

衣壳蛋白靶向灭活策略应用于抗登革病毒感染的研究

秦成峰 姜 涛 陈水平 于 曼 秦鄂德*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 衣壳蛋白靶向病毒灭活是近年来新兴的抗病毒策略。为探索该策略在抗登革病毒感染中的应用,首先建立了稳定表达登革 2 型病毒衣壳蛋白(D2C)与葡萄球菌核酸酶(SN)融合蛋白 D2C-SN 的哺乳动物细胞系,然后以登革病毒攻击上述细胞系,研究表达的融合蛋白 D2C-SN 对产生的子代病毒颗粒感染性的影响。结果表明融合蛋白 D2C-SN 能够在病毒装配过程中与野生型衣壳蛋白共组装入子代病毒颗粒内部,并导致病毒基因组的降解。与正常 BHK 细胞相比较,融合蛋白 D2C-SN 可导致产生的子代病毒感染性滴度降低 $10^3 \sim 10^4$, 显示出很强的抗病毒效果。

关键词 登革病毒,衣壳蛋白,靶向核酸酶,抗病毒

中图分类号:R373 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)01-0111-05

登革病毒(Dengue virus)感染导致的登革热/登革出血热是目前世界上分布最广、发病人数最多、危害较为严重的一类蚊媒病毒性疾[1]。自上世纪 80 年代以来,登革热/登革出血热在世界范围内的暴发流行日益频繁,尤其是在热带及亚热带地区,登革病毒感染导致的发病率及病死率急剧上升,我国南方及东南沿海各省区也是登革热/登革出血热的高发区。由于目前缺乏有效的疫苗和抗病毒药物,登革病毒感染已经成为世界性公共卫生难题。

衣壳蛋白靶向病毒灭活(Capsid-targeted virus inactivation,CTVI)是近年来新兴的抗病毒策略[2],该策略的基本原理在于通过病毒的衣壳蛋白将核酸酶靶向地导入到病毒颗粒内部,从而达到灭活病毒的目的。而登革病毒衣壳蛋白富含碱性氨基酸,能够与其基因组 RNA 结合形成松散的“鸟笼状”核衣壳结构[3],这为引入抗病毒蛋白提供了可能。本研究中我们建立了稳定表达登革 2 型病毒衣壳蛋白(D2C)与葡萄球菌核酸酶(SN)融合蛋白 D2C-SN 的哺乳动物细胞系,然后攻击登革病毒,在此基础上分析了表达的融合蛋白 D2C-SN 对子代病毒感染性的影响,为衣壳蛋白靶向病毒灭活策略应用于抗人类登革病毒感染奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞 登革 2 型病毒 43 株(D2-43)为

我室于 1987 年从广西登革热病人血清中分离,经乳鼠脑传至第三代。地鼠肾传代细胞 BHK21 及白纹伊蚊 C6/36 均为我室保存。

1.1.2 抗体 抗登革 2 型病毒衣壳蛋白的鼠单克隆抗体 mAb 8H8 为古巴热带医学研究所 M 赠送。兔抗 SN 血清为本室制备。HRP 标记相应 IgG 为 Sigma 公司产品。

1.1.3 主要试剂和仪器 pfx 高保真 DNA 聚合酶、Blasticidin 等购自 Invitrogen 公司;SuperscriptTM II 逆转录酶为 Gibco 公司产品;RNA 小提试剂盒、限制性内切酶、 ϕ X174 质粒 DNA 等均购自 TaKaRa 公司。Mini Protean II 电泳系统为 Bio-Rad 公司产品;PCR system 2000 为 Perkin Elmer 公司产品,超速冷冻离心机为 Beckman 公司产品。

1.2 工程细胞系的建立

采用高保真 PCR 的方法从构建的原核表达载体中扩增获得编码 D2C-SN 及 D2C-SN* 基因的 DNA 片段,将其插入真核表达载体 pcDNA6/V5-His 后,分别构建成功重组质粒 pc/D2C-SN 及 pc/D2C-SN*,详见文献[4]。BHK21 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中。通过电穿孔的方法将重组质粒分别转染 BHK21 细胞。然后在 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Blasticidin 压力下筛选抗性克隆,扩大培养后,分别通过 RT-PCR、间接免疫荧光及 Western blot 鉴定表达的目的蛋白。将稳定表达融合蛋白 D2C-SN 及其核酸酶活性突变对照体 D2C-SN* 的工程细胞系分别命名为

