

基于体外血脑屏障-人脑类器官共培养模型揭示肠道病毒 A71 型跨越与逆向破坏血脑屏障并诱导中枢炎症反应

刘俊彤[#], 霍威邦[#], 陆柔剑, 邓瑶, 周剑芳, 黄保英, 谭文杰^{*}

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 国家卫生健康委员会生物安全重点实验室, 北京

刘俊彤, 霍威邦, 陆柔剑, 邓瑶, 周剑芳, 黄保英, 谭文杰. 基于体外血脑屏障-人脑类器官共培养模型揭示肠道病毒 A71 型跨越与逆向破坏血脑屏障并诱导中枢炎症反应[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4030-4041.

LIU Juntong, HUO Weibang, LU Roujian, DENG Yao, ZHOU Jianfang, HUANG Baoying, TAN Wenjie. Dissecting the ability of enterovirus A71 to traverse and retrogradely disrupt the blood-brain barrier and induce central nervous system inflammatory responses using an *in vitro* blood-brain barrier-human cerebral organoid co-culture model[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 4030-4041.

摘要:【目的】探究肠道病毒 A71 型(enterovirus A71, EV-A71)突破血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)感染人脑类器官的能力, 以及 EV-A71 经神经途径逆行侵入中枢神经系统后对 BBB 完整性的影响, 明确 EV-A71 在 BBB 及人脑类器官中的感染特征及其诱导的炎症反应。【方法】将人脑微血管内皮细胞、脑血管周细胞及星形胶质细胞接种于 Transwell 体系, 构建体外 BBB 模型; 使用人诱导多能干细胞诱导分化形成人脑类器官, 建立 BBB-人脑类器官共培养模型。以 10^2 、 10^4 、 10^6 TCID₅₀ 3 种滴度 EV-A71 分别感染 BBB 各主要组成细胞, 明确病毒在不同细胞类型中的复制动力学及细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。随后以 10^4 TCID₅₀ EV-A71 通过 2 种方式感染 BBB-人脑类器官共培养模型: (1)顶端接种法, 直接感染人脑微血管内皮细胞侧; (2)反向感染法, 先感染人脑类器官, 再与 BBB 共培养。采用实时荧光定量逆转录 PCR (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)检测细胞培养上清及细胞内病毒核酸拷贝数, 检测跨内皮电阻以评估 BBB 完整性, 并以 RT-qPCR 检测人脑类器官中炎症因子的表达水平以评价炎症反应。【结果】EV-A71 可在人脑微血管内皮细胞、脑血管周细胞及星形胶质细胞中复制并诱导明显 CPE。其中星形胶质细胞对 EV-A71 最为敏感, 病变进程最快; 脑血管周细胞次之; 人脑微血管内皮细胞相对不易感, 需较高病毒滴度方可建立有效感染。顶端接种法结果显示, EV-A71 可在

资助项目: 国家自然科学基金-国际(地区)合作与交流项目(82061138008)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China-International (Regional) Cooperation and Exchange Project (82061138008).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: tanwj@ivdc.chinacdc.cn

Received: 2026-02-26; Accepted: 2026-03-31; Published online: 2026-04-10

BBB 中复制, 破坏 BBB 完整性, 穿越屏障感染人脑类器官并显著激活炎症反应。反向感染法结果显示, EV-A71 可在人脑类器官中复制, 靶向感染神经元与星形胶质细胞, 激活细胞炎症反应, 并可进一步逆向侵袭 BBB, 导致其结构完整性受损。【结论】EV-A71 可穿越血脑屏障感染人脑类器官并激活炎症反应, 也可先感染人脑类器官后逆向破坏血脑屏障结构。本研究系统阐明了 EV-A71 对体外 BBB 及人脑类器官的感染特征, 为深入解析 EV-A71 入侵中枢神经系统的感染及致病机制提供了有效的研究模型, 并为后续致病机制的探索及抗病毒药物研发奠定了研究基础。

关键词: 肠道病毒 A71 型; 血脑屏障; 人脑类器官; 共培养模型; 炎症反应

Dissecting the ability of enterovirus A71 to traverse and retrogradely disrupt the blood-brain barrier and induce central nervous system inflammatory responses using an *in vitro* blood-brain barrier-human cerebral organoid co-culture model

LIU Juntong[#], HUO Weibang[#], LU Roujian, DENG Yao, ZHOU Jianfang, HUANG Baoying, TAN Wenjie^{*}

National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

Abstract: [Objective] To investigate the ability of enterovirus A71 (EV-A71) to traverse the blood-brain barrier (BBB) and infect human cerebral organoids, as well as the impact of EV-A71 on BBB integrity following retrograde invasion into the central nervous system *via* neural routes, and to characterize the infection profiles of EV-A71 in the BBB and human cerebral organoids and the associated inflammatory responses. **[Methods]** An *in vitro* BBB model was established by seeding human brain microvascular endothelial cells, brain vascular pericytes, and astrocytes into a Transwell system. Human cerebral organoids were generated from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), and a BBB-human cerebral organoid co-culture model was subsequently established. EV-A71 at three titers (10^2 , 10^4 , and 10^6 TCID₅₀) was used to infect each cell type of the BBB to evaluate viral replication kinetics and cytopathic effects (CPE) across different cell types. Subsequently, the BBB-human cerebral organoid co-culture model was infected with 10^4 TCID₅₀ EV-A71 using two distinct routes: (1) an apical inoculation strategy, in which EV-A71 was directly applied to the human brain microvascular endothelial cell layer; and (2) a retrograde infection strategy, in which human cerebral organoids were first infected and subsequently co-cultured with the BBB model. Viral RNA copy numbers in culture supernatants and cells were quantified by RT-qPCR. BBB integrity was assessed by measuring transendothelial electrical resistance, and inflammatory responses were evaluated by determining the expression levels of inflammatory cytokines in human cerebral organoids using RT-qPCR. **[Results]** EV-A71 efficiently replicated in human brain microvascular endothelial cells, brain vascular pericytes, and astrocytes,

inducing pronounced CPE. Among these cell types, astrocytes were the most susceptible to EV-A71 infection, showing the most rapid progression of cytopathic changes, followed by brain vascular pericytes. Human brain microvascular endothelial cells were relatively less susceptible, requiring higher viral titers to establish effective infection. Under apical inoculation conditions, EV-A71 replicated within the BBB, compromised BBB integrity, traversed the barrier to infect human cerebral organoids, and significantly activated inflammatory responses. In the retrograde infection model, EV-A71 replicated within human cerebral organoids, preferentially targeted neurons and astrocytes, triggered cellular inflammatory responses, and subsequently invaded the BBB in a retrograde manner, resulting in compromised structural integrity of the BBB. **[Conclusion]** EV-A71 can traverse the BBB to infect human cerebral organoids and activate inflammatory responses, and can also infect human cerebral organoids first and subsequently disrupt BBB integrity in a retrograde manner. This study systematically characterizes the infection dynamics of EV-A71 in an *in vitro* BBB-human cerebral organoid model, provides a robust experimental model for in-depth analysis of the mechanisms underlying EV-A71 invasion of the central nervous system, and lays a research foundation for future investigations into viral pathogenesis and antiviral therapeutic development.

