



廖曦蓝, 黄伟涛, 罗永文, 罗均, 郭霄峰. 趋化因子受体 CXCR3 在狂犬病病毒感染中的作用研究[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(11): 120-130.
LIAO Xilan, HUANG Weitao, LUO Yongwen, LUO Jun, GUO Xiaofeng. The role of chemokine receptor CXCR3 in rabies virus infection[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(11): 120-130.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.11.13

趋化因子受体 CXCR3 在狂犬病病毒感染中的作用研究

廖曦蓝^{1,2} 黄伟涛¹ 罗永文¹ 罗均¹ 郭霄峰^{1*}

(1. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 复旦大学 生命科学学院, 上海 200438)

摘要 为分析 CXC 趋化因子受体 3 (CXC chemokine receptor 3, CXCR3) 在狂犬病病毒 (Rabies virus, RABV) 感染中发挥的作用, 首先将 RABV 强毒株 CVS-11 和弱毒株 HEP-Flury 分别滴鼻感染小鼠, 以实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR) 检测不同时间点 RABV 感染的小鼠脑内 CXCR3 相关配体的转录水平, 以及蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 CXCR3 的蛋白表达水平; 此外, 将 C57BL/6 小鼠和 CXCR3^{-/-} 小鼠分别滴鼻感染 RABV 街毒株 GD-SH-01、强毒株 CVS-11 和弱毒株 HEP-Flury, 检测小鼠血清中和抗体水平及记录临床表现, 同时以 qPCR 检测鼠脑白细胞分化抗原、细胞因子和 RABV 基因组等的转录水平。结果表明: 1) 感染强毒株 CVS-11 可极显著提高鼠脑趋化因子 CXCL9、CXCL10 和 CXCL11 的转录水平 ($P < 0.0001$)。2) 与强毒株 CVS-11 相比, 感染弱毒株 HEP-Flury 可显著提高鼠脑 CXCR3 蛋白表达水平 ($P < 0.0001$)。3) 敲除 CXCR3 对小鼠血清中和抗体的产生、存活率、体重和临床症状影响差异均不显著 ($P > 0.05$), 但显著增加了弱毒株 HEP-Flury 感染后第 9 天鼠脑内的病毒载量 ($P < 0.05$)。4) 敲除 CXCR3 对感染 RABV 后鼠脑的 CD4、IL-2 和 IL-6 的转录水平有显著的调节作用 ($P < 0.01$), 但对鼠脑中 CD8、IFN- γ 和 IgG κ -L chain 转录水平的影响差异不显著 ($P > 0.05$)。综上, 趋化因子受体 CXCR3 通过调控鼠脑免疫应答, 即 CD4、IL-2 和 IL-6 的表达以抵抗 RABV 感染, 但其不是唯一的决定因素。本研究为预防和治疗狂犬病提供理论基础。

关键词 狂犬病病毒; CXC 趋化因子受体 3; 致病机理

中图分类号 S85

文章编号 1007-4333(2024)11-0120-11

文献标志码 A

The role of chemokine receptor CXCR3 in rabies virus infection

LIAO Xilan^{1,2}, HUANG Weitao¹, LUO Yongwen¹, LUO Jun¹, GUO Xiaofeng^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. College of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract In order to analyze the role of CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) in rabies virus (RABV) infection, RABV virulent strain CVS-11 and attenuated strain HEP-Flury were intranasally infected mice, and the transcription levels of ligands of CXCR3 in the brains of RABV-infected mice collected at different time points were detected by real-time quantitative PCR (qPCR), and the protein expression level of CXCR3 was detected by western blot. In addition, C57BL/6 mice and CXCR3^{-/-} mice were infected with RABV street strain GD-SH-01, virulent strain CVS-11 and attenuated strain HEP-Flury, respectively, and the RABV neutralizing antibody in the peripheral blood and clinical manifestations of each group of mice were

收稿日期: 2024-05-09

基金项目: 广州市科技局基础与应用基础研究项目 (202201010652); “十四五”国家重点研发计划 (2022YFD1800104)

第一作者: 廖曦蓝 (ORCID: 0009-0004-5116-9444), 硕士研究生, E-mail: 759709448@qq.com

通讯作者: 郭霄峰 (ORCID: 0000-0003-2896-3629), 教授, 主要从事重要动物疫病和人兽共患病的研究, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

monitored. At the same time, the transcription levels of some cluster of differentiation (CD) macromolecules, cytokines and RABV genome were detected by qPCR. The results showed as follows: 1) Infection with virulent strain CVS-11 could extremely significantly increase the transcription levels of *CXCL9*, *CXCL10* and *CXCL11* in brain tissue of mice ($P < 0.0001$). 2) Compared with the virulent strain CVS-11, infection with attenuated strain HEP-Flury could significantly increase the expression level of CXCR3 in brain tissue of mice ($P < 0.0001$). 3) *CXCR3* knockout had no significant effects on the production of RABV neutralizing antibody, survival, body weight change and clinical symptoms of mice ($P > 0.05$), but the viral load in the brain tissue of mice on the 9th day after HEP-Flury infection was significantly increased ($P < 0.05$). 4) *CXCR3* knockout significantly regulated the transcription levels of some cytokines such as *CD4*, *IL-2* and *IL-6* in brain tissue of RABV-infected mice ($P < 0.01$), but had no significant influence on the transcription levels of *CD8*, *IFN- γ* and *IgG κ -L chain* ($P > 0.05$). In conclusion, CXCR3 had effect on the resistance to RABV infection by regulating immune response in brain tissue of mice, namely the expression of *CD4*, *IL-2* and *IL-6*, but might not play a decisive role. This study lays the foundation for the prevention and treatment to rabies.

