

## 不同亚型流感病毒 NS1 蛋白的细胞定位差异分析

余萌<sup>1,2</sup>, 曹帅帅<sup>1,3</sup>, 郑伟楠<sup>1</sup>, 贾潇潇<sup>1</sup>, 李晶<sup>1</sup>, 刘文军<sup>1,2,3</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 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230039

余萌, 曹帅帅, 郑伟楠, 等. 不同亚型流感病毒 NS1 蛋白的细胞定位差异分析. 生物工程学报, 2016, 32(11): 1600–1609.

Yu M, Cao SS, Zheng WN, et al. Comparison of cellular localization of NS1 from different subtypes of influenza A virus. Chin J Biotech, 2016, 32(11): 1600–1609.

**摘要:** NS1 蛋白是流感病毒编码的一种小分子多功能蛋白, 可在病毒的复制过程中抑制宿主细胞的抗病毒免疫应答。为研究不同亚型流感病毒的 NS1 蛋白在细胞内的定位差异, 分别用 H1N1 亚型 WSN、PR8 和 CA04 毒株, H9N2 亚型 SD 毒株及 H7N9 亚型 AH01 毒株感染 A549、MDCK 细胞系以及构建的可表达不同亚型流感病毒 NS1 蛋白的 pCMV-Myc-NS1 质粒转染 293T 细胞, 用激光共聚焦显微镜观察发现不同亚型流感病毒在不同细胞系和时间点的定位差异, 感染后 24 h 时 WSN 和 PR8 毒株的 NS1 主要定位于细胞质中, 而 CA04 和 SD 毒株主要定位于细胞核内。另外, 观察过表达的 WSN、SD 和 AH01 毒株 NS1 的细胞定位, 转染后 24 h 时 WSN 毒株 NS1 定位于细胞质中, 而 SD 和 AH01 毒株主要定位于细胞核中。经氨基酸序列比对, 对 WSN 毒株 NS1 蛋白进行关键氨基酸点突变, 结果显示单一位点的改变未导致 NS1 蛋白细胞定位的改变, 其细胞定位的差异不是由单一位点决定的。综上所述, 分析不同亚型中的 NS1 的定位差异, 这对进一步了解 NS1 蛋白同宿主细胞不同区域的蛋白的相互作用、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。

**关键词:** 流感病毒, NS1 蛋白, 细胞定位, 氨基酸位点突变

**Received:** January 27, 2016; **Accepted:** March 11, 2016

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31100644, 81271849, 81321063).

**Corresponding authors:** Jing Li. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: lj418@163.com

Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; Fax: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.com

国家自然科学基金 (Nos. 31100644, 81271849, 81321063) 资助。

# Comparison of cellular localization of NS1 from different subtypes of influenza A virus

Meng Yu<sup>1,2</sup>, Shuaishuai Cao<sup>1,3</sup>, Weinan Zheng<sup>1</sup>, Xiaoxiao Jia<sup>1</sup>, Jing Li<sup>1</sup>,  
and Wenjun Liu<sup>1,2,3</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 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

**Abstract:** The non-structural (NS1) protein is a multifunctional molecular protein encoded by influenza A virus genome. NS1 plays an important role in inhibition of host immune responses. In order to assess the cellular localization of NS1 in different influenza A virus subtypes, we performed the immunofluorescence assay to observe the cellular location of NS1 after infection with influenza A virus WSN (H1N1), PR8 (H1N1), CA04 (H1N1), SD (H9N2) and AH01 (H7N9) in A549 cells and MDCK cells respectively. According to the results, NS1-WSN and NS1-PR8 accumulated mainly in cytoplasm at 24 h post infection, while the NS1-CA04 and NS1-SD appeared major in the nucleus. We also observed localization of NS1 by transfected 293T cells with plasmids which encoding the full-length NS1 from WSN, SD and AH01. The key sites which might determine the different cellular localization of NS1 were chosen by sequence alignment, and seven residues which were different between WSN, PR8 and CA04, SD and AH01 were finally focused. However, we found that single mutation of these residues could not alter the localization of NS1. The data indicated that the difference of location might not be caused by substitution of a single site, which contributes to our understanding of the diverse regulation of host factors during different subtypes of influenza virus infection.

