

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.011

B19 病毒 XA 株 VP1 独特区蛋白对 Hela 细胞凋亡的影响 *

迟 明¹ 迟海峰² 许 波¹ 晁玉瑾¹ 郑 楠¹ 曹艳华¹ 王曼秋¹ 张国成^{3△}

(1 济南军区总医院儿科 山东 济南 250031; 2 总参谋部老干部服务管理局卫生处 北京 100191;

3 天津武警儿童医院 天津 300100)

摘要 目的:构建 B19 病毒 XA 株 VPlu 基因的真核表达载体和稳定转染细胞系,探讨 B19 病毒 XA 株 VP1 独特区蛋白对 Hela 细胞凋亡的影响。**方法:**采用本课题组前期构建的真核表达载体 pIRES2-EGFP-Vplu 及 pIRES2-EGFP 对照质粒,将其稳定转染至 Hela 细胞,通过流式细胞术检测 EGFP 阳性细胞的比例以确定稳定转染的细胞系是否成功构建;提取稳定转染的 Hela 细胞的总蛋白,通过 Western blot 检测细胞内凋亡相关基因 Caspase3 的表达;转染 pIRES2-EGFP-Vplu 及 pIRES2-EGFP 的 Hela 细胞经过 Annexin V 和 PI 的染色后,通过流式细胞术检测其凋亡率。**结果:**本实验成功构建了 pIRES2-EGFP-VPlu 稳定转染的 Hela 细胞系,pIRES2-EGFP-Vplu 稳定转染的 Hela 细胞中 Caspase3 的表达较转染对照质粒的 Hela 细胞明显增加,细胞凋亡率亦显著升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**B19 病毒 XA 株 VP1 独特区蛋白能够显著促进 Hela 细胞的凋亡。

关键词:VPlu 基因;稳定转染;细胞凋亡;Caspase3

中图分类号:Q75;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)33-6446-04

Effect of VP1-unique Region Protein of Parvovirus B19-XA on the Apoptosis in Hela Cells*

CHI Ming¹, CHI Hai-feng², XU Bo¹, CHAO Yu-jin¹, ZHENG Nan¹, CAO Yan-hua¹, WANG Man-qiu¹, ZHANG Guo-cheng^{3△}

(1 Department of Pediatrics, The General Hospital of Ji'nan Military Command, Ji'nan, Shandong, 250031, China;

2 General Staff Headquarters Veteran Department of Health Services Administration, Beijing, 100191, China;

3 Children's hospital of Tianjin armed police forces, Tianjin, 300100, China)

ABSTRACT Objective: To clone VP1-unique region of parvovirus B19-XA and construct eukaryotic expression plasmid and stable transfection cell line, and explore the effect of VP1-unique region of parvovirus B19-XA on the apoptosis in Hela cells. **Methods:** pIRES2-EGFP-VPlu constructed previously was used and transfected to Hela to construct a stable transfection cell line. Flow cytometry was used to detect the transfection rate, western blot was used to detect the expression of caspase3. Hela cells transfected with pIRES2-EGFP-Vplu and pIRES2-EGFP were stained with Annexin V and PI and flow cytometry was used to detect the apoptotic rate. **Results:** A cell line stably expressed VP1-unique region of parvovirus B19-XA was successfully constructed. The expression of Caspase3 and apoptotic rate were significantly increased in the cell line stably expressed VP1-unique region of parvovirus B19-XA ($P<0.05$). **Conclusion:** VP1-unique region of parvovirus B19-XA could obviously promote the apoptosis of Hela cells.

