

# 中文摘要

## 介导狂犬病病毒侵入神经肌肉接头的调控因子研究

狂犬病是由狂犬病病毒 (rabies virus, RABV) 感染引起的一种高度致死性人兽共患传染病, 感染者一旦发病, 致死率几乎 100%。狂犬病在全球一些地区仍然是一个重要的公共卫生问题, 尤其是在亚洲和非洲的一些地区, 每年有数千人死于此病, 且目前无有效的临床治疗手段, 故深入探究其感染机制意义重大。

经患犬等咬伤感染的 RABV 从外周肌肉组织经神经肌肉接头 (neuromuscular junction, NMJ) 侵袭中枢神经系统 (CNS), 其在 NMJ 处自肌肉细胞入侵神经细胞的机制至关重要。我们分别对 RABV 感染的小鼠海马神经元 (HT22) 和小鼠成肌细胞 (C2C12) 进行转录组学测序, 比较两种细胞中的差异表达基因 (DEGs), 发现它们涉及的主要信号通路有所不同。其中聚集蛋白 (Agrin) 和其受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 4 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 4, LRP4) 在 C2C12 细胞感染 RABV 后显著上调, 而在 HT22 细胞感染后无显著变化。为此, 我们深入探究了 Agrin 和 LRP4 对 RABV 感染 C2C12 细胞的具体调控机制。

有研究表明, Agrin 和 LRP4 在 NMJ 的功能调控中起着关键作用。在肌肉细胞中, Agrin 通过刺激肌肉特异性激酶 (muscle-specific kinase, MuSK) 发挥作用, 可诱导 MuSK 的酪氨酸磷酸化从而调控 NMJ 的形成和 nAChR 的聚集。LRP4 作为 Agrin 受体复合物的关键成分, 负责将信号从 Agrin 传递给 MuSK, 是 Agrin-MuSK 信号通路转导和肌细胞中 nAChR 聚集所必需的。

本研究首先采用基因沉默手段下调 C2C12 细胞中 Agrin 和 LRP4 的表达水平, 接种 RABV 24h 和 48h 后, 采用 Western Blot、RT-qPCR、TCID<sub>50</sub> 等手段分别检测 RABV N 和 nAChR 的蛋白水平、mRNA 水平及细胞上清病毒滴度的变化。结果显示, Agrin 和 LRP4 敲低组的 RABV N 和 nAChR 的蛋白水平、mRNA 水平及细胞上清中病毒滴度均显著降低。随后用 Agrin 外源性蛋白处理 C2C12 细胞 24h, 然后接种 RABV, 分别在 24h 和 48h 检测其对于病毒感染水平的影响, 发现 Agrin 蛋白处理导致病毒感染水平增加。以上结果表明 Agrin 和 LRP4 促进 RABV 感染。

其次，为进一步探究 Agrin 是否通过 Agrin-LRP4 通路调控 RABV 感染，我们敲低 LRP4 后用 Agrin 外源蛋白处理 C2C12 细胞，后接种 RABV，24h 后进行检测。结果显示，LRP4 的沉默一定程度抑制了外源 Agrin 蛋白对 RABV 感染的促进作用，说明 Agrin-LRP4 通路发挥对 RABV 感染的调控作用。