基金项目 国家自然科学基金(30100006)

* 通讯作者。Tel 86-10-66948614 Fax 86-10-63898239 E-mail qincede@sohu.com

作者简介 秦成峰(1979-)男,山东蒙阴人,硕士研究生,主要从事分子病毒学研究。E-mail:cfqin@hotmail.com

收稿日期 2004-07-27,修回日期 2004-10-25

BHK/D2C-SN 和 BHK/D2C-SN*。

1.3 病毒感染性滴度测定

按 $M.O.I = 0.1$ 感染剂量分别向生长良好的 BHK/D2C-SN、BHK/D2C-SN* 及正常 BHK21 细胞接种登革病毒, 37°C 吸附 1h, 弃尽感染液, 加入含 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液。37°C 继续培养, 每日收集细胞培养上清, 离心后用于病毒感染性滴度测定。病毒感染性滴度测定采用细胞病变法。用 96 孔微量滴定板培养 C6/36 细胞, 将待测病毒液 10 倍系列稀释后按 0.1mL/孔接种。37°C 培养并连续观察细胞病变; 按照 Reed-Muench 法计算病毒滴度 ($\lg TCID_{50}/mL$)。

1.4 病毒颗粒的浓缩和纯化

病毒感染后 5d, 收集细胞培养上清, 4°C 10000g 离心 20 min 沉淀细胞碎片。加入 40% PEG 6000 溶液(含 15% NaCl)使终浓度分别达到 8% 和 2.5%。4°C 静置过夜。然后 10000g 离心 40 min。弃上清, 沉淀重悬于 VSB 液(0.1mol/L NaCl, 0.01mol/L Tris-HCl)中。

采用蔗糖密度梯度离心纯化病毒颗粒。向水平离心管中加入 5mL 60% 蔗糖溶液作为梯度的底层, 上层加入 3mL 10% 蔗糖溶液。反复冻融 3 次, 获得 10% ~ 60% 蔗糖梯度。上样 0.5mL 浓缩后的病毒悬液。4°C、28000g 离心 3 h。强光下观察, 轻轻用穿刺针取出相应病毒条带。分别以抗 D2C 的鼠单克隆抗体 mAb 8H8 和兔抗 SN 血清作为一抗, 以相应 HRP 标记的 IgG 作为二抗, 对纯化的病毒颗粒进行 Western blot 分析。

1.5 核酸酶活性分析

采用体外 DNA 消化试验鉴定 SN 的核酸酶活性。纯化的病毒颗粒重悬于 TN 缓冲液(40mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.1mol/L NaCl)中, 煮沸 5min。再加入含 500 ng ϕ X174 质粒 DNA 的反应液(0.1mol/L Tris-HCl pH 8.8, 10mmol/L $CaCl_2$), 37°C 反应 30min, 0.5mol/L EDTA 终止反应。反应毕用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查质粒 DNA 的降解情况。

1.6 病毒颗粒中完整基因组含量分析

用 TaKaRa MiniBEST RNA/DNA Extraction 试剂盒提取病毒 RNA, 10 倍梯度稀释后以靠近基因组 3' 端的反向引物 R9854(5'-CACATTTGGCGCTAGGA CT-3')进行逆转录, 反应体系为: 模板 RNA 10 μ L, 引物 R9854 2 μ L, 80°C 作用 5min; 依次加入 RNasin 1 μ L, 5 \times 1st strand buffer 6 μ L, dNTPs 1.5 μ L, DTT 3 μ L, 补水至 30 μ L, 然后加入 SuperscriptTM II 逆转录酶 1.5 μ L

(200U/ μ L), 72°C 反应 120 min, 最后于 95°C 灭活 5min, 直接用于 PCR 检测。分别以靠近 5' 端的 F3545 (5'-TCAGGACCCGACTAGGAACGAA-3') 和 R3844 (5'-TTGTAATATCACTGCATTTGG-3') 作为上、下游引物进行 PCR 扩增, 循环参数为: 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 45s, 30 个循环; 72°C 7min。反应产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 for windows 进行统计学分析, $p < 0.01$ 时, 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 工程细胞系的建立

