

# RIP3 在 H1N1 流感病毒感染中发挥促炎症病理作用

秦波音, 王超, 任晓楠, 谭丹, 陈丽香, 方钟, 李顺, 周晓辉\*

(复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海 201508)

**【摘要】 目的** 研究调控细胞程序性坏死(necroptosis)的关键分子——受体相互作用蛋白激酶3(receptor-interacting protein 3, RIP3)在甲型流感病毒 H1N1 PR8 感染中的作用。**方法** 用  $5.25 \times 10^3$  半数组织细胞感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>)的流感病毒 H1N1 PR8 通过滴鼻方式感染 RIP3 敲除(RIP3<sup>-/-</sup>)小鼠和野生型(WT)C57BL/6 小鼠,连续 14 d 每天称量小鼠体重,观察小鼠生存状态,并记录死亡情况。分别在感染后第 3 天(day post infection, d. p. i)和第 7 天处死解剖小鼠。取整个肺称重,左叶肺用 4% 多聚甲醛固定后进行 HE 染色,检测感染后肺组织的病理变化;通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测肺组织病毒载量;流式微珠阵列术(CBA)检测肺匀浆上清中部分炎症相关细胞因子。**结果**  $5.25 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> 流感病毒感染后,各组小鼠均出现一定程度临床症状;RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠感染后死亡率(50%)较 WT 组小鼠(87.5%)显著降低( $P < 0.05$ )。分别对比每天两组小鼠体重,发现从第 3 天开始,WT 组小鼠的体重降低比率大于 RIP3<sup>-/-</sup> 组,但两组小鼠体重总体改变趋势无统计学差异。病毒学方面,两组小鼠在相同时间点(3/7 d. p. i)病毒载量差异均无显著性。炎症应答方面:两组小鼠肺指数(肺重与体重比值)差异无显著性。病理方面:肉眼观察大体病理及 HE 病理切片显示;RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠肺组织损伤较轻,炎症浸润较少;小鼠肺部炎症细胞因子也较 WT 组相对减少。**结论** RIP3 敲除的条件下,流感病毒 H1N1 PR8 感染小鼠时因减弱了炎症应答导致肺部病理损伤减轻,提示 RIP3 可能在 H1N1 PR8 流感病毒感染中发挥促炎症病理作用。

**【关键词】** 细胞程序性坏死;RIP3;流感病毒;炎症应答

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018)06-0727-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.009

## Rip3 plays a role in the inflammatory responses during H1N1 influenza virus infection

QIN Boyin, WANG Chao, REN Xiaonan, TAN Dan, CHEN Lixiang, FANG Zhong, LI Shun, ZHOU Xiaohui\*

(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China)

Corresponding author: ZHOU Xiaohui. E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of RIP3 (receptor-interacting protein 3), which is a key molecule in regulating programmed cell necrosis, in H1N1 influenza virus infection. **Methods** RIP3 knockout (RIP3<sup>-/-</sup>) and wild-type (WT) mice were infected by influenza virus H1N1 PR8 at a dose of  $5.25 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose). Changes of clinical signs, survival, and body weight of those mice were monitored daily for 14 consecutive days. Six mice from each group were sacrificed at 3 and 7 days post-infection (d. p. i.), from which whole lungs were harvested. Some of the lobes were fixed in 4% paraformaldehyde for histopathological assessment and the rest were split and stored at -80°C for further analysis. Real-time quantitative PCR and cytometric bead array (CBA) were performed to detect viral loads in lungs and inflammatory cytokines in supernatants of lung homogenates. **Results** Both groups showed severe symptoms after the infection of PR8. The RIP3<sup>-/-</sup> mice with PR8 infection showed a high survival rate (50%) compared with the control group (12.5%) ( $P < 0.05$ ). The body weight loss of WT was greater than that of RIP3<sup>-/-</sup>

**【基金项目】** 国家重点研发计划(2016YFD0500208); 国家自然科学基金(81471397)。

Funded by National Key Research Program of China (2016YFD0500208), and National Natural Science Foundation of China (81471397).

**【作者简介】** 秦波音(1983—),男,兽医师,本科,研究方向:主要从事实验动物和动物实验工作。Email: qinboyin@shphc.org.cn

**【通信作者】** 周晓辉(1973—),男,研究员。Email: zhouxiaohui@shphc.org.cn

mice from 3 d. p. i. , but there was no significant difference between these two groups. No significant differences in viral loads and lung weight to body weight ratio were also observed between the two groups at 3 and 7 d. p. i. Pathological changes in RIP3<sup>-/-</sup> mice were less severe than those in WT mice. CBA detection assay revealed that the levels of proinflammatory cytokines in the lungs of RIP3<sup>-/-</sup> mice were lower than those in WT mice. **Conclusion** RIP3 plays a pathogenic role in mice infected with  $5.25 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> of influenza virus H1N1 PR8 by promoting inflammatory responses.

