

• 生物技术与方法 •

## 可调控表达人博卡病毒1型非结构蛋白NS1稳定细胞系的建立及其反式转录激活作用初探

朱记平, 刘媛, 骆茹梦, 冯小婷, 李毅

武汉生物工程学院 湖北省病毒载体(基因治疗)工程技术研究中心, 湖北 武汉 430415

朱记平, 刘媛, 骆茹梦, 等. 可调控表达人博卡病毒1型非结构蛋白NS1稳定细胞系的建立及其反式转录激活作用初探. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1126-1134.

Zhu JP, Liu Y, Luo RM, et al. Establishment of stable cell line expressing human bocavirus type 1 non-structural protein NS1 and its *trans*-transcriptional activation. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 1126-1134.

**摘要:** 人博卡病毒1型(Human bocavirus 1, HBoV1)非结构蛋白NS1是多功能蛋白,对病毒复制有重要作用,同时可诱导宿主细胞凋亡。在研究NS1蛋白功能时,降低NS1蛋白对宿主细胞的毒性作用是急需解决的问题。基于此,文中建立了可调控表达HBoV1非结构蛋白NS1的稳定细胞系。构建NS1重组慢病毒质粒(含可调控启动子),应用转染试剂将NS1重组慢病毒质粒转染至HEK 293T细胞。通过嘌呤霉素筛选抗性细胞、多西环素诱导NS1表达,建立可稳定表达NS1-100、NS1-70蛋白的HEK 293T细胞系,利用荧光标记蛋白和Western blotting检测,确定NS1蛋白的表达。并在稳定表达NS1细胞系中转染HBoV1启动子-荧光素酶基因的质粒,分析NS1的反式转录激活活性。结果表明NS1蛋白可在建立的细胞系中稳定表达,且稳定表达NS1蛋白对HBoV1启动子有较强的激活活性,为进一步研究非结构蛋白NS1的功能及人博卡病毒致病机理奠定了良好的基础。

**关键词:** 人博卡病毒1型, NS1, 稳定表达细胞系, 反式转录激活

## Establishment of stable cell line expressing human bocavirus type 1 non-structural protein NS1 and its *trans*-transcriptional activation

Jiping Zhu, Yuan Liu, Rumeng Luo, Xiaoting Feng, and Yi Li

Hubei Engineering Research Center of Viral Vector, Wuhan University of Bioengineering, Wuhan 430415, Hubei, China

**Abstract:** Human bocavirus 1 (HBoV1) non-structural protein NS1 is a multifunctional protein important for virus replication and induction of apoptosis in host cell. To better understand the function of the NS1 protein, it is urgent to address reducing the toxicity of NS1 to host cells. In the present study, we established a stable cell line that regulates expression of

**Received:** December 4, 2018; **Accepted:** March 26, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31470268), Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2017CFB228).

**Corresponding author:** Yi Li. Tel: +86-27-89648113; E-mail: liyi@whsw.edu.cn

国家自然科学基金(No. 31470268), 湖北省自然科学基金(No. 2017CFB228)资助。

NS1 of HBoV1. The recombinant lentivirus plasmid containing a regulatable promoter fused with *ns1* gene was constructed and transfected into HEK 293T cells using transfection reagent. The HEK 293T cell lines stably expressing NS1-100 and NS1-70 proteins were established by screening resistant cells with puromycin and inducing NS1 expression with doxycycline. The expression of NS1 protein was determined by fluorescent labeling protein and Western blotting. HBoV1 promoter was transfected into stably expressing NS1 cell line and its *trans*-transcriptional activity was analyzed. The results showed that NS1 protein was expressed stably in the established cell lines and had a strong activation activity on the HBoV1 promoter driving luciferase gene. Taken together, this study provides a solid basis for further research on the function of NS1 and the pathogenesis of human bocavirus.

**Keywords:** human bocavirus 1, NS1, stable cell line, *trans*-transcriptional activation

人博卡病毒 1 型 (Human bocavirus 1, HBoV1) 主要感染 2 岁以下婴幼儿, 引起急性哮喘等严重呼吸系统疾病, 是婴幼儿呼吸道疾病的重要病原之一, 引起人们广泛关注。2005 年, Allander 等首次在幼儿呼吸道患者的样本中发现了 HBoV1<sup>[1]</sup>。随后, 在不同国家和地区的呼吸道患者的样本中均相继检出 HBoV1, 感染率为 2%–19%, 其中在 2 岁以下婴幼儿呼吸道的感染率达到 2%–22%。人博卡病毒经常与其他呼吸道病毒共同感染, 混合感染率高达 83%<sup>[2-6]</sup>。

HBoV1 属于细小病毒科博卡病毒属<sup>[7]</sup>, 其基因组为 5.5 kb 左右的单链线状 DNA, 含 3 个开放阅读框 (ORF), 分别编码衣壳蛋白 VP1-3、NP1 和非结构蛋白 NS1-4<sup>[8]</sup>。非结构蛋白 NS1 是 HBoV1 复制必需基因, 而 NS2-4 是病毒 DNA 复制非必需基因<sup>[9]</sup>。值得注意的是, 经过可变剪接的 NS1 转录本较大, 编码约 100 kDa 的 NS1 蛋白 (NS1-100), 而未经过可变剪接的 NS1 转录本较小, 编码约 70 kDa 的 NS1 蛋白 (NS1-70)<sup>[8, 10]</sup>。

