

树鼩脊髓微血管内皮细胞的分离培养及 EV71 感染实验

施梅言, 王璇, 王文广, 阮蕾颖, 代解杰

(中国医学科学院 / 北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

[摘要] 目的 建立树鼩脊髓来源的微血管内皮细胞体外分离培养技术, 用 71 型肠道病毒 (enterovirus 71, EV71) 感染该细胞, 探讨其感染特性, 为 EV71 损伤中枢神经系统机制的研究提供基础。方法 采用 II 型胶原酶、分散酶、DNase I 三酶联合两次消化树鼩脊髓组织后, 获取微血管内皮细胞, 并进行纯化和鉴定。用 EV71 感染树鼩脊髓微血管内皮细胞, 测定感染不同时间点的细胞及其培养上清液中病毒载量。采用间接免疫荧光法检测细胞中 EV71 标志蛋白的表达, 以确定 EV71 对树鼩脊髓微血管内皮细胞的感染性。结果 分离培养获得的树鼩脊髓微血管内皮细胞呈典型的分支状和串珠状, 经过嘌呤霉素纯化培养后的传代细胞主要是不规则的多角状细胞; 细胞免疫荧光鉴定结果显示, 微血管内皮细胞标志蛋白 CD31 和血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 表达都呈阳性。用感染复数为 1 的 EV71 感染树鼩脊髓微血管内皮细胞, 可见典型的细胞病变, 且病毒滴度可达 3.2×10^6 TCID₅₀/mL, 表明 EV71 可成功感染树鼩脊髓微血管内皮细胞并有效增殖; 而且在 48 h 内, 细胞培养上清液中病毒载量呈线性升高, 而细胞中病毒载量在 12 h 到达顶峰。间接免疫荧光法在 EV71 感染后 12 h 的树鼩脊髓微血管内皮细胞质中可检测到病毒颗粒。结论 成功建立了树鼩脊髓微血管内皮细胞体外分离培养方法, 确定了 EV71 对树鼩脊髓微血管内皮细胞的感染性和病毒增殖特性, 为开展 EV71 入侵中枢神经系统的机制研究提供了一定基础。

[关键词] 脊髓微血管内皮细胞; 分离培养; EV71; 病毒增殖; 树鼩

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0148-07

Isolation and Culture of Spinal Microvascular Endothelial Cells of Tree Shrews and Experimental Study on Infection with Enterovirus 71

SHI Meiyang, WANG Xuan, WANG Wenguang, RUAN Leiyang, DAI Jiejie

(Tree Shrew Germplasm Resource Center, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Correspondence to: DAI Jiejie, dj@imbcams.com.cn

[Abstract] **Objective** To establish an effective method of isolation and primary culture method for microvascular endothelial cells derived from the spinal cord of tree shrews *in vitro*. Enterovirus 71 (EV71) was used to infect these cells to explore its infectious characteristics and provide a reference for the study of the mechanism of EV71 induced damage to the central nervous system. **Methods** The spinal cord tissues were digested twice with type II collagenase, dispase, and DNase I, then the microvascular endothelial cells were obtained. EV71 was used to infect tree shrew spinal microvascular endothelial cells, and the virus titer at different time points was measured. The expression of EV71 in the infected cells was detected by immunofluorescence assay to determine the infectivity of EV71 to the spinal cord microvascular endothelial

[基金项目] 云南省应用基础研究计划项目(2018FB045); NSFC- 云南联合基金重点支持项目(U1702282); 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019); 昆明市科技创新团队(2019-1-R-24483)

[作者简介] 施梅言(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型建立及相关研究。E-mail: 1758651731@qq.com

[通信作者] 代解杰(1961—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型建立与应用研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

cells of tree shrews. **Results** The microvascular endothelial cells were typically branched and beaded, and the passage cells obtained after puromycin purification and culture were mainly irregular polygonal cells. The cellular immunofluorescence results showed that CD31 and vWF expressions were positive. The spinal microvascular endothelial cells of tree shrews were infected with EV71 at a multiplicity of infection of 1, the cells showed typical cytopathic appearance, and the virus titer was approximately 3.2×10^6 TCID₅₀/mL. This proved that EV71 infected and proliferated in the tree shrew spinal cord microvascular endothelial cells, and within 48 h, the viral load in the supernatant increased linearly, reaching its peak at 12 h. The indirect immunofluorescence method detected virus particles in the cytoplasm of the cells 12 h after infection.