为了能够在细胞水平探讨登革病毒衣壳蛋白靶向病毒灭活的应用, 我们将构建的重组质粒 pc/D2C-SN 转染 BHK21 细胞, 经压力筛选获得了可稳定表达融合蛋白 D2C-SN 的工程细胞系 BHK/D2C-SN。表达的融合蛋白相对分子量大小约为 30 kD, D2C 与 SN 之间通过 6 个氨基酸相连接。同步建立了稳定表达融合蛋白 D2C-SN* 的细胞系 BHK/D2C-SN* 用作对照。SN* 与 SN 相比存在两个氨基酸突变, 可导致 SN 核酸酶活性完全丧失^[5]。在此基础上, 用登革病毒感染上述工程细胞系及正常 BHK21 细胞, 分析登革病毒衣壳蛋白靶向灭活的抗病毒效果。

2.2 融合蛋白 D2C-SN 的装配活性鉴定

病毒感染后 5d 后, 分别收集各细胞系培养上清中产生的病毒颗粒, 经蔗糖密度梯度离心纯化后, 进行 Western blot 分析(图 1)。结果表明在 BHK/D2C-SN 及 BHK/D2C-SN* 细胞中产生的病毒颗粒中均可

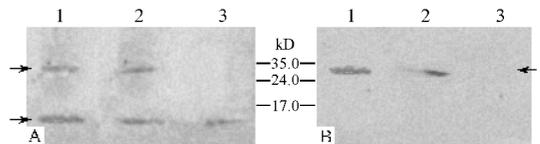


图 1 子代病毒颗粒的 Western blot 分析

Fig.1 Analysis of progeny virions from dengue-infected cell cultures by Western blot assay with mAb 8H8 (A) and antisera against SN (B)

The fusion proteins D2C-SN were indicated by a double arrow and D2C a single arrow. Lane 1 ~ 3: Purified virions from BHK/D2C-SN, BHK/D2C-SN* and BHK21 cell cultures, respectively.

检测到能够同时被抗 D2C 单抗 mAb 8H8 及抗 SN 血清特异识别相对分子量约为 30 kD 的融合蛋白 D2C-SN 的存在, 而正常 BHK21 细胞上清中仅可检测到大小为 11kD 的野生型 D2C。这说明在 BHK/D2C-SN 及 BHK/D2C-SN* 细胞中增殖产生的子代病毒颗粒

中分别存在相应的融合蛋白 D2C-SN 和 D2C-SN*。也即融合蛋白 D2C-SN/D2C-SN* 在野生型 D2C 组装过程中被共组装入病毒颗粒内部。

2.3 装配入病毒颗粒内部的 D2C-SN 的核酸酶活性分析

为进一步证实装配入病毒颗粒内部的融合蛋白 D2C-SN 仍具有核酸酶活性,能够对病毒基因组进行降解,我们以噬菌体 ϕ X174 RFI DNA 作为反应底物进行体外 DNA 消化试验。结果表明(图 2)在 BHK/D2C-SN 细胞中增殖产生的病毒颗粒呈现出良好的核酸酶活性,能够使 DNA 降解。而且病毒颗粒经尿素预处理后,核酸酶活性明显增强,这进一步证实了融合蛋白 D2C-SN 被装配于病毒颗粒内部;同时经 EDTA 处理去除 Ca^{2+} 后,其核酸酶活性消失,这与 SN 的生化特性完全吻合。对照组 BHK/D2C-SN* 及 BHK21 细胞中增殖产生的子代病毒颗粒则无论进行何种处理均不能呈现核酸酶活性。这些结果表明装配入病毒颗粒内部的 D2C-SN 具有良好的核酸酶活性,能够对病毒基因组进行切割。

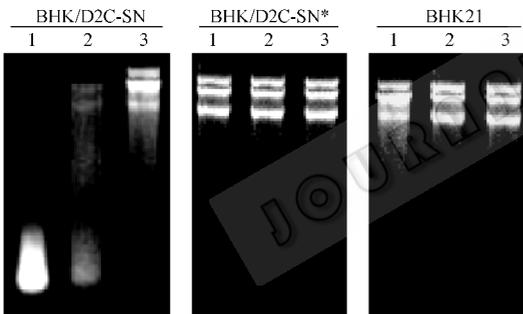


图 2 子代病毒颗粒中融合蛋白 D2C-SN 的核酸酶活性分析

Fig.2 Analysis of nuclease activity by *in vitro* DNA digestion assay
Samples were pre-treated with 3mol/L urea (lane 1) or 5mol/L EDTA (lane 3).