来自不同属的细小病毒均可编码非结构蛋白 NS1, 其作为多功能蛋白, 参与了病毒复制、转录激活及诱导细胞凋亡、周期阻滞等过程。NS1 的反式激活作用可显著提高病毒基因组转录水平, 促进病毒在细胞内的增殖。人细小病毒 B19 5'端 P6 启动子启动病毒所有 mRNA 转录, 表达的 NS1 蛋白又能反式激活 P6 启动子活性, 这种反式激活作用依赖于启动子 TATA box 上游富含 GC 的 2 个串联重复序列, 且启动子的 100–160 nt 序列

对该反式激活作用极其重要<sup>[11-14]</sup>。小鼠细小病毒 MVM 的 NS1 蛋白的表达能反式激活 P4 启动子的活性, P4 启动子又能促进非结构蛋白 NS1 的表达<sup>[15]</sup>。此外, 有报道显示, B19 NS1 的反式激活作用可能与病毒感染后宿主特定基因的正常表达及宿主致病有关<sup>[16-18]</sup>。

本研究通过构建 NS1 重组慢病毒质粒 (含可调控启动子和绿荧光标签蛋白), 应用转染试剂将 NS1 重组慢病毒质粒转染至 HEK 293T 细胞。通过嘌呤霉素筛选抗性细胞, 多西环素诱导 NS1 表达, 建立可稳定表达 NS1-100、NS1-70 蛋白的 HEK 293T 细胞系, 利用荧光标记蛋白和 Western blotting 检测, 确定 NS1 蛋白的表达。并在稳定表达 NS1 细胞系中转染 HBoV1 启动子-荧光素酶基因的质粒, 分析 NS1 的反式转录激活活性。结果表明 NS1 蛋白可在建立的细胞系中稳定表达, 且稳定表达 NS1 蛋白对 HBoV1 启动子有较强的激活活性。可调控表达 HBoV1 NS1 蛋白的稳定细胞系, 可有效控制 NS1 蛋白对细胞的毒性, 为深入研究 NS1 蛋白的功能奠定良好基础, 并对进一步深入研究 HBoV1 复制机理具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、细胞及主要试剂

HBoV1 武汉株近全长质粒 pWHL-1 (GenBank 登录号: GU139423.1) 由本实验室保存; 分别含 HBoV1 启动子和 CMV 启动子的重组质粒 pGL3-HBoV1、pGL3-CMV 由本实验室构建并保

存, RL-TK 由本实验室保存; NS1-100、NS1-70 真核表达质粒 pCAGGS-NS1-100、pCAGGS-NS1-70 由本实验室构建并保存; NS1-100、NS1-70 特异性抗体为本实验室制备并保存的兔源多克隆抗体, 工作浓度为稀释 1 000 倍; 可调控慢病毒载体 pLVX-TRE3G-ZsGreen1 (含可调控启动子, 可表达绿荧光标签蛋白 GFP) 购于生物风公司, 慢病毒包装质粒 psPAX2、pMD2.G 由武汉生物工程学院赖晓晶老师惠赠; 人类胚胎肾细胞 HEK 293T 由本实验室保存, 胎牛血清、DMEM、Opti-MEM 购自 Gibco 公司, 胰酶-EDTA 细胞消化液购自上海源培生物科技股份有限公司; Neofect™ 转染试剂购自零客创智 (北京) 生物科技有限公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自美国英杰生命技术有限公司 (Invitrogen); 多西环素 (DOX)、嘌呤霉素 (Puro)、polybrene (聚凝胺) 购自美国 Selleck 生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司; PCR 高保真酶、Easy II Protein Quantitative Kit (BCA) 购自北京全式金生物技术有限公司; Gel Extraction Kit、DNA 快速纯化回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; ECL 显色液购自 Thermo Fisher scientific 公司; 双荧光素酶检测试剂盒购于普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司。

## 1.2 重组慢病毒质粒 pLVX-NS1-100 和 pLVX-NS1-70 的构建

以 pWHL-1 为模板, 应用引物 NS1-100-F 和 NS1-100-Ar 扩增 *ns1-100* N 端 A 片段, 应用引物 NS1-100-Bf 和 NS1-100-R 扩增 *ns1-100* C 端 B 片段。将回收的 A 和 B 片段混合液作为模板, 利用引物 NS1-100-F 和 NS1-100-R 扩增获得 *ns1-100* 基因 ORF 序列。以 pWHL-1 为模板, 应用引物 NS1-70-F、NS1-70-R 扩增获得人博卡病毒 *ns1-70* 基因 ORF 序列。将 *ns1-100*、*ns1-70* 的 ORF 序列克隆至 pLVX-TRE3G-ZsGreen1, 获得重组质粒

pLVX-NS1-100 和 pLVX-NS1-70。

## 1.3 CCK-8 测定细胞活性

在 96 孔板中, 每孔接种 100  $\mu$ L 细胞悬液, 细胞量不低于 2 500 个/孔。待细胞贴壁后, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 避光孵育 1–4 h, 测定每孔  $OD_{450}$  吸光值。

