

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.07.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210225.1829.022.html\(2021-02-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210225.1829.022.html(2021-02-26))

基于 RLR 信号通路的去泛素化酶对 EV71 感染的调控机制研究

梁赣锋, 沈 扬, 俞逊婕, 吴海燕
(浙江省台州市第一人民医院感染科 318020)

[摘要] **目的** 探讨基于维甲酸诱导基因 I 样受体(RLR)信号通路的去泛素化酶对肠道病毒 71 型(EV71)感染的调控机制。**方法** 将人横纹肌肉瘤细胞 A-204 分为空白对照组、空载质粒组、去泛素化酶组,空白对照组不作任何处理,空载质粒组转染 10 nmol/L 空载质粒 48 h 后加入 EV71(MOI=0.5),去泛素化酶组转染 10 nmol/L 去泛素化酶 USP4 过表达质粒 48 h 后加入 EV71(MOI=0.5)。采用 RT-PCR 检测各组细胞中 EV71 mRNA 表达,Western blot 检测各组细胞 USP4、维甲酸诱导基因 I (RIG-I)、黑色素瘤分化相关基因 5(MDA5)、LGP2 蛋白表达。**结果** 空载质粒组细胞 USP4 蛋白表达明显低于空白对照组($P<0.05$),去泛素化酶组细胞 USP4 蛋白表达明显高于空载质粒组和空白对照组($P<0.05$)。空载质粒组和去泛素化酶组细胞 EV71 mRNA 表达明显高于空白对照组($P<0.05$),去泛素化酶组细胞 EV71 mRNA 表达明显低于空载质粒组($P<0.05$)。空载质粒组细胞 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达明显低于空白对照组($P<0.05$),去泛素化酶组细胞 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达明显高于空载质粒组和空白对照组($P<0.05$)。**结论** 去泛素化酶 USP4 可能通过激活 RLR 信号通路而发挥抗 EV71 感染作用。

[关键词] 泛素特异性蛋白酶 4;去泛素化酶;RLR 信号通路;肠道病毒 71 型;感染
[中图法分类号] R373.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)07-1100-04

Study on regulatory mechanism of deubiquitinase on EV71 infection based on RLR signaling pathway

LIANG Ganfeng, SHEN Yang, YU Sunjie, WU Haiyan
(Department of Infection, Taizhou Municipal First People's Hospital, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory mechanism of deubiquitinase enzyme on enterovirus 71 (EV71) infection based on retinoic-acid-inducible gene I-like receptor (RLR) signaling pathway. **Methods** Human rhabdomyosarcoma cells A-204 were divided into the blank control group, empty load plasmid group and deubiquitinating enzyme group. The blank control group had no treatment; the empty plasmid group was transfected with 10 nmol/L empty plasmid for 48 h before adding EV71 (MOI=0.5); the deubiquitinating enzyme group was transfected with 10 nmol/L deubiquitinating enzyme USP4 overexpression plasmid for 48 h before adding EV71 (MOI=0.5); real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of EV71 mRNA in A-204 cells. The expression levels of USP4, retinoic acid-inducible gene- I (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) and LGP2 protein in A-204 cells were detected by Western blot. **Results** The expression of cellular USP4 protein in the empty load plasmid group was significantly lower than that in the blank control group ($P<0.05$), the expression of cellular USP4 protein in the deubiquitinating enzyme group was significantly higher than that in the empty load plasmid group and blank control group ($P<0.05$). The expression of EV71 mRNA in the empty load plasmid group and deubiquitinating enzyme group was significantly higher than that in the blank control group, and the expression of EV71 mRNA in the deubiquitinating enzyme group was significantly lower than that in the empty load plasmid group ($P<0.05$); the expression levels of cellular RIG-I, MDA5 and LGP-2 in the empty

load plasmid group were significantly lower than those in the blank control group, and the levels of cellular RIG- I ,MDA5 and LGP-2 in the deubiquitinating enzyme group were significantly higher than those in the empty load plasmid group and blank control group ($P<0.05$). **Conclusion** Deubiquitinating enzyme USP4 plays the anti-EV71 infection role possibly by activating the RLR signaling pathway.

