

· 论 著 ·

4 型登革病毒 NS2A 蛋白通过 UXT-V1 逃避宿主免疫的机制研究

鞠鹏飞, 王政坤, 张建立[△]

(青岛大学附属医院胃肠外科, 山东青岛 266555)

摘要:目的 探讨 4 型登革病毒 NS2A 蛋白通过泛转录表达因子剪接变体 1(UXT-V1)逃避宿主免疫的机制。方法 在 HEK-293T 细胞中, 4 型登革病毒感染后过表达 NS2A 蛋白, 通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测干扰素- β (IFN- β)、白细胞介素-8(IL-8)、干扰素诱导蛋白 54(ISG54) 的表达量; 通过荧光素酶报告实验检测 NS2A 蛋白对 IFN- β 与核因子 κ B(NF- κ B) 通路的影响; 通过免疫共沉淀检测 NS2A 蛋白与 UXT-V1 的相互作用; 通过核蛋白抽取检测 IRF3 和 p65 的核定位。结果 4 型登革病毒 NS2A 蛋白与宿主 UXT-V1 存在相互作用。此外, 4 型登革病毒 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN- β 、IL-8 和 ISG54 的 mRNA 水平, 阻断 IRF3 和 p65 的核转移, 抑制宿主 IFN- β 与 NF- κ B 通路。结论 4 型登革病毒 NS2A 蛋白通过与 UXT-V1 的相关作用阻断宿主固有免疫关键因子 IRF3 和 p65 的核定位, 抑制宿主 IFN- β 与 NF- κ B 通路, 最终到达其免疫逃避的目的。

关键词: 4 型登革病毒; NS2A 蛋白; 泛转录表达因子剪接变体 1; 免疫

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.08.014

中图法分类号: R373.33

文章编号: 1673-4130(2020)08-0952-04

文献标识码: A

Study on the mechanism of evading host immunity by UXT-V1 by type 4 dengue virus NS2A protein

JU Pengfei, WANG Zhengkun, ZHANG Jianli[△]

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266555, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which the NS2A protein of type 4 dengue virus escapes host immunity through ubiquitously expressed transcript splice variant 1(UXT-V1). **Methods** In HEK-293T cells, NS2A protein was overexpressed after infection with type 4 dengue virus, and the expression levels of IFN- β , IL-8 and ISG54 were detected by qPCR. NS2A protein was detected by luciferase reporter assay for IFN- β . Interaction with NF- κ B pathway; interaction of NS2A protein with UXT-V1 was detected by co-immunoprecipitation; nuclear localization of IRF3 and p65 was detected by nuclear protein extraction. **Results** The type 4 dengue virus NS2A protein interacted with host UXT-V1. In addition, the type 4 dengue virus NS2A protein inhibits mRNA levels of host IFN- β , IL-8 and ISG54, blocks nuclear transfer of IRF3 and p65, and inhibits host IFN- β and NF- κ B pathways. **Conclusion** The type 4 dengue virus NS2A protein blocks the nuclear localization of the host innate immune key factors IRF3 and p65 through the correlation with UXT-V1, inhibits the host IFN- β and NF- κ B pathway, and finally reaches the goal of immune evasion.

Key words: type 4 dengue virus; NS2A protein; ubiquitously expressed transcript splice variant 1; immunity

登革病毒感染是当今世界上最主要的由蚊子传播的病毒性疾病的原因^[1]。与其他黄病毒一样, 其基因组包含编码 3 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白的单链正义 RNA^[2]。与其他黄病毒不同, 有 4 种血清型, 它们具有遗传相似性但抗原性不同^[3]。4 型登革病毒 NS2A 蛋白含有几个跨膜结构域并与内质网膜相关^[4]。由于其高疏水性, 这种蛋白质可能是登革病毒非结构蛋白中最不为人知的。除了参与膜重排和病毒复制外, NS2A 蛋白参与宿主的免疫系统逃避和免疫反应^[5]。泛转录表达因子剪接变体 1(UXT-V1)

