

登革 2 型病毒对人血管内皮细胞自噬的影响^{*}

杨 杨^{**}, 左 丽^{***}

(贵州医科大学 基础医学院 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] **目的:** 研究登革 2 型病毒 NGC 株(DEN2)感染人血管内皮细胞(HUVEC)后对 HUVEC 自噬的影响。**方法:** 采用免疫组织化学法检测Ⅷ因子表达, 鉴定 HUVEC, 50% 组织细胞感染量(TCID50)测定 DEN2 NGC 株对白纹伊蚊 C6/36 细胞的毒力, 实时荧光定量 PCR 检测感染 DEN2 的 HUVEC 中病毒 mRNA 表达水平的变化, Western-blot 检测 DEN2 感染对 HUVEC 自噬标记性蛋白 LC3B 表达的影响, 激光共聚焦显微镜观察 DEN2 感染 HUVEC 自噬现象。**结果:** 免疫组织化学法结果显示, 细胞表达Ⅷ因子, 符合 HUVEC 特点; 接种 DEN2 后 5~7 d C6/36 细胞出现肿胀、融合、产生空泡等典型的细胞病变, TCID50 为 $10^{-5.6}$; 随着感染 DEN2 量增加, HUVEC 中 DEN2 mRNA 相对表达量呈上升趋势, 在加入 1×10^4 TCID50 病毒量时 DEN2 mRNA 相对表达量最高($P < 0.05$); 用巴伐洛霉素 A1(Baf)抑制后, 与未用 Baf 相比, 相同 TCID50 DEN2 感染 HUVEC 后 DEN2 mRNA 表达减少($P < 0.05$)。Western-blot 结果显示, 与空白对照组比较, 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID50 DEN2 感染组 LC3B II/I 比值升高, LC3B II/I 条带灰度值增加($P < 0.05$); 用 Baf 抑制后, 与未用 Baf 相比, 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID50 DEN2 感染组 LC3B II/I 比值上高, LC3B II/I 条带灰度增加($P < 0.05$)。激光共聚焦扫描显微镜检测结果显示, 在正常 HUVEC 胞浆内有 LC3B(绿色荧光)及 LAMP1(红色荧光), 荧光融合后绿色、红色荧光重叠; 用 Baf 抑制后, HUVEC 胞浆内绿色红色荧光强度增加, 荧光融合后绿色、红色荧光重叠部分减少; 与正常 HUVEC 相比, 1×10^4 TCID50 DEN2 感染组 HUVEC 胞浆内可观察到绿色、红色及橘黄色荧光(DEN2 NS1), 绿色、红色荧光强度增加, 在荧光融合后绿色、红色与橘黄色荧光重叠。**结论:** HUVEC 在 DEN2 感染后 24 h, 随着感染量增加, 病毒载量增加, 加 Baf 抑制后 DEN2 增殖被抑制; DEN2 感染 HUVEC 后, 在胞浆内 DEN2 NS1 与 LC3B、溶酶体标记蛋白 LAMP1 共定位; DEN2 可诱导 HUVEC 自噬增强, Baf 可抑制 DEN2 感染 HUVEC 自噬的发生。

[关键词] 登革 2 型病毒; 感染; 人血管内皮细胞; 自噬; LC3B; 溶酶体标记性蛋白; 巴伐洛霉素 A1
[中图分类号] Q93-3; R512.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)10-1183-09
DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.013

The Effect of Autophagy on HUVEC Infected with Dengue Virus 2 NGC Strain

YANG Yang, ZOU Li

(Department of Immunology, School of Basic Medicine, Guiyang Medical University, Guizhou, 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To research the effect of autophagy on human vascular endothelial cells (HUVEC) infected with Dengue virus 2 NGC strain (DEN2), so as to provide a scientific basis for the study of the pathogenesis of injury of HUVEC infected with DEN2. **Methods:** Median tissue culture infectious dose (TCID50) was used to determine the virus virulence of DEN2; Changes of DEN2 mRNA levels of HUVEC infected with DEN2 was detected by real-time florescence quantitative PCR; The expression of autophagy marker protein LC3B of HUVEC infected with DEN2 was detected by Western-blot; HUVEC autophagy infected with DEN2 was observed by laser scanning confocal microscopy. **Re-**

^{*}[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81560263, 81860289)
^{**} 贵州医科大学免疫学专业硕士研究生, 现在工作单位河南南阳高等医学专科学校第一附属医院
^{***} 通信作者 E-mail: zuoligymc@163.com
网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.020.html>