[Key words] ubiquitin-specific protease 4; deubiquitinase; RLR signaling pathway; enterovirus 71; infection

手足口病是一种由肠道病毒引起的常见传染性疾病,轻度患者临床症状以手、足、口腔等部位出现疱疹为主,重症患者可出现心肌炎、肺水肿、无菌性脑炎等并发症甚至出现死亡^[1]。重症病例多由肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)感染引起,病情凶险,病死率高^[2]。因此深入研究 EV71 感染发生的机制对提高临床疗效具有重要的临床指导意义。去泛素化酶是一类数量很大的蛋白酶类家族,可通过对底物蛋白的去泛素化来调控蛋白活性^[3]。维甲酸诱导基因 I 样受体(RIG- I -like receptor, RLR)为机体识别病毒的主要免疫识别受体,其介导的信号通路在抵抗病毒感染过程中发挥着重要作用^[4]。有研究显示^[5]去泛素化酶对 EV71 感染有一定调控作用,但其是否通过 RLR 信号通路发挥调控作用尚不清楚。本研究基于 RLR 信号通路研究去泛素化酶对 EV71 感染的调控机制,以期临床防治 EV71 感染提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人横纹肌肉瘤细胞 A-204 购于上海雅吉生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

10%胎牛血清(上海彩佑实业有限公司);DMEM 培养基(上海达豪生物科技有限公司);空载质粒(上海柯雷生物科技有限公司);去泛素化酶 USP4 过表达质粒(上海权阳生物公司);总 RNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);反转录试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);RIPA 裂解液(北京普利莱基因技术有限公司);Thermo MX150 离心机(苏州亚凡生物技术有限公司);BCA 试剂盒(美国 Thermo 公司);5%脱脂奶粉封闭液(北京百奥莱博科技有限公司);兔抗 USP4 单克隆抗体(上海恒科生物科技有限公司),兔抗维甲酸诱导基因-I (RIG- I)单克隆抗体(上海信裕生物科技有限公司),兔抗黑色素瘤分化相关基因 5(MDA5)单克隆抗体(上海科敏生物科技有限公司),兔抗 LGP-2 单克隆抗体(武汉维克赛思科技有限公司),兔抗 GAPDH 单克隆抗体(上海强耀生物科技有限公司),山羊抗小鼠 IgG(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);ECL 发光试剂盒(上海史瑞克

生物科技有限公司);培养箱(章丘舜泽生物工程有限公司,型号:Thermo BB150)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理

将细胞分为空白对照组、空载质粒组、去泛素化酶组,进行原代培养,取对数生长期细胞,接种于 6 孔细胞培养板(5×10^6 个/孔),采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养,待细胞融合度达 80%,空白对照组不作任何处理,空载质粒组转染 10 nmol/L 空载质粒 48 h 后加入 EV71 (MOI=0.5),去泛素化酶组转染 10 nmol/L 去泛素化酶 USP4 过表达质粒 48 h 后加入 EV71 (MOI=0.5),继续培养 24 h。

1.2.2 RT-PCR 检测各组细胞 EV71 mRNA 表达

采用总 RNA 提取试剂盒提取其总 RNA,反转录试剂盒将其逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系:上下游引物各 10 μmol/L 0.5 μL,SYBR Green Mix 10 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH₂O 8 μL,总体积 20 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 120 s;95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,40 次循环。EV71 上游引物 5'-GAGTG-GCAGATGTGATTGA-3',下游引物 5'-TCCAGT-GTCTAAGCGATGA-3'。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描分析,测定各扩增条带吸光度值,以目的基因扩增条带吸光度值与 GAPDH 扩增条带吸光度值之比计算 EV71 mRNA 相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测各组细胞 USP4、RIG- I 、MDA5、LGP-2 蛋白表达

将细胞加入 RIPA 裂解液匀浆裂解,13 000 r/min 离心 15 min,取上清液。BCA 试剂盒测定蛋白浓度并定量,取总蛋白上样,电泳,切胶,转膜,5%脱脂奶粉封闭液封闭,加入 1:400 稀释的兔抗 USP4 单克隆抗体、1:500 稀释的兔抗 RIG- I 单克隆抗体、1:500 稀释的兔抗 MDA5 单克隆抗体、1:500 稀释的兔抗 LGP-2 单克隆抗体、1:500 稀释的兔抗 GAPDH 单克隆抗体,4℃孵育过夜。TBST 洗膜。加入 1:2 000 稀释的山羊抗小鼠 IgG,37℃孵育 60 min, TBST 洗膜。ECL 发光试剂盒对 PVDF 膜进行曝光显影,成像扫描分析系统测定内参和目的条带的灰

