



刘悦,李青超,兰英,等.血凝素诱发内质网应激反应初探[J].黑龙江农业科学,2023(2):54-58.

血凝素诱发内质网应激反应初探

刘悦,李青超,兰英,赵秀梅,刘洋,王立达,韩业辉,徐妍

(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:为促进药物结构优化和改造,利用 293T 细胞进行转染及蛋白免疫印迹试验,研究病毒血凝素(HA)在内质网应激反应中的作用。结果表明,不同糖基化位点 HA 蛋白差异性表达明显,HA 蛋白可诱发内质网应激反应,且不同的 HA 蛋白样中 CHOP 的表达量不同,从而引起内质网应激反应所导致的细胞凋亡也不同。

关键词:流感病毒;HA 蛋白;内质网应激反应

近年来,禽流感病毒传播的趋势明显增强,使养禽业遭受巨大的经济损失。为了降低流感病毒对我们的伤害,很多学者都在研究血凝素(Hemagglutinin, HA)的结构、功能和表达,因为禽流感病毒的毒力和抗原性与其 HA 有着非常密切的关系。HA 在病毒表面,属于一种主要的刺突成分,HA1 和 HA2 连接成 HA 单体,它作为一种重要的结构蛋白,可以介导禽流感病毒吸附,同时发挥致病作用(靠穿入宿主细胞的方式),同时还可以帮助宿主来抵抗禽流感,以此认为 HA 也是一种良好的保护性抗原。流感病毒的毒力会受流感病毒 HA 上糖基化位点的增减影响^[1]。研究表明,HA 茎部的糖基化位点一般高

度保守,这些位点可能是功能性 HA 形成和保持所必需的;而头部的糖基化位点随毒株不同其结构和数量都发生变化,这可能是导致病毒多样性的重要因素之一^[2-3]。在病毒感染力和宿主细胞免疫反应中 N 连接的糖基化位点起着非常重要的作用,这一点已经被证实,尤其是蛋白酶对 HA 的裂解作用会受到 HA 裂解位点附件的糖基化位点的影响,这一现象会引起病毒毒力的变化^[4]。

细胞凋亡属于是一种生理性、主动的细胞死亡。目前,细胞凋亡的通路主要有:死亡受体活化(外源性途径)、线粒体损伤途径(内源性途径)和内质网应激启动的凋亡途径^[5]。内质网应激是一种亚细胞器病理的过程,该过程会在某种条件改变下,导致细胞内质网生理功能发生一系列的紊乱现象,如蛋白质不能正确折叠。同时,可以诱发内质网应激的因素还有很多,比如内质网内钙流失或钙超负荷,蛋白质糖基化形成障碍或蛋白质

收稿日期:2022-10-26

基金项目:中国科学院战略性先导科技专项(XDA28130504)。

第一作者:刘悦(1995—),女,硕士,研究实习生,从事微生物与病毒研究。E-mail:2563522180@qq.com。

Control Effects of Six Fungicides on Kiwifruit Brown Spot in Western Hunan

CUI Lihong, SONG Jinqiu, HUANG Wei

(XiangXi Vocational and Technical College for Nationalities, Jishou 416000, China)

Abstract: In order to screen out high-efficiency fungicides for the control of kiwifruit brown spot, the field control effects of six fungicides were comprehensively evaluated. The results showed that the treatment of 40% benzophenone prochloraz water emulsion had best control effects on kiwifruit brown spot disease. The relative control effect was 81.05% after three consecutive applications, and its disease index was only 13.24, which was significantly best than other agents. At the same time, the soluble solid content was 13.8%, which was 19.0% higher than the control; The equivalent yield was also the highest, which was 855.7 kg·(667 m²)⁻¹ respectively, 24.4% higher than the control. In conclusion 40% benzophenone prochloraz water emulsion can be used as an ideal fungicide to control kiwifruit brown spot in cultivation.

