

秦波音,王超,刘洋,等. 受体相互作用蛋白激酶-3参与甲型流感病毒 H1N1 感染 C57BL/6 小鼠诱导特异性 CD8⁺T 细胞应答 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 549-554.

Qin BY, Wang C, Liu Y, et al. Receptor-interacting protein 3 plays a role in the induction of influenza viral antigen specific CD8⁺T cell responses in C57BL/6 mice upon H1N1 influenza virus infection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(5): 549-554.

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2019. 05. 001

受体相互作用蛋白激酶-3 参与甲型流感病毒 H1N1 感染 C57BL/6 小鼠诱导特异性 CD8⁺T 细胞应答

秦波音,王超,刘洋,谭丹,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 研究受体相互作用蛋白激酶-3(receptor-interacting protein 3, RIP3)在 C57BL/6 小鼠感染甲型流感病毒 H1N1 PR8 后,在特异性 CD8⁺T 细胞免疫应答中的作用。方法 用剂量为 0.7×10^3 半数组织细胞感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)的甲型流感 H1N1 PR8 病毒株,通过滴鼻方式分别感染 RIP3 敲除(RIP3^{-/-})和野生型(WT)的 C57BL/6 小鼠。在感染后第 8 天(day post infection, d.p.i)分离小鼠脾细胞,使用流式细胞术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)检测流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞数量及功能;MHC I 表位肽四聚体法(tetramer staining)染色流感特异性 CD8⁺T 细胞,细胞内细胞因子染色法(intracellular cytokine staining, ICS)检测 CD8⁺T 细胞产生 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 等效应性细胞因子水平和与 CD8⁺T 细胞杀伤功能有关的颗粒酶(granzyme B)的表达情况。结果 0.7×10^3 TCID₅₀ 流感病毒感染后,WT 小鼠中流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞比例为 RIP3^{-/-} 小鼠的 2.71 倍;WT 小鼠中 CD8⁺T 细胞分泌细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 的能力均显著高于 RIP3^{-/-} 小鼠($P < 0.01$);且 WT 小鼠 CD8⁺T 表达 granzyme B 水平显著高于 RIP3^{-/-} 小鼠($P < 0.01$)。结论 本研究在甲型流感病毒感染的小鼠体内发现敲除 RIP3 分子可导致流感感染诱导的特异性 CD8⁺T 细胞数量减少、功能降低,表明 RIP3 是参与流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞的诱导及功能发挥的关键分子之一。

【关键词】 RIP3;流感病毒;特异性 CD8⁺T 细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 05-0549-06

Receptor-interacting protein 3 plays a role in the induction of influenza viral antigen specific CD8⁺T cell responses in C57BL/6 mice upon H1N1 influenza virus infection

QIN Boyin, WANG Chao, LIU Yang, TAN Dan, 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 whether RIP3 (receptor-interacting protein 3) is involved in the induction of influenza antigen specific CD8⁺T cell responses in C57BL/6 mice upon H1N1 influenza virus infection. **Methods** RIP3

【基金项目】国家重点研发计划(2016YFD0500208);国家十三五传染病重大专项(2017ZX10304402-001-012, 2017ZX10304402-001-006);国家自然科学基金(31601908, 81471397);上海市公共卫生临床中心院内项目(KY-GW-2018-48, KY-GW-2019-19)。

Funded by the National Major Projects for Science and Technology (2016YFD0500208), National Major Special Program on Infectious Diseases in the 13th Five-Year Plan (2017ZX10304402-001-012, 2017ZX10304402-001-006), the National Natural Science Foundation of China (31601908, 81471397) and Shanghai Public Health Clinical Center Hospital Project (KY-GW-2018-48, KY-GW-2019-19).

