

## • 论著 •

# 鼻病毒非结构蛋白 2B 诱导细胞发生内质网应激

迟苗苗, 宋娟, 宋芹芹, 于洁, 罗小暖, 张璐, 王欣玲, 韩俊

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

**摘要:**为探讨鼻病毒非结构蛋白 2B 诱导内质网应激和细胞凋亡的机制,本研究构建了鼻病毒非结构蛋白 2B 的真核表达载体 p2B-GFP,通过转染 BHK-21 细胞检测相关标志蛋白的变化情况。结果显示,非结构蛋白 2B 定位表达于 BHK-21 细胞内质网,诱导内质网应激标志蛋白 Grp78、CHOP 的表达增加,并使活化转录因子 6(ATF6)的转录活性增加,还诱导 BHK-21 细胞发生核浓缩而凋亡,使凋亡标志蛋白 PARP 发生降解而减少。结果提示,鼻病毒非结构蛋白 2B 可诱导细胞发生内质网应激,并经该途径诱导细胞凋亡。

**关键词:**鼻病毒; 非结构蛋白 2B; 内质网应激; 凋亡

## Endoplasmic reticulum stress induced by human rhinovirus 16 2B protein

CHI Miao-Miao, SONG Juan, SONG Qin-Qin, YU Jie, LUO Xiao-Nuan, ZHANG Lu, WANG Xin-Ling, HAN Jun

*State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China*

**Abstract:** To investigate whether the non-structural protein 2B of rhinovirus 16 induces endoplasmic reticulum stress (ERS) and apoptosis, BHK-21 cells were transfected with a plasmid p2B-GFP expressing rhinovirus 16 2B protein. Biomarkers of ERS and apoptosis were detected respectively. The results showed that 2B protein was localized to the ER apparatus. 2B protein increased the expressions of ERS marker proteins Grp78 and CHOP and the transcriptional activity of activating transcription factor 6 (ATF6). We also found 2B protein induced nuclear condensation associated with apoptosis and degradation of marker protein PARP in BHK-21 cells. In conclusion, the rhinovirus 16 2B protein induces both ERS and apoptosis.

**Key words:** Rhinovirus; Non-structural protein 2B; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis

鼻病毒(rhinovirus, RhV)是导致普通感冒的最重要病原体。近年来大量研究表明,RhV 不仅可引起上呼吸道感染,还与细支气管炎、肺炎、哮喘等下呼吸道疾病密切相关<sup>[1]</sup>。RhV 也可与其他病毒和细菌发生共感染而加重哮喘和慢性阻塞性肺病的病情<sup>[2]</sup>。RhV 进入人体后,与呼吸道上皮细胞的特

异性受体即细胞间黏附因子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)相结合,在上皮细胞及局部淋巴组织中复制,引起细胞病变及炎症反应<sup>[3]</sup>。然而,RhV 引发呼吸道疾病的具体机制还不十分清楚。

内质网(endoplasmic reticulum, ER)作为细胞

基金项目:国家自然科学基金(31371397),传染病预防控制国家重点实验室发展基金(2011SKLID104)

通信作者:韩俊

Corresponding author: HAN Jun, E-mail: hanjun\_sci@163.com

内诱导凋亡的新场所,可介导 ER 应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)反应性凋亡途径。正常情况下,细胞 ER 膜上存在需肌醇酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, Ire1)、双链 RNA 依赖的蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK) 和活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 3 种跨膜蛋白。在 ERS 过程中,这 3 种跨膜蛋白可感知 ERS 信号并通过寡聚化和自身磷酸化由 ER 膜向细胞核和细胞质转导 ERS 信号,引起 Grp78 等反应性高表达<sup>[4]</sup>。如果损伤太严重,内环境稳定不能及时恢复,ERS 可引起细胞凋亡<sup>[5]</sup>。鼻病毒的非结构蛋白 2B 具有相对分子质量小和疏水区域程度高等特点,能整合至细胞 ER<sup>[6]</sup>,引起细胞病理生理变化,在 RhV 的致病机制中可能发挥了重要作用。

为了解 RhV 非结构蛋白 2B 对细胞的影响,本研究构建了带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标签的 RhV16 2B 真核表达载体 p2B-GFP,转染 BHK-21 细胞。结果显示 RhV16 非结构蛋白 2B 定位表达于 ER,诱导 BHK-21 细胞发生 ERS 和凋亡,为阐明非结构蛋白 2B 的细胞损伤机制奠定了基础,也为抗病毒药物设计提供了新的潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

