

B19 病毒 11 kDa 蛋白对 Hela 细胞内 NF- κ B 信号通路的影响

董衍明¹, 黄玉¹, 彭建新¹, 李毅^{1,2}

1 华中师范大学生命科学学院昆虫所, 湖北 武汉 430079

2 武汉生物工程学院生物工程系, 湖北 武汉 430079

董衍明, 黄玉, 彭建新, 等. B19 病毒非结构蛋白 11 kDa 蛋白对细胞内 NF- κ B 信号通路的影响. 生物工程学报, 2013, 29(7): 965–973.

Dong YM, Huang Y, Peng JX, et al. Regulatory effect of 11 kDa protein of parvovirus B19 on NF- κ B pathway in Hela cells. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 965–973.

摘 要: 11 kDa 蛋白作为 B19 病毒的一个非结构蛋白, 可能在病毒复制周期中发挥重要作用。为了研究 11 kDa 蛋白对细胞内 NF- κ B 信号通路的影响, 首先通过原核表达纯化获得 GST-11 kDa 融合蛋白, 并制备免疫血清, 利用免疫血清验证了 11 kDa 蛋白在 Hela 细胞呈胞浆定位。荧光素酶检测系统发现 11 kDa 蛋白能上调细胞内 NF- κ B 转录活性, Western blotting 进一步表明 11 kDa 蛋白能够引起细胞内 I κ B- α 的降解。同时, 11 kDa 蛋白还能够上调细胞内炎症因子 IL6 启动子的活性, 而该反应主要依赖于 NF- κ B 通路。结果表明, 11 kDa 蛋白通过参与细胞内信号途径激活相关炎症因子的表达。

关键词: 人细小病毒 B19, 11 kDa 蛋白, 核转运因子

Regulatory effect of 11 kDa protein of parvovirus B19 on NF- κ B pathway in Hela cells

Yanming Dong¹, Yu Huang¹, Jianxin Peng¹, and Yi Li^{1,2}

1 College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

2 Bioengineering Department, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430079, Hubei, China

Abstract: The 11 kDa protein, a small nonstructural protein of parvovirus B19, may play important roles in viral

Received: January 20, 2013; **Accepted:** March 6, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30670081).

Corresponding author: Yi Li. Tel: +86-27-89645531; E-mail: johnli2668@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 30670081) 资助。

网络出版时间: 2013-06-20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130620.1103.002.html>

replication cycle. To investigate the effect of 11 kDa protein on the NF- κ B signaling pathway, we first prepared the poly-antiserum using GST-11 kDa fusion protein purified via prokaryotic expression system, and demonstrated that the 11 kDa protein mainly localized in cytoplasm when expressed in HeLa cells. Meanwhile, luciferase activity assay and Western blotting assay showed that 11 kDa up-regulated the transcriptional activity of NF- κ B and induced the degradation of I κ B- α in HeLa cells. Moreover, the 11 kDa protein activated the IL6 promoter, which is probably through the NF- κ B pathway. Taken together, these results suggested that 11 kDa protein may contribute to activating inflammatory factors through participating in the cell signaling pathway.

Keywords: human parvovirus B19, 11 kDa protein, NF- κ B

Human Parvovirus B19 (HPV B19), 简称 B19 病毒, 属于细小病毒科 (*Parvoviridae*), 细小病毒病毒亚科 (*Densovirinae*), 红细胞病毒属 (*Erythrovirus*), 是目前为止仅有的两种能感染人类的细小病毒科成员之一^[1]。B19 病毒作为一种重要病原, 能够引起多种疾病, 如: 第五疾病、儿童传染性红斑、急性再障现象、胎儿水肿、孕妇关节炎和自然流产、血小板减少性紫癜以及急性肝炎^[2-4]。

