

# 热休克蛋白 27 增强 A 型流感病毒 NS1 对 $\beta$ 干扰素的抑制作用

李铮<sup>1,2</sup>, 刘晓玲<sup>1</sup>, 赵振东<sup>1,2</sup>, 刘文军<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

李铮, 刘晓玲, 赵振东, 等. 热休克蛋白 27 增强 A 型流感病毒 NS1 对  $\beta$  干扰素的抑制作用. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1205–1215.

Li Z, Liu XL, Zhao ZD, et al. Heat shock protein 27 enhances the inhibitory effect of influenza A virus NS1 on the expression of interferon- $\beta$ . Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1205–1215.

**摘 要:** 热休克蛋白 27 (Heat shock protein 27, HSP27) 是一种具有多重功能的小热休克蛋白, 它在一些病毒的生命周期中也发挥着重要作用。为研究 HSP27 对流感病毒感染的调节作用, 首先在原核及真核细胞中克隆并表达了人源的 HSP27 蛋白, 并验证了 HSP27 和 A 型流感病毒 NS1 蛋白能够相互结合。通过荧光素酶检测试验发现, HSP27 可以抑制病毒感染细胞中  $\beta$  干扰素 (IFN- $\beta$ ) 的表达, 但不依赖于其自身的磷酸化状态, 而且 HSP27 与 NS1 共同对于 IFN- $\beta$  的表达具有叠加抑制效果。进一步的结果表明 HSP27 可能通过 RIG-I 样 RNA 解旋酶 (RLH) 途径中 MDA5 因子抑制 IFN- $\beta$  的表达。研究表明, HSP27 在被感染细胞的天然免疫中发挥一定作用, 有助于进一步阐明宿主因子对于流感病毒感染的调节机理。

**关键词:** 热休克蛋白 27, NS1 蛋白, 相互作用,  $\beta$  干扰素

**Received:** April 9, 2012; **Accepted:** May 7, 2012

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81101253), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB955501-06).

**Corresponding author:** Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; Fax: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 81101253), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB955501-06) 资助。

# Heat shock protein 27 enhances the inhibitory effect of influenza A virus NS1 on the expression of interferon- $\beta$

Zheng Li<sup>1,2</sup>, Xiaoling Liu<sup>1</sup>, Zhendong Zhao<sup>1,2</sup>, and Wenjun Liu<sup>1</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduated University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Heat shock protein 27 (HSP27) is a member of the small heat shock proteins (sHSP) and has multiple functions, it also plays an important role in the life cycle of some viruses. To investigate the regulatory effect of HSP27 during influenza virus infection, we cloned and expressed human HSP27 in both prokaryotic and eukaryotic cells, and demonstrated that HSP27 interacted with influenza A virus NS1 protein both *in vivo* and *in vitro*. Luciferase assay showed that HSP27 inhibited the expression of interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) in infected cells, and independent of its phosphorylation. Moreover, HSP27 enhanced the inhibitory effect of NS1 on the expression of IFN- $\beta$ . Further analysis indicated that HSP27 exerted the inhibitory effect probably through influencing MDA5 of the RIG-I like helicase (RLH) pathway. The results suggested that HSP27 play a role in the innate immunity of infected cells, contributed to our understanding of the regulatory effect of host factors during influenza virus infection.

**Keywords:** heat shock protein 27, NS1 protein, interaction, interferon- $\beta$

流感病毒属于正黏液病毒科,是一种囊膜病毒。其中 A 型流感病毒是哺乳动物中传播的主要类型,其基因组包含 8 个单股负链 RNA 片段,编码 12 种蛋白,20 世纪以来人类所经历的 4 次流感大流行全部由 A 型流感病毒引起,给人类带来严重危害<sup>[1-4]</sup>。流感病毒在其感染周期中,会利用多种宿主因子来辅助自身生命过程,因此,有关宿主蛋白对流感病毒感染的调节机理的研究具有十分重要的意义。

NS1 蛋白是 A 型流感病毒 NS 基因编码的一种非结构蛋白,它仅在病毒感染细胞中表达。NS1 蛋白在病毒感染过程中发挥多重作用,包括抑制细胞 pre-mRNA 的剪切和 mRNA 的出核<sup>[5-8]</sup>,增强病毒 mRNA 的翻译<sup>[9-10]</sup>等;其中,NS1 最重要的功能是拮抗流感病毒感染细胞的免疫反应,它通过两种机制抑制  $\beta$  干扰素 (IFN- $\beta$ ) 的表达<sup>[11]</sup>:

在转录前水平,可与 RLH 通路中 RIG-I 结合,阻碍 IPS-1、IRF3 的激活,从而抑制 IFN- $\beta$  启动子的激活<sup>[12-13]</sup>;在转录后水平,通过和 CPSF30 及 PABP II 结合,阻断细胞 mRNA 的出核,抑制 IFN- $\beta$  的表达<sup>[6,14]</sup>。

热休克蛋白 27 (HSP27) 是一种在细胞中广泛存在,不依赖于 ATP 的伴侣蛋白,属于小热休克蛋白家族的成员<sup>[15-16]</sup>,它可促进受损伤或构象异常的蛋白进行重新折叠,维持细胞稳态<sup>[17]</sup>。除作为分子伴侣外,HSP27 还可作为调控因子,调节细胞膜的稳定性、细胞骨架的形成、细胞增殖及凋亡、细胞周期的进行、信号转导等过程<sup>[16,18-20]</sup>。在应激条件下,HSP27 的第 15、78、82 位丝氨酸常会发生磷酸化,且寡聚化状态发生改变,从而行使其生物学功能<sup>[16]</sup>。有研究发现,在流感病毒的病毒粒子中,可以检测到 HSP27