参与基因转录调节^[6]。HUANG 等^[7]发现 UXT-V1 能够促进线粒体上线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)抗病毒信号体的形成激活干扰素- β (IFN- β)与核因子 κ B(NF- κ B)通路。然而, 4 型登革病毒 NS2A 蛋白在 UXT-V1 的抗病毒活动中的作用鲜少报道。基于此, 本研究旨在探讨 4 型登革病毒 NS2A 蛋白通过 UXT-V1 逃避宿主免疫的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 HEK-293T 细胞购自上海康朗生物科技有限公司(货号: H-HEK-293T)。总 RNA 抽取试剂

作者简介: 鞠鹏飞, 男, 住院医师, 主要从事胃肠道肿瘤外科治疗研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhangjianli6551@163.com。

本文引用格式: 鞠鹏飞, 王政坤, 张建立. 4 型登革病毒 NS2A 蛋白通过 UXT-V1 逃避宿主免疫的机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8): 952-955.

购自上海科敏生物科技有限公司(货号: DXT-15596018)。Flag、Myc、IRF3、p65、TUBULIN、H3 抗体购自 abcam 公司(货号: ab205606、ab32072、ab68481、ab16502、ab210797、ab1791)。BCA 蛋白质测定试剂盒购自上海经科化学科技有限公司(货号: JK-201)。NF- κ B 报告试剂盒购自 BPS 公司(货号: 60614)。IFN- β 报告试剂盒购自 R&D 公司(货号: 41410-1)。蛋白裂解液购自金克隆(北京)生物技术有限公司(货号: EX6020, 100 mL)。核蛋白提取试剂盒购自贝博-Bestbio(货号: BB-3102)。DMEM 培养基购自上海中乔新舟生物科技有限公司(货号: 09211-1), 优级胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司(货号: 11011-8611)。蛋白酶抑制剂购自 bi-make 公司(货号: B14011)。转染试剂购自上海邦奕生物科技有限公司(货号: BB-4601)。磷酸盐缓冲液购自天津泰泽兴业生物科技有限公司(货号: MA0015)。荧光素酶报告试剂盒购自上海科敏生物科技有限公司(货号: DXT-ST219020)。青链霉素混合液(100 \times)购自上海亿言生物科技有限公司(货号: SL6040, 100 mL)。FLAG-NS2A 质粒和 Myc-UXT-V1 质粒均由北京擎科生物合成, 载体为 PCDNA3.1。4 型登革病毒获赠于武汉病毒所。2 \times SDS 蛋白电泳上样缓冲液购自上海樊克生物科技有限公司(货号: FK-ZH536J)。IFN- β 、白细胞介素-8(IL-8)、干扰素诱导蛋白 54(ISG54)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)实时荧光定量 PCR(qPCR)引物序列见表 1, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 qPCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'~3')	大小(bp)
IFN- β	正向 ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC C	124
	反向 GGA ATC CAA GCA AGT TGT AGC TC	
IL-8	正向 TTT TGC CAA GGA GTG CTA AAG A	135
	反向 AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC	
ISG54	正向 AAG CAC CTC AAA GGG CAA AAC	104
	反向 TCG GCC CAT GTG ATA GTA GAC	
GAPDH	正向 TGT GGG CAT CAA TGG ATT TGG	118
	反向 ACA CCA TGT ATT CCG GGT CAA T	

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和感染 HEK-293T 细胞在含有 10% 胎牛血清中和 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中培养。将所有细胞维持在 37 $^{\circ}$ C 的含 5% CO₂ 的培养箱中。将 FLAG-NS2A 质粒或 Myc-UXT-V1 质粒与脂质体混合, 静止大约 20 min 后, 缓缓滴入 HEK-293T 细胞。使用感染复数为 1 的 4 型登革病毒感染 HEK-293T 细胞^[9]。

