

人偏肺病毒通过活化EGFR促进其入胞的机制研究

吴婷婷 张盼 李智宇 杨晖 赵耀*

(重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所/国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地/儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘要 研究发现人偏肺病毒入胞过程有脂筏的参与, 而EGFR是定位于胞膜脂筏上的一种跨膜糖蛋白, 在多种病毒的感染中发挥重要作用, 该文主要探索表皮生长因子受体(EGFR)在人偏肺病毒(hMPV)感染中的作用及其相关机制。利用人支气管上皮细胞16HBE, 用Western blot检测细胞感染hMPV特定时间后EGFR的活化情况。使用EGFR的激活剂和抑制剂改变EGFR的表达和活化水平后再感染hMPV, 实时荧光定量PCR检测病毒滴度的变化。结果显示, hMPV入胞5 min就可观察到EGFR磷酸化水平明显增高, 15 min时达到最大值。活化剂预先激活EGFR可以促进病毒入胞, 而抑制EGFR则可降低病毒的滴度。该研究阐述了hMPV入胞可以激活EGFR, 且EGFR的活化会促进病毒入胞。

关键词 人偏肺病毒; 表皮生长因子受体; 病毒入胞

Study on the Mechanism of Human Metapneumovirus Activating EGFR to Promote Virus Entry

WU Tingting, ZHANG Pan, LI Zhiyu, YANG Hui, ZHAO Yao*

(Department of Pediatric Research Institute of Children's Hospital of Chongqing Medical University/National Clinical Research Center for Child Health and Disorders/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders/Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Chongqing 400014, China)

Abstract Previous researches have revealed that lipid rafts involve in the cell entry of hMPV (human metapneumovirus virus). EGFR is a transmembrane glycoprotein located on membrane lipid rafts, which plays an important role in the infection of a variety of viruses. Therefore, this study aims to explore the role and related mechanism of EGFR (epidermal growth factor receptor) in hMPV infection. Human bronchial epithelial cells 16HBE were used to detect EGFR activation after hMPV infection at a specific time using Western blot. The activators and inhibitors were used to alter the expression and activation levels of EGFR, which was applied to hMPV and the virus titer was determined by real-time quantitative PCR. The results showed that the phosphorylation level of EGFR was significantly increased within 5 min of hMPV entry and reached the maximum at 15 min. Activated EGFR prior to infection promoted hMPV entry, while inhibition of EGFR reduced viral titer. The results demonstrate that hMPV infection activates EGFR, which promotes virus entry.

Keywords human metapneumovirus; epidermal growth factor receptor; virus entry

收稿日期: 2020-09-08 接受日期: 2020-10-13

国家自然科学基金(批准号: 81371876、81701997)和重庆市自然科学基金(批准号: cstc2019jcyj-msxm X0244)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63633083, E-mail: Zhaoy@cqmu.edu.cn

Received: September 8, 2020 Accepted: October 13, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81371876, 81701997) and Chongqing Natural Science Foundation of China (Grant No.cstc2019jcyj-msxm X0244)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63633083, E-mail: Zhaoy@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5402>

急性呼吸道感染是目前世界上呼吸道疾病发病及致死的重要原因, 主要是由病毒感染引起。2019年新型冠状病毒在武汉爆发, 感染后主要导致肺炎、严重急性呼吸道综合征、多器官损伤甚至死亡^[1-2]。同样作为呼吸道病毒的人偏肺病毒(human metapneumovirus, hMPV)属于副黏病毒科, 偏肺病毒属, 是一种有包膜的单负链RNA病毒, 自2001年在荷兰被发现以来^[3], 世界范围内都有相继报道, 其主要易感人群为儿童、老年人与免疫力低下患者^[4-7]。hMPV感染后的常见临床表现为发烧、咳嗽、缺氧、气喘、呼吸道感染等症状, 往往被诊断为细支气管炎、支气管炎和肺炎^[8]。然而到目前为止, 尚无针对hMPV感染的特异性抗病毒药物或疫苗。