**【Keywords】** necroptosis; RIP3; influenza virus; inflammatory response

**Conflict of interest statement:** We declare that we have no conflict of interest statement.

随着每年的流感流行,流感已成为人类面临的主要公共卫生问题之一。每年约 15% 的全球人口因流感病毒感染而导致严重的发病率和死亡率<sup>[1-2]</sup>。从 1918 年西班牙大流感(H1N1 亚型)引起约 5000 万人的死亡,到 1968 年香港流感(H3N2 型)造成约 100 万人的死亡,直至 2009 年首次出现在墨西哥(甲型 H1N1 型)后在各国迅速流行,造成约 1 万人死亡<sup>[3-4]</sup>。甲型流感病毒的感染已对人类健康产生极大的威胁并造成了巨大的经济损失。深入探究甲型流感病毒感染致病机制,对抗流感病毒疫苗和药物的研发具有重要意义。

甲型流感病毒的感染可引起严重的急性肺炎,这种原发性病毒性肺炎可能会导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS),这是一种高死亡风险的呼吸综合征。许多宿主因素与流感感染引起的 ARDS 有关,其中“细胞因子风暴”是机体天然免疫反应失调而引起 ARDS 的一个关键因素<sup>[5-7]</sup>。近期的研究表明,细胞死亡特别是细胞坏死可导致肺支气管上皮的严重退化,虽然在一定程度上控制了病毒的复制,但如引发起过度炎症反应则是严重的病理病变和高死亡率发生的重要原因<sup>[8-10]</sup>。

细胞程序性坏死关键调控分子 RIP3 参与流感感染后的确切作用还有待探讨。本研究通过 H1N1 PR8 流感病毒分别感染 RIP3<sup>-/-</sup> 小鼠和 C57BL/6 小鼠,结果显示 RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠生存率显著提高,两组小鼠病毒学方面虽无明显差异,但 RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠的病理改变和炎症应答较对照组减轻。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒

H1N1 病毒株 A/ Puerto Rico/8/34 (简称 PR8),由中国科学院上海巴斯德研究所孟广勋教授惠赠。流感病毒通过鸡胚和 MDCK 细胞培养滴定后, -80℃ 放置备用,病毒感染实验均在上海市公共卫生临床中心内的动物生物安全二级实验室(ABSL-2)中开展。

#### 1.1.2 实验动物及分组

SPF 级 6 ~ 7 月龄 C57BL/6 小鼠和 RIP3<sup>-/-</sup> (C57BL/6 背景)小鼠共 44 只,雌雄各半。C57BL/6 小鼠来源于上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心实验动物部【SCXK(沪)2015 - 0002】,RIP3<sup>-/-</sup> 小鼠由北京生命科学研究所王晓东院士惠赠,两品系小鼠均饲养于上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心实验动物部 SPF 区域【SYXK(沪)2015 - 0008】中。病毒感染前一天将小鼠转移到 ABSL-2。实验共分为 4 组:RIP3<sup>-/-</sup> 小鼠解剖组(A 组)12 只、RIP3<sup>-/-</sup> 小鼠生存曲线组(B 组)10 只、C57BL/6 小鼠解剖组(C 组)12 只和 C57BL/6 小鼠生存曲线组(D 组)10 只。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:IACUC2018-A044-02)。

#### 1.1.3 实验试剂

DMEM 培养液(Gibco,1868707),异氟烷(上海雅培制药有限公司,B506),多聚甲醛固定液(武汉谷歌生物科技有限公司,163307),Total RNA 抽提试剂盒(QIAGEN GmbH,52906),One-Step SYBR PrimeScriptPLUS RT-PCR kit (Perfect Real Time, RR096A),MS INFLAMMATION CBA KIT (BD, 552364)。

#### 1.1.4 实验仪器

CO2 培养箱(3111,Thermo,美国),匀浆机分散机(607EUR,Biospec,美国),冷冻离心机(Micro 17R,Thermo,美国),精密高温干燥箱(DHG-9070C,上海之信仪器有限公司,中国),荧光定量 PCR 仪(ViiA7,ABI,美国),超微量分光光度计(K5600,北京凯奥科技发展有限公司,中国),流式细胞仪(LSR Fortessa,BD 公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 感染方法和样本采集