Key words: Vplu Gene; Stable transfection; Cell apoptosis; Caspase3

Chinese Library Classification (CLC): Q75; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6446-04

前言

B19 病毒感染与多种疾病相关,感染疾病谱广,涉及人体系统多,严重可致死^[1]。B19 病毒核酸全长 5596 个碱基,为单链线性 DNA 分子,病毒基因组编码 5 个蛋白,分别为 84kDa 的结构蛋白 VP1,58kDa 的结构蛋白 VP2,77kDa 的非结构蛋白 NS1 和功能不确切的 11kDa 和 7.5kDa 小分子量蛋白。结构蛋

白 VP1 氨基酸末端比结构蛋白 VP2 多 220 余个氨基酸,多出的 220 余个氨基酸所组成的蛋白被叫做 VP1 独特区蛋白(VPlu 蛋白)^[1,2]。有关研究证实,VPlu 蛋白在温度、pH 值变化及 Ca^{2+} 参与的情况下,具有 PLA2 酶活性,通过分子模拟刺激宿主产生多种自身抗体,导致机体免疫紊乱^[3,4]。VPlu 蛋白含有许多线性抗原决定簇,可被中和抗体识别,具备良好的抗原性。其良好的抗原性被认为可作为疫苗研究的候选分子。Moffatt S 等提出

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070543)

作者简介:迟明(1982-),男,硕士,住院医师,研究方向:儿童感染性疾病的诊断与治疗,E-mail: chiming_1982@126.com

△ 通讯作者:张国成,男,博士生导师,主任医师,E-mail: zhangguocheng@sina.com

(收稿日期:2014-04-18 接受日期:2014-05-15)

NS1 蛋白通过激活 caspase 3, 引发细胞凋亡^[5]。NS1 蛋白中三磷酸核苷结合结构域与 B19 病毒诱导细胞凋亡有关, 通过触发 TNF 受体信号通路, 分别激活 caspase3、caspase6、caspase9 完成^[6]。Chen AY 通过研究证实如果抑制 11kDa 蛋白合成, B19 病毒致细胞凋亡的能力明显减弱, 11kDa 蛋白诱导细胞凋亡可能与激活 caspase 10 有关^[7]。VP1u 蛋白导致免疫紊乱的过程中是否伴随细胞凋亡的发生呢? 本实验利用已构建好的真核表达载体 pIRES2-EGFP-VPlu, 将其转染至 HeLa 细胞, 构建稳定转染细胞系, 旨在研究 VPlu 蛋白对 HeLa 细胞凋亡的影响, 为基因疫苗的可行性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pIRES2-EGFP-VPlu 由我科保存, HeLa 细胞购自 ATCC, Lipofectamine 2000 购买自 Invitrogen 公司, 蛋白 Marker 购买自天根公司, 细胞裂解液 RIPA 购买自碧云天公司, BCA 定量试剂盒和化学发光液购于康为试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 将 HeLa 细胞接种于六孔板, 每孔 4×10^5 个, 加含 10% 血清的 DMEM 2 mL, 置于 37°C 孵箱培养过夜。第二天, 每孔换成 800 μ L 不含血清的 DMEM 培养液, 将重组质粒 pIRES2-EGFP-VPlu (或者 pIRES2-EGFP) 2 μ g 和 Lipofectamine 2000 5 μ L 分别加入 DMEM (100 μ L, 不含血清) 培养液中, 室温孵育 5 分钟, 再将两者混合室温孵育 30 分钟。然后将混合液加入含 800 μ L 不含血清的 DMEM 培养液的六孔板中, 于 5% CO₂, 37°C 培养 5 h, 再将培养液换成含 10% 血清的 DMEM, 并且在培养液中加入 G418, 使其终浓度为 600 μ g/mL, 每 3 天换液更新 G418, 连续培养 4 周, 筛选稳定转染的细胞株。

1.2.2 细胞流式检测 收集稳定转染或正常的 HeLa 细胞 5×10^5 个, 1000 rpm, 离心 5 min 后重悬于 300 μ L 的流式液 (含 2% 胎牛血清的 PBS) 中, 通过流式细胞仪进行检测。