Keywords: fungicides; kiwifruit brown spot; control effect

不能形成正常的二硫键等,这些内质网某些生理功能发生障碍的情况,内质网发生应激反应一般都会通过未折叠蛋白来进行提示^[6]。内质网应激会诱导细胞凋亡,它会通过三个主要途径来进行,其中一个重要途径就是 CHOP 通路。CHOP/GADD153 是 C/EBP 转录因子家族成员中的一分子,在内质网应激中属于特异性的转录因子^[7]。CHOP 含有两个结构域,它们一个是 N 端转录激活域,一个是 C 端的碱性锌指(bZIP)结构域^[8]。PERK、ATF6 以及 IRE1 都能诱导 CHOP 的转录,其中 PERK-Eif2 α -ATF4 是 CHOP 蛋白表达主要途径^[9]。在正常情况下,CHOP 的分布范围并不是很广,主要集中存在于细胞质中,并且含量非常低。CHOP 的过量表达是促进细胞凋亡的一个重要因素,在细胞处于应激状态的时候,CHOP 的表达量会大大增加,并且在细胞核内聚集。CHOP 有几种凋亡反应蛋白,如 GADD34、ERO1 和死亡受体 DR5 等^[10]。本文是利用 293T 细胞,做蛋白免疫印迹(western blot)实验,来研究流感病毒血凝素在内质网应激反应中的作用,以期为进一步的药物结构优化和改造提供空间。

1 材料与仪器

1.1 细胞

293T 细胞由黑龙江省农业科学院实验室保存。

1.2 质粒

PCAGGS-7705HA-WT、PCAGGS-7705HA- ΔG_0 、PCAGGS-7705HA ΔG_1 、PCAGGS-7705HA ΔG_2 、GGs-7705HA-Flag-WT、GGs-7705HA-Flag- Δg_{ly0} 、 ΔG_1 、 ΔG_2 、 ΔG_3 、 ΔG_4 、 ΔG_6 、 ΔG_7 等^[11]。

1.3 试验试剂

转染试剂 PEI(Invitrogen 公司)、0.25%胰酶(Thermo 公司,美国)、DMEM 细胞培养液(购自 Hyclone)、PBS(武汉博士德生物有限公司)、H5N1 兔源多克隆抗体及羊抗兔 IgG-HRP(购自 Cell Signaling Technology)。

1.4 SDS-PAGE 缓冲液

5 \times Tris-甘氨酸电泳缓冲液:Tris 碱 7.55 g、甘氨酸(电泳级,pH8.3)47 g、10%SDS 聚丙烯酰胺(分离胶,20 mL):H₂O 7.9 mL、30% Acrylamide 6.7 mL、1.5 M Tris-HCl(pH8.8) 5.0 mL、10% SDS 0.2 mL、70% 过硫酸胺 0.2 mL、TEMED 0.008 mL。

5%SDS 聚丙烯酰胺(浓缩胶 8 mL):H₂O

5.5 mL、30% Acrylamide 1.3 mL、1.0 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl(pH6.8)、10%SDS 0.08 mL、70% 过硫酸胺 0.008 mL、TEMED 0.008 mL。

1.5 Western blot 缓冲液

10 \times trans Buffer 100 mL、甲醇 200 mL、加 dd H₂O 至总量为 1 000 mL。

TBS (pH8.0): 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl、150 mmol \cdot L⁻¹ NaCl。

TBST: 在 TBS 中加入终浓度为 0.05% Tween-20 即可。

脱脂乳:奶粉 5 g TBST 100 mL。

1.6 仪器设备

高速离心机(购自 Eppendorf 公司)、细胞恒温培养箱(上海三腾仪器有限公司)、Millipore 超纯水仪购自 MILLIPORE 公司、显影仪(购自上海天能公司)、摇床、湿转的转膜槽等。

2 方法

2.1 HA 蛋白量检测及对内质网的应激反应检测

2.1.1 细胞转染准备 在细胞培养箱内取出生长良好的 293T 细胞,加入 1 mL 预热 10 min 的 25%胰酶,轻轻移动,使胰酶可以充分消化到细胞,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱,消化 2 min,取出消化好的细胞,加入 10 mL 预热了的但没有加血清的细胞培养液 DMEM,用长管的吸液枪将细胞吹起来,按 5 $\times 10^5$ 个细胞 \cdot 孔⁻¹ 的密度接种到无菌 6 孔细胞培养板,等细胞长至 80%~90% 时进行转染。

