

猪瘟病毒 E0 蛋白对 IFN- β 启动子 的抑制作用研究

夏燕华¹, 赵天生¹, 陈柳², 张楚瑜³

(1.南昌大学 医学院, 江西 南昌 330006; 2.浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021;
3.武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 以新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)为 IFN- β 诱导剂, 将猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV) E0 基因的 C 末端与增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因相连, 瞬时表达于猪肾细胞 PK15 中, 利用荧光素酶报告基因系统检测 IFN- β 启动子的活化状态, 结果显示 CSFV E0 蛋白可抑制 NDV 对 IFN- β 启动子的诱导作用, 抑制效应随 E0 蛋白量增加而增强; 半定量 RT-PCR 结果显示, E0 蛋白可明显降低 IFN- β mRNA 的生成量。结果表明, E0 蛋白具有干扰素拮抗功能。该研究为阐明 CSFV 的致病及持续感染机制提供了理论支持。

关键词: 猪瘟病毒; E0 蛋白; IFN- β

中图分类号: S852.65*1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)03-0541-05

A Study of CSFV E0 Protein Block Interferon-beta Induction Mediated by Newcastle Disease Virus (NDV)

XIA Yan-hua¹, ZHAO Tian-sheng¹, CHEN Liu², ZHANG Chu-yu³

(1. Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Institute of Virology & Biotechnology, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou 310021, China; 3. College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Newcastle disease virus (NDV) as IFN- β inducer, E0 of classical swine fever virus (CSFV) fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was transiently expressed in porcine kidney 15 (PK15) cells. In the luciferase activity assay, E0-EGFP was found to block the induction of IFN- β promoter mediated by NDV in a dose-dependent manner. Through IFN-specific semi-quantitative RT-PCR detection, obvious decrease of IFN- β mRNA in NDV-infected PK15 cells was observed in the presence of E0-EGFP. These evidences establish a novel function for CSFV E0 glycoprotein in counteraction of the IFN- β induction pathway.

Keywords: classical swine fever virus; E0 protein; IFN- β

猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV) 是引起猪瘟的病原体, 属黄病毒科瘟病毒属, 基因组长约 12.3 kb, 包括四种结构基因 C, E0, E1, E2 和 8 种非结构基因 N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B^[1]。一直以来, 猪瘟时有发生, 严重影响了我国养猪业的发展。猪瘟长期流行、难以根除与病毒进入猪体后可突破宿主的免疫防御系统建立持续感染有关^[2]。

很早就发现, CSFV 感染的猪睾丸细胞内新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)复制水平增加, 即新城疫病毒强化(exaltation of ND virus, END) 现象^[3-4], 提示 CSFV 具有抑制免疫系统的能力。体外细胞培养实验也表明, CSFV 感染的猪肾细胞既不产生致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE) 也

收稿日期: 2012-01-06 修回日期: 2012-02-21

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(2009GQY0136)

作者简介: 夏燕华(1977—), 女, 讲师, 博士, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: xyh_papers@163.com。

不产生干扰素 (Interferon, IFN) [5]。目前的研究表明, 非结构基因 N^{pro} 是 CSFV 基因组中第一个干扰素拮抗基因, 其产物可调节病毒复制过程中双链 RNA 中间体的产生水平从而干扰细胞免疫应答 [6-8]。对牛病毒性腹泻粘膜病病毒 (bovine viral diarrhoea virus, BVDV) 研究发现, 结构蛋白 E0 可抑制由 poly(IC) 和辛得毕斯病毒诱导的 I 型 IFN 的产生 [9]。BVDV 与 CSFV 同属黄病毒科瘟病毒属, 二者在基因组结构、氨基酸序列及蛋白功能上存在较大的同源性, 其中 E0 蛋白氨基酸同源性达到 70% 以上, 推测 CSFV E0 蛋白也具有抑制 IFN 产生的功能。而最新研究发现, CSFV E0 糖蛋白的确能抑制细胞中外源性 Poly(IC) 诱导的 IFN- β 的产生, 且这种抑制作用与 E0 的 RNAase 活性密切相关 [10-13]。