B19 病毒基因组为单链线性 DNA 分子, 长约 5 596 bp, 两端为长约 386 nt 的长末端反向重复序列 (ITRs)^[5]。病毒粒子为无包膜, 二十面体结构, 其衣壳由 VP1 (84 kDa) 及 VP2 (58 kDa) 两种结构蛋白组成^[6]。NS1 (72 kDa) 作为其主要的非结构蛋白, 是一个重要的多功能蛋白, 能引起细胞凋亡、激活细胞内多种炎性因子的表达, 并且对于病毒 DNA 的复制是必要的^[7-10]。另外, 在非结构基因编码区还存在两种由小 mRNA 编码的小蛋白 7.5 kDa 和 11 kDa^[11]。已有的研究发现 11 kDa 蛋白能够影响病毒粒子的出核、诱发细胞凋亡, 特异结合生长因子受体结合蛋白 (Grb2), 推测其可能通过干扰细胞内信号通路引起 B19 病毒相关疾病^[12-14]。而对于 7.5 kDa 蛋白在病毒复制和感染过程中具体发挥什么作用, 目

前还不清楚。

核转录因子 NF- κ B 广泛存在于各种类型的真核细胞中, 其活性受细胞胞浆内多种蛋白质家族成员的调控, 共同构成 NF- κ B 系统, 包括 NF- κ B/Rel 家族、I κ B 蛋白家族和 IKK 蛋白家族^[15]。在正常生理条件下, NF- κ B 在胞浆中与 I κ B 抑制蛋白相结合, 处于非活化状态, 当细胞受到外界刺激时, I κ B- α 构象发生改变, 发生泛素化降解, NF- κ B 被掩盖的核定位信号暴露, 并进入细胞核, 启动下游相关基因的表达, 从而完成 NF- κ B 信号途径的激活^[16]。

为了研究 11 kDa 蛋白对细胞内 NF- κ B 信号通路的影响, 我们通过原核表达与纯化得到 11 kDa 融合蛋白, 制备了多克隆抗体, 并在 HeLa 细胞内验证了其呈胞浆定位, 同时通过荧光素酶检测及 Western blotting 证实了其对于细胞内 NF- κ B 信号通路的诱导。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及细胞

质粒 pGEX-KG、pcDNA3.1(-)、pGL3-Basic、pNF- κ B-luc, *E. coli* DH5 α /BL21(DE3)菌株, HeLa 细胞由本实验室保存; B19 病毒感染性克隆 pB194244 由加拿大 INRS-Institute Armand-

Frappier 的 Tijssen 教授赠送。

1.2 主要试剂及引物

各种工具酶均购自 TaKaRa 公司; DNA 片段胶回收试剂盒、高纯度质粒小提中量试剂盒购自 Tiangen 公司; 蛋白 marker 购自 Fermentas 公司; 转染试剂 jetPEI Reagent 购自 Polylus 公司; 荧光素酶检测试剂盒 (Luciferase Assay System) 购自 Promega 公司; RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购自 Wisent 公司; BAY11-7082、LPS、DAPI、多聚甲醛购自碧云天生物技术公司; Dylight488 标记羊抗鼠购自艾美捷生物技术公司; 所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 11 kDa 原核和真核表达载体的构建

以 B19 病毒感染性克隆 pB194244 为模板, P1、P2 互为引物, PCR 扩增非结构蛋白基因 11 kDa, PCR 产物经 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切, 与经同样酶切的原核表达载体 pGEX-KG 连接。以 P3、P4 为引物, PCR 获得的 11 kDa-HA 融合基因经 *Xho* I/*Bam*H I 酶切后插入真核表达载体 pcDNA3.1(-)中。上述连接产物转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞, 挑单菌落摇菌, 经 PCR 及酶切验证正确后, 送上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 11 kDa 蛋白多克隆抗体的制备

将测序正确的 pGEX-KG-11 kDa 重组质粒转化表达菌株 *E. coli* BL21(DE3), 经 IPTG (0.6 mmol/L) 诱导条件下获得的菌体裂解物, 超声破碎, 12 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液, 0.4 μ mol/L 滤膜过滤杂质, GST·Bind™树脂孵育并进行亲和层析纯化。BSA 法测定纯化后蛋白浓度, 取 200 μ g 重组蛋白 GST-11 kDa 加入适量完全弗氏佐剂至 300 μ L, 背部皮下免疫 BALB/c 小鼠, 第 2 次起用弗氏不完全佐剂, 每隔 7 天加强免疫 1 次, 共免疫 4 次, 并于第 4 次免疫后 1 周眼球取血。

