



NDV 诱导 HeLa 细胞发生核糖体应激及对翻译起始复合体的影响

陈琳琳, 兰金苹, 武彩霞, 王静, 贾朝霞, 曹旭, 刘开扬*

河北北方学院生命科学研究中心, 河北 张家口 075000

陈琳琳, 兰金苹, 武彩霞, 王静, 贾朝霞, 曹旭, 刘开扬. NDV 诱导 HeLa 细胞发生核糖体应激及对翻译起始复合体的影响. 微生物学报, 2022, 62(9): 3576–3586.

Chen Linlin, Lan Jinping, Wu Caixia, Wang Jing, Jia Zhaoxia, Cao Xu, Liu Kaiyang. NDV induces ribosomal stress in HeLa cells and affects the translation initiation complex. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3576–3586.

摘要: 【目的】研究新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV) HBUN/LSRC/F3 株(以下简称 NDV F3)诱导宫颈癌细胞(HeLa)发生核糖体应激后对 eIF2 α 介导的翻译起始复合体 eIF4F 的调控作用。【方法】流式细胞术及 CCK-8 检测细胞凋亡; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 *c-Myc* 基因表达; 流式细胞术分析细胞周期; Western blotting 技术检测 *c-Myc*、RPS7、Bcl-2、NP、eIF4E 及 eIF2 α 蛋白的表达; Western blotting 和免疫荧光染色技术检测 NP、eIF4E 蛋白定位。【结果】与阴性对照组相比, NDV F3 抑制 HeLa 细胞增殖并诱导细胞凋亡。细胞周期中 G₀/G₁ 期出现停滞, *c-Myc* 表达呈时间依赖性抑制, *c-Myc* 与 Bcl-2 蛋白表达量在 0–48 h 内逐渐下降, NP 蛋白在 24 h 时生成并逐渐增加, RPS7、eIF4E 和 eIF2 α 蛋白含量在 0–48 h 内呈先增加后降低趋势。Western blotting 定位分析及激光共聚焦显微镜结果显示 NP 蛋白主要存在细胞质中, NP 与 eIF4E 存在共定位现象。【结论】NDV F3 诱导 HeLa 细胞凋亡并引发核糖体应激反应, NP 与 eIF4E 相互作用而抑制 eIF2 α 介导的翻译起始复合体 eIF4F 形成, 阻断其与宿主 mRNA 之间的联系, 同时促进 NDV F3 mRNA 的翻译, 最终造成宿主蛋白翻译抑制。

关键词: 新城疫病毒; 核糖体; 应激; 宫颈癌

基金项目: 河北省自然科学基金(H2018405044); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2020247); 张家口市应用基础研究和人才培养计划(1911038A)

Supported by the Natural Science Foundation Hebei Province (H2018405044), by the Science and Technology Research Project of Hebei Higher Education Institutions (QN2020247) and by the Science and Technology Research Project of Zhangjiakou (1911038A)

*Corresponding author. E-mail: kaiyang1999@126.com

Received: 24 January 2022; Revised: 11 April 2022; Published online: 2 June 2022

NDV induces ribosomal stress in HeLa cells and affects the translation initiation complex

CHEN Linlin, LAN Jinping, WU Caixia, WANG Jing, JIA Zhaoxia, CAO Xu, LIU Kaiyang*

Life Science Research Center of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

Abstract: [Objective] To study the regulation of eIF2 α -mediated translation initiation complex eIF4F after Newcastle disease virus (NDV) HBUN/LSRC/F3 (hereinafter referred to as NDV F3) induces ribosomal stress in cervical cancer HeLa cells. [Methods] Flow cytometry and cell counting Kit-8 (CCK-8) were used to detect cell apoptosis, quantitative real-time polymerase chain reaction to examine *c-Myc* gene expression, flow cytometry to analyze cell cycle, Western blotting to assess the expression of *c-Myc*, RPS7, Bcl-2, NP, eIF4E, and eIF2 α proteins, and Western blotting and immunofluorescence staining to locate NP and eIF4E proteins. [Results] Compared with the negative control group, NDV F3 inhibited the proliferation of HeLa cells and induced apoptosis. We observed G₀/G₁ arrest, inhibition of *c-Myc* expression in a time-dependent manner, decrease in protein expression of *c-Myc* and Bcl-2 in 0–48 h, generation of NP protein at 24 h followed by the increasing trend, and the increase in content of RPS7, eIF4E and eIF2 α proteins followed by a decrease during 0–48 h. The results of Western blotting and laser confocal microscopy showed that NP protein was mainly in cytoplasm and that NP co-localized with eIF4E. [Conclusion] NDV F3 induces apoptosis of HeLa cells and triggers ribosomal stress. NP interacts with eIF4E to inhibit the formation of eIF2 α -mediated translation initiation complex eIF4F, which blocks the connection with host mRNA and promotes the expression of NDV F3 mRNA, ultimately resulting in the inhibition of host protein translation.

Keywords: Newcastle disease virus; ribosome; stress; cervical cancer

癌症是当前世界范围内导致死亡最主要的原因之一,近年来,随着医药科技的不断发展,各种放、化疗药物不断涌入市场,但都不能从根本上治疗癌症^[1]。溶瘤病毒疗法成为目前治疗癌症的一种新选择。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)于1926年在全球首次被发现,属于副粘病毒科禽腮腺炎病毒属,其减毒疫苗株作为重要的溶瘤病毒来治疗肿瘤^[2]。NDV可以通过诱导肿瘤细胞发生凋亡、自噬、触发机体免疫等多种途径进行溶瘤反应^[3–4]。同时,本课题组前期已证实,NDV F3株能够引起线粒体、微丝骨架等细胞器发生应激反应,但对核糖体的研究尚未涉及^[5–6]。