Conclusions The isolation and purification methods of spinal cord microvascular endothelial cells from tree shrews are successfully established, and the infectivity to the obtained cells and proliferation of EV71 in the cells are confirmed, providing a basis for the study of the mechanism of EV71 invading the central nervous system.

[Key words] Spinal cord microvascular endothelial cells; Isolation and culture; Enterovirus 71; Virus proliferation; Tree shrews

71型肠道病毒(enterovirus 71, EV71)是小核糖核酸家族的一员,由无包膜单链RNA病毒组成。EV71能侵入中枢神经系统,引起神经系统疾病。越来越多的证据表明, EV71可直接感染神经元,而且中枢神经系统的先天免疫反应在限制病原体感染中发挥重要作用^[1]。但是EV71感染中枢神经的致病机制尚不明确。

微血管内皮细胞是构成血-脊髓屏障与血-脑屏障的主要成分,与其他类型的细胞如星形胶质细胞或周细胞一起,通过紧密连接的方式形成神经血管单位^[2],专门调节体液、分子和细胞在外周血和中枢神经系统之间的交换。脊髓微血管内皮细胞(spinal cord microvascular endothelial cells, SCMECs)与脑微血管内皮细胞相似,也参与了许多与神经系统疾病相关的病理过程^[3],是血-脊髓屏障的重要组成部分。在脊髓损伤和实验性自身免疫性脑脊髓炎中,内皮细胞通过调节巨噬细胞浸润、病理性血管生成和纤维化,发挥了髓鞘清除之外的重要功能,从而促进脱髓鞘疾病的进展^[4]。推测EV71可能通过血液跨越血-脊髓屏障引起脊髓内皮细胞损伤,最终导致中枢神经系统疾病,但其相关机制的研究需要建立血-脊髓屏障感染细胞模型。

树鼩是一种新型的实验动物,已广泛应用于人类疾病模型的研究,包括病毒感染模型、肿瘤模型、呼吸系统疾病模型和神经系统疾病模型等^[5]。例如Tong等^[6]利用慢病毒感染,成功地在树鼩中生成了恶性胶质瘤;与相应的小鼠胶质瘤相比,树鼩胶质瘤在基因表达谱上与人类成

胶质细胞瘤更为相似。王文广等^[7]发现EV71能感染幼龄中缅树鼩,并建立了树鼩EV71手足口病的疾病动物模型。本研究在此基础上探索一种操作简便、经济可行的原代SCMECs分离培养方法,并用EV71感染树鼩SCMECs,初步探究EV71的感染性及增殖活性,为利用树鼩开展EV71入侵中枢神经系统的致病机制研究提供重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与病毒

取1只3月龄的雄性滇西亚种中缅树鼩(*Tupaia Belangeri Chinensis*),由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供,生产许可证号为SCXK(滇)K2018-0002,使用许可证号为SYXK(滇)K2018-0002。本研究遵循实验动物使用的3R和福利伦理原则。

EV71标准毒株(FY-23-KB株)由中国医学科学院医学生物学研究所病毒免疫室分离馈赠。非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心保存。

1.2 主要仪器与试剂

生物安全柜和CO₂恒温培养箱均购自美国Forma公司。台式高速冷冻离心机购自美国Beckman公司。ECLIPSE Ti倒置显微镜购自日本Nikon公司。D-Hank's液、DNase I、HEPE缓冲液和II型胶原酶购自北京索莱宝科技有限公司。分散酶和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国Sigma公司。嘌呤霉素和胰岛素铁

硒转运蛋白 (insulin-transferrin-selenium, ITS) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 均购自美国 PeproTech 公司。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25% Trypsin-EDTA、DMEM/F12 培养液和双抗 (青链霉素混合液) 均购自美国 HyClone 公司。鼠源性抗 CD31 单克隆抗体、兔源性抗血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 单克隆抗体、荧光标记的羊抗兔或羊抗鼠 IgG 购自英国 Abcam 公司。兔源性抗 EV71 抗体购自美国 GeneTex 公司。CCK-8 购自日本 Dojindo 公司。一步法荧光定量 PCR 试剂盒 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 购自日本 TaKaRa 公司, 病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp® Viral RNA Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司, 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 树鼩 SCMECs 的分离

