

DOI:10.13350/j.cjpb.230612

• 论著 •

白纹伊蚊唾液 ralb34k2-1 对 DENV2 在不同细胞中复制的影响*

李莹¹, 黄贞植¹, 覃燕春¹, 朱亚妮², 吴家红³, 商正玲^{1**}

(1. 贵州医科大学基础医学院免疫学教研室, 贵州贵阳 550025; 2. 联勤保障部队第九四〇医院检验科;
3. 贵州医科大学基础医学院寄生虫学教研室)

【摘要】 目的 探讨白纹伊蚊 ralb34k2-1 对 DENV2 在不同宿主细胞中复制的影响。方法 采用 Dot-ELISA 和间接 ELISA 检测 ralb34k2-1 与 DENV2/DENV-EDⅢ 的结合特性。采用 qRT-PCR 检测不同剂量 ralb34k2-1 对蚊细胞 C6/36、Aa23T, 哺乳动物细胞 BHK-21、RAW264.7、HacaT、THP-1 中 DENV2-E 基因表达的影响; 检测 C6/36 细胞中抗菌肽 DEFE、DPT 以及 RAW264.7、THP-1 细胞中抗病毒因子 IFN-β、ISG15、ISG56 基因表达的影响。结果 Dot-ELISA 和间接 ELISA 检测显示 ralb34k2-1 能与 DENV2、DENV-EDⅢ 结合, 其中与 DENV-EDⅢ 结合的 A 值最高, 为 0.9177 ± 0.04422。ralb34k2-1 预孵育可促进 DENV2 在 C6/36、Aa23T 细胞中的复制 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 值最高为 2.0419 ± 0.1027)。5 μg ralb34k2-1 对 C6/36 中 DEFE 的抑制率可达 73% ($P < 0.05$)。ralb34k2-1 能促进 HacaT、THP-1 细胞中 DENV2 的复制, 瞬时混合组 DENV-E $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值最高, 为 2.8024 ± 0.3091, 高于预孵育组的 2.1325 ± 0.06746, 但对鼠源细胞 BHK-21、RAW264.7 中 DENV-E 基因的表达无显著影响 (均 $P > 0.05$)。抗病毒因子检测显示, ralb34k2-1 单独作用能诱导 RAW264.7、THP-1 中 IFN-β、ISG15、ISG56 的表达, 其中 5 μg ralb34k2-1 作用于 RAW264.7 细胞后 ISG56 RNA 相对表达 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 值为 377.9795 ± 12.5457, THP-1 细胞 ISG56 RNA 的相对表达 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 值为 9.5703 ± 1.0332。结论 ralb34k2-1 可与 DENV2、DENV-EDⅢ 结合, 推测该蛋白可能通过抑制蚊细胞中抗菌肽的表达协助蚊源细胞中 DENV2 的复制, 而在人源细胞中 ralb34k2-1 协助 DENV2 复制的机制与蚊源细胞不同, 可为伊蚊雌蚊唾液中 34k2 蛋白参与 DENV2 在蚊-人细胞中循环的研究提供实验线索。

【关键词】 白纹伊蚊; 重组 34k2 蛋白; DENV2; 蚊源细胞; 鼠源细胞系; 人源细胞

【中图分类号】 R384.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)06-0683-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jun;18(6):683-688,694.]

The change of DENV2 replication in different host cells treated with ralb34k2-1

LI Ying¹, HUANG Zhenzhi¹, QIN Yanchun¹, ZHU Yani², WU Jiahong³, SHANG Zhengling¹ (1. Department of Immunology, College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Laboratory department, Joint Logistics Support Force No. 940 Hospital of PLA; 3. Department of Human Parasitology, College of Basic Medicine, Guizhou Medical University) ***

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of ralb34k2-1 on DENV2 replication in different cells derived from mosquito and mammal. **Methods** 1) The binding characteristics of ralb34k2-1 with DENV2/rEDIII was evaluated by Dot-ELISA and indirect ELISA. 2) DENV2-E gene expression in mosquito cells C6/36 and Aa23T and mammal cells BHK-21, RAW264.7, HacaT and THP-1 cells treated with ralb34k2-1 was detected by qRT-PCR, DEFE, DPT genes expression in C6/36 and IFN-β, ISG15, ISG56 treated with ralb34k2-1 in RAW264.7 and THP-1 was detected by qRT-PCR. **Results** 1) The binding results showed that ralb34k2-1 could interact with DENV2 and DENV-EDⅢ. The highest binding A value of ralb34k2-1 combined with DENV2 is 0.8775 ± 0.01436, and the highest A value of Ralb34k2-1 combined with DENV-EDⅢ was 0.9177 ± 0.04422. 2) The mRNA expression of DENV-E in C6/36 and Aa23T cells pre-incubated with ralb34k2-1 were increased ($2^{-\Delta\Delta CT}$ value was 2.0419 ± 0.1027). The inhibitory rate of 5 μg ralb34k2-1 on DEFE in C6/36 was 73% ($P < 0.05$). 3) The mRNA expression of DENV-E of DENV2 was increased in HacaT and THP-1 cells infected with DENV2 mixed with ralb34k2-1 (The $2^{-\Delta\Delta CT}$ values was 2.8024 ± 0.3091 which mixed instantaneously with ralb34k2-1 while pre-incubated with ralb34k2-1 was 2.1325 ± 0.06746. But it had no significant effect on the expression of DENV-E gene in BHK-21 and RAW264.7 cells ($P > 0.05$). 4) The mRNA expression of IFN-

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 81960295)。

** **【通讯作者】** 商正玲, E-mail: zhenglingshang@gmc.edu.cn

【作者简介】 李莹 (1999-), 女, 江苏南通人, 硕士在读, 主要从事虫媒病毒感染与免疫研究。E-mail: 1213678987@qq.com

β , ISG15 and ISG56 was induced by ralb34k2-1 strongly whether virus mixed in it or not. The mRNA relative expression of ISG56 in RAW264. 7 (377. 9795 \pm 12. 5456) was higher than that in THP-1 (9. 5703 \pm 1. 0332). There was no significant difference in antiviral factors between ralb34k2-1 instantaneous mixing and pre-incubated THP-1 ($P > 0. 05$).