在 96 孔板中, 每孔接种 100  $\mu$ L 细胞悬液, 培养 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ L 不同稀释度待测药物, 继续培养一段时间后, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 避光孵育 1–4 h, 测定每孔  $OD_{450}$  吸光值。

应用如下公式计算细胞存活率或药物对细胞毒性:

细胞存活率%=(待测药物组  $OD_{450}$ -空白对照组  $OD_{450}$ )/(正常细胞对照组  $OD_{450}$ -空白对照组  $OD_{450}$ ) $\times$ 100%。

待测药物组: 细胞中添加了 CCK-8 溶液、待测药物; 空白对照组: 无细胞, 含培养基、CCK-8 溶液; 正常细胞对照组: 细胞中添加了 CCK-8 溶液。

## 1.4 重组慢病毒的包装

取 10  $\mu$ g 重组慢病毒质粒 pLVX-NS1-100 或 pLVX-NS1-70、6  $\mu$ g psPAX2 质粒、4  $\mu$ g pMD2.G 质粒采用转染试剂 Neofect™ 进行共转染 HEK 293T 细胞, 转染 72 h 后, 收集细胞上清液 3 000 r/min 离心 10 min, 去除细胞碎片, 上清液中加入等体积 20% PEG 8 000, 之后每 30 min 混合 1 次, 共混合 3–5 次, 然后将混合液置于 4  $^{\circ}$ C 沉淀过夜; 次日取出, 于 4  $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 30 min, 弃上清; 沉淀用 500  $\mu$ L 1 $\times$ PBS 重悬, 将 500  $\mu$ L 20% 蔗糖溶液轻轻缓慢地加入到病毒重悬液的下面, 使蔗糖垫底, 4  $^{\circ}$ C、15 000 r/min 离心 4 h; 离心后, 弃去上清, 留下少量沉淀, 用 100  $\mu$ L 1 $\times$ PBS 重悬即可获得浓缩的重组慢病毒 pLVX-NS1-100 或 pLVX-NS1-70。

## 1.5 病毒滴度的测定

将 HEK 293T 细胞接种至 96 孔板, 培养至细

胞量达到 80%–90% 进行病毒滴度的检测。将重组慢病毒悬液进行连续 10 倍梯度稀释, 分别稀释成  $10^{-1}$ – $10^{-10}$ , 将病毒稀释液感染细胞, 每一稀释度感染 8 孔, 每孔加入 1  $\mu$ L 聚凝胺 (储存浓度为 10  $\mu$ g/ $\mu$ L), 设未感染病毒的正常细胞为对照组。次日吸弃细胞培养上清液, 添加 2% 细胞维持液, 之后于荧光显微镜下逐日观察并记录表达 GFP 的细胞数量, 连续观察 2–5 d, 计算病毒滴度 (表达 GFP 的细胞数 $\times$ 其相应的病毒稀释倍数, 滴度单位 TU/mL)。

### 1.6 嘌呤霉素 (Puro) 工作浓度的确定

将 HEK 293T 细胞按照每孔  $5\times 10^4$ – $10\times 10^4$  个细胞量铺于 24 孔板, 过夜培养, 待细胞密度达 70%–80% 时, 弃去孔内旧的细胞培养基, 1 $\times$ PBS 洗涤 1 次, 向 24 孔板中加入 Puro 筛选培养基, Puro 浓度分别为 2、4、6、8、10  $\mu$ g/mL; 每个筛选浓度平行做 4 孔重复, 未加药物的细胞作为阴性对照; 连续培养 7 d, 每隔 2–3 d 更换新鲜筛选培养基; 每天观察细胞形态、存活率, 一周后, 有效杀死所有细胞的 Puro 最低浓度, 确定为 Puro 抗性筛选最佳工作浓度。

### 1.7 稳定表达 NS1-100 和 NS1-70 细胞系的筛选

将重组慢病毒 pLVX-NS1-100 或 pLVX-NS1-70 感染 HEK 293T 细胞, 6–8 h 后加入适量完全培养基继续培养; 第 3 天弃去旧培养基, 加入含 Puro 的筛选培养基继续培养, 每隔 2–3 d 更换新鲜筛选培养基, 筛选 10–14 d; 每天观察细胞形态、存活率, 计数表达 GFP 的细胞数量, 两周后几乎所有细胞都表达 GFP, 将阳性细胞扩大培养, 之后进行冻存保种, 即建立了稳定表达细胞系。

