DOI:10.16016/j.2097-0927.202211078

ARRDC3 在 D68 型肠道病毒感染 A549 细胞中的功能研究

李华怡,傅慧超,司俊卓,杨 春 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室

[摘要] **目的** 探索含 a-Arrestin 结构域蛋白 3(a-Arrestin-domain-containing-3,ARRDC3)在肠道病毒 D 组 68 型(enterovirus D species,EV-D68)感染 A549 中的表达以及对 A549 细胞株生物学行为的影响。**方法** 对 EV-D68 感染宿主细胞前后的样本进行全转录组高通量测序分析,通过生物信息学分析筛选出差异表达基因 ARRDC3;RT-qPCR 和 Western blot 验证 ARRDC3 的表达水平;设计实验分组 4 组,对照组(未感染 EV-D68 的 A549 细胞)、感染组(感染 EV-D68 的 A549 细胞)、敲低 ARRDC3 感染组(感染 EV-D68 的 A549 细胞转染 ARRDC3-SiRNA-干扰片段)、敲低对照感染组(感染 EV-D68 的 A549 细胞转染 NC-SiRNA-干扰片段),通过流式细胞术、CCK-8、Transwell 实验检测 ARRDC3 在 EV-D68 感染模型中对 A549 细胞周期、增殖、迁移的影响。**结果** 从测序结果中共筛选出差异表达 2 倍以上的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs)239 个,其中上调基因 135 个,下调基因 104 个,ARRDC3 是差异表达基因之一。EV-D68 感染 A549 后,通过 RT-qPCR 和 Western blot 结果发现 ARRDC3 的表达水平显著增加($P<0.05$)。细胞周期明显缩短,抑制细胞迁移。进一步通过转染成功干扰 ARRDC3 表达载体,沉默 ARRDC3 可以增强 EV-D68 感染 A549 细胞,沉默 ARRDC3 细胞周期 DNA 合成期延长($P<0.05$),虽然对宿主细胞增殖无显著影响,但沉默 ARRDC3 可引起细胞迁移能力增强($P<0.05$)。**结论** ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 后表达明显上调,通过阻滞宿主细胞 DNA 合成期,抑制宿主细胞迁移等作用来发挥对宿主细胞的影响。

[关键词] ARRDC3;肠道病毒 D68 型;A549;细胞周期;细胞增殖和迁移

[中图法分类号] R373.2;R394.3;R734.2 [文献标志码] A

Role of ARRDC3 in enterovirus D68-infected A549 cells

LI Huayi, FU Huichao, SI Junzhuo, YANG Chun Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Methods** To explore the expression of a-arrestin domain containing protein 3 (ARRDC3) in EV-D68 infected A549 cells and its effect on the biological behaviors of the cells. **Methods** The samples before and after EV-D68 infecting host cells (A549 cells) were analyzed by high-throughput whole transcriptome analysis with sequencing. After bioinformatics analysis was used to screen differentially expressed genes (DEGs), RT-qPCR and Western blotting were used to verify the expression of ARRDC3 at mRNA and protein levels. Then the A549 cells were designed and divided into 4 groups: control group (A549 cells not infected with EV-D68), infection group (A549 cells infected), knockdown ARRDC3 infection group (ARRDC3 siRNA interference-mediated knockdown in A549 cells after infection), knockdown control infection group (A549 cells infected with EV-D68 transfected with NC siRNA interference). Flow cytometry, CCK-8 assay, and Transwell assay were used to determine the effects of ARRDC3 on cell cycle, proliferation,

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2016jcyjA0212)

[通信作者] 杨 春,E-mail:100494@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and migration in above groups of cells. **Results** Gene sequencing showed there were 239 DEGs with more than 2-fold differential expression, with 135 up-regulated and 104 down-regulated genes, and ARRDC3 is one of DEGs. After A549 cells were infected with EV-D68, the expression level of ARRDC3 was significantly increased through RT-qPCR and Western blotting ($P<0.05$), cell cycle was arrested and cell migration was inhibited. Silencing of ARRDC3 through siRNA transfection improved EV-D68 infection to A549 cells and prolonged the cell cycle arrested at DNA synthesis phase ($P<0.05$). Although the silencing showed no significant effect on the proliferation of host cells, cell migration ability was obviously enhanced ($P<0.05$). **Conclusion** ARRDC3 is significantly up-regulated after EV-D68 infects A549 cells, and exerts its influence on host cells by blocking the DNA synthesis phase and inhibiting migration of host cells.

[**Key words**] ARRDC3; EV-D68; A549 cells; cell cycle; proliferation and migration

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2016jcyjA0212). Corresponding author: YANG Chun, E-mail: 100494@cqmu.edu.cn

EV-D68 属于小 RNA 病毒科、肠道病毒属、肠道病毒种 D(human enterovirus D species)组为单股正链 RNA 病毒,最早于 1962 年在美国加利福尼亚州 4 名患有肺炎和细支气管炎的儿童患者中分离得到[1]。在 2009 年之前,每年仅有少量的 EV-D68 病毒感染病例被报告,但是在 2010-2015 年间出现了大规模流行[2]。EV-D68 感染导致的重症病例的主要临床表现为重症呼吸道、中枢神经系统感染,少数病例表现为急性弛缓性麻痹[3-6]。EV-D68 感染病例临床表型多变,多为亚临床或轻症感染;且儿童为高危人群,显性感染多呈急性呼吸道感染,全球临床分离病毒株在持续快速变异及进化,存在潜在暴发流行的可能[7]。

