

刘青涛, 李 银, 黄欣梅, 等. 坦布苏病毒对小鼠的神经致病力[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 619-625.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.021

坦布苏病毒对小鼠的神经致病力

刘青涛, 李 银, 黄欣梅, 韩凯凯, 赵冬敏, 刘宇卓, 杨 婧

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 为评价坦布苏病毒(TMUV)对哺乳动物和人类健康的潜在危害,测定 TMUV 的增殖能力、神经毒力和神经侵袭力,并对小鼠脑组织进行病理学观察和炎性细胞因子测定,研究 TMUV 对小鼠的神经致病力。结果显示, TMUV 可以在小鼠的脑内进行有效的复制;3 日龄和 3 周龄的小鼠经脑内注射 TMUV 后,可以导致小鼠的发病和死亡,其半致死剂量分别为 $1 \times 10^{0.5} ELD_{50}$ 和 $1 \times 10^{2.5} ELD_{50}$;3 周龄的小鼠经腹腔注射 TMUV 后,同样可以引起小鼠的死亡,并且可以在脑内检测到病毒;此外, TMUV 还在小鼠脑内引起了神经原的变性、炎性细胞的浸润和过度的炎性细胞因子应答。以上结果说明, TMUV 可以在小鼠脑内进行有效复制并导致强烈的炎性应答,对小鼠具有较强的神经毒力和侵袭力。因此应该加强 TMUV 的流行病学监测和防控,防止该病毒的跨种间传播。

关键词: 坦布苏病毒; 小鼠; 神经致病力

中图分类号: S852.65+9.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0619-07

Neuropathogenicity of Tembusu virus in mice

LIU Qing-tao, LI Yin, HUANG Xin-mei, HAN Kai-kai, ZHAO Dong-min, LIU Yu-zhuo, YANG Jing
(*Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology/Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China*)

Abstract: To evaluate the potential threat to mammals and human health caused by Tembusu virus (TMUV), the neuropathogenicity of TMUV to mice was detected by evaluation of the replication, neurovirulence and neuroinvasiveness of the virus, the brain histopathology and inflammatory cytokine responses. TMUV could replicate in mouse brain and showed half mouse lethal dose (MLD_{50}) of $1 \times 10^{0.5}$ 50% egg lethal doses (ELD_{50}) and $1 \times 10^{2.5} ELD_{50}$ by intracerebral inoculation in 3-day- and 3-week-old mice, respectively. TMUV was also able to cause 3-week-old mice death and spread to mouse brain by intraperitoneally inoculation. In addition, neuronal degeneration, inflammatory cell infiltration, and high levels of inflammatory cytokine responses were induced in mice brains infected with TMUV. Taken together, TMUV could replicate and result in elevated inflammatory response in mouse brain, which led to strong neurovirulence and neuroinvasiveness in mice. It is necessary to improve the control of TMUV to prevent interspecies transmission.

Key words: Tembusu virus; mouse; neuropathogenicity

收稿日期: 2016-01-13

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2015M571714), 江苏省博士后科研资助计划项目(1402025B), 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2091]

作者简介: 刘青涛(1981-), 男, 山东滨州人, 博士, 助理研究员, 主要从事分子病毒学与免疫学研究。(Tel) 025-84390047; (E-mail) taoqingliu2013@163.com

通讯作者: 李 银, (Tel) 025-84391687; (Email) muziyin08@163.com

坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)属于黄病毒科(Flaviviridae), 黄病毒属(*Flavivirus*), 恩塔亚病毒群(Ntaya virus group), 为单股正链 RNA 病毒, 具有囊膜。该病毒于 1955 年首次分离于马来西亚吉

隆坡地区的库蚊,随后又在马来西亚其他地区和泰国的库蚊中分离到^[1-5]。2000年,在马来西亚霹雳州实兆远地区的患病肉鸡中分离到 TMUV,这是首次发现 TMUV 对家禽的致病性^[6]。2010年春季,在中国东部省份主要养鸭地区的鸭群中暴发了由 TMUV 引起的疫情,主要表现为种鸭、蛋鸭采食量和产蛋率迅速下降,肉鸭拉稀、神经症状和死亡,此次疫情一直持续到2010年冬季^[7-8]。目前 TMUV 已成为中国鸭群中的常见病原,给中国养鸭业造成了巨大经济损失^[9]。据不完全统计,坦布苏病毒病仅2010年造成的经济损失就达数十亿元。对于 TMUV 的流行病学调查显示, TMUV 除了可以感染鸭外还可以感染鸡和鹅,并且可以引起鸡和鹅的发病^[10-11]。此外,在鸽子和麻雀等飞禽和野鸟体内也分离到了 TMUV^[12-13],这提示 TMUV 的禽类宿主广泛,或者其宿主范围正在不断扩大。而对养殖场工人的检查结果显示,在养殖工人的血清中存在 TMUV 的核酸和抗体^[14],因此 TMUV 不仅可以感染禽类还可以感染人。

