

研究论文

Caveolin-1在EMCV感染宿主细胞中的作用

刘杨^{1,2} 赵克学^{1,2} 许淑娟^{1,2} 刘翊忠^{2*} 李琼毅^{1,2*}¹西北民族大学, 生物医学研究中心, 生物工程与技术国家民委重点实验室, 兰州 730030;²西北民族大学, 生命科学与工程学院, 兰州 730030)

摘要 脑心肌炎病毒(EMCV)是一种重要的人畜共患病病原,但其致病机制目前尚不明确,小窝蛋白-1(Caveolin-1)可介导多种病毒感染宿主细胞。为了探究Caveolin-1在EMCV感染宿主细胞中的作用,该实验检测了EMCV感染不同时间段HeLa细胞中Caveolin-1的表达量,对HeLa细胞和HEK-293细胞中Caveolin-1进行瞬时过表达实验、瞬时沉默实验和Caveolin-1依赖型内吞途径抑制实验,然后观察EMCV对HeLa细胞和HEK-293细胞的感染情况。结果发现,HeLa细胞中Caveolin-1表达量会随病毒感染时间的增加而升高;在Caveolin-1瞬时过表达实验结果中,病毒滴度、病毒拷贝数、病毒蛋白检测结果均显示,上调Caveolin-1促进EMCV感染宿主细胞, Caveolin-1瞬时沉默实验和Caveolin-1依赖型内吞途径抑制实验的结果则显示,下调Caveolin-1或抑制Caveolin-1依赖型内吞途径可抑制EMCV感染宿主细胞。上述现象提示,EMCV可通过Caveolin-1依赖型内吞途径感染宿主细胞。

关键词 小窝蛋白-1; 脑心肌炎病毒; 人宫颈癌细胞; 人胚肾细胞

Study on the Role of Caveolin-1 in EMCV Infected Host Cells

LIU Yang^{1,2}, ZHAO Kexue^{1,2}, XU Shujuan^{1,2}, LIU Yizhong^{2*}, LI Qiongyi^{1,2*}¹Key Bio-engineering and Technology Laboratory, Biomedical Research Center of the Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; ²Life Science and Engineering College of Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract EMCV (encephalomyocarditis virus) is an important zoonotic pathogen, but its pathogenesis is not clear yet. Caveolin-1 mediate various viruses to infect host cells. In order to explore the effect of Caveolin-1 in EMCV-infection *in vitro*, this study detected the expression of Caveolin-1 at different times of EMCV-infection. And conducted the test of transient overexpression, transient silencing and inhibiting Caveolin-1 endocytic pathway on HeLa cells and HEK-293 cells, then observed the effects of viral infection. The results showed that the expression of Caveolin-1 in HeLa cells increased during virus infection. In the results of Caveolin-1 transient overexpression test, virus titer, virus copies and virus protein detection results showed that EMCV infection was promoted, the results of Caveolin-1 transient silencing test and inhibition test showed that EMCV infection was inhibited. These findings suggest that the Caveolin-1 dependent endocytosis pathway promotes EMCV infected host cells.

收稿日期: 2019-07-22 接受日期: 2019-09-03

国家自然科学基金(批准号: 31702234、31460665)、中央专项研究生科研创新项目(批准号: Yxm2018146)和教育部“创新团队发展计划”(批准号: IRT_17R88)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13919872338, E-mail: lyz@xbmu.edu.cn; Tel: 13669301879, E-mail: lqy@xbmu.edu.cn

Received: July 22, 2019 Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31702234, 31460665), the Central Special Postgraduate Research and Innovation Project (Grant No.Yxm2018146) and the Ministry of Education “Innovation Team Development Plan” Project (Grant No.IRT_17R88)

*Corresponding authors. Tel: +86-13919872338, E-mail: lyz@xbmu.edu.cn; Tel: +86-13669301879, E-mail: lqy@xbmu.edu.cn

网络出版时间: 2020-01-06 17:05:57

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200106.1705.004.html>

Keywords Caveolin-1; EMCV (encephalomyocarditis virus); HeLa (human cervical carcinoma cell); HEK-293 (human embryonic kidney cells)

脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)是一种重要的人畜共患病病原^[1]。该病毒于1945年从美国佛罗里达州一只患急性致死性心肌炎的黑猩猩体内首次发现并分离得到, 1985年被确诊为猪的致死性病原之一^[2], 此后, 该病毒又在多个国家相继被发现; 我国于2005年首次从病死仔猪和流产胎儿中分离到了EMCV^[3]。脑心肌炎临床症状表现为脑炎、心肌炎或心肌周围炎^[4]。猪是EMCV的易感动物^[5], 感染后可造成猪的突然死亡和实质器官的病理性损伤, 母猪感染后还可造成繁殖障碍, 给世界养猪业带来重大的经济损失^[6-7]。该病目前尚无有效的治疗措施, 只能通过消灭传染源和切断传播途径方面着手, 如扑杀带毒老鼠和带毒猪等。该病毒可通过多种途径感染动物和人类, 但具体的感染机制目前尚未完全清楚, 有报道称, 包括EMCV在内的心肌病毒属病毒可能经由内吞途径感染宿主细胞^[8]; 而Caveolin-1介导的内吞途径正是受体介导的内吞途径之一, 也是目前内吞途径的热点研究方向之一^[9]。

Caveolin-1是由Clenney等于1989年首次报道的, 分子量为21~24 kDa, 为小窝蛋白家族的成员。Caveolin-1广泛分布于上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞中^[10]。该蛋白可参与多种细胞活动, 包括细胞周期调节、胆固醇转运排出和血管生成等^[11-14]。Caveolin-1的脚手架结构域(caveolin scaffolding domain, CSD)与一些细胞膜上的信号分子存在相互作用, 调控细胞的信号转导以及细胞的增殖、凋亡、转化和癌变等过程^[15]。近年来, 随着病毒感染宿主细胞机制研究的不断深入, 越来越多的研究提示, Caveolin-1与病毒感染细胞密切相关, 如猴空泡病毒40、人冠状病毒和口蹄疫病毒等都是通过Caveolin-1介导的内吞途径感染宿主细胞^[16-19]。Caveolin-1对少量病毒的感染过程又起到抑制作用, 如人类免疫缺陷病毒等^[20-22]。

