

去泛素化酶抑制剂 PR-619 抑制单纯疱疹病毒复制机制的研究

吕晓文,黄先玫*

(南京医科大学附属杭州医院儿科,浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的:探讨去泛素化酶抑制剂 PR-619 对人类单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 复制的影响。方法:通过 In-cell Western 和 Western blot 技术检测病毒复制及蛋白表达,同时利用 real-time PCR 检测相关病毒基因的表达水平。着重考察广谱去泛素化酶抑制剂 PR-619 对病毒 mRNA 转录和病毒相关蛋白合成的作用。结果:在细胞感染体系中,PR-619 可以抑制 HSV 极早期及晚期蛋白(ICPO、ICP4 和 gD)的表达,从而有效阻断病毒的复制;进一步研究发现,PR-619 可以增加细胞内泛素连接蛋白含量,从而抑制细胞内泛素循环,这可能是 PR-619 抑制病毒复制的机制。结论:HSV 的复制依赖于功能化泛素的存在,而抑制细胞去泛素化酶(DUBs)活性可以阻断细胞内正常的泛素循环,从而抑制 HSV 复制;该研究为寻找抗 HSV 治疗药物或生殖道杀微生物剂新靶点提供了新方向。

[关键词] 单纯疱疹病毒;泛素;去泛素化酶;病毒复制

[中图分类号] R752.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-980-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170812

The mechanism study of a deubiquitinating enzyme inhibitor PR-619 on suppression herpes simplex virus replication

Lü Xiaowen, Huang Xianmei*

(Department of Pediatrics, Hangzhou Hospital Affiliated to NJMU, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of a small molecule deubiquitinating enzyme inhibitor, PR-619 on Herpes simplex virus (HSV) replication. **Methods:** HSV replication and viral protein expression were detected via In-cell Western and Western blot. Viral gene expression on mRNA level was evaluated using Real-time PCR. We studied the inhibitory effect of PR-619 on viral replication, including viral mRNAs transcription and proteins expression. **Results:** PR-619 down-regulated HSV immediate-early and late gene expression (ICPO, ICP4 and gD) to inhibit viral replication effectively; PR-619 increased amount of ubiquitin-conjugates to suppress intracellular ubiquitin cycle, which may cause inhibitory effect on viral replication and block viral induced NF- κ B pathway activation. **Conclusion:** HSV effective replication is dependent on functional ubiquitin. Deubiquitinating enzymes is vital for intracellular ubiquitin cycle, which is associated to viral replication. This study could give deep insight into finding novel anti-HSV agents or genital microbicides.

[Key words] herpes simplex virus; ubiquitin; deubiquitinating enzymes; viral replication

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08): 980-984]

单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 属于疱疹病毒科 (herpesviridae) 的 α -疱疹病毒亚科。在人类感染中, 主要有单纯疱疹病毒 1 型和 2 型 (HSV-1

和 HSV-2) 两类, 也叫做人类单纯疱疹病毒 1 型和 2 型^[1]。从 HSV 被发现到现在, 人们一直致力于开发更有效的抗病毒药物和疫苗, 来治愈或减轻患者的病痛、阻断或降低 HSV 的传播。但到目前为止, 并没有有效的药物和疫苗。深入了解病毒与宿主细胞的相互作用或许有利于寻找新的抗病毒药物治疗靶点。

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(2015NJMU175)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hxianmei630715@163.com

泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS)是细胞内蛋白质降解的主要系统,在许多细胞功能中发挥关键性的调节作用,其中包括抗原递呈、细胞周期调节、细胞凋亡、信号转导、转录调节及 DNA 修复等^[2]。作为高度依赖宿主细胞增殖的一种生物,病毒会充分利用宿主细胞自身的表达调控系统维持其生命周期;而大量研究证明,病毒的增殖与泛酰化以及泛素介导的蛋白酶体降解途径有着诸多关联^[3-5]。HSV 的复制与其极早期蛋白 ICP0 的功能直接相关,特别是在病毒滴度很低的情况下;另外,ICP0 表现出 E3 泛素连接酶活性,会和细胞内泛素及蛋白酶体相互作用^[6-10]。HSV 作为一个极度依赖细胞完成自身生活周期的生命体,会“绑架”细胞内的 UPS 通路来完成一系列过程,包括对细胞天然抗病毒分子的降解,对非折叠或错误折叠蛋白的降解调控等。去泛素化酶 (deubiquitinating enzymes, DUB)是 UPS 系统中的重要一环,是细胞内泛素循环不可或缺的。本研究发现一种广谱性去泛素化酶抑制剂 PR-619 可以抑制 HSV 病毒的复制,并在此基础上探讨其可能的抗病毒机制,以寻找新的抗病毒潜在药物靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

PR-619、MG132 (Sigma-Aldrich 公司,美国)。SYBR Green Master Mix、TRIzol reagent (Life Technologies 公司,美国)。ReverTra Ace qPCR RT Kit (ToYoBo 公司,日本)。RIPA 裂解液(Santa Cruz 公司,美国)。DMEM 高糖培养基(Hyclone 公司,美国),胎牛血清(Life Technologies 公司,美国)。预染蛋白 marker (Fermentas 公司,美国)。BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司,美国)。0.45 μm 的低荧光 PVDF 膜(Millipore 公司,美国)。Ubiquitin 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国)。human I κ B- α 抗体(江苏海门碧云天生物技术研究所)。IRDye 680 goat-anti-rabbit IgG、IRDye 800 goat-anti-mouse IgG(LI-COR 公司,美国)。HSV gD-1/2、HSV ICP0-1、HSV ICP4-1、human β -catenin、human GAPDH 抗体 (Santa Cruz 公司,美国)。其他试剂均为国产分析纯级。

人胚肾细胞 HEK-293T, 人子宫内膜腺癌细胞 HEC-1-A, 人宫颈癌上皮细胞 HeLa 和非洲绿猴肾细胞 Vero 来源于中国科学院细胞库。HEC-1-A 细胞培养于含有 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基中,而 HEK-293T、HeLa 和 Vero 细胞培养于含有 10% FBS

的 DMEM 高糖培养基中。HSV-1(HF)和 HSV-2(G)由南京大学医学院李尔广教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 病毒扩增与滴定

HSV-1 (HF) 株和 HSV-2 (G) 株分别在 Vero 和 HEK-293T 细胞上进行扩增^[11]。细胞接种于 10 cm 培养皿中,待细胞达到 100%汇合,分别接种病毒,接种量为 MOI=0.1~0.2。培养 48 h,收集细胞上清和细胞于 50 mL 离心管中,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次。离心去除细胞碎片,留取上清,分装并保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。病毒滴定实验在 Vero 细胞上进行检测,将细胞按照 1.5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中,待细胞汇合后,将按照 10 \times 梯度连续稀释的病毒液加入到对应孔中。培养 48 h 后在倒置显微镜下计数嗜斑数量,从而确定病毒滴度。

1.2.2 病毒相关蛋白表达检测

病毒相关蛋白检测利用 Western blot 进行;利用细胞刮刀收集细胞于 1.5 mL 离心管中,用适量体积的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min。而后 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min,收集上清。利用 BCA 法测定上清中的总蛋白浓度,而后调整蛋白总量。利用 SDS-PAGE 分离蛋白,之后将蛋白转膜至 PVDF 上。将膜浸润于 Odyssey Blocking Buffer,封闭 1 h。之后,将膜在一抗中孵育,室温 2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 PBS-T 将膜洗涤 5 次,每次 5 min。将膜与荧光二抗稀释液孵育,室温 1 h,而后洗涤 5 次,每次 5 min。最后利用 LI-COR Odyssey 远红外扫描仪进行条带的扫描和分析。

