



HSP27 在脑心肌炎病毒体外增殖中的多重调控作用

李向茸^{1,2}, 吴贝^{1,3}, 高铭³, 李殿玉^{1,3}, 李洪珊^{1,3}, 牛宇辉^{1,3}, 马瑞仙^{1,3},
张梦月³, 赵旭³, 谢晶莹^{1,3}, 冯若飞^{1,2*}

1 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

2 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

3 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030

李向茸, 吴贝, 高铭, 李殿玉, 李洪珊, 牛宇辉, 马瑞仙, 张梦月, 赵旭, 谢晶莹, 冯若飞. HSP27 在脑心肌炎病毒体外增殖中的多重调控作用[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 333-345.

LI Xiangrong, WU Bei, GAO Ming, LI Dianyu, LI Hongshan, NIU Yuhui, MA Ruixian, ZHANG Mengyue, ZHAO Xu, XIE Jingying, FENG Ruofei. Multiple regulatory effects of HSP27 on the proliferation of encephalomyocarditis virus *in vitro*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 333-345.

摘要: 【目的】探究热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27)在脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV)体外增殖过程中对多种信号通路的调控作用,为明确其他宿主因子体外调控 EMCV 增殖的机制研究奠定基础,并为进一步揭示 EMCV 致病的分子机制提供有力证据。【方法】利用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)、免疫印迹、间接免疫荧光和核质分离等方法检测干扰或过表达 HSP27 对 EMCV 感染引起的细胞自噬、翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α subunit 1, EIF2S1)-应激特异性转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)信号通路及髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核转录因子 κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B)信号通路的影响。【结果】干扰宿主细胞中 HSP27 的表达可促进自噬及 EIF2S1-ATF4 信号

资助项目: 甘肃省高等学校创新基金项目(2020B-064); 西北民族大学国家级大学生创新创业训练计划(202210742022); 西北民族大学本科生创新项目(X202210742293); 甘肃省青年科技基金计划(20JR5RA501); 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金(31920210051, 31920220068)

This work was supported by the Education Department of Gansu Province Project (2020B-064), the College Students Innovative Entrepreneurship Training Program (State Level) of Northwest Minzu University (202210742022), the Undergraduate Innovation Project of Northwest Minzu University (X202210742293), the Gansu Youth Science and Technology Fund Project (20JR5RA501), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (31920210051, 31920220068).

*Corresponding author. Tel: +86-931-2928315, E-mail: fengruofei@xbmu.edu.cn

Received: 2022-05-04; Accepted: 2022-06-19; Published online: 2022-06-24

通路, 抑制 EMCV 诱导的 MyD88/NF- κ B 信号通路的活化。相反, 过表达 HSP27 不仅能有效降低 EMCV 诱导的自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路, 还能促进 MyD88/NF- κ B 信号通路分子的表达、p65 的核移位和炎症相关因子的转录表达。【结论】HSP27 既可以通过抑制 EIF2S1-ATF4 信号通路来负调控 EMCV 诱导的自噬, 还可以正向调控 EMCV 触发的 MyD88/NF- κ B 信号通路, 表明 HSP27 在 EMCV 感染中具有多重调控作用。

关键词: 热休克蛋白 27; 脑心肌炎病毒; 细胞自噬; 内质网应激反应; NF- κ B 信号通路

Multiple regulatory effects of HSP27 on the proliferation of encephalomyocarditis virus *in vitro*

LI Xiangrong^{1,2}, WU Bei^{1,3}, GAO Ming³, LI Dianyu^{1,3}, LI Hongshan^{1,3}, NIU Yuhui^{1,3}, MA Ruixian^{1,3}, ZHANG Mengyue³, ZHAO Xu³, XIE Jingying^{1,3}, FENG Ruofei^{1,2*}

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

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

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

Abstract: [Objective] We explored the regulatory effects of heat shock protein 27 (HSP27) on various signaling pathways during the proliferation of encephalomyocarditis virus (EMCV) *in vitro*, aiming to lay a foundation for deciphering the mechanism of other host factors in regulating EMCV proliferation *in vitro* and provide evidence for comprehensively revealing the pathogenic mechanism of EMCV. **[Methods]** Real-time quantitative PCR (RT-qPCR), Western blotting, indirect immunofluorescence, and nucleocytoplasmic separation were employed to evaluate the effects of the knockdown and overexpression of HSP27 on the EMCV infection-induced autophagy, eukaryotic translation initiation factor 2 α subunit 1 (EIF2S1)-activating transcription factor 4 (ATF4) signaling pathway, and myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway. **[Results]** Interfering with the expression of HSP27 in host cells promoted autophagy and activated EIF2S1-ATF4 signaling pathway, and inhibited EMCV-induced activation of MyD88/NF- κ B signaling pathway. On the contrary, overexpression of HSP27 not only reduced EMCV-induced autophagy and inhibited EIF2S1-ATF4 signaling pathway, but also up-regulated the expression of the proteins in MyD88/NF- κ B signaling pathway and promoted the nuclear translocation of p65 and the transcription of inflammation-related cytokines. **[Conclusion]** HSP27 can not only negatively regulate EMCV-induced autophagy by inhibiting the EIF2S1-ATF4 signaling pathway, but also positively regulate the EMCV-triggered MyD88/NF- κ B signaling pathway, playing multiple regulatory roles in EMCV infection.

Keywords: heat shock protein 27; encephalomyocarditis virus; autophagy; endoplasmic reticulum stress; nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway

脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)是一种重要的自然疫源性人兽共患病病原体,呈全球性分布,可使偶蹄类动物、啮齿动物甚至灵长类动物出现脑炎、心肌炎或心肌周围炎等临床症状^[1]。血清学调查发现,我国规模化猪场普遍存在 EMCV 感染,而且人类也易感染 EMCV,统计数据显示,健康中国人血清中 EMCV 的抗体阳性率大约为 30.56%^[2]。此外,EMCV 常作为病毒性心肌炎和糖尿病的研究模型,并且在免疫学中可用作双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)的刺激剂,被广泛用于 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)和胞质受体的研究^[1]。因此深入了解 EMCV 的感染机制对于 RNA 病毒的防控具有重要的指导意义。病毒作为一类严格的胞内寄生生物,在侵入宿主细胞后通常会利用宿主细胞的内质网(endoplasmic reticulum, ER)合成系统生产自身蛋白,为其复制服务;同时,内质网中大量的病毒蛋白迅速聚集,迫使蛋白质加工超负荷运转,极易导致内质网中未折叠蛋白及错误折叠蛋白的过度堆积,引起内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[3-5]。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78 kDa, GRP78)作为内质网稳态的感受器,通常被认为是 ERS 发生的标志分子^[6]。当堆积的蛋白质量超过 ER 的降解能力时,会诱发非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),激活蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)、激活转录因子-6 (activating transcription factor 6 α , ATF6)及肌醇酶-1 α (inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1 α , IRE-1 α)这 3 种不同的信号通路,促使 ER 恢复正常生理功能,利于细胞存活^[5]。此外,为了进一步协助 ER 恢复稳态,抵抗 ERS 的持续发生,宿主细胞还能通过 UPR 诱导细胞自噬