BHK-21 细胞株和 RhV16 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒资源中心保藏,RhV16 2B 真核表达载体 p2B-GFP 由本室构建和保存。胎牛血清购自美国 Gibco 公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗购自英国 Abcam 公司,限制性内切酶 EcoR I 和 *Xba*I、感受态细胞 DH5a、T4 连接酶购自日本 TaKaRa 公司,转染试剂 X-treme GENE HP 购自美国 Roche 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

BHK-21 细胞用含 10% 胎牛血清的 Eagle 培养基,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

#### 1.2.2 重组质粒 p2B-GFP 的蛋白免疫印迹鉴定

将 p2B-GFP 真核表达载体转染 BHK-21 细胞,同时设 pEGFP-N1 载体转染对照组及正常细胞对照组。

转染 36 h 后收集细胞,裂解,以 1 : 1 000 稀释的 GFP 抗体和 1 : 5 000 稀释的 IgG-HRP 标记鼠二抗行蛋白免疫印迹检测,用增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色。

#### 1.2.3 ATF6 检测

将 p2B-GFP 载体和 pATF6-FLuc<sup>[7]</sup>(ATF6 启动子控制的萤火虫荧光素酶)共转染 BHK-21 细胞,同时设 pEGFP-N1 载体对照组及正常细胞对照组。于转染 12、24、36 和 48 h 用多标记微孔板检测仪分别检测 Fluc 活性。

#### 1.2.4 ERS 标志蛋白 Grp78 和 CHOP 的检测

将 p2B-GFP 真核表达载体转染 BHK-21 细胞,同时设 pEGFP-N1 载体对照组及正常细胞对照组。于 24、36、48 h 收集细胞,裂解,以 1 : 1 000 稀释的 Grp78 抗体或 CHOP 抗体和 1 : 5 000 稀释的 IgG-HRP 兔二抗行蛋白免疫印迹检测,ECL 显色。

#### 1.2.5 DAPI 染色观察细胞核的形态

方法同上,将 p2B-GFP 真核表达载体转染 BHK-21 细胞并设立对照组。24、36、48 h 后,用丙酮固定 10 min,含 0.2% Triton X-100 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.4)通透 5 min,4',6-二咪基-2 苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色 5 min,PBS 洗 3 次,于荧光显微镜下观察并拍片记录。

#### 1.2.6 凋亡标志蛋白 PARP 的检测

方法同上,将 p2B-GFP 真核表达载体转染 BHK-21 细胞并设立对照组,于 24、36、48 h 收集细胞,裂解,以 1 : 1 000 稀释的 PARP 抗体和 1 : 5 000 稀释的 IgG-HRP 兔二抗行蛋白免疫印迹检测,ECL 显色。

#### 1.2.7 ER 染色观察 RhV16 在细胞内的定位

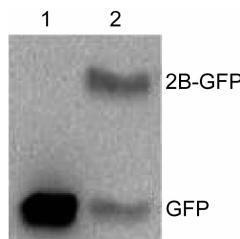
方法同上,将 p2B-GFP 真核表达载体转染 BHK-21 细胞并设立对照组。36 h 时,弃上清液,PBS 洗 3 次,加入 37 ℃ 预温育的 ER-Tracker Red 染色工作液,37 ℃ 共孵育 1 h;PBS 洗 3 次,丙酮固定 10 min;PBS 洗 3 次,DAPI 染色 5 min;PBS 洗 3 次,PE Operetta 高内涵成像系统 (high content system, HCS) 观察并拍片记录。

## 2 结果

### 2.1 RhV16 非结构蛋白 2B 定位表达于 ER

为鉴定构建的 p2B-GFP 质粒能否在细胞内正常表达 RhV16 非结构蛋白 2B,将质粒经双酶切并测序正确后转染 BHK-21 细胞,转染 36 h 收集细

胞, GFP 抗体用于蛋白免疫印迹检测 2B 融合蛋白的表达情况。结果显示, 转染 p2B-GFP 质粒组细胞在约 35 000 处检测到预计大小的条带, 而 pEGFP-N1 载体转染对照组表达的 GFP 蛋白在 25 000 左右处出现条带(图 1)。结果表明, p2B-GFP 质粒能在细胞内正常表达 2B-GFP 融合蛋白。