EV-D68 感染宿主细胞前后的样本进行全转录组高通量测序分析,通过生物信息学分析筛选出的差异表达基因(a-Arrestin-domain-containing-3, ARRDC3)。a-Arrestins 是一个细胞内蛋白家族,可与 G 蛋白偶联受体(G Protein-Coupled Receptors, GPCR)结合并调节其信号转导[8]。Arrestin 家族是一类重要的信号调控蛋白,通过使 GPCR 脱敏,参与肿瘤发生、发展、血管生成等过程[9-10]。近几年的研究报道 ARRDC3 与多种疾病(如 COVID-19 和 HPV)、肿瘤的发生密切相关,且都呈现出病毒相关的表达增强[11-12]。有研究发现在 HeLa 细胞中敲低 ARRDC3 会导致细胞生长缓慢且对 HPV16 假病毒颗粒感染的敏感性显著降低,这表明 ARRDC3 参与了 HPV 进入细胞的感染[12]。迄今尚未见 ARRDC3 在 EV-D68 感染后的相关功能报道。本次研究旨在探究 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 细胞中的功能及影响,为防治 EV-D68 感染呈现一个新的研究视角。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

A549 由金麦研究中心惠赠。DMEM/F12. 购自美国 Gibco 公司。蛋白质裂解液 RIPA、抗兔二抗、电泳缓冲液、转膜缓冲液、ECL 发光液检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。ARRDC3 抗体(ab64817)购自 Affinity 公司。细胞增殖检测试剂 CCK-8 试剂购自日本同仁化学研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 EV-D68 感染 A549 细胞 A549 细胞复苏后,经换液及扩大培养,将 A549 细胞以 4.25×10^5/孔接种于 6 孔板中;6 h 待细胞完全贴壁,将 6 孔板培养基换成 2%FBS 的 DMEM;分别以 MOI 为 0、0.01、0.1、0.5、1、3、5、10、15、20、25、30 的病毒量感染细胞,24 h 后镜下观察并拍照记录细胞病变效应(cytopathic effects, CPE)。

1.2.2 mRNA 表达谱差异分析 将 EV-D68 以 MOI=1、感染宿主细胞 24 h 后提取总 RNA 制备样本,送至华大基因进行高通量测序,后续获得表达谱数据库。根据实验设计,使用华大基因系统软件 Dr. Tom 来筛选差异表达的基因(DEGs)。计算差异基因的软件方法是 DESeq2,设定 $|Log2(Fold\ change)|\geq1$ 和 Q. Value<0.05 作为识别感染组和非感染组之间显著差异的指标。

1.2.3 细胞转染 合成的 siRNA 开盖前,稍稍离心,将粉末收集管底,再用灭菌的 ddH_2O 配制成 20 μmol/L 的储存溶液;将其分装至 EP 管中,放-20 ℃冰箱保存;12 h 后,取出接种的细胞,显微镜下观察细胞密度为 40%,细胞状态良好;稀释 siRNA 及转染试剂(lipo2000)。以 1 个孔为例:取 2 支 EP 管,分别加入

100 μL 的不完全培养基,一管加入 siRNA 5 μL,另一管加入 lipo2000 4 μL;分别轻轻混匀后,室温孵育 5 min;将稀释好的 siRNA 及转染试剂混匀至一管中,室温孵育 20 min;每孔加入 200 μL 的 siRNA 转染混合物,轻轻混匀。转染 6 h 取出细胞,将原有转染液去掉;每孔加入 2 mL 的完全培养基,放培养箱培养 24~72 h,根据后续检测目的收集样本。

1.2.4 实验分组 RT-qPCR 检测 A549 细胞中 ARRDC3 表达,Western blot 检测,流式细胞仪检测细胞周期,CCK-8 检测细胞增殖和细胞迁移检测实验分组均分为 4 组:对照组(未感染 EV-D68 的 A549 细胞)、感染组(感染 EV-D68 的 A549 细胞)、敲低 ARRDC3 感染组(感染 EV-D68 的 A549 细胞转染 ARRDC3-SiRNA-干扰片段)、敲低对照感染组(感染 EV-D68 的 A549 细胞转染 NC-SiRNA-干扰片段)。

1.2.5 RT-qPCR 检测 A549 细胞中 ARRDC3 表达

Trizol 提取 EV-D68 感染 A549 细胞组和对照组总 RNA,并进行反转录获得 cDNA。ARRDC 定量引物序列为:上游 5′-ATGCTCACCCTCCCACTTTC-3′,下游 5′-GTCTTCTTCCCACAGTTCTCACAG-3′。内参引物 GAPDH 序列为:上游 5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′,下游 5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′。定量 PCR 体系为 95 ℃变性 10 min,95 ℃,15 s;54 ℃,1 min 共 40 个循环。结果使用 ABI7300 系统实时荧光定量 PCR 仪分析软件 SDS-v2.4_FCO3_B124_WebRelease 对结果进行分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 ARRDC3 相对表达量。

