

毒胡萝卜素通过 ATF6 途径促进柯萨奇病毒 B3 复制的初步研究

宋芹芹 罗小暖 宋娟 夏冬 史冰田 刘宓 夏志强 王文军 曹天宇 程恒顺
韩俊

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 传染病诊断和治疗协同中心, 北京 102206

通信作者: 韩俊, Email: hanjun_sci@163.com, 电话: 010-58900680

【摘要】 目的 探讨内质网应激诱导剂毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG) 对柯萨奇病毒 B3 (coxsackievirus B3, CV-B3) 病毒复制的影响。方法 将 10 个 MOI 的病毒感染 HeLa 细胞后, 在病毒的吸附和补液过程中加入 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 TG, 分别在药物刺激的 3 h、6 h 和 9 h 收集病毒感染的样品。通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 CV-B3 病毒复制效率; 分别使用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.08 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.025 $\mu\text{mol/L}$ 的 TG 刺激 CV-B3 病毒感染细胞, 通过噬斑形成试验进一步验证 TG 对病毒复制的影响; 通过内质网应激 3 条通路的抑制剂分别作用于 TG 刺激的病毒感染细胞, 通过 qRT-PCR 检测病毒量的变化。结果 qRT-PCR 结果显示, TG 刺激后, 相对于对照, 病毒量在 3 h 没有发生明显的变化; 在病毒感染的 6 h 和 9 h, 病毒量分别增加了 2.5 倍和 158.6 倍。噬斑形成试验显示, TG 作用后, 病毒的噬斑明显增大。通过加入内质网应激的 3 条通路 PERK、ATF6 和 IRE1 的抑制剂 GSK2656157、AEBSF 和 STF-083010 发现, 加入 ATF6 的抑制剂 AEBSF 6 h 后, 病毒增加量下降了 90%; AEBSF 作用 9 h 后, 病毒增加量下降了 55%。结论 TG 能够通过 ATF6 途径诱导内质网应激并有效的促进 CV-B3 病毒的复制。

【关键词】 Coxsackievirus B3; 毒胡萝卜素; 内质网应激; 噬斑; ATF6 通路

基金项目: 国家重大科技专项 (2018ZX10102001, 2018ZX10711001, 2018ZX10734404); 传染病预防控制国家重点实验室发展基金 (2011SKLID104)

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1003-9279.2019.03.004

A preliminary study on thapsigargin promoting coxsackievirus B3 replication through activating transcription factor 6 pathway

Song Qinqin, Luo Xiaonuan, Song Juan, Xia Dong, Shi Bingtian, Liu Mi, Xia Zhiqiang, Wang Wenjun, Cao Tianyu, Cheng Hengshun, Han Jun

National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Beijing 102206, China

Corresponding author: Han Jun, Email: hanjun_sci@163.com, Tel: 0086-10-58900680

【Abstract】 Objective To investigate the effect of thapsigargin (TG) which can induce endoplasmic reticulum stress (ERS) on the replication of coxsackievirus B3 (CV-B3). **Methods** After 10 MOI CV-B3 infected HeLa cells were exposed 0.25 $\mu\text{mol/L}$ TG for 3 h, 6 h and 9 h, virus RNA of HeLa cells were extracted and viral replication was evaluated by real time PCR. After 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 0.08 $\mu\text{mol/L}$ and 0.025 $\mu\text{mol/L}$ TG exposed, the plaque of CV-B3 was used to confirm further replication of CV-B3. To verify TG induced ERS through three signal pathway, one of among PERK, ATF6 and IRE1 inhibitors GSK2656157, AEBSF and STF-083010, and 0.25 $\mu\text{mol/L}$ TG were used in HeLa cells infected with 10 MOI CV-B3, replication of CV-B3 was evaluated by qRT-PCR. **Results** The stimulation of TG did not induce increase of virus replication after post-infection 3 h. However, TG induced replication of virus to increase 2.5 times after post-infection 6 h and 158.6 times after post-infection 9 h. And, the area of viral plaque was significantly increased. ATF6 inhibitors AEBSF significantly inhibited promotion of virus replication from TG. **Conclusions** TG can promote the replication of CV-B3 through ATF6 signal pathway.