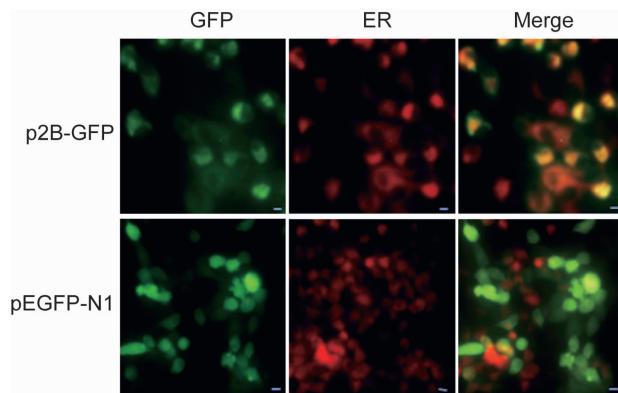


1: BHK-21 cells transfected with pEGFP-N1. 2: BHK-21 cells transfected with pGFP-2B for 24 h.

图 1 p2B-GFP 质粒的蛋白表达鉴定

Fig. 1 Protein identification of vector p2B-GFP

为了解 RhV16 非结构蛋白 2B 的定位, 将上述鉴定的 p2B-GFP 质粒转染 BHK-21 细胞, 结果发现 p2B-GFP 融合蛋白分布于细胞质, 呈绿色荧光。细胞经 ER-Tracker Red 染色, 细胞质出现红色。非结构蛋白 2B 定位表达于 ER, 与 ER-Tracker Red 共定位而呈现黄色。而 GFP 在 BHK-21 细胞内的表达方式不同于非结构蛋白 2B, 大部分出现于细胞核(图 2)。



BHK cells were transfected with the expression plasmid p2B-GFP vector encoding GFP-tagged 2B, or pEGFP-N1 expressing GFP. ER was visualized by staining with ER-Tracker Red. The colocalization was shown yellow. Scale bar, 20 μm.

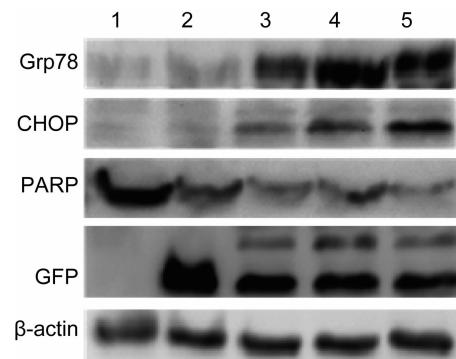
图 2 RhV16 非结构蛋白 2B 定位于内质网

Fig. 2 RhV16-2B localized in ER

## 2.2 RhV16 非结构蛋白 2B 诱导 ERS

为探讨 RhV16 非结构蛋白 2B 是否诱导细胞 ERS, 将 p2B-GFP 载体转染 BHK-21 细胞, 用蛋白

免疫印迹法检测 ERS 标志蛋白 Grp78 和 CHOP。结果显示, p2B-GFP 转染组 Grp78 蛋白和 CHOP 蛋白明显增加, 而 pEGFP-N1 载体转染组和正常细胞对照组 Grp78 和 CHOP 蛋白表达量远远低于 p2B-GFP 转染组。随着转染时间延长, Grp78 和 CHOP 蛋白表达水平均呈上升趋势(图 3)。结果表明, RhV16 非结构蛋白 2B 诱导细胞发生 ERS。



Lane 1, BHK-21 cells; Lane 2, BHK-21 cells transfected with pEGFP-N1; Lane 3, BHK-21 cells transfected with p2B-GFP for 24 h; Lane 4, BHK-21 cells transfected with p2B-GFP for 36 h; Lane 5, BHK-21 cells transfected with p2B-GFP for 48 h.