1.5 含细胞因子 IL6 启动子的荧光素酶报告质粒的构建

按照分子克隆手册^[17]的蛋白酶 K 和苯酚法从 HeLa 细胞中提取细胞基因组 DNA, 以提取的细胞基因组 DNA 为模板, P5、P6 互为引物, PCR 扩增 IL6 启动子区片段 IL6-Promoter, PCR 产物经 *Kpn* I/*Hind* III 酶切后插入含荧光素酶报告基因的载体 pGL3-Basic 中, 转化挑取单克隆, 经 PCR 和双酶切验证后, 将阳性克隆送于上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 克隆 11 kDa 基因以及 hIL6 启动子区的引物
Table 1 Primers for cloning of 11 kDa and human IL6 promoter region

Primer	Primer sequence (5'-3')
P1	CGCGGATCCATGCAAAACAACACCACAGACA
P2	CCCAAGCTTTTATTTTCTAAATTTTGAT
P3	CCGCTCGAGACCATGCAG AATAACACTACC
P4	CGCGGATCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTTTCCAG GTTCTG
P5	CGGGGTACCTGGAGACGCCTTGAAGTAAC
P6	CCCAAGCTTCTGGAGGGGAGATAGAGCTT

1.6 细胞培养与转染

Hela 细胞在 37 °C、5% CO₂ 环境下培养于含有 10% 胎牛血清, 10 000 U/mL 青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养基中。转染前一天将细胞接种于培养板中, 细胞汇合度约为 60%~70%。按照 jetPEI 转染试剂操作手册, 将不同剂量的质粒转染于细胞中。

1.7 免疫荧光检测 11 kDa 蛋白在细胞内的定位

Hela 细胞接种于铺有盖玻片的 24 孔板中, 将 0.5 µg pcDNA3-11 kDa-HA 质粒转染 Hela 细胞。转染后约 48 h, 使用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 然后用含 0.2% TritonX-100 的 PBS 穿孔 15 min, 含 1% BSA 的 PBS 室温封闭 1 h。分别加入抗 11 kDa 小鼠血清 (1 : 1 000) 或鼠抗 HA (1 : 1 000) 作为一抗, 37 °C 结合 2 h; PBST 洗 3 次, 每次 10 min。然后加入 DyLight488 标记山羊抗小鼠二抗, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗 3 次, 每次 10 min。加入 DAPI 室温避光染色 15 min, PBST 洗 3 次, 荧光显微镜观察 11 kDa 在细胞内的定位情况。

1.8 Western blotting 检测

铺于 6 孔板的细胞转染后, 于 48 h 收集细胞, 每孔细胞加入 150 µL WB 及 IP 裂解液, BSA 法测定蛋白浓度, 取同样蛋白量上清样品进行 12% SDS-PAGE 电泳, 半干转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h, 然后加入一定比例稀释的一抗, 室温结合 2 h, TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween20) 洗 3 遍, 每次 10 min; IRDye 800CW 标记的山羊抗兔或小鼠二抗 (1 : 5 000), 室温结合 45 min, TBST 洗 3 遍, 每次 10 min,

于 Odyssey 近红外双色激光成像系统扫描采集图像。

1.9 荧光素酶检测 11 kDa 蛋白对 NF-κB 转录活性及细胞因子 IL6 启动子活性的影响

接种 Hela 细胞于 24 孔板中, 将含荧光素酶基因的报告质粒 pNF-κB-luc, pGL3-IL6-P-luc (0.20 µg) 分别与 pcDNA3-11 kDa-HA 及空载体 pcDNA3.1 (0.20 µg) 共转染 Hela 细胞, 转染后 12 h, 更换新鲜正常培养基, 阳性刺激组加入 LPS (100 ng/mL) 刺激; 抑制组加入 NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082 (20 µmol/L), 继续培养至 48 h, 裂解并收集细胞上清, 检测荧光素酶活性。

