

mRNA应激颗粒的形成对新孢子虫活力影响的研究

傅勇 苏宁 刘群 刘晶*

(中国农业大学动物医学院, 国家动物寄生原虫实验室, 农业部动物流行病学重点实验室, 北京 100193)

摘要 新孢子虫是一种专性细胞内寄生原虫。速殖子从细胞内释放到再次入侵新的细胞会受到细胞内外离子环境改变的刺激, 出现一系列应激反应。目前, 新孢子虫的应激反应机制尚不清楚。该研究用高浓度的钠离子或钾离子分别作用于纳虫空泡内和新鲜释放的新孢子虫速殖子, 使其处于应激状态, 通过RNA fish检测虫体应激颗粒的形成情况。研究发现, 新孢子虫在高钾离子缓冲液的刺激下会形成大量的mRNA颗粒。随后, 通过噬斑实验、入侵实验以及增殖实验证明, 应激颗粒的形成提高了新孢子虫的入侵能力以及胞内增殖能力。结果表明, 新孢子虫mRNA应激颗粒的形成提高了新孢子虫适应应激环境的能力, 有助于其入侵新的细胞并进行增殖, 更有利于新孢子虫的生存。

关键词 新孢子虫; 应激反应; mRNA颗粒; 分裂周期

Roles of the Formation of mRNA Stress Granules in the Viability of Extracellular *Neospora caninum*

Fu Yong, Su Ning, Liu Qun, Liu Jing*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, National Animal Protozoa Laboratory, Key Laboratory of Animal Epidemiology of the Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract *Neospora caninum* is an obligate intracellular apicomplexan parasite. When searching for a new cell to invade after egress, the parasites are directly exposed to the stress of extracellular environment. So far, the mechanism of stress response outside the host cells of this parasite is still to be revealed. In this study, we used two different buffers that mimics the extracellular and intracellular environment respectively, to stimulate the newly egressed tachyzoites. Using RNA fish, we found that extracellular tachyzoites stimulated by intracellular buffer formed stronger mRNA granules. Lytic cycle assays were performed to evaluate the role of granules formation in maintaining the viability of extracellular *N. caninum*. The results demonstrated that mRNA granules formation led to a growth advantage, increased invasion and proliferation ability. Overall, mRNA granules formation improved the fitness of extracellular tachyzoites under stress conditions, contributed to the proliferation of newly-invaded tachyzoites, and enhanced the survival of *N. caninum*.

Keywords *Neospora caninum*; stress response; mRNA granules; lytic cycle

新孢子虫(*Neospora caninum*)是一种能感染多种动物的细胞内寄生原虫, 在世界范围内广泛流行, 主要引起犬神经肌肉疾病以及牛的繁殖障碍等^[1]。

新孢子虫主要包括卵囊、速殖子以及缓殖子(包囊)三种形态。其中, 速殖子能引起新孢子虫病急性期感染。在急性感染阶段, 速殖子入侵宿主细胞, 形

收稿日期: 2017-02-21 接受日期: 2017-03-28

北京市自然科学基金(批准号: 6172023)、国家自然科学基金(批准号: 31302075)和中国农业大学教育基金会“大北农教育基金”资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62732622, E-mail: liujingvet@cau.edu.cn

Received: February 21, 2017 Accepted: March 28, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Beijing (Grant No.6172023), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31302075) and the Da Bei Nong Educational Foundation of China Agricultural University Education Foundation

*Corresponding author. Tel: +86-10-62732622, E-mail: liujingvet@cau.edu.cn

网络出版时间: 2017-05-18 16:54:28 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170518.1654.006.html>