sults: 1. Adherent cells were spindle type, growth well and clear outline, which was consistent with HUVEC growth characteristics; The expression of HUVEC factor VIII was detected by immunohistochemistry, and after DAB staining, HUVEC was stained as brown compared to the control group. 2. DEN2 mRNA was detected by Real-time fluorescence quantitative PCR. In groups infected with DEN2 of 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 TCID₅₀, DEN2 mRNA expression increased and showed a rising trend, with statistical significance ($P < 0.05$); In groups infected with DEN2 of 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 TCID₅₀ inhibited by Bafilomycin A1 (Baf), DEN2 mRNA expression increased and showed a rising trend, with statistical significance ($P < 0.05$); Compared with groups uninhibited by Baf, DEN2 mRNA expression decreased in groups inhibited by Baf infected with the same TCID₅₀ DEN2, with statistical significance ($P < 0.05$). 3. LC3B II/I ratio of HUVEC was detected by Western-blot for 24 h. Compared with the control group, in groups infected with DEN2 of 1×10^2 , 1×10^3 TCID₅₀, gray of LC3B II, I bands increased and LC3B II/I ratio of HUVEC turned up with a growing trend. In the group infected with DEN2 of 1×10^4 TCID₅₀ gray of LC3B II, I bands increased and LC3B II/I ratio of HUVEC turned up, with statistical significance ($P < 0.05$); Compared with control group, in groups infected with DEN2 of 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 TCID₅₀ inhibited by Baf, gray of LC3B II, I bands increased and LC3B II/I ratio of HUVEC turned up; Compared with groups uninhibited by Baf, in groups inhibited by Baf infected with 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 gray of LC3B II, I bands increased and LC3B II / I ratio of HUVEC turned up. 4. HUVEC autophagy was observed by Laser confocal microscope for 24 h, autophagy marker protein LC3B (Green), lysosomal marker protein LAMP1 (red) and DEN2 NS1 (orange). In the normal HUVEC, green and red fluorescence could be observed in HUVEC cytoplasm and after fluorescence was synthesized, green and red fluorescence were overlapped. Compared with the control group, in the group inhibited by Baf, the green and red fluorescence intensity increased and after fluorescence was synthesized, green and red fluorescence were partly overlapped. In 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 infected group, green, red and orange fluorescence were observed in cytoplasm and after fluorescence was synthesized, green, red and orange fluorescence were overlapped. **Conclusions:** 1. After infected with DEN2 for 24 h, as concentration of DEN2 increases, viral load in HUVEC increases; DEN2 replication is inhibited after autophagy was inhibited by Baf. 2. DEN2 can enhance HUVEC autophagy; Baf can inhibit HUVEC autophagy induced by DEN2. 3. After infected with DEN2, in HUVEC cytoplasm, DEN2 NS1, autophagy marker protein LC3B and lysosomal marker protein LAMP1 were co-localized.

[**Key words**] Dengue virus 2; human vascular endothelial cells; autophagy; LC3B; lysosomal marker protein; bafilomycin A1

登革病毒 (dengue virus, DEN) 属于黄病毒科黄病毒属, 为被覆包膜的单股正链 RNA 病毒, 分为 1、2、3、4 四个血清型, 其中 DEN2 引起的症状较为严重。DEN 主要通过埃及伊蚊和白纹伊蚊等媒介昆虫传播, 引起登革热 (dengue fever, DF) 以及死亡率很高的登革出血热 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 和登革休克综合征 (dengue shock syndrome, DSS)。DEN 感染广泛流行于热带和亚热带地区, WHO 估计全球每年有 25 亿人处于 DEN 感染威胁当中, 其中有 5 000 万人感染 DEN, 25 万 ~ 50 万为 DHF 和 (或) DSS。DEN 对人类健康的影响在近十年来越来越严重, 其感染已成为世界面临的重大公

共卫生问题^[1-2]。被 DEN 感染后, 可表现为发热、剧烈肌肉疼痛或骨关节痛, 重则广泛出血、迅速休克。DHF 和 DSS 是 DEN 感染的严重的临床类型, 以血管内皮细胞肿胀、通透性增加和出血为主要的病理特征, 其发病机制尚未阐明^[3-4]。自噬 (autophagy) 是在 1962 年被发现的, Ashford 和 Porter 在发现细胞内有“自己吃自己”的现象, 是指降解细胞内物质如损伤的蛋白质和细胞器来维持细胞的稳态, 以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新^[5]。自噬在机体的生理和病理过程中都能见到, 其所起的作用是正面还是负面的尚未完全阐明^[6], 对病毒的研究尤其如此。最近的研究表明,

自噬在病毒感染和病毒复制中起着双重作用,细胞可以利用自噬抵抗病毒感染,亦可利用自噬保护病毒,逃避细胞对病毒的抑制和清除^[7]。本课题以体外培养脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)为模型,观察 DEN2 对 HUVEC 自噬的影响,为 DEN 致病机制的研究提供科学依据。

1 材料及方法

1.1 材料及主要试剂

白纹伊蚊细胞株(C6/36)是中山大学医学院微生物学教研室江丽芳、郭辉玉教授惠赠,常规液氮保存。DEN2 NGC 株购于中国预防科学院流行病学研究所,常规液氮保存。HUVEC 购于上海拜力生物公司,ATCC Catalog No. CRL-1730TM。细胞培养试剂 Medium 199/EBSS 购于 Hyclone,胎牛血清购于 GIBCO, Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)购于 ScienCell, Penicilin-Streptomycin Solu-

tion 和 0.25% 胰蛋白酶(1x)购于 Hyclone, DMSO 购于 Amresco,常规方法配制 Hanks' 液和 PBS。免疫组化 DAB 显色试剂盒,通用型二步法检测试剂,Ⅷ因子相关抗原 F 兔多抗均购于中杉金桥。Trizol, M-MLV 逆转录试剂盒, Platinum SYBR Green qPCR, DNase I Amplification Grade 为 Invitrogen 产品。REGULAR AGAROSE G-10 为 SPAIN 产品, RNA loading Buffer 为 Takara 产品, Rapamycin(Rap, 雷帕霉素)购于碧云天, Bafilomycin A1(Baf, 巴伐洛霉素)为 SIGMA 产品。Anti-LC3B antibody 为 Abcam 产品, Anti-Rabbit IgG (H + L) Antibody 和 Peroxidase labeled 为 KPL 产品, ECL 试剂盒 购于 Thermo, 凯基核蛋白和胞浆蛋白抽提试剂盒购于凯基生物, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购于 Beyotime, Prestained Protein Ladder 为 Thermo 产品。甲醇、胎牛血清(杭州四季青), Triton X-100 为 Solarbio 产品, 抗荧光衰减封片剂购于博士德。实验所用部分抗体及试剂见表 1。

