

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.11.1169

· 论 著 ·

西尼罗病毒对人神经母细胞瘤细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶途径的调控

徐铮昊¹, 唐海琳¹, 任瑞文², 赵平¹, 戚中田¹, 赵兰娟^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系生物医学防护教研室, 上海 200433

2. 南部战区疾病预防控制中心, 广州 510507

[摘要] **目的** 探讨西尼罗病毒(WNV)感染人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 后对 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径的影响, 以及该途径在 WNV 复制及应激应答、炎症应答相关分子表达调控中的作用。**方法** WNV 分别短时孵育(5、15、30、60 min)和感染(12、24、48、60 h) SH-SY5Y 细胞, 用蛋白质印迹法检测 p38 MAPK 和磷酸化 p38 MAPK 表达, 用 qRT-PCR 检测 WNV 感染细胞内 C/EBP 同源蛋白(CHOP)、白细胞介素 6(IL-6)、活化转录因子 6α(ATF6α)和干扰素刺激基因 15(ISG15) mRNA 表达水平的动态变化。用 WNV 感染 p38 MAPK siRNA 转染的 SH-SY5Y 细胞, 用 qRT-PCR 检测 WNV RNA 水平及 CHOP、IL-6、ATF6α 和 ISG15 mRNA 水平。**结果** 与未孵育的细胞相比, WNV 短时孵育细胞内 p38 MAPK 的磷酸化水平升高。WNV 感染 SH-SY5Y 细胞 12 h、24 h 时激活了 p38 MAPK 途径, 而感染 48 h、60 h 时明显抑制了 p38 MAPK 途径。WNV 感染促进了 CHOP、IL-6 和 ISG15 mRNA 表达而抑制了 ATF6α mRNA 表达。与对照 siRNA 转染的细胞相比, p38 MAPK siRNA 转染的细胞内 WNV RNA ($P<0.05$) 水平和 ATF6α mRNA ($P<0.01$) 水平升高, 而 CHOP mRNA 水平降低 ($P<0.05$)。**结论** WNV 感染早期激活了 p38 MAPK 途径, 该途径的激活可能负反馈调控 WNV 的复制。WNV 经 p38 MAPK 途径调控与应激应答相关的 CHOP、ATF6α 表达及与炎症应答相关的 IL-6 表达。

[关键词] 西尼罗病毒; 人神经母细胞瘤细胞; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 病毒复制

[中图分类号] R 373.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)11-1169-07

Regulation of p38 mitogen-activated protein kinase pathway by West Nile virus in human neuroblastoma cells

XU Zheng-hao¹, TANG Hai-lin¹, REN Rui-wen², ZHAO Ping¹, QI Zhong-tian¹, ZHAO Lan-juan^{1*}

1. Department of Biodefense, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Center for Disease Control and Prevention of Southern Theater Command of PLA, Guangzhou 510507, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To explore the regulation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by West Nile virus (WNV) in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and the contributions of p38 MAPK to WNV replication as well as stress and inflammatory response related molecule expression. **Methods** Total and phosphorylated p38 MAPK levels were analyzed in SH-SY5Y cells incubated with WNV for short (5, 15, 30 and 60 min) and long (12, 24, 48 and 60 h) durations by Western blotting. Dynamic changes of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), interleukin 6 (IL-6), activating transcription factor 6α (ATF6α) and interferon-stimulated gene 15 (ISG15) mRNA expression in WNV infected cells were detected by qRT-PCR. In response to WNV infection, WNV RNA level and CHOP, IL-6, ATF6α and ISG15 mRNA levels were assessed in SH-SY5Y cells transfected with p38 MAPK siRNA. **Results** Incubation with WNV for short durations enhanced p38 MAPK phosphorylation compared to the untreated control. The p38 MAPK signaling pathway was activated at 12 h and 24 h in WNV-infected SH-SY5Y cells, but down-regulated at 48 h and 60 h. WNV infection led to increased mRNA expression of CHOP, IL-6 and ISG15 and reduced ATF6α mRNA. In comparison with control siRNA transfection, the levels of WNV RNA ($P<0.05$) and ATF6α mRNA ($P<0.01$) were increased and CHOP mRNA level was decreased ($P<0.05$) in WNV-infected SH-SY5Y cells with the p38 MAPK siRNA transfection. **Conclusion** The p38 MAPK

[收稿日期] 2019-06-17 **[接受日期]** 2019-09-23

[基金项目] 国家重点研发计划(2016YFC1202903), 上海市公共卫生三年行动计划重点学科建设项目(15GWZK0103). Supported by National Key Research and Development Program of China (2016YFC1202903) and Key Discipline Construction Program of Shanghai Public Health 3-Year Action Plan (15GWZK0103).