1.2.3 Western blot 检测 正常和稳定转染的 HeLa 细胞培养 48 h 后用 RIPA 裂解液裂解, 提取细胞总蛋白并用 BCA 定量试剂盒定量, 在蛋白液中加入蛋白 Loading Buffer, 于沸水中煮 10 min。蛋白样品进行蛋白电泳后, 100 V 恒压 1 h 转至 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 (抗人 Caspase3 或 GAPDH) 4°C 孵育过夜, PBST 漂洗 15 min $\times$ 4 次, 二抗 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体室温孵育 1 h, PBST 漂洗 15 min $\times$ 4 次, 化学发光液反应 30s, 通过发光仪进行检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, Western blot 的结果通过软件灰度扫描, 展示为均值 $\pm$ 标准差, 流式细胞术的结果统计凋亡率, 展示为均值 $\pm$ 标准差, 两组间的比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pIRES2-EGFP-VPlu 稳定转染的 HeLa 细胞的鉴定

采用常规脂质体转染的方法将 pIRES2-EGFP-VPlu 转染至 HeLa 细胞, G418 压力筛选 (G418 使用终浓度为 600 μ g/mL) 获得稳定转染的细胞系。为了检测所建立的细胞系是否成功, 我们同时转染了 pIRES2-EGFP-VPlu 和对照质粒, 通过流式细胞仪检测其转染效率, 结果显示转染效率在 90% 以上, 表明本研究成功构建了稳定转染 pIRES2-EGFP-VPlu 的 HeLa 细胞系 (见图 1)。

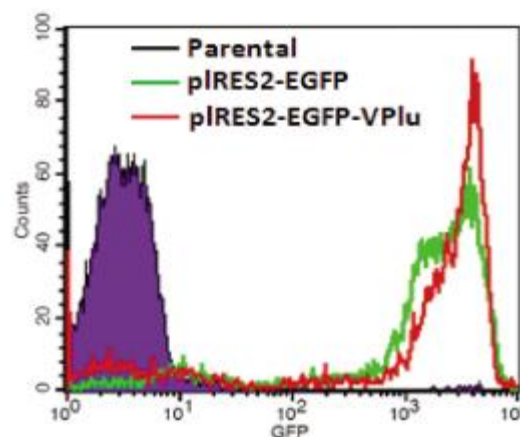


图 1 pIRES2-EGFP-VPlu 稳定转染 HeLa 细胞的鉴定

Fig. 1 Identification of HeLa cells stably transfected by pIRES2-EGFP-VPlu

注: HeLa 细胞稳定转染 pIRES2-EGFP-VPlu 或 pIRES2-EGFP 后通过流式细胞术检测 EGFP 的表达。

Note: HeLa cells (parental) were stably transfected with pIRES2-EGFP-VPlu or pIRES2-EGFP, and were analyzed by FACS for the expression of EGFP.

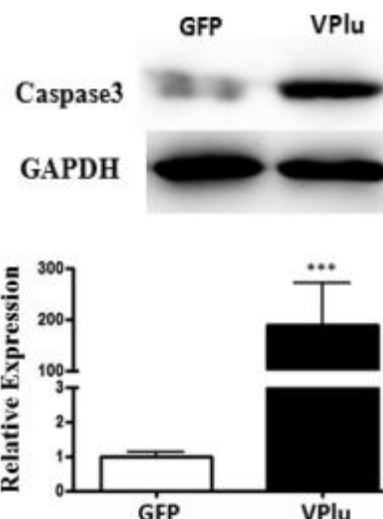


图 2 pIRES2-EGFP-VPlu 稳定转染的 HeLa 细胞中 Caspase3 的表达

Fig. 2 The expression of Caspase3 in HeLa cells stably transfected by pIRES2-EGFP-VPlu

注: HeLa 细胞稳定转染 pIRES2-EGFP-VPlu (VPlu) 或 pIRES2-EGFP (GFP) 后提取细胞全蛋白, Western Blot 检测 Caspase3 的表达, *** $P < 0.001$ 与 GFP 组比较。

Note: The protein level of Caspase3 in HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP-VPlu (VPlu) or pIRES2-EGFP (GFP) examined by Western blot, *** $P < 0.001$ compared with GFP group.