表 1 实验所用部分抗体及试剂
Tab. 1 Antibody used in the experiment

抗体	编号	公司
Anti-LC3B antibody	ab51520	Abcam
Anti- LAMP1 antibody[H4A3]-Lysosome Marker	ab25630	Abcam
Anti-Dengue Virus NS1 glycoprotein antibody[DN2] Goat Anti-Mouse IgG, Dylight TM 550	ab41623	Abcam
Goat Anti-Mouse IgG, Dylight TM 663	NC168254	Pierce
Fluorescein-Labeled Affinity Purified Antibody To Rabbit IgG (H + L)	NB167398	Pierce
4',6-Diamidino-2-phenylindole	02-15 -06	KPL
	D9542	SIGMA

1.2 HUVEC 培养及鉴定

用含 10% 胎牛血清、内皮细胞生长添加物 (ECGS, 稀释比例 1: 100)、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 M199 培养液, 37 ℃、5% CO₂ 条件下常规培养。采用免疫组织化学法鉴定 HUVEC; 接种 HUVEC 细胞 10⁵ 个/孔, 37 ℃ 5% CO₂ 培养 24 h, 常规 Triton X-100 破膜, HRP 标记的抗Ⅷ因子单克隆抗体 200 μL/孔, DAB 显色。

1.3 DEN2 NGC 株毒力鉴定

常规培养, 传代白纹伊蚊细胞株 C6/36, 根据 Reed-Muench 法计算病毒对 C6/36 细胞的 50% 组织细胞感染量 (TCID₅₀)。

1.4 DEN2 感染 HUVEC DEN2 mRNA 的水平检测

Real-time PCR 相对定量法检测 DEN2 感染 HUVEC DEN2 mRNA 的水平。取对数生长期的 HUVEC, 接种于六孔板内, 1 × 10⁶/孔。24 h 用 Hanks'

液洗 3 遍, 加入巴伐洛霉素 A1 (Baf, 20 μmol/L), 37 ℃ 孵育 2 h 后, 再分别加入 1 × 10²、1 × 10³、1 × 10⁴ TCID₅₀ DEN2, 37 ℃ 孵育 2 h。于 24 h 收获细胞。常规方法提取细胞总 RNA, ONE DROP 检测 RNA 浓度, 以 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, -80 ℃ 冻存备用。以 cDNA 为模板, 设空白对照, 3 个复孔, Real-time PCR 引物序列见表 2, 反应体系为 DEPC-H₂O 1.5 μL、10 μmol/L 上游引物 0.5 μL、10 μmol/L 下游引物 0.5 μL、cDNA 10.0 μL (50 ng)、SYBR Green qPCR SuperMix-UDG/ROX 12.5 μL, 总体积为 25.0 μL。95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 10 s、60.5 ℃ 退火 30 s、65 ℃ 延伸 0.05 s、共 39 个循环。记录 Ct 值, 计算平均值, 根据 $\Delta\Delta Ct = DEN2 \text{ 处理组} (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}) - \text{阴性对照组} (Ct_{\text{对照基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})$ 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行统计学分析。

表2 DEN2 及 GAPDH 引物序列

Tab.2 The Primer Sequence for DEN2 and GAPDH

基因	序列	预期扩增 长度(bp)	合成 公司
DEN2	上游5'- AAGCATTACAACCCAGCAACC-3' 下游5'- CCACAGCATACAGCGTCCA-3'	83	TAKARA
GAPDH	上游5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' 下游5'-TGCTGAAGACGCCAGTGGA-3'	138	TAKARA

1.5 检测 HUVEC 自噬蛋白 LC3B

取对数生长期的 HUVEC,接种于6孔板分别加入 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID50 DEN2 病毒液,37℃孵育2h,同时设阳性对照,雷帕霉素(Rap,10nmol/L)37℃孵育2h,于24h收获细胞;取对数生长期的 HUVEC,接种于6孔板,加入Baf(20μmol/L),37℃孵育2h后,再分别加入 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID50 DEN2 病毒液,37℃孵育2h,同时设阳性对照,Rap(10nmol/L)37℃孵育2h,收集24h的HUVEC,加入100μL预冷的buffer,常规方法获取胞浆蛋白,-80℃保存。取HUVEC胞浆蛋白,常规方法SDS-PAGE电泳,NC膜转膜,LC3B抗体(LC3B I及LC3B II),HRP标记的羊抗兔IgG,覆盖NC膜37℃孵育1h,ECL化学发光法显色、曝光;Western-blot检测LC3B水平,计算感染DEN2 24h时HUVEC中LC3B II/I比值及Baf抑制组HUVEC LC3B II/I比值。

1.6 HUVEC 自噬现象

取对数生长期的 HUVEC,接种于激光共聚焦专用培养皿,1×10⁶/孔。设Baf(20μmol/L),1×10⁴TCID50 DEN2 病毒对照,37℃孵育,于24h检测。收集24h HUVEC,1×10⁵/孔,接种于激光共

聚焦专用皿,冰甲醇固定,Triton x-100 破膜,孵育一抗(1:100 兔抗 LC3B、1:10 鼠抗 LAMP1、15鼠抗 NS1),4℃过夜;孵育二抗(110 FITC 标记抗兔、633 标记抗鼠、550 标记抗鼠),50 m/L DAPI 染细胞核 DNA,激光共聚焦扫描显微镜下观察。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件包进行单因素方差分析,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 HUVEC 的鉴定