坦布苏病毒所在的黄病毒属是一个很大的病毒群,目前已发现的成员有70多种,其中大多数病毒可以感染蚊、虱等节肢动物,并通过这些中间宿主传播给动物或人。目前有多种黄病毒可以通过蚊虫叮咬感染人类,并且引起人类的发病和死亡,例如登革热病毒(DENV)可以引起人类的登革热或者登革出血热,日本脑炎病毒(JEV)可以引起人的流行性乙型脑炎,西尼罗病毒(WNV)可以引起人的西尼罗热和西尼罗脑炎。而对于 TMUV 的遗传进化分析显示,该病毒也是一种蚊媒传播病毒^[8],并且在蚊子体内也分离到了 TMUV^[15],因此不排除 TMUV 经蚊子叮咬感染人的可能。而先前的研究结果显示,小鼠是评价黄病毒对人类致病性的一个理想模型,对人类高致病力的毒株一般对小鼠也表现出很强的神经致病力和侵袭力,而对于人类致病力比较弱的疫苗株对小鼠的神经致病力和侵袭力也比较弱^[16-20]。因此,本研究以小鼠为模型评价了 TMUV 跨种间传播的危害及其潜在的公共卫生风险。

1 材料与方法

1.1 试验材料

坦布苏病毒(TMUV) JS804株由江苏省农业科学院兽医研究所分离并保存^[10]。3日龄和3周龄

ICR 雌性小鼠购自中国科学院上海实验动物中心。TMUV JS804株的病毒含量用鸡胚半致死剂量(ELD_{50})来表示。将 TMUV 进行10倍系列稀释,每个稀释度接种5个鸡胚,在37℃孵育120h,弃去24h内的死亡鸡胚,记录24~120h内的死亡鸡胚数,通过 Reed-Muench 方法计算 ELD_{50} 。

1.2 仪器和试剂

RNA 提取试剂盒购自康宁公司, T7 体外转录试剂盒购自百奥迈科生物技术有限公司, One Step RT-PCR Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司, ABI 7500 Real-Time PCR System 购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 TMUV 在小鼠脑内的增殖能力测定

将 TMUV 通过脑内注射对3周龄小鼠进行感染,感染剂量为每只 $1 \times 10^3 ELD_{50}$,感染后的第1d、第2d、第3d、第5d取小鼠的脑组织,用本实验室已经建立的 qRT-PCR 方法^[21]对小鼠脑组织内的 TMUV 滴度进行测定。按照试剂盒(AxyPrep™ multisource total RNA miniprep kit)说明进行脑组织内病毒核酸的提取, TMUV 的 qRT-PCR 测定引物见表1。

1.4 TMUV 对小鼠的神经毒力试验

将 TMUV 进行10倍系列稀释,通过脑内注射分别对3日龄和3周龄小鼠进行攻毒,同时设 PBS 注射组为对照。攻毒后每天观察小鼠的发病和死亡情况,观察至第14d。

1.5 TMUV 对小鼠的神经侵袭力试验

取20只3周龄小鼠腹腔内注射 $1 \times 10^5 ELD_{50}$ 的 TMUV,在攻毒后的第1d、第3d、第5d、第7d各取5只小鼠的脑组织,用 qRT-PCR 对脑内的 TMUV 进行测定。另外,将 TMUV 进行10倍系列稀释,通过腹腔内注射对3周龄小鼠进行攻毒,同时设 PBS 注射组为对照。攻毒后每天观察小鼠的发病和死亡情况,观察至第21d。