Conclusion The ralb34k2-1 can bind to DENV2 and DENV-ED III, and may up-regulate the replication of DENV2 in mosquito cells by inhibiting antimicrobial peptides. Moreover, the replication of DENV2 in human cells enhanced by ralb34k2-1 is different from that in mosquito-derived cells. These results provides a novel paradigm for DENV2 transmission between mosquito and human cells under the condition of *Aedes albopictus* saliva 34k2.

【Key words】 *Aedes albopictus*; ralb34k2-1 protein; DENV2; mosquito cells; mouse cells; human cells

登革病毒(dengue virus, DENV)是全球传播速度最快的虫媒病毒之一,分为4种血清型(DENV1-4),其中DENV2流行最为广泛^[1]。埃及伊蚊和白纹伊蚊是DENV传播的主要媒介^[2],由于全球气候变暖,贸易经济等全球化影响,近20年来白纹伊蚊成为全球扩散速度最快的物种之一^[3]。蚊吸食DENV感染患者血液后,病毒突破蚊的肠道屏障进入蚊体内进行复制并在蚊唾液腺蓄积,当携带病毒的蚊虫再次吸血时,通过蚊刺刺破坏宿主皮肤屏障,含有病毒的唾液被注入宿主体内而引起感染^[4]。人感染DENV可导致类似流感症状的登革热(DF)或临床危重症的登革出血综合征(DHF)、登革休克综合征(DSS),由于缺乏有效的疫苗及特异性药物治疗,DENV感染在全球造成严重的医疗卫生负担^[5]。

在蚊媒病毒的传播中,病毒随蚊唾液一起进入宿主体内,探究蚊唾液组分在蚊媒病毒感染中的作用成为解析蚊媒-病毒-宿主三者间相互作用的关键。研究显示,源自埃及伊蚊唾液蛋白LTRIN可通过干扰宿主细胞淋巴毒素- β 受体介导的信号参与促进寨卡病毒的传播^[6],埃及伊蚊唾液中富含的D7唾液蛋白可与DENV2结合而降低病毒在宿主细胞中的复制^[7]。

伊蚊唾液中的34ku蛋白家族是雌蚊唾液腺特异性高表达的分泌性蛋白组分,含有2个成员(34k-1、34k-2),生物信息学分析未发现其具有已知功能的结构域^[8]。在埃及伊蚊和白纹伊蚊聚集区的人群血清中检测到相应的特异性IgG抗体,提示该蛋白家族成员进入宿主体内后能诱导机体产生特异性体液免疫应答^[9-10]。Surasombatpattana等^[11]报道重组埃及伊蚊34k-1具有增强DENV在人角质形成细胞中的复制并同时抑制胞内抗菌肽和I型IFN活性的效应。利用RNAi技术的检测显示埃及伊蚊唾液中的AaSG34蛋白(即34k1蛋白)与DENV2在蚊子唾液腺中的复制有关联^[10]。但鲜有关于34k-2蛋白生物学功能的报道。

李方站等^[12]报道白纹伊蚊唾液腺中的34k2蛋白具有两种可变剪切的转录本(34k2-1和34k2-2)。重

组表达的白纹伊蚊34k2-1(ralb34k2-1)可在6h内抑制DENV2在C6/36细胞中的复制^[13]。为了进一步探究ralb34k2-1与DENV-2的互作效应,本研究利用Dot-ELISA和间接ELISA检测ralb34k2-1与DENV2病毒颗粒及DENV2包膜E蛋白III结构域的结合情况,探讨ralb34k2-1与DENV2预孵育对蚊虫细胞和不同种属宿主细胞中病毒复制的影响,以明确ralb34k2-1参与DENV2在蚊-人源细胞中循环可能的分子机制。

材料与方法

1 材料

1.1 蛋白、病毒及细胞 ralb34k2-1, r7510(白纹伊蚊唾液分泌型蛋白), rDENV-ED III, 2型DENV新几内亚株(DENV2 NGC, 简称为DENV2), 白纹伊蚊幼虫细胞C6/36, 白纹伊蚊胚胎细胞Aa23T, 鼠成纤维细胞BHK-21, 鼠巨噬细胞RAW264. 7, 人单核细胞THP-1, 人角质形成细胞HacaT, 均由贵州医科大学免疫学实验室提供。

1.2 主要试剂 DMEM培养基, 青霉素和链霉素, 胎牛血清, 美国Gibco公司产品; 鼠抗HIS和羊抗鼠IgG HRP, 美国Invitrogen公司产品; 鼠抗DENV-E, 美国GeneTex公司产品; Trizol购于上海优宁维生物科技有限公司; 逆转录试剂盒和QPCR荧光定量试剂盒购于武汉ABclonal公司。

1.3 主要仪器 凝胶成像系统, 购于上海天能公司; 微量微孔板分光光度计, 美国Molecular Devices公司生产; 实时荧光定量PCR仪, 美国Bio-Rad公司生产。