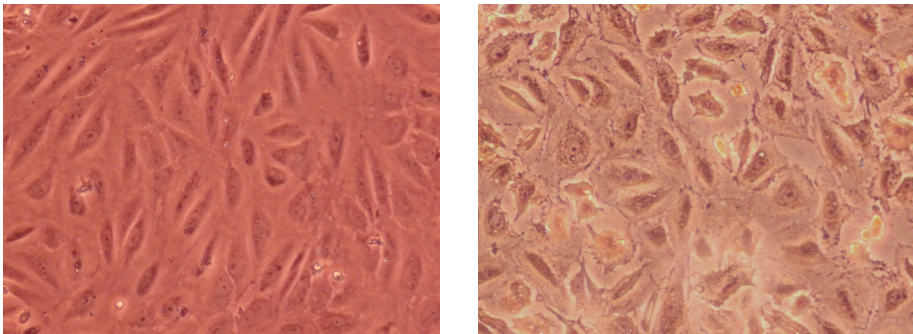
免疫组织化学结果显示,HUVEC 着色呈棕黄色,提示Ⅷ因子阳性表达,符合 HUVEC 特点,见图1。

2.2 HUVEC 培养与 DEN2 的毒力鉴定

接种 DEN2 后5~7d出现C6/36细胞肿胀、融合、产生空泡等典型的细胞病变,结果见图2。将DEN2接种C6/36细胞,逐日观察细胞病变,根据Reed-Muench法计算TCID50为10^{-5.6}。

2.3 感染 DEN2 的 HUVEC 中 DEN2 mRNA 水平

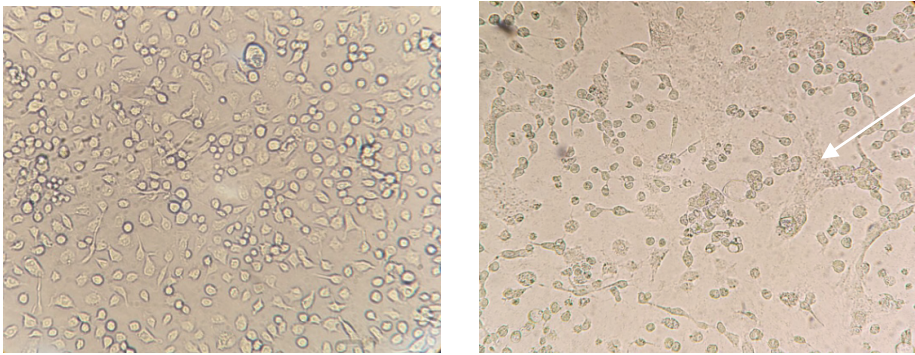
图3显示DEN2、GAPDH mRNA的熔解曲线,波峰单一,波形锐利,排除非特异性扩增。感染DEN2病毒量增加,HUVEC中DEN2 mRNA相对表达量也随之增加,在加入1×10⁴TCID50病毒量时DEN2 mRNA相对表达量最高($P<0.05$),用Baf抑制后,与未用Baf相比,相同TCID50 DEN2感染HUVEC后DEN2 mRNA表达减少($P<0.05$)。见图4。



HUVEC 空白对照 HUVEC 中Ⅷ因子阳性表达

图1 HUVEC 鉴定(DAB, ×200)

Fig.1 Immunohistochemistry of factor Ⅷ in HUVEC



空白对照
DEN2 感染 C6/36 细胞
图 2 DEN2 所致 C6/36 细胞病变 (200 ×)
Fig. 2 The cytopathic effect of C6/36 cell infected with DEN2

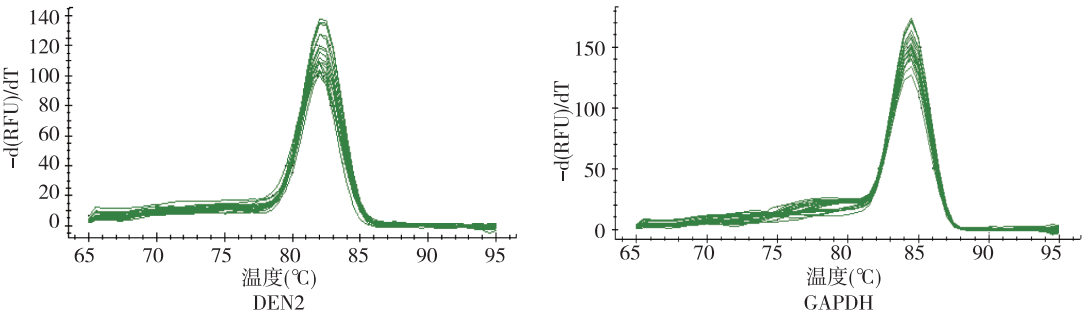
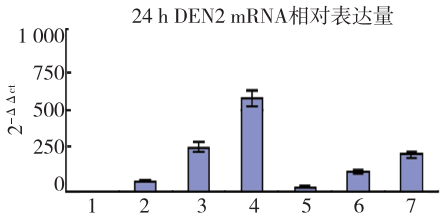


图 3 DEN2、GAPDH mRNA 的溶解曲线
Fig. 3 Dissociation Curve of DEN2 and GAPDH mRNA



注:1 为对照,2、3、4 分别为 1×10^2 TCID₅₀、 1×10^3 TCID₅₀、 1×10^4 TCID₅₀,5、6、7 分别为 1×10^2 TCID₅₀ + Baf, 1×10^3 TCID₅₀ + Baf, 1×10^4 TCID₅₀ + Baf
图 4 感染 DEN2 24 h 时 HUVEC 中 DEN2 mRNA 相对表达量