1.6 组织病理学观察

将 TMUV 通过脑内注射对3周龄小鼠进行攻毒,攻毒剂量为每只 $1 \times 10^3 ELD_{50}$,同时设 PBS 注射组为对照。攻毒后的第4d,取小鼠的脑组织用4%的多聚甲醛进行固定,按照常规方法进行石蜡切片制备,经苏木素-伊红(HE)染色后置显微镜下观察脑组织的病理变化。

1.7 TMUV 在小鼠脑内引起的炎性细胞因子应答测定

将 TMUV 通过脑内注射对3周龄小鼠进行攻

毒,攻毒剂量为每只 $1 \times 10^3 ELD_{50}$,同时设 PBS 注射组为对照。攻毒后的第 1 d、第 2 d、第 3 d、第 5 d 用 qRT-PCR 对小鼠脑内的炎性细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 IL-10) 应答进行测定^[22-23]。qRT-PCR 以 β -肌动蛋白基因 (β -actin) 为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各个细胞因子基因的表达变化,所用引物见表 1。

表 1 用于 TMUV 和细胞因子 qRT-PCR 测定的引物

Table 1 Primers used for viral quantification and cytokine expression detection

| 引物名称 | 引物序列 (5'→3') | 参考文献 |
|-------------------|---------------------------|------|
| TMUV-NS2AF | GCAGCCAGGAGATTTTGAG | [6] |
| TMUV-NS2AR | CTAACGCAACGCCAAGCA | |
| β -actin-F | AGAGGGAAATCGTGCCTGAC | [18] |
| β -actin -R | CAATAGTGATGACCTGGCCGT | |
| TNF- α -F | CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA | [18] |
| TNF- α -R | TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC | |
| IL-1 β -F | CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG | [18] |
| IL-1 β -R | GATCCACACTCTCCAGCTGCA | |
| IL-8-F | ATGGCTGGGATTACCTCAA | [19] |
| IL-8-R | AAGCCTCGCGACCATCTT | |
| IL-10-F | GGTTGCCAAGCCTTATCGGA | [18] |
| IL-10-R | ACCTGCTCCACTGCCTTGCT | |

2 结果

2.1 TMUV 在小鼠脑内的增殖能力

以 $1 \times 10^3 ELD_{50}$ 对 3 周龄的小鼠进行脑内攻毒,

然后测定其脑内的 TMUV 滴度。结果(图 1)显示,在攻毒后的第 1 d TMUV 在小鼠脑内的增殖滴度为 $1 \times 10^{6.11}$ 拷贝,而到第 3 d 时病毒的滴度为 $1 \times 10^{6.60}$ 拷贝;在攻毒后的第 5 d TMUV 的增殖达到高峰,其滴度为 $1 \times 10^{8.87}$ 拷贝;到第 7 d 时, TMUV 在脑内仍然保持比较高的滴度,其滴度为 $1 \times 10^{8.30}$ 拷贝。以上结果说明, TMUV 在小鼠脑内具有比较强的增殖能力。

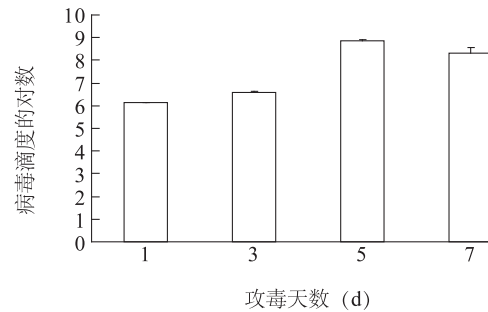
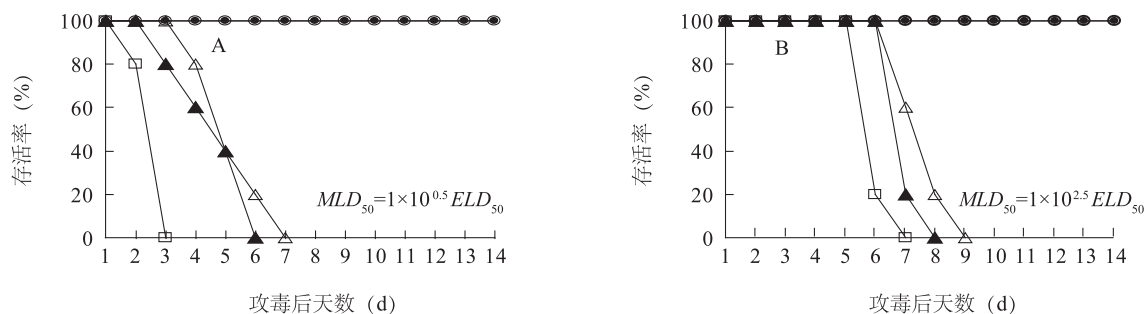


