

EV71 诱导不完整的细胞自噬促进自身复制

刘子薇¹ 张文强² 宋绍霞² 赵丽¹ 王志玉¹ 温红玲¹

¹山东大学公共卫生学院 微生物检验学系 感染性疾病防控重点实验室(山东省“十三五”高校重点实验室), 济南 250012; ²山东省疾病预防控制中心 山东省传染病预防控制重点实验室, 济南 250012

通信作者: 温红玲, Email: wenhongling@sdu.edu.cn, 电话: 0531-88382625

【摘要】 目的 探讨肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)与细胞自噬之间的关系以及细胞自噬对病毒复制的影响。**方法** 用雷帕霉素、氯喹(chloroquine, CQ)、3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)对人横纹肌肉瘤细胞(rhabdomyosarcoma, RD)进行前处理,用 Western blot 和噬斑试验检测自噬的不同阶段对病毒复制的影响。**结果** EV71 感染能够诱导 RD 细胞发生不完整的自噬。CQ 处理组 EV71 的复制被促进,而雷帕霉素和 3-MA 处理组病毒的复制水平降低。mTOR 是影响 EV71 复制的关键分子,用雷帕霉素抑制 mTOR 可抑制病毒 RNA 的合成。**结论** 自噬的不同阶段对病毒复制的影响亦不同,抑制自噬溶酶体降解,病毒复制被促进,而抑制自噬早期阶段或促进自噬,病毒复制水平降低。mTOR 可在 RNA 水平上影响 EV71 的复制。

【关键词】 肠道病毒 71 型;细胞自噬;病毒复制;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2018MH035);山东省传染病预防控制重点实验室开放课题(2017KEYLAB02)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.05.001

EV71 induces incomplete cellular autophagy to promote self-replication

Liu Ziwei¹, Zhang Wenqiang², Song Shaoxia², Zhao Li¹, Wang Zhiyu¹, Wen Hongling¹

¹Department of Microbiological Laboratory Technology, School of Public Health, Shandong University, Key Laboratory for the Prevention and Control of Infectious Diseases (Key Laboratory of the "13th Five-Year Plan" University of Shandong), Jinan 250012, China; ²Shandong Center for Disease Control and Prevention; Shandong Provincial Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Jinan 250012, China

Corresponding author: Wen Hongling, Email: wenhongling@sdu.edu.cn, Tel: 0086-531-88382625

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between enterovirus 71 (EV71) and autophagy and the effect of autophagy on viral replication. **Methods** RD cells were pretreated with rapamycin, Chloroquine (CQ) and 3-methyladenine (3-MA). The effects of different stages of autophagy on viral replication were detected by Western blotting and plaque assay. **Results** The study showed that EV71 infection could induce incomplete autophagy in RD cells. Replication of EV71 was promoted in the CQ treatment group, while the level of replication of the rapamycin and 3-MA treatment groups was reduced. Further studies have shown that mTOR is a key molecule affecting EV71 replication, and inhibition of mTOR by rapamycin can inhibit the synthesis of viral RNA. **Conclusions** The effects of different stages of autophagy on viral replication are also different. Inhibition of autophagic lysosome degradation promotes viral replication, while inhibition of the early stage of autophagy or promotion of autophagy reduces the level of viral replication. mTOR can affect the replication of EV71 at RNA level.

【Key words】 Enterovirus 71; Autophagy; Viral replication; mTOR

Fund programs: Shandong Natural Science Foundation (ZR2018MH035); Shandong Province Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (2017KEYLAB02)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.05.001

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)主要发生在 4 岁以下儿童,通常具有自限性,而

EV71 引起的 HFMD 常常伴有严重的中枢神经系统并发症。然而,目前其致病机制仍不明确。细胞自

噬是维持细胞稳态的重要过程,开始于成核现象,随着膜的延伸闭合形成具有双层膜结构的自噬体。自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体。最后,在自噬溶酶体内降解底物,微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 是自噬泡的标志,多功能泛素结合蛋白 p62 是自噬过程中的一个特殊的底物,并通过自噬-溶酶体途径降解。大量研究表明肠道病毒感染可诱导宿主细胞自噬。EV71 可在 RD 细胞中诱导自噬和 caspase 依赖性凋亡^[1]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 被认为是细胞生长、增殖、存活以及代谢的重要稳态调节因子,可以上调蛋白质、脂质合成并抑制过度自噬。研究发现 mTOR 与病毒感染诱导的细胞自噬密切相关。然而,细胞自噬对病毒复制的影响以及细胞自噬影响病毒复制的机制仍需进一步探究。