图 3 RhV16 非结构蛋白 2B 诱导 ERS 标志蛋白 Grp78、CHOP 和 PARP 的变化

Fig. 3 Expressions of Grp78, CHOP and PARP induced by RhV16-2B

为进一步确认 RhV16 非结构蛋白 2B 是否诱导细胞发生 ERS, 将 p2B-GFP 载体和 pATF6-FLuc 共转染 BHK-21 细胞, 转染 12、24、36 和 48 h 后, 用多标记微孔板检测仪分别检测 Fluc 的活性。结果显示, p2B-GFP 明显增强了 ATF6 启动子控制的 Fluc 表达活性, 并随转染时间延长呈逐渐增强趋势。而 pEGFP-N1 载体转染对照组及正常细胞对照组虽然随时间延长也呈现一定 Fluc 表达活性增高的趋势, 但远低于 p2B-GFP 转染组(图 4)。这一结果表明, 非结构蛋白 2B 能通过提高 ATF6 的转录活性而诱导 ERS。

## 2.3 RhV16 非结构蛋白 2B 诱导细胞凋亡

为了观察 RhV16 非结构蛋白 2B 能否引起细胞凋亡, 将 BHK-21 细胞传代铺于 24 孔板, 转染 p2B-GFP 或 pEGFP-N1 载体, 于转染 24、36 和 48 h 时用 DAPI 染色。结果显示, 在转染 24、36 和 48 h 时, p2B-GFP 转染组与 pEGFP-N1 载体转染组和正常细胞对照组相比, 细胞出现明显的核聚集现象(图 5)。

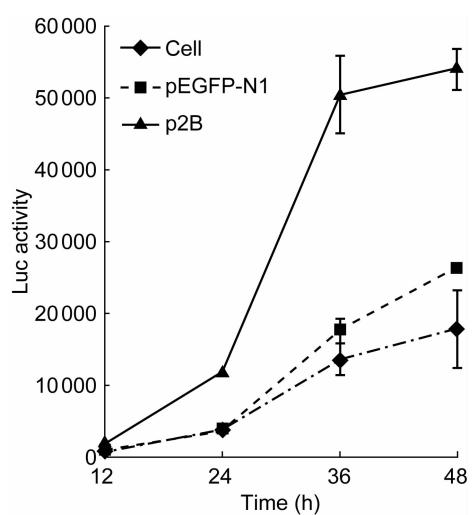
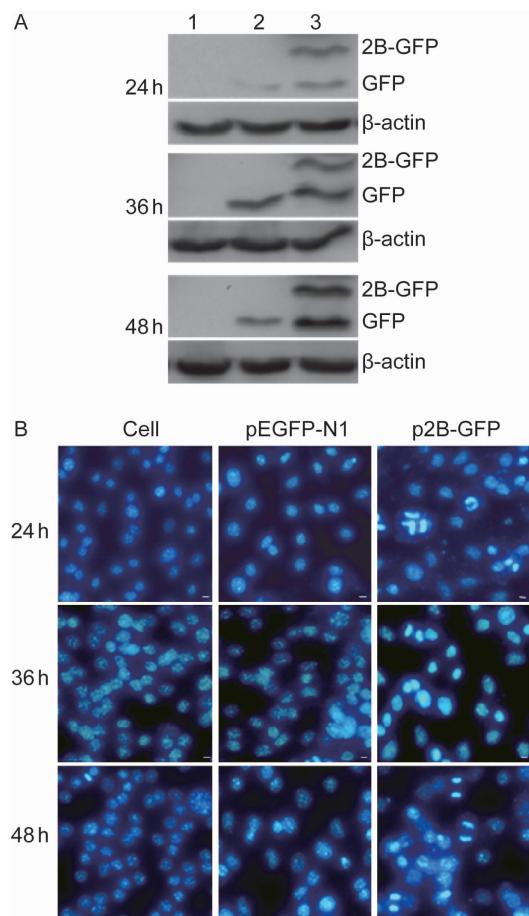


图4 非结构蛋白2B增强ATF6基因的表达活性

Fig. 4 RhV16-2B increased expression of ATF6



A: Expression of 2B-GFP in BHK cells. Lane 1, BHK cells; Lane 2, BHK cells transfected with pEGFP-N1; Lane 3, BHK cells transfected with p2B-GFP. B: Nuclear condensation associated with apoptosis induced by RhV16-2B.