本实验借鉴苑晓晨等^[8]的分离方法, 并做了一些改进。取 3 月龄左右的树鼩, 行安乐死 (腹腔注射 3% 的戊巴比妥 0.4 mL) 处死后, 迅速取出整段脊柱, 浸入 75% 的乙醇溶液中消毒 3 min, 无菌 PBS 漂洗 3 次。无菌操作取出中段脊髓组织, 在体视镜下去除脊膜和血管, 用 D-Hank's 漂洗 3 次, 转入无菌培养皿中, 加入 1 mL DMEM/F12 培养液。将脊髓组织剪为 1 mm³ 的小块, 分别加入 II 型胶原酶 (2 mg/mL) 和 DNase I (60 U/mL) 各 2 mL, 37 °C 消化 1 h, 每 15 min 轻摇混匀一次。将消化液转至 15 mL 离心管中, 4 °C 207 × g 离心 8 min, 弃上清液。用 22% BSA-DMEM/F12 培养液重悬后, 4 °C 下 824 × g 离心 20 min, 弃上清液。加入 II 型胶原酶 (2 mg/mL)、分散酶 (2 mg/mL) 和 DNase I (60 U/mL) 各 1 mL, 混匀后 37 °C 消化 30 min。室温下 207 × g 离心 8 min, 弃上清液后获得微血管片段, 用 DMEM/F12 培养液漂洗, 再 207 × g 离心 8 min, 弃上清液, 重复 3 次。用 DMEM/F12 培养液 (含 20% FBS、1% ITS、10 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF、1% 双抗和 1% HEPE 缓冲液) 重悬后, 接种于 T25 培养瓶中, 72 h 后换液, 之后每隔 1 d 换液一次。

1.4 SCMECs 的纯化

倒置显微镜下观察细胞长满瓶底后, 用 0.25% 的 Trypsin-EDTA 消化传代 2 次。待细胞铺满瓶底的 70%, 换用含嘌呤霉素 (5 ng/mL) 的 DMEM/F12 培养液培养 9~12 h。去除培养液, PBS 漂洗 2 次, 用不含嘌呤霉素的 DMEM/F12 培养液继续培养至细胞长满瓶底。然后用 0.25% Trypsin-EDTA 消化传代, 重复纯化 3 次。

1.5 SCMECs 的形态学观察及免疫荧光鉴定

取不同培养时期的 SCMECs, 用倒置显微镜观察细胞生长情况, 并拍照。

将纯化后第 3 代的细胞接种于 24 孔板中, 待细胞长满 80% 左右, 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 2~3 min; 用体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 用体积分数为 5% 的山羊血清封闭 30 min; 弃山羊血清, PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 分别在不同的孔板中滴加稀释好的鼠源性抗 CD31 一抗 (工作液稀释比例为 1:400) 和兔源性抗 vWF 一抗 (1:400), 对照孔加 PBS 代替, 4 °C 过夜孵育; PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 分别滴加羊抗鼠、羊抗兔荧光二抗 (1:400), 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; DAPI 染核 2 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 加入抗荧光淬灭剂 (1:500), 在荧光显微镜下观察拍照。

1.6 CCK-8 法测定细胞生长曲线

细胞纯化培养后, 将单层生长的细胞用培养液制成细胞悬液, 并稀释至 5×10^4 个细胞/mL。每孔接种 100 μ L 细胞液于 96 孔板, 设 1~8 d 共 8 组, 每组 3 个实验孔、3 个空白调零孔; 其中空白调零孔不接种细胞, 只加培养液。置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养细胞, 分别在第 1、2、3、4、5、6、7、8 d 吸去培养液, 每孔加入 100 μ L 含 CCK-8 试剂的混合培养液 (90 μ L 培养液、10 μ L CCK-8 试剂), 继续培养 30 min。选择波长 450 nm, 在酶标仪上测定各孔吸光度 (A 值)。

1.7 EV71 滴度的测定

病毒样品用含 2% FBS 的 DMEM/F12 培养液连续 10 倍梯度稀释, 将稀释好的病毒液加入含 Vero 细胞的 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 连续观察 8 d。使用病毒半数组织