Keywords: enterovirus A71; blood-brain barrier; human cerebral organoids; co-culture model; inflammatory response

肠道病毒(enteroviruses, EVs)是人类常见的感染病毒之一,属于肠道病毒属(Enterovirus),小 RNA 病毒科(Picornaviridae),具有多种血清型^[1]。肠道病毒 A71 型(enterovirus A71, EV-A71)是引起手足口病的主要病原体之一,在婴幼儿中最为常见,其感染可导致严重的神经系统并发症,包括脑炎、脑膜炎、脊髓灰质炎样综合征、脑脊髓炎等,严重者可伴有长期后遗症甚至危及生命^[2-4]。尽管 EV-A71 相关的中枢神经系统(central nervous system, CNS)并发症比例在不同队列研究中有所差异,但已有研究显示约 20% 的儿童感染者会出现 CNS 并发症,这一比例明显高于其他常见手足口病病原体^[5]。然而,目前 EV-A71 入侵中枢神经系统的途径及不同感染途径所引发的血脑屏障与中枢神经系统病变的分子机制尚不完全清晰^[6-7]。

近年来,多项研究表明 EV-A71 可通过多种途径侵入 CNS。动物模型显示, EV-A71 可感染树鼯鼠脑微血管内皮细胞及星形胶质细胞,导致血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性增

加^[8]。体外研究采用人脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞 Transwell 共培养 BBB 模型证实, EV-A71 可利用小型细胞外囊泡或微囊泡经转胞吞作用或内吞途径穿越 BBB,进而诱发脑损伤^[9-10]。此外,研究还发现 EV-A71 可利用周围神经的逆行轴突运输至 CNS^[11-12]。以上研究表明 EV-A71 具有入侵中枢神经系统的能力。血脑屏障是由脑微血管内皮细胞、基底膜、周细胞以及星形胶质细胞组成的高度选择性屏障,对于维持 CNS 稳态及防御外源性病原体具有关键作用^[13]。然而,目前的研究主要采用单一的细胞模型或动物模型,这 2 种实验模型均存在一定的局限性。二维细胞培养缺乏组织结构、细胞间相互作用和细胞类型的复杂性^[14-15]。此外,实验动物与人类的神经结构和功能存在显著差异,难以模拟人源 BBB 及 CNS 的生理和病理特征,因而限制了其在解析 EV-A71 侵袭过程中 BBB 与 CNS 复杂相互作用机制方面的应用价值^[16]。

人脑类器官是由人诱导多能干细胞(human

induced pluripotent stem cells, hiPSCs)经体外模拟胚胎发育过程诱导分化形成的三维神经球体结构。相较于传统二维细胞培养模型及动物模型,人脑类器官因其包含多样化的神经细胞类型、具有层级化的组织结构和特定的发育时序特征,能够更为真实地模拟人脑的发育过程及功能特点^[17]。在病毒学研究领域,人脑类器官有效克服了物种特异性限制,可准确反映人源细胞对特定病毒的易感性,为研究病毒的细胞嗜性及其感染所必需的受体分子提供了理想模型^[18-19]。因此,本研究在体外构建由人脑微血管内皮细胞、星形胶质细胞及脑血管周细胞组成的 BBB-人脑类器官共培养模型,系统探究 EV-A71 直接感染 BBB 后病毒在 BBB 及人脑类器官中的感染特性;同时模拟 EV-A71 经外周神经途径逆行侵入中枢神经系统后,对人脑类器官的感染特征、炎症反应诱导及 BBB 完整性的影响。本研究旨在为 EV-A71 致病机制的深入探索及抗病毒干预策略的开发提供良好的研究模型。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

本研究所用细胞均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心保存。hiPSCs 购自柏寿生物科技有限公司;人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, hBMECs)与人星形胶质瘤细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC);人脑血管周细胞(human brain vascular pericytes, HBVPs)购自 iXCells Biotechnologies 公司。EV-A71/FY0805 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所周剑芳研究员惠赠,本科室保存^[20]。

1.2 hiPSCs 细胞培养

将 hiPSCs 接种于经 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Vitronectin XFTM (STEMCELL Technologies 公司)包被的 6 孔板中,使用 mTeSRTM Plus 培养基 (STEMCELL Technologies 公司) 37 $^{\circ}\text{C}$ 维持培养。每日更新新

鲜培养基,每 4–5 d 采用温和细胞解离试剂 (STEMCELL Technologies 公司) 处理后进行传代。

1.3 人脑类器官的构建

参照 Lancaster 等^[17] 及 STEMCELL Technologies 公司建立的方法进行 hiPSCs 向脑类器官的分化诱导。首先,采用温和细胞解离试剂将 hiPSCs 消化为单细胞悬液,以每孔 9 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μL 添加 Supplement A 的 STEMdiff 脑类器官基础培养基及 20 $\mu\text{mol/L}$ ROCK 抑制剂。培养第 2 天和第 4 天各补充 100 μL 添加 Supplement A 的 STEMdiff 脑类器官基础培养基 (STEMCELL Technologies 公司);第 5 天更换为添加 Supplement B 的 STEMdiff 脑类器官基础培养基;第 7 天将类胚体包埋于 Matrigel 基质胶 (Corning 公司)中,加入添加 Supplement C 和 D 的 STEMdiff 脑类器官基础培养基继续培养 3 d;第 10 天更换为添加 Supplement E 的 STEMdiff 脑类器官成熟培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、75 r/min 培养,每 3–4 d 更换培养基 1 次。

