文章编号:1000-5404(2007)24-2311-04

论著

登革病毒及其E蛋白和NS3蛋白对HepG2细胞中GSH水平的影响

江 雯[1],田衍平[1],刘丽梅[2],陈 炜[1],陈宗涛[1],高 娜[1],徐小峰[1],安 静[1,3] (第三军医大学:[1]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,[2]西南医院病理学研究所,重庆 400038;[3]首都医科大学基础医学院微生物学教研室,北京 100069)

提 要:目的 通过对登革病毒感染后不同时相点以及稳定表达登革病毒E蛋白和NS3蛋白的HepG2细胞中GSH水平的测定,确定登革病毒感染后细胞内GSH水平的变化规律,以及登革病毒蛋白的表达对HepG2细胞内GSH水平的影响。**方法** 用分光光度计比色定量检测登革病毒2型感染后不同时相点以及稳定表达登革病毒E蛋白和NS3蛋白的HepG2细胞中GSH水平的变化。**结果** 总体来说,登革病毒2型感染后48 h内,HepG2细胞内GSH的水平呈下降趋势,其中以感染后的30 min、2 h和24 h细胞内GSH变化最为明显,与模拟感染组和其他时相点比较,均有显著差异;而稳定表达登革病毒E蛋白和NS3蛋白的HepG2细胞内GSH的水平也均较空质粒对照组降低。**结论** 登革病毒2型感染HepG2细胞,可使细胞内的GSH下降,且呈现阶段性,推测可能与病毒的吸附、穿入、蛋白质合成、释放等过程有关,且登革病毒E蛋白和NS3蛋白在细胞内的表达也能一定程度地降低其GSH水平。

关键词: 登革病毒;HepG2细胞;GSH
中图法分类号: R373;R373.33;R394.2 **文献标识码:** A

GSH changes in HepG2 cells infected by dengue virus or stably expressing viral protein E and NS3

JIANG Wen[1], TIAN Yan-ping[1], LIU Li-mei[2], CHEN Wei[1], CHEN Zong-tao[1], GAO Na[1], XU Xiao-feng[1], AN Jing[1,3] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [3]Department of Microbiology, Basic Medical School, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of intracellular GSH content in HepG2 cells infected with dengue virus (DV) or stably expressing E or NS3 protein. **Methods** HepG2 cells were cocultured with DV or inactivitated DV, 1 h later the viral supernatant was removed. The infected HepG2 cells were collected 10, 20, 30, 40, 60 min, and 2, 6, 12, 24, 48 h after the beginning coculture and intracellular GSH content was detected by spectrophotometry. Intracellular GSH content was also detected in HepG2 cells stably expressing E protein/NS3 (pReceiver-E/HepG2, pReceiver-NS3/HepG2) and those containing empty plasmid (pReceiver/HepG2). **Results** GSH content showed a decreasing tendency after DV-2 infection. The lowest values were seen 30 min and 2, 24 h after infection, which were of significant difference in comparison with those in inactivated DV infected HepG2 cells as well as at other time points. GSH levels in pReceiver-E/HepG2, pReceiver-NS3/HepG2 were significantly lower than those in pReceiver/HepG2. **Conclusion** DV-2 infection might lead to the GSH depletion in HepG2 cells, and GSH lost from HepG2 cells might undergo a three-step process: virus adsorption/penetration, protein synthesis and budding. E or NS3 protein stably expressed in HepG2 cells can also decrease the GSH levels.

Key words: dengue virus; HepG2 cells; GSH

基金项目: 国家自然科学基金(30471552,30640065,30671853)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471552,30640065,30671853)
作者简介: 江 雯(1982-),女,重庆市人,硕士研究生,助教,主要从事病毒学方面的研究。电话:(023)68752774, E-mail: wen_jiang@tmmu.edu.cn
通讯作者: 安 静,电话:(023)68752774, E-mail: anjing60@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-09-12;**修回日期:** 2007-10-16

登革病毒(dengue virus,DV)为黄病毒属单股正链RNA病毒,能引起人类登革热(classical dengue fever,DF)、登革出血热(dengue haemorrhagic fever,DHF)/登革休克综合征(dengue shock syndrome,DSS),后者病死率较高[1]。DV基因组分别编码3种结构蛋白(衣壳蛋白、膜蛋白、包膜蛋白)和7种非结构蛋白(non-structural protein,NS protein)。其中,E蛋白是位于DV表面的结构蛋白,它既含有黄病毒亚群和DV血清型特异的抗原表位,又有与中和、血凝抑制作用有关的抗原表位,是病毒颗粒的主要包膜蛋白。非结构蛋白3(NS3)是一个多功能蛋白,具有多种酶活性,它涉及到病毒多聚蛋白的加工和RNA的复制及5′端加帽,该蛋白具有很好的免疫原性,并存在特异性$CD4^+$和$CD8^+$识别表位,可诱导机体产生特异性的体液免疫和细胞免疫反应。

