Fisher)、Biodragon Quickshuttle (博奥龙) 及 jetPRIM transfection reagent (Polyplus transfection)。质粒提取 (TIANGEN 无内毒素大提质粒试剂盒 DP117)。DMEM 完全培养基 (10%胎牛血清 FBS+1%双抗/1000U+DMEM); 病毒孵育液 (2%双抗+DMEM); 病毒维持液 (2%FBS+1%双抗/1000U+DMEM)。其余试剂与耗材同 2.2.2 (1)。

(3) 实验设备

细胞培养箱 (Thermo scientific, 3111), 荧光电子显微镜 (Life technologies, EVOS FL)。其余同 2.2.2 (2)。

4.2.2 实验方法

4.2.2.1 过表达质粒 moPrP^c-pcDNA3.1(+)的构建

(1) 小鼠 Prnp 基因的调取

① 小鼠肺 RNA 的提取, 同 2.3.4.3 (1) Trizol 法提取组织 RNA。

② 逆转录合成 cDNA, 同 2.3.4.3 (2)。

③ PCR 扩增 Prnp 基因, 小鼠 Prnp 基因 PCR 引物为 prnp-F: TGG CGA ACC TTG GCT ACT G; prnp-R: GTG CTG CTT GAT GGT GAT ATT GA。PCR 体系和条件如下表 4-1。

表 4-1. 小鼠 Prnp 基因扩增的 PCR 体系和程序

Table 4-1. PCR system and procedure for amplification of mouse Prnp gene.

试剂	体积/ μ L	终浓度	反应体系 (30cycles)
cDNA	1	100ng/ μ l	94°C 5min
prnp-F	1	10 μ M	{ 94°C 20s 55°C 20s 72°C 1min
prnp-R	1	10 μ M	
2×Taq-buffer	10		
补 ddH ₂ O 至	20		72°C 1min 12°C < 1h

④ 将获得的的 PCR 产物分别送生工测序和 1.2%琼脂糖凝胶电泳。

⑤ 目的条带割胶回收。采用 Promega (A9282) 试剂盒, 切下目的条带置于离心管中, 加入等体积膜结合溶液, 涡旋并 50-65°C水浴溶解至完全; 溶解的溶

液加入柱子中，配套放置收集管，室温孵育 1min，16,000g 离心 1min，弃废液，重复离心一次，彻底弃废液；加入 500 μ L 膜结合液，16,000g 离心 5min；弃收集管，换成新的离心管，开盖状态下离心 16,000g 1min；柱子中加 30 μ L ddH₂O，室温静置 1min，离心 16,000g 1min，得到纯化 PCR 产物。

⑥ 双酶切及产物回收，酶切位点为 Hind III/ BamH I，体系见下表 4-2。

表 4-2. 双酶切体系和程序

Table 4-2. Double enzyme cutting system and procedure.

试剂	体积/ μ L	反应条件
pcDNA3.1	5	37°C 水浴 2h
Prnp DNA	15	
Hind III	1	
BamH I	1	
ddH ₂ O 补至	50	

将得到的酶切产物按照⑤的流程回收。

⑦ 分子克隆—连接，连接体系如下表 4-3。

表 4-3. 分子克隆的连接体系和程序

Table 4-3. Linkage system and procedure of molecular cloning.

试剂	体积/ μ L	反应条件
pcDNA3.1	1	4°C 过夜连接
Prnp DNA	3	
2 $\times$ buffer	5	
T4-ligase	1	

⑧ LB 培养基制备，LB⁻为液体培养基，LB⁺为 LB⁻液体培养基中添加了氨苄霉素（300 μ L/500mL）。LB 培养基(1L)配方如下表 4-4。

表 4-4. LB 培养基配方表

Table 4-4. Composition of LB medium.

成分	质量/g	条件
胰蛋白胨	10	121°C 30min 灭菌
酵母提取物	5	

NaCl	10
琼脂粉(固体培养基)	15

灭菌后 60℃左右加 Amp⁺液体培养基为 LB⁺；固体培养基倒平板后存放于 4℃备用。

⑨ 转化。10μL 枪头-80℃预冷，水浴锅设为 42℃；取出连接体系，从-80℃冰箱迅速取出 E.coli 于冰上解冻 5min；使用预冷枪头向 90μL E.coli 中加入 10μL 连接体系，冰上反应 30min；LB⁺培养基 37℃预热，E.coli 体系 42℃热激 90s，冰上反应 3min；超净台上操作，将 E.coli 菌液加入 700 LB⁺培养基，摇床上 180r 摇 60-90min。

⑩ 涂平板。将菌液 3000rpm 离心 3min；弃部分菌液，余 200μL，用移液枪充分吹打混匀菌液，加入 50μL X-gal（购自生工，B541006。含 IPTG，X-gal：IPTG 体积比为 40:7）；混匀后加至 LB 固体培养基平板上，涂平板后置于培养箱倒置，37℃过夜培养。

⑪ 蓝白斑筛选，鉴定阳性单克隆重组质粒。挑取单菌落，用灭菌牙签挑取“白斑”单菌落放在含有 PCR 体系的 EP 管中轻沾一下，然后放入 LB⁺液体培养基中继续培养。

⑫ 菌落 PCR，体系和条件见下表 4-5

表 4-5. 菌落 PCR 的体系和程序

Table 4-5. The system and procedure of colony PCR.

试剂	体积/μL	反应条件
dNTP	0.8	94℃ 5min
10×buffer	1	94℃ 30s 53℃ 30s 72℃ 1min10s
Prnp-F	0.2	
Prnp-R	0.2	
Easy-Taq	0.2	72℃ 10min
ddH ₂ O	1	12℃ < 1h

得到的 PCR 产物跑电泳，条带正确者取菌液送测，测序引物，moPrP-F(Hind-III)：GTA AGC TTA TGG CGA ACC TTG GCT ACT G，moPrP-795R(BamH I)：ATG GAT CCT CAT CCC ACG ATC AGG AAG ATG 测序结果

blast 后取阳性克隆样品的菌液扩大培养，同时部分菌液甘油保存。

⑬ 提取重组质粒并测序。

选用 TIANGEN 无内毒素大提质粒试剂盒 DP117。首先将扩大培养的菌液分装到 50mL 离心管中离心，8000rpm 8min 尽量弃上清；向留有菌体沉淀的离心管中加入 8mL 溶液 P1(对应原始菌液 100mL)，涡旋彻底悬浮菌液沉淀；离心管中加入 8mL 溶液 P2，温和上下翻转 8 次，以充分裂解菌体，室温静置 5min 后观察到菌液清亮粘稠；离心管中加入 8mL 溶液 P4，温和上下翻转 8 次混匀，出现白色絮状沉淀，室温静置 10min；8000rpm 离心 8min 确保白色沉淀沉在管底，全部容易倒入过滤器 CS1 中，过滤后滤液收集在 50mL 干净离心管中；加入 0.3 倍体积的异丙醇，混匀后加入 CP6 吸附柱中，可分多次过柱；室温 8000rpm 离心 2min，弃废液；向 CP6 中加入 10mL 漂洗液 PW，8000rpm 离心 2min，弃废液；重复上一步；向 CP6 中加入 3mL 无水乙醇，8000rpm 离心 2min，弃废液；CP6 放回收集管中，8000rpm 离心 5min，将 CP6 中残余液体去掉；换新的收集管，吸附膜中心位置悬空滴加 1mL RNase-H₂O，静置 5min，8000rpm 离心 2min；洗脱液转入新的 1.5mLEP 管，检测质粒浓度和纯度(moPrP^c-pcDNA3.1 为 300ng/μL, A260/280 为 1.80)，随后置于-80℃保存。

⑭ 测序回来的序列，在酶切位点 Hind III/ BamH I 之间，NCBI blast 结果表明能够比对上小鼠 Prnp 的基因序列和蛋白序列，表明测序正确，成功获得 moPrP^c-pcDNA3.1 重组质粒。

4.2.2.2 H7N7 感染 MLE-12 细胞

(1) H7N7 病毒感染细胞后病毒含量的检测

① 细胞准备：7 个 T75 的细胞培养瓶，将 MLE-12 细胞胰酶消化传代，长至 80%左右时，消化并均匀传代至 36×T25 瓶内，每瓶加完全培养基（DMEM/F-12+10%FBS+1%双抗）4ml（以下简称全培），37℃，5%CO₂ 过夜培养。待细胞丰度长至 80-90%时备用。

② 吸弃细胞全培，PBS 洗涤两次，在 2.0mlEP 管中，加 1350μL DMEM/F-

12 稀释 200 μ l H7N7-AIV 尿囊液原液（双抗 4 $^{\circ}$ C 过夜处理并 200 μ m 滤芯过滤，含 $1.5 \times 10^{7.31.8}$ TCID₅₀，即 100 倍稀释尿囊液），混匀后加入 T25 瓶中，放在细胞培养箱孵育 1h，每隔 10min 轻轻晃动细胞培养瓶，时贴壁细胞充分接触病毒液。对照组细胞不加病毒同样处理。

③ 1h 后，去除含病毒的细胞培养液，1 $\times$ PBS 润洗两次，换 2 $\times$ 双抗、无 FBS 的 DMEM 培养基，对照组 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 培养继续。对照组做同样处理。

④自 0h 开始，每隔 2h，收取细胞 3 瓶作为 3 重复，弃细胞培养上清液，加入 600 μ l 细胞裂解液（QIAGEN RNeasy Mini Kit），用细胞刮刀刮取细胞待用，的时间点为 0h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h、36h、48h、72h，对照组细胞为阴性对照。

（2）采用 QIAGEN 试剂盒（QIAGEN RNeasy Mini Kit）提取细胞 RNA，步骤如下：

前述步骤（1）④中获得的细胞样品；每管加入 700 μ l 70%乙醇，涡旋混匀，低转速离心；取 700 μ l 混合液加入 RNeasy 柱子中，10000rpm 离心 15s，弃收集管；重复上步，直到全部离心完毕；加 700 μ l 缓冲液 RW1，10000rpm 离心 15s；加 500 缓冲液 RPE，10000rpm 离心 15s；加 500 缓冲液 RPE，10000rpm 离心 15s；空离，14000rpm，1min；将 RNeasy 柱子转移至新的 1.5mL RNase-free 的 EP 管中，加 35 μ L RNase -free 的水，静置 1min，10000rpm 离心 1min；检测 RNA 浓度和纯度，计算后续步骤中 RNA 用量。

（3）逆转录合成 cDNA。

采用逆转录试剂盒 Superscript III 逆转录试剂盒（Invitrogen），以 RNA 为模板于 PCR 仪上进行逆转录实验。逆转录反应体系（50 μ l）如下表 4-6。

表 4-6. 细胞 RNA 逆转录的体系和程序

Table 4-6. The system and procedure of cell RNA reverse transcription.

试剂	体积/ μ L	终浓度	反应体系（30cycles）
RNA	2.5-5	500-1000ng	} 65°C 5min On ice 1min
Random Hexmer	2.5	10mM	
dNTP	2.5		
RNase-free H ₂ O	17.5		
补 ddH ₂ O 至	50		
10×RT buffer	6.5		

MgCl ₂	10	25mM	}	25°C 10min
DTT	5	0.1mM		50°C 50min
RNase out enzyme	2.5			85°C 5min
SSIII RT enzyme	1.0			
RNase H	1.0			37°C 20min

得到 cDNA 原液，按照比例稀释 5-10 倍待用，-20℃冰箱保存。

(4) 实时荧光定量 q-PCR 检测病毒 M 基因含量变化。

采用 QuantiNova SYBR Green PCR Kit 试剂盒(QIAGEN)，步骤同 3.2.3(3)。

4.2.2.3 过表达质粒转染 MLE-12 细胞

(1) 细胞准备，MLE-12 丰度达 60%-80%时，经胰酶消化后加完全培养基，传代至 24 孔板，每孔 500μL，37℃，5%CO₂，过夜培养至各孔细胞丰度至 60-80%。预实验得知细胞贴壁密度为 60%时转染效果较好；

(2) 配置转染复合物。选用吉玛生物的 GP-transfect-Mate(货号 180718)。

① 将 GP-transfect-mate 转染试剂置于室温，轻轻混匀；

② 1.5mL 无菌 EP 管+50μL 无血清全培+转染试剂 GP-transfect-Mate，移液枪轻轻混匀，室温静置 5min；

③ 1.5mL 无菌 EP 管中+50μL 无血清全培+ moPrP-pcDNA3.1 或空质粒 pcDNA3.1-GFP 做阳性对照，以便后续观察转染效率。

④ 将 GP-transfect-Mate 培养基混合物滴加到 DNA 培养基混合物中，移液枪轻轻吹打混匀，室温静置 15-20min 后，立即转染。阴性对照组同样处理。

(3) 转染

① 静置时，给 24 孔板换液，每孔 400μL 预热的新鲜全培；

② 将 100μL 转染混合液加入孔中充分混匀，每孔终体积为 500μL，轻轻摇晃混匀。用量优化实验和不同时间点均设置 3 个复孔。

③ 37℃，5%CO₂ 静置培养 4-6h 后更换完全培养基。24-72h 收样，观察转染效率，确定最佳转染试剂用量和 DNA 用量后，q-PCR 检测 mRNA 表达。

(4) 转染试剂与 DNA 对应用量 (24 孔板，终体积 500μL)，见下表 4-7。

表 4-7.转染试剂与 DNA 用量

Table 4-7. Dosage of transfection reagent and DNA.

DNA / μg	DNA / μL	转染试剂/ μL
0.6	2	1.2
0.9	3	1.2
1.5	5	1.2
0.6	2	2.0
0.9	3	2.0
1.5	5	2.0
0.6	2	3.0
0.9	3	3.0
1.5	5	3.0

(5) 每次观察完毕, 各取 1 个 24 孔板, 收取培养液上清和胞浆, 提取 RNA, 方法参照 4.2.2.2 (2); 逆转录合成 cDNA 同 4.2.2.2 (3); Real-time q-PCR 检测同 3.2.3 (3)。

(6) 后续观察转染结果, 存在细胞凋亡现象, 转染效率最高为 30-40%, 研究推测为常用转染试剂并不适用于 MLE-12 细胞, 并不适用随后选择其他转染试剂 Lipo-2000 Transfection reagent (ThermoFisher)、Biodragon Quickshuttle 及 jetPRIM transfection reagent (Polyplus transfection)对比, 分别进行转染条件优化, 最后选择 jetPRIM transfection reagent 为转染试剂。基本流程为 50 μL jetPRIM buffer 稀释 0.5 μg DNA (24 孔板), 涡旋 10s 混匀, 微离心 10s, 加入 1 μL jetPRIM 转染试剂, 同样涡旋和微离心, 室温孵育 10min, 加入到含有血清的培养基中, 充分混合转染细胞, 4h 后换全培, 24-72h 观察荧光判断转染效果。

4.2.2.4 H7N7 感染已转染 moPrP-pcDNA3.1 的 MLE-12 细胞后检测基因表达

前述条件优化实验, 分别得到 H7N7 感染 MLE-12 后 12h 后病毒含量达到最高, 转染实验表明加入转染试剂和质粒, 24h 后 GFP 荧光强度最高, 转染效率达到 50%。根据优化结果, 我们进行以下实验, 流程见图 4-2。

(1) 实验分组和处理情况如下表 4-8。

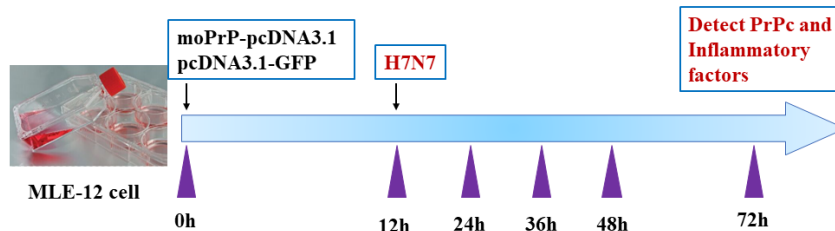


图 4-2. H7N7 与 moPrP-pcDNA3.1 干扰 MLE-12 基因表达实验流程图

Figure 4-2. Schematic diagram of moPrP-pcDNA3.1 transfection and H7N7 infection of MLE-12 cells.

表 4-8. 转染实验分组表

Table 4-8. Different groups of transfection experiment.