2.2 pIRES2-EGFP-VPlu 稳定转染的 Hela 细胞中 Caspase3 的表达

如图 2 所示,转染 pIRES2-EGFP-VPlu 的 Hela 细胞中 Caspase3 的表达量较转染 pIRES2-EGFP 的对照 Hela 细胞显著增加($P<0.001$),提示 B19 病毒 XA 株的 VPlu 基因能够促进 Hela 细胞凋亡。

2.3 pIRES2-EGFP-VPlu 稳定转染的 Hela 细胞的凋亡率

如图 3 所示,稳定转染了 pIRES2-EGFP-VPlu 或 pIRES2-EGFP 的 Hela 细胞经过 Annexin V 和 PI 的染色之后,进行流式细胞检测凋亡情况。转染 pIRES2-EGFP-VPlu 的 Hela 细胞的凋亡率较转染 pIRES2-EGFP 的对照 Hela 细胞显著升高($P<0.05$)。

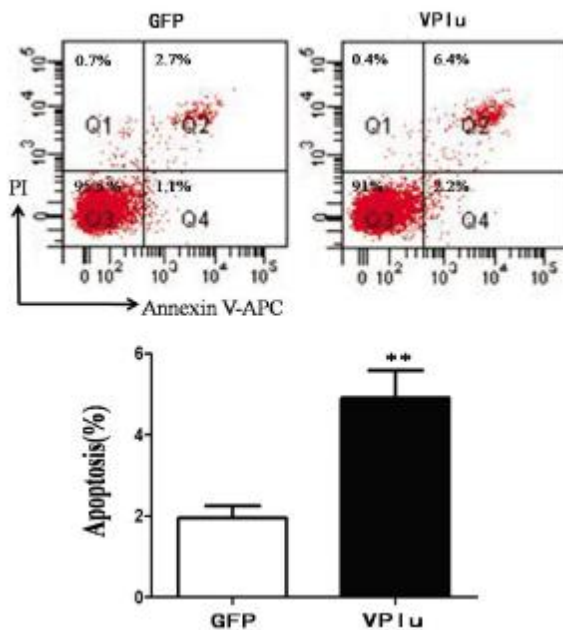


图 3 流式细胞术检测 pIRES2-EGFP-VPlu 稳定转染的 Hela 细胞的凋亡率

Fig. 3 The apoptotic rate of Hela cells stably transfected by pIRES2-EGFP-VPlu

注:Hela 细胞稳定转染 pIRES2-EGFP-VPlu(VPlu)或 pIRES2-EGFP (GFP),流式细胞术检测其细胞凋亡率,** $P<0.05$ 与 GFP 组比较。

Note: The apoptotic rate of Hela cells transfected with pIRES2-EGFP-VPlu(VPlu) or pIRES2-EGFP(GFP) examined by flow cytometry, ** $P<0.05$ compared with GFP group.

3 讨论

B19 病毒在人群中感染率高,主要通过呼吸道、血制品及血-胎途径传播^[1]。B19 病毒 VP1u 蛋白的分子量为 22kDa,延伸于病毒表面^[6],但其功能位点没有显露,只有在适宜的温度及 pH 值等情况下才能暴露其功能位点^[9],该功能位点有助于 B19 病毒进入细胞^[10]。VP1u 蛋白与心磷脂和 β 2 糖蛋白 I 有类似的抗原决定簇^[11],含有较多抗原决定簇 VP1u 蛋白决定了其较好的抗原性^[12]。Lindner J 等构建了含有 VP1u 基因的重组质粒,转

染重组质粒的 B 细胞可刺激外周血产生较多的 CD4⁺T 细胞^[13,14]。VP1u 蛋白具有 PLA2 酶活性,VP1u 蛋白保守结构域序列与蛇毒及蜂毒中 PLA2 酶具有同源性^[15,16]。保守性的 PLA2 样序列相继在 30 多种细小病毒 VP1 蛋白中发现^[16,17]。另外,VP1u 蛋白中的氨基酸残基对 PLA2 酶活性的产生同样有非常关键的作用^[18,19]。红细胞糖苷脂(P 抗原)存在于红系细胞表面,可能作为 B19 病毒感染细胞过程中的受体。B19 病毒与红细胞糖苷脂结合后病毒蛋白构象发生变化,经内吞作用进入细胞质,内吞作用产生的内吞泡内 pH 值发生变化,病毒 PLA2 样序列产生 PLA2 酶活性,病毒进入细胞核^[16],诱导细胞凋亡及细胞 DNA 损伤^[20-22]。