成纳虫空泡并在其中大量增殖, 最终导致宿主细胞破裂, 胞内速殖子被释放到胞外。宿主细胞内外的离子环境差异很大, 因此, 速殖子从胞内到胞外再侵入新的细胞这一系列过程中实际上是处于一种应激环境。真核细胞处于胞外环境应激时, 会启动凋亡机制或者激活应激机制, 后者的特征之一是形成mRNA颗粒^[2]。在真核细胞中, mRNA颗粒主要分为应激颗粒和P小体, 应激颗粒含有Poly(A)结合蛋白, 能够结合mRNA Poly(A)尾巴, 而P小体则缺少这种结合蛋白^[3]。应激颗粒的形成主要参与mRNA的储存^[4-5]。在这种储存模型中, 胞质中旧的mRNA会被转运至应激颗粒中, 保证应激机制激活新产生的mRNA在胞质中正确翻译。这一机制有利于细胞迅速地应对外周环境变化并作出适当反应。

mRNA应激颗粒在顶复门原虫中比较保守, 弓形虫、疟原虫以及锥虫在胞外环境中都可以产生mRNA颗粒, 有助于提高胞外虫体的活力^[6-7]。本研究利用缓冲液模拟细胞内和细胞外的环境, 检测新孢子虫应激颗粒的形成情况, 比较不同离子环境下应激颗粒的形成对虫体生长、增殖以及入侵能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫株及细胞 实验所用的虫株及细胞有: 新孢子虫Nc1标准株、人包皮成纤维细胞(human foreskin fibroblasts, HFFs)以及非洲绿猴肾细胞(the kidney cells of the African green monkey, Vero cells)。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM购自迈晨科技(北京)有限公司; 血清购自北京四季青生物科技有限责任公司; PDTTC凋亡诱导剂、EGTA、Hepes、马来酸、酵母tRNA均购自Sigma公司; 蛋白酶K购自Fisher公司; RNAsin购自Promega公司; FITC-oligo-dT50购自Thermo Fisher公司; 其他试剂均为国产分析纯。

细胞培养瓶及培养板购自Corning公司; 倒置荧光显微镜购自Olympus公司, 型号为Olympus IX73; 激光共聚焦显微镜购自德国徕卡公司, 型号为Leica TCS SP5 II; 二氧化碳细胞培养箱购自Scientific Forma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞及虫体培养 HFF细胞以及Vero细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中。新孢子虫Nc1在细胞上传代, 培养于含1%新生牛血清、100 U/mL

青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的DMEM培养基中, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 RNA荧光原位杂交(RNA fluorescence *in situ* hybridization, RNA fish) 新孢子虫培养96 h, 用细胞刮刮取细胞, 再用0.3 mm注射器针头反复吹打破碎细胞后, 8 μm 滤膜过滤, 1 000 $\times\text{g}$ 离心5 min。将收集到的新孢子虫置于高钠离子缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养1 h, 使新孢子虫速殖子状态统一。然后, 分别将该虫体悬浮于高钾缓冲液和高钠缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养1 h。1 000 $\times\text{g}$ 离心5 min, 收集虫体, 以4%多聚甲醛将虫体固定于预处理无RNAase的飞片上, 2 \times SSPE缓冲液洗3遍。100 mmol/L HCl常温孵育7 min, 2 \times SSPE缓冲液洗3遍。加入经酵母tRNA预处理的FITC-oligo-dT₅₀杂交缓冲液(10 U/mL RNAsin、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶K、1 \times SSPE缓冲液), 50 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 2 \times SSPE缓冲液洗3遍。最后, 用马来酸缓冲液(100 mmol/L马来酸、150 mmol/L NaCl, pH7.5)洗10 min, DAPI染核, 封片。激光共聚焦显微镜观察结果。

高钾离子缓冲液(high K^+ buffer), 也是胞内缓冲液(intracellular buffer, IC buffer): 142 mmol/L KCl、5 mmol/L NaCl、2 mmol/L EGTA、5 mmol/L MgCl_2 、25 mmol/L Hepes-KOH、1 mg/mL BSA, pH7.2。高钠离子缓冲液(high Na^+ buffer), 也是胞外缓冲液(extra-cellular buffer, EC buffer): 120 mmol/L NaCl、1 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L MgCl_2 、25 mmol/L Hepes-NaOH、1 mg/mL BSA, pH7.2。