Keywords rabies virus; CXCR3 chemokine receptor 3; pathogenesis

狂犬病(Rabies)是由狂犬病病毒(Rabies virus, RABV)引起的一种嗜神经性人兽共患传染病,目前依然是我国乃至全球公众健康的重大威胁。狂犬病目前尚无特效治疗药物,人感染 RABV 后一旦出现临床症状,几乎 100% 死亡^[1]。病毒感染机体后,免疫应答启动,通过早期的先天性免疫和后期的获得性免疫清除感染的病毒。然而,RABV 感染机体后,逆神经轴突进入脑组织,但由于血脑屏障的防护作用,外周免疫因子、免疫细胞和特异性抗体无法进入脑组织,致使 RABV 在中枢神经系统大量复制,最终导致死亡。研究证实,RABV 弱毒株感染机体后,于 CNS 中诱导产生大量趋化因子,进而导致血脑屏障的通透性增强,外周的免疫因子和免疫细胞进入 CNS,清除感染的 RABV^[2-4]。然而,街毒株在感染前期和中期无法诱导 CNS 产生趋化因子,血脑屏障无法打开,故免疫因子和免疫细胞不能进入 CNS,最终机体因 RABV 的大量复制引起严重的神经炎症而发病死亡,其中的具体机制尚不明晰。

趋化因子受体 CXCR3 是 CXC 趋化因子受体家族中的 G 蛋白偶联受体,又称 CD183,具有 7 个跨膜结构域,其参与免疫细胞募集和炎症反应,可能在神经系统疾病的发展中发挥关键作用^[5-6]。CXCR3 受体在 Th1 细胞、CTL 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞上高表达,具有多个趋化因子配体,包括 CXCL4、CXCL9、CXCL10 和 CXCL11,这 4 种趋化因子仅结合于 CXCR3 受体;趋化因子发挥生物学功能依赖于特定的趋化因子受体结合,CXCL9、CXCL10、CXCL11/CXCR3 轴主要作用于免疫细胞的迁移、

分化和激活,其调控幼稚 T 细胞向 Th1 辅助细胞(Th1 cell)的分化,并使免疫细胞迁移至病灶部位^[6-8]。研究表明,小鼠肺炎病毒感染导致不同的 Treg 细胞亚群募集、扩增到小鼠肺部和纵隔淋巴结,从而介导免疫反应清除病毒,然而低纤维饮食可减少表达 CXCR3 的 Treg 细胞的募集,增加了小鼠下呼吸道感染的严重程度^[9];此外,CXCR3 可以显著增强 CD8⁺ T 细胞迁移至病灶部位的能力,进而发挥抗病毒作用,且 CXCR3 缺陷的小鼠在感染登革热病毒后,脑组织内的病毒载量和小鼠死亡率比未感染病毒的对照组更高^[10]。尽管病毒感染后的炎症反应对于控制病毒增殖至关重要,但一些证据表明,过度的免疫反应和侵袭性炎症反应是感染后病情恶化甚至死亡的主要原因。AMG487 是一种 IP-10-CXCR3 拮抗剂,通过减少产生 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞等淋巴细胞来减轻 H1N1 病毒诱导的过度的肺部炎症^[11]。总而言之,CXCR3 在多种病毒感染中参与免疫细胞的迁移和浸润,介导正常或过度的免疫反应,然而 CXCR3 在 RABV 感染中是否参与免疫应答的调节,尚不清楚。

RABV 的前期研究表明,与街毒株相比,弱毒株在感染前期能诱导更高水平的趋化因子,进而更有效地打开血脑屏障,使免疫因子和免疫细胞进入 CNS。但是,结果同时显示感染前期弱毒株在 CNS 中的病毒载量显著高于街毒株(高 3~4 个数量级)。因此,弱毒株诱导的高水平趋化因子可能是其高病毒载量导致的^[12]。田钦^[1]通过体内转录组学研究发

现,RABV强毒株 CVS-11和弱毒株 HEP-Flury 分别滴鼻感染小鼠后,鼠脑中 CVS-11的病毒载量显著高于 HEP-Flury(高3~4个数量级),CVS-11诱导的趋化因子水平高于 HEP-Flury 或者相当,然而高水平的趋化因子依然没有改变小鼠死亡的结果,同时,CVS-11组小鼠脑组织中趋化因子受体 CXCR3的转录水平显著低于 HEP-Flury 组。此外,Callahan 等^[13]于2004年通过体外血脑屏障模型试验发现,能通过血脑屏障的 T(CD4)细胞表面高表达 CD45RO 和 CXCR3,进一步研究发现,CXCR3是免疫细胞穿过血脑屏障的标志物。而在 RABV 感染中,小鼠血脑屏障通透性的差异是强毒株和弱毒株致病性不同的主要原因之一。

因此,为分析趋化因子受体 CXCR3在 RABV 感染中的作用,本研究先用 RABV 强毒株 CVS-11和弱毒株 HEP-Flury 感染昆明小鼠以分析 CXCR3 表达水平的差异性,然后用街毒株 GD-SH-01、强毒株 CVS-11和弱毒株 HEP-Flury 分别感染 CXCR3 敲除小鼠以进一步验证。

1 材料与方法

1.1 毒株和实验动物

RABV 街毒株 GD-SH-01、标准攻击强毒株 CVS-11以及弱毒株 HEP-Flury 由华南农业大学兽医学院微生物学教研室保存。因本研究涉及 RABV 街毒株 GD-SH-01,故所有涉及 RABV 活毒的相关试验均于华南农业大学动物生物安全三级实验室进行。

实验动物 SPF 级 6~8 周龄昆明小鼠购自南方医科大学实验动物中心,SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠购自珠海百试通生物科技有限公司,B6.129P2-Cxcr3^{tm1Dgen}/J 基因敲除小鼠(CXCR3^{-/-}小鼠)购自美国 Jackson Laboratory,CXCR3^{-/-}小鼠购买 2 雌 1 雄,于华南农业大学实验动物中心屏障环境中进行繁育。所有动物均在华南农业大学实验动物中心进行严格的饲养管理。动物试验由华南农业大学实验动物中心进行伦理审查及批准。

1.2 主要试剂

RPMI-1640 细胞培养基及胎牛血清均购自 Life Technologies 公司。用于提取 RNA 的 Trizol 试剂盒购自 Mangan 公司。反转录试剂 HiScriptII Q

RT Supermix for qPCR(+gDNA wiper)、用于 qPCR 的试剂盒 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix 购自南京诺唯赞(Vazyme)生物科技公司。相关引物均由生工生物(上海)科技有限公司合成。抗 β -actin 一抗购自碧云天生物技术研究所以、抗 CXCR3 一抗购自 Abcam 公司。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗 RABV 核蛋白荧光抗体购自美国 Fujirebio Inc. 公司。用于中和试验的国际标准狂犬病免疫球蛋白为 WHO 产品。