[作者简介] 徐铮昊, 硕士生. E-mail: 619302871@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870990, E-mail: ljzhao13@163.com

pathway is activated during early stage of WNV infection and such activation may negatively regulate WNV replication. WNV-induced stress response molecules CHOP and ATF6 α and proinflammatory cytokine IL-6 production by SH-SY5Y cells are coupled with the regulation of p38 MAPK pathway.

[Key words] West Nile virus; human neuroblastoma cells; p38 mitogen-activated protein kinase; virus replication

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(11): 1169-1175]

西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV) 是有包膜的单正链 RNA 病毒, 属于黄病毒科黄病毒属。该属成员还包括寨卡病毒、黄热病病毒、登革病毒、日本脑炎病毒和蜱传脑炎病毒等, 均是高致病性病原体^[1-2]。作为蚊媒叮咬传播的嗜神经性黄病毒, WNV 是全球虫媒传播病毒性脑炎最重要的病原体^[3]。WNV 感染造成的机体炎性病理反应和中枢神经系统的严重损伤, 可引起西尼罗热和西尼罗脑炎, 并伴有持久的中枢神经系统后遗症或慢性肾脏疾病^[4]。据报道, 从我国新疆采集的蚊标本中分离出 WNV, 并且在当地出现了成人型西尼罗脑炎的流行^[5-6]。2018 年, 美国、希腊、意大利和塞尔维亚各国相继发生 WNV 疫情, WNV 感染已成为人类健康的严重威胁^[7]。WNV 通过在储存宿主鸟和蚊之间的循环传播而长期存在于自然界, 人、马和其他脊椎动物均对 WNV 易感。人被携带病毒的伊蚊和库蚊叮咬感染是 WNV 的主要传播途径^[8]。目前, 尚无防治人感染 WNV 的特异性抗病毒药物和疫苗。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族广泛存在于哺乳动物体内, 参与调控细胞的多种功能如增殖、分化、应激、凋亡和存活等。p38 MAPK 是 MAPK 家族的重要成员, 也是调控细胞应激和炎性应答的关键激酶。研究发现, 抑制 p38 MAPK 不仅可减轻登革病毒感染导致的炎性病理反应^[9], 还能有效阻止寨卡病毒感染诱生的炎症反应^[10]、降低 WNV 感染诱生的趋化因子水平^[11]。这些研究均表明, 虫媒病毒引发 p38 MAPK 途径信号转导与其致病机制密切相关。本研究拟探讨 WNV 感染人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 后对 p38 MAPK 途径的影响和该途径在 WNV 复制及调控细胞应激、炎性应答相关分子表达中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 p38 MAPK、磷酸化 p38 MAPK (phosphorylated p38 mitogen-activated protein

kinase, p-p38 MAPK; Thr180/Tyr182)、 β -actin 兔多克隆抗体、对照 siRNA、p38 MAPK siRNA (美国 Cell Signaling Technology 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、ECL 化学发光液 (美国 Bio-Rad 公司), DMEM 培养基、Opti-MEM I 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), M-MLV 反转录酶、dNTP Mix、Easstep qPCR Master Mix (美国 Promega 公司), 随机引物、WNV 非结构蛋白 5、C/EBP 同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)、干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, ISG15)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、活化转录因子 (activating transcription factor, ATF) 6 α 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物 (北京六合华大基因科技股份有限公司)。人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y、猴肾细胞 Vero 和仓鼠肾细胞 BHK-21 由海军军医大学 (第二军医大学) 海军医学系生物医学防护教研室保存。

1.2 细胞培养与病毒制备 将 SH-SY5Y 细胞、Vero 细胞、BHK-21 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养。细胞生长密度达到 90% 以上时, 用含 EDTA 的胰蛋白酶消化, 按 1:3 的比例传代培养。WNV 在 Vero 细胞内增殖, 收集病毒、分装贮存于 -80 °C 冰箱^[12-13]。病毒滴度在 BHK-21 细胞上用蚀斑法测定^[14]。同时, 收集无病毒感染的 Vero 细胞培养上清作为处理细胞的对照 (mock infection)。

1.3 WNV 感染细胞 将 SH-SY5Y、Vero 细胞接种于 35 mm 培养皿, 培养过夜。吸弃皿内培养液, 加入 WNV 在 37 °C 分别孵育 5、15、30、60 min, 病毒的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 2, 收集 WNV 短时孵育 SH-SY5Y、Vero 细胞的