1.2.3 分裂周期噬斑实验 收集新鲜释放的新孢子虫裂殖子, 在高钠离子缓冲液中37 $^{\circ}\text{C}$ 培养1 h。分别将虫体在含有70 $\mu\text{mol/L}$ PDTTC(pyrrolidine dithiocarbama team monium)的高钾离子缓冲液或高钠离子缓冲液中培养1 h。将1 000个预处理过的速殖子接种于铺满HFF细胞的6孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养7 d, 4%多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 统计噬斑数量及面积, 实验独立重复3次。增殖实验: 收集新鲜释放的虫体, 在高钠离子缓冲液中37 $^{\circ}\text{C}$ 培养1 h, 然后分别将虫体在高钾离子缓冲液或高钠离子缓冲液中培养1 h。将 8×10^5 个处理的虫体接种于铺满HFF细胞的24孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养1 h, PBS洗3遍, 培养24 h后用甲醇固定。以兔抗新孢子虫Nc1为一抗、羊抗兔FITC为二抗进行间接免疫荧光检测(indirect immunofluorescence assay, IFA)。统计200个纳虫空泡中虫体的增殖情况, 实验独立重复3次。入侵实验:

收集新鲜释放的虫体,在高钠离子缓冲液中37 °C培养1 h,然后分别将虫体在高钾离子缓冲液或高钠离子缓冲液中培养1 h。将 5×10^5 个处理过的虫体接种于铺满HFF细胞的飞片中,37 °C培养,PBS洗3遍,继续培养24 h后用甲醇固定,以实验室制备的兔抗Nc1为一抗、羊抗兔FITC为二抗,进行IFA检测。统计200个宿主细胞中的纳虫空泡数目,实验独立重复3次。

1.2.4 数据统计 应用SPSS 11.5软件进行数据统计,*t*检验进行显著性差异分析,实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 胞外新孢子虫mRNA应激颗粒形成

为了研究虫体mRNA应激颗粒的形成情况,模拟胞内和胞外离子环境,应用高钾或高钠离子缓冲液刺激胞外新孢子虫。研究发现,利用FITC-oligoDT₅₀荧光探针进行RNA原位杂交,两种缓冲液刺激胞外新孢子虫均可形成mRNA应激颗粒,但是高钾离子缓冲液刺激的虫体中发现更多的mRNA颗粒聚集(图1),说明由胞外环境到胞内环境的离子环境变化会引起胞外新孢子虫的mRNA应激颗粒的大量产生。