蛋白的存在<sup>[21]</sup>, 而 H9N2 流感病毒感染后的人胃腺癌细胞 AGS 中, HSP27 蛋白的表达上调<sup>[22]</sup>, 但对于 HSP27 在病毒感染中所发挥的功能仍不清楚。

为了探讨 HSP27 蛋白在流感病毒感染周期中的具体作用, 我们分别在原核及真核细胞中克隆、表达了人源的 HSP27 蛋白, 验证了 HSP27 和 NS1 的相互作用, 而且发现, HSP27 可能通过 RLH 通路中 MDA5 因子, 和 NS1 共同抑制被感染细胞中 IFN- $\beta$  的表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 载体及菌株

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 由本实验室保存。载体 pET-28a、pGEX-4T-2、pCMV-Myc、pcDNA3-Flag, 质粒 pCMV- $\beta$ -gal、pIFN- $\beta$ -luc、pEF-Flag-RIG-IN、pEF-Flag-mda-5H、pcDNA3.1/Zeo-MAVS、pcDNA3.1-Flag-TBK1、pIRES-hrGFP-IRF3/5D 质粒由本实验室保存。

#### 1.1.2 细胞株、病毒株

293T 细胞系、流感病毒 A/WSN/33、仙台病毒 SeV 由本实验室传代并保存。

#### 1.1.3 主要试剂及引物

各种工具酶均购自 TaKaRa 公司; 点突变试剂盒赠自北京诺派生物科技有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 蛋白预染 Marker 购自 Fermentas 公司; Myc 抗体购自 Santa Cruz 公司; Flag 抗体、anti-FLAG-M2-agarose、DAPI、多聚甲醛、BSA 购自 Sigma-Aldrich 公司; sepharose 4B-glutathione 购自 GE 公司; Trizol 购

自 Invitrogen 公司;  $\beta$ -actin 抗体、FITC 标记羊抗鼠 IgG、TRITC 标记羊抗兔 IgG 购自康为世纪公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠、羊抗兔 IgG 购自中杉金桥公司; HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天根生化科技有限公司; 荧光素酶检测试剂盒、AMV 逆转录酶购自 Promega 公司; 邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳糖苷 (ONPG)、Triton X-100 购自 Amresco 公司。引物由上海生工公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HSP27 表达载体的构建

取生长状态良好的 293T 细胞, 43 °C 热击 20 min 后, 重新置于 37 °C 培养箱中恢复培养 4 h。Trizol 法提取细胞总 RNA。以总 RNA 为模板进行 RT-PCR, 获得 cDNA。以 cDNA 为模板, P1、P2 互为引物 (表 1), PCR 扩增人 HSP27 基因。PCR 产物经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 与酶切后的 pCMV-Myc、pcDNA3-Flag、pGEX-4T-2 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性克隆, 经北京博迈德生物科技有限公司测序获得重组子质粒。

#### 1.2.2 HSP27 磷酸化突变体表达载体的构建

以 pcDNA3-Flag-HSP27 质粒为模板, P3、P4 互为引物, 采用点突变试剂盒, 构建获得第 78、82 位丝氨酸突变为丙氨酸的 HSP27 双突变体质粒。以该双突变体质粒为模板, P5、P6 互为引物, 构建获得第 15、78、82 位丝氨酸突变为丙氨酸的 HSP27 磷酸化突变体。

#### 1.2.3 NS1 表达载体的构建

取流感病毒 A/WSN/33 毒株, Trizol 法提取病毒 RNA, 以病毒 RNA 为模板进行 RT-PCR 获

得病毒 cDNA。以 cDNA 为模板, P7、P8 互为引物 (表 1), PCR 扩增 NS1 基因。PCR 产物经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 与酶切后的 pCMV-Myc、pcDNA3-Flag 载体连接; 以 P9、P10 互为引物 (表 1) 同上述步骤酶切, 与酶切后的 pET28a 载体连接。将连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性克隆, 经北京博迈德生物科技有限公司测序获得重组子质粒。

表 1 克隆 HSP27、HSP27 突变体以及 NS1 基因的引物

Table 1 Primers for cloning of HSP27, HSP27-mutants and NS1

Primers	Primer sequence (5'-3')
P1	CCGGAATTCAGATGACCGAGCGCCG
P2	CCGCTCGAGTTACTTGGCGGCAGTC
P3	CCTACAGCCGCGCGCTCGCCCGGCAACT CGCCAGCGGGGTCTCG
P4	CGAGACCCCGCTGGCGAGTTGCCGGGC GAGCGCGCGGCTGTAGG
P5	GCTCCTGCGGGGCCCCGCTGGGACCCC TTCCGCGACTGG
P6	CCAGTCGCGGAAGGGGTCCCAGGCGGG GCCCCGCAAGAGC
P7	CCGGAATTCGGATGGATCCAAACACTGTG
P8	CCGCTCGAGTCAAACCTTCTGACCTAATTG
P9	CCGGAATTCATGGATCCAAACACTGTG
P10	CCGCTCGAGTCAAACCTTCTGACCTAATTG