本研究通过使用 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA)、氯喹 (chloroquine, CQ) 分别抑制自噬早期阶段和自噬溶酶体降解,并用雷帕霉素激活自噬,来探究细胞自噬各个阶段对 EV71 复制的影响,并进一步研究激活自噬后影响病毒复制的机制,为探究 EV71 致病机制以及抗病毒药物的研发提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒 EV71 重症毒株 SDLY107 分离自山东临沂市 HFMD 死亡病例,轻症毒株 SDJN2015-01 分离自山东济宁市 HFMD 轻症病例。RD 细胞为山东省疾病预防控制中心惠赠,病毒均以 MOI=1 的接毒量感染细胞。

1.2 材料 LC3B (Cell Signaling Technology, 2775)、p62 (Abcam, 56416)、EV 71 (Abcam, 169442)、 β actin (ZSGB-BIO)、anti-GAPDH (Proteintech, 60004)、mTOR (Cell Signaling Technology, 2983)、phospho-mTOR (Cell Signaling Technology, 5536)、HRP 标记的山羊抗鼠或抗兔的 IgG 抗体购自中杉金桥生物技术公司。

氯喹 (Chloroquine, CQ)、3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3-MA)、雷帕霉素均购自 Sigma 公司; DMSO 购自 Solarbio 公司; SDS-PAGE 凝胶试剂盒购自 Solarbio 公司; 硝酸纤维素膜 (NC) 0.22 μ m 购自 Millipore 公司; 蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; 逆转录试剂盒购自

Toyobo 公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (Light Cycler 480 SYBR Green I Master) 购自 Roche 公司; 其他试剂为国产化学分析纯试剂。

1.3 药物处理 6 孔板或 96 孔板接种细胞后,加入含有相应处理剂的溶液处理: CQ (抑制自噬溶酶体降解) 溶于 MEM, 工作液浓度为 20 μ mol/L; 3-MA (抑制自噬早期阶段) 溶于 MEM, 工作液浓度为 50 μ mol/L; 雷帕霉素 (促进自噬) 溶于 DMSO, 工作液浓度为 10 nmol/L。药物处理细胞 2 h 后,再用病毒感染细胞。

1.4 Western blot 细胞裂解变性处理后,BCA 法定量,取 30 μ g 蛋白样品进行 SDS PAGE 电泳,湿法转膜至 NC 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,再分别与对应的一抗结合,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 遍,然后再与 HRP 标记的山羊抗鼠或抗兔的 IgG 抗体室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 遍, ECL 显色。

1.5 空斑法检测病毒滴度 RD 细胞接种至 12 孔板,用梯度稀释的病毒感染细胞。每天观察细胞病变情况,至不再有新的噬斑形成。多聚甲醛室温固定细胞 20 min,结晶紫染色 30 min,计数噬斑。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测病毒 RNA 含量 分别提取培养上清及总的病毒 RNA,反转录成 cDNA,使用 qRT-RT-PCR 进行定量检测,试剂盒为 Light Cycler 480 SYBR Green I Master,引物如表 1 所示。获得 Ct 值后,通过标准曲线计算病毒 RNA 模板量。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Tab.1 Primers used for real-time fluorescence quantitative PCR

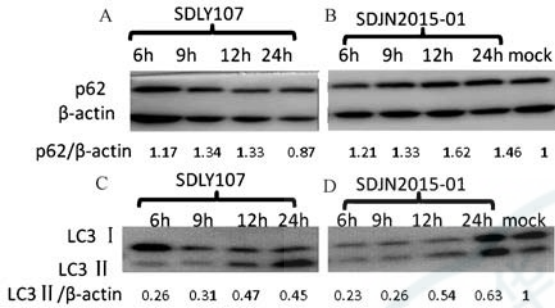
引物名称	引物序列 5'-3'	PCR 产物大小
EV71-S	GCAGCCCAAAGAACTTCAC	226 dp
EV71-A	ATTTCAGCAGCTTGAGTGC	