2.2 mRNA应激颗粒的形成对胞外新孢子虫活力的影响

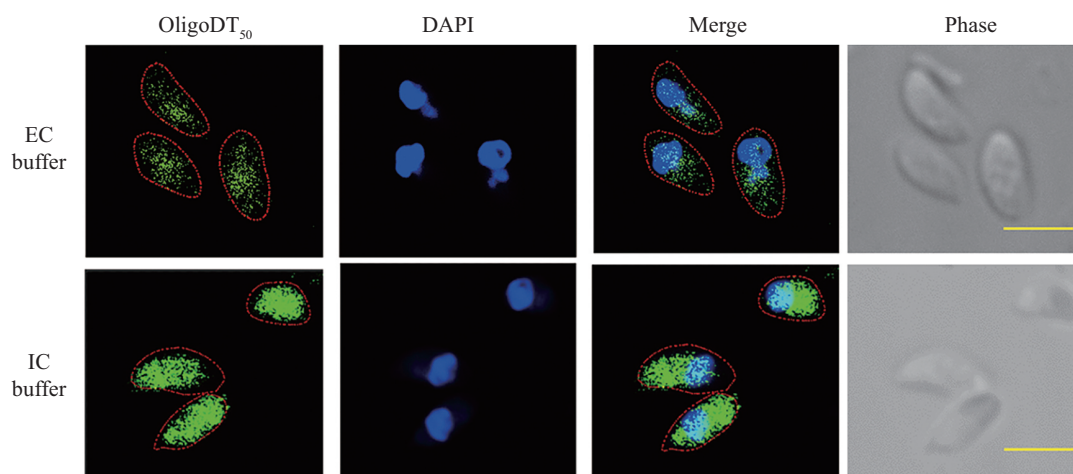
为了研究应激颗粒的形成对胞外虫体活力的

影响,我们进行了一系列分裂周期实验,包括噬斑实验、增殖实验以及入侵实验。结果发现,使用能够诱导凋亡的PDTC刺激胞外虫体后,再将虫体置于高钾或高钠离子缓冲液中孵育,经高钾离子缓冲液刺激的虫体比高钠离子缓冲液刺激的虫体,在HFF细胞上形成的噬斑面积更大(图2A和图2B)。经高钾离子缓冲液刺激的虫体形成了含有更多速殖子的纳虫空泡(图2C),表明mRNA应激颗粒的大量产生有助于胞外虫体在细胞内的增殖。入侵实验发现,高钾离子缓冲液刺激的虫体表现出更高的入侵效率(图2D)。这些结果说明,mRNA应激颗粒的形成增强了新孢子虫的胞外虫体的活力和适应性。

3 讨论

本研究证明,胞外新孢子虫可以形成mRNA应激颗粒,这些应激颗粒的产生增强了胞外新孢子虫的适应性以及整个虫体分裂周期(入侵、增殖以及生长)的效率。

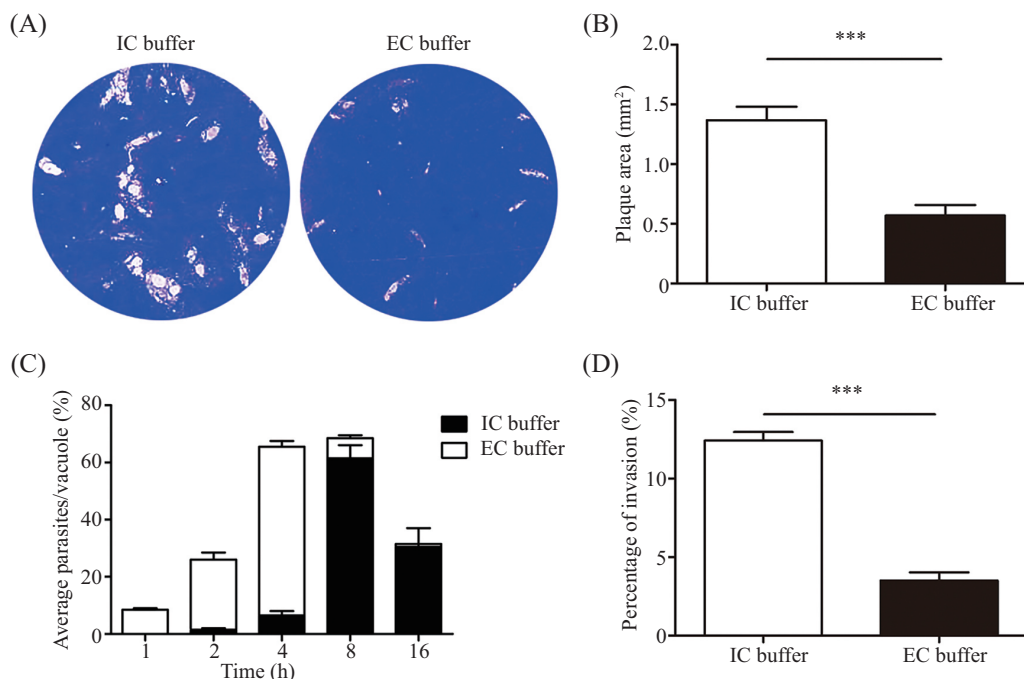
弓形虫胞外以及胞内蛋白质表达水平存在显著差异^[8],表明胞外虫体有着独特的细胞生物学特征。因此,我们推测,与弓形虫形态结构极为相似的另一项复门原虫——新孢子虫胞外与胞内阶段蛋白质谱也不同。当新孢子虫释放后,mRNA应激颗粒聚集了大量虫体胞内阶段mRNA,这些转录产物可能有利于胞外虫体的存活,但并不是必需的,通过