2 方法

2.1 ralb34k2-1、DENV-ED III蛋白的表达与纯化 用*E. coli* BL21(DE3)和载体pET28a进行蛋白表达, 不同浓度IPTG诱导重组蛋白的表达(ralb34k2-1: 0. 2 mmol/L, DENV-ED III 1 mmol/L), 120 r/min培养12 h。使用亲和层析纯化, 不同浓度咪唑洗脱纯化重组蛋白(ralb34k2-1: 300 mmol/L咪唑, DENV-ED III: 200 mmol/L咪唑)。洗脱后蛋白透析袋透析后浓缩, Western blot鉴定。

2.2 细胞培养与病毒扩增 所有细胞均用含 90% DMEM、10% 胎牛血清及 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的培养液培养。其中, C6/36、Aa23T 细胞培养温度为 28 °C, 二氧化碳浓度为 5%。RAW264.7、BHK-21、HacaT、THP-1 细胞在 37 °C、5% 二氧化碳的培养箱中培养。病毒扩增按照文献 [14] 的方法进行。

2.3 ralb34k2-1 与 DENV2、DENV-EDIII 结合特性检测 采用 Dot-ELISA 和间接 ELISA 法。将 2 μg ralb34k2-1 抗原于硝化纤维素(NCM)或包被 96 孔微量滴度板, 4 °C 过夜, 5% 脱脂牛奶在 37 °C 封闭 1 h, PBST 洗涤 5 次; 分别加入 10~80 μl DENV2, 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗涤; 加入 1/1000 鼠抗 DENV-E 单克隆抗体, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤; 加入 1/1000 羊抗鼠 IgG-HRP, 室温孵育 1 h, 洗涤; 加入 ECL blot 化学发光显影或 TMB 显色后用酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

分别将 0.2~2 μg ralb34k2-1, 2 μg r7510、BSA 抗原滴加于硝化纤维素(NCM), 或包被 96 孔微量滴度板, 4 °C 过夜, 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 1 h, PBST 洗涤; 加入 2 μg DENV-EDIII, 37 °C 孵育 2 h。其余步骤同上。

2.4 RT-qPCR 检测 ralb34k2-1 对 DENV2 感染的影响 按 2×10⁵ 个细胞/孔将受试细胞接种于 24 孔板中, 待细胞长满至 80% 时弃去原培养基, PBS 洗涤; 将 0.5~5 μg 34k2 与 DENV2 (MOI=2) 混合室温孵育 1 h 或瞬时接种于细胞板, 37 °C 吸附 1 h, 洗涤去除混合物后加入新鲜培养基进行培养。Trizol 法提取不同方式处理的细胞总 RNA, 根据逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA, 采用 SYBR Green 染料法检测目的基因表达水平^[15]。目的基因的 mRNA 表达采用 2^{-ΔΔCT} 公式计算。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR in this study

基因名称 Gene name	上游引物 (5'-3') Forward sequences(5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse sequences(5'-3')
β-actin(human)	TGACGTGGACATCCGCAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG
β-actin(Mouse)	GGCTGTATCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
RPS6	CATGACAGGAGACATCAA	GAGATGGTCAGCGGTGATTT
DEFE	GATGGGGTCACAGTATCTGT	CATGTGCGCAGACGCAGAC
DPT	AGACGTCAGTTTTCGATGAAC	CGGTGGTTCGCTTTTACTTC
IFN-β	CCAACAAGTGTCCTCCAAATT	GTAGGAATCCAAGCAAGTTGTAGCT
ISG15	AGGACAGGGTCCCTTTGCC	CCTCCAGCCCGCTCACTTGC
ISG56	TCATCAGGTCAAGGATAGTC	CCACACTGTATTTGGTGTCTAGG
DENV-E	CATTCAAGTGAGAATCTCTTTGTCA	CAGATCTCTGATGAATAACCAACG

注: β-actin 和 IFN-β、ISG15、ISG56 基因引物引自 PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>)。RPS6 基因引物引自文献^[16], DENV-E 基因引物引自文献^[17], DEFE、DPT 基因引物引自文献^[18]。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

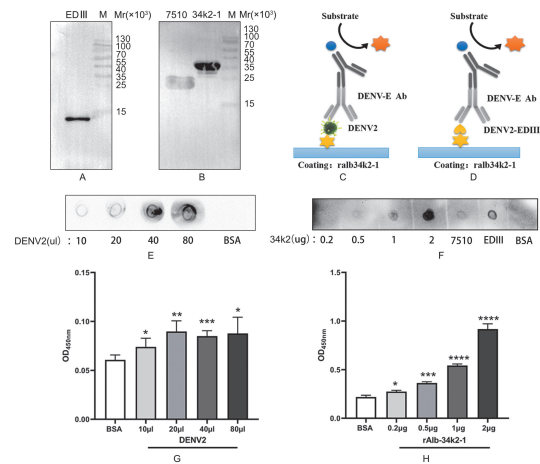
2.5 统计学分析 实验数据均用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用独立样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计