### 1.8 NS1-100 和 NS1-70 的反式转录激活活性检测

HEK 293T 细胞接种于 96 孔板, 过夜培养至细胞密度达 70%–80%, 将 pCAGGS-NS1-100 或

pCAGGS-NS1-70 分别与 pGL3-HBoV1 或 pGL3-CMV 进行共转染, RL-TK 为内参质粒。转染后 48 h, 应用双荧光素酶检测试剂盒进行启动子活性检测。稳定表达 NS1-100 或 NS1-70 的 HEK 293T 细胞系接种于 96 孔板, 过夜培养至细胞密度达 70%–80%, 将 pGL3-HBoV1、pGL3-CMV 分别转染两种细胞, RL-TK 为内参质粒。转染后 6 h, 添加合适浓度 DOX, 诱导 NS1-100 或 NS1-70 的表达。转染后 48 h, 应用双荧光素酶检测试剂盒进行启动子活性检测。

双荧光素酶检测试剂盒检测方法具体如下: 弃去细胞孔中旧的培养基, PBS 漂洗 1–2 次, 每孔滴加 20  $\mu$ L 1 $\times$ PLB 裂解液, 置于摇床振摇 20–30 min; 收集裂解后的细胞悬液, 4 000 r/min 离心 1 min 后, 置于室温待检。于 EP 管中先后加入 50  $\mu$ L LAR II、10  $\mu$ L 待测样品, 轻轻吹打混匀; 置于检测仪中检测萤火虫荧光素酶活性 (RLU1); 检测结束后, 向 EP 管中加入 50  $\mu$ L Stop & Glo Reagent, 轻轻吹打混匀; 再次置于检测仪中, 检测海肾荧光素酶活性 (RLU2); RLU1/RLU2 即为启动子活性。每个样品重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pLVX-NS1-70 和 pLVX-NS1-100 的构建及鉴定

以 pWHL-1 为模板, 分别扩增 *ns1*-100 N 端 A 片段 1 912 bp 和 C 端 B 片段 526 bp, 然后将 A 和 B 片段分别纯化回收后混合作为模板, 扩增获得 *ns1*-100 基因 ORF 序列, 连接至 pLVX-TRE3G-ZsGreen1 载体, 构建重组慢病毒质粒 pLVX-NS1-100。以 pWHL-1 为模板, 特异性引物扩增 *ns1*-70, 酶切后连接至载体, 构建重组慢病毒质粒 pLVX-NS1-70。重组质粒经 *Mlu* I、*Eco*R I 双酶切鉴定, 可获得 1 920 bp (*ns1*-70) 和 2 346 bp (*ns1*-100) 的目的片段, 测序结果显示, 目的基因

正确插入载体。

## 2.2 药物对 HEK 293T 细胞活性影响

在 96 孔板中培养不同密度的 HEK 293T 细胞, 加入 CCK-8 试剂后继续培养 1-4 h, 不同时间点检测每孔吸光值, 结果显示细胞数量 ( $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4$ ) 与细胞增殖呈正相关 (图 1), 且 2.5 h 后细胞孔吸光值趋于稳定, 表明细胞增殖达到最大, 基于此确定 96 孔板适宜的细胞接种量为  $2 \times 10^4$  个/孔, 加入 CCK-8 试剂后 2.5 h 为最佳测定时间。

以  $2 \times 10^4$  个/100  $\mu$ L 细胞悬液接种 96 孔板, 培养 24 h 后, 加入 10  $\mu$ L 的 DOX 或 Puro, DOX 浓度梯度依次为 1、2、3、4、5  $\mu$ g/mL, Puro 浓度梯度为 2、4、6、8、10  $\mu$ g/mL。每个浓度重复 4 孔, 分别培养 6、12、24、48 h 时, 向每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 不加药物溶液正常细胞为对照组, 只含培养基孔为空白对照组。将细胞避光孵育 2.5 h, 测定 OD 值, 根据公式计算细胞存活率。如表 1 所示, DOX 浓度为 1  $\mu$ g/mL 或 2  $\mu$ g/mL 时, 对细胞毒性最低, 确定 DOX 最适工作浓度为 2  $\mu$ g/mL。如表 2 所示, Puro 浓度为 2  $\mu$ g/mL 或 4  $\mu$ g/mL 时, 对细胞毒性最低, 确定 Puro 最适工作浓度为 4  $\mu$ g/mL。

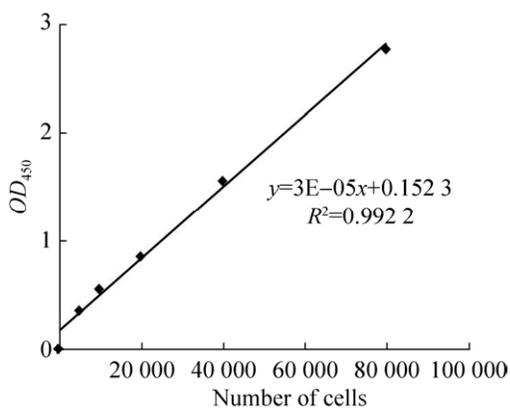


图 1 CCK8 检测 HEK 293T 细胞活性

Fig. 1 Detection of HEK 293T cell viability by CCK8.