图 1 小鼠脑内的增殖能力测定

Fig.1 Replication of TMUV in mouse brain

2.2 TMUV 对小鼠的神经毒力

对 3 日龄乳鼠的脑内攻毒结果(图 2)显示,攻毒剂量为 $1 \times 10^3 ELD_{50}$ 时在攻毒后的第 2 d 即可引起 20% 的小鼠死亡,而到第 3 d 导致全部小鼠死亡;攻毒剂量为 $1 \times 10^2 ELD_{50}$ 和 $1 \times 10^1 ELD_{50}$ 时,在攻毒后的第 3~4 d 小鼠开始出现后肢瘫痪和死亡,在攻毒后的第 6~7 d 小鼠全部死亡;攻毒剂量为 $1 \times 10^0 ELD_{50}$ 时并未引起小鼠的神经症状或者死亡,因此 TMUV 对 3 日龄乳鼠的半致死剂量为 $1 \times 10^{0.5} ELD_{50}$ 。而对 3 周龄小鼠的脑内攻毒结果显示,以 $1 \times$



图A中, —○— 对照组; —●— $1 \times 10^0 ELD_{50}$; —△— $1 \times 10^1 ELD_{50}$; —▲— $1 \times 10^2 ELD_{50}$; —□— $1 \times 10^3 ELD_{50}$
图B中, —○— 对照组; —●— $1 \times 10^2 ELD_{50}$; —△— $1 \times 10^3 ELD_{50}$; —▲— $1 \times 10^4 ELD_{50}$; —□— $1 \times 10^5 ELD_{50}$

A: 对 3 日龄乳鼠的脑内攻毒; B: 对 3 周龄小鼠的脑内攻毒; MLD_{50} : 小鼠的半致死剂量。

图 2 对小鼠的神经毒力测定结果

Fig.2 Neurovirulence of TMUV in mice

$10^5 ELD_{50}$ 攻毒的小鼠在攻毒后的第 6 d 开始出现后肢瘫痪和死亡,其死亡率为 80%,而在攻毒后的第 7 d 死亡率达到 100%;以 $1 \times 10^4 ELD_{50}$ 和 $1 \times 10^3 ELD_{50}$ 攻毒的小鼠在攻毒后的第 8 d 和第 9 d 死亡率也达到了 100%;以 $1 \times 10^2 ELD_{50}$ 攻毒的小鼠仅仅表现出一过性的精神倦怠,并没有出现死亡,因此 TMUV 对 3 周龄小鼠的半致死剂量为 $1 \times 10^{2.5} ELD_{50}$ 。以上结果说明, TMUV 对 3 日龄的乳鼠和 3 周龄小鼠均具有很强的神经毒力。

