

禽 6 型副粘病毒 V 蛋白对抗宿主细胞干扰素 β 的产生

田志革, 柴洪亮, 华育平* (东北林业大学野生动物资源学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的] 研究禽 6 型副粘病毒 V 蛋白对抗宿主细胞干扰素 β 的产生的机制。[方法] 构建真核表达禽 6 型副粘病毒 P、V、W 蛋白的重组载体, 分别与 IFN- β -Luc、NF- κ B-Luc、PRDIII/I-Luc、AP-1-luc 报告质粒共转染 HEK-293T 细胞, 接种仙台病毒刺激细胞后, 测定细胞内萤火虫荧光素酶及海肾荧光素酶活性。[结果] 禽 6 型副粘病毒 V 蛋白能通过降低 NF- κ B 的活性, 进而显著抑制宿主细胞产生 IFN- β 。[结论] 该研究初步阐明了禽 6 型副粘病毒 V 蛋白对抗宿主天然免疫的机制。

关键词 副粘病毒; V 蛋白; 对抗; 干扰素 β

中图分类号 S852.65⁺⁷ 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)01-130-02

The V Protein of Avian Paramyxovirus Type 6 Antagonizes Beta Interferon Production of Host Cells

TIAN Zhi-ge, CHAI Hong-liang, HUA Yu-ping* (Department of Wildlife Resource, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] To study the mechanism of avian paramyxovirus type 6 V protein antagonizing beta interferon production. [Method] The study constructed the combine plasmids pCDNA-P, pCDNA-V, pCDNA-W for expressing protein P, V, W, respectively. The 293T cells were cotransfected with combine plasmids and report gene plasmids, after SeV stimulating, the firely luciferase and Renilla luciferase activities were determined. [Result] The V protein remarkably inhibited beta interferon production by decreasing the NF- κ B activity. [Conclusion] The study clarified the mechanism of V protein antagonizing innate immunity of host cells preliminarily.

Key words Paramyxovirus; V protein; Antagonize; Beta interferon

当病毒侵染宿主时, 会遭受多种来自宿主的抗病毒反应, 其中干扰素 (IFN) 反应在早期的天然免疫及调节获得性免疫反应时发挥重要的作用^[1-3]。大量研究表明, 大部分副粘病毒编码特殊的附件蛋白, 即由 P 基因编辑剪接产生的 V 或/和 C 蛋白, 通过阻断 IFN 传导信号或限制宿主 IFN 的产生来规避 IFN 系统^[4-9]。例如, 副粘病毒科的腮腺炎病毒属成员 5 型猴猴病毒 (SV5) 通过降解 STAT1 来阻断 IFN 的信号传导, 仙台病毒 (SeV) 的 C 蛋白发挥相似的功能。SV5 及 SeV 的 V 蛋白能降低干扰素调节因子 IRF-3 和 NF- κ B 的活性, 从而抑制 IFN- β 的产生^[10-11]。

副粘病毒 P 基因除了表达 P 蛋白外, 还通过编辑剪接表达 V 蛋白及 W 蛋白。为了阐明禽 6 型副粘病毒对抗宿主细胞先天免疫的机制, 笔者将表达 P、V 和 W 蛋白的重组质粒与一系列报告质粒共转染 293T 细胞, 通过测定荧光素酶活性来判断病毒蛋白对 IFN- β 基因的启动子序列的作用机制, 从而对抗宿主细胞先天免疫。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞。重组质粒 pCDNA-P (flag 标签)、pCDNA-V (flag 标签)、pCDNA-W (flag 标签) 由笔者构建; IFN- β -Luc、NF- κ B-Luc、PRDIII/I-Luc、AP-1-luc 双荧光素酶报告质粒均由东北农业大学生命科学学院胡晓亮博士惠赠; HEK-293T 细胞由哈尔滨兽医研究所国家重点实验室马病团队提供。

1.1.2 主要试剂。Flag 鼠源单抗和脂质体 Lipofectamine

2000 均购自 Invitrogen 公司; DMEM 培养基购自 Hyclone 公司; DyLight800 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 KPL 公司; 双荧光素酶报告分析系统试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 转染试验。将 HEK-293T 细胞均匀铺于 24 孔板中, 待细胞长成单层且密度达到 80% 左右时进行转染。转染体系中的共同成分为: 300 μ l DMEM、3 μ l 脂质体、60 ng RL-TK 质粒; 另依据试验目的不同, 分别向体系中加入 0.6 μ g IFN- β -Luc、NF- κ B-Luc、PRDIII/I-Luc 或 AP-1-luc 报告质粒, 每个试验重复 3 次, 同时设置转染空载体的空白对照。转染 24 h 后, 每孔加入 100 HAU 的 SeV 进行刺激, 同时设置不加病毒刺激的空白对照。病毒刺激 12 h 后, 弃去细胞培养液, 用细胞裂解液裂解细胞, 离心后弃去细胞碎片, 裂解获得的上清液用于免疫印迹分析及荧光素酶活性测定试验。