表 1 DOX 对 HEK 293T 细胞毒性

Table 1 Cytotoxicity of DOX to HEK 293T cells

| Concentration of DOX ( $\mu$ g/mL) | Cell viability (%) |      |      |      |
|------------------------------------|--------------------|------|------|------|
|                                    | 6 h                | 12 h | 24 h | 48 h |
| 1                                  | 100                | 100  | 100  | 99   |
| 2                                  | 98                 | 99   | 100  | 98   |
| 3                                  | 94                 | 95   | 86   | 83   |
| 4                                  | 90                 | 96   | 85   | 80   |
| 5                                  | 86                 | 91   | 75   | 73   |

表 2 Puro 对 HEK293T 细胞毒性

Table 2 Cytotoxicity of Puro to HEK 293T cells

| Concentration of puro ( $\mu$ g/mL) | Cell viability (%) |      |      |      |
|-------------------------------------|--------------------|------|------|------|
|                                     | 6 h                | 12 h | 24 h | 48 h |
| 2                                   | 98                 | 90   | 62   | 84   |
| 4                                   | 98                 | 81   | 56   | 75   |
| 6                                   | 81                 | 61   | 26   | 21   |
| 8                                   | 77                 | 68   | 27   | 21   |
| 10                                  | 74                 | 60   | 24   | 17   |

## 2.3 DOX 诱导 NS1 蛋白表达对细胞活性的影响

将重组质粒 pLVX-NS1-100、pLVX-NS1-70 分别转染 HEK 293T 细胞, 6 h 后加入 2  $\mu$ g/mL DOX 诱导 NS1 的表达, 不同时间点在显微镜下观察 NS1 蛋白表达对细胞活性的影响。结果表明 (图 2), 加入 DOX 诱导 NS1 蛋白表达后, HEK 293T 细胞在 48 h 内形态基本正常, 但生长减缓, 随着时间推移, 大部分细胞形态变化, 边缘不清晰, 慢慢变圆直至死亡。

## 2.4 稳定表达 NS1-70 或 NS1-100 细胞系的建立和鉴定

根据 1.4 的方法包装慢病毒。重组慢病毒滴度为  $1 \times 10^5$  TU/mL, 取 100  $\mu$ L 重组慢病毒感染 HEK 293T 细胞, 感染后 48 h, 用 4  $\mu$ g/mL Puro 筛选培养基培养 10-14 d, 几乎所有细胞都表达 GFP, 将细胞扩大培养, 继续用 Puro 筛选培养基培养, 细胞冻存后复苏传代培养 3 代, 经 DOX 诱导后, 仍表达 GFP (图 3), 即成功建立了稳定表达 NS1-70 或 NS1-100 细胞系。

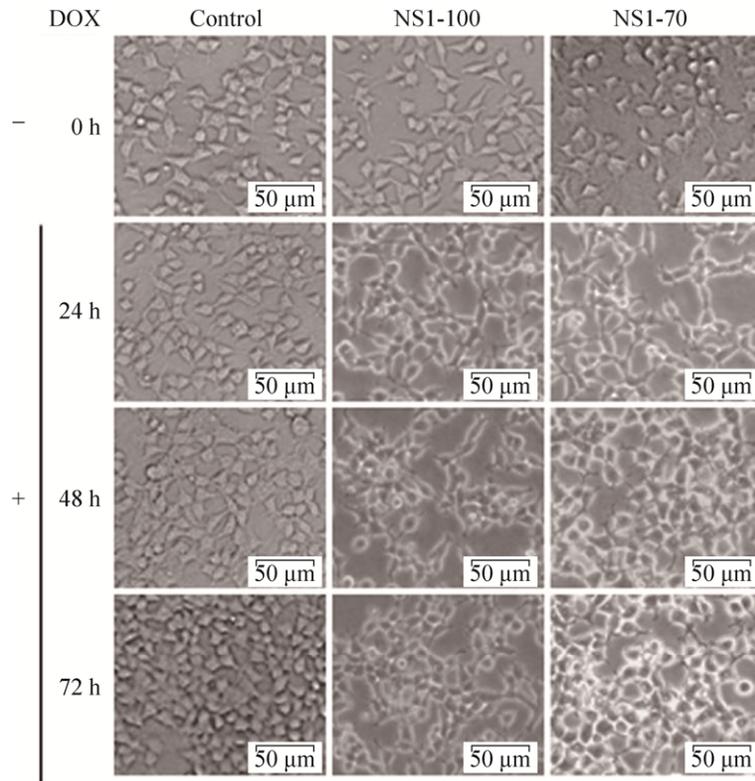


图 2 DOX 诱导 NS1 表达后细胞形态变化

Fig. 2 Cell morphology changes after expression of NS1 induced by DOX.

Western blotting 检测稳定表达细胞系中 NS1 的表达, 结果显示 (图 4), 在 100 kDa、70 kDa 分别出现特异性条带, 与预期相符, 表明构建的细胞系可表达 HBoV1 的 NS1-100 或 NS1-70 蛋白。

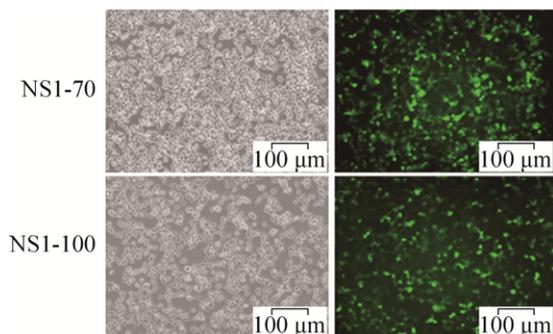


图 3 稳定表达 NS1-70、NS1-100 细胞系

Fig. 3 Stable cell line expressing NS1-70 or NS1-100.