EC buffer: 高钠离子缓冲液,用于刺激胞外虫体形成mRNA颗粒; IC buffer: 高钾离子缓冲液,用于刺激胞外虫体形成mRNA颗粒; OligoDT₅₀: FITC标记的寡聚核酸探针; DAPI: 细胞核染料; Merge: mRNA颗粒与细胞核的图像叠加; Phase: 白光。红色边缘线为虫体轮廓; 标尺=5 μm。
EC buffer: high Na⁺ buffer; IC buffer: high K⁺ buffer; OligoDT₅₀: FITC labeled oligonucleotide probe; DAPI: the nucleus dye; Merge: overlay of the photos of both mRNA granules and nucleus; Phase: white light. Red edge line indicates the profile of extracellular parasites; scale bars=5 μm.

图1 胞外虫体mRNA颗粒形成

Fig.1 mRNA granules formation in extracellular tachyzoites



A: 噬斑实验, 分别用IC buffer和EC buffer刺激胞外虫体2 h后侵染HFF细胞, 培养10 d; B: 对噬斑实验的噬斑面积进行统计; C: 增殖实验, 将按照上述相同处理的胞外虫体侵染HFF细胞, 培养24 h, 对纳虫空泡的速殖子数量进行统计; D: 入侵实验, 按照上述相同方法处理胞外虫体后侵染HFF细胞, 培养24 h后统计染虫率(染虫率=纳虫空泡数/细胞核数 \times 100%)。*** $P<0.001$ 。

A: plaque assay, intracellular parasites were suspended in IC buffer and EC buffer respectively and subsequently allowed to infect the HFF cells for 10 days; B: analysis of the plaque areas; C: proliferation assay, the HFF cells were infected with extracellular tachyzoites prepared as the same method above, the average parasites per vacuoles were analyzed after 24 h incubation; D: invasion assay, extracellular tachyzoites were prepared as the same method and allowed to infect the HFF cells with 1×10^6 tachyzoites, the percentage of invasion was analyzed (percentage of invasion=vacuoles numbers/cell nucleus numbers \times 100%)。*** $P<0.001$ 。

图2 mRNA颗粒形成对胞外虫体活力的影响

Fig.2 The effect of mRNA granules for mation on the viability of extracellular tachyzoites

募集这些胞内阶段的转录产物, 保证胞外虫体新合成的mRNA不必和旧的胞内阶段的mRNA进行竞争, 从而使胞外虫体新合成的mRNA顺利翻译成蛋白质, 维持胞外虫体的活力。

当胞外虫体成功入侵新的宿主细胞后, mRNA应激颗粒溶解, 释放储存的胞内阶段的mRNA, 从而保证新孢子虫在细胞内快速地增殖。这也是形成更多mRNA应激颗粒的胞外虫体在胞内增殖更快的原因。胞外阶段产生的mRNAs会与胞内阶段产生的mRNAs竞争, 干扰胞外阶段mRNAs的翻译过程, 从而可能会造成胞外新孢子虫活力的下降。这种mRNAs应激颗粒储存模型表明, 新孢子虫在一定周期产生的mRNAs可能会用于新的分裂周期的建立, 这在柏氏疟原虫的研究中有相似的报告^[9]。

在一些高等真核细胞中, 应激条件会引起真核转录因子翻译起始因子2 α (translation initiation factor 2 α , IF2 α)的磷酸化, 继而引起应激颗粒的产生, 造成全面的翻译沉默。在弓形虫体内, 利用去磷酸

