文章编号:1000-5404(2011)21-2265-03

论著

Ⅱ型登革病毒感染对细胞波形蛋白表达及磷酸化水平调控的实验研究

雷 舜,陈 炜,宋富强,王嘉丽,饶贤才,黎 庶,胡晓梅 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室)

[摘要] **目的** 研究Ⅱ型登革病毒(dengue virus serotype 2, DV2)感染ECV304细胞后,波形蛋白(vimentin)的表达及丝氨酸第71位点(Ser71)磷酸化水平的变化。**方法** 使用DV2感染ECV304细胞,以Western blot检测病毒进入和复制期不同时相点细胞波形蛋白的表达和Ser71磷酸化水平。**结果** DV2感染的ECV304细胞中波形蛋白表达较对照组没有显著差异($P>0.05$),而波形蛋白Ser71位点的磷酸化水平较对照组有显著差异:DV2在进入ECV304细胞第30分钟时波形蛋白Ser71磷酸化水平显著增高,达到对照组的176.3%($P<0.01$);而在感染后第8小时,Ser71位点磷酸化水平再次显著增高,达到对照组的333.2%($P<0.01$),感染后第12小时降低至对照组的203.5%($P<0.05$)。**结论** 波形蛋白Ser71位点的磷酸化水平变化与DV2在ECV304细胞中的感染与复制周期密切相关。

[关键词] 登革病毒;ECV304细胞;波形蛋白;磷酸化
[中图法分类号] R361.3; R363.21; R373.33 [文献标志码] A

Effect of Dengue virus serotype 2 infection on expression and phosphorylation of vimentin in EV304 cells

Lei Shun, Chen Wei, Song Fuqiang, Wang Jiali, Rao Xiancai, Li Shu, Hu Xiaomei (Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To analyze the effect of Dengue virus serotype 2 (DV2) infection on the expression and Serine 71 (Ser71) phosphorylation of vimentin in ECV304 cells. **Methods** ECV304 cells were infected with DV2. Expression and vimentin-Ser71 phosphorylation levels of vimentin were detected by Western blotting at different time points during DV2 entry and replication in ECV304 cells. **Results** Vimentin expression showed no significant difference between the infected group and the control group, but the levels of vimentin-Ser71 phosphorylation were significantly different between the two groups. As compared with the control group, the level of vimentin-Ser71 phosphorylation in the infected group was increased to 176.3% at 30 min after DV2 entry ($P<0.01$); then it was increased to 333.2% at 8 h postinfection ($P<0.01$) and was decreased to 203.5% at 12 h postinfection ($P<0.05$). **Conclusion** Vimentin-Ser71 phosphorylation is closely related to the process of DV2 entry and replication in ECV304 cells.

[**Key words**] dengue virus; ECV304 cells; vimentin; phosphorylation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972596, 31070811), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5015), the Youngth Innovative Foundation of Third Military Medical University (2009XQN10), the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas of Third Military Medical University (2009XHG03), and the Advanced Research Foundation of Third Military Medical University (2009XYY04). Corresponding author: Chen Wei, Tel: 86-23-68771937, E-mail: chongqingchenwei@126.com; Hu Xiaomei, Tel: 86-23-68775224, E-mail: hxm03@yahoo.com.cn

登革病毒(dengue viruses, DV)是黄病毒属的单股正链RNA病毒,分为4个血清型(DV1-4)。DV感染可引起人类登革热(classical dengue fever, DF)和登革出血热/登革休克综合征(dengue hemorrhagic fever / dengue shock syndrome, DHF/DSS)。近年来,世界范围内的DF和DHF/DSS流行、暴发更加频繁[1-2]。而目前对于DV感染仍无有效的疫苗和特异性药物,预防主要依赖于对蚊媒的控制。由于DV完全依赖宿主细胞来完成自我复制,深入研究DV与宿主细胞相互作用的机制,将有助于阐明DV的致病机制和寻找防治的突破点。

目前研究表明,宿主细胞骨架在病毒的感染过程中发挥重要作用,而构成细胞骨架的主要成分微丝、微管、中间纤维在不同病毒的感染过程中分别扮演着独特角色。例如,阿根廷出血热病毒的早期感染依赖完整的微丝骨架[3];微管介导单纯疱疹病毒的顺行性运输[4];Nitahara-Kasahara等[5]在对丙型肝炎病毒的研