(autophagy)来降解和清除 ER 中的错误折叠蛋白^[7]。已有研究显示,很多 RNA 病毒比如柯萨奇病毒 B3 (coxsackievirus B3, CVB3)、肠病毒 71 (enterovirus 71, EV71)、鼻病毒(rhinovirus, RV)都能诱导 ERS 的发生,并且越来越多的研究揭示 ERS 能诱导细胞自噬的发生^[8-9]。PERK 是 ERS 的重要传感器之一,它能诱导翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α subunit 1, EIF2S1)的第 51 位丝氨酸发生磷酸化,促进应激特异性转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)翻译,激活自噬相关因子的表达,有助于自噬的发生^[7]。Hou 等研究报道 EMCV 的非结构蛋白 2C 和 3D 能够通过激活 PERK 和 ATF6 α 这两条内质网应激途径参与病毒诱导的细胞自噬^[10]。而关于宿主因子在 EMCV 感染过程中是否参与这两条内质网应激信号通路,目前国内外尚无相关报道。

通常在病毒感染期间,核转录因子 κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B)信号通路的活化被认为是宿主为抵抗病原体感染而产生的一种保护机制^[11]。NF- κ B 介导的信号通路在细胞增殖、细胞凋亡、炎症反应及机体的免疫应答反应等过程中发挥着重要的调控作用,参与多种生命进程^[12]。研究表明多种 RNA 病毒感染均能激活 NF- κ B 信号级联反应,如 EMCV、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)及新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2),并促使多种细胞因子和趋化因子的表达^[1,13-14]。髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是一种重要的 TLRs 信号通路转导分子,它能与大多数 TLRs 直接作用,如 TLR1/2/5/6/7/8/9,活化 NF- κ B 信号通路,调控炎症反应和疾病发生发展^[15]。本课题组前期研究发现 MyD88 在

EMCV 感染期间能被活化(未发表),但对 MyD88 介导的 NF- κ B 信号通路是否参与 EMCV 感染过程未进行深入研究。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)又称应激蛋白(stress protein, SP),是指细胞在高温、低温、缺氧、微生物感染、饥饿或创伤等应激原的刺激下表达量急剧升高的一类蛋白质^[16]。热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27)隶属于该家族中的小分子热休克蛋白(small heat shock proteins, sHSPs),它在自然界生物中分布比较广泛,不仅见于细菌、酵母菌,也普遍存在于植物和动物中^[17-18],在细胞增殖分化、细胞凋亡、细胞应激、病毒增殖及肿瘤的发生和转移等免疫调节过程中均发挥重要作用^[19-21]。Kumano 等^[20]研究发现使用 siRNA 沉默前列腺癌细胞中 HSP27 基因表达后,能够诱导 ERS,并激活 UPR 中 3 条内质网应激信号通路和细胞自噬。近年来有研究证实 HSP27 还可以与猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)及与 EMCV 同科的口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)等多种病毒的结构或非结构蛋白互作,调控病毒诱导的 NF- κ B 信号通路、I 型干扰素或自噬通路^[22-24],进而影响病毒的增殖过程。本课题组前期研究表明 EMCV 非结构蛋白 2C^{pro} 和 3A^{pro} 能够与 HSP27 相互作用,降解 HSP27 蛋白表达;而 HSP27 能够负向调控 EMCV 的增殖,并通过特异性地与黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5)结合来稳定 MDA5 的表达从而促进病毒触发的 I 型干扰素(interferon, IFN)信号级联反应^[25]。鉴于 HSP27 可参与机体的多种免疫调节过程,在 EMCV 感染过程中 HSP27 是否还参与其他信号通路尚无明确报道。本研究拟通过探究在 EMCV 感染过程中 HSP27 与内质网应激介导的 EIF2S1-ATF4 信号通路、MyD88 介导的

NF- κ B 信号通路的关系,为明确其他宿主因子体外调控 EMCV 增殖的机制研究奠定基础,并为进一步揭示 EMCV 致病的分子机制提供有力证据。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒及毒株

人肺泡腺癌基底上皮细胞(A549)、叙利亚地鼠肾细胞(BHK-21)、pCMV-Myc 质粒(简称 vector)、pCMV-Myc-HSP27 质粒(简称 Myc-HSP27)及 EMCV PV21 毒株(GenBank 登录号: X74312)均由西北民族大学生物医学研究中心提供。

1.2 主要试剂及抗体

新生牛血清,兰州民海生物工程有限公司; DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基,兰州百灵生物技术有限公司; RIPA 裂解液、PMSF、鼠抗 SQSTM1、兔抗 GRP78、兔抗 ATF4、兔抗 ATG5、兔抗 NF- κ B p65 亚基(简称 p65)及兔抗 phospho-p65 (简称 p-p65),上海碧云天生物技术有限公司; Evo M-MLV RT kit with gDNA clean for qPCR II 及 TransStart Top Green qPCR SuperMix(+Dye II),北京全式金生物技术股份有限公司; Lipofectamine[®] 2000 及 Opti-MEM[®] I 减血清培养基, Thermo Fisher 公司; Premix Ex Taq Probe qPCR 及 RNAiso Plus, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 鼠抗 Myc Tag、鼠抗 GAPDH、兔抗 HSP27、兔抗 LC3B、兔抗 MyD88、兔抗 TAK1、兔抗 EIF2S1、兔抗 phospho-EIF2S1 (简称 p-EIF2S1)、Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L) 及 CoraLite488 标记的山羊抗兔 IgG(H+L), Proteintech 公司; 兔抗 IKK α , 生工生物工程(上海)股份有限公司; 兔抗 HIST3H3, 北京索莱宝科技有限公司; 兔抗 Beclin1, 亚科因(武汉)生物技术有限公司; 鼠抗 ATF6 α , Santa cruz 公司; DAPI, Sigma-Aldrich 公司; 细胞膜/胞浆/核膜

蛋白分步提取试剂盒, 上海贝博生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠/兔 IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch 公司; EMCV VP1 单克隆抗体由南京农业大学白娟副教授惠赠。