Groups	Vector	H7N7	Time to detect
A	moPrP-pcDNA3.1	+	24h
B	pcDNA3.1-GFP	+	24h
C	moPrP-pcDNA3.1	+	48h
D	pcDNA3.1-GFP	+	48h
E	moPrP-pcDNA3.1	+	72h
F	pcDNA3.1-GFP	+	72h
G	pcDNA3.1-GFP	—	72h
H	—	—	72h

(2) 细胞准备: MLE-12 细胞消化传代至 T25 细胞培养瓶 24 孔 (24 孔板), 分为 8 组, 每组 3 重复, 编号分别为 A1、A2、A3, B1、B2、B3 依次类推至 H1、H2、H3, 添加完全培养基 (DMEM/F-12+10%FBS+1×双抗) 至 500 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 过夜培养至细胞密度达到 60-70%;

(3) 450 μ L jetPRIM buffer 稀释 4.5 μ g DNA (moPrP-pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GFP 分别稀释), 涡旋 10s 混匀, 微离心 10s, 加入 9 μ L jetPRIM 转染试剂, 同样涡旋和微离心, 室温孵育 10min, 加入到含有血清的培养基中, 每孔 (50+0.5 μ g 质粒体积) μ L 充分混合转染细胞, 4h 后换成完全培养基, 阴性对照组 H 组用等量完全培养基作同样的处理。

(4) 转染 12h 后, H7N7-AIV 感染细胞。弃完全培养基, PBS 洗涤两次,

在 2.0mlEP 管中每 1350 μ L DMEM/F-12 稀释 200 μ L H7N7-AIV 尿囊液原液（双抗 4 $^{\circ}$ C 过夜处理并 200 μ m 滤芯过滤，含 $1.5 \times 10^{7.31.8}$ TCID₅₀），混匀后加入 24 孔板中，按照分组，每孔加 500 μ L。细胞培养箱孵育 1h，每隔 10min 轻轻晃动细胞培养瓶，使贴壁细胞充分接触病毒液。对照组细胞不加病毒做同样处理。1h 后，去除含病毒的细胞培养液，1 $\times$ PBS 润洗两次，换 2 $\times$ 双抗、无 FBS 的 DMEM 培养基，对照组 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 培养继续。对照组做同样处理。

（5）病毒感染细胞 12h、24h、48h 即转染后 24h、36h、60h，收取细胞。弃细胞培养上清液，每孔加入 100 μ l 细胞裂解液（QIAGEN RNeasy Mini Kit），用细胞刮刀刮取细胞待用。RNA 提取同 4.2.2.2（2）、逆转录合成 cDNA 同 4.2.2.2（3）；Real-time q-PCR 检测同 3.2.3（3）。

4.3 实验结果

4.3.1 H7N7 感染细胞后 M 基因表达评价

根据图 4-3，我们用 H7N7 毒株感染 MLE-12 细胞，并在感染后 0h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h、36h、48h、72h 收集细胞并用 q-PCR 方法检测了病毒保守基因 M 基因的表达水平，选用 ACTB（ β -actin）做内参基因，以阴性对照组为基准， $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算得到各组 M 基因的相对表达量。以 12h 为节点，H7N7 体外侵染小鼠肺上皮细胞后，病毒在细胞内的含量变化逐渐上升，到 12h 达到最高值，随后下降，到 72h 降低到略高于阴性对照组水平，表明病毒侵入细胞病毒基因组即开始复制并增殖，到 12h 细胞内病毒含量达到最高，并显著高于其他时间点，随后开始降低，病毒可能通过与细胞相互作用被清除到细胞外或裂解细胞后以出芽等方式离开细胞。我们选择 12h 为 H7N7 病毒感染 MLE-12 后取样检测的时间点。

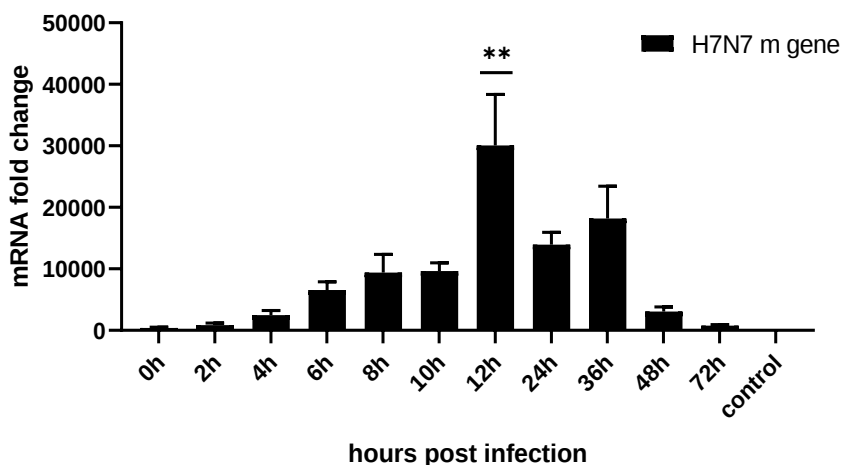


图 4-3. H7N7 感染 MLE-12 细胞后 M 基因表达量变化的动态评价结果

Figure 4-3. The expression level of M gene on MLE-12 post H7N7 infection at different time points. 图为 q-PCR 检测 H7N7-AIV 病毒保守基因 M 基因的相对表达量变化, 统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\text{mean} \pm \text{SD}$, * 表示与对照组之间的统计学差异, $**P < 0.01$ 表示感染病毒组与阴性对照组相比 M 基因表达差异极显著。

4.3.2 moPrP^c-pcDNA3.1 转染细胞后基因表达评价

我们采用双酶切与分子克隆技术将小鼠 prnp 基因插入到常用的真核表达载体 pcDNA3.1(+)上构建了 prnp 的过表达质粒。经测序、序列比对表明质粒构建成功。

为探究 moPrP^c-pcDNA3.1 重组质粒对 MLE-12 的转染效率, 我们采用 moPrP^c-pcDNA3.1 和带有 GFP 绿色荧光标签的阳性对照质粒 pcDNA3.1-GFP 同时转染细胞, 使用 jetPRIM transfection reagent 转染试剂, 并通过荧光显微镜连续 3 天观察荧光记录转染效率, 由图 4-4 可知, 在转染后 24h 荧光密度达到最高, 约为 50%, 这是在我们尝试了众多转染试剂, 包括 GP-transfect-Mate、Lipo-2000、Biodragon Quickshuttle 以及 jetPRIM transfection reagent 在 MLE-12 细胞上观察到的最高转染效率。随着时间的延长, 荧光强度逐渐降低, 到 72h 时荧光变得相当微弱。由此, 结合图 4-5, Prnp 表达量最高, 我们选择 24h 为转染效率最高的时间点, 供后续实验采用。

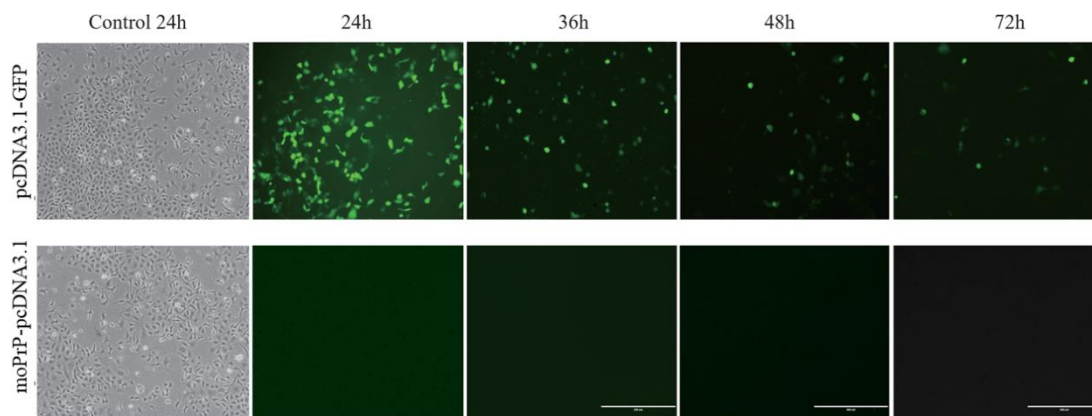


图 4-4. 质粒 moPrP^c-pcDNA3.1 与 pcDNA3.1-GFP 转染细胞效率评价

Figure 4-4. Evaluation of transfection of moPrP^c-pcDNA3.1 and pcDNA3.1-GFP on MLE-12 cell line.

图中分别为重组质粒 moPrP^c-pcDNA3.1 和阳性对照质粒 pcDNA3.1-GFP 转染 MLE-12 细胞后, 在 24h、36h、48h、72h 时细胞状态和荧光图。

moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞, 采用 q-PCR 检测了 PrP^c 蛋白在 12h、24h、36h、60h 时 mRNA 水平的表达量变化, 如下图 4-5 所示, 可以看出, 阳性对照质粒 pcDNA3.1-GFP 转染细胞对 Prnp 基因的表达基本无影响, 基于此我们排除空质粒转染 MLE-12 细胞对细胞中基因表达含量变化的影响。

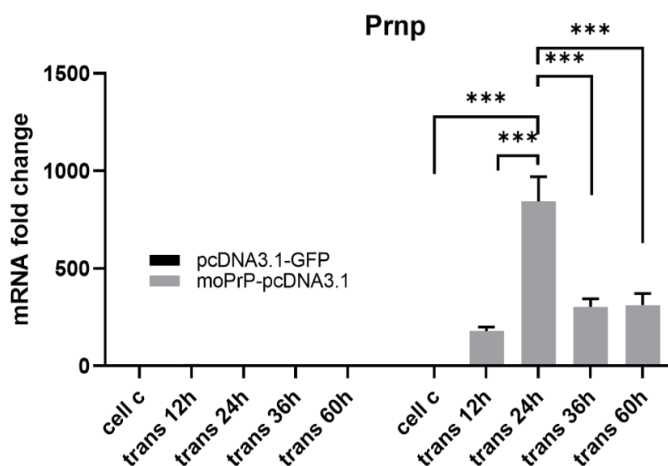


图 4-5. 过表达质粒 moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 后不同时间点 Prnp 基因表达变化

Figure 4-5. Gene expression of prnp at different time post transfection of moPrP^c-pcDNA3.1 on MLE-12 cell line.

图为 moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 后不同时间 Prnp 基因的表达变化, 由 q-PCR 检测, 统计方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, mean $\pm$ SD, * 表示与两组之间的统计学差异, ***P<0.001 表示两组相比 Prnp 基因表达差异极显著。

4.3.3 moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞后基因表达评价

随后我们用 moPrP^c-pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GFP 质粒转染 MLE-12 细胞, 12h 后用 H7N7 感染细胞, 在感染后 12h、24h、48h (即转染后 24h、36h、60h) 检测病毒 M 基因、Prnp 以及其他炎性因子的表达量变化, 探讨 PrP^c 过表达对 H7N7 感染 MLE-12 细胞后诱导细胞炎症应答的影响。

首先如图 4-6 (a) 右侧为 H7N7 感染细胞后 12h、24h、48h M 基因表达量的变化, 结合图 4-3 表明, 感染病毒后细胞中 M 基因表达水平极显著上调表达。图 4-6 (a) 左侧为过表达质粒转染细胞后, 病毒感染细胞后不同时间 M 基因的表达量, 相较于空白对照细胞显著上升, 转染后 24-60 h (即感染病毒后 12-48 h), M 基因水平显著降低 (相对表达量从 800 降低到 700, 再到 200 fold change), 到 60h 降低了 4 倍。相对于受到 H7N7 侵染的对照组细胞, 每个对应的时间点, 转染了过表达质粒以及受到 H7N7 感染的细胞, M 基因都是显著低表达的。由此我们推测 Prnp 基因的过表达可能下调了 M 基因的表达, 即抑制了细胞内 H7N7 病毒的复制和扩增。

图 4-6 (b) 为过表达质粒转染细胞后, 又感染 H7N7 病毒, 不同时间 Prnp 基因表达水平。由图 4-5 可知, moPrP^c-pcDNA3.1 质粒转染后, 诱导细胞过表达 Prnp 基因, 质粒转染 12h 后, H7N7 侵染细胞 12h 后, 相对于仅转染质粒 (图 4-5) 朊蛋白编码基因上调表达, 36h 后表达量下降至较低水平, 到转染后 60h, Prnp 基因表达回升到与仅 moPrP^c-pcDNA3.1 刺激的同一表达水平。推测在 moPrP^c-pcDNA3.1 诱导 MLE-12 细胞过表达 Prnp 的基础上, 添加 H7N7 感染细胞 12h 内, 能够刺激 Prnp 基因再次上调表达, 细胞内过度表达的 Prnp 基因与 AIV 病毒颗粒互相作用, Prnp 抑制病毒增殖, 下调 M 基因表达; 之后 12h 内, 病毒含量继续降低, 同时 Prnp 表达量显著下调; 随着感染时间继续延长, 病毒含量继续减少, Prnp 基因则恢复表达, 到 60h 基本恢复到与仅 moPrP^c-pcDNA3.1 转染细

胞诱导过表达一致的水平。

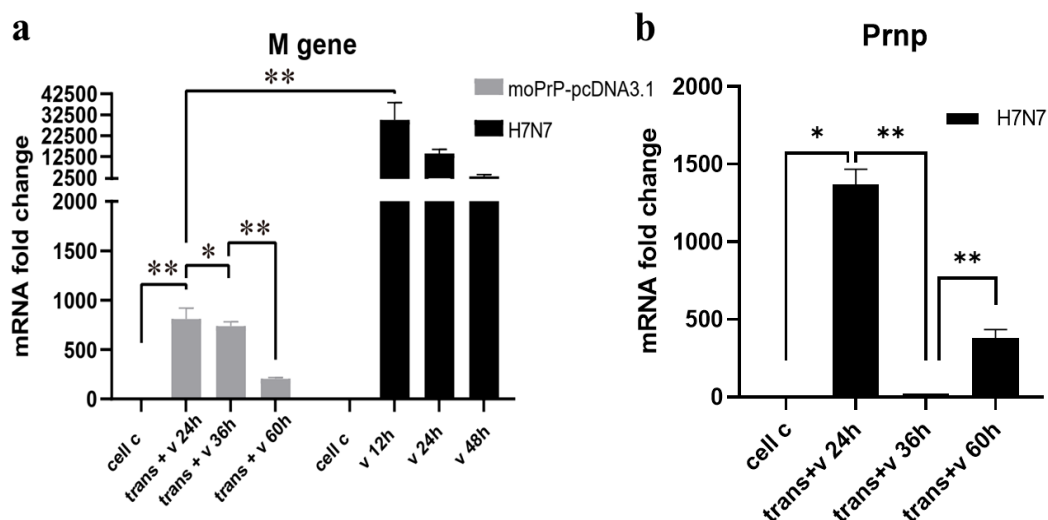


图 4-6. H7N7 感染 moPrP^c-pcDNA3.1 转染的 MLE-12 后 Prnp、M 基因表达量变化

Figure 4-6. Gene expression at different time post transfection of moPrP^c-pcDNA3.1 and H7N7 infection on MLE-12 cell line.

图 4-6(a)左侧为 moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞 12h 后, H7N7 侵染细胞, 不同时间点 M 基因的表达变化; 右侧为仅 H7N7 感染 MLE-12 后不同时间 M 基因的表达量变化。

4-6(b)为 moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞 12h 后, H7N7 侵染细胞, 不同时间点 Prnp 基因的表达变化。由 q-PCR 检测, 统计方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\text{mean} \pm \text{SD}$, * 表示与两组之间的统计学差异, * $P < 0.05$ 表示两组对比基因差异显著, ** $P < 0.01$ 表示两组相比该基因表达差异极显著。

随后我们检测了 IFN- β 、TLR3、TNF- α 和 IL-6 在 mRNA 水平的表达变化。后两个细胞因子在不同时间点的表达变化无显著差异。由图 4-7 (a, b) 可知, 转染 moPrP^c-pcDNA3.1 后诱导 Prnp 基因过表达, 并且在转染后 24h Prnp 的过表达水平最高。与之相关的是, 在转染质粒 24h 后干扰素 β (IFN- β) 和 TLR 样受体 3 (TLR3) 的表达量显著上调, 随后又明显下降到基本水平线, 说明过表达的 Prnp 能够在 MLE-12 中诱导 IFN- β 和 TLR3 显著上调表达, 并且上调表达与否可能与 Prnp 过表达的程度有关。图 4-7 (c) 展示了在 moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞 12h 后, H7N7 感染细胞, 12h 后, 过表达质粒诱导上调表达的 IFN- β 在 moPrP^c-pcDNA3.1 和 H7N7 的共同作用下显著下调, 在随后的 36h 和 60h 表达水平也都低于空白细胞对照组。

与之相反的是,图 4-7 (d) 中 TLR3 在转染 24h 后表达量显著上升,并且上调水平显著高于只有 moPrP^c-pcDNA3.1 作用的调节。此时我们假设,过表达的 Prnp 诱导的 IFN β 和 H7N7 病毒感染诱导的 IFN β 作用结合在一起时,结果是显著降低 IFN β 水平的,可能是过表达的 Prnp 能够抑制上皮细胞中病毒的复制,也能够负向调节病毒诱导的 IFN β 基因的上调表达。Prnp 与 H7N7 共同作用的结果是更加显著的上调 TLR3 的基因表达水平,其中具体的作用机制有待于进一步研究。

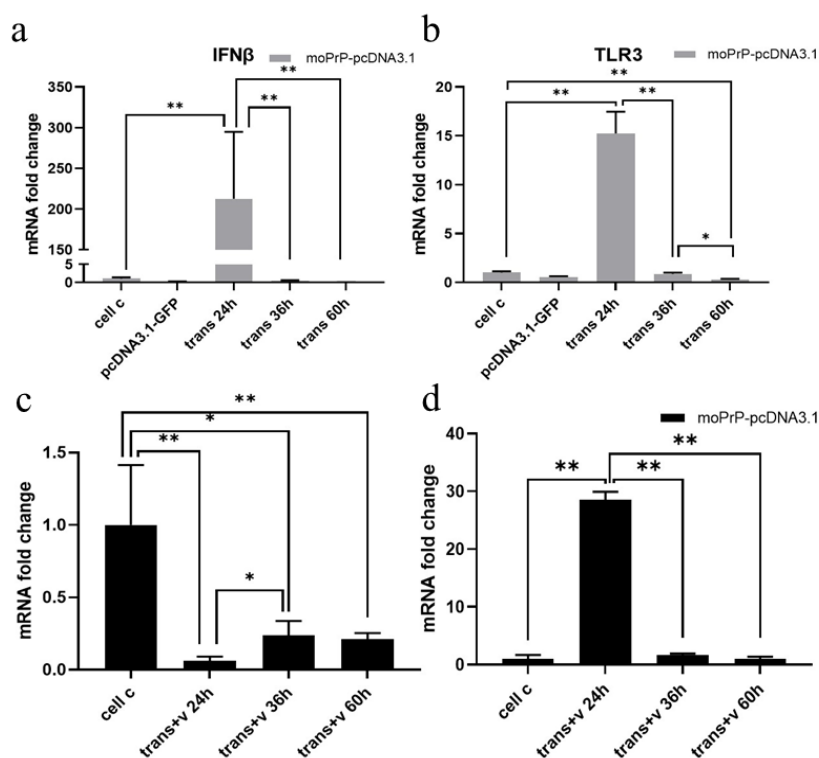


图 4-7. moPrP-pcDNA3.1 转染及 H7N7 感染干扰 MLE-12 的基因表达

Figure 4-7. Interference of gene expression by transfection of moPrP-pcDNA3.1 and H7N7 infection on MLE-12 cell line.