#### 1.2.4 细胞培养与转染

293T 细胞在含有 10% 胎牛血清, 10 000 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中贴壁生长, 培养环境为 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>。将细胞接种于培养板中, 待细胞密度为 60%~80% 后, 进行转染。转染前 1~2 h, 为细胞更换新鲜培养基。采用 PEI 为转染试剂, 根据实验要求, 转染

不同剂量的质粒于细胞中。转染后 6~8 h 更换培养基, 培养约 36 h 后, 使用细胞裂解液 (0.5% NP40, 150 mmol NaCl, 20 mmol Hepes pH 7.4, 10% 甘油, 1 mmol EDTA, 加入蛋白酶抑制剂 cocktail) 裂解细胞并离心收集上清液, 进行后续检测。

#### 1.2.5 Western blotting 检测

将收获的细胞上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 采用半干法将蛋白转移至 PVDF 膜上。封闭液 (5% 脱脂奶粉、1% BSA) 室温封闭 2 h。然后加入一定比例稀释的一抗, 室温结合 1 h, TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween20) 洗 3 遍; 加入一定比例稀释的 HRP 标记二抗, 室温结合 45 min, TBST 洗 3 遍。采用底物显色试剂盒进行 X-ray 曝光显影。

#### 1.2.6 免疫共沉淀 (Co-IP)

接种 293T 细胞于 10 cm 细胞培养皿中, 共转染 pCMV-Myc-HSP27 与 pcDNA3-Flag-NS1, 或 pCMV-Myc-HSP27 与 pcDNA3-Flag 于两皿细胞中, 每种质粒 3  $\mu$ g。转染后 36 h, 使用 1 mL 细胞裂解液裂解细胞并收集上清液。加入 anti-Flag-M2-agarose 于上清液中, 4 °C 孵育 2 h, 充分洗去杂蛋白, 进行 Western blotting 检测。

#### 1.2.7 GST-pull down

将分别转化 pET28a-NS1 与 pGEX-4T-2-HSP27 质粒的 *E. coli* BL21 培养至 OD<sub>600</sub>~0.5~0.6, 100  $\mu$ g/mL IPTG 诱导, 16 °C 过夜培养。镍柱纯化 His-NS1 蛋白, sepharose 4B-glutathione 纯化 GST-HSP27 蛋白。取 1  $\mu$ g 结合于 sepharose 4B-glutathione 上的 GST-HSP27 及 GST 蛋白, 加入 1  $\mu$ g His-NS1 蛋白, 4 °C 孵育 2 h, 充分洗去杂蛋白, 进行 Western blotting 检测。

### 1.2.8 免疫荧光检测 HSP27 和 NS1 的共定位

接种 293T 细胞于铺有玻片的 24 孔板中, 将 pcDNA3-Flag-HSP27 与 pCMV-Myc-NS1 质粒各 0.3  $\mu\text{g}$  共同转染 293T 细胞。转染后约 36 h, 使用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 然后用含有 4% BSA 的 TBST (PBS 中加入 0.5% Triton X-100) 室温封闭 1 h。加入一定比例稀释的兔抗 Myc、鼠抗 Flag 作为一抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  结合 1 h; PBST 洗 5 次, 每次 10 min。然后加入一定比例稀释的荧光二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  结合 1 h; PBST 洗 5 次, 每次 10 min。加入 DAPI 室温染色 5 min, PBST 洗 3 次。然后在盖玻片上滴一滴封片液 (50% 甘油, 50% PBS), 以指甲油封闭四周。激光共聚焦显微镜观察 HSP27 和 NS1 在细胞中的定位情况。

### 1.2.9 荧光素酶报告基因检测 HSP27 及 NS1 蛋白对于 IFN- $\beta$ 表达的影响

接种 293T 细胞于 24 孔板中, 每孔中转染 pIFN- $\beta$ -luc 0.25  $\mu\text{g}$ 、pCMV- $\beta$ -gal 0.1  $\mu\text{g}$  及不同实验中所需质粒和对照质粒。转染后 36 h, 更换为无血清 DMEM, 并加入 SeV 刺激细胞, 6 h 后, 裂解并收集细胞, 以  $\beta$ -gal 作为内参, 检测细胞的 luciferase 活性。

### 1.2.10 荧光素酶报告基因检测 HSP27 对于 RLH 通路中各因子的影响

接种 293T 细胞于 24 孔板中, 共转染 pIFN- $\beta$ -luc 0.25  $\mu\text{g}$ 、pCMV- $\beta$ -gal 0.1  $\mu\text{g}$ 、pcDNA3-Flag-HSP27 或 pcDNA3-Flag 0.2  $\mu\text{g}$ , RLH 通路中各因子质粒 (pEF-Flag-RIG-IN、pEF-Flag-mda-5H、pcDNA3.1/Zeo-MAVS、pcDNA3.1-Flag-TBK1、pIRES-hrGFP-IRF3/5D) 各 0.2  $\mu\text{g}$ 。转染后 36~48 h, 裂解并收获细胞, 以  $\beta$ -gal 作为内参, 检测细胞的 luciferase 活性。

## 2 结果

### 2.1 HSP27 蛋白的原核及真核表达

将转化有 pGEX-4T-2-HSP27 的 *E. coli* BL21 培养并经 IPTG 诱导后, 离心并收集菌体, SDS-PAGE 检测 GST-HSP27 蛋白的表达。结果显示, 在约 53 kDa 处有一条明显的蛋白条带, 与 GST-HSP27 大小一致 (图 2A)。将 pCMV-Myc-HSP27 与 pcDNA3-Flag-HSP27 转染 293T 细胞, 36 h 后收获细胞, Western blotting 可检测到 HSP27 的表达 (图 2B、2C)。