Fig. 4 Relative expression of DEN2 mRNA-24h

2.4 HUVEC 自噬蛋白 LC3B 表达

与空白对照组相比, 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 感染组 LC3B II / I 比值升高, LC3B II、I 条带灰度值增加 ($P < 0.05$); 用 Baf 抑制后, 与未用 Baf 相比, 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 感染组 LC3BII/I 比值升高, LC3BII、I 条带灰度值增加 ($P < 0.05$)。见图 5、表 3。

2.5 感染 DEN2 的 HUVEC 中自噬蛋白 LC3B、溶酶体标记性蛋白 LAMP1、DEN2 NS1 表达

在正常 HUVEC, 胞浆内可观察到 LC3B (绿色荧光)、LAMP1 (红色荧光) 及 DAPI 染细胞核 (蓝色), 荧光合成后, 绿色、红色荧光重叠 (见图 6); 用

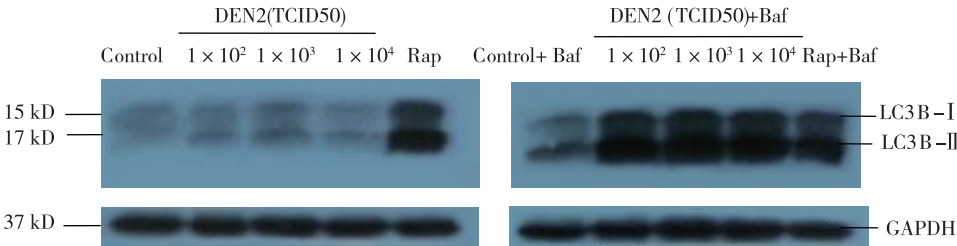


图 5 DEN2 感染 HUVEC 24 h 时 LC3B 表达
Fig. 5 The level of LC3B-24 h of HUVEC infected with DEN2

表3 DEN2 感染 24 h 时 HUVEC 中 LC3BⅡ/Ⅰ 比值

Tab.3 The level of LC3BⅡ/Ⅰ -24 h of HUVEC infected with DEN2

组别	HUVEC 中 LC3BⅡ/Ⅰ 比值	
	未加 Baf	加入 Baf
对照	0.859 0 ±0.065 0	5.512 7 ±0.096 4 ⁽²⁾
1 ×10 ² TCID50 DEN2	1.402 7 ±0.030 9 ⁽¹⁾	26.792 7 ±0.291 6 ⁽¹⁾⁽²⁾
1 ×10 ³ TCID50 DEN2	1.878 3 ±0.069 6 ⁽¹⁾	19.210 3 ±0.286 9 ⁽¹⁾⁽²⁾
1 ×10 ⁴ TCID50 DEN2	1.560 7 ±0.052 3 ⁽¹⁾	24.279 3 ±0.609 1 ⁽¹⁾⁽²⁾
Rap	5.611 0 ±0.231 2 ⁽¹⁾	22.357 3 ±0.510 4 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与未加 Baf 比较, $P < 0.05$

Baf 抑制后, HUVEC 胞浆内可观察到绿色、红色荧光强度增加, 荧光融合后, 绿色、红色荧光重叠部分减少。与正常 HUVEC 相比, 1×10^4 TCID50 DEN2 感染组, 在胞浆内可观察到绿色、红色及 DEN2 NS1 (橘黄色荧光), 绿色、红色荧光强度增加, 在荧光融合后, 绿色、红色与橘黄色荧光重叠, 见图 7。

3 讨论

DEN 在 C6/36 细胞株、猴肾细胞株、1~3 日龄新生小白鼠脑及伊蚊胸肌内生长良好, 并产生恒定

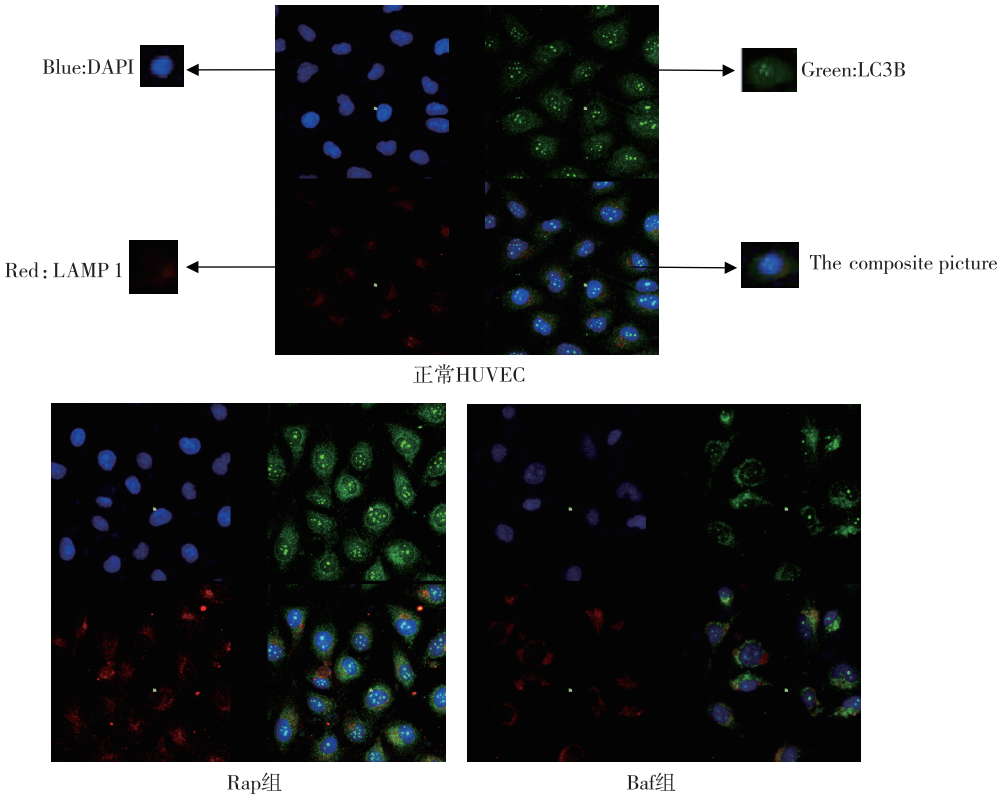


图6 正常 HUVEC 中 LC3B 及 LAMP1 的表达(800 ×)