为了探索Caveolin-1是否促进EMCV感染宿主细胞, 本实验选取Caveolin-1高表达的HeLa细胞和低表达的HEK-293细胞, 通过对细胞中Caveolin-1进行瞬时过表达和瞬时沉默实验之后观察病毒的复制增殖, 再用Caveolin-1依赖型内吞途径特异性抑制剂作用于细胞后探索Caveolin-1在EMCV感染宿主细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及毒株

人宫颈癌细胞(HeLa)、人胚肾细胞(HEK-293)、仓鼠肾细胞(BHK-21)、脑心肌炎病毒(EMCV)由甘肃省兰州市西北民族大学生物医学研究中心提供。

1.2 主要仪器与试剂

PCR仪购自Biometra公司; 凝胶成像系统购自GE Healthcare公司; 酶标仪购自Thermo Fisher公司; Proliferation细胞活力检测试剂盒购自Gromega公司; TRIzol[®]试剂盒购自Invitrogen公司、质粒小提试剂盒、高纯质粒小提试剂盒、TIANScript M-MLV、TaqDNA聚合酶均购自北京天根生化科技有限公司; pMD18-T、*Bam*HI和*Eco*R I限制性内切酶、T4 DNA连接酶均购自大连宝生物工程有限公司; PVDF膜购自伯乐生命医学产品公司; Lipofectamine[™] 2000试剂购自Invitrogen公司; ECL显色试剂盒购自PerkinElmer公司; 特异性抑制剂Nystatin购自Abcam公司; 鼠抗Caveolin-1抗体购自上海碧云天生物技术有限公司; 鼠抗 β -actin抗体购自Abcam公司; 山羊抗鼠IgG-HRP购自Jackson公司; 鼠抗VP1抗体由南京农业大学动物医学院白娟副教授惠赠; 胎牛血清、DMEM培养基购自兰州民海生物工程有限公司; DMSO购自北京索莱宝科技有限公司; 感受态细胞BL21、表达载体pcDNA3.1由西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室提供; 人源Caveolin-1小干扰RNA序列购自广州市锐博生物科技有限公司。EMCV攻毒实验均在西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室的二级生物安全防护实验室的生物安全柜中进行。

1.3 EMCV感染不同时间段Caveolin-1表达水平检测

将对数生长期的HeLa细胞接种于6孔细胞培养板, 待细胞融合度达80%~90%时, 进行EMCV接毒, 接毒量为0.1 MOI(接毒操作时病毒粒子与细胞的数量之比), 病毒体积=(细胞数 $\times$ 0.1)/(0.7 $\times$ TCID₅₀)^[23]。接毒1 h后弃去毒液, 换为含3% FBS的DMEM维持液, 于感染后0、3、6、9、12 h收集细胞, 用RIPA裂解, 产物经SDS-PAGE电泳, 每孔上样量为20 μ g, 转印至PVDF膜。0.25 g/L脱脂奶粉于室温封闭1 h, 加入鼠抗Caveolin-1的抗体(1:1 000稀释), 室温下孵育2 h, PBST洗5次,

每次5 min, 再加入HRP标记的山羊抗鼠二抗, 室温下孵育1 h, PBST洗膜5次, ECL显色。

1.4 Caveolin-1瞬时过表达后EMCV攻毒

1.4.1 Caveolin-1真核表达载体构建 按TRIzol®试剂盒说明书提取HeLa细胞的总RNA; 反转录获取cDNA用于PCR扩增*Caveolin-1*基因, 引物序列见表1, 琼脂糖凝胶电泳验证后回收。将回收产物与克隆载体pMD18-T连接并转化至大肠杆菌BL21感受态细胞, 随机挑取阳性菌落培养并提取克隆质粒, *Bam*H I和*Eco*R I双酶切后, 将目的片段和pcDNA3.1载体连接, 进行转化及培养, 提取重组表达质粒并进行双酶切验证, 阳性质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 重组质粒命名为pcDNA3.1-Cav1。

1.4.2 Caveolin-1瞬时过表达 将对数生长期的HeLa细胞接种于6孔细胞培养板, 待细胞融合度达80%~90%时, 参照Lipofectamine™ 2000试剂说明书, 将1、1.5、2 μg重组质粒pcDNA3.1-Cav1及空载质粒pcDNA3.1转染至6孔板的HeLa细胞中, 在37 °C恒温培养箱内培养4 h后更换为含10% FBS DMEM培养基继续培养。48 h后观察并收集细胞, 参照1.3所述方法进行Western blot分析, 确定蛋白表达及适合的质粒转染浓度。

1.4.3 Caveolin-1瞬时过表达后接毒 参照1.4.2的方法对HeLa细胞中的Caveolin-1瞬时过表达, 然后进行EMCV攻毒, 接毒量为0.1 MOI, 病毒体积=(细胞数×0.1)/(0.7×TCID₅₀)^[23]。接毒1 h后弃去毒液, 换为含3% FBS的DMEM维持液, 于感染后0、6、12、18 h、24 h收集上清病毒液, 将收集到的病毒接种BHK-21细胞并测定其滴度, 绘制

EMCV生长曲线; 收集24h的细胞检测EMCV结构蛋白VP1含量, 并对24 h收集的上清进行病毒滴度和病毒拷贝数检测, 病毒拷贝数检测方法参考本实验室建立的方法^[24]。

1.5 Caveolin-1瞬时沉默后EMCV攻毒

1.5.1 Caveolin-1瞬时沉默 将对数生长期的HeLa细胞接种于6孔细胞培养板, 待细胞融合度达30%~50%时, 将3组 siRNA和NC对照序列(表2)分别转染HeLa细胞, 转染方法参照Lipofectamine™ 2000试剂说明书, 转染终浓度为50 nmol/L, 转染48 h后观察并收集细胞, 进行Western blot分析, 确定Caveolin-1的干扰效果。

1.5.2 Caveolin-1瞬时沉默后接毒 参照1.5.1的方法对HeLa细胞中的Caveolin-1瞬时沉默, 然后进行EMCV攻毒, 收集0、6、12、18、24 h的上清病毒液检测病毒滴度, 绘制EMCV生长曲线; 收集24 h的细胞和上清检测EMCV结构蛋白VP1含量、病毒滴度和病毒拷贝数。

1.6 特异性抑制实验

1.6.1 特异性抑制剂浓度筛选 按照Caveolin-1依赖型内吞途径抑制剂Nystatin的说明书和已有文献, 用DMSO将Nystatin配置成含5% FBS的0、12.5、25、50、100 μg/mL的Nystatin工作液^[22]。实验前24 h时将数生长期的HeLa细胞接种于96孔细胞培养板中, 待细胞融合度达80%时分别加入含5% FBS DMEM培养基和Nystatin工作液, 37 °C恒温培养箱中孵育24 h。24 h后, 按照细胞活力检测试剂盒说明书进行细胞活力检测, 重复3次, 筛选不影响细胞活力的抑制剂浓度。