【Key words】 Coxsachieviuus B3; Thapsigargin; Endoplasmic reticulum stress ; Plaque;

ATF6 pathway

Fund programs: China Mega-Project for Infectious Disease (2018ZX10102001, 2018ZX10711001, 2018ZX10734404), the SKLID Development Grant (2011SKLID104).

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.03.004

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是真核细胞中的基本细胞器,主要在蛋白的折叠、翻译后的蛋白修饰以及细胞膜和细胞浆蛋白的运输和分泌过程中发挥着重要的作用。在应激条件下,如钙离子平衡紊乱、蛋白质糖基化状态改变、突变蛋白表达等引起 ER 腔内未折叠或错误折叠蛋白聚集,导致 ER 内稳态失衡^[1],进而触发内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[2]。

柯萨奇病毒 B3(CV-B3)病毒属于小 RNA 病毒科,肠道病毒属,是引起病毒性心肌炎的重要病原,严重时可引发病人猝死^[3-4]。ERS 在多种病毒感染性疾病中发挥了重要作用^[5]。小 RNA 病毒可以引起 ERS 促进病毒复制,人鼻病毒 16 型(HRV 16)可以诱导细胞钙离子变化而引起 ERS^[6], CV-B3 病毒复制引起内质网膜结构重排,病毒蛋白定位于 ER,引起内质网穿孔,导致内质网钙离子紊乱,病毒复制对细胞内环境的改变等都能造成内质网功能紊乱,引起 ERS^[7-8]。但诱导 ERS 是否对 CV-B3 病毒的复制有影响,目前尚不清楚。本研究通过 ERS 诱导剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)刺激 CV-B3 病毒感染的 HeLa 细胞,分析 TG 诱导 ERS 后对 CV-B3 病毒复制的影响。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 HeLa 细胞和 CV-B3 W 株由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒资源中心所保存;DMEM 细胞培养液购自美国 Gibco 公司。GRP78 抗体购自 Cell Signaling 公司;肠道病毒通用引物和 actin 引物均在 Invitrogen 公司合成;荧光定量一步法试剂盒购自 ABI 公司;4%多聚甲醛来购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;草酸铵结晶紫染色液购自北京雷根生物技术有限公司;PERK、ATF6 和 IRE1 的抑制剂 GSK2656157、AEBSF 和 STF-083010 均购自 MedChemExpress 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养、病毒接种和 TG 刺激:细胞培养:含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基重悬 HeLa 细胞,调整细胞浓度为分别为 6×10^5 /ml 和 1×10^6 /ml。

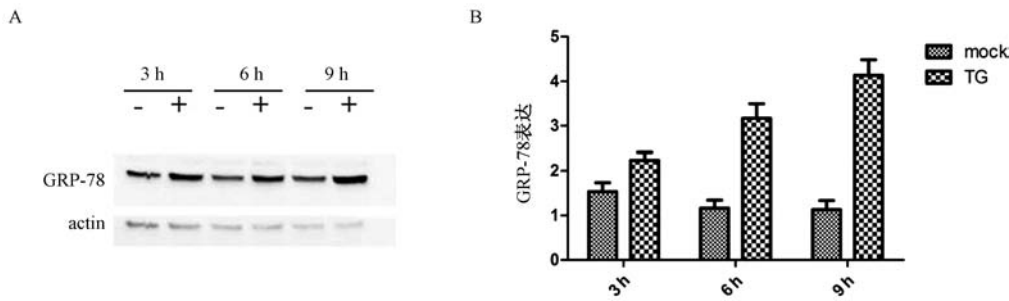
然后加入 10 个 MOI 的病毒到 96 孔板或 3×10^4 MOI 到 6 孔板中,病毒吸附 1 h 后,弃去病毒液,用 PBS 洗 3 遍。然后加入含 0.25、0.08、0.025 $\mu\text{mol/L}$ TG 的 2%的维持液。

1.2.2 噬斑:在 6 孔板中接种病毒并吸附 1 h 后,补充的维持液为 1.5%低熔点琼脂糖的溶液和 4%的 DMEM 的等体积混合物。病毒培养 3 d 后,观察噬斑的形成。每孔加入 500 ml 4%的多聚甲醛溶液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 min。倒掉液体,将琼脂糖凝胶取出。随后加入去离子水清洗残留的凝胶碎渣;加入结晶紫草酸铵溶液(500 μl /孔),静置 1 min,去离子水清洗细胞 3 次;对噬斑进行计数。

