

研究报告

禽流感病毒 NS1 蛋白对细胞的影响

赵莉霞, 张莹莹, 杨志新, 许龙, 杨予涛, 于孟斌, 王荣, 周晓巍, 黄培堂

军事医学科学院生物工程研究所 蛋白质工程实验室, 北京 100071

摘要: NS1 蛋白为流感病毒非结构蛋白, 只在病毒侵入宿主细胞后产生。目前 NS1 蛋白对细胞整体水平上的作用仍不清楚, 为了解 NS1 蛋白在病毒感染细胞中的作用, 构建了重组质粒 pCMV-myc-NS1 并将其转染 A549 细胞, 利用双向电泳技术检测了受 NS1 蛋白调控的宿主蛋白, 以期从蛋白质组水平上研究禽流感病毒与宿主细胞间的相互作用。同时, 还检测了转染 NS1 对细胞增殖和细胞周期的影响。结果显示, NS1 在细胞中的表达, 能够明显引起宿主细胞代谢的变化, 并通过阻滞细胞周期的正常进行而减缓细胞的增殖。

关键词: NS1 蛋白, 宿主细胞, 双向电泳, 细胞增殖, 细胞周期

Effect of Influenza Virus NS1 Protein on Host Cell

Lixia Zhao, Yingying Zhang, Zhixin Yang, Long Xu, Yutao Yang, Mengbin Yu, Rong Wang, Xiaowei Zhou, and Peitang Huang

Laboratory of Protein Engineering, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Abstract: NS1 is a non-structural protein of the influenza A virus, which could only be expressed when cells are infected. The effect of NS1 protein on host cell is still not clear. To understand the role of NS1 protein in cell infection, recombinant plasmid pCMV-myc-NS1 was constructed, and then transfected into A549 cells. Two-dimensional electrophoresis was employed to analyze proteins regulated by NS1 that could reflect the interaction between influenza virus and host cells at the protein level. The influence of NS1 on cell proliferation and cell cycle was also studied. The result showed that not only could NS1 remarkably affect metabolism, but it could also slow down cell proliferation through blocking cell cycle.

Keywords: NS1, host cell, two-dimensional electrophoresis, cell proliferation, cell cycle

禽流感的广泛流行不仅给养禽业及相关产业造成巨大的经济损失, 而且禽流感可感染人类并致人死亡。我国自 2005 年 10 月发生了首例人感染禽流感以来, 迄今为止共发生了 30 例确诊病例, 其中死亡 20 例, 病死率 66.67%。

NS1 蛋白是具有 202~237 个氨基酸的禽流感病毒非结构蛋白, 其序列在病毒株系间有差异。NS1

蛋白有 2 个功能区: 位于 N 端的 RNA 结合区和位于 C 端的效应区。NS1 与 RNA 结合发挥以下作用: 与 polyA 结合, 抑制 mRNA 的运输^[1,2]; 与 U6 SnRNA 结合, 抑制 Pre-mRNA 的剪接^[2,3]; 与 dsRNA 结合, 阻断 PKR 的活性^[4]; 与 5'端的 UTR 结合, 刺激病毒 mRNA 的翻译^[5,6]。效应区与不同蛋白分子结合具有以下作用: 与 PACT 结合抑制 PKR 的活化^[4]; 与

Received: May 3, 2008; **Accepted:** June 19, 2008

Supported by: the National Key Technology R & D Program (No. 2006BAD06A01).