表1 Caveolin-1过表达引物序列
Table 1 Caveolin-1 overexpress primer sequences

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Name of primer	Primer sequences (5'→3')	Length of product /bp
Caveolin-1-F	CGG GAT CCA TGT CTG GGG GCA AAT ACG TGG ACT C	537
Caveolin-1-R	GGA ATT CTC ATA TCT CTT TCT GCG TGC TGA TGC	

表2 Caveolin-1小干扰RNA序列
Table 2 Sequence of Caveolin-1 siRNA

序列名称	小干扰RNA序列(5'→3')
Name of sequence	Sequence of siRNA (5'→3')
Homo-Cav1-siRNA1	CAG GGC AAC ATC TAC AAG C
Homo-Cav1-siRNA2	GCA AAT ACG TAG ACT CGG A
Homo-Cav1-siRNA3	GCA GTT GTA CCA TGC ATT A

1.6.2 特异性抑制剂作用后接毒 将对数生长期的HeLa细胞接种于6孔细胞培养板,待细胞融合度达80%~90%时,取适合的Nystatin浓度,参照1.6.1的方法作用于HeLa细胞1 h,1 h后进行EMCV攻毒,接毒量为0.1 MOI,接毒1 h后弃去毒液,换为含Nystatin的维持液,于感染后24 h收集细胞和上清,检测病毒蛋白VP1含量,病毒滴度和病毒拷贝数。

1.7 Caveolin-1在HEK-293细胞中作用的探究

选取Caveolin-1表达水平较低的HEK-293细胞,参照1.4、1.5、1.6中的实验方法,对细胞中Caveolin-1上调和下调后进行EMCV攻毒,收集上清检测病毒滴度和病毒拷贝数。然后筛选适合浓度的Nystatin作用于HEK-293细胞后进行EMCV攻毒,并收集上清检测病毒滴度和病毒拷贝数。

1.8 统计学分析

使用GraphPad Prism 5软件对实验数据进行单因素方差分析(ns表示 $P>0.05$,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$)。

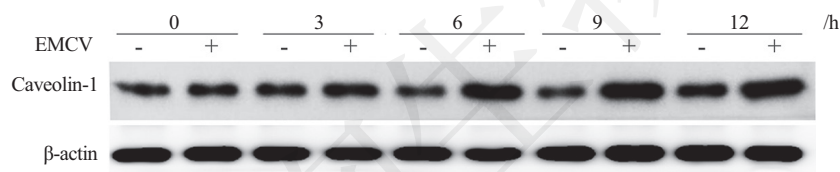
2 结果

2.1 EMCV感染不同时间段Caveolin-1表达水平检测结果

HeLa细胞接毒后0、3、6、9、12 h收集细胞进行Western blot检测,未接毒细胞作为对照。结果显示,同时时间段的接毒细胞比未接毒细胞中Caveolin-1含量高,而且随着感染时间的延长,Caveolin-1的表达量也随之升高,在感染EMCV后3 h至9 h时表达量急剧升高(图1)。这提示,Caveolin-1的表达量与EMCV的感染有关。

2.2 Caveolin-1过表达对EMCV感染的影响

2.2.1 Caveolin-1真核表达载体构建结果 PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,条带大小符合预期结果(图2A),这提示Caveolin-1扩增成功。将目的条带回收后经双酶切与pcDNA3.1载体连接,转化后进行双酶切验证和测序比对,最终成功构建出pcDNA3.1-Cav1重组质粒。双酶切检测图中有2条带,下方约500 bp大小的条带与目的条带大小相符,上方

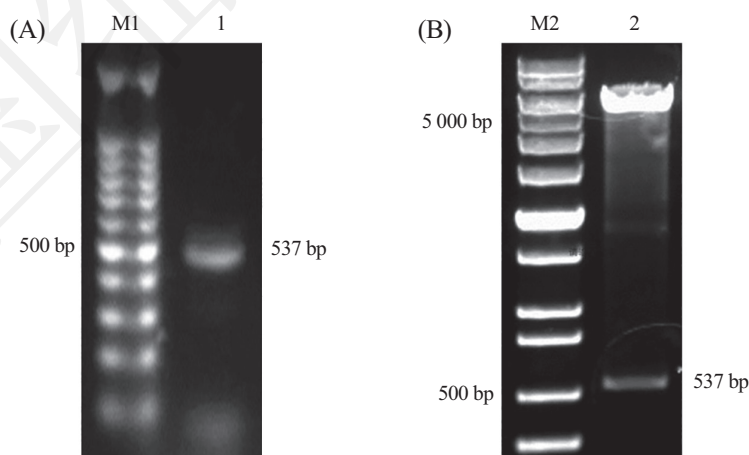


+: 感染EMCV的HeLa细胞; -: 未感染EMCV的HeLa细胞。

+: HeLa cells infected with EMCV; -: HeLa cells don't infected with EMCV.

图1 EMCV感染不同时间段Caveolin-1表达量检测

Fig.1 Expression of Caveolin-1 in different periods of EMCV infection



A: Caveolin-1 PCR扩增实验; B: pcDNA3.1-Cav1质粒双酶切检测; M1: DNA分子质量标准(100 bp); 1: Caveolin-1的PCR扩增产物; M2: DNA分子质量标准(1 Kb); 2: pcDNA3.1-Cav1质粒双酶切产物。

A: Caveolin-1 amplification product; B: double enzyme digestion of pcDNA3.1-Cav1 plasmid; M1: DNA molecular mass standard (100 bp); 1: amplification products of Caveolin-1; M2: DNA molecular quality standard (1 Kb); 2: detection of pcDNA3.1-Cav1 plasmid by double enzyme digestion.