学意义。

结果

1 ralb34k2-1 蛋白与 DENV2 和 DENV-EDIII 的结合作用

使用 BL21(DE3) 表达重组病毒包膜蛋白 DENV-EDIII (rEDIII) (Western blot 结果见图 1A) 以及白纹伊蚊唾液蛋白 ralb34k2-1、r7510 (Western blot 结果见图 1B), 采用 ELISA 检测 ralb34k2-1 捕获 rEDIII 蛋白和 DENV2 病毒颗粒的能力 (图 1C、D)。结果显示, ralb34k2-1 均能与 DENV2 病毒颗粒和 rEDIII 结合。2 μg 的 ralb34k2-1 与加入不同体积的病毒颗粒结合 A 值介于 0.05~0.15 之间 (图 1G); 随包被浓度的增加, ralb34k2-1 与 2 μg rEDIII 蛋白结合的 A 值在 0.5~1.0 之间 (图 1H)。Dot-ELISA 检测 ralb34k2-1 捕获 DENV2/rEDIII 的能力与 ELISA 结果相一致 (图 1E、F)。且在 Dot-ELISA 试验中, 与包被 7510 和 BSA 组比较, ralb-34k2-1 与 rEDIII 的结合具有一定的特异性 (图 1F)。



A、B 分别为 Western blot 检测纯化重组蛋白 DENV-EDIII 和 ralb34k2-1、r7510 C、D 分别为 ELISA 测定 ralb34k2-1 与 DENV2、DENV2-EDIII 结合示意图 E、G 分别为 ralb34k2-1 与 DENV2 结合的 Dot-ELISA 和间接 ELISA 检测 F、H 分别为 ralb34k2-1 与 DENV-EDIII 结合的 Dot-ELISA 和间接 ELISA 检测 A 值

图 1 白纹伊蚊 ralb34k2-1 蛋白与 DENV2 和 DENV-EDIII 结合特性检测

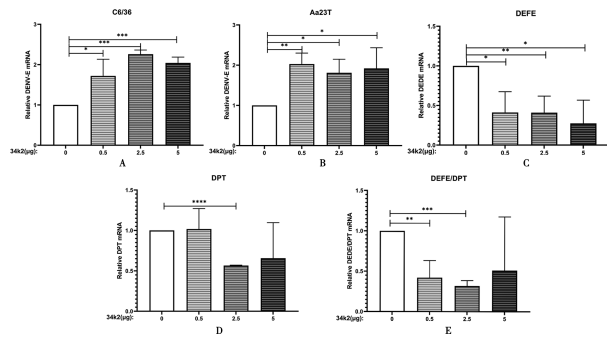
A、B The recombinant proteins DENV-ED III, ralb34k2-1 and 7510 were detected by Western blot C、D Schematic diagram of ELISA analysis the combination of ralb34k2-1 and DENV2、DENV2-ED III E、G Dot-ELISA, indirect ELISA analysis the combination of ralb34k2-1 and DENV2 F、H Dot-ELISA, indirect ELISA analysis the combination of ralb34k2-1 and DENV-ED III.

Fig. 1 A. *albopictus* protein ralb34k2-1 can bind to DENV2 and DENV-ED III

2 DENV-2 和 ralb34k2-1 预孵育对 C6/36、Aa23T 蚊细胞中病毒复制的影响

已经证明将 ralb34k2-1 与 DENV2 瞬时混合后引发感染早期 (6 h) C6/36 蚊细胞中病毒复制被抑制的

现象^[18],并确定 ralb34k2-1 与 rEDIII 有较好的结合能力。为进一步探讨预先孵育的混合物对 DENV2 在不同蚊细胞中复制的影响,本实验用 0.5~5 μg ralb34k2-1 与 DENV2(MOI=2)于 28 °C 预孵育 1 h,结果显示预混物均能增强 DENV2 在 C6/36、Aa23T 蚊细胞中的复制。在 C6/36 细胞,0.5、2.5、5 μg ralb34k2-1 组 DENV-E RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 1.7194 ± 0.3591, 2.2601 ± 0.07181, 2.0419 ± 0.1027(图 2A);在 Aa23T 细胞,0.5、2.5、5 μg ralb34k2-1 组 DENV-E RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 2.0274 ± 0.2222, 1.8107 ± 0.2385, 1.9198 ± 0.4191(图 2B),差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。RT-qPCR 检测 C6/36 细胞内 DEFE、DPT 两种抗菌肽 mRNA 表达水平,结果表明 ralb34k2-1 抑制胞内 AMPs 的表达,5 μg ralb34k2-1 组 DEFE RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0.2740 ± 0.2078, DPT RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0.6563 ± 0.3114(图 2C、D),差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。2.5 μg ralb34k2-1 组 DEFE/DPT RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0.3182 ± 0.04775($P < 0.01$)(图 2E)。



A、B 分别为 C6/36、Aa23T 使用 0.5-5 μg ralb34k2-1 与 DENV2 预孵育后感染 55 h 胞内 DENV-E 相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$) C、D、E 分别为感染的 C6/36 细胞中,DEFE、DPT 以及 DEFE/DPT 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$)

图 2 预先与 DENV-2 孵育的 ralb34k2-1 可增强 DENV-2 在 C6/36、Aa23T 蚊细胞中的复制

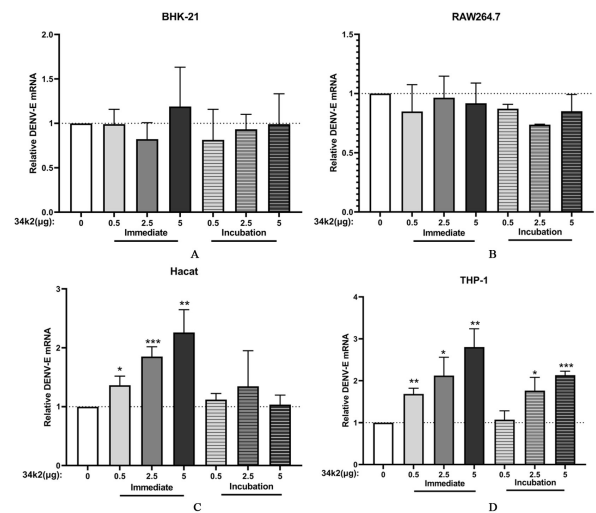
A、B The relative expression of DENV-E ($2^{-\Delta\Delta CT}$) in C6/36 and Aa23T were infected for 55 hours with DENV2 pre-incubated with 0.5-5 μg ralb34k2-1 C、D、E The relative expression of DEFE, DPT and DEFE/DPT($2^{-\Delta\Delta CT}$) in C6/36