1.2.6 Western blot 检测 使用蛋白裂解液 RIPA 提取实验组及对照组细胞总蛋白。提取的蛋白进行 SDSPAGE 凝胶电泳,并将凝胶上蛋白转制 PVDF 膜上。按 1∶500 浓度加入抗 ARRDC3 抗体,置于 4 ℃冰箱孵育过夜。后加入抗兔二抗(1∶2 000),37 ℃孵育 2 h。ECL 发光液显色。以 β-actin 为内参,比较各组蛋白表达差异。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期 A549 细胞接种至 6 孔板感染 EV-D68,消化、沉淀、适当分散细胞,避免细胞成团,固定细胞。参考试剂盒说明书,根据待测样本的数量配制适量的碘化丙啶染色液染色,用流式细胞仪在激发波长 488 nm 波长处检测红色荧光,同时检测光散射情况。

1.2.8 CCK-8 检测细胞增殖 将待测细胞接种至 96 孔板,每孔 1×10^3 细胞,将培养板放在培养箱培养,分别在培养 24、48、72 h 时取出培养板将原液去掉,加入现配制好的含 10% CCK-8 的 100 μL 培养基,置 37 ℃培养箱培养 2 h,将待测培养基吸于 96 孔板中,测定 450 nm 的光密度。

1.2.9 细胞迁移检测 取细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室,24 孔板下加入 500 μL 的完全培养基,置培养箱培养 48 h,取出 Transwell 小室,弃去孔中培养基,用 PBS 洗 2 遍,4%多聚甲醛固定 30 min,取出小室置 PBS 洗 2 次,0.1%的结晶紫染液染色 2 min,PBS 洗 2 次;用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,用手术刀片将小室的膜取下,甘油封片拍照。

1.3 统计学方法

计量资料使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较使用 t 检验,实验进行 3 次重复,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EV-D68 感染 A549 模型构建

为验证 EV-D68 感染 A549 模型构建成功,用不同浓度 MOI 感染细胞 24 h 后,除对照组外,各组细胞均出现了不同程度的 CPE(图 1),且轻重程度与加入的病毒量呈正相关。细胞从最开始皱缩、变圆直至碎裂,然后从瓶壁脱落。证明 EV-D68 成功感染了 A549,后续通过 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中基因表达和蛋白水平的验证进一步证实感染成功。

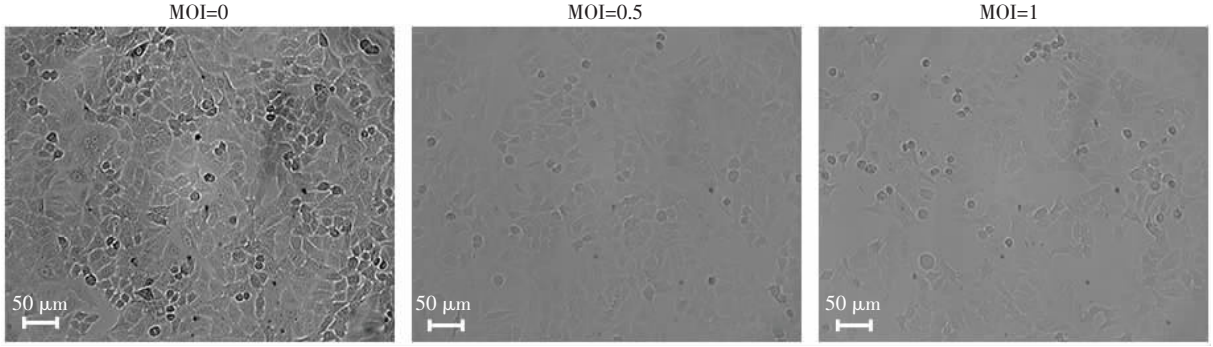


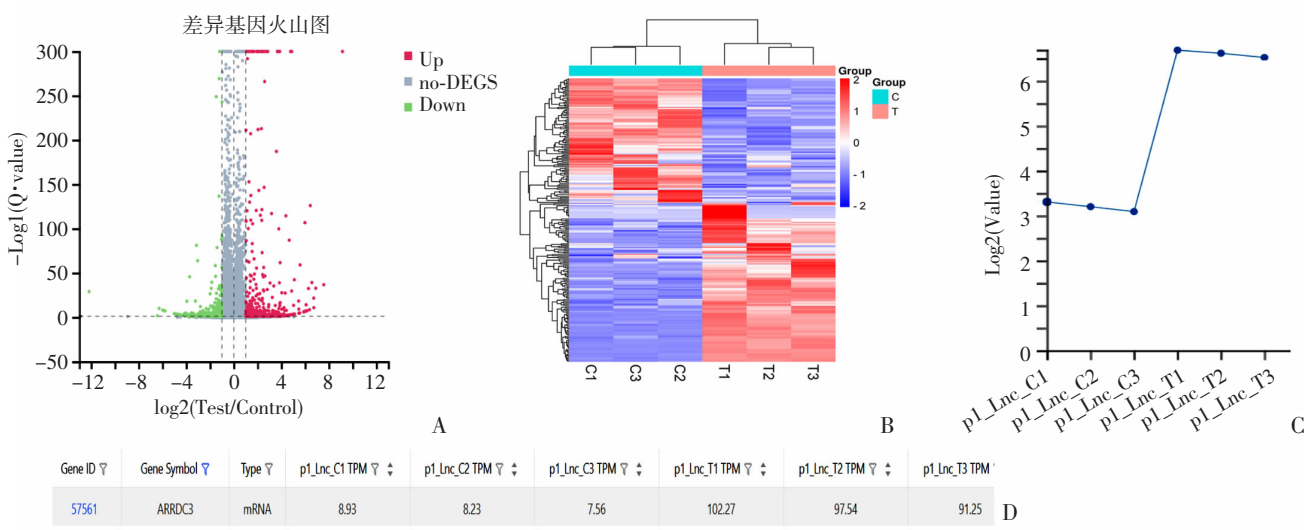
图 1 以不同 MOI 的 EV-D68 感染 A549 细胞 24 h 时细胞形态观察结果