1.2.2 RNA 抽取与 qPCR 总 RNA 抽取试剂细胞中提取总 RNA, 并用逆转录酶进行逆转录。将转录水平标准化为 GAPDH 的水平。使用 mRNA qPCR 试剂盒并根据制造商的说明书测定 IFN- β 、IL-8、

ISG54、GAPDH mRNA 的表达^[10]。

1.2.3 免疫印迹 使用 RIPA 裂解缓冲液或核蛋白提取试剂盒从 HEK-293T 细胞中提取总蛋白质, 并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒进行定量^[8]。使用多克隆抗 Flag、Myc、IRF3、p65、TUBULIN、H3 抗体作为一抗、抗兔和抗小鼠 IgG 为二抗。使用化学发光试剂检测相应蛋白质^[11]。

1.2.4 荧光素酶报告实验 将每孔总共 5 \times 10⁴ 个 HEK-293T 细胞接种在 24 孔板中。培养 24 h 后, 用含有 200 ng/mL 双荧光素酶报告质粒 IFN- β 或 NF- κ B 与转染试剂混合后转染细胞。使用荧光素酶报告检测试剂盒在转染后 24 h 通过酶标仪测量荧光素酶活性。所有转染独立重复至少 3 次^[12]。

1.2.5 免疫共沉淀 HEK-293T 细胞用在 1 mL NP-40 裂解缓冲液中裂解。在 14 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 15 min, 立即将上清液转移到新管中。用磷酸盐缓冲液洗涤琼脂糖珠 2 次, 并制成 50% 琼脂糖工作液。在水平振荡器上 4 $^{\circ}$ C 振荡 10 min。在 14 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 15 s, 将上清液转移到新管中并丢弃琼脂糖。加入适量的 FLAG 抗体至总体积约 500 μ L。旋转振荡器上于 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动过夜。在 14 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 15 s, 保持沉淀并用预先冷却的洗涤缓冲液(或冷磷酸盐缓冲液)洗涤 3 次。加入 15 μ L SDS 加样缓冲液后 100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后取 7 μ L 进行下游分析^[13]。

1.3 统计学处理 使用 Prism 5 软件分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过 Student's *t* 检验分析组间差异后, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 型登革病毒 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN- β 与 NF- κ B 通路 HEK-293T 细胞用 4 型登革病毒感染后再过表达 Flag-NS2A 蛋白, 见图 1。qPCR 检测发现, 4 型登革病毒 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN- β 、IL-8 和 ISG54 的 mRNA 水平, 见图 2。通过荧光素酶报告实验发现 4 型登革病毒 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN- β 、IL-8 和 ISG54 的 mRNA 水平, 见图 2。通过荧光素酶报告实验检测发现 4 型登革病毒 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN- β 与 NF- κ B 通路, 见图 3。

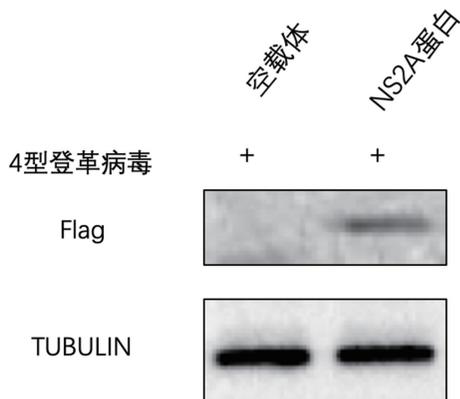
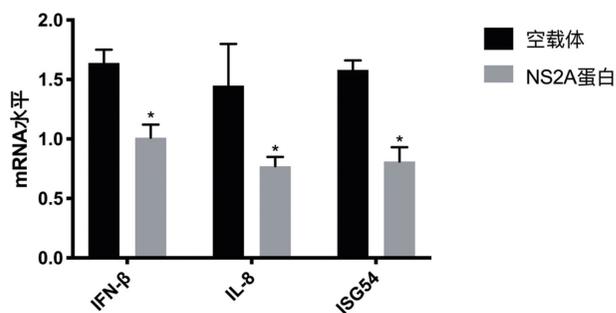
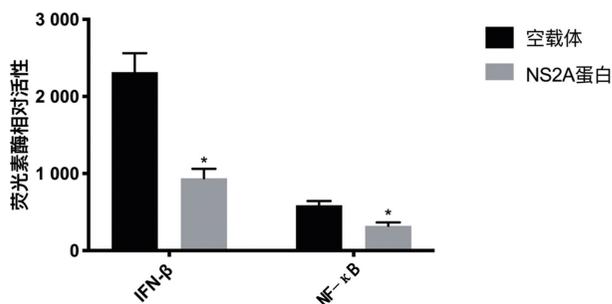


