

· 医药生物技术 ·

转谷氨酰胺酶 2 抑制 H1 亚型流感病毒在 MDCK 细胞中的增殖

郭寿清^{1,3}, 廖月姣^{1,3}, 仇真毓^{1,3}, 刘耿^{1,3}, 王家敏^{1,2}, 杨迪^{1,2}, 张家友^{1,2}, 乔自林^{1,2}, 马忠仁^{1,2}, 李倬^{1,2}, 刘振斌^{1,2}

1 西北民族大学 生物医学研究中心甘肃省动物细胞技术创新中心, 甘肃 兰州 730030

2 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, 甘肃 兰州 730030

3 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030

郭寿清, 廖月姣, 仇真毓, 刘耿, 王家敏, 杨迪, 张家友, 乔自林, 马忠仁, 李倬, 刘振斌. 转谷氨酰胺酶 2 抑制 H1 亚型流感病毒在 MDCK 细胞中的增殖. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1124-1137.

GUO SQ, LIAO YJ, QIU ZY, LIU G, WANG JM, YANG D, ZHANG JY, QIAO ZL, MA ZR, LI Z, LIU ZB. Transglutaminase 2 inhibits the proliferation of H1 subtype influenza virus in MDCK cells. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1124-1137.

摘要: 组织转谷氨酰胺酶 (transglutaminase 2, TGM2) 是一种普遍存在的多功能蛋白, 与不同细胞的粘附和肿瘤形成有关。有证据表明, TGM2 参与了宿主细胞与病毒间的相互作用, 但是对于流感病毒在细胞内增殖的影响还未有报道。为了探究 MDCK 细胞中 TGM2 对 H1N1 亚型流感病毒增殖的影响, 本研究构建了 TGM2 过表达和敲除的 MDCK 稳定细胞系, 感染 H1N1 亚型流感病毒 48 h 后检测病毒 NP 和 NS1 蛋白 mRNA 和蛋白表达水平的变化, 测定病毒滴度。结果显示, 过表达 TGM2 能够有效抑制 H1N1 亚型流感病毒的 NP、NS1 基因的表达, 而敲除 TGM2 可上调病毒 NP、NS1 基因的表达, 其中 NP 蛋白的蛋白表达情况与 mRNA 水平一致。病毒增殖曲线结果显示, TGM2 过表达后 H1N1 亚型流感病毒滴度显著降低, 而敲除 TGM2 后结果相反, 48 h 时病毒滴度在敲除细胞中达到高峰, 进一步证明 TGM2 在 MDCK 细胞中参与对 H1N1 亚型流感病毒增殖的抑制。通过对流感病毒应答信号途径下游基因的表达分析发现, TGM2 可能通过促进激活 JAK-STAT 分子途径和抑制 RIG-1 信号途径, 抑制 H1N1 亚型流感病毒增殖。以上发现对于揭示宿主细胞与病毒互作机制以及建立高产的流感疫苗生产基因工程细胞系具有重要意义。

Received: September 7, 2021; **Accepted:** November 30, 2021; **Published online:** December 24, 2021

Supported by: Science and Technology Plan of Gansu Province, China (20JR10RA121); Regional Science Fund of National Natural Science Foundation of China (32160164); Special Fund Project for Basic Scientific Research Business Expenses of Central Universities (31920210033); Key Research and Development Plan of Gansu Province-Social Development, China (21JR1RA222)

Corresponding authors: LI Zhuo. E-mail: smlz@xbmu.edu.cn

LIU Zhenbin. E-mail: liuzhenbin6@163.com

基金项目: 甘肃省科技计划 (20JR10RA121); 国家自然科学基金地区科学基金 (32160164); 中央高校基本科研业务费专项资金 (31920210033); 甘肃省重点研发计划-社会发展类 (21JR1RA222)

关键词: TGM2; MDCK 细胞; H1N1 亚型流感病毒

Transglutaminase 2 inhibits the proliferation of H1 subtype influenza virus in MDCK cells

GUO Shouqing^{1,3}, LIAO Yuejiao^{1,3}, QIU Zhenyu^{1,3}, LIU Geng^{1,3}, WANG Jiamin^{1,2}, YANG Di^{1,2}, ZHANG Jiayou^{1,2}, QIAO Zilin^{1,2}, MA Zhongren^{1,2}, LI Zhuo^{1,2}, LIU Zhenbin^{1,2}

1 Gansu Tech Innovation Center of Animal Cell, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

3 Life Science and Engineering College, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

Abstract: Transglutaminase 2 (TGM2) is a ubiquitous multifunctional protein, which is related to the adhesion of different cells and tumor formation. Previous studies found that TGM2 is involved in the interaction between host cells and viruses, but the effect of TGM2 on the proliferation of influenza virus in cells has not been reported. To explore the effect of TGM2 during H1N1 subtype influenza virus infection, a stable MDCK cell line with TGM2 overexpression and a knockout cell line were constructed. The mRNA and protein expression levels of NP and NS1 as well as the virus titer were measured at 48 hours after pot-infection with H1N1 subtype influenza virus. The results showed that overexpression of TGM2 effectively inhibited the expression of *NP* and *NS1* genes of H1N1 subtype influenza virus, while knockout of TGM2 up-regulated the expression of the *NP* and *NS1* genes, and the expression of the NP at protein level was consistent with that at mRNA level. Virus proliferation curve showed that the titer of H1N1 subtype influenza virus decreased significantly upon TGM2 overexpression. On the contrary, the virus titer in TGM2 knockout cells reached the peak at 48 h, which further proved that TGM2 was involved in the inhibition of H1N1 subtype influenza virus proliferation in MDCK cells. By analyzing the expression of genes downstream of influenza virus response signaling pathway, we found that TGM2 may inhibit the proliferation of H1N1 subtype influenza virus by promoting the activation of JAK-STAT molecular pathway and inhibiting RIG-1 signaling pathway. The above findings are of great significance for revealing the mechanism underlying the interactions between host cells and virus and establishing a genetically engineering cell line for high-yield influenza vaccine production of influenza virus.