1.4 BBB 与人脑类器官模型的构建

本研究参照 Malik 等^[21]和 Stone 等^[22]建立的方案构建血脑屏障模型,于特定时间点分别接种不同类型细胞。Transwell 培养第 10 天时,将人脑类器官与 Transwell 体系进行共培养,建立 BBB-人脑类器官共培养模型。

1.5 EV-A71 感染 BBB 主要组成细胞及 BBB-人脑类器官共培养模型

将 hBMECs、HBVPs 及星形胶质细胞接种于 12 孔板中,待细胞培养至 90% 的汇合度后,将病毒以 10^2 、 10^4 、 10^6 TCID₅₀ 3 种滴度分别接种至单层细胞中,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 2 h, PBS 清洗 1 次,加入 1 mL 新鲜培养基,每日收取细胞上清液并记录细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) (判定标准:细胞皱缩、变圆、脱落)。

1.6 实时荧光定量逆转录 PCR

对各实验组及时间点分别进行 RNA 提取与实时荧光定量逆转录 PCR (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) 分析。人脑类器官细胞内总 RNA 采用 TRIZOL 法提取。以 500 ng–1 μ g 总 RNA 为模板, 使用 SuperScript III 逆转录酶及引物进行 cDNA 合成。采用 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa 公司) 检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 及单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的相对表达水平, 操作严格按试剂说明书进行。以 β -actin 为内参基因计算 ΔC_t 值, 以未处理组为校准样本计算 $\Delta\Delta C_t$ 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达倍数。

细胞培养上清中病毒核酸采用全自动核酸提取仪 (西安天隆科技有限公司) 进行提取。实验体系中, hBMECs 位于 Transwell 上室, 星形胶质细胞与 HBVPs 位于基底侧 (背侧), 脑类器官悬浮培养于 Transwell 外室与 12 孔板之间。分别刮取各部位细胞后, 使用 TRIzol 法提取总 RNA; 按照一步法 Primescript RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书配制反应体系并设置反应程序。每个样本设置 3 个复孔, 通过标准曲线 $\lg \text{copies}/\mu\text{L} = -0.2977C_t + 9.7401$ 计算病毒核酸拷贝数, 每组实验重复 3 次。

1.7 免疫荧光染色

将病毒感染后的人脑类器官置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 室温静置 24 h。经石蜡包埋后制备厚度为 5 μ m 的切片, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 1 h, 依次经二甲苯 I、II、III、IV 各脱蜡 5 min, 无水乙醇 I、II 各水化 2 min, 70% 乙醇水化 2 min, 双蒸水浸泡 5 min。将切片置于 pH 6.0 或 9.0 的抗原修复液中, 90 $^{\circ}\text{C}$ 以上修复 10 min, 自然冷

却至室温。杜氏磷酸缓冲盐溶液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) 洗涤 1 次后, 0.2% Triton X-100 透化处理 10 min, 5% 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 封闭 1 h, 加入以 1% BSA 稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。一抗包括: 抗 MAP2 (Abcam 公司)、抗 S100B (Abcam 公司) 及抗 Enterovirus Pan Monoclonal (Invitrogen 公司)。次日 DPBS 洗涤 5 次, 每次 5 min, 加入以 1% BSA 稀释的荧光二抗及 DAPI, 室温避光孵育 1 h。二抗包括: 驴抗大鼠 Alexa Fluor 488 (Invitrogen 公司)、驴抗兔 Alexa Fluor 555 (Invitrogen 公司)、DAPI (Invitrogen 公司)。DPBS 洗涤 5 次, 每次 5 min, 滴加 50 μ L 抗荧光淬灭封片剂封片, 采用激光共聚焦显微镜 (Leica 公司) 采集图像。

1.8 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 并标注各测量值的散点分布。两组间比较采用独立样本 t 检验 (unpaired t -test), 3 组及以上比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有统计分析及作图均采用 GraphPad Prism 9.5 软件完成。

2 结果与分析

2.1 EV-A71 可在 BBB 的组成细胞中复制并诱发显著的 CPE

为探究 EV-A71 对 BBB 的感染及侵袭能力, 本研究采用不同滴度 EV-A71 分别感染 BBB 的主要组成细胞——hBMECs、HBVPs 及星形胶质细胞, 并系统评估其复制动力学与 CPE。以 10^4 TCID₅₀ 和 10^6 TCID₅₀ 滴度感染 hBMECs 后, 病毒均能有效复制 (图 1A)。光镜观察显示, 10^4 TCID₅₀ 组于感染后第 3 天出现明显 CPE, 第 5–6 天细胞完全病变 (图 1B); 10^6 TCID₅₀ 组感染后第 1 天即观察到明显 CPE, 第 3 天细胞完全病变 (图 1B)。 10^2 TCID₅₀ 滴度感染组未检测到病毒复制, 且无明显 CPE。以 10^2 TCID₅₀ 和