1.2.3 细胞相关蛋白表达检测

细胞相关蛋白表达检测利用 Western blot 进行,方法同 1.2.2。

1.2.4 病毒复制水平检测

病毒复制水平检测利用 In-cell Western 进行。细胞接种于 96 孔板中,待细胞汇合后,进行药物或病毒感染处理。24 h 后,细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,然后用 0.1% Triton X-100 进行穿渗 5 次,每次 5 min。然后用 PBS 清洗细胞 2 次,每次 5 min。之后,细胞用 4% 脱脂奶粉溶液室温封闭 90 min。除去封闭液,加入一抗稀释液 50 μL ,室温孵育 2 h。用 PBS-T 洗涤 5 次,每次 5 min,后加入远红外荧光二抗组合稀释液(1:10 000),室温孵育 1 h。洗涤后,于 LI-COR Odyssey 远红外扫描仪进行扫描并进行结果分析。特定蛋白的表达水平需经过内参 (β -catenin)标准化。

1.2.5 病毒相关 mRNA 检测

病毒相关 mRNA 的检测采用 real-time PCR;细

胞总 RNA 的提取利用 TRIzol 试剂,方法参照产品说明书。提取的总 RNA 利用 TECAN 酶标仪进行定量,然后利用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 进行逆转录合成 cDNA 的第 1 链。real-time PCR 使用 SYBR Green 法在 ABI Prism 7300 进行,设置 3 个复孔。反应体系和实验中所使用的引物序列如下。mRNA 的表达量利用 $\Delta\Delta C_T$ 法进行计算,利用看家基因 GAPDH 进行标准化。本研究所使用引物见表 1。

表 1 Realtime PCR 引物序列

基因名	引物序列(5'→3')
HSV-1 ICP0	Forward:TACGTGAACAAGACTATCACGGG Reverse:TCCATGTCCAGGATGGGC
HSV-1 gD	Forward:AGCAGGGGTTAGGGAGTTG Reverse:CCATCTTGAGAGAGGCATC
HSV-2 ICP0	Forward:GTGCATGAAGACCTGGATTCC Reverse:GGTCACGCCCACTATCAGGTA
HSV-2 gD	Forward:CCAAATACGCCTTAGCAGACC Reverse:CACAGTGATCGGGATGCTGG

1.3 统计学方法

统计分析运用 SPSS20.0 软件,采用双尾 *t* 检验方法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 去泛素化酶抑制剂 PR-619 抑制 HSV 复制

利用 In-cell Western 技术对 HSV 晚期蛋白 gD 进行检测,可以考察化合物对于 HSV 的复制水平。研究发现,PR-619 对 gD 蛋白表达具有抑制作用(图 1),说明 PR-619 可以有效抑制 HSV-1 和 HSV-2 在 HEC-1-A 细胞上的复制,并且其抑制作用呈浓度梯度依赖关系。为了验证该现象不是一种宿主细胞特异性的现象,还在 HeLa 细胞和 Vero 细胞上验证 PR-619 的抗 HSV 效果,结果发现在这 2 种细胞系上都有抗病毒效果(结果未显示)。该结果说明,PR-619 对 HSV 的复制具有抑制作用。同时,利用 real-time PCR 技术对病毒的 gD mRNA 的表达进行了检测,结果也显示 PR-619 可以抑制 gD mRNA 的转录(图 1)。以上结果证明 PR-619 可以有效抑制 HSV 的复制,且呈现剂量依赖关系。

2.2 PR-619 可以抑制 HSV 极早期蛋白的表达

检测 PR-619 对于 HSV-1 的 2 种 IE 基因 ICP0 和 ICP4 的表达。结果显示 PR-619 不仅可以在 mRNA 水平抑制 HSV 极早期基因的转录,同时可以在蛋白表达水平抑制这 2 种极早期基因的表达(图