图5 RhV16非结构蛋白2B诱导细胞出现核浓缩

Fig. 5 Nuclear condensation associated with apoptosis induced by RhV16-2B

为进一步确证非结构蛋白2B诱导细胞凋亡的发生,用p2B-GFP质粒转染BHK-21细胞,于24、36、48 h收集细胞,用蛋白免疫印迹法检测PARP蛋白的表达情况。结果显示,p2B-GFP转染组的PARP蛋白从24 h开始降低,而pEGFP-N1载体转染组和正常细胞对照组PARP蛋白表达量远高于p2B-GFP转染组。随着转染时间延长,PARP蛋白的表达水平呈明显下降趋势(图3)。进一步表明RhV16非结构蛋白2B诱导BHK-21细胞发生了凋亡,且随着转染时间延长凋亡加重。

### 3 讨论

已有证据显示,RhV16非结构蛋白2B可定位于ER<sup>[6]</sup>,并造成ER聚集。RhV14也有类似表现,还可造成ER的Ca<sup>2+</sup>外流<sup>[7]</sup>。以此推断鼻病毒非结构蛋白2B可影响ER功能而引起ERS,但目前研究缺少ERS发生时相关蛋白变化的证据。因此,本研究构建了RhV16非结构蛋白2B片段的GFP融合表达载体,并展开相关研究。结果显示,非结构蛋白2B可上调细胞中的ERS标志蛋白Grp78和CHOP的表达,ATF6的转录活性也增加<sup>[8]</sup>。此外,本研究还发现非结构蛋白2B诱导BHK-21细胞发生细胞凋亡,其凋亡标记PARP随非结构蛋白2B作用时间延长而降解。有研究显示,小RNA病毒科的柯萨奇病毒感染可上调Grp78表达,激活PERK导致真核起始因子2α(eukaryotic initiation factor 2α, eIF2α)磷酸化,活化ATF6和X-盒结合蛋白1(X-box binding protein 1, XBP1),最终激活CHOP、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶7(cysteinyl aspartate specific proteinase 7, caspase-7)和caspase-12,并诱发凋亡<sup>[9,10]</sup>。本研究初步验证了同属小RNA病毒科的鼻病毒其非结构蛋白2B也能引起细胞类似的ERS,包括Grp78上调表达、ATF6活化表达,最终激活CHOP并诱发凋亡现象。但还需在多种细胞中用多种方法如免疫共沉淀等进一步验证,并开展凋亡相关通路的研究。

本研究还发现,p2B-GFP质粒转染细胞后,蛋白免疫印迹法检测出2条带,35 000左右的为目的蛋白。经测序、挑取单克隆进行反复验证,显示序列正确,且未混杂pEGFP-N1质粒,推测这可能是病毒非结构蛋白复制的新特点。目前,本实验室已构建了非结构蛋白2B的区域片段,正在开展相应的

研究工作。

## 参考文献

- [1] van Kempen M, Bachert C, Van Cauwenberge P. An update on the pathophysiology of rhinovirus upper respiratory tract infections [J]. Rhinology, 1999, 37(3): 97-103.
- [2] Traves SL, Proud D. Viral-associated exacerbations of asthma and COPD [J]. Curr Opin Pharmacol, 2007, 7(3): 252-258.
- [3] 李军,朱启鎔. 鼻病毒的研究现状[J]. 中华儿科杂志,2005, 43(1):18-20.
- [4] Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus [J]. Endocr Rev, 2008, 29(1): 42-61.
- [5] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. EMBO Rep, 2006, 7(9): 880-885.
- [6] Mousnier A, Swieboda D, Pinto A, Guedán A, Rogers AV, Walton R, Johnston SL, Solari R. Human rhinovirus 16 causes Golgi apparatus fragmentation without blocking protein secretion [J]. J Virol, 2014, 88(20): 11671-11685.
- [7] de Jong AS, de Mattia F, van Dommelen MM, Lanke K, Melchers WJ, Willems PH, van Kuppeveld FJ. Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking [J]. J Virol, 2008, 82(7): 3782-3790.
- [8] Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response [J]. J Biol Chem, 2000, 275(35): 27013-27020.
- [9] Weithauer A, Bobbert P, Antoniak S, Böhm A, Rauch BH, Klingel K, Savvatis K, Kroemer HK, Tschope C, Stroux A, Zeichhardt H, Poller W, Mackman N, Schultheiss HP, Rauch U. Protease-activated receptor-2 regulates the innate immune response to viral infection in a coxsackievirus B3-induced myocarditis [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(19): 1737-1745.
- [10] Zhang HM, Ye X, Su Y, Yuan J, Liu Z, Stein DA, Yang D. Coxsackievirus B3 infection activates the unfolded protein response and induces apoptosis through downregulation of p58IPK and activation of CHOP and SREBP1 [J]. J Virol, 2010, 84(17): 8446-8459.

(收稿日期:2015-02-16)