

## 人博卡病毒 HBoV1 非结构蛋白 NP1 对细胞转录因子的调控

孙彬<sup>1</sup>, 李永淑<sup>1</sup>, 董衍明<sup>1</sup>, 刘凯于<sup>1</sup>, 杨勇波<sup>1\*</sup>, 李毅<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

<sup>2</sup>武汉生物工程学院生物工程系, 武汉 430415

**摘要:**【目的】研究人博卡病毒非结构蛋白 NP1 对细胞转录因子活性和炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达的调控作用。【方法】通过双荧光素酶报告基因系统分析 NP1 对转录因子的调控作用, 通过 ELISA 和荧光定量 PCR 分别从蛋白质和 RNA 水平检测 NP1 是否影响 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达, 最后利用哺乳动物双杂交系统分析 NP1 是否通过寡聚化发挥功能。【结果】在 293T 细胞中, NP1 可分别提高 AP-1、STAT3 和 GAS 转录因子报告载体荧光素酶活性 3.69 倍、2.45 倍和 3.03 倍, 但对 NF- $\kappa$ B 转录因子报告载体荧光素酶活性无明显影响 ( $P > 0.05$ )。转染 24 h 和 48 h 后, NP1 表达细胞和对照细胞培养基中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白浓度没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 但 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平上调。哺乳动物双杂交实验表明 NP1 蛋白自身没有相互作用。【结论】结果首次表明 HBoV1 非结构蛋白 NP1 对细胞转录因子和炎症细胞因子具有调节作用, 揭示 NP1 可能与 HBoV1 致病性有关, 为进一步探究 HBoV1 病毒致病的分子机制提供参考。

**关键词:** 人博卡病毒, 非结构蛋白 NP1, 转录因子, 细胞因子

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013)07-0737-09

人博卡病毒 (Human bocavirus1, HBoV1, 意译为“牛犬病毒”<sup>[1]</sup>) 是通过随机 PCR 扩增结合生物信息学分析, 从下呼吸道感染幼儿样本中检测到的一种新细小病毒<sup>[2]</sup>。它与细小病毒 B19<sup>[3]</sup>、parvovirus 4<sup>[4]</sup> 及 parvovirus 5<sup>[5]</sup> 是迄今为止发现与人类疾病有关的细小病毒成员。全基因序列分析表明, 该病毒与牛细小病毒 (BPV)<sup>[6]</sup>、犬细小病毒 (MVC)<sup>[7]</sup> 及新发现的猪博卡病毒 (PBoV)<sup>[8]</sup>, 归属于细小病毒亚科博卡病毒属。众多研究表明, HBoV1 在世界范围内引起儿童下呼吸道感染, 主要感染 2 岁以下婴幼儿, 临床症状主要表现为咳嗽、

发热常伴有重症哮喘<sup>[9]</sup>, 在患儿的血液、尿液和粪便样本中也检测到 HBoV<sup>[10]</sup>。HBoV1 在呼吸道分泌物中的检出率为 1.5% - 19%<sup>[11-13]</sup>, 腹泻和肠胃炎儿童的粪便样本检出率分别达 16%、9.1%<sup>[14-15]</sup>。随后另 3 种不同基因型的人博卡病毒 HBoV2、HBoV3 和 HBoV4 在胃肠道疾病患者的粪便中也被发现<sup>[16-18]</sup>, 表明博卡病毒不仅是呼吸道感染的病原体, 还可能还会引发病毒性肠胃炎疾病。HBoV 可单独感染, 也可以与其他病毒混合感染<sup>[19]</sup>。

HBoV 基因全长约 5.2 kb, 2 个主要的开放式阅

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30670081)

\* 通信作者。李毅, Tel/Fax: +86-27-89645531, E-mail: johnli2668@hotmail.com; 杨勇波, E-mail: yongboyang@mail.ccnu.edu.cn

**作者简介:** 孙彬 (1986 -), 女, 安徽芜湖人, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学。E-mail: sunbinice@163.com

**收稿日期:** 2013-01-21; **修回日期:** 2013-03-12

读框分别编码非结构蛋白 NS1 和衣壳蛋白 VP1 和 VP2, 同时还有第 3 个阅读框编码非结构蛋白 NP1。HBoV1 感染的假分层人气管上皮细胞和近全长 HBoV1 基因组(不含两端 ITR 结构)体外转染实验可检测到其转录产物<sup>[20-21]</sup>。NP1 为博卡病毒属所特有, 序列高度保守, 博卡病毒属成员 HBoV、BPV 和 MVC 的 NP1 蛋白氨基酸序列同一性达 47%<sup>[2]</sup>。HBoV1 和 MVC 的 NP1 在病毒 DNA 复制中均起着至关重要的作用<sup>[21-23]</sup>, 终止 MVC NP1 的表达可使其 DNA 的复制水平降低 320 倍, 而且 HBoV 和 BPV NP1 在一定程度上可替代 MVC 的 NP1 发挥作用<sup>[23]</sup>。近期研究表明近全长的 HBoV 基因组可以有有效的抑制由仙台病毒和聚脱氧腺苷酸诱导的 IFN- $\beta$  表达, 抑制效应主要通过 HBoV NP1 与干扰素生成过程中的重要调控因子 IRF-3 的 DNA 结合域相互作用从而干扰 IRF-3 与 IFNB 启动子结合, 进而抑制 IFN- $\beta$  的生成<sup>[24]</sup>, 该研究揭示了 NP1 抑制宿主天然免疫反应及 HBoV 调控宿主免疫反应的新机制。细小病毒非结构蛋白在病毒感染及引起相关疾病的过程中起至关重要的调控作用。细小病毒 B19 非结构蛋白 NS1 作为反式因子可以调控一系列细胞因子如 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的表达, 激活 AP-1、NF- $\kappa$ B、STAT3 等转录因子<sup>[25-28]</sup>, 表明了非结构蛋白在 B19 感染引起相关疾病的过程中起到重要的作用。