**Keywords:** influenza A virus, NS1 protein, cellular location, amino acid mutation

流感病毒属于正黏病毒科，其中 A 型流感病毒基因组由 8 节段的负链单股 RNA 组成，编码 17 种蛋白。该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、细胞形态变化以及信号转导通路抑制或激活等<sup>[1]</sup>，最近流行的 H7N9 和 H5N6 亚型流感，均由 A 型流感病毒引起，给人类带来了严重危害<sup>[2-3]</sup>。在流感病毒感染周期中，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。而流感病毒能够产生多种机制来应对这种抗病毒免疫反应，NS1 蛋白是流感病毒编码的一个重要毒力蛋白，以抵抗宿主细胞的免疫

反应<sup>[4-6]</sup>。

NS1 由病毒基因组第 8 段 RNA 编码，由 2 个独立的功能域所组成<sup>[7-8]</sup>，即 N 端的 RNA 结合结构域（第 1-73 位氨基酸），可与多种类型的 RNA 以低亲和力的方式结合；C 端的“效应”区域（第 87-230 位氨基酸），主要与宿主细胞蛋白质相互作用，同时稳定与 RNA 结构域的作用，抑制宿主细胞的免疫反应。

NS1 蛋白是一种多功能蛋白，一方面可抑制宿主天然免疫系统对病毒复制的抑制，另一方面又可调节病毒 RNA 的合成及提高病毒 mRNA 的翻译水平<sup>[9-11]</sup>。NS1 蛋白在细胞中的不同定位可与不同的宿主蛋白发生相互作用，从

而发挥不同的功能, NS1 蛋白包含有 2 个入核定位信号 NLS 和 1 个出核信号 NES。有报道称 NS1 在病毒复制的早期定位到细胞核中, 在复制的后期出核, 主要定位在细胞质中<sup>[12]</sup>。NS1 在细胞核内主要与 CPSF30、PAPB II 相互作用, 抑制宿主自身的 mRNA 后加工修饰<sup>[13]</sup>, 而在细胞质中, NS1 可与 RIG-I、TRIM25 结合<sup>[14-16]</sup>, 抑制干扰素的产生。

为了探究 H1N1 亚型流感病毒的复制和传播机制以及其毒力和致病机理, 发现引起不同流感病毒毒力差异的因素, 我们分析了不同亚型流感病毒 NS1 蛋白的细胞定位情况, 旨在研究细胞定位情况是否与不同流感毒株的毒力存在相关性, 并且这种细胞定位情况是否与某个关键氨基酸位点的作用相关。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及病毒株

流感病毒 A/WSN/33 (H1N1) (以下简称为 WSN)、A/H1N1/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (以下简称为 PR8)、A/California/04/2009 (H1N1) (以下简称为 CA04)、A/Shandong/lx1023/2007 (H9N2) (以下简称为 SD)、A/Anhui/1/2013 (H7N9) (以下简称为 AH01), 由本实验室繁殖、传代并保存。293T 细胞系、A549 细胞系及 MDCK 细胞系, 由本实验室传代并保存。

### 1.2 载体及菌株

大肠杆菌 TOP10 由本实验室保存; 载体 pCMV-Myc 不同亚型的 pCMV-Myc-NS1 质粒, 表达流感病毒的反向遗传系统的 4 个表达质粒 Ben9、Ben10、Ben11、Ben13, 均由本实验室构建及保存。

### 1.3 主要试剂

用于构建克隆的各种工具酶均购自 TaKaRa 公司; 点突变试剂盒由北京诺派生物科技有限公司惠赠; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; TRITC 标记羊抗兔 IgG 购自康为世纪公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; TritonX-100 购自 Amreso 公司; 转染试剂 Lipo-2000、普通胰酶、蛋白酶抑制剂和 TPCK 处理的胰酶购自罗氏公司; Myc 鼠单、抗 AMV 反转录酶、RNase 抑制剂、荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; 兔抗 NS1 多克隆抗体由本实验室制备保存; 多聚甲醛、BSA 和 DAPI 购自 Sigma-Aldrich 公司。所有引物由深圳华大基因科技有限公司合成。

### 1.4 NS1 表达载体及点突变克隆的构建

取流感病毒 A/WSN/33 的十二质粒系统中的第 8 片段为模板, 用 P1/P2 一对引物 (表 1), 进行 PCR 扩增获得 NS1 基因, PCR 产物经 *Bam*H I、*Kpn* I 双酶切, 与酶切后的 pCMV-Myc 载体连接。将连接产物转化 TOP10 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 经深圳华大基因科技有限公司测序确认获得重组质粒。