1.3 引物

根据 NCBI 中公布的人源 *p65*、*TNF α* 、*CXCL10*、*IL-6* 和 *IL-1 β* 核苷酸序列, 利用 Primer Express v3.0 软件分别设计 1 对荧光定量 PCR 引物, 引物序列如表 1 所示; *GAPDH* 及 *HSP27* 基因的荧光定量引物序列参见 Li 等^[25]研究, 所有引物均由西安擎科泽西生物科技有限责任公司合成。

1.4 EMCV 感染对自噬及内质网应激信号通路分子表达的影响

为了探究 EMCV 感染对自噬相关蛋白表达的影响, 以 0.000 1 感染复数(multiplicity of infection, MOI) EMCV 感染 A549 细胞, 或者以 0.1 MOI EMCV 感染 BHK-21 细胞, 然后分别于不同时间收集细胞, 免疫印迹分别检测 VP1、Beclin1、SQSTM1 及 LC3B 等蛋白表达的情况。随后分别以 0.000 1、0.001、0.01 及 0.1 MOI EMCV 感染 BHK-21 细胞, 12 h 后收集细胞, 免疫印迹检测 VP1、Beclin1、SQSTM1 及 LC3B 等蛋白表达的情况。为进一步明确 EMCV 感染

对内质网应激介导的 EIF2S1-ATF4 信号通路的影响, 以 0.1 MOI EMCV 感染 BHK-21 细胞, 分别于不同时间(0、6、9 和 12 h)收取细胞, 免疫印迹检测 Beclin1、GRP78、ATG5、ATF6 α 、ATF4、EIF2S1、p-EIF2S1 及 VP1 等蛋白的表达变化。

1.5 干扰 HSP27 对自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路分子表达的影响

参考 NCBI 中公布的人源 HSP27 核苷酸序列(NM_001540.5), 由广州锐博生物技术有限公司设计并合成 2 条靶向 HSP27 的 siRNA, 其中 siHSP27-001 靶序列为 5'-GCTGCAAAATCCGATGAGA-3', siHSP27-002 靶序列为 5'-GGTGCTTCACGCGGAAATA-3'。因这两个 siRNA 均具有降低 HSP27 蛋白表达的效果^[25], 故将两者混合, 命名为 siHSP27-Mix。将形态正常且生长状态良好的 A549 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 次日待细胞密度达到约 50%时, 利用 Lipofectamine 2000 将 siHSP27-Mix 或 siNC 转染细胞, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。然后以 0.01 MOI EMCV 感染上述细胞, 36 h 后收集细胞, 免疫印迹检测 HSP27、VP1、LC3B、SQSTM1 及 ATG5、EIF2S1、p-EIF2S1、ATF4 等 1.4 中 EMCV 感染激活的自噬及内质网应激通路相关蛋白表达的变化。

表 1 核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences

Names	Nucleotide sequences (5'→3')
Homo- <i>p65</i> -qF	TGAACCGAAACTCTGGCAGCTG
Homo- <i>p65</i> -qR	CATCAGCTTGCGAAAAGGAGCC
Homo- <i>TNFα</i> -qF	GCCGCATCGCCGTCTCCTAC
Homo- <i>TNFα</i> -qR	CCTCAGCCCCCTCTGGGGTC
Homo- <i>CXCL10</i> -qF	GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC
Homo- <i>CXCL10</i> -qR	GTCCATCCTTGGAAGCACTGCA
Homo- <i>IL-6</i> -qF	TTCTCCACAAGCGCCTTCGGTC
Homo- <i>IL-6</i> -qR	TCTGTGTGGGGCGGCTACATCT
Homo- <i>IL-1β</i> -qF	TGGCAATGAGGATGACTTGTTCT
Homo- <i>IL-1β</i> -qR	CTGTAGTGGTGGTCGGAGATT

1.6 过表达 HSP27 对自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路分子表达的影响

将形态正常且生长状态良好的 A549 细胞接种于 6 孔培养板中, 次日待细胞密度达到约 80% 时, 利用 Lipofectamine 2000 将 pCMV-Myc 或 Myc-HSP27 转染细胞^[26], 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。然后以 0.01 MOI EMCV 感染上述细胞, 36 h 后收集细胞, 免疫印迹检测 Myc、VP1、LC3B、SQSTM1、Beclin1 及 ATG5、EIF2S1、p-EIF2S1、ATF4 等 1.4 中 EMCV 感染激活的自噬及内质网应激通路相关蛋白表达的变化。

1.7 干扰 HSP27 对 MyD88/NF-κB 信号通路分子及炎症相关因子表达的影响

将形态正常且生长状态良好的 A549 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 次日待细胞密度达到约 50% 时, 利用 Lipofectamine 2000 将 siHSP27-Mix 或 siNC 转染细胞, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。然后以 0.01 MOI EMCV 感染上述细胞, 36 h 后收集细胞, RT-qPCR 检测 *IL-1β*、*IL-6*、*CXCL10*、*TNFα* 及 *p65* 等炎症相关因子基因水平的变化, 免疫印迹检测 HSP27、VP1、p65、p-p65、IKKα、TAK1、MyD88 等 MyD88/NF-κB 信号通路蛋白表达的变化。

1.8 过表达 HSP27 对 MyD88/NF-κB 信号通路分子及炎症相关因子表达的影响

将形态正常且生长状态良好的 A549 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 次日待细胞密度达到约 80% 时, 利用 Lipofectamine 2000 将 pCMV-Myc 或 Myc-HSP27 转染细胞, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。然后以 0.01 MOI EMCV 感染上述细胞, 36 h 后收集细胞, RT-qPCR 检测 *IL-1β*、*IL-6*、*CXCL10*、*TNFα* 及 *p65* 等炎症相关因子基因水平的变化, 免疫印迹检测 Myc、VP1、p65、p-p65、IKKα、TAK1、

MyD88 等 MyD88/NF-κB 信号通路蛋白表达的变化。

1.9 HSP27 对 p65 核移位的影响

为了深入探索 HSP27 对 MyD88/NF-κB 信号通路下游关键分子 p65 核移位的影响, 一组将 pCMV-Myc 或 Myc-HSP27 转染 A549 细胞, 36 h 后收集细胞, 按照贝博生物的细胞膜、胞浆和核膜蛋白提取试剂盒说明书进行核质分离实验; 另一组将 pCMV-Myc 或 Myc-HSP27 转染 A549 细胞, 24 h 后固定细胞, 加入兔抗 p65 和鼠抗 Myc 孵育一定时间, 然后加入 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 及 CoraLite488 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 避光作用 1 h, 再加入荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), 最后利用蔡司激光共聚焦显微镜(LSM900)进行拍照。