Corresponding author: Peitang Huang. Tel: +86-10-66948832; Fax: +86-10-66948833; E-mail: amms832@126.com

国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD06A01)资助。

CPSF 和 PABII 结合抑制干扰素的生成^[7,8]; 与 p85 β 结合活化 PI3K 信号通路^[9,10]。NS1 蛋白还具有诱导细胞凋亡^[11,12]和抑制细胞凋亡^[13]的双重作用。

NS1 蛋白在流感病毒复制早期大量表达, 提示这种蛋白在流感病毒复制及与细胞蛋白的相互作用中发挥着重要作用。目前认为, 血凝素和神经氨酸酶两种蛋白在流感病毒感染细胞过程中发挥关键作用, 而 NS1 蛋白则决定了病毒在宿主细胞内的破坏作用。因此, 研究 NS1 蛋白与宿主细胞的相互作用, 对阐明病毒引起疾病的机理具有相当重要的作用。本研究中利用双向电泳技术和相关细胞生物学技术, 检测了 NS1 蛋白的表达对宿主细胞代谢、增殖和周期的影响, 为进一步研究禽流感病毒与宿主相互作用机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 及质粒 pCMV-myc、pEGFP-N3 由本实验室保存。来源于 A/goose/Jilin/hb/2003 (H5N1) 毒株 NS1 基因的重组质粒 pEGFP-N3-NS1 由本室张传福构建。

1.1.2 细胞系

A549、293FT、CV-1 和 NIH3T3 细胞由本实验室保存。

1.1.3 试剂

DMEM 购自 Gibco 公司; McCoy's 5A 购自 HyClone 公司; 胎牛血清购自 Biochrom 公司; 脂质体 LipopectamineTM2000 和 pH4~7、长 24 cm 的 IPG 干胶条购自 Invitrogen 公司; Taq Plus I 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司; T4 DNA 连接酶、Sal I 和 Not I 限制性内切酶购自 NEB 公司; 2-D Quant Kit、2-D Clean-Up Kit 及蛋白分子量标准购自 Amersham 公司; 二硫苏糖醇(DTT) 购自 Promega 公司; 碘乙酰胺购自 Merck 公司; 硫脲和尿素购自 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自中杉金桥生物公司; DNA marker III、DNA 快速纯化/回收试剂盒及质粒快速提取试剂盒购自天根生化公司; DNA 序列合成及测定由北京奥科生物技术有限责任公司完成; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 NS1 基因的获得及表达载体的构建

以重组质粒 pEGFP-N3-NS1 为模板, 表 1 所列序列为正反向引物, 扩增 NS1 基因。分别在上游引物中加入 Sal I 和 Not I 限制性酶切位点。用 Sal I 及 Not I 双酶切 PCR 产物和 pCMV-myc 载体, 电泳纯化并回收 NS1 基因和线性化的载体, T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定并测序。测序正确后, 提取重组质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward	ACGC GTCGACC ATGGATCCCAACTGTGTC
Reverse	TT GCGGCCGC TCAAACCTTCTGACTCAATTG

1.2.2 细胞培养

A549 细胞用含 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基, 293FT、CV-1 和 NIH3T3 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 温箱。

1.2.3 细胞转染与收集

使用脂质体 LipopectamineTM2000 进行细胞转染。将 8 μ g DNA 和 20 μ L 脂质体 LipopectamineTM2000 分别稀释于 1 mL 不含血清及抗生素的培养基中, 5 min 后将两者混合, 室温放置 20 min。将上述脂质体-DNA 混合物加到汇合度达 90% 的细胞中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 温箱中培养 4 h~6 h 后, 换成含 10% FBS 的培养基继续培养 24 h。弃去培养液, 用 10 mL PBS 轻轻洗涤 2 次, 然后加入 1 mL PBS, 细胞刮刀刮下细胞, 1000 r/min(Sigma 3K12 离心机, 11133 号转子)离心 5 min 收集细胞。

1.2.4 免疫印记

SDS-PAGE 结束后, 用半干转印法将蛋白转移至 PVDF 膜, 将膜于 20 mL 含 5% 脱脂奶粉的 TBST (25 mmol/L pH 7.5 Tris, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 中室温封闭 2 h。以抗 Myc 标签抗体 (1:5000 稀释) 为一抗, 室温孵育 2 h。TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。之后, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:5000 稀释) 为二抗进行杂交, 室温孵育 1 h。漂洗后用 DAB 显色。