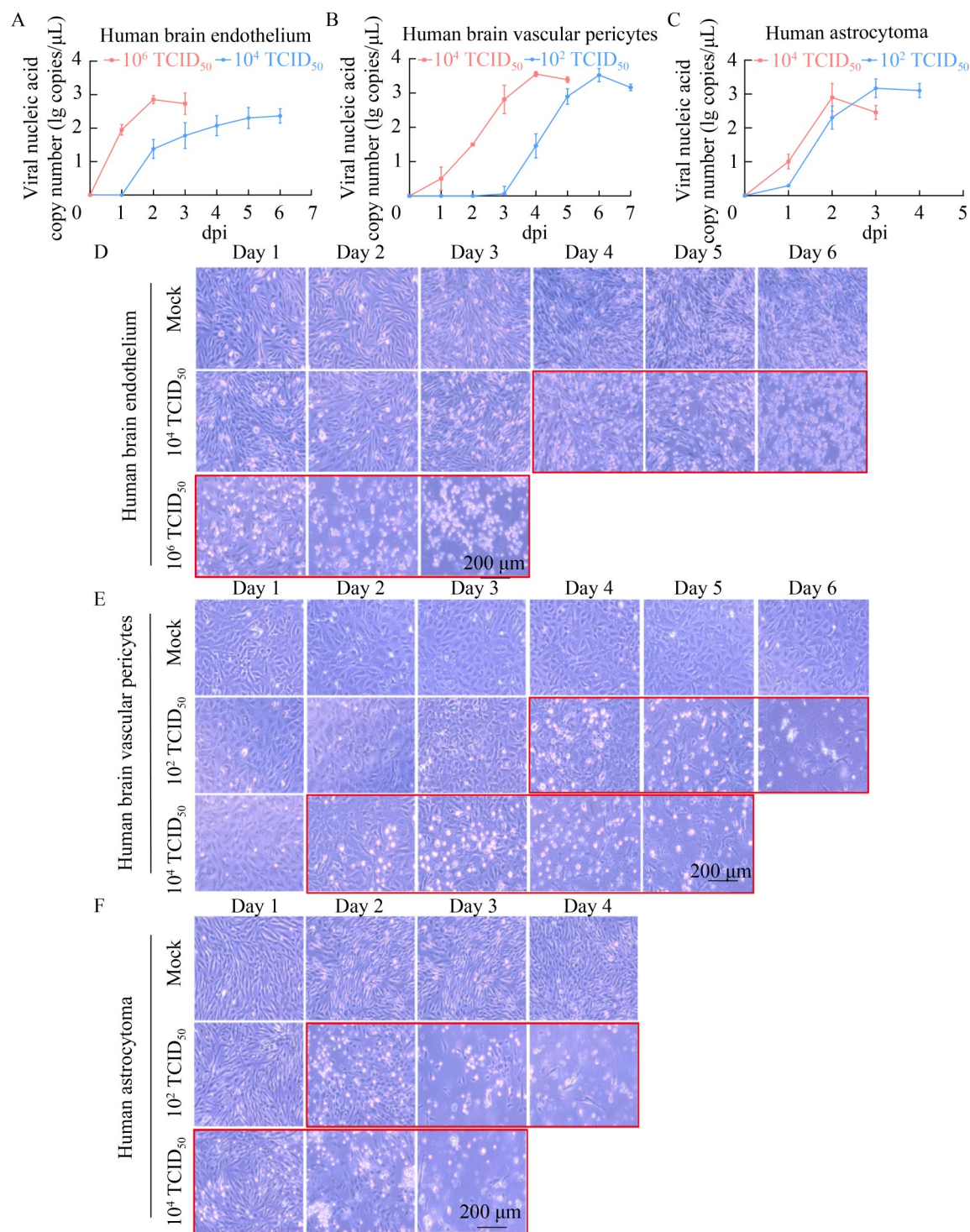


图1 EV-A71在BBB的主要组成细胞中的复制动力学及细胞病变效应

Figure 1 Replication kinetics and cytopathic effects of EV-A71 in the main cellular components of the BBB. A: Viral RNA copy numbers in culture supernatants of hBMECs infected with EV-A71 at titers of 10^4 and 10^6 TCID₅₀; B: Viral RNA copy numbers in culture supernatants of HBVPs infected with EV-A71 at titers of 10^2 and 10^4 TCID₅₀; C: Viral RNA copy numbers in culture supernatants of astrocytes infected with EV-A71 at titers of 10^2 and 10^4 TCID₅₀; D–F: CPE were observed and recorded every 24 h under an optical microscope.

10^4 TCID₅₀ 滴度感染 HBVPs 后病毒均能有效复制(图 1C)。光镜观察显示, 10^2 TCID₅₀ 组于感染后第 4 天出现明显 CPE, 第 6–7 天细胞完全病变(图 1E); 10^4 TCID₅₀ 组感染后第 2 天出现明显 CPE, 第 4–5 天细胞完全病变(图 1E)。以 10^2 TCID₅₀ 和 10^4 TCID₅₀ 滴度感染星形胶质细胞后病毒均能有效复制(图 1C)。光镜观察显示, 10^2 TCID₅₀ 组于感染后第 2 天出现明显 CPE, 第 3–4 天细胞完全病变(图 1F); 10^4 TCID₅₀ 组感染后第 1 天即出现明显 CPE, 第 2–3 天细胞完全病变(图 1F)。综上所述, EV-A71 可在 BBB 3 种主要细胞类型中复制并诱导显著 CPE。3 种细胞的易感性存在差异: 星形胶质细胞对 EV-A71 最为敏感, 细胞病变进程最快; HBVPs 次之; hBMECs 相对不易感, 需较高病毒载量方可建立有效感染。

2.2 EV-A71 破坏 BBB 完整性感染人脑类器官

为深入探究 EV-A71 对 BBB 及人脑类器官的感染特性, 采用滴度为 10^4 TCID₅₀ 的 EV-A71 对 BBB-人脑类器官共培养模型进行感染实验。实验设置 2 种感染模式: (1) 顶端接种法, EV-A71 直接感染 hBMECs 侧; (2) 反向感染法, 先将 EV-A71 感染人脑类器官, 再与 BBB 进行共培养(图 2A)。实验结果显示, 在顶端接种模式下, hBMECs 上层培养上清中病毒核酸拷贝数呈时间依赖性递增; 感染后第 4 天在下层培养上清中首次检出病毒核酸, 并随时间推移持续升高(图 2B)。在反向感染模式下, 下层培养上清中病毒核酸拷贝数同样呈时间依赖性增长; 感染后第 3 天在上层培养上清中检测到病毒核酸, 随后拷贝数持续上升(图 2B)。跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)检测表明, 2 种感染模式均导致 BBB 电阻值显著下降(图 2C), 提示 EV-A71 感染导致屏障功能受损。此外, 2 种感染模式下 hBMECs、HBVPs、星形胶质细胞及人脑类器官中均检测到较高水

平的病毒核酸(图 2D–2F)。上述结果表明, EV-A71 可在 BBB 及人脑类器官中高效复制; 该病毒既能突破 BBB 感染人脑类器官, 也可先感染人脑类器官后逆向侵袭 BBB, 最终导致 BBB 结构完整性受损。

2.3 EV-A71 感染人脑类器官的神经元与星形胶质细胞

为进一步明确 EV-A71 感染人脑类器官的靶细胞类型, 本研究采用免疫荧光染色法对病毒结构蛋白 VP3 与细胞特异性标志物进行共定位分析。结果显示, VP3 蛋白与神经元标志物微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2) (图 3A)及星形胶质细胞标志物 S100 钙结合蛋白 B (S100 calcium-binding protein B, S100B) (图 3B)均存在明显共定位, 表明 EV-A71 可靶向感染人脑类器官中的神经元与星形胶质细胞。