【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,研究方向:新发传染病动物模型构建与免疫机制研究。Email: zhouxiaohui@shphc.org.cn

knockout (RIP3^{-/-}) and wild type (WT) C57BL/6 mice were infected by influenza virus H1N1 PR8 with the dose of 0.7×10^3 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose). Splenocytes were isolated from the infected mice which were sacrificed at 8 days post infection (d.p.i), and fluorescence-activated cell sorting (FACS) were used for the comparison of quantities and functions of influenza viral antigen specific CD8⁺T cells between the RIP3^{-/-} group and WT group. Surface staining of influenza viral MHC I tetramer was performed to quantify the antigen specific CD8⁺T cells. Intracellular cytokine staining (ICS) was carried out to dissect the production levels of effector cytokines, such as IFN- γ , TNF- α and IL-2. Granzyme B, which is related to the cytotoxic effect of the antigen specific CD8⁺T cells, was also assayed by ICS. **Results** On average, the percentages of influenza viral antigen specific CD8⁺T cells in the WT group of mice were about 2.71 fold comparing with that in the RIP3^{-/-} group of mice. Furthermore, the production levels of IFN- γ , TNF- α and IL-2 by the antigen specific CD8⁺T cells in the WT group of mice were significantly higher than those levels in the counterpart group of RIP3^{-/-} mice ($P < 0.01$); and in regards to granzyme B, the same trend was showed when comparing the expression levels between those two group mice, i.e., WT group was higher than the RIP3^{-/-} group ($P < 0.01$). **Conclusions** The data of the present study reported that the deficiency of RIP3 molecule in C57BL/6 mice will decrease the quantity and functionality of the influenza viral antigen specific CD8⁺T cells at 8 d.p.i. upon influenza virus H1N1 PR8 infection, which indicates that RIP3 is indispensable for the induction of influenza viral antigen specific CD8⁺T cells at effector stage.

【Keywords】 RIP3; influenza virus; influenza-Specific CD8⁺T cells

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

甲型流感病毒 (IAV) 是鸟类和哺乳动物流感的主要病原体, 可引起反复流行, 造成人类高发病率和死亡率^[1]。1918 年的 H1N1 流感大流行是有史以来最严重的流感大流行, 造成全世界 2 ~ 5 千万人死亡^[2]。而 2009 年墨西哥等国爆发的甲型 H1N1 型流感大流行, 也造成了 1 万多人死亡^[3-4]。甲型流感病毒的感染已严重危害人类生命健康, 并造成了巨大的经济损失, 深入研究甲型流感病毒的感染致病及免疫反应的机制, 对研发流感病毒疫苗和抗病毒药物具有深远意义。

受体相互作用蛋白激酶-3 (receptor-interacting protein 3, RIP3) 是细胞程序性坏死 (necroptosis) 信号通路的关键分子。近年来发现, 细胞坏死在特定条件下也受信号通路参与和调控, 称为程序性坏死。调控细胞坏死的分子机制主要由受体相互作用蛋白激酶 (receptor-interacting proteins, RIPs) 参与, RIP3 分子作为 RIPs 家族的重要成员和 RIP1 一起通过 RHIM 基序 (RIP homotypic interaction motif) 相互结合及相互磷酸化, 从而对程序性坏死起关键调节作用^[5-7]。本课题组前期研究发现, RIP3 介导的程序性坏死信号通路在流感病毒 H1N1 PR8 感染中起到一定的炎症病理作用^[8], 但 RIP3 分子在诱导流感特异性 T 细胞应答中的作用尚不明确。本研究继续观察了 RIP3 敲除小鼠在感染流感后 CD8⁺T 细胞的变化, 发现缺失 RIP3 分子会导致流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞生成数量减少, 且分泌效应

性细胞因子的能力和表达颗粒酶的水平降低, 报道了 RIP3 分子在参与流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞诱导生成及其效应性应答功能中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 3 月龄左右 C57BL/6 雌性小鼠 10 只, RIP3 敲除 (RIP3^{-/-}) 的雌性 C57BL/6 背景小鼠 10 只, 体重约 20 ~ 22 g。C57BL/6 小鼠购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK (沪) 2018-0016】, RIP3^{-/-} 小鼠由王晓东院士惠赠, 经本实验动物部繁育扩群, 两品系小鼠共同饲养于复旦大学附属公共卫生临床中心实验动物部二楼 SPF 实验区域【SYXK (沪) 2015-0008】。在攻毒前 1 d, 实验小鼠从 SPF 区转移到动物生物安全二级实验室。所有操作均符合复旦大学附属公共卫生临床中心实验动物伦理要求 (伦理审批号: IACUC2018-A044-02)。