2.1.2 质粒转染 稀释 PEI:取 800 μ L 无血清的 DMEM 在 1 mL EP 管中,再加入 50 μ L PEI。

稀释质粒:取 8 个 1 mL 的 EP 管,分别加入 100 μ L 无血清 DMEM,再在每个管中依次加入 2 μ g 目的质粒:PCAGGS-7705HA-WT、 ΔG_0 、 ΔG_1 、 ΔG_2 ,吹打混匀。在稀释好的质粒中分别加入之前稀释了的 PEI 100 μ L,混匀静置 15 min,取出培养箱内的 293T 细胞,将每种质粒缓缓地分别加入到两个孔中,混匀后放回细胞培养箱中。待细胞培养 4 h 后,进行换液处理,沿着 6 孔板每个孔壁的一侧,慢慢吸走悬液,避免细胞被吹起来,然后在每个孔里加入细胞营养液 DMEM,最后在每种质粒的其中一孔加入 20 μ L 的驱动蛋白(kif)。

2.1.3 提取蛋白 72 h 后,取出培养箱内的细胞,无菌下贴孔板的一侧用自动吸管将孔板中细胞悬液吸出。在室温下,每孔加入 1 mL PBS 混匀,放入新的 1.5 mL EP 管内,5 000 r \cdot min⁻¹,离心 5 min,弃上清,在每个管中加入 150 μ L 的细

胞裂解液(lysis Buffer),在漩涡振荡器上振荡,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5 min,吸上清置于 1.5 mL 的离心管中,加入 50 μL 的 $4\times$ 上样缓冲液,吹打混匀,放在水浴锅中煮沸 5 min,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱里保存。

2.1.4 凝胶的制备及电泳 具体步骤和方法参考文献[11]。

2.1.5 转膜(干转) 取下凝胶模子,将凝胶片取出用小绿铲子将凝胶孔切掉,把切好的胶及滤纸放入 trans Buffer 中,将 PVDF 膜先在纯甲醇中浸泡 3~5 s,放入 Buffer 中,然后按照 3 层滤纸/膜/胶/3 层滤纸装配,每一层都要用玻璃管赶走气泡,上下两层滤纸不要对齐,错开放置,以免造成电源短路,将多余的滤纸边缘剪掉,最后一次性盖好转膜仪的盖子,连上电源,调节电流 100 mA,转膜时间为 2 h。

2.1.6 封闭 把转完的膜放在加有 5% 脱脂乳封闭液的小盒中,在摇床上封闭 1 h。

2.1.7 孵育一抗+洗膜 将封闭好的膜放入保鲜膜中,加入 5 mL 脱脂乳,按 1:1 000 的比例加入抗体 Flag 5 μL ,把保鲜膜封口,摇床孵育 1 h,用 TBST 进行清洗,10 min 一次,共洗 5 次。

2.1.8 孵育二抗+洗膜 加入 5 mL 脱脂乳,按 1:5 000 比例加入 HRP-mouse 1 μL ,封上保鲜膜的口,孵育 1 h,然后按照上一步的清洗方法,进行洗抗体的操作,用 TBST 每间隔 10 min 换 1 次,共洗 5 次。

2.1.9 显影 将处理过的膜放在干净的保鲜膜上,加入显色底物 2 mL,静置 2 min 后,将其固定在暗匣内,在暗室内进行曝光处理。

2.1.10 HA 蛋白对内质网的应激反应 具体步骤参考文献[12]。

2.2 CHOP 含量的检测

2.2.1 细胞的转染 稀释 PEI:取 1 mL 无血清的 DMEM 在 1.5 μL EP 管中,再加入 60 μL PEI。

稀释质粒:实验步骤同 2.1.2。

2.2.2 SDS 聚丙烯凝胶电泳 具体步骤参考文献[12]。

2.2.3 转膜(湿转) 取下凝胶模子,把切好的胶

及滤纸放入 trans Buffer 中,将 PVDF 膜先在盛有纯甲醇中的塑料盒中进行预处理,浸泡 3~5 s。装配转移“三明治”:海绵/3 层滤纸/胶/膜/3 层滤纸/海绵,按照这样的顺序,把每层放好后,取一支小试管在每一层上来回碾压(轻轻地),避免产生气泡,然后把配好的胶放在电源的负极面,把安装好的转移槽放置在装满冰块的泡沫箱内,放入三明治(黑色面对黑色面),在其中灌满转移缓冲液,连通电源,调节电源在 60 V,过夜。