病毒入胞在病毒侵犯人体中至关重要。本课题组前期研究发现, hMPV可以通过内吞途径入胞^[9], 且在这一过程中脂筏发挥了重要作用^[10]。脂筏是位于质膜上的一段微结构域, 主要由胆固醇和鞘磷脂构成。脂筏具有多种生物学功能, 如细胞黏附、信号转导和蛋白质转运等。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是定位于胞膜脂筏上的一种跨膜糖蛋白^[11], 具有配体诱导的酪氨酸激酶活性。研究表明, EGFR在多种病毒的感染中发挥了重要作用^[12-16], 但EGFR和hMPV感染的关系目前未见报道。本研究采用人支气管上皮细胞作为病毒感染模型, 来研究EGFR在hMPV感染中的作用, 期为临床治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

16HBE细胞株和Vero E6细胞株为本实验室保存。DMEM高糖培养基和胎牛血清购自Gibco公司。胰酶购自上海索莱宝生物科技有限公司。青-链霉素溶液、Western blot配胶试剂盒、蛋白提取试剂盒、BCA浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。Human EGF购自PeproTech公司。EGFR抑制剂gefitinib、AG-1478购自Selleck公司。兔源单克隆抗体磷酸化EGFR(p-EGFR)、EGFR、GAPDH及HRP酶标记的羊抗兔IgG二抗均购自CST公司。hMPV引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司。

1.2 病毒培养、保存及测定

hMPV病毒株NL/1/00前期经反向遗传技术构

建, 并在F基因质粒上插入了一个表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的基因。病毒在Vero E6细胞中使用含有3%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%青-链霉素和0.1%胰酶的DMEM(病毒维持液)进行扩增。待绿色荧光至80%时, 连同培养瓶一起放入-80℃冰箱, 冻融3次后离心过滤取上清, 分装, 再保存于-80℃备用, 提取RNA, 逆转录为cDNA, 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测病毒滴度。

1.3 细胞培养与细胞饥饿

16HBE细胞正常生长于含10% FBS的DMEM培养基中, 37℃、5% CO₂孵箱中常规培养。待细胞在培养瓶中长至致密单层后, 用胰酶消化后重新铺于6孔板中, 前后十字摇晃使细胞均匀生长, 置于孵箱孵育12 h待细胞充分贴壁后, 将培养基换为不含FBS的DMEM不完全培养基, 进行细胞饥饿12 h, 此步骤目的为使所有细胞同步化。若无特殊说明, 所有实验操作前均进行此步骤。

1.4 细胞毒性实验

为了检测抑制剂是否会对细胞有毒性作用, 将16HBE细胞接种于96孔板。细胞分别在添加有DMSO、不同浓度gefitinib、AG-1478的培养基中孵育48 h, PBS洗3次, 每孔加入100 μL 10% CCK8溶液(每100 μL DMEM培养基中含有10 μL CCK8), 在培养箱中37℃孵育60 min, 检测孔板450 nm处的吸光度(D)值。根据公式细胞活力=(实验组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)×100%, 计算细胞的存活率。

1.5 病毒内化实验

16HBE细胞生长于6孔板中, PBS洗3次, 以MOI=10的hMPV感染细胞。将6孔板置于4℃孵育2 h, 使病毒只吸附但不入胞, 用冰PBS洗去未结合的病毒颗粒, 然后转入37℃孵箱中启动入胞, 孵育特定的时间后裂解细胞提取总蛋白, 以用于后续蛋白免疫印迹分析。

1.6 qRT-PCR检测hMPV病毒滴度

用RNA提取试剂盒提取经不同处理后的细胞RNA, 然后逆转录为cDNA, 使用探针法进行绝对定量, 用标准曲线计算病毒拷贝数。标准曲线是由载有hMPV F的质粒倍比稀释后检测hMPV的拷贝数绘制而来。引物序列如下:

探针序列为5'-TTG CCA ACA CAC GAA CTC

CAT CCC-3'; 上游引物为 5'-GAG CAA TAG CAC TCG GTG TTG-3'; 下游引物为 5'-TCA CAA ATC TTT CAG CTC TCT CAC-3'。病毒感染细胞后在 37 °C 孵箱中孵育 1 h, 提取病毒 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 用于检测病毒滴度。

1.7 蛋白免疫印迹分析

用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, 离心后取上清, 用 BCA 方法检测蛋白浓度, 将蛋白样品与蛋白上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min。置于 -20 °C 保存备用。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别与特异性的一抗 (1:1 000) p-EGFR、EGFR 和 GAPDH 在 4 °C 孵育过夜, 再经 TBST 洗涤 3 次后, 与 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 洗涤 3 次, 最后使用发光液曝光显影, 利用 Quantity One 软件分析灰度值。

1.8 统计学方法

实验数据采用 Graphpad prism 7 软件进行统计学分析, 以均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 两组数据之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hMPV 诱导表皮生长因子受体活化

在 hMPV 入胞 5、10、15、30、60 min 后检测 EGFR 的磷酸化水平。结果显示, hMPV 入胞 5 min

就可观察到 EGFR 磷酸化水平升高, 15 min 时达到峰值 (图 1A), 对照组 EGFR 磷酸化水平无明显变化 (图 1B)。

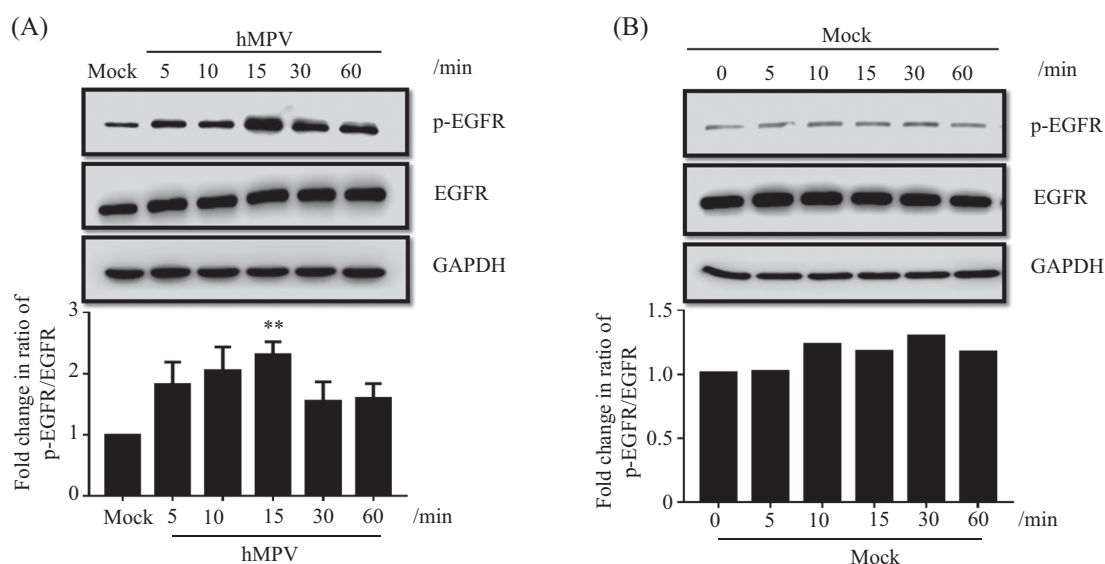
2.2 EGFR 活化可以促进 hMPV 入胞

如图 2A 所示, 用 10 ng/mL EGF 刺激细胞, 可检测到 EGFR 在刺激 5~15 min 时磷酸化明显升高, 我们采用 EGF 刺激 15 min 来激活 EGFR, 以供后续实验使用。用 10 ng/mL EGF 刺激细胞 15 min 后感染 hMPV, 37 °C 孵育 1 h 后提取细胞 RNA 并逆转录为 cDNA, qRT-PCR 测定病毒滴度, 单纯 hMPV 组病毒滴度低于 10 ng/mL EGF+hMPV 组的病毒滴度 (图 2B), 差异有统计学意义。