2.4 子代病毒颗粒中 D2C-SN 对基因组降解作用

为获得装配入病毒颗粒内部的融合蛋白 D2C-SN 降解病毒基因组 RNA 的直接证据,我们通过 RT-PCR 的方法,对子代病毒颗粒中完整基因组的含量进行了分析。结果表明(图 3),BHK/D2C-SN 细胞中产生的子代病毒颗粒与 BHK21 细胞及 BHK/D2C-SN* 细胞产生的子代病毒颗粒相比较,完整基因组的 RNA 的含量至少下降了 $10^2 \sim 10^3$ 。这说明,装配入病毒颗粒内部的具有核酸酶活性的 D2C-SN 能够与病毒基因组“接触”并使其降解,显示出潜在的抗病毒能力。

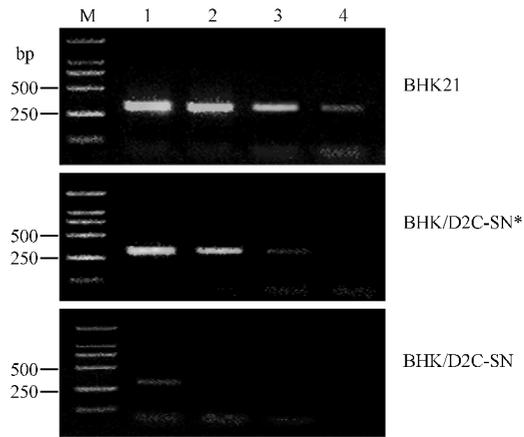


图 3 子代病毒颗粒中完整基因组含量分析

Fig.3 Analysis of content of full genome RNA by RT-PCR

1~4: Result of RT-PCR from progeny virions RNA and $10^{-1} \sim 10^{-3}$ diluted RNA respectively; M: DNA Marker.

2.5 融合蛋白 D2C-SN 对登革病毒增殖的抑制

为进一步观察登革病毒衣壳蛋白靶向病毒灭活策略的抗病毒效果,收集病毒感染后 2~8d 各细胞系中产生的子代病毒颗粒并测定其感染性滴度。结果表明(图 4)BHK/D2C-SN 细胞中产生的子代病毒感染性滴度明显降低。统计学分析表明 p 值远小于 0.01,各组间具有显著差异。病毒感染 5d 后 BHK/D2C-SN* 细胞中产生的病毒(D2C-SN* 组)与正常 BHK21 细胞(Mock 组)中产生的病毒感染性滴度差异仅在 2~4 倍之间,而 BHK/D2C-SN 细胞中产生的病毒(D2C-SN 组)与 Mock 组相比,感染性滴度下降倍数高达 $10^3 \sim 10^4$,显示出很强的抗病毒效果。

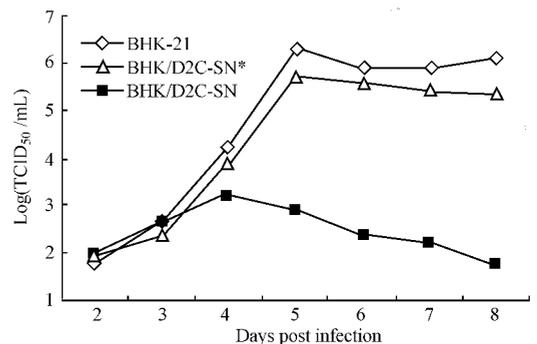


图 4 融合蛋白 D2C-SN 的抗病毒效果

Fig.4 Antiviral effect of D2C-SN fusion protein in BHK cell cultures

3 讨论

理论上讲,衣壳蛋白靶向病毒灭活策略与目前流行的基于核苷酸水平的抗病毒策略(如反义核酸、核酶、RNAi 等)相比,具有明显的优势。首先,蛋白质形式的核酸酶比核酶及 siRNA 稳定,抗病毒效率更高;即使只有一个核酸酶分子被装配于病毒颗粒