裂解物样品。将 SH-SY5Y 细胞接种于 35 mm 培养皿, 培养过夜后, 吸弃皿内培养液, 加 2 MOI WNV 至皿内, 37 °C 吸附 1 h, 吸弃病毒液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 1 次, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基分别培养 12、24、48、60 h。WNV 吸附 1 h (感染时间为 0 h) 后开始计时。SH-SY5Y 细胞的对照组用 Vero 细胞培养上清吸附 1 h 后, 加入新鲜培养基分别培养至上述各时间点。Vero 细胞的 WNV 感染组与对照组培养 48 h。

1.4 siRNA 转染 将 SH-SY5Y 细胞接种于 12 孔培养板内, 待细胞生长密度约 50% 时进行 siRNA 转染。使用 Lipofectamine 2000 转染 siRNA, 用 Opti-MEM I 培养基稀释 p38 MAPK siRNA、对照 siRNA 至终浓度为 100 nmol/L, 按照产品说明书操作。转染 72 h 后, 收集细胞裂解物样品评估 siRNA 干扰效率; 此外, 细胞用 PBS 洗涤 2 次, 2 MOI WNV 感染 24 h 后收集细胞样品, 检测 WNV 在敲低 p38 MAPK 表达的细胞内复制和宿主分子表达变化。

1.5 蛋白质印迹检测 将 WNV 短时孵育细胞、WNV 感染细胞和 Vero 细胞培养上清处理的对照细胞用 PBS 洗涤 2 次, 裂解细胞制备样品^[15]。样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉于室温封闭 2 h, 用 1:1 000 稀释的 p38 MAPK、p-p38 MAPK、 β -actin 兔多克隆抗体在 4 °C 孵育过夜。膜用 TBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 用 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 在室温孵育 2 h, 再用 TBST 洗涤 3 次, 5 min/次。膜上加入 ECL 化学发光底物, 用化学发光成像仪 (英国 GeneGnome 公司) 显色成像, 利用 Gene Tools 分析软件进行图像分析。样品蛋白质的信号经内参 β -actin 均一处理后计算 p38 MAPK、p-p38 MAPK 水平的变化。

1.6 qRT-PCR 检测 在确定的样品收集时间点, WNV 感染细胞和 Vero 细胞培养上清处理的对照细胞用 PBS 洗涤 2 次, 用 TRIzol 试剂抽提细胞 RNA, 用多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司) 检测 RNA 纯度和浓度后, 使用随机引物、M-MLV 反转录酶和 dNTP Mix 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用 Eastep qPCR Master Mix, 在 Rotor-Gene

3000 PCR 仪 (澳大利亚 Corbett 公司) 上扩增目的基因, 利用 Rotor-Gene 6.1.81 软件, 采用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行相对定量分析, 以 GAPDH 为内参, 每个样品检测 3 次^[15]。WNV 非结构蛋白 5 引物序列: 正向 5'-GAG TCC AAG AAG TCA GAG GGT ACA-3', 反向 5'-CCA CTC TTC ATG GTG ACA ATG TTC C-3'; CHOP 引物序列: 正向 5'-AGC TGG AAC CTG AGG AGA GA-3', 反向 5'-TGG ATC AGT CTG GAA AAG CA-3'; ISG15 引物序列: 正向 5'-GAC AAA TGC GAC GAA CCT CT-3', 反向 5'-CGG CCC TTG TTA TTC CTC A-3'; IL-6 引物序列: 正向 5'-CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG AC-3', 反向 5'-CTC TGG CTT GTT CCT CAC TAC TC-3'; ATF6 α 引物序列: 正向 5'-TTT TGT GAG CGG GGA AAA GC-3', 反向 5'-TGG TCC CCA GAG AAA ATG GT-3'; GAPDH 引物序列: 正向 5'-TGG GCT ACA CTG AGC ACC AG-3', 反向 5'-AAG TGG TCG TTG AGG GCAAT-3'。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Student's *t* 检验分析病毒 RNA、宿主分子 mRNA 和 p38 MAPK 水平的差异。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 WNV 感染早期促进 p38 MAPK 磷酸化而晚期抑制其磷酸化 蛋白质印迹分析结果显示, WNV 孵育 SH-SY5Y 细胞 5、15、30、60 min 激活了 p38 MAPK 途径, 表现为 p38 MAPK 磷酸化水平升高, 其中病毒孵育 5 min 时能明显促进 p38 MAPK 的磷酸化 (图 1A)。在 Vero 细胞, 与对照组 (0 min) 相比, WNV 孵育 5、15、30 min 也导致 p38 MAPK 磷酸化水平升高, 并且病毒孵育 5 min 时也明显促进 p38 MAPK 磷酸化 (图 1B)。如图 2A 所示, WNV 感染 SH-SY5Y 细胞 12 h、24 h 时激活了 p38 MAPK 途径, 而感染 48 h、60 h 时则明显抑制了 p38 MAPK 途径。此外, WNV 感染 Vero 细胞 48 h, p38 MAPK 磷酸化水平也明显降低 (图 2B)。上述结果表明 WNV 感染早期 (24 h 以内) 激活了 SH-SY5Y 细胞内 p38 MAPK 途径。