1.2.3 Western blot 检测内质网应激相关蛋白 GRP78:将 HeLa 细胞接种于 6 孔板中,12 h 后用终浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 TG 刺激 HeLa 细胞,分别在刺激之后的 12 h、24 h 和 36 h 收集细胞,裂解细胞后留取上清,加入 5 \times 的缓冲液,煮沸 10 min 后上样,SDS-PAGE 电泳后进行电转膜。用稀释好的 GRP78 抗体孵育醋酸纤维素膜过夜,洗膜 3 次,然后用带有辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 单克隆抗体(1:5 000),洗膜后进行发光显影。

1.2.4 内质网通路抑制剂对病毒复制的影响:将细胞传代至 96 孔板,细胞量为 1×10^6 /ml,在细胞传代 12 h 后,加入内质网应激抑制剂,抑制剂加入 2 h 后,接种病毒。在病毒吸附和加入维持液的过程中都同时再加入 PERK、ATF6 和 IRE1 抑制剂 GSK2656157(0.1 $\mu\text{mol/L}$)、AEBSF(300 $\mu\text{mol/L}$)和 STF-083010(60 $\mu\text{mol/L}$)和 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 毒胡萝卜素,分别在接种病毒后的 3 h、6h 和 9 h 收取病毒液。

1.2.5 荧光定量 PCR:收取 TG 刺激和加入内质网应激抑制剂后的病毒培养液,然后提取样品中的总 RNA;配置荧光定量 PCR 体系,按照试剂盒的说明加入反液、肠道病毒和 actin 的上下游引物以及带有发光集团的探针各 0.5 μl ,用无 RNA 酶的水补充至 20 μl 。荧光定量 PCR 的过程为:45 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。肠道病毒通用引物,上游:5'-CCCTGAATCGCGCTAATCC-3',下游:5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3',探



A.TG 刺激 3、6、9 h 后的 GRP-78 表达量经 Western blot 检测结果。B:GRP-78vs actin 灰度扫描分析结果
实验独立进行 3 次,6 h 和 9 h 结果差异, $P < 0.001$

图 1 TG 刺激可诱导 HeLa 细胞的内质网应激的标志蛋白 GRP78 表达增加

A:The expression levels of GRP-78 and actin were detected by Western blot at 3, 6, and 9 h post stimulation.B: Gray scanning analysis of GRP-78 to actin. The experiment was repeated three times independently, 6 h and 9 h, $P < 0.001$

Fig.1 Effect of TG on GRP78 of ERS marker in HeLa cells

针:FAM-5'-AACCGA CTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC
-3'-TAMRA;actin 引物,上游:5'-GGACATCCGCAAA
GACCTGTA-3',下游:5'-TGCATCCTGTCCGCAAT G-
3',探针:VIC-5'-CCAACACA GTGCTGTCT GGCGGC-
3'-TAMRA。

2 结果

2.1 毒胡萝卜素诱导细胞的内质网应激 Western blot 结果显示,当用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 TG 刺激 HeLa 细胞 3 h 后,HeLa 细胞的 GRP78 的表达未出现明显变化,而在刺激的 6 h 和 9h,TG 可诱导 HeLa 细胞的 GRP78 表达明显增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.001$,图 1)。

2.2 毒胡萝卜素促进了 CV-B3 病毒的复制 使用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 TG 刺激 CV-B3 病毒感染的 HeLa 细胞,通过 qRT-PCR 检测,并计算使用 TG 和不使用 TG 的病毒量的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,发现病毒感染 3 h 后,病毒量增加不明显。在感染的 6 h 和 9 h,与对照相比,病毒量增加了 2.5 倍和 158.6 倍(图 2)。因此,TG 可以诱导 CV-B3 病毒在 HeLa 细胞中扩增。

2.3 噬斑形成试验进一步验证了 TG 对病毒复制的促进 病毒接种细胞后,用 0.25、0.08、0.025 $\mu\text{mol/L}$ 的 TG 刺激后,与对照组相比,噬斑的数量没有出现显著性变化,但病毒的噬斑明显增大。进一步说明 TG 促进了 CV-B3 病毒的复制(如图 3)。