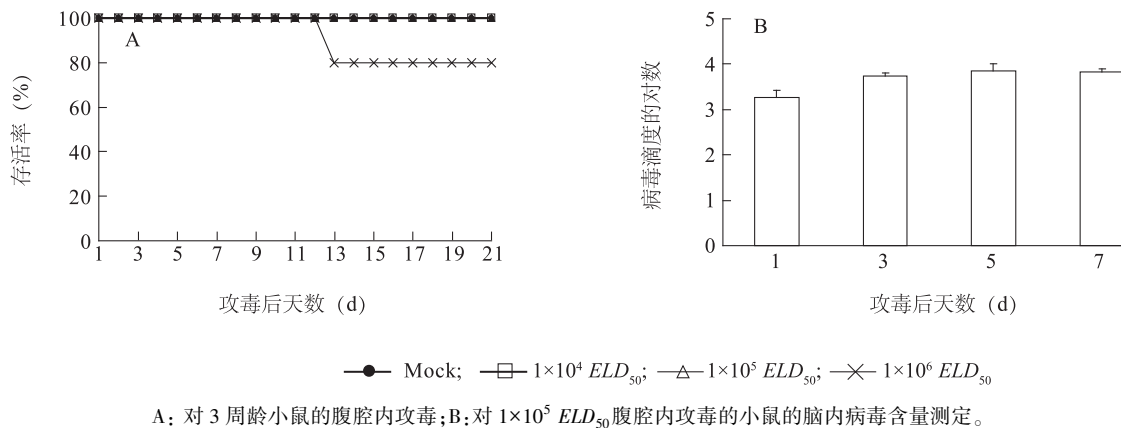
2.3 TMUV 对小鼠的神经侵袭力

对以 $1 \times 10^5 ELD_{50}$ 进行腹腔内攻毒的小鼠的脑内病毒测定结果(图 3)显示,在攻毒后的第 1 d TMUV 即可扩散到脑内,并且在第 5~7 d 增殖到较

高的滴度,这说明通过腹腔内注射 TMUV 也可以侵害小鼠的中枢神经系统。另外,当以 $1 \times 10^6 ELD_{50}$ 对小鼠进行攻毒时可以引起小鼠 20% 的死亡率;而当以 $1 \times 10^4 ELD_{50}$ 和 $1 \times 10^5 ELD_{50}$ 对小鼠进行攻毒时,虽不能引起小鼠的死亡,但却可以引起小鼠一过性的精神萎靡,因此 TMUV 对小鼠具有一定的神经侵袭力。

2.4 病理学观察

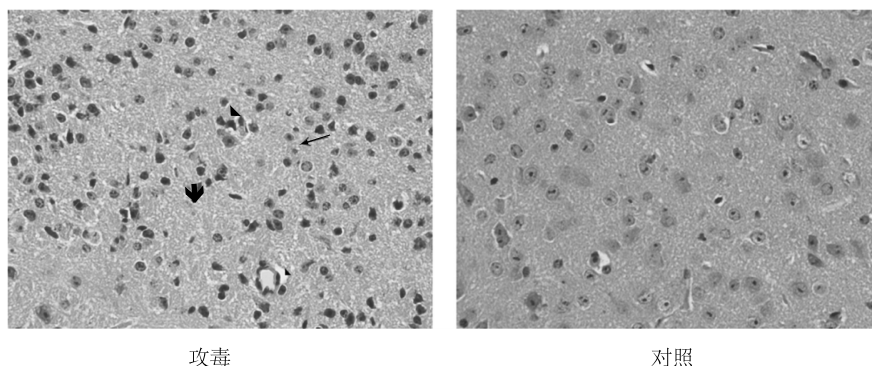
以 $1 \times 10^3 ELD_{50}$ 对 3 周龄的小鼠进行脑内攻毒,然后观察 TMUV 所引起的小鼠脑组织的病理学变化。结果(图 4)显示, TMUV 在攻毒后第 4 d 即可引起小鼠脑内的神经元变性、坏死、炎性细胞浸润和出血,而 PBS 注射并未引起小鼠脑组织的明显病理变化。



A: 对 3 周龄小鼠的腹腔内攻毒; B: 对 $1 \times 10^5 ELD_{50}$ 腹腔内攻毒的小鼠的脑内病毒含量测定。

图 3 对小鼠的神经侵袭力测定

Fig.3 Neuroinvasiveness of TMUV in mice



细箭头: 神经元变性、坏死; 黑三角: 炎性细胞浸润; 粗箭头: 出血。

图 4 脑组织的病理学观察 ($\times 400$)

Fig.4 The histopathology of TMUV-infected mouse brain ($\times 400$)