1.2.2 免疫印迹分析。裂解上清液与 5 \times Loading buffer 按照 4:1 的比例混合, 在沸水浴中煮 10 min, 样品进行蛋白电泳后, 转印至纤维素膜, 进行常规免疫印迹分析。其中, 一抗使用 flag 鼠源单抗, 二抗使用羊抗鼠 IgG 抗体, β -actin 作为内参蛋白。

1.2.3 荧光素酶活性的测定。取裂解上清液 20 μ l, 使用双荧光素酶报告分析系统试剂盒测定其活性。

2 结果与分析

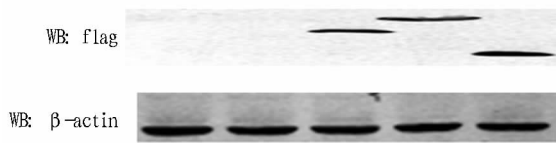
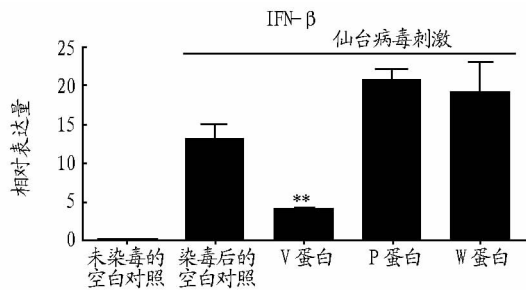
为了验证表达的蛋白能否抑制 IFN- β 启动子的活性, 在不同蛋白表达的情况下测定 IFN- β -luc 报告基因的双荧光素酶活性水平, 当 SeV 感染 293T 细胞时, IFN- β -luc 的酶活性是未染毒空白对照的 50 倍左右, 在表达蛋白 P 及 W 蛋白时酶活性并未被抑制; 在 V 蛋白表达后, 酶活性被显著抑制 (图 1), 表明 APMV6 的 V 蛋白能够抑制 IFN- β 启动子的活性。为了阐明 V 蛋白发挥作用的区域, 将表达 V 蛋白的质粒与 NF- κ B-luc、PRDIII/I-luc、AP-1-luc 的质粒共转染 293T 细胞, 在 SeV 刺激条件下

基金项目 中央高校基本科研业务费专项 (2572014AA03); 林业公益性行业科研专项 (201404404)。

作者简介 田志革 (1985 -), 女, 黑龙江大庆人, 博士研究生, 研究方向: 动物病毒学及分子生物学研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事野鸟疾病监测与防治研究。

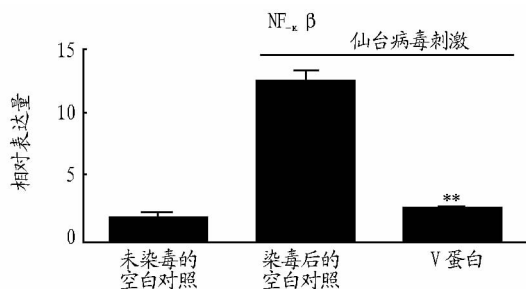
收稿日期 2014-11-24

测定双荧光素酶活性。结果表明,V 蛋白能显著抑制 NF- κ B 启动子活性(图 2),对 PRDIII/I(图 3)和 AP-1(图 4)启动子也有抑制作用,但不如对 NF- κ B 启动子的抑制效果明显。免疫印迹分析(Western blot)试验表明,重组蛋白能够在 293T 细胞中表达, β -actin 作为内参蛋白,表明细胞数目之间并无差异(图 1~4)。