核糖体应激已经成为研究热点,从核糖体应

激的角度去治疗癌症已成为一种有前景的治疗方法。核糖体是一种由核糖体RNA及数十种蛋白质构成的,具有蛋白质合成功能的高度复杂的细胞机器。核糖体受到病毒感染、放线菌素D等刺激时发生应激反应,核糖体合成受阻或功能受到抑制而导致细胞内稳态受到破坏,进而抑制细胞蛋白翻译,促进病毒蛋白表达^[7]。因此,了解NDV对核糖体应激及翻译起始复合体的调控有助于人们对其抗肿瘤机制的研究,为今后溶瘤病毒疗法治疗癌症提供更加扎实丰富的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

宫颈癌HeLa细胞及NDV F3株由生命科学

研究中心生物安全二级(P2)实验室保存。DMEM 基础培养基、胰酶购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自上海 ExCellBio 公司; *c-Myc* 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司; FastKing cDNA 第一链合成试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; *c-Myc*、*eIF4E*、*eIF2 α* 及 *GAPDH* 抗体购自武汉 ABclonal 公司; *RPS7* 与 *Bcl-2* 抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京博奥森公司; NP 抗体由本实验室制备; 流式细胞周期试剂盒与流式凋亡试剂盒购自 Becton Dickinson 公司; CCK-8 试剂盒购自同仁公司, 细胞器分离试剂盒购自北京碧云天公司。

1.2 细胞培养

从液氮中取出 HeLa 细胞株, 放入 37 °C 水浴箱, 完全解冻后立即离心, 随后用 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清和 1%双抗)在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养细胞。实验室保存的 NDV F3 毒株原液感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 100, 用 DMEM 基础培养基分别进行梯度稀释, 使其 MOI 分别为 10、1、0.1、0.01。用终浓度 MOI=0.1 的 NDV F3 分别作用细胞 12、24、36、48 h, 并在普通倒置显微镜下观察细胞形态改变。

1.3 CCK-8 检测细胞凋亡

选择生长状态良好的 HeLa 细胞, 用胰酶消化后重置成细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养至对数生长期时, 加入终浓度 MOI=1、0.1、0.01、0.001 的 NDV F3, 分别培养 12、24、36、48 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 同时设置对照组和空白组, 将培养板放于培养箱内孵育 2 h, 在 450 nm 波长处测定 OD 值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

选取生长状态良好且处于对数生长期的

HeLa 细胞, 用胰酶消化, 制成单细胞悬液, 计数 1×10^6 个/mL, 接种于 6 孔板中。设置对照组, 处理组中加入终浓度 MOI=0.1 的 NDV F3, 放入培养箱中分别培养 12、24、36、48 h。收集上清, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞并一起收集, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤 2 遍, 离心弃上清。加入 500 μ L 染色缓冲液悬浮细胞, 加入 7-ADD/PI 染液各 5 μ L 混匀。室温、避光, 孵育 20 min 后上机检测。

1.5 qRT-PCR 检测 *c-Myc* 基因表达

选择生长状态良好的 HeLa 细胞, 用胰酶消化后重置成细胞悬液, 加入 6 孔板中, 培养箱培养过夜, 细胞密度长到 70%–80%时, 设置对照组, 同时给实验组加入终浓度为 MOI=0.1 的 NDV F3 并继续培养 12、24、36、48 h 后, 提取 RNA。用反转录试剂盒合成 cDNA 后, 以 *GAPDH* 为内参, 对 *c-Myc* 基因进行实时荧光定量检测。以上每组均有 3 个复孔并且重复实验 3 次。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

用 6 孔板接种细胞, 37 °C、5% CO₂ 培养至细胞密度为 80%左右时接种终浓度为 MOI=0.1 的 NDV F3, 培养 12、24、36、48 h 并设置对照组。收集细胞, 加入 PBS 洗涤细胞 2 次, 最后用 PBS 制成细胞悬液(密度为 1×10^6 个/mL)。取 1 mL 细胞悬液, 离心后加入体积分数为 70%的冷乙醇 4 °C 固定过夜, 第 2 天用 PBS 洗去固定液, 加入 500 μ L PI/RNase A 染液, 室温避光孵育 30 min 后上机。以上实验均重复 3 次。

1.7 Western blotting 检测蛋白表达

在 6 孔板中接种培养细胞, 设置对照组, 同时给实验组加入终浓度为 MOI=0.1 的 NDV F3 并继续培养 6、12、24、36、48 h 后, 收集细胞和上清液, 提取蛋白。在电压 160 V 条件下, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE) 50 min, 100 V 冰浴转膜 1 h。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 室温孵育一抗 3 h。漂洗液 (tris-tween buffer saline, TTBS) 洗膜 3 次, 每次 10 min。二抗在室温下孵育 2 h, 洗膜后上机显色, 以上实验均重复 3 次。

1.8 NDV 核蛋白(NP)亚细胞定位检测

在 6 孔板中接种培养细胞, 设置对照组, 同时给实验组加入终浓度为 MOI=0.1 的 NDV F3 并继续培养 12、24、48 h 后, 提取 HeLa 细胞中的总蛋白后利用试剂盒分别提取细胞膜、细胞质、线粒体、细胞核中的蛋白, 最后通过 Western blotting 技术检测 NP 蛋白表达位置。另外, 利用激光共聚焦显微镜观察 NP 蛋白亚细胞定位, 具体步骤参照 1.9。

1.9 免疫荧光染色观察 NP 与 eIF4E 共定位情况

选择生长状态良好的 HeLa 细胞, 用胰蛋白酶液消化细胞, 完全培养基重悬细胞, 接种于激光共聚焦培养皿, 于培养箱放置过夜。第 2 天加入终浓度 MOI=0.1 的 NDV F3 继续培养 24 h, 同时设立对照组。24 h 后用 4% 的多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。0.5%

Triton X-100 处理 30 min, 再用 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 30 min。按照说明书稀释抗体, 孵育过夜后用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min。在避光条件下, 用 PBS 稀释对应的二抗, 37 °C 孵育 30 min 后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。最后, 用 DAPI 染液染核, 孵育 10 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min。最后加入抗荧光淬灭剂后用激光共聚焦显微镜观察结果。