图 4-7 (a, b) 为 moPrP-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞不同时间点 IFN β 和 TLR3 表达量变化。图 4-7 (c, d) 为 H7N7 侵染已转染 moPrP-pcDNA3.1 的 MLE-12 细胞后不同时间点 IFN β 和 TLR3 表达量变化。由 q-PCR 检测, 统计方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\text{mean} \pm \text{SD}$, * 表示与两组之间的统计学差异, $*P < 0.05$ 表示两组对比基因差异显著, $**P < 0.01$ 表示两组相比该基因表达差异极显著。

4.4 讨论

H7N7 病毒感染小鼠，在小鼠体内导致高致病性、高死亡率和严重肺部病理损伤，病毒感染 PrP^c OR 区缺失小鼠会增加死亡率，加重肺部损伤；而感染 PrP^c 完全缺失的小鼠后，致病性则会减轻，我们推测 PrP^c 在小鼠体内的不同表达水平对小鼠感染 IAV-H7N7 诱导的损伤中发挥不同的作用。随后我们感染病毒的小鼠肺在不同时间取样并进行转录组测序，对转录组中差异表达基因进行一系列分析后得知，正常细胞朊蛋白编码基因 Prnp 在病毒感染小鼠肺后不同的时间的病毒感染小鼠和对照组小鼠以及朊蛋白缺失小鼠和野生型小鼠之间都发生差异表达，同时 IAV 感染诱导肺部强烈炎症反应的相关免疫因子、趋化因子差异表达显著；以及抗病毒反应、细胞信号调节、宿主免疫等信号通路显著富集。我们认为朊蛋白编码基因 Prnp 参与调节 IAV 感染诱导的小鼠肺损伤和高致病性相关的“炎症风暴”。但 Prnp 具体的作用机制尚不清楚，需要在细胞水平进行进一步的研究。

呼吸道上皮细胞是流感病毒的主要靶标。本章在体外水平构建 Prnp 过表达质粒 moPrP^c-pcDNA3.1 转染 MLE-12 细胞，随后用 H7N7 感染细胞，探究 Prnp 过表达在 H7N7-AIV 感染小鼠肺上皮细胞 MLE-12 的过程中发挥的作用。实验结果表明 moPrP^c-pcDNA3.1 转染细胞后 Prnp 基因过表达，并且在转染后 24h 表达量达到最高。而在 H7N7 侵染细胞后，在感染的不同时期，病毒与 Prnp 互相作用的结果不同，感染早期诱导 Prnp 基因继续上调表达；随后，Prnp 抑制病毒扩增，持续降低 M 基因水平；之后，Prnp 表达量发生显著下降后又恢复其过表达水平。说明在 IAV 感染 MLE-12 的不同时期，PrP^c 在细胞内发挥不同的作用，具有阶段依赖性。病毒感染诱导细胞内 Prnp 显著上调表达，属于宿主细胞应对病毒感染的炎症响应；12h 后，外源转染进入细胞的 PrP^c 在细胞中过表达，能够反过来下调病毒基因的表达，抑制病毒复制，发挥抗病毒感染，保护细胞的作用。尽管此时作为抗病毒因子的 Prnp 的作用机制仍有待探究。

由此，我们认为，首先，PrP^c 在 IAV 感染小鼠肺上皮细胞的不同时间或不同阶段发挥不同的作用。与这一点类似的是，外源细胞因子刺激能够上调 PrP^c 的表达，然后 PrP^c 的激活和表达会进一步上调促炎症因子的表达，促进细胞凋亡^[101,102]，

PrP^c 作为促炎症因子起作用。而在感染后的恢复期, PrP^c 上调 IL10 等抗炎症因子的水平, 发挥抗炎症作用^[103,104]。在 LPS 感染过程中 PrP^c 的表达既受到细胞因子 TGF β 和糖皮质激素的调节, 也受下丘脑-垂体-肾上腺的神经调节^[103]。

其次, 不同表达水平的 PrP^c 对 IAV 病毒的复制发挥不同的调节作用。与这一点一致, 也研究发现 PrP^c 的缺失有助于 HSV 潜伏期建立^[112], PrP^c 表达则会使 HSV 在神经细胞中有效复制^[113], PrP^c 过表达则会抑制病毒的复制, 但过表达小鼠感染 HSV 后致病性更高是, 死亡率更高^[113,115]。Nakamura 等人的研究显示 PrP^c 小鼠大脑细胞中对柯萨奇病毒 B3 (CVB3) 更敏感, 病毒复制更有效, 并促进细胞凋亡; 而外源 PrP^c 转染到缺失朊蛋白的细胞则会抑制该病毒的复制^[120]。2001 年 Gabus 研究发现 PrP^c 可能具有影响病毒复制和组装的 RNA 结合与分子伴侣特性^[116], PrP^c 蛋白 N 端区域具有逆转录病毒编码的核酸结合蛋白 (NC) 类似的特性, 对核酸有很强的亲和力, 表现出与这些病毒的 NC 蛋白非常相似的分子伴侣特性, 能够参与逆转录病毒如 HIV-1、MoMuLV 以及猫免疫缺陷病毒 (FIV) 的核酸代谢^[228], 从而干扰病毒复制^[116]。为了更全面的了解 PrP^c 的不同表达水平在 IAV 感染细胞中的作用, 后续有待构建 Prnp 缺失质粒来探究其对 IAV 病毒感染细胞的干扰。

另一方面, 过表达的 Prnp 能够激活细胞中细胞因子 IFN β 和 TLR3 的表达; IAV 病毒感染激活细胞炎症因子, 上调细胞中 Prnp、TLR3 的表达。感染中期, 病毒与过表达的 Prnp 基因叠加作用的结果是下调 IFN β 与 Prnp 的表达但仍然上调 TLR3 的表达水平。这个过程中病毒与 PrP^c, 病毒与细胞因子以及 PrP^c 与细胞因子之间的相互作用机制尚不清楚。

我们知道 I 型干扰素是 IAV 感染诱导固有免疫中关键的抗病毒因子^[229], 会限制病毒的复制和感染, 许多 IAV 病毒感染机体或 MLE-12 细胞、A549 细胞后能够诱导 IFN β 的强表达^[230], 包括 H5N1^[192]、H3N2^[231]、H7N9^[232]、H7N7^[233-235]; 并且病毒诱导的 IFN β 的激活依赖于 RIG-I 基因 (视黄酸诱导基因 I)^[236], RIG-I 信号通过上调转录因子 IRF-3/7、NF- κ B 和 ATF-2/c-jun 以及 100 多个 I 型干扰素刺激基因的表达来激活 IFN β 基因的表达^[237-239]。同时, 细胞病毒的 NS1

蛋白能够很好的抑制 IFN β 的诱导^[192], 说明 IFN- β 会受到 NS1 的拮抗^[240]。如果上调的 IFN β 没有被病毒处理或抑制, 被激活的 IFN β 能够上调 JAK 和 STAT 通路, 诱导上百个 IFN 刺激基因 ISGs 的表达^[241], 抵消 IAV 的复制和传播。会导致感染细胞和旁边细胞建立抗病毒状态, 有效抑制病毒复制^[242]。季节性流感病毒一般通过 NS1 蛋白和 RNA 聚合酶聚合物 (PB1、PB2、PA 聚合物)^[243–245]抑制 IFN β 基因的激活 (抑制 RIG-I 通路、NF- κ B 通路、干扰素调节因子 3 (IRF-3)、c-Jun 激酶和 AP-1 转录因子、线粒体抗病毒信号蛋白 MAVS 等多种途径) 来实现有效复制^[236,237,246–252]。另外, 2013 年 Wolff 的研究证明了肺泡巨噬细胞分泌的 IFN β 通过诱导促凋亡因子 TNF 相关的凋亡诱导配体途径 (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 显著促进了 IAV-H1N1 诱导的肺泡上皮细胞的损伤^[253], 发现 IFN- β 的表达和细胞凋亡的诱导与病毒生长呈负相关^[254]。研究表明 Prnp 的缺乏会延迟 CVB3 病毒诱导的 IFN 的激活, 使得病毒复制增加和细胞凋亡, 而转染 Prnp 到缺失细胞后, Prnp 在小鼠脑细胞 HpL3-4 中过表达, I 型 IFN 水平升高, 细胞凋亡减少^[120]。研究表明 PrP^c 能够与 HIV-1 病毒在体内相互作用, 干扰 HIV-1 的复制和组装^[255], 并可能通过诱导神经元中 IFN 高水平表达介导增加神经细胞的抗病毒活性^[120]。

参考以上分子调节机制, 第三章体内转录组分析表明 IRF7 为 KO 与 WT 组在病毒感染后不同时间的差异表达基因, 与本章实验结果结合在一起, 我们推测过表达质粒转染细胞后, Prnp 上调 IFN β 的表达; H7N7 感染小鼠肺上皮细胞, 上调 Prnp 的表达 (在 Prnp 过表达转染细胞的基础上) 并可能通过 RIG-I/IRF7 通路调节 IFN β 的上调表达, 病毒感染 12h 后, 被 Prnp 上调的 IFN β 又被病毒 NS1 蛋白和 RNA 聚合酶聚合物 (PB1、PB2、PA 聚合物) 等抑制, 显著下调, 其中介导 IFN β 下调的通路, 可能有 RIG-I/NF- κ B/IRF-3/c-Jun/MAVS^[236,237,246–252]等参与。这有待于我们进一步研究。与此同时, 病毒 M 基因也在显著降低, 说明过表达的 Prnp 抑制病毒复制, 具体机制尚不清楚, 我们可以确定的是, Prnp 介导上调表达的 IFN β 不参与抗病毒作用。

过表达的 Prnp 对感染细胞的 H7N7 具有负调节作用, 而 Prnp 对 IFN β 和

TLR3 的调节作用可能跟 PrP 的过表达水平相关,当 Prnp 过度表达达到一定程度时(本研究是上调表达 1000 倍以上),才能显著诱导细胞因子 IFN β 和 TLR3 的表达升高(图 4-7a, b)。

先天免疫受体 Toll 样受体 3 (TLR3) 介导 IAV 诱导的急性肺炎^[256,257]。TLR3 及其信号传导相关分子 TRIF 在呼吸道上皮细胞对 IAV 的免疫应答中起关键作用^[258], TLR3 有助于呼吸道上皮细胞对 IAV 感染的免疫响应,介导 MAPK/PI3K/Akt/TRIF 并能诱导转录因子 IFN 调节因子 3 (IRF3) 产生^[259],启动 IFN β 转录^[260],上调 IFN β ^[257],激活促炎因子,引起促炎反应^[261]。TLR3 缺陷小鼠表现出更高的死亡率,并伴随 IAV 引起的炎症反应减弱^[262],小鼠对病毒感染的适应性反应也大大降低,说明 TLR3 具有保护小鼠及抗病毒作用。在小鼠肺和肺上皮细胞,TLR3 组成型表达,有研究证实通过 TLR3/TRIF 介导的磷酸化 NF- κ B 的活性以及 AP-1 而减轻肺组织炎性病理损伤及增强抗体的抗病毒能力^[191,257,263]。

根据以上研究进展,TLR3 具有抗甲型流感病毒作用,过表达的 Prnp 能有显著上调 TLR3 的表达水平,病毒感染 MLE-12 细胞 12h 后,TLR3 依然显著上调表达,而病毒复制显著降低,我们推测 Prnp 可能通过诱导 TLR3 的显著上调表达来抑制病毒复制,有助于细胞抵抗病毒,减轻细胞损伤和炎症反应。参与这一作用的信号通路有待进一步研究。

4.5 小结

病毒感染肺泡上皮细胞,能够有效的引发复制,诱导炎性细胞因子表达水平增加,同时细胞活力降低、细胞增殖减少^[176]。上皮细胞产生高水平的细胞因子、趋化因子可能是病毒感染小鼠出现严重肺炎的原因^[203,205,207,264]。体内实验和基因表达谱分析表明 PrP^c 在小鼠体内的不同表达水平在 IAV-H7N7 诱导的损伤和炎症中发挥不同作用。我们认为朊蛋白编码基因 Prnp 参与调节 IAV 感染诱导的小鼠肺损伤和高致病性相关的炎症反应,但作用机制仍不清楚。本章对小鼠肺上皮细胞感染 H7N7 诱导的炎症反应中, PrP^c 发挥的作用进行探究。MLE-12 细胞转染 Prnp

过表达质粒moPrP^c-pcDNA3.1 12h后,用H7N7感染细胞,检测不同时间病毒M基因、Prnp、IFN β 和TLR3的表达变化。我们推测,而Prnp对IFN β 和TLR3的调节作用可能跟PrP^c编码基因的过表达水平相关,当Prnp过度表达达到一定程度时(本研究是上调表达1000倍以上),才能显著诱导细胞因子IFN β 和TLR3的表达升高。

我们发现,过表达质粒转染细胞后,Prnp上调IFN β 和TLR3的表达,并在转染后24h变化最显著。H7N7感染小鼠肺上皮细胞,在Prnp过表达的基础上,上调Prnp的表达;病毒感染12h后,被Prnp上调的IFN β 又被病毒NS1蛋白和RNA聚合酶聚合物(PB1、PB2、PA聚合物)等抑制,显著下调。其中,可能有RIG-I/NF- κ B/IRF-3/c-Jun/MAVS等分子参与介导IFN β 下调。与此同时,病毒M基因也在显著降低。说明过表达的Prnp抑制病毒复制,我们认为IFN β 不参与帮助Prnp发挥抗病毒作用。在病毒感染MLE-12细胞12h后,TLR3依然显著上调表达,而病毒复制显著降低,我们推测Prnp可能通过诱导TLR3的显著上调表达来抑制病毒复制,介导细胞抵抗病毒,减弱炎症反应。

与前面PrP^c在体内应对IAV-H7N7感染发挥的作用对比来看,OR区缺失小鼠致病性加重,相对于表达PrP^c的小鼠(WT小鼠)而言,PrP^c完全缺失则导致小鼠致病性和死亡率降低。表明,OR区可能具有抗IAV-H7N7病毒感染的作用,而PrP^c缺失可能导致炎症反应大幅减弱,免疫应答反应发生缺失或降低。结合转录组分析结果,PrP^c可能作为一个重要的宿主因子,参与多条IAV诱导炎症和免疫应答信号通路,在H7N7病毒感染后,在上游参与诱导广泛而迅速的过度炎症反应。有趣的是,与PrP^c完全缺失的结果形成对比,在MLE-12细胞水平上,病毒诱导PrP^c及细胞因子IFN β 和TLR3显著上调表达,过表达的PrP^c能够抑制病毒复制,减弱细胞损伤和炎症。进一步分析表明,PrP^c可能通过TLR3依赖的通路而非IFN β 下调M基因水平,抑制病毒复制,发挥抗病毒作用。

第五章 总结与展望

甲型流感病毒 (IAV) 感染并入侵宿主呼吸道和肺上皮细胞, 随后病毒增殖并在宿主体内传播, 通过PAMP与细胞中的PRR相互作用诱导细胞因子/趋化因子的产生, 激活相应的免疫应答和炎症反应。IAV对宿主细胞的致病性依赖于病毒的复制和宿主免疫反应之间的平衡。当IAV诱导的免疫应答或炎症反应失调时, 会导致细胞因子过度产生, 形成“细胞因子风暴”, 这可能是IAV致病性或致命性感染的重要原因之一。流感病毒通过突变和重组产生更多亚型并广泛传播, 这使它们能够适应鸟类和包括人类在内的不同哺乳动物宿主^[12,16]。跨越动物-人的物种屏障的新型AIV的出现^[14], 使流感大流行成为潜在威胁^[19]。

正常细胞朊蛋白 (PrP^c) 作为细胞表面的膜糖蛋白, 最初仅被认为与朊病毒疾病有关。近年来出现许多有趣的研究表明朊蛋白不仅参与神经保护, 而且在细胞增殖、细胞凋亡、信号转导、肿瘤免疫。过去几年中, 许多研究揭示了 PrP^c 的表达与病毒复制之间的密切关系。多数情况下 PrP^c 的表达可以抑制病毒的复制, 这暗示 PrP^c 可能参与宿主的病毒防御途径^[111], 充当宿主细胞防御因子。有研究表明 IAV 感染肺上皮细胞, 诱导炎性细胞因子产生, 而导致过量 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (ROS) 产生, 使被感染的上皮细胞凋亡。PrP^c 可以同转移结合在 N 端 OR 区的铜离子来调节 SOD1 的酶活性, 减轻感染细胞中的 ROS 负担, 最终保护细胞免于凋亡^[124]。

为了探究PrP^c在IAV病毒感染诱导的炎症反应中的作用以及病毒与PrP^c等宿主因子之间的相互作用, 本课题借助近交系C57BL/6小鼠与小鼠肺上皮细胞MLE-12来研究体内和体外水平上PrP^c在H7N7-IAV诱导的免疫应答和炎症中的作用, 并得出一些有意思的结论。

5.1 主要结论

(1) 体内水平上, 敲除朊蛋白 N 端 OR 区后, 相对于 WT 小鼠, PrP^c 的 OR 区缺失小鼠更易于感染 H7N7 病毒, 并且小鼠肺中细胞因子和趋化因子的表达水平显著高于 WT 小鼠。推测朊蛋白 OR 区可能对小鼠抗病毒 H7N7 感染具有保护

作用。这与 Chida 的研究结果一致^[123], PrP^c N 端八肽重复区多肽可能具有抗 IAV 感染, 有助于提高存活率和维持体重, 减轻肺损伤, 降低肺部细胞因子和趋化因子的表达水平以及肺部炎症反应保护小鼠免受致命性感染的作用。

(2) 体内水平上, 相较于 WT 小鼠, PrP^c 完全缺失 (同时缺失 OR 区和非 OR 区) 小鼠在 H7N7 感染后死亡率降低, 体重损失减轻, 病毒诱导的致病性减弱; 肺中细胞因子以及趋化因子的表达水平显著低于 WT 小鼠。表明 PrP^{-/-} 小鼠更不易感染病毒。肺转录组差异基因表达分析表明病毒有效的引发肺部感染, 诱导了大量的基因显著上调表达。我们认为, PrP^c 的非 OR 区可能具有促进趋化因子上调表达的作用, 即促进或增强 H7N7-IAV 感染诱导的炎症反应。即朊蛋白在 H7N7-IAV 感染的小鼠肺损伤及炎症反应中具有双重调节作用。并且, 我们推测, PrP^c 可能通过调节 TLR7/TLR4/TLR3-MyD88-MAVs/IRF3-TAK1-IFN α/β 等众多细胞因子以及趋化因子的表达水平来发挥双重调节作用。

(3) 体外 MLE-12 细胞水平, 与 PrP^{-/-} 形成对比, 过表达的 Prnp 基因可能下调病毒 M 基因的表达, 抑制细胞内 H7N7 病毒的复制和扩增。过表达的 Prnp 能够显著诱导细胞因子 IFN β 和 TLR3 的表达升高, 这种调节作用可能跟 Prnp 的过表达水平相关, 当 Prnp 过表达达到一定程度时 (本研究是上调表达 1000 倍以上), 才能显著诱导 IFN β 和 TLR3 的高表达。在 H7N7 侵染细胞后的不同时期, 病毒与 Prnp 互相作用的结果不同, 感染早期, 病毒诱导 Prnp 基因显著上调表达; 随后, Prnp 持续下调 M 基因水平, 抑制病毒扩增; 进一步分析表明, PrP^c 可能通过 TLR3 依赖的通路而非 IFN β 来下调 M 基因水平, 抑制病毒复制, 发挥抗病毒作用。