图2 pcDNA3.1-Cav1质粒构建

Fig.2 Plasmid design of pcDNA3.1-Cav1

约5 000 bp的条带为经过双酶切的pcDNA3.1的条带(图2B), 经测序比对重组质粒pcDNA3.1-Cav1构建成功。

2.2.2 HeLa细胞中Caveolin-1过表达效果检测 将1、1.5、2 μg 重组质粒pcDNA3.1-Cav1和空载pcDNA3.1质粒分别转染到HeLa细胞中, 于转染后48 h收集细胞进行Western blot检测。与转染空载质粒的细胞中Caveolin-1相比, Caveolin-1表达量随着质粒浓度的增加而升高(图3), 提示Caveolin-1瞬时过表达成功, 确定重组质粒的适宜转染量为1.5 μg 和2 μg 。

2.2.3 Caveolin-1过表达后EMCV攻毒实验 将1.5 μg 、2 μg 重组质粒pcDNA3.1-Cav1和pcDNA3.1空载质粒分别转染到HeLa细胞中, 于转染后48 h接毒, 接毒24 h后收集细胞和上清进行病毒蛋白VP1、病毒滴度和病

毒拷贝数检测, 并对VP1蛋白检测结果进行灰度分析; 然后将2 μg 重组质粒和空载质粒分别转染至HeLa细胞中, 再进行接毒, 检测接毒后不同时间段的病毒滴度, 并绘制病毒生长曲线。结果显示, 2 μg 组的VP1蛋白含量、病毒滴度、病毒拷贝数与空载组相比明显增加(图4)。如病毒滴度检测结果中, 空载组的病毒滴度均值为5.625, 而2 μg 组则达到6.625, 差异显著。1.5 μg 组的检测结果与空载组相比只有病毒拷贝数增加显著(图4D, $P<0.05$), VP1蛋白含量和病毒滴度虽有增加, 但不显著(图4B和图4C, $P>0.05$)。总体来说, 3种检测方式结果虽然不完全一致, 但总体趋势一致, 都提示Caveolin-1上调可促进EMCV感染。而且, 从病毒生长曲线也可看出, 在EMCV复制增殖的过程中, Caveolin-1过表达组的病毒滴度高于对照组(图4E)。

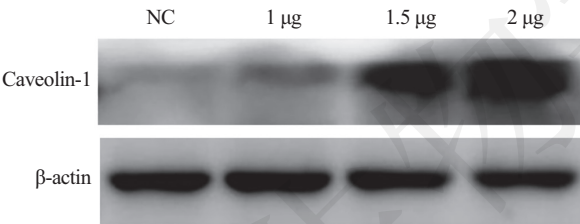
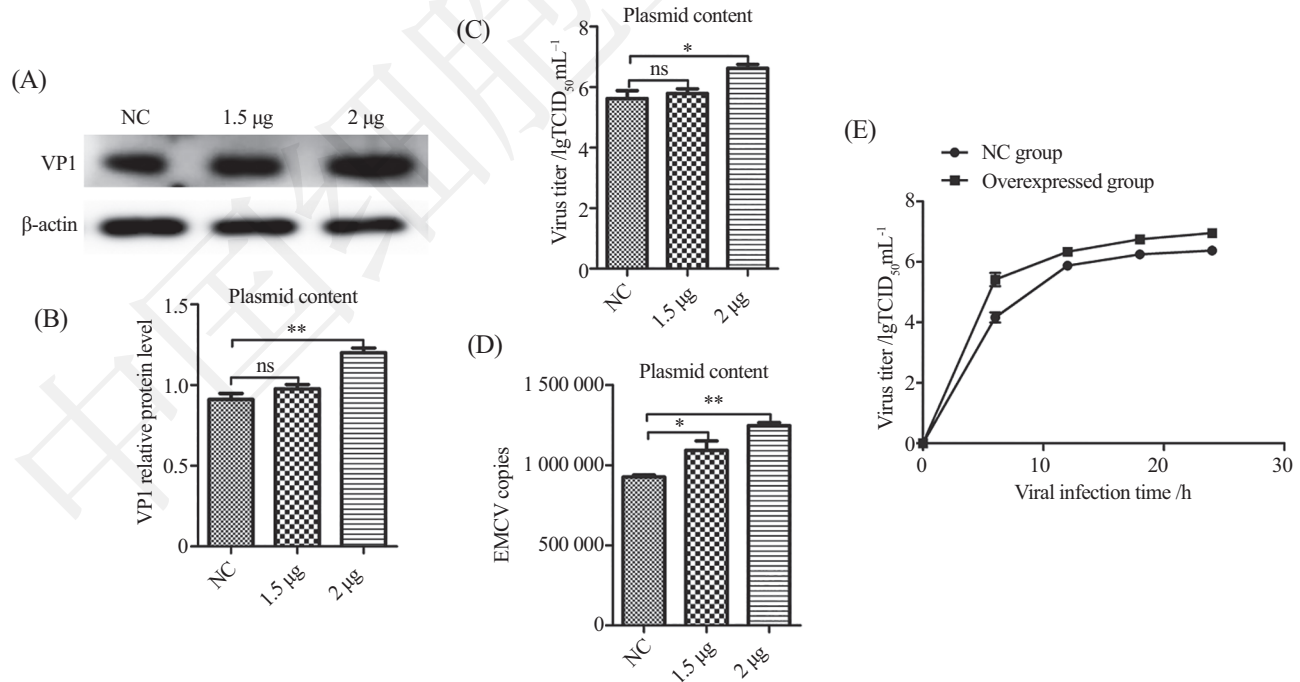


图3 Caveolin-1过表达检测

Fig.3 Detection of Caveolin-1 overexpression



A、B: VP1蛋白检测; C: 病毒滴度检测; D: 病毒拷贝数检测; E: 病毒生长曲线; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

A,B: VP1 protein detection; C: virus titer detection; D: virus copies test; E: virus growth curve; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

图4 Caveolin-1上调后接种EMCV

Fig.4 EMCV infection after Caveolin-1 overexpression

2.3 Caveolin-1瞬时沉默对EMCV感染的影响

2.3.1 HeLa细胞中Caveolin-1瞬时沉默结果检测 将转染NC、siRNA1、siRNA2、siRNA3的HeLa细胞收集并裂解, Western blot检测Caveolin-1的表达量。结果提示, 转染siRNA的HeLa细胞中Caveolin-1的蛋白表达量明显低于NC组, 提示Caveolin-1瞬时沉默成功, 尤其是siRNA3组瞬时沉默效果最好(图5)。

2.3.2 Caveolin-1瞬时沉默后EMCV攻毒实验 将siRNA1、siRNA2、siRNA3及NC分别转染到HeLa细胞中, 转染48 h后接毒, 24 h后收集细胞和上清分别进行病毒蛋白VP1、病毒滴度和病毒拷贝数检测, 再取下调效果较好的siRNA3组和NC对照组接毒后不同时间段的病毒滴度绘制生长曲线。病毒蛋白