1.10 数据统计分析

数据以 3 个独立实验的平均值±标准差 (standard deviation, SD) 来表示, 统计学显著性分析采用 one-way ANOVA 或 Student's *t*-test 进行 (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 EMCV 感染对自噬及内质网应激信号通路分子表达的影响

结果显示, 随着 EMCV 感染时间的延长及感染复数的增加, LC3B-I 型向 LC3B-II 型转化明显增多, Beclin1 的表达也明显增加, 而 SQSTM1 的表达逐渐降低, 说明 SQSTM1 在 EMCV 感染过程中被大量降解(图 1A-1C), 以上结果均说明 EMCV 感染不同细胞后均可诱导细胞自噬的发生。EMCV 感染 BHK-21 细胞后, ATG5 表达无明显变化, 说明 EMCV 诱导的细胞自噬可能与 ATG5 无关; GRP78 表达有增加趋势, 提示 EMCV 感染可能与内质网应激信号

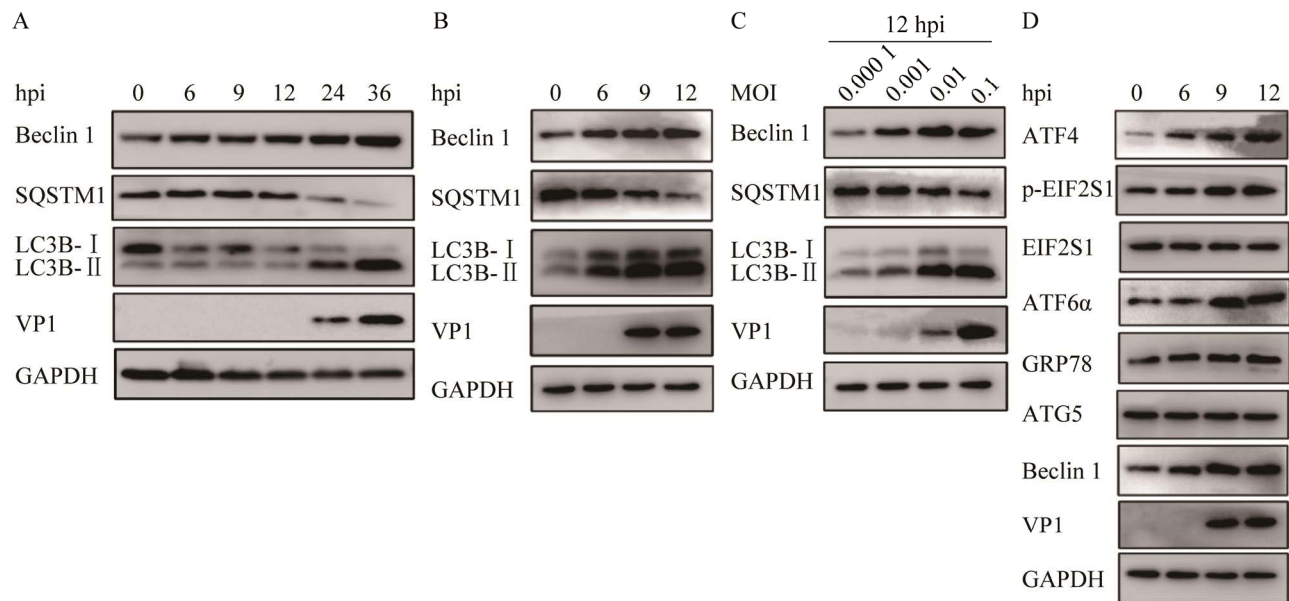


图 1 EMCV 感染对自噬及内质网应激信号通路分子表达的影响

Figure 1 Effects of EMCV infection on the expression of autophagy and endoplasmic reticulum stress signaling pathway molecules. A: A549 cells were infected with EMCV at a multiplicity of infection (MOI) of 0.000 1 for 0 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h or 36 h, respectively. Cells were collected and treated, and the expression of autophagy markers such as SQSTM1, LC3B were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. B: BHK-21 cells were infected with EMCV at an MOI of 0.1 for 0 h, 6 h, 9 h or 12 h, respectively. Cells were collected and treated, and the expression of autophagy markers such as SQSTM1, LC3B were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. C: BHK-21 cells were infected with EMCV at an MOI of 0.000 1, 0.001, 0.01 or 0.1 for 12 h, respectively. Cells were collected and treated, and the expression of autophagy markers such as SQSTM1, LC3B were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. D: BHK-21 cells were infected with EMCV at an MOI of 0.1 for 0 h, 6 h, 9 h or 12 h, respectively. Cells were collected and treated, and the expression of ATG5, GRP78, ATF6 α , EIF2S1, p-EIF2S1 and ATF4 were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control.

通路相关, 进一步检测发现 EIF2S1 蛋白表达没有改变, 而磷酸化的 EIF2S1(p-EIF2S1)、ATF6 α 及 ATF4 表达均明显上升(图 1D)。综上所述, 均说明 EMCV 感染可通过激活 EIF2S1-ATF4 及

2.2 干扰 HSP27 对自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路分子表达的影响

为探索 HSP27 对 EMCV 诱导的自噬和 EIF2S1-ATF4 内质网应激信号通路的影响, 干扰宿主细胞中的 HSP27 表达后感染 EMCV, 结

果发现干扰 HSP27 有利于 EMCV 增殖(图 2A–2C), 促进 Beclin1 和 LC3B-II 表达的增加及 SQSTM1 的降解(图 2B), 从而更利于细胞自噬的发生; 而且干扰 HSP27 后也能显著增加 p-EIF2S1 和 ATF4 的表达(图 2C), 促进内质网应激信号通路的激活。