化抑制剂salubrinal抑制TgIF2 α 的去磷酸化^[10]。当对TgIF2 α 进行突变后, 使其不能正常磷酸化, 发现这会抑制弓形虫的胞外活力^[11], 间接支持了本研究mRNAs应激颗粒的产生引起新孢子虫胞外虫体的活力增强的结果。此外, 弓形虫与新孢子虫均可以在宿主细胞内形成纳虫空泡。弓形虫入侵细胞形成的纳虫空泡起到了类似分子筛的作用, 可以允许分子量小于1 300 kDa的小分子自由通过纳虫空泡, 表明纳虫空泡内的离子环境应该与细胞胞质离子环境极为类似。然而, 最近有研究表明, 弓形虫纳虫空泡膜上存在主动的离子泵, 当弓形虫入侵宿主细胞后, 宿主细胞胞质中的钾离子升高, 钠离子下降, 表明弓形虫的纳虫空泡内的离子环境与宿主细胞胞质中的离子环境可能存在差异, 进一步说明当弓形虫在入侵宿主细胞的过程中, 会受到宿主细胞高钾离子环境的自然刺激。由于高钾离子缓冲液的刺激会促进虫体蛋白质的合成^[12]。因此, 我们推测, 利用高钾离子缓冲液刺激胞外虫体, 可能会引起虫体入侵阶段

所需蛋白质的合成, 从而促进胞外虫体的入侵。

新孢子虫在应激条件下可以进行速殖子与缓殖子的转换, 从而进一步适应复杂的细胞环境^[13]。当新孢子虫速殖子释放进入胞外环境中, 处于胞外环境的刺激下时, 会诱导应激反应的产生, 从而保证维持胞外虫体的活力。本研究发现, 胞外新孢子虫速殖子可产生mRNA应激颗粒, 从而使胞外虫体的生长优势、入侵和增殖能力显著增加。因此, 我们推测, 新孢子虫体内存在一种在高等真核生物中保守的应激机制, 从而进一步保证胞外虫体的活力和环境适应性。

参考文献 (References)

- 1 Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol* 2013; 13: 133-50.
- 2 Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL. RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 2011; 23(2): 324-34.
- 3 Anderson P, Kedersha N. RNA granules: Post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(6): 430-6.
- 4 Balagopal V, Parker R. Polysomes, P bodies and stress granules: States and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(3): 403-8.
- 5 Cassola A, de Gaudenzi JG, Frasch AC. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol* 2007; 65(3): 655-70.
- 6 Lirussi D, Matrajt M. RNA granules present only in extracellular *Toxoplasma gondii* increase parasite viability. *Int J Biol Sci* 2011; 7(7): 960-7.
- 7 Kramer S, Queiroz R, Ellis L, Webb H, Hoheisel JD, Clayton C, *et al.* Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2 α phosphorylation at Thr169. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 18): 3002-14.
- 8 Lescault PJ, Thompson AB, Patil V, Lirussi D, Burton A, Margarit J, *et al.* Genomic data reveal *Toxoplasma gondii* differentiation mutants are also impaired with respect to switching into a novel-extracellular tachyzoite state. *PLoS One* 2010; 5(12): e14463.
- 9 Zhang M, Fennell C, Ranford-Cartwright L, Sakthivel R, Gueirard P, Meister S, *et al.* The *Plasmodium* eukaryotic initiation factor-2 α kinase IK2 controls the latency of sporozoites in the mosquito salivary glands. *J Exp Med* 2010; 207(7): 1465-74.
- 10 Narasimhan J, Joyce BR, Naguleswaran A, Smith AT, Livingston MR, Dixon SE, *et al.* Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 2008; 283(24): 16591-601.
- 11 Joyce BR, Queener SF, Wek RC, Sullivan WJ Jr. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α promotes the extracellular survival of obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(40): 17200-5.
- 12 Beckers CJ, Roos DS, Donald RG, Luft BJ, Schwab JC, Cao Y, *et al.* Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii*. Implications for the target of macrolide antibiotics. *J Clin Invest* 1995; 95(1): 367-76.
- 13 Eastick FA, Elsheikha HM. Stress-driven stage transformation of *Neospora caninum*. *Parasitol Res* 2010; 106(5): 1009-14.