本研究探究了 Agrin-LRP4 调控 RABV 感染的重要功能，深入揭示了 RABV 在 NMJ 的感染机制，可望为狂犬病的预防和治疗提供新的策略。

**关键词：**

狂犬病病毒，神经肌肉接头，nAChR，Agrin，LRP4

# 目 录

引 言 .....	1
第一篇 文献综述 .....	2
第 1 章 RABV 的研究进展 .....	2
1.1 狂犬病的概述 .....	2
1.2 RABV 的结构 .....	3
1.3 RABV 的生命周期 .....	5
1.4 RABV 入侵 NMJ .....	6
第 2 章 Agrin 蛋白的研究进展 .....	11
2.1 Agrin 蛋白概述 .....	11
2.2 Agrin 及相关分子对 NMJ 的调节 .....	12
第二篇 研究内容 .....	15
第 1 章 RABV 感染小鼠神经元细胞 HT22 的差异基因表达谱鉴定 ..	15
1.1 材料和方法 .....	15
1.2 结果 .....	18
1.3 讨论 .....	22
1.4 小结 .....	23
第 2 章 RABV 感染小鼠成肌细胞 C2C12 的差异基因表达谱鉴定	24
2.1 材料与方法 .....	24
2.2 结果 .....	25
2.3 讨论 .....	29
2.3 小结 .....	31
第 3 章 Agrin-LRP4 调控 RABV 感染的机制 .....	32
3.1 材料与方法 .....	32

3.2 结果 .....	35
3.3 讨论 .....	47
3.4 小结 .....	48
结 论 .....	49
参考文献 .....	50
附 录 .....	67
导师简介 .....	71
作者简介及科研成果 .....	72
致 谢 .....	73

## 英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
C2C12	C2C12 Mouse Myoblast Cells	小鼠成肌细胞
HT22	HT22 Mouse Hippocampal Neuronal Cells	小鼠海马神经元细胞
N2a	MouseneuroblastomaN2a	小鼠神经瘤母细胞
RABV	Rabies virus	狂犬病病毒
CVS	Challenge virus standard	标准攻击毒株
RNP	Ribonucleoprotein complex	核糖核蛋白复合体
MOI	Multiplicity of Infection	感染复数
TCID <sub>50</sub>	50% tissue cell infection does	半数组织细胞感染量
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
FBS	Fatal bovine serum	胎牛血清
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
BCA	Bicinchoninic acid	二喹啉甲酸法
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR	定量逆转录 PCR
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

## 引 言

狂犬病由 RABV 引起，是一种高度致死性的传染病，其历史悠久，每年在全球范围内持续影响 4 万至 7 万人<sup>[1]</sup>。人类通常通过接触感染 RABV 的动物而感染，一旦 RABV 侵入中枢神经系统，没有任何有效的治疗方法，造成的死亡率几乎为 100%<sup>[1]</sup>。

NMJ 是一种特殊的化学突触，位于神经细胞和肌肉纤维之间，主要功能是将神经信号从神经细胞传导至肌肉纤维，促使肌肉收缩<sup>[2]</sup>。RABV 通过这一结构侵入神经系统，这一过程是其感染过程中的关键环节<sup>[3]</sup>。RABV 的感染发生在被患病动物咬伤的肌肉处感染，在部分动物中发现，该病毒在肌肉组织中经过一定时间的复制之后，经由 NMJ 入侵神经元，最终感染中枢神经系统。研究发现，通过咬伤侵入的 RABV 主要通过 NMJ 侵入运动神经末梢和感觉神经末梢<sup>[3-5]</sup>。这可能与 NMJ 上特有的病毒受体和 NMJ 处介导其感染的调控因子相关，因此揭示这些机制可能对探究 RABV 的感染具有重要意义。

基于此，本项目对 RABV 感染和对照组的肌细胞 C2C12 和神经元 HT22 进行转录组学测序，以模拟 NMJ 突触前后的两种细胞类型，筛选两种不同细胞中的差异表达基因，发现 Agrin 和 LRP4 是介导其在 NMJ 处感染的关键调控因子。本研究拟以此作为切入点，通过 WB、RT-qPCR、TCID<sub>50</sub>、siRNA 干扰、外源蛋白处理等一系列生物学手段，检测 Agrin 和 LRP4 对于 RABV 感染和 nAChR 表达的影响，为阐释 RABV 致病机理提供新的依据。