### 2.2 HSP27 和 NS1 能够相互结合

将 pCMV-Myc-HSP27 与 pcDNA3-Flag-NS1 质粒转染 293T 细胞, 采用 anti-FLAG-M2-agarose 结合 Flag-NS1, 免疫共沉淀检测 HSP27 和 NS1 蛋白的相互作用。如图 3A 所示, 在同时转染 HSP27 和 NS1 的细胞裂解液中, 能够检测到 HSP27 蛋白, 说明 HSP27 和 NS1 在细胞内水平存在相互作用。

采用 IPTG 诱导 *E. coli* BL21 pGEX-4T-2-HSP27、pET28a-NS1, 表达并纯化 GST-HSP27 及 His-NS1 蛋白, GST-pull down 结果显示, 在 HSP27 和 NS1 蛋白同时存在的体系中, 可检测到 HSP27 与 NS1 的相互作用, 即二者在细胞外水平能够直接结合 (图 3B)。

在 293T 细胞中共转染 pcDNA3-Flag-HSP27 与 pCMV-Myc-NS1 质粒后, 免疫荧光检测 HSP27 和 NS1 的定位。激光共聚焦显微镜的观察结果显示, Flag-HSP27 主要定位于细胞质中, Myc-NS1 在细胞质与细胞核中都有分布, 两者在细胞质中存在一定的共定位 (图 3C)。

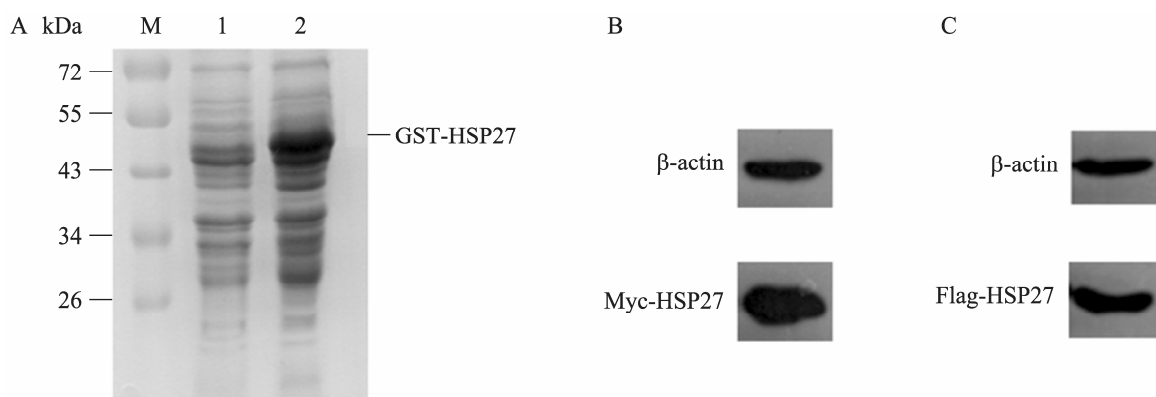


图2 HSP27 蛋白在原核及真核细胞中的表达

Fig. 2 Expression of HSP27 in prokaryotic and eukaryotic cells. (A) Expression of GST-HSP27 in *E. coli* BL21. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21 before induction; 2: *E. coli* BL21 after induction. (B, C) Expression of Myc-HSP27 and Flag-HSP27 in 293T cells.