将 4 组实验小鼠分别标记称重,小鼠经异氟烷麻醉后,用 40 μL 含  $5.25 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> PR8 的 DMEM 病毒液滴鼻感染,将流感病毒液通过小鼠的一个鼻孔缓慢滴入,至完全吸收,滴鼻动作过程需轻柔。感染完成后将小鼠放回独立送风隔离笼具

(IVC)中正常饲养。感染后 14 d 内,每天观察小鼠状态并进行体重称量,记录小鼠生存情况(若体重下降大于等于 25% 则记为伦理死亡),在感染后第 3、7 天分别处死 A 组和 C 组小鼠各 6 只(3 雄/3 雌)。取整个肺组织称重并拍照,左叶肺 4% 多聚甲醛固定,剩下肺分装后速冻于液氮,转移保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱待用。小鼠体重变化计算:根据每日体重变化,计算体重变化率 = (感染后当天体重 - 0 d 体重) / 0 d 体重  $\times 100\%$ ,小鼠肺指数计算:根据处死小鼠的肺湿重和体重计算肺指数,肺指数 = 小鼠的肺重 / 小鼠的体重  $\times 100\%$  [11]。

### 1.2.2 qRT-PCR 检测肺病毒载量

取右叶部分肺组织,以 0.05 g 肺组织/500  $\mu\text{L}$  PBS 的比例匀浆。使用 Total RNA 抽提试剂盒抽提肺组织中的总 RNA,抽提产物用超微量分光光度计测定核酸浓度和吸光度值 ( $A_{260/280}$  为 1.90 ~ 2.25)。将抽提好的 RNA 用 One-Step SYBR RT-PCR kit 进行肺病毒载量检测。采用实验室建立的检测方案 [11],扩增体系为 25  $\mu\text{L}$ : TaqMan PCR 基础液 12.5  $\mu\text{L}$ ,引物 10  $\mu\text{mol/L}$ ,RNA 模板 2.5  $\mu\text{L}$ 。按照以上体系加样后,通过荧光定量 PCR 仪进行扩增。扩增程序为:  $42^{\circ}\text{C}$  10 min;  $95^{\circ}\text{C}$  1 min;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  45 s, 45 个循环。管家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的上游引物: (5'-AGGTCGGTGAACGGATTTG-3'); 下游引物: (5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3')。流感病毒的上游引物: (5'-AAGACCAATCCTGTACCTCTGA-3'); 下游引物: (5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3')。根据  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  的方法计算组织总 RNA 中的相对病毒载量。

### 1.2.3 CBA 检测细胞因子

相关炎性细胞因子的检测均严格参照流式微珠阵列术 (BD CBA Mouse Inflammation Kit, 美国) 说明书进行操作。

### 1.2.4 肺组织病理检测

取实验小鼠肺左叶,置于 4% 多聚甲醛溶液中进行固定,石蜡包埋,常规 HE 染色后,光镜下观察组织病理学变化。

## 1.3 统计学方法

所有数据采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,通过统计学软件 GraphPad Prism Software 5.0 进行统计学分析,两组数据统计比较采用两个独立样本  $t$  检验统计分析,生存曲线选用 log-rank (Mantel-Cox) 方法分析,  $P < 0.05$  结果为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RIP3 缺失对小鼠体重和死亡率的影响

流感病毒感染后,每日称重,观察小鼠状态并记录小鼠死亡情况。WT 组和  $\text{RIP3}^{-/-}$  组小鼠分别在攻毒后第 2 天和第 3 天起活动开始减少,反应迟钝。第 3 天后,两组小鼠均出现竖毛蜷缩、厌食和体重迅速下降。第 7 天后 WT 组小鼠出现弓背死亡,两组小鼠体重下降至第 8 ~ 9 天开始逐渐恢复。第 3 天后,两组小鼠的体重降低比率为: WT 组  $>$   $\text{RIP3}^{-/-}$  组,但两组小鼠体重总体改变趋势差异无显著性,均为感染后前 8 天体重逐渐降低,第 8 天后体重开始逐渐恢复 (图 1)。WT 组小鼠第 7 天出现死亡,至第 14 天时,其死亡率为 87.5%,  $\text{RIP3}^{-/-}$  组小鼠第 9 天出现死亡,至第 14 天时,其死亡率为 50%,故  $\text{RIP3}^{-/-}$  组小鼠死亡率显著低于 WT 组 ( $P < 0.05$ , 图 2)。提示 RIP3 的缺失可降低小鼠死亡率。

