

# IFIT 家族基因抑制 A 型流感病毒 WSN 毒株的复制和转录

侯力丹<sup>1,2</sup>, 李晶<sup>1</sup>, 瞿洪仁<sup>1</sup>, 杨利敏<sup>1</sup>, 陈亚军<sup>3</sup>, 杜茜茜<sup>4</sup>, 刘文军<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 北京市大兴区畜禽繁育改良指导站, 北京 102600

4 北京市大兴区动物疾病控制中心, 北京 102600

侯力丹, 李晶, 瞿洪仁, 等. IFIT 家族基因抑制 A 型流感病毒 WSN 毒株的复制和转录. 生物工程学报, 2015, 31(1): 123-134.

Hou LD, Li J, Qu HR, et al. Inhibition of replication and transcription of WSN influenza A virus by IFIT family genes. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 123-134.

**摘要:** IFIT (Interferon induced proteins with tetratricopeptide repeats) 家族基因是一组较早发现的干扰素刺激基因, 它在抗病毒和免疫调节中发挥了重要作用。为研究 IFIT 家族基因抑制 A 型流感病毒复制的机理, 利用高通量 RNA 深度测序 (RNA-Seq) 技术发现 A 型流感病毒 A/WSN/33 (WSN) 毒株感染 293T 细胞后, IFIT 家族基因均出现明显上调。同时发现在 IFIT2、IFIT3 过表达后, 流感病毒的复制和转录均有明显下调, 并对 vRNP 聚合酶活性具有剂量依赖型的抑制作用。进一步研究证明在感染 IFIT2、IFIT3 编码蛋白与流感病毒非结构蛋白 (NS1) 存在细胞内共定位, 证明二者存在相互作用的可能。综上所述, IFIT 家族基因可以抑制 A 型流感病毒的复制和转录, 有助于进一步阐明宿主因子对流感病毒感染的调节机制。

**关键词:** IFIT 家族蛋白, A 型流感病毒, 病毒复制, 天然免疫

**Received:** March 17, 2014; **Accepted:** April 28, 2014

**Supported by:** National Science and Technology Major Projects of Infectious Diseases (No. 2013ZX10004-610), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A215), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31100644, 81101253), Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSZD-EW-Z-005-001).

**Corresponding author:** Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; Fax: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (No. 2013ZX10004-610), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A215), 国家自然科学基金 (Nos. 31100644, 81101253), 中国科学院重点部署项目 (No. KSZD-EW-Z-005-001) 资助。

# Inhibition of replication and transcription of WSN influenza A virus by IFIT family genes

Lidan Hou<sup>1, 2</sup>, Jing Li<sup>1</sup>, Hongren Qu<sup>1</sup>, Limin Yang<sup>1</sup>, Yajun Chen<sup>3</sup>, Qianqian Du<sup>4</sup>, and Wenjun Liu<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Daxing Station for Livestock and Poultry Breeding, Beijing 102600, China

4 Centers for Disease Control of Daxing District, Beijing 102600, China

**Abstract:** IFIT family genes are a kind of interferon stimulated genes (ISGs), and play important roles in antiviral sector and immunity regulation. To study the regulatory effect of IFIT family genes during influenza A virus (IAV) infection, we used RNA-sequencing analysis (RNA-Seq) technique and found that when 293T cells were infected by A/WSN/33 (WSN), the concentration of IFIT family genes were increased. Further study reveals that overexpression of IFIT2 or IFIT3 could inhibit IAV replication and transcription, and cause the dose-dependent inhibition of polymerase activity of vRNP. In addition, IFIT2 and IFIT3 encoding protein could colocalize with NS1 in 293T cells infected by WSN, indicating that they might interact with each other. The results suggest that IFIT family genes can inhibit the replication and transcription of IAV, which contributes to our understanding of the regulatory effect of host factors during influenza virus infection.

**Keywords:** IFIT family genes, Influenza A virus, virus replication, innate immunity

流感病毒的感染能够引起多种宿主因子发生变化, 从而引起宿主细胞的各种生理生化反应, 如炎症反应、凋亡、细胞形态变化以及抑制或激活信号转导通路等<sup>[1]</sup>。RNA-seq 技术是分析宿主的系统性转录组学中较为常用的方法, 利用基因本体富集分析发现转录发生变化的基因参与多个生物学途径, 包括宿主细胞免疫、抗原递呈、细胞粘附、信号转导和转录激活等<sup>[2-3]</sup>。流感病毒的感染周期中, 许多宿主因子蛋白通过多个途径抑制病毒复制和调控细胞凋亡, 以减少病毒对宿主的损伤。因此, 相关宿主因子对流感病毒感染的调节功能的研究具有重要意义。

IFIT 家族基因是一组较早发现的干扰素刺激基因, 位于人类 4 号染色体上, 通常 IFIT 家

族基因在大多数细胞中表达量较低, 但干扰素 (IFN)、病毒感染、外源双链 RNA、脂多糖等刺激可强烈诱导其表达。该家族共有 4 个成员, 分别为 IFIT1/ISG56、IFIT2/ISG54、IFIT3/ISG60 和 IFIT5/ISG58<sup>[4-6]</sup>。IFIT 家族编码蛋白大小均在 47–56 kDa 之间, 为胞浆蛋白并具有多个 TPR (Tetratricopeptide repeat helix-turn-helix) 结构域。TPR 是由 34 个氨基酸折叠成螺旋-转折-螺旋构象的基序<sup>[7]</sup>。研究证明 IFIT 家族是一种多功能的宿主因子, 可以抑制黄病毒、冠状病毒等的复制, 同时还具有抗肿瘤、调节细胞凋亡和参与天然免疫通路调控的功能<sup>[8-10]</sup>。但 IFIT 家族对流感病毒复制影响的相关研究却未见报道。