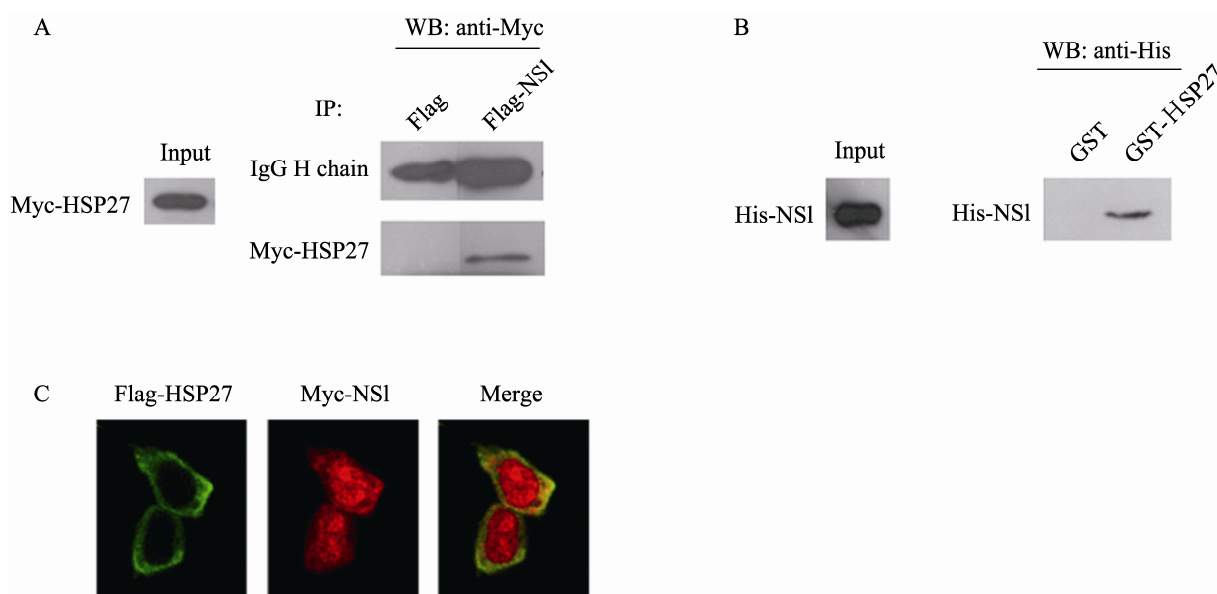


图3 HSP27 和 NS1 的相互作用检测

Fig. 3 Interactions of HSP27 and NS1 both *in vivo* and *in vitro*. (A) Co-immunoprecipitation of Myc-HSP27 and Flag-NS1 in 293T cells. (B) GST-pull down assay of GST-HSP27 and His-NS1. (C) The co-localization of Flag-HSP27 and Myc-NS1 in transfected 293T cells detected by immunofluorescence assay.

### 2.3 HSP27 抑制细胞中 IFN- $\beta$ 的表达

将质粒 pIFN- $\beta$ -luc、pCMV- $\beta$ -gal、pCMV-Myc-HSP27 (0.05、0.1、0.2、0.4  $\mu$ g) 同时转染 293T 细胞, 36 h 后采用 SeV 刺激, 6 h 后收获细胞, 检测细胞的  $\beta$ -gal 及 luciferase 活性。如图 4A

所示, 和转染空质粒相比, 在过表达 HSP27 的细胞中, IFN- $\beta$  的表达水平有所下降, 且随着 HSP27 转染剂量的增加, 下降程度逐渐增加。

HSP27 具有 15、78、82 位 3 个丝氨酸磷酸化位点, 细胞中 HSP27 功能的发挥常与其磷酸

化过程相关,但其 3 个丝氨酸磷酸化位点所各自具有的功能仍不清楚<sup>[16]</sup>。为了检测 HSP27 磷酸化对 IFN- $\beta$  的影响,将其第 15、78、82 位丝氨酸同时突变为丙氨酸,构建 HSP27 磷酸化突变体。然后将质粒 pIFN- $\beta$ -luc、pCMV- $\beta$ -gal、磷酸

化突变体 pcDNA3-Flag-HSP27-mutant 或野生型 pcDNA3-Flag-HSP27 同时转染 293T 细胞。如图 4B 所示, HSP27 磷酸化突变体和野生型相比,对于 IFN- $\beta$  的抑制程度并没有显著差别,说明磷酸化并不影响 HSP27 对于 IFN- $\beta$  的抑制作用。