Fig.6 Induction of autophagy in HUVEC cell

的细胞病变。DF 是登革病毒引起的一种急性传染病, 临床特征为起病急骤, 高热, 全身肌肉、关节及骨髓痛, 可有皮疹、出血倾向和淋巴结肿大。DHF 和 DSS 临床症状严重、死亡率较高。DHF 病理变化为全身微血管损害, 导致血浆蛋白渗出及出血。消化道、心内膜下、皮下、肝包膜下、肺及软组织均有渗出和出血, 内脏小血管及微血管周围水肿、出血和淋巴细胞浸润^[1]。

目前关于自噬对人类疾病的研究知之甚少。在疾病进程的早期阶段, 自噬可能作为一种代偿机

制维持自身稳态^[8]。细胞自噬在疾病晚期阶段可诱导持续的适应性反应或防御不足来阻碍疾病进程。自噬在疾病的发病机制中可以发挥重要的作用^[9]。最近的研究发现自噬在很多人类疾病发生过程中起作用, 许多研究都存在相似的结论。用来调节自噬的一类基因被称为自噬相关基因 (Atg), 通过对酵母的遗传研究已经确定自噬所需的 20 多种 Atg 基因^[10]。

现在已有研究证明, 某些病毒可以利用自噬为自己的复制和生存提供优势条件^[11]。髓灰质炎病

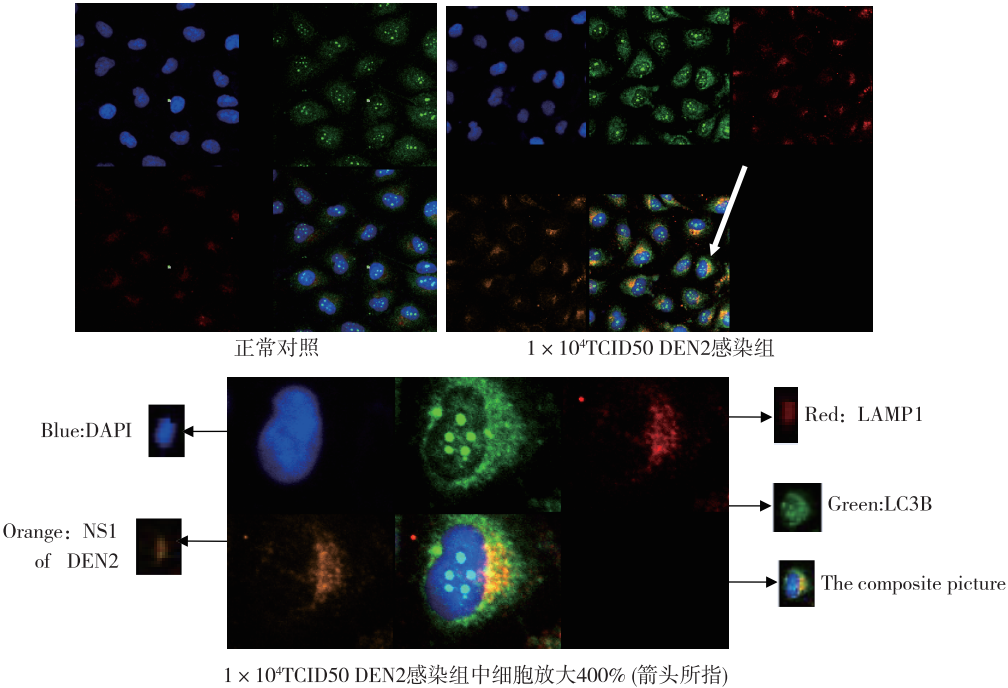


图 7 DEN2 诱导 HUVEC 24 h 自噬 (800 ×)

Fig. 7 Induction of HUVEC 24 h autophagy in response to DENV-2 infection

毒和马动脉炎病毒 (正链 RNA 病毒) 可以诱导自噬的发生。siRNA 减少 Atg12 和 LC3 的表达, 不仅导致细胞外的脊髓灰质炎病毒和鼻病毒复制减少^[12], 细胞内的病毒载量也降低。某些病毒诱导细胞自噬增强从而有利于自身复制, 例如轮状病毒, 双链 RNA 病毒, 呼肠孤病毒家族, 通过 NSP4 蛋白诱导细胞自噬增强并在自噬体内复制^[13]。B19 细小病毒, 单链 DNA 病毒, 甲、乙、丙肝病毒把诱导自噬作为一种手段延长感染细胞的生命。这些研究共同表明病毒已经进化到可以利用细胞自噬促进病毒复制的能力。病毒的复制在何种程度上依赖于自噬作用还需要进一步的研究。DEN2 是否能够诱导自噬的发生, 以及自噬的发生对病毒复制的影响, 是本课题研究的重点, 为研究 DEN2 感染损伤血管内皮细胞的机制提供科学依据。