2 结果与分析

2.1 NDV F3 对 HeLa 细胞形态、数目的影响

普通光学倒置显微镜观察到(图 1), 空白对照组的细胞贴壁状态良好, 形态正常, 边缘整齐, 折光性好。NDV F3 感染 12 h 后, 细胞逐渐失去正常形态, 边缘逐渐模糊, 开始出现融合现象。NDV 感染 24 h 后, 细胞开始破碎、变圆并脱落。感染 36 h 后, 细胞大部分出现融合现象, 贴壁细胞减少, 细胞碎裂, 漂浮在培养基中, 失去折光性。感染 48 h 后, 细胞几乎全部漂浮在培养基中。

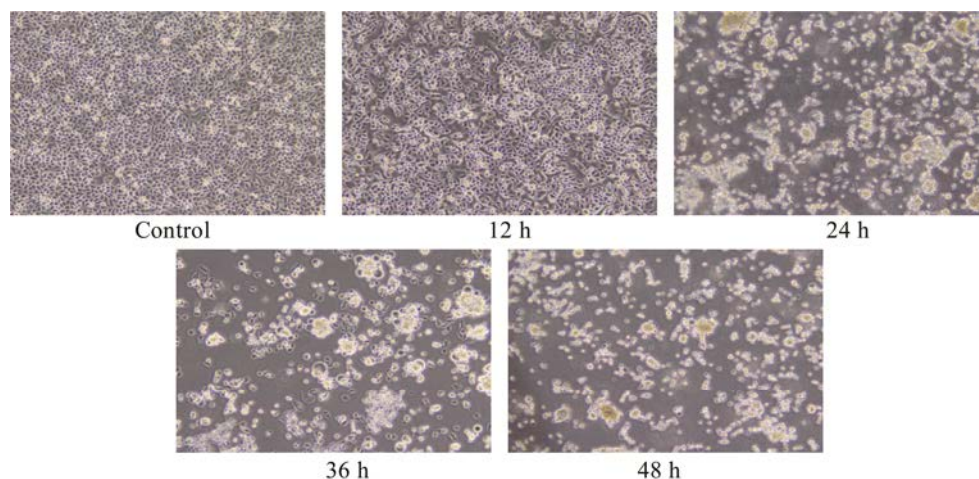


图 1 普通倒置显微镜下观察 NDV F3 感染 HeLa 细胞后形态($\times 100$)

Figure 1 Observation of the morphology of HeLa cells infected by NDV F3 under an ordinary inverted microscope ($\times 100$).

2.2 NDV F3 对 HeLa 细胞增殖的影响

如图 2 所示, 用 NDV F3 处理后, 细胞增殖均以时间和剂量依赖性方式受到抑制。MOI=0.1 和 MOI=0.01 组的抑制作用在 36 h 和 48 h 后清晰可见。MOI=1 组在 48 h 后活细胞数量显著减少($P<0.05$)。

2.3 NDV F3 对 HeLa 细胞凋亡的影响

NDV 可以选择性地感染肿瘤细胞并在肿瘤细胞中复制, 触发直接溶瘤作用。流式细胞凋亡结果如图 3 所示, 各组的凋亡率分别为: 对照组 ($2.70\pm 0.98\%$); 12 h 处理组 ($7.10\pm 0.78\%$); 24 h 处理组 ($15.27\pm 2.35\%$); 36 h 处理组 ($33.30\pm 1.85\%$); 48 h 处理组 ($52.90\pm 3.10\%$)。与对照组相比, 12 h 处理组无显著性差异, 24 h、36 h、48 h 处理组差异性显著($P<0.01$)。从图中可发现, 随着作用时间的延长, 凋亡率不断增加。

2.4 NDV F3 对 *c-Myc* 基因表达的影响

Myc 是核糖体形成的主要调节因子, 控制整个核糖体的形成步骤, *Myc* 基因表达水平的改变常见于多种恶性肿瘤细胞中^[8]。为了验证

NDV F3 对 *c-Myc* 基因表达的影响, 用 NDV F3 分别刺激 HeLa 细胞 12、24、36、48 h 后用 qRT-PCR 评估 *c-Myc* 基因表达。结果如图 4 所示, 与对照组相比, NDV 处理组的 *c-Myc* 基因表达量随着时间的延长呈逐渐下降趋势, 在 0–12 h 内降低不明显, 24–48 h 内下降显著 ($P<0.01$), 该结果表明 NDV F3 诱导核糖体发生应激反应。

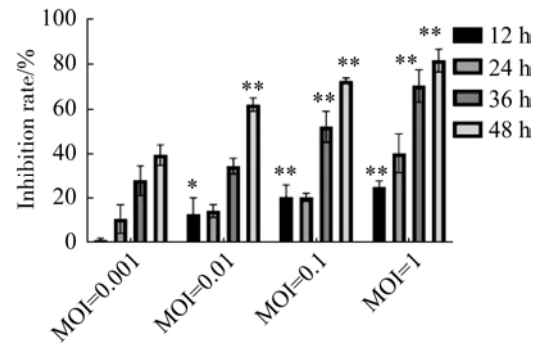


图 2 NDV F3 对 HeLa 细胞的抑制率

Figure 2 Inhibition rate of NDV F3 on HeLa cells (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ vs. MOI=0.001 group).