近年来研究表明,被病毒感染的机体常处于氧化应激状态,而人体疾病的发生、发展与机体的氧化应激状态密切相关。病毒可诱导宿主细胞产生氧化应激,释放大量活性氧自由基,在活性氧自由基的作用下病毒复制增强[2]。正常情况下,人体细胞内外均存在着有效的抗氧化保护系统,其中谷胱甘肽(Glutathione,GSH)氧化还原系统是抗过氧化反应的中心机制之一。一般认为细胞内的GSH水平下降,可以反映细胞处于氧化状态。黄病毒属中的日本脑炎病毒等感染可引起细胞内的氧化还原状态的改变[3],但DV感染后,细胞中GSH水平的变化趋势目前报道较少。本实验以DV易感染的肝癌细胞株HepG2细胞为研究对象,重点探讨了DV及其结构蛋白E和非结构蛋白NS3在与宿主细胞相互作用过程中细胞内GSH的变化,以此反映宿主细胞氧化还原状态的改变,初步探讨DV对细胞内氧化还原状态的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 感染材料 2型DV(DV-2,Tr1751株)由日本感染病研究所惠赠。病毒在白蚊伊蚊C6/36细胞株中增殖,病毒液-80 ℃保存备用。

1.1.2 细胞株及试剂 HepG2细胞株购自ATCC。pReceiver-E/HepG2、pReceiver-NS3/HepG2细胞、pReceiver/HepG2细胞由本室构建并保存。RPMI1640培养液和DMEM培养液购自Gibco公司。GSH和氧化型谷胱甘肽(L-Glutathione oxidized,GSSG)检测试剂盒购自碧云天公司。还原型谷胱甘肽(L-Glutathione reduced)购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞的培养 HepG2细胞常规用含10%小牛血清的DMEM,pReceiver-E/HepG2、pReceiver-NS3/HepG2、pReceiver/HepG2细胞培养液中含6% G418以维持稳定表达,37 ℃,5 % CO_2 培养;其中pRexeiver-E/HepG2细胞稳定表达E蛋白,pReciever-NS3/HepG2细胞稳定表达NS3蛋白,pReceiver/HepG2细胞作为空质粒对照。

1.2.2 HepG2细胞的DV感染实验 将HepG2细胞制成细胞悬液,以2×10^5/孔接种于6孔培养板中,37 ℃,5% CO_2,孵育18~24 h。感染前吸出培养上清,用PBS润洗1次,再加入DV液2 ml/孔(MOI = 10),模拟感染组则加入56 ℃灭活30 min的DV液,同等条件置于37 ℃,于10、20、30、40、60 min收集细胞样本。1 h后弃去病毒上清液,PBS洗涤3次,加入DMEM维持液(含2%小牛血清)2 ml/孔,置于37 ℃,收集2、6、12、24、48 h的细胞样本。

1.2.3 细胞样本收集及GSH的测定 于感染后10、20、30、40、60 min、2、6、12、24、48 h收集感染组细胞及模拟感染组细胞。先吸出DMEM维持液,用PBS洗涤4次,加入150~200 μl消化液(0.25% 胰酶,0.02% EDTA)/孔,消化约2 min,加入2 ml PBS/孔,将6孔板每孔中细胞吹匀,每孔均匀分装入2个EP管中,各1 ml,分别标记为GSH管和蛋白管。8 000 r/min,离心1 min。蛋白管弃去500 μl上清后,超声处理,用核酸蛋白定量仪测定蛋白浓度。GSH管弃去全部上清,加入50 μl蛋白去除试剂M溶液,充分Vortex后,利用液氮和37 ℃水浴对样品进行4次快速冻融,冰浴5 min。4 ℃,10 000 × g 离心10 min。取上清10 μl加入96孔板中,另分别加入标准品(含10、1 mmol/L、750、500、250、100、10、1 μmol/L的还原型GSH)各10 μl和M试剂(空白对照)10 μl,然后迅速加入新鲜配制的显色液(DTNB + NADPH),同时开始计时,25 min时,用分光光度计于412 nm波长比色测定,得出值减去M试剂的空白对照,然后用标准品的值做标准曲线,得出各个样本的GSH含量,并与平行的蛋白管所测定的蛋白浓度进行比值计算,得出样本中的GSH/蛋白的相对量(nmol/mg),再用感染组与模拟感染组作对比,得出感染组GSH浓度占模拟感染组GSH浓度的百分比。稳定表达DV E蛋白和NS3蛋白以及含空质粒的HepG2细胞(pReceiver-E/HepG2、pReceiver-NS3/HepG2和pReceiver/HepG2细胞)分别传入6孔板中,待细胞单层长满,用上述方法测细胞内的GSH水平。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计分析软件进行分析处理,组间比较采用成对 t 检验、时间点间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 DV感染早期HepG2细胞内GSH水平变化