[基金项目] 国家自然科学基金(30972596,31070811);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5015);第三军医大学青年创新人才基金(2009XQN10);第三军医大学回国启动基金(2009XHG03);第三军医大学预研基金(2009XYY04)
[通信作者] 陈 炜,电话:(023)68771937,E-mail:chongqingchenwei@126.com
胡晓梅,电话:(023)68775224,E-mail:hxm03@yahoo.com.cn

究中发现,调节波形蛋白纤维的表达可影响病毒的增殖。我们的前期研究也显示波形蛋白纤维在DV感染中发挥重要的作用,DV感染诱导波形蛋白纤维的排列发生改变[6]。而波形蛋白纤维的重排与多种病毒的感染复制过程密切相关:汉坦病毒、非洲猪瘟病毒感染宿主细胞后,可通过改变波形蛋白纤维形成围绕"病毒工厂"的笼状结构[7-8],日本脑炎病毒可通过与波形蛋白结合感染宿主细胞[9]。研究表明:波形蛋白纤维的重排通常是由激酶磷酸化其头部区结构域所致[10]。小G蛋白家族主要成员RhoA能通过激活其下游相关激酶ROCK(rho associated coiled-coil forming protein kinase),使波形蛋白头部磷酸化位点Ser71特异性地发生磷酸化而进行重排[11-12]。因此本研究通过检测DV感染ECV304后不同时相点细胞中波形蛋白的表达及Ser71位点磷酸化水平,观察其与DV复制周期的关系,期望为进一步阐明中间纤维在DV感染中的作用机制奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞株 Ⅱ型登革病毒(DV2,Tr1751株)由日本感染病研究所惠赠。病毒在白纹伊蚊C6/36细胞株中增殖,病毒液-80 ℃保存备用。C6/36和ECV304细胞株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养液、RPMI1640培养液购自Hy Clone公司。灭活胎牛血清购自天津灏洋公司。小鼠抗人波形蛋白抗体购自Sigma公司,大鼠抗人Ser71磷酸化波形蛋白抗体购自日本MBL公司,兔抗GAPDH抗体购自杭州贤至生物公司。羊抗小鼠lgG-HRP、羊抗大鼠lgG-HRP、羊抗兔lgG-HRP二抗购自北京中杉金桥。Super Signal West Pico化学发光液购自Pierce公司。RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自广州碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与登革病毒感染 ECV304细胞制成细胞悬液,以1×10^6/瓶,接种于100 ml培养瓶中,37 ℃,5% CO_2,孵育18~24 h,待细胞密度达到70%~80%融合时进行病毒感染。感染前吸出培养上清,用PBS润洗细胞表面3次,加入DV2液或65 ℃灭活30 min的病毒液2 ml/瓶(MOI=1),置37 ℃吸附1 h,PBS洗涤3次,加入DMEM维持液(含2%胎牛血清)5 ml/瓶,置37 ℃,5% CO_2,于DV2进入细胞过程中不同时相点(0、15、30、60 min)和感染后不同时相点(0、4、8、12 h)刮取细胞样品,用下述方法制备蛋白样品。

1.2.2 Western blot 使用RIPA裂解液冰上裂解细胞样品30 min,超声10 s,BCA法测定总蛋白浓度。取80 μg总蛋白进行SDS-PAGE,转移蛋白至PVDF膜,于含5%脱脂牛奶的TBST缓冲液中室温封闭1h,将PVDF膜分别孵育抗磷酸化Ser71波形蛋白抗体(1∶1 000)和抗GAPDH抗体(1∶2 000)4℃过夜,次日TBST洗膜10 min×3,孵育对应HRP偶联的羊抗大鼠/兔二抗,室温孵育1 h,洗膜10 min×3,加入ECL化学发光液后X光片压片曝光,凝胶成像系统照相分析结果。PVDF膜洗脱抗体后以同样方法检测总波形蛋白表达水平。使用Quantity One软件扫描光密度值进行定量分析,以内参GAPDH校正误差,以波形蛋白Ser71磷酸化条带光密度值与总波形蛋白条带光密度值的比值表示Ser71磷酸化水平,各组数据以感染组与对照组的比值表示,以消除细胞中波形蛋白及Ser71磷酸化水平的本底水平。