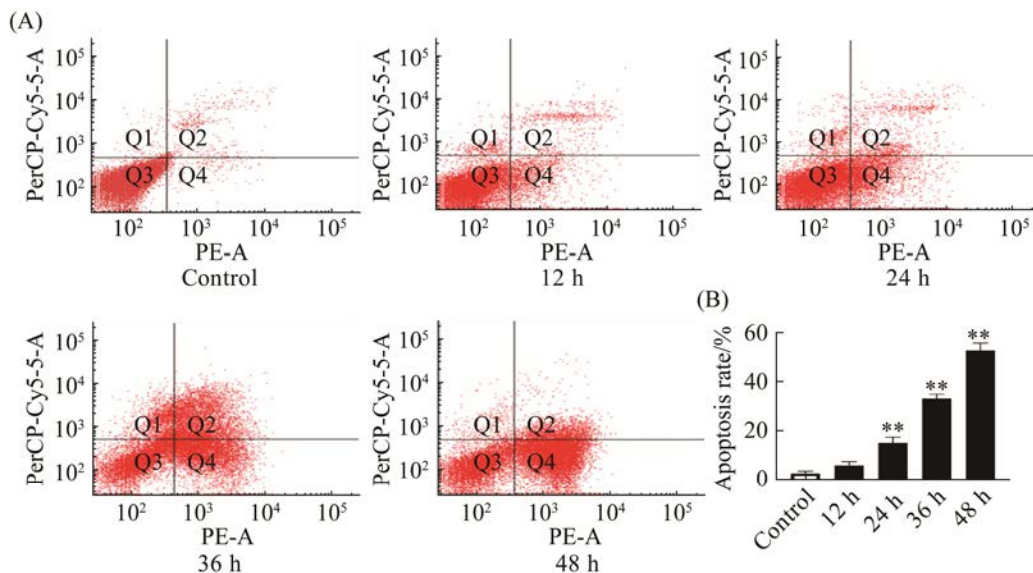


图 3 NDV F3 对 HeLa 细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of NDV F3 on HeLa apoptosis. A: the apoptosis of control, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h groups by flow cytometry. B: histogram of the mean percentage of control, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h groups apoptosis profiles (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ vs. control group).

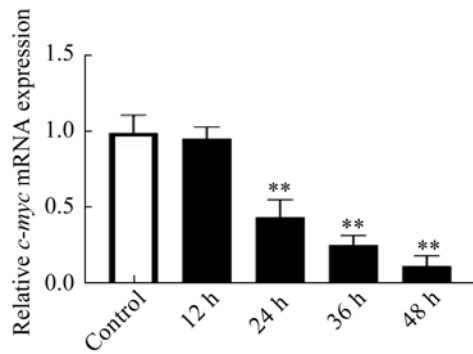


图 4 NDV F3 对 HeLa 细胞 *c-Myc* 基因表达的影响

Figure 4 Effect of NDV F3 on the expression of the *c-Myc* gene in HeLa cells (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ vs. control group).

2.5 NDV F3 对 HeLa 细胞周期的影响

如图 5 所示, 对照组、12 h、24 h、36 h 和 48 h 处理组 G_0/G_1 期细胞百分比分别为 $(49.67\pm 1.70)\%$ 、 $(51.23\pm 1.66)\%$ 、 $(61.17\pm 1.01)\%$ 、 $(65.45\pm 0.81)\%$ 和 $(70.78\pm 0.64)\%$ 。对照组与 24、

36 和 48 h 处理组之间差异性显著 ($P<0.01$)。与对照组相比, NDV F3 诱导 HeLa 细胞 G_0/G_1 期发生停滞, 进入 S 期和 G_2 期的细胞减少。随着作用时间的延长, HeLa 细胞 G_0/G_1 期受阻作用越来越强。核糖体发生应激反应的表现之一为细胞周期受阻, 该结果进一步验证了 NDV F3 诱导核糖体发生应激反应。

2.6 NDV F3 对 *c-Myc*、RPS7、Bcl-2、eIF2 α 、eIF4E 及 NP 蛋白表达的影响

Bcl-2 是最早发现的抑制细胞凋亡的基因, 该基因的表达与细胞抵抗力密切相关^[9]。Western blotting 检测结果如图 6 所示, NDV F3 组与对照组相比, *Bcl-2* 蛋白表达量随着 NDV F3 作用时间的延长而逐渐降低, 在 12 h 时无明显差异, 在 36–48 h 内迅速降低 ($P<0.01$); *Myc* 是核糖体形成的主要调节因子, 控制整个核糖体的形成步骤, 结果发现 *c-Myc* 蛋白表达下降, 核糖体小亚基蛋白 RPS7 也随之降低, 该结果

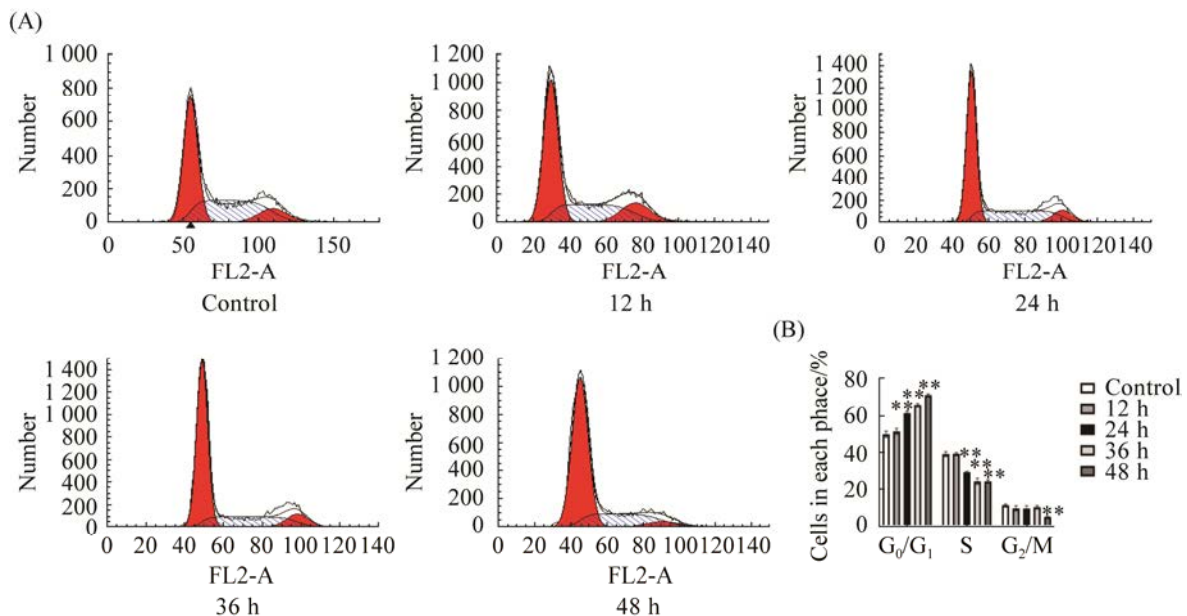


图 5 NDV F3 感染 HeLa 细胞后细胞周期停滞于 G_0/G_1 期

Figure 5 The cell cycle stagnates at G_0/G_1 after NDV infection with HeLa cells. A: the phase of cell cycle of control, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h groups by flow cytometry. B: histogram of the mean percentage of control, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h groups cell cycle profiles (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ vs. control group).