2.3 过表达 HSP27 对自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路相关蛋白表达的影响

为了进一步验证过表达 HSP27 对上述信号通路的激活是否具有反向调控作用, 结果发现过表达 HSP27 能够抑制 EMCV 增殖(图 3A–3C),

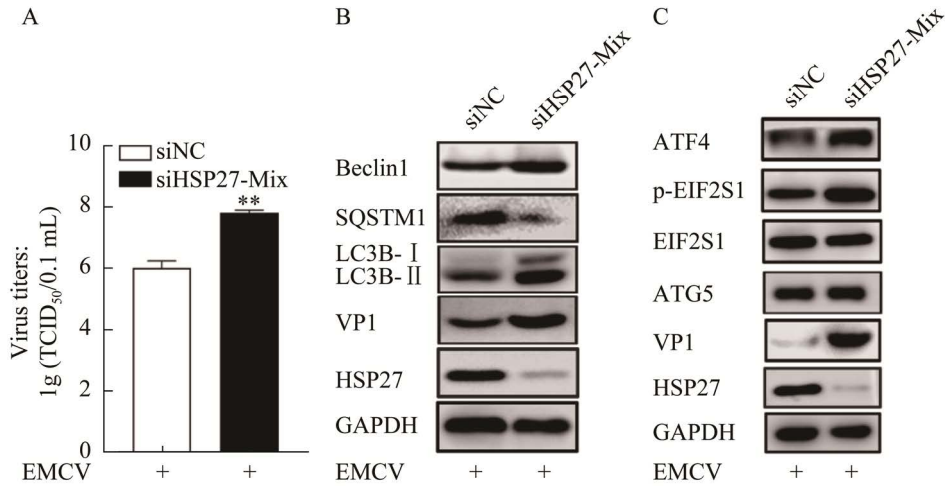


图 2 干扰 HSP27 对自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路分子表达的影响

Figure 2 Effects of knockdown of HSP27 on the expression of autophagy and EIF2S1-ATF4 signaling pathway molecules. A549 cells were transfected with either 150 nmol of siHSP27-Mix or siNC for 24 h before infecting with EMCV at an MOI of 0.01 for 36 h. Cells were collected and treated. A: Viral titers were measured by TCID₅₀ assay. B: The expression of autophagy markers such as SQSTM1, LC3B were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. C: The expression of ATG5, EIF2S1, p-EIF2S1 and ATF4 were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. Data were represented as mean±SD of three independent experiments, **: $P < 0.01$.

有效降低 EMCV 感染激活的 Beclin1 及 LC3B-II 的表达, 减少 SQSTM1 的降解, 从而削弱细胞自噬的进程(图 3B); 并且也能显著抑制 EMCV 感染激活的 p-EIF2S1 和 ATF4 的表达(图

3C), 抑制内质网应激信号通路的激活。总之, 这些结果均表明 HSP27 抑制 EMCV 增殖还可通过抑制 EIF2S1-ATF4 信号通路从而负调控自噬而实现。

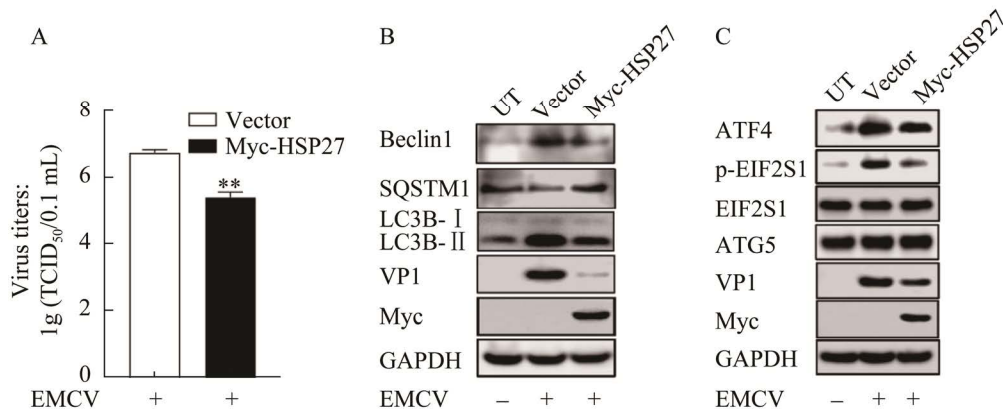


图 3 过表达 HSP27 对自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路分子表达的影响

Figure 3 Effects of overexpression of HSP27 on the expression of autophagy and EIF2S1-ATF4 signaling pathway molecules. A549 cells were transfected with either pCMV-Myc or Myc-HSP27 for 24 h before infecting with EMCV at an MOI of 0.01 for 36 h. Cells were collected and treated. A: Viral titers were measured by TCID₅₀ assay. B: The expression of autophagy markers such as SQSTM1, LC3B were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. C: The expression of ATG5, EIF2S1, p-EIF2S1 and ATF4 were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. Data were represented as mean±SD of three independent experiments, **: $P < 0.01$.

2.4 干扰 HSP27 对 MyD88/NF- κ B 信号通路分子及炎症相关因子表达的影响

为了验证 HSP27 对其他信号通路是否也具有调控作用, 沉默细胞中 HSP27 表达再感染 EMCV 后发现病毒滴度明显上调(图 4A), *p65*、*IL-1 β* 、*IL-6*、*CXCL10*、*TNF α* 等炎症相关因子基因水平均下调(图 4B-4D), 并且也可以减少 EMCV 感染激活的 MyD88、TAK1、IKK α 、p-p65 蛋白的表达(图 4E), 说明干扰 HSP27 能抑制 EMCV

诱导的 MyD88/NF- κ B 信号通路的活化。

2.5 过表达 HSP27 对 MyD88/NF- κ B 信号通路分子及炎症相关因子表达的影响

同样, 验证在 EMCV 感染过程中过表达 HSP27 对 MyD88/NF- κ B 信号通路的影响, 结果显示过表达 HSP27 能显著抑制 EMCV 的增殖, 并且抑制程度与转染的质粒剂量呈正相关(图 5A), 促进 *p65*、*IL-1 β* 、*IL-6*、*CXCL10*、*TNF α* 等炎症相关因子基因的表达水平(图 5B-5D),