2.4 EV-A71 感染激活人脑类器官炎症反应

为进一步探究 EV-A71 感染对人脑类器官炎症反应的影响, 本研究采用 RT-qPCR 技术检测 2 种感染模式下关键炎症因子 mRNA 的表达水平。结果显示, 相较于对照组, 2 种感染方式下人脑类器官中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-12 及 MCP-1 的 mRNA 表达水平均显著上调(图 4)。上述结果表明, EV-A71 感染可显著激活人脑类器官的炎症反应。

3 讨论与结论

本研究基于体外构建的人 BBB-人脑类器官共培养模型解析了 EV-A71 在 BBB 各组成细胞及人脑类器官中的感染特征、复制动力学及其对 BBB 完整性与炎症反应的影响。结果表明, EV-A71 不仅能够直接感染并破坏 BBB、跨越屏障感染人脑类器官并激活炎症反应, 还可在先感染人脑类器官后有效复制并激活炎症反应, 进而逆向侵袭 BBB 并导致其完整性受损。

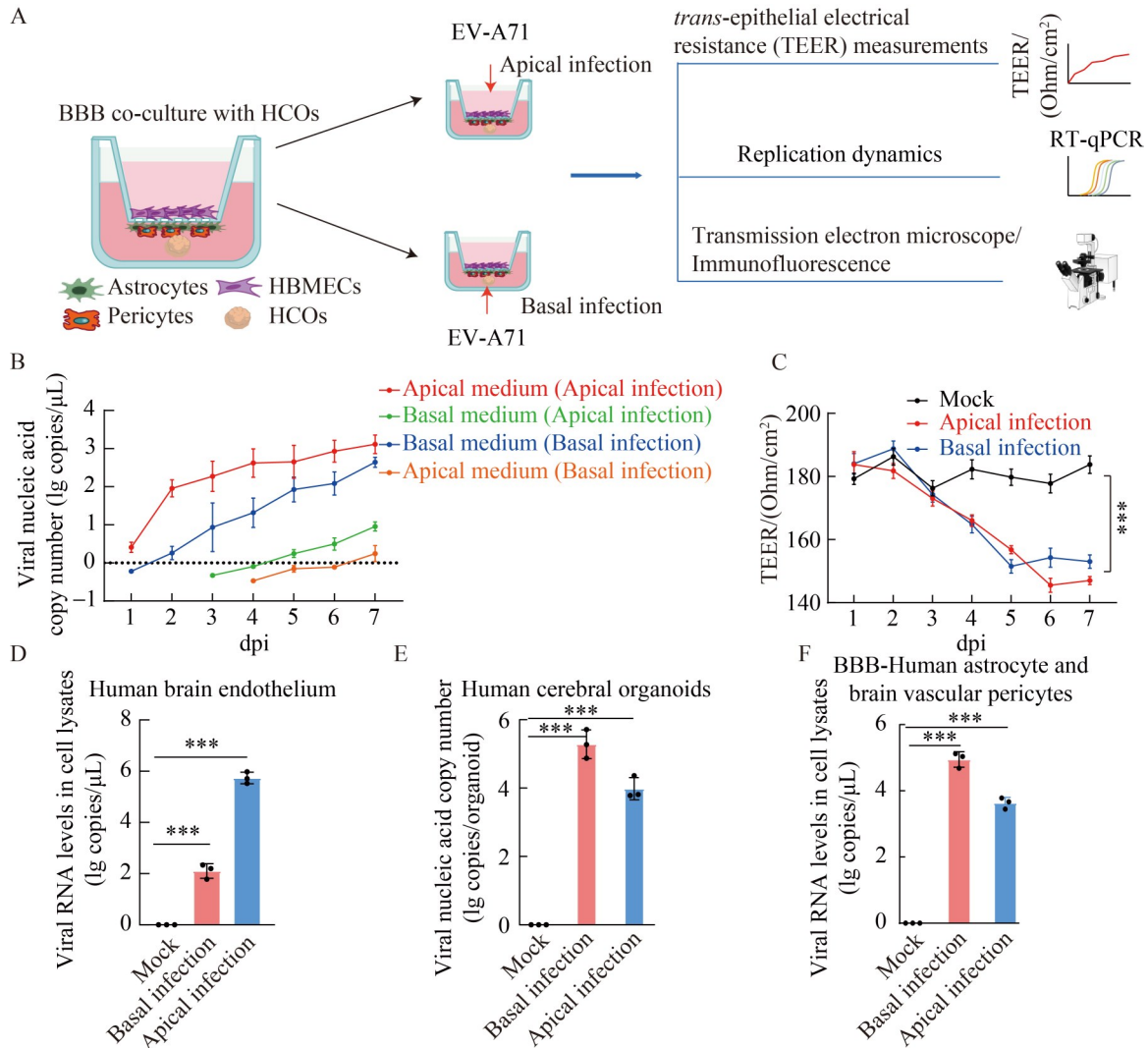


图2 EV-A71感染人脑类器官并破坏血脑屏障完整性

Figure 2 EV-A71 infects human cerebral organoids and disrupts BBB integrity. A: Schematic illustration of the EV-A71 infection procedure in the BBB-human cerebral organoid co-culture model; B: Viral RNA copy numbers in the apical and basolateral culture supernatants after EV-A71 infection of the co-culture model; C: TEER of the co-culture model after EV-A71 infection; D: Viral RNA copy numbers in human brain microvascular endothelial cells in the BBB model; E: Viral RNA copy numbers in brain pericytes and astrocytes in the BBB model; F: Viral RNA copy numbers in human cerebral organoids. ***: $P < 0.001$.

BBB 由脑微血管内皮细胞、基底膜、周细胞及星形胶质细胞组成。为探索 EV-A71 对 BBB 的感染特征, 本研究使用不同滴度的 EV-A71 分别感染人脑微血管内皮细胞、脑血管周细胞及星形胶质细胞。结果显示, EV-A71 在 3 种细胞中均可复制并诱导明显的 CPE, 其中星

形胶质细胞最为敏感, CPE 出现最快; 脑血管周细胞次之; 脑微血管内皮细胞则需较高的感染滴度方可建立有效感染。此外, 本研究还发现人脑类器官中的星形胶质细胞也可被 EV-A71 靶向感染。星形胶质细胞是大脑中数量最多的胶质细胞, 其足突与脑血管外层基底膜紧密接