为了探究 IFIT 抑制流感病毒复制的分子机

制,我们在 293T 细胞系中过表达 IFIT2 及 IFIT3,并感染 WSN 流感病毒。结果发现 IFIT 家族编码蛋白对 WSN 流感病毒复制具有强烈的抑制作用。同时,IFIT2 和 IFIT3 对流感病毒的转录及 vRNP 聚合酶活性均有抑制作用,而且它们与流感病毒非结构蛋白(NS1)在细胞内存在共定位。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株、病毒株

293T 细胞系、MDCK 细胞系、WSN 流感病毒由本实验室传代并保存。

#### 1.1.2 载体及菌株

大肠杆菌 TOP10 由本实验室保存;载体 pCMV-Myc、pcDNA3.0-Flag,表达 WSN 流感病毒 PA、PB1、PB2 和 NP 的反向遗传系统 4 个表达质粒 Ben9、Ben10、Ben11、Ben13 由 pol I 启动子控制并含有 NS 片段非编码序列的 CNS-luciferase、 $\beta$ -Galactosidase 质粒,均由本实验室保存。

#### 1.1.3 主要试剂及引物

IFIT2、IFIT3 基因由 Origen 公司合成;用于构建克隆的各种工具酶均购自 TaKaRa 公司;DMEM 培养基、优级胎牛血清、无酚红 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;转染试剂 Polyethylenimine (PEI)、普通胰酶、蛋白酶抑制剂和 TPCK 处理的胰酶购自罗氏公司;AMV 反转录酶、RNase 抑制剂、荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司;邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳糖吡喃糖苷 (ONPG)、TritonX-100 购自 Amreso 公司;DAPI、Flag 抗体、多聚甲醛和 BSA 购自 Sigma 公司;Myc 鼠抗单克隆抗体购自 Santa

Cruz Biotechnology;FITC 标记抗兔 IgG 和 TRITC 标记抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠、羊抗兔 IgG 购自中杉金桥公司;鼠抗 M1 单克隆抗体和兔抗 NS1 多克隆抗体由本实验室制备保存;HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天根生物科技有限公司;所有引物由上海生工公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 IFIT2、IFIT3 表达载体的构建

以合成的 IFIT2 和 IFIT3 基因为模板,用 P1/P2、P3/P4 两对引物(表 1),分别进行 PCR 扩增 IFIT2 和 IFIT3 基因,PCR 产物经 Sal I 和 Xho I 双酶切,与酶切后的 pCMV-Myc 载体连接。用 P5/P2 和 P6/P4 两对引物(表 1),分别 PCR 扩增 IFIT2 和 IFIT3 基因,PCR 产物经 Kpn I 和 Xho I 双酶切,与酶切后的 pcDNA3.0-Flag 载体连接。转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,挑取阳性克隆,经上海美吉生物医药科技有限公司测序确认获得重组质粒。

#### 1.2.2 RNA-Seq 文库构建及分析

将 WSN 流感病毒以感染复数 (MOI) 为 1 的剂量感染 293T 细胞,同时设置未感染组 293T 细胞作为阴性对照,分别在感染后 0、4、8、10、12 h 收获细胞。利用 Trizol 法提取 293T 细胞样品中的总 RNA。将感染后 8 h 收获的样品利用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) 进行 RNA RIN (The RNA integrity number) 值的检测,筛选鉴定 RIN 值 > 8 的总 RNA 质量。获得高质量总 RNA 后,使用 Illumina Truseq RNA 制备试剂盒构建 RNA-Seq 文库,再利用 Hiseq2000 进行双端 PE 100 (Paired-end 100) 测序,所得数据筛选质量高的数值,将剩余数值去

表 1 克隆 *IFIT2*、*IFIT3* 及 Real-time PCR 检测 *IFIT2*、*IFIT3*、M1、NP、 $\beta$ -Actin 的引物

Table 1 Primers for cloning of *IFIT2*, *IFIT3* and detection of *IFIT2*, *IFIT3*, M1, NP,  $\beta$ -Actin by Real-time PCR

Primers	Primer sequence (5'-3')
P1	ACGCGTCGACCATGAGTGAGGTCACCAA
P2	CCGCTCGAGTCAGTTCAGTTGCTCTGAGT
P3	ACGCGTCGACCATGAGTGAGGTCACCAA
P4	CCGCTCGAG TCAGTTCAGTTGCTCTGAGT
P5	GGGTACC ATGAGTGAGAACAATAA
P6	GGGTACCATGAGTGAGGTCACCAA
P7	CAGCTGAGAATTGCACTGCAA
P8	CGTAGGCTGCTCTCCAAGGA
P9	GAACATGCTGACCAAGCAGA
P10	CAGTTGTGTCCACCCTTCT
P11	GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT
P12	GAAGTGGGGTGGCTTTTAGGA
P13	TGGCACTCCAATTTGAATGAATGATG
P14	TCCATTCTGTGCGAACAAG
P15	TCTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAA
P16	AATGACCATCGTCAACATCCACAGC

除。最后利用 Tophat 软件和人的参考基因组 hg19 进行比对, 获得可用比对数据。

另外, 将各时间段收获细胞的总 RNA 用 Oligo (dT) 引物进行反转录获得 cDNA, Real-time PCR 检测 *IFIT2* 和 *IFIT3* 的 mRNA 水平, 分别以 P7/P8 引物扩增 *IFIT2*, 以 P9/P10 引物扩增 *IFIT3*, 以 P11/P12 引物扩增内参基因  $\beta$ -Actin。Real-time PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 60 °C 收集荧光。应用内参基因对校准样本和待测样本进行校正, 进行相对定量检测。