综合上述, 本研究首次探究了 PrP^c 在 H7N7 感染小鼠诱导的肺损伤与炎症因子反应中的作用。研究表明, 朊蛋白 PrP^c 的不同表达水平 (或不同功能域) 在 IAV-H7N7 病毒感染过程中具有不同的作用。OR 区缺失的 PrP^c 更易于感染 H7N7 病毒, 表明 PrP^c N 端 OR 区可能具有抗甲型流感病毒感染的作用, 能够保护小鼠免受 IAV 致死性感染的作用。PrP^c 缺失 (PrP^{-/-}) 小鼠则更不易感染病毒。我们认为, PrP^c 蛋白的非 OR 区 (可能包含其他功能域) 具有促进 H7N7 病毒感

染的作用,可能促进细胞因子过度分泌,加剧炎症反应,诱导细胞凋亡,导致小鼠更严重的肺损伤和致病性。并且,我们推测,PrP^c可能通过调节TLR7/TLR4/TLR3-MyD88-MAVs/TRAF3-IRF3-TAK1-IFN α/β 等众多细胞因子以及趋化因子的表达水平来发挥双重调节作用。细胞水平上,我们认为过表达的PrP^c可能通过TLR3依赖的通路而非IFN β 抑制IAV-H7N7病毒复制,在MLE-12上发挥抗病毒作用。

总的来说,本研究的结果为我们全面了解PrP^c在病毒感染中的作用提供了重要信息和证据,拓宽了我们对正常细胞朊蛋白生理功能的认识,为进一步探究PrP^c能否成为宿主抗病毒靶分子提供了科学依据。

5.2 后续研究建议

本研究从体内、体外以及肺mRNA表达谱层面对PrP^c在甲型流感病毒感染中的作用展开了研究,也取得了一些十分有趣的研究结果,然而,想要了解PrP^c在IAV病毒感染中更加精确的调控机制,仍有待于进一步研究。

首先,我们发现缺失OR区PrP^c更易于感染H7N7病毒。推测朊蛋白OR区可能对小鼠抗病毒H7N7感染具有保护作用而完全敲除PrP^c则会减轻病毒感染。这里我们推测有两种可能,一种是PrP^c缺失可能导致免疫应答反应发生缺失或缺陷,导致IAV感染小鼠诱导的炎症风暴减弱,从而致病性降低,存活率提高。另一种可能是,PrP^c蛋白的另外一段氨基酸序列组成的多肽结构域,具有促进IAV诱导的促炎症因子上调,增强炎症反应,从而导致小鼠更严重的肺损伤和致病性。仅从H7N7病毒感染小鼠获得的信息有限。因此,可以构建PrP^c过表达小鼠以及朊蛋白其他结构域缺失小鼠,感染H7N7以及其他不同亚型的病毒,如HPAIV-H5N1或者LPAIV-H9N2,多方面、多角度探究朊蛋白在甲型流感病毒感染中的具体作用。其他亚型AIV感染小鼠的实验我们已经进行了,并在小鼠临床指标和肺组织病理方面得到了一些非常有趣的结果。我们认为,要更全面的理解PrP^c在流感病毒诱导的感染中的作用和机制,还需要在其它动物模型上进行试验,包括雪貂、猪和非人灵长类动物。描述这些宿主对病毒感染包括LPAIV和HPAIV

感染中 PrP^c 的作用对我们理解 PrP^c 的生理功能和其在病毒感染到底发挥了怎样的作用非常重要。

其次，我们在 MLE-12 水平的探究得知，过表达的 PrP^c 在 H7N7-AIV 感染的不同时期，对病毒和不同的细胞因子具有不同的调节作用，可能通过上调 TLR3 的相关通路抑制病毒的复制，但具体的信号机制尚不清楚。后续可以将病毒感染时间更加细化，区分更多感染阶段；以及沉默 Prnp 的表达，完成“gain of function and loss of function”的双向验证，来探究 PrP^c 在病毒感染不同阶段发挥的调节作用。

最后，转录组水平的差异基因表达谱分析和 q-PCR 验证提供给我们一些信息，仍然需要我们下一步对更多相关的差异表达基因进行验证并对通路上下游加以调控来获得更确切的调控机制。

总而言之，本论文从体内小鼠临床症状、肺组织病理变化，细胞水平 PrP^c 过表达干扰以及肺组织的 mRNA 差异基因变化等方面对朊蛋白在病毒甲型流感病毒感染中的作用进行了研究，并得出了一些有意思的结论。通过以上研究，可以帮助我们更好的了解朊蛋白的生理功能，并使进一步探究其能否作为抗病毒感染的宿主基因靶点成为可能。

附录

附录 1. 原始数据统计结果表

Appendix 1. Rawdata of mRNA-sequencing

附录 1.

样本名称	序列数(条)	碱基数(bp)	Error%	Q20%	Q30%	GC%
H7d11_119KO	49868752	7480312800	0.0256	97.6	93.79	51.49
H7d11_119WT	59710778	8956616700	0.0251	97.83	94.21	52.3
H7d11_120KO	58665004	8799750600	0.0248	97.98	94.54	52.22
H7d11_120WT	46137384	6920607600	0.0253	97.71	94.04	50.6
H7d3_119KO	61899050	9284857500	0.025	97.87	94.32	52.24
H7d3_119WT	58984628	8847694200	0.0253	97.74	94.05	51.87
H7d3_120KO	55369776	8305466400	0.0249	97.91	94.41	51.67
H7d3_120WT	53821742	8073261300	0.0246	98.02	94.69	51.13
H7d5_119KO	57849056	8677358400	0.0248	97.96	94.46	52.38
H7d5_119WT	52480126	7872018900	0.0254	97.7	93.96	52.02
H7d5_120KO	60784220	9117633000	0.0249	97.94	94.46	52.29
H7d5_120WT	54866540	8229981000	0.025	97.89	94.31	52.16
H7d8_119KO	54285220	8142783000	0.0251	97.81	94.2	51.77
H7d8_119WT	60622076	9093311400	0.0253	97.75	94.04	52.37
H7d8_120KO	54194730	8129209500	0.0252	97.78	94.09	51.97
H7d8_120WT	56622726	8493408900	0.0253	97.75	94.03	52.37
saline_119KO	43141128	6471169200	0.0252	97.79	94.19	49.87
saline_119WT	51034198	7655129700	0.0254	97.69	94.02	50.29
saline_120KO	52733308	7909996200	0.0253	97.74	94.05	50.8
saline_120WT	54700686	8205102900	0.0251	97.84	94.27	50.42

注：Q20、Q30%：Phred 数值（测序质量值）大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比；Error %：碱基错误率；GC %：碱基 G 和 C 的数量总和占总的碱基数量的百分比。

附录 2

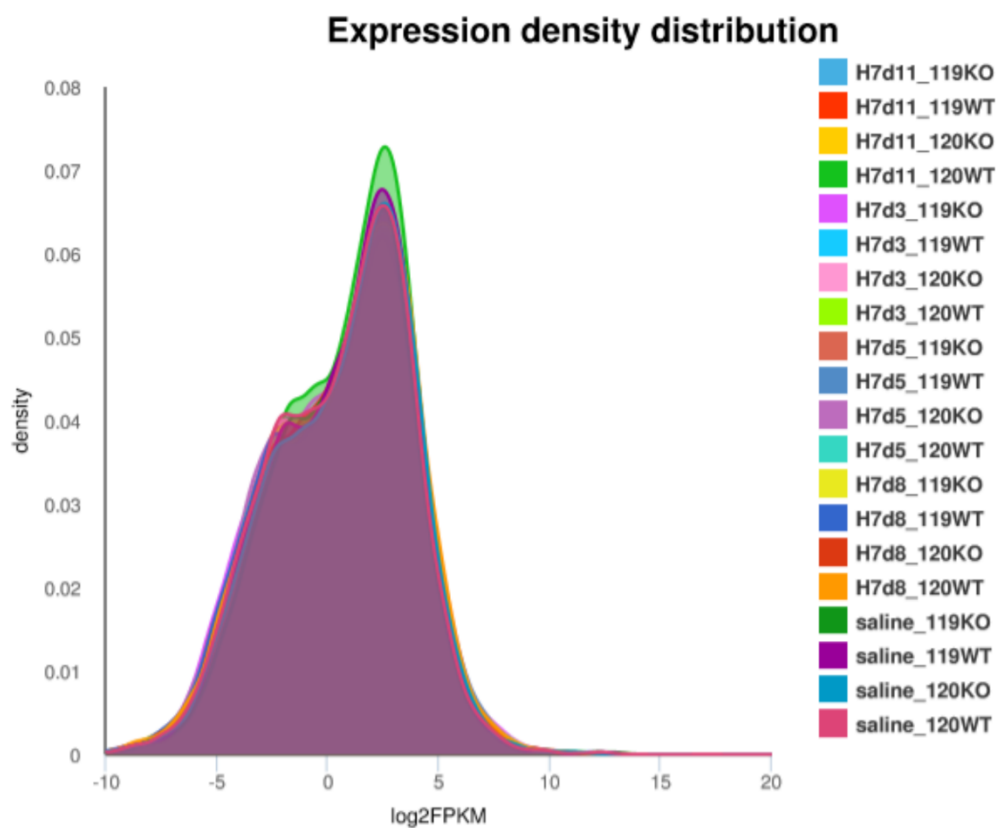
附录 2. Reads 与参考基因组比对结果统计表

Appendix 2. Alignment results of mapped reads.

sample	all_read	mapped_read	mapped_ratio	unique_mapped_read	unique_mapped_ratio
H7d11_119KO	24864680	23244345	93.48%	22105833	88.90%
H7d11_119WT	29793341	28247017	94.81%	27116698	91.02%
H7d11_120KO	29281444	27792760	94.92%	26648133	91.01%
H7d11_120WT	23035329	21429126	93.03%	20244102	87.88%
H7d3_119KO	30897334	29234161	94.62%	28018652	90.68%
H7d3_119WT	29442556	27764873	94.30%	26636070	90.47%
H7d3_120KO	27640170	26160959	94.65%	25020932	90.52%
H7d3_120WT	26858043	25346934	94.37%	24127176	89.83%
H7d5_119KO	28880648	27387645	94.83%	26296298	91.05%
H7d5_119WT	26168323	24720690	94.47%	23650260	90.38%
H7d5_120KO	30331833	28760057	94.82%	27610200	91.03%
H7d5_120WT	27394304	25906798	94.57%	24884654	90.84%
H7d8_119KO	27095971	25604069	94.49%	24542403	90.58%
H7d8_119WT	30248936	28586162	94.50%	27441313	90.72%
H7d8_120KO	27059707	25601237	94.61%	24571752	90.81%
H7d8_120WT	28251418	26688723	94.47%	25586451	90.57%
saline_119KO	21543506	20142584	93.50%	18684629	86.73%
saline_119WT	25459027	23851491	93.69%	22407754	88.01%
saline_120KO	26333774	24806435	94.20%	23735103	90.13%
saline_120WT	27316982	25870307	94.70%	24413082	89.37%

注: sample, 样品名, all_read 过滤后的 reads 总数, mapped_read 比对上参考基因组的 reads 数, mapped_ratio 比对上的 reads 比例, unique_mapped_read 唯一比对上参考基因组的 reads 总数, unique_mapped_ratio, 唯一比对上参考基因组的 reads 比例。

附录 3

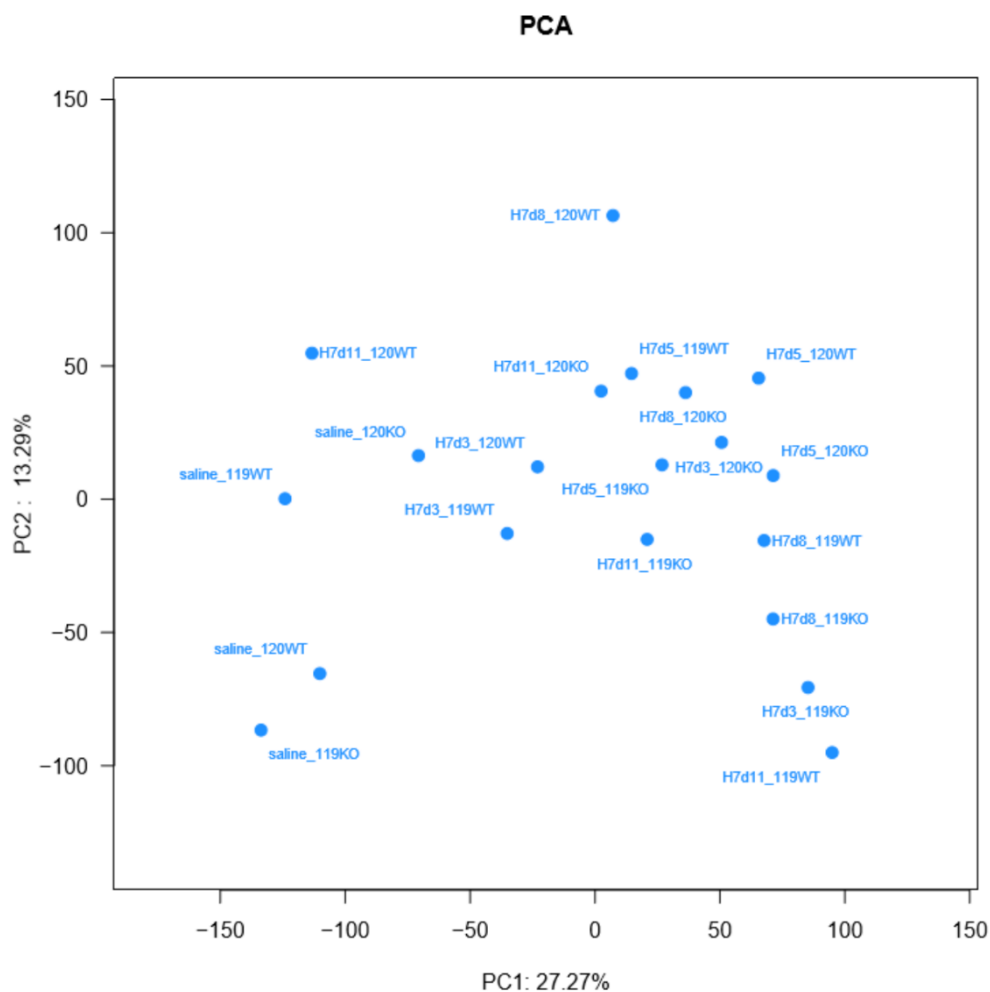


附录 3. 基因表达量分布图

Appendix 3. Expression density distribution of all genes (FPKM scores).

图 3 为所有基因的表达量概率密度分布图，图中横坐标为 $\log_2\text{FPKM}$ ，该值越高，基因表达量越高；纵坐标为基因的密度，即为对应横轴表达量的基因数/检测已表达基因的总数；图中每种颜色表示一个样本，所有概率的总和为 1，即每个区域的面积均为 1；密度曲线的峰值表示整个样本基因表达量最集中的区域。