2.4 毒胡萝卜素通过 ATF6 信号通路提高了病毒的复制率 细胞通过 3 种经典的途径激活 ERS,分别为 PERK、ATF6 和 IRE1。为了确认 TG 通过哪条通路激活 ERS 的途径,本研究在上述实验结果的基

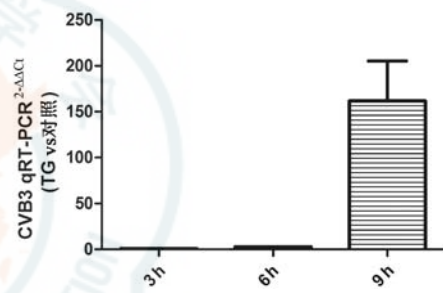


图 2 CV-B3 荧光定量检测显示 TG 刺激促进了 CV-B3 病毒的复制

Fig.2 TG promotes replication of CV-B3 through real time PCR detection

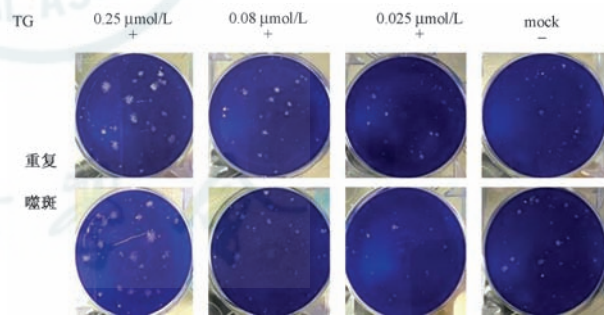


图 3 噬斑形成试验显示 TG 促进了病毒的复制

Fig.3 TG promotes CV-B3 replication through plaque formation

础上,分别加入内质网应激 3 条通路 PERK、ATF6 和 IRE1 的抑制剂 GSK2656157、AEBSF 和 STF-083010,通过 qRT-PCR 检测,并计算使用抑制剂和不使用抑制剂的病毒量的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,发现 PERK 的抑制剂 GSK2656157 和 IRE1 的抑制剂 STF-083010 均未显示明显抑制病毒的复制。而加入了 ATF6 的抑制剂 AEBSF,TG 对病毒复制率的促进作用出现明显的降低。相对于 TG 对 CV-B3 复制率的促进作用,AEBSF 作用 6 h 后,病毒增加量下降了 90%;AEBSF 作用 9 h 后,病毒增加量下降了 55%(图 4)。结果提示,TG 通

过 ATF6 途径促进 CV-B3 病毒的复制效率。

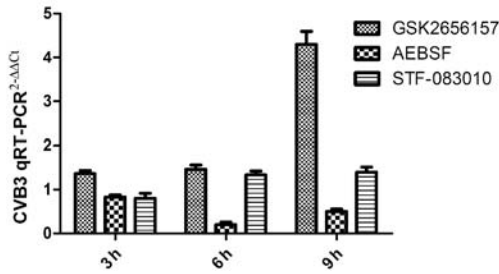


图4 CV-B3 荧光定量检测显示 ATF6 抑制剂 AEBSF 抑制了 TG 对 CV-B3 复制率的促进作用

Fig.4 Inhibitor AEBSF of ATF6 inhibited the promotion of TG to CV-B3 replication

3 讨论

GRP78 是 ERS 过程中重要的分子伴侣,在蛋白的折叠和组装过程中发挥着重要作用^[9]。本研究结果显示,毒胡萝卜素刺激细胞后,GRP78 表达明显增加,并且随着刺激时间的延长,表达量逐渐增多。实验结果显示,毒胡萝卜素能够诱导 HeLa 细胞 ERS 的产生。

小 RNA 病毒的翻译起始方式不同于真核细胞的依赖于帽样结构的翻译起始途径,而是通过依赖 IRES 序列的蛋白翻译起始途径。在正常生长状态下,机体更倾向于通过帽样结构依赖的起始途径合成蛋白。在应激状态下,帽样结构依赖的蛋白起始过程被抑制,而 IRES 依赖的起始途径则发挥着至关重要的作用^[10]。ERS 是病毒感染并诱发相关疾病的重要环节^[5]。CV-B3 病毒通过诱导细胞 ERS,抑制细胞蛋白的合成,同时促进自身蛋白的合成。而 TG 能够诱导 ERS 的产生,因此,HeLa 细胞在加入 TG 时,提前诱导了 ERS 的环境,为 CV-B3 病毒的复制提供了病毒蛋白合成的适合环境。本研究结果显示,在病毒感染的 6 h,病毒的复制开始增加,在病毒感染的 9 h,病毒复制量相较于对照增长了 158.6 倍,所以 TG 促进了 CV-B3 病毒的复制。通过噬斑实验,同样验证了该过程,CV-B3 的噬斑面积大大增加,也说明病毒的复制增加。通过两个实验都证明了毒胡萝卜素促进了病毒的复制过程。