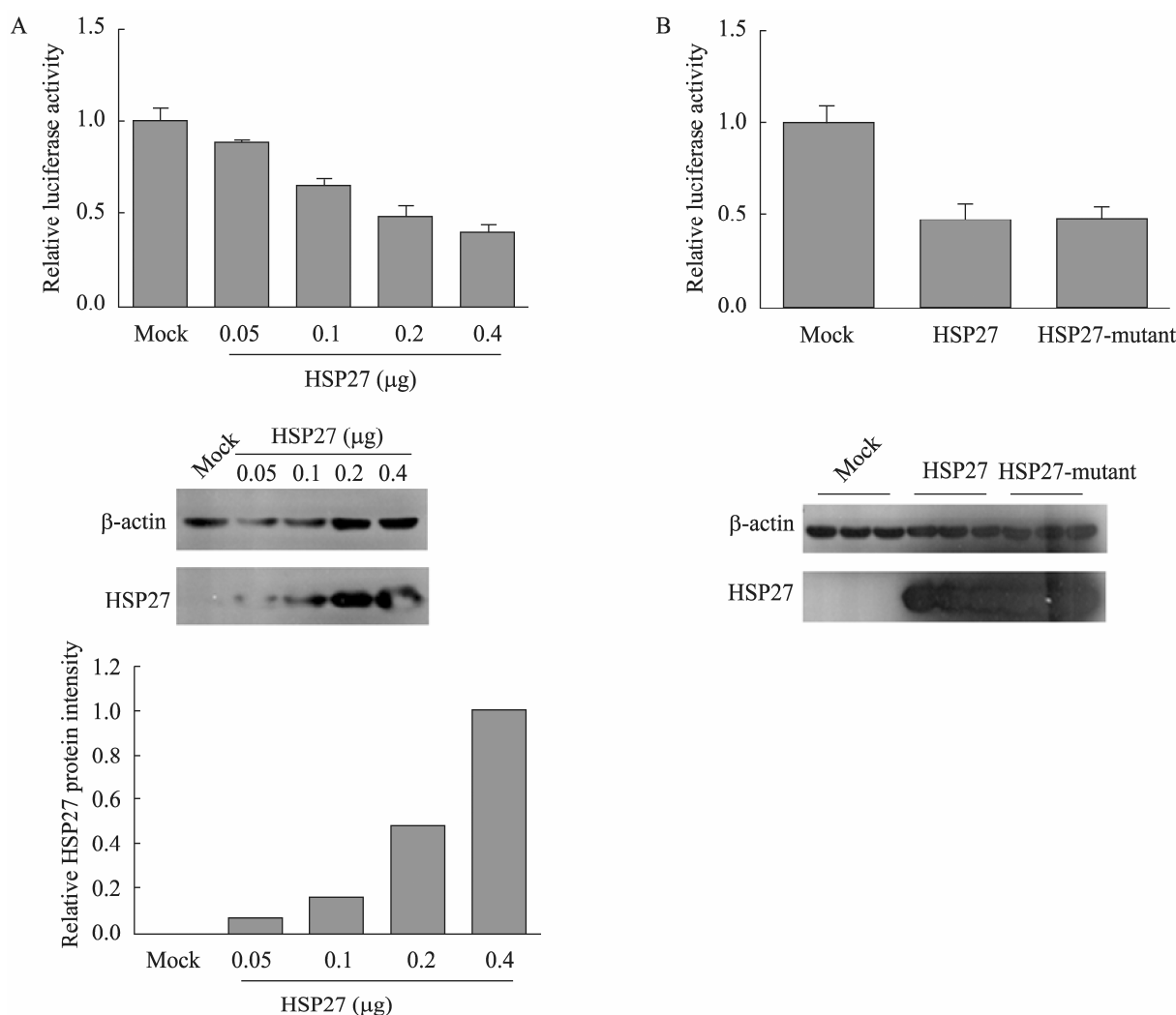


图 4 HSP27 及其磷酸化对于细胞中 IFN- $\beta$  表达的影响

Fig. 4 Effect of wild type HSP27 and mutant HSP27 on the expression of IFN- $\beta$ . (A) Luciferase activities of 293T cells transfected with different doses of pCMV-myc-HSP27 were measured (A, upper). Both the expression and the relative protein levels of different doses of Myc-HSP27 were analyzed (A, middle and bottom). (B) Luciferase activities of 293T cells transfected with wild type and mutant HSP27 were measured (B, upper). The expression of both the wild type and mutant HSP27 were detected (B, bottom). The data of (A) and (B) is based on the results of three independent experiments, and error bars represent the standard deviation ( $n=3$ ).

## 2.4 HSP27 与 NS1 共同对于 IFN- $\beta$ 的表达具有叠加抑制作用

将 293T 细胞分为 6 组, 分别转染 0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16  $\mu\text{g}$  pCMV-Myc-NS1, 同时转染 pIFN- $\beta$ -luc、pCMV- $\beta$ -gal, 每组内又分为两小组, 分别转染 pcDNA3-Flag-HSP27 与 pcDNA3-Flag。36 h 后 SeV 感染, 6 h 后收获细

胞, 检测  $\beta$ -gal 及 luciferase 活性。结果表明, 随着转染剂量的增加, NS1 对于 IFN- $\beta$  的抑制水平不断加大, 在 HSP27 存在的条件下, 对 IFN- $\beta$  具有更强的抑制效果, 表明 HSP27 和 NS1 对 IFN- $\beta$  具有叠加抑制作用。在低剂量转染 NS1 时, 该叠加效果较明显; 在 NS1 转染剂量较高时, HSP27 发挥的叠加效果较弱 (图 5)。

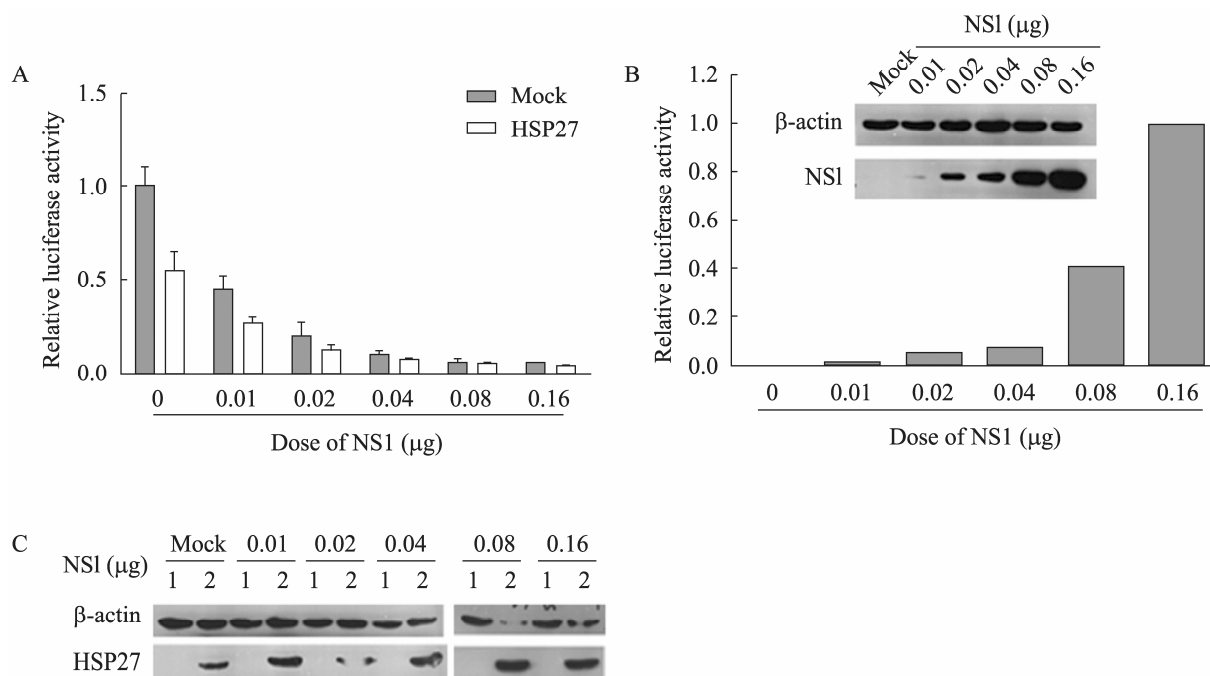


图 5 HSP27 与 NS1 共同对于 IFN- $\beta$  表达的影响

Fig. 5 The relationship of HSP27 and NS1 on the expression of IFN- $\beta$ . (A) Luciferase activities of 293T cells transfected with different doses of NS1 together with HSP27. The data is based on the results of three independent experiments, and error bars represent the standard deviation ( $n=3$ ). (B) Expression and relative protein levels of different doses of NS1 in transfected cells were analyzed. (C) Expression of HSP27 in transfected cells. 1: cells transfected with pcDNA3-FLAG; 2: cells transfected with pcDNA3-FLAG-HSP27. 1: cell transfected with pcDNA3-FLAG; 2: cell transfected with pcDNA3-FLAG-HSP27.