度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞 USP4 蛋白表达

空载质粒组细胞 USP4 蛋白表达(0.59 ± 0.13)明显低于空白对照组(1.23 ± 0.25),差异有统计学意义($P < 0.05$);去泛素化酶组细胞 USP4 蛋白表达(2.95 ± 0.88)明显高于空载质粒组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

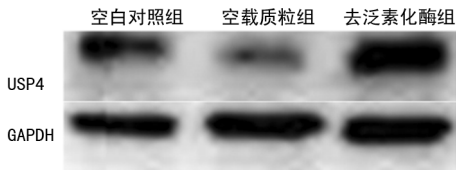


图 1 各组细胞 USP4 蛋白表达

2.2 各组细胞 EV71 mRNA 表达

空载质粒组和去泛素化酶组细胞 EV71 mRNA 表达(3.77 ± 1.96)、(1.85 ± 1.12)明显高于空白对照组(0.02 ± 0.01),差异有统计学意义($P < 0.05$);去泛素化酶组细胞 EV71 mRNA 表达明显低于空载质粒组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组细胞 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达

空载质粒组细胞 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达明显低于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);去泛素化酶组细胞 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达明显高于空载质粒组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 2。

表 1 各组细胞 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	RIG-I	MDA5	LGP-2
空白对照组	6	1.29 ± 0.31	1.23 ± 0.28	1.25 ± 0.26
空载质粒组	6	0.56 ± 0.10^a	0.48 ± 0.09^a	0.52 ± 0.12^a
去泛素化酶组	6	2.78 ± 0.45^{ab}	2.83 ± 0.52^{ab}	2.91 ± 0.49^{ab}

^a: $P < 0.05$,与空白对照组比较; ^b: $P < 0.05$,与空载质粒组比较。

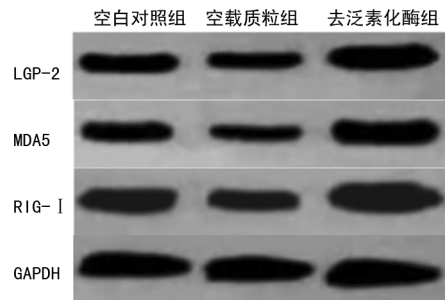


图 2 各组细胞 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达 Western blot

3 讨 论

EV71 是引起手足口病的主要病原体之一,自 1974 年首次报道患者体内分离 EV71 后,世界各地相继报道 EV71 感染,近些年我国 EV71 感染比例逐年上升^[6]。目前针对 EV71 感染临床无特效药物,只能对症治疗,尽管近年出现了手足口疫苗,但是引起手足口病毒种类繁多,且病毒变异速度迅速,大大降低了疫苗的预防作用^[7]。因此从 EV71 感染发生机制角度探寻有效治疗方案对提高临床疗效有重要意义。

泛素化是常见的蛋白质修饰方式之一,蛋白质泛素化修饰是可逆的过程,主要通过泛素(ubiquitin, UB)、泛素激活酶 E1(ubiquitin activating enzyme E1,UBE1)、泛素结合酶 E2(ubiquitin activating enzyme E2,UBE2)、泛素连接酶 E3(ubiquitin activating enzyme E3,UBE3)共同完成^[8]。抗病毒信号通路中的蛋白分子可受到泛素化修饰,如环指蛋白 135 催化 RIG-I 发生 K63 连接,从而活化 RIG-I^[9]。去泛素化酶是一类数量众多的蛋白水解酶家族,可通过催化去除底物蛋白质上的泛素从而逆转泛素化修饰过程^[10]。近年来不断有新的去泛素化酶被发现和报道,研究发现的去泛素化酶中以泛素特异性蛋白酶 USP 为主,其相对分子质量为 105 000~110 000^[11]。既往文献报道^[12]在猪水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)诱导的信号通路中,USP4 过表达能特异性去除 RIG-I 分子 K48 偶联的泛素链,抑制 VSV 复制增殖。本研究显示去泛素化酶组 A-204 细胞中 USP4 蛋白表达明显高于空载质粒组, EV71 mRNA 表达明显低于空载质粒组,提示去泛素化酶 USP4 具有抗 EV71 感染作用。RLR 是识别胞浆中病毒 RNA 的主要受体,其介导的信号通路在抵抗病毒感染过程中发挥着重要作用^[13]。目前发现的 RLR 家族成员包括 RIG-I、MDA5、LGP-2,其中 RIG-I、MDA5 均包含 C 端 1 个阻遏子结构域(repressor domain, RD),以及 N 端 1 个具有三磷酸腺苷(ATP)酶活性的 DExD/H-box 解旋酶结构域和 2 个半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate-specific proteinase, caspase)激活和募集结构域(caspase activation and recruitment domain, CARD),而 LGP-2 无 CARD^[14]。据报道^[15] RIG-I、MDA5 识别相应病毒 RNA 结构后,可发生二聚化,引起下游信号级联反应。本研究显示空载质粒组细胞中 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达明显低于空白对照组,提示 EV71 感染抑制了 RLR 信号通路。去泛素化酶组细胞中 RIG-I、MDA5、LGP-2 蛋白表达明显高于空载质粒组,提示去泛素化酶 USP4 可能通过激活 RLR 信号通路而发挥抗 EV71 感染作用,这可为寻找新的药物作用靶点