B19 病毒感染后,VP1u 蛋白发挥 PLA2 酶活性,打通细胞膜上 Ca^{2+} 通道,改变细胞内外 Ca^{2+} 浓度,继而导致细胞功能障碍^[23]。B19 病毒 NS1 蛋白的细胞毒性与细胞凋亡有关,B19 病毒核酸侵入宿主细胞核,NS1 蛋白中三磷酸核苷结构域与 B19 病毒诱导细胞凋亡有关,通过影响细胞膜内外的酸碱平衡,触发 TNF 受体信号通路,继而激活 caspase3、caspase6、caspase9 酶,产生细胞凋亡^[24-26]。B19 病毒 VP1u 蛋白致细胞凋亡可能有 NF- κ B 信号通路和 p38MAPK 信号通路参与。PKC- α 、NF- κ B、TNF- α 、iNOS 等参与了细胞凋亡,PKC 活化后激活 p38MAPK 产生 iNOS^[27,28]。iNOS 过量表达,上调 Bax 和抑制 Bcl-2,活化 caspase 酶,进而致细胞凋亡^[29]。活化的 PKC 可使靶蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基发生磷酸化反应而激活细胞凋亡基因^[30]。Caspase 酶在细胞凋亡中发挥重要作用,caspase3 通过其水解作用,参与细胞凋亡^[31]。B19 病毒编码的 11kDa 小分子量蛋白可能通过激活 caspase10 启动细胞凋亡。聂晓晶等通过研究发现,B19 病毒 XA 株 VP1u 蛋白可使受免疫动物免疫紊乱继而产生免疫损伤^[32]。

为了进一步研究 VP1u 蛋白导致机体免疫损伤的机制以及作为疫苗研究的候选蛋白的可能性,我们首先构建了稳定表达 VP1u 蛋白的稳转细胞系,随后通过 Western blot、流式细胞术分别检测其凋亡相关基因 Caspase3 的表达和细胞凋亡情况,结果显示过表达 B19 病毒 VPlu 蛋白可以显著上调 Hela 细胞内 Caspase3 的表达,并提高其凋亡率,提示 B19 病毒 VPlu 蛋白促进 Hela 细胞的凋亡。本研究的结果为 B19 病毒 XA 株在疫苗的研究方面奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Young NS, Brown KE. Parvovirus B19 [J]. N Engl J Med, 2004;350(6): 586-597
- [2] Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG. The structure of human parvovirus B19[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(32): 11628-11633
- [3] Filippone C, Zhi N, Wong S, Lu J, et al. VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones [J]. Virology, 2008, 374(2): 444-452
- [4] Lu J, Zhi N, Wong S, et al. Activation of synoviocytes by the secreted phospholipase A2 motif in the VP1-unique region of parvovirus B19