附录 4

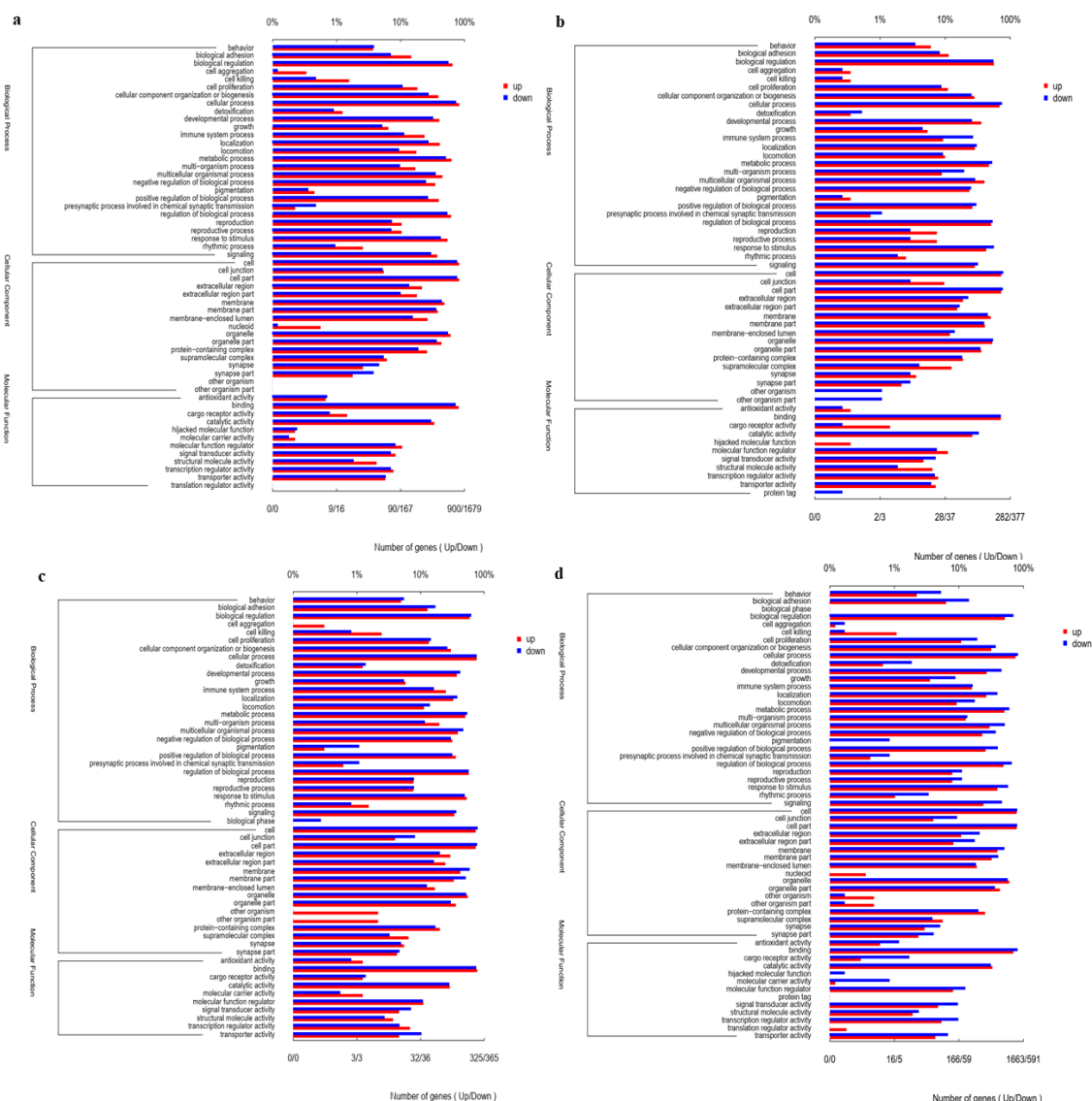


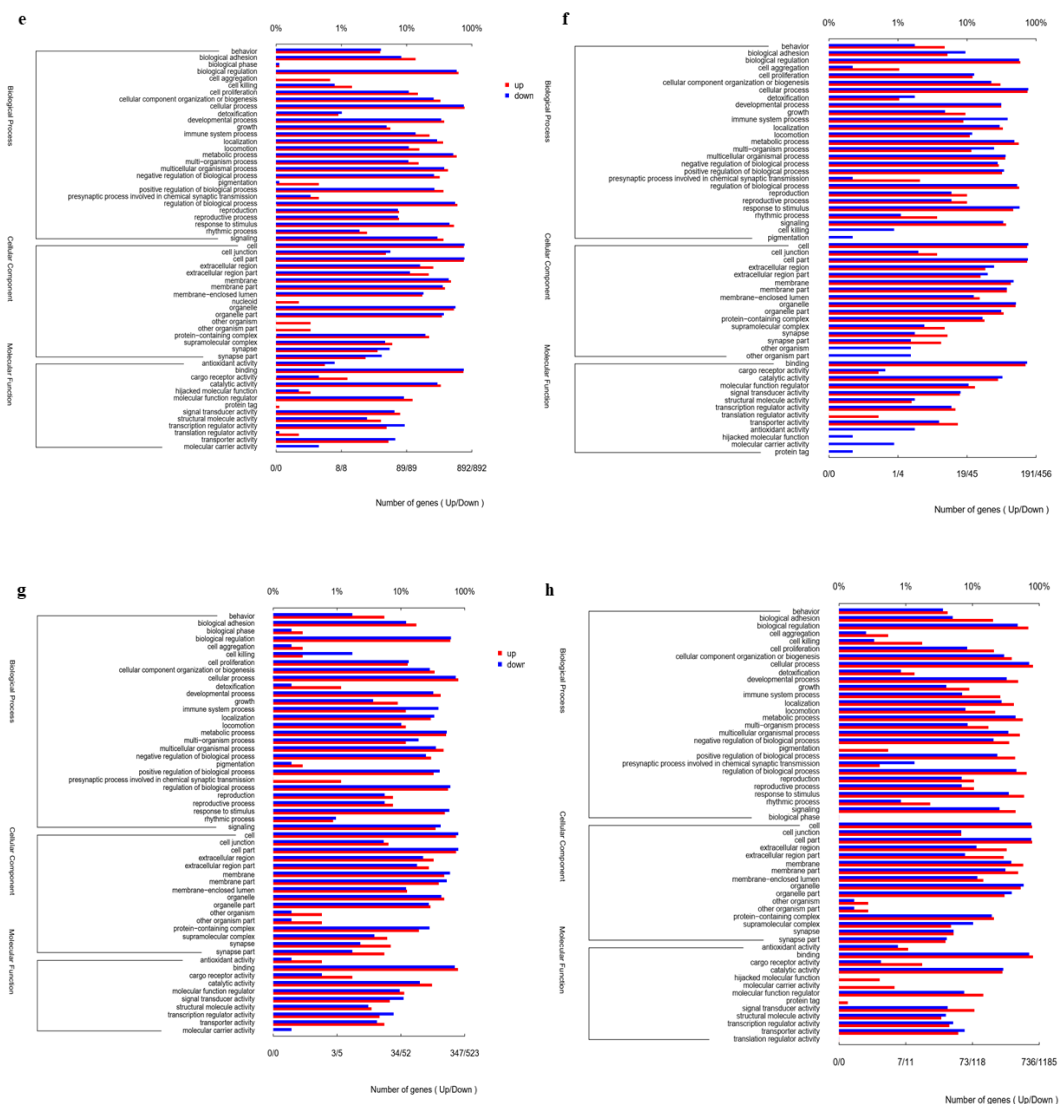
附录 4. 样本主成分分析结果图

Figure 4. PCA analysis result of samples.

图中 X、Y 轴表示样品表达量经过降维处理后得到的对应主成分的新的数据集，表示样品之间的差距；X、Y 轴数值代表对应主成解释释总体方差的百分比。圆点代表每个样品，同一个颜色形状代表同一个样品组。以上所有样品都为肺组织，属于同一样品组。

附录 5



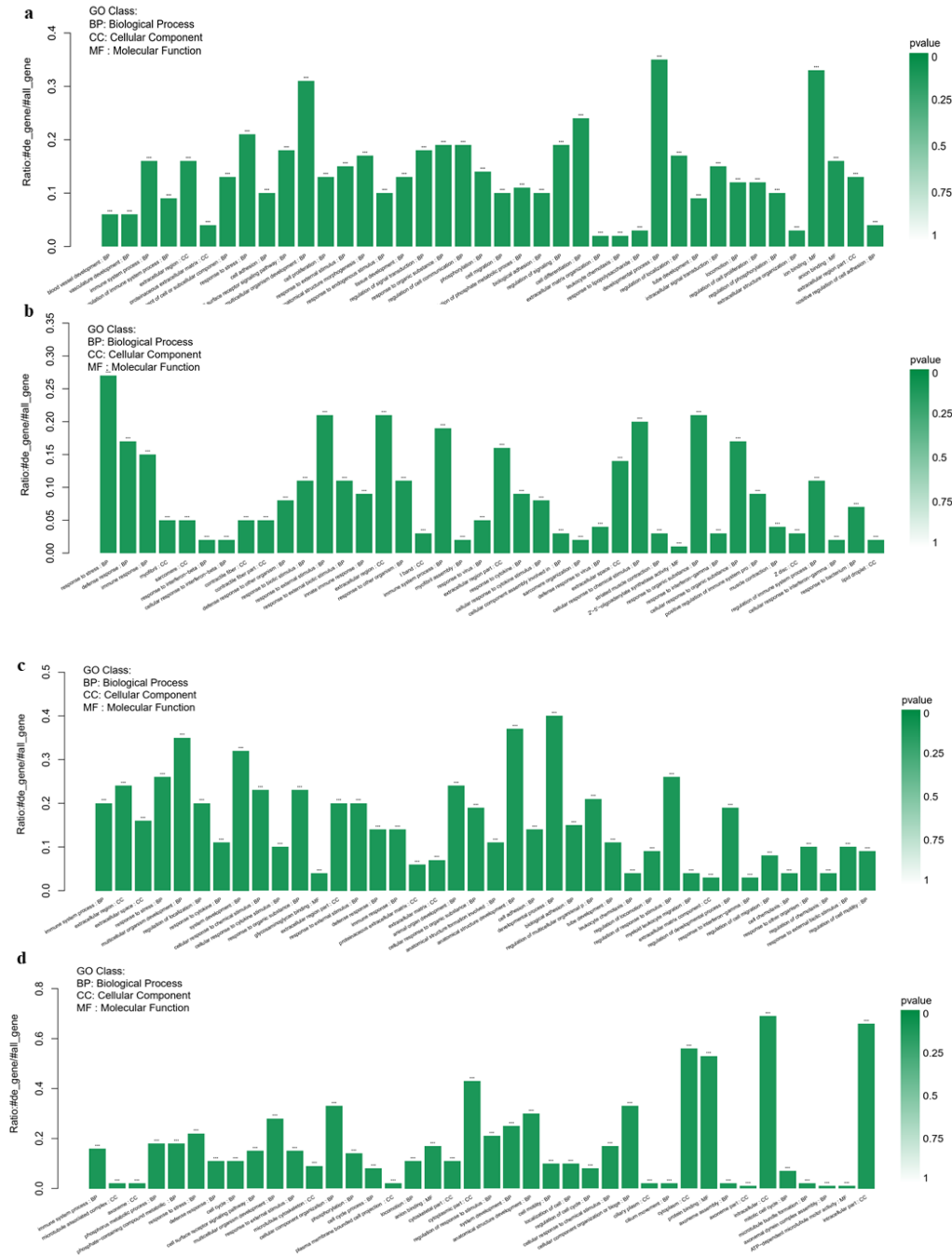


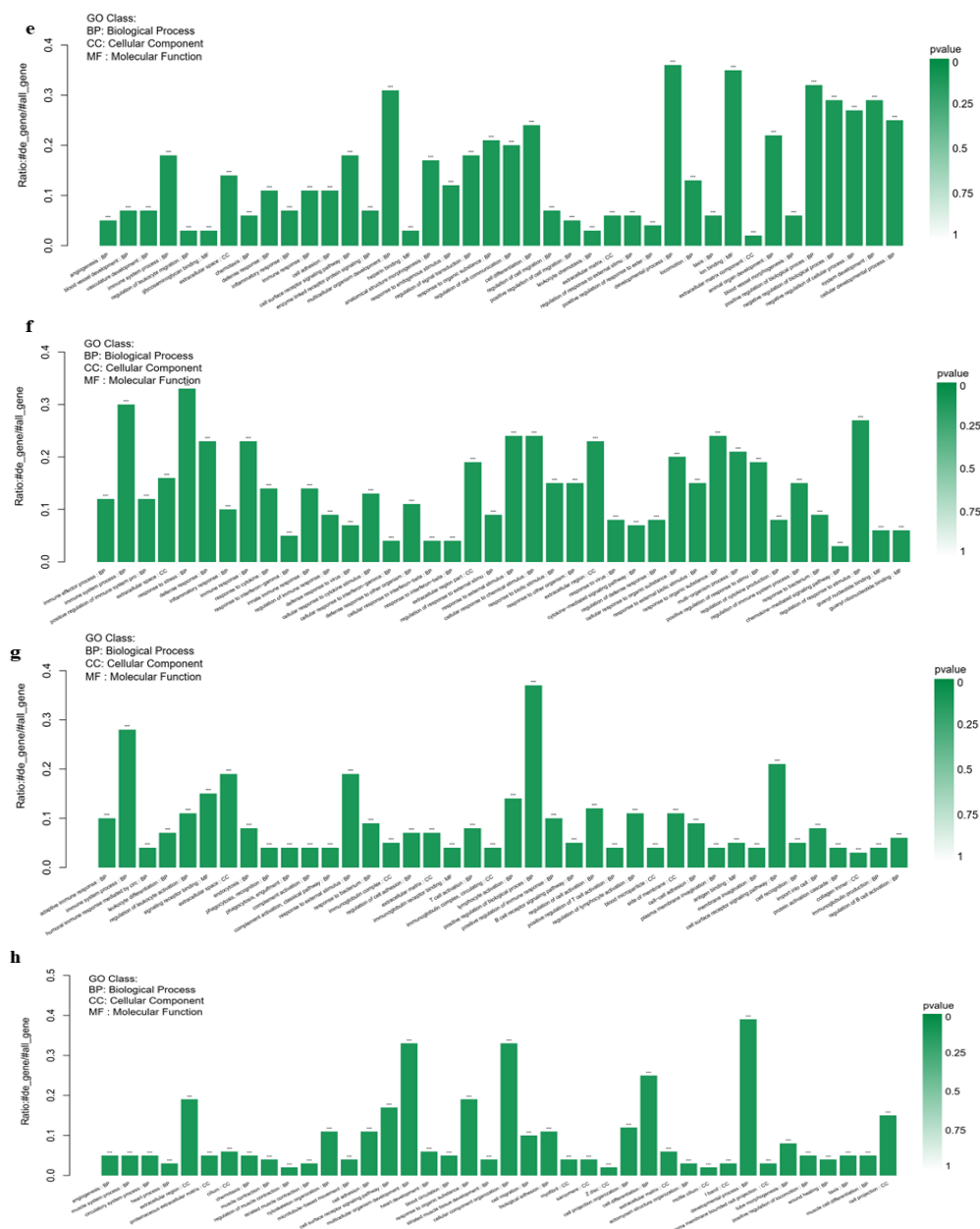
附录 5. 上下调基因 GO 功能注释柱形图

Figure 5. GO annotations of Differentially expressed genes.

图 a 为 d3 119KOvs d3 119WT、b 为 d5 119KOvs d5 119WT、c 为 d8 119KOvs d8 119WT、d 为 d11 119KOvs d11 119WT 的 DEGs GO 注释图, e 为 d3 120KOvs d3 120WT、f 为 d5 120KOvs d5 120WT、g 为 d8 120KOvs d8 120WT、h 为 d11 120KOvs d11 120WT 的 DEGs GO 注释图。横坐标为注释到某 GO term 的基因个数, 上方横坐标表示注释到该 GO term 的基因数占 GO 注释基因总数的比例 (基因和 GOterm 是多对多的关系); 纵坐标表示 GO 的详细分类, 代表 GO 的三个二级分类, 分别为生物过程 (Biological Process)、细胞组分 (Cellular Component)、分子功能 (Molecular Function); 红色柱形代表上调基因, 蓝色柱形代表下调基因。

附录 6



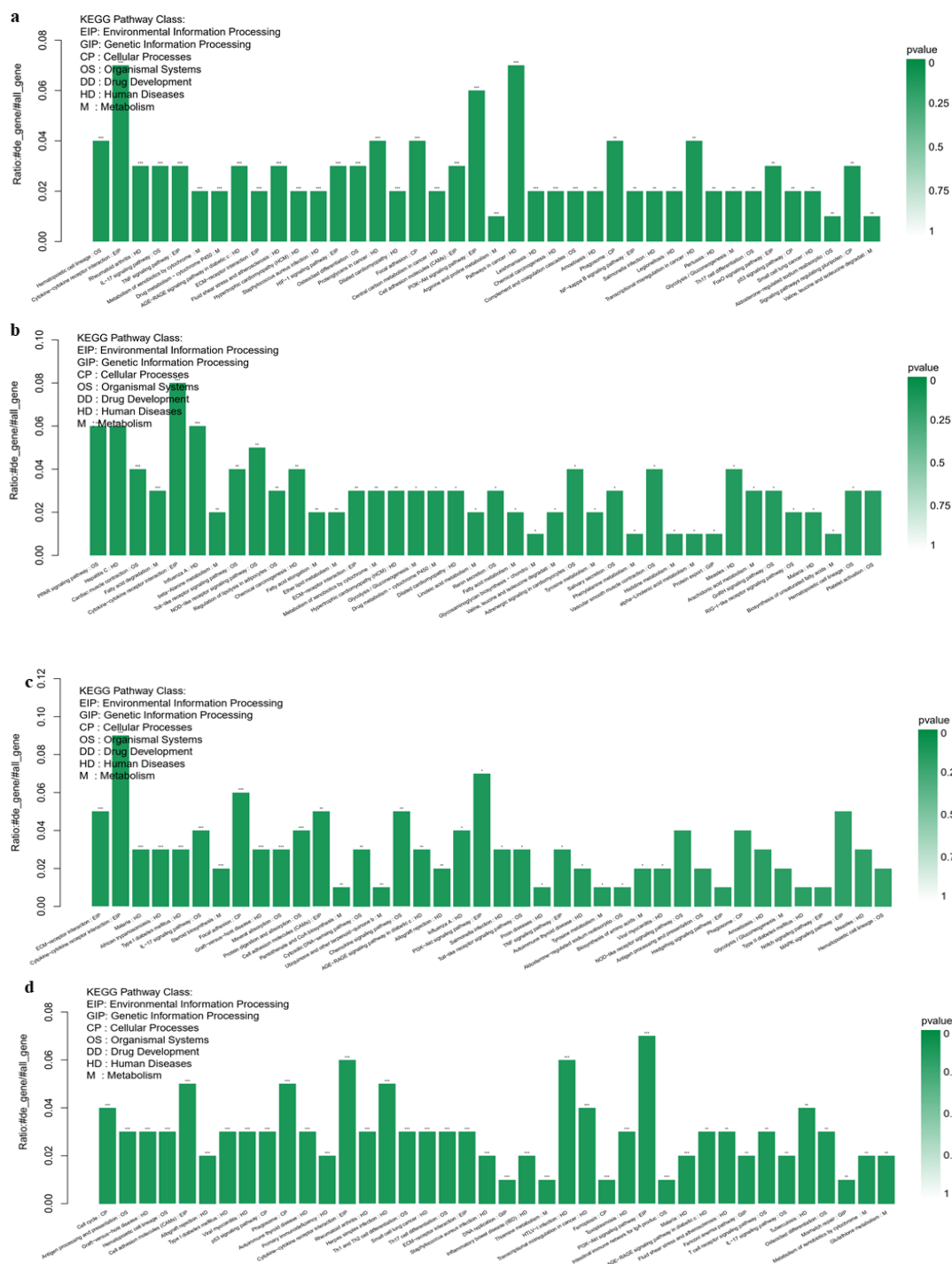


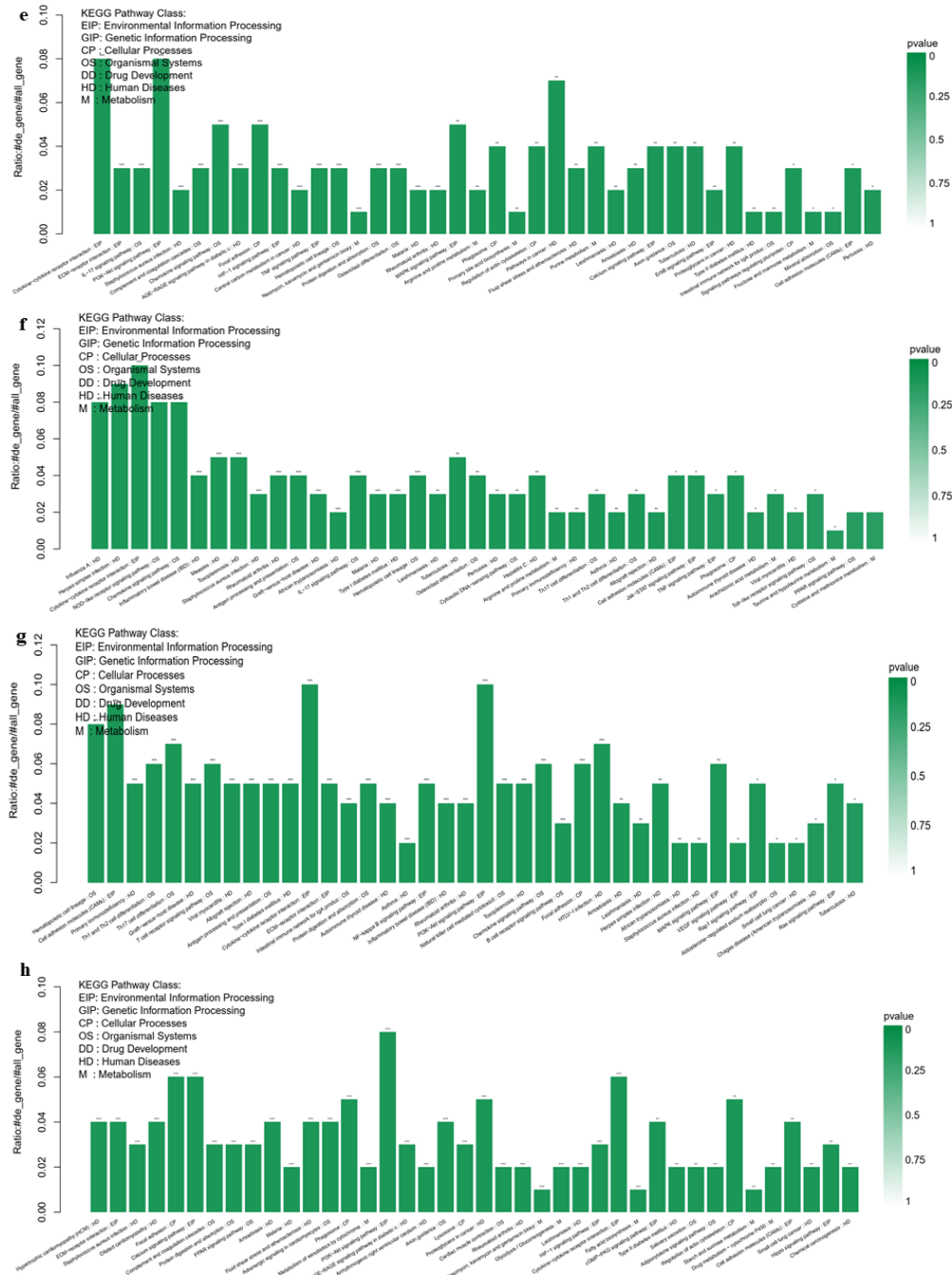
附录 6. 差异表达基因 GO 功能富集柱状图

Figure 6. GO terms of functional enrichment DEGs.