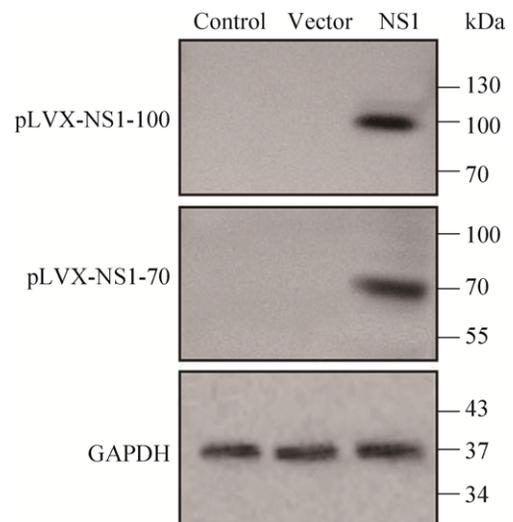


图 4 Western blotting 检测稳定表达细胞系中 NS1 蛋白的表达

Fig. 4 Detection of NS1 protein expression in the stable cell line by Western blotting.

## 2.5 NS1 蛋白反式转录激活活性检测

将 pCAGGS-NS1-100、pCAGGS-NS1-70 分别与 pGL3-HBoV1 或 pGL3-CMV 进行共转染, RL-TK 为内参质粒。转染后 48 h, 检测启动子活性。结果显示, 瞬时表达 NS1-100 (图 5A) 或 NS1-70 (图 5B) 后, HBoV1 启动子活性显著高于 CMV 启动子和阴性对照。

分别在稳定表达 NS1-100、NS1-70 的 HEK 293T 细胞系中, 转染 pGL3-HBoV1 或 pGL3-CMV, RL-TK 为内参质粒。转染后 6 h, 添加 2  $\mu\text{g/mL}$

DOX, 诱导 NS1-100 或 NS1-70 的表达。转染后 48 h, 检测启动子活性。结果显示, 表达 NS1-100 或 NS1-70 细胞系中, HBoV1 启动子活性与 CMV 启动子活性差异显著, 且均显著高于阴性对照 pGL3-Basic (图 5C), 表明稳定表达 NS1 对 HBoV1 启动子有更强的反式激活作用。同时, 还发现 NS1 蛋白的表达量与其反式激活作用成正相关 (图 5D), 随着时间的推移, NS1 的表达量逐渐增高, 其反式激活作用也逐渐增强。