1.2.5 细胞总蛋白的提取与浓度测定

细胞中加入 0.5 mL 裂解液 (7 mol/L 尿素+2 mol/L

硫脲+4% CHAPS)和 10 μ L 100 \times 蛋白酶抑制剂, 混匀后于冰浴中超声 1 min(Sonic 超声仪, 脉冲 2 s 隔 10 s)。用 2-D Quant Kit 测定蛋白浓度, 2-D Clean-Up Kit 纯化细胞总蛋白。

1.2.6 双向电泳^[14,15]

第一向等电聚焦用 pH 4~7、长 24 cm 的 IPG 干胶条, 蛋白上样量为 1.0 mg, 体积 450 μ L, 加入 IPG 缓冲液至终浓度为 0.5%, 等电聚焦至电压时间乘积为 80 000 Vh。等电聚焦结束后分别用加 1% DTT 和加 2.5%碘乙酰胺的平衡缓冲液(75 mmol/L pH 8.8 Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, 2% SDS, 30%甘油)振荡平衡胶条各 15 min。平衡后的胶条转移至 24 cm \times 20 cm \times 0.1 cm、12.5%的 SDS-PAGE 凝胶, 恒流 60 mA 进行第二向电泳。电泳结束后, 用 G-250 胶体染色法对凝胶进行染色, ImageScanner 扫描仪扫描记录结果。ImageMaster 2D Elite3.1 双向电泳凝胶图像分析软件分析实验结果。实验重复 3 次, 所得差异点的肽质量指纹图谱分析由军事医学科学院仪器测试分析中心完成。

1.2.7 MTT 实验

将 CV-1 细胞接种于 24 孔板, 待汇合度达 90% 时, 分别转染 pCMV-myc 和 pCMV-myc-NS1 载体并培养 48 h。每孔中加入 50 μ L MTT(5 mg/mL in PBS) 溶液, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h 后小心吸弃培养基, 加入 DMSO 溶液室温振荡 30 min 充分溶解紫色结晶。酶标仪 570 nm 波长检测 OD 值。每种转染细胞设置 3 个平行孔, OD 值取其平均值。

1.2.8 细胞周期测定

将 pEGFP-N3 空载体和重组质粒 pEGFP-N3-NS1 分别转染 293FT、NIH3T3 及 CV-1 细胞, 24 h 后胰酶消化并收集细胞。用 6.5 mL DMEM 加 3.5 mL 70%乙醇重悬细胞, 于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。然后, 500 \times g 离心收集细胞, 用 7 mL PBS 加 3 mL 2% FBS-DMEM 洗细胞 1 次, 然后将细胞重悬于染色液(含 20 mg/mL PI 及 0.5 mg/mL RNase 的 PBS 溶液)中置 37 $^{\circ}$ C 染色 15 min, 流式细胞仪分析细胞周期。

2 结果

2.1 重组质粒的构建及表达

以 pEGFP-N3-NS1 重组质粒为模板扩增 NS1 基因, 将其连入经相同酶切的 pCMV-myc 表达载体中,

经 PCR 鉴定和序列测定, 结果与文献报道的 NS1 基因序列相一致。NS1 基因的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 基因大小为 678 bp。将重组质粒 pCMV-myc-NS1 及 pCMV-myc 转染 A549 细胞后, Western blotting 结果表明, NS1 蛋白在细胞中得到了表达(图 2)。