表明, 宿主细胞核糖体生成受损。在真核翻译起始过程中, 限制翻译速度的关键部分是翻译复合体 eIF4F, 其亚基之一 eIF4E 能与 mRNA 5'帽子结构结合, 该环节是翻译起始的核心, eIF2 α 是真核翻译起始的负调控因子, 能够介导 eIF4F 翻译^[10]。Western blotting 检测结果如图 6 所示, 与对照组相比, NDV F3 分别作用于 HeLa 细胞 6、12、24、36、48 h 后, eIF4E 及 eIF2 α 蛋白在 0–12 h 内逐渐增加, 12–48 h 内依次降低($P<0.05$); 该结果表明 NDV F3 对细胞翻译起始存在一定的抑制作用。NP 蛋白是 NDV 编码蛋白之一, 在翻译时被优先翻译, 与 NDV 的转录、复制、mRNA

转移等密切相关^[11]。从实验结果中可以看出, NP 蛋白在 0–12 h 内不表达, 12–48 h 内表达逐渐上升, 48 h 时明显增加($P<0.01$)。推测 NDV F3 抑制了 eIF4E 蛋白表达, 从而抑制细胞的翻译速度。

2.7 NP 蛋白亚细胞定位检测

如图 7 所示, 经 Western blotting 技术检测, NDV 感染 HeLa 细胞后, β -actin 主要表达在全细胞和细胞质中, ATPase Na⁺/K⁺在全细胞和细胞膜中表达, Lamin B 在全细胞、细胞质和细胞核中表达, 以上结果表明细胞器蛋白提纯效果甚佳。而目的蛋白 NP 在 0 和 12 h 内不表达, 在 24–48 h 内表达在细胞质、细胞膜和线粒体。

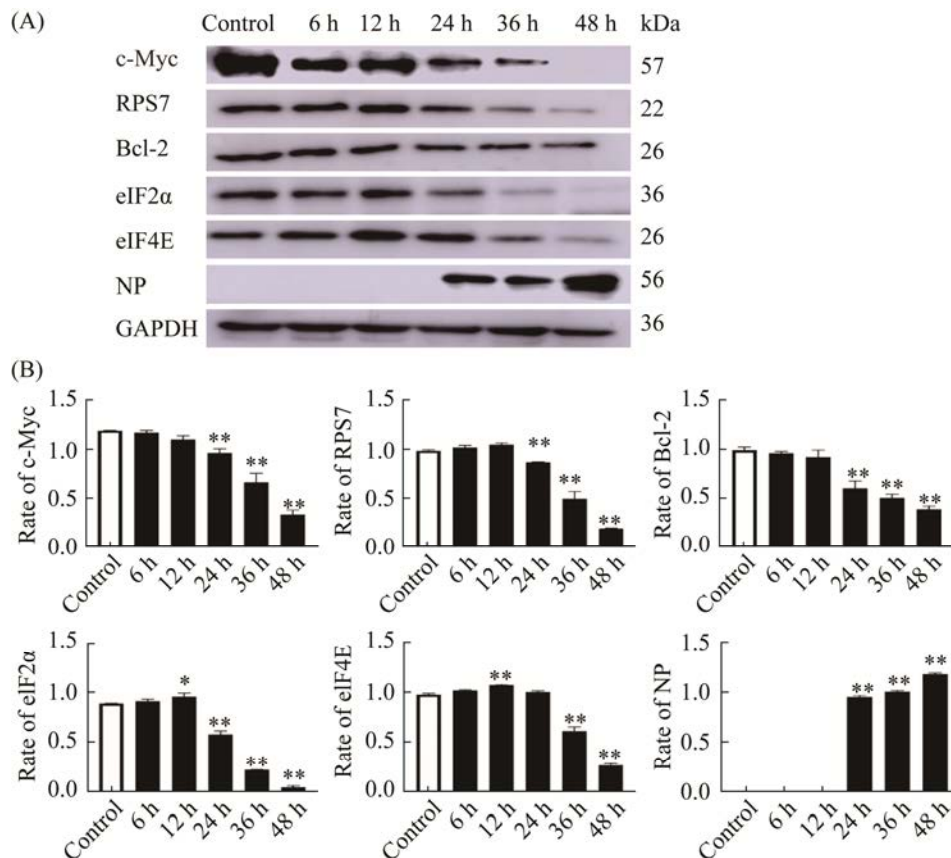


图 6 HeLa 细胞被 NDV F3 感染不同时间段后对 c-Myc、RPS7、Bcl-2、eIF2 α 、eIF4E 及 NP 蛋白表达的影响

Figure 6 Effect of HeLa cells on c-Myc, RPS7, Bcl-2, eIF2 α , eIF4E and NP protein expression after different time periods of NDV F3 infection. A: c-Myc, RPS7, Bcl-2, eIF2 α , eIF4E and NP protein expression was assessed by Western blotting. B: relative ratios of c-Myc, RPS7, Bcl-2, eIF2 α , eIF4E and NP proteins to GAPDH (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ vs. control group).