## 2.5 HSP27 可能通过 MDA5 抑制 IFN- $\beta$ 的表达

NS1 可与 RLH 通路中 RIG-I 结合, 抑制下游 IFN- $\beta$  的表达。为了阐明 HSP27 抑制 IFN- $\beta$  的机理, 将质粒 pEF-Flag-RIG-IN、pEF-Flag-

mda-5H、pcDNA3.1/Zeo-MAVS、pcDNA3.1-Flag-TBK1、pIRES-hrGFP-IRF3/5D 分别转染 293T 细胞, 表达出 RLH 通路中 RIG-I、MDA5、MAVS、TBK1、IRF3 的活性蛋白, 同时转染



pIFN- $\beta$ -luc、pCMV- $\beta$ -gal、pcDNA3-Flag-HSP27 或 pcDNA3-Flag, 然后检测细胞中的 luciferase 活性。结果显示, 在转染 RIG-I、MAVS、TBK1、IRF3 的细胞中, 同时过表达 HSP27 对于细胞

IFN- $\beta$  的表达均没有显著影响; 在转染 MDA5 的细胞中, HSP27 对于 IFN- $\beta$  的表达水平具有显著抑制作用, 说明 HSP27 可能通过 MDA5 而抑制 IFN- $\beta$  的表达 (图 6A、6B)。

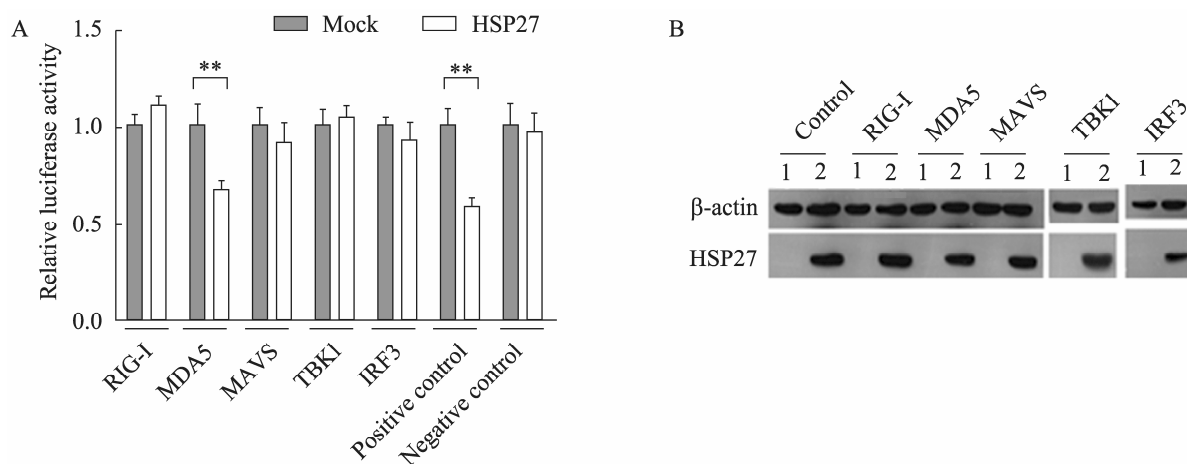


图 6 HSP27 对 RLH 通路中各因子的影响

Fig. 6 Analysis of target proteins of HSP27 in the RLH pathway. (A) 293T cells were transfected with different factors of RLH pathway, and luciferase activities were compared between HSP27 and mock of each factor. The data is based on the results of three independent experiments, and error bars represent the standard deviation ( $n=3$ ).  $**P<0.01$  by  $t$  test. (B) Detection of expression levels of HSP27.

### 3 讨论

HSP27 作为一种具有多重功能的蛋白在多种病毒的感染周期中都发挥重要作用<sup>[16]</sup>。例如, HSP27 的过表达及 MK2/HSP27 途径的激活可增强腺病毒粒子从胞质到细胞核的转运, 促进腺病毒的感染<sup>[23]</sup>; 呼吸道合胞病毒 RSV 对于细胞的感染常伴随着 HSP27 磷酸化水平的增加, 且磷酸化的 HSP27 可促进病毒的复制<sup>[24]</sup>; 在 HSV-1 感染后, 细胞中 HSP27 可迅速磷酸化, 改变细胞定位, 并促进病毒复制<sup>[25]</sup>。虽然在流感病毒粒子中可检测到 HSP27<sup>[21]</sup>, 但其在病毒生命周期中所起的作用尚不清楚。研究表明, HSP27 可和流