### 1.2.3 细胞转染与感染

293T 细胞在含有 10%胎牛血清, 10 000 U/mL

青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中贴壁生长, 培养环境为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。将细胞接种于培养板中, 待细胞密度为 60%–80%后, 进行转染。采用 PEI 作为转染试剂, 根据实验要求, 分别转染 2  $\mu$ g pcDNA3.0-Flag-*IFIT2* 和 pcDNA3.0-Flag-*IFIT3* 质粒于 293T 细胞中。转染后 4–6 h 更换普通新鲜培养基。转染约 24 h 后, 以 MOI 为 0.01 的剂量感染 WSN 流感病毒, 孵育 1 h 后更换病毒感染液 (DMEM、1 : 4 000 TPCK 处理的胰酶、10 000 U/mL 青霉素和链霉素)。感染 12 h 后, 收集细胞上清, 用于噬斑试验检测病毒滴度。细胞用细胞裂解液 (0.5% NP40、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L Hepes (pH 7.4)、10%甘油、1 mmol/L EDTA、蛋白酶抑制剂 cocktail) 裂解细胞并离心收集上清液, 进行后续 Western blotting 检测。

### 1.2.4 Western blotting 检测

将收集的细胞上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 采用半干法将蛋白转移至 PVDF 膜上。封闭液 (5%脱脂奶粉、1% BSA) 室温封闭 2 h。然后加入一定比例稀释的一抗, 室温结合 1 h, TBST (20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.05% Tween20) 洗 3 次。加入一定比例稀释的 HRP 标记二抗, 室温结合 45 min, TBST 洗 3 次。采用底物显色试剂盒进行 X-ray 曝光显影。

### 1.2.5 蚀斑试验

将 MDCK 细胞接种于 12 孔板中, 培养过夜待细胞长成单层, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 将 10 倍梯度稀释的病毒样品加入到细胞中, 每个梯度设 3 个重复, 置于 37 °C 温箱中孵育 1 h。弃掉培养基, 将细胞用 PBS 洗 3 次。加热融化的 3% 低熔点琼脂糖 (用 PBS 配制), 待其冷却到 40 °C 左右时, 与 37 °C 预热的无酚红 DMEM 培养基按

1 : 1 的比例混合 (DMEM 中含有 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCK 处理的胰酶, 即终浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。充分混匀后迅速加入 12 孔板中, 每孔 1 mL。将细胞板置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中 10 min, 使琼脂凝固后, 将 12 孔板倒置于 37  $^{\circ}\text{C}$  中培养。培养 3–5 d 后, 观察细胞病变, 并通过统计肉眼可见的病毒蚀斑计算病毒滴度。

### 1.2.6 Real-time PCR

293T 细胞铺满 12 孔板, 生长过夜待细胞长满单层后转染 pcDNA3.0-FLAG-IFIT2, pcDNA3.0-FLAG-IFIT3 及 pcDNA3.0-FLAG 空载体作为阴性对照。转染 24 h 后, 感染 WSN 流感病毒 (MOI=0.01), 在感染后 0 h (未感染的对照组)、2 h、4 h、6 h、8 h 分别用 Trizol 收集并裂解细胞进行 RNA 提取。用 Oligo (dT) 引物将病毒 mRNA 进行反转录获得 cDNA。以不同处理组的 cDNA 样品为模板, 用 Real-time PCR 扩增流感病毒 NP 基因 (P13/P14 引物)、M1 流感病毒基因 (P15/P16 引物)、内参基因  $\beta$ -Actin (P11/P12 引物)。Real-time PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环; 60  $^{\circ}\text{C}$  收集荧光, 应用内参基因对校准样本和待测样本进行校正, 进行相对定量检测。

### 1.2.7 荧光素酶试验

把 293T 细胞置于 24 孔板中, 培养过夜后转染以下质粒: Ben9、Ben10、Ben11、Ben13、CNS-Luciferase 和内参  $\beta$ -Galactosidase 质粒, 同时分别转染不同剂量的 pcDNA3.0-Flag-IFIT2、pcDNA3.0-Flag-IFIT3 质粒及 pcDNA3.0-Flag 对照质粒。转染 30 h 后, 裂解并收集细胞, 以  $\beta$ -Galactosidase 为内参, 检测细胞的荧光素酶活性。

### 1.2.8 免疫荧光试验

把 293T 细胞置于铺有玻片的 24 孔板中, 培养过夜后分别转染 pCMV-Myc-IFIT2 和 pCMV-Myc-IFIT3 各 0.5  $\mu\text{g}/\text{孔}$ 。转染后 24 h, 在分别过表达 IFIT2 和 IFIT3 的两组 293T 细胞中感染 WSN 流感病毒 (MOI=0.01)。感染 6 h、12 h、24 h 后分别用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 然后用含有 4% BSA 的 TBST (PBS 中加入 0.5% TritonX-100) 室温封闭 1 h。加入一定比例稀释的 Myc 抗体、NS1 抗体作为一抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  结合 1 h, PBST 洗 5 次, 每次 10 min。加入一定比例稀释的荧光二抗 FITC 标记抗兔 IgG 和 TRITC 标记抗鼠 IgG, 37  $^{\circ}\text{C}$  结合 1 h, PBST 洗 5 次, 每次 10 min。加入 DAPI 室温染色 5 min, PBST 洗 3 次。然后用封片液 (50% 甘油, 50% PBS) 封片, 以指甲油固定四周。激光共聚焦显微镜观察 IFIT2、IFIT3 及 NS1 在细胞中的定位情况。

## 2 结果

### 2.1 流感病毒感染可上调 IFIT2、IFIT3 的转录

用 WSN 流感病毒感染 293T 细胞, 提取细胞总 RNA 进行 RNA-Seq 分析。其中 IFIT2、IFIT3 显示的 mRNA 丰度值如图 1A 所示, IFIT2、IFIT3 均能被流感病毒上调至少 3 倍以上。将数据分析统计后作图, 可更直观地分析 WSN 流感病毒对 IFIT2、IFIT3 的上调情况。WSN 流感病毒刺激后 IFIT3 的上调倍数高于 IFIT2。Real-time PCR 结果显示, 与未感染组相比, 293T 细胞感染 WSN 流感病毒后 4 h、8 h、10 h、12 h, IFIT2 和 IFIT3 的 mRNA 水平显示不同程度上调, 且与 IFIT2 相比, IFIT3 的上调效果更加明显, 结果与 RNA-seq 一致 (图 1B)。