- minor capsid protein [J]. Infect Dis, 2006, 193(4): 582-590
- [5] Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, et al. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells[J]. J Virol, 1998, 72(4): 3018-3028
- [6] Hsu T C, Wu W J, et al. Human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) induces apoptosis through mitochondria cell death pathway in COS-7 cells[J]. Scand J Infect Dis, 2004, 36(8): 570-577
- [7] Chen A Y, Zhang E Y, Guan W, et al. The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells[J]. Blood, 2010, 115(5): 1070-1080
- [8] Kawase M, Momoeda M, Young NS, et al. Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface [J]. Virology, 1995, 211(2): 359-366
- [9] Ros C, Gerber M, Kempf C. Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity[J]. Virol, 2006, 80(24): 12017-12024
- [10] Bonsch C, Zuercher C, Lieby P, et al. The globoside receptor triggers structural changes in the B19 virus capsid that facilitate virus internalization[J]. Virol, 2010, 84(22): 11737-11746
- [11] Rosenfeld SJ, Young NS, Alling D, et al. Subunit interaction in B19 parvovirus empty capsids[J]. Arch Virol, 1994, 136(1-2): 9-18
- [12] Tzang BS, Lee YJ, Yang TP, et al. Induction of antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome-like autoimmunity in naive mice with antibody against human parvovirus B19 VP1 unique region protein[J]. Clin Chim Acta, 2007, 382(1-2): 31-36
- [13] Isa A, Kaspirowicz V, Norbeck O, et al. Prolonged activation of virus-specific CD8+T cells after acute B19 infection [J]. PLoS Med, 2005, 2(12): e343
- [14] Lindner J, Barabas S, Saur K, et al. CD4 (+) T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent parvovirus B19 infection[J]. Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2005, 52(7-8): 356-361
- [15] Li Y, Zadori Z, Bando H, et al. Genome organization of the densovirus from Bombyx mori (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid[J]. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 11): 2821-2825
- [16] Zadori Z, Szelei J, Lacoste M C, et al. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity[J]. Dev Cell, 2001, 1(2): 291-302
- [17] Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, et al. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity[J]. J Virol, 2002, 76(4): 2014-2018
- [18] Deng X, Dong Y, Yi Q, et al. The determinants for the enzyme activity of human parvovirus B19 phospholipase A2 (PLA2) and its influence on cultured cells[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61440
- [19] Lambeau G., Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2 [J]. Trends Pharmacol Sci, 1999, 20(4): 162-170
- [20] Chen AY, Zhang EY, Guan W, et al. The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells[J]. Blood, 2010, 115(5): 1070-1080
- [21] Luo Y, Lou S, Deng X, et al. Parvovirus B19 infection of human primary erythroid progenitor cells triggers ATR-Chk1 signaling, which promotes B19 virus replication[J]. J Virol, 2011, 85(16): 8046-8055
- [22] Lou S, Luo Y, Cheng F, et al. Human parvovirus B19 DNA replication induces a DNA damage response that is dispensable for cell cycle arrest at phase G2/M[J]. J Virol, 2012, 86(19): 10748-10758
- [23] Lupescu A, Bock CT, Lang PA, et al. Phospholipase A2 activity-dependent stimulation of Ca²⁺ entry by human parvovirus B19 capsid protein VP1[J]. Virol, 2006, 80(22): 11370-11380
- [24] Lupescu A, Geiger C, Zahir N, et al. Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger activity by parvovirus B19 protein NS1 [J]. Cell Physiol Biochem, 2009, 23(1-3): 211-220
- [25] Kivovich V, Gilbert L, Vuento M, et al. The putative metal coordination motif in the endonuclease domain of human Parvovirus B19 NS1 is critical for NS1 induced S phase arrest and DNA damage [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(1): 79-92
- [26] Chen A Y, Qiu J. Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest[J]. Future Virol, 2010, 5(6): 731-743
- [27] Chan E D, Winston B W, Uh S T, et al. Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinases in the expression of inducible nitric oxide synthase by IFN-gamma and TNF-alpha in mouse macrophages [J]. J Immunol, 1999, 162(1): 415-422
- [28] Da S J, Pierrat B, Mary J L, et al. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes[J]. J Biol Chem, 1997, 272(45): 28373-28380
- [29] Wang K, Brems J J, Gamelli R L, et al. iNOS/NO signaling regulates apoptosis induced by glycochenodeoxycholate in hepatocytes[J]. Cell Signal, 2011, 23(10): 1677-1685
- [30] Li L, She H, Yue S, et al. Vasoactive intestinal peptide induces surfactant protein A expression in ATII cells through activation of PKC/c-Fos pathway[J]. Peptides, 2010, 31(11): 2046-2051
- [31] Clarke P, Debiasi R L, Goody R, et al. Mechanisms of reovirus-induced cell death and tissue injury: role of apoptosis and virus-induced perturbation of host-cell signaling and transcription factor activation[J]. Viral Immunol, 2005, 18(1): 89-115
- [32] Nie X, Zhang G, Xu D, et al. The VP1-unique region of parvovirus B19 induces myocardial injury in mice [J]. Scand J Infect Dis, 2010, 42(2): 121-128