Fig. 2 The replication of DENV-2 in C6/36 and Aa23T cells was increased when infected with DENV-2 pre-incubated with ralb34k2-1

3 ralb34k2-1 与 DENV2 结合对不同哺乳细胞中病毒复制的影响

采用两种鼠源细胞 BHK21 和 Raw264.7 及两种人源细胞 HacaT 和 THP-1 进行试验,观察 ralb34k2-1 对 DENV2 复制的影响。结果显示,ralb34k2-1 对不同哺乳细胞中病毒复制的调控作用显著不同:在鼠源细胞,无论 ralb-34k2-1 是否与 DENV-2 预孵育,病毒在细胞内的复制强度与对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。在 RAW264.7 细胞,5 μg

ralb34k2-1 瞬时作用组与预孵育组 DENV-E RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 0.9182 ± 0.1392 和 0.8510 ± 0.1154。在 BHK-21 细胞,5 μg ralb34k2-1 瞬时作用组与预孵育组 DENV-E RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 1.1894 ± 0.3618, 0.9913 ± 0.2785(图 3A、B)。在人源细胞,ralb34k2-1 能促进病毒的复制,尤其在瞬时混合组中促复制作用更显著。如在 HacaT 细胞,5 μg ralb34k2-1 瞬时作用组 DENV-E RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 2.2597 ± 0.3156, 预孵育组为 1.0355 ± 0.1319;在 THP-1 细胞,5 μg ralb34k2-1 瞬时作用组 DENV-E RNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 2.8024 ± 0.3091, 预孵育组为 2.1325 ± 0.06746, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 3C、D)。



A、B、C、D 分别为 BHK-21、RAW264.7、HacaT、THP-1 使用不同剂量 ralb34k2-1 与 DENV2 瞬时混合、预孵育后感染 12 h 胞内 DENV-E 相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$)

图 3 ralb34k2-1 与 DENV2 结合可影响宿主细胞中的病毒复制

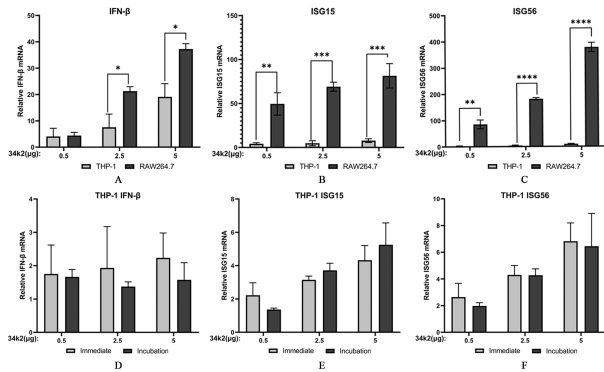
A、B、C、D The relative expression of DENV-E of BHK-21, RAW264.7, HacaT and THP-1 infected with DENV2 mixed with ralb34k2-1 instantaneously or pre-incubated after 12 hours

Fig. 3 The combination of ralb34k2-1 with DENV2 can affect DENV2 replication in host cells

4 ralb34k2-1 对 THP-1 细胞和 raw264.7 细胞 I 型干扰素相关基因表达的影响

细胞内抗病毒基因的表达是细胞抵抗病毒复制的重要机制,其中 I 型干扰素及干扰素诱导基因(ISG)尤为重要。为比较 ralb34k2-1 对不同种属单核巨噬细胞抗病毒基因的调控是否存在差异性,本实验用 0.5~5 μg 34k2 分别刺激 THP-1 和 RAW264.7 细胞,比较胞内抗病毒因子 IFN-β(图 4A)、ISG-15(图 4B)、ISG-56(图 4C)表达的差异性。结果显示,5 μg ralb34k2-1 作用于 RAW264.7 细胞后,ISG56 RNA 的相对表达($2^{-\Delta\Delta CT}$)值为 377.9795 ± 12.5457, THP-1 细胞为 9.5703 ± 1.0332。表明 ralb34k2-1 上调 RAW264.7 细胞中抗病毒因子的能力显著强于对

THP-1 细胞的调控。进一步分析感染 THP-1 细胞预孵育与未预孵育组中抗病毒因子表达的差异性,结果见图 4D-F。5 μg ralb34k2-1 瞬时作用组与预孵育组胞内 IFN- β RNA $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值分别为 2.2348 \pm 0.6102 和 1.5766 \pm 0.4201, ISG15 RNA $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值分别为 4.3299 \pm 0.7164、5.2534 \pm 1.0699, ISG56 RNA $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值分别为 6.8263 \pm 1.1167、6.4532 \pm 2.0045。ralb-34k2-1 与 DENV-2 瞬时作用组与预孵育组胞内 IFN- β 、ISG-15、ISG-56 mRNA 的表达水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。



A、B、C 分别为 RAW264.7、THP-1 细胞使用 0.5-5 μg ralb34k2-1 刺激后 12 h 胞内 IFN- β 、ISG15、ISG56 相对表达量($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) D、E、F 分别为感染的 THP-1 细胞中,IFN- β 、ISG15、ISG56 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)。