1.1.2 病毒

甲型流感 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 病毒株 (简称 PR8), 由上海兽医研究所李泽君教授赠予。病毒通过鸡胚及 MDCK 细胞培养并滴定后, 分装于 EP 管中, -80℃ 冰箱冻存储存, 涉及动物感染性实验均在复旦大学附属公共卫生临床中心实验动物部动物生物安全二级实验室 (ABSL-2) 内开展 (实验室注册备案号: 金字第 022006005 号)。

1.1.3 实验试剂

多聚甲醛固定液(武汉谷歌生物科技有限公司,163307),DMEM 培养液(Gibco,1868707),异氟烷(上海雅培制药有限公司,B506),流式抗体(上海达科维生物技术有限公司,Biolegend),BD Cytotfix/Cytoperm Plus 固定破膜试剂盒(BD,555028),针对 MHC-I 类四聚体 Flu.NP366 [ASNNMETM, H-2D(b)](广州好芝生物科技有限公司,HG08T7030),Biolegend FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI(上海达科维生物技术有限公司,640914)。

1.1.4 实验仪器

生物安全柜(HR40-II A2,Haier,青岛海尔特种电器有限公司,中国),冷冻离心机(Micro 17R,Thermo,美国),CO₂ 培养箱(3111,Thermo,美国),流式细胞仪(LSR Fortessa,BD 公司,美国),精密高温干燥箱(DHG-9070C,上海之信仪器有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及小鼠攻毒

将小鼠随机分为 4 组:WT 感染组(A 组)和 WT 对照组(B 组)、RIP3^{-/-} 感染组(C 组)和 RIP3^{-/-} 对照组(D 组),每组小鼠各 5 只。将 4 组实验小鼠分别打耳孔标记并称重,使用异氟烷对小鼠进行麻醉,用 100 μ L 移液枪吸取 40 μ L 含 0.7×10^3 TCID₅₀ 的 PR8 DMEM 病毒液从小鼠鼻部缓慢滴入进行攻毒,病毒液滴入鼻孔时需缓慢并顺应小鼠呼吸节奏,直至液体完全吸收,同时轻拍小鼠胸腹部,以保证攻毒剂量的准确。结束后将小鼠置于负压独立送风隔离笼具(IVC)系统内正常饲养。

1.2.2 样本采集

流感感染后第 8 天,分别处死 A 组和 C 组小鼠各 5 只,B 组和 D 组小鼠各 3 只。解剖各组小鼠后取脾,置于无菌培养皿上研磨后进行脾单细胞制备。

1.2.3 流式细胞术(FACS)检测流感特异性 CD8⁺T 细胞

流感病毒感染小鼠后第 8 天,对小鼠解剖后取脾脏,制备脾单细胞。使用 CD4-PB、CD8-FITC、CD44-APC-Cy7 流式抗体和 MHC-I 类四聚体,4 $^{\circ}$ C 染色 45 min,加 150 μ L 染色 buffer,4 $^{\circ}$ C 300 g 5 min 离心,弃上清后使用 200 μ L 染色 buffer 对细胞进行重悬,液体通过滤膜过滤后流式上机。实验数据通过 Flowjo(V10)软件进行分析。

1.2.4 流式细胞术(FACS)检测细胞内因子表达

流感病毒感染小鼠后第 8 天,对小鼠解剖后取脾,制备脾单细胞。加入终浓度均为 2.5 μ g/mL 的流感肽段 NP₃₆₆₋₃₇₄ (ASNNMETM) 和 PA₂₂₄₋₂₃₃ (SSLENFRAYV) 至脾细胞培养液,同时 1:1000 加入高尔基体阻断剂,在恒温细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 放置 5 h,使用 CD4-PB、CD8-FITC、CD44-APC-Cy7、TNF- α -PE-Cy7、IFN- γ -PE、IL-2-BV605、Granzyme B-PB 流式抗体和 BD Cytotfix/Cytoperm Plus 固定破膜试剂,参考各自使用说明书进行细胞内因子染色,结束后 200 μ L 染色 buffer 对细胞进行重悬,液体通过滤膜过滤后流式上机。实验数据通过 Flowjo(V10)软件进行分析。