研究表明 HBoV1 感染性克隆在 293 细胞中可以复制并产生感染性病毒粒子<sup>[22]</sup>。本实验将 HBoV 非结构蛋白 NP1 克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 中, 检测其在 293T 细胞中的表达, 分析 NP1 是否调控细胞内转录因子如 STAT3、NF- $\kappa$ B、AP-1 及 STAT1 的活性并影响炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达, 从而为 NP1 的功能研究提供信息。同时, 生物信息学分析发现 NP1 蛋白的 C 端具有较多的  $\alpha$ -螺旋结构, 本研究应用哺乳动物双杂交系统分析 NP1 蛋白自身是否可以形成二聚体而行使相关生物学功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌种和细胞株: 质粒 pcDNA3.1(+),

pRL-TK、pSTAT3-luc、pAP-1-luc、p-GAS-luc、p-NF- $\kappa$ B-luc、pWHL-1 (GenBank accession No: GU139423) 和大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  由本实验室保存; 质粒 pACT、pBIND、pG5luc、pACT-MyoD 和 pBIND-Id 由华中农业大学农业微生物国家重点实验室李永涛博士惠赠; 293T 细胞购自中科院细胞库。

**1.1.2 主要试剂:** 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; DNA 片段胶回收试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术公司; DNA Marker 购自东盛生物公司; 高纯度质粒小提中量试剂盒购自天根生物技术公司; 转染试剂 Lipofectamine Reagent 购自 Invitrogen 公司; 荧光素酶双报检测试剂盒 Luciferase Assay System 购自 Promega 公司; ELISA 试剂盒购自武汉博士得生物有限公司; UltraSYBR Mixture (with ROX) 购自北京康为生物有限公司。DMEM 和胎牛血清购自 Multicell 公司; 鼠源抗 NP1 一抗由本实验室自制;  $\beta$ -actin 抗体和 Dylight 800-标记的羊抗鼠二抗购自艾美捷科技有限公司。

### 1.2 重组表达质粒的构建

根据博卡病毒序列 (Accession No: GU139423) 设计扩增 NP1 的上下游引物, 引物与酶切位点如表 1 所示。以 pWHL-1 质粒为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物。重组载体 pcDNA-NP1 的构建: 分别用限制性内切酶对 NP1 回收片段和 pcDNA3.1 (+) 载体质粒进行双酶切, 酶切回收产物 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性克隆摇菌, 酶切鉴定后测序。哺乳动物双杂交系统中重组载体的构建: 根据 GU139423 序列设计扩增 NP1、N110、C110 上下游引物, 引物与酶切位点如表 1。以 pcDNA-NP1 质粒为模板进行 PCR 扩增, 反应条件同上。分别用限制性内切酶对 NP1、N110 和 C110 回收片段和 pACT、pBIND 载体质粒进行双酶切, 酶切回收产物 16 $^{\circ}$ C 连接转化, 挑取阳性克隆, 酶切鉴定后测序, 测序工作由上海生工生物公司完成。

表 1. 构建克隆所需引物  
Table 1. Primers used for construction of clones

Recombinant Plasmid	Insert DNA Encoding Protein Region	PCR primer pair (5'→-3') <sup>a</sup>	Restriction Site
pcDNA-NP1	NP1 1 - 220aa	F1: <b>CGGAATT</b> CGCCATGCTGATGAGCTCAGGGAATATGAAAG R1: <b>GCTCTAG</b> ATTAATTGGAGGCATCTGCTTC	<i>EcoRI</i> <i>XbaI</i>
pACT-NP1	NP1 1 - 220aa	F3: <b>CGGGATC</b> CGTGGAGGAGGTGGTAGCTCAGGGAATATGAAAG R3: R1	<i>BamHI</i> <i>XbaI</i>
pBIND-NP1	NP1 1 - 220aa	F4: F3 R4: R1	<i>BamHI</i> <i>XbaI</i>
pACT-N110	NP1 1 - 110aa (N110)	F5: F3 R5: <b>GCTCTAG</b> ATTAGAACCCACACCACCC	<i>BamHI</i> <i>XbaI</i>
pACT-C110	NP1 110 - 220aa (C110)	F6: <b>CGGGATC</b> CGTGGAGGAGGTGGTTACTGGCACTCTACTCGC R6: R1	<i>BamHI</i> <i>XbaI</i>
pBIND-N110	NP1 1 - 110aa (N110)	F7: F3 R7: R5	<i>BamHI</i> <i>XbaI</i>
pBIND-C110	NP1 110 - 220aa (C110)	F8: F6 R8: R1	<i>BamHI</i> <i>XbaI</i>

<sup>a</sup>Cloning Sites are highlighted in bold. F, forward; R, reverse.