VP1的检测结果显示, Caveolin-1干扰组与对照组相比显著下降(图6B, $P<0.05$), 病毒拷贝数结果显示, 干扰组与对照组相比下降极显著(图6D, $P<0.001$ 、 $P<0.01$), 病毒滴度的检测结果同样下降极显著(图6C, $P<0.001$), 如NC组的病毒滴度均值为5.04, 3个siRNA组的均值分别为3.46、3.33、3.83, 差异极显著。3种检测的结果趋势一致, 都提示Caveolin-1表达下调后可抑制EMCV感染。而且, 从病毒生长曲线也可看出, 在EMCV复制增殖的过程中, Caveolin-1下调组的病毒滴度低于对照组(图6E)。

2.4 Caveolin-1内吞途径特异性抑制剂对EMCV感染的影响

2.4.1 Nystatin适宜浓度筛选 将HeLa细胞在含有

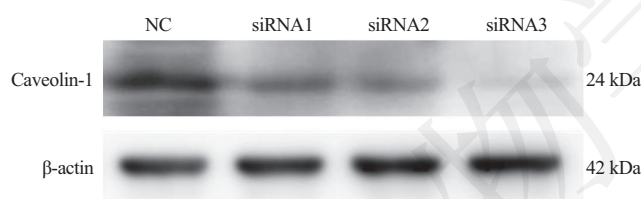
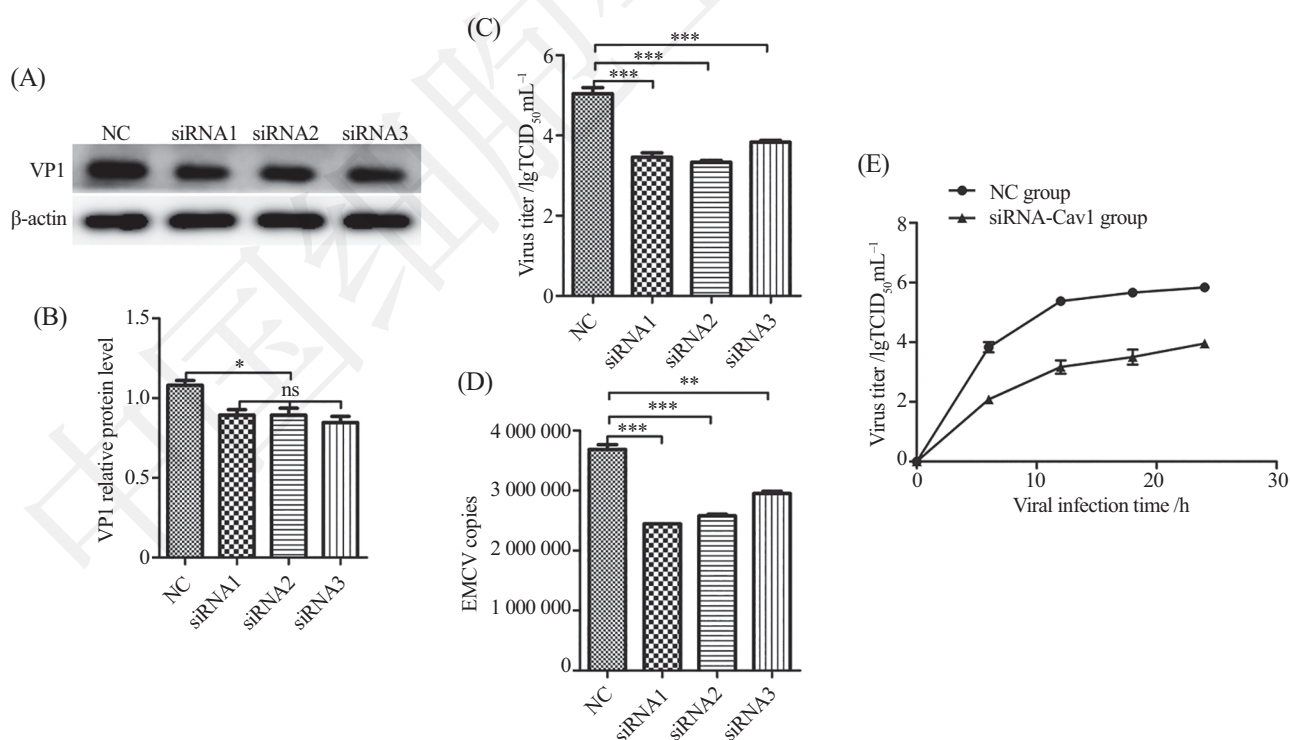


图5 Caveolin-1瞬时沉默检测
Fig.5 Results of Caveolin-1 Silencing



A、B: VP1蛋白检测; C: 病毒滴度检测; D: 病毒拷贝数检测; E: 病毒生长曲线; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

A, B: VP1 protein detection; C: virus titer detection; D: virus copies test; E: virus growth curve; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

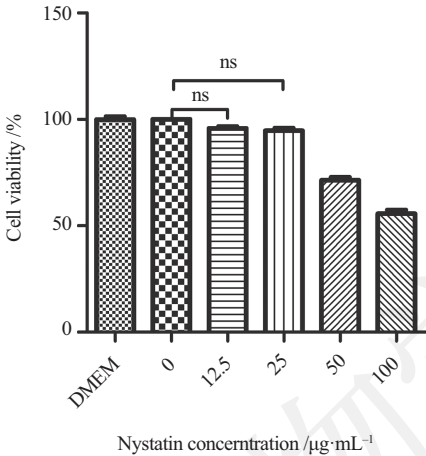
图6 Caveolin-1下调后接种EMCV

Fig.6 EMCV infection after Caveolin-1 Silencing

不同浓度特异性抑制剂Nystatin的培养基中培养24 h, 用Proliferation细胞活力检测试剂盒在490 nm处测定吸光度(*D*)值, 并计算细胞活力。DMEM处理的细胞和DMSO处理的细胞24 h后细胞活力相近; 随着Nystatin含量的增加, 细胞活力逐渐降低(图7), 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组和25 $\mu\text{g/mL}$ 组所对应的细胞活力与0 $\mu\text{g/mL}$ 组所对应的细