2.2.4 孵育一抗+洗膜 本试验要做内参, β -actin 蛋白的大小为 42 kDa。将膜用剪刀在恰当的位置剪成两个部分,上部分加 5 mL 脱脂乳,按 1:1 000 的比例加 β -actin,下部分加 5 mL 脱脂乳,按 1:500 比例加一抗 CHOP 10 μL ,两块膜分开放入两个保鲜膜中,封好口,孵育过夜。第二天取出封闭好的膜,重复上一个洗膜的操作过程,用 TBST 清洗,共洗 5 次。

2.2.5 孵育二抗+洗膜 在一抗为 β -actin 的膜上按 1:5 000 比例加二抗 HRP-mouse 1 μL ,在摇床上孵育 1 h。在第二张膜上加入二抗 α -rabbit 1 μL ,孵育 1 h,两者孵育完后,进行洗膜处理,用 TBST,10 min 一次,共洗 5 次。

2.2.6 显影 将两张膜按顺序,用双面胶贴在暗匣的中间位置,拿到暗室进行曝光。

3 结果与分析

3.1 不同糖基化位点 HA 蛋白表达

由图 1 可知,整体的 HA 表达量较多,同时表达的差异性也很明显。前 4 个泳道是没有加入 kif 抑制剂的野生型(WT)的 HA 蛋白和突变体 ΔG_0 、 ΔG_1 、 ΔG_2 的 HA 蛋白,后 4 个泳道是加有 kif 抑制剂的野生型 WT 和突变体 ΔG_0 、 ΔG_1 、 ΔG_2 的 HA 蛋白,两部分的蛋白表达含量差异很大。前 4 个电泳条带比较窄,表明 HA 的表达量比较少,而后 4 个电泳条带明显比较黑,比较粗,即表达量较前 4 个样品要多。组内进行比较,没有加入抑制剂的前 4 个样品中,尽管既存在野生型又有突变体,但是其表达含量并没有太大的差别,而加有 kif 的样本之间 HA 的表达量存在差异。

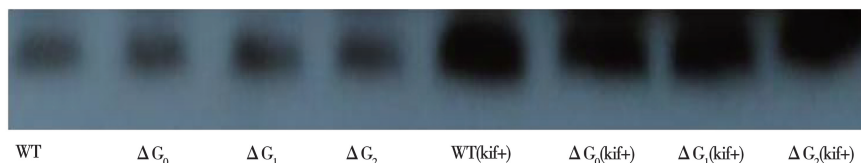


图 1 不同糖基化位点 HA 蛋白表达

3.2 HA 蛋白对内质网的应激反应

细胞处于内质网应激时,为维持稳定状态可通过 Xbp1 剪切错误蛋白,本研究通过酶标仪检测结果发现,过表达的 HA 蛋白的相对 Xbp1 剪切明显增强,是对照的 10 倍(图 2),表明 HA 蛋白可诱发内质网的应激反应。