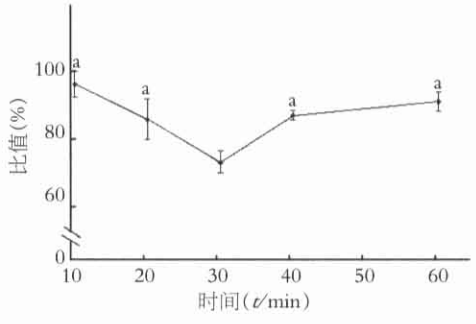
在MOI = 10的感染条件下,DV感染后10、20、30、40、60 min,HepG2细胞内GSH水平与模拟感染组比较,呈下降趋

势,除 10 min 外其余时相点均有显著差异($P<0.05$)(表 1)。在以模拟感染组细胞内 GSH 水平为 100% 的情况下,从各时相点感染组占模拟感染组 GSH 浓度的百分比可看出 GSH 的变化趋势。其中以 30 min 下降最为明显,与其他时相点比较均有显著差异($P<0.01$)。其后虽有逐渐恢复趋势,但 60 min 时仍低于模拟感染组(图 1)。

表 1　DV 感染早期感染组与模拟感染组 HepG2 细胞内 GSH 水平(nmol/mg, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

感染时间	模拟感染组	感染组
10 min	8.663 ±2.472	8.362 ±2.611
20 min	7.600 ±1.231	6.516 ±1.256[a]
30 min	7.713 ±1.409	5.606 ±0.862[a]
40 min	7.531 ±1.034	6.531 ±0.823[a]
60 min	8.468 ±2.447	7.666 ±2.138[b]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与模拟感染组比较



a: $P<0.01$, 与 30 min 比较

图 1　DV 感染早期感染组与模拟感染组 HepG2 细胞内 GSH 水平的比值 ($n=5$)

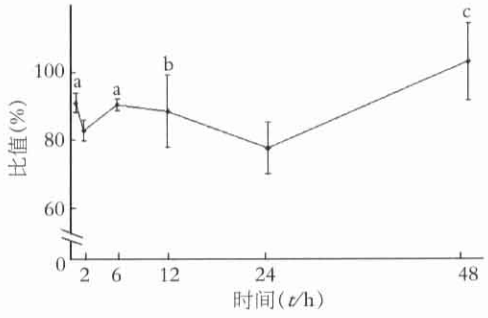
2.2　DV 感染 1 ~48 h 后 HepG2 细胞内 GSH 水平变化

在 MOI = 10 的感染条件下,DV 感染后 60 min、2、6、12、24、48 h, HepG2 细胞内 GSH 水平与模拟感染组比较,仍呈下降趋势,除 12 h 和 48 h 外其余时相点均有显著差异。设模拟感染组细胞内 GSH 水平为 100% 的情况下,从各时相点感染组占模拟感染组 GSH 浓度的百分比可看出 GSH 的变化趋势。其中以 2、24 h 时下降较为明显,与模拟感染组和其他时相点相比,差异显著($P<0.05$),其后逐渐恢复,到 48 h 时与模拟感染组无显著差异($P>0.05$)(表 2,图 2)。

表 2　DV 感染 1 ~48 h 后感染组与模拟感染组 HepG2 细胞内 GSH 水平(nmol/mg, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

感染时间	模拟感染组	感染组
60 min	8.468 ±2.447	7.666 ±2.138[b]
2 h	11.817 ±3.551	9.837 ±3.156[a]
6 h	7.349 ±1.411	6.658 ±1.360[a]
12 h	8.576 ±4.382	7.418 ±3.490
24 h	7.638 ±4.152	5.917 ±3.319[b]
48 h	5.141 ±1.774	5.150 ±1.317