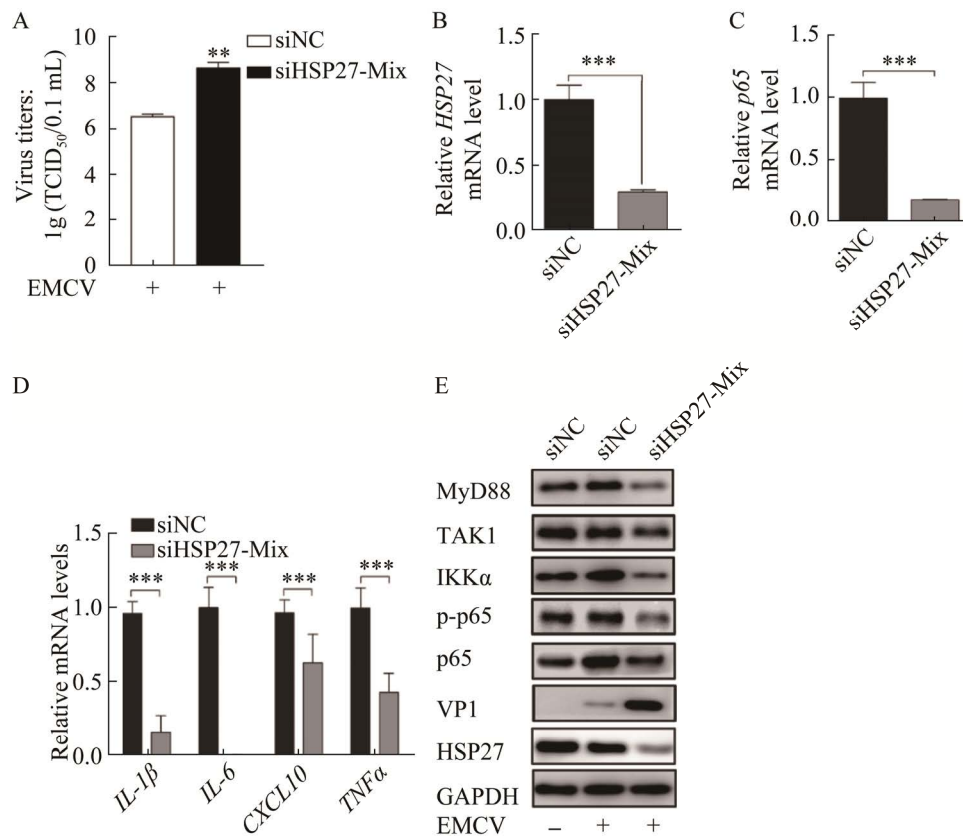


图 4 干扰 HSP27 对 MyD88/NF- κ B 信号通路分子及炎症相关因子表达的影响

Figure 4 Effects of knockdown of HSP27 on the expression of MyD88/NF- κ B signaling pathway molecules and inflammation related factors. A549 cells were transfected with either 150 nmol of siHSP27-Mix or siNC for 24 h before infecting with EMCV at an MOI of 0.01 for 36 h. Cells were collected and treated. A: Viral titers were measured by TCID₅₀ assay. B: The mRNA expression level of HSP27 was detected by RT-qPCR. C: The mRNA expression level of p65 was detected by RT-qPCR. D: The mRNA expression levels of *p65*, *IL-1 β* , *IL-6*, *CXCL10*, *TNF α* were detected by RT-qPCR. E: The expression of MyD88, TAK1, IKK α , p65 and p-p65 were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. Data were represented as mean \pm SD of three independent experiments, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

增强 MyD88、TAK1、IKK α 、p-p65 蛋白的表达，并呈现明显的剂量依赖关系(图 5E)。综合这些结果表明，HSP27 在 EMCV 感染宿主细胞过程中，还能促进 MyD88/NF- κ B 信号通路的活化及下游炎症相关因子的表达。

2.6 HSP27 对 p65 核移位的影响

为了验证 HSP27 对 NF- κ B p65 亚基核移位的影响，结果发现过表达 HSP27 后细胞核中 p65

的表达明显增加，证实了 HSP27 能够促进 p65 的入核(图 6A)；激光共聚焦显微镜检测发现，对照组细胞中 p65 几乎都弥散性地分布在胞质中，而过表达 HSP27 后 p65 分子在细胞核中的分布呈增加趋势(图 6B)。这些结果均说明 HSP27 正调控 EMCV 触发的 MyD88/NF- κ B 信号通路下游炎症相关因子的表达是通过促进 p65 的核移位来实现的。

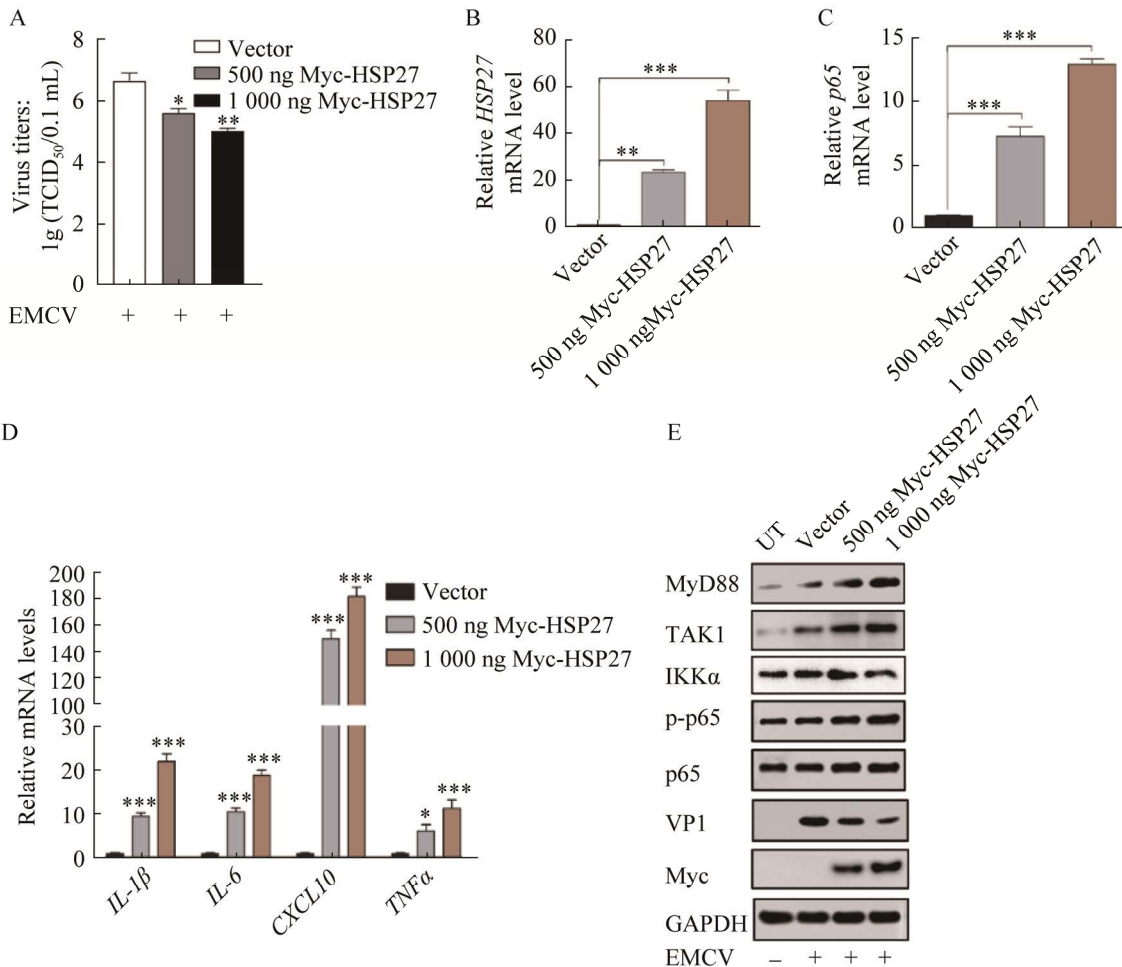


图 5 过表达 HSP27 对 MyD88/NF- κ B 信号通路分子及炎症相关因子表达的影响

Figure 5 Effects of overexpression of HSP27 on the expression of MyD88/NF- κ B signaling pathway molecules and inflammation related factors. A549 cells were transfected with either pCMV-Myc or Myc-HSP27 (500 ng and 1 000 ng) for 24 h before infecting with EMCV at an MOI of 0.01 for 36 h. Cells were collected and treated. A: Viral titers were measured by TCID₅₀ assay. B: The mRNA expression level of HSP27 was detected by RT-qPCR. C: The mRNA expression level of p65 was detected by RT-qPCR. D: The mRNA expression levels of p65, IL-1 β , IL-6, CXCL10, TNF α were detected by RT-qPCR. E: The expression of MyD88, TAK1, IKK α , p65 and p-p65 were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. Data were represented as mean \pm SD of three independent experiments, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