## 第一篇 文献综述

### 第1章 RABV 的研究进展

#### 1.1 狂犬病的概述

狂犬病是一种人畜共患疾病，由 RABV 引起的一种急性病毒性神经系统疾病，最早于公元前 4 世纪被发现<sup>[6]</sup>，主要通过感染动物（如犬、狐、蝙蝠等）的唾液传播给人类和其他动物。由于全球每年的死亡人数很高，狂犬病仍持续对人类和动物健康构成严重威胁<sup>[7]</sup>。狂犬病的潜伏期长短不一，通常为 1-3 个月，但也可能长达数年。狂犬病的最初症状包括发烧、疼痛、伤口有刺痛或灼烧感。随着病毒扩散到 CNS，疾病发展为致死性脑炎和脑脊髓炎，导致兴奋性或麻痹性狂犬病的典型临床体征，最终因咽部痉挛或呼吸循环衰竭而窒息死亡<sup>[8-10]</sup>。一旦狂犬病的临床症状出现，目前几乎束手无策。有限的治疗主要集中在镇静和提供支持性护理上，因此预防是控制狂犬病最有效的方法。动物和人类狂犬病可以通过接种疫苗来预防，第一个有效的人类使用的狂犬病疫苗是在 19 世纪开发出来的<sup>[11]</sup>。然而，在 21 世纪，这种病毒仍然在全球范围内流行，尤其在亚洲、非洲和拉丁美洲的发展中国家中狂犬病的发病率依然较高<sup>[7]</sup>。

据报道，高达 99% 的人类狂犬病病例是由患狂犬病的狗的深咬或抓伤引起的<sup>[12]</sup>。该病毒也可以通过接触被感染动物的唾液或其他体液传播。感染患者器官移植引起 RABV 感染和气溶胶传播的病例相对罕见<sup>[13, 14]</sup>。通常，在部分被感染动物深咬后，RABV 在肌肉细胞中复制，并与神经肌肉接头的受体结合，引发早期外周感染<sup>[15]</sup>。病毒通过周围神经和脊髓，向心扩散到达中枢神经系统。RABV 一旦进入大脑，就会大规模复制并离心扩散到周围神经系统，感染周围组织，如心脏、唾液腺、肾上腺、胃肠道和胰腺<sup>[16-19]</sup>。唾液腺是 RABV 离心扩散的主要出口，支持病毒复制。部分受感染的狗可以在其唾液中排泄病毒颗粒长达 14 天，然后才出现明显的狂犬病临床症状<sup>[20]</sup>。

减少人类狂犬病负担的首要任务是控制犬传播的狂犬病，特别是在人类社区中自由行动的犬类<sup>[11, 21-23]</sup>。在北美、欧洲和拉丁美洲的一些国家，以及在欧洲和

加拿大的野生动物中，狂犬病已基本被消灭<sup>[24]</sup>，随之这些地区的人类狂犬病病例也大幅减少，所以 WHO 倡导采取“**One Health**”办法控制狂犬病刻不容缓，即强调人类健康、动物健康和环境健康之间的密切联系和相互依赖性。该理念认识到，为了有效地预防和控制全球性的健康威胁，必须跨越传统的学科壁垒，采用一种综合性、多学科的方法，协同工作以实现最佳健康结果<sup>[25]</sup>。因此，世界卫生组织（WHO）、世界动物卫生组织（OIE）和联合国粮食及农业组织（FAO）制定了到 2030 年在狂犬病流行国家消除狗传播的人类狂犬病的目标<sup>[26]</sup>。

## 1.2 RABV 的结构

RABV 属于弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）狂犬病毒属（*Lyssavirus*），是一种单股负链 RNA 病毒，具有子弹形状的外观<sup>[9]</sup>。RABV 的 RNA 基因组（约 12 kb）由 5 个基因组成，分别编码五种主要的病毒结构蛋白：核蛋白（N）（58-62 kDa）、磷蛋白（P）（35-40 kDa）、基质蛋白（M）（22-25 kDa）、糖蛋白（G）（65-80 kDa）和 RNA 聚合酶（L）（190 kDa）<sup>[27]</sup>。