1.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。采用 *t* 检验比较雷帕霉素、CQ、3-MA 对病毒复制及细胞损伤率的影响, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EV71 感染能在 RD 细胞中诱导自噬 EV71 感染 RD 细胞,分别在感染后 6 h、9 h、12 h、24 h 收获细胞蛋白, Western blot 检测细胞内自噬相关蛋白 LC3、p62 的变化。2 株病毒在感染 RD 细胞后, p62 均呈现先上升后下降的趋势而 LC3 II 含量随着感染时间延长而上升 (图 1)。说明 SDLY107 株

以及 SDJN2015-01 株均可诱导 RD 细胞自噬,并抑制自噬溶酶体的降解。但 SDLY107 株感染 RD 细胞 12 h 后,LC3 II 含量有下降趋势,说明 SDLY107 株感染 RD 细胞后,先是抑制自噬溶酶体降解,而后是诱导正常的细胞自噬。而 SDAJN2015-01 株感染 RD 细胞后,24 h 内诱导的均是不完整的细胞自噬。



注:A:SDLY107 株感染 RD 细胞后,Western blot 检测细胞内 p62 含量的变化;B:SDLY107 株感染 RD 细胞后,Western blot 检测细胞内 LC3 含量的变化;C:SDJN2015-01 株感染 RD 细胞后,Western blot 检测细胞内 p62 含量的变化;D:SDJN2015-01 株感染 RD 细胞后,Western blot 检测细胞内 LC3 含量的变化

图 1 RD 细胞感染病毒后 Western blot 检测自噬相关蛋白
Note: A: SDLY107 strains were infected with RD cells, the content of p62 was detected by Western blot; B: SDLY107 strains were infected with RD cells, the content of LC3 was detected by Western blot; C: SDJN2015-01 strains were infected with RD cells, the content of p62 was detected by Western blot; D: SDJN2015-01 strains were infected with RD cells, the content of LC3 was detected by Western blot

Fig.1 Autophagy-associated protein was detected by Western blot after RD cells were infected with virus

2.2 细胞自噬影响 EV71 的复制 为探究细胞自噬对 EV71 复制的影响,本研究分别用 CQ、3-MA、雷帕霉素对细胞进行前处理,感染病毒 24 h 后收获细胞蛋白。结果显示 CQ 抑制自噬溶酶体降解后,细胞内病毒 VP1 含量升高,而雷帕霉素促进细胞自噬后,细胞内 VP1 含量明显降低。3-MA 抑制自噬早期阶段对细胞内 VP1 的含量没有明显影响(图 2)。用空斑法检测细胞培养上清病毒的滴度,结果显示 SDLY107、SDJN2015-01 感染用雷帕霉素、3-MA 处理过的细胞后,细胞培养上清中病毒的滴度降低,而感染用 CQ 处理过的细胞后,培养上清中病毒的滴度虽然低于对照组,但却比其他处理组高(图 3)。抑制自噬溶酶体的降解有利于病毒的复制,而抑制自噬早期阶段或促进自噬,