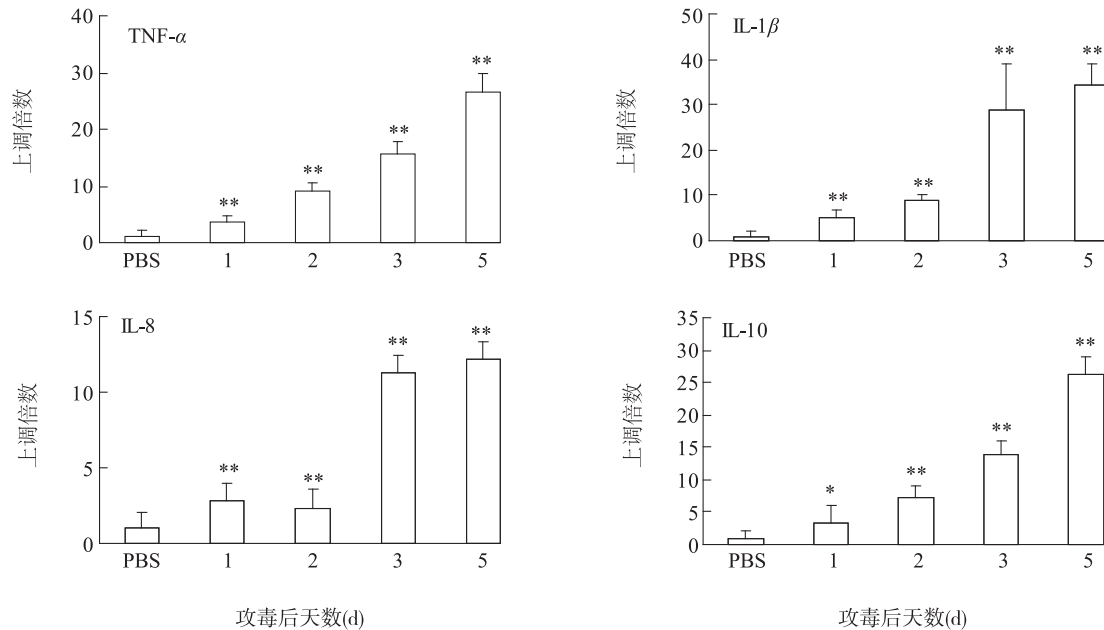
2.5 细胞因子测定

对西尼罗病毒和登革热病毒等的研究结果显

示,过度的炎性细胞因子应答在黄病毒的致病过程中发挥了关键作用,因此我们对 TMUV 引起的炎性

细胞因子应答进行了测定。结果(图5)显示, TMUV在攻毒后的第1 d即可以引起炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 IL-10 的显著上调表达;到第3 d、第5 d时 TNF- α 的上调表达倍数在 15 倍以上, IL-1 β

的上调表达倍数在 28 倍以上, IL-8 的上调表达倍数在 11 倍以上, IL-10 的上调表达倍数在 14 倍以上。以上结果说明 TMUV 的感染可以引起小鼠脑内强烈的细胞因子应答。



PBS:磷酸盐缓冲液对照; *表示差异达到显著水平($P<0.05$); **表示差异达到极显著水平($P<0.01$)。

图5 小鼠脑内的炎症细胞因子应答

Fig.5 Inflammatory cytokine responses in TMUV-infected mouse brain

3 讨论

中国在2010年首次出现鸭的TMUV疫情后,该病毒在鸭群中迅速扩散,目前已发展为地方流行。TMUV除了感染鸭以外还可以感染鹅、鸡、鸽子、麻雀和蚊子^[10-13,15],该病毒的宿主范围正在不断扩大。而令人担心的是在人的血清中也检测到了TMUV的抗体和核酸^[14],所以不排除TMUV感染人的可能。因此,基于其他黄病毒(WNV、DENV和JEV等)给人类健康所造成的严重危害,十分有必要开展TMUV对哺乳动物和人的潜在致病性研究。

小鼠作为一种经典的动物模型已被许多学者用于人类黄病毒的神经致病力评价^[20],因此本研究也以小鼠为模型对TMUV的神经致病力进行了评价。对神经毒力的研究发现, TMUV不仅可以在小鼠的脑内进行有效复制,而且还可以引起小鼠的死亡,这说明TMUV对小鼠具有很强的神经毒力。而对神经侵袭力的研究发现, TMUV经腹腔注射后可以扩

散到小鼠的脑内,并且在攻毒剂量为 1×10^6 ELD₅₀时可以引起小鼠的死亡,这说明TMUV对小鼠同样具有一定的神经侵袭力,存在TMUV经蚊虫叮咬进而感染人类的可能。

细胞因子应答在病毒对宿主的致病过程中发挥关键作用。例如, H5N1高致病性禽流感病毒之所以能引起人和小鼠的严重发病,均与其感染所诱发的“细胞因子风暴”有关^[24-25];而SARS冠状病毒感染的一个严重后果就是引起了人体内的炎症细胞因子的过度应答^[26]。而我们的研究结果显示, TMUV在感染后的第1 d即可引起小鼠脑内促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 的显著应答,到第3 d和第5 d时达到比较高的水平。先前的研究结果显示, TNF- α 的过度应答与 DENV 诱发的登革出血热/登革休克综合征(DHF/DSS)密切相关^[27-28],而在WNV诱发脑炎的过程中同样也伴随着 TNF- α 的过度应答^[29-30]。IL-1 β 是参与急性炎症反应的主要细胞因子之一,可以促使炎症细胞向局部炎症部位的