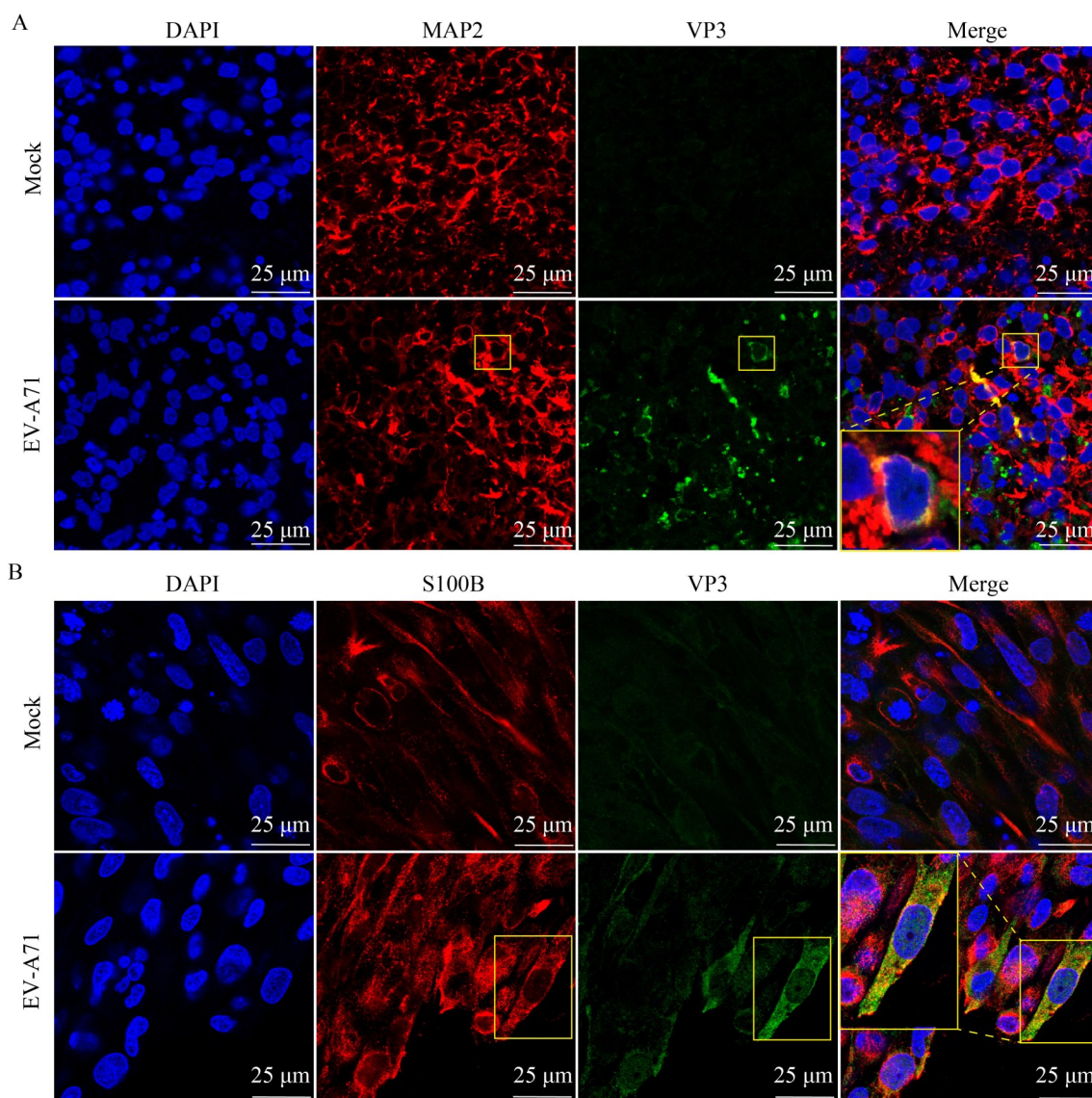


图3 EV-A71感染人脑类器官中神经元(A)与星形胶质细胞(B)

Figure 3 EV-A71 infection of neurons (A) and astrocytes (B) in human cerebral organoids.

触，是维持 BBB 结构与功能的重要组成部分^[23]。在病毒感染过程中，星形胶质细胞在神经炎症期间发挥多重作用，也可能促进病毒的复制与扩散^[24]。树鼯鼠及体外细胞模型的研究结果同样表明，EV-A71 能够感染星形胶质细胞并影响血脑屏障的结构与功能^[8,25]。上述结果进一步证实了星形胶质细胞对 EV-A71 的高易感性，提示其可能是 EV-A71 感染后破坏 BBB 微环境及诱发神经炎症的关键靶细胞。

在顶端感染模型中，本研究发现 EV-A71 可在 BBB 中复制，伴随 TEER 值降低，下层人脑类器官被感染，表明 EV-A71 可直接感染 BBB、破坏其完整性并进一步感染中枢神经系统。这与已有研究结果一致，即 EV-A71 感染脑微血管内皮细胞可降低细胞紧密连接蛋白的表达^[8-10]。本研究结果进一步支持了 EV-A71 通过“直接跨越 BBB”途径侵入 CNS 的假说。除经典的“血源性入脑”途径外，本研究还模拟了 EV-A71 经神