感病毒蛋白互作, 并且通过功能试验, 检测了 HSP27 在流感病毒感染中可能发挥的功能。

据报道, HSP27 可拮抗 HIV-1 Vpr 蛋白的活性, 抑制病毒复制<sup>[26]</sup>。流感病毒的 NS1 蛋白和 HIV-1 Vpr 蛋白具有相似的细胞定位及功能, 因此, 本实验首先检测了 HSP27 和 NS1 的相互作用。通过 Co-IP、GST-pull down、免疫荧光, 我们证实, HSP27 和 NS1 在细胞内及细胞外水平都能够相互结合, 而且在细胞质中存在共定位。

I 型干扰素的产生是抗病毒免疫反应的一个重要方面, 细胞主要通过 Toll 样受体 (TLR) 途径及 RIG-I 样 RNA 解旋酶 (RLH) 途径来识别病毒<sup>[27]</sup>。而流感病毒 NS1 蛋白可在 RLH 途径中

发挥作用, 它可和 RIG-I 结合, 进而干扰下游 MAVS、IRF3 的激活, 最终影响 IFN- $\beta$  启动子的激活, 抑制 IFN- $\beta$  的产生<sup>[13]</sup>。由于 HSP27 和 NS1 存在相互作用, 因此 HSP27 是否影响 IFN- $\beta$  的表达是我们需要探究的重要问题。

研究表明, HSP27 以剂量依赖型式抑制病毒感染细胞中的 IFN- $\beta$  表达, 而且不依赖于其磷酸化状态, 即磷酸化并不影响 HSP27 对于 IFN- $\beta$  表达的抑制, 因此推测这种抑制作用是由 HSP27 本身具有的性质来介导的, 如分子伴侣活性, 具体机制仍需进一步验证。由于 NS1 的一项重要功能即是抑制病毒感染细胞中的 IFN- $\beta$  表达, 实验结果表明, HSP27 可以和 NS1 对于 IFN- $\beta$  的抑制作用叠加, 更大程度抑制 IFN- $\beta$  的表达, 但是由于 NS1 本身对于 IFN- $\beta$  的抑制作用非常明显, 而且在病毒感染早期 NS1 蛋白大量表达, 因此这种叠加效果比较有限, 在 NS1 剂量较低时较为显著。另外, 我们发现 HSP27 可能通过 MDA5 来发挥对于 IFN- $\beta$  的抑制作用, 但这种抑制作用的具体机制, 即 HSP27 可否通过影响 MDA5 上游对于病毒 RNA 的识别或下游对于 MAVS 等因子的招募而最终影响 IFN- $\beta$  的表达仍需进一步的实验。

综上所述, 研究结果表明 HSP27 蛋白可参与流感病毒感染后细胞内的天然免疫过程, 对于进一步了解宿主因子对于流感病毒的调节机制以及病毒感染细胞中天然免疫反应具有一定的指导意义。

## REFERENCES

- [1] Whittaker GR. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 2001: 1-13.
- [2] Chen WS, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 2001, 7(12): 1306-1312.
- [3] Wise HM, Foeglein A, Sun JC, et al. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, 2009, 83(16): 8021-8031.
- [4] Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(4): 481-486.
- [5] Nemeroff ME, Barabino SML, Li YZ, et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell*, 1998, 1(7): 991-1000.
- [6] Chen ZY, Li YZ, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J*, 1999, 18(8): 2273-2283.
- [7] Qiu Y, Krug RM. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol*, 1994, 68(4): 2425-2432.
- [8] Fortes P, Beloso A, Ortín J. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J*, 1994, 13(3): 704-712.
- [9] de la Luna S, Fortes P, Beloso A, et al. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol*, 1995, 69(4): 2427-2433.
- [10] Burgui I, Aragón T, Ortín J, et al. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 12): 3263-3274.
- [11] Hale BG, Randall R E, Ortín J, et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 10): 2359-2376.
- [12] Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo YM, et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene

- I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, 2007, 81(2): 514–524.
- [13] Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, et al. IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol*, 2007, 9(4): 930–938.
- [14] Kochs G, García-Sastre A, Martínez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, 2007, 81(13): 7011–7021.
- [15] Arrigo AP. The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 594: 14–26.
- [16] Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(20): 3289–3307.
- [17] Welsh MJ, Gaestel M. Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 851: 28–35.
- [18] Kostenko S, Johannessen M, Moens U. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal*, 2009, 21(5): 712–718.
- [19] Matsushima-Nishiwaki R, Takai S, Adachi S, et al. Phosphorylated heat shock protein 27 represses growth of hepatocellular carcinoma via inhibition of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*, 2008, 283(27): 18852–18860.
- [20] Wu R, Kausar H, Johnson P, et al. Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *J Biol Chem*, 2007, 282(30): 21598–21608.
- [21] Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, et al. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog*, 2008, 4(6): e1000085.
- [22] Liu N, Song WJ, Wang P, et al. Proteomics analysis of differential expression of cellular proteins in response to avian H9N2 virus infection in human cells. *Proteomics*, 2008, 8(9): 1851–1858.
- [23] Suomalainen M, Nakano MY, Boucke K, et al. Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1310–1319.
- [24] Singh D, McCann K L, Imani F. MAPK and heat shock protein 27 activation are associated with respiratory syncytial virus induction of human bronchial epithelial monolayer disruption. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(2): L436–L445.
- [25] Mathew S S, Della Selva M, Burch A D. Modification and reorganization of the cytoprotective cellular chaperone Hsp27 during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol*, 2009, 83(18): 9304–9312.
- [26] Liang D, Benko Z, Agbottah E, et al. Anti-vpr activities of heat shock protein 27. *Mol Med*, 2007, 13(5/6): 229–239.
- [27] Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(1): 17–22.