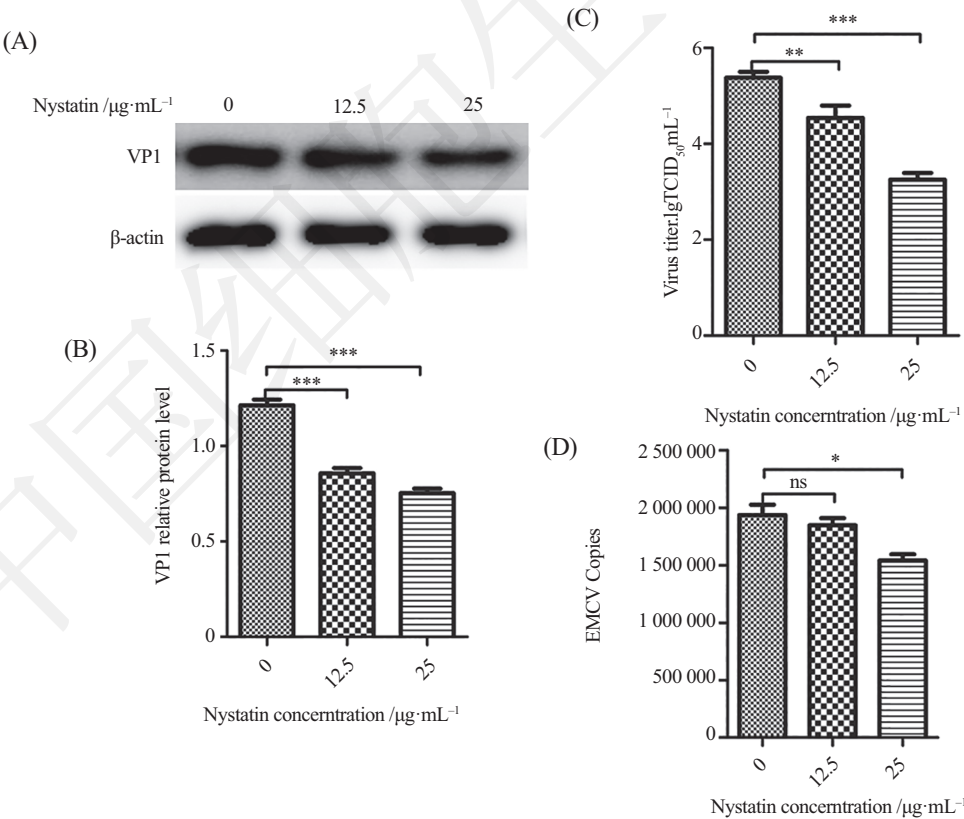
胞活力无显著性差异(图7, $P>0.05$); 故选择12.5 $\mu\text{g/mL}$ 和25 $\mu\text{g/mL}$ 两浓度继续后续实验。

2.4.2 Nystatin对EMCV感染的影响 将12.5 $\mu\text{g/mL}$ 和25 $\mu\text{g/mL}$ 的Nystatin处理过的HeLa细胞进行EMCV攻毒实验, 0 $\mu\text{g/mL}$ Nystatin组接毒作为对照。结果显示, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组VP1含量、病毒滴度和对照组相



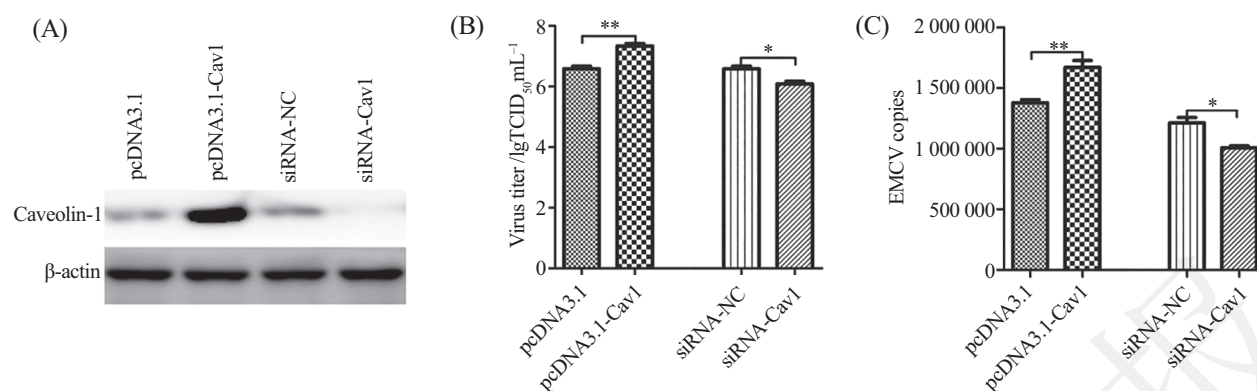
ns: $P>0.05$.

图7 细胞活力检测
Fig.7 Cell activity assay



A、B: VP1蛋白检测; C: 病毒滴度检测; D: 病毒拷贝数检测; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。
A,B: VP1 protein detection; C: virus titer detection; D: virus copies test; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

图8 Nystatin作用下接种EMCV
Fig.8 EMCV infect after dealt with Nystatin



A: Caveolin-1蛋白检测; B: 病毒滴度检测; C: 病毒拷贝数检测; * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

A: Caveolin-1 protein detection; B: virus titer detection; C: virus copies test; * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

图9 上调和下调后接种EMCV

Fig.9 EMCV infect after Caveolin-1 overexpressing and silencing

比下降极显著(图8B, $P<0.001$, 图8C, $P<0.01$), 如病毒滴度检测中, 0 $\mu\text{g/mL}$ 组的病毒滴度均值为5.375, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组为4.542, 差异极显著; 病毒拷贝数虽有下降, 但不显著(图8D, $P>0.05$)。25 $\mu\text{g/mL}$ 组VP1含量、病毒滴度和对照组相比下降极显著(图8B和图8C, $P<0.001$), 如病毒滴度检测中, 0 $\mu\text{g/mL}$ 组的病毒滴度均值为5.375, 25 $\mu\text{g/mL}$ 组为3.25, 差异极显著; 病毒拷贝数下降显著(图8D, $P<0.05$)。上述检测结果提示, Caveolin-1依赖型内吞途径抑制剂Nystatin可以抑制EMCV感染HeLa细胞。