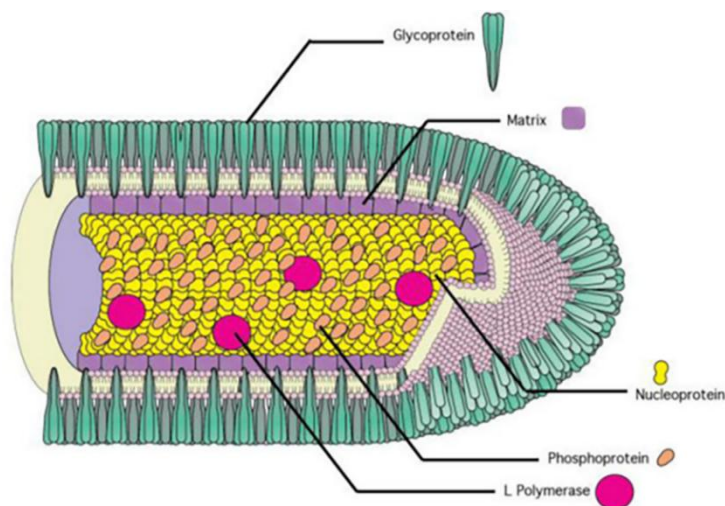


图 1.1 RABV 的结构（引自 DAVIS B M<sup>[1]</sup>）

N 是 *lyssavirus* 基因组中最保守的基因<sup>[28]</sup>，因此在 *lyssavirus* 属中，N 常被用于毒株基因型鉴别<sup>[29]</sup>。N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白组合在一起形成病毒粒子的核糖核蛋白（RNP），其具有 RNA 聚合酶活性。N 包被病毒基因组后，L 可对病毒基因组进行转录和复制<sup>[30]</sup>。N-RNA 的封闭形式有可能限制了 RNA 基因组的



复制,从而抑制了 RIG-I 的激活。除了这一基本功能外, N 在感染过程中参与对宿主先天性免疫应答的抑制,从而帮助病毒在大脑和中枢神经系统中高效复制和传播。N 通过限制 RIG-I 的激活来抑制 IRF-3 通路的激活,从而降低宿主干扰素和趋化因子的表达<sup>[30]</sup>。

P 蛋白是病毒 RNA 聚合酶的辅助因子,在病毒转录和复制中起核心作用。P 还具有拮抗宿主先天免疫反应的作用,可利用细胞因子通过不同的机制逃避免疫反应<sup>[31]</sup>。例如,RABV P 蛋白通过与 STAT1/2 蛋白的相互作用,抑制 I 型(IFN- $\alpha/\beta$ )和 II 型(IFN- $\gamma$ ) IFN 依赖的 JAK-STAT 信号,通过这种机制使宿主免疫系统被隔离<sup>[32]</sup>。I 型和 II 型 IFN 受体由相关的 IFN 触发,继而 STATs 被 JAK 和酪氨酸激酶磷酸化。在这一步骤中, P 与 STAT1/2 结合,阻止其转移至细胞核,进而抑制抗病毒产物的表达,如抗粘病毒蛋白 1、OAS1 和其他 ISG 产物。P 蛋白对宿主免疫系统的抑制机制是保障 RABV 感染的关键因素<sup>[33]</sup>。

RABV 中最小、数量最多的蛋白质是 M 蛋白,其主要负责病毒组装/出芽以及通过 L 和 M 之间的直接或间接相互作用调节病毒转录和复制的平衡<sup>[34]</sup>。它也能下调宿主基因表达<sup>[34]</sup>及凋亡<sup>[35]</sup>、调节宿主先天性免疫防御和病毒粒子脱壳<sup>[36, 37]</sup>。其中, M 蛋白的 PPEY 核心基序(35-38 氨基酸)可能通过与宿主蛋白(包括 NEDD4)的 WW 结构域相互作用而参与病毒出芽。PPEY 基序中 Y 与 A 的取代破坏了这种相互作用<sup>[31]</sup>。宿主介导的 M 泛素化对 RABV 出芽也很重要<sup>[37]</sup>,这种结合可能使细胞的内体分选所需转运蛋白复合体(ESCRT)从核内体膜重新定位到质膜<sup>[38]</sup>。此外, M 参与 RABV 复制的不同步骤、劫持宿主细胞的翻译机制,并抑制宿主关键的抗病毒途径 NF- $\kappa$ B 和 JAK-STAT,在狂犬病感染过程中发挥重要作用<sup>[31]</sup>。