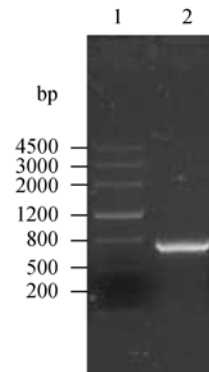


图 1 NS1 基因的扩增
Fig. 1 Amplification of NS1 gene

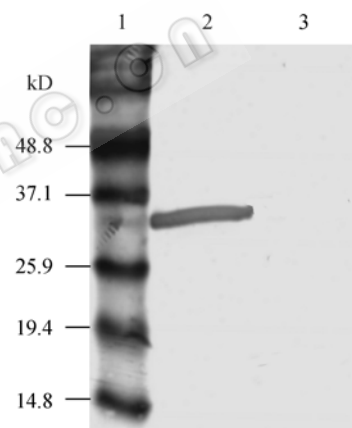


图 2 NS1 重组蛋白在细胞中的表达
Fig. 2 Western blotting analysis of the expression of NS1 protein

1: protein marker; 2: pCMV-myc-NS1/A549; 3: pCMV-myc/A549

2.2 NS1 在细胞中的表达影响代谢

将质粒 pCMV-myc-NS1 和 pCMV-myc 转染 A549 细胞后, 提取细胞总蛋白, 用 pH 4~7、24 cm 胶条进行双向电泳。凝胶经胶体考马斯亮蓝染色后, 用 ImageMaster 2D Elite3.1 软件进行分析, 取蛋白丰度变化大于 1.8 倍的蛋白点作胶内酶切并进行 MALDI-TOF 鉴定。结果显示, 与转染空载体相比, 转染 NS1 基因后的细胞, 有 9 种蛋白表达上调, 6 种蛋白表达下调, 而 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 蛋白既上调又下调, 这种同一种蛋白在胶上表现出多个对应点可能是由于蛋白的修饰

表 2 肽质量指纹图谱分析结果
Table 2 Analysis of the peptide mass fingerprint

Number of spot	Name of protein	Accession No.	Score	Queries matched	Nominal mass	Calculated pI value
1	<u>GDP dissociation inhibitor 2</u>	Q5SX88_HUMAN	45	4	45590	4.40
3	MHC class I antigen	Q6L625_HUMAN	29	2	31726	5.71
4	pre-mRNA splicing factor	I54089	67	4	19318	11.64
5	isocitrate dehydrogenase (NAD)	S55282	58	7	39566	6.47
6	TALDO1 protein	Q8WV32_HUMAN	66	7	37385	6.35
7	<u>Triose-phosphate isomerase</u>	TPIS_HUMAN	98	8	26522	6.51
8	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)	Q567U4	116	12	46646	6.53
9	Glucose-6-phosphate 1- dehydrogenase	Q2VF42	125	14	54789	6.91
10	<u>Glucose-6-phosphate 1- dehydrogenase</u>	Q2VF42	125	14	54789	6.91
11	dihydropyrimidinase-related protein 2	JC5317	96	11	62255	5.95
12	t-complex-type molecular chaperone TCP1	S10486	125	15	60306	5.80
13	Beta-succinyl CoA synthetase	Q7Z503_HUMAN	52	5	43583	5.41
14	lamin C	VEHULC	86	14	65096	6.40

*underline indicated down-regulated protein, the others are up-regulated protein

或蛋白裂解造成。电泳结果如图 3 所示, 标记的点为在相应的胶面上表达变化的点, 变化点的蛋白质信息列于表 2。结果显示, 鉴定出的蛋白大多与代谢相关。

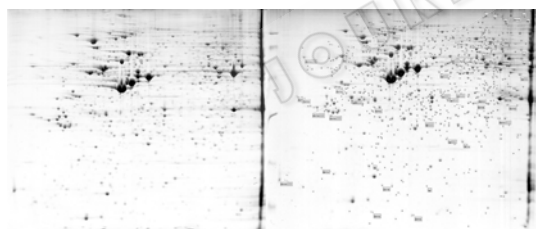


图 3 双向电泳图谱

Fig. 3 Representative 2-D gel image of A549 cell lysate
A549 cells transfected with pCMV-Myc(left) and pCMV-Myc-NS1(right). 111 indicated proteins varied at least 1.8-fold volume