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与模拟感染组比较



a: $P<0.05$, 与 2 h 比较, b: $P<0.05$, c: $P<0.01$, 与 24 h 比较

图 2　DV 感染 1 ~48 h 后感染组与模拟感染组 HepG2 细胞内 GSH 水平的比值($n=5$)

2.3　稳定表达 E 蛋白和 NS3 蛋白分别对细胞内的 GSH 水平的影响

将 pReceiver-E/HepG2、pReceiver-NS3/HepG2 细胞和 pReceiver/HepG2 细胞分别接种于 6 孔板,待细胞单层长满,测定 GSH 水平。pReceiver-E/HepG2、pReceiver-NS3/HepG2 细胞内 GSH 水平与 pReceiver/HepG2 细胞对照组比较,仍呈下降趋势。pReceiver-E/HepG2 细胞 GSH 平均浓度为(25.608 ± 2.226) nmol/mg ($n=4$),pReceiver-NS3/HepG2 细胞 GSH 平均浓度为(26.414 ±0.843) nmol/mg($n=4$),pReceiver/HepG2 细胞内的 GSH 浓度平均为(33.375 ± 1.073) nmol/mg($n=4$),与 pReceiver/HepG2 细胞比较,pReceiver-E/HepG2 细胞组细胞内 GSH 下降了 24.3% ($P<0.01$),pReceiver-NS3/HepG2 细胞组细胞内 GSH 下降了 20.9% ($P<0.01$),pReceiver-E/HepG2 和 pReceiver-NS3/HepG2 细胞与 pReceiver/HepG2 空质粒对照细胞之间均存在显著差异($P<0.01$)。但 pReceiver-E/HepG2 与 pReceiver-NS3/HepG2 细胞之间没有显著差异($P>0.05$)。

3　讨论

当病毒感染后,细胞处于氧化应激状态。业已证明体外培养的细胞感染单纯疱疹病毒 1 型[4]、仙台病毒[5]、甲型肝炎病毒[6]和人免疫缺陷病毒(HIV)[7]时,细胞内的 GSH 水平均降低,活性氧簇(ROS)增多,并氧化了细胞内的还原性 GSH 池。小鼠感染流感病毒后产生了氧化应激[8,9],且肺组织中的抗氧化剂 GSH 和抗坏血酸的浓度均降低[9]。

本研究结果表明,感染 DV 后的 HepG2 细胞中 GSH 水平较模拟感染组降低,且 GSH 随着感染时间的推移呈现阶段性的变化,即感染后 30 min、2、24 h 呈现 3 个低谷。一般认为细胞内的 GSH 水平下降反映了细胞的一种氧化状态,因此提示 DV 的感染也造成了细胞内氧化还原状态的改变。我们知道病毒感染宿主细胞,必须经过吸附、穿入/脱壳、大分子生物合成及组装、释放这样一个完整的复制周期。

本实验所观察到的 DV 感染早期细胞内 GSH 水

平下降，与仙台病毒[5]和疱疹病毒1型[4]的研究结果一致，此时病毒处于吸附、穿入阶段，这一时期细胞内GSH水平迅速下降的原因可能有：①病毒可能通过与细胞表面的受体结合，启动细胞内氧化还原相关的信号传递系统，导致细胞内的GSH被氧化成为GSSG。②GSH被细胞转运系统输送出细胞外。③GSH从质膜漏出细胞外[5]。但研究证实细胞内的GSSG水平在病毒感染时无变化，且用肝细胞GSH转运抑制物蛋氨酸也不能阻止受感染细胞中GSH的丢失，因此认为GSH可能主要是通过质膜非特异性地漏出细胞外。用紫外线灭活的仙台病毒也得到了同样的结果，证实GSH的丢失主要是因为病毒与膜的融合造成细胞的膜混乱[5]。

而在感染后1 h时，GSH水平出现了回升，1 h正好是病毒的吸附和穿入期末，这时的回升说明30 min时的GSH下降与病毒感染有着直接、紧密的联系[4]。而在感染后2 h时出现GSH水平的第2次下降，其可能的原因目前尚不清楚。

DV感染细胞后24 h，细胞中GSH再次降低，这正好是病毒组装释放及新一轮病毒吸附、穿入的时期，推测其主要原因：其一是用于合成GSH的半胱氨酸被优先用于合成病毒的蛋白，有研究表明，从HIV感染的患者体内分离的T细胞中半胱氨酸和GSH含量都较低[10]；其二是GSH用于解除病理状态下细胞内蛋白质二巯键的形成[11]；其三可能因为新一轮病毒的吸附、穿入，GSH再次通过质膜非特异性地漏出细胞外。