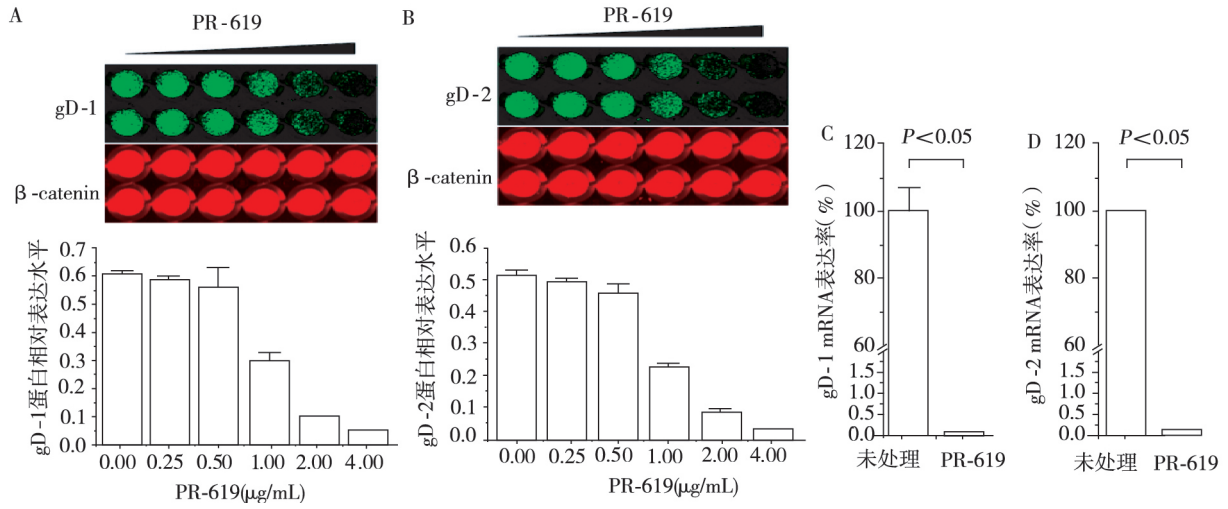
2)。说明 PR-619 抑制 HSV 的复制是通过影响病毒极早期蛋白的表达水平来实现的。

2.3 PR-619 可能通过抑制细胞泛素循环影响病毒复制水平

大量研究发现,许多病毒复制依赖于细胞正常的泛素循环和泛素水平^[3-5]。因此,猜测 PR-619 可能通过影响宿主细胞泛素循环来抑制病毒复制。通过 Western blot,评价了 PR-619 对病毒介导的 NF- κ B 激活的影响。NF- κ B 信号通路的激活依赖泛素和蛋白酶体蛋白降解系统。结果显示,PR-619 可以抑制 HSV-2 介导的 NF- κ B 激活(图 3A),提示它可能可以影响细胞泛素循环从而抑制病毒介导的信号激活现象。之后检测了 PR-619 对于宿主细胞泛素化水平的影响。如图 3B 显示,PR-619 的加入可以增加细胞内高分子量泛素化蛋白的水平,从而证明了其对细胞 UPS 具有抑制作用。本课题组之前研究发现,HSV 的复制可以促进宿主细胞泛素化蛋白的降解,高分子量泛素连接蛋白含量降低。在此基础上,研究其对于 HSV-2 介导的泛素化程度降低的影响,发现 PR-619 可以抑制病毒介导的细胞泛素化水平的降低。这说明 PR-619 破坏了正常细胞的 UPS 通路,从而抑制了病毒的蛋白表达和复制(图 3C)。