Keywords: TGM2; MDCK cells; H1N1 subtype influenza virus

流感病毒 (influenza virus, IV) 是引起流感的病原体, 由于其 RNA 聚合酶缺乏复制校正机制, 变异很快, 曾造成 4 次世界范围内的大流行^[1], 其中 H1N1 通常与季节性流感病毒

有关, 威胁数百万人的健康^[2]。因此, 流感作为一种病毒性传染病不仅严重威胁着公众健康, 而且给社会带来了沉重的经济负担, 是一个世界性的公共卫生难题^[3]。目前, 接种疫苗

是预防流感感染最有效的手段。传统的流感疫苗是在鸡胚中生产的,虽然以鸡胚生产为基础的流感疫苗的有效性和安全性已经确定,但它们有以下缺点:生产能力有限,生产时间长,以及蛋源蛋白引起的过敏反应。近年来,以细胞培养为基础生产流感疫苗的生产技术受到了人们的关注。在一些欧洲国家,基于细胞培养生产流感疫苗的方法已经获得批准^[4-6]。目前有2种经监管部门批准的连续细胞系用于生产流感疫苗: Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞和非洲绿猴肾 (Vero) 细胞,已经被用于研究高致病性禽流感病毒 (highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV) 的增殖^[7-8]。这2种细胞系既可以在无血清培养基中悬浮培养,也可以在微载体中培养。MDCK 细胞是由 Madin 和 Darby 于 1958 年从可卡犬的肾脏组织中分离培育出来的细胞系。MDCK 细胞因其病毒生产效率高、快速增殖和低突变率而被认为是生产流感病毒的有效宿主^[9-10]。

组织转谷氨酰胺酶 2 (tissue transglutaminase 2, TGM2) 是一种普遍存在的多功能蛋白,作为转谷氨酰胺酶家族的重要成员,通过插入高度稳定的异肽键/或诱导多胺和组胺的共价结合来催化蛋白质的翻译后修饰^[11-12]。最初 TGM2 被认为是一种胞内酶,但越来越多的证据表明,该酶具有胞外活性,能够交联多种细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白,在细胞粘附和迁移中起重要作用。TGM2 除了参与调控 ECM 粘附外,还与肿瘤的形成有关。肿瘤细胞中 TGM2 的表达与细胞存活率和侵袭功能有关。有研究表明^[13], TGM2 通过蛋白质翻译后修饰参与了病毒与宿主细胞之间的相互作用, TGM2 上调通过炎症和氧化应激激活病毒感染细胞的应答过程,表明 TGM2 可能是一种抗病毒因子。TGM2 介导病毒感染细胞时进入人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency

virus, HIV)、复制人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 和包装丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 过程是交联的或多胺化的^[13-14]。值得注意的是, TGM2 可以作为宿主细胞防御系统,抵御 HPV 以外的病毒感染。在丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染的细胞中发现, TGM2 通过交联 HCV 核心蛋白形成二聚体,通过多胺化使 RNA 与 TGM2 结合,从而抑制丙型肝炎病毒复制^[15]。TGM2 蛋白质交联通过降低 HIV 感染过程中病毒传播而发挥作用。在 HIV 感染的单核/巨噬细胞中, TGM2 的表达上调导致单核/巨噬细胞病毒释放减少,从而表现出细胞凋亡^[16-17]。除了蛋白质翻译后修饰功能外, TGM2 还具有另一个功能,如 GTP 水解活性也可能有助于产生抗病毒活性。目前对于 TGM2 与病毒之间的互作关系及作用机制还不清楚,有待进一步研究。因此,本文探究 TGM2 如何参与调控 H1N1 亚型流感病毒增殖,将为进一步探究 TGM2 与病毒及其分子机制提供新的研究策略。

为了探究 TGM2 对 IAV 的影响,本研究构建了 TGM2 敲除和过表达细胞系,在此基础上研究不同细胞系感染 H1N1 亚型流感病毒后病毒基因的表达及病毒复制水平的变化,并对 TGM2 是否影响细胞增殖进行了分析,为了进一步分析 TGM2 是如何调控 H1N1 亚型流感病毒复制,我们利用定量 PCR 测定了常见细胞对于亚型流感病毒应答信号途径的下游基因的表达。这些研究有助于更全面理解宿主细胞与流感病毒相互作用机制以及 TGM2 的生物学功能,也为构建高产的基因工程疫苗细胞系提供依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞、质粒及病毒

慢病毒包装载体 psPAX2、pVSVG 以及

lentiCRISPR v2 敲除载体由本实验室保存; TGM2 过表达慢病毒 (TGM2-OE)、载体对照慢病毒 (Con) (病毒滴度: 10^9 TU/mL) 购于上海吉凯生物科技有限公司; MDCK 贴壁细胞 (ATCC, #CCL-34)、H1N1 亚型流感病毒 X-275 株由武汉生物制品研究所有限责任公司提供。

1.2 主要试剂和仪器

2×*Taq* Master Mix (P111-1) 购于 Vazyme; 引物购于艾基生物; 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (DP304) 购于 TIANGEN; Neno 配套转染试剂购于 Thermo; Puromycin 购于上海懋康生物科技有限公司; 无菌双蒸水 (ddH₂O)、0.25%胰酶、1×磷酸盐缓冲液 (PBS)、完全培养基、质粒、细胞冻存液购于 Ubigen; 移液器 (Thermo); CO₂ 培养箱 (Thermo); 超净工作台 (苏净安泰); 生物安全柜、台式冷冻离心机、小型台式高速离心机、电转移 (Thermo) 恒温水浴锅 (天津恒奥); PCR 仪 (柏恒); 微量紫外可见分光光度计 (Nanodrop); 电泳仪 (北京六一); 鼠源抗体 β-actin (Cell Signaling Technology); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 单克隆抗体 (美国 Jackson); PVDF 膜、超敏 ECL 化学发光液 (Millipore); Poly (I : C) 购于上海懋康生物科技有限公司。

1.3 TGM2 过表达稳定细胞系的构建及稳定细胞株的筛选

将生长状态良好的 MDCK 细胞均匀接种于 12 孔板中, 次日待细胞密度达到约 50%–70%时, 将 TGM2 过表达质粒以及阴性对照质粒通过慢病毒转染至 MDCK 细胞中, 12 h 后更换培养基为含 10%胎牛血清的 DMEM, 5% CO₂、37 °C 培养箱孵育 48 h 后在荧光显微镜下观察荧光表达情况并对细胞进行传代, 待细胞贴壁后加入 4 μg/mL 浓度的嘌呤霉素对细胞进行抗性筛选, 连续筛选 15 代后即获得 TGM2

过表达稳定细胞系。

1.4 TGM2 敲除靶点的筛选和 sgRNA 的合成

从 NCBI 中检索犬 TGM2 基因序列, 将序列输入 CRISPR 在线设计软件 (<http://crispr.mit.edu>) 中, 设计了 2 个特异性 sgRNA 序列 (TGM2-gRNA1: 5'-GTCCATCACCACGGCCGTCCAGG-3'; TGM2-gRNA2: 5'-AGGCCGACCGGGCGTTAGGCGG-3') 送生物公司合成。