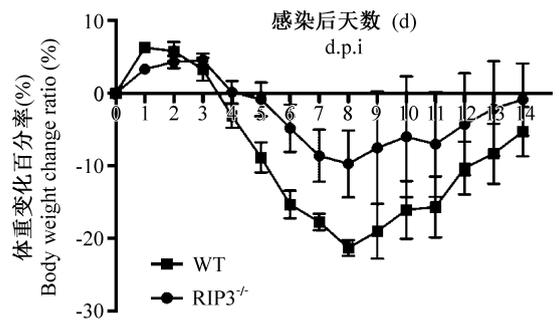
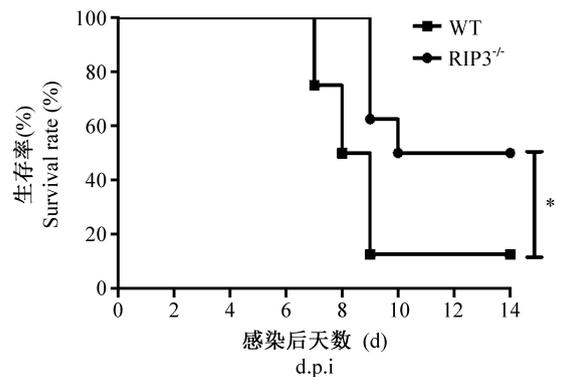


图 1 攻毒后小鼠体重变化百分率

Figure 1 The body weight change ratio of the mice after virus inoculation



注: WT 组与  $\text{RIP3}^{-/-}$  组相比差异有显著性, \*  $P < 0.05$ 。

图 2 攻毒后小鼠生存率

Note. Significant difference between the groups of WT and  $\text{RIP3}^{-/-}$  mice, \*  $P < 0.05$ .

Figure 2 Survival rates of the mice after virus inoculation

## 2.2 RIP3 缺失对病毒载量和肺指数的影响

在感染后第 3、7 天分别对两组小鼠进行解剖取材。取整个肺组织测得肺指数,用肺匀浆上清进行病毒载量分析。结果显示两组小鼠病毒载量在第 3 天和第 7 天无明显差异。而从肺指数上看,两组小鼠第 7 天比第 3 天肺炎症都严重,但差异均无显著性(图 3)。可见,流感病毒 PR8 感染后,RIP3 的缺失对病毒载量和肺指数基本无影响。

## 2.3 RIP3 缺失对小鼠肺组织病理学损伤

在感染后第 3、7 天分别对两组小鼠肺组织取材发现,肉眼可见两组小鼠均出现不同程度的肺病理改变并伴有充血现象。感染后第 3 天,WT 组小鼠肺病变范围达 10%~20%,RIP3<sup>-/-</sup>组小鼠未见显著病变;感染后第 7 天,两组小鼠均较第 3 天充血严重,但 WT 组小鼠肺病变范围达 70%~80%,而 RIP3<sup>-/-</sup>组只有 30%~40%(图 4)。HE 染色镜下观察(图 5):两组小鼠感染后第 7 天病理损伤均比第 3 天严重:肺泡间隔增宽,肺炎症细胞浸润增加。而同一时间点,RIP3<sup>-/-</sup>组小鼠较 WT 组小鼠病理损伤较轻,在感染后第 3 天,RIP3<sup>-/-</sup>组较 WT 组肺泡结构完整,炎症细胞浸润较少;感染后第 7 天,WT 组肺间隔增宽显著,肺泡结构明显破坏,肺实变明显,肺泡壁毛细血管扩张充血出血,而 RIP3<sup>-/-</sup>组小鼠则相比损伤较轻。表明流感病毒 PR8 感染后,RIP3<sup>-/-</sup>的缺失可减少小鼠肺组织病理损伤。

## 2.4 RIP3 缺失对炎症因子释放的影响

为研究 RIP3 信号通路在小鼠感染 PR8 后,在诱导机体产生炎症细胞因子中发挥的作用。用

CBA 实验对感染后第 3、7 天的 WT 和 RIP3<sup>-/-</sup>小鼠肺组织匀浆中相关细胞因子进行检测。发现感染后第 3 天,TNF- $\alpha$  在 RIP3<sup>-/-</sup>小鼠中显著减少( $P < 0.05$ ),感染后第 7 天,IFN- $\gamma$  在 RIP3<sup>-/-</sup>组小鼠中显著增多( $P < 0.05$ ),而 IL-6、MCP-1 水平在两个时间点均未达到统计学差异(图 6)。