提供新思路。

综上所述,去泛素化酶 USP4 可能通过激活 RLR 信号通路而发挥抗 EV71 感染作用,这可为抗 EV71 药物开发和临床应用提供新的方向。但去泛素化酶 USP4 对 EV71 感染的调控作用是否还可通过其他机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 隋美丽,李懿,刘新奎,等.手足口病流行病学,病原学及重症化机制的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2017,4(1):98-104.

[2] 李晶,单若冰,刘瑞海,等.肠道病毒 71 型感染手足口病 S100B 基因多态性研究[J].中国当代儿科杂志,2017,10(8):118-120.

[3] 梁超超,程梦华,刘石娟.去泛素化酶活性的调控[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(1):38-44.

[4] 李圣纳,徐杉杉,何天生. ZWINT 在 RLR 抗病毒先天免疫信号通路中的作用[J].免疫学杂志,2018,20(12):1147-1151.

[5] 夏思墨,刘翔,杨正东,等.去泛素化酶在病毒感染中的调控作用[J].中国免疫学杂志,2019,16(6):749-752.

[6] 石瑛,任静静,王云凤,等.肠道病毒 71 型感染手足口病患儿免疫学相关指标变化与临床应用价值[J].中华实用儿科临床杂志,2017,32(22):1741-1743.

[7] 冉飞,郭青青,钟龙青,等.肠道病毒 71 型感染手足口病患儿白细胞介素-21 水平变化及其作用机制[J].中华传染病杂志,2018,36(3):176-178.

[8] FOOT N, HENSHALL T, KUMAR S. Ubiquitination and the regulation of membrane pro-

teins[J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(1):253-281.

[9] XIAN H, XIE W, YANG S, et al. Stratified ubiquitination of RIG- I creates robust immune response and induces selective gene expression[J]. *Sci Adv*, 2017, 3(9):e1701764.

[10] AN W, YAO S, SUN X, et al. Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 (GMEB1) interacts with the de-ubiquitinase USP40 to stabilize CFLARL and inhibit apoptosis in human non-small cell lung cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):181.

[11] CHINYENGETERE F, SEKULA D J, LU Y, et al. Mice null for the deubiquitinase USP18 spontaneously develop leiomyosarcomas [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1):886.

[12] PARK J K, DAS T, SONG E J, et al. Structural basis for recruiting and shuttling of the spliceosomal deubiquitinase USP4 by SART3[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(11):5424-5437.

[13] HAN J, SUN Y, SONG W, et al. Microrna-145 regulates the RLR signaling pathway in miiuy croaker after poly(I:C) stimulation via targeting MDA5[J]. *Dev Comp Immunol*, 2017, 68: 79-86.

[14] BRUNS A M, HORVATH C M. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling [J]. *Cytokine*, 2015, 74(2):198-206.

[15] ZHANG H L, YE H Q, LIU S Q, et al. West Nile virus NS1 antagonizes interferon beta production by targeting RIG- I and MDA5[J]. *J Virol*, 2017, 91(18):2396-2398.

(收稿日期:2020-09-18 修回日期:2020-12-30)