1.5 敲除载体的构建

1.5.1 电转靶细胞及单克隆细胞株制备

取 3×10^6 个 MDCK 细胞悬液于无菌管中, 1 000×g 离心 5 min。弃上清, 细胞沉淀用 600 μL 缓冲液 R 重悬, 加入 30 μg 无内毒素的 CRISPR-UTM 表达质粒混合均匀。电击杯中加入 3 mL 缓冲液 E2, 随后放入电转仪的卡槽。使用 100 μL 电转枪头吸取细胞与质粒混合物, 插入电击杯中, 设置电转条件, 开始电击。电转完成后, 将细胞接种于 6 孔板中继续培养。转染 24–48 h 后, 镜下观察电转效果, 选择细胞活率及绿色荧光细胞百分率相对最佳的孔, 更换成含嘌呤霉素的培养基筛选 2–3 d, 筛选后将细胞消化成单细胞悬液, 进行细胞计数。

1.5.2 TGM2 敲除细胞株单克隆的筛选和测序鉴定

细胞接种至 96 孔板培养 1 d 后, 观察克隆的生长情况并标记。当细胞密度达到 40%–60% 时, 进行单克隆鉴定。将 96 孔板中的培养基倒干净, 加入 100 μL Ubigen 快速核酸释放试剂, 室温静置 10 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 细胞的核酸释放到上清中, PCR 扩增敲除区域。

1.6 定量 RT-PCR

提取生长状态良好的 TGM2-OE、Con、*tgm2*-KO、WT 细胞的总 RNA, 并用 Thermo 公司的酶标仪进行 RNA 浓度测定。然后以 1 μg 的 RNA 总量进行反转录, 以此 cDNA 为模板分

别按照荧光定量 PCR 反转录试剂盒和 All-in-One qPCR Mix 试剂盒说明设置实时荧光定量反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 35 s, 95 °C 延伸 30 s, 循环 40 次。在 Applied Biosystems 7500 荧光定量 PCR 仪中进行 RT-qPCR 反应, 所得数值均用内参 GAPDH 进行标准化。定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 运算方法进行分析。

1.7 蛋白免疫印迹(Western blotting)

待 T25 细胞培养瓶中的细胞铺满单层时, 用 PBS 清洗各组细胞样品 3-5 次, 然后用细胞刮收集细胞, 并向细胞培养瓶中加入 500 μ L RIPA 裂解液(裂解液中加入 1% 的 PMSF), 冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 调整每个样品蛋白浓度为 1.5 μ g/ μ L, SDS-PAGE 凝胶电泳后用湿转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 2 h; TGM2 一抗(1:1 000), β -actin 一抗(1:5 000) 4 °C 过夜孵育, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 用封闭液稀释相应的二抗, 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; TBS 洗膜 1 次, 约 10 min; ECL 显影作用 5 s, β -actin 曝光时间 1 s, TGM2 曝光 5 s。

1.8 细胞活性检测

取生长状态良好的 TGM2-OE、Con、tgm2-KO 和野生型 MDCK 细胞 (WT) 采用胰酶消化法制成细胞悬液, 调整细胞浓度至 4×10^3 细胞/mL, 接种于 24 孔细胞培养板, 每孔 0.5 mL, 于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养, 每 48 h 换液一次, 每隔 24 h 用胰酶消化计数, 每组做 3 个平行, 共计 10 d, 计算平均值, 并绘制细胞生长曲线。

1.9 平板克隆检测细胞克隆形成能力

取对数生长期细胞消化、离心, 培养基重

悬细胞调整细胞密度为 50 个/mL, 均匀接种于 6 孔板, 每孔加入细胞悬液 2 mL 后将 6 孔板放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 5-7 d, 每 2 天更换一次培养基, 观察克隆细胞数大于 50 个时终止培养, 弃上清, PBS 液清洗 2-3 次。用甲醇固定 20 min, 加入结晶紫染色液避光染色 20 min 左右, PBS 液清洗 2-3 次, 洗完后干燥拍照并计数。试验重复 3 次, 定量分析计数 > 50 个的细胞克隆数目, 克隆形成率 = 克隆数目/接种细胞数 \times 100%。

1.10 H1N1 亚型流感病毒感染和滴度测定

分别将 TGM2-OE、Con、tgm2-KO 和 WT 细胞均匀铺板于 12 孔板中, 待其细胞长满后, 用 PBS 将细胞清洗 1 次以去除细胞中残留的血清, 随后用含有 4 μ g/mL TPCK 胰酶 (MOI=0.01) 的 H1N1 亚型流感病毒分别感染两组细胞, 并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱吸附 1 h。1 h 之后, 更换为含有 4 μ g/mL TPCK 胰酶的无血清 DMEM 培养基继续培养并于 48 h 后分别收集细胞培养上清液。以 500 ng 的 Poly(I:C) 诱导处理 TGM2-OE、Con、tgm2-KO、WT 细胞, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 6、12、24、48 和 72 h 后, 收取细胞上清以及细胞样品, 最后用 TCID₅₀ 检测病毒滴度。统计结果后用 Reed-Muench 法计算病毒的半数细胞培养物感染量(TCID₅₀)

1.11 H1N1 亚型流感病毒的定量 RT-PCR

用 TRizol 法提取感染 H1N1 亚型流感病毒 48 h 的 TGM2 过表达、敲除细胞和野生型细胞样品总 RNA, 进行 3 次独立试验。通过测量分析每种总 RNA 样品的浓度和纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 数值范围需为 1.8-2.0。提取细胞 RNA 后, 将 RNA 反转录为 cDNA, 详细操作步骤按 SYBR[®]Premix Ex Taq TM kit 说明书进行, 同时设计 NP、NSI 基因上下游引物, 以

GAPDH 为内参基因。根据 CT 值比较 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算每个基因的拷贝数。使用 GraphPad Prism 5 软件中 *t* 检验平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 检查统计学上显著性差异。

1.12 H1N1 亚型流感病毒

Western blotting 的收获感染流感病毒 48 h 的 TGM2 过表达、载体对照、敲除细胞和野生型细胞样品, 进行 SDS-PAGE 电泳, 采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭液 (5%脱脂奶粉) 室温封闭 2 h, 然后加入 H1N1 亚型流感病毒 NP 蛋白抗体 1:1 000 倍稀释一抗, 室温孵育 2 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 1 h, TBST 洗 3 遍。采用底物显色试剂盒进行 X-ray 曝光显影。

1.13 数据分析

实验数据均以“平均值 \pm 标准差”表示, 用 GraphPad Prism 8.0 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析。*: $P<0.05$ 为差异显著; **: $P<0.01$, 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 MDCK 细胞中 TGM2 表达受到 H1N1 亚型流感病毒感染的影响