图 a 为 d3 119KOvs d3 119WT、b 为 d5 119KOvs d5 119WT、c 为 d8 119KOvs d8 119WT、d 为 d11 119KOvs d11 119WT 的 DEGs GO 富集柱状图, e 为 d3 120KOvs d3 120WT、f 为 d5 120KOvs d5 120WT、g 为 d8 120KOvs d8 120WT、h 为 d11 120KOvs d11 120WT 的 DEGs GO 富集柱状图, 图中为不同时间富集最显著的前 40 个 GO terms, 横坐标为名称和分类, 纵坐标为 GO term, 柱高为富集率 (Sample Number/Background Number), 颜色为 *fdr* 显著性, 颜色越深富集越显著, *fdr* < 0.001 的标记为***, *fdr* < 0.01 的标记为**, *fdr* < 0.05 的标记为*, 右侧颜色梯度表示 *fdr* 大小。

附录 7





附录 7. 差异表达基因 KEGG 通路富集柱状图

附录 7. KEGG pathways of enrichment DEGs.

图 a 为 d3 119KOvs d3 119WT、b 为 d5 119KOvs d5 119WT、c 为 d8 119KOvs d8 119WT、d 为 d11 119KOvs d11 119WT 的 DEGs KEGG 富集柱状图, e 为 d3 120KOvs d3 120WT、f 为 d5 120KOvs d5 120WT、g 为 d8 120KOvs d8 120WT、h 为 d11 120KOvs d11 120WT 的 DEGs KEGG 富集柱状图, 图中为富集最显著的前 40 个 KEGG terms, 横坐标为名称和分类, 纵坐标为 KEGG term, 柱高为富集率 (Sample Number/Background Number), 颜色为 fdr 显著性, 颜色越深富集越显著, $fdr < 0.001$ 的标记为***, $fdr < 0.01$ 的标记为**, $fdr < 0.05$ 的标记为*, 右侧颜色梯度表示 fdr 大小。

附录 8

缩略词	英文全称	中文全称
IAV	Influenza A virus	甲型流感病毒
PrP ^c	Prion protein	朊蛋白
SOD1	Superoxide dimeutase-1	活性氧产生酶
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
HPAIV	Highly pathogenic avian influenza virus	高致病性禽流感病毒
LPAIV	Low pathogenic avian influenza virus	低致病性禽流感病毒
HA	Hemagglutinin	血凝素
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
SA	Sialic acid	唾液酸
PRR	Pattern recognition receptor	模式识别受体
PAMP	Pathogen associated molecular patterns	病原体相关分子模式
IFN	Interferon	干扰素
APCs	antigen-presenting cells	抗原递呈细胞
IL	interleukin	白介素
TNF	tumor-necrosis factor	肿瘤坏死因子
TGF β	transforming growth factor	β 型转化生长因子
CSF	colony stimulating factor	集落刺激因子
TLR	Toll like receptor	Toll 样蛋白受体
NOD	nucleotide oligomerization domain	核苷酸寡聚域
LRR	Leucine-rich repeat containing	富含亮氨酸的重复序列
NLR	NOD-like receptor	NOD 样蛋白受体
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I	视黄酸/维甲酸诱导基因 I
RLR	Retinoic acid-inducible gene I-like receptors	解螺旋受体
NLRP3	NLR family, Pyrin domain containing protein 3	含有 NLR3 蛋白的嘧啶结构域
MAPK	mitogenactivated protein kinase	促分裂原激活的蛋白激酶
PrP ^{sc}	scrapie prion protein	感染性蛋白
TSE	Transmissible spongiform encephalopathies	传染性海绵状脑病
BSE	Bovine sponspongiform encephalopathy	牛海绵状脑病
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
TGF α	Transforming growth factor- α	转化生长因子 α
NOS2	Nitric oxide synthase2	一氧化氮合酶 2
CVB-3	Coxsackievirus B3	柯萨奇病毒 B3
HSV-1	Herpes simplex virus 1	1 型单纯疱疹病毒
EMCV-B	Encephalomyocarditis virus B	脑心肌炎病毒 B
hCG	Human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
TEMED	Tetramethyl-ethylene diamine	四甲基乙二胺
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸铵
GRC	Genome Reference Consortium	参考序列比对分析
PCA	Principal component analysis	主成分分析

DEGs	Differentially expressed genes	差异表达基因
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PKB	Protein kinase B	蛋白激酶 B
NFAT	Nuclear factor of activated T cells	活化 T 细胞核因子
TWEAK	Tumor necrosis factor- like weak inducer of apoptosis	肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂
ARDS	Acute respiratory distress syndrome	急性呼吸窘迫综合征

参考文献

- [1] Betáková T, Kostrabova A, Lachova V, et al. Cytokines induced during influenza virus infection[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23(18):2616.
- [2] Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J, et al. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus affects receptor binding[J]. *Journal of virology*, 2010, 84(22):11802–11813.
- [3] Spackman E. A brief introduction to avian influenza virus[J]. *Methods in molecular biology*, 2014, 1161:61–68.
- [4] Van Riel D, den Bakker M A, Leijten L M E, et al. Seasonal and pandemic human influenza viruses attach better to human upper respiratory tract epithelium than avian influenza viruses[J]. *The American journal of pathology*, 2010, 176(4):1614–1618.
- [5] Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy A A, et al. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA[J]. *Cell*, 2011, 147(2):423–435.
- [6] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family[J]. *Immunology letters*, 2003, 85(2):85–95.
- [7] Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. *Nature communications*, 2011, 2(1):1–10.
- [8] Martinez O, Tsibane T, Basler C F. Neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies: therapeutics and tools for discovery[J]. *International reviews of immunology*, 2009, 28(1-2):69–92.
- [9] Nayak B, Kumar S, DiNapoli J M, et al. Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity[J]. *Journal of virology*, 2010, 84(5):2408–2420.
- [10] Schmolke M, Garcia-Sastre A. Evasion of innate and adaptive immune responses

- by influenza A virus[J]. Cellular microbiology, 2010, 12(7):873–880.
- [11] Cytokine release and innate immunity in respiratory viral infection[C]. Elsevier, 1996.
- [12] Paul W E, Seder R A. Lymphocyte responses and cytokines[J]. Cell, 1994, 76(2):241–251.
- [13] Strieter R M, Belperio J A, Keane M P. Cytokines in innate host defense in the lung[J]. The Journal of clinical investigation, 2002, 109(6):699–705.
- [14] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression[J]. Methods, 2001, 25(4):386–401.
- [15] Alcamì A, Ghazal P, Yewdell J W. Viruses in control of the immune system[J]. EMBO reports, 2002, 3(10):927–932.
- [16] Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression[J]. Cytokine & growth factor reviews, 2001, 12(2-3):171–180.
- [17] Alcamì A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors[J]. Nature Reviews Immunology, 2003, 3(1):36–50.
- [18] Mahalingam S, Karupiah G. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases[J]. Immunology & Cell Biology, 1999, 77(6).
- [19] Maghazachi A A. Chemokines, G proteins and natural killer cells[J]. Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis, 2000, 48(2):65–72.
- [20] Bendtzen K. Immune hormones (cytokines); pathogenic role in autoimmune rheumatic and endocrine diseases[J]. Autoimmunity, 1989, 2(2):177–189.
- [21] Landgraeber S, J 盲 ger M, Jacobs J J, et al. The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines[J]. Mediators of inflammation, 2014, 2014.
- [22] Masi A, Glozier N, Dale R, et al. The immune system, cytokines, and biomarkers

- in autism spectrum disorder[J]. *Neuroscience bulletin*, 2017, 33(2):194–204.
- [23] The meteorology of cytokine storms, and the clinical usefulness of this knowledge[C]. Springer, 2017.
- [24] La Gruta N L, Kedzierska K, Stambas J, et al. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection[J]. *Immunology and cell biology*, 2007, 85(2):85–92.
- [25] Tumpey T M, Basler C F, Aguilar P V, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus[J]. *Science*, 2005, 310(5745):77–80.
- [26] Cohen J. IL-12 deaths: explanation and a puzzle[J]. *Science*, 1995, 270(5238):908.
- [27] Mogensen T H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses[J]. *Clinical microbiology reviews*, 2009, 22(2):240–273.
- [28] Iwasaki A, Pillai P S. Innate immunity to influenza virus infection[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(5):315–328.
- [29] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. *Nature immunology*, 2001, 2(8):675–680.
- [30] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. *Nature immunology*, 2004, 5(10):987–995.
- [31] Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA[J]. *Science*, 2004, 303(5663):1529–1531.
- [32] Lund J M, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(15):5598–5603.
- [33] Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus induced acute pneumonia[J]. *PLoS pathogens*, 2006, 2(6).
- [34] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-

- activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis[J].
Nature immunology, 2009, 10(3):241.
- [35] Gross O, Thomas C J, Guarda G, et al. The inflammasome: an integrated view[J].
Immunological reviews, 2011, 243(1):136–151.
- [36] Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body[J].
Annual review of immunology, 2009, 27:229–265.
- [37] Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, et al. Molecular pathogenesis of influenza A
virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression[J].
Cytokine and growth factor reviews, 2001, 12(2-3):171–180.
- [38] Kerr I M, Williams B R, et al. How cells respond to interferons[J]. Annual Reviews
of biochemistry, 1998.
- [39] Randall R E, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between
induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures[J]. Journal of
general virology, 2008, 89(1):1–47.
- [40] Garcia-Sastre A. Mechanisms of inhibition of the host interferon- β mediated
antiviral responses by viruses[J]. Microbes and infection, 2002, 4(6):647–655.
- [41] Taubenberger J K, Morens D M. 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics[J].
Emerging infectious diseases, 2006, 12(1):15–22.
- [42] Budka H, Aguzzi A, Brown P, et al. Neuropathological diagnostic criteria for
Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies
(prion diseases)[J]. Brain Pathology, 1995, 5(4):459–466.
- [43] Kovacs G G, Puopolo M, Ladogana A, et al. Genetic prion disease: the EURO CJD
experience[J]. Human genetics, 2005, 118(2):166–174.
- [44] Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, et al. Cellular prion protein prevents
brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice[J]. Archives of
virology, 2008, 153(6):1007–1012.
- [45] Li R, Liu D, Zanusso G, et al. The expression and potential function of cellular

- prion protein in human lymphocytes[J]. Cellular immunology, 2001, 207(1):49–58.
- [46] Sakudo A, Lee D-c, Sacki K, et al. Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2003, 308(3):660–667.
- [47] Stopschinski B E, Diamond M I. The prion model for progression and diversity of neurodegenerative diseases[J]. The Lancet Neurology, 2017, 16(4):323–332.
- [48] Sakudo A, Nakamura I, Ikuta K, et al. Recent developments in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models[J]. Journal of veterinary medical science, 2007, 69(4):329–337.
- [49] Sailer A, Büeler H, Fischer M, et al. No propagation of prions in mice devoid of PrP[J]. Cell, 1994, 77(7):967.
- [50] Legname G, Baskakov I V, Nguyen H B, et al. Synthetic mammalian prions[J]. Science, 2004, 305(5684):673–676.
- [51] Parchi P, Zou W, Wang W, et al. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(18):10168–10172.
- [52] Safar J, Roller P P, Gajdusek D C, et al. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(27):20276–20284.
- [53] Caughey B W, Dong A, Bhat K S, et al. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy[J]. Biochemistry, 1991, 30(31):7672–7680.
- [54] Ross C A, Poirier M A. Protein aggregation and neurodegenerative disease[J]. Nature medicine, 2004, 10(7): S10-S17.
- [55] Gasset M, Baldwin M A, Lloyd D H, et al. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid[J]. Proceedings of the

- National Academy of Sciences, 1992, 89(22):10940–10944.
- [56] Huang Z, Gabriel J-M, Baldwin M A, et al. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(15):7139–7143.
- [57] Cohen F E, Pan K M, Huang Z, et al. Structural clues to prion replication[J]. Science, 1994, 264(5158):530–532.
- [58] Fornai F, Ferrucci M, Gesi M, et al. A hypothesis on prion disorders: Are infectious, inherited, and sporadic causes so distinct?[J]. Brain research bulletin, 2006, 69(2):95–100.
- [59] Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? [J]. Trends in molecular medicine, 2003, 9(6):237–243.
- [60] Bolton D C, McKinley M P, Prusiner S B. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein[J]. Biochemistry, 1984, 23(25):5898–5906.
- [61] Radovanovic I, Braun N, Giger O T, et al. Truncated prion protein and Doppel are myelinotoxic in the absence of oligodendrocytic PrPC[J]. Journal of Neuroscience, 2005, 25(19):4879–4888.
- [62] Oesch B, Westaway D, Wälchli M, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein[J]. Cell, 1985, 40(4):735–746.
- [63] Donne D G, Viles J H, Groth D, et al. Structure of the Recombinant Full-Length Hamster Prion Protein PrP (29-231): The N Terminus is Highly Flexible[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of Ameica, 1997, 94(25):13452–13457.
- [64] Jackson G S, Murray I, Hosszu L L P, et al. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(15):8531–8535.
- [65] Silveira J R, Raymond G J, Hughson A G, et al. The most infectious prion protein particles[J]. Nature, 2005, 437(7056):257-261.

- [66] Yokoyama T, Shimada K, Masujin K, et al. Both host prion protein 131–188 subregion and prion strain characteristics regulate glycoform of PrPSc[J]. Archives of virology, 2007, 152(3):603-609.
- [67] Riek R, Hornemann S, Wider G, et al. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121–231) [J]. Nature, 1996, 382(6587):180–182.
- [68] Scott J D. Compartmentalized cAMP signalling: a personal perspective[J]. Biochemical Society Transactions, 2006, 34(Pt 4):465–467.
- [69] Haigh C L, Brown D R. Prion protein reduces both oxidative and non-oxidative copper toxicity [J]. Journal of Neurochemistry, 2006, 98(3):677–689.
- [70] Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, et al. Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein[J]. Neuroscience, 2005, 136(1):281–287.
- [71] Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, et al. The Role of the Octarepeat Region in Neuroprotective Function of the Cellular Prion Protein[J]. Brain Pathology, 2007, 17(2):174–183.
- [72] Filippo Z, Andrea C, Roberta M, et al. The cellular prion protein counteracts cardiac oxidative stress[J]. Cardiovascular Research, 2014(1):1.
- [73] Zhang B, Cowden D, Zhang F, et al. Prion Protein Protects against Renal Ischemia/Reperfusion Injury[J]. Plos One, 2015, 10(9): e0136923.
- [74] Zanetti F, Carpi A, Menabò R, et al. The cellular prion protein counteracts cardiac oxidative stress[J]. Cardiovascular Research, 2014, 104(1):93–102.
- [75] Peggion C, Bertoli A, Sorgato M C. Almost a century of prion Protein(s): From pathology to physiology, and back to pathology[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2017, 483(4):1148-1155.
- [76] Varela-Nallar L, Toledo E M, Larrondo L F, et al. Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons[J]. American Journal of Physiology-

- Cell Physiology, 2006, 290(1):C271-C281.
- [77] Mahal S P, Asante E A, Antoniou M, et al. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene[J]. Gene, 2001, 268(1-2):105–114.
- [78] Mehrpour M, Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology[J]. Cancer letters, 2010, 290(1):1–23.
- [79] Pan Y, Zhao L, Liang J, et al. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer[J]. The FASEB journal, 2006, 20(11):1886–1888.
- [80] Saeki K, Matsumoto Y, Matsumoto Y, et al. Identification of a promoter region in the rat prion protein gene[J]. Biochemical and biophysical research communications, 1996, 219(1):47–52.
- [81] Cai Q, Yuan Z, Lan K. Advances in Experimental Medicine and Biology, Infectious Agents Associated Cancers[J]. Epidemiology and Molecular Biology, 2017,349:127-134.
- [82] Premzl M, Delbridge M, Gready J E, et al. The prion protein gene: identifying regulatory signals using marsupial sequence[J]. Gene, 2005, 349:121–134.
- [83] Yang X, Cheng Z, Zhang L, et al. [J]. Advances in experimental medicine and biology.2017, 1018: 207–224.
- [84] Westergard L, Christensen H M, Harris D A. The cellular prion protein (PrPC): its physiological function and role in disease[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2007, 1772(6):629–644.
- [85] Mangé A, Nishida N, Milhavet O, et al. Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures[J]. Journal of virology, 2000, 74(7):3135–3140.
- [86] Almeida C J G de, Chiarini L B, da Silva J P, et al. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response[J]. Journal of leukocyte biology, 2005, 77(2):238–246.