1.3 统计学分析

本实验所有数据均采用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,通过统计学软件 GraphPad Prism 5.0 进行数据的统计学分析,两组数据统计比较采用非配对 *t* 检验统计分析, $P < 0.05$ 结果为差异具有显著性,有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异极具有显著性。

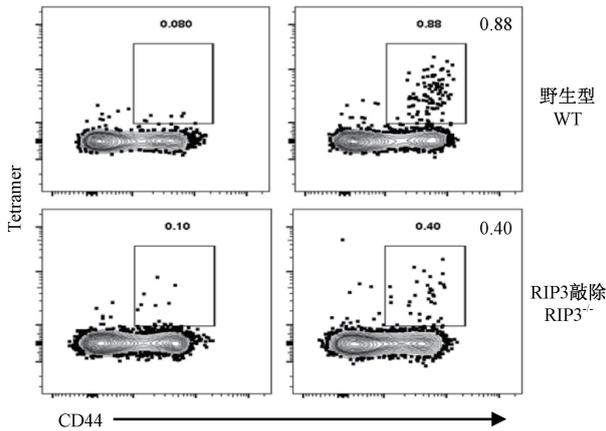
2 结果

2.1 RIP3 对小鼠流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞诱导能力的影响

各组小鼠感染后第 8 天,解剖取脾制备单细胞,从淋巴细胞中圈出 CD8⁺T 细胞群后,分析流感抗原特异性 Tetramer 阳性细胞群(图 1)。在 WT 和 RIP3^{-/-} 感染组小鼠中,流感感染后均能造成流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞的增加。但在 WT 感染组增加更显著[WT 对照组:(0.07 ± 0.03)%,WT 感染组:(0.89 ± 0.52)%, $P < 0.05$];RIP3^{-/-} 组也有显著上调[RIP3^{-/-} 对照组:(0.12 ± 0.06)%,RIP3^{-/-} 感染组:(0.41 ± 0.17)%, $P < 0.05$]。流感感染后,WT 感染组小鼠流感特异性 Tetramer⁺T 细胞比例是对照组的 12.71 倍,RIP3^{-/-} 感染组小鼠是对照组的 3.42 倍。WT 感染组小鼠流感特异性 Tetramer⁺T 细胞比例是 RIP3^{-/-} 感染组的百分比均值差异达到 2.71 倍。以上数据提示,PR8 流感病毒感染小鼠后,RIP3 分子可能参与流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞的生成。

2.2 RIP3 对小鼠 CD8⁺T 细胞分泌内因子能力的影响

各组小鼠感染后第 8 天,解剖取脾制备单细胞,加入流感 NP 和 PA 的 CD8 表位肽段,体外刺激 8 h



注:从脾细胞中圈出 CD8⁺ 阳性细胞群,分析该群细胞中抗原特异性 T 细胞比例。

图 1 攻毒后小鼠流感抗原特异性 CD8⁺ T 细胞比例

Note. CD8 positive cells were gated from spleen cells and the proportion of antigen specific T cells was analyzed.

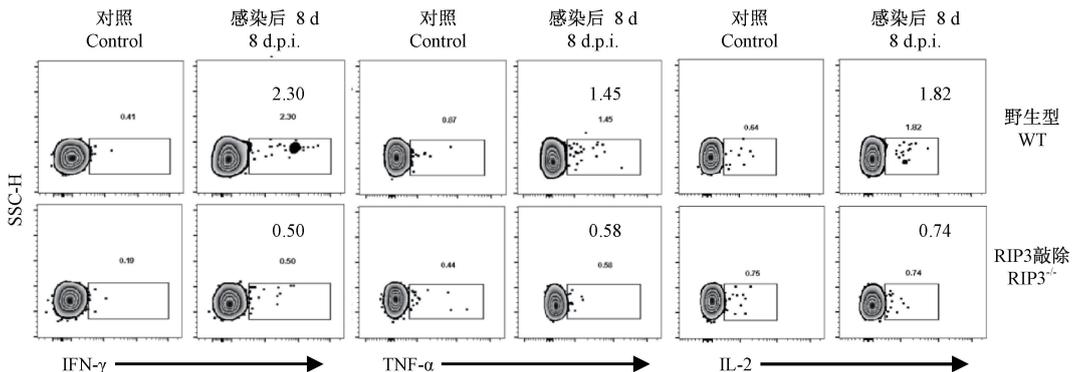
Figure 1 The proportion changes of influenza antigen-specific CD8⁺ T cells in the mice after challenge