2 结果

2.1 B19 病毒 11 kDa 蛋白的纯化及抗体制备

将酶切并测序正确的重组质粒 pGEX-KG-11 kDa 转化 *E.coli* BL21(DE3), 经 IPTG (0.6 mmol/L) 诱导条件下获得的菌体裂解物, 10% SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色后, 在相对分子质量 38 kDa 附近有目的蛋白条带表达 (图 1A)。经 Western blotting 验证确为目的融合蛋白 GST-11 kDa (结果未给出)。蛋白诱导表达成功后, 大规模诱导并收集菌体, 菌体经过超声破碎, 12 000 r/min 离心 1 h, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测发现目的蛋白主要以可溶性蛋白的形式存在于上清中, 经 GST 树脂亲和层析纯化后于目的条带处获得单一的目的蛋白 GST-11 kDa (图 1B)。接着按照 1.4 方法, 成功制备小鼠源多抗血清。

2.2 B19 病毒 11 kDa 蛋白的细胞定位

为了探究 11 kDa 蛋白在细胞内的定位, 我

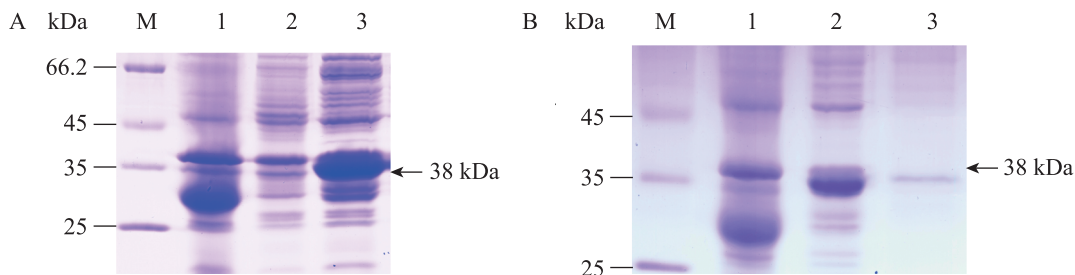


图 1 11 kDa 蛋白的原核表达及纯化
Fig. 1 Expression and purification of 11 kDa protein. (A) Expression of GST-11 kDa protein in *E. coli* BL21(DE3). M: untagged protein marker; 1: expression of empty control vector induced by IPTG; 2: expression of recombinant plasmid un-induced by IPTG; 3: expression of recombinant plasmid induced by IPTG. (B) Purification of 11 kDa protein in *E. coli* BL21(DE3). M: untagged protein marker; 1: empty control vector induced by IPTG; 2: recombinant plasmid induced by IPTG; 3: purified protein.

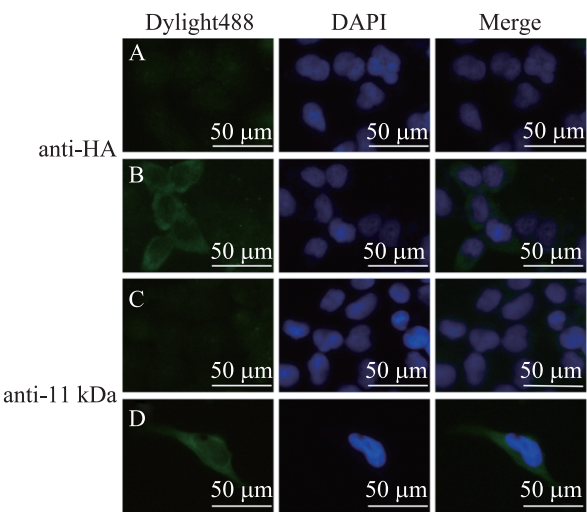


图 2 11 kDa 蛋白在 Hela 细胞内的定位
Fig. 2 Cellular localization of 11 kDa proteins in transfected Hela cells. (A) and (C): Hela cells were transfected with empty vector pcDNA3.1; (B) and (D): Hela cells were transfected with pcDNA3-11 kDa-HA.