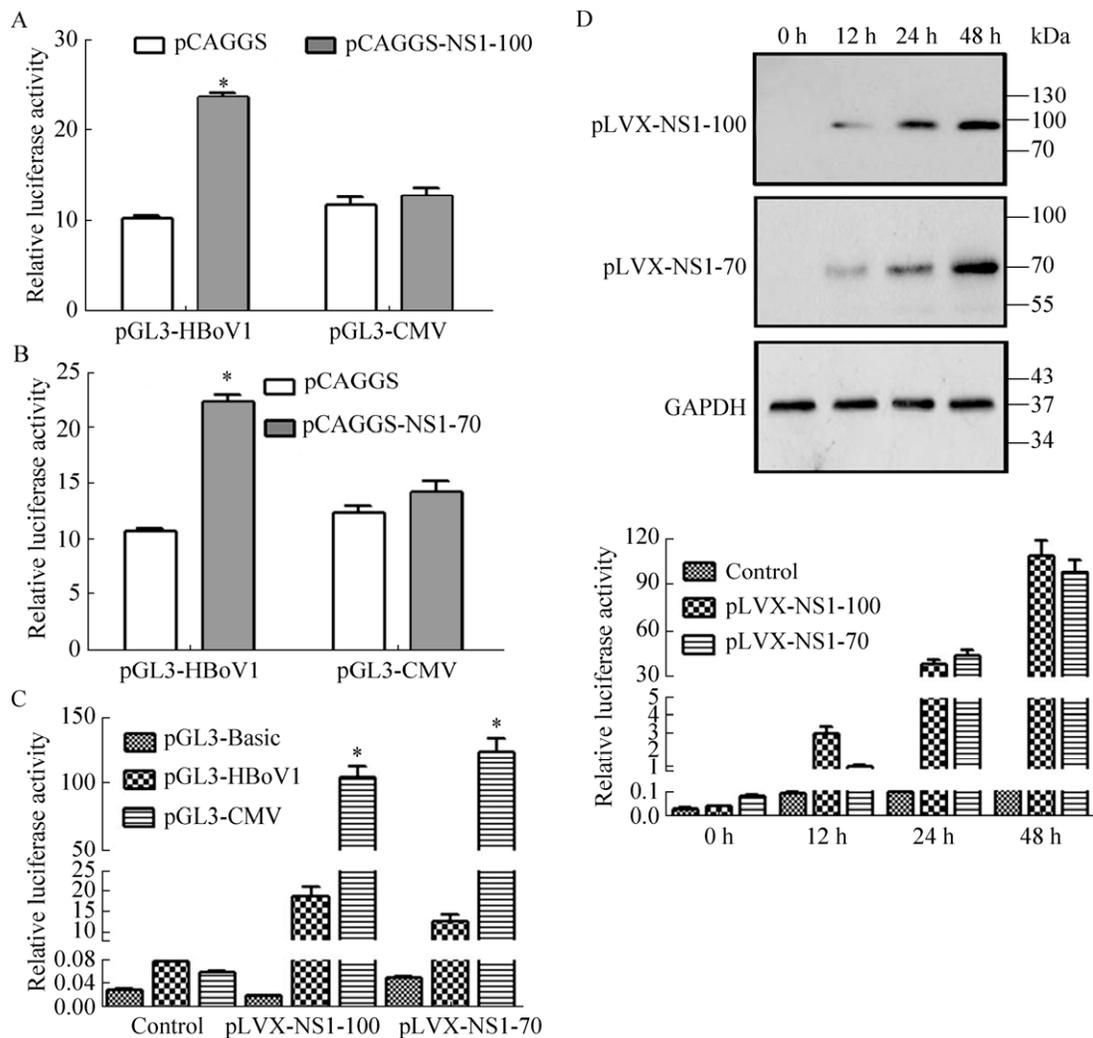


图 5 NS1 蛋白对 HBoV1 启动子的反式激活活性

Fig. 5 Transactivation activity of NS1 protein to HBoV1 promoter. (A) Transactivation activity of transiently expressed NS1-100. (B) Transactivation activity of transiently expressed NS1-70. (C) Transactivation activity of stably expressed NS1-100 or NS1-70. (D) Expression and transactivation activity of NS1-100 or NS1-70 at different time points.

### 3 讨论

HBoV1 属于细小病毒科博卡病毒属<sup>[7]</sup>, 其靶向性感染呼吸道, 常被发现与其他呼吸道病毒共感染宿主, 是呼吸道疾病的重要病原体之一, 对人类健康有巨大威胁<sup>[1]</sup>。细小病毒的非结构蛋白 NS1, 因其在病毒感染、复制及损伤细胞过程中均扮演重要角色而被广泛研究<sup>[9,15-17]</sup>。在病毒复制过程中, NS1 的反式激活作用促进病毒在细胞内的增殖。研究 HBoV1 的 NS1 蛋白反式转录激活作用, 有助于进一步解析 HBoV1 复制机理。

细小病毒 NS1 蛋白的表达, 对细胞具有一定的毒性。小鼠细小病毒 (MVM) 磷酸化位点 (T585 或 S588) 的突变, 分别降低或增强 NS1 对细胞的毒性<sup>[19]</sup>。B19 感染细胞后, NS1 通过招募细胞蛋白 Bax 和 Bad, 导致 caspase-3 和 caspase-9 高度活化, 引发细胞凋亡<sup>[12]</sup>。B19 NS1 蛋白通过激活 ATR CDC25C-CDK1 通路诱导 G2 期细胞周期阻滞, 诱导 DNA 损伤<sup>[20]</sup>。黑胸大蠊浓核病毒 (PfdNV) 感染昆虫细胞后, NS1 可抑制宿主细胞基因表达, 共表达 PfdNV 的 3 种非结构蛋白可诱导细胞坏死<sup>[21]</sup>。

由于瞬时表达 NS1 的不稳定性及其对细胞的毒性, 不利于深入探索 NS1 的相关功能, 文中构建了可调控表达 HBoV1 NS1 蛋白的 HEK 293T 稳定细胞系, 经 DOX 诱导表达的 NS1, 对 HBoV1 启动子有较强的激活作用。相比较于瞬时表达 NS1, 稳定表达 NS1-70 或 NS1-100 细胞对 HBoV1 启动子活性更强, 其原因可能是由于随时间的推移, 瞬时表达 NS1 蛋白对细胞的毒性有累积效应, 诱导细胞死亡, 导致检测反式激活作用时的不稳定。而稳定细胞系中 NS1 蛋白表达时相可调控, 且表达量更高, 因此有更强更稳定的反式激活作用。

HBoV1 的 NS 蛋白是病毒复制必不可少的成分, 当缺失 *ns*, HBoV1 的病毒核酸无法复制。基

于此, Yan 等构建了 HBoV1 和 AAV 病毒的嵌合基因治疗载体<sup>[22]</sup>, 该载体含有不完整的 HBoV1 *ns* 基因, 因此必须回补 NS 的表达, 才能获得重组嵌合病毒<sup>[22-23]</sup>。可调控表达 HBoV1 NS1 稳定细胞系的建立, 将有助于 HBoV1 基因治疗载体深入研究和研发。