到感染后期，细胞整体状态趋于恢复，说明GSH水平与病毒感染达到一定的平衡，因此GSH水平逐渐回复到模拟感染组的水平。Gil等[3]对DV感染3 d后的患者血清中GSH含量与对照比较没有显著差异，与本实验结果基本相符。

丙型肝炎病毒(HCV)多聚蛋白质在转基因小鼠中的表达使其对氧化应激异常敏感、脆弱[12]。而DV蛋白在细胞中的稳定表达造成细胞内氧化还原状态的改变，目前尚不清楚。E蛋白是DV结构蛋白中最重要的蛋白之一，它既是DV的吸附蛋白，也是DV的主要抗原，有多种生物学活性，并在免疫保护性方面起重要作用，同时其存在有“增强性”抗原表位，与登革出血热或登革休克综合征的发生有着密切联系。而NS3是一个多功能蛋白，具有多种酶活性，在病毒多聚蛋白的加工和RNA的复制及5′端加帽中起到重要的作用，且该蛋白也具有很好的免疫原性。本研究表明，E蛋白和NS3蛋白在细胞中的表达均可使细胞中GSH水平较空质粒对照组降低，提示DV蛋白可能改变细胞内的氧化还原状态，以促进病毒的感染。但是否所有的病毒蛋白都会引起这种改变呢？其中有没有起主要作用的蛋白呢？本实验室将对DV的其他蛋白做进一步的研究。

综上所述，我们认为DV感染HepG2细胞，可使细胞内的GSH下降，且呈阶段性，推测与病毒的吸附、穿入、蛋白质合成、释放等过程有关。且DVE蛋白和NS3蛋白的单独表达均可改变细胞内的GSH水平。本研究结果可给研究GSH水平与病毒复制之间的复杂关系提供一些有意义的信息。GSH水平的快速降低导致了短时间内细胞内氧化还原状态的改变，这种状况可能增强了氧化应激对细胞其他功能的影响，尤其是与氧化还原机制相关的功能，引起细胞的一系列反应，从而可能影响到病毒在细胞中的复制、增殖。关于DV感染细胞后GSH水平降低的分子机制以及GSH对DV感染的影响等方面，本实验室将做进一步研究。

参考文献：

[1] 张俊磊，蹇 锐，万颖杰. 广州2002年登革病毒流行株的分离鉴定及进化分析[J]. 第三军医大学学报，2005，27(4)：282－286.

[2] Beck M A. The influence of antioxidant nutrients on viral infection [J]. Nutr Rev，1998，56(1 Pt 2)：S140－S146.

[3] Gil L，Martinez G，Tapanes R，*et al*. Oxidative stress in adult dengue patients[J]. Am J Trop Med Hyg，2004，71(5)：652－657.

[4] Palamara A T，Perno C F，Ciriolo M R，*et al*. Evidence for antiviral activity of glutathione：*in vitro* inhibition of herpes simplex virus type 1 replication[J]. Antiviral Res，1995，27(3)：237－253.

[5] Ciriolo M R，Palamara A T，Incerpi S，*et al*. Loss of GSH，oxidative stress，and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection[J]. J Biol Chem，1997，272(5)：2700－2708.

[6] Ceme K M，Dede S，Bayiroglu F，*et al*. Rlationship between antioxidamt capacity and oxidative stress in children with acute hepatitis A [J]. World J Gastroenterol，2006，12(38)：6212－6215.

[7] Droge W，Schulze-Osthoff K，Mihm S，*et al*. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology[J]. FASEB J，1994，8(14)：1131－1138.

[8] Suliman H B，Ryan L K，Bishop L，*et al*. Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2001，280(1)：L69－L78.

[9] Hennet T，Peterhans E，Stocker R. Alterations in antioxidant defences in lung and liver of mice infected with influenza A virus[J]. J Gen Virol，1992，73(Pt 1)：39－46.

[10] Staal F J，Roederer M，Israelski D M，*et al*. Intracellular glutathione levels in T cell subsets decrease in HIV-infected individuals[J]. AIDS Res Hum Retroviruses，1992，8(2)：305－311.

[11] Tatu U，Hammond C，Helenius A. Folding and oligomerization of influenza hemagglutinin in the ER and the intermediate compartment [J]. EMBO J，1995，14(7)：1340－1348.

[12] Hidaka I，Hino K，Korenaga M，*et al*. Stronger Neo-Minophagen C，a glycyrrhizin-containing preparation，protects liver against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein[J]. Liver Int，2007，27(6)：845－853.

（编辑 郭建秀）