们将成功构建的 pcDNA3-11 kDa-HA 真核表达质粒 (0.5 μ g), 按照 jetPEI Reagent 操作说明书, 转染入 Hela 细胞中, 48 h 后, 利用 anti-HA 抗体及 GST-11 kDa 抗鼠血清作为一抗, 免疫荧光法检测 pcDNA3-11 kDa-HA 转染组的 11 kDa 蛋白

的表达情况。结果显示, HA 抗体和 11 kDa 抗鼠血清两组免疫荧光的结果一致, 11 kDa 蛋白在 Hela 细胞内均主要呈胞浆分布, 该结果与 Chen 等在 UT7/Epo-S1 细胞中的结果一致^[13]。

2.3 B19 病毒 11 kDa 蛋白对 NF- κ B 转录活性的影响

NF- κ B (核转录因子) 是细胞内的主要调控因子, 尤其在病毒感染过程中起着重要的作用。鉴于 11 kDa 的细胞质定位, 推测其可能参与 NF- κ B 信号通路的调控, 为此, 我们首先检测了 11 kDa 蛋白对 NF- κ B 转录活性的影响。将 pcDNA3-11 kDa-HA (0.5 μ g) 和 pNF- κ B-luc (0.25 μ g) 共转染 Hela 细胞, 空载体 pcDNA3.1 作为对照, 荧光素酶检测发现, 阳性刺激组中 LPS (100 ng/mL) 能显著上调 NF- κ B 转录活性。与对照组相比, 11 kDa 蛋白能上调细胞内 NF- κ B 的转录活性, 同时利用 NF- κ B 的抑制剂 BAY 11-7082 (20 μ mol/L) 能够显著抑制其活性的上调。此结果说明 B19 病毒 11 kDa 蛋白能激活细胞内 NF- κ B 的转录活性 (图 3)。

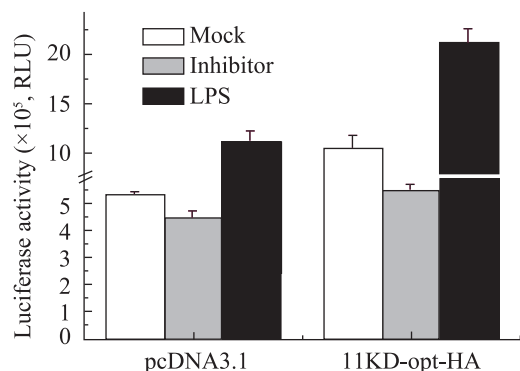


图3 11 kDa 蛋白对细胞内 NF-κB 转录活性的影响

Fig. 3 Effect of 11 kDa protein on the transcription activity of NF-κB. The data is based on the results of three independent experiments, and error bars represent the standard deviation ($n=3$).

2.4 B19 病毒 11 kDa 蛋白引起 IκB-α 的降解

在 NF-κB 信号通路激活的过程中会伴随着 IκB-α 的降解,为了研究 11 kDa 是否能诱导 IκB-α 的降解,我们将 pcDNA3-11 kDa-HA 和空载体 pcDNA3.1 各 1 μg 分别转染 Hela 细胞,于 48 h 收集细胞样品,BSA 法测定蛋白浓度,按照 1.8 中 Western blotting 方法,分别用 anti-HA/p65/IκB-α/β-actin 为一抗检测细胞总蛋白中的 11 kDa、IκB-α、p65 及 β-actin。结果所示,11 kDa 蛋白成功得到了表达,与对照组相比,p65 亚基含量保持一致,而细胞中 IκB-α 的含量明显降低,表明 11 kDa 蛋白的表达导致细胞浆中 IκB-α 发生了降解 (图 4)。

2.5 B19 病毒 11 kDa 蛋白对细胞因子 IL6 启动子的调控作用

为了研究 11 kDa 蛋白能否诱导细胞炎症因子 IL6 的产生,我们将含 IL6 启动子的荧光素酶报告质粒 pGL3-IL6-P-luc (0.1 μg) 与真核表达质粒 pcDNA3-11 kDa-HA (0.5 μg) 共转染 Hela 细胞,同时设空载体对照,48 h 后收集细胞样品,

通过荧光素酶报告系统检测 11 kDa 对 IL6 启动子活性的影响。结果显示,与空载体相比,11 kDa 激活 IL6 启动子活性提高了 2 倍 ($P<0.05$)。同时,为了探究 11 kDa 对 IL6 的激活是否依赖于 NF-κB 信号通路的活化,在同样的共转染条件下,12 h 后使用 20 μmol/L 特异性抑制剂 BAY11-7082 处理细胞,48 h 收集细胞样品并检测荧光素酶活性,结果显示 11 kDa 激活 IL6 启动子的能力下降了 80% (图 5)。这表明,11 kDa