培养感染量 (median tissue culture infective dose, TCID₅₀) 检测病毒滴度, 在倒置显微镜下每天观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 情况, 用 Karper 法计算病毒的滴度。

1.8 EV71 感染细胞与病毒增殖活性的测定

用滴度为 3.2×10^6 TCID₅₀/mL 的 EV71, 以最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 感染 SCMECs。待病毒吸附 1.5 h 后, PBS 洗去未吸附的病毒, 加入含 2% FBS 的 DMEM/F12 培养液 1 mL, 在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养。分别在感染 0、12、24、36、48、72、96 h 收集样品, 检测病毒载量。

采用 QIAamp®Viral RNA Mini Kit, 提取上述收集到的病毒感染后细胞样品中的 RNA。使用 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit, 采用 TaqMan 荧光定量 PCR 法检测细胞培养上清液、细胞中的病毒载量。EV71 上游引物序列为 5'-CAGTCATC-GATTGGATAC-3', 下游引物序列为 5'-CTCTG-CTGAAGAACTATC-3', 荧光探针序列为 5'-FAMCAAGGTTCCAGCACTCCAAGC-BHQ1-3'。反转录程序: 42 °C 5 min, 95 °C 10 s。PCR 反应程序: 95 °C 5 s, 60 °C 45 s, 45 个循环。根据标准品浓度来计算上清液和细胞中的病毒载量。

1.9 EV71 感染细胞后的间接免疫荧光观察

取纯化后的 SCMECs, 接种病毒感染 12 h 后, 参照 1.5 节的方法进行免疫荧光实验; 其中一抗为兔源性抗 EV71 抗体 (工作液稀释比例为 1:1 000), 二抗为羊抗兔荧光二抗 (1:400)。反应结束后, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。各实验

均独立重复 3 次, 结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 树鼩 SCMECs 形态学观察

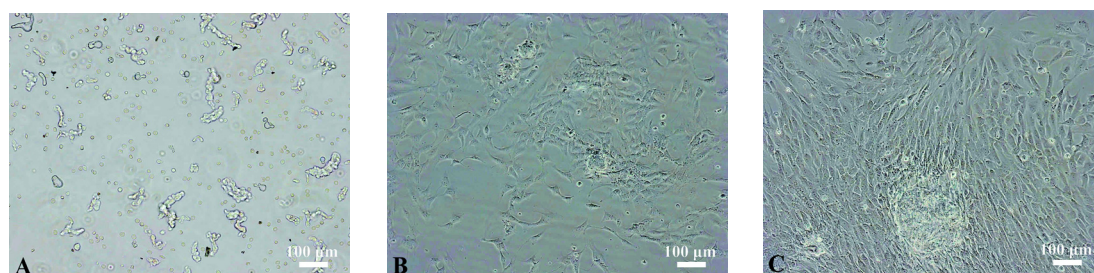
在显微镜下可见, 原代培养 24 h 的树鼩脊髓微血管片段主要呈现分支状和串珠状 (图 1A); 72 h 后有细胞从微血管段中爬出, 呈现多角状和不规则形态 (图 1B); 培养至第 5 天, 细胞逐渐铺满瓶底, 大部分呈“铺路石”状 (图 1C)。加入嘌呤霉素 (5 ng/mL) 进行细胞纯化时, 可观察到杂细胞脱落死亡; 嘌呤霉素处理 9 h 左右, 大部分杂细胞已经脱落死亡 (图 2A、2B); 而经嘌呤霉素纯化培养后的细胞主要是不规则的多角状细胞 (图 2C)。

2.2 树鼩 SCMECs 细胞免疫荧光鉴定

CD31 (又称为血小板内皮细胞黏附分子 1) 和 vWF (又称为 VIII 因子相关抗原) 在主要的器官和血管内皮细胞中都有表达, 可作为鉴定微血管内皮细胞的特异性标志蛋白。使用抗 CD31 和抗 vWF 抗体对纯化培养后的内皮细胞进行免疫荧光染色, 结果显示 CD31 阳性细胞激发红色荧光, vWF 阳性细胞激发绿色荧光, 细胞核为蓝色 (图 3), 证明纯化的细胞为 SCMECs。