2.2　差异表达基因的生物信息学分析

将 EV-D68 感染宿主细胞前后转录组的表达变化进行生物信息学分析,数据经过定量且标准化处理后筛选出|Log2FC|≥1 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)mRNA 239 个。其中上调基因 135 个、下调基因 104 个,绘制了火山图(图 2A)和聚类热图(图 2B)。考虑到蛋白编码 RNA 在病毒感染中的调控作用,从 239 个 mRNA 中选择了较为感兴趣的 ARRDC3 做后续的研究。图 2C、D 显示了 ARRDC3 在测序样本中的表达量水平变化:较之对照组,ARRDC3 在感染组表达明显上调。由此,本研究结果提示 ARRDC3 表达量差异可能与 EV-D68 病毒感染有关。

2.3　ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中基因表达和蛋白水平的验证

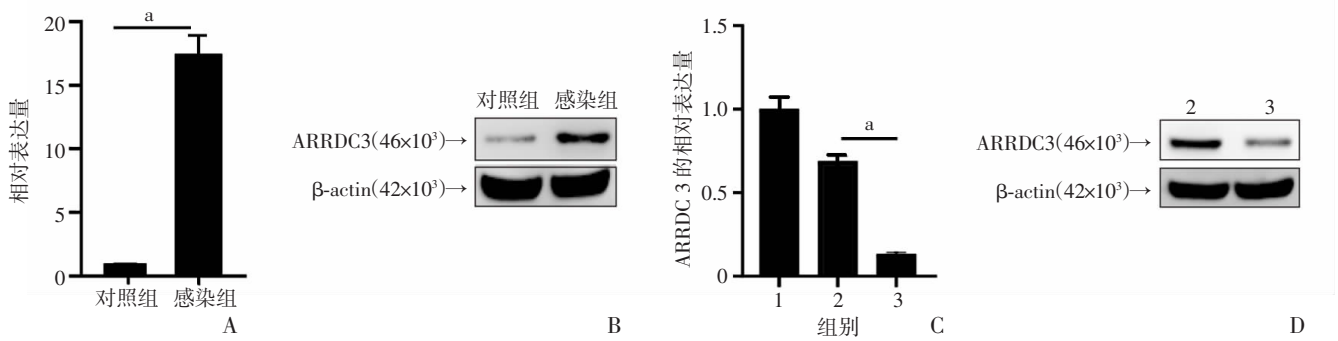
通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测验证 EV-D68 感染 A549 后 ARRDC3 表达水平上调。图 3A 显示 EV-D68 感染 A549 之后,ARRDC3 在 RNA 水平显著提高($P<0.05$)。与感染前相比,感染后 ARRDC3 的蛋白水平也显著增加(图 3B),与 RT-qPCR 的结果一致。构建 Si-ARRDC3 转染至 A549 细胞,RT-qPCR 结果显示:ARRDC3 表达水平下降,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3C)。敲低 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中蛋白水平也显著下降(图 3D),与 RT-qPCR 结果一致,并为后续的实验做准备。



Gene ID	Gene Symbol	Type	p1_Lnc_C1 TPM	p1_Lnc_C2 TPM	p1_Lnc_C3 TPM	p1_Lnc_T1 TPM	p1_Lnc_T2 TPM	p1_Lnc_T3 TPM
57561	ARRDC3	mRNA	8.93	8.23	7.56	102.27	97.54	91.25