为了进一步证实 E0 蛋白的干扰素拮抗功能, 本研究以 NDV 为 IFN- β 诱导剂, 将 CSFV E0 基因的 C 末端与 EGFP 基因相连, 瞬时表达于 PK15 细胞中, 通过荧光素酶报告基因系统检测 IFN- β 启动子活性以及半定量 RT-PCR 检测 IFN- β mRNA 的生成水平。该研究为进一步阐明 CSFV 的致病及持续感染机制奠定了基础, 也为猪瘟病的防治提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒和质粒 猪肾细胞系 (PK15) 由中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 提供。CSFV Shimen 株由本室保存, NDV- Mukteswar (Series I) 株购自北京疾病预防控制中心。含有人源 IFN- β 启动子的报告质粒 pIFN- β -Luc 由 Dr.Lu 惠赠, 对照质粒海肾荧光素酶质粒 pRL-CMV 购自 Promega 公司, 真核表达载体 pEGFP-N1 购自 Clontech 公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM、胰蛋白酶 (Trypsin)、小牛血清、转染试剂盒 LipofectaminTM2000 购自 GIBCO 公司。Dual-GloTM Luciferase Assay System 购自 Promega 公司。总 RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物公司。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒 pE0-EGFP 的构建 从 CSFV Shimen 株感染猪的组织中提取病毒总 mRNA, 进行 RT-PCR, 扩增引物为 5' -CGGAATTCTGATGGCCCTATTGGCATGGGCG-3' (*EcoRI*), 5' -CGGGATCCCGGGCATAGGCACCAAACCA-3' (*BamHI*), 得到 758 bp E0 基因。对 E0 基因和真核表达载体 pEGFP-N1 分别进行 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切后用连接酶进行连接, 得到真核表达质粒 pE0-EGFP。

1.2.2 细胞培养和转染 PK15 细胞培养于含体积分数 10% 小牛血清、pH 为 7.2~7.4 的 DMEM 培养基中, 于 37 °C 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 隔天传代备用。转染前 1 d 将细胞接种至 24 孔板, 待细胞长到 40%~60% 时进行转染, 转染按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行。

1.2.3 病毒接种 取 10⁵ PFU/mL 病毒液至无血清培养基洗涤的 PK15 细胞单层中, 37 °C 吸附 2 h, 每 20 min 轻摇一次, 以促进病毒吸附。换用含体积分数 2% 小牛血清的 DMEM 维持培养液于 37 °C CO₂ 培养箱内培养。

1.2.4 荧光素酶报告基因分析 荧光素酶实验按照 Promega 试剂盒 Dual-Luciferase Reporter Assay System 技术操作手册进行。每次试验样品设 3 个平行孔。

相对荧光素酶活性 (以诱导倍数表示) = [每个样品的萤火虫荧光素酶荧光强度 (FL-Luc) / 海肾荧光素酶荧光强度 (RL-Luc)] / (对照 FL-Luc / RL-Luc)。(1)

E0-EGFP 蛋白表达时间与抑制效应的相关性: 将 1.0 μ g pE0-EGFP 高效转入 PK15 细胞, 同时共转染 100 ng pIFN- β -Luc 和 20 ng pRL-CMV, 在转染前后多个时间点进行 NDV 感染, 24 h 后测定荧光素酶活性。进行如下分组: 先转染 pE0-EGFP 6, 12, 24 h 再感染 NDV 的细胞样品、pE0-EGFP 转染和 NDV 感染同时进行的细胞样品、先 NDV 感染 12 h 再转染 pE0-EGFP 的细胞样品以及 NDV 感染细胞和阴性对照细胞。

E0-EGFP 蛋白表达量与抑制效应的相关性: 分别将 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 μ g pE0-EGFP 和 pEGFP-N1 转入 PK15 细胞, 同时共转染 100 ng pIFN- β -Luc 和 20 ng pRL-CMV。12 h 后感染 NDV, 24 h 后测定荧光素酶活性。

1.2.5 IFN- β mRNA 的半定量 RT-PCR 检测 以 180 bp 的 β -actin 基因作为参照物, 对 IFN- β 的 mRNA 进行半定量检测: 共设置 8 个样品: 无菌水直接 PCR 排除 PCR 系统污染; 抽提未经任何处理的 PK15 细胞、NDV 感染细胞、pEGFP-N1 和 pE0-EGFP 转染细胞、NDV 感染的 pEGFP-N1 和 pE0-EGFP 转染细