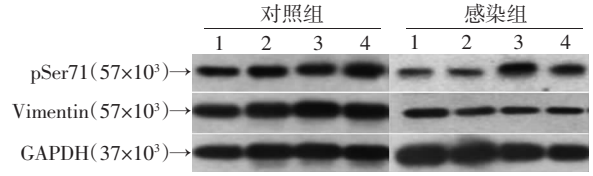
1.3 统计学分析

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,使用SPSS 14.0软件进行方差分析。

2 结果

2.1 DV2进入ECV304细胞过程中波形蛋白表达及Ser71磷酸化水平变化

为研究DV2进入宿主细胞过程中波形蛋白表达及其磷酸化水平,分别在感染后第0、15、30、60 min收集样本,进行Western blot检测。结果显示:与模拟感染对照组相比,DV感染组第0、15、30、60 min 4个时相点的波形蛋白表达没有明显差异($P>0.05$),而Ser71磷酸化水平在第30min达到对照组的176.3%($P<0.01$),第1小时时开始呈下降趋势,达到对照组的132.3%($P<0.05$)(图1)。结果提示,波形蛋白Ser71磷酸化水平的升高具有时序性,可能与DV进入ECV304细胞这一过程密切相关。

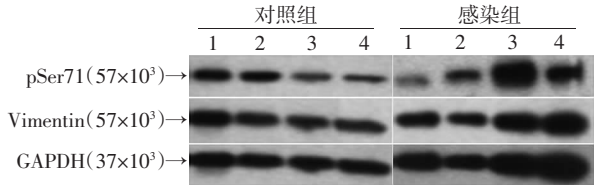


1-4:感染后第0、15、30、60分钟

图1 DV2进入ECV304细胞过程中波形蛋白表达和Ser71磷酸化水平

2.2 DV2在ECV304细胞内进行复制增殖过程中波形蛋白表达及Ser71磷酸化水平变化

为研究DV2复制增殖过程中波形蛋白表达及其磷酸化水平,分别在感染后第0、4、8、12 h收集样本,进行Western blot检测。结果表明,与模拟感染对照组相比,DV2感染组第0、4、8、12小时4个时相点的波形蛋白表达没有明显差异($P>0.05$),而Ser71磷酸化水平在感染后第4小时增高至对照组的171.1%,第8小时增高至对照组的333.2%达到峰值($P<0.01$),第12小时呈明显下降的趋势($P<0.01$),达到对照组的203.5%($P<0.05$)(图2)。结果提示,波形蛋白Ser71磷酸化水平的升高可能与DV2在ECV304细胞内的复制增殖过程密切相关。



1-4:DV2病毒感染后第0、4、8、12小时

图2 DV2在ECV304细胞内进行复制增殖过程中波形蛋白表达和Ser71磷酸化水平

3 讨论

病毒感染宿主细胞,必须经过以下几个步骤:①吸

附到宿主细胞表面;②穿入细胞质或内含体;③脱壳;④早期病毒蛋白合成;⑤基因组复制;⑥晚期病毒蛋白合成;⑦病毒组装/成熟;⑧释放。这实际上是一个病毒与宿主细胞相互作用的过程。病毒必须利用宿主细胞内的某些蛋白组分包括酶类才能完成其在细胞内的运行和复制增殖。近年来,大量研究证实细胞骨架参与了病毒完整的复制周期[3-5]。我们的前期研究也显示波形蛋白纤维在DV感染中发挥重要的作用,DV感染诱导波形蛋白纤维的排列发生改变[6]。