内部,也能够降解病毒基因组使其感染性丧失。同时,丧失感染性的“病毒样颗粒”能够有效诱导机体的免疫反应,产生特异抗体,起到免疫保护的作用。其次,衣壳蛋白在病毒复制及组装过程中不可或缺,能够有效避免逃避免疫突变体的产生^[6]。更为重要的是该策略应用前景更为广阔,可通过基因治疗、转基因动物甚至重组蛋白药物等多种形式应用于病毒性疾病的防治。因而该策略一经问世就显示出强大生命力,目前在抗 HIV^[7,8]、HBV^[9,10]及 MLV^[11,12]等领域均进行了深入研究。Schumann 等^[13]应用该策略成功培育出了抗鼠白血病转基因小鼠,与正常小鼠相比转基因小鼠在攻击鼠白血病病毒后,血液中的病毒滴度降低了 10 倍以上,生存时间延长了近 3 倍,脾肿大等症状也得到明显缓解。这些研究为探讨 CTVI 策略在其他病毒模型中的应用奠定了基础。

本研究表明,与登革病毒衣壳蛋白融合表达的具有核酸酶活性的 SN 能够在野生病毒组装过程中装配入子代病毒颗粒内部,并能在病毒成熟后降解其基因组 RNA,导致其感染性明显降低。本研究采用的抗病毒蛋白 SN 是由金黄色葡萄球菌分泌的一种广谱核酸酶,能够对 DNA 或 RNA 进行切割,其核酸酶活性严格依赖于 Ca^{2+} 浓度。真核细胞内 Ca^{2+} 浓度一般在纳摩级水平,SN 在该浓度下活性几乎为零,因而不会对宿主细胞造成伤害,目前已有较多研究^[14]表明 SN 对于哺乳动物细胞不具毒性。而人类血液及其他细胞外体液中, Ca^{2+} 浓度一般在毫摩级, SN 能够非特异的降解 DNA/RNA^[15]。

稳定表达 D2C-SN 的细胞与正常 BHK21 细胞相比较,可导致增殖产生的子代病毒的感染性急剧降低 ($10^3 \sim 10^4$),显示出良好的抗病毒效果。研究中同时发现,阴性对照 D2C-SN* 也呈现出轻微的抗病毒效果,并具有显著意义。估计这种病毒感染性的降低是由于子代病毒空间结构的改变造成的。病毒的感染性与病毒颗粒的正确组装及成熟密切相关^[16]。相对于野生型衣壳蛋白而言,与 SN 及 SN* 融合的衣壳蛋白有可能会影响子代病毒正常的形态发生过程,进而导致感染性的降低。事实上, D2C-SN 的抗病毒效果应由两个方面累加造成,主要原因是 SN 对基因组 RNA 的降解,空间结构的改变也有着轻微的影响。

尽管,本研究表明衣壳蛋白靶向病毒灭活策略具显示出良好的抗病毒效果。然而该策略要真正应用于人类抗病毒感染,仍有许多问题有待解决。除了要改进基因导入系统以外,首先要考虑的是在体

内证实该策略的可行性。在本研究的基础上,培育表达 D2C-SN 的转基因小鼠动物模型,研究其在体内的抗病毒效果将是此后登革病毒衣壳蛋白靶向抗病毒作用研究的重点。

致谢 感谢古巴热带医学研究所 M. Pupo-Antunez 教授赠送单克隆抗体,感谢军科院微生物流行病学研究所的魏茂提同志在统计学分析方面给予的帮助!