图 4 ralb34k2-1 对 THP-1 细胞和 Raw264.7 细胞中 I 型干扰素相关基因表达的影响

A、B、C The relative expression of IFN- β , ISG15 and ISG56 in THP-1, RAW264.7 cells was detected after stimulated with 0.5-5 μg ralb34k2-1 for 12 h D、E、F The relative expression of IFN- β , ISG15 and ISG56 in infected THP-1 cells ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)

Fig. 4 Effect of ralb34k2-1 on the expression of interferon type I related genes in THP-1 cell and Raw264.7 cell

讨论

蚊唾液腺中的分泌性蛋白具有调控蚊吸血、抗凝及调控宿主免疫等多种生物学功能,可参与蚊媒病毒的传播和感染^[6,18]。本研究克隆表达了白纹伊蚊雌蚊唾液腺特异性的 34ku 蛋白家族成员中的 34k2 蛋白(ralb-34k2-1),发现该蛋白与 DENV2 预孵育后能增强病毒在 C6/36 细胞(白纹伊蚊幼虫细胞)和 Aa23T 细胞(白纹伊蚊胚胎细胞)中的复制,并抑制蚊细胞中 DEFE(防御素)和 DPT(抗菌肽)的表达,且 ralb-34k2 促进 DENV2 在哺乳动物细胞 HacaT 和 THP-1 复制的效应显著强于在 BHK21 和 Raw264.7 细胞中的复制。

本研究采用 Dot-ELISA 和间接 ELISA 法检测了 ralb34k2-1、ralb7510 以及 BSA 与 DENV2 病毒颗粒/rEDIII 结合情况,结果显示 ralb34k2-1 能与 DENV2 及 DENV-EDIII 蛋白结合,且 ralb34k2-1 与 rEDIII 蛋白结合的 A 值高于 DENV2,而 ralb7510 及 BSA 与病

毒的 rEDIII 无明显结合作用,这为 ralb34k2-1 直接调控 DENV2 的复制奠定了基础。

前期研究发现,在 ralb34k2-1 与 DENV2 瞬时混合后感染 C6/36 蚊细胞的早期(6 h),病毒的复制被抑制^[13]。本实验将 ralb34k2-1 与 DENV2 预孵育 1 h 后分别感染 C6/36 细胞及 Aa23T 细胞,发现病毒在两种细胞内的复制显著增强。在白纹伊蚊,ralb-34k2 蛋白属于蚊细胞的内源性蛋白,理论上蚊细胞对 ralb34k2-1 无免疫反应。含 ralb34k2-1 的预混物使 DENV2 在蚊细胞中的复制增强,可能是 ralb34k2-1 与病毒的结合改变了蚊细胞对 DENV2 的摄取作用。有研究报道在 DENV 和 DTMUV(Duck Tembusu virus)感染后 2~4 d,埃及伊蚊唾液腺提取物中 AaSG34(34K1)表达增多,且利用 RNAi 技术下调表达 34k1 蛋白后 DENV2 及 DTMUV 在蚊唾液腺中的复制和病毒蛋白表达均显著下降,推测埃及伊蚊的 34k1 蛋白能促进病毒在蚊唾液腺中的复制^[6,18]。以上结果均提示 34ku 家族成员可能具有促进病毒在蚊细胞中复制的作用。同时,蚊细胞内天然免疫分子的表达可抵御病原体感染,蚊体内的防御素(DEF)家族已被证明对 DENV 有抑制效应,下调 C6/36 细胞中该家族分子的表达可显著提高胞内病毒的滴度^[18-19]。本实验结果显示,预混物中的 ralb34k2-1 参与下调 C6/36 细胞中 DEFE(防御素)和 DPT(抗菌肽)的表达,提示内源性 34k2 蛋白可通过抑制蚊细胞中抗病毒反应协助胞内 DENV2 的复制。

在自然界中,蚊媒病毒借助蚊吸血方式入侵宿主,可能与病毒自身突破宿主物理屏障的能力有限有关。在吸血过程中,蚊唾液腺释放的分泌性蛋白可能协助病毒感染,这一现象对理解蚊媒病毒的致病机制具有重要价值^[6,18]。不同来源的靶细胞可能存在种属和组织差异,因此本研究选择了 HacaT 细胞(人角质形成细胞系)、THP-1 细胞(人单核细胞系)、BHK-21 细胞(鼠成纤维细胞系)及 Raw264.7(鼠巨噬细胞系)进行感染试验,观察 34k2 对 DENV2 复制的影响。分别用预孵育或瞬时混合的病毒与蛋白混合物感染细胞,结果显示无论是用预孵育或瞬时混合物感染细胞,34k2 仅在人源细胞中显示出更强的协助 DENV2 复制的效应。有研究显示 SARS-Cov2 在 Calu-3 细胞中的复制较 VeroE6 细胞中更佳,该效应是由于不同靶细胞中 TMRPSS2 的差异表达从而导致病毒入侵的差异性,提示同一病毒入侵不同细胞时感染效率不同^[20]。本实验中 34k2 协助 DENV2 在人源细胞中复制的作用更强,可能与 34k2 调控不同种属细胞胞内的免疫差异性有关。胞内 PRRs 识别病毒核酸后通过 IRF3/IRF7 通路启动 IFN- β 的转录、翻译及分泌。INF- β 通过与