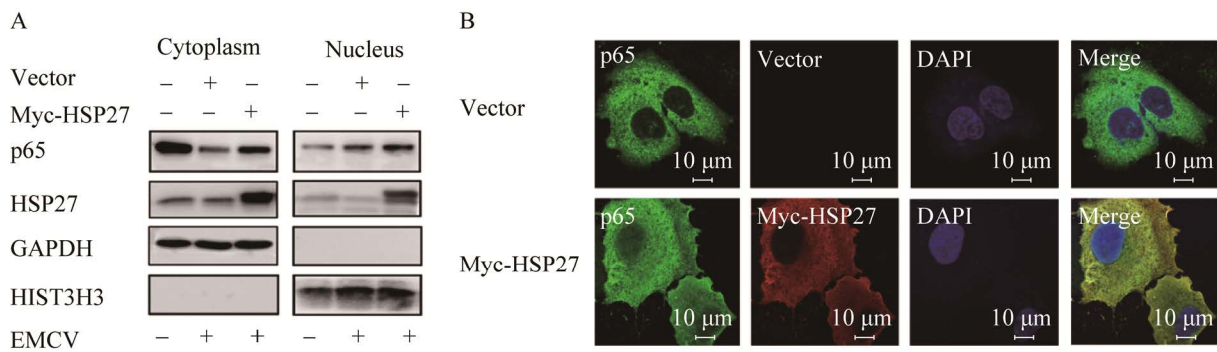


图 6 HSP27 对 p65 核移位的影响

Figure 6 Effects of HSP27 on nuclear translocation of p65. A: A549 cells were transfected with either pCMV-Myc or Myc-HSP27 for 24 h before infecting with EMCV at an MOI of 0.01 for 36 h. Cells were collected and detected for nucleocytoplasmic separation. The expression of p65 and HSP27 were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a cytoplasmic loading control; HIST3H3 was used as a nuclear loading control. B: A549 cells were transfected with either pCMV-Myc or Myc-HSP27 for 12 h before fixing cells for immunofluorescence imaging under a confocal microscope for Myc-HSP27 (red), nuclei (blue) and p65 protein (green). Scale bar=10 μm (630 \times 1.4).

3 讨论与结论

ERS 和细胞自噬是机体为了维持自身环境稳态而形成的两种生理机制, 研究表明 ERS 能够促使自噬的发生, 与此同时自噬会通过降解错误折叠或未折叠的蛋白质, 减少或缓解内质网的压力, 保证细胞生存^[3,7]。本研究发现在 EMCV 感染过程中 GRP78 表达有增加趋势, 推测可能 EMCV 感染与内质网应激信号通路相关, 经验证发现 EIF2S1-ATF4 及 ATF6 α 信号通路被激活, 这与 Hou 等的研究结果一致^[10]。同时发现在 EMCV 感染过程中腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) 的磷酸化水平有所增加, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的磷酸化水平有明显减弱 (图片略), 推测 EMCV 感染还能通过激活 AMPK 和抑制 mTOR 活性, 促进自噬的形成, 但具体机制还需要进一步探索和证实。而且发现 EMCV 诱导的自噬和 HSP27 对自噬的调控作用均与 Beclin1 紧密相关, 而与 ATG5 无关。近年来大

量研究表明 EMCV、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 及 PRRSV^[27-29] 等多种病毒在诱导宿主细胞发生自噬的同时又可借助自噬来促进病毒的复制。本研究发现干扰宿主细胞中的 HSP27 可促进自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路, 而过表达 HSP27 能有效降低 EMCV 诱导的自噬及 EIF2S1-ATF4 信号通路, 综合这些表明 HSP27 还可以通过抑制 EIF2S1-ATF4 信号通路来负调控自噬, 从而抑制 EMCV 的体外增殖。

NF- κB 信号通路的活化能促进天然免疫和获得性免疫中的许多炎症因子和趋化因子的表达, 故 NF- κB 具有抗感染的作用, 但是过度激活的炎症反应也可能会启动“细胞因子风暴”效应, 引起免疫病理反应^[11]。本研究结果表明 EMCV 感染可以诱导 MyD88/NF- κB 信号通路的活化, 干扰 HSP27 能抑制病毒诱导的 MyD88/NF- κB 信号通路的活化, 相反过表达 HSP27 能促进 MyD88/NF- κB 信号通路分子的表达、p65 的核移位和炎症相关因子的转录表达, 表明 HSP27 在 EMCV 感染过程中还可以正

调控 MyD88/NF- κ B 信号通路。故推测 HSP27 抑制 EMCV 增殖可能不仅仅是因为它作为 MDA5 的伴侣分子在 I 型干扰素信号级联反应中的作用,还与它参与内质网应激介导的自噬途径及 NF- κ B 信号通路相关。但这些信号通路中哪种优先触发或是发挥主导作用,而且各个信号通路之间是否存在交互作用,这些问题都有待进一步研究予以解决。结合本课题组对 HSP27 的前期研究结果,表明 HSP27 在 EMCV 感染过程中具有多种调控作用。但鉴于不同的 RNA 病毒生命周期及复制的分子机理等都不尽相同,故 HSP27 在不同 RNA 病毒的具体调控机制可能存在不同,不能一概而论。

本研究是在课题组前期研究基础上进行的补充和延续,更加详尽地揭示了 HSP27 在 EMCV 感染中发挥着多重调控作用,为明确其他宿主因子体外调控 EMCV 增殖的机制研究提供思路;也愈发深刻地了解了 RNA 模式病毒 EMCV 在感染宿主细胞过程中为了实现自身增殖,逃避机体免疫系统的清除,可利用多种免疫逃逸策略,为进一步揭示 EMCV 致病的分子机制提供有力证据。