同时, 设计特异性的点突变引物 (表 1), 以此引物进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物 SDM 37 °C 酶切 2 h 后转化 SDM 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 经深圳华大基因科技有限公司测序确认获得重组质粒。

### 1.5 细胞培养、转染与病毒感染

293T、A549、MDCK 细胞在含有 10% 胎牛血清和加入 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>。将生长密度为 80% 的细胞传代至细胞

表 1 克隆 NS1 基因以及 NS1 突变体的引物

Table 1 Primers for cloning of NS1 and detection of NS1 mutation by PCR

Primers	Primer sequence (5'-3')
P1	CCGGAATTCGGATGGATCCAAACACTGTG
P2	CGGGGTACCTCAAACCTTCTGACCTAATTG
V22F-F	CATGTCCGCAAAAAGATTGTCAGACCAAGAAGTAGGTGATGCC
V22F-R	TAGTTCTTGGTCTGCAAATCTTTTTCGGACATGCCAAAGAAAG
M81I-F	GCACTCAAATGACCATCGCCTCTGTACCTGCATCGCGCTAC
M81I-R	TGCAGGTACAGAGGCGATGGTCATTTTGAGTGCCTCATCAGA
A86S-F	ATGGCCTCTGTACCTTCATCGCGCTACCTAACTGACATGACT
A86S-R	AGTTAGGTAGCGCGATGAAGGTACAGAGGCCATGGTCATTTT
A86E-F	ATGGCCTCTGTACCTGAATCGCGCTACCTAACTGACATGACT
A86E-R	AGTTAGGTAGCGCGATTTCAGGTACAGAGGCCATGGTCATTTT
T197N-F	GTTCGAGTCTCTGAAAATCTACAGAGATTTCGCTTGGAGAAGC
T197N-R	AGCGAATCTCTGTAGATTTTCAGAGACTCGAAGTGTGTTATT
D139N-F	GTGATTTTAAACCGGCTGGAGACTCTAATATTACTAAGGGCC
D139N-R	GTGATTTTAAACCGGCTGGAGACTCTAATATTACTAAGGGCC
S205N-F	AGATTCGCTTGGAGAAACAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCA
S205N-R	CCCATTCTCATTACTGTTTCTCCAAGCGAATCTCTGTAGAGT
S205E-F	AGATTCGCTTGGAGAGAGAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCA
S205E-R	CCCATTCTCATTACTCTCTCTCCAAGCGAATCTCTGTAGAGT
N207D-F	GCTTGGAGAAGCAGTGATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACT
N207D-R	AGGTCTCCCATTCTCATCACTGCTTCTCCAAGCGAATCTCTG

培养皿中,待其生长密度为 60%–80%时,进行转染。转染前 1–2 h,为细胞更换新鲜的 OPTI-MEM 培养基。采用 Lipo-2000 为转染试剂,根据实验需要,转染不同剂量的质粒于 293T 细胞中。转染后 4–6 h 后更换新鲜 DMEM 培养基,转染并收取细胞。病毒感染实验在细胞传代 24 h 后,将病毒 (MOI=0.01) 加入病毒感染液中 (DMEM、10 000 U/mL 青霉素和链霉素、1 μg/mL TPCK 处理的胰酶),感染后 1 h 为细胞换液为病毒感染液,在合适的时间点收取并固定细胞。

### 1.6 Western blotting 鉴定 NS1 兔多抗的有效性

293T 细胞传代至 6 cm 培养皿,分别用以上

5 种毒株 NS 片段为模板构建的 pCMV-Myc-NS1 转染细胞,8 μg/皿,转染后 24 h 用细胞裂解液 (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes), 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂) 收取细胞,4 °C 裂解 30 min, 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 吸取上清中加入 10×上样缓冲液,95 °C 处理样品 10 min, SDS-PAGE 电泳,后将蛋白转移至 PVDF 膜。用 TBST 配制含 1% BSA, 5% 脱脂牛奶的封闭液,室温封闭 2 h,分别用一抗 NS1 兔多抗 (1 5 000) 和 Myc 鼠单抗 (1 2 000) 对蛋白进行检测。内参 β-actin 鼠单抗 (1 2 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 15 min/次。二抗羊抗兔, 羊抗鼠, 稀释比例均为 1 5 000, 室温

孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 15 min/次。使用底物显色试剂盒进行曝光显影。

### 1.7 免疫荧光检测 NS1 的细胞定位

传代 293T 细胞至铺有玻片的 24 孔板中, 用 MOI=0.01 的病毒感染细胞, 或将 0.8  $\mu$ g/孔 pCMV-Myc-NS1 转染细胞, 在感染或转染后不同时间点收取细胞。使用 4% 的多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 然后利用含有 4% BSA 的 PBST (PBS 中加入 0.5% TritonX-100) 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 h。加入 1:200 的兔抗 NS1 多抗 (实验室自制) 作为一抗, 37  $^{\circ}$ C 结合 1 h, PBST 清洗细胞 5 次, 每次 10 min。然后加入 1:200 的荧光二抗 TRITC 标记抗兔 IgG 抗体, 37  $^{\circ}$ C 结合 1 h; PBST 清洗 5 次, 每次 10 min。加入 DAPI 室温染色 10 min, PBST 清洗 3 次。然后用封片液 (50% 甘油, 50% PBS) 封片, 以指甲油固定玻片。激光共聚焦显微镜观察 NS1 在细胞中的定位情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 WSN-NS1 兔多抗对于不同亚型 NS1 蛋白均有检测效果

不同毒株构建的 pCMV-Myc-NS1 克隆在 293T 细胞中进行表达, 分别用 NS1 兔多抗和 Myc 鼠单抗对蛋白进行检测 (图 1), Myc 鼠单抗检测组 (图 1A) 在 25 kDa 左右处均有明显条带, 与预期 NS1 大小相符, 其中 CA04-NS1 相较于其他毒株分子量略小, 与实验结果吻合, 未转染对照相应位置无条带; NS1 兔多抗检测组 (图 1B) 在 25 kDa 左右处也有明显条带, 与 Myc 检测组一致, 但在 WSN-NS1 及 PR8-NS1 中各出现一条非特异性条带, 推测与毒株差异相关。结果显示本实验中所用 NS1 兔多抗对于不同亚型毒株 NS1 蛋白均有检测能力。

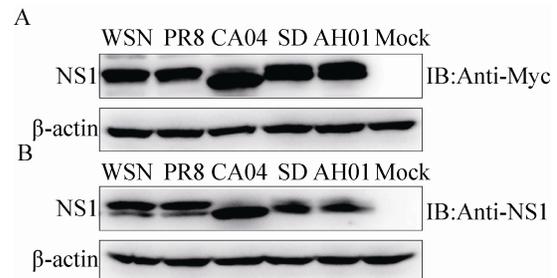


图 1 NS1 兔多抗对于不同毒株 NS1 蛋白的有效性检测

Fig. 1 Identification of anti-NS1 polyclonal antibody on different strains of influenza A virus. 293T cells were transfected by pCMV-Myc-NS1 which came from different strains template. Further the NS1 protein was detected by Western blotting using anti-Myc monoclonal antibody (A) and anti-NS1 polyclonal antibody (B) respectively.

### 2.2 不同亚型病毒感染 A549 细胞系 NS1 蛋白定位不同

将 WSN、PR8、CA04、SD 四株流感病毒 MOI=0.01 感染 A549 细胞, 在感染后的 6、12 和 24 h 分别固定样品, 制片后激光共聚焦显微镜观察。结果如图 2 所示, WSN、PR8 毒株在感染后的 6 h、12 h, NS1 蛋白主要定位于细胞核中, 而在感染后的 24 h 蛋白出核, 主要定位于细胞质中; 而 CA04 和 SD 毒株在感染后的 3 个时间点其 NS1 蛋白均主要定位于细胞核中, 与前两株毒株存在明显的差异。

### 2.3 不同亚型病毒感染 MDCK 细胞系 NS1 蛋白定位差异

为了进一步观察这种定位差异是否也存在于其他细胞系中, 我们用 WSN、PR8、CA04 三株流感病毒以相同 MOI (MOI=0.01) 分别感染 MDCK 细胞, 在感染后的 6、12 和 24 h 后收样并制片, 后用激光共聚焦显微镜观察。如图 3 所示, WSN、PR8 感染 MDCK 后的 6 h、12 h,