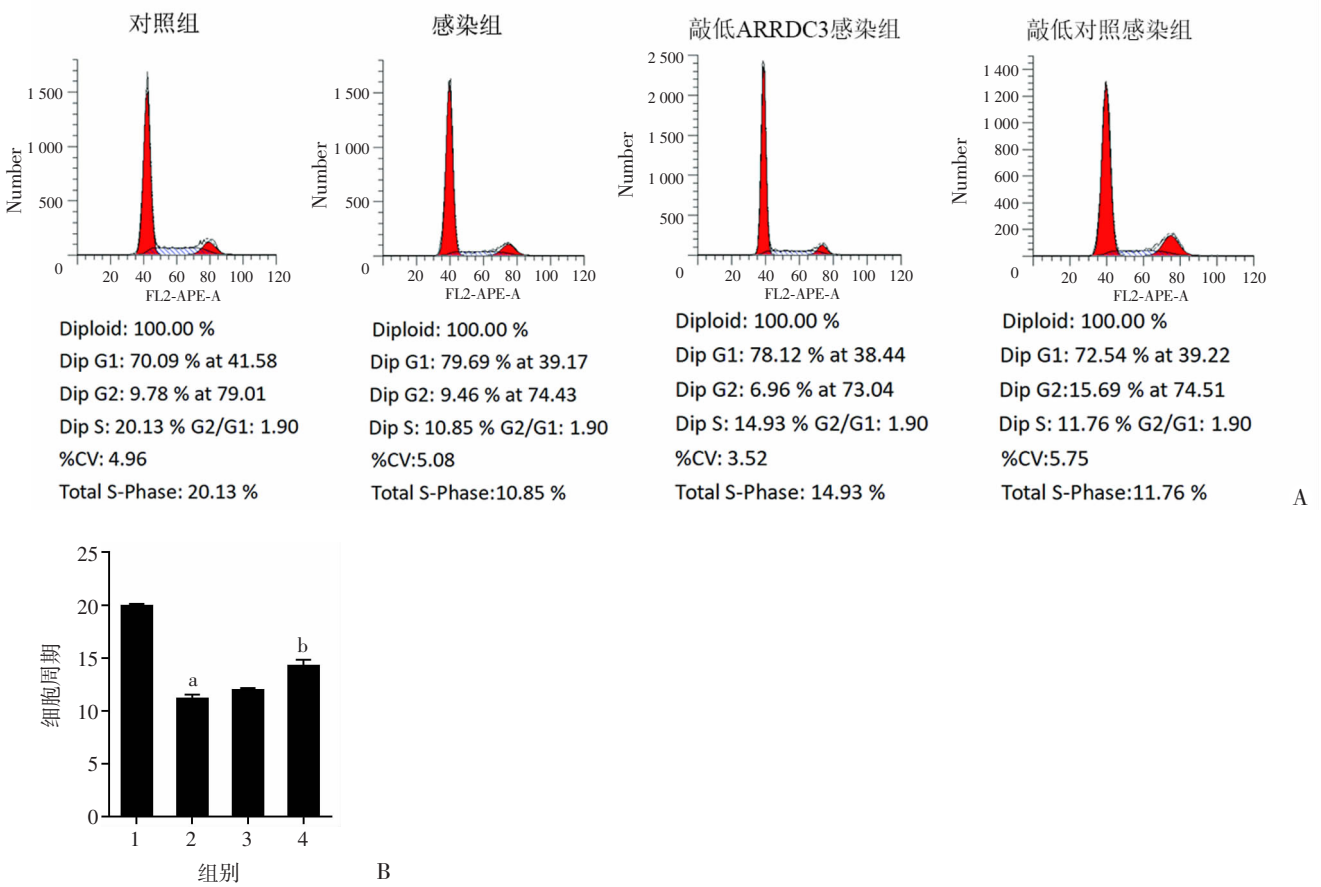
A:差异表达基因的火山图　使用|Log2(Fold change)|≥1,Q. Value<0.05 作为介质标准;B:差异表达基因热图的聚类分析;C:ARRDC3 在测序样本中的表达量折线图;D:ARRDC3 在测序样本中的表达量

图 2　差异表达基因的生物信息学分析结果



a:$P<0.05$　1:对照组;2:敲低对照感染组;3:敲低 ARRDC3 感染组　A:RT-qPCR 验证 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 细胞后的表达水平;B:Western blot 检测 ARRDC3 在 EV-D68 感染模型中的蛋白水平;C:RT-qPCR 验证干扰 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 细胞后的表达水平;D:Western blot 检测干扰 ARRDC3 在 EV-D68 感染模型中的蛋白水平

图 3　ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中基因表达和蛋白水平的验证　($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:流式细胞术结果;B:各组细胞的细胞周期变化($n=3,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与敲低对照感染组比较;1:对照组,2:感染组,3:敲低对照感染组,4:敲低 ARRDC3 感染组

图 4 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中对宿主细胞周期的影响

2.4 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中对宿主细胞周期的影响

如图 4 所示,EV-D68 感染 A549 后,宿主细胞的细胞周期明显缩短。沉默 ARRDC3 的表达后,发现宿主细胞的细胞周期较对照组明显缩短,但较感染组有所增加($P<0.05$)。说明 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中可以通过改变细胞周期(DNA 合成期)发挥宿主细胞在病毒感染后的细胞功能变化的作用。