2.3 SCMECs 的生长曲线

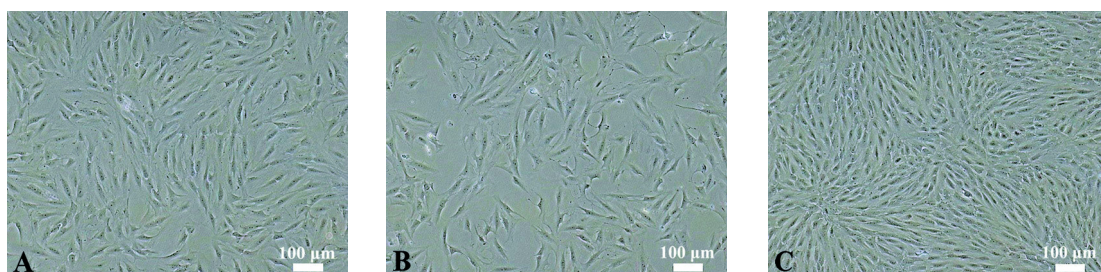
根据细胞生长每天测得的 A_{450 nm}, 取平均值, 绘制细胞生长曲线 (图 4A)。统计分析显示, SCMECs 在第 2 天、第 3 天生长较快, 第 3 天时已长满培养瓶底部; 在 1~3 d 细胞增殖明



注: A 为脊髓微血管段, B 为培养第 3 天, C 为培养第 5 天。标尺=100 μm。

图 1 树鼩原代脊髓微血管内皮细胞

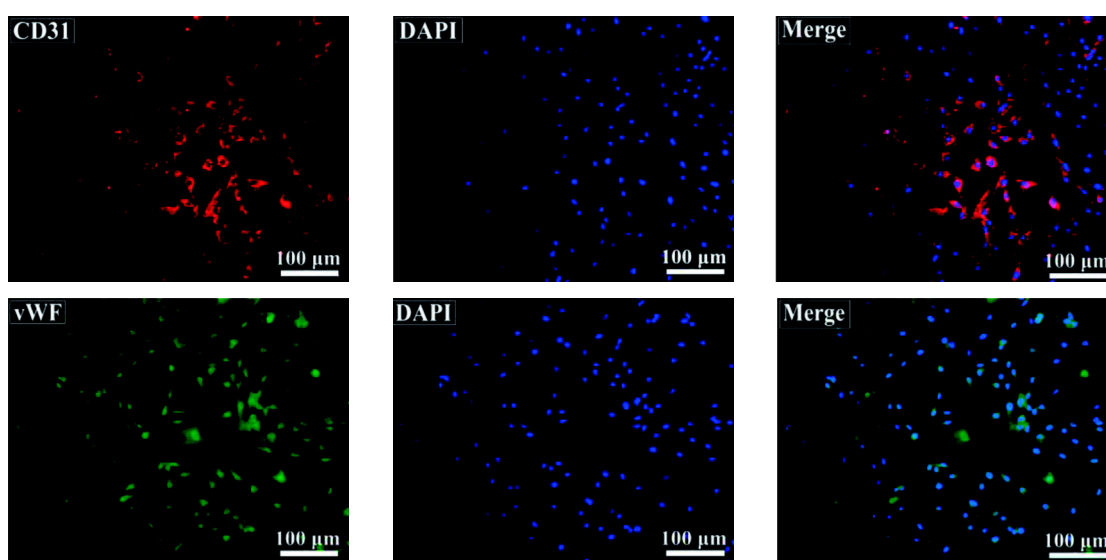
Figure 1 Primary cultured spinal cord microvascular endothelial cells derived from tree shrews



注：A 为嘌呤霉素处理 2 h，B 为嘌呤霉素处理 9 h，C 为纯化后第 4 代细胞。标尺=100 μm。

图 2 纯化后的树鼯脊髓微血管内皮细胞

Figure 2 Tree shrew spinal cord microvascular endothelial cells after puromycin purification



注：CD31 为血小板内皮细胞黏附分子 1，vWF 为抗血管性血友病因子（又称为Ⅷ因子相关抗原），DAPI 为 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶（可特异性染色细胞核 DNA），Merge 为 CD31（或 vWF）和 DAPI 二者的集合。标尺=100 μm。