2.3 NS1 在细胞中的表达减缓细胞增殖

双向电泳结果表明, 转染 NS1 后细胞的代谢发生变化。为了进一步检测其是否影响细胞的增殖, 我们采用了 MTT 法进行测定。结果表明(图 4), 转染 pCMV-myc-NS1 质粒后, 与转染 pCMV-myc 的细胞相比, 增殖速度减慢, 但变化不明显。

2.4 NS1 在细胞中的表达阻滞细胞周期正常进行

NS1 在细胞中的表达导致细胞代谢相关的蛋白

表达升高, 而 MTT 实验结果表明细胞增殖速度变慢, 进而我们推测 NS1 蛋白可能影响细胞周期的正常运转。为了证实这种可能性, 我们对 293FT、NIH3T3 和 CV-1 细胞分别转染重组质粒 pEGFP-N3-NS1 和 pEGFP-N3, 用流式细胞仪分析细胞周期的变化。结果表明, 与未转染的细胞及转染 pEGFP-N3 的细胞相比, 转染 NS1 后, 细胞周期发生变化, 分布于 G2-M 期(293FT 和 CV-1 细胞)及 S 期(NIH3T3 细胞)的细胞比例增加(图 5)。

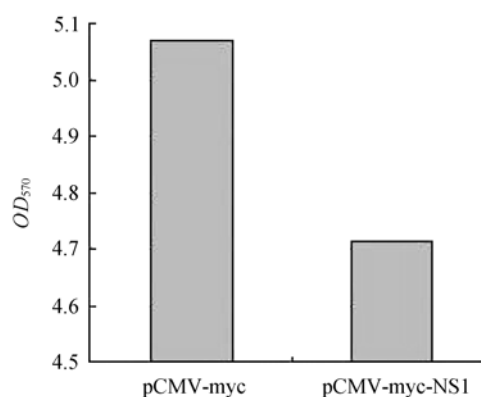


图 4 MTT 实验结果
Fig. 4 Cell viability MTT test

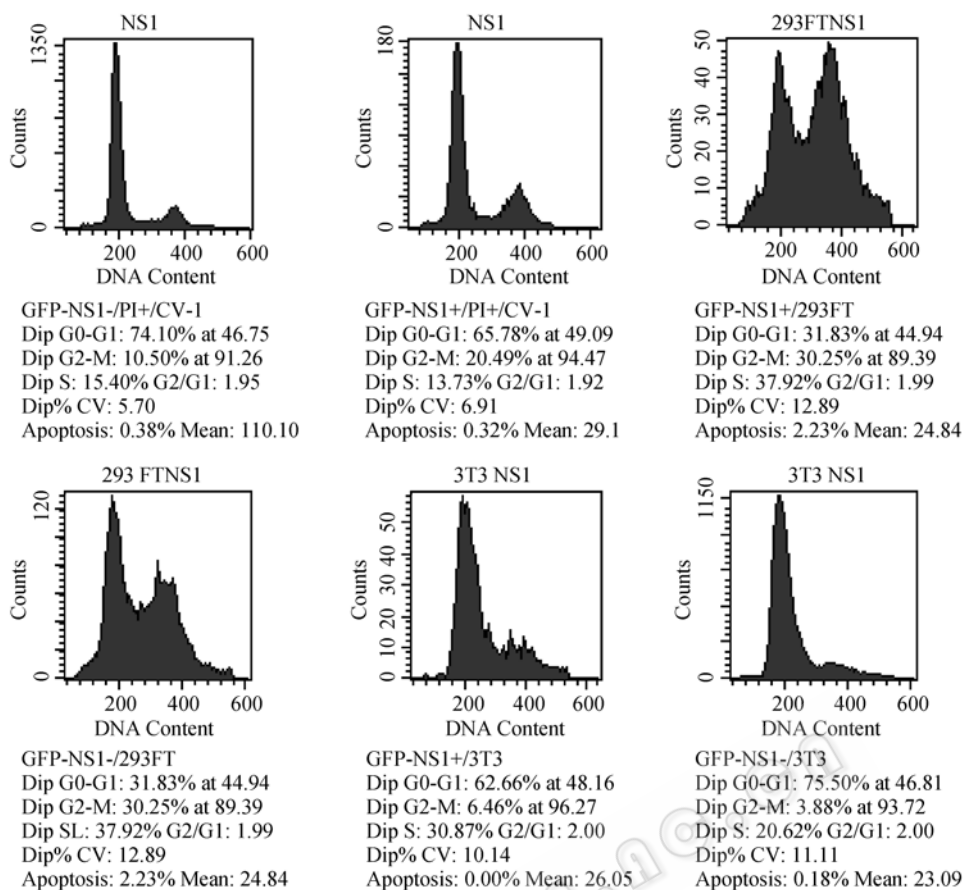


图 5 流式细胞仪分析细胞周期

Fig. 5 DNA flow cytometric analysis results of NIH3T3, CV-1 and 293FT cells transfected with pEGFP-NS1 and pEGFP respectively

3 讨论

在细胞凋亡方面, NS1 蛋白具有双重功能^[16]。在病毒整体水平上, NS1 蛋白具有抑制细胞凋亡的功能, 而单独表达 NS1 蛋白则能诱导细胞凋亡。本研究中所采用的 NS1 基因来源于 A/goose/Jilin/hb/2003(H5N1)病毒株, 我们已有的结果表明单独表达该病毒的 NS1 蛋白时并不能引起细胞凋亡。