2.5 Caveolin-1对EMCV感染HEK-293细胞的作用

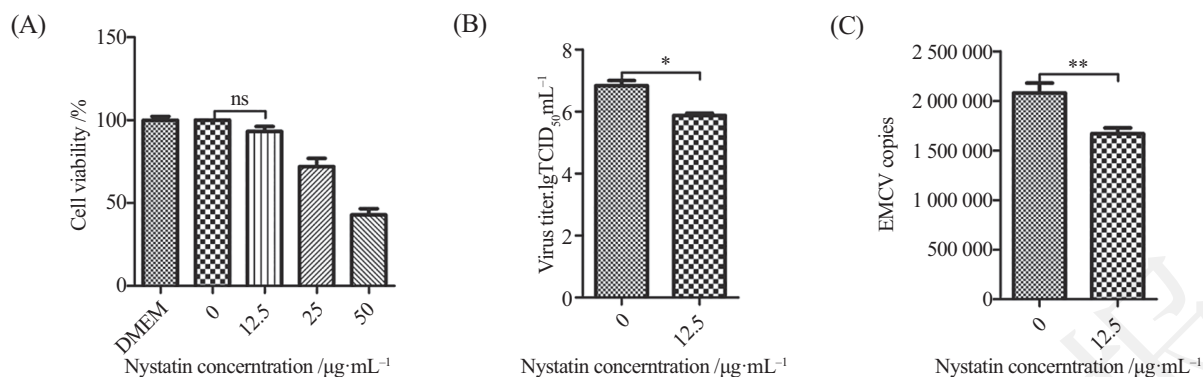
2.5.1 上调和下调Caveolin-1对EMCV感染HEK-293的影响 将2 μg pcDNA3.1-Cav1质粒转染至HEK-293细胞中, 转染2 μg pcDNA3.1的HEK-293细胞作为对照; 将siRNA-Cav1序列(siRNA3)转染至的HEK-293细胞中, 转染siRNA-NC序列的HEK-293细胞作为对照, 转染终浓度为50 nmol/L。转染48 h后接种EMCV, 接毒后24 h收集上清进行病毒滴度和病毒拷贝数检测。结果显示上调Caveolin-1的HEK-293细胞所对应的病毒滴度和病毒拷贝数与对照组相比差异极显著(图9, $P<0.01$), 如对照组的病毒滴度均值为6.58, 而pcDNA3.1-Cav1组为7.33, 差异极显著。下调Caveolin-1的HEK-293细胞的病毒滴度和病毒拷贝数与对照组相比差异显著(图9, $P<0.05$), 如siRNA-NC组的病毒滴度为6.58, 而siRNA-Cav1的病毒滴度为6.08。这提示在HEK-293细胞中, 上调Caveolin-1促进病毒感染HEK-293细胞, 下调Caveolin-1抑制病毒感染HEK-293细胞。

2.5.2 Nystatin对EMCV感染的影响 用不同浓度的Nystatin工作液作用于HEK-293细胞, 24 h后进行细胞活力检测, 筛选Nystatin的适宜浓度为12.5 $\mu\text{g/mL}$ (图10A), 然后用12.5 $\mu\text{g/mL}$ Nystatin作用于HEK-293细胞后接毒EMCV, 0 $\mu\text{g/mL}$ Nystatin作用于HEK-293细胞后接毒作为对照组, 24 h后收集上清检测病毒滴度和病毒拷贝数。0 $\mu\text{g/mL}$ 组所对应的病毒滴度均值为6.83, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组所对应的病毒滴度为5.875, 差异显著(图10B, $P<0.05$)。病毒拷贝数检测结果同样显示差异极显著(图10C, $P<0.05$)。这提示Caveolin-1依赖型内吞途径抑制剂Nystatin可抑制EMCV感染HEK-293细胞。

3 分析与讨论

EMCV是一种重要的人畜共患病病原, 其感染宿主细胞的机制目前尚不清楚。根据相关报道, EMCV可通过内吞途径感染宿主细胞^[8]。Caveolin-1介导的内吞途径是受体介导的内吞途径之一, 与多种病毒感染宿主细胞相关, 如猴空泡病毒40、人冠状病毒和口蹄疫病毒等^[13-16]。因此, 研究Caveolin-1在EMCV感染宿主细胞中的作用具有一定的科学价值及意义。

本实验首先探究EMCV的感染对HeLa细胞中Caveolin-1表达的影响, 检测结果发现, Caveolin-1表达量随着EMCV感染时间的增加而升高, 3~9 h表达量增长最快(图1), 提示Caveolin-1可能参与EMCV的复制增殖过程。病毒感染细胞所需时间一般少于3 h, 而Caveolin-1却在3~9 h内大量表达, 针对这一现象, 分析可能是由于0~3 h内病毒入侵细胞, 3 h时病毒才大量聚集



A: 细胞活力检测; B: 病毒滴度检测; C: 病毒拷贝数检测; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

A: cell activity test; B: virus titer detection; C: virus copies test; ns: $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

图10 Nystatin作用下接种EMCV

Fig.10 EMCV infect after dealt with Nystatin

于细胞中,此时开始刺激细胞大量表达 Caveolin-1,而0~3 h内虽有病毒入侵,但细胞中的病毒总量不大,所以0~3 h内Caveolin-1表达量虽有增加,但增加不明显,在3 h之后才开始大量表达^[25]。随后设计针对Caveolin-1的重组质粒pcDNA3.1-Cav1和siRNA,对Caveolin-1进行瞬时过表达和瞬时沉默后接种EMCV,并测定病毒蛋白VP1含量、病毒滴度和病毒拷贝数。实验结果显示,过表达Caveolin-1可促进EMCV感染HeLa细胞(图4);在瞬时沉默的实验结果中,下调Caveolin-1对于EMCV感染宿主细胞的抑制效果明显(图6);在病毒滴度和病毒拷贝数检测结果中发现一个现象,即小干扰siRNA3组的敲低效果明显强于siRNA1和siRNA2,但siRNA3组的病毒滴度和病毒拷贝数与前两组相比有所升高,甚至在病毒拷贝数检测中siRNA3和siRNA2两组之间病毒拷贝数差异显著(图6D, $P<0.05$),与预期结果相反,针对这一现象查阅相关资料,发现EMCV入侵宿主细胞的通路不止一条,促进EMCV感染的影响因子也很多,分析发生上述实验结果的原因可能是由于Caveolin-1在HeLa细胞中的表达量降低太多而激活HeLa细胞的某种“代偿”反应,增强了某一条甚至数条EMCV感染宿主细胞的通路,反而使得EMCV的复制增殖效果增强。上述实验结果提示,Caveolin-1参与EMCV感染宿主细胞的过程,具体表现为促进EMCV感染HeLa细胞。随后,用Caveolin-1依赖型内吞途径抑制剂Nystatin进行特异性抑制实验。Nystatin为多烯类抗真菌药,临床用药时口服较大剂量可发生腹泻、恶心、呕吐和上腹痛等消化道反应。所以接下来的实验中首先筛选出不影响HeLa细胞的细胞活性