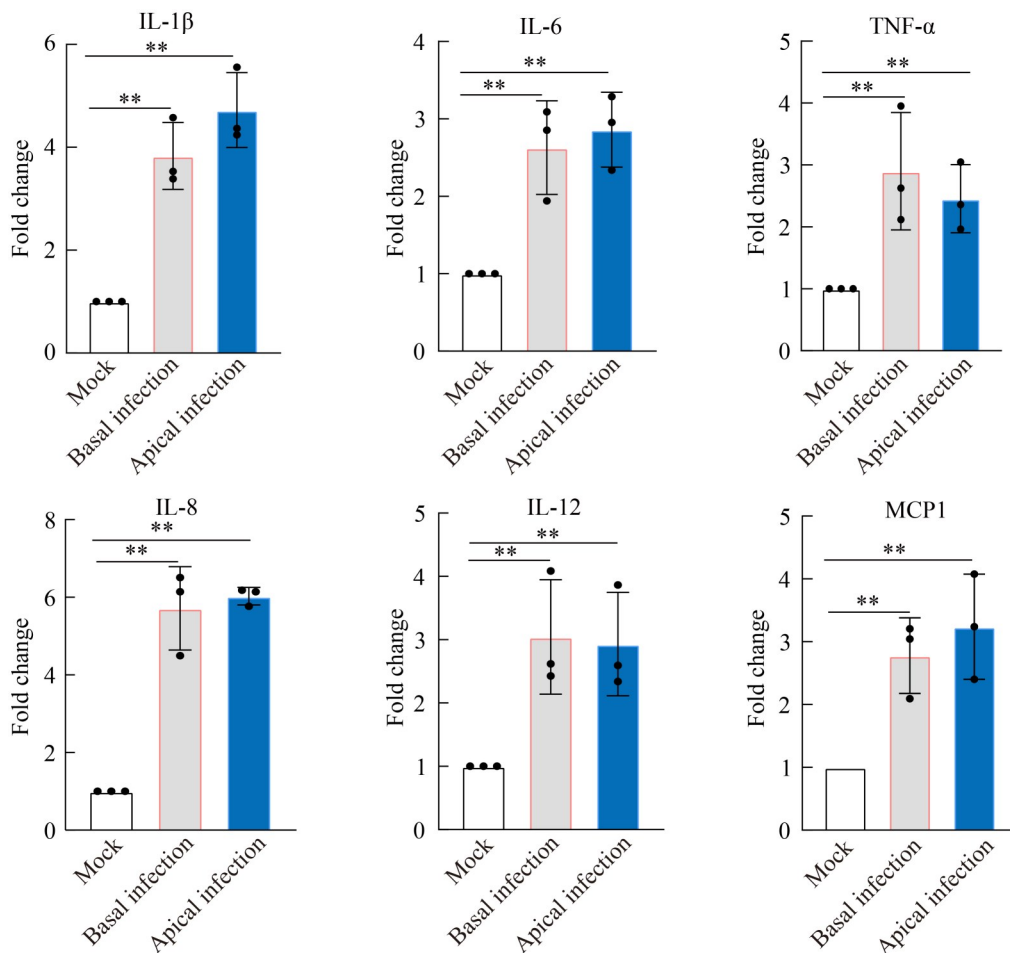


图4 EV-A71感染人脑类器官诱导炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-12及MCP-1的mRNA表达水平升高

Figure 4 EV-A71 infection of human cerebral organoids induces increased mRNA expression levels of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, IL-12, and MCP-1. **: $P < 0.01$.

经途径逆行入侵脑组织的感染方式,即先感染人脑类器官,再与BBB模型进行共培养。结果显示, EV-A71可在人脑类器官中高效复制,并优先靶向神经元与星形胶质细胞。以往关于EV-A71神经病变机制的研究主要依赖实验动物模型,尤其是新生小鼠和表达人源受体的转基因小鼠^[26-27]。这些模型研究表明, EV-A71具有较强的神经趋向性,能够侵入中枢神经系统并导致脑干和脊髓的神经元损伤,本研究中EV-A71的神经嗜性结果与上述发现一致^[28-29]。此外,已有研究表明EV-A71可沿外周神经轴突逆行运

输至脊髓和脑干^[30-31],从而引发瘫痪和脑炎等神经系统并发症,但其入脑后能否反向作用于BBB并加重屏障损伤尚不明确。本研究表明, EV-A71感染人脑类器官后可进一步损伤BBB,为该过程的机制研究提供了新的理论依据。与传统动物模型相比,这种基于人源细胞的实验体系能够直接研究EV-A71与人血脑屏障及中枢神经系统之间的相互作用,减少病毒感染过程中宿主物种差异带来的偏倚,并揭示感染过程中血脑屏障与中枢神经系统的双向交互作用。

EV-A71感染中枢神经系统后诱导释放的炎

症因子及趋化因子可直接或间接影响疾病的严重程度^[32]。本研究结果显示, EV-A71 感染人脑类器官后可显著上调 IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-12 和 MCP-1 等多种炎症因子 mRNA 的表达水平。临床病例报道也显示, EV-A71 感染患儿脑脊液中 IL-6、IL-8 等促炎因子的平均浓度显著升高, 且与神经系统损伤程度密切相关^[33]。研究表明, IL-6、TNF- α 等炎症因子联合引发的炎症应激可导致体外 BBB 模型的紧密连接蛋白表达降低、BBB 通透性增加^[34]。结合本研究结果, 提示炎症因子可能是介导逆向屏障破坏的重要分子基础。

本研究仍存在一定的局限性。首先, 在研究模型方面, 体外 BBB 模型缺乏血流剪切力、免疫细胞参与及基底膜复杂成分等因素, 无法完全再现体内微血管微环境; 人脑类器官在成熟度和区域特异性方面与真实人脑仍存在差异。其次, 目前研究仅限于 EV-A71 对 BBB 及人脑类器官感染特征的描述, 缺乏对 BBB 功能损伤的深入验证及具体分子机制的探讨。后续研究可通过以下策略进一步验证炎症因子在屏障功能损伤中的关键作用: (1) 单独或联合外源性补充特定炎症因子, 模拟炎症微环境; (2) 在病毒感染背景下, 应用炎症因子受体拮抗剂进行干预, 明确炎症在 BBB 屏障功能受损中的具体作用。此外, 还可在该模型基础上引入免疫细胞, 深入探索 BBB 的结构与功能改变及相关分子机制。

综上所述, 本研究通过 BBB-人脑类器官共培养体系系统证明了 EV-A71 既可通过直接破坏 BBB 实现跨屏障入侵中枢神经系统, 也可在感染脑组织后逆向损伤 BBB 并诱导显著的神经炎症反应, 为后续深入解析关键分子通路及开发靶向干预策略提供了重要的实验基础。