我们前期的研究对亚型流感病毒 H1N1 感染 MDCK 细胞前后的蛋白质组学进行比较分析发现, TGM2 的蛋白表达水平在 MDCK 细胞感染 H1N1 亚型流感病毒后显著降低 (图 1A), 进一步利用定量 RT-PCR 测定该基因 mRNA 水平的变化, 结果也显示 (图 1B), TGM2 的表达在 MDCK 细胞被流感病毒感染后受到抑制, 推测其功能可能涉及病毒与宿主细胞的相互作用。所以本研究进一步探究 MDCK 细胞中 TGM2 在流感病毒应答中的功能。

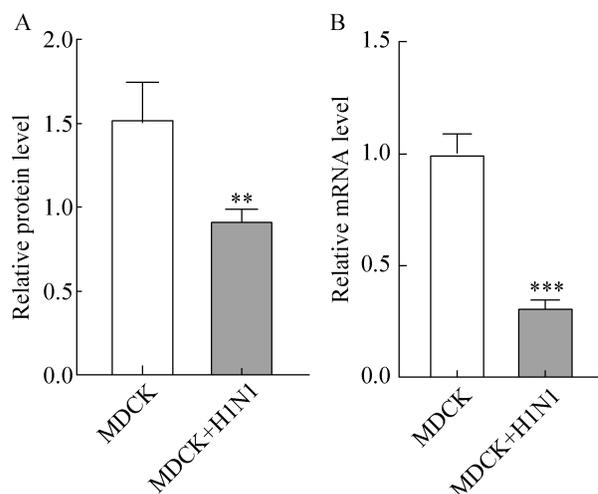


图 1 H1N1 亚型流感病毒感染 MDCK 细胞后 TGM2 表达情况

Figure 1 TGM2 expression in the MDCK cells infected with H1N1 subtype influenza virus. (A) Proteomics analysis of the changes of TGM2 gene expression in MDCK cells infected with influenza virus. (B) The expression of TGM2 gene mRNA in MDCK cells infected with H1N1 influenza A virus was detected by qPCR. MDCK (before H1N1 influenza virus infection); MDCK+H1N1 (after H1N1 influenza virus infection). The data are expressed as $\bar{x}\pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

2.2 TGM2 过表达抑制 H1N1 亚型流感病毒增殖

在前期研究基础上, 我们使用慢病毒载体介导的表达系统, 成功构建了 TGM2 过表达 MDCK 细胞系。结果显示 (图 2A), TGM2 基因 mRNA 水平在其过表达细胞中显著升高。蛋白表达水平与 mRNA 水平一致 (图 2B), 在 TGM2 过表达细胞系中, 其蛋白水平显著上调。TGM2 过表达载体转染 MDCK 细胞后, 荧光显微镜下看到明显的绿色荧光 (图 2C)。用 H1N1 亚型流感病毒分别感染 TGM2 过表达 (TGM2-OE)、对照细胞 (Control), 收取流感病毒感染 48 h 的细胞上清和细胞样品。用定量 RT-PCR 测定 NP、

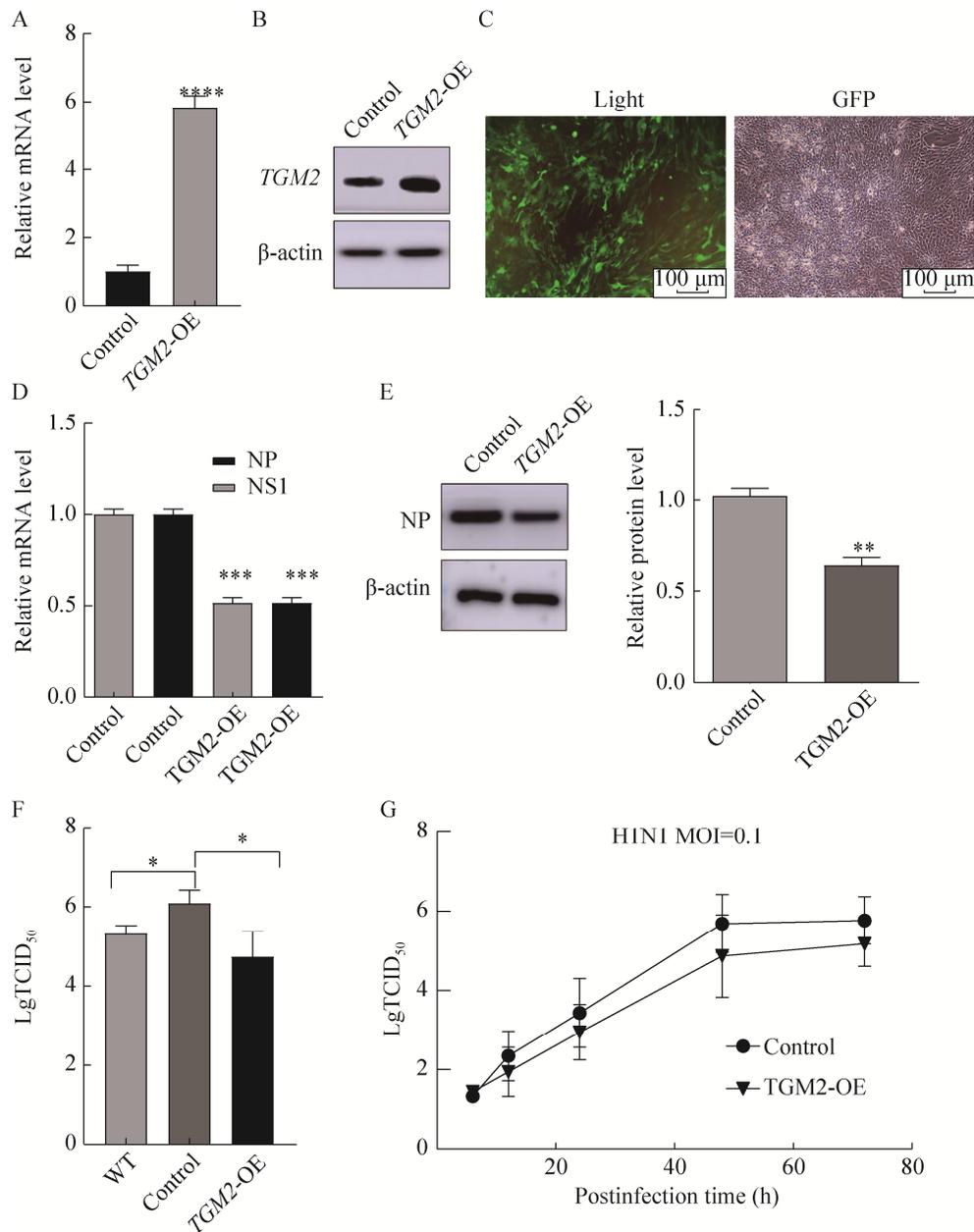


图2 *TGM2* 基因过表达对 H1N1 亚型流感病毒增殖水平影响

Figure 2 Effects of *TGM2*-overexpression on the proliferation of H1N1 subtype influenza virus. (A) Real-time PCR detection of *TGM2*-overexpression gene transcription in MDCK cells. (B) Western blotting detection of *TGM2* protein expression in *TGM2*-overexpressing cells. (C) Observation of MDCK cells (GFP labelled) transfected with lentivirus under fluorescence microscope (100 \times). (D) Effects of influenza virus infection on the transcription of NP and NS1 gene mRNA in *TGM2* overexpression cells. (E) Effects of *TGM2* overexpression on NP expression was detected by Western blotting. (F) TCID₅₀ was used to detect the effects of *TGM2*-overexpression on H1N1 subtype influenza virus (48 h) titer in MDCK cells. (G) H1N1 influenza virus growth curve (6, 12, 24, 48 and 72 h) on Con and *TGM2*-OE cells. Overexpression cell (*TGM2*-OE); vector control cells (Control). The data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