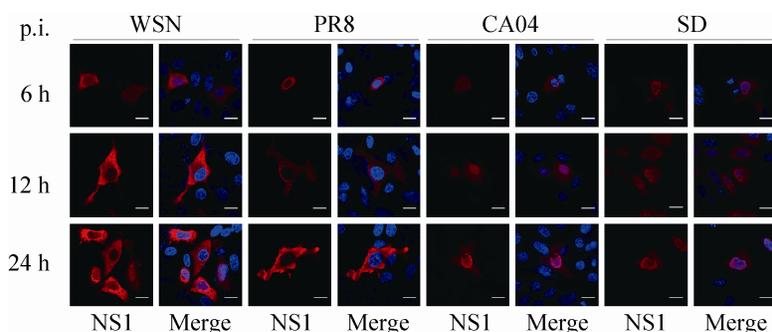


图 2 感染不同亚型流感病毒的 A549 细胞中不同时间点的 NS1 蛋白定位情况

Fig. 2 Location of NS1 of the different subtype influenza A virus in A549 by different time point. A549 cells were infected by influenza virus WSN, PR8, CA04, and SD respectively. At 6, 12, and 24 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and followed by detection with immunofluorescence assay. Bars=10  $\mu$ m.

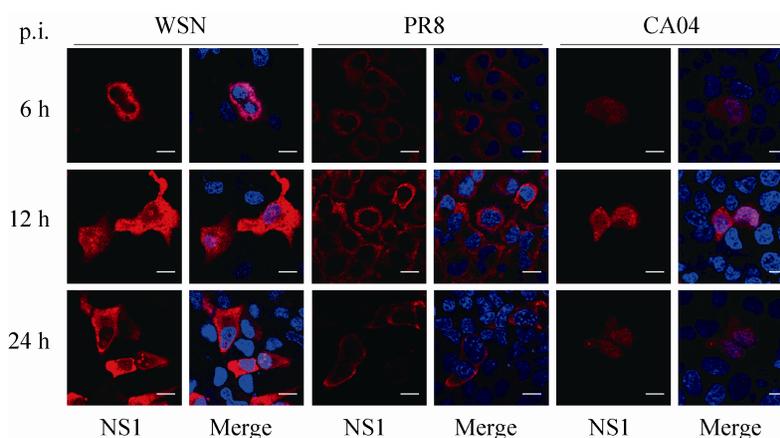


图 3 感染不同亚型流感病毒的 MDCK 细胞中不同时间点的 NS1 蛋白定位情况

Fig. 3 Location of NS1 of the different subtype influenza A virus in MDCK by different time point. MDCK cells were infected by influenza virus WSN, PR8, and CA04 respectively. At 6, 12, and 24 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and followed by detection with immunofluorescence assay. Bars=10  $\mu$ m.

NS1 蛋白也主要定位于细胞核中；同样的感染后 24 h NS1 蛋白出核，主要定位于细胞质中；而 CA04 在感染后 3 个时间点 NS1 蛋白都主要定位于细胞核内。

结果显示，病毒感染后不同时间点 NS1 蛋白定位存在差异，这种差异有可能导致了 NS1 蛋白在不同病毒感染中发挥了不同的功能，这也可能在一定程度上解释了不同亚型的流感病

毒的毒力、宿主的适应能力和致病性的不同。

#### 2.4 pCMV-Myc-NS1 转染 293T 细胞 NS1 蛋白差异性定位

将质粒 pCMV-Myc-NS1 (WSN、CA04、PR8、SD、AH01) 0.8  $\mu$ g/孔，分别转染 293T 细胞中，转染后 6、12 和 24 h 后分别取出玻片固定后制片，后观察检测 NS1 蛋白的细胞定位。如图 4 所示，在转染情况下不同毒株 NS1 定位

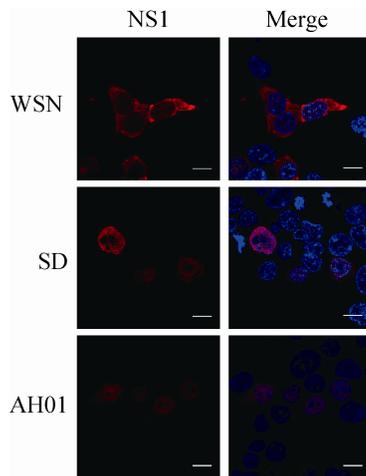


图4 不同亚型流感毒株转染293T细胞后NS1蛋白定位情况

Fig. 4 Location of NS1 of the different subtype influenza A virus in 293T by transfection. 293T cells were transfected by pCMV-Myc-WSN-NS1, pCMV-Myc-SD-NS1, and pCMV-Myc-AH01-NS1 respectively. At 36 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and followed by detection with immunofluorescence assay. Bars=10  $\mu$ m.