波形蛋白是一种Ⅲ型中间纤维蛋白,蛋白单体通过聚合为二聚体、四聚体并最终组装成直径约10 nm的波形蛋白纤维丝,其聚合与解聚是通过磷酸化和去磷酸化调控。波形蛋白纤维与细胞形态的维持、细胞黏附、有丝分裂期染色体移动等活动密切相关,但其确切的生物学功能至今尚不清楚。波形蛋白纤维的重排通常是由激酶磷酸化其头部区结构域所致[10],小G蛋白家族主要成员RhoA能通过激活其下游相关激酶ROCK,使波形蛋白头部磷酸化位点Ser71特异性地发生磷酸化而进行重排[11-12]。研究显示,波形蛋白的重排与病毒复制增殖密切相关,如汉坦病毒、非洲猪瘟病毒在感染宿主细胞后,能诱导波形蛋白重排由星状结构形成特殊的笼状结构[7-8],Risco[13]和Wileman等[14]认为,感染早期波形蛋白的重排可能在病毒工厂的组装中充当了"脚手架"的作用,帮助招募病毒复制所需要的蛋白,而随后形成的笼状结构能阻止病毒组分过早扩散进入细胞质,利于病毒基因组与结构蛋白在病毒工厂中的进一步复制与装配。这一特殊结构与细胞中的毒性蛋白聚集体Aggresomes具有相似的结构组成,都会形成由波形蛋白包绕的结构。Aggresomes被认为是细胞减少错误折叠蛋白毒性而形成的保护性结构,而病毒可能利用了这一区域完成病毒组分的复制与装配[15]。因而本研究通过检测DV感染ECV304后不同时相点细胞中波形蛋白的表达及Ser71位点磷酸化水平,观察波形蛋白重排与DV复制周期的关系。结果显示:在DV2进入ECV304细胞的过程中,波形蛋白Ser71磷酸化水平在第30分钟时达峰值,第1小时已呈明显下降趋势。这一结果提示波形蛋白Ser71磷酸化水平的升高具有时序性,可能与DV进入ECV304细胞这一过程密切相关。感染后第4小时波形蛋白Ser71磷酸化水平逐渐升高,第8小时达峰值,第12小时呈明显下降的趋势。我们的前期工作显示:DV2在感染ECV304细胞后第4~5小时培养上清即可检测到病毒滴度,感染后第8小时到达第1个病毒释放的高峰[16]。由此可见,波形蛋白磷酸化水平升高与DV2复制增殖的过程密切相关。

综上所述,DV2感染ECV304细胞的过程中,可能通过调控波形蛋白Ser71磷酸化水平诱导波形蛋白重排参与了病毒进入和在细胞内的复制,但其机制尚需进一步实验证实。

参考文献:

[1] Guzman M G, Halstead S B, Artsob H, *et al*. Dengue: a continuing global threat[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(12 Suppl): S7-S16.
[2] 刘丽梅, 陈宗涛, 高娜, 等. 利用DNA免疫技术制备抗登革2型病毒NS2B蛋白多克隆抗体[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(4): 327-330.
[3] Martinez M G, Cordo S M, Candurra N A. Involvement of cytoskeleton in Junin virus entry[J]. Virus Res, 2008, 138(1/2): 17-25.
[4] Shanda S K, Wilson D W. UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules [J]. J Virol, 2008, 82(15): 7388-7394.
[5] Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, *et al*. Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells[J]. Virology, 2009, 383(2): 319- 327.
[6] Chen W, Gao N, Wang J L, *et al*. Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process[J]. Arch Virol, 2008, 153(9): 1777- 1781.
[7] Ramanathan H N, Chung D H, Plane S J, *et al*. Dynein-dependent transport of the hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment [J]. J Virol, 2007, 81(16): 8634-8647.
[8] Stefanovic S, Windsor M, Nagata K I, *et al*. Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II[J]. J Virol, 2005, 79(18): 11766-11775.
[9] Liang J J, Yu C Y, Liao C L, *et al*. Vimentin binding is critical for infection by the virulent strain of Japanese encephalitis virus[J]. Cell Microbiol, 2011, 13(9): 1358-1370.
[10] Minin A A, Moldaver M V. Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution[J]. Biochemistry (Mosc), 2008, 73(13): 1453-1466.
[11] Goto H, Kosako H, Tanabe K, *et al*. Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis[J]. J Biol Chem, 1998, 273(19): 11728-11736.
[12] Kosako H, Goto H, Yanagida M, *et al*. Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments[J]. Oncogene, 1999, 18(17): 2783- 2788.
[13] Risco C, Rodriguez J R, Lopez-Iglesias C, *et al*. Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly[J]. J Virol, 2002, 76(4): 1839-1855.
[14] Wileman T. Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication[J]. Science, 2006, 312(5775): 875-878.
[15] Heath C M, Windsor M, Wileman T. Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly[J]. J Cell Biol, 2001, 153(3): 449-455.
[16] 陈炜, 王嘉丽, 彭涛, 等. 微管骨架在登革病毒感染ECV304细胞中作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(7): 628-631.

(**收稿**:2011-08-08;**修回**:2011-09-13)
(编辑 王 红)