1.3 RABV 接种小鼠与脑组织的采集

用 RPMI-1640 培养基将 3 株毒株 GD-SH-01、CVS-11 以及 HEP-Flury 的 TCID₅₀ 调整为 1.0×10^{-6} PFU/mL,对昆明小鼠、C57BL/6 小鼠与 CXCR3^{-/-}小鼠进行保定与麻醉,昆明小鼠分别滴鼻感染 RABV 强毒株 CVS-11 和弱毒株 HEP-Flury,C57BL/6 小鼠和 CXCR3^{-/-}小鼠分别滴鼻感染 RABV 街毒株 GD-SH-01、强毒株 CVS-11 和弱毒株 HEP-Flury,每只小鼠滴鼻接种的病毒量为 30 μ L,同时设置空白对照,即滴鼻等量的 RPMI-1640 培养基,GD-SH-01、CVS-11 以及 HEP-Flury 感染组各设置 9 只小鼠。

于感染后第 3 天、第 6 天以及第 9 天,从 3 个感染组中各取 3 只小鼠进行心脏灌流。灌流结束后,无菌取出鼠脑,置于 1.5 mL 离心管中,置于冰上或 4℃ 暂存。

1.4 RABV 感染后小鼠脑组织转录因子、白细胞分化抗原以及细胞因子等的测定

将 RABV 强毒株 CVS-11 和弱毒株 HEP-Flury 分别滴鼻感染昆明小鼠,将 RABV 街毒株 GD-SH-01、强毒株 CVS-11 和弱毒株 HEP-Flury 分别滴鼻感染 C57BL/6 小鼠和 CXCR3^{-/-}小鼠,在感染后第 3 天、第 6 天和第 9 天收集小鼠的脑组织,将采集的鼠脑加入 Trizol,并用电动组织研磨器研磨均匀,提取总 RNA,反转录成 cDNA。参照 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒说明书,以 qPCR 检测 RABV 感染的昆明小鼠脑内 CXCR3 相关配体 CXCL9、CXCL10 和 CXCL11 的转录水平,以 qPCR 检测 RABV 感染的 C57BL/6 小鼠和 CXCR3^{-/-}小鼠脑内白细胞分化抗原 CD4 和 CD8,IL-2、IL-6 和 IFN- γ 等细胞因子以及 IgG K-L chain 和 RABV 基因组的转录水平。所用引物信息如表 1 所示,RABV genome 的 qPCR 引物基于 RABV 先导 RNA 序列设计。

表 1 本研究用于 qPCR 的引物序列

Table1 Primer sequences used for qPCR in the study

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	退火温度/℃ <i>T_m</i>	产物长度/bp Product length
<i>GAPDH</i>	F: CGTCCCGTAGACAAAATGGT	57.4	110
	R: TTGATGGCAACAATCTCCAC	56.3	
<i>CXCL9</i>	F: CAGTGTGGAGTTCGAGGAACC	59.3	176
	R: AGGCAGGTTTGATCTCCGTT	58.6	
<i>CXCL10</i>	F: GTCTGAGTGGGACTCAAGGGAT	59.5	139
	R: TCAACACGTGGGCAGGATAG	59.0	
<i>CXCL11</i>	F: GGAAGGTCACAGCCATAGCC	59.4	171
	R: CTTTGTCGCAGCCGTTACTC	58.5	
<i>IL-2</i>	F: TGAGCAGGATGGAGAATTACAGG	61.0	120
	R: GTCCAAGTTCATCTTCTAGGCAC	57.6	
<i>IL-6</i>	F: GGCATAACGCACTAGGTTT	53.0	117
	R: GCTGGAGTCACAGAAGGAG	52.0	
<i>IFN-γ</i>	F: AGCAACAACATAAGCGTCATT	55.4	100
	R: CCTCAAACCTTGGCAATACTCA	55.6	
<i>IgG K-L chain</i>	F: CTGCCCAGTTCCTGTTTCTGTAG	62.3	112
	R: TGTCCAATGGTAACCGACAAAGTG	63.8	
<i>CD4</i>	F: AGGTCTCGCTTCAGTTTGCT	56.7	98
	R: AGCCACTTTCATCACCACCA	58.3	
<i>CD8</i>	F: CATCCTGCTTCTGCTGGCATT	62.6	116
	R: TGGGCGCTGATCATTTGTGAAA	65.9	
RABV genome	F: AGAAGAAGCAGACATCGTCAGTTG	60.5	98
	R: GGAGACCACCTGATTATTGACTTTGA	63.0	

1.5 Western blot 检测 RABV 感染对小鼠脑组织 CXCR3 表达的影响

将采集的昆明小鼠鼠脑加入配置好的蛋白裂解液,并用电动组织研磨器研磨均匀,提取总蛋白,超声 5 s, 100 ℃金属浴 10 min 后 10 000 r/min 离心 5 min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳,转膜。使用 5% 脱脂牛奶将 PVDF 膜 37 ℃封闭 1 h 后,用 PBST 清洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min,再分别孵育抗 CXCR3 一抗和抗 β-actin 一抗过夜。次日,用 PBST 清洗 PVDF 膜 3 次,然后 37 ℃孵育二抗 1~2 h,再次

用 PBST 清洗 PVDF 膜 3 次,随后将 PVDF 膜置于蛋白成像系统并使用 ECL 发光液进行曝光。最后,利用 Image J 软件对 Western blot 图像进行灰度值分析。

1.6 感染 RABV 小鼠临床症状、死亡率及体重监测

按照材料与方法 1.3 对 C57BL/6 小鼠与 CXCR3^{-/-}小鼠进行滴鼻攻毒,每天监测其发病、死亡和体重变化情况,持续 21 d。发病小鼠会出现体重下降、精神沉郁、反应迟钝、耸毛、瘫痪等临床症状。将各种可能出现的临床症状进行赋分^[14];其中

无临床症状记为0分,厌食、竖毛和精神沉郁等前驱症状记为1分,兴奋狂躁或运动失调等初期症状记为2分,麻痹或抽搐等记为3分,瘫痪或昏迷等后期症状记为4分,死亡记为5分。利用Excel绘制小鼠存活曲线,体重变化曲线以及临床症状变化曲线。

1.7 感染RABV小鼠血清中和抗体的检测

将RABV街毒株GD-SH-01、强毒株CVS-11和弱毒株HEP-Flury分别滴鼻感染C57BL/6小鼠和CXCR3^{-/-}小鼠,于感染后第14天和第21天检测小鼠血清中和抗体水平。因感染GD-SH-01和CVS-11的小鼠均于第一个检测时间点前发病、死亡,故于检测时间点仅采集了感染HEP-Flury的C57BL/6小鼠与CXCR3^{-/-}小鼠的外周血。通过眼眶静脉丛采血后,将血液样本置于37℃1h,然后于4℃静置过夜。随后1500 r/min离心10 min,取血清于56℃水浴30 min灭活补体,随后参照WHO的RABV中和试验标准操作流程检测小鼠血清RABV中和抗体水平。