作者贡献声明

刘俊彤: 方案设计、实验操作、数据整理与分析、初稿写作; 霍威邦: 方案设计、实验操作、数据

整理与分析、初稿修改; 陆柔剑: 提供材料、实验操作; 邓瑶: 提供材料、实验操作; 周剑芳: 提供材料、实验操作; 黄保英: 提供材料、实验操作、初稿修改; 谭文杰: 方案设计、项目管理、提供资源与经费资助、监督指导、文稿审查修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Noor A, Krilov LR. Enterovirus infections[J]. *Pediatrics in Review*, 2016, 37(12): 505-515.
- [2] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardosa MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(11): 778-790.
- [3] Huang HI, Weng KF, Shih SR. Viral and host factors that contribute to pathogenicity of enterovirus 71[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(4): 467-479.
- [4] Lee KY. Enterovirus 71 infection and neurological complications[J]. *Korean Journal of Pediatrics*, 2016, 59(10): 395.
- [5] Chang LY, Lin HY, Gau SS, Lu CY, Hsia SH, Huang YC, Huang LM, Lin TY. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2019, 26: 57.
- [6] Huang HI, Shih SR. Neurotropic enterovirus infections in the central nervous system[J]. *Viruses*, 2015, 7(11): 6051-6066.
- [7] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(12): 9969-9975.
- [8] Wang WG, Wang X, Li N, Kuang DX, Tong PF, Lu CX, Han YY, Sun XM, Dai JJ, Liu LD. EV-A71 invades the central nervous system and affects the blood-brain barrier in a tree shrew model[J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 16: 1583768.
- [9] Tian XY, Liu BX, Li LR, Yuan M, You Q, Zhang R, Chen DY, Cheng M, Zheng N, He M, Wu ZW. Microvesicles carrying EV71 virions cross BBB through endocytic pathway to induce brain injury[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2025, 23: 183.
- [10] Gu JQ, Zhao YX, Wu J, Chen YW, Yin YQ, Jia XN, Mao LX. Enterovirus-71 utilizes small extracellular vesicles to cross the blood-brain barrier for infecting the central nervous system via transcytosis[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95: jmv.28120.
- [11] Dang MH, Wang XX, Wang Q, Wang YX, Lin JP, Sun YN, Li XM, Zhang LG, Lou ZY, Wang JZ, Rao ZH. Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71[J]. *Protein & Cell*, 2014, 5(9): 692-703.

- [12] Huang SW, Huang YH, Tsai HP, Kuo PH, Wang SM, Liu CC, Wang JR. A selective bottleneck shapes the evolutionary mutant spectra of enterovirus A71 during viral dissemination in humans[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(23): e01062-17.
- [13] Alahmari A. Blood-brain barrier overview: structural and functional correlation[J]. *Neural Plasticity*, 2021, 2021: 6564585.
- [14] Paşca SP. The rise of three-dimensional human brain cultures[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 437-445.
- [15] Jacob F, Pather SR, Huang WK, Zhang F, Wong SZH, Zhou HW, Cubitt B, Fan WQ, Chen CZ, Xu M, Pradhan M, Zhang DY, Zheng W, Bang AG, Song HJ, Carlos de la Torre J, Ming GL. Human pluripotent stem cell-derived neural cells and brain organoids reveal SARS-CoV-2 neurotropism predominates in choroid plexus epithelium[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(6): 937-950.e9.
- [16] Reddehase MJ, Lemmermann NAW. Mouse model of cytomegalovirus disease and immunotherapy in the immunocompromised host: predictions for medical translation that survived the “test of time” [J]. *Viruses*, 2018, 10(12): 693.
- [17] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly[J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-379.
- [18] Liu JT, Zhu N, Huo WB, Tan WJ. Advancing virology research with a human brain organoid platform[J]. *hLife*, 2025, 3(5): 237-242.
- [19] Liu JT, Deng Y, Huo WB, Song JD, Zhai CC, Wei L, Wu CC, Zhang GQ, Huang BY, Wang WL, Lu RJ, Zhu N, Tan WJ. Human coronavirus OC43 infection in human cerebral organoids: novel insights on pathogenesis and potential therapeutic interventions[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2025, 32: 96.
- [20] Lin XJ, Sun Q, Cao Y, Li Z, Xu CL, Liu J, Song JD, Qin K, Zhang Y, Zhou JF. A novel peptide from VP1 of EV-D68 exhibits broad-spectrum antiviral activity against human enteroviruses[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(10): 1331.
- [21] Malik JR, Modebelu UO, Fletcher CV, Podany AT, Scarsi KK, Byrareddy SN, Anand RK, Buch S, Sil S, Le J, Bradley JS, Brown AN, Sutar D, Avedissian SN. Establishment of a four-cell *in vitro* blood-brain barrier model with human primary brain cells[J]. *Current Protocols*, 2024, 4(6): e1067.
- [22] Stone NL, England TJ, O’Sullivan SE. A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13: 230.
- [23] Zhao YB, Gan L, Ren L, Lin YB, Ma CC, Lin XM. Factors influencing the blood-brain barrier permeability[J]. *Brain Research*, 2022, 1788: 147937.
- [24] Jorgačevski J, Potokar M. Immune functions of astrocytes in viral neuroinfections[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 3514.
- [25] Yang WH, Wang JY, Tao Y, Li XD, Tao SB, Zhu HL, Chen X, Shan JJ, Li YM, Ma TH, Cao P, Cui GY. Breviscapine injection and its main component scutellarin prevents lethal enterovirus infection by inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in newborn mice[J]. *Phytomedicine*, 2025, 145: 157042.
- [26] Lin YW, Yu SL, Shao HY, Lin HY, Liu CC, Hsiao KN, Chitra E, Tsou YL, Chang HW, Sia C, Chong P, Chow YH. Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57591.
- [27] Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(36): 14753-14758.
- [28] Liu GM, Zhu DP, Feng K, Peng HX, Yang SD, Huang L, Li PQ. The neurological damage caused by enterovirus 71 infection is associated with hsa_circ_0069335/miR-29b/PMP22 pathway[J]. *Journal of Virology*, 2025, 99: e00844-24.
- [29] Chooi WH, Winanto, Zeng YY, Lee CY, Lim ZQ, Gautam P, Chu JJH, Loh YH, Alonso S, Ng SY. Enterovirus-A71 preferentially infects and replicates in human motor neurons, inducing neurodegeneration by ferroptosis[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2024, 13: 2382235.
- [30] Li HH, Su L, Zhang T, He F, Yin YX. MRI reveals segmental distribution of enterovirus lesions in the central nervous system: a probable clinical evidence of retrograde axonal transport of EV-A71[J]. *Journal of NeuroVirology*, 2019, 25(3): 354-362.
- [31] Hamidi M, Ong KC, Tan SH, Wong KT. An intracerebrally-infected mouse model of enterovirus A71 demonstrates restricted inter-neuronal spread within the brain parenchyma despite strong SCARB2 expression[J]. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2025, 51(4): e70031.
- [32] Wang SM, Lei HY, Liu CC. Cytokine immunopathogenesis of enterovirus 71 brain stem encephalitis[J]. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 2012: 876241.
- [33] Lin TY, Hsia SH, Huang YC, Wu CT, Chang LY. Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, 36(3): 269-274.
- [34] Voirin AC, Perek N, Roche F. Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells *in vitro* BBB model[J]. *Brain Research*, 2020, 1730: 146647.