图 1 4 型登革病毒感染的情况下过表达 NS2A 蛋白



注:与空载体比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN-β、IL-8 和 ISG54 的 mRNA 水平



注:与空载体比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN-β 与 NF-κB 通路

2.2 4 型登革病毒 NS2A 蛋白与宿主 UXT-V1 存在相互作用 将 Flag-NS2A 质粒与 Myc-UXT-V1 质粒共转染进入 HEK-293T 细胞中,免疫共沉淀后免疫印迹结果显示 4 型登革病毒 NS2A 蛋白与宿主 UXT-V1 存在相互作用,见图 4。

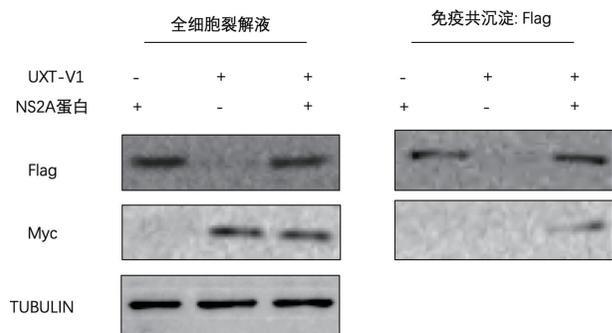
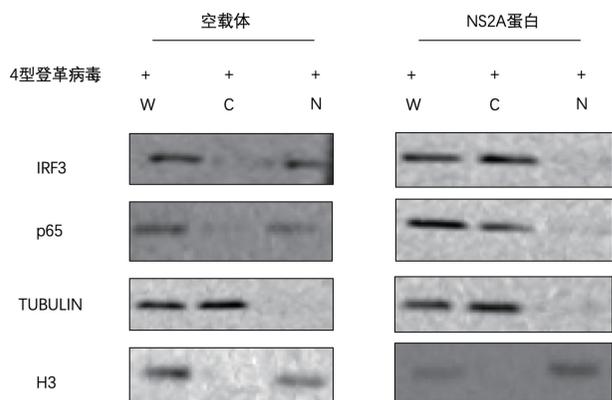


图 4 4 型登革病毒 NS2A 蛋白与宿主 UXT-V1 存在相互作用



注:W 表示全细胞裂解液;C 表示细胞质;N 表示细胞核。

图 5 4 型登革病毒 NS2A 蛋白阻断 IRF3 和 p65 的核转移

2.3 4 型登革病毒 NS2A 蛋白阻断 IRF3 和 p65 的核转移 HEK-293T 细胞用 4 型登革病毒感染后,过表达 NS2A 蛋白时,IRF3 和 p65 均定位在细胞质中,细胞核中几乎没有。因此,4 型登革病毒 NS2A 蛋白阻断 IRF3 和 p65 的核转移。见图 5。

3 讨论

登革病毒是蚊子传播的人类病原体,主要影响热带地区,39 亿人生活,每年有近 1 亿株感染引起临床症状^[14]。病毒的传播是通过来自伊蚊属的蚊子(主要是埃及伊蚊和白纹伊蚊)的叮咬而发生的。这些蚊媒通常在热带地区发现,但现在也在更温和的地区发现全球变暖,从而增加了受登革热影响地区进一步扩大的可能性。大多数感染是无症状的或导致持续数天的轻微症状(发烧、关节疼痛或皮疹)^[15]。然而,在一些严重的情况下,后果可能更严重:登革热出血热、登革热休克综合征,这些疾病每年导致约 20 000 人死亡^[16]。