1.8 数据分析

使用GraphPad Prism 8.0.1软件,采用双因素方差分析法进行数据分析(* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 感染不同致病性的RABV对小鼠脑组织趋化因子CXCL9、CXCL10和CXCL11转录水平的影响

qPCR结果显示,RABV感染后的第6天和第9天,CVS-11感染组的小鼠脑组织中趋化因子受体CXCR3的配体CXCL9(图1(a))、CXCL10(图1(b))和CXCL11(图1(c))的转录水平均显著高于HEP-Flury感染组($P<0.0001$),并且在感染的前中期有明显的上升趋势,而在中后期有所下降(图1)。结果表明,RABV强毒株CVS-11可以诱导比弱毒株HEP-Flury更高的趋化因子转录水平。

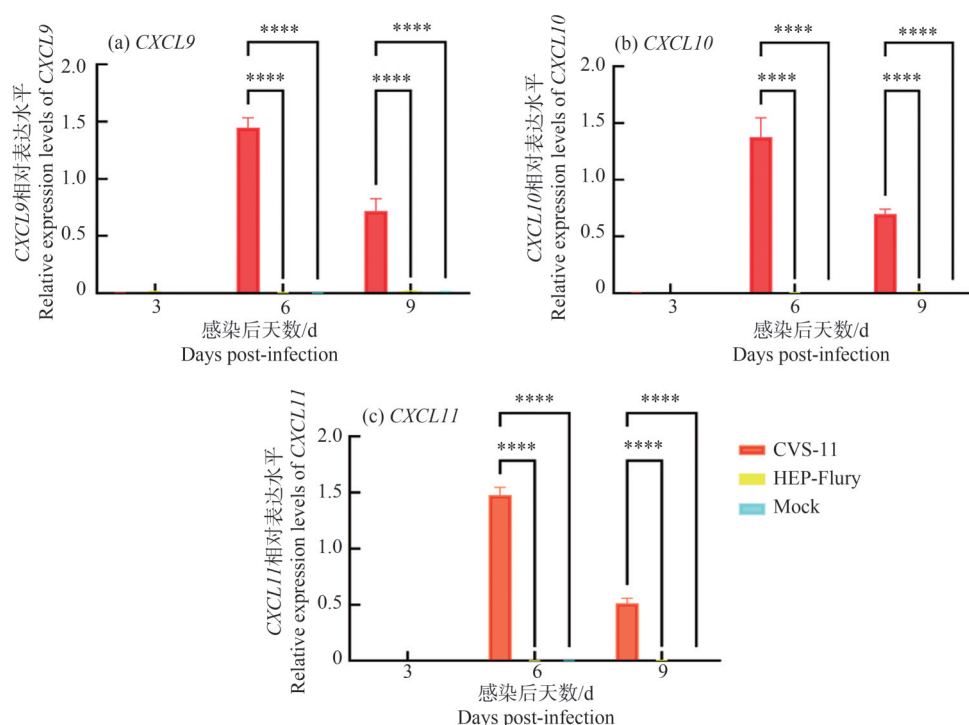


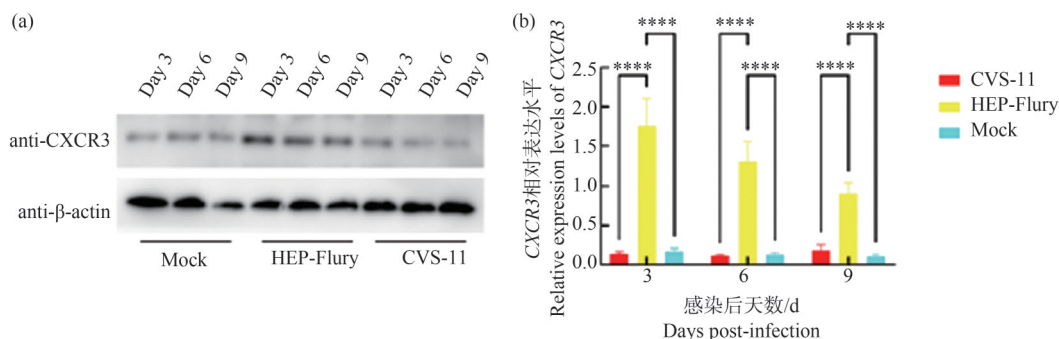
图1 感染不同致病性RABV后鼠脑趋化因子的转录水平

Fig. 1 Transcription levels of chemokines in mice brain after infection with different pathogenic RABV

2.2 感染不同致病性的RABV对小鼠脑组织CXCR3表达水平的影响

趋化因子发挥作用需要与趋化因子受体结合,本试验检测了趋化因子受体CXCR3在RABV感染后的表达水平。Western blot结果显示(图2),在感染后第

3天、第6天和第9天,HEP-Flury感染组的小鼠脑组织中趋化因子受体CXCR3蛋白表达水平均高于CVS-11感染组和对照组,即于感染后,与强毒株CVS-11相比,弱毒株HEP-Flury可以诱导小鼠脑组织表达更高水平的CXCR3,差异极显著($P<0.0001$)。



(a) 蛋白条带图; (b) 蛋白定量分析。

(a) Western blot analysis; (b) Relative protein level analysis.