2.2 WNV 在 p38 MAPK 敲低的细胞内复制增强 如图 3A 所示, 与未转染的对照细胞与转染对照 siRNA 的细胞相比, p38 MAPK siRNA 转染 72 h 后 SH-SY5Y 细胞内 p38 MAPK 表达降低

($P<0.01$), 表明 p38 MAPK siRNA 转染可敲低 p38 MAPK。因 WNV 感染 24 h 激活 SH-SY5Y 细胞内 p38 MAPK 途径 (图 2A), 故 p38 MAPK siRNA 转染 72 h 后再以 WNV 感染转染细胞 24 h。qRT-PCR 检测显示, 与对照 siRNA 转染的细胞相比, p38 MAPK siRNA 转染的细胞内 WNV RNA 水

平升高 (168% vs 100%, $P<0.05$)。同时, WNV 对 p38 MAPK 磷酸化的上调作用也因 p38 MAPK siRNA 转染而削弱 ($P<0.05$, 图 3B)。结果表明, 在敲低 p38 MAPK 表达的 SH-SY5Y 细胞内 WNV 复制增强。

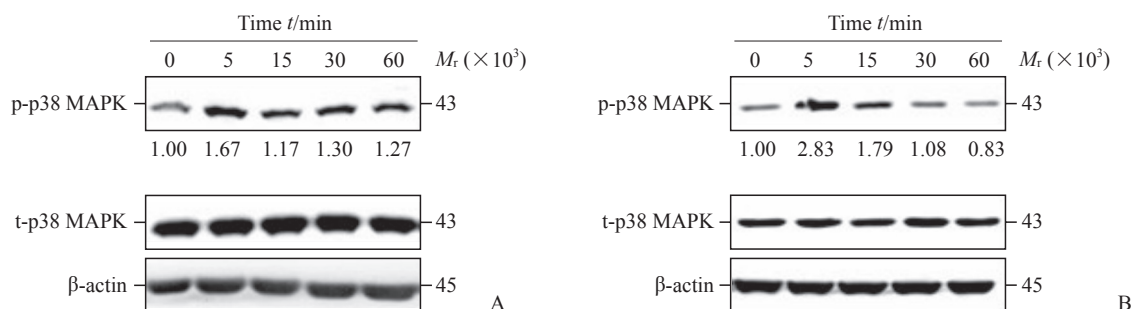


图1 WNV 短时孵育细胞内 p38 MAPK 的磷酸化水平

Fig 1 Levels of p38 MAPK phosphorylation in cells incubated with WNV for short durations

A: SH-SY5Y cells; B: Vero cells. WNV: West Nile virus; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; p-p38 MAPK: Phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase; t-p38 MAPK: Total p38 mitogen-activated protein kinase. Fold change of p-p38 MAPK levels in SH-SY5Y cells and Vero cells incubated with WNV over the levels in cells without WNV incubation (set to 1.00) was shown below each blot after being normalized to β -actin levels. Representative results out of three experiments were shown