NS2A 蛋白是许多黄病毒的毒力决定因子,其与病毒毒素具有相似性^[17]。NS2A 蛋白是高度疏水的跨膜蛋白,与脂质双分子层相互作用,与复制复合物中的 dsRNA,病毒蛋白 NS1、NS3 和 NS5 共定位,在病毒组装和释放中发挥关键作用^[18]。泛素表达转录因子(UXT)广泛存在于人和小鼠组织中^[19]。生物信息学分析揭示了 UXT 的两种同种型,即 UXT-V1 和泛转录表达因子剪接变体 2(UXTV2)^[7]。在本研究中,发现 4 型登革病毒 NS2A 蛋白与宿主 UXT-V1 存在相互作用。UXT-V1 能够促进线粒体上 MAVS 抗病毒信号体的形成,激活 IFN-β 与 NF-κB 通路^[7]。提示 4 型登革病毒 NS2A 蛋白可能抑制宿主 IFN-β 与 NF-κB 通路。

RIG-I 和 MDA5 已被表征为在宿主细胞的初级应答期间检测细胞溶质 RNA 病毒普遍存在的传感器^[20]。一旦 RIG-I/MDA5 感知病毒 RNA,就会形成线粒体信号体,其中包括线粒体抗病毒信号蛋白^[21]。MAVS 信号体是线粒体上新出现的抗病毒蛋白复合物。UXT-V1 是 MAVS 信号体的一个新成分,它对病毒诱导的 NF-κB 和干扰素调节因子 3(IRF3)的激活至关重要^[7]。在本研究中,发现 4 型登革病毒 NS2A 蛋白抑制宿主 IFN-β、IL-8 和 ISG54 的 mRNA 水平,阻断 IRF3 和 p65 的核转移,抑制宿主 IFN-β 与 NF-κB 通路。MAVS 本身通过其 C-末端跨膜结构域定位于线粒体的外膜上^[22-25]。在静息细胞中,MAVS 信号体中的大多数蛋白质存在于胞质溶胶中,包括 TNF 受体相关因子 3 和死亡域相关蛋白。病毒感染后,这些蛋白质与线粒体上的 MAVS 快速聚集,导致 Tank 结合激酶 1 的活化,然后其在 C 末端磷酸化 IRF3,之后 IRF3 二聚化并易位到细胞核中。此外,MAVS 信号体可以激活 NF-κB。转录因子 IRF3 和 NF-κB 协同诱导 I 型干扰素的早期产生并随后建立抗病毒状态^[26]。因此,4 型登革病毒 NS2A 能够抑制

MAVS 信号体下游的 IFN- β 与 NF- κ B 通路以抑制宿主细胞的抗病毒状态的形成。

4 结 论

综上所述, 4 型登革病毒 NS2A 蛋白通过与 UXT-V1 的相互作用阻断宿主固有免疫关键因子 IRF3 和 p65 的核定位, 抑制宿主 IFN- β 与 NF- κ B 通路, 最终到达其免疫逃避的目的。