图 3 树鼯脊髓微血管内皮细胞中 CD31 和 vWF 的免疫荧光染色结果

Figure 3 Immunofluorescence staining of CD31 and vWF in spinal cord microvascular endothelial cells isolated from tree shrews

显，细胞处于对数生长期；4 d 后，细胞增殖变缓，细胞数量逐渐减少；随着培养时间的增加，细胞增殖的速度先加快后降低（ $P < 0.05$ ）。

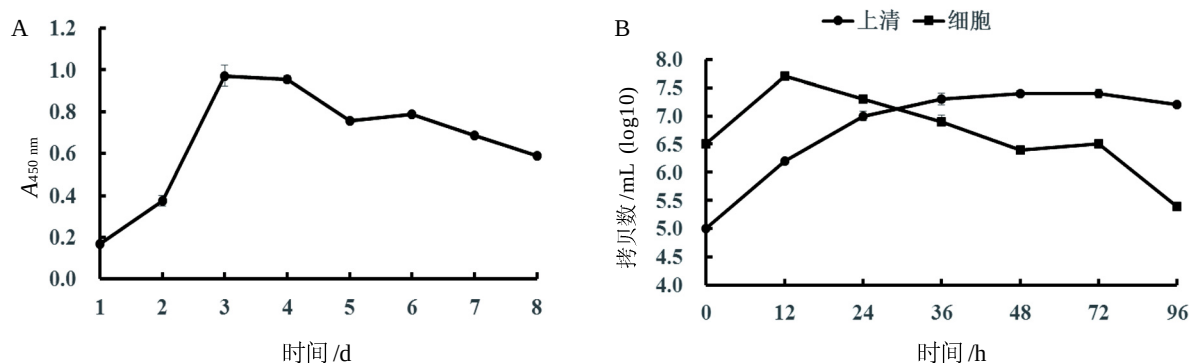
2.4 EV71 感染树鼯 SCMECs 的病毒增殖曲线

检测不同时间点的病毒载量，绘制病毒增殖曲线（图 4B）。结果显示，EV71 感染 SCMECs 48 h 内，细胞培养上清液中的病毒载量呈线性上升的趋势，且在感染 48 h 达到顶峰（ $P < 0.05$ ），48 h 后缓慢降低；细胞中的病毒载量在 12 h 达到顶峰，12 h 后病毒载量逐渐降低，且在 24 h

发现细胞开始死亡，96 h 时细胞已完全脱落死亡（ $P < 0.05$ ）。这一结果初步说明 EV71 能感染 SCMECs，并在细胞内有效增殖。

2.5 EV71 感染细胞后的免疫荧光观察

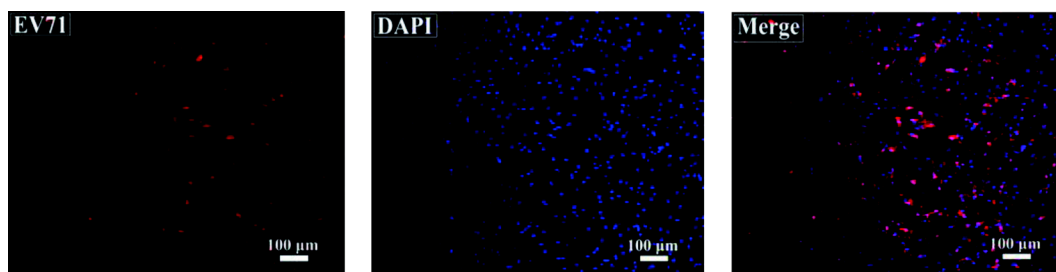
将 EV71 感染纯化后的 SCMECs 12 h 后，使用兔源性抗 EV71 抗体进行间接免疫荧光检测。结果显示，EV71 感染的细胞可见红色荧光，且大部分红色荧光都围绕在细胞核周围。这一结果进一步说明，EV71 能感染 SCMECs，且 EV71 颗粒主要分布于被感染细胞的细胞质（图 5）。



注: A 图中, 第 2、3、4、5、6、7、8 天与第 1 天比较, $F=525.818$, $^*P < 0.05$ 。B 图中, 细胞培养上清液(简称上清)的病毒载量在 12、24、36、48、72、96 h 与 0 h 比较, $F=187.389$, $^*P < 0.05$; 细胞中病毒载量在 12、24、36、48、72、96 h 与 0 h 比较, $F=152.704$, $^*P < 0.05$ 。