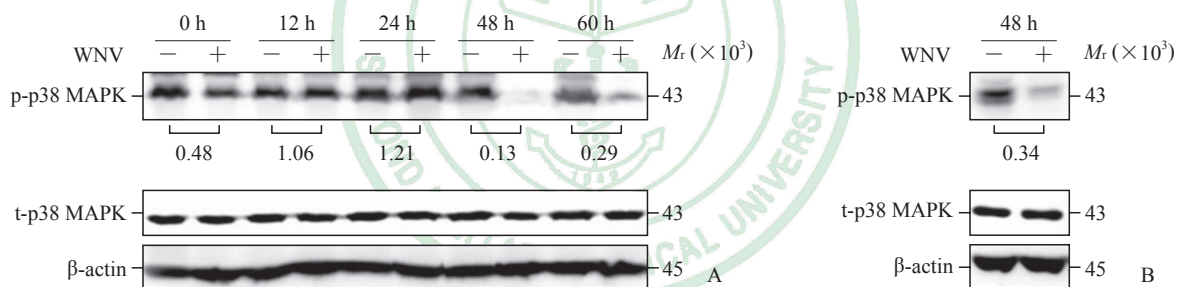


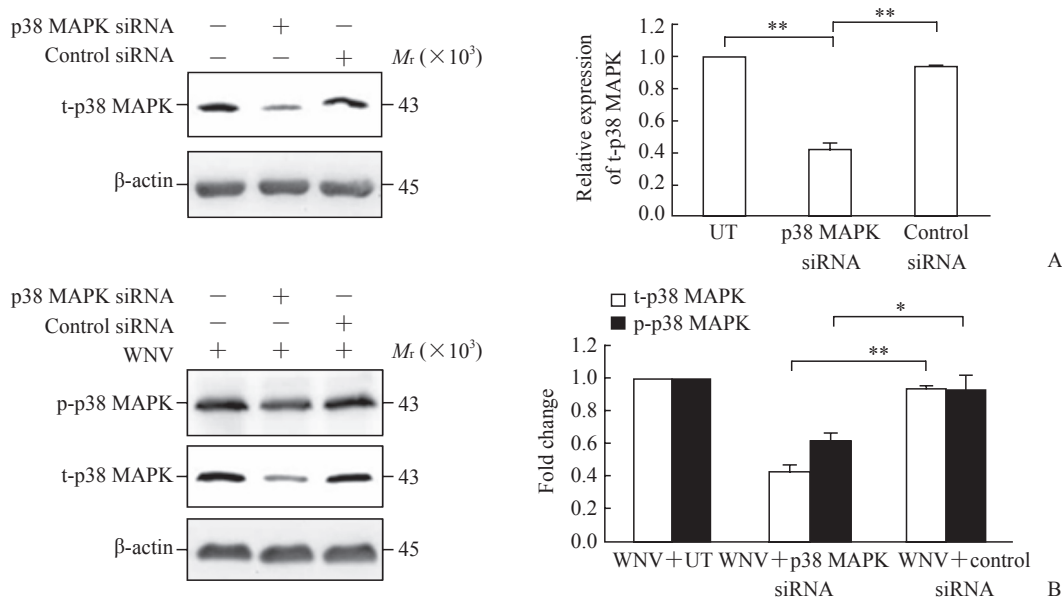
图2 WNV 感染细胞内 p38 MAPK 磷酸化的变化

Fig 2 Phosphorylation of p38 MAPK in cells during WNV infection

A: SH-SY5Y cells; B: Vero cells. WNV: West Nile virus; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; p-p38 MAPK: Phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase; t-p38 MAPK: Total p38 mitogen-activated protein kinase. Fold change of p-p38 MAPK levels in SH-SY5Y cells and Vero cells with WNV infection (+) over the levels in cells with mock infection (−) was shown below each blot after being normalized to β -actin levels. Results were representative of at least three experiments

2.3 WNV 经 p38 MAPK 途径调控 CHOP、ATF6 α 与 IL-6 的表达 如图 4 所示, WNV 感染促进 CHOP、ISG15 和 IL-6 mRNA 表达而抑制 ATF6 α mRNA 表达, 并且 CHOP、ISG15、IL-6 mRNA 表达水平的升高趋势一致, 呈 WNV 感染时间依赖性升高。与感染 12 h 相比, WNV 感染 24、48、60 h 可促进 ISG15 和 IL-6 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 感染 48 h、60 h 可促进 CHOP mRNA 表达 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与感染 12 h 相比, WNV 感染 24、48、60 h 抑制了 ATF6 α mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

qRT-PCR 检测结果 (图 5) 显示, 与未转染的细胞相比, p38 MAPK siRNA 转染细胞内 IL-6 ($P<0.05$)、ATF6 α ($P<0.01$) mRNA 水平升高; 与对照 siRNA 转染的细胞相比, p38 MAPK siRNA 转染细胞内 ATF6 α mRNA 水平升高 ($P<0.01$)、CHOP mRNA 水平降低 ($P<0.05$); ISG15 mRNA 水平在各组差异无统计学意义。结果表明, WNV 感染差异调控 SH-SY5Y 细胞内 CHOP、IL-6、ATF6 α 和 ISG15 的表达; WNV 可经 p38 MAPK 途径调控与应激应答相关的 CHOP、ATF6 α 表达和与炎症应答相关的 IL-6 表达。

图 3 WNV 在敲低 *p38 MAPK* 表达的 SH-SY5Y 细胞内复制Fig 3 WNV replication in *p38 MAPK* knockdown SH-SY5Y cells

A: t-p38 MAPK expression; B: Influence of WNV on p38 MAPK signaling. WNV: West Nile virus; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; t-p38 MAPK: Total p38 mitogen-activated protein kinase; p-p38 MAPK: Phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase; UT: Untransfected cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