胞 mRNA 进行 RT-PCR, 分别扩增 IFN- β 和 β -actin 基因。同时抽提 NDV 感染细胞 mRNA 直接 PCR 排除 IFN- β DNA 干扰。提前一天将细胞传至 24 孔板, 当细胞长至 60% 时分别转染 1.0 μ g 的质粒 pEGFP-N1 和/或 pE0-EGFP, 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后接毒 10^5 PFU/mL NDV, 37 $^{\circ}$ C 孵育 36 h。按华舜总 RNA 抽提试剂盒方法抽提各孔细胞的总 mRNA。RT-PCR 检测 IFN- β 和 β -actin。IFN- β 扩增引物为 5'-CCGAATTCGCTAACAAGTGCATCCTCC-3' 和 5'-G CGAAGCTTT CAGTTCCGGAGGTAATC-3', 扩增片段为 571 bp。

1.2.6 统计学分析 数据资料显示为均值士标准差 (Mean \pm SE), 数据检验采用 Student's t-test 分析, $P < 0.05$ 表示有显著性意义。

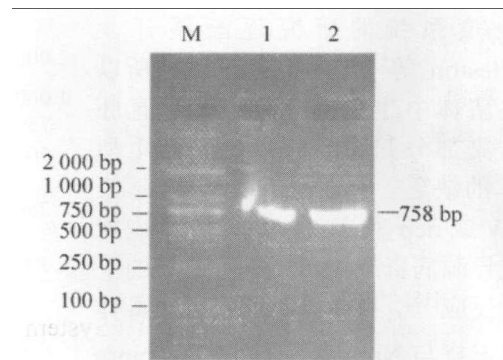
2 结果

2.1 真核表达质粒 pE0-EGFP 的构建

真核表达质粒 pE0-EGFP 经测序和 PCR (如图 1) 鉴定, 证明构建正确。

2.2 抑制效应与 E0-EGFP 蛋白表达时间和表达量的相关性

对荧光素酶活性进行分析发现, 如图 2A 所示, 相对虫荧光素酶活性在先转染 pE0-EGFP 0, 6, 12, 24 h 的细胞 (lane 3、4、5 和 6) 内较阳性 NDV 感染细胞 (lane 1) 有明显的降低, 分别降低 62.2%、82.2%、77.8%、80% 和 77.8% ($P < 0.05$); 而先感染 NDV 12 h 再转染 pE0-EGFP 的细胞 (lane 2) 中相对虫荧光素酶活性有小幅降低。说明 pE0-EGFP 转染不晚于 NDV 感染时, E0 蛋白对 NDV 激活 IFN- β 启动子有较好的抑制作用。如图 2B 所示, 无论 pEGFP-N1 转染量如何变化, 相对虫荧光素酶活性都达到阴性对照的 3 倍以上, 说明 EGFP 本身对 NDV 诱导的 IFN- β 启动子活性没有抑制作用; 而随着 pE0-EGFP 转染量的增加, 相对虫荧光素酶活性逐渐下降, 说明 E0-EGFP 蛋白表达量越高, 对 NDV 激活的 IFN- β 启动子的抑制作用越强。

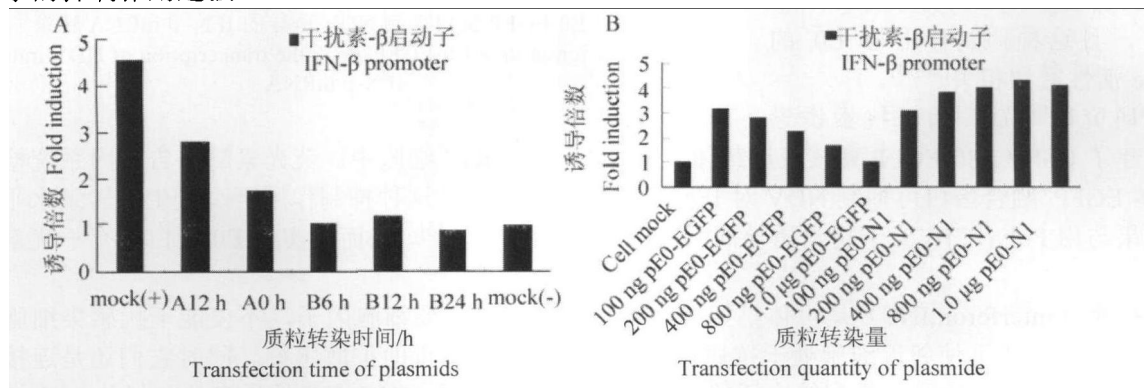


M: DL2000; 1 和 2: E0 基因 (758 bp)