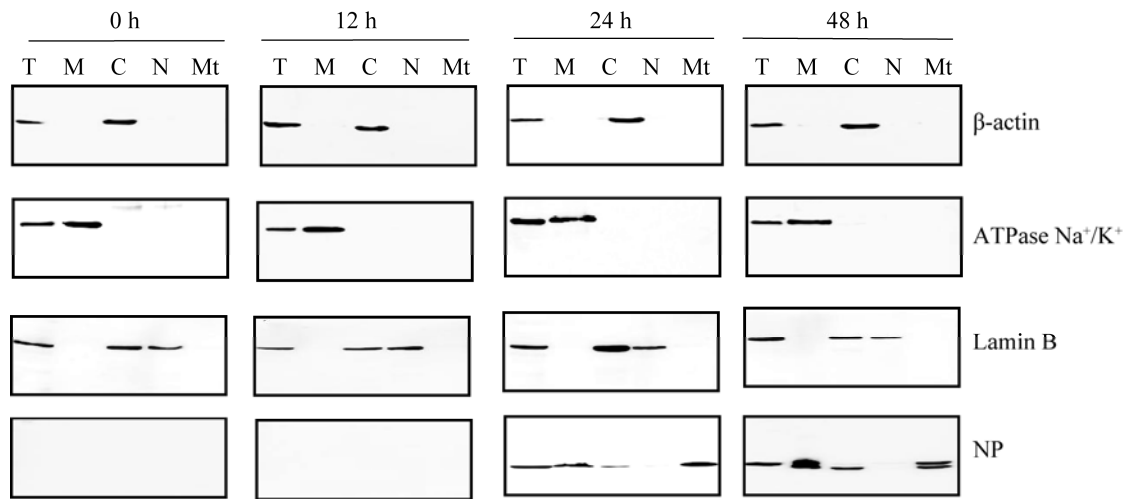


图 7 NDV F3 侵染 HeLa 细胞后 NP 蛋白的亚细胞定位

Figure 7 Subcellular localization of NP protein after NDV infecting HeLa cells. T: total protein; M: cell membrane protein; C: cytoplasmic protein; N: nuclear protein; Mt: mitochondrial protein.

2.8 免疫荧光检测 NP 蛋白定位

如图 8 所示, NDV F3 感染 HeLa 细胞 24 h 后, NP 蛋白表达, 且主要位于细胞质中。

2.9 NDV F3 NP 蛋白与 eIF4E 蛋白共定位

此前有文献报道发现, 痘病毒在感染后能够诱导 eIF4E 亚细胞定位发生变化, 通过将其定位于细胞内的场所从而选择性地促进病毒 mRNA 的翻译^[12]。为了研究 NDV F3 是否能够

引起该现象, 我们采用免疫荧光检测 NDV F3 感染 24 h 后的 HeLa 细胞中, NP 与 eIF4E 的定位情况, 发现 NP 与 eIF4E 在细胞质中共定位(图 9), 该结果表明二者可能相互作用, NDV F3 激活 eIF4E 将其转运至病毒 mRNA 的翻译场所。NDV F3 可能利用该机制促进病毒 mRNA 的复制, 另一方面切断 eIF4F 与宿主 mRNA 之间的联系, 造成宿主翻译的抑制。

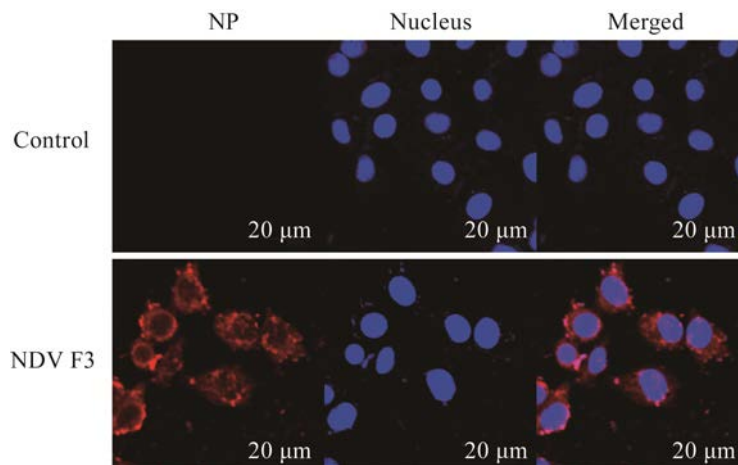


图 8 NDV F3 侵染 HeLa 细胞后免疫荧光检测 NP 蛋白定位

Figure 8 Immunofluorescence detection of NP protein localization after NDV F3 infects HeLa cells.

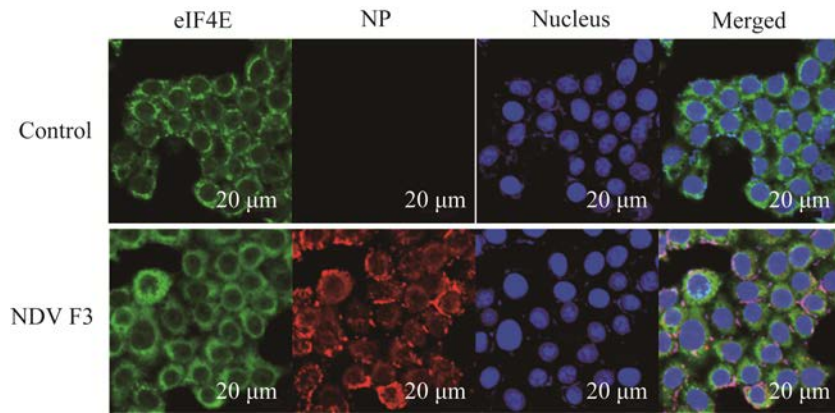


图9 NDV F3 编码蛋白 NP 与 eIF4E 蛋白共定位
Figure 9 Co-localization of NDV F3 encoded protein NP.