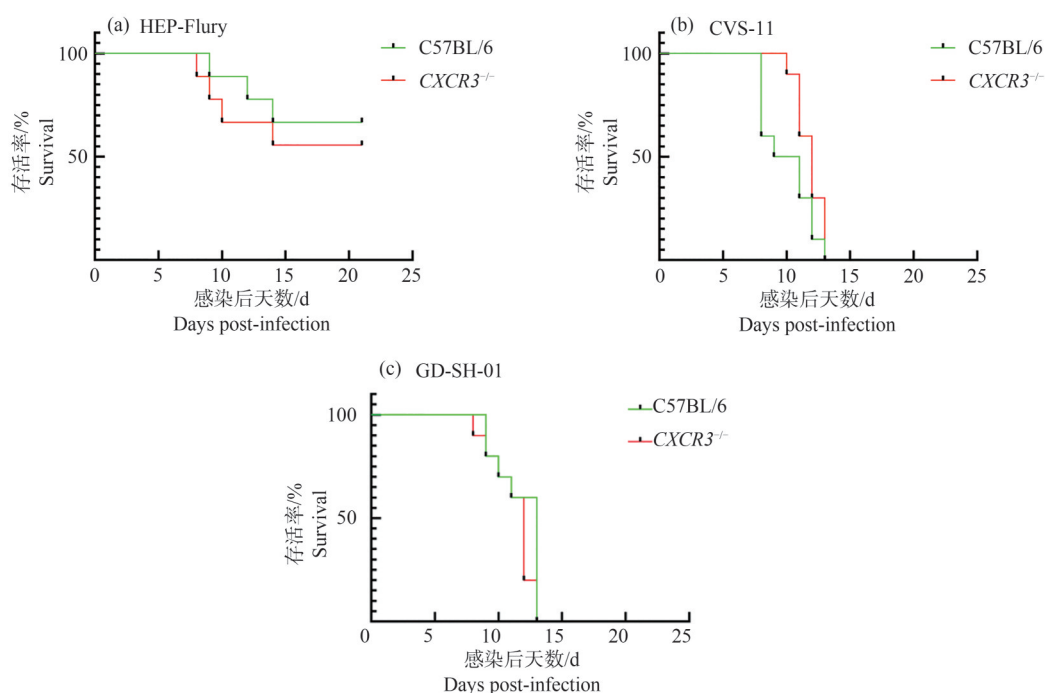
图 2 感染不同致病性 RABV 后鼠脑 CXCR3 的蛋白表达水平

Fig. 2 Expression level of CXCR3 in mice brain after infection with different pathogenic RABV

2.3 CXCR3 敲除对 RABV 致病性的影响

为进一步探究 CXCR3 对 RABV 致病性的影响, RABV 街毒株 GD-SH-01、强毒株 CVS-11 以及弱毒株 HEP-Flury 分别通过滴鼻途径感染 C57BL/6 小鼠

与 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠, 每天监测小鼠发病、死亡和体重变化情况, 持续 21 d。如图所示, 两组小鼠的存活率 (图 3)、体重变化率 (图 4) 以及临床症状评分 (图 5) 均差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 3 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠感染不同致病性的 RABV 的存活率Fig. 3 Survival rate of $CXCR3^{-/-}$ mice infected with different pathogenic of RABV

2.4 CXCR3 敲除对感染 RABV 小鼠血清中和抗体的影响

研究表明, 若外周血中和抗体水平大于或等于 0.5 IU/mL, 则可及时清除感染的 RABV 而起到保护作用。RABV 感染小鼠后, GD-SH-01 感染组和

CVS-11 感染组均于感染后第 10~12 天死亡, 在这两组小鼠濒临死亡时采集外周血, 检测发现该两组小鼠均无产生或只产生极低水平的中和抗体 (< 0.5 IU/mL)。对于 HEP-Flury 感染组, 于感染后第 14 天, C57BL/6 组有 4 只小鼠产生不足 0.5 IU/mL

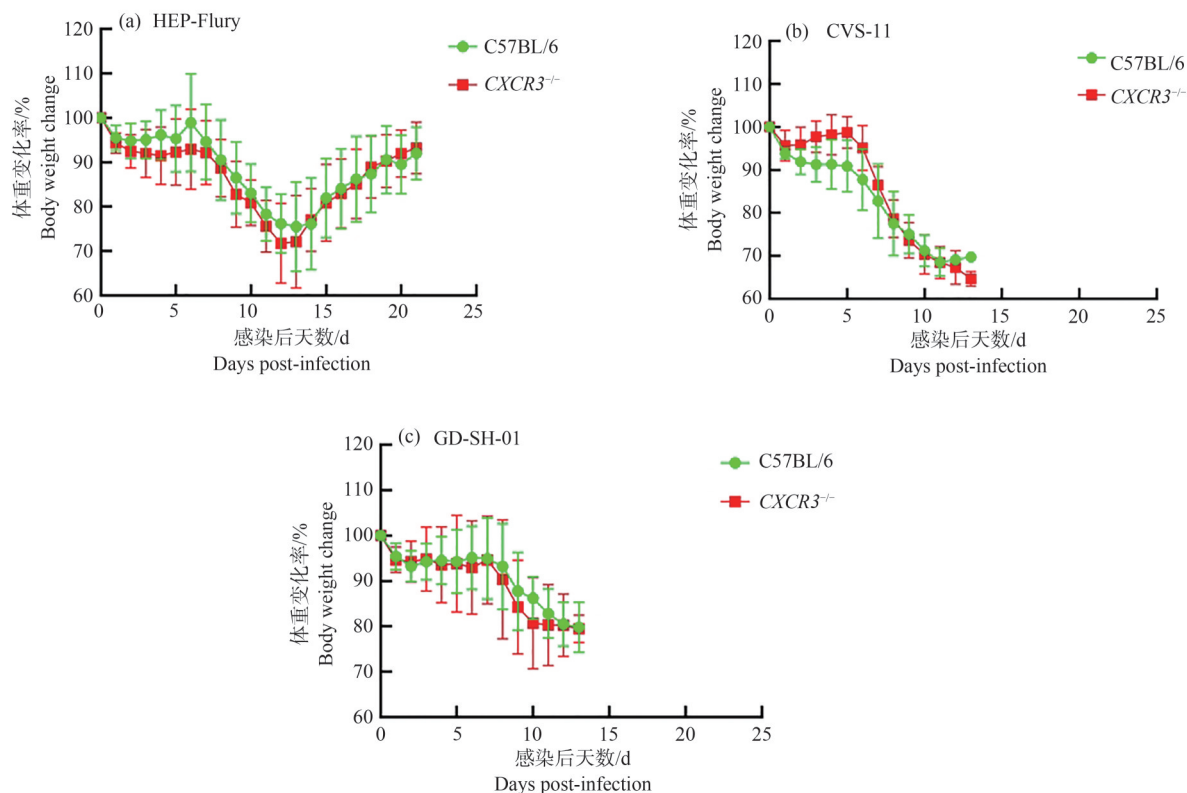


图4 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠感染不同致病性的RABV的体重变化趋势

Fig. 4 Weight change trend of $CXCR3^{-/-}$ mice infected with different pathogenic of RABV

的中和抗体,而 $CXCR3^{-/-}$ 组有3只小鼠没有产生或只产生极低水平的中和抗体(<0.5 IU/mL)。与第14天相比,HEP-Flury感染组所有小鼠于感染后第21天的中和抗体水平均有所提高(图6)。结果表明, $CXCR3$ 敲除对感染GD-SH-01、CVS-11和HEP-Flury小鼠血清中和抗体的影响不显著($P>0.05$)。