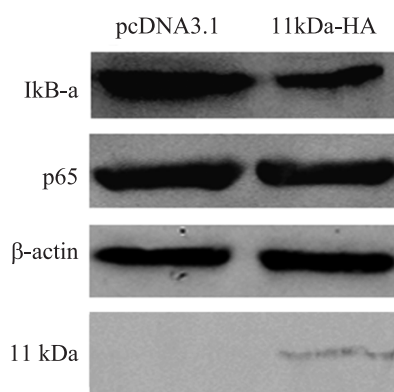


图4 11 kDa 蛋白引起 IκB-α 的降解

Fig. 4 11 kDa protein induced the degradation of IκB-α.

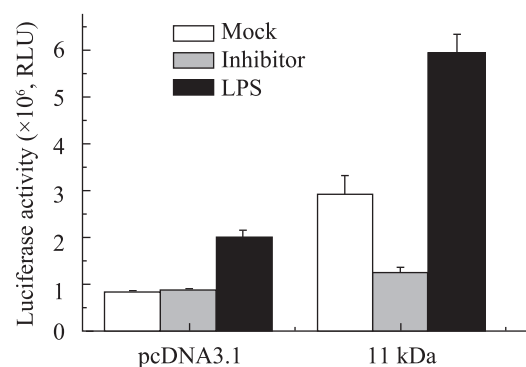


图5 11 kDa 蛋白上调 IL6 启动子的活性

Fig 5 11 kDa protein up-regulate the activity of IL6 promoter. The data is based on the results of three independent experiments, and error bars represent the standard deviation ($n=3$).

激活的细胞因子 IL6 是部分依赖于 NF- κ B 信号通路的。

3 讨论

机体在遭受外界病原感染及刺激时能通过识别相关分子模式引发机体相应的免疫应答反应,而 NF- κ B 信号通路的诱导活化在此过程中发挥了重要的作用,其主要是通过诱导激活下游的免疫及炎性相关因子的转录表达^[15]。已有研究表明病毒相关蛋白也可激活或者调节细胞内的 NF- κ B 信号途径。如 EB 病毒编码的 LMP1 蛋白及 HCV 编码的核心蛋白 X 能通过活化 NF- κ B 维持持续性感染^[18-19]。B19 病毒编码的 NS1 蛋白能激活细胞内 TNF- α 的大量表达,其过程主要是依赖于 NF- κ B 信号途径^[20]。而作为 B19 病毒的另外一个小非结构蛋白 11 kDa 蛋白质是否具有相应的生物功能,目前还不清楚。

本研究通过 NF- κ B 荧光素报告质粒检测发现 11 kDa 能显著刺激细胞内 NF- κ B 的转录,Western blotting 检测表明 11 kDa 能通过诱导 I κ B- α 的降解从而激活核转录因子 NF- κ B。在实验中我们还通过免疫荧光方法检测了 p65 的核转运过程,发现部分表达了 11 kDa 蛋白的细胞发生了 p65 的入核现象,推测其由于该过程的发生较短暂,导致很多入核现象难以检测(该部分结果未给出)。已有的研究表明,各种外界刺激因子诱导 NF- κ B 信号通路中的下游途径基本相同,但上游信号传递方式却是不同的。目前了解比较清楚的上游信号途径主要有 TNFR、TLRs、IL-1R 以及 RIG/MDA5 介导的 NF- κ B 的活化^[16]。在实验中我们还发现通过共转染含 TNF- α 启动子的荧光素酶报告质粒及 11 kDa 真核表达质粒,检

测到 TNF- α 启动子的显著性表达(数据未给出),因此我们推测 11 kDa 激活 NF- κ B 信号通路的上游途径主要是通过其诱导的 TNF- α 激活信号蛋白 TRAF2 从而激活 NF- κ B 的。