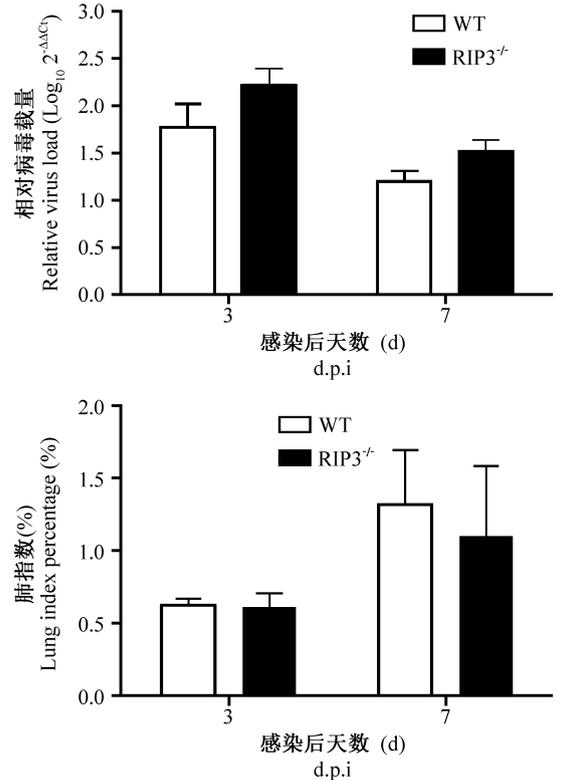


图 3 攻毒后小鼠肺病毒载量和肺指数

Figure 3 Viral loads and lung weight body weight ratios in the WT and RIP3<sup>-/-</sup> mice after virus inoculation

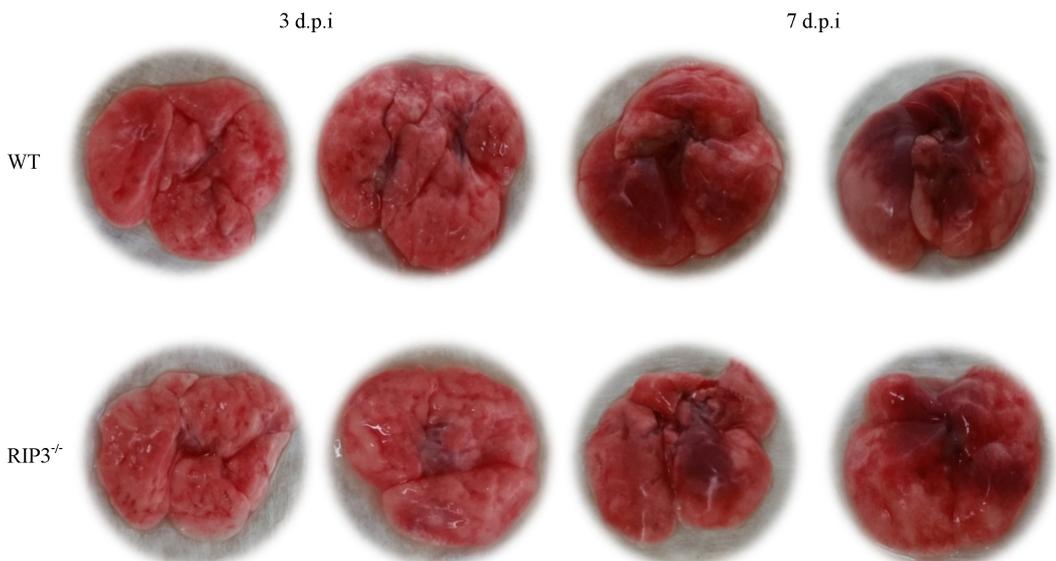
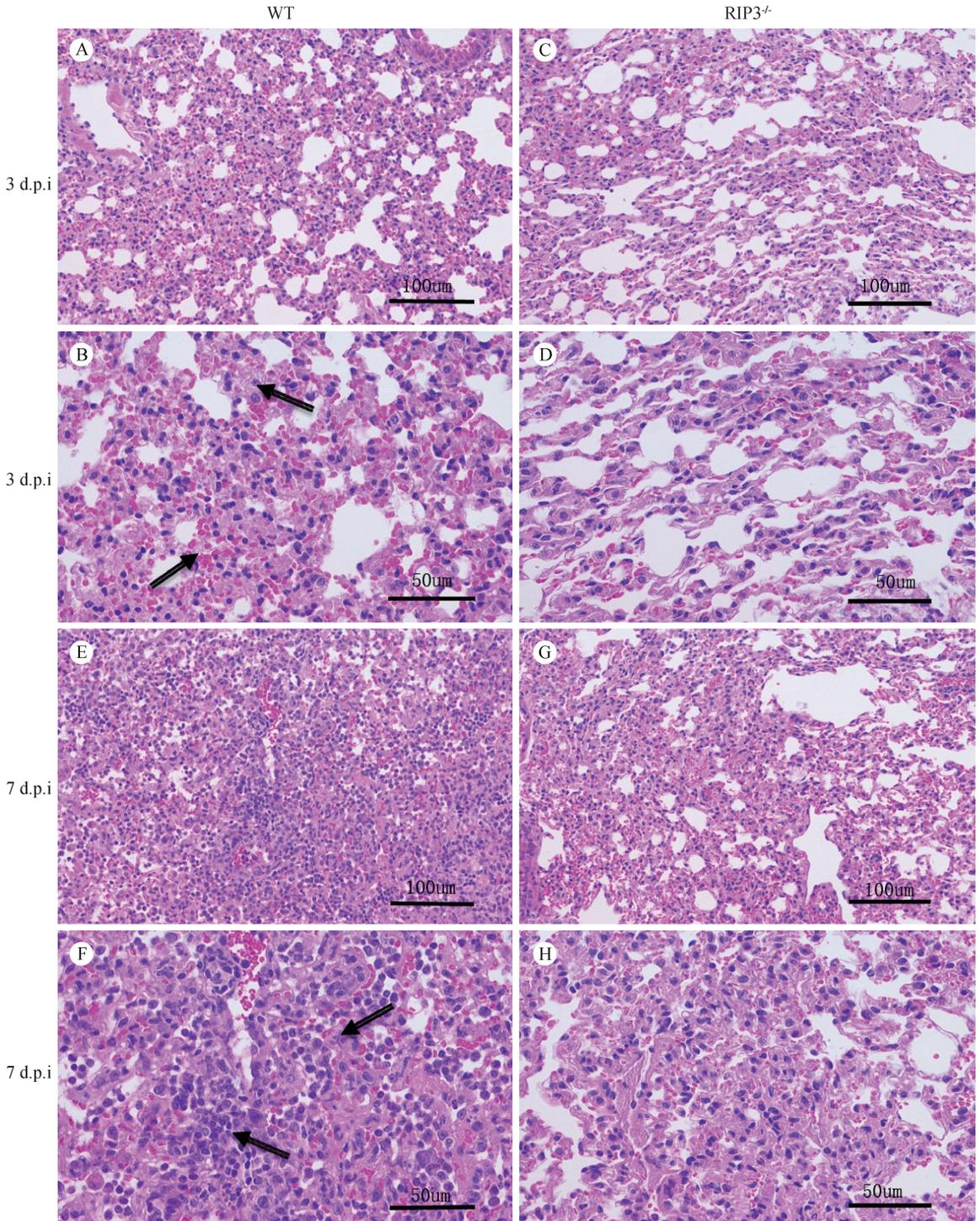