2.3 EGFR 降解或活化受到抑制可以降低病毒滴度

使用 100 ng/mL 的 EGF 分别刺激细胞 60、90、120 min, 检测细胞中 EGFR 的表达水平。Western blot 结果显示, EGF 刺激 16HBE 细胞 120 min 后, EGFR 显著降解 (图 3A)。于是, 我们使用 100 ng/mL 的 EGF 刺激细胞 120 min, 再用 PBS 洗 3 次, 感染病毒, 37 °C 孵箱孵育 1 h 后检测病毒滴度。单纯 hMPV 组的病毒滴度高于 100 ng/mL EGF+hMPV 组 (图 3B), 差异有统计学意义。

我们使用 EGFR 特异性抑制剂处理细胞, 抑制 EGFR 的活化后进一步验证 EGFR 对病毒感染的影响。CCK8 试剂盒检测抑制剂的细胞毒性, 结果显示均无明显毒性效应。抑制剂预先处理 16HBE 细

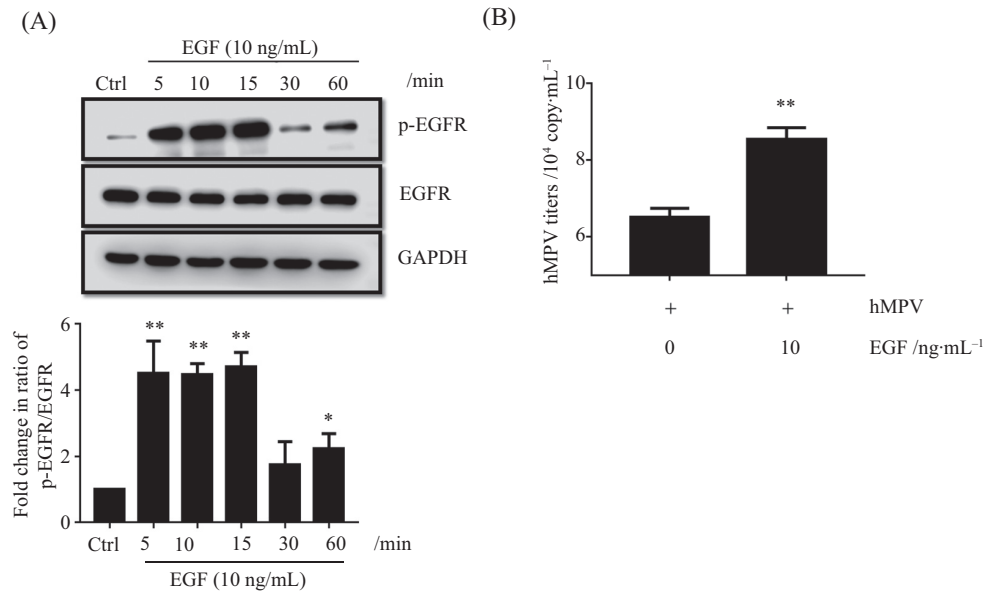


A: Western blot检测hMPV入胞中的EGFR活化情况。 ** $P < 0.01$, 与对照组比较; B: 空白处理作为对照。

A: the activation levels of EGFR were detected by Western blot in cell entry of hMPV. ** $P < 0.01$ compared with the control group; B: blank treatment as a control.