参考文献

- [1] CAROCCI M, BAKKALI-KASSIMI L. The encephalomyocarditis virus[J]. *Virulence*, 2012, 3(4): 351-367.
- [2] FENG RF, WEI J, ZHANG HX, FAN JJ, LI XR, WANG D, XIE JY, QIAO ZL, LI MS, BAI JL, MA ZR. National serosurvey of encephalomyocarditis virus in healthy people and pigs in China[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(12): 2957-2964.
- [3] 季宇彬, 张璐, 辛国松, 李莹琳, 杨琪, 李鑫, 薛沁冰. 内质网应激反应与细胞自噬相互作用机制研究进展[J]. *食品与药品*, 2016, 18(6): 443-447.
- [4] 谭小飞, 吕颂雅. 病毒感染与内质网应激[J]. *生物化工*, 2018, 4(3): 150-151, 154.
- [5] 刘宇婷, 李国新, 王斌. 疱疹病毒与内质网应激[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 67-77.
- [6] LEE AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress[J]. *Methods*, 2005, 35(4): 373-381.
- [7] 尹姣姣, 潘耀柱, 白海. 内质网应激与细胞自噬[J]. *西北国防医学杂志*, 2016, 37(11): 746-749.
- [8] LUO XN, YAO HL, SONG J, SONG QQ, SHI BT, XIA D, HAN J. Coxsackievirus B3 infection triggers autophagy through 3 pathways of endoplasmic reticulum stress[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2018, 31(12): 867-875.
- [9] LI PQ, YANG SD, HU DD, WEI D, LU J, ZHENG HY, NIE SS, LIU GM, YANG HM. Enterovirus 71 VP1 promotes mouse Schwann cell autophagy via ER stress-mediated PMP22 upregulation[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 44(2): 759-767.
- [10] HOU L, GE XN, XIN LX, ZHOU L, GUO X, YANG HC. Nonstructural proteins 2C and 3D are involved in autophagy as induced by the encephalomyocarditis virus[J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 156.
- [11] 王平忠, 于海涛, 白雪帆, 张颖. NF- κ B 信号通路在病毒感染中的作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(8): 933-934, 937.
- [12] 单佳铃, 程虹毓, 文乐, 钟国跃, 朱继孝. TLR/MyD88/NF- κ B 信号通路参与不同疾病作用机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4): 451-455.

- [13] YU ZB, HUANG C, ZHANG Q, FENG WH. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces IL-12p40 production through JNK-AP-1 and NF- κ B signaling pathways[J]. *Virus Research*, 2016, 225: 73-81.
- [14] HARIHARAN A, HAKEEM AR, RADHAKRISHNAN S, REDDY MS, RELA M. The role and therapeutic potential of NF-kappa-B pathway in severe COVID-19 patients[J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(1): 91-100.
- [15] 王敏. 基因 3 型戊型肝炎病毒 ORF3 蛋白对 NF- κ B 通路调控作用的研究[D]. 武汉: 华中科技大学博士学位论文, 2018.
WANG M. Research on the nf-kb pathway regulation by ORF3 of genotype 3 hepatitis E virus[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)
- [16] IKWEGBUE PC, MASAMBA P, OYINLOYE BE, KAPPO AP. Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer[J]. *Pharmaceuticals: Basel, Switzerland*, 2017, 11(1): 2.
- [17] DAN XL, WAN QY, YI LN, LU J, JIAO Y, LI HC, SONG D, CHEN Y, XU HX, HE ML. Hsp27 responds to and facilitates *Enterovirus* A71 replication by enhancing viral internal ribosome entry site-mediated translation[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(9): e02322-e02318.
- [18] HILTON GR, LIOE H, STENGEL F, BALDWIN AJ, BENESCH JLP. Small heat-shock proteins: paramedics of the cell[A]//Topics in Current Chemistry[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 69-98.
- [19] ARRIGO AP. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2017, 22(4): 517-529.
- [20] KUMANO M, FURUKAWA J, SHIOTA M, ZARDAN A, ZHANG F, BERARDI E, WIEDMANN RM, FAZLI L, ZOUBEIDI A, GLEAVE ME. Cotargeting stress-activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012, 11(8): 1661-1671.
- [21] RAJAIYA J, YOUSUF MA, SINGH G, STANISH H, CHODOSH J. Heat shock protein 27 mediated signaling in viral infection[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(28): 5695-5702.
- [22] LING SF, LUO MY, JIANG SN, LIU JY, DING CY, ZHANG QH, GUO HC, GONG WJ, TU CC, SUN JF. Cellular Hsp27 interacts with classical swine fever virus NS5A protein and negatively regulates viral replication by the NF- κ B signaling pathway[J]. *Virology*, 2018, 518: 202-209.
- [23] 李铮, 刘晓玲, 赵振东, 刘文军. 热休克蛋白 27 增强 A 型流感病毒 NS1 对 β 干扰素的抑制作用[J]. *生物工程学报*, 2012, 28(10): 1205-1215.
LI Z, LIU XL, ZHAO ZD, LIU WJ. Heat shock protein 27 enhances the inhibitory effect of influenza A virus NS1 on the expression of interferon-B[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(10): 1205-1215 (in Chinese).
- [24] SUN P, ZHANG SM, QIN XD, CHANG XN, CUI XR, LI HT, ZHANG SJ, GAO HH, WANG PH, ZHANG ZD, LUO JX, LI ZY. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP2 activates the cellular EIF2S1-ATF4 pathway and induces autophagy via HSPB1[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 336-346.
- [25] LI XR, MA RX, WU B, NIU YH, LI HS, LI DY, XIE JY, IDRIS A, FENG RF. HSP27 protein dampens encephalomyocarditis virus replication by stabilizing melanoma differentiation-associated gene 5[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 788870.
- [26] 李倩, 马瑞仙, 许淑娟, 陈延宏, 李向茸, 冯若飞. HSP27 过表达抑制脑心肌炎病毒复制的作用初探[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(5): 812-819.
LI Q, MA RX, XU SJ, CHEN YH, LI XR, FENG RF. The preliminary study on the inhibitory effect of overexpression of HSP27 in encephalomyocarditis virus replication[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2020, 42(5): 812-819 (in Chinese).
- [27] ZHANG YN, LI ZC, GE XN, GUO X, YANG HC. Autophagy promotes the replication of encephalomyocarditis virus in host cells[J]. *Autophagy*, 2011, 7(6): 613-628.
- [28] MOHL BP, TEDBURY PR, GRIFFIN S, HARRIS M. Hepatitis C virus-induced autophagy is independent of the unfolded protein response[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10724-10732.
- [29] LIU QH, QIN YX, ZHOU L, KOU QW, GUO X, GE XN, YANG HC, HU HB. Autophagy sustains the replication of porcine reproductive and respiratory virus in host cells[J]. *Virology*, 2012, 429(2): 136-147.