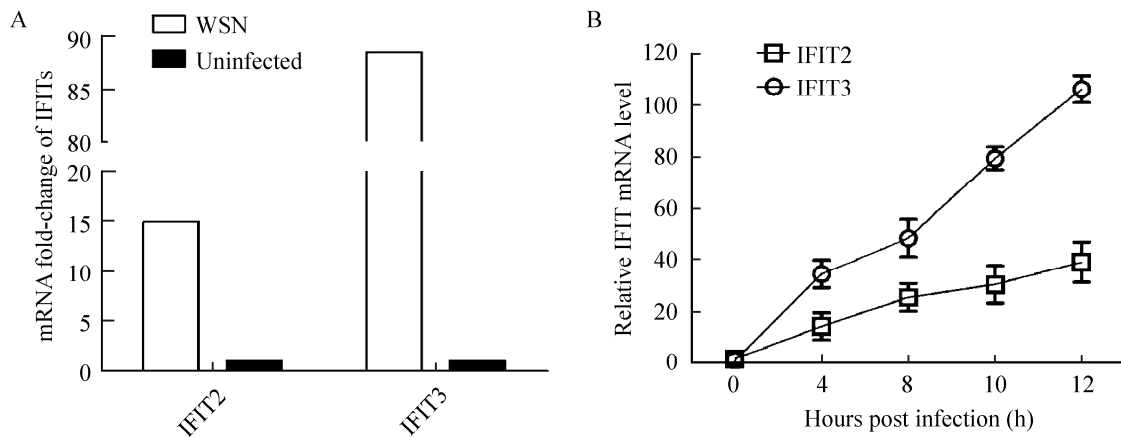


图 1 H1N1 流感病毒刺激 293T 细胞中 *IFIT2*、*IFIT3* 基因表达上调

Fig. 1 Abundance of influenza A virus (H1N1) induced gene difference of IFIT family in 293T cells. (A) The relative ratio of mRNA of *IFIT2* and *IFIT3* between infected and uninfected group was analysed by RNA-Seq. (B) The abundance value of IFIT was detected by real-time PCR under different stimulation. Data was shown as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ).

## 2.2 IFIT2、IFIT3 抑制流感病毒蛋白质的表达

为了检测 IFIT2、IFIT3 编码蛋白是否具有抗流感病毒的功能，在 293T 细胞中转染带有 Flag 标签的目的质粒 pcDNA3.0-Flag-IFIT2、pcDNA3.0-Flag-IFIT3 及对照质粒 pcDNA3.0-Flag。转染 24 h 后，以 MOI=0.01 的感染剂量用 WSN 流感病毒感染 293T 细胞，感染后 16 h，收集细胞上清用于蚀斑试验，收获细胞裂解液用于 Western blotting 检测，各种蛋白的表达情况如图 2A 所示。与对照组相比，过表达 IFIT2 及 IFIT3 使流感病毒的 NP 蛋白表达量分别下降 70.52% 和 83.31% (图 2B)，同时使 M1 蛋白表达量分别下降 62.22% 和 63.57% (图 2C)。IFIT2 和 IFIT3 使细胞上清的病毒滴度分别下降 74.15% 和 63.19% (图 2D)。因此得出结论，IFIT2、IFIT3 能显著抑制流感病毒的复制。为了观察 IFIT2 和 IFIT3 的

过表达效率，在 293T 细胞中分别过表达 pcDNA3.0-Flag-IFIT2 与 pcDNA3.0-Flag-IFIT3 质粒，24 h 后固定细胞，免疫荧光检测发现 IFIT2 和 IFIT3 表达效率较高，且都主要分布于细胞质中 (图 2E)。

## 2.3 IFIT2、IFIT3 抑制流感病毒的转录

本实验利用 real-time PCR 的方法，检测病毒复制的一个周期内 IFIT 对流感病毒 NP 及 M1 的 mRNA 水平的影响。如图 3A 所示，从 4 hpi 开始，IFIT2、IFIT3 均显示出对 NP 的 mRNA 水平有极显著的抑制作用，在 8 hpi 抑制效果分别达到 58.22% 和 54.89%。如图 3B 所示，在 M1 的 mRNA 水平方面，IFIT2、IFIT3 也均在 4 hpi 显示出对其有极显著的抑制作用，在 8 hpi 抑制效果分别达到 5.58% 和 40.94%。以上结果表明，IFIT2、IFIT3 能显著抑制流感病毒的转录。

## 2.4 IFIT2、IFIT3 抑制流感病毒的聚合酶活性

将质粒 Ben9 (pcDNA-PB2)、Ben10 (pcDNA-PB1)、Ben11 (pcDNA-PA)、Ben13 (pcDNA-NP)、CNS-luciferase 和内参  $\beta$ -Galactosidase 质粒转染 293T 细胞,同时转染不同剂量 (0.05  $\mu$ g、0.15  $\mu$ g、0.45  $\mu$ g) 的 pcDNA3.0-Flag-IFIT3、pcDNA3.0-Flag-IFIT2 及 0.15  $\mu$ g

pcDNA3.0-Flag 对照质粒。转染 30 h 后,收获细胞裂解液,测定不同处理的  $\beta$ -Galactosidase 及 luciferase 的活性,同时 Western blotting 检测 IFIT3、IFIT2 的表达。如图 4 所示,和转染空质粒对照组相比,过表达 IFIT2、IFIT3 的细胞中,流感病毒聚合酶活性均下降。在转染 0.45  $\mu$ g 剂量水平时,IFIT2 及 IFIT3 对聚合酶活性的抑制