- [87] Pushie M J, Pickering I J, Martin G R, et al. Prion protein expression level alters regional copper, iron and zinc content in the mouse brain[J]. Metallomics, 2011, 3(2):206–214.
- [88] Westaway D, DeArmond S J, Cayetano-Canlas J, et al. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins[J]. Cell, 1994, 76(1):117–129.
- [89] Lazarini F, Castelnau P, Chermann J-F, et al. Modulation of prion protein gene expression by growth factors in cultured mouse astrocytes and PC-12 cells[J]. Molecular brain research, 1994, 22(1-4):268–274.
- [90] Al-Hilal T A, Chung S W, Choi J U, et al. Targeting prion-like protein doppel selectively suppresses tumor angiogenesis[J]. The Journal of clinical investigation, 2016, 126(4):1251–1266.
- [91] Satoh J-i, Kurohara K, Yukitake M, et al. Constitutive and cytokine-inducible expression of prion protein gene in human neural cell lines[J]. Journal of neuropathology and experimental neurology, 1998, 57(2):131–139.
- [92] Shyu W-C, Kao M-C, Chou W-Y, et al. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells[J]. Neuroreport, 2000, 11(4):771–774.
- [93] Shyu W-C, Harn H-J, Saeki K, et al. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock[J]. Molecular neurobiology, 2002, 26(1):1–12.
- [94] Pammer J, Cross H S, Frobert Y, et al. The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract[J]. Virchows Archiv, 2000, 436(5):466–472.
- [95] Pammer J, Weninger W, Tschachler E. Human Keratinocytes Express Cellular Prion-Related Protein in Vitro and during Inflammatory Skin Diseases[J]. The American journal of pathology, 1998, 153(5):1353–1358.
- [96] Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. Prion Protein Gene-Deficient Cell Lines: Powerful Tools for Prion Biology[J]. Microbiology and Immunology, 2007, 51(1):1–13.
- [97] Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, et al. A mouse prion protein transgene rescues

- mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination[J]. *Laboratory Investigation*, 1999, 79(6):689–697.
- [98] Brown D R, Schmidt B, Kretzschmar H A. A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture[J]. *Glia*, 1998, 18(1):59–67.
- [99] Brown D R, Schmidt B, Kretzschmar H A. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment[J]. *Nature*, 1996, 380(6572):345–347.
- [100] Kuwahara C, Takeuchi A M, Nishimura T, et al. Prions prevent neuronal cell-line death[J]. *Nature*, 1999.
- [101] Konturek P C, Bazela K, Kukharskyy V, et al. *Helicobacter pylori* upregulates prion protein expression in gastric mucosa: a possible link to prion disease[J]. *World journal of gastroenterology*, 2005, 11(48):7651.
- [102] Ding T, Zhou X, Kouadir M, et al. Cellular prion protein participates in the regulation of inflammatory response and apoptosis in BV2 microglia during infection with *Mycobacterium bovis*[J]. *Journal of molecular neuroscience*, 2013, 51(1):118–126.
- [103] Liu J, Zhao D, Liu C, et al. Prion protein participates in the protection of mice from lipopolysaccharide infection by regulating the inflammatory process[J]. *Journal of molecular neuroscience*, 2015, 55(1):279–287.
- [104] Ladner-Keay C L, LeVatte M, Wishart D S. Role of polysaccharide and lipid in lipopolysaccharide induced prion protein conversion[J]. *Prion*, 2016, 10(6):466–483.
- [105] Dürig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes[J]. *British journal of haematology*, 2000, 108(3):488–495.
- [106] Sander P, Hamann H, Drögemüller C, et al. Bovine prion protein gene (PRNP)

- promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(45):37408–37414.
- [107] Burwinkel M, Riemer C, Schwarz A, et al. Role of cytokines and chemokines in prion infections of the central nervous system[J]. *International journal of developmental neuroscience*, 2004, 22(7):497–505.
- [108] Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, et al. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases[J]. *Brain Research Reviews*, 2005, 48(1):16–42.
- [109] Isaacs J D, Jackson G S, Altmann D M. The role of the cellular prion protein in the immune system[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2006, 146(1):1–8.
- [110] Zhang C C, Steele A D, Lindquist S, et al. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(7):2184–2189.
- [111] Alais S, Soto-Rifo R, Balter V, et al. Functional mechanisms of the cellular prion protein (PrP^C) associated anti-HIV-1 properties[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, 69(8):1331–1352.
- [112] Thackray A M, Bujdoso R. PrP^C expression influences the establishment of herpes simplex virus type 1 latency[J]. *Journal of virology*, 2002, 76(5):2498–2509.
- [113] Korom M, Wylie K M, Wang H, et al. A proautophagic antiviral role for the cellular prion protein identified by infection with a herpes simplex virus 1 ICP34.5 mutant[J]. *Journal of virology*, 2013, 87(10):5882–5894.
- [114] Mouillet-Richard, S. Signal Transduction Through Prion Protein[J]. *Science*, 2000, 289(5486):1925-1928.
- [115] Fraser N W, Valyinyag T. Viral, neuronal and immune factors which may influence herpes simplex virus (HSV) latency and reactivation[J]. *Microbial*

- Pathogenesis, 1993, 15(2):83.
- [116] Gabus C, Derrington E, Leblanc P, et al. The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(22):19301–19309.
- [117] Gabus C, Auxilien S, Péchoux C, et al. The prion protein has DNA strand transfer properties similar to retroviral nucleocapsid protein[J]. Journal of molecular biology, 2001, 307(4):1011–1021.
- [118] Leblanc P, Baas D, Darlix J-L. Analysis of the Interactions Between HIV-1 and the Cellular Prion Protein in a Human Cell Line[J]. Journal of molecular biology, 2004, 337(4):1035–1051.
- [119] Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, et al. Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture[J]. The Embo Journal, 2006, 25(12):2674–2685.
- [120] Nakamura Y, Sakudo A, Saeki K, et al. Transfection of prion protein gene suppresses coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells[J]. Journal of general virology, 2003, 84(12):3495–3502.
- [121] Caruso P, Burla R, Piersanti S, et al. Prion expression is activated by Adenovirus 5 infection and affects the adenoviral cycle in human cells[J]. Virology, 2009, 385(2):343–350.
- [122] Baj A, Bettaccini A, Nishimura T, et al. Poliovirus type 1 infection of murine PRNP-knockout neuronal cells[J]. Journal of neurovirology, 2005, 11(3):237–246.
- [123] Sakaguchi S, Chida J. Roles of prion protein in virus infections[J]. DNA and cell biology, 2018, 37(10):808–811.
- [124] Chida J, Hara H, Yano M, et al. Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A virus [J]. PLoS pathogens, 2018, 14(5): e1007049.
- [125] Akaike T, Ando M, Foda T, Oda T, Fdoi T, et al. Dependence on O₂- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice[J]. The

- Journal of clinical investigation, 1990, 85(3), 739-745.
- [126] Oda T, Akaike T, Hamamoto T, Hamamoto T, Suzuki F, et al. Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD[J]. Science, 1989, 244(4907): 974-976.
- [127] Vlahos R, Selemidis S. NADPH oxidases as novel pharmacologic targets against influenza A virus infection[J]. Molecular pharmacology, 2014, 86(6): 747-759.
- [128] Sakaguchi S, Chida J. Prion Protein is a Novel Modulator of Influenza: Potential Implications for Anti-Influenza Therapeutics[J]. Current issues in molecular biology, 2020, 37: 21-32
- [129] Berlett B S, Stadtman E R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(33):20313–20316.
- [130] Wells M A, Jackson G S, Jones S, et al. A reassessment of copper (II) binding in the full-length prion protein[J]. Biochemical Journal, 2006, 399(3):435–444.
- [131] Millhauser G L. Copper and the prion protein: methods, structures, function, and disease[J]. Annu. Rev. Phys. Chem., 2007, 58:299–320.
- [132] Aronoff-Spencer E, Burns C S, Avdievich N I, et al. Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy[J]. Biochemistry, 2000, 39(45):13760–13771.
- [133] Bio Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota M, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2001, 30(10):1137–1144.
- [134] Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding[J]. Virus Research, 2004, 106(2):147-165.
- [135] Smyth RP, Negroni M, Lever AM, et al. RNA Structure-A Neglected Puppet Master for the Evolution of Virus and Host Immunity[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 2097
- [136] Kawai T, Akira S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors[J].

- The Journal of Biochemistry, 2007, 141(2):137–145.
- [137] Thomas P G, Dash P, Aldridge Jr J R, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1[J]. Immunity, 2009, 30(4):566–575.
- [138] Salentin R, Gems D, Sprenger H, et al. Chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness of human monocytes after influenza A virus infection[J]. Journal of leukocyte biology, 2003, 74(2).
- [139] McKimm-Breschkin J L, Sahasrabudhe A, Blick T J, et al. Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site decreases sensitivity to Neu5Ac2en-derived inhibitors[J]. Journal of virology, 1998, 72(3):2456–2462.
- [140] Hurt A C, Holien J K, Parker M, et al. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation[J]. Journal of virology, 2009, 83(20):10366–10373.
- [141] Ramakrishnan M A, Muthuchelvan D. Influence of Reed-Muench Median Dose Calculation Method in Virology in the Millennium[J]. Nature, 2018, 8:9633.
- [142] Shao Y, Guan Y, Wang L, et al. CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos[J]. Nature Protocols, 2014, 9(10):2493–2512.
- [143] Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology[M].
- [144] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 180-181.
- [145] Chan M, Cheung C Y, Chui W H, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells[J]. Respiratory Research, 6(1):135.
- [146] Wu Z Q, Zhang Y, Zhao N, et al. Comparative Epidemiology of Human Fatal

- Infections with Novel, High (H5N6 and H5N1) and Low (H7N9 and H9N2) Pathogenicity Avian Influenza A Viruses[J]. International Journal of environmental research and public health, 2017, 14(3): e263.
- [147] Fasanmi O G, Odetokun I A, Balogun F A, et al. Public health concerns of highly pathogenic avian influenza H5N1 endemicity in Africa[J]. Vet World, 2017, 10(10):1194–1204.
- [148] Rigoni M, Shinya K, Toffan A, et al. Pneumo- and neurotropism of avian origin Italian highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates in experimentally infected mice[J]. Virology, 2007, 364(1):28–35.
- [149] Gu J, Xie Z, Gao Z, et al. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: A molecular pathology study[J]. Lancet, 2007, 370(9593):1137–1145.
- [150] Hassan M Z, Ahmed M S, Khan M M, et al. Genomic profiling of Nipah virus using NGS driven RNA-Seq expression data[J]. Bioinformation, 2019, 15(12):853–862.
- [151] 薛瑞雪. 貂源 H9N2 亚型流感病毒对小鼠致病性与宿主 hnRNP H1 抑制流感病毒复制机理研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2018, 32-35.
- [152] 贾燕青. 新城疫病毒感染鸡胚 miRNAs 和 mRNAs 表达谱分析与抗病毒基因的筛选[D]. 西北农林科技大学, 2018, 45-48.
- [153] Cock P J A, Fields C J, Goto N, et al. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants[J]. Nucleic acids research, 2010, 38(6):1767–1771.
- [154] Genome Reference Consortium. GRCm38 [OL]. <http://gtrnadb.ucsc.edu/genomes/eukaryota/Mmuscl0/>.
- [155] Bardou P, Mariette J, Escudie F, et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer[J]. 2014, 15(1):293.
- [156] Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) project in 2006[J]. Nucleic acids research, 2005, 34: 322-326.

- [157] Gene Ontology Consortium. Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation[J]. Genome research, 2001, 11(8):1425–1433.
- [158] Okuda S, Yamada T, Hamajima M, et al. KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways[J]. Nucleic acids research, 2008, 36(Web server issue): W423-W426.
- [159] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2012, 4:204–205.
- [160] Ramsköld D, Wang E T, Burge C B, et al. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data[J]. PLoS computational biology, 2009, 5(12).
- [161] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature methods, 2008, 5(7):621.
- [162] Wang E T, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes[J]. Nature, 2008, 456(7221):470–476.
- [163] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature genetics, 2000, 25(1):25–29.
- [164] Sultan M, Schulz M H, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome[J]. science, 2008, 321(5891):956–960.
- [165] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature reviews genetics, 2009, 10(1):57–63.
- [166] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. Nature methods, 2009, 6(5):377.
- [167] 王文静, 李素, 王竞晗等. USP18 分子通过 I 型干扰素通路影响猪瘟病毒复制的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2019(05):455–461.
- [168] Wu S, Li R W, Li W, et al. Transcriptome characterization by RNA-seq unravels the mechanisms of butyrate-induced epigenomic regulation in bovine cells[J].

- Plos One, 2012, 7(5).
- [169] Hölzer M, Schoen A, Wulle J, et al. Virus-and interferon alpha-induced transcriptomes of cells from the microbat *Myotis daubentonii*[J]. *iScience*, 2019, 19:647–661.
- [170] Josset L, Zeng H, Kelly S M, et al. Transcriptomic Characterization of the Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus: Specific Host Response and Responses Intermediate between Avian (H5N1 and H7N7) and Human (H3N2) Viruses and Implications for Treatment Options[J]. *mBio*, 2014, 5(1):e01102-13-e01102-13.
- [171] Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst G R. Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle[J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1998, 12(12):1151.
- [172] Hayashi S, Jibiki I, Asai Y, et al. Analysis of gene expression in human bronchial epithelial cells upon influenza virus infection and regulation by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-N-terminal kinase[J]. *Respirology*, 2010, 13(2):203–214.
- [173] Victoria A, Hinton H J, Eftychi C, et al. Generation and Characterization of p38 β (MAPK11) Gene-Targeted Mice[J]. 2005, 25(23):10454.
- [174] Uchide N, Obatake K, Yamada R, et al. Regulation of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Gene Expression in Cultured Human Fetal Membrane Cells by Influenza Virus Infection[J]. 2016, 39(12):1912–1921.
- [175] Joronen, K. Adenovirus mediated intra-articular expression of collagenase-3 (MMP-13) induces inflammatory arthritis in mice[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004, 63(6):656–664.
- [176] Zeng H, Belser J A, Goldsmith C S, et al. A(H7N9) Virus Results in Early Induction of Proinflammatory Cytokine Responses in both Human Lung

- Epithelial and Endothelial Cells and Shows Increased Human Adaptation Compared with Avian H5N1 Virus[J]. *Journal of virology*, 89(8):4655–4667.
- [177] Mashimo Y, Sakurai-Yageta M, Watanabe M, et al. Erratum to: Induction of the Matrix Metalloproteinase 13 Gene in Bronchial Epithelial Cells by Interferon and Identification of its Novel Functional Polymorphism[J]. *Inflammation*, 2016, 39(3):963.
- [178] Cheung C Y, Poon L, Lau A S, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? [J]. *Lancet*, 2002, 360(9348):1831–1837.
- [179] Kash J C, Tumpey T M, Proll S C, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus[J]. *Nature*, , 443:158–160.
- [180] Zhang N, Bao Y-J, Tong A H-Y, et al. Whole transcriptome analysis reveals differential gene expression profile reflecting macrophage polarization in response to influenza A H5N1 virus infection[J]. *BMC medical genomics*, 2018, 11(1):20.
- [181] Li H, LIU XIAOLIN, CHEN FEIYANG, et al. Avian Influenza Virus Subtype H9N2 Affects Intestinal Microbiota, Barrier Structure Injury, and Inflammatory Intestinal Disease in the Chicken Ileum[J]. 10(5):270-278.
- [182] SHIZUO, AKIRA, TAKEUCHI, et al. Pathogen Recognition and Innate Immunity[J]. *Cell*, 2006, 124(4):783-801.
- [183] Ehrhardt C, Seyer R, Hrincius E R, et al. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling[J]. *Microbes and infection*, 2010, 12(1):81–87.
- [184] Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression[J]. *Cytokine & growth factor reviews*, 2001, 12(2-3):171–180.
- [185] Clark I A. The advent of the cytokine storm[J]. *Immunology and cell biology*,

- 2007, 85(4):271.
- [186] Xu L G, Wang Y Y, Han K J, et al. Xu, L.G. et al. VISA Is an adapter protein required for virus-triggered IFN- signaling. *Mol. Cell* 19, 727-740[J]. *Molecular Cell*, 2005, 19(6):727–740.
- [187] Oganessian G, Saha S K, Guo B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response[J]. *Nature*, 2006, 439(7073):208–211.
- [188] Jae-Min Y, Eun-Kyeong J. Toll-like Receptors and Innate Immunity[J]. *Journal of Bacteriology & Virology*, 2011, 41(4):225.
- [189] Takeshita F, Ishii K, Kobiyama K, et al. TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF[J]. *European Journal of Immunology*, 2005, 35(8):2477–2485.
- [190] MOGENSEN, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses[J]. *Clinical microbiology reviews*, 2009, 22(2):240–273.
- [191] Pothlichet J, Meunier I, Davis B K, et al. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells[J]. *PLoS pathogens*, 2013, 9(4): e1003256.
- [192] Markus M, Matthias B, Thorsten W, et al. Highly Pathogenic H5N1 Influenza A Virus Strains Provoke Heterogeneous IFN- α/β Responses That Distinctively Affect Viral Propagation in Human Cells[J]. *Plos One*, 8(2): e56659.
- [193] Fitzgerald K A, Rowe D C, Barnes B J, et al. LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NF- κ B Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(7):1043–1055.
- [194] Zhang M, Wang L, Zhao X, et al. TRAF-interacting protein (TRIP) negatively regulates IFN- γ production and antiviral response by promoting proteasomal degradation of TANK-binding kinase 1[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209(10):1703–1711.