### 1.3 Western blot 分析

收集转染 48 h 的细胞, 设空载体转染对照, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 将分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 放入 TBS-T 中, 洗膜 5 min, 封入含有 5% 脱脂奶粉封闭液的塑料袋中, 室温孵育 2 h, TBS-T 洗膜 15 min × 4, 稀释一抗于 TBS-T 中, 将膜封入含适当稀释一抗的塑料袋中 4℃ 过夜。次日洗膜 15 min。稀释二抗(羊抗鼠)于 TBS-T 中, 将膜封入含适当稀释二抗的塑料袋中室温孵育 2 h, 洗膜 15 min × 4。室温避光直接利用近红外双色激光成像系统 Odyssey 进行扫描分析蛋白的表达。

### 1.4 荧光素酶双报告基因活性测定

将 293T 细胞按 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔的量接种在 96 孔板中, 质粒共转染细胞按照 Lipofectamine Reagent 说明书操作方法进行。培养 48 h 后吸弃细胞培养基, 用 PBS 洗 1 次, 加入裂解液 100 μL/孔, 室温摇动裂解 15 min, 裂解液 10000 × g, 1 min 离心去除细胞碎片, 取上清。按照 Dual luciferase Report Assay 试剂盒的操作说明书, 每孔细胞裂解液加入 25 μL LAR 反应液, 混匀后加入 96 孔检测板, 设定微孔板式发光仪 (Centro LB 960) 延迟 2 s, 发光仪测读 10 s, 测读萤火虫荧光素酶发光值, 然后再在同一个样品中加入 25 μL Stop & Glo<sup>®</sup> 试剂, 终止上述反应, 同时测定海肾萤光素酶发光值。转染试验重复至少 3 次, 数据采用 Origin6.0 软件进行统计分析。

### 1.5 ELISA 和实时荧光定量 PCR 检测 IL6 和 TNF-α 的表达

将 pcDNA-NP1 重组质粒和对照质粒转染 293T 细胞, 转染 24 h 和 48 h 后收集细胞的上清按照 ELISA 试剂盒说明书进行 ELISA 检测。同时将转染细胞 24 h 和 48 h 后, Trizol 法提取细胞的总 RNA, 反转录成 cDNA。设计 IL-6 和 TNF-α 的荧光定量 PCR 引物, 以 GAPDH 为内参基因 (表 2) 进行实时荧光定量 PCR 检测, 每个样品 3 个复孔。mRNA 相对表达水平采用比较 Ct 法计算, 相对 mRNA 表达 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>。

表 2. 实时荧光定量 PCR 引物

Table 2. Primers used in the quantitative real-time PCR

Primer names	Sequences (5'→-3')
IL-6	F1: AGAGGCACTGGCAGAAAAC
	R1: TGCAGGAAGTGGATCAGGAC
TNFα	F2: CTGCCCAATCCCTTTATT
	F2: CCCAATCTCTTTTTTGAGCC
GAPDH	F3: CGGGCTCTCCAGAACATC
	R3: CTTCGACGCTGCTTCAC

### 1.6 哺乳动物双杂交实验

将细胞接种于 96 孔板中, 待其覆盖率达到 60% 时, 用 Lipofectamine Reagent 试剂进行转染, pBIND-X, pACT-Y 和报告基因 (pG5luc) 按 1:1:1 比例共转染 293T 细胞, pACT-MyoD 和 pBIND-Id 作为阳性对照, pACT 和 pBIND 载体作为阴性对照, 转染 48 h 后收集细胞, 用 Dual luciferase Report Assay 试

试剂盒提供的试剂裂解细胞并用微孔板式发光仪测定,测定方法同 1.4。上述实验每组设 3 个平行,每个实验至少重复 3 次,数据采用 Origin6.0 软件进行统计分析。

### 1.7 统计学分析

表示的实验数据均为 3 组 3 批的平均值  $\pm$  标准差。  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体的构建

以 pWHL-1 为模板,PCR 分别扩增目的片段 NP1 基因,通过琼脂糖凝胶电泳分析确认得到约 660 bp 与预期大小一致的扩增片段。获得片段经酶切回收后与 pcDNA3.1 (+) 载体连接,经双酶切鉴定,获得与预期结果大小一致 DNA 条带(图 1-

A),证明成功构建了 pcDNA-NP1 重组载体。以构建成功的 pcDNA-NP1 载体为模板,PCR 扩增目的片段 NP1、N110 及 C110,通过电泳确认得到与预期大小一致的片段,分别约 660、330 和 330 bp。将目的片段经酶切回收分别与载体 pACT、pBIND 连接,获得重组质粒经酶切鉴定及测序,证实成功构建了 pACT-NP1、pBIND-NP1、pACT-N110、pACT-C110、pBIND-N110 及 pBIND-C110 重组载体(图 1-B)。将克隆正确的重组载体 pcDNA-NP1 转染 293T 细胞,空载体转染作为对照,转染 48 h 后收集细胞样品,用细胞裂解液裂解细胞后收集上清,Western blot 检测总蛋白中的 NP1 和  $\beta$ -actin,NP1 一抗为实验室自制的鼠源抗 NP1 抗体。如图 1-C 所示,重组载体转染的细胞检测到 NP1 的条带,而空载体中未有条带显出,表明 NP1 蛋白在 293T 细胞中成功表达。