浸润^[31],已被证实与 DENV 感染和致病的严重程度密切相关^[32]。IL-8 作为一种促炎性细胞因子与 JEV 感染的预后不良密切相关^[33-34]。另外,我们发现 TMUV 在诱发促炎性细胞因子过度应答的同时也导致了小鼠脑内抗炎性细胞因子 IL-10 的高度应答,这说明 TMUV 诱发了细胞因子应答的高度紊乱。对于 JEV 的研究结果显示,JEV 感染树突状细胞后在诱发促炎性细胞因子应答的同时也同样导致了 IL-10 的高度应答^[35]。因此,TMUV 感染小鼠后所诱发的脑内的炎性细胞因子应答与其他黄病毒具有很大的相似性,但是对于 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 IL-10 在 TMUV 致病过程中的作用机理还需要进一步的研究。

本研究系统评价了 TMUV 对小鼠的神经致病力,为 TMUV 潜在的公共卫生风险评价提供了重要的试验数据。同时,我们对 TMUV 感染所引起的小鼠脑组织的病理变化和炎性细胞因子应答也进行了初步研究,这为阐明 TMUV 跨物种感染的致病机理提供了研究基础。

参考文献:

- [1] 韩凯凯,李 银,黄欣梅,等.鹅新型坦布苏病毒囊膜蛋白的二级结构与 B 细胞表位预测[J].江苏农业科学,2014,42(6):166-169.
- [2] 赵冬敏,黄欣梅,刘宇卓,等.鹅坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I 的原核表达及免疫原性鉴定[J].南方农业学报,2014,45(12):2259-2263.
- [3] PLATT G S, WAY H J, BOWEN E T, et al. Arbovirus infections in Sarawak, october 1968--February 1970 Tembusu and Sindbis virus isolations from mosquitoes [J]. Ann Trop Med Parasitol, 1975, 69(1):65-71.
- [4] 赵冬敏,黄欣梅,刘宇卓,等.鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 在大肠杆菌中的表达及免疫学鉴定[J].江苏农业学报,2015,31(3):619-623.
- [5] 黄欣梅,赵冬敏,刘宇卓,等.鹅坦布苏病毒 E 蛋白结构域 III 的原核表达及抗原性分析[J].南方农业学报,2015,46(1):150-154.
- [6] KONO Y, TSUKAMOTO K, ABD HAMID M, et al. Encephalitis and retarded growth of chicks caused by Sitiawan virus, a new isolate belonging to the genus Flavivirus [J]. Am J Trop Med Hyg, 2000, 63(1-2):94-101.
- [7] 曹贞贞,张 存,黄 瑜,等.鸭出血性卵巢炎的初步研究[J].中国兽医杂志,2010,46(12):3-6.
- [8] LIU P, LU H, LI S, et al. Genomic and antigenic characterization of the newly emerging Chinese duck egg-drop syndrome flavivirus; genomic comparison with Tembusu and Sitiawan viruses [J]. J Gen Virol, 2012, 93(10):2158-2170.
- [9] 刘志刚,孙青松,姚 蓉,等.鸭坦布苏病毒研究进展[J].中国动物传染病学报,2013,21(1):81-86.
- [10] 黄欣梅,李 银,赵冬敏,等.新型鹅黄病毒 JS804 毒株的分离与鉴定[J].江苏农业学报,2010,27(2):354-360.
- [11] LIU M, CHEN S, CHEN Y, et al. Adapted Tembusu-like virus in chickens and geese in China [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8):2807-2809.
- [12] DAI L, LI Z, TAO P. Evolutionary analysis of Tembusu virus; evidence for the emergence of a dominant genotype [J]. Infect Genet Evol, 2015, 32:124-129.
- [13] TANG Y, DIAO Y, YU C, et al. Characterization of a Tembusu virus isolated from naturally infected house sparrows (Passer domesticus) in northern China [J]. Transbound Emerg Dis, 2013, 60(2):152-158.
- [14] TANG Y, GAO X, DIAO Y, et al. Tembusu virus in human, China [J]. Transbound Emerg Dis, 2013, 60(3):193-196.
- [15] TANG Y, DIAO Y, CHEN H, et al. Isolation and genetic characterization of a tembusu virus strain isolated from mosquitoes in Shandong, China [J]. Transbound Emerg Dis, 2015, 62(2):209-216.
- [16] BEASLEY D W, LI L, SUDERMAN M T, et al. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype [J]. Virology, 2002, 296(1):17-23.
- [17] BEASLEY D W, DAVIS C T, ESTRADA-FRANCO J, et al. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(12):2221-2224.
- [18] CHAMBERS T J, LIANG Y, DROLL D A, et al. Yellow fever virus/dengue-2 virus and yellow fever virus/dengue-4 virus chimeras: biological characterization, immunogenicity, and protection against dengue encephalitis in the mouse model [J]. J Virol, 2003, 77(6):3655-3668.
- [19] CHAMBERS T J, JIANG X, DROLL D A, et al. Chimeric Japanese encephalitis virus/dengue 2 virus infectious clone: biological properties, immunogenicity and protection against dengue encephalitis in mice [J]. J Gen Virol, 2006, 87(11):3131-3140.
- [20] KIMURA T, SASAKI M, OKUMURA M, et al. Flavivirus encephalitis: pathological aspects of mouse and other animal models [J]. Vet Pathol, 2010, 47(5):806-818.
- [21] 刘青涛,李 银,赵冬敏,等.一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测坦布苏病毒方法的建立[J].江苏农业学报,2015,31(4):829-833.
- [22] DE BARROS V E, SAGGIORO F P, NEDER L, et al. An experimental model of meningoencephalomyelitis by Rocio flavivirus in BALB/c mice: inflammatory response, cytokine production, and histopathology [J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 85(2):363-373.
- [23] INOUE R, OTSUKA M, NISHIO A, et al. Primary administration of lactobacillus johnsonii NCC533 in weaning period suppresses the elevation of proinflammatory cytokines and CD86 gene expressions in skin lesions in NC/Nga mice [J]. FEMS Immunol Med Micro-