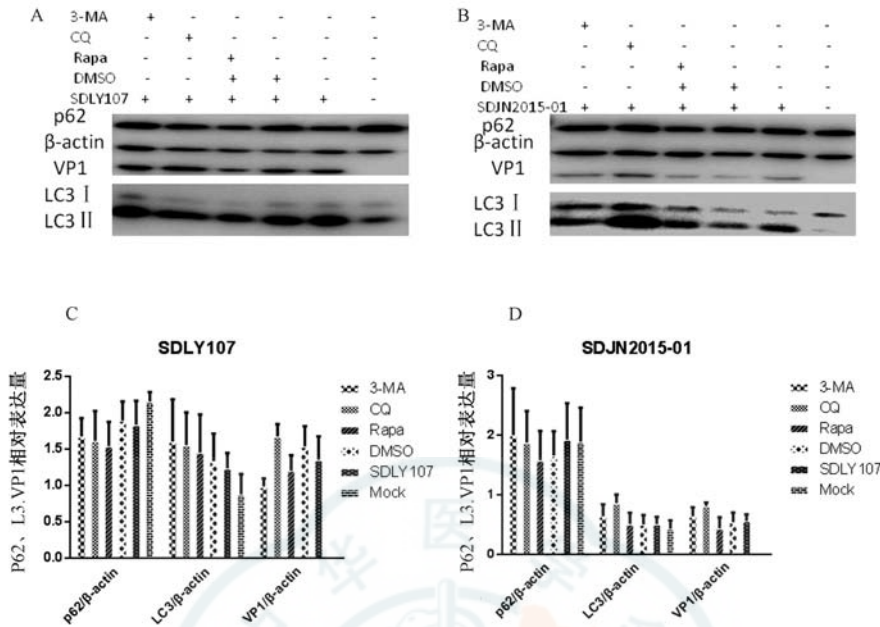
病毒的复制减弱。

2.3 mTOR 是细胞内影响 EV71 复制的关键信号分子 mTOR 信号通路参与调节细胞存活、细胞生长、细胞代谢、蛋白质合成、细胞自噬以及细胞稳态^[2]。RD 细胞感染 SDLY107 株后,于 6 h、9 h、12 h、24 h 收获细胞蛋白,并用 Western blot 检测细胞内 mTOR 与磷酸化 mTOR(p-mTOR)的变化。随着感染时间延长,细胞内 p-mTOR 水平降低(图 4)。用雷帕霉素对细胞进行前处理,感染 SDLY107 株 12 h 后收获细胞蛋白,检测细胞内 VP1 含量变化,同时提取细胞培养上清及总的病毒 RNA,检测病毒 RNA 含量。结果表明,雷帕霉素抑制 mTOR 后,细胞内 p-mTOR 水平降低,病毒 VP1 蛋白含量减少(图 5 A)。且抑制 mTOR 后,病毒 RNA 的合成降低(图 5 B)。说明 mTOR 可在 RNA 水平上影响病毒的复制。

3 讨论

EV71 是重症 HFMD 的主要病原体,而目前尚没有特效的治疗药物。细胞自噬是维持细胞稳态的重要过程,多项研究表明细胞自噬在病毒的感染与免疫中发挥着重要作用。本研究证明 EV71 感染可以诱导 RD 细胞自噬,并抑制自噬溶酶体降解。EV71 感染 RD 细胞后,自噬反应被快速激活,细胞内 LC3 II 含量随时间上升,p-62 水平先上升而后却下降。研究表明,在 CVB3 感染后,SQSTM1 可被病毒蛋白酶 2 A (pro)裂解。由此产生的 SQSTM1 裂解片段不再是自噬的底物,其形成蛋白聚集体的能力大大降低^[3]。感染后期 p-62 水平降低可能与病毒 2 A 蛋白酶活性有关。

自噬是一个保守的分解代谢过程,对细胞的稳态至关重要。有证据表明,多种病毒可以调控自噬以有利于自身的复制^[4]。研究发现,EV71 诱导 NSC-34 细胞发生自噬,促进病毒的复制和非裂解性释放^[5]。Lee 等^[6]研究表明,EV71 感染人神经母细胞瘤细胞(human neuroblastoma)SK-N-SH 可诱导自噬内涵体的形成以及自噬流发生,且抑制自噬后,病毒滴度降低。本研究发现抑制自噬的早期阶段,病毒复制被抑制,细胞培养上清中病毒滴度降低;抑制自噬溶酶体降解能促进 EV71 的复制;用雷帕霉素促进自噬时,病毒复制被抑制,病毒滴度降低。说明细胞自噬的不同阶段对 EV71 的复制有不同影响。细胞自噬以及其他先天免疫反应的激活是抵御病原