M: DL2000; 1 and 2: 758 bp of E0

图 1 真核表达质粒 pE0-EGFP 的 PCR 鉴定

Fig.1 The PCR product of E0



A: E0 蛋白表达时间对抑制效应的影响; Mock (-): PK15 细胞; mock (+): 感染 NDV 的 PK15 细胞; A12 h 和 A0 h: PK15 细胞在转染 pE0-EGFP 和报告基因前 12 h 和 0 h 进行 NDV 感染; B6 h, B12 h 和 B24 h: PK15 细胞在转染 pE0-EGFP 和报告基因后 6, 12, 24 h 进行 NDV 感染; B: E0 蛋白表达量对抑制效应的影响。

A: The effect of E0 protein expression time on the inhibition. Mock (-): PK15 cells; mock (+): PK15 cells infected with NDV; A12 h and A0 h: PK15 cells transfected with pE0-EGFP and report gene at 0 h and 12 h after NDV infection; B 6 h, B12 h and B 24 h: PK15 cells infected with NDV at 6 h, 12 h and 24 h after transfection with pE0-EGFP and report gene; B: The effect of E0 protein expression quantity on the inhibition.

图 2 E0-EGFP 融合蛋白抑制 NDV 诱导细胞产生 IFN- β

Fig.2 E0-EGFP fusion protein inhibite NDV-induced IFN- β production

2.3 IFN- β mRNA 的半定量检测

如图 3 所示,在排除 PCR 污染和 DNA 干扰(lane1,7)后, β -actin mRNA 在所有细胞中是一致的,说明各样品中 cDNA 量一致。在模板量一致的情况下,无 NDV 感染的样品中 IFN- β 转录信号很弱 (lane2,3,5),而有 NDV 感染的样品中,pE0-EGFP 转染细胞中 IFN- β 转录信号明显减弱 (lane6),较阳性对照 (lane8)和载体对照 (lane4)分别降低了 85%和 92% ($P<0.05$),说明 E0 抑制了 IFN- β 的 mRNA 转录。

3 讨论

猪瘟病毒是病毒中典型的具有持续感染特性的毒株,它是如何逃避宿主的免疫系统,一直以来是猪瘟病毒研究者希望解决的目标,也是揭开猪瘟病毒致病机制的重要突破口。

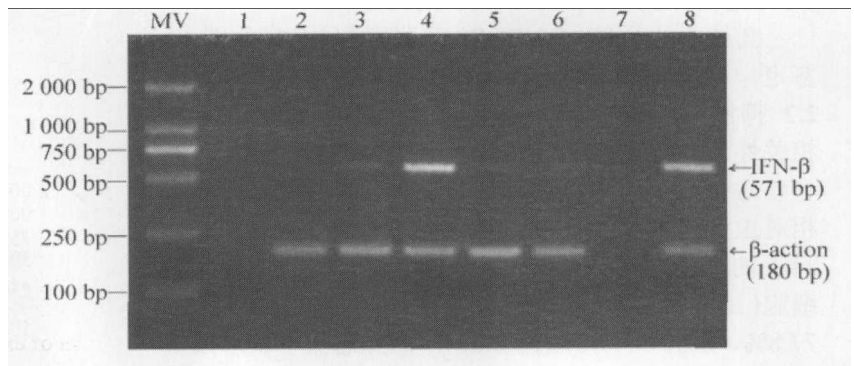
近几年来,关于猪瘟病毒干扰宿主免疫系统的研究逐渐展开。Charleston 等^[14]认为,CSFV 之所以能在猪体中建立持续感染及垂直胚胎传染部分归因于病毒感染后 I 型 IFN 的缺乏。体外研究表明,感染 CSFV 或 ncp 型 BVDV 的培养细胞能抵抗异源病毒或 dsRNA 所诱导的干扰素反应^[15],CSFV 对细胞抗病毒体系的干扰与 Npro 蛋白有关^[6-7]。Npro 蛋白可调节病毒复制过程中双链 RNA 中间体的产生量,从而干扰细胞免疫应答^[8]。BVDV 中的研究表明,E0 蛋白能特异性的抑制宿主细胞的干扰素途径^[9]。最新研究发现,CSFV E0 糖蛋白能与 dsRNA 结合从而抑制细胞中外源性 Poly(IC)诱导的 IFN- β 的产生,且这种抑制作用与 E0 的 RNAase 活性密切相关^[10-13]。

本研究以 NDV 为干扰素诱导剂,构建了 CSFV pE0-EGFP 真核表达载体,瞬时表达于 PK15 细胞中。荧光素酶报告基因系统检测发现,E0-EGFP 融合蛋白可抑制 NDV 对 IFN- β 的诱导效应,且这种抑制作用至少发生在转录水平,本研究结果与用 Poly(IC)作为干扰素诱导剂所得出的结论一致^[10-13],从而证实了 E0 蛋白具有干扰素拮抗功能。