参 考 文 献

- [1] 杨佩英,秦鄂德. 登革热和登革出血热. 第一版. 北京:人民军医出版社,1999.
- [2] Natsoulis G, Boeke J D. New antiviral strategy using capsid nuclease fusion proteins. *Nature*, 1991, **352**: 632-635.
- [3] Kuhn R J, Zhang W, Rossmann M G, et al. Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 2002, **108**: 717-725.
- [4] Qin C, Qin E. Development of cell lines stably expressing staphylococcal nuclease fused to dengue 2 virus capsid protein for CTVI. *Acta Biochim Biophys Sin* 2004 **36**: 577-582.
- [5] Beterams G, Bottcher B, Nassal M. Packaging of up to 240 subunits of a 17 kDa nuclease into the interior of recombinant hepatitis B virus capsid. *FEBS Lett*, 2000, **481**: 169-176.
- [6] Ma L, Jones C T, Groesch T D, et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 3414-3419.
- [7] Kobinger G P, Borsetti A, Nie Z, et al. Virion-targeted viral inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by using Vpr fusion proteins. *J Virol*, 1998, **72**: 5441-5448.
- [8] Okui N, Kitamura Y, Kobayashi N, et al. Virion-targeted viral inactivation: New therapy against viral infection. *Mol Urol*, 2001, **5**: 59-66.
- [9] Beterams G, Nassal M. Significant interference with hepatitis B virus replication by a core-nuclease fusion protein. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 8875-8883.
- [10] Liu J, Li Y, Xue C, et al. Targeted ribonuclease can inhibit replication of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*, 2003, **9**: 295-299.
- [11] VanBrocklin M, Federspiel M J. Capsid-targeted viral inactivation can eliminate the production of infectious murine leukemia virus *in vitro*. *Virology*, 2000, **270**: 111-123.
- [12] Natsoulis G, Seshiah P, Federspiel M J. Targeting of a nuclease to murine leukemia virus capsids inhibits viral multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 364-368.
- [13] Schumann G, Hermankova M, Cannon K, et al. Therapeutic effect of a Gag-nuclease fusion protein against retroviral infection *in vivo*. *J Virol*, 2001, **75**: 7030-7041.
- [14] Schumann G, Qin L, Rein A, et al. Therapeutic effect of gag-nuclease fusion protein on retrovirus-infected cell cultures. *J Virol*, 1996, **70**: 4329-4337.

- [15] Boeke J D , Hahn B. Destroying retrovirus from within. *Trends Microbiol* , 1996 , 4 :421 - 426. sarcoma/leukosis virus capsid protein is required for infectivity. *J Virol* , 2001 , 75 :6016 - 6021.
- [16] Yang Y , Thorichs R , Vana M L , et al . Proper processing of avian

Capsid-targeted viral inactivation for dengue virus infection

QIN Cheng-feng JIANG Tao CHEN Shui-ping YU Man QIN E-de *

(Institute of Microbiology & Epidemiology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China)

Abstract : To explore the feasibility of capsid-targeted viral inactivation for dengue virus infection , a newly-discovered antiviral strategy , a mammalian cell line stably expressing staphylococcal nuclease fused to the capsid protein of dengue 2 virus was established and the effects on the production of infectious virus particles were examined. The results presented evidence that the enzymatically active staphylococcal nuclease fused to capsid protein could be incorporated into the nascent virions during wild virus assembly , resulting in degradation of viral genomic RNA and decrease in infectivity. Comparing the effects of incorporated SN and SN* , an enzymatically inactive missense mutant form of SN , on the infectivity of progeny virions , nucleolytic activity of incorporated SN was responsible for the major antiviral effects. These results paved the road of developing capsid-targeted viral inactivation as a new antiviral strategy against dengue.

Key words : Dengue virus , Capsid protein , Staphylococcal nuclease , Antiviral

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30100006)

* Corresponding author. Tel : 86-10-66948604 , Fax : 86-10-63898239 , E-mail : qinede@sohu.com

Received date : 07-27-2004

写 作 要 点

凡投送本刊的稿件 ,如涉及到以下内容 ,请作者按照本刊要求撰写。

1. 摘要 :中英文摘要均采用第三人称叙述 ,不允许出现第一人称 ,如“本文、本研究、我们……”等。研究论文摘要包括目的、方法、结果和讨论 ,综述摘要包括论述内容的发展水平、自己的评论和展望。英文摘要中也可以加入自己的一些观点 ,用过去时态叙述作者工作 ,用现在时态叙述作者结论。要求语法正确 ,句子通顺 ,最好请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投来。

2. 系统发育树 :系统树中菌名应列出全称及菌株号 ;名字后加括号 ,其内含序列号 ,还应标出分枝点上的数字(即 Bootstrap 值) 。图注应说明“树”上所有的内容 ,包括 括号中的序列号、分支点上的数字涵义、比例尺代表的意义(如 0.01) 。[参见《微生物学报》2004 44(2):143.]

3. 测序结果 :因本刊版面紧张 ,所有测序结果(核酸、蛋白质) ,请作者先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL(欧洲)或 GenBank(美国)或 DDBJ(日本) ,申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投稿。

4. 参考文献 :参考文献按文内引用的先后排序 ,必须是作者在论文中直接引用的、发表在正式出版物上的文献。未正式发表的文献(包括私人通讯、毕业论文等)一般不作为文献引用 ,必要时可作为脚注处理。