图 4 树鼯脊髓微血管内皮细胞生长曲线 (A) 和 EV71 感染后的病毒增殖曲线 (B)

Figure 4 Growth curve of spinal cord microvascular endothelial cells (SCMECs) (A) and the proliferation curve of enterovirus 71(EV71) in EV71-infected SCMECs of tree shrew (B)



注: EV71 为 71 型肠道病毒抗原, DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(可特异性染色细胞核 DNA), Merge 为二者集合。标尺=100 μm。

图 5 EV71 感染后脊髓微血管内皮细胞中的免疫荧光观察

Figure 5 Immunofluorescence staining in microvascular endothelial cells infected with enterovirus 71 (EV71)

3 讨论

EV71 是一种嗜神经性病毒, 能够引起严重的神经系统疾病, 使患者出现明显的临床综合征; 研究发现, 病毒主要集中在患者的脊髓和脑干^[9]。然而, EV71 感染的确切发病机制, 特别是引起严重神经症状的机制, 尚不清楚。SCMECs 是构成血-脊髓屏障的重要细胞成分, 许多神经系统疾病相关的病理过程都与 SCMECs 相关, 包括创伤、缺血、辐射、感染和炎症反应等^[10-12]。本实验采用树鼯的 SCMECs 进行 EV71 体外感染特性的研究, 以期探讨 EV71 致病机制提供新的实验模型。

目前, 微血管内皮细胞的体外分离培养主要来源于动物的脑组织, 而鲜有脊髓来源的微血管内皮细胞分离培养的文献报告。本实验主要采用

苑晓晨等^[8]报告的 SCMECs 培养方法, 并做了以下改良: (1) 借鉴部分学者选用 4~6 周小鼠的研究经验^[13], 本实验采用 3 月龄树鼯的脊髓中段组织分离微血管内皮细胞, 此年龄段树鼯的脊膜和血管容易分离, 后期培养时不易混入成纤维细胞和周细胞; 且我们的预实验表明, 相比于使用 1~2 周的树鼯, 使用 3 月龄树鼯进行细胞分离获得的微血管内皮细胞纯度更高, 数量更多。(2) 借鉴 Browning 等^[14]培养微血管内皮细胞时采用 MEM 培养液的经验, 本实验采用 DMEM/F12 基础培养液并补充生长因子, 成本更低, 且细胞增殖快, 活性高。本研究分离的原代细胞在第 3 代完成纯化, 该细胞分离培养能持续 13 代, 且能传代培养, 满足本次实验要求。第 14 代时, 细胞增殖缓慢, 活性降低。另外, 据报告, Wang 等^[15]和苑晓晨等^[8]分别采用内皮细胞特异性

标志物 CD31 及 vWF 进行免疫荧光染色鉴定; 本实验也采用这两种特异性标志物进行荧光染色以鉴定树鼩微血管内皮细胞, 结果显示分离的细胞均能被荧光标记, 此结果与之前文献报告一致。细胞生长曲线结果显示, 在体外培养 1~3 d 时, 细胞快速增殖进入对数期; 3~4 d 后达到平台期, 细胞生长状态良好, 提示分离的 SCMECs 能够充分满足体外 EV71 感染实验的要求。

马娜^[16]用 EV71 感染中枢神经系统的重要细胞——星形胶质细胞后, 发现感染 6~8 h 时病毒滴度达到峰值, 然后随细胞破坏的增多而逐渐下降。本研究用 EV71 感染树鼩 SCMECs 后, 分别检测不同时间点细胞及其培养上清液中的病毒载量, 发现细胞中病毒载量在 12 h 到达顶峰后逐渐降低, 与 EV71 感染星形胶质细胞的病毒增殖动力曲线相似, 表明 EV71 能在 SCMECs 中有效复制、增殖。为进一步确定 EV71 的感染情况, 本研究用间接免疫荧光法检测 EV71 颗粒的定位情况, 结果在感染 12 h 后能明显检测到红色荧光, 且主要围绕在细胞核周围, 表明 EV71 颗粒主要分布于被感染细胞的细胞质中。一般认为, 病毒能够在细胞内复制即表明病毒培养成功。因此, 以上结果证明 EV71 可感染 SCMECs, 提示 SCMECs 有望成为研究 EV71 感染的体外细胞模型。