2.5 $CXCR3$ 敲除对感染RABV小鼠脑组织白细胞分化抗原和细胞因子等的转录水平的影响

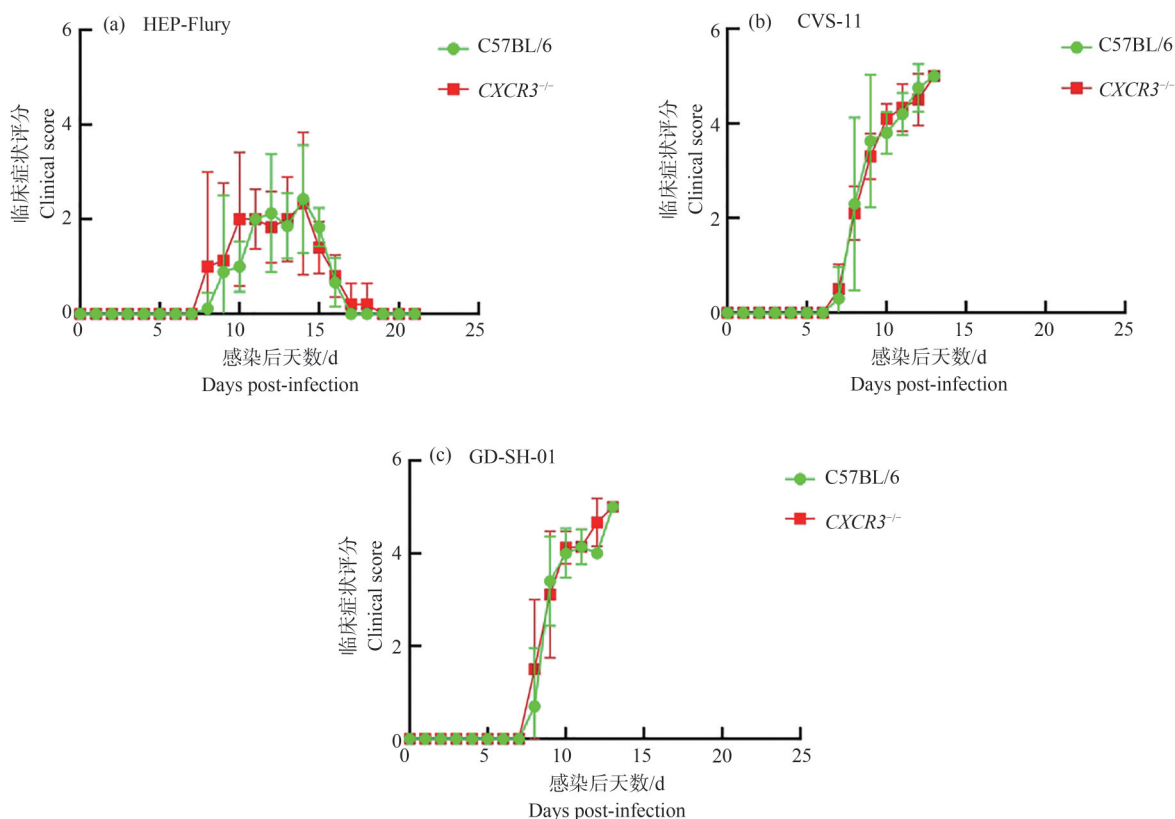
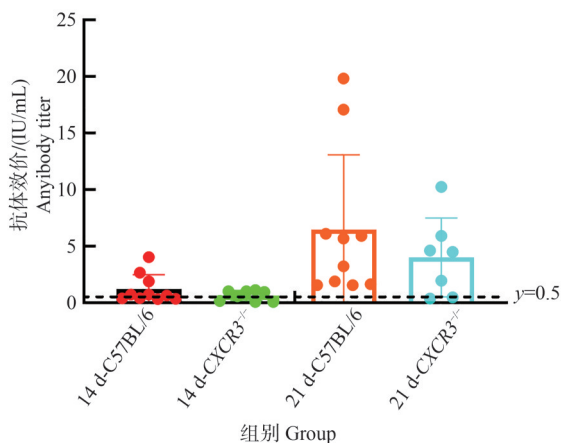
如图7所示,GD-SH-01感染小鼠后,不同时间点 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠和C57BL/6小鼠脑组织中病毒载量差异不显著($P>0.05$),而 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠的 $CD4$ ($P<0.01$)和 $IL-6$ ($P<0.01$)转录水平分别在感染中前期和感染后期显著低于C57BL/6小鼠;与C57BL/6小鼠相比,HEP-Flury感染 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠后第9天,脑组织的病毒载量显著增加($P<0.05$),而 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠的 $IL-2$ 转录水平在感染中期显著低于C57BL/6小鼠($P<0.01$)。结果表明,敲除 $CXCR3$ 对感染RABV后小鼠脑组织 $CD8$ 、 $IFN-\gamma$ 、 IgG κ -L chain转录水平的影响差异不显著

($P>0.05$),但对 $CD4$ 、 $IL-2$ 和 $IL-6$ 的转录水平有显著的调节作用($P<0.01$)。

3 讨论

狂犬病是由RABV引起的一种嗜神经性、烈性人兽共患传染病,致死率高达100%,尚无有效的治疗药物。RABV有很长的研究历史,但对于狂犬病具体的发病机制仍不完全清楚,其中RABV强毒株和弱毒株感染人和动物后,致病性差异显著,但人们对此认知有限。研究表明,相较于强毒株,弱毒株感染能更快地激活机体的固有免疫应答,且能提高血脑屏障的通透性,使免疫细胞和某些免疫大分子更快进入CNS清除病毒,而这其中的机制尚不明晰。趋化因子受体 $CXCR3$ 具有调节免疫细胞浸润的功能,并且是免疫细胞穿过血脑屏障的标志物^[13],但它在RABV感染中发挥的功能尚不清楚。

本研究通过对RABV强、弱毒株感染小鼠后脑组织趋化因子受体 $CXCR3$ 及其配体表达进行检测,发现强毒株CVS-11能诱导更高的趋化因子转

图 5 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠感染不同致病性的 RABV 临床症状评分Fig. 5 Clinical symptoms of $CXCR3^{-/-}$ mice infected with different pathogenic of RABV图 6 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠感染 HEP-Flury 的外周血中和抗体水平Fig. 6 Levels of RABV neutralizing antibodies in peripheral blood of $CXCR3^{-/-}$ mice infected with HEP-Flury