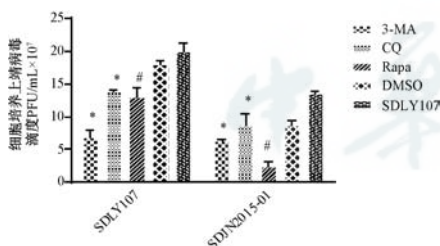


注:A;SDLY107 感染用 3-MA、CQ、雷帕霉素处理的 RD 细胞后,Western blot 检测自噬相关蛋白及 VP1 的蛋白;B;SDJN2015-01 感染 RD 细胞后,Western blot 检测自噬相关蛋白及 VP1 蛋白;C: SDLY107 感染用 3-MA、CQ、雷帕霉素处理的 RD 细胞后,细胞内自噬相关蛋白及 VP1 蛋白含量变化;D;SDJN2015-01 感染 RD 细胞后,细胞内自噬相关蛋白及 VP1 蛋白含量变化

图 2 3-MA、CQ、雷帕霉素处理细胞后,Western blot 检测自噬相关蛋白及 VP1

Note: A;SDLY107 infected RD cells treated with 3-MA, CQ and rapamycin, autophagy-related protein and VP1 protein were detected by Western blot;B;SDJN2015-01 infected RD cells treated with 3-MA, CQ and rapamycin, autophagy-related protein and VP1 protein were detected by Western blot;C:Changes of autophagy-related protein and VP1 protein content in RD cells after SDLY107 infection;D:Changes of autophagy-related protein and VP1 protein content in RD cells after SDJN2015-01 infection

Fig.2 3-MA, CQ, rapamycin treatment of cells, Western blot was used to detect autophagy-associated protein and VP1



注:3-MA、CQ、雷帕霉素处理细胞后,空斑法检测培养上清病毒滴度,* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与 DMSO 处理组相比,Rapa 代表雷帕霉素

图 3 3-MA、CQ、雷帕霉素处理细胞后,检测培养上清病毒滴度
Note: 3-MA, CQ, rapamycin treatment of cells, plaque assay for culture supernatant virus titer CQ, rapamycin; * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with the DMSO-treated group. Rapa stands for rapamycin

Fig.3 Cells were treated with 3-MA, CQ and rapamycin, and then viral titer in culture supernatant

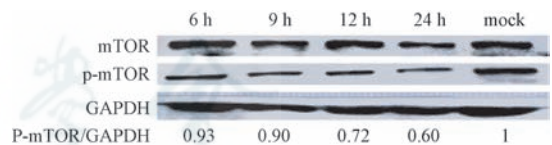
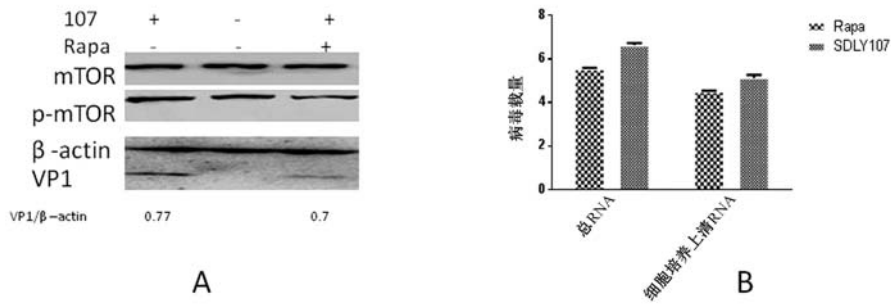


图 4 SDLY107 株感染 RD 细胞后细胞内 p-mTOR 水平变化
Fig.4 Changes of intracellular p-mTOR levels in SDLY107 infected RD cells

忆等多种途径增强宿主防御机制^[7-9]。有些 RNA 病毒通过阻止自噬体的降解来稳定自噬体。人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV)就可以阻断被感染巨噬细胞的自噬体成熟^[10]。这与本研究中 EV71 在 RD 细胞中诱导的自噬类似。当病毒诱导的自噬被促进时,自噬体的降解以及病原体的清除加速。因此雷帕霉素处理细胞后病毒复制力降低而 CQ 抑制自噬溶酶体降解后却得到相反的结果。EV71 感染在体内和体外均可诱导自噬反应,但其确切机制尚不清楚。PI3K/Akt/mTOR 信号通路在调节自噬过程中发挥