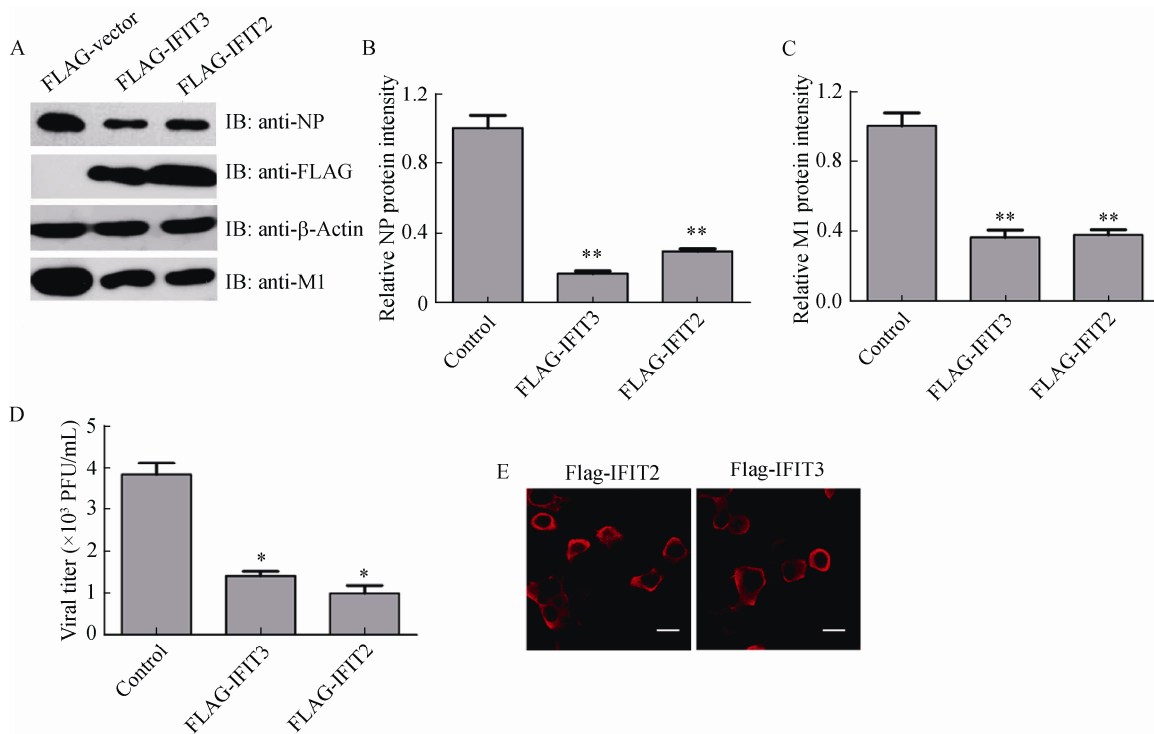


图 2 IFIT2、IFIT3 对 A 型流感病毒复制的影响

Fig. 2 Effects of IFIT2 and IFIT3 on the replication of influenza A virus. (A) 293T cells were transfected with pcDNA3.0-Flag-IFIT2, pcDNA3.0-Flag-IFIT3 or pcDNA3.0-Flag plasmid, and followed by infecting with WSN at MOI of 0.01. The cell lysates was analyzed by Western blotting with anti-Flag, anti- $\beta$ -Actin, anti-NP and anti-M1 antibodies. (B, C) Relative expression levels of NP and M1 were calculated by quantifying the results shown in panel A. (D) The media was collected and the titers of viruses were measured. The data was presented as mean standard error of mean from three independent experiments. The Mann-Whitney U test was used to compare the differences in relative protein level or viral titer between control and IFIT2/IFIT3. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ . The asterisks were masked on the top of higher columns. (E) 293T cells were transfected with pcDNA3.0-Flag-IFIT2 or pcDNA3.0-Flag-IFIT3 plasmid, at 24 h post-infection (hpi), cells were fixed by paraformaldehyde, and applied to immunofluorescence assay. Bars=50  $\mu$ m.

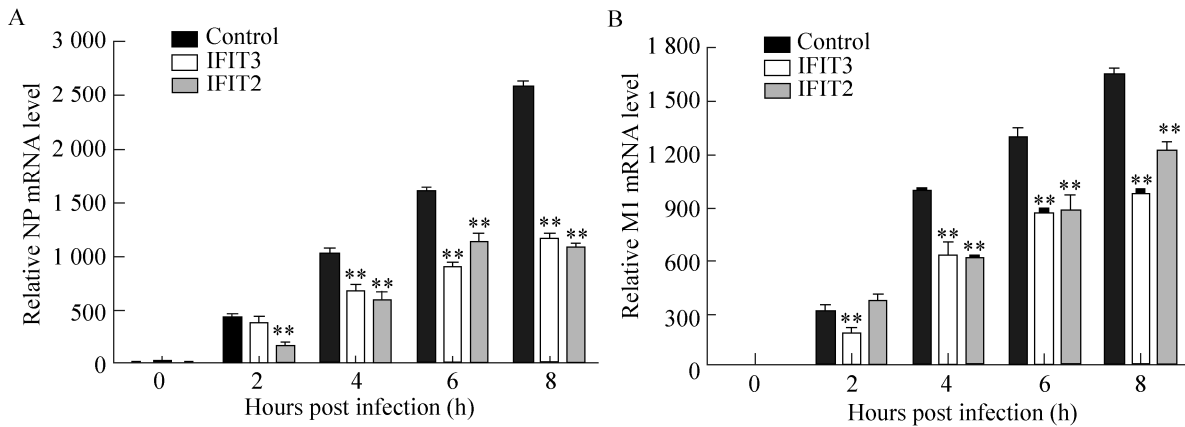


图3 IFIT2及IFIT3对A型流感病毒转录水平的影响

Fig. 3 Effects of IFIT2 and IFIT3 on the transcription of influenza A virus. (A) 293T cells were transfected with 1  $\mu$ g pcDNA3.0-Flag-IFIT2, pcDNA3.0-Flag-IFIT3 and pcDNA3.0-Flag respectively. At 24 h post transfection, cells were infected with WSN (MOI=0.1). At 0, 2, 4, 6 and 8 hpi, cells were harvested and extracted total RNA for quantitative real-time PCR assays. The mRNA levels of M1 gene were detected by quantitative RT-PCR. The  $\beta$ -Actin mRNA served as an internal control. (B) The mRNA levels of NP gene were also analyzed as described in (A). All data was shown as mean standard error of mean from three independent experiments. The relative mRNA level of IFIT2 or IFIT3 treatments were compared with that of control at the same time points by the Mann-Whitney U test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.  $**P < 0.01$ . The asterisks were masked on the top of higher columns.