G 蛋白是 RABV 病毒粒子的表面蛋白,在病毒粒子表面形成三聚体纤突。G 的 N 端结构域在 RABV 的脂质包膜上向外延伸, C 端结构域插入到病毒的包膜下,与 M 结合产生一个完整的病毒粒子<sup>[31]</sup>。G 在病毒感染中扮演多种重要作用,如病毒附着于神经元的特异性受体<sup>[39]</sup>、诱导病毒中和抗体<sup>[40]</sup>、神经元存活或凋亡<sup>[41]</sup>、病毒释放<sup>[42]</sup>等。其中 G 最主要的作用之一是与宿主细胞的特异性受体结合从而介导病毒的附着和内化, nAChR、NCAM、p75NTR 和 mGluR2 等已被证明是于 G 蛋白结合的 RABV 特异性受体<sup>[43-46]</sup>。G-宿主蛋白的相互作用决定了

病毒感染性、神经存活或凋亡以及病毒在中枢神经系统内的传播。

L 蛋白具有 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 活性。L 通过其转录酶、加帽作用和聚腺苷酸化活性来引导病毒基因组的复制和 mRNA 的转录<sup>[47]</sup>。在 RNP 核心中, L 与 P 的相互作用和 L-P 复合物的形成是病毒转录和复制所必需的<sup>[31]</sup>。L 与 N 的结合对 RABV 基因组 RNA 复制的起始起重要作用<sup>[48]</sup>。L 中已检测到类似于 RABV P 的 DLC1 结合基序,有研究认为 DLC1-RABV L 相互作用在 RABV 感染中发挥着核心作用,主要通过感染早期阶段的病毒转录调控、DLC1 基因表达调控、微管的乙酰化和 L 与乙酰化微管共定位。然而 DLC1 对转录的调控并非不可或缺,该因子仅能增强病毒的初级转录过程<sup>[49, 50]</sup>。

### 1.3 RABV 的生命周期

RABV 的整个生命循环都在宿主细胞的胞质内进行,这一过程主要分为三个阶段。首先,病毒通过内吞作用侵入宿主细胞,并通过病毒外壳与内吞体的膜融合来释放其基因组。第二阶段涉及病毒组分的合成,包括 RNA 的转录与复制以及蛋白质的合成。最后阶段,病毒的几个组件被组装成新的病毒颗粒,随后出芽并释放出细胞,这一过程可能启动新一轮的感染周期<sup>[39]</sup>。(图 1.2)。

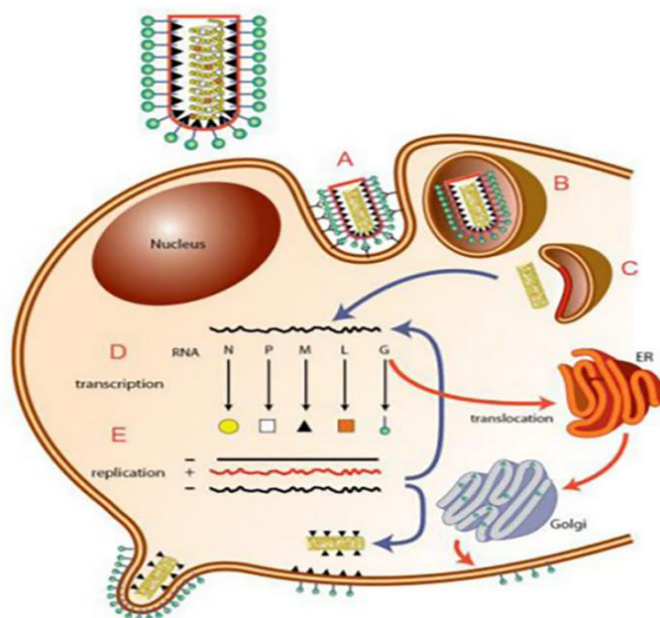


图 1.2 RABV 的生命周期 (引自 DAVIS B M<sup>[1]</sup>)

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/135044112300011342>