ERS 会引发非折叠蛋白反应,它是细胞的保护性反应,它通过 4 种途径来减缓 ERS,使内质网和细胞恢复正常的生理状态。非折叠蛋白反应的保护性功能主要是由位于内质网的 3 个跨膜蛋白完成的,即 PERK、ATF6 和 IRE1。当细胞处于正常状态时,这 3

个蛋白与内质网伴侣蛋白葡萄糖调控蛋白 78×10^3 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 结合,处于静息状态。当内质网中错误折叠或者非折叠蛋白超载引起 ERS 时,PERK、ATF6 和 IRE1 分别与 GRP78 分离,随后各自激活,引起非折叠蛋白反应。为了了解 TG 通过哪条通路引起的 ERS 诱导病毒复制增加,本研究在实验体系中引入 ERS 的 3 条通路的抑制剂:PERK 抑制剂 GSK2656157,ATF6 抑制剂 AEBSF 和 IRE1 抑制剂 STF-083010。结果发现,PERK 抑制剂 GSK2656157 和 IRE1 抑制剂 STF-083010 没有对 TG 诱导的病毒复制产生显著影响,而 ATF6 的明显抑制剂 AEBSF 抑制了 TG 对病毒复制增强作用。因此,TG 可通过 ATF6 信号通路诱导 ERS 促进 CV-B3 病毒在 HeLa 细胞中的复制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 宋芹芹:参与酝酿和设计实验,采集,分析并解释数据,撰写文章;罗小暖:审阅文章,并给予指导和支持性贡献;宋娟、夏冬、史冰田、刘宓、夏志强、曹天宇、程恒顺:给予指导和支持性贡献;韩俊:酝酿和设计实验,分析并解释数据,对文章的知识性内容进行批评性阅读,给予研究经费

参考文献

- [1] 余保军,彭娜,古正涛,等.内质网应激和 Ca^{2+} 超载在热打击诱导的肺微血管内皮细胞损伤中的作用与机制[J].解放军医学杂志,2017,42(6):488-94. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2017.06.02.
- [2] Nuno C, Alexander D, Evekian G, et al. Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways[J]. Embo J, 2014, 32(9): 1214-24. DOI: 10.1038/emboj.2013.80.
- [3] Dalldorf G, Sickles GM. An Unidentified, Filtrable Agent isolated from the Feces of Children with Paralysis[J]. Science, 1948, 108(2794): 61-2. DOI: 10.1126/science.108.2794.61.
- [4] Melnick JL, Shaw EW, Curnen EC. A Virus isolated from Patients diagnosed as Non-Paralytic Poliomyelitis or Aseptic Meningitis[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1949, 71(3): 344-349. DOI: 10.3181/00379727-71-17186.
- [5] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3): 184-190. DOI: 10.1038/ncb0311-184.
- [6] Andm T C, Hall C B. Human Herpesvirus-6[J]. Clin Infect Dis, 2001, 33(6): 829-33. DOI: W01992001816 A1.
- [7] Jheng JR, Ho JY, Horng JT. ER stress, autophagy, and RNA viruses[J]. Front Microbiol, 2014, 5: 388. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00388.
- [8] Luo XN, Yao HL, Song J, et al. Coxsackievirus B3 Infection Triggers Autophagy through 3 Pathways of Endoplasmic Reticulum Stress[J]. Biomed Environ Sci, 2018, 31(12): 867-75. DOI:10.3967/bes2018.115.
- [9] Ji H, Fraser CS, Yu Y, et al. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(49): 16990-5. DOI:10.1073/pnas.0407402101.
- [10] Merrick WC. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems[J]. Gene, 2004, 332(1-2): 1-11. DOI: 10.1016/j.gene.2004.02.051.

(收稿日期:2019-04-09)

(本文编辑:唐涑英)