效果分别为 41.4%和 58.6%。同时发现, 与对照组相比, 过表达 IFIT2 或 IFIT3 时, 随着转染剂量的增加, 聚合酶活性下调程度越来越显著, 呈现剂量依赖性抑制效果。

## 2.5 IFIT2 或 IFIT3 在感染 WSN 的 293T 细胞中与流感病毒 NS1 蛋白有共定位

用 WSN 流感病毒感染分别转染有 IFIT2 或 IFIT3 的细胞, 在 12 hpi、24 hpi 时固定样品。在激光共聚焦显微镜下观察, 结果如图 5 所示, pCMV-Myc-IFIT2 及 pCMV-Myc-IFIT3 主要分布于细胞质中, 12 hpi 时流感病毒 NS1 在细胞核与细胞质中均有分布, IFIT2、IFIT3 与流感病毒 NS1 蛋白在细胞质内存在一定的共定位。24 hpi 时, NS1 主要位于细胞质内, 它与 IFIT2 及 IFIT3 的共定位现象更加明显。结果表明, IFIT2、IFIT3 与 NS1 有潜在相互作用的可能。

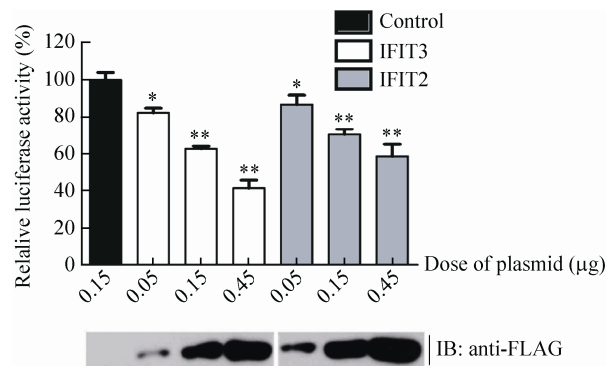


图4 IFIT2与IFIT3对A型流感病毒vRNP聚合酶活性的影响

Fig. 4 Effects of IFIT2 and IFIT3 on the vRNP polymerase activities of influenza A virus. Luciferase activities of 293T cells transfected with different doses of pcDNA3.0-Flag-IFIT2 and pcDNA3.0-Flag-IFIT3 were measured. The expression of different doses of Flag-IFIT2 and Flag-IFIT3 were analyzed by Western blotting. Data was shown as mean standard error of mean from three independent experiments. The relative luciferase activity of different doses of IFIT2 or IFIT3 treatments were compared with that of control by the Mann-Whitney U test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ . The asterisks were masked on the top of higher columns.



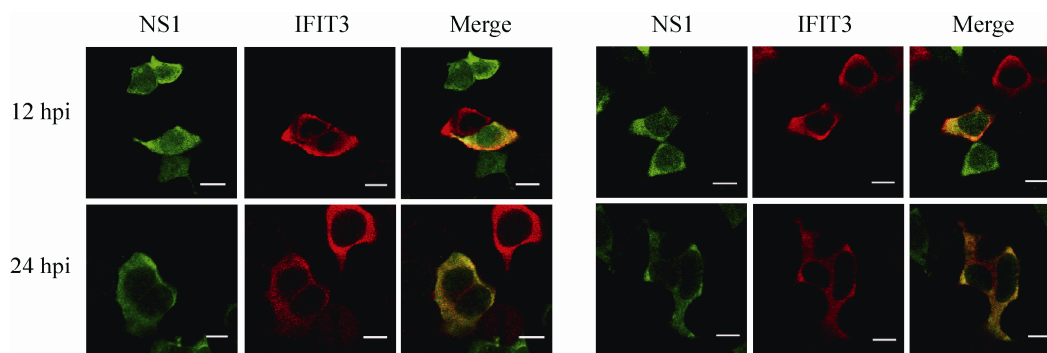


图 5 感染 WSN 流感病毒的 293T 细胞中 IFIT2、IFIT3 与 A 型流感病毒 NS1 蛋白有共定位

Fig. 5 Co-location of IFIT2, IFIT3 with NS1 of influenza A virus showed that IFIT2 and IFIT3 had the potential ability of interacting with NS1. 293T cells were transfected by pCMV-Myc-IFIT2 and pCMV-Myc-IFIT3 respectively. At 24 hpi, cells were infected with WSN (MOI=0.01). At 12 and 24 hpi, cells were fixed with paraformaldehyde, and followed by detection with immunofluorescence assay. Bars=10  $\mu$ m.