双向电泳结果中, 对已鉴定的蛋白质点进行了分子量、pI 值与理论值的一致性分析, 结果大多数蛋白质点的实验值与理论值基本吻合。个别实验值与理论值差异较大, 推测可能主要是由于翻译后修饰或蛋白裂解造成。质谱鉴定的结果表明, 检测到的大多数蛋白与糖酵解、柠檬酸循环和戊糖磷酸途径相关, 表明 NS1 基因在细胞中的表达导致了细胞代谢发生变化。未检测到与细胞凋亡相关的蛋白。

文献报道 NS1 蛋白具有抑制 Pre-mRNA 剪接的

功能, 而我们的结果显示 NS1 在宿主细胞的表达导致了 mRNA 前体剪接因子的表达上升, 提示病毒在抑制宿主蛋白表达的同时, 宿主细胞可能通过促进 mRNA 前体剪接因子的表达而对抗病毒入侵造成的影响。二氢嘧啶相关蛋白 2 和 Lamin C 是与细胞骨架相关的 2 个蛋白, 二氢嘧啶相关蛋白 2 可通过与微管蛋白异二聚体结合促进微管形成, Lamin C 是核纤层的成分, 组成多细胞真核生物核骨架。NS1 在宿主细胞中表达可导致两者的表达升高, 提示细胞骨架相关蛋白可能在病毒感染宿主细胞及造成宿主细胞形态改变中发挥作用。

双向电泳结果显示, NS1 蛋白在宿主细胞中的表达还能够导致糖代谢和脂肪代谢过程的异常, 如参与糖代谢的异柠檬酸脱氢酶和参与脂肪代谢的乙酰辅酶 A 合成酶的表达升高。柠檬酸循环是三大营养素的最终代谢通路, 糖、脂肪和氨基酸均将最终进入柠檬酸循环而降解, 为氧化磷酸化反应提供还

原当量。异柠檬酸脱氢酶是柠檬酸循环中 3 个限速酶之一, 在催化循环中的第一次氧化脱羧反应中发挥重要作用。乙酰辅酶 A 合成酶是脂肪代谢过程中的一个关键酶, 负责催化脂肪酸的活化。两者表达量的升高表明, NS1 的表达导致了宿主细胞能量代谢活动的增强。双向电泳结果也显示, 参与戊糖磷酸途径的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和转二羟丙酮基酶的表达也发生改变, 尤其转二羟丙酮基酶的表达升高, 必将导致其催化产物甘油醛-3-磷酸和果糖-6-磷酸的含量升高, 从而增强糖酵解代谢途径, 也进一步证明了 NS1 的表达能够增强宿主细胞的能量代谢过程。