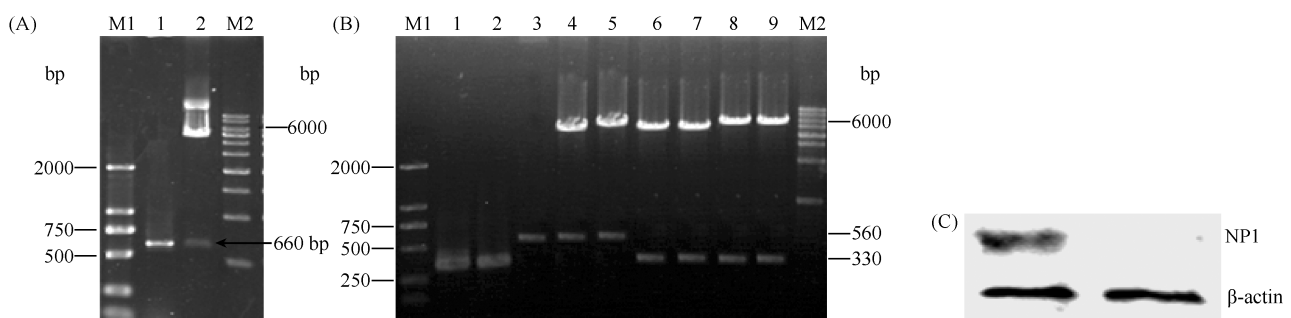


图 1. 重组载体的酶切鉴定 (A、B) 及目的蛋白的 Western blot 检测 (C)

Figure 1. Verification of recombinant plasmid by enzyme digestion (A and B) and western blotting detection of NP1 expression (C). (A) M1: DL2000 DNA marker; M2: 1kb DNA marker; 1: PCR product of NP1; 2: pcDNA-NP1 digested with *EcoRI* and *XbaI*. (B) M1: DL2000 DNA marker; M2: 1kb DNA marker; 1-3: PCR products of N110, C110 and NP1; 4-5: pACT-NP1 and pBIND-NP1 digested with *BamHI* and *XbaI*, respectively; 6-7: pACT-N110 and pACT-C110 digested with *BamHI* and *XbaI*, respectively; 8-9: pBIND-N110 and pBIND-C110 digested with *BamHI* and *XbaI*, respectively. (C) 293T cells were transfected with recombinant vectors and control plasmid. Anti-NP1 mouse serum and  $\beta$ -actin antibody were used in western blotting analysis.

### 2.2 HBoV1 NP1 上调转录因子 AP-1、STAT3 及 STAT1 的活性,对 NF- $\kappa$ B 活性无影响

为确定 HBoV1 非结构蛋白 NP1 是否具有 B19 非结构蛋白的可激活细胞转录因子而引起炎症反应的相似功能,我们将重组表达质粒 pcDNA-NP1 (0.6  $\mu$ g) 分别与转录因子荧光素酶报告质粒 (0.2  $\mu$ g) 及内参质粒 pRL-TK (0.05  $\mu$ g) 共转染 293T 细胞,48 h 后收集样本。通过双荧光素酶报告系统分别检测 AP-1、STAT3、GAS 及 NF- $\kappa$ B 报告载体的荧光素酶活性,将 pcDNA3.1 共转染试验细胞测得荧光素酶活性值设为 1,计算得出实验组细胞中荧光

素酶活性相对值。如图 2 所示,与对照组相比, NP1 分别提高 AP-1、STAT3 和 GAS 报告载体的荧光素酶活性 3.69 倍(图 2-A)、2.45 倍(图 2-B)、3.03 倍(图 2-C)。而与对照组相比, NP1 不能上调 NF- $\kappa$ B 活性( $P > 0.05$ )(图 2-D)。

### 2.3 NP1 对炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 表达的影响

我们的研究发现 HBoV1 NP1 不能激活 NF- $\kappa$ B 活性,进一步通过 ELISA 方法检测 NP1 是否可以影响 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的分泌表达。结果如图 3-A 和 3-B 所示,与对照组相比,转染 24 h 和 48 h 后, NP1 没有引起 293T 细胞 IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白分泌水平的明显