2.5 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中对宿主细胞迁移的影响

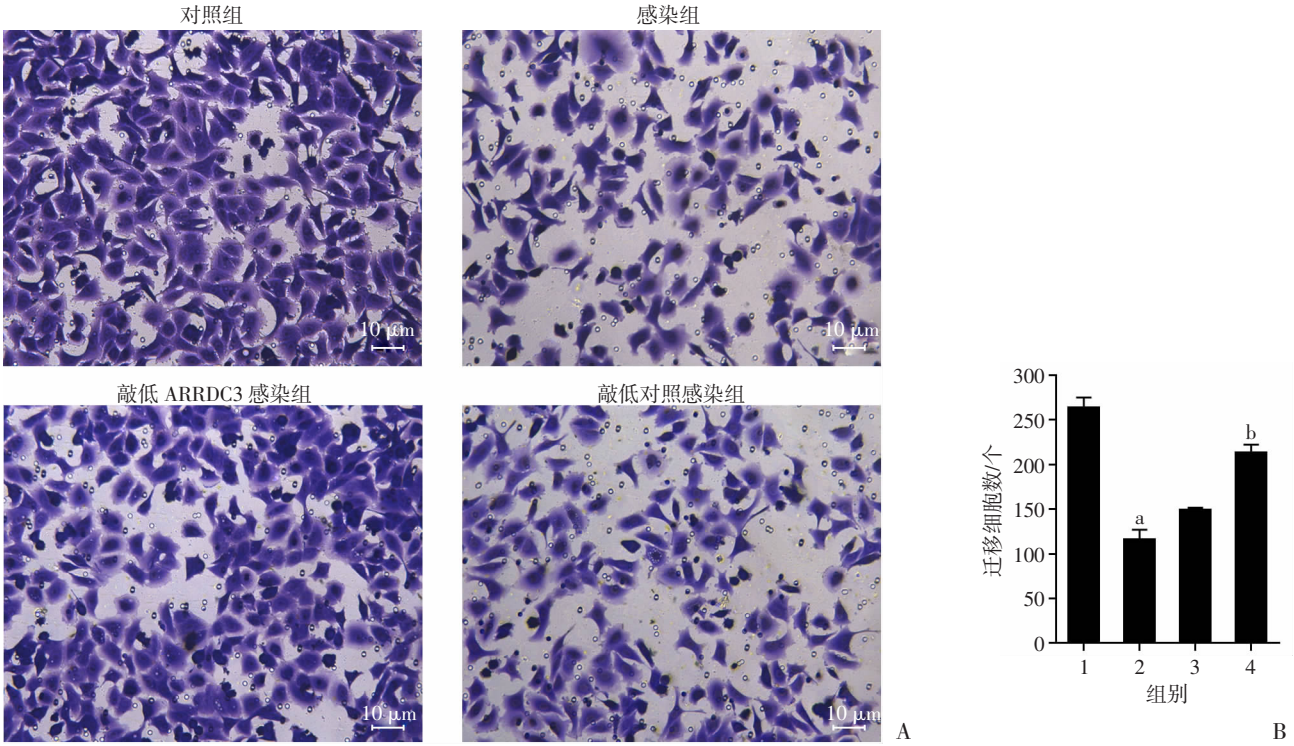
如图 5 所示,EV-D68 感染 A549 后,宿主细胞的迁移能力明显下降,干扰 ARRDC3 的表达后,发现宿主细胞的迁移能力较对照组明显下降,但较感染组有所增加($P<0.05$)。说明 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中可以通过改变细胞迁移水平从而发挥宿主细胞在病毒感染后的细胞功能变化的作用。

2.6 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中对宿主细胞增殖的影响

如图 6 所示,对照组、感染组、敲低 ARRDC3 感染组、敲低对照感染组细胞接种后 24、48 和 72 h,使用 CCK-8 检测细胞的吸光度,看对宿主细胞的细胞增殖能力影响。干扰 ARRDC3 的表达 48 h 后,虽然宿主细胞的细胞增殖能力较对照组低,较感染组高,但是干扰 ARRDC3 的表达 72 h 后,增殖能力与感染组差别不大,说明 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中对增殖无显著影响。

3 讨论

EV-D68 虽然是肠道病毒,但主要引发呼吸系统疾病,严重者可出现呼吸困难、血氧下降等情况。ARRDC3 是哺乳动物 α-抑制家族中的一员,具有与蛋白质的抑制蛋白家族结构同源性,具有一簇酸性和嗜水性基团,



A:细胞迁移实验结果(结晶紫染色);B: Transwell 实验检测各组细胞迁移能力($n=3,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与敲低对照感染组比较;1:对照组,2:感染组,3:敲低对照感染组,4:敲低 ARRDC3 感染组

图 5 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中对宿主细胞迁移的影响

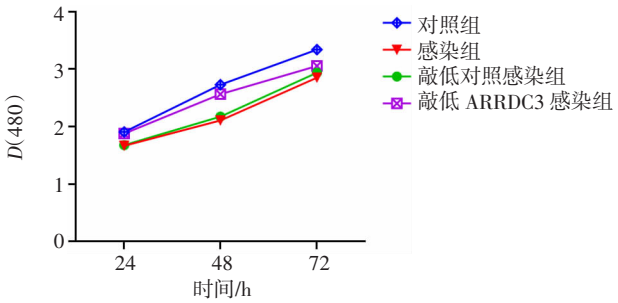


图 6 CCK-8 检测 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 模型中对宿主细胞增殖的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

能内化膜蛋白阻断 GPCR 激活,从而影响下游相关信号蛋白变化。可以内化和脱敏 GPCR,进而调控一些信号蛋白如 JNK3、AKT 的活性,增加 P53 介导的凋亡等[13]。之前的研究表明,ARRDC3 主要介导 G 蛋白偶联受体的泛素化途径降解,在 COVID-19 和 HPV 中有报道,且都呈现出病毒相关的表达增强,近几年的研究发现 ARRDC3 与多种肿瘤的发生密切相关[14]。在结直肠癌中,ARRDC3 表达量在结肠癌组织比正常组织低,并且通过与癌破坏蛋白(yes-associated protein, YAP)结合可以抑制结肠癌细胞的增殖迁移作用[15]。在三阴性乳腺癌中,ARRDC3 在调节 GPCR 诱导的乳腺癌细胞系中 Hippo 通路转录共激活因子活性中的作用,从而抑制乳腺癌细胞系迁移和侵袭[16]。还有研究[17]报道前列腺癌中 ARRDC3 表达降低 Caspase-3 酶活性,在前列腺癌进展中起着抑制癌症形成发展的作用。ARRDC3 在多种疾病的发生发展中,通过不同的机制影响着疾病的进程。