3 讨论

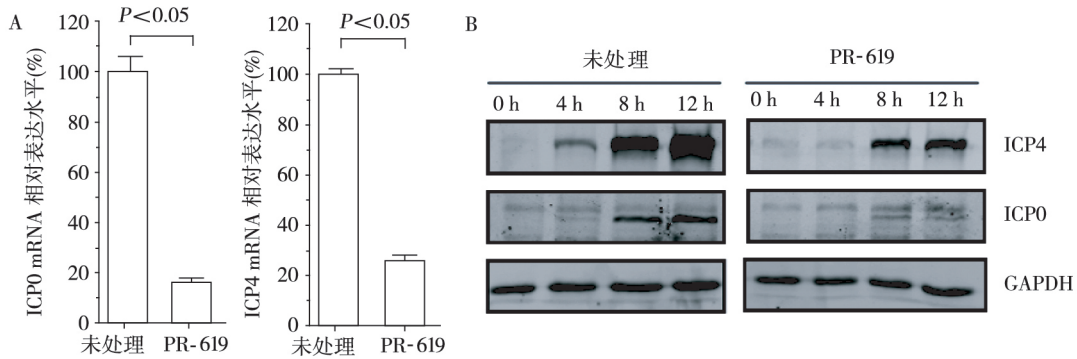
现有的其他研究已经证明,许多病毒的复制与细胞的 UPS 通路具有相互作用。泛素是细胞内蛋白质降解途径的主要标签蛋白之一,而在 UPS 通路中,DUB 是其重要的一环。DUB 是一类从蛋白或其他分子上切割泛素的特异性蛋白酶^[12-13],它们参与了泛素的循环和再利用。研究发现,DUB 在许多疾病进程中发挥了重要作用,这其中就包括癌症和神经系统疾病^[14]。本文讨论了 1 种 DUB 抑制剂 PR-619 对于 HSV 蛋白的表达和复制的影响,同时探究了其抑制病毒可能的机制。结果显示,PR-619 也可以抑制 HSV 的复制,不仅可以抑制病毒晚期蛋白表达,也可以强效抑制病毒 2 个 IE 蛋白 ICP0 和 ICP4 的表达。相关研究发现,HSV 的复制可以降低细胞泛素化蛋白水平,而蛋白酶体抑制剂可以逆转该过程从而抑制病毒复制^[15]。这说明,正常的泛素循环对于病毒复制至关重要。本研究发现,PR-619 的加入可以增加细胞中泛素化蛋白的水平;另外,PR-619 可以有效抑制病毒复制介导的细胞泛素化水平的降低,有效破坏病毒复制的有利环境。本研究推断,抑制宿主细胞 DUB 活性可以有效抑制或干扰细胞泛



HEC-1-A 细胞接种于 96 孔板中,待汇合后用不同浓度的 PR-619 处理细胞,30 min 后感染病毒 HSV-1 和 HSV-2。A,B:感染 24 h 后,In-cell Western 检测病毒 gD 蛋白的表达;C,D:感染 12 h 后,real-time PCR 鉴定 HSV-gD mRNA 的表达量。

图 1 PR-619 抑制 HSV-1 和 HSV-2 的复制

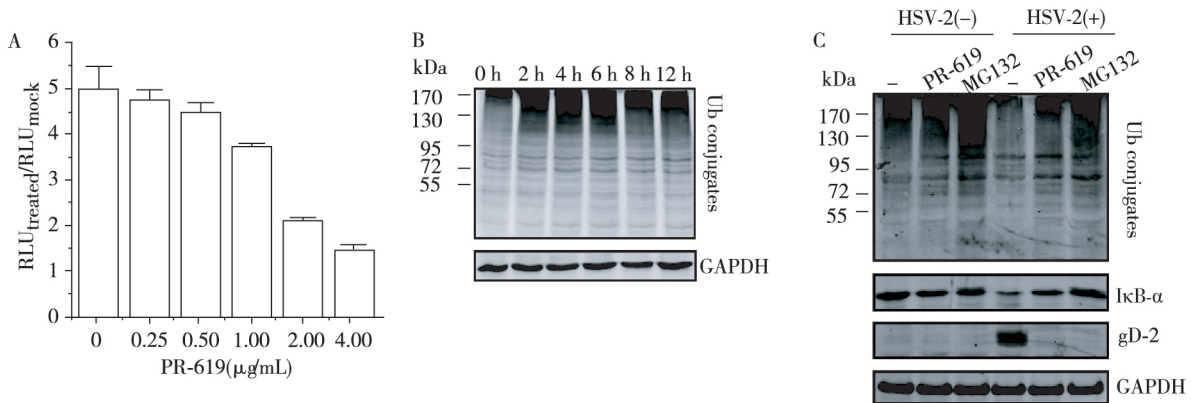
Figure 1 PR-619 inhibited HSV-1 and HSV-2 replication