综上所述, 本研究成功分离了树鼩原代 SCMECs 并优化培养条件, 通过嘌呤霉素纯化结合自然传代的方法得到较纯且生长状态良好的 SCMECs; 并且在体外用 EV71 感染 SCMECs 后, 定量检测细胞中病毒增殖情况, 免疫荧光法鉴定病毒蛋白表达, 结果证明 EV71 可成功感染 SCMECs。这些结果为今后进行体外血-脊髓屏障功能及相关研究奠定了一定基础, 也为利用树鼩进行 EV71 体内感染模型的研究提供了理论支持。

参考文献:

- [1] HUANG H I, LIN J Y, CHEN S H. EV71 infection induces IFN β expression in neural cells[J]. *Viruses*, 2019, 11(12): E1121. DOI:10.3390/v11121121.
- [2] RUCK T, BITTNER S, EPPING L, et al. Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells[J]. *J Vis Exp*, 2014(93):e52204. DOI:10.3791/52204.
- [3] ZHANG B, GENSEL J C. Is neuroinflammation in the injured spinal cord different than in the brain Examining intrinsic differences between the brain and spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2014, 258:112-120. DOI:10.1016/j.expneurol.2014.04.007.
- [4] ZHOU T, ZHENG Y M, SUN L, et al. Microvascular endothelial cells engulf myelin debris and promote macrophage recruitment and fibrosis after neural injury[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3):421-435. DOI:10.1038/s41593-018-0324-9.
- [5] 黄晓燕, 徐娟, 孙晓梅, 等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展[J]. *实验动物科学*, 2013, 30(2):59-64. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2013.02.014.
- [6] TONG Y H, HAO J J, TU Q, et al. A tree shrew glioblastoma model recapitulates features of human glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11):17897-17907. DOI:10.18632/oncotarget.15225.
- [7] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩[J]. *动物学研究*, 2012, 33(1):7-13. DOI:10.3724/SP.J.1141.2012.01007.
- [8] 苑晓晨, 李炳蔚, 秦伟伟, 等. 大鼠脊髓微血管内皮细胞的分离培养与鉴定[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(10): 1112-1113. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2013.10.012.
- [9] TEOH H L, MOHAMMAD S S, BRITTON P N, et al. Clinical characteristics and functional motor outcomes of Enterovirus 71 neurological disease in children[J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(3):300-307. DOI:10.1001/jamaneurol.2015.4388.
- [10] SAIDA K, SAIDA T, KAI K, et al. Central nervous system lesions in rats infected with Friend murine leukemia virus-related PVC441: ultrastructural and immunohistochemical studies[J]. *Acta Neuropathol*, 1997, 93(4):369-378. DOI:10.1007/s004010050628.
- [11] NAIDU K A, FU E S, SUTTON E T, et al. The therapeutic effects of epidural intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody in a rabbit model: involvement of the intercellular adhesion molecule-1 pathway in spinal cord ischemia[J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(3):857-862. DOI:10.1213/01.ane.0000072800.66277.cc.
- [12] NORDAL R A, WONG C S. Intercellular adhesion molecule-1 and blood-spinal cord barrier disruption in central nervous system radiation injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(5):474-483. DOI:10.1093/jnen/63.5.474.
- [13] GE S J, PACHTER J S. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord[J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 177(1-2):209-214. DOI:10.1016/j.jneuroim.2006.05.012.
- [14] BROWNING A C, GRAY T, AMOAKU W M. Isolation, culture, and characterisation of human macular inner choroidal microvascular endothelial cells[J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89(10):1343-1347. DOI:10.1136/bjo.2004.063602.
- [15] WANG J M, CHEN A F, ZHANG K Z. Isolation and primary culture of mouse aortic endothelial cells[J]. *J Vis Exp*, 2016(118):52965. DOI:10.3791/52965.
- [16] 马娜. EV71 对星形胶质细胞的感染及其病理意义的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2013.
(收稿日期: 2020-12-14 修回日期: 2021-03-11)