录水平,这与之前的研究中 RABV 固定毒能诱导神经元合成分泌大量细胞因子与趋化因子的结果相一致^[15],但也可能是感染 CVS-11 小鼠脑内病毒载量更高所致^[12];而 HEP-Flury 能诱导更高的趋化因

子受体 CXCR3 蛋白表达,尤其在感染的前期,HEP-Flury 诱导的 CXCR3 蛋白表达比对照组高 3 倍以上。研究表明,RABV 街毒株感染机体后,抑制了趋化因子产生,这可能是导致机体无法清除病毒的因素之一^[12]。本研究中,RABV 固定强毒株能诱导高水平的趋化因子,但并不能在 RABV 感染过程中发挥理想的保护作用,这可能与过度表达的趋化因子会引起严重的炎症和损伤神经元相关^[16]。然而,致病性 RABV 和非致病性 RABV 在感染小鼠后 CNS 诱导不同水平的趋化因子受体 CXCR3。

研究表明,CXCR3 可以调节免疫细胞浸润 CNS 以及影响血脑屏障通透性^[10, 13]。为分析 CXCR3 在 RABV 感染中对免疫应答的调节作用,本研究用街毒株 GD-SH-01、强毒株 CVS-11 和弱毒株 HEP-Flury 分别感染 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠和 C57BL/6 小鼠,检测小鼠 CNS 中免疫相关指标的表达水平。若 CXCR3 可通过调节小鼠 CNS 的免疫应答以抵抗 RABV 的感染,则感染不同致病性毒株的 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠的免疫应答都应发生变化,理论

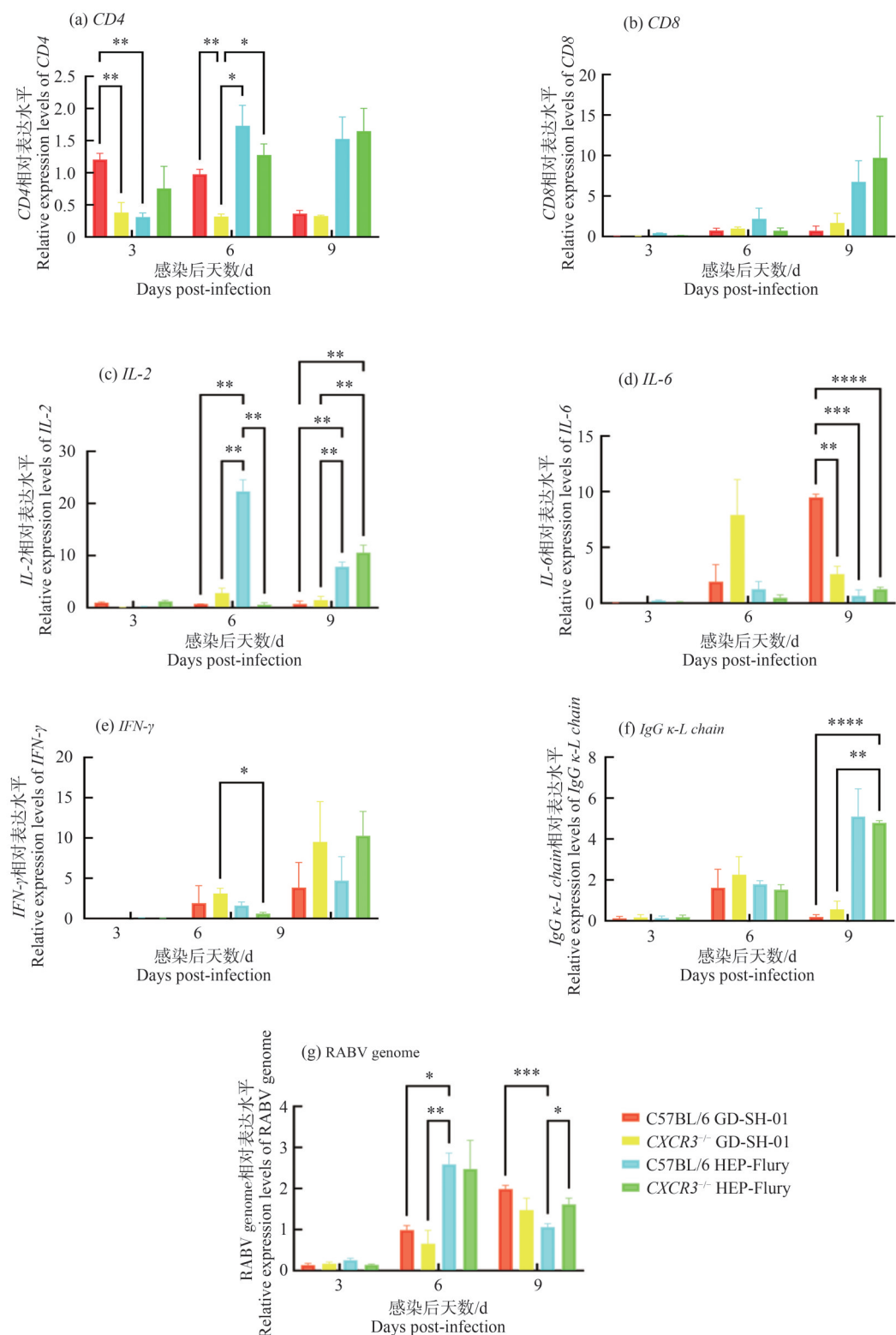


图7 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠感染RABV后脑组织白细胞分化抗原和细胞因子等的转录水平

Fig. 7 Transcription levels of CD and cytokines, etc. in $CXCR3^{-/-}$ mice brain after infection with RABV

上,感染弱毒株的 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠免疫应答下调应最为显著,最终导致小鼠死亡,而街毒株和强毒株感染的 $CXCR3^{-/-}$ 小鼠应比 C57BL/6 小鼠更快死亡。然而,本研究探究敲除 $CXCR3$ 对 RABV 致病