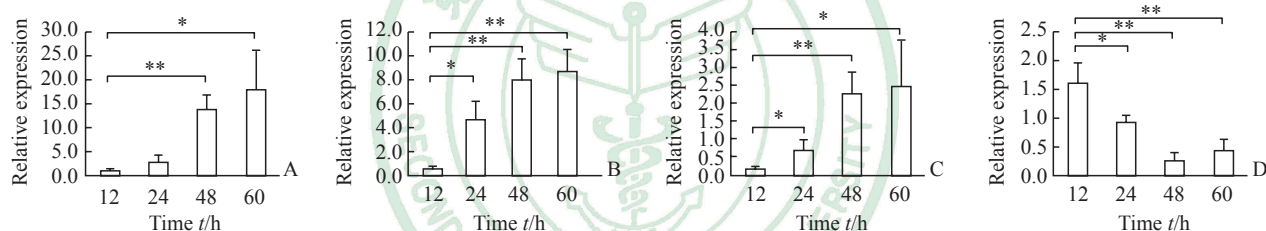
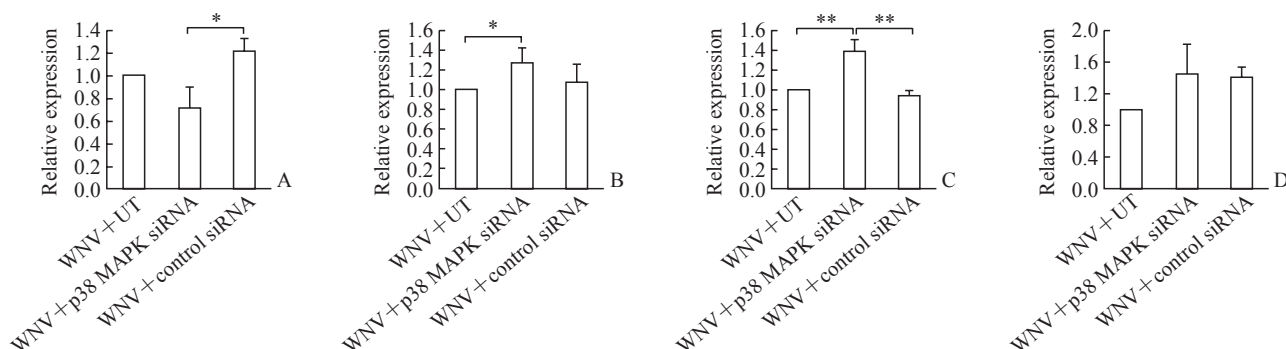


图 4 WNV 感染诱导 SH-SY5Y 细胞内相关分子 mRNA 表达的动态变化

Fig 4 Kinetics of related molecule mRNA expression in SH-SY5Y cells during WNV infection

A: *CHOP*; B: *ISG15*; C: *IL-6*; D: *ATF6α*. *CHOP*: CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; *ISG15*: Interferon-stimulated gene 15; *IL-6*: Interleukin 6; *ATF6α*: Activating transcription factor 6α. Data were shown as fold induction of the mRNA levels in WNV-infected cells over the corresponding mRNA levels in mock-infected cells at the same time point. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

图 5 敲低 *p38 MAPK* 表达对 WNV 调控 SH-SY5Y 细胞内相关分子 mRNA 表达的影响Fig 5 Influence of *p38 MAPK* knockdown on related molecule mRNA expression in SH-SY5Y cells induced by WNV infection

A: *CHOP*; B: *IL-6*; C: *ATF6α*; D: *ISG15*. *CHOP*: CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; *IL-6*: Interleukin 6; *ATF6α*: Activating transcription factor 6α; *ISG15*: Interferon-stimulated gene 15; UT: Untransfected cells. Data were shown as fold induction of the mRNA levels in the siRNA-transfected cells over the corresponding mRNA levels in UT (set to 1.0). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨 论

许多黄病毒通过调控宿主细胞的多条信号转导途径(如固有免疫途径、应激应答途径和凋亡途径等)维持自身复制增殖,因此揭示黄病毒如何调控宿主细胞信号转导从而建立感染对于阐明病毒致病机制、研发抗病毒治疗的新策略具有重要意义^[16]。细胞和小动物模型的研究均表明,宿主免疫应答对于控制 WNV 向中枢神经系统播散、炎性病理反应及病毒的清除至关重要^[17]。在 WNV 感染过程中,与免疫应答、细胞应激相关的干扰素途径、ATF6 途径和炎性因子受到关注。