图1 hMPV入胞诱导EGFR活化

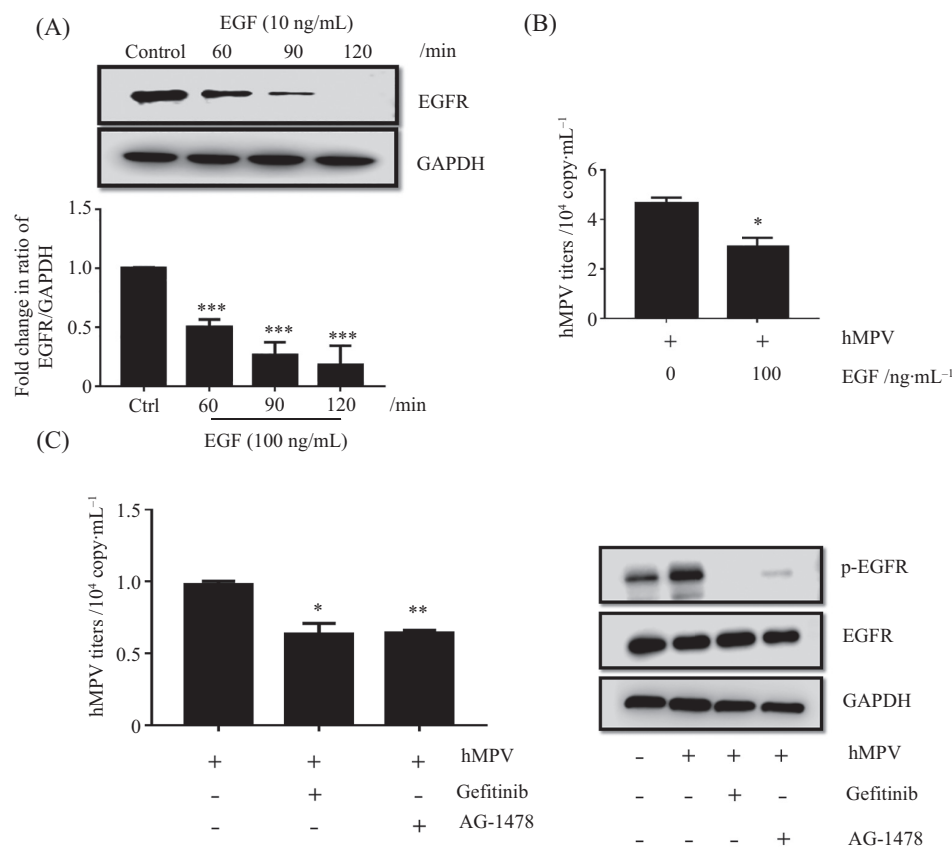
Fig.1 hMPV entry induces activation of EGFR



A: Western blot分析10 ng/mL EGF刺激细胞后EGFR的活化水平; B: 10 ng/mL EGF处理对病毒入胞的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。
A: activation level of EGFR was detected by Western blot after stimulation with 10 ng/mL; B: the effect of 10 ng/mL EGF treatment on virus cell entry.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图2 EGFR活化可以促进hMPV入胞

Fig.2 EGFR activation promotes hMPV entry



A: Western blot分析EGFR的降解程度; B: 100 ng/mL EGF处理对病毒滴度的影响; C: 抑制剂处理后的病毒滴度, 右图使用抑制剂后EGFR的磷酸化水平明显受到了抑制。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比。

A: the degradation degree of EGFR was analyzed by Western blot; B: the effect of 100 ng/mL EGF treatment on virus titer; C: virus titer after inhibitor treatment. The phosphorylation of EGFR was significantly inhibited after treatment with inhibitors, shown on the right. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