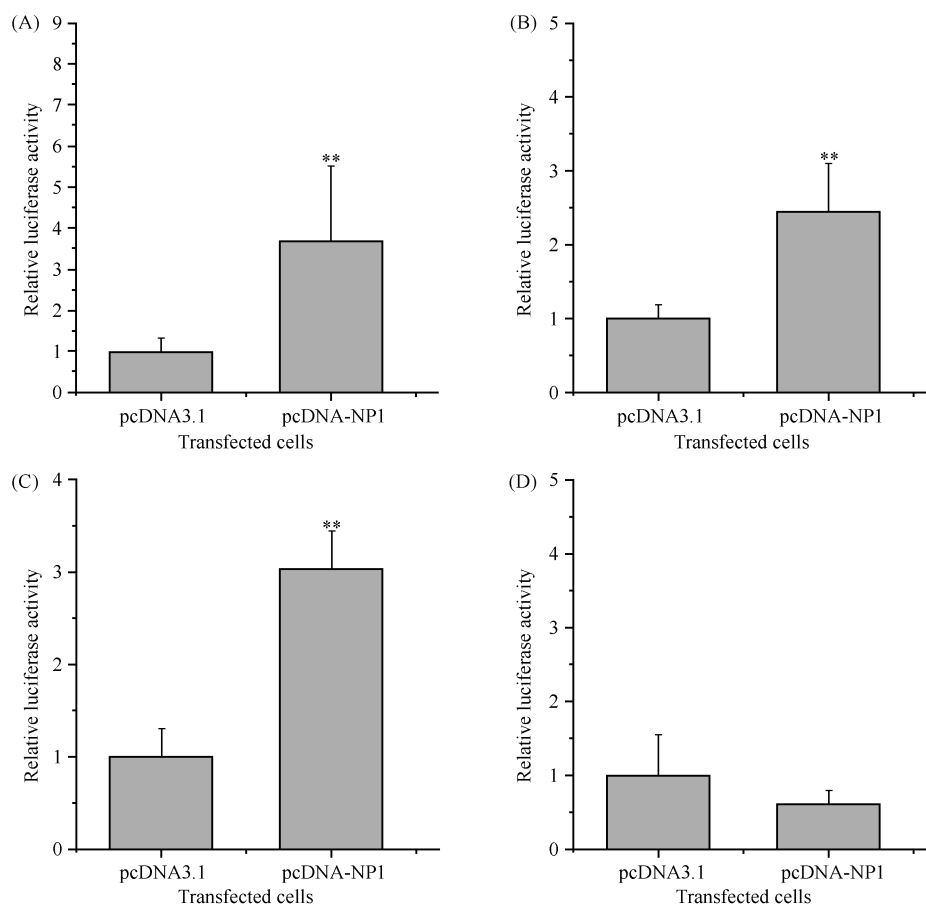


图 2. NP 对细胞转录因子活性的调节

Figure 2. Regulation of transcription factor activity by NP1 in 293T cells. A: AP-1 activity, B: the STAT3 activity, C: the GAS activity, D: NF- $\kappa$ B activity. \*  $P < 0.05$  as compared with vector control. \*\*  $P < 0.01$  as compared with vector control. All experiments were performed in triplicates and were repeated at least three times and the results were expressed as the mean  $\pm$  SD.

变化 ( $P > 0.05$ )。另外,我们通过荧光定量 PCR 分析转染 NP1 表达质粒 24 h 和 48 h 时 IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达情况。结果显示,在 mRNA 表达水平上, NP1 也不影响 IL-6 的表达 ( $P > 0.05$ ), 但 TNF- $\alpha$  表达水平有较显著上升 ( $P < 0.05$ ) (图 3-C 和 D)。

#### 2.4 单独表达的 NP1 蛋白不存在自身相互作用

生物信息学分析发现 NP1 含有较多的  $\alpha$ -螺旋结构,主要位于 NP1 蛋白 C 末端的 110 - 220aa 之间,我们利用哺乳动物双杂交系统验证 NP1 是否通过  $\alpha$ -螺旋结构形成同源二聚体发挥功能。我们将 NP1 蛋白、N 末端 1 - 110aa 和 C 末端 110aa - 220aa (图 4-A) 的各种重组表达载体与内参质粒共转染 293T 细胞,检测萤火虫和海肾荧光素酶活性。结果显示,共转染的实验组与阴性对照组 (图 4-B NC1-

NC3) 荧光素酶活性没有明显差别 ( $P > 0.05$ ), 而阳性对照组有显著性差异 (图 4-B PC)。共转染 NP1、C110 与报告质粒 (图 4-B S4, S5) 与阴性对照比也没有显著性差异。这个结果一定程度上表明 NP1 蛋白在 293T 细胞内可能不存在自身的相互作用。

### 3 讨论

人博卡病毒 HBoV1 是新发现的可能引起人呼吸道和胃肠道疾病的病原体, 主要与小儿急性呼吸道感染疾病有关。由于缺乏传统体外培养系统和动物模型, HBoV1 的分子生物学研究进展有限。近期发现 HBoV1 感染性克隆在 HEK293 细胞内可成功完成基因组的复制、基因表达并产生具有感染性的病毒粒子, 产生的病毒粒子可以体外感染极化的人原代假分层呼吸道上皮细胞, 并引起该细胞的病