人视网膜 Müller 细胞能表达高水平的寨卡病毒入侵因子 anexelexto (AXL),故对病毒高度易感。寨卡病毒感染 Müller 细胞可激活 p38 MAPK 途径,该途径的激活与细胞产生大量促炎细胞因子密切相关,研究者们认为阻断病毒感染引发 p38 MAPK 途径信号转导可能是控制寨卡病毒感染导致眼部炎症的新靶点^[10]。肝脏是登革病毒感染的重要器官,病毒在肝脏复制并产生较高的病毒载量。利用登革病毒感染的小鼠模型,研究表明病毒感染诱导 p38 MAPK 和其下游信号分子(如 MAPKAPK2、HSP27 和 ATF2)发生磷酸化;以 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 处理后可降低 p38 MAPK 下游信号分子的磷酸化水平,从而减轻登革病毒造成的肝损伤^[18]。WNV 感染人小神经胶质细胞后通过激活 MAPK 途径促进促炎细胞因子和趋化因子的产生,抑制 p38 MAPK 可降低趋化因子的表达,这可能与 WNV 的神经致病机制相关^[11]。本研究发现,WNV 短时孵育(1 h 以内)和早期感染(24 h 以内)激活了 SH-SY5Y 细胞 p38 MAPK 途径,表现为 p38 MAPK 磷酸化水平升高。该结果与寨卡病毒、登革病毒和 WNV 对 p38 MAPK 途径调控的报道^[9-11,18]一致。p38 MAPK 磷酸化的动态变化显示 WNV 感染 48 h、60 h 时抑制了 p38 MAPK 途径,提示病毒感染引发细胞信号转导的时空性和复杂性。同时,WNV 对 Vero 细胞 p38 MAPK 途径具有相似的调控作用。qRT-PCR 检测结果显示,在敲低 p38 MAPK 表达的 SH-SY5Y 细胞内 WNV 复制增强。上述结果表明,在病毒感染早期,WNV 激活了人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞 p38 MAPK 途径,而该途径下调可促进病毒复制。

在 WNV 感染的中枢神经系统,神经元是产生促炎细胞因子的潜在来源,而促炎细胞因子是 WNV 神经毒性作用的主要因素。研究报道,WNV 诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 的表达与病毒导致死亡神经元数量的升高具一致性;用 IL-1 β 或 TNF α 抗体处理神经元可降低 WNV 对神经元的毒性作用^[19]。黄病毒感染诱导内质网应激可激活细胞非折叠蛋白应答,病毒通过调控此应答完成自身复制^[20]。WNV 诱导非折叠蛋白应答可抑制抗病毒信号转导途径以利于病毒复制和免疫逃逸^[21]。本研究考察了 WNV 感染后非折叠蛋白应答途径(CHOP 和 ATF6 α)、干扰素途径(ISG15)的相关分子和促炎细胞因子(IL-6)表达的动态变化,结果表明 WNV 感染促进了 CHOP、IL-6 和 ISG15 mRNA 的表达,并且表达水平呈 WNV 感染时间依赖性升高;WNV 感染 24、48、60 h 抑制了 ATF6 α mRNA 表达。有研究者提出,WNV 感染促进 CHOP 表达代表宿主防御反应,因 CHOP 依赖的细胞凋亡能限制病毒的增殖和中枢神经系统的侵袭^[22]。在敲除 ATF6 的鼠胚成纤维细胞,WNV 蛋白表达和病毒产量均下降,表明 ATF6 信号转导可促进细胞存活、抑制固有免疫应答,从而维持病毒复制^[23]。本研究提示,WNV 对宿主细胞相关分子的差异调控与其致病机制有关。考察敲低 p38 MAPK 表达对 WNV 调控上述分子 mRNA 表达的影响,结果证实,WNV 经 p38 MAPK 途径调控与应激应答相关的 CHOP、ATF6 α 表达,并调控与炎性应答相关的 IL-6 表达。

综上所述,WNV 激活 p38 MAPK 途径是病毒感染早期的重要信号转导事件,p38 MAPK 途径的激活可能负反馈调控 WNV 复制,WNV 经该途径调控细胞应激和炎性应答反应。对 WNV 感染引发宿主细胞信号转导的深入解析有助于阐明病毒致病的分子机制和提供抗病毒治疗的新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] OUHOUMMANE N, TCHOUAKET E, LOWE A M, FORTIN A, KAIRY D, VIBIEN A, et al. Economic burden of West Nile virus disease, Quebec, Canada, 2012—2013[J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25: 1943-1950.
- [2] PASTORINO B, NOUGAIREDE A, WURTZ N, GOULD E, DE LAMBALLERIE X. Role of host cell factors in