细胞表面的 IFN 受体结合激活胞内 stat1/2 信号通路,介导 ISG 应答。I 型干扰素及 ISG 表达是哺乳细胞快速抗病毒的重要方式^[21]。ISG15 是一种泛素样分子,通过对蛋白质的 ISG 标记发挥抗病毒效应^[22]。ISG56 能选择性抑制病毒 mRNA 的翻译^[23]。本研究用 ralb34k2-1 刺激 Raw264.7 和 THP-1 细胞,观察到 ralb34k2-1 能直接诱导上述细胞抗病毒因子表达上调,但 ralb34k2-1 对 Raw264.7 细胞的调控作用显著强于对 THP-1 细胞的调控作用,这部分解释了在 Raw264.7 细胞中 ralb34k2-1 的促病毒复制效应不明显的现象。由于在人源细胞(THP-1 和 HacaT)中瞬时混合组 ralb34k2-1 促病毒复制的效应较预孵育组强,因此本研究比较了不同作用方式对胞内抗病毒因子表达的影响,结果表明不同作用方式均未造成 THP-1 细胞 IFN- β 、ISG15 及 ISG56 表达的显著变化。鉴于临时混合组胞内病毒复制更明显,推测 ralb34k2-1 可通过其他免疫调控方式协助 DENV2 抵抗胞内 IFN 抗病毒效应。预孵育组 34k2 与病毒 EDIII 结构域预先结合,干扰了病毒 E 蛋白与细胞膜受体的结合,部分阻碍了病毒的入侵或改变靶细胞对 ralb34k2-1 与病毒混合物的摄取方式与降解。Kaczmarek 等^[7]报道能与 DENV2 E 蛋白结合的 D7 唾液蛋白也能抑制小鼠 U937 细胞中 DENV2 的复制。Andrejeva 等^[24]报道 Antigen 5 protein (AAEL000793), Factor Xa inhibitor (AAEL007420), Apyrase (AAEL006347) 等多种蚊唾液蛋白均能与 ZIKV-VLPs、ZIKV-E 直接结合,但这些蚊唾液蛋白均未参与调控内皮细胞和角质形成细胞中病毒的复制。DENV 包膜 E 蛋白已被公认为是介导病毒入侵的关键蛋白,E 蛋白与受体结合后,其第 3 个结构域(EDIII)的构象改变开启了病毒穿入细胞的过程^[25]。迄今已发现硫酸肝素软骨素, CLEC5A, DC209, HSP90 等多种 DENV 受体可通过黏附因子或共受体方式浓缩细胞表面的病毒,或参与病毒内吞、抑制靶细胞的免疫反应或协助囊泡酸化促病毒基因组释放等不同机制启动病毒的感染^[26]。推测 ralb34k2 可作为 DENV2 病毒的黏附分子通过不同的免疫调控机制而造成病毒在不同细胞中的复制差异。

本研究结果表明白纹伊蚊的 ralb-34k2 可与 DENV2 结合,并发现该蛋白可通过调控胞内免疫反应的不同方式促进蚊源细胞和人源细胞中病毒的复制,为探讨 ralb34k2-1 调控 DENV 在蚊-人循环的机制提供了线索。

【参考文献】

- Messina JP, Brady OJ, Scott TW, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history[J]. Trends Microbiol, 2014, 22(3):138-146.
- Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(12):1271-1280.
- Wanasen N, Nussenzeig RH, Champagne DE, et al. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*[J]. Med Vet Entomol, 2004, 18(2):191-199.
- Cheng G, Liu Y, Wang P, et al. Mosquito defense strategies against viral infection[J]. Trends Parasitol, 2016, 32(3):177-186.
- Ogunlade ST, Meehan MT, Adekunle AI, et al. A review: Aedes-borne arboviral infections, controls and Wolbachia-based strategies [J]. Vaccines (Basel), 2021, 9(1):32.
- Sri-In C, Weng SC, Chen WY, et al. A salivary protein of *Aedes aegypti* promotes dengue-2 virus replication and transmission[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2019, 111:103181.
- Kaczmarek ME, Herzog NL, Noval MG, et al. Distinct New York City *Aedes albopictus* mosquito populations display differences in salivary gland protein D7 diversity and chikungunya virus replication[J]. Viruses, 2020, 12(7):698.
- Ribeiro JM, Martin-Martin I, Arca B, et al. A deep insight into the sialome of male and female *Aedes aegypti* mosquitoes[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0151400.
- Ndille EE, Dubot-Peres A, Doucoure S, et al. Human IgG antibody response to *Aedes aegypti* Nterm-34 kDa salivary peptide as an indicator to identify areas at high risk for dengue transmission: a retrospective study in urban settings of Vientiane city, Lao PDR[J]. Trop Med Int Health, 2014, 19(5):576-580.
- Buezo MS, Gabrieli P, Montarsi F, et al. IgG antibody responses to the *Aedes albopictus* 34k2 salivary protein as novel candidate marker of human exposure to the tiger mosquito[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020(10):377.
- Surasombattana P, Hamel R, Patramool S, et al. Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses[J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(7):1664-1673.
- 李方站, 程金芝, 王涛, 等. 白纹伊蚊唾液腺 34 ku-2 基因克隆与原核表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(2):165-169.
- 朱亚妮, 金芮, 代薇露, 等. 白纹伊蚊 rAlb-34k2 蛋白对 C6/36 细胞内的 DENV2 早期抑制作用[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(2):167-170, 176.
- 李雪莲, 武峰, 王莹. 登革病毒组织培养技术[J]. 河南医学研究, 2002(03):217-219.
- Sun XK, Gong Y, Shang DD, et al. Degradation of alginate by a newly isolated marine bacterium *Agarivorans sp.* B2Z047[J]. Mar Drugs, 2022, 20(4):254.
- Lu P, Bian G, Pan X, et al. Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells[J]. Plos Neglected Tropical Dis, 2012, 6(7):e1754.
- Ribeiro JM, Charlab R, Valenzuela JG. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* [J]. J Experimental Biol, 2001, 204(11):2001-2010.