后,运用流式细胞术对活化的 CD8⁺ T 细胞 (CD8⁺ CD44^{high}) 亚群设门分析分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 的比例(图 2)。流感抗原特异性 CD8⁺ T 细胞在分泌 IFN- γ 方面,WT 感染组均值 [(3.094 \pm 1.49)%] 显著高于 RIP3^{-/-} 感染组均值 [(0.712 \pm 0.3778)%] ($P < 0.01$); 在分泌 TNF- α 方面,WT 感染组均值 [(1.522 \pm 0.4462)%] 显著高于 RIP3^{-/-} 感染组均值 [(0.686 \pm 0.2939)%] ($P < 0.01$); 在分泌 IL-2 方面,WT 感染组均值 [(1.698 \pm 1.3734)%] 显著高于 RIP3^{-/-} 感染组均值 [(0.71 \pm 0.194)%] ($P < 0.01$)。以上结果提示,RIP3 分子在流感抗原特异

性 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 以及 IL-2 等效应性细胞因子功能的过程中发挥一定的作用,缺失该分子将导致抗原特异性 CD8⁺ T 细胞分泌这些细胞因子的能力降低。

2.3 RIP3 对小鼠 CD8⁺ T 细胞分泌 Granzyme B 能力的影响

当流感病毒感染宿主后,病毒特异性 CD8⁺ T 细胞在发挥免疫功能的过程中除了分泌效应性细胞因子外,还会通过释放 granzyme B 直接杀伤感染流感病毒的肺实质细胞。因此,在加入流感 NP 和 PA 的 CD8⁺ T 细胞表位肽段体外刺激后,研究人员检测了活化的 CD8⁺ T 细胞亚群 (CD8⁺ CD44^{high}) 表达 granzyme B 的情况(图 3)。在 WT 和 RIP3^{-/-} 感染组小鼠中,流感感染后均能显著提高 granzyme B 的分泌。但在 WT 感染组增加更显著 [WT 对照组: (1.597 \pm 1.026)%, WT 感染组: (6.878 \pm 2.076)%, $P < 0.01$]; RIP3^{-/-} 组也有显著上调 [RIP3^{-/-} 对照组: (0.96 \pm 0.451)%, RIP3^{-/-} 感染组: (2.446 \pm 0.584)%, $P < 0.01$]。流感感染后,WT 感染组小鼠是对照组分泌 granzyme B 能力的 4.34 倍,而 RIP3^{-/-} 组则为 2.03 倍,WT 感染组小鼠分泌 granzyme B 的能力显著高于 RIP3^{-/-} 感染组 ($P < 0.01$)。该结果提示 PR8 流感病毒感染小鼠后,RIP3 分子能够显著提高机体分泌 granzyme B 的能力。RIP3 分子对流感抗原特异性 CD8⁺ T 细胞发挥特异性杀伤功能有一定影响,缺失该分子将导致抗原特异性 CD8⁺ T 细胞表达与杀伤功能有关的 granzyme B 水平降低。