上的差异仍然存在，转染后24 h WSN、PR8主要位于细胞质而CA04、SD主要定位于核内，与病毒感染的结果一致。

同时我们也构建了H7N9亚型毒株AH01-NS1的质粒，结果显示AH01的NS1在转染的后期也主要定位在细胞核中。NS1蛋白定位在细胞核内，主要抑制了宿主自身蛋白

mRNA的转录后加工修饰和出核，引起宿主的多种蛋白表达下调，包括多种参与免疫应答的抗病毒免疫蛋白，这也可能与H7N9流感的致死性有较强关联。

## 2.5 不同亚型毒株的NS1蛋白序列比对分析

为了了解这种蛋白定位的差异是否与不同亚型毒株自身的NS1蛋白特性相关，我们比对并分析了上述5种毒株的NS1蛋白序列。图5结果显示，NS1蛋白的氨基酸序列在不同亚型毒株之间的保守性较差。根据图5的比对结果，我们选取了关键差异性位点，在WSN-NS1的序列上分别是：V22、M81、A86、D139、T197、S205和N207，根据这些位点设计引物构建点突变克隆（表1）。具体突变如下：V22F、M81I、A86S、A86E、D139N、T197N、S205E、S205N和N207D。

## 2.6 关键氨基酸位点突变后NS1蛋白的细胞定位差异

以pCMV-Myc-WSN-NS1为模板，获得各点突变体的质粒，分别转染293T细胞，在感染后24 h收集细胞固定并制片。在激光共聚焦显微镜下观察NS1蛋白的细胞定位，结果如图6所示。各突变体的NS1蛋白与野生型相比，并未发生明显定位差异，转染后24 h均主要定位

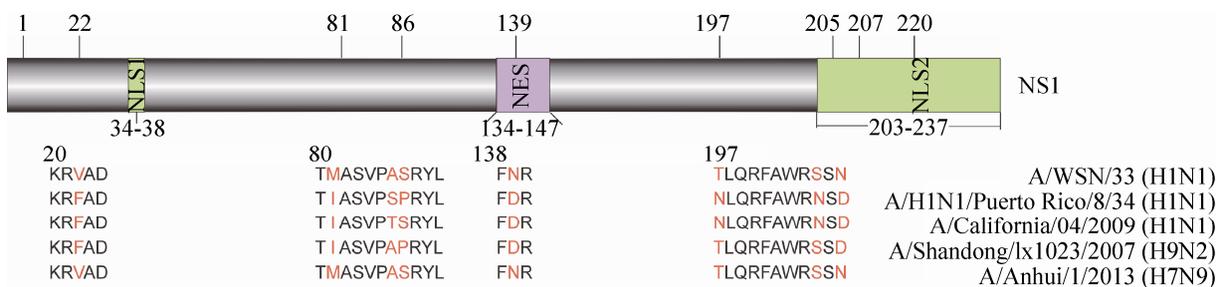


图5 不同亚型毒株的NS1蛋白序列比对分析

Fig. 5 Analysis of sequence alignment of different subtype strains of NS1 protein.

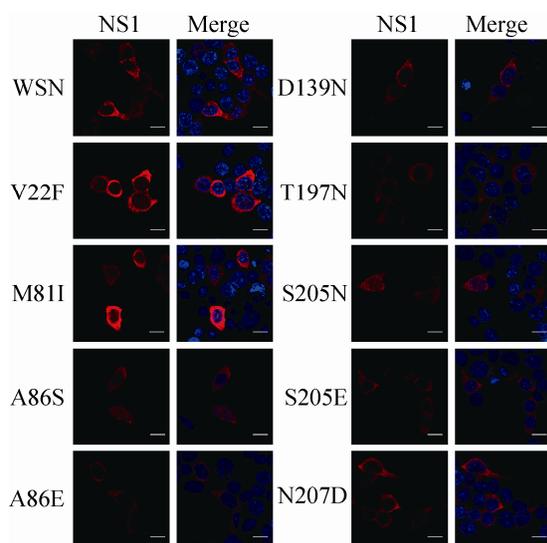


图 6 关键氨基酸位点突变后 NS1 蛋白的细胞定位情况

Fig. 6 Location of NS1 protein of key amino acid mutation. Bars=10  $\mu$ m.