的Nystatin浓度,然后用适宜浓度的Nystatin作用于HeLa细胞后接种。实验结果显示,EMCV对HeLa细胞的感染受到抑制(图8),提示Caveolin-1依赖型内吞途径抑制剂Nystatin可以抑制病毒感染HeLa细胞(图8)。这证明,EMCV可通过Caveolin-1依赖型内吞途径感染HeLa细胞。

最后,为了探究Caveolin-1依赖型内吞途径在EMCV感染宿主细胞中的普遍性,我们再选择Caveolin-1表达水平低的HEK-293细胞进行了Caveolin-1上调、下调以及Nystatin作用后EMCV攻毒实验,然后观察EMCV复制增殖的变化。HEK-293细胞的实验结果和HeLa细胞实验结果一致(图9和图10),都提示EMCV可通过Caveolin-1依赖型内吞途径感染宿主细胞。

本实验初步探索了Caveolin-1在EMCV感染宿主细胞中的作用,证明Caveolin-1依赖型内吞途径可促进EMCV感染宿主细胞。在此之前,Nystatin只是作为一种广谱抗真菌药而用于治疗人和动物的多种真菌感染;但在本实验的结果中,Nystatin对Caveolin-1介导的内吞途径表现出良好的抑制效果,这为临床上使用制霉菌素防治EMCV及其他经由Caveolin-1依赖型内吞途径感染宿主细胞的病毒提供一个可能。再者,随着EMCV感染宿主细胞机制的不断深入,有望从抑制Caveolin-1表达这方面入手,为预防和治疗人与动物的脑心肌炎提供更好的方案。

参考文献 (References)

- 1 陆承平. 兽医微生物学, 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2001, 559-64.
- 2 Brewer L, Brown C, Murtaugh MP. Transmission of porcine

- encephalomyocarditis virus (EMCV) to mice by transplanting EMCV-infected pig tissues. *Xenotransplantation* 2003; 10(6): 569-76.
- 3 Brewer L, Larue R, Hering B, Brown C, Njenga MK. Transplanting encephalomyocarditis virus-infected porcine islet cells reverses diabetes in recipient mice but also transmits the virus. *Xenotransplantation* 2004; 11(2): 160-70.
- 4 Straw BE, D Allaire S, William L. Diseases of swine. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 1999, 139-44.
- 5 Billinis C. Encephalomyocarditis virus infection in wildlife species in Greece. *J Wild Dis* 2009; 45(2): 522-6.
- 6 Hunter P, Swanepoel SP, Esterhuysen JJ, Raath JP, Bengis RG. The efficacy of an experimental oil-adjuvanted encephalomyocarditis vaccine in elephants, mice and pigs. *Vaccine* 1998; 16(1): 55-61.
- 7 Zimmermann A, Nelsen-Salz B, Kruppenbacher JP, Eggers HJ. The complete nucleotide sequence and construction of an infectious cDNA clone of a highly virulent encephalomyocarditis virus. *Virology* 1994; 203(2): 366-72.
- 8 Dorobantu CM, Lucian A, Christian H, Feng Q, Kampen M, Stratting JR1, *et al.* Modulation of the host lipid landscape to promote RNA virus replication: the picornavirus encephalomyocarditis virus converges on the pathway used by hepatitis C virus. *PLoS Pathog* 2015; 11(9): 100.
- 9 钱莉玲. 小窝及小窝蛋白的研究进展. 国外医学(Qian Liling. Research progress of caveolea and caveolin. *Foreign Medical*) 2002; 24(2): 100-2.
- 10 Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, Virta H, Simons K, Ikonen E. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol* 1998; 140(4): 795-806.
- 11 Fernandez-Rojo MA, Ramm GA. Caveolin-1 function in liver physiology and disease. *Trends Mol Med* 2016; doi: 10.1016/j.molmed.2016.08.007.
- 12 Chen Z, Oliveira SD, Zimnicka AM, Jiang Y, Sharma T, Chen S, *et al.* Reciprocal regulation of eNOS and caveolin-1 functions in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2018; doi: 10.1091/mbc.E17-01-0049.
- 13 Ayalew M. The role of caveolin 1 in HIV infection and pathogenesis. *Viruses* 2017; 9(6): 129.
- 14 Yang W, Shuang F, Wei Z. Caveolin-1, MMP-2 in the invasion and metastasis of breast cancer. *J Biochem Mol Biol* 2010; 26(4): 311-4.
- 15 Baker N, Tuan RS. The less-often-traveled surface of stem cells: Caveolin-1 and caveolae in stem cells, tissue repair and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4(4): 90.
- 16 Atwood WJ, Norkin LC. Class I major histocompatibility proteins as cell surface receptors for simian virus 40. *J Virol* 1989; 63(10): 4474-7.
- 17 Atwood LW, Breau C, Norkin LC. Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J Virol* 1992; 66(4): 2037.
- 18 Owczarek K, Szczepanski A, Milewska A. Early events during human coronavirus OC43 entry to the cell. *Sci Rep* 2018; 8(8): 7124.
- 19 O'Donnell V, Larocco M, Baxt B. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol* 2008; 82(18): 9075-85.
- 20 Lin S, Nadeau PE, Wang X, Mergia A. Caveolin-1 reduces HIV-1 infectivity by restoration of HIV Nef mediated impairment of cholesterol efflux by apoA-I. *Retrovirology* 2012; 9(1): 85.
- 21 Lin S, Nadeau PE, Mergia A. HIV inhibits endothelial reverse cholesterol transport through impacting subcellular caveolin-1 trafficking. *Retrovirology* 2015; 12(1): 62.
- 22 Bo Y, Xuefeng Q, Hui G, Jia P, Chen S, Chen Z. Peste des petits ruminants virus enters caprine endometrial epithelial cells via the caveolae-mediated endocytosis pathway. *Front Microbiol* 2018; 9: 210.
- 23 Quinting B, Robert B, Letellier C, Boxus M, Kerkhofs P, Schynts F, *et al.* Development of a 1-step enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of bovine respiratory syncytial virus in postmortem specimens. *Vet Diagn Invest* 2007; 19(30): 238-43.
- 24 Zhang Haixia, Feng Ruofei, Wang Dan. Establishment and application of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of encephalomyocarditis virus. *Chinese J Microbiol Immunol* 2013; 9(33): 706-10.
- 25 Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell* 2018; 69(2): 169-81.