- biol, 2007, 50(1):67-76.
- [24] DE JONG M D, SIMMONS C P, THANH T T, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia [J]. Nat Med, 2006, 12(10):1203-1207.
- [25] TISONCIK J R, KORTH M J, SIMMONS C P, et al. Into the eye of the cytokine storm [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2012, 76(1):16-32.
- [26] HUANG K J, SU I J, THERON M, et al. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients [J]. J Med Virol, 2005, 75(2):185-194.
- [27] VITARANA T, DE SILVA H, WITHANA N, et al. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever [J]. Ceylon Med J, 1991, 36(2):63-65.
- [28] SRIKIATKHACHORN A, GREEN S. Markers of dengue disease severity [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2010, 338:67-82.
- [29] DANIELS B P, HOLMAN D W, CRUZ-ORENGO L, et al. Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals [J]. M Bio, 2014, 5(5):e1476-1488.
- [30] GARCIA-TAPIA D, HASSETT D E, MITCHELL W J, et al. West Nile virus encephalitis: sequential histopathological and immunological events in a murine model of infection [J]. J Neurovirol, 2007, 13(2):130-138.
- [31] DINARELLO C A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases [J]. Blood, 2011, 117(14):3720-3732.
- [32] TAN T Y, CHU J J. Dengue virus-infected human monocytes trigger late activation of caspase-1, which mediates pro-inflammatory IL-1 β secretion and pyroptosis [J]. J Gen Virol, 2013, 94(10):2215-2220.
- [33] SINGH A, KULSHRESHTHA R, MATHUR A. Secretion of the chemokine interleukin-8 during Japanese encephalitis virus infection [J]. J Med Microbiol, 2000, 49(7):607-612.
- [34] WINTER P M, DUNG N M, LOAN H T, et al. Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis [J]. J Infect Dis, 2004, 190(9):1618-1626.
- [35] ALEYAS A G, GEORGE J A, HAN Y W, et al. Functional modulation of dendritic cells and macrophages by Japanese encephalitis virus through MyD88 adaptor molecule-dependent and -independent pathways [J]. J Immunol, 2009, 183(4):2462-2474.

(责任编辑:陈海霞)