- ingredients[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:193.
- [18] 卓怡呈, 刘程豪, 张示杰. 一种多房棘球蚴原头节提取筛选方法 [P]. CN114606176A, 2022-06-10.
- [19] Hemer S, Brehm K. *In vitro* efficacy of the anticancer drug imatinib on *Echinococcus multilocularis* larvae [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(5):458-462.
- [20] Zhou L, Sui H, Wang T, et al. Tanshinone IIA reduces secretion of proangiogenic factors and inhibits angiogenesis in human colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(4):1159-1168.
- [21] Zhou LH, Hu Q, Sui H, et al. Tanshinone II-a inhibits angiogenesis through down regulation of COX-2 in human colorectal cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(9):4453-4458.
- [22] Bai Y, Zhang L, Fang X, et al. Tanshinone IIA enhances chemosensitivity of colon cancer cells by suppressing nuclear factor- κ B[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(3):1085-1089.
- [23] Jung JH, Kwon TR, Jeong SJ, et al. Apoptosis induced by tanshinone IIA and cryptotanshinone is mediated by distinct JAK/STAT3/5 and SHP1/2 signaling in chronic myeloid leukemia K562 cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013.
- [24] 谭小武, 姜慧娇, 俞晓凡, 等. 黄腐酚对体外多房棘球蚴原头节活性的影响[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(2):131-136.
- [25] 裴彩霞, 汪晓敏, 吴永灿, 等. 桔梗皂苷 D 通过 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路抑制细胞凋亡保护急性肺损伤的机制研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(10):3551-3558.
- [26] Tait SWG, Oberst A, Quarato G, et al. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis[J]. *Cell Rep*, 2013, 5(4):878-885.
- [27] Banjara S, Suraweera CD, Hinds MG, et al. The Bcl-2 family: ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1):128.
- [28] Yao S, Tian C, Ding Y, et al. Down-regulation of Kr ppe1-like factor-4 by microRNA-135a-5p promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by transforming growth factor- β 1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27):42566.
- [29] Li FL, Xu R, Zeng Q, et al. Tanshinone IIA inhibits growth of keratinocytes through cell cycle arrest and apoptosis; underlying treatment mechanism of psoriasis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012.
- [30] Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(5):737-747.
- [31] Zeeshan HMA, Lee GH, Kim HR, et al. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3):327.
- [32] Chiu TL, Su CC. Tanshinone IIA induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through the induction of reactive oxygen species and decreasing the mitochondrial membrane potential [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 25(2):231-236.
- [33] Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodriguez L, et al. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*[J]. *Evodevo*, 2014, 5(1):1-23.
- [34] Kuster T, Hermann C, Hemphill A, et al. Subcutaneous infection model facilitates treatment assessment of secondary Alveolar echinococcosis in mice[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(5):e2235.
- [35] 刘锡娟, 丁慧荣, 张宏. 用 DAPI 和 Hoechst33342 染色法测定 DNA 的流式细胞方法探讨[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2010, 42(4):480-484.
- [36] Cheng Z, Xu Z, Tian H, et al. In vitro and in vivo efficacies of the EGFR/MEK/ERK signaling inhibitors in the treatment of Alveolar Echinococcosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(8):e00341-20.
- [37] Xue J, Jin X, Wan X, et al. Effects and mechanism of tanshinone II A in proliferation, apoptosis, and migration of human colon cancer cells[J]. *Med Sci Monit*, 2019(25):4793.

【收稿日期】 2022-12-25 【修回日期】 2023-03-11

(上接 688 页)

- [18] Sun P, Nie K, Zhu Y, et al. A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):260.
- [19] Mukherjee D, Das S, Begum F, et al. The mosquito immune system and the life of dengue virus: What we know and do not know[J]. *Pathogens*, 2019, 8(2):77.
- [20] Xiao X, Liu Y, Zhang X, et al. Complement-related proteins control the flavivirus infection of *Aedes aegypti* by inducing antimicrobial peptides[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(4):e1004027.
- [21] Schroeder S, Pott F, Niemeyer D, et al. Interferon antagonism by SARS-CoV-2: a functional study using reverse genetics [J]. *Lancet Microbe*, 2021, 2(5):e210-e218.
- [22] Michalska A, Blaszczyk K, Wesoly J, et al. A positive feedback amplifier circuit that regulates interferon (IFN)-stimulated gene expression and controls type I and type II IFN responses[J]. *Front Immunol*, 2018(9):1135.
- [23] Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, et al. Mycobacterial disease and impaired IFN- γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency[J]. *Science*, 2012, 337(6102):1684-1688.
- [24] Andrejeva J, Norsted H, Habjan M, et al. ISG56/IFIT1 is primarily responsible for interferon-induced changes to patterns of parainfluenza virus type 5 transcription and protein synthesis [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 1):59-68.
- [25] Valenzuela-Leon PC, Shrivastava G, Martin-Martin I, et al. Multiple salivary proteins from *Aedes aegypti* mosquito bind to the Zika virus envelope protein[J]. *Viruses*, 2022, 14(2):221.
- [26] Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame[J]. *Cell*, 2006, 124(4):729-740.

【收稿日期】 2022-12-15 【修回日期】 2023-03-05