高通量测序技术近年来被广泛运用在科研及临床医学领域,它有完美的定量功能,能对细胞群体进行精准的分析,还能对信号通路进行全面的研究。本研究通过高通量测序筛选了差异表达基因 ARRDC3。在本实验室前期研究成果中发现,当敲除 ARRDC3 时,发现较对照组病毒的 VP1 在 RNA 水平表达上升,Western blot 实验证实 VP1 蛋白明显上升。VP1 是 EV-D68 外露的主要衣壳蛋白,与病毒的吸附致病有关。同时,病毒滴度实验发现病毒复制能力上升。由此,前期研究结果得出 ARRDC3 抑制病毒复制,产生抗病毒效应[18]。目前,在国内外关于 EV-D68 的研究中,通常使用 RD 细胞(人恶性胚胎横纹肌瘤细胞)作为宿主细胞[19-20],EV-D68 虽然是肠道病毒,但主要引起呼吸系统疾病,A549 细胞是人肺腺癌细胞,用 A549

作为 EV-D68 感染的宿主细胞探究病毒对宿主细胞的影响更具说服力。故本研究重点探讨 EV-D68 感染 A549 细胞后,ARRDC3 对宿主细胞的作用及潜在机制。

本研究分别通过 RT-qPCR 和 Western blot 揭示 EV-D68 感染 A549 后,宿主细胞表达 ARRDC3 在 RNA 和蛋白质水平上水平均显著提高,二者相互印证。EV-D68 感染 A549 后,ARRDC3 明显上调,A549 细胞周期显著缩短,抑制细胞迁移。进一步通过沉默 ARRDC3,探讨 ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 细胞后对宿主细胞周期、增殖及迁移等生物学行为的影响。有研究发现,敲除 ARRDC3 在肾透明细胞癌 786-O 细胞内,可通过降低 ARRDC3 对 AXL 的泛素化降解,上调 AXL 蛋白水平和 PI3K/AKT 信号通路的活性,并促进肾癌细胞的增殖[21]。Arrestin 家族是一类重要的信号调控蛋白,通过使 GPCR 脱敏,参与肿瘤发生、发展、血管生成等过程。a-Arrestin 蛋白家族是一类介导受体内吞,泛素化降解的接头蛋白,ARRDC3 是其蛋白家族的成员之一[22]。泛素化修饰对蛋白的调节机制在多种疾病的病理过程中均发挥着十分重要的作用。SOUNG 等[23]近期的研究发现,除抑制肿瘤增殖、侵袭、转移以外,ARRDC3 还与 miR-200b 之间存在正反馈回路,这一机制在逆转肿瘤上皮间充质转化和 DNA 损伤剂的化疗耐药方面也发挥了关键的作用。本研究结果表明:ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 后,宿主细胞周期阻滞于 DNA 合成期。结合既往的文献和研究结果,本研究推测 ARRDC3 可能对宿主细胞 DNA 合成期的阻滞进而对宿主细胞的周期蛋白及周期蛋白泛素化水平产生影响。此外,ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 后,通过抑制宿主细胞迁移,更有利于宿主细胞分泌细胞因子充分发挥旁分泌作用而实现细胞功能。结果提示 EV-D68 感染 A549 后可能通过上调宿主细胞 ARRDC3 水平,发挥抑制宿主细胞相关功能和致细胞病变效应。然而本研究未深入系统地探讨 ARRDC3 在 EV-D68 感染后对宿主细胞影响的具体蛋白及蛋白通路及致病机制,这些工作也是下一步主要研究内容。

综上所述,ARRDC3 在 EV-D68 感染 A549 后表达明显上调,通过阻滞宿主细胞 DNA 合成期,抑制宿主细胞迁移等作用来发挥对宿主细胞的影响,为探究 ARRDC3 在病毒感染后宿主细胞的发生发展提供了新的研究思路。

参考文献:

[1] SUN J, HU X Y, YU X F. Current understanding of human enterovirus D68[J]. Viruses, 2019, 11(6): 490. DOI: 10.3390/v11060490.

[2] 唐弘, 杨春, 康月茜, 等. 人肠道病毒 D68 型 5′UTR 间隔区域对下游基因表达的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4196-4204. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.200207.
TANG H, YANG C, KANG Y X, *et al*. Effect of EV-D68 virus 5' UTR spacer region on downstream gene expression [J]. Microbiol China, 2020, 47(12): 4196-4204. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.200207.

[3] WANG X L, ZHANG P F, LI J, *et al*. Enterovirus D68 in a 6-year-old acute flaccid myelitis case in China, 2018: a case report[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 125. DOI: 10.1186/s12879-020-4829-y.

[4] HARDY D, HOPKINS S. Update on acute flaccid myelitis: recognition, reporting, aetiology and outcomes[J]. Arch Dis Child, 2020, 105(9): 842-847. DOI: 10.1136/archdischild-2019-316817.

[5] AYERS T, LOPEZ A, LEE A, *et al*. Acute flaccid myelitis in the United States: 2015-2017[J]. Pediatrics, 2019, 144(5): e20191619. DOI: 10.1542/peds.2019-1619.