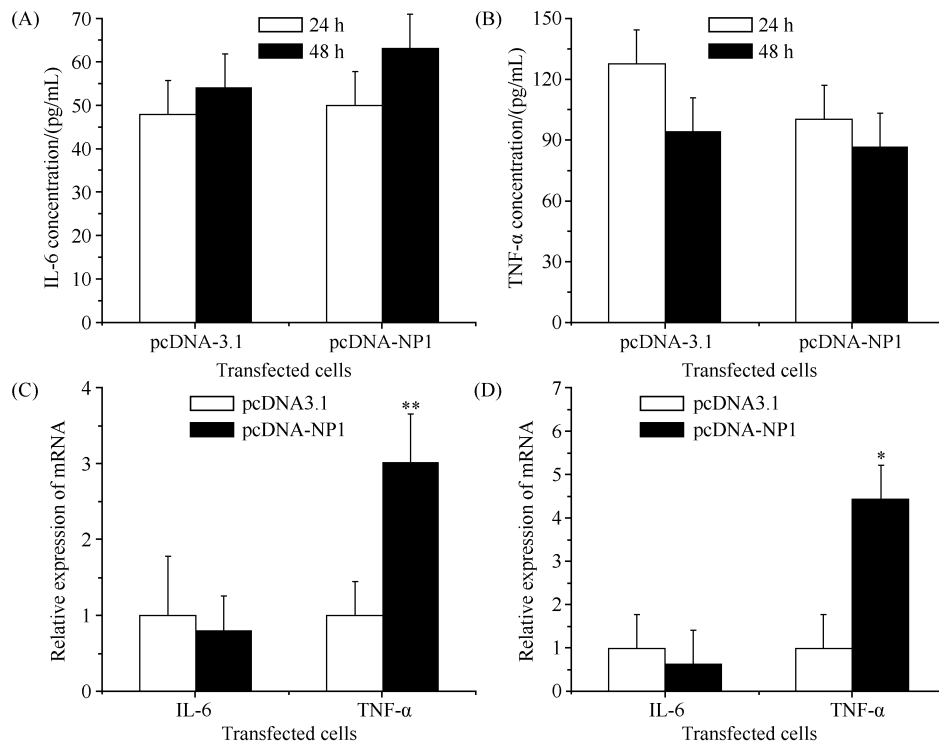


图 3. NP1 对 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达的调节

Figure 3. ELISA analysis of IL6 (A) and TNF- $\alpha$  (B) levels in culture supernatants of NP1 expressing 293T cells. Fold changes of IL6 and TNF- $\alpha$  mRNA level at 24h (C) and 48h (D) post-transfection. \*  $P < 0.05$  as compared with vector control. \*\*  $P < 0.01$  as compared with vector control. The data expressed as the mean of duplicate experiments  $\pm$  SD.

变<sup>[22]</sup>。这个刚刚建立的 HBoV1 反向遗传操作系统的出现为病毒的深入研究奠定了基础,但 HBoV1 的独特生物学特性和可能致病分子机制仍然未知。

博卡病毒的两个非结构蛋白分别为 NS1 和 NP1。NS1 是病毒复制所必须的蛋白<sup>[23]</sup>,而 NP1 是一个多功能蛋白。NP1 定位于细胞核<sup>[21]</sup>,在 HBoV1 感染过程中表达量很高,其缺失可以引起 HBoV1 复制中间体的显著减少,表明该蛋白参与病毒复制<sup>[21-22]</sup>。我们的研究发现 NP1 蛋白单独可以诱导非敏感细胞系 HeLa 发生细胞周期阻滞和凋亡(数据未发表)。NP1 蛋白还可以通过直接的蛋白相互作用与 IRF3 结合,抑制 IFN- $\beta$  表达,表明 HBoV1 可能通过 NP1 蛋白调节宿主细胞天然免疫应答<sup>[21,24]</sup>。病毒感染调节天然免疫系统可以产生如 TNF- $\alpha$  和 IL6 等细胞因子<sup>[29]</sup>,如细小病毒 B19 的非结构蛋白 NS1 可以调节细胞因子 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的表达<sup>[25-28]</sup>,这些细胞因子调节包括诱导炎症应答在内的一系列生物学反应,可能与病毒的致病性密切相关。

通过实时荧光定量 PCR 和 ELISA 我们分析

HBoV1 非结构蛋白 NP1 是否同样具有调节细胞因子 TNF- $\alpha$  及 IL-6 表达的相似功能。实验结果证实,在 NP1 表达的 293T 细胞中,IL-6 在 RNA 和蛋白质水平的表达均没有明显的改变,表明在 293T 细胞中 NP1 不能对 IL6 的表达进行调节。NP1 在 mRNA 水平可以上调 TNF- $\alpha$  的表达,这表明 NP1 可能上调 TNF- $\alpha$  的转录。但 ELISA 分析发现细胞外 TNF- $\alpha$  分泌水平没有明显变化,可能是由于 TNF- $\alpha$  表达存在转录后加工和翻译后加工调节<sup>[30]</sup>,也可能由于 NP1 在 293T 细胞中引起的 TNF- $\alpha$  蛋白分泌变化比较微小,ELISA 检测无法反映。NP1 在原代人假分层呼吸道上皮细胞或其他可能的敏感细胞中是否具备同样的调节功能,是否影响其他炎症因子的表达及其可能的作用仍需进一步的研究。

病毒感染可以引起激活包括转录因子在内的一系列炎症信号途径,从而对炎症细胞因子的表达进行严格的调控。NF- $\kappa$ B、AP-1、STATs 是几种涉及炎症反应的主要转录因子。已有研究发现细小病毒 B19 的结构蛋白 NS1 可以激活转录因子 NF-