NF- κ B 所调节的大量炎性因子和趋化因子,包括 IL6、IL8、CXCL1 等在自身免疫性疾病及许多炎性疾病中发挥重要的作用^[21-22]。本文中通过荧光素酶报告检测系统发现 11 kDa 能够上调细胞内 IL6 启动子活性,由于 B19 病毒能够引起显著的自主性免疫疾病,已有的报道认为其诱因主要是 NS1 蛋白激活的 IL6 及 TNF- α 等细胞因子以及细胞对 NS1 产生的过多的特异性抗体对其自身造成的损伤影响。鉴于 11 kDa 在诱导细胞凋亡过程中起着比 NS1 更重要的作用,而我们的结果也显示 11 kDa 能够激活 IL6 的表达,推测 11 kDa 蛋白在 B19 病毒引起机体自主性免疫疾病方面可能起着与 NS1 类似的功能。在实验中,我们同样观察到 11 kDa 能明显诱导 Hela 细胞凋亡。已有研究表明 NF- κ B 主要通过诱导下游抗凋亡基因的表达抑制细胞凋亡^[23];然而也有研究表明 NF- κ B 的激活与细胞凋亡密切相关^[24-28]。因此,我们推测 11 kDa 蛋白引起 Hela 细胞凋亡与 NF- κ B 的激活可能相关,其具体机制有待进一步的研究。总之,探究 B19 病毒 11 kDa 非结构蛋白在诱导 NF- κ B 信号途径中的作用,将为研究 B19 病毒与宿主细胞的相互作用提供新的思路和方向,具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] Tijssen P, Agbandje-McKenna M, Almendral JM, et al. Parvoviridae, in virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses//Ninth

- Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ed. by King AMQ, Adams MJ, Carstens E, et al. San Diego: Elsevier, 2011: 375–395.
- [2] Woolf AD, Campion GV, Chishick A, et al. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch Intern Med*, 1989, 149(5): 1153–1156.
- [3] Sheikh AU, Ernest JM. Clinical picture and consequences of fetal parvovirus B19 infection. *Ann Med*, 1995, 27(1): 7–8.
- [4] Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med*, 2004, 350(6): 586–597.
- [5] Deiss V, Tratschin JD, Weitz M, et al. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology*, 1990, 175(1): 247–254.
- [6] Cotmore SF, Tattersall P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science*, 1984, 226(4679): 1161–1165.
- [7] Morita E, Nakashima A, Asao H, et al. Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J Virol*, 2003, 77(5): 2915–2921.
- [8] Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, et al. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol*, 1998, 72(4): 3018–3028.
- [9] Moffatt S, Tanaka N, Tada K, et al. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *J Virol*, 1996, 70(12): 8485–8491.
- [10] Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, et al. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology*, 2002, 293(1): 86–93.
- [11] Ozawa K, Ayub J, Hao YS, et al. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J Virol*, 1987, 61(8): 2395–2406.
- [12] Zhi N, Mills IP, Lu J, et al. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol*, 2006, 80(12): 5941–5950.
- [13] Chen AY, Zhang EY, Guan W, et al. The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood*, 115(5): 1070–1080.
- [14] Fan MM, Tamburic L, Shippam-Brett C, et al. The small 11-kDa protein from B19 parvovirus binds growth factor receptor-binding protein 2 *in vitro* in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner. *Virology*, 2001, 291(2): 285–291.
- [15] Malek S, Huxford T, Ghosh G, et al. Ikappa Balph functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF- κ B. *J Biol Chem*, 1998, 273(39): 25427–2535.
- [16] Caamano J, Hunter CA. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15(3): 414–429.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [18] Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, et al. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, 1995, 80(3): 389–399.
- [19] Waris G, Livolsi A, Imbert V, et al. Hepatitis C virus NS5A and subgenomic replicon activate NF- κ B via tyrosine phosphorylation of Ikappa Balph and its degradation by calpain protease. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 40778–40787.
- [20] Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, et al. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J Virol*, 2002, 76(11): 5395–5403.
- [21] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein

- NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986, 47(6): 921-998.
- [22] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986, 46(5): 705-716.
- [23] Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, et al. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 2003, 22(56):8961-8982.
- [24] Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, et al. NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 2001, 276(52): 48921-48929.
- [25] Hettmann T, DiDonato J, Karin M, et al. An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med*, 1999, 189(1): 145-158.
- [26] Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell*, 2004, 13(6): 853-865.
- [27] Bessho R, Matsubara K, Kubota M, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48(10): 1883-1889.
- [28] Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, et al. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 2000, 404(6780):892-897.

(本文责编 郝丽芳)