3 讨论

宫颈癌是临床最常见的女性恶性肿瘤之一，除了最常规的放、化疗治疗手段外，溶瘤病毒疗法也是一种相对安全有效的治疗方法，它利用基因工程技术和免疫疗法来进行癌症治疗^[13]。NDV 是一种有效的溶瘤病毒，一方面，NDV 感染肿瘤细胞后可诱导产生多种细胞因子，从而激活宿主细胞的凋亡信号导致溶瘤^[14]；另一方面，NDV 感染细胞后，核转录因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路的激活和 TNF- α /TRAIL 的上调导致 caspase 8 激活和 Bid 裂解为 tBid，tBid 将凋亡信号途径传递到线粒体并介导内源性细胞凋亡^[15]。本研究利用细胞增殖检测 (CCK-8) 和流式细胞术方法发现，用 NDV F3 处理后的 HeLa 细胞，其增殖均以时间和浓度依赖性方式受到抑制，同时，Western blotting 结果中抗凋亡蛋白 Bcl-2 在 0–48 h 内逐渐降低。以上实验结果均证实 NDV F3 抑制 HeLa 细胞增殖并诱导细胞发生凋亡。

NDV 作为一种具有潜在抗肿瘤应用价值的病毒，感染肿瘤细胞后引发一系列应激反应。据研究报道，NDV 侵染肿瘤细胞后，首先

引起细胞内质网应激，IRE1 的 RNase 活化，TXNP1 表达水平上调，CHOP 蛋白表达增加，Ca²⁺ 被释放转运到线粒体中，线粒体因此发生应激，膜电位发生变化，线粒体从融合状态转为分离状态，线粒体活性氧 (mitochondrial Reactive Oxygen Species, mROS) 产生，细胞色素 C 释放，损伤的线粒体途径 PINK/PARKIN 介导 MFN2 泛素化，在伴侣分子 P62、NDP52 的介导下发生选择性自噬，降解天然免疫中枢 MAVS 进而抑制 I 型干扰素的表达，促进病毒复制。病毒复制这一过程则由核糖体参与调控，触发核糖体应激^[16]。核糖体应激具体表现为：核仁体积变小；RNA 聚合酶介导的 rRNA 合成受到抑制；核糖体应激相关的核仁定位蛋白从核仁转移到核质或胞质；细胞周期受阻^[17–18]。Wang 等发现 NDV 能通过 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 信号通路诱导细胞周期中 G₀/G₁ 期停滞，促进 NDV 增殖^[19]。本研究通过流式细胞术显示，NDV F3 刺激 HeLa 细胞后，周期的 G₀/G₁ 期增加，36 h 和 48 h 处理组的 G₀/G₁ 期细胞百分比从 (49.67 \pm 1.70)% 增加到 (65.45 \pm 0.81)% 和 (70.78 \pm 0.64)%，表明 NDV F3 诱导 HeLa 细胞发生核糖体应激。

Myc 基因是一种原癌基因, 通过转录激活和抑制众多的靶基因来调节复杂的生物程序, 如细胞周期、新陈代谢和核糖体生成^[20]。*c-Myc* 能够通过直接调控上游结合因子(UBF)与核糖体 DNA(rDNA)相互作用, 以此来增强 rDNA 的转录^[21]。另外, *c-Myc* 可以直接调控前体 rRNA 的加工, 激活 RNA 聚合酶 III 的转录增加 5S rRNA 的合成^[22]。qRT-PCR 和 Western blotting 结果表明, NDV F3 引起核糖体应激后, 显著抑制 *c-Myc* 基因及蛋白的表达, 说明 *c-Myc* 基因参与核糖体应激并可能通过降低 rDNA 的转录与 5S rRNA 的合成两种方式来降低核糖体的生成, 最终达到杀伤抑制肿瘤的效果。

核糖体基因表达的调节在核糖体生物发生中蛋白质和 RNA 的平衡合成中起重要作用^[23]。NDV F3 作用于 HeLa 细胞后, 核糖体小亚基蛋白 RPS7 含量明显下降, 表明 NDV F3 导致核糖体生成受损。真核翻译起始过程中的翻译起始复合物 eIF4F 与 5'甲基化的帽子结构结合, 调控蛋白质的合成。eIF4F 由帽结合蛋白(eIF4E)、支架蛋白(eIF4G)、DET-D-box RNA 解旋酶(eIF4A) 3 个部分组成。eIF2 α 是真核翻译起始的负调控因子, eIF2 α 在 Ser 51 的磷酸化会损害三元复合物中 GTP 交换 GDP, 导致全局蛋白质合成急剧抑制。我们通过 Western blotting 对翻译起始因子 eIF4E 和负调控因子 eIF2 α 的表达研究发现, eIF4E 和 eIF2 α 在 NDV F3 作用于 HeLa 细胞后 0–12 h 内表达量未有显著变化, 但之后 12–48 h 内蛋白表达量显著降低; 此时, 对 NDV F3 的 NP 蛋白检测发现其表达量在 24 h 后逐渐升高。推测 NDV mRNA 的翻译能够抵抗这种 eIF2 α 磷酸化所造成的翻译抑制作用, 促进自身蛋白质的复制, 同时抑制宿主蛋白合成, 其机制可能与 PI3K/Akt/mTOR 及 p38MAPK/Mnk1 通路引起

eIF4E 及 eIF4G 的磷酸化并促进 eIF4F 复合体的形成等方式来开启宿主的帽子依赖性翻译系统, 从而实现病毒 mRNA 的快速复制有关^[10]。

许多病毒能通过自身编码蛋白与 eIF4F 相互作用来招募其进行病毒 mRNA 的翻译。如杯状病毒的病毒基因末端结合蛋白(viral protein genome-linked, VPg)可以与 eIF4E 和 eIF3 相互作用从而促进核糖体与病毒 mRNA 的结合^[24]。流感病毒的 NS1 蛋白能够通过 eIF4G 之间的作用将 eIF4F 招募至病毒 mRNA 周围, 选择性地促进病毒 mRNA 翻译^[25]。Western blotting 与免疫荧光染色结果发现在 NDV F3 感染后, NP 与 eIF4E 共定位, 并且 NP 表达上升。据此, 我们推测 NDV F3 可能利用自身编码的 NP 蛋白调控 eIF4F, 抑制翻译起始环节, 从而促进病毒 mRNA 的翻译。

综上所述, NDV F3 诱导 HeLa 细胞发生核糖体应激反应后, 通过 NP 抑制 eIF2 α 介导的翻译起始复合物 eIF4F, NDV F3 将 eIF4E 转运至病毒 mRNA 翻译场所, 并可能利用该机制一方面促进 NDV F3 mRNA 的翻译, 另一方面切断 eIF4F 与宿主 mRNA 之间的联系, 造成宿主蛋白翻译受到抑制。