Beclin1 (Atg6 同源染色体编码) 在介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体起关键作用, 参与调控细胞自噬体的形成^[14]。Beclin1 通过与Ⅲ型 PI3K 及 VPS34 形成复合体诱导自噬发生^[15], 有研究证明位点 244 – 337 缺失的 Beclin1 不能与 PI3K 结合, 无法促进饥饿诱导的自噬作用。在敲除了小鼠 *Beclin1* 基因的胚胎干细胞后, 发现缺乏 *Beclin1* 基因的小鼠死于胚胎早期, *Beclin1* 不足的胚胎存活

也不能超过 8.5 d, *Beclin1* 的不足导致小鼠不能经受细胞重塑和内胚层的分化, 引起胚胎死亡^[16]。

细胞自噬形成有两条泛素调节途径: 第一泛素调节途径, 自噬基因 12 (Atg12) 激活后相继与 Atg7、Atg10、Atg5 共价结合, 随后在自噬隔离膜与 Atg16 共价结合生成 Atg5-Atg12-Atg16 复合物; 第二泛素调节途径, 在微管相关的羧基末端氨基酸蛋白轻链 3 (LC3, 由 Atg8 同源染色体编码) 被半胱氨酸蛋白酶 Atg4 分解暴露出保守的甘氨酸残基, 是自噬体形成必需的。裂解 LC3 瞬时相继与 Atg7、Atg3、磷脂酰乙醇胺共价结合形成 LC3B II, LC3B II 在自噬体与溶酶体结合时被降解。细胞自噬过程中两条泛素途径互相调节和影响。自噬形成过程中 LC3 合成增多, 使之成为自噬的标志物。LC3B II / I 比值, 是近年来比较完善的检测自噬蛋白的指标。本课题采用自噬标志性蛋白 LC3B II / I 比值检测自噬的发生。

Baf 是一种抗生素, 使空泡型 H⁺-ATP 酶的活性被抑制。已有研究证明在肿瘤细胞发生自噬后, 加入 Baf, 可使自噬蛋白降解被抑制, 自噬体增多而自噬溶酶体数目减少, 证明自噬体与溶酶体的融合过程中被阻断。本课题所用的自噬抑制剂为 Baf。

本研究以 HUVEC 为模型,采用免疫组织化学法检测细胞Ⅷ因子的表达,鉴定该细胞系确为 HUVEC。Western-blot 检测 DEN2 感染 24 h 对 HUVEC 中 LC3B Ⅱ/I 比值的变化。与空白对照组相比, 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 感染组 LC3B Ⅱ、I 条带灰度增加,LC3B Ⅱ/I 比值上升,说明 DEN2 能够诱导自噬增强。在 1×10^2 、 1×10^3 TCID₅₀ DEN2 感染组,随着 DEN2 浓度增加,自噬增强;与 1×10^3 TCID₅₀ DEN2 感染组相比,在 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 感染组 LC3B Ⅱ、I 条带灰度降低,可能与 DEN2 浓度较高造成细胞凋亡增多所致。用 Baf 后,与空白对照相比, 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 感染组 LC3B Ⅱ、I 条带灰度增加,LC3B Ⅱ/I 比值上升,说明在 Baf 作用下,DEN2 可诱导 HUVEC 自噬发生。与未用 Baf 相比, 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 感染组,LC3B Ⅱ、I 条带灰度增加,LC3B Ⅱ/I 比值上升,提示 Baf 抑制 HUVEC 自噬小体与溶酶体的融合,自噬成熟被抑制,LC3B 降解被抑制。

为了更直观的看到自噬的发生,本课题用激光共聚焦技术观察自噬现象。在自噬体的成熟阶段与溶酶体融合过程中,形成自噬溶酶体^[17],获得 LAMP1 和 LAMP2,LAMP1 是溶酶体标记蛋白。激光共聚焦自噬检测选择的靶分子是自噬标记蛋白 LC3B(绿色荧光标记),LAMP1(红色荧光标记),登革病毒选择标记蛋白为 DEN2 NS1(橘黄色荧光标记)。与空白对照组相比,在 Rap 阳性对照组,HUVEC 胞浆绿色荧光和红色荧光强度明显增强,说明雷帕霉素诱导 HUVEC 自噬增强;与空白对照组相比,用 Baf 后,HUVEC 胞浆绿色荧光和红色荧光强度明显增强,但荧光重叠的部分明显减少,说明 Baf 抑制 HUVEC 自噬的发生,Baf 抑制自噬小体与溶酶体的融合,抑制自噬体成熟使 LC3B、LAMP1 积累;与空白对照组相比,在 1×10^4 TCID₅₀ DEN2 感染组,HUVEC 胞浆绿色荧光和红色荧光强度明显增加,说明 DEN2 可以诱导自噬增强。HUVEC 胞浆绿色、红色荧光与橘黄色荧光有部分重叠,说明 NS1 与 LC3B、LAMP1 共定位。

DEN2 是否能够利用 HUVEC 自噬发生免疫逃逸,从而促进 DEN2 复制,基于这个问题,进行了实时荧光定量 PCR 检测 DEN2 mRNA,从分子水平研究自噬对 DEN2 复制的作用。结果表明,随着 DEN2 感染浓度增加,HUVEC DEN2 mRNA 含量升高;用 Baf 抑制自噬后,随着 DEN2 感染浓度增加,