干扰素 (interferon,INF) 是机体早期抗病毒感染的一类重要细胞因子,不仅能干扰感染细胞内病毒的复制增殖,还可使邻近细胞处于抗病毒状态,从而限制病毒的扩散感染。同时它们还是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁,具有较广泛的免疫调节功能(如促进 MHC I 类抗原表达,活化 NK 细胞和 CTL 等),在机体的免疫防御中起着重要的作用。干扰素拮抗基因的存在使得病毒能够逃避宿主的免疫清除,为病毒的致病创造了有利条件,是病毒持续感染的重要原因。猪瘟病毒正是一种具有持续感染特性的病毒,研究其与干扰素的相互作用有望阐明病毒感染的发生发展过程,是揭开病毒致病的重要突破口,也可为消除猪瘟研制有效疫苗和药物提供新的思路。

参考文献:

- [1] Rice C M. Flaviviridae[M].Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers, 1996:931-960.
- [2] Dewulf J, Koenen F, Ribbens S, et al. Evaluation of the epidemiological importance of classical swine fever infected, E2



MV: DL2000; 1:无菌水; 2:PK15; 3:pEGFP-N1 转染细胞; 4:先转染 pEGFP-N1 再感染 NDV 的 PK15 细胞; 5:pE0-EGFP 转染细胞; 6:先转染 pE0-EGFP 再感染 NDV 的 PK15 细胞; 7:NDV 感染细胞 mRNA 直接 PCR; 8:NDV 感染细胞。

MV: DL2000; 1:sterile water; 2:PK15 cells; 3:PK15 cells transfected with pEGFP-N1; 4:PK15 cells infected with NDV after trasfection with pEGFP-N1; 5:PK15 cells transfected with pE0-EGFP; 6:PK15 cells infected with NDV after trasfection with pE0-EGFP; 7:PCR of mRNA extracted from cells infected with NDV; 8:PK15 cells infected with NDV.

图 3 E0-EGFP 蛋白抑制 NDV 诱导的 IFN- β mRNA 转录
Fig.3 Fusion protein E0-EGFP block the transcription of NDV-induced IFN- β mRNA

- sub-unit marker vaccinated animals with RT-nPCR positive blood samples[J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2005, 52 (9):367-371.
- [3] Kumagai T, Shimizu T, Matsumoto M. Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture[J]. *Science*, 1958, 128 (3320):366.
- [4] Inaba Y, Tanaka Y, Kumagai T, et al. Bovine diarrhea virus II END phenomenon: exaltation of Newcastle disease virus in bovine cells infected with bovine diarrhea virus[J]. *Jpn J Microbiol*, 1968, 12(1):35-49.
- [5] Bensaude E, Turner J L, Wakeley P R, et al. Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(4):1029-1037.
- [6] Ruggli N, Tratschin J D, Schweizer M. Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of Npro[J]. *J Virol*, 2003, 77(13):7645-7654.
- [7] Ruggli N, Bird B H, Liu L. Npro of Classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- α/β induction[J]. *J Virol*, 2005, 340(2):265-276.
- [8] Bauhofer O, Summerfield A, McCullough K C. Role of double-stranded RNA and Npro of classical swine fever virus in the activation of monocyte-derived dendritic cells[J]. *Virology*, 2005, 343(1): 93-105.
- [9] Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, et al. Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA[J]. *J Virol*, 2004, 78(1):136-145.
- [10] Luo X, Ling D, Li T, et al. Classical swine fever virus Erns glycoprotein antagonizes induction of interferon-beta by doublestranded RNA[J]. *Can J Microbiol*, 2009, 55(6):698-704.
- [11] Luo X, Pan R, Wan C, et al. Glycosylation of classical swine fever virus E(rns) is essential for binding double-stranded RNA and preventing interferon-beta induction[J]. *Virus Res*, 2009, 146(1/2):135-139.
- [12] Magkouras I, Matzener P, Rumenapf T, et al. RNase dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (10):2501-2506.
- [13] Matzener P, Magkouras I, Rumenapf T, et al. The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and doublestranded RNAs[J]. *Virus Res*, 2009, 140 (1/2):15-23.
- [14] Charleston B, Fray M D, Baigent S, et al. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(8):1893-1897.
- [15] Schweizer Matthias, Peterhans E. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis[J]. *J Virol*, 2001, 75(10):4692-4698.