NS1 基因 mRNA 水平结果显示 (图 2D), TGM2 过表达后 NP 和 NS1 基因 mRNA 水平显著下调。之后进一步用 Western blotting 检测 NP 基因的蛋白表达情况, 结果显示 (图 2E), 与载体对照相比, TGM2 过表达细胞中 NP 蛋白表达量显著下调, 与 mRNA 水平结果一致。在病毒感染后的细胞上清中, TCID₅₀ 法检测病毒滴度, 结果显示 (图 2F), TGM2 过表达后, 与载体对照相比 (Control), 过表达细胞中流感病毒滴度显著降低, 载体对照细胞 (Control) 中流感病毒滴度高于野生型细胞 (WT)。用流感病毒分别感染 TGM2 过表达细胞 (TGM2-OE)、载体对照细胞 (Control), 并在感染后不同时间点进行取样与滴定并绘制流感病毒生长曲线结果显示 (图 2G), 流感病毒在 TGM2-OE 细胞系中复制能力低于 Control 细胞, TGM2-OE 细胞上收获的病毒滴度在各时间节点均低于载体对照细胞 (Control), 之后我们将进一步验证敲除细胞中流感病毒的增殖情况。

2.3 TGM2 基因敲除促进 H1N1 亚型流感病毒增殖

为了进一步确定 TGM2 调控亚型流感病毒增殖的功能, 我们利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 TGM2 基因敲除细胞系, 分别从 mRNA、蛋白水平上验证 TGM2 基因的敲除情况, 定量 RT-PCR 测定结果显示 (图 3A), TGM2 mRNA 水平在其敲除细胞中显著降低。蛋白表达水平与 mRNA 水平一致 (图 3B), 在 TGM2 基因敲除细胞系中, 其蛋白水平显著下调。图 3C 是敲除细胞形态图, 测序结果显示 (图 3D), 在 TGM2 编码基因的 4 号外显子上成功删除了 59 个核苷酸。定量 RT-PCR 测定流感病毒感染 48 h 时细胞上清和细胞样品 NP、NS1 基因 mRNA 水平结果显示 (图 3E), TGM2 基因敲除后 NP 和 NS1 基因 mRNA 水平显著上调。之后用

Western blotting 检测 NP 基因表达情况, 结果显示 (图 3F), TGM2 基因敲除细胞中 NP 蛋白表达量显著上调, 与 mRNA 结果一致。在流感病毒感染后的细胞上清中, 测定病毒滴度, 结果显示 (图 3G), TGM2 基因敲除后, MDCK 细胞中流感病毒滴度显著增加。用流感病毒分别感染 TGM2 基因敲除细胞 (tgm2-KO)、对照细胞 (WT), 并在感染后不同时间点进行取样与滴定, 流感病毒生长曲线结果显示 (图 3H), 流感病毒在 tgm2-KO 细胞系中复制能力高于 MDCK 细胞, 特别是在感染后的 48 h 时。病毒在感染后 48 h 时才达到复制高峰。所以综合 TGM2 基因过表达和敲除结果, 能够证明 TGM2 对 H1N1 亚型流感病毒的增殖具有抑制作用。

2.4 TGM2 抑制 MDCK 细胞增殖活性

为了探究 TGM2 敲除和过表达后是否对 MDCK 细胞增殖活性有影响, 我们分别使用胰酶消化法和平板克隆法比较不同细胞的增殖情况, 平板克隆结果显示 (图 4A、4D): 与载体对照细胞相比, 过表达细胞克隆形成能力显著降低, 而敲除细胞克隆形成能力显著增强。克隆形成率结果 (图 4B、4E) 与克隆形成结果一致, 胰酶消化结果如图 4C、4F 所示, 与过表达对照相比, 过表达细胞增殖活性显著降低, 而敲除细胞增殖活性高于对照细胞, 综合上述结果可知, TGM2 能显著抑制 MDCK 细胞的增殖。

2.5 TGM2 可能通过调控 JAK-STAT 或 RIG-1 信号途径参与调控 H1N1 亚型流感病毒复制

通过查阅文献, 我们关注了宿主细胞中主要的 H1N1 亚型流感病毒应答信号途径下游基因, 包括 IL-1、IL-8、IL-6、Mx1、ISG15、IFN- α , 用定量 PCR 分析其表达量变化结果显示 (图 5), 当敲除 TGM2 基因后, 流感病毒诱导感染的 IL-1、IL-8、IL-6 这几个促炎症细胞

的活化和细胞因子的产生。为了验证 Poly(I : C)模拟物是否对 TGM2 过表达细胞以及敲除细胞中流感病毒有影响, 我们分别用 Poly(I : C) 诱导刺激后收取 48 h 不同细胞上清, 用定量 RT-PCR 验证其 IL-1、IL-8、IL-6、Mx1、ISG15、IFN- α 的 mRNA 变化水平, 结果显示, IFN- α 、IL-1、IL-8、IL-6 下游基因在过表达细胞中显著下调, 在敲除细胞中显著上调。Mx1、ISG15 在过表达细胞中显著上调, 敲除细胞中显著下调。综合上述结果说明, 在 poly

(I : C) 刺激下, 能够诱导 RIG-1 信号通路以及 JAK-STAT 信号途径及其下游相关基因的表达量发生变化, IL-1、IL-6 和 IL-8 在其 RIG-1 信号途径下游, 在流感病毒感染的敲除和过表达 TGM2 细胞中其表达量差异倍数显著, 这表明, TGM2 可能影响了细胞内的 RIG-1 信号通路, 而 Mx1、ISG15 存在于 JAK-STAT 信号途径中, 所以我们推测, TGM2 可能通过调控 RIG-1 信号通路以及 JAK-STAT 信号途径参与调控 H1N1 亚型流感病毒复制。