注: ** 表示与染毒后空白对照存在极显著差异($P < 0.01$)。

图 1 外源蛋白对 IFN- β 启动子的影响



注: ** 表示与染毒后空白对照存在极显著差异($P < 0.01$)。

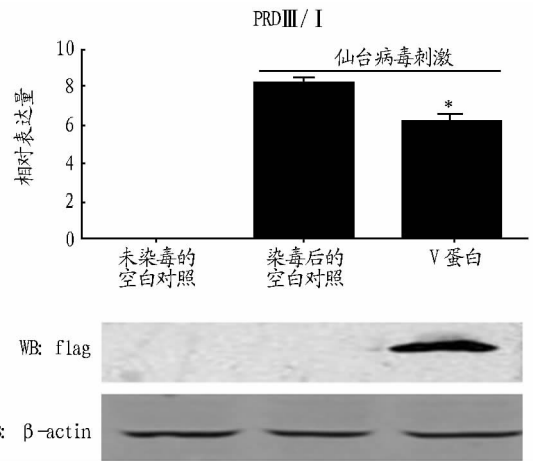
图 2 外源蛋白对 NF- κ B 启动子的影响

3 讨论

目前,病毒对抗宿主先天免疫的机制研究已成为热点,具有对抗功能的蛋白及对抗机制被不断发现。关于禽 6 型副粘病毒分离的报道并不多见,更没有关于该病毒对抗宿主先天免疫的研究,作为副粘病毒的一种,其对抗机制与其他已报道的副粘病毒是否相似尚存在差异,值得探讨。笔者利用自主分离的 1 株 APMV6,表达其 P、V、W 蛋白,用于对抗机制的研究。笔者首先发现 V 蛋白能够抑制 IFN- β 启动子的活性,但并不清楚 V 蛋白作用于该启动子 NF- κ B、PRDIII/I、AP-1 中的哪个部分。笔者进行了进一步验证试验,发现 V 蛋白对这 3 个部分都具有抑制作用,但对 NF- κ B 启动子的活性显著抑制。

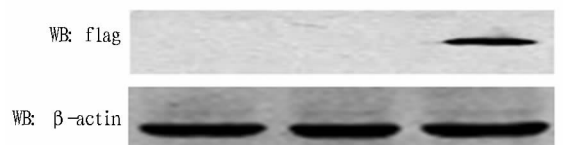
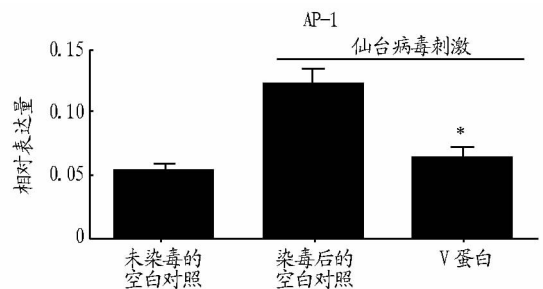
参考文献

[1] GOODBOURN S, DIDCOCK L, RANDALL R E. Interferons: cell signaling



注: * 表示与染毒后空白对照存在极显著差异($P < 0.05$)。

图 3 外源蛋白对 PRDIII/I 启动子的影响



注: * 表示与染毒后空白对照存在显著差异($P < 0.05$)。

图 4 外源蛋白对 AP-1 启动子的影响

- immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures [J]. J Gen Virol, 2000, 81: 2341 - 2364.
- [2] SEN G C. Viruses and interferons [J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55: 255 - 281.
- [3] TANIGUCHI T, TAKAOKA A. The interferon- α/β system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors [J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14: 111 - 116.
- [4] GARCIA-SASTRE A. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A virus and other negative-strand RNA viruses [J]. Virology, 2001, 279: 375 - 384.
- [5] GARCIA-SASTRE A. Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA virus [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2004, 283: 249 - 280.
- [6] GOTOH B, KOMATSU T, TAKEUCHI K, et al. Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists [J]. Microbiol Immunol, 2001, 45: 787 - 800.
- [7] GOTOH B, KOMATSU T, TAKEUCHI K, et al. Paramyxovirus strategies for evading the interferon response [J]. Rev Med Virol, 2002, 12: 337 - 357.
- [8] HORVATH C M. Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein [J]. Eur J Biochem, 2004, 271: 4621 - 4628.
- [9] NAGAI Y, KATO A. Accessory genes of the paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetic [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2004, 283: 198 - 248.
- [10] DIDCOCK L, YOUNG D F, GOODBOURN S, et al. Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive gene: importance for virus pathogenesis [J]. J Virol, 1999, 73: 3125 - 3133.
- [11] DIDCOCK L, YOUNG D F, GOODBOURN S, et al. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signaling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation [J]. J Virol, 1999, 73: 9928 - 9933.