图 4 RIP3<sup>-/-</sup>和 WT 小鼠肺大体病理改变(肉眼观察)

Figure 4 Gross appearance of the lungs of RIP3<sup>-/-</sup> and WT mice (unaided viewing)

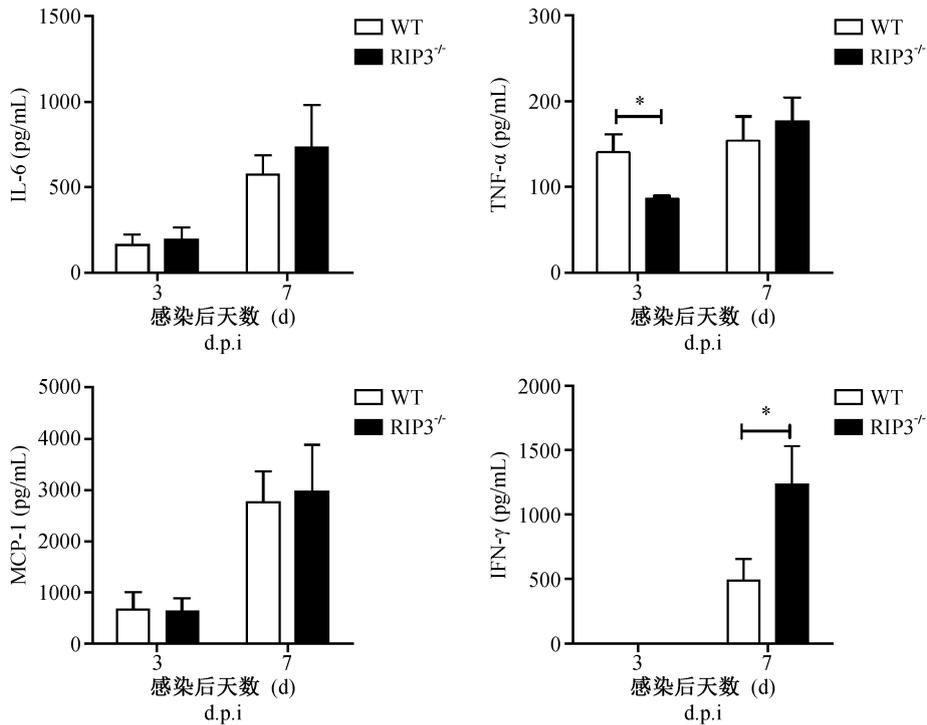


注: B 箭头表示肺泡间隔显著增厚, 有大量血细胞渗出; F 箭头表示肺泡结构完全破坏, 炎性细胞大量浸润。

图 5 WT 和  $RIP3^{-/-}$  小鼠肺的病理改变 (HE 染色)

Note. B. Arrow indicates significant thickening of the alveolar septum with numerous blood cells. F. Arrow represents complete breakdown of the alveolar structure with infiltration of a large number of inflammatory cells.