于细胞质中,结果表明,在所选取的位点中单个氨基酸位点的改变并不能导致 NS1 定位的明显差异。NS1 是一种重要的毒力因子,受到宿主免疫系统进化的巨大压力,只有在多个位点的协调作用下才有可能发生某些功能的改变,具体哪些位点可以协同发挥用来改变其蛋白定位,将是我们下一步工作的重点。

### 3 讨论

近年来,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,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。2013 年首次爆发的 H7N9 亚型流感病毒为跨种间的传播,且其重要的独立因子 NS1 蛋白的细胞定位与 WSN 存在明显的差异,NS1 蛋白可能在其跨种间传播和致病机制上发挥了重

要作用<sup>[17-18]</sup>。

NS1 蛋白的细胞内定位方式及 NS1 的分布很可与多种因素相关,如病毒株、细胞类型等。在病毒感染的细胞内 NS1 优先定位于细胞核,但在感染后期也会部分存在于细胞质中<sup>[19]</sup>。

NS1 的主要功能为参与病毒与宿主相互作用,包括蛋白与蛋白之间、蛋白与 RNA 之间的相互作用<sup>[20-21]</sup>。宿主为了抑制流感病毒的复制,被病毒感染的细胞通常会激活多种抗病毒反应。在进化的压力下,流感病毒演变出多种机制来应对宿主细胞的抗病毒反应。NS1 蛋白被认为是流感病毒抵制宿主细胞免疫反应的重要蛋白,且其主要功能是抑制宿主细胞干扰素的产生。

不同毒株的 NS1 蛋白序列长度不同,约在 230-237 氨基酸之间,相对分子量约为 26 kDa。序列比对分析发现,在 20 世纪 40 年代,流行的人 H1N1 病毒 NS1 蛋白序列通过单核苷酸的突变,在 C 末端出现了 7 个氨基酸的延伸。这些延伸在随后的人 H1N1、H2N2 和 H3N2 病毒都存在;直到 20 世纪 80 年代,当 H1N1 和 H3N2 病毒通过回复突变,失去了多出来的 7 个氨基酸,并发生了共同流行。

在细胞核内 NS1 蛋白可以与 CPSF30、PABP II 相互作用来抑制宿主细胞 mRNA 的成熟和出核,在细胞质中可以同更多的蛋白发生相互作用。近期的研究发现,NS1 的 C 末端的最后几个氨基酸同 NS1 与宿主蛋白如 PABP I 的相互作用以及 NS1 蛋白的核仁定位相关<sup>[22]</sup>。Burgui 等<sup>[23]</sup>研究表明 NS1 同 eIF4G I、PABP I 的结合将翻译所需的细胞因子募集到病毒 mRNA 附近,有效地提高了病毒蛋白的翻译效率,随后 Haller 及 Kochs 等<sup>[24-26]</sup>报道称 NS1 同

RIG-I、TRIM25 等的相互作用,有效地抑制了 IFN 信号通路的激活,抑制了宿主免疫系统对病毒复制的免疫应答。这些结果表明,NS1 蛋白是流感病毒抵制宿主细胞免疫反应的重要蛋白,抑制宿主细胞干扰素的产生。因此,NS1 表现出多种抑制活性,对于病毒的复制和感染过程中毒力的提高起到了重要的促进作用。