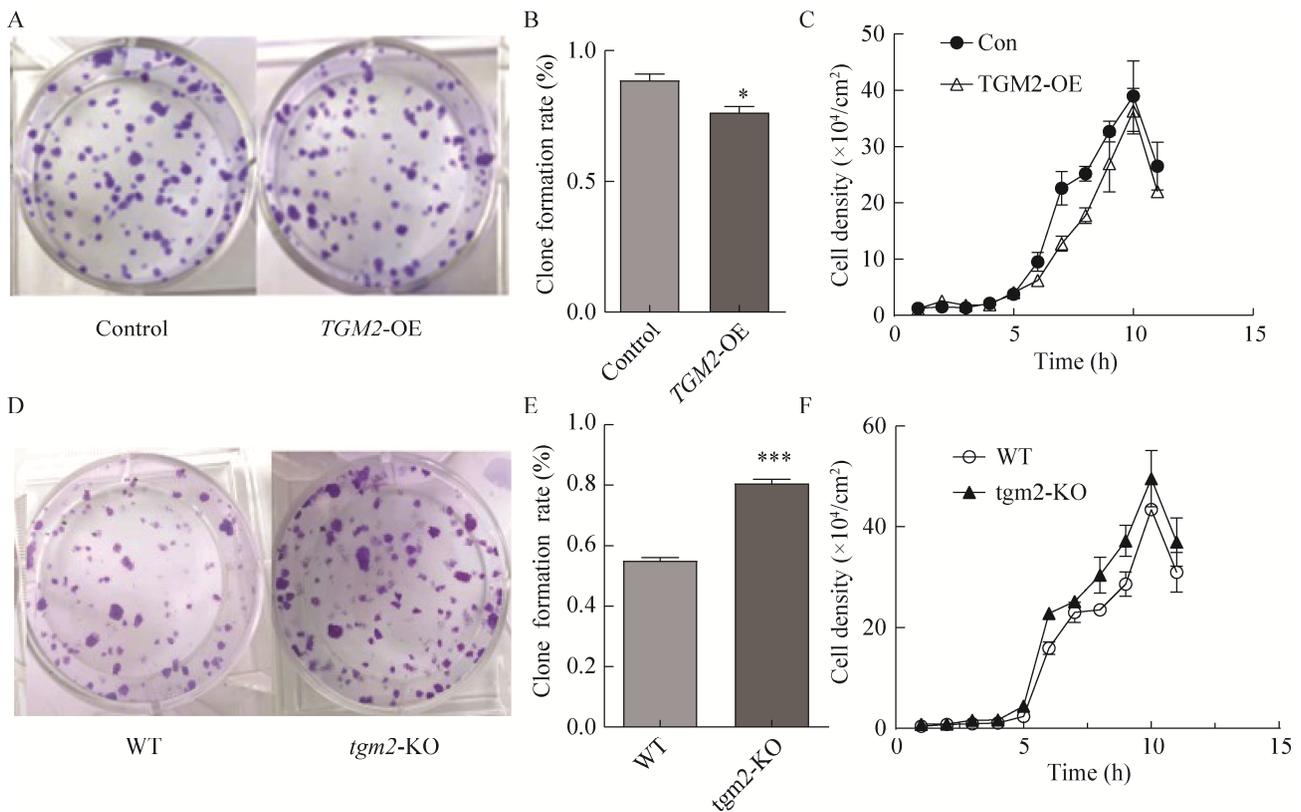


图 4 MDCK 细胞增殖活性检测

Figure 4 Detection of MDCK cell proliferation activity. (A) Effects of *TGM2*-overexpression on the clonal ability of MDCK cells. (B) Detection of the clonal formation rate of *TGM2*-overexpressing cells. (C) Detection of the effect of *TGM2*-overexpression on the proliferation of MDCK cells by trypsin digestion. (D) Detection of the clonal formation rate of *TGM2*-knockout cells. (E) Detection of the clonal formation rate of *TGM2*-knockout cells. (F) Detection of the effects of *TGM2*-knockout on the proliferation of MDCK cells by trypsin digestion. *TGM2*-overexpressing cells: *TGM2*-OE; *TGM2* vector control cells: Control; *TGM2*-knockout cells: *tgm2*-KO; wild-type control cells: WT. The data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