图3 EGFR降解或活化受到抑制可以降低病毒滴度

Fig.3 Degradation or inhibition of EGFR reduce viral titer

胞12 h后感染hMPV, 37 °C孵育1 h后, qRT-PCR检测病毒滴度, 结果显示, 抑制剂处理组的病毒RNA明显低于病毒对照组。

3 讨论

hMPV作为一种呼吸道病毒, 其发病率与死亡率与呼吸道合胞病毒一样危险。血清学研究表明, 绝大多数儿童5~10岁时已被感染^[3]。由于首次感染时未能产生有效的免疫记忆, 或是感染的病毒基因型不同, 成年以后可再次感染, 目前临床仍无有效的治疗药物或疫苗。

本课题组前期研究发现, hMPV可以通过脂筏入胞, 脂筏是质膜上富含胆固醇、鞘磷脂以及特定蛋白质的微结构域, 而EGFR是定位在脂筏上的一种跨膜糖蛋白, 能够与特定的配体结合, 将生物信号从胞外传递到细胞内, 以往大量的研究主要集中在EGFR与癌症的相互关系上^[17-20], 但近年来, 越来越多的研究指出病毒可以利用EGFR信号来促进其入胞和复制, 或是劫持EGFR信号通路来抑制宿主抗病毒系统。比如, 在甲型流感病毒感染中, EGFR可以促进其进入宿主细胞, 在EGFR增加的情况下, 加快病毒内化速度^[21]; EGFR是传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)感染靶细胞的辅助因子, 而TGEV表面的S1蛋白与EGFR胞外受体结合域I相互作用^[16]。RSV激活EGFR后, 可以进一步抑制干扰素调节因子I依赖的干扰素- λ 和呼吸道上皮的抗病毒防御系统^[13,22]。于是, 我们提出EGFR可能也参与了hMPV感染。

本研究主要探索EGFR是否参与了hMPV入胞这一过程。选取了入胞5、10、15、30、60 min时检测细胞膜EGFR的磷酸化水平, 结果发现, EGFR在hMPV入胞5 min时就可观察到明显的磷酸化, 15 min时磷酸化水平最高, 这提示hMPV入胞过程可以激活EGFR信号。这一结果同猪流行性腹泻病毒的研究类似, 该病毒在入胞5~15 min时EGFR磷酸化水平较高^[23]。为了进一步研究EGFR在hMPV感染中的作用, 我们使用一种重要的调节细胞生长和存活的生长因子——表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF), 低剂量(10 ng/mL)短时间刺激可以诱导受体发生同源或异源二聚体化、自磷酸化以及下游信号通路的激活, 高剂量(100 ng/mL)长时间刺激可以引起受体的降解或内化。一方面, 我们使用10 ng/mL的EGF

刺激细胞, 结果显示, EGFR在5~15 min磷酸化最高。接下来, 在10 ng/mL的EGF刺激15 min的基础上感染hMPV 1 h, 结果显示, 10 ng/mL EGF+hMPV组的病毒滴度高于hMPV组, 说明EGFR激活可以促进hMPV入胞。另一方面, 使用100 ng/mL的EGF降解细胞表面的EGFR后再感染hMPV, 结果显示, 高剂量处理组病毒滴度低于单纯病毒组。为了进一步验证EGFR在hMPV入胞中的作用, 使用EGFR抑制剂抑制EGFR的活性后再感染hMPV, 病毒滴度低于未使用抑制剂病毒组, 说明EGFR丰度降低或者活化受到抑制, 可以抑制hMPV病毒感染。我们的结果同之前的关于甲型流感病毒、鼻病毒和猪流行性腹泻病毒的研究结果相类似, EGFR受到抑制后会导致病毒滴度降低^[23-24]。

综上所述, 本研究利用细胞模型首次对EGFR与hMPV感染进行了初步研究。hMPV入胞可以激活EGFR, 活化的EGFR可以促进病毒入胞, 而抑制EGFR可以降低病毒滴度。然而在hMPV感染中, EGFR是如何被激活的, 为什么在15 min左右时磷酸化水平较高, 这些问题值得被深入研究。

参考文献 (References)