研究表明,流感病毒在感染 A549、MDCK 细胞系时其 NS1 定位存在明显的差异,这种差异不仅存在于不同的亚型病毒间;而且普遍存在于同一种亚型的不同毒株间。我们对 NS1 序列进行分析,发现在转染的情况下,NS1 的定位现象与感染一致。根据电荷差异和空间位阻的不同,本研究选取了其中的部分差异位点进行关键氨基酸位点的突变,其中几个位点是潜在的磷酸化位点,如 S205,除突变为 N 外我们也将它突变为 E 模拟持续的磷酸化状态<sup>[27]</sup>,但单独的点突变都没有导致 WSN-NS1 蛋白在细胞内的定位发生明显改变。分析结果认为,不同毒株间的 NS1 蛋白定位差异并不是由单一氨基酸位点所导致的。这些突变体的细胞定位与野生型病毒相比未发生改变,也许在其他方面能影响 NS1 蛋白的功能,如是否对干扰素活性存在抑制作用?是否由多位点协同影响其定位差异?某些宿主蛋白与 NS1 的相互作用是否影响了 NS1 的细胞定位及抗天然免疫功能?这些问题需要下一步探究。

综上所述,流感病毒的重要毒力因子 NS1 蛋白参与病毒与宿主相互作用,研究分析在不同亚型中的定位存在差异,这对进一步了解 NS1 蛋白同宿主细胞不同区域的蛋白的相互作用、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] Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 2008, 26(Suppl 4): D49–D53.
- [2] Qi XP, Jiang D, Wang HL, et al. Calculating the burden of disease of avian-origin H7N9 infections in China. *BMJ Open*, 2014, 4(1): e004189.
- [3] Chowell G, Simonsen L, Towers S, et al. Transmission potential of influenza A/H7N9, February to May 2013, China. *BMC Med*, 2013, 11: 214.
- [4] Krug RM, Yuan W, Noah DL, et al. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, 2003, 309(2): 181–189.
- [5] Hale BG, Randall RE, Ortín J, et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 10): 2359–2376.
- [6] Kochs G, García-Sastre A, Martínez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, 2007, 81(13): 7011–7021.
- [7] Salahuddin P, Khan AU. Structural and functional analysis of NS1 and NS2 proteins of H1N1 subtype. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*, 2010, 8(3): 190–199.
- [8] Cheng A, Wong SM, Yuan YA. Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res*, 2009, 19(2): 187–195.
- [9] Aragón T, de la Luna S, Novoa I, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(17): 6259–6268.
- [10] de la Luna S, Fortes P, Beloso A, et al. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol*, 1995, 69(4): 2427–2433.
- [11] Enami K, Sato TA, Nakada S, et al. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, 1994, 68(3): 1432–1437.
- [12] Qian XY, Alonso-Caplen F, Krug RM. Two

- functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *J Virol*, 1994, 68(4): 2433–2441.
- [13] Nemeroff ME, Barabino SML, Li YZ, et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell*, 1998, 1(7): 991–1000.
- [14] Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, et al. IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol*, 2007, 9(4): 930–938.
- [15] 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.
- [16] Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo YM, et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, 2007, 81(2): 514–524.
- [17] Jia DL, Rahbar R, Chan RWY, et al. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PLoS ONE*, 2010, 5(11): e13927.
- [18] Hale BG, Albrecht RA, García-Sastre A. Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol*, 2010, 5(1): 23–41.
- [19] Newby CM, Sabin L, Pekosz A. The RNA binding domain of influenza A virus NS1 protein affects secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interferon in primary murine tracheal epithelial cells. *J Virol*, 2007, 81(17): 9469–9480.
- [20] Peiris JSM, Hui KPY, Yen HL. Host response to influenza virus: protection versus immunopathology. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(4): 475–481.
- [21] Murayama R, Harada Y, Shibata T, et al. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(4): 880–885.
- [22] Melén K, Kinnunen L, Fagerlund R, et al. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol*, 2007, 81(11): 5995–6006.
- [23] Burgui I, Aragón T, Ortín J, et al. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol*, 2003, 84(12): 3263–3274.
- [24] Li WX, Li HW, Lu R, et al. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(5): 1350–1355.
- [25] Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, 2006, 344(1): 119–130.
- [26] Kochs G, Martínez-Sobrido L, Lienenklaus S, et al. Strong interferon-inducing capacity of a highly virulent variant of influenza A virus strain PR8 with deletions in the NS1 gene. *J Gen Virol*, 2009, 90(12): 2990–2994.
- [27] Wang SS, Zhao ZD, Bi YH, et al. Tyrosine 132 phosphorylation of influenza A virus M1 protein is crucial for virus replication by controlling the nuclear import of M1. *J Virol*, 2013, 87(11): 6182–6191.

(本文责编 陈宏宇)