参考文献

- [1] 张高红, 郑永唐. 抗登革病毒化学药物研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2017, 22(10): 6-10.
- [2] 谢仕兰, 陈守义. 登革病毒和蚊虫感染与免疫[J]. 疾病监测, 2017, 32(1): 20-24.
- [3] 吴德, 赵令斋, 吴衍恒, 等. 登革病毒非结构蛋白 1 抗原检测试剂的比较[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(2): 141-144.
- [4] SHRIVASTAVA G, GARCÍACORDERO J, LEÓNJUÁ REZ M, et al. NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2[J]. *Virulence*, 2017, 8(7): 1450-1456.
- [5] CHEN S, WU Z, WANG M, et al. Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins[J]. *Viruses*, 2017, 9(10): 291.
- [6] 陈婉南, 俞燕飞, 吴琼, 等. 乙型肝炎病毒剪接蛋白 HBSP 与泛转录表达因子剪接变体 1 相互作用增强 NF- κ B 活性[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(1): 29-34.
- [7] HUANG Y, LIU H, GE R, et al. UXT-V1 facilitates the formation of MAVS antiviral signalosome on mitochondria[J]. *J Immunol*, 2012, 188(1): 358-366.
- [8] 彭健, 张耀婷, 李慧, 等. 啤酒酵母野生型和缺失型菌株的比较蛋白组学分析[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(21): 18-24.
- [9] LIU Y, ZHANG F, LIU J, et al. Transmission-blocking antibodies against mosquito C-type lectins for dengue prevention[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(2): e1003931.
- [10] LIU J, LIU Y, NIE K, et al. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(9): 16087.
- [11] XIAO X, LIU Y, ZHANG X, et al. Complement-related proteins control the flavivirus infection of *Aedes aegypti* by inducing antimicrobial peptides[J]. *PLoS pathogens*, 2014, 10(4): e1004027.
- [12] ZHANG R, ZHU Y, PANG X, et al. Regulation of antimicrobial peptides in *Aedes aegypti* Aag2 cells[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7(2): 22.
- [13] LIU Y, LIU J, DU S, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes[J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 482.

- [14] HLADISH T J, PEARSON C A B, TOH K B, et al. Designing effective control of dengue with combined interventions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(6): 3319-3325.
- [15] 杨永红, 宋璋瑶, 郑学礼. 登革热的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 22(8): 107-111.
- [16] 洪文昕. 重症登革热的预警指征及其发病影响因素研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2013.
- [17] TAN K K, ZULKIFLE N I, SULAIMAN S, et al. Emergence of the Asian lineage dengue virus type 3 genotype III in Malaysia[J]. *BMC Evol Biol*, 2018, 18(1): 58.
- [18] OZKURT Z, TANRIVERDI E C. Global Alert; Zika virus-an emerging arbovirus[J]. *Eurasian J Med*, 2017, 49(2): 142-147.
- [19] SÀN N, KIRSCH K H, TRACKMAN P C, et al. UXT is a LOX-PP interacting protein that modulates estrogen receptor alpha activity in breast cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(8): 2347-2356.
- [20] ZHAO C Y, JIA M T, SONG H, 等. E3 泛素连接酶 TRIM40 通过靶向 MDA5 及 RIG-I 从而负向调控抗病毒天然免疫应答[J]. 科学新闻, 2018, 546(4): 145.
- [21] ZHAO C, JIA M, SONG H, et al. The E3 Ubiquitin Ligase TRIM40 Attenuates Antiviral Immune Responses by Targeting MDA5 and RIG-I[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(6): 1613-1623.
- [22] ZHANG L, LIU J, QIAN L, et al. Induction of OTUD1 by RNA viruses potently inhibits innate immune responses by promoting degradation of the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome[J]. *Plos Pathogens*, 2018, 14(5): e1007067.
- [23] LU A, DISOMA C, ZHOU Y, et al. Protein interactome of the deamidase phosphoribosylformylglycinamide synthetase (PFAS) by LC-MS/MS[J]. *Biochem*, 2019, 513(3): 746-752.
- [24] DING C, HE J, ZHAO J, et al. β -catenin regulates IRF3-mediated innate immune signalling in colorectal cancer[J]. *Cell Proliferation*, 2018, 51(5): e12464.
- [25] LI G Q, LI J J, TIAN Y, et al. Sequence analysis of a putative goose RIG-I gene[J]. *Canadian J Sci*, 2017, 92(2): 143-151.
- [26] CZERKIES M, KORWEK Z, PRUS W, et al. Cell fate in antiviral response arises in the crosstalk of IRF, NF- κ B and JAK/STAT pathways[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 493.

(收稿日期: 2019-09-02 修回日期: 2019-12-25)