性的影响的结果显示, CXCR3 敲除对 GD-SH-01、CVS-11 和 HEP-Flury 感染小鼠的临床症状、死亡率和体重变化趋势没有显著影响($P>0.05$)。但其他结果表明, 虽然 CXCR3 敲除后对鼠脑内街毒株 GD-SH-01 的病毒载量影响不显著($P>0.05$), 但在感染后第 9 天显著增加了鼠脑内弱毒株 HEP-Flury 的病毒载量($P<0.05$), 同时, 也确实减少了 RABV 感染所诱导的 *CD4*、*IL-2* 和 *IL-6* 的表达水平($P<0.01$), 说明 CXCR3 在 RABV 感染中确实参与调控部分白细胞分化抗原和细胞因子的表达。由此观之, 趋化因子受体 CXCR3 虽然不是唯一的决定因素, 但小鼠确实可通过调节 CNS 中的免疫应答而对抵抗 RABV 感染产生一定的作用, 这为研究 RABV 致病性和免疫逃逸提供基础, 同时可能为狂犬病疫苗研制和治疗药物的研究提供新的靶点。结果表明, CXCR3 在一定程度上可以调节抵抗 RABV 的免疫应答, 则可应用刺激表达 CXCR3 的 T 细胞产生的疫苗佐剂, 以期研制更有效和廉价的狂犬疫苗; 对于治疗药物的研究而言, 可通过将表达 CXCR3 的 T 细胞分选出来而后回输至机体, 或使用 CXCR3 激动剂提高 T 细胞表面 CXCR3 的表达, 达到治疗狂犬病的目的。

然而, 本研究并未明确 CXCR3 在 RABV 感染中对小鼠血脑屏障通透性的调节作用, 这将是今后进一步研究的方向之一。

4 结 论

本研究证实, 在 RABV 感染中, 趋化因子受体 CXCR3 调控了白细胞分化抗原 *CD4*、细胞因子 *IL-2* 和 *IL-6* 的表达, 且敲除 CXCR3 后, 鼠脑内的 HEP-Flury 病毒载量于感染后第 9 天显著增加, 但对感染 RABV GD-SH-01 株、CVS-11 株和 HEP-Flury 株的小鼠的血清中和抗体的产生、临床症状、存活率和体重变化没有显著影响。综上, 趋化因子受体 CXCR3 通过调控小鼠 CNS 的免疫应答, 即 *CD4*、*IL-2* 和 *IL-6* 的表达来抵抗 RABV 感染, 但其不是唯一的决定因素。

参考文献 References

- [1] 田钦. 基于基因替换的重组狂犬病病毒生物学性状及其感染小鼠的全脑转录组研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017
- Tian Q. Effect of gene substitution on biological character of rabies virus

- and transcriptional profiles of mice brain infected with rabies virus [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [2] 龙家慧. 狂犬病病毒疫苗株及致病株感染鼠脑中 I 型干扰素相关基因的差异表达分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2019
- Long J H. A study on the differential expression analysis of type I interferon-related genes in mouse brain by infected by rabies virus vaccine strain and pathogenic strain [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [3] Chai Q Q, He W Q, Zhou M, Lu H J, Fu Z F. Enhancement of blood-brain barrier permeability and reduction of tight junction protein expression are modulated by chemokines/cytokines induced by rabies virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(9):4698-4710
- [4] Chai Q Q, She R P, Huang Y, Fu Z F. Expression of neuronal CXCL10 induced by rabies virus infection initiates infiltration of inflammatory cells, production of chemokines and cytokines, and enhancement of blood-brain barrier permeability[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(1):870-876
- [5] Zhou Y Q, Liu D Q, Chen S P, Sun J, Zhou X R, Xing C, Ye D W, Tian Y K. The role of CXCR3 in neurological diseases [J]. *Current Neuropharmacology*, 2019, 17(2):142-150
- [6] Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger M D, Soni S, McSkane M, Baba H, Lenz H J. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation: A target for novel cancer therapy[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2018, 63:40-47
- [7] Hosking M P, Lane T E. The role of chemokines during viral infection of the CNS[J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(7):e1000937
- [8] Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of the CXCL chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2011, 22(1):1-18
- [9] Sebina I, Ngo S, Rashid R B, Alorro M, Namubiru P, Howard D, Ahmed T, Phipps S. CXCR3⁺ effector regulatory T cells associate with disease tolerance during lower respiratory pneumovirus infection [J]. *Immunology*, 2024, 172(3):500-515
- [10] Hickman H D, Reynoso G V, Ngudankama B F, Cush S S, Gibbs J, Bennink J R, Yewdell J W. CXCR3 chemokine receptor enables local CD8⁺ T cell migration for the destruction of virus-infected cells [J]. *Immunity*, 2015, 42(3):524-537
- [11] Ding W B, Li R F, Song T T, Yang Z F, Xu D T, Huang C Q, Shen S R, Zhong N S, Lai K F, Deng Z. AMG487 alleviates influenza A (H1N1) virus-induced pulmonary inflammation through decreasing IFN- γ -producing lymphocytes and IFN- γ concentrations [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2024, 181(13):2053-2069
- [12] Kuang Y, Lackay S N, Zhao L, Fu Z F. Role of chemokines in the enhancement of BBB permeability and inflammatory infiltration after rabies virus infection[J]. *Virus Research*, 2009, 144(1/2):18-26
- [13] Callahan M K, Williams K A, Kivisakk P, Pearce D, Stins M F, Ransohoff R M. CXCR3 marks CD4⁺ memory T lymphocytes that are competent to migrate across a human brain microvascular endothelial cell layer[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2004, 153(1/2):150-157
- [14] 罗均. G 蛋白替换及点突变对狂犬病病毒生物学特性的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2018
- Luo J. Effect of RABV G protein replacement and mutation on biological characters [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [15] Appolinário C M, Allendorf S D, Peres M G, Ribeiro B D, Fonseca C R, Vicente A F, Antunes J M, Megid J. Profile of cytokines and chemokines

triggered by wild-type strains of rabies virus in mice[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2016, 94(2):378-383

[16] Zhao L, Toriumi H, Kuang Y, Chen H C, Fu Z F. The roles of

chemokines in rabies virus infection: Overexpression may not always be beneficial[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(22):11808-11818

责任编辑:秦梅



第一作者简介: 廖曦蓝,华南农业大学毕业本科生,复旦大学在读硕士研究生,主要从事狂犬病病毒致病的分子机制研究。曾荣获国家奖学金和华南农业大学一等学业奖学金各1次。本科期间,以第三作者发表SCI论文1篇。



通讯作者简介: 郭霄峰,教授,博士,华南农业大学博士生导师,广东省“南粤优秀教师”,主要从事重要动物疫病和人兽共患病的研究。目前主持国家“十四五”重点专项子课题1项,主持岭南现代农业科学与技术广东省实验室肇庆分中心省级项目1项。申请专利13项,获授权10项。主编教材1部,参编3部。获国家级科技成果2项,省级4项,以通讯作者在国内外高质量期刊发表论文70余篇。