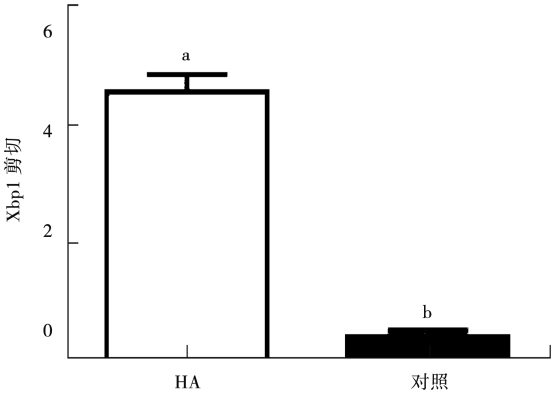


图 2 HA 蛋白对内质网的应激反应

3.3 HA 蛋白中 CHOP 的表达

由图 3 可知,各个样品的 CHOP 表达量不尽相同,其中 GGS-7705HA-Flag•WT、GGS-7705HA-Flag-Δgly₀ HA 蛋白的 CHOP 的表达量要明显高于其他样品。而样品 ΔG₁、ΔG₂、ΔG₃、ΔG₄ 的 CHOP 的表达量要少一些。ΔG₆、ΔG₇、空白质粒和普通的 293T 细胞这几个样品中 CHOP 的表达含量也高,但是较之前提到的 GGS-7705HA-Flag•WT、GGS-7705HA-Flag-Δgly₀ HA 蛋白的 CHOP 的表达量又要略低一些。说明不同的 HA 蛋白样品(包括野生型和各个糖基化位点突变的野生型)中 CHOP 的表达量是不同的,从而对细胞内质网应激的影响也不同。

3.4 β-actin 的检测

为了排除试验误差,选用 PCR 常用的内参蛋白 β-actin 对试验体系进行检测,由图 4 可知,各个样品间内参显色条带一致,含量平衡,排除了误差错误,保证了试验的准确性。

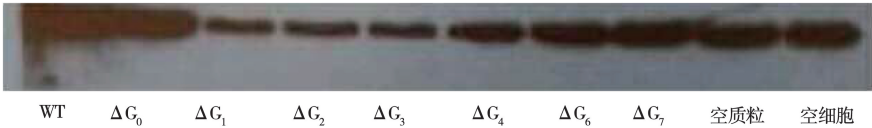


图 3 HA 蛋白中 CHOP 的表达

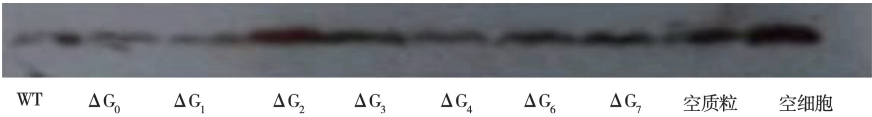


图 4 β-actin 的检测

4 讨论

流感病毒 HA 感染宿主细胞的方式主要是靠特异结合宿主细胞表面的糖链受体来实现。决定流感病毒宿主特异性的主要因素就是 HA 受体结合位点和细胞表面糖链受体的结构等。HA 的每个单体含有一个受体结合位点,导致整个病毒与宿主细胞受体结合能力显著改变的因素有很多,凡是影响到受体结合位点结构的因素(如糖基化的改变等)都有可能会导致结合能力发生变化^[13]。

相关研究表明流感病毒的毒力变化会受到流感病毒 HA 上糖基化位点的增减影响^[14]。而流感病毒蛋白上的糖基化位点数量和位置的改变主要受编码该蛋白的特异核苷酸序列的影响^[15]。决定病毒蛋白糖基化的因素有两个,一个是病毒

基因组,另一个就是宿主细胞,病毒蛋白糖基化会受宿主细胞选择压力的影响,在病毒的演化中扮演着重要角色^[16]。本研究结果发现不同糖基化位点 HA 蛋白差异性表达明显,后续试验将会进一步验证 HA 的糖基化与病毒致病性关系。

流感病毒中 CHOP 的表达量与内质网的应激作用有密切关联。本研究中 HA 蛋白可诱发内质网应激,且不同的 HA 蛋白样中 CHOP 的表达量不同。近几年发现,内质网应激反应参与多种疾病进程,尤其是神经退行性疾病,比如脑缺氧性疾病、阿尔茨海默症,癌症和糖尿病^[17],这使人们更深入地认识内质网应激以及相关疾病的分子机制,从而产生了一个新的构想,那就是以内质网应激反应为靶目标的治疗方案,这为新药物的开发提供了有利条件。