### 3 讨论

A 型流感病毒严重危害人类健康并造成巨大的经济损失和社会负担, 由于流感病毒基因组的高度变异特性, 频繁更新流感疫苗的研发费用越来越高<sup>[11]</sup>。近年来, H1N1 亚型流感病毒等变异毒株成为研究人员热点关注的领域。流感病毒激发的宿主细胞信号转导非常复杂, 许多信号分子在不同条件下发挥的作用不同, 并且信号通路间还可能产生交叉影响, 按照信号通路或对单个分子进行研究难以在整体上把握流感病毒与宿主的相互作用, 引入基因组、转录组、蛋白质组及生物信息学的系统性研究方法将有助于从总体上解读流感病毒的感染过程<sup>[12]</sup>。

细胞天然免疫反应是机体抵御病毒感染的第一道防线, 病毒感染细胞激活了天然免疫通路, 从而诱导了 I 型干扰素和炎症因子的产生, 继而 I 型干扰素通过信号转导诱导大量具有抗病毒功能的干扰素刺激基因, 抑制病毒复制, 清除被感染的细胞。I 型干扰素防御体系是机体最

重要的抗病毒天然免疫系统, 其功能的发挥主要依赖其诱导生成的干扰素刺激基因<sup>[13]</sup>。

据前人报道, IFIT 发挥抗病毒作用的一个重要方面是通过识别病毒 RNA 的 5'-PPP 结构, 这是一种广泛的效应<sup>[14]</sup>。本实验室前期转录组学 RNA-seq 的结果显示, WSN 流感病毒感染 293T 细胞后能引起宿主细胞大量 ISG 表达上调, 这其中有些基因在 GenBank 中未能找到任何注释, 而有些基因则对多种病毒均具有较大的抗病毒潜能, Rathi 等<sup>[15]</sup>报道称猿猴病毒 40 (SV40) 能刺激 IFIT 家族基因上调。随后, Zhu 等<sup>[16]</sup>发现人巨细胞病毒 (HCMV) 感染 8 h 后刺激产生的 RNA 是由干扰素诱导产生的。研究证明, A 型流感病毒感染急性期的病人, 其外周血细胞中 IFIT 家族基因上调最为显著<sup>[17]</sup>。另外, 采用 iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) 技术对 A 型流感病毒感染的巨噬细胞进行分析, 也发现 IFIT 家族分子的明显上调<sup>[18]</sup>。我们将 IFIT2 和 IFIT3 在细胞中瞬时表达, 发现其能显著抑制流感病毒的复制。这些结果提

示我们, IFIT 家族有可能是机体一种重要的抗流感病毒宿主因子, 在干扰素防御体系被流感病毒破坏后, IFIT 家族分子可能作为宿主另一个抗流感病毒防御系统, 抑制流感病毒的复制、清除感染的细胞, 以保护机体免受流感病毒进一步的损伤。

此前, 已有一些关于 IFIT 家族蛋白抗病毒功能的报道。Kimura 等研究指出, 在乙型脑炎病毒 (JEV) 2'-O 甲基转移酶缺失的情况下, IFIT1 可以通过直接与 mRNA 5'端结合抑制病毒 mRNA 翻译, 进而抑制 JEV 的复制<sup>[19]</sup>。同时, 对于可编码自身 2'-O 甲基转移酶的病毒来说, 缺失病毒的 2'-O 甲基转移酶的方法也常常用于一些病毒疫苗的研发, 这与突变毒株对干扰素及 IFIT 蛋白的敏感性增强有关<sup>[20-21]</sup>。在缺失 MDA5 或 IFIT1 的情况下, 识别未甲基化的 2'-O RNA 的干扰素应答基因可引起 NSP16 突变病毒的复制<sup>[22]</sup>。

IFIT 家族分子包括 IFIT1、IFIT2、IFIT3、IFIT5 四个成员, IFIT 家族基因表达的蛋白都具有多个 TPR, 用以参与蛋白-蛋白互作、翻译起始、识别 RNA 等功能<sup>[23]</sup>。各成员之间存在共性同时也存在着结构和功能的差异。IFIT2 单体具有 9 个 TPR, 常以二聚体形式存在, 其超螺旋部分特殊的结构使 IFIT2 可以特异性地结合富 AU 的 RNA 或富 AU 的 RNA 元件 (AREs)<sup>[24]</sup>。在结构方面, 虽然与 IFIT1 和 IFIT2 相比, IFIT3 基因 ISREII 的位置更加靠近上游, 但它拥有与 IFIT1 和 IFIT2 相似的干扰素刺激反应元件 (ISG60)。基于上述研究, IFIT2/3 之间的结构和功能的差异也是我们需要下一步探究的重点。

流感病毒之所以引起高发病率和高致死率,

其中一个重要原因是其能够有效逃逸机体的天然免疫防护, 从而保证流感病毒在宿主体内的有效复制<sup>[25]</sup>。流感病毒逃逸天然免疫反应的途径中包括流感病毒非结构蛋白 (NS1) 与 Trim25 相互作用, 影响其激活 RIG-I<sup>[26]</sup>, 从而抑制了 RIG-I 信号通路启动。IFIT 家族在 IFN、RIG-I、RLH 等多条天然免疫信号通路中发挥重要作用。固有免疫的重要调节因子, IFIT3 具有可与 TBK1N 端的 K38 相互作用的 TPR, 使 TBK1 和 MAVS 在线粒体上发生相互作用<sup>[27]</sup>。TBK1 和 IKK-i 可以磷酸化 IRF3 和 IRF7, 二者的二聚体转移至细胞核中, 促进 I 型干扰素的产生及干扰素刺激基因的表达, IKK-i 也能使 STAT1 发生磷酸化以促进 IFIT3 等一系列干扰素刺激基因的产生<sup>[28]</sup>。Wilson 等研究发现 GBP1 能够抑制流感病毒复制但具体机制不详, 该文献仅证明了 GBP1 能和流感病毒的 NS1 蛋白相互作用<sup>[29]</sup>。我们的另一个重要发现是 IFIT 家族能与流感病毒的 NS1 蛋白共定位, 证明二者有潜在相互作用的可能, 这进一步说明 IFIT 对流感病毒的抑制效果可能是通过 NS1 蛋白来发挥作用的。那么, IFIT 是在哪个环节影响了病毒的复制? IFIT 编码蛋白与 NS1 的相互作用是否影响了 NS1 的抗天然免疫功能? 这些是需要下一步探究的问题。