[6] SADEUH-MBA S A, JOFFRET M L, MAZITCHI A, *et al*. Genetic and phenotypic characterization of recently discovered enterovirus D type 111[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2019, 13(10): e0007797. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007797.

[7] 李飞, 沈军, 谭文杰. 肠道病毒 D 组 68 型流行情况研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2020, 10(6): 471-475.
LI F, SHEN J, TAN W J. Recent progress in epidemiology of enterovirus D68[J]. Chin J Viral Dis, 2020, 10(6): 471-475.

[8] SMITH J S, PACK T F, INOUE A, *et al*. Noncanonical scaffolding of $G_{\alpha i}$ and β-arrestin by G protein-coupled receptors[J]. Science, 2021, 371(6534): eaay1833. DOI: 10.1126/science.aay1833.

[9] ZHANG Y H, LI M M, LI L Y, *et al*. β-arrestin 2 as an activator of cGAS-STING signaling and target of viral immune evasion[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6000. DOI: 10.1038/s41467-020-19849-9.

[10] SMITH J S, PACK T F. Noncanonical interactions of G proteins and β-arrestins: from competitors to companions [J]. FEBS J, 2021, 288(8): 2550-2561. DOI: 10.1111/febs.15749.

[11] WYLER E, MÖSBAUER K, FRANKE V, *et al*. Transcriptomic profiling of SARS-CoV-2 infected human cell lines identifies HSP90 as target for COVID-19 therapy[J]. iScience, 2021, 24(3): 102151. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102151.

[12] TAKEUCHI F, KUKIMOTO I, LI Z Q, *et al*. Genome-wide association study of cervical cancer suggests a role for *ARRDC3* gene in human papillomavirus infection[J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(2): 341-348. DOI: 10.1093/hmg/ddy390.

[13] LEI D, DENG N, WANG S Q, *et al*. Upregulated ARRDC3 limits trophoblast cell invasion and tube formation and is associated with preeclampsia[J]. Placenta, 2020, 89: 10-19. DOI: 10.1016/j.placenta.2019.10.009.

[14] WEDEGAERTNER H, PAN W A, GONZALEZ C C, *et al*. The α-arrestin ARRDC3 is an emerging multifunctional adaptor protein in cancer[J]. Antioxid Redox Signal, 2022, 36(13/14/15): 1066-1079. DOI: 10.1089/ars.2021.0193.

[15] SHEN X, SUN X H, SUN B, *et al*. ARRDC3 suppresses colorectal cancer progression through destabilizing the oncoprotein YAP[J]. FEBS Lett, 2018, 592(4): 599-609. DOI: 10.1002/1873-3468.12986.

[16] ARAKAKI A K S, PAN W A, WEDEGAERTNER H, *et al*. α-Arrestin ARRDC3 tumor suppressor function is linked to GPCR-induced TAZ activation and breast cancer metastasis[J]. J Cell Sci, 2021, 134(8): jcs254888. DOI: 10.1242/jcs.254888.

[17] 洪善超, 俞蕾, 黄嘉琪, 等. ARRDC3 在前列腺癌中的表达及对前列腺癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(21): 3582-3585. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.21.034.
HONG S C, YU L, HUANG J Q, *et al*. Expression of ARRDC3 in prostate cancer and its effect on proliferation and apoptosis of prostate cancer cells[J]. J Pract Med, 2016, 32(21): 3582-3585. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.21.034.

[18] SI J Z, TANG X, XU L, *et al*. High throughput sequencing of whole transcriptome and construct of ceRNA regulatory network in RD cells infected with enterovirus D68[J]. Virol J, 2021, 18(1): 216. DOI: 10.1186/s12985-021-01686-x.

[19] JHENG J R, CHEN Y S, HORNG J T. Regulation of the proteostasis network during enterovirus infection: a feedforward mechanism for EV-A71 and EV-D68[J]. Antivir Res, 2021, 188: 105019. DOI: 10.1016/j.antiviral.2021.105019.

[20] ELRICK M J, PEKOSZ A, DUGGAL P. Enterovirus D68 molecular and cellular biology and pathogenesis[J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100317. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100317.

[21] 陈暮霖, 穆星宇, 李维国, 等. 敲除含 α-Arrestin 结构域蛋白 3 对肾癌细胞 PI3K/AKT 信号通路及增殖能力的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(13): 2401-2405. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.001.
CHEN M L, MU X Y, LI W G, *et al*. Effects of α-arrestin-domain-containing-3 deficiency on PI3K/AKT signaling pathway and proliferation of renal cell carcinoma cells[J]. Prog Mod Biomed, 2020, 20(13): 2401-2405. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.001.

[22] DORES M R, TREJO J. Endo-lysosomal sorting of G-protein-coupled receptors by ubiquitin: diverse pathways for G-protein-coupled receptor destruction and beyond[J]. Traffic, 2019, 20(2): 101-109. DOI: 10.1111/tra.12619.

[23] SOUNG Y H, CHUNG H, YAN C, *et al*. Arrestin domain containing 3 reverses epithelial to mesenchymal transition and chemo-resistance of TNBC cells by up-regulating expression of miR-200b[J]. Cells, 2019, 8(7): 692. DOI: 10.3390/cells8070692.

(**收稿**:2022-11-11;**修回**:2023-04-23)

(编辑 邓强庭)