参考文献

- [1] Walsh RJ, Tan DSP. The role of immunotherapy in the treatment of advanced cervical cancer: current status and future perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(19): 4523.
- [2] Meng QX, He J, Zhong LP, Zhao YX. Advances in the study of antitumour immunotherapy for Newcastle disease virus. *International Journal of Medical Sciences*, 2021, 18(11): 2294–2302.
- [3] Xu XH, Zhang D, Ding W, Wang WQ, Jin NY, Ding Z. NDV related exosomes enhance NDV replication through exporting *NLRX1* mRNA. *Veterinary Microbiology*, 2021, 260: 109167.
- [4] Zhao LJ, Niu C, Shi XM, Xu DS, Li M, Cui JW, Li W, Xu JT, Jin HF. Dendritic cells loaded with the lysate of

- tumor cells infected with Newcastle disease virus trigger potent anti-tumor immunity by promoting the secretion of IFN- γ and IL-2 from T cells. *Oncology Letters*, 2018, 16(1): 1180–1188.
- [5] 刘开扬, 屈建国, 刘进军, 刘芳. 新城疫病毒对 BGC-823 胃癌细胞线粒体的影响. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22(3): 198–200.
Liu KY, Qu JG, Liu JJ, Liu F. Effects of Newcastle disease virus on the mitochondria of human gastric carcinoma BGC-823 cells. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2008, 22(3): 198–200. (in Chinese)
- [6] 谢晓娟, 金燕, 王静, 兰金苹, 武彩霞, 刘宇, 刘开扬. 细胞微丝骨架在 NDV 诱导肺癌细胞凋亡中的作用. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 51–56.
Xie XJ, Jin Y, Wang J, Lan JP, Wu CX, Liu Y, Liu KY. Role of microfilament sketeton in NDV inducing apoptosis of human lung cancer cells. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2020, 55(1): 51–56. (in Chinese)
- [7] James A, Wang YB, Raje H, Rosby R, DiMario P. Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus*, 2014, 5(5): 402–426.
- [8] Stasevich EM, Murashko MM, Zinevich LS, Demin DE, Schwartz AM. The role of non-coding RNAs in the regulation of the proto-oncogene MYC in different types of cancer. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 921.
- [9] Timucin AC, Basaga H, Kutuk O. Selective targeting of antiapoptotic BCL-2 proteins in cancer. *Medicinal Research Reviews*, 2019, 39(1): 146–175.
- [10] Zhan Y, Yu SQ, Yang S, Qiu XS, Meng CC, Tan L, Song CP, Liao Y, Liu WW, Sun YJ, Ding C. Newcastle disease virus infection activates PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Mnk1 pathways to benefit viral mRNA translation via interaction of the viral NP protein and host eIF4E. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(6): e1008610.
- [11] 丁铲. 新城疫病毒核衣壳蛋白的结构和功能. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(1): 80–84.
Ding C. The structure and function of Newcastle disease virus nucleocapsid protein. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(1): 80–84. (in Chinese)
- [12] Walsh D, Arias C, Perez C, Halladin D, Escandon M, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Mohr I. Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Molecular And Cellular Biology*, 2008, 28(8): 2648–2658.
- [13] Chiocca EA, Rabkin SD. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunology Research*, 2014, 2(4): 295–300.
- [14] Huang Z, Liu M, Huang Y. Oncolytic therapy and gene therapy for cancer: recent advances in antitumor effects of Newcastle disease virus. *Discovery Medicine*, 2020, 30(159): 39–48.
- [15] Liao Y, Wang HX, Mao X, Fang HJ, Wang H, Li YR, Sun YJ, Meng C, Tan L, Song CP, Qiu XS, Ding C. RIP₁ is a central signaling protein in regulation of TNF- α /TRAIL mediated apoptosis and necroptosis during Newcastle disease virus infection. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 43201–43217.
- [16] 丁铲. 病毒感染引起的细胞器应激损伤和选择性自噬. *中国家禽*, 2019, 41(10): 1–9.
Ding C. Virus infection causes cell organelle stress and selective autophagy. *China Poultry*, 2019, 41(10): 1–9. (in Chinese)
- [17] Lu L, Yi HM, Chen C, Yan SC, Yao H, He GC, Li GF, Jiang YQ, Deng T, Deng XY. Nucleolar stress: is there a reverse version? *Journal of Cancer*, 2018, 9(20): 3723–3727.
- [18] Ma H, Oederson T. The nucleolus stress response is coupled to an ATR-Chk1-mediated G₂ arrest. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24(9): 1334–1342.
- [19] Wang Y, Wang R, Li YR, Sun YJ, Song CP, Zhan Y, Tan L, Liao Y, Meng CC, Qiu XS, Ding C. Newcastle disease virus induces G₀/G₁ cell cycle arrest in asynchronously growing cells. *Virology*, 2018, 520: 67–74.
- [20] Pandya N, Khan E, Jain N, Satham L, Singh R, Makde RD, Mishra A, Kumar A. Curcumin analogs exhibit anti-cancer activity by selectively targeting G-quadruplex forming *c-Myc* promoter sequence. *Biochimie*, 2020, 180: 205–221.
- [21] Dai MS, Lu H. Crosstalk between *c-Myc* and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 105(3): 670–677.
- [22] Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ. Direct activation of RNA polymerase III transcription by *c-Myc*. *Nature*, 2003, 421(6920): 290–294.
- [23] Mikhaylina AO, Nikonova EY, Kostareva OS, Tishchenko SV. Regulation of ribosomal protein synthesis in prokaryotes. *Molecular Biology (Mosk)*, 2021, 55(1): 16–36.
- [24] Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JWB, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF₃, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO Journal*, 2003, 22(11): 2852–2859.
- [25] Burgui I, Aragón T, Ortín J, Nieto A. PABP₁ and eIF4GI associate with influenza virus NS₁ protein in viral mRNA translation initiation complexes. *The Journal of General Virology*, 2003, 84(Pt 12): 3263–3274.