Figure 5 Histopathological changes in the lung tissues of WT and  $RIP3^{-/-}$  mice (HE staining)



注: WT 组与 RIP3<sup>-/-</sup> 组相比差异有显著性, \*  $P < 0.05$ 。

图 6 PR8 攻毒后小鼠细胞因子应答

Note. Significant difference in cytokines of the groups of WT and RIP3<sup>-/-</sup> mice, \*  $P < 0.05$ .

Figure 6 Levels of different cytokines in the WT and RIP3<sup>-/-</sup> mice after infection of PR8 influenza virus

### 3 讨论

甲型流感病毒 (IAV) 是一种带有负股、单链、分节的 RNA 基因组的包膜病毒,它是禽类和哺乳动物中流感病毒的主要病原体。急性 IAV 感染伴随着被感染的肺原发性上皮细胞和成纤维细胞的溶解,以及在体内呼吸道上皮细胞的破坏。在病毒复制的生命周期或对该病毒的免疫应答中,宿主细胞起到重要的作用<sup>[10,12]</sup>。有报道指出,细胞死亡例如细胞凋亡,可能是一种宿主防御机制,限制病毒在感染早期的传播和宿主的免疫病理<sup>[13]</sup>。

真核细胞的死亡机制包括细胞凋亡 (apoptosis)、自噬 (autophagy) 和坏死 (necrosis)。凋亡一般不引起炎症,而坏死与自噬则可能导致炎症。坏死的形态学特点明显异于前两者,表现为细胞膜和细胞核溶解,细胞内容物外溢,常伴随炎症的发生。而近些年的研究表明,在一定条件下细胞坏死也有信号通路参与调控,称为程序性坏死 (necroptosis 或 programmed necrosis)。2009 年,Cho<sup>[14]</sup> 和 Zhang<sup>[15-16]</sup> 等先后发表 3 篇报道,揭示了受体相互作用蛋白激酶 (receptor-interacting proteins, RIPs) 参与调控细胞坏死的分子机制。RIPs 家族成员中 RIP1 和 RIP3 可通过 RHIM 基序 (RIP homotypic interaction

motif) 相互作用,二者相互结合及相互磷酸化对程序性坏死起关键调节作用。

近期研究表明,在体内无节制的细胞坏死可导致肺支气管上皮的严重退化,尽管一定程度上控制了流感病毒的复制,但还是增加了宿主的死亡率<sup>[17]</sup>。此外,一些高致病性的 H1N1 和 H5N1 型甲型流感病毒感染后,宿主对这些毒株的过度免疫应答和炎症反应是引起严重的病理病变和高死亡率的重要原因<sup>[8-10]</sup>。虽然有研究报道:Shoko Nogusa 等<sup>[18]</sup> 用 4000 EID<sub>50</sub> (鸡胚半数感染量) 的 H1N1 PR8 对 RIP3<sup>-/-</sup> 和 WT 小鼠进行接种研究,该研究认为细胞程序性坏死关键分子 RIP3 在 IAV 感染后, RIP3 驱动细胞死亡和炎症小体激活并共同作用,可消除受感染细胞从而限制病毒传播,提示 RIP3 在机体对抗 IAV 中起到保护作用。

但本研究中使用细胞培养扩增来源的 H1N1 PR8 (5.25 × 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>) 感染 6~7 月龄的 RIP3<sup>-/-</sup> 和 WT 组小鼠,结果发现, RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠生存率显著高于 WT 组小鼠,且 WT 组小鼠第 8 天出现死亡,而 RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠第 9 天才出现死亡。影响生存率因素主要为以下两方面:病毒方面因素及宿主自身的免疫应答方面。本研究对感染小鼠后第 3 天和第