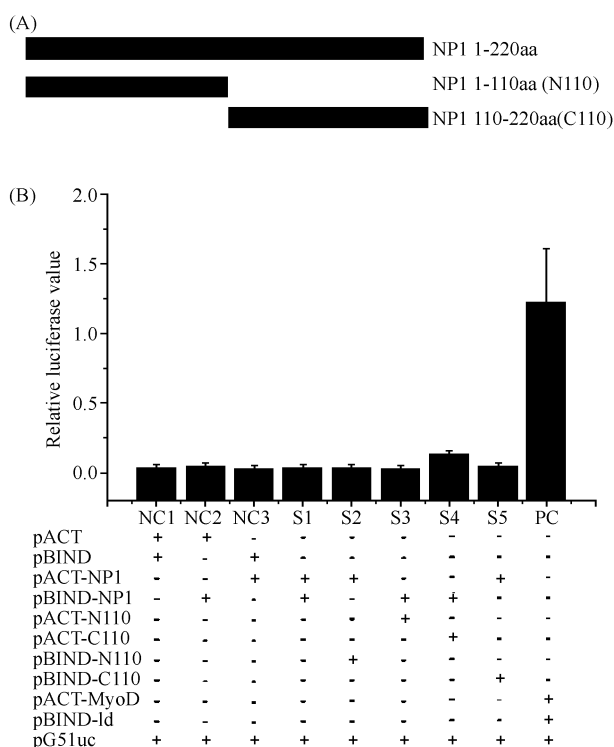


图 4. 哺乳动物双杂交分析 NP1 的自身相互作用

Figure 4. The measurement of NP1 protein self-interaction by mammalian two-hybrid system. (A) Schematic diagrams of NP1 and deletion mutants. (B) Mammalian two hybrid assay was performed with 293T cells in which pG51uc were co-transfected with the indicated plasmids. The luciferase assays were performed at 48h post-transfection. All experiments were performed in triplicates and were repeated at least three times and the results were expressed as the mean  $\pm$  SD.

$\kappa$ B, 激活的 NF- $\kappa$ B 可以通过 IL-6 启动子区域的 NF- $\kappa$ B 结合位点上调 IL-6 的表达<sup>[28]</sup>, 或通过与激活的 AP-1、AP-2/CRE 协同作用上调 TNF- $\alpha$  启动子活性来上调 TNF- $\alpha$  的表达<sup>[25]</sup>。通过转录因子荧光素酶报告系统我们发现, 在 293T 细胞中 NP1 蛋白对 NF- $\kappa$ B 的活性没有影响, 但可以上调 TNF- $\alpha$  表达, 表明在 293T 细胞中 NP1 可能不通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路调控 TNF- $\alpha$  的表达。NP1 在 293T 细胞中可以上调 AP-1、STAT1 和 STAT3 的活性。AP-1 蛋白以异源二聚体复合体形式存在, 这种复合体蛋白磷酸化也可以促进 TNF- $\alpha$  的激活<sup>[25]</sup>。NP1 激活 AP-1 活性和诱导 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平升高在 293T 细胞中是否直接相关还需要验证。STAT1 和 STAT3 属于 JAK-STAT 信号途径 STATs 家族成员, 被磷酸化后可形成多聚体与 DNA 结合发挥转录激活的活性, JAK-STAT 信号通路可以受包括 TNF- $\alpha$  在内的多种

细胞因子的刺激, 并调控下游细胞因子的表达<sup>[31]</sup>。NP1 蛋白诱导的 STAT1 和 STAT3 活化可能通过病毒蛋白直接作用于细胞内信号通路, 或者通过上调 TNF- $\alpha$  等细胞因子间接作用。由于病毒感染激活细胞内信号途径并调节炎症细胞因子的表达具有宿主和细胞类型的特异性, 而且比单个蛋白的作用更加复杂, 单独的 NP1 蛋白与博卡病毒感染调控的细胞因子及其调控的信号途径是否具有一致性还需要更广泛和深入的研究。

病毒蛋白自身的寡聚化在病毒生活周期中起重要作用, 病毒蛋白可以通过多聚体形式调控病毒基因组转录和复制、病毒粒子包装和释放<sup>[32-34]</sup>。尽管通过生物信息学分析预测发现 HBov1 的 NP1 蛋白的 C 端存在大量的螺旋结构, 但由于预测的准确性, 或 NP1 蛋白的多聚化依赖于其他因素如核酸结合或其他病毒蛋白的辅助等, 哺乳动物双杂交实验初步显示 HBov1 的 NP1 蛋白单独存在时不发生自身的相互作用, 该蛋白是否可以通过多聚化发挥作用需要采用其他的方法进一步分析。

尽管人博卡病毒可能的致病机制还不明确, 病毒蛋白在病毒感染过程中确切的生物学功能仍有待进一步研究, 但分析人博卡病毒 NP1 对细胞转录因子及炎症细胞因子的影响, 为深入研究人博卡病毒 NP1 蛋白的功能和病毒可能的致病机制提供了一定参考。

### 参考文献

- [1] 邵一鸣. 实用病毒名称. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 1-228
- [2] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [3] Lefrere JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrere F, Girot R, Allain JP, Laperche S. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood*, 2005, 106(8): 2890-2895.
- [4] Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 195(9): 1345-1352.
- [5] Fryer JF, Delwart E, Hecht FM, Bernardin F, Jones MS, Shah N, Baylis SA. Frequent detection of the parvoviruses, PARV4 and PARV5, in plasma from blood