丙糖磷酸异构酶是糖酵解途径中一个重要酶, 果糖-1, 6-二磷酸的裂解产物二羟丙酮磷酸在其催化作用下转化成甘油醛-3-磷酸, 才能继续进入糖酵解途径。NS1 蛋白的表达能够导致丙糖磷酸异构酶表达量降低, 但丙糖磷酸异构酶催化的是一个可逆反应, 其酶量的改变并不能决定反应的方向。

MTT 及细胞周期测定结果表明, 转染 NS1 后细胞增殖速度减慢, 细胞周期阻滞。同时, 细胞周期测定结果显示, NS1 蛋白对不同类型细胞的细胞周期影响不同, 对于 293FT 和 CV-1 细胞主要阻滞于 G2-M 期(30.25%到 47.82%; 10.50%到 20.49%), 而对于 NIH3T3 细胞则主要阻滞于 S 期(30.87%到 20.62%), 这表明 NS1 对宿主细胞的影响可能因细胞类型的不同而具有不同的作用机制。

本研究的结果表明, NS1 将细胞阻滞在特定周期而延缓细胞增殖的同时, 却增强宿主细胞的代谢活动。

REFERENCES

- [1] Qiu Y, Krug RM. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol*, 1994, **68**: 2425–2432.
- [2] Fortes P, Beloso A, Ortin J. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J*, 1994, **13**: 704–712.
- [3] Lu Y, Qian XY, Krug RM. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, 1994, **8**: 1817–1828.
- [4] Li SD, Min JY, Krug RM, *et al.* Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*, 2006, **349**: 13–21.
- [5] Luna DL, Fortes SP, Beloso A. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol*, 1995, **69**: 2427–2433.
- [6] Enami K, Sato TA, Nakada S, *et al.* Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, 1994, **68**: 1432–1437.
- [7] Robert MK, Yuan WM, Diana L, *et al.* Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, 2003, **309**: 181–189.
- [8] Fernandez SA. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. *Infect Disord Drug Targets*, 2007, **7(4)**: 336–343.
- [9] Li Y, Anderson DH, Liu Q, *et al.* Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85 β , but not the p85 α , subunit of PI3K and upregulation of PI3K activity. *J Bio Chem*, 2008, in Press.
- [10] Hale BG, Jackson D, Chen YH, *et al.* Influenza A virus NS1 protein binds p85 β and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103(38)**: 14194–14199.
- [11] Schultz CS, Dybdahl SN, Neumann G, *et al.* Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, 2001, **75(17)**: 7875–7881.
- [12] Lam WY, Tang JW, Yeung AC, *et al.* Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. *J Virol*, 2008, **82(6)**: 2741–2751.
- [13] Zhirnov OP, Konakova TE, Wolff T, *et al.* NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol*, 2002, **76**: 1617–1625.
- [14] Tom B, Tirra S. 2-D Electrophoresis: using immobilized pH gradients, Principles & Methods. Amersham Biosciences, 1998.
- [15] Liao X, Zhu XD, Dang Y, *et al.* Analysis of cell membrane subproteome by biotinylation of proteins. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, **22(3)**: 247–251.
廖翔, 朱旭东, 党颖, 等. 通过生物素化标记分析细胞膜亚蛋白质组. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, **22(3)**: 247–251.
- [16] Morrissa SJ, Nightingalea K, Smithb H, *et al.* Influenza A virus-induced apoptosis is a multifactorial process: Exploiting reverse genetics to elucidate the role of influenza A virus proteins in virus-induced apoptosis. *Virology*, 2005, **335**: 198–211.