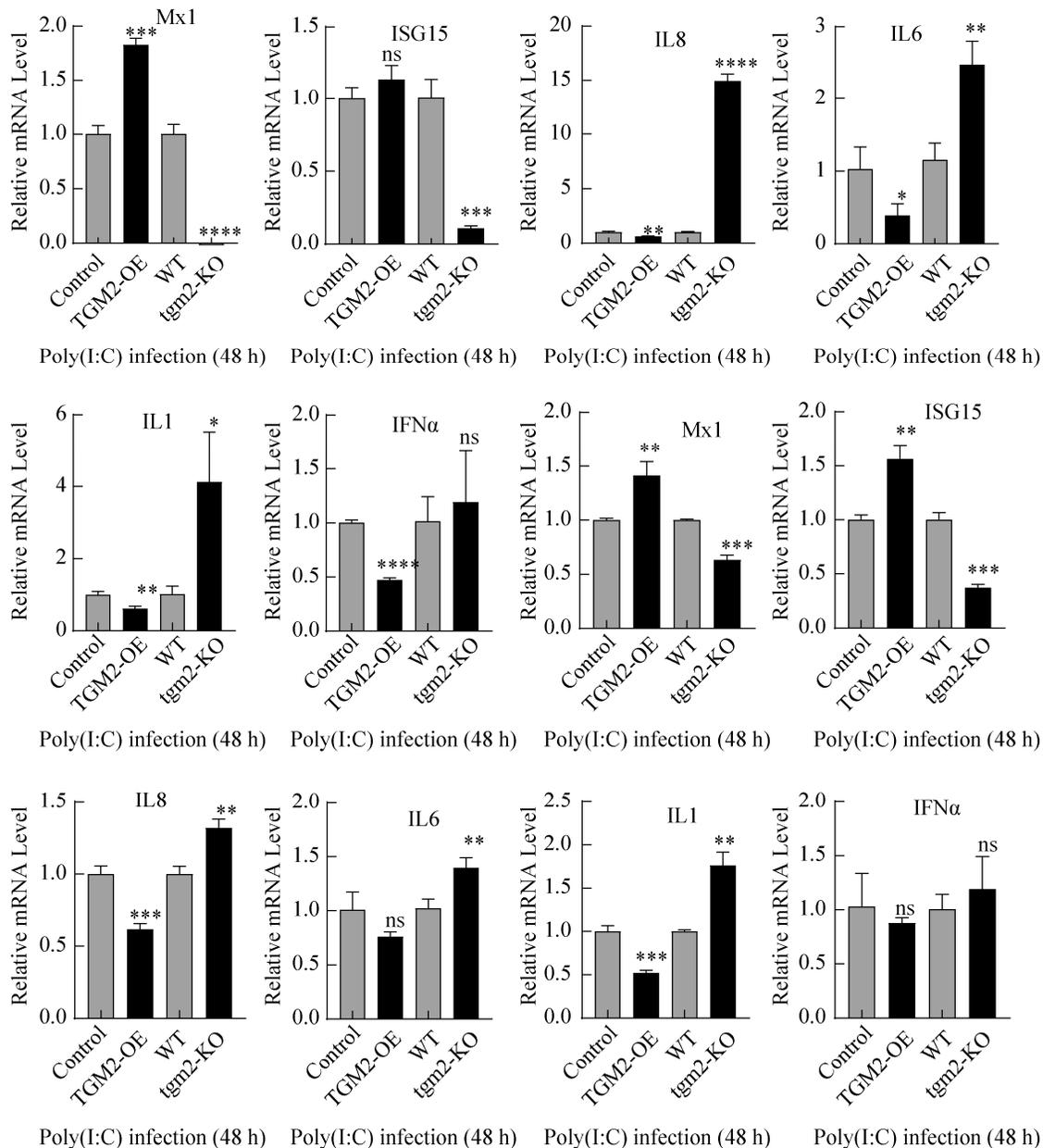


图5 TGM2 介导 H1N1 亚型流感病毒以及 Poly(I : C) 处理野生型细胞 (WT)、敲除细胞 (tgm2-KO)、载体对照细胞 (Control)、过表达细胞 (TGM2-OE) 的干扰素、炎症因子及干扰素刺激基因的产生

Figure 5 TGM2 mediates the production of interferon, inflammatory factors and interferon-stimulating genes in wild-type cells (WT), TGM2-knockout cells (tgm2-KO), vector control cells (Control) and TGM2-overexpressing cells (TGM2-OE) treated with poly(I : C). The relative mRNA expression levels of IFN- α , IL-1, IL-8, IL-6, Mx1 and ISG15 were detected by real-time RT-PCR in TGM2-knockout cells, overexpressing cells, vector control cells at 48 hours post-infection with H1N1 influenza virus or treatment with poly(I : C) (0.5 μ g/mL). The data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

3 讨论

TGM2 是一种钙依赖酶，与细胞膜上的 β 1

整合素和纤维连接蛋白相结合，参与细胞骨架的形成和胞外基质粘附过程。有研究表明，TGM2 也参与调控不同细胞的增殖，比如，在

外胚间充质干细胞 (ectomesenchymal stem cells, emscs) 细胞中, 体外分离和培养的 EMSCS 能够分泌多种神经营养因子, 包括神经生长因子 (nerve growth factor, ngf)、神经营养因子 3 (neurotrophin3, nt-3) 和 BDNF, 它们在神经细胞的增殖、分化过程中起重要作用^[18-19]。而 TGM2 过表达在 EMSCS 中通过促进细胞外基质 (extracellular matrix, ecm) 的沉积和内源性神经因子的交联, 促进 EMSCS 细胞的增殖和分化。此外, 在胶质瘤细胞中, TGM2 基因敲除抑制了该细胞的增殖并降低胶质瘤细胞 ID1 的表达, ID1 是 TGM2 调控胶质瘤细胞增殖的下游介质, 同时 TGM2 能通过 PI3K/Akt 通路来调节 ID1 的表达来调控胶质瘤细胞的增殖。在胃癌细胞中, TGM 家族中的 TGM1 能够正向调控 Wnt/ β -catenin 信号通路, Wnt 信号通路的激活与细胞增殖和细胞凋亡有关^[20-21], 有关 TGM1 是否能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路参与其他细胞增殖的研究目前报道很少, TGM2 与 TGM1 同为一个家族, 是否也能够通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控不同细胞的增殖还有待研究。影响细胞增殖的分子途径有很多, 如整合素/黏着斑激酶、mTOR 信号通路、MAPK、NF- κ B 等^[22]。而在本研究中, 在 MDCK 细胞上将 TGM2 基因敲除后能够显著增强 MDCK 细胞的增殖, 而 TGM2 过表达则显著抑制该细胞的增殖, 说明 MDCK 细胞中 TGM2 参与到细胞增殖的负调控过程。推测可能是 TGM2 的表达则在不同细胞类别上有差异, 由于 MDCK 细胞的一些特性影响了该基因的表达。在 MDCK 细胞上, TGM2 是通过何种方式调控细胞增殖的目前尚未可知, 这个问题将作为我们下一步的研究重点。

TGM2 主要定位于细胞外, 包括质膜和细

胞外基质 (ECM)^[23]。在 TGM2 的众多功能中, TGM2 介导的蛋白质翻译后修饰功能参与了病毒复制过程。TGM2 抑制病毒复制可以通过宿主细胞蛋白的翻译后修饰改变蛋白质-蛋白质之间的相互作用, 并阻止病毒-宿主蛋白复合物的形成。有研究表明, TGM2 能够间接调控 HIV 病毒的复制, EIF-5A 在 HIV 复制过程中起着重要作用, TGM2 通过改变 EIF-5A 的活性来调控 HIV 的复制。已知热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 与多种病毒相互作用, 在体外实验中, HSP 被证明是 TGM2 的底物, TGM2 可能会影响 HSP 的 ATP 依赖伴侣活性以及 HSP 与病毒蛋白之间的相互作用^[24]。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 与流感病毒、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒能够相互作用, GAPDH 在细胞质中的丰度和 RNA 的不稳定性表明 GAPDH 可以直接影响病毒的翻译和复制^[25], GAPDH 是 TGM2 的酰基受体^[26]。在本实验中, 敲除 TGM2 基因后促进了 H1N1 亚型流感病毒在 MDCK 细胞中的增殖, 相反地, 过表达 TGM2 基因后抑制了 H1N1 亚型流感病毒增殖活性, 本文结果与之前文献报道的 TGM2 基因是抗病毒基因一致。此外, 在 MDCK 细胞上作了信号途径分析发现, 与对照组相比, 在 TGM2 敲除的 MDCK 细胞系中, 由病毒感染所引起的 IL-1、IL-8、IL-6 表达量上调, 在 TGM2 过表达的 MDCK 细胞系中其表达量受到抑制。由此推测 TGM2 可以通过抑制 RIG-1 信号途径, 抑制 H1N1 亚型流感病毒的复制。JAK-STAT 信号通路的 Mx1、ISG15 下游因子, 有文献报道, OAS 介导的 RNASEL 途径、MxA 介导的 Mx GTPase 途径和 ISG15 介导的泛素化途径已被证实可以抑制病毒转录, 抑制病毒 RNA 转录, 抵抗病毒蛋白翻译后修饰功能, 从而抑制病毒复制^[27]。在 MDCK 细