- donors and symptomatic individuals. *Transfusion*, 2007, 47(6):1054-1061.
- [ 6 ] Chen KC, Shull BC, Moses EA, Lederman M, Stout ER, Bates RC. Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. *Journal of Virology*, 1986,60(3):1085-1097.
- [ 7 ] Schwartz D, Green B, Carmichael LE, Parrish CR. The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology*, 2002, 302(2):219-223.
- [ 8 ] Cheng WX, Li JS, Huang CP, Yao DP, Liu N, Cui SX, Jin Y, Duan ZJ. Identification and nearly full-length genome of novel porcine bocaviruses. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13583.
- [ 9 ] Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, van den Hoogen BG, Hyypiä T, Ruuskanen O. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44(7):904-910.
- [10] Allander T. Human bocavirus. *Journal of Clinical Virology*, 2008, 41(1):29-33.
- [11] Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43(3):283-288.
- [12] Bastien N, N Chui, Robinson JL, Lee BE, K Dust, L Hart, Y Li. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007,45(2):610-613.
- [13] Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, J Fischer, Dowell SF, Anderson LJ, Erdman D, Olsen SJ. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 195(7):1038-1045.
- [14] Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *Journal of Medical Virology*, 2006, 78(9):1232-1240.
- [15] Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13(4):636-637.
- [16] Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaikat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. A newly identified bocavirus species in human stool. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, 199(2):196-200.
- [17] Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(4):e1000391.
- [18] Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN, Besser J, Bartkus J, Delwart E. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *Journal of Infectious Diseases*, 2010, 201(11):1633-1643.
- [19] Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, Simmonds P. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2006,194(9):1283-1290.
- [20] Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *Journal of Virology*, 2009, 83(15):7739-7748.
- [21] Chen AY, Cheng F, Lou S, Luo Y, Liu Z, Delwart E, Pintel D, Qiu J. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology*, 2010, 403(2):145-154.
- [22] Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W, Lei-Butters DC, Chen AY, Li Y, Tang L, Söderlund-Venermo M, Engelhardt JF, Qiu J. Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human Airway Epithelia. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(8):e1002899.
- [23] Sun Y, Chen AY, Cheng F, Guan W, Johnson FB, Qiu J. Molecular characterization of infectious clones of the minute virus of canines reveals unique features of bocaviruses. *Journal of Virology*, 2009, 83(8):3956-3967.
- [24] Zhang ZF, Zheng ZH, Luo HL, Meng J, Li HX, Li Q, Zhang XW, Ke XL, Bai BK, Mao PY, Hu QX, Wang HZ. Human Bocavirus NPI Inhibits IFN- $\beta$  Production by Blocking Association of IFN Regulatory Factor 3 with IFNB Promoter. *Journal of Immunology*, 2012, 189(3):1144-1153.
- [25] Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki T. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *Journal of Virology*, 2002, 76(11):5395-5403.
- [26] Sol N, Le Junter J, Vassias I, Freyssinier JM, Thomas A, Prigent AF, Rudkin BB, Fichelson S, Morinet F. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *Journal of Virology*, 1999, 73(10):8762-8770.
- [27] Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R,



- Bock CT. Human Parvovirus B19 NS1 Protein Modulates Inflammatory Signaling by Activation of STAT3/PIAS3 in Human Endothelial Cells. *Journal of Virology*, 2008, 82(16):7942-7952
- [28] Moffatt S, Tanaka N, Tada K, Nose M, Nakamura M, Muraoka O, Hirano T, Sugamura K. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *Journal of Virology*, 1996, 70(12):8485-8491.
- [29] Webb DS, Shimizu Y, Van Seventer GA, Shaw S, Gerrard TL. LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science*, 1990, 249(4974):1295-1297.
- [30] Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual Review of Immunology*, 1992, 10:411-452.
- [31] Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(5):375-386.
- [32] Hoenen T, Biedenkopf N, Zielecki F, Jung S, Grosseth A, Feldmann H, Becker S. Oligomerization of Ebola Virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription. *Journal of Virology*, 2010, 84(14):7053-7063.
- [33] Serrao E, Thys W, Demeulemeester J, Al-Mawsawi LQ, Christ F, Debyser Z, Neamati N. A Symmetric region of the HIV-1 integrase dimerization interface is essential for viral replication. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45177.
- [34] Stern O, Hung YF, Valdau O, Yaffe Y, Harris E, Hoffmann S, Willbold D, Sklan EH. An N-terminal amphipathic helix in the Dengue virus nonstructural protein 4A mediates oligomerization and is essential for replication. *Journal of Virology*, 2013, Jan 16. [Epub ahead of print].

## Modulation of cellular transcriptional factors by human bocavirus 1 nonstructural protein NP1

Bin Sun<sup>1</sup>, Yongshu Li<sup>1</sup>, Yanming Dong<sup>1</sup>, Kaiyu Liu<sup>1</sup>, Yongbo Yang<sup>1\*</sup>, Yi Li<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

<sup>2</sup>Bioengineering Department, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430415, China

**Abstract:** [Objective] We studied the regulating effect of human bocavirus 1 (HBoV1) nonstructural protein NP1 on the activity of cellular transcription factors and the expression of inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and IL-6. [Methods] The modulation of NP1 was measured by the Dual Luciferase Reporter Assay System and the expression of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 was detected by ELISA and Real-time PCR. The luciferase based mammalian two-hybrid system was used to analyze whether the function of NP1 protein aroused from oligomerization. [Results] The transcription factors AP-1, STAT3 and STAT1 but not NF- $\kappa$ B were up-regulated by NP1, which was evidenced by approximately 2-3-fold increase of the luciferase activity compared to the control vector. Moreover, NP1 increased the TNF- $\alpha$  mRNA expression, but not contributed to cytokine IL-6 secretion. We also found that the self-interaction did not exist when NP1 was solely expressed in 293T cells. [Conclusion] This study demonstrates for the first time that NP1 may play important roles in activation of transcription factors and up-regulation of inflammatory cytokines expression, suggesting that NP1 be involved in HBoV1 pathogenesis.

**Keywords:** Human bocavirus 1, Nonstructural protein NP1, Transcription factor, Cytokine

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670081)

\* Corresponding authors. Yi Li, Tel/Fax: +86-27-89645531, E-mail: johnli2668@hotmail.com; Yongbo Yang, E-mail: yongboyang@mail.cnu.edu.cn

Received: 21 January 2013/Revised: 12 March 2013