HUVEC DEN2 mRNA 含量升高;与未用 Baf 相比,相同 DEN2 浓度感染,HUVEC DEN2 mRNA 含量降低,说明 HUVEC 自噬增强,有利于 DEN2 复制^[18]。虽然机体利用细胞自噬能清除胞内微生物,但是致病微生物也进化了一套很精巧的系统来适应细胞的这种机制。对于 DEN2 来说,就是利用细胞自噬进行免疫逃逸,从而利于 DEN2 的复制,为 DEN2 感染血管内皮细胞损伤机制提供理论依据。

4 参考文献

- [1] ARMAS-RILLO L, VALERA M S, MARRERO-HERNANDEZ S, et al. Membrane dynamics associated with viral infection[J]. Rev Med Virol, 2016, 26(3):146 – 160.
- [2] ALLONSO D, ANDRADE I S, CONDE J N, et al. Dengue virus NS1 protein modulates cellular energy metabolism by increasing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity[J]. J Virol, 2015, 89(23):11871 – 11883.
- [3] MORIN C W, COMRIE A C, ERNST K. Climate and dengue transmission: Evidence and implications[J]. Environ Health Perspect, 2013, 121(11-12):1264 – 1272.
- [4] XIAO F Z. The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in Aedes albopictus[J]. Arch Virol, 2014, 159(20):3053 – 3057.
- [5] PANDEJPONG D, SAENGSERI P, RATTARITTAMRONG R, et al. Is excessive acetaminophen intake associated with transaminitis in adult patients with dengue fever[J]. Intern Med J, 2013, 221(6):653 – 658.
- [6] PRATIWI D, ARIWIBOWO A B. Dengue haemorrhagic fever (DHF) severity detection by using neural network technique based on human blood components[J]. International Journal of Mechanical & Mechatronics Engineering, 2017, 17(3):79 – 86.
- [7] BHATT S, GATHING P W, BRADY O J, et al. The global distribution and burden of dengue[J]. Nature, 2013, 496(7446):504 – 507.
- [8] MACIEL-DE-FREITAS R, VALLE D. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil[J]. Bull World Health Organ, 2014, 92(9):685 – 689.
- [9] MURRAY N E A, QUAM M B, WILDER-SMITH A. Epidemiology of dengue: Past, present and prospects[J]. Clin Epidemiol, 2013, 5(1):299 – 309.
- [10] ASHSHI A M. Serodetection of Dengue virus and its anti-

- bodies among blood donors in the western region of Saudi Arabia: a preliminary study [J]. *Blood Transfusion*, 2015, 13(1):135 – 138.
- [11] LIU L, LIAO J Z, HE X X, et al. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34):57707 – 57722.
- [12] MISHRA P, DAUPHINEE A N, WARD C, et al. Discovery of pan autophagy inhibitors through a high-throughput screen highlights macroautophagy as an evolutionarily conserved process across 3 eukaryotic kingdoms [J]. *Autophagy*, 2017, 13(9):1556 – 1572.
- [13] MUSIWARO P, SMITH M, MANIFAVA M, et al. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells[J]. *Autophagy*, 2013, 9:1407 – 1417.
- [14] BAEK S H, KIM K I. Epigenetic control of autophagy: Nuclear events gain more attention. [J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(9):781 – 785.
- [15] HUGO L E. Adult survivorship of the dengue mosquito *Aedes aegypti* varies seasonally in central Vietnam[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(2): e2669.
- [16] KURUSU T, KUCHITSU K. Autophagy, programmed cell death and reactive oxygen species in sexual reproduction in plants[J]. *Journal of Plant Research*, 2017, 130(3):1 – 9.
- [17] ÜSTÜN S, HAFRÉN A, HOFIUS D. Autophagy as a mediator of life and death in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 40(5):122 – 130.
- [18] HO T T, WARR M R, ADELMAN E R, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells[J]. *Nature*, 2017, 543(7644):205 – 210.
- (2018-07-18 收稿, 2018-09-20 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 丁廷森
- (上接第 1182 页)
- [9] ZHANG C, Patient R, Liu F. Hematopoietic stem cell development and regulatory signaling in zebrafish [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(2):2370 – 2374.
- [10] WHITE R, ROSE K, ZNO L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward[J]. *Nature reviews Cancer*, 2013, 13(9):624 – 636.
- [11] CHOI M R, GWAK M, YOO N J, et al. Regional bias of intratumoral genetic heterogeneity of apoptosis-related genes BAX, APAF1, and FLASH in colon cancers with high microsatellite instability[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(6):1674 – 1679.
- [12] JUBIE S, DHANABAL S P, Chaitanya M. V. Isolation of methyl gamma linolenate from *Spirulina platensis* using flash chromatography and its apoptosis inducing effect [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(3): 263.
- [13] JACKSON M, MA R, TAYLOR A. H, et al. Enforced Expression of HOXB4 in human embryonic stem cells enhances the production of hematopoietic progenitors but has no effect on the maturation of red blood cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(8): 981 – 990.
- [14] XIN C, ZHAO C, YIN X, et al. Bioinformatics analysis of molecular mechanism of the expansion of hematopoietic stem cell transduced by HOXB4/HOXC4[J]. *Hematology*, 2016, 21(8): 462 – 469.
- [15] YASUNAGA S, OHNO Y, SHIRASU N, et al. Role of Geminin in cell fate determination of hematopoietic stem cells (HSCs) [J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(3): 324 – 329.
- [16] 丁可军, 何志旭, 舒莉萍, 等. pCS ~ (2 +) -FLASH 重组质粒的构建及斑马鱼 FLASH 基因反义 mRNA 探针的制备[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 36(10):1119 – 1120.
- (2018-07-18 收稿, 2018-09-14 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 冉海勇