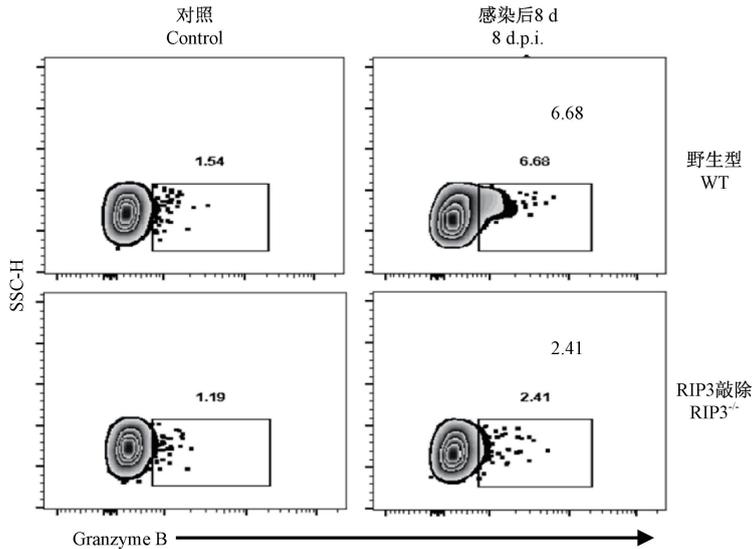


注:从脾细胞中圈出 CD8⁺ CD44^{high} 的细胞群,分析该群细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 的情况,WT 感染组与 RIP3^{-/-} 感染组相比差异极显著, ** $P < 0.01$ 。

图 2 攻毒后小鼠细胞因子分泌情况

Note. CD8⁺ CD44^{high} cell group was gated from spleen cells and the secretion of IFN- γ , TNF- α and IL-2 was analyzed. Significant difference between the groups WT and RIP3^{-/-} mice, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Secretion of cytokines in the mice after challenge



注:从脾细胞中圈出 $CD8^+CD44^{high}$ 的细胞群,分析该群细胞分泌 Granzyme B 的情况,WT 感染组与 $RIP3^{-/-}$ 感染组相比差异极显著, $**P < 0.01$ 。

图 3 攻毒后小鼠 $CD8^+CD44^{High}$ 亚群表达 Granzyme B 的情况

Note. $CD8^+CD44^{high}$ cell group was gated from spleen cells and the secretion of granzyme B was analyzed. Significant difference between the groups WT and $RIP3^{-/-}$ mice, $**P < 0.01$.

Figure 3 Granzyme B expression of $CD8^+CD44^{High}$ subgroup in the mice after challenge

3 讨论

抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞在病毒感染过程中发挥重要作用。研究发现,在感染流感病毒后人体的免疫系统会通过树突状细胞或巨噬细胞来激活流感 NP/PA 等抗原特异性的 $CD8^+$ T 细胞,后者可杀伤感染病毒的呼吸道上皮细胞和肺实质细胞^[9-11],从而清除病毒。在感染流感病毒的小鼠中,NP/PA 特异性的 $CD8^+$ T 细胞也发挥重要功能,可以迁移到气道和肺组织,进一步杀伤流感病毒感染的肺实质细胞以清除病毒,伴随局部病理炎症损伤的发生。

已知 RIP3 是细胞程序性坏死的关键分子。课题组之前的研究发现用 H1N1 PR8 (5.25×10^3 TCID₅₀)感染 6~7 月龄的 $RIP3^{-/-}$ 和野生型 C57BL/6 小鼠后, $RIP3^{-/-}$ 组小鼠生存率显著高于野生型小鼠,并提示可能与 RIP3 介导的体内炎症病理作用有关^[8]。但目前尚无研究表明 RIP3 的敲除可以直接影响流感抗原特异性的 $CD8^+$ T 细胞诱生及功能。

本研究使用流感病毒 H1N1 PR8 (0.7×10^3 TCID₅₀)感染 3 月龄左右的 $RIP3^{-/-}$ 和野生型 C57BL/6 小鼠,结果发现 RIP3 分子对于流感病毒感染后的抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞的诱生,活化的 $CD8^+$ T 细胞分泌效应性细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 能力,以及表达与杀伤功能有关的 granzyme B

水平等方面均有一定影响。

本研究发现,C57BL/6 小鼠在感染流感病毒后,无论是否存在 RIP3 缺陷,NP 抗原特异的 $CD8^+$ T 细胞数量均能显著增加,但在 $RIP3$ 敲除鼠中 NP 抗原特异的 $CD8^+$ T 细胞生成能力较野生型小鼠弱,所诱生的流感抗原特异的 $CD8^+$ T 细胞较少。从流感病毒感染 $RIP3$ 敲除以及野生型的 C57BL/6 小鼠分离脾淋巴细胞,并在体外用 NP/PA 的肽段进一步刺激其中的抗原特异性的 $CD8^+$ T 细胞,发现野生型小鼠感染流感后活化的 $CD8^+$ T 细胞分泌细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 的能力显著高于感染流感的 $RIP3$ 敲除鼠。

IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 这三种细胞因子是抗原特异性的 $CD8^+$ T 细胞发挥免疫效应的重要介质分子,在流感病毒感染过程中起到清除病毒的作用,也与免疫炎症反应有关。流感感染后,IFN- γ 可以通过非杀伤的方式抑制胞内病毒复制^[12],TNF- α 与肺损伤密切相关^[13],IL-2 可以通过调节 T 细胞从而抑制病毒^[14-15]。本研究结果表明 RIP3 可以调控抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞分泌这些细胞因子的能力。

$CD8^+$ T 细胞除了可以通过非杀伤性细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 来帮助流感病毒的清除,也可以通过 granzyme B 来直接杀伤感染流感病毒的肺实质细胞^[16]。本研究发现在 $RIP3$ 敲除的 $CD8^+$ T

细胞上 granzyme B 的表达显著下降。这表明 RIP3 对 CD8⁺T 细胞功能的调节作用不仅限于细胞因子,也能直接影响其杀伤能力。

综上所述,本研究利用小鼠体内感染模型检测了 RIP3 敲除对 CD8⁺T 细胞应答的情况,首次报道了 RIP3 分子参与调节流感抗原特异性 CD8⁺T 细胞的生成,并影响 CD8⁺T 细胞的功能(分泌细胞因子的能力和表达 granzyme B 的水平)。研究结果有利于从新的角度理解流感病毒感染活化 CD8⁺T 细胞过程,但相关的分子机制目前尚待进一步阐明。推测可能是 CD8⁺T 细胞自身的 RIP3 的敲除影响了其诱生及活化过程,也可能是抗原递呈细胞中 RIP3 的缺失导致其无法有效帮助 T 细胞诱生和活化发挥功能,具体的机制值得下一步作深入的探究。此外,RIP3 分子对于抗原特异的记忆性 CD8⁺T 细胞形成以及二次应答功能是否存在影响及可能的机制,也是值得继续深入研究的问题之一。

参 考 文 献(References)

- [1] Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective-emergence of influenza A (H1N1) viruses [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(3): 279-285.
- [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] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 秦波音,王超,任晓楠,等. RIP3 在 H1N1 流感病毒感染中发挥促炎症病理作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(6): 727-733.
- Qin BY, Wa C, Ren XN, et al. Rip3 plays a role in inflammatory responses during H1N1 influenza virus infection [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(6): 727-733.
- [9] Waithman J, Mintern JD. Dendritic cells and influenza A virus infection [J]. *Virulence*, 2012, 3(7): 603-609.
- [10] Jenkins MR, Trapani JA, Doherty PC, et al. Granzyme K expressing cytotoxic T lymphocytes protects against influenza virus in granzyme AB^{-/-} mice [J]. *Viral Immunol*, 2008, 21(3): 341-346.
- [11] Bivas-Benita M, Gillard GO, Bar L, et al. Airway CD8⁺T cells induced by pulmonary DNA immunization mediate protective antiviral immunity [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(1): 156-166.
- [12] Suzue K, Asai T, Takeuchi T, et al. In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(10): 2666-2675.
- [13] Damjanovic D, Divangahi M, Kugathasan K, et al. Negative regulation of lung inflammation and immunopathology by TNF- α during acute influenza infection [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(6): 2963-2976.
- [14] Kariminik A. IL-2 and polyoma BK virus infection: A systematic review article [J]. *Cytokine*, 2016, 88: 276-280.
- [15] Molloy MJ, Zhang W, Usherwood EJ. Cutting edge: IL-2 immune complexes as a therapy for persistent virus infection [J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 4512-4515.
- [16] Johnson BJ, Costelloe EO, Fitzpatrick DR, et al. Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8⁺T cells in influenza virus-infected mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(5): 2657-2662.

[收稿日期] 2019-08-05