7 天肺病毒载量、肺组织病理及肺炎症应答作了进一步检测。结果显示,两组小鼠的病毒载量并无显著性差异;但 RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠的肺组织大体病理表现明显轻于 WT 组小鼠,而 HE 显示炎症病理也轻于 WT 组,这表明 RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠的肺炎症及损伤较 WT 组显著减轻。提示造成高死亡率及严重体重损失很可能与体内的高炎症应答有关,而非受病毒因素的影响。细胞因子检测显示,RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠肺内部分炎性细胞因子(TNF- $\alpha$ )产生的减少,与炎症病理减轻表形一致;而第 7 天时 RIP3<sup>-/-</sup> 组分泌的 IFN- $\gamma$  显著高于 WT 组,但具体机制尚不清楚。IFN- $\gamma$  是一类具有免疫调节效应的细胞因子,它的产生在病毒入侵后可以限制病毒的复制,并增强宿主免疫对机体发挥保护作用。

有研究报道,在 LPS 诱导的细胞炎症模型中,RIP3 缺失的骨髓来源的巨噬细胞和树突状细胞均不能产生炎性细胞因子<sup>[19-20]</sup>,揭示了 RIP3 介导的程序性坏死在促炎细胞因子产生中的促进作用。但炎症是一把双刃剑。根据 Shoko Nogusa 等的研究及本文的实验结果,我们推测由于在 RIP3<sup>-/-</sup> 组小鼠中,程序性坏死信号通路在关键分子 RIP3 敲除后,坏死通路被抑制,从而减少了促炎性细胞因子的产生,而拥有完整坏死通路的 WT 组则促发了大量炎性细胞因子的产生。炎症可以限制病毒复制,起到一定保护作用;但炎症过度的情况下也会导致宿主的炎症病理损伤,从而引起高病死率。本研究报道了与 Shoko Nogusa 等不一致的结果,可能是由于病毒来源不同(鸡胚来源或细胞培养来源)、病毒滴度高低不同(需用同一方法滴定才能比较)、小鼠月龄不同,导致炎症处于不同的状态,从而导致不同的结局。

总之,在本研究实验条件下,观察到 RIP3 介导的程序性坏死信号通路在流感病毒 H1N1 PR8 引起的急性感染中起到一定的炎症病理作用。深入探讨 RIP3 介导的程序性坏死信号通路在流感病毒中的作用有助于揭示其致病机制,从而可能为研发临床治疗流感病毒感染的新药提供潜在的靶标。

#### 参 考 文 献(References)

[ 1 ] Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs [J]. *Vaccine*, 2007, 25(27): 5086-5096.

[ 2 ] Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(3): 225-229.

[ 3 ] Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(1): 9-14.

[ 4 ] Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, et al. Pandemic potential

of a strain of influenza A (H1N1): early findings [J]. *Science*, 2009, 324 (5934): 1557-1561.

[ 5 ] Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, et al. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(1): 57-69.

[ 6 ] Cilloniz C, Pantin-Jackwood MJ, Ni C, et al. Lethal dissemination of H5N1 influenza virus is associated with dysregulation of inflammation and lipoxin signaling in a mouse model of infection [J]. *J Virol*, 2010, 84(15): 7613-7624.

[ 7 ] Cilloniz C, Shinya K, Peng X, et al. Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(10): e1000604.

[ 8 ] Brandes M, Klauschen F, Kuchen S, et al. A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection [J]. *Cell*, 2013, 154(1): 197-212.

[ 9 ] Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus [J]. *Nature*, 2006, 443(7111): 578-581.

[ 10 ] Sanders CJ, Doherty PC, Thomas PG. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection [J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 343(1): 13-21.

[ 11 ] Zhu Z, Yang Y, Feng Y, et al. Infection of inbred BALB/c and C57BL/6 and outbred Institute of Cancer Research mice with the emerging H7N9 avian influenza virus [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2(8): e50.

[ 12 ] Yatim N, Albert ML. Dying to replicate: the orchestration of the viral life cycle, cell death pathways, and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 35(4): 478-490.

[ 13 ] Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis [J]. *Cell*, 1994, 76(5): 777-779.

[ 14 ] Cho YS, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1112-1123.

[ 15 ] He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$  [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1100-1111.

[ 16 ] Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis [J]. *Science*, 2009, 325 (5938): 332-336.

[ 17 ] Rodrigue-Gervais IG, Labbe K, Dagenais M, et al. Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(1): 23-35.

[ 18 ] Nogusa S, Thapa RJ, Dillon CP, et al. RIPK3 activates parallel pathways of MLKL-driven necroptosis and FADD-mediated apoptosis to protect against influenza A virus [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 20(1): 13-24.

[ 19 ] Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(4): 302-313.

[ 20 ] Cullen SP, Kearney CJ, Clancy DM, et al. Diverse activators of the NLRP3 inflammasome promote IL-1 $\beta$  secretion by triggering necrosis [J]. *Cell Rep*, 2015; 11(10):1535-1548.