HEC-1-A 细胞未处理或用 PR-619(4 µg/mL)处理,30 min 后感染病毒 HSV-1。A:感染 12 h 后,real-time PCR 检测病毒 ICP0 和 ICP4 的表达;B:不同时间点收集细胞,Western blot 检测 ICP0 和 ICP4 的表达。

图 2 PR-619 抑制 HSV-1 的 ICP0 和 ICP4 的表达

Figure 2 PR-619 inhibited HSV-1 ICP0 and ICP4 expression



A:HEC-1-A 细胞转染 NF-κB-luc 的报告质粒,24 h 后用不同浓度 PR-619 处理细胞,而后加入 HSV-2,感染 24 h 后检测 Luciferase 活性;B:HEC-1-A 细胞用 PR-619(4 µg/mL)处理,不同时间点收集细胞,Western blot 检测细胞的泛素化水平;C:HEC-1-A 细胞未处理或用 PR-619(4 µg/mL)或 MG132(5 µg/mL)处理,之后感染 HSV-2(MOI=1),24 h 后检测细胞的泛素化水平及 IκB-α 和 gD 的表达水平。

图 3 PR-619 对于 HSV-2 诱导的 NF-κB 的激活以及细胞泛素化水平的影响

Figure 3 The effect of PR-619 on HSV-2 induced NF-κB activation and cellular ubiquitin-conjugates

素循环,从而抑制 HSV 的复制。该研究说明,细胞 DUB 是维系 UPS 稳定和平衡的重要环节,而 HSV 复制需要 DUB 为其进行“服务”。PR-619 是一种广谱性 DUB 抑制剂,它可以抑制超过 30 种 DUB 的活性^[16]。具体的抑制靶点需要后续研究加以证明。而在现阶段,人们已经发现超过 100 多种的 DUB 存在于人的细胞内,每种酶都具有不同的功能和特异性的底物,而与 HSV 复制相关的特定的 DUB 还不得而知,这有赖于之后进一步研究,通过发现特异性的药物靶点为抗病毒药物的研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] Ryan KJ, Sherris JC. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases[M]. McGraw-Hill Medical Publishing, 1994:38
- [2] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2):373-428
- [3] Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53[J]. *Cell*, 1990, 63(6): 1129-1136
- [4] Masucci MG. Epstein-Barr virus oncogenesis and the ubiquitin-proteasome system [J]. *Oncogene*, 2004, 23(11):2107-2115
- [5] Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(20):4620-4624
- [6] Everett RD, Orr A, Preston CM. A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *EMBO J*, 1998, 17(24):7161-7169
- [7] Everett RD. ICPO, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection[J]. *Bioessays*, 2000, 22(8): 761-770
- [8] Everett RD. A detailed mutational analysis of Vmw110, a trans-acting transcriptional activator encoded by herpes simplex virus type 1 [J]. *EMBO J*, 1987, 6(7):2069
- [9] Everett RD. The roles of ICPO during HSV-1 infection. *Alpha herpesviruses: molecular and cellular biology* [M]. Caister Academic Press: United Kingdom, 2006:39-64
- [10] Everett RD, Freemont P, Saitoh H, et al. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms[J]. *J Virol*, 1998, 72(8):6581-6591
- [11] Mclean C, Erturk M, Jennings R, et al. Protective vaccination against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus (HSV) type 2 using a genetically disabled HSV-1 [J]. *J Infect Dis*, 1994, 170(5):1100-1109
- [12] Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes [J]. *FASEB J*, 1997, 11(14): 1245-1256
- [13] Turcu FER, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes [J]. *Ann Rev Biochem*, 2009, 78:363
- [14] Singhal S, Taylor M, Baker R. Deubiquitylating enzymes and disease [J]. *BMC Biochem*, 2008, 9(Suppl 1):S3
- [15] Qiu M, Chu Y, Cheng L, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits herpes simplex virus 1 and 2 replication, and its activity may be mediated through dysregulation of the ubiquitin-proteasome system [J]. *J Virol*, 2013, 87(15): 8675-8686
- [16] Verma R, Aravind L, Oania R, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome [J]. *Science*, 2002, 298(5593):611-615

[收稿日期] 2016-12-09