胞中, 由病毒感染所引起的 Mx1、ISG15 的表达受到 TGM2 敲除后的抑制, 在 TGM2 过表达 MDCK 细胞系中, Mx1、ISG15 的表达上调, 进一步说明 TGM2 通过激活 JAK-STAT 信号途径, 抑制 H1N1 亚型流感病毒复制。poly(I : C) 能够诱导 NF- κ B 的活化和细胞因子的产生。除了 TLR3 能识别 dsRNA 外, RIG-1 也能够识别 dsRNA 并引起 I 型干扰素和炎性细胞因子的产生。在本研究中, 定量 RCR 结果表明, poly(I : C) 能够诱导 IL-1、IL-8、IL-6、IFN- α 基因在 TGM2 敲除细胞中上调表达, 在 TGM2 过表达细胞中下调表达, Mx1、ISG15 在 TGM2 敲除细胞中表达下调, TGM2 过表达细胞中表达上调。进一步说明, 在 MDCK 细胞中 TGM2 调控 H1N1 亚型流感病毒的 RIG-I 和 JAK-STAT 信号通路发挥了重要调控作用。JAK/STAT 通路的抗病毒活性是抗病毒免疫应答的重要靶点, 结合本文结果, 我们推测, TGM2 可能通过激活 JAK-STAT 信号通路和抑制 RIG-1 信号途径, 抑制 H1N1 亚型流感病毒的增殖。我们将进一步探索和挖掘 JAK/STAT 分子途径和 RIG-1 信号途径如何调控 TGM2 与流感病毒的互作关系, 以便更好地帮助我们全面理解宿主细胞与流感病毒互作机制以及 TGM2 发挥的抗病毒作用。

目前有关 TGM2 调控流感病毒增殖的研究尚未报道, 在本研究中我们首次发现, 在 MDCK 细胞上 TGM2 对 H1N1 亚型流感病毒有抑制作用, 我们推测主要通过激活 JAK/STAT 分子途径和抑制 RIG-1 信号途径, 抑制流感病毒复制。同时我们发现, TGM2 参与调控 MDCK 细胞增殖过程。我们期望进一步了解 TGM2 蛋白在流感病毒增殖中的作用, 更好地理解病毒与宿主细胞之间的互作关系以及 TGM2 的生物学功能, 也为构建高产的基因工程疫苗细胞系提供依据。

REFERENCES

- [1] Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *Ann NY Acad Sci*, 2014, 1323(1): 115-139.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [3] Sano K, Aina A, Suzuki T, et al. The road to a more effective influenza vaccine: up to date studies and future prospects. *Vaccine*, 2017, 35(40): 5388-5395.
- [4] Barrett PN, Berezuk G, Fritsch S, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a vero-cell-culture-derived trivalent influenza vaccine: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2011, 377(9767): 751-759.
- [5] Halperin SA, Smith B, Mabrouk T, et al. Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children. *Vaccine*, 2002, 20(7/8): 1240-1247.
- [6] Ehrlich HJ, Müller M, Oh HML, et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Engl J Med*, 2008, 358(24): 2573-2584.
- [7] Govorkova EA, Kodihalli S, Alyмова IV, et al. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. *Dev Biol Stand*, 1999, 98: 39-51, 73-74.
- [8] Hu AY, Weng TC, Tseng YF, et al. Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of influenza H5N1 vaccines. *Vaccine*, 2008, 26(45): 5736-5740.
- [9] Merten OW, Kallel H, Manuguerra JC, et al. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnology*, 1999, 30(1/3): 191-201.
- [10] Taub M, Chuman L, Saier MH Jr, et al. Growth of Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCK) line in hormone-supplemented, serum-free medium. *PNAS*, 1979, 76(7): 3338-3342.
- [11] Chen JS, Mehta K. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(8): 817-836.
- [12] Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(2): 140-156.
- [13] Mariniello L, Esposito C, Gentile V, et al. Transglutaminase covalently incorporates amines into human immunodeficiency virus envelope glycoprotein

- gp120 *in vitro*. *Int J Pept Protein Res*, 1993, 42(2): 204-206.
- [14] Jeon JH, Choi KH, Cho SY, et al. Transglutaminase 2 inhibits Rb binding of human papillomavirus E7 by incorporating polyamine. *EMBO J*, 2003, 22(19): 5273-5282.
- [15] Lu W, Strohecker A, Ou JH. Post-translational modification of the hepatitis C virus core protein by tissue transglutaminase. *J Biol Chem*, 2001, 276(51): 47993-47999.
- [16] Mariniello L, Esposito C, Di Pierro P, et al. Human-immunodeficiency-virus transmembrane glycoprotein gp41 is an amino acceptor and donor substrate for transglutaminase *in vitro*. *Eur J Biochem*, 1993, 215(1): 99-104.
- [17] Bergamini A, Capozzi M, Piacentini M. Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) stimulation induces cell death in HIV-infected human monocytes. *Immunol Lett*, 1994, 42(1/2): 35-40.
- [18] Pollock K, Dahlenburg H, Nelson H, et al. Human mesenchymal stem cells genetically engineered to overexpress brain-derived neurotrophic factor improve outcomes in Huntington's disease mouse models. *Mol Ther*, 2016, 24(5): 965-977.
- [19] Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1982, 1(5): 549-553.
- [20] Sherwood V. WNT signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism? *Mol Cell Biol*, 2015, 35(1): 2-10.
- [21] Pai P, Rachagani S, Dhawan P, et al. Mucins and Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers: an unholy nexus. *Carcinogenesis*, 2016, 37(3): 223-232.
- [22] Hao NB, Tang B, Wang GZ, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) upregulates heparanase expression via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway for gastric cancer metastasis. *Cancer Lett*, 2015, 361(1): 57-66.
- [23] Zemskov EA, Janiak A, Hang J, et al. The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions. *Front Biosci*, 2006, 11(1): 1057-1076.
- [24] Mayer MP. Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2005, 153: 1-46.
- [25] Petrik J, Parker H, Alexander GJM. Human hepatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds to the poly(U) tract of the 3' non-coding region of hepatitis C virus genomic RNA. *J Gen Virol*, 1999, 80(12): 3109-3113.
- [26] Cooper AJL, Sheu KFR, Burke JR, et al. Transglutaminase-catalyzed inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and -ketoglutarate dehydrogenase complex by polyglutamine domains of pathological length. *PNAS*, 1997, 94(23): 12604-12609.
- [27] Strandén AM, Staeheli P, Pavlovic J. Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology*, 1993, 197(2): 642-651.

(本文责编 陈宏宇)