- flavivirus infection: implications for pathogenesis and development of antiviral drugs[J]. *Antiviral Res*, 2010, 87: 281-294.
- [3] SUTHAR M S, DIAMOND M S, GALE M Jr. West Nile virus infection and immunity[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 115-128.
- [4] SAXENA V, BOLLING B G, WANG T. West Nile virus[J]. *Clin Lab Med*, 2017, 37: 243-252.
- [5] 梁国栋. 我国西尼罗病毒和 Tahyna 病毒的发现与流行[J]. *微生物与感染*, 2016, 11: 66-71.
- [6] 梁国栋. 虫媒病毒——重要的被忽略的热带传染病病原体[J]. *中国热带医学*, 2018, 18: 1-5.
- [7] 韩硕. 欧洲多国遭西尼罗河病毒侵袭[EB/OL]. (2018-08-28)[2019-06-02]. <http://m.people.cn/n4/2018/0828/c3535-11515528.html>.
- [8] LIM S M, KORAKA P, OSTERHAUS A D, MARTINA B E. West Nile virus: immunity and pathogenesis[J]. *Viruses*, 2011, 3: 811-828.
- [9] FU Y, YIP A, SEAH P G, BLASCO F, SHI P Y, HERVÉ M. Modulation of inflammation and pathology during dengue virus infection by p38 MAPK inhibitor SB203580[J]. *Antiviral Res*, 2014, 110: 151-157.
- [10] ZHU S, LUO H, LIY H, HA Y, MAY S E R, LAWRENCE R E, et al. p38 MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection[J]. *Antiviral Res*, 2017, 145: 70-81.
- [11] CHEERAN M C, HU S, SHENG W S, RASHID A, PETERSON P K, LOKENSGARD J R. Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection[J]. *J Neurovirol*, 2005, 11: 512-524.
- [12] LI S H, LI X F, ZHAO H, JIANG T, DENG Y Q, YU X D, et al. Cross protection against lethal West Nile virus challenge in mice immunized with recombinant E protein domain III of Japanese encephalitis virus[J]. *Immunol Lett*, 2011, 138: 156-160.
- [13] 张培, 梁克峰, 李春缘, 陈迪嘉, 陈颖龙, 管文升, 等. 基孔肯雅热 IgG 抗体胶体金快速检测试纸条初步评价[J]. *检验医学*, 2019, 34: 82-83.
- [14] 张浩旻, 郭佳慧, 赵兰娟, 姚茜茜, 文荣, 徐娅佳, 等. DC-SIGN 与 mCEACAM1a 分子相互作用调控鼠冠状病毒复制[J]. *微生物与感染*, 2018, 13: 136-145.
- [15] ZHAO L J, HE S F, LIU Y, ZHAO P, BIAN Z Q, QI Z T. Inhibition of STAT pathway impairs anti-hepatitis C virus effect of interferon alpha[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1/2): 77-90.
- [16] ZHANG H, SUN J, YE J, ASHRAF U, CHEN Z, ZHU B, et al. Quantitative label-free phosphoproteomics reveals differentially regulated protein phosphorylation involved in West Nile virus-induced host inflammatory response[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14: 5157-5168.
- [17] LUO H, WANG T. Recent advances in understanding West Nile virus host immunity and viral pathogenesis [J/OL]. *F1000Res*, 2018, 7: 338. doi: 10.12688/f1000research.13362.1.
- [18] SREEKANTH G P, CHUNCHARUNEE A, SIRIMONTAPORN A, PANAAAMPON J, NOISAKRAN S, YENCHITSOMANUS P T, et al. SB203580 modulates p38 MAPK signaling and dengue virus-induced liver injury by reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 phosphorylation[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11: e0149486. doi: 10.1371/journal.pone.0149486.
- [19] KUMAR M, VERMA S, NERURKAR V R. Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death[J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 73. doi: 10.1186/1742-2094-7-73.
- [20] BLÁZQUEZ A B, ESCRIBANO-ROMERO E, MERINO-RAMOS T, SAIJ J C, MARTIN-ACEBES M A. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy[J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 266. doi: 10.3389/fmicb.2014.00266.
- [21] AMBROSE R L, MACKENZIE J M. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion[J]. *J Virol*, 2011, 85: 2723-2732.
- [22] MEDIGESHI G R, LANCASTER A M, HIRSCH A J, BRIESE T, LIPKIN W I, DEFILIPPIS V, et al. West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis[J]. *J Virol*, 2007, 81: 10849-10860.
- [23] AMBROSE R L, MACKENZIE J M. ATF6 signaling is required for efficient West Nile virus replication by promoting cell survival and inhibition of innate immune responses[J]. *J Virol*, 2013, 87: 2206-2214.

[本文编辑] 尹 茶