体感染的第一道防线。自噬可通过直接消灭入侵的病原体、处理抗原调节适应性免疫、诱导先天免疫记



注: Rapa 代表雷帕霉素 A: 雷帕霉素处理细胞后细胞内 VP1 水平变化; B: qRT-RT-PCR 检测病毒 RNA 量

图 5 雷帕霉素处理细胞后, 检测细胞内病毒含量

Note: Rapa stands for rapamycin A: Changes in intracellular VP1 levels after rapamycin treatment of cells; B: qRT-RT-PCR detection of viral RNA

Fig.5 Detection of intracellular viral content after cells treated with rapamycin

着重要作用^[14]。本研究表明 mTOR 信号分子与 EV71 的复制关系密切。雷帕霉素抑制 mTOR 后细胞损伤率、细胞内病毒 VP1 蛋白含量、培养上清滴度均降低。此外, 本研究证明抑制 mTOR 可在 RNA 水平上抑制病毒的合成。

综上所述, 本研究证明 EV71 可诱导 RD 细胞发生自噬, 并抑制自噬溶酶体的降解以促进自身复制。自噬的不同阶段对 EV71 的复制有不同影响, 抑制自噬早期阶段或促进自噬, 病毒复制被抑制, 而抑制自噬溶酶体的降解则有利于病毒的复制。EV71 的复制与 mTOR 信号分子关系密切, 抑制 mTOR 可抑制 EV71 RNA 的合成。细胞自噬与病毒的感染与免疫是相互作用的动态过程, 其相互作用的具体机制仍需进一步探究。本研究为 EV71 致病机制的研究以及抗病毒药物的研发提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘子薇: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章; 张文强: 支持性贡献; 宋绍霞: 支持性贡献; 赵丽: 支持性贡献; 王志玉: 支持性贡献; 温红玲: 酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、指导参考文献

参考文献

[1] Xi X, Zhang X, Wang B, et al. The interplays between autophagy and apoptosis induced by enterovirus 71 [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (2): e56966. DOI: 10.1371/journal.pone.0056966.

[2] Watanabe R, Wei L, Huang J. mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets [J]. *J Nucl Med*, 2011, 52 (4): 497-500. DOI: 10.2967/jnumed.111.089623.

[3] Shi J, Wong J, Piesik P, et al. Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NFκB signaling [J]. *Autophagy*, 2013, 9 (10): 1591-603. DOI: 10.4161/aut.26059.

[4] Kembal CC, Alirezaei M, Flynn CT, et al. Coxsackievirus infection induces autophagy-like vesicles and megaphagosomes in pancreatic acinar cells in vivo [J]. *J Virol*, 2010, 84 (23): 12110-12124. DOI: 10.1128/jvi.01417-10.

[5] Too IH, Yeo H, Sessions OM, et al. Enterovirus 71 infection of motor neuron-like NSC-34 cells undergoes a non-lytic exit pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36983. DOI: 10.1038/srep36983.

[6] Lee YR, Wang PS, Wang JR, et al. Enterovirus 71-induced autophagy increases viral replication and pathogenesis in a suckling mouse model [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21: 80. DOI: 10.1186/s12929-014-0080-4.

[7] Henault J, Martinez J, Riggs JM, et al. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes [J]. *Immunity*, 2012, 37 (6): 986-997. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.014.

[8] Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy [J]. *Science*, 2005, 307 (5709): 593-596. DOI: 10.1126/science.1104904.

[9] Buffen K, Oosting M, Quintin J, et al. Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to intravesical BCG therapy for bladder cancer [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10 (10): e1004485. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004485.

[10] Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages [J]. *J Cell Biol*, 2009, 186 (2): 255-268. DOI: 10.1083/jcb.200903070.

[11] Heras-Sandoval D, Perez-Rojas JM, Hernandez-Damian J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. *Cell Signal*, 2014, 26 (12): 2694-2701. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.08.019.

(收稿日期: 2019-09-29)

(本文编辑: 陈培莉)