研究表明, IFIT2 和 IFIT3 均能抑制流感病毒的 M1 及 NP 蛋白的表达, 而且是在转录水平中发挥作用的, 因为它们都能够抑制流感病毒的转录和聚合酶活性, 这是对目前研究现状的有力补充, 也是对 IFIT 家族成员的抗病毒机理进行了更精确的定位。而 IFIT2 和 IFIT3 是否仅在转录水平抑制流感病毒复制? 它们在转录前水平是否也能发挥作用? 这些问题都是我们下

一步研究的重点所在。

综上所述, IFIT 家族蛋白是机体一种重要的抗流感病毒宿主因子, 可参与流感病毒感染后细胞内的天然免疫过程。该研究对于进一步了解宿主因子对于流感病毒的调节机制以及病毒感染细胞中天然免疫反应具有一定的指导意义。

## REFERENCES

- [1] Coombs KM, Berard A, Xu W, et al. Quantitative proteomic analyses of influenza virus-infected cultured human lung cells. *J Virol*, 2010, 84(20): 10888–10906.
- [2] Zou W, Chen D, Xiong M, et al. Insights into the increasing virulence of the swine-origin pandemic H1N1/2009 influenza virus. *Sci Rep*, 2013, 3(16): 1–9.
- [3] Iwasaki A, Lietzén N, Hman T, et al. Quantitative subcellular proteome and secretome profiling of influenza A virus-infected human primary macrophages. *PLoS Pathog*, 2011, 7(5): e1001340.
- [4] Xiang Z, Jennifer JM, Lifan Z, et al. Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(2): 200–208.
- [5] Zhao HX, Boije H, Granberg F, et al. Activation of the interferon-induced STAT pathway during an adenovirus type 12 infection. *Virology*, 2009, 392(2): 186–195.
- [6] Grinde B, Gayorfar M, Rinaldo CH. Impact of a polyomavirus (BKV) infection on mRNA expression in human endothelial cells. *Virus Res*, 2007, 123(1): 86–94.
- [7] Liu Y, Zhang YB, Liu TK, et al. Lineage-specific expansion of IFIT gene family: an insight into coevolution with IFN gene family. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e66859.
- [8] Marcin S, Sarah VS, Prasanna K, et al. The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J Biol Chem*, 2011, 286(9): 7257–7266.
- [9] Fenster V, Wetzel JL, Ramachandran S, et al. Interferon-induced Ifit2/ISG54 protects mice from lethal. *PLoS Pathog*, 2012, 8(5): e1002712.
- [10] Zhang BH, Liu XY, Chen W, et al. IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013, 45(10): 867–874.
- [11] Dang Y. Co-infection swine influenza virus and streptococcus suis and NDV single infection difference proteomic analysis[D]. Changchun: Jilin University, 2013 (in Chinese).  
党源. 新城疫病毒单感染及猪流感病毒与猪链球菌共感染差异蛋白组学分析[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [12] Liu XL, Zhao ZD, Li Z, et al. Cyclosporin A inhibits the influenza virus replication through Cyclophilin A-dependent and -independent pathway. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e37277.
- [13] Qu HR, Yang LM, Meng SS, et al. The differential antiviral activities of chicken interferon  $\alpha$  (ChIFN- $\alpha$ ) and ChIFN- $\beta$  are related to distinct Interferon-stimulated gene expression. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59307.
- [14] Pichimair A, Lassnig C, Eberle CA, et al. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat Immunol*, 2011, 12(7): 624–630.
- [15] Rathi AV, Cantalupo PG, Sarkar SN, et al. Induction of interferon-stimulated genes by Simian virus 40 T antigens. *Virology*, 2010, 406(2): 202–211.
- [16] Zhu H, Cong JP, Shenk S. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: Induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 13985–13990.
- [17] Kawada J, Kimura H, Kamachi Y, et al. Analysis of gene-expression profiles by oligonucleotide microarray in children with influenza. *J Gen Virol*, 2006, 87(6): 1677–1683.
- [18] Lietzen N, Ohman T, Rintahaka J, et al. Quantitative subcellular proteome and secretome profiling of influenza A virus-infected human primary macrophages. *PLoS Pathog*, 2011, 7(5): e1001340.
- [19] Taishi K, Hiroshi K, Hisako K, et al. Ifit1 inhibits Japanese Encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol*, 2013, 87(18): 9997–10003.
- [20] Li SH, Dong HP, Li XF, et al. Rational design of a

- Flavivirus vaccine by abolishing viral RNA 2'-O methylation. *J Virol*, 2013, 87(10): 5812–5819.
- [21] Züst R, Dong HP, Li XF, et al. Rational design of a live attenuated Dengue vaccine: 2'-O-Methyltransferase mutants are highly attenuated and immunogenic in mice and macaques. *PLoS Pathog*, 2013, 9(8): e1003521.
- [22] Vineet DM, Boyd LY, Laurence J, et al. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-Methyltransferase activity. *J Virol*, 2014, 88(8): 4251–4264.
- [23] Fensterl V, Sen GC. The ISG56/IFIT1 gene family. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(1): 71–78.
- [24] Yang Z, Liang H, Zhou Q, et al. Crystal structure of ISG54 reveals a novel RNA binding structure and potential functional mechanisms. *Cell Res*, 2012, 22(9): 1328–1338.
- [25] Pothlichet J, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway. *J Immunol*, 2008, 180(4): 2034–2038.
- [26] Gack MU, Albrecht RA, Urano T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(5): 439–449.
- [27] Liu XY, Chen W, Wei B, et al. IFN-induced TPR protein IFIT3 potentiates antiviral signaling by bridging MAVS and TBK1. *J Immunol*, 2011, 187(5): 2559–2568.
- [28] Lena T, Sven E, Boris Z, et al. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene*, 2002, 21(8): 1251–1262.
- [29] Wilson EH, Zhu Z, Shi Z, et al. Nonstructural protein 1 of influenza A virus interacts with human guanylate-binding protein 1 to antagonize antiviral activity. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e55920.

(本文责编 郝丽芳)



### 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法 (Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results)：本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等)，或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英文摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。