文中建立了可调控表达 HBoV1 NS1 蛋白的 HEK 293T 稳定细胞系, 为深入探索 NS1 蛋白的功能提供体外细胞实验模型, 有助于全面认识 HBoV1 非结构蛋白的作用机制。

### REFERENCES

- [1] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12891–12896.
- [2] Zhou JY, Peng Y, Peng XY, et al. Human bocavirus and human metapneumovirus in hospitalized children with lower respiratory tract illness in Changsha, China. *Infl Other Respir Viruses*, 2018, 12(2): 279–286.
- [3] Silva PE, Figueiredo CA, Luchs A, et al. Human bocavirus in hospitalized children under 5 years with acute respiratory infection, Sao Paulo, Brazil, 2010. *Arch Virol*, 2018, 163(5): 1325–1330.
- [4] Salvo M, Lizasoain A, Castells M, et al. Human bocavirus: detection, quantification and molecular characterization in sewage and surface waters in uruguay. *Food Environ Virol*, 2018, 10(2): 193–200.
- [5] Chen AX, Xie GC, Pan D, et al. Three-dimensional culture of human airway epithelium in matrigel for evaluation of human rhinovirus C and bocavirus infections. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31(2): 136–145.
- [6] Abdel-Moneim AS, Mahfouz ME, Zytouni DM. Detection of human bocavirus in Saudi healthy blood donors. *PLoS ONE*, 2018, 13(2): e0193594.
- [7] Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, et al. The family *Parvoviridae*. *Arch Virol*, 2014, 159(5): 1239–1247.

- [8] Shen WR, Deng XF, Zou W, et al. Analysis of *cis* and *trans* requirements for DNA replication at the right-end hairpin of the human bocavirus 1 genome. *J Virol*, 2016, 90(17): 7761–7777.
- [9] Liu QS, Zhang ZF, Zheng ZH, et al. Human bocavirus NS1 and NS1-70 proteins inhibit TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B by targeting p65. *Sci Rep*, 2016, 6: 28481.
- [10] Li JJ, Yang YB, Dong YM, et al. Key elements of the human bocavirus type 1 (HBoV1) promoter and its *trans*-activation by NS1 protein. *Virol J*, 2013, 10: 315.
- [11] Morita E, Nakashima A, Asao H, et al. Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G<sub>1</sub> phase. *J Virol*, 2003, 77(5): 2915–2921.
- [12] Hsu TC, Wu WJ, Chen MC, et al. Human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) induces apoptosis through mitochondria cell death pathway in COS-7 cells. *Scand J Infect Dis*, 2004, 36(8): 570–577.
- [13] Tzang BS, Chen DY, Tsai CC, et al. Human parvovirus B19 nonstructural protein NS1 enhanced the expression of cleavage of 70 kDa U1-snRNP autoantigen. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 40.
- [14] Sanchez JL, Romero Z, Quinones A, et al. Dna binding and cleavage by the human parvovirus B19 NS1 nuclease domain. *Biochemistry*, 2016, 55(47): 6577–6593.
- [15] Willwand K, Moroianu A, Hörlein R, et al. Specific interaction of the nonstructural protein NS1 of minute virus of mice (MVM) with [ACCA]<sub>2</sub> motifs in the centre of the right-end MVM DNA palindrome induces hairpin-primed viral DNA replication. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1659–1664.
- [16] Sheu MJ, Chiu CC, Yang DJ, et al. The root extract of *Gentiana macrophylla* pall. Alleviates B19-NS1-exacerbated liver injuries in NZB/W F1 mice. *J Med Food*, 2017, 20(1): 56–64.
- [17] Wu JQ, Chen X, Ye HY, et al. Nonstructural protein (NS1) of human parvovirus B19 stimulates host innate immunity and blunts the exogenous type I interferon signaling *in vitro*. *Virus Res*, 2016, 222: 48–52.
- [18] Chen DY, Chen YM, Chen HH, et al. Human parvovirus B19 nonstructural protein NS1 activates NLRP3 inflammasome signaling in adult-onset Still's disease. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3364–3371.
- [19] Daeffler L, Hörlein R, Rommelaere J, et al. Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol*, 2003, 77(23): 12466–12478.
- [20] Xu P, Zhou Z, Xiong M, et al. Parvovirus B19 NS1 protein induces cell cycle arrest at G<sub>2</sub>-phase by activating the ATR-CDC25C-CDK1 pathway. *PLoS Pathog*, 2017, 13(3): e1006266.
- [21] Yang B, Cai DW, Yu PR, et al. Non-structural proteins of *Periplaneta fuliginosa* densovirus inhibit cellular gene expression and induce necrosis in Sf9 cell cultures. *Virus Genes*, 2009, 38(3): 478–486.
- [22] Yan ZY, Keiser NW, Song Y, et al. A novel chimeric adeno-associated virus 2/human bocavirus 1 parvovirus vector efficiently transduces human airway epithelia. *Mol Ther*, 2013, 21(12): 2181–2194.
- [23] Wang ZK, Deng XF, Zou W, et al. Human bocavirus 1 is a novel helper for adeno-associated virus replication. *J Virol*, 2017, 91(18): e00710-17.

(本文责编 陈宏宇)