- [1] LI G D, DE CLERCQ E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3): 149-50.
- [2] THOMPSON R. Pandemic potential of 2019-nCoV [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(3): 280.
- [3] VAN DEN HOOGEN B G, DE JONG J C, GROEN J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease [J]. *Nat Med*, 2001, 7(6): 719-24.
- [4] EDWARDS K M, ZHU Y, GRIFFIN M R, et al. Burden of human metapneumovirus infection in young children [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7): 633-43.
- [5] WILLIAMS J V, HARRIS P A, TOLLEFSON S J, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(5): 443-50.
- [6] LARCHER C, GELTNER C, FISCHER H, et al. Human metapneumovirus infection in lung transplant recipients: clinical presentation and epidemiology [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2005, 24(11): 1891-901.
- [7] FALSEY A R. Human metapneumovirus infection in adults [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2008, 27(10 Suppl): S80-3.
- [8] WILLIAMS J V, EDWARDS K M, WEINBERG G A, et al. Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(12): 1890-8.
- [9] YANG H, HE H, TAN B, et al. Human metapneumovirus uses

- endocytosis pathway for host cell entry [J]. *Mol Cell Probes*, 2016, 30(4): 231-7.
- [10] CHEN S, HE H, YANG H, et al. The role of lipid rafts in cell entry of human metapneumovirus [J]. *J Med Virol*, 2019, 91(6): 949-57.
- [11] LU Y C, CHEN H C. Involvement of lipid rafts in adhesion-induced activation of Met and EGFR [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 78.
- [12] WANG R, WANG X, WU J Q, et al. Efficient porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry in MARC-145 cells requires EGFR-PI3K-AKT-LIMK1-Cofilin signaling pathway [J]. *Virus Res*, 2016, 225: 23-32.
- [13] MONICK M M, CAMERON K, STABER J, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 2147-58.
- [14] KALINOWSKI A, UEKI I, MIN-OO G, et al. EGFR activation suppresses respiratory virus-induced IRF1-dependent CXCL10 production [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(2): L186-96.
- [15] LUPBERGER J, ZEISEL M B, XIAO F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy [J]. *Nat Med*, 2011, 17(5): 589-95.
- [16] HU W, ZHANG S, SHEN Y, et al. Epidermal growth factor receptor is a co-factor for transmissible gastroenteritis virus entry [J]. *Virology*, 2018, 521: 33-43.
- [17] CIARDIELLO F, TORTORA G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs [J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(10): 1348-54.
- [18] SPEAKE G, HOLLOWAY B, COSTELLO G. Recent developments related to the EGFR as a target for cancer chemotherapy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5(4): 343-9.
- [19] JEONG Y, BAE S Y, YOU D, et al. EGFR is a therapeutic target in hormone receptor-positive breast cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(5): 805-19.
- [20] 张梦然, 盛唯瑾, 弓建华, 等. EGFR在肿瘤靶向治疗中的研究进展 [J]. *中国医药生物技术* (ZHANG M R, SHENG W J, GONG J H, et al. Research progress of EGFR in tumor targeted therapy [J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*), 2019, 14(3): 266-8.
- [21] EIERHOFF T, HRINCIUS E R, RESCHER U, et al. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(9): e1001099.
- [22] KALINOWSKI A, GALEN B T, UEKI I F, et al. Respiratory syncytial virus activates epidermal growth factor receptor to suppress interferon regulatory factor 1-dependent interferon-lambda and antiviral defense in airway epithelium [J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(3): 958-67.
- [23] YANG L, XU J, GUO L, et al. Porcine epidemic diarrhea virus-induced epidermal growth factor receptor activation impairs the antiviral activity of type I interferon [J]. *J Virol*, 2018, doi: 10.1128/JVI.02095-17.
- [24] UEKI I F, MIN-OO G, KALINOWSKI A, et al. Respiratory virus-induced EGFR activation suppresses IRF1-dependent interferon lambda and antiviral defense in airway epithelium [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(10): 1929-36.