- [195] Rathinam V, Vanaja S, Waggoner L, et al. TRIF Licenses Caspase-11-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation by Gram-Negative Bacteria[J]. *Cell*, 2012, 150(3):606–619.
- [196] Shenoy A R, Wellington D A, Kumar P, et al. GBP5 Promotes NLRP3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals[J]. *Science*, 2012, 336(6080):481–485.
- [197] Wolf S, Johnson S, Perwitasari O, et al. Targeting the pro-inflammatory factor CCL2 (MCP-1) with Bindarit for influenza A (H7N9) treatment[J]. *Clinical & Translational Immunology*, 2017, 6(3): e135.
- [198] LACHOVÁ V, ŠKORVANOVÁ L, SVETLÍKOVÁ D, et al. Comparison of transcriptional profiles of interferons, CXCL10 and RIG-1 in influenza infected A549 cells stimulated with exogenous interferons[J]. *Acta Virologica*, 2017, 61(02):183–190.
- [199] Dawson T C, Beck M A, Kuziel W A, et al. Contrasting Effects of CCR5 and CCR2 Deficiency in the Pulmonary Inflammatory Response to Influenza A Virus[J]. *American Journal of Pathology*, 2000, 156(6):1951–1959.
- [200] Wang G, Li R, Jiang Z, et al. Influenza Virus Induces Inflammatory Response in Mouse Primary Cortical Neurons with Limited Viral Replication[J]. *Biomed Research International*, 2006, 2016:1–7.
- [201] Shahangian A. Influenza-induced type I interferons sensitize hosts to secondary pneumococcal pneumonia[J]. *Dissertations & Theses Gradworks*, 2008, 119(7):1910-1920.
- [202] Gong D, Farley K, White M, et al. Critical Role of SerpinB1 in Regulating Inflammatory Responses in Pulmonary Influenza Infection[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2011, 204(4):592–600.
- [203] Cheung C Y, Poon L, Lau A S, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual

- severity of human disease? [J]. *Lancet* (London, England), 360(9348):0–1837.
- [204] Fujisawa H, Tsuru S, Taniguchi M, et al. Protective Mechanisms against Pulmonary Infection with Influenza Virus. I. Relative Contribution of Polymorphonuclear Leukocytes and of Alveolar Macrophages to Protection during the Early Phase of Intranasal Infection[J]. *Journal of general virology*, , 68(2):425–432.
- [205] Wareing M D, Lyon A B, Lu B, et al. Chemokine expression during the development and resolution of a pulmonary leukocyte response to influenza A virus infection in mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 76(4).
- [206] Peiris J, Yu W, Leung C, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease[J]. *Lancet* (London, England), 2004, 363(9409):617–619.
- [207] Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12(2):171–180.
- [208] Cortez K J, Jackson J O, Kottlilil S. Chemokines and Chemokine Receptors in Infectious Disease[J]. *Current Topics in Membranes*, 2005, 55:289–329.
- [209] Maghazachi A A. Chemokines, G proteins and natural killer cells[J]. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 2000, 48(2):65–72.
- [210] Luster A D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation [J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(7):436–445.
- [211] Hennet T, Ziltener H J, Frei K, et al. A kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus[J]. *Journal of Immunology*, 1992, 149(3):932–939.
- [212] Burns C S, Aronoff-Spencer E, Dunham C M, et al. Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(12):3991–4001.
- [213] Brown D R, Schulz-Schaeffer W J, Schmidt B, et al. Prion protein-deficient cells

- p show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity[J].
-
- Experimental neurology, 1997, 146(1):104–112.
- [214] Chan R W Y, Yuen K M, Yu W C L, et al. Influenza H5N1 and H1N1 Virus Replication and Innate Immune Responses in Bronchial Epithelial Cells Are Influenced by the State of Differentiation[J]. Plos One, 2010, 5(1): e8713.
- [215] Tumpey T M, García-Sastre A, Taubenberger J K, et al. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice[J]. Journal of virology, 2005, 79(23):14933–14944.
- [216] Kim H M, Lee Y-W, Lee K-J, et al. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs[J]. Journal of virology, 2008, 82(9):4265–4274.
- [217] Herold S, Becker C, Ridge K M, et al. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment[J]. The European respiratory journal, 2015, 45(5):1463–1478.
- [218] Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza[J]. Veterinary microbiology, 2000, 74(1-2):109–116.
- [219] Jewell N A, Vaghefi N, Mertz S E, et al. Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo[J]. Journal of virology, 2007, 81(18):9790–9800.
- [220] Herold S, Wulffen W von, Steinmueller M, et al. Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules[J]. The Journal of Immunology, 2006, 177(3):1817–1824.
- [221] Chan M CW, Cheung C Y, Chui W H, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells[J]. Respiratory Research, 2005, 6(1):135.

- [222] To K K W, Hung I F N, Li I W S, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection[J]. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2010, 50(6):850–859.
- [223] Hui E K-W, Smee D F, Wong M-H, et al. Mutations in influenza virus M1 CCHH, the putative zinc finger motif, cause attenuation in mice and protect mice against lethal influenza virus infection[J]. Journal of virology, 2006, 80(12):5697–5707.
- [224] Ellis B, Kaercher L, Snively C, et al. Lipopolysaccharide triggers nuclear import of Lpcat1 to regulate inducible gene expression in lung epithelia[J]. World journal of biological chemistry, 2012, 3(7):159–166.
- [225] Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, et al. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice[J]. Critical care medicine, 2013, 41(1):171–181.
- [226] Peralta O A, Eyestone W H. Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP(C)) expression in bovine somatic tissues[J]. Prion, 2009, 3(3):161–170.
- [227] Kadoya H, Ikeda K, Nakatani K, et al. Cellular prion protein expression in non-ciliated epithelial cells (Clara cells) of proliferating bronchioles during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamster[J]. Osaka city medical journal, 2001, 47(1):23–32.
- [228] Moscardini M, Pistello M, Bendinelli M, et al. Functional interactions of nucleocapsid protein of feline immunodeficiency virus and cellular prion protein with the viral RNA[J]. Journal of molecular biology, 2002, 318(1):149–159.
- [229] Koerner I, Kochs G, Kalinke U, et al. Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus[J]. Journal of virology, 2007, 81(4):2025–2030.
- [230] Zhao L, Zhang X, Wu Z, et al. The Downregulation of MicroRNA hsa-miR-340-5p in IAV-Infected A549 Cells Suppresses Viral Replication by Targeting RIG-I

- and OAS2[J]. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*, 2019, 14:509–519.
- [231] Su S, Huang S, Fu C, et al. Identification of the IFN- β Response in H3N2 Canine Influenza Virus Infection[J]. *Journal of general virology*, 2015, 97(1).
- [232] Ren R, Zhou L, Xiang N, et al. Epidemiological characteristics of human avian influenza A (H7N9) virus infection in China[J]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi*, 2014, 35(12):1362–1365.
- [233] Amos S, Elbers A R W, Hagenaars T J, et al. Estimating the Per-Contact Probability of Infection by Highly Pathogenic Avian Influenza (H7N7) Virus during the 2003 Epidemic in The Netherlands[J]. *Plos One*, 2012, 7(7):e40929.
- [234] Wit E de, Munster V J, Spronken M I J, et al. Protection of Mice against Lethal Infection with Highly Pathogenic H7N7 Influenza A Virus by Using a Recombinant Low-Pathogenicity Vaccine Strain[J]. *Journal of virology*, 2005, 79(19):12401–12407.
- [235] He F, Kumar S R, Syed Khader S M, et al. Effective intranasal therapeutics and prophylactics with monoclonal antibody against lethal infection of H7N7 influenza virus[J]. *Antiviral research*, 2013, 100(1):207–214.
- [236] Pichlmair A, Schulz O, Tan C P, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates[J]. *Science*, 2006, 314(5801):997–1001.
- [237] Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, et al. IFN β induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein[J]. *Cellular microbiology*, 2007, 9(4):930.
- [238] Wathlet M G, Lin C H, Parekh B S, et al. Virus Infection Induces the Assembly of Coordinately Activated Transcription Factors on the IFN- γ enhancer in Vivo[J]. *Molecular Cell*, 1998, 1(4):507–518.
- [239] Leonidas C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(5):375–386.

- [240] Fink K, Martin L, Mukawera E, et al. IFN β /TNF α synergism induces a non-canonical STAT2/IRF9-dependent pathway triggering a novel DUOX2 NADPH Oxidase-mediated airway antiviral response[J]. *Cell Research*, 2013, 24(4):509.
- [241] Szabo A, Magyarics Z, Pazmandi K, et al. TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner[J]. *Immunology & Cell Biology*, 2014, 92(8):671–678.
- [242] Randall R E, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures[J]. *Journal of general virology*, 2008, 89(1):1–47.
- [243] Varga Z T, Ramos I, Hai R, et al. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein[J]. *PLoS pathogens*, 2011, 7(6): e1002067.
- [244] Graef K M, Vreede F T, Lau Y-F, et al. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon[J]. *Journal of virology*, 2010, 84(17):8433–8445.
- [245] Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, et al. Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon beta promoter stimulator 1[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2010, 285(42):32064–32074.
- [246] García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems[J]. *Virology*, 1998, 252(2):324–330.
- [247] Guo Z, Chen L-M, Zeng H, et al. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I[J]. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2007, 36(3):263–269.
- [248] Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, et al. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors[J]. *Journal of virology*, 2002, 76(21):11166–11171.

- [249] Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo Y-M, et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus[J]. *Journal of virology*, 2007, 81(2):514–524.
- [250] Talon J, Horvath C M, Polley R, et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein[J]. *Journal of virology*, 2000, 74(17):7989–7996.
- [251] Wang X, Li M, Zheng H, et al. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon[J]. *Journal of virology*, 2000, 74(24):11566–11573.
- [252] Wolff T, Zielecki F, Abt M, et al. Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses[J]. *Biological chemistry*, 2008, 389(10):1299–1305.
- [253] Hoqner K, Wolff T, Pleschka S, et al. Macrophage-expressed IFN- β Contributes to Apoptotic Alveolar Epithelial Cell Injury in Severe Influenza Virus Pneumonia[J]. *PLoS pathogens*, 2013, 9(2):e1003188.
- [254] Wang Z, Robb N C, Lenz E, et al. NS Reassortment of an H7-Type Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Affects Its Propagation by Altering the Regulation of Viral RNA Production and Antiviral Host Response[J]. *Journal of virology*, 2013, 84(21):11323–11335.
- [255] DARLIX J, LAPADAT M, ROQUES B, et al. First Glimpses at Structure-function Relationships of the Nucleocapsid Protein of Retroviruses[J]. *Journal of Molecular biology*, 1995, 254(4):523-537.
- [256] Legolf R, Balloy V, Lagranderie M, et al. The Toll-like receptor (TLR)-3 médiate influenza A virus-induced acute pneumonia[J]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 2006, 22(5):859.
- [257] Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-stranded RNA and Influenza A Virus[J]. *Journal of biological chemistry*, 2005, 280(7):5571–5580.

- [258] Hidaka F, Matsuo S, Muta T, et al. A missense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy[J]. *Clinical immunology*, 2006, 119(2):188–194.
- [259] Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, et al. Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(6):3368–3372.
- [260] Kim T K, Maniatis T. The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon- β enhanceosome[J]. *Molecular Cell*, 1997, 1(1):119–129.
- [261] Wenxin W, Xiaoqi W, Zhang W, et al. RIG-I signaling via MAVs is dispensable for survival in lethal influenza infection in vivo[J]. *Mediators Inflammation*, 2018, 8:6808934.
- [262] Zhang C J, Yu H T. The Signal Pathways of Immune Inflammation Mediated by the Tlr3/Nf-Kappab and Activator Protein-1 in Cells Infected with Influenza A Virus Antagonized by Baicalin[J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 345:201–209.
- [263] Caiyun H, Jin Y, Shumei Z, et al. Lethal influenza A virus preferentially activates TLR3 and triggers a severe inflammatory response[J]. *Virus Research*, 2018, 257:102-112.
- [264] Lee D-H, Bertran K, Kwon J-H, et al. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4[J]. *Journal of veterinary science*, 2017, 18(S1):269–280.

科研成果

科研成果

1. **Hu, C.**, Li X., Zhu C., & He G. Co-circulation of multiple reassortant H6 subtype avian influenza viruses in wild birds in eastern China, 2016-2017. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 62.
2. Zhu, C., **Hu, C.**, Gui, B., Chen, Q., Zhang, S., & He, G. Genetic characteristics of H9N2 avian influenza viruses isolated from free-range poultry in Eastern China, in 2014–2015. *Poultry science*, 2018, 97(11), 3793-3800.
3. Gui, B., Chen, Q., **Hu, C.**, Zhu, C., & He, G. Effects of calcitriol (1, 25-dihydroxy-vitamin d3) on the inflammatory response induced by h9n2 influenza virus infection in human lung a549 epithelial cells and in mice. *Virology Journal*, 2017, 14(1), 10.
4. **Hu, C.**, Zhu, C., & He, G. Surveillance of Avian influenza viruses in wild birds, Shanghai, 2016-2018. *Transboundary and Emerging Diseases*. (in review)
5. Wang T., Li X., **Hu C.**, & He, G. Isolation of H8N4 avian influenza virus from wild birds in Shanghai, China, *Acta virologica*, 2019, 63: 121-125.
6. 实用新型专利 3 项，皆为第一发明人：一种凝胶切割刀，已授权，专利号：ZL201520317908.5；一种细胞刮刀，已授权，专利号：ZL201520920176.9；细胞刮刀，已授权，专利号：ZL201520955934.0。

参与的科研项目

1. 国家自然科学基金（青年项目）：MIF 在 H9N2 禽流感病毒诱导急性肺损伤中的作用及机制研究（31402163），2015-2017
2. 上海市科委（18DZ2293800）：上海市野生动物源疫病监控专业技术服务平台能力提升专项
3. 上海市 CDC 合作项目：禽流感病毒溯源调查（48105990），2014-2015
4. 上海市野生动植物保护管理站合作项目：上海野生鸟类禽流感病毒监控，2017-2019

致谢

学生时代最后一段求学生涯，时光如白驹过隙，已然进入 20 年代第一个年头，冬去、春归、夏至，因疫情而安静的校园依旧古典又美丽。窗外的蔷薇、百合和鸢尾花依次烂漫，岁月悠长，尽头已是曙光。

落笔毕业论文的最后一部分，内心五味杂陈、百感交集。在华东师范大学的六年时光里，获益良多。在这里，我不仅收获了丰富的专业知识，而且获得了对待科学问题和科学研究的严谨态度。与老师们和同学们一起，在实验室和办公室的朝朝暮暮，这些宝贵又充实的时光，将是我人生中的财富。

首先，感谢我的导师王天厚教授，岁月如梭，我仍清楚地记得在会议室得知可以报名并成为您的博士的那一天，之后如愿成为大家庭的一员。记得每一次大组会上您对待科学问题严肃认真的态度，举重若轻的指出学生汇报中的每一个问题。您严谨的治学态度、在科学研究上专注又敬业的精神、在工作中的睿智让我无比敬佩和崇敬。您在科学问题、论文的框架和逻辑上的指导，给予我莫大的帮助与思考；您的每次鼓励，都给我信心和动力。“学向勤中得”，从您那里，我领会了天道酬勤的道理，也从您的一言一行里学会了给自己更长远的职业规划。谢谢您，王老师！

感谢六年来悉心指导我的老师何桂梅副研究员，您不仅在学业上给我各方面的指导和帮助，更是我科研道路上的领路人，是我敬爱的、亲爱的导师。您条理清晰的逻辑，对待实验研究和论文写作的严谨态度，对待科学问题敏锐的洞察力和敏捷的思维都深深改变着我。您对生活的热爱，对工作的积极参与和灵活处理，对学生的关心爱护，点点滴滴都刻在我心里。您教会我专业上的入门，实验操作上的精确和严谨，论文阅读与写作的方法、思路和逻辑，给我课题研究上的自由。言传身教，从您那里我学会了许多为人处世，做人做事的道理。何老师，您辛苦了！谢谢您！您不仅是我尊敬的导师和指导老师，也是我们喜爱的大姐姐，人生路上的前辈，从您那里我收获了太多太多生活、学习与工作上的道理和经验。感谢实验室已经毕业的陈秦师兄、桂博翔师兄，感谢你们带我入门实验，适应科研生活的日子。感谢潘逸萱老师组的李洋洋师妹和郑珊师妹在动物实验包括小鼠喂

养、基因型鉴定、小鼠给毒、解剖等方面给予的帮助，你们辛苦了！感谢已毕业的朱才会师弟、李晓芳、李智慧师妹；感谢实验室的汤王鋆师妹、唐玲师妹、明乐师妹、宋宁宁师妹、钟淑蓉师妹；感谢徐颖师妹在实验上的帮助。感谢张祥毅同学在实验方面给我的帮助和鼓励；感谢李贲师兄、刘晶师兄；感谢赵闪闪、徐欢、刘宁宁师弟。感谢大家在实验和生活中给我的诸多关心与帮助，与你们一起做实验、一起讨论问题、一起思考人生、一起聚餐的日子是明亮又开心的。感谢康静怡学妹，在春夏之交我们一起做实验和交流的日子，是紧张又充实的！学术之外的收获，让我惊喜与感恩。

感谢潘逸萱老师在毕业课题和实验方面给予的巨大支持，包括实验动物的喂养、繁殖和处理，您在实验方法和数据处理方面不厌其烦的给我指导和帮助，以及不断的鼓励，都让我获益良多，感谢您，潘老师！感谢马继延老师在课题思路和实验规划方面给予的指导和帮助！感谢聊城大学的李旭勇老师和高鑫鑫同学在动物实验、动物伦理申请给予的支持！还要感谢实验室的王正寰老师、陈珉老师、汪成焕老师在论文撰写方面给我的意见和帮助！感谢华攀玉老师、毛秀光老师、张树义老师、张俊鹏老师、王喆老师、马骥老师、辅导员李初旭老师、王琛老师、赵娟老师、丁媛媛老师和学院各位老师六年来在学习和生活方面给予的关心和帮助！还要感谢已经毕业的戴梦瑶师姐、石慧珍师姐、葛含笑师姐、方涛师兄、董骥师兄、杨天笑师兄、朱光剑师兄、王人杰师兄、韩怡捷师姐、张伟师兄、谢汉斌师兄、邢宇彤师妹、孙海建师兄、马大成师兄、殷诚聪师兄在实验、科研、学习和生活方面给我帮助和关心。感谢石玉帛师弟在学院工作中给予的指出和帮助。感谢同级的翁晓东、潘李念、王义丹、张祥毅，读博和准备毕业论文期间的相互鼓励和帮助；感谢刘娣、任敏、石达、黄文杰、花永杰、吴浩楠、鲍振宇，感谢我们一起上课、做实验和写论文的日子，感谢室友柴瑞娟、张亚娟、刘婷婷、刘娣，感谢宿管阿姨和大叔，感谢你们不管在凌晨几点都等我们回宿舍的温暖。感谢可爱的你们，让实验室和宿舍成为温馨有爱的家庭。

感谢挚友刘娣，我们一起学习和生活，以及后来工作和科研的时光，在得意

和失意的日子里互相鼓励、帮助和安慰，分享、总结和学习人生的种种失去与收获，互相陪伴走过这段珍贵的时光。期待我们拥有更多关于生活平淡的、深刻的交流和人生一个又一个阶段的不同收获。

最后，感谢家人一直给我支持、鼓励、陪伴与爱，让我在这几年中安心求学。感谢父母的培养和言传身教，父母亲的严格与温柔、勤奋与善良，一直影响我，从他们那里，我学到关于为人处世、立言立行最初的道理。感谢胡元厚先生、秦显玲女士、传震同学、路仰兰女士、胡培芹老先生，谨以此文献给你们！

在实验室安静自由的氛围里实验、阅读、思考与记录，这段孤独时光使我清醒，在实验顺利与失败的交织中愈挫愈勇。命运埋伏的草蛇灰线，伏脉千里，明日可期。

愿秉烛夜游、砥砺前行！

人生聚散，愿大家一帆风顺，万事胜意。