研究禽流感病毒血凝素内质网应激反应特性,使我们更深入地了解了流感病毒糖蛋白的结构和病毒中糖蛋白糖链在病毒生活周期的重要作用,以及 HA 在病毒演化中扮演的重要角色。而这些发现将会帮助我们设计和生产新型流感病毒疫苗和药物,从而更准确地进行流感病毒的治疗和防控,并在一定程度上降低流感带给畜牧业的威胁和伤害^[18]。

5 结论

本研究利用 293T 细胞进行转染及蛋白免疫印迹实验。结果表明,不同糖基化位点 HA 蛋白差异性表达明显,HA 蛋白可诱发内质网应激,且不同的 HA 蛋白样中 CHOP 的表达量不同,从而引起内质网应激反应所导致的细胞凋亡也不同,为进一步对药物结构优化和改造奠定了基础。

参考文献:

- [1] 石建州,李青梅,刘肖,等.一株 H1N1 亚型猪流感病毒血凝素 HA 蛋白中和性单克隆抗体的制备及抗原表位鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2020,42(3):300-304.
- [2] 王天杰,王槿年,江定丰,等.禽流感病毒血凝素蛋白的结构、功能与表达[J]. 现代生物医学进展,2006,15(4):51-53.
- [3] WAGNER R, WOLFF T, HERWIG A, et al. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics[J]. Journal of Virology, 2000, 74(14): 6316-6323.
- [4] 叶贺佳,梁昭平,彭特,等. 2012—2015 年 H9N2 亚型 AIV 分离株 HA 基因的克隆及序列号分析[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(5): 1148-1155.
- [5] 刘宝琴,王华芹. 内质网应激与未折叠蛋白反应的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 6(7): 869-872.
- [6] 刘春雷,何昆仑,王莉莉. 基于内质网应激途径的细胞保护策略的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 27(4): 455-458.
- [7] 滕旭,齐永芬. 内质网应激与心脏疾病[J]. 生理科学进展, 2009, 40(2): 1013-1030.
- [8] 关丽英,许彰民,潘华珍. 内质网应激介导的细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(11): 1136-1141.
- [9] 夏元平,王立花,樊燕蓉. 细胞凋亡与内质网应激机制[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(3): 291-298.
- [10] 李载权,周爱儒,唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3): 283-288.
- [11] 王斌. 细胞溶酶体降解 A 型流感病毒 HA 蛋白的机制研究[J]. 中国预防兽医学报, 2019(10): 993-998.
- [12] 郭晓琴,张谓霄,马诚太,等. H7N9 亚型禽流感病毒血凝素蛋白在杆状病毒中的表达及其免疫效力评估[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(1): 143-150.
- [13] 张晓剑,李彦芳,熊丽平,等. H5N1 亚型禽流感病毒 HA 糖基化位点缺失突变株的构建及生物学特性[J]. 病毒学报, 2015, 29(5): 495-497.
- [14] 孙士生,王秦哲,李铮. 流感病毒糖蛋白糖链的作用和功能研究[J]. 中国科学, 2014, 41(3): 424-432.
- [15] 钟耀刚,孙士生,陈闻天,等. 流感病毒识别糖链受体分子机制的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(7): 605-612.
- [16] 黄蓉,梁威,刘纪国,等. H9N2 亚型禽流感病毒血凝素蛋白分子特征分析及其对小鼠致病力的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(3): 443-450.
- [17] 冯利杰,王海平,沈玉先. 内质网应激与神经元退行性变[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(4): 428-32.
- [18] 李一鸣,臧宇,郭云山,等. CHOP/GADD153 在内质网应激介导细胞凋亡中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(11): 2178-2182.

Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Hemagglutinin

LIU Yue, LI Qingchao, LAN Ying, ZHAO Xiumei, LIU Yang, WANG Lida, HAN Yehui, XU Yan

(Qiqihar Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: In order to promote the optimization and transformation of drug structure, 293T cells were used for transfection and Western blot to study the role of viral hemagglutinin(HA) in endoplasmic reticulum(ER) stress response. The results showed that there were significant differences in the expression of HA proteins at different glycosylation sites. HA protein could induce ER stress response, and the expression of CHOP in different HA protein samples was different, which led to different apoptosis caused by ER stress response.

Keywords: the influenza virus; the HA protein; endoplasmic reticulum stress