

## 研究报告



## EV71 诱导人神经细胞 SH-SY5Y 自噬的分子机制

卢莉莉<sup>\*1,2,3</sup> 邹晓琳<sup>1</sup> 晏丹<sup>1,2</sup> 袁琼<sup>1,2,3</sup> 邓海英<sup>1</sup> 于志君<sup>1</sup>

1 武汉科技大学医学院 湖北 武汉 430065

2 武汉科技大学新药创制研究所 湖北 武汉 430065

3 武汉科技大学职业危害识别与控制湖北省重点实验室 湖北 武汉 430065

**摘要:**【背景】EV71 感染所致的重症手足口病易导致神经系统并发症,使患儿预后较差,甚至死亡。

【目的】从 EV71 可诱导神经细胞自噬这一现象出发,探索该病毒诱导神经细胞自噬的 miRNA 机制,探讨 EV71 损伤神经细胞可能的分子机制。【方法】通过 RT-PCR 及 Western blot 技术,在感染 EV71 病毒的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中检测细胞自噬变化;通过芯片分析细胞感染前后差异表达的 miRNA 分子,再使用 miRNA mimics 调节工具明确与 EV71 诱导神经细胞自噬有关的 miRNA 分子。

【结果】EV71 可诱导 SH-SY5Y 细胞自噬增加,下调细胞内 miRNA29b (miR29b) 分子的表达水平;当上调细胞内 miR29b 的表达后, EV71 诱导细胞自噬增加的现象可被逆转,病毒复制水平下降。【结论】EV71 诱导神经细胞自噬是通过下调 miR29b 分子的表达水平实现;miR29b 不仅与自噬相关,它与 EV71 病毒复制也存在密切关系。因此,该研究不仅有助于阐明 EV71 导致神经系统损伤的具体分子机制,还为 miR29b 成为治疗 EV71 感染可能的新药物靶点奠定了理论基础。

**关键词:** 肠道病毒 71 型, miRNA29b, 自噬

## Mechanism of autophagy induced by EV71 in human neuroblastoma cell SH-SY5Y

LU Li-Li<sup>\*1,2,3</sup> ZOU Xiao-Lin<sup>1</sup> YAN Dan<sup>1,2</sup> YUAN Qiong<sup>1,2,3</sup> DENG Hai-Ying<sup>1</sup>  
YU Zhi-Jun<sup>1</sup>

1 College of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430065, China

2 New Medicine Innovation and Development Institute, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430065, China

3 Hubei Province Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430065, China

**Abstract:** [Background] Enterovirus 71 (EV71) is likely to cause severe hand, foot, and mouth disease (HFMD) that is sometimes associated with severe central nervous system complications, resulting in poor

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81700446); Foundation of Health and Family Planning Commission of Hubei Province (WJ2017M175); Foundation for Key Teachers of Wuhan University of Science and Technology (2018zx10)

\*Corresponding author: E-mail: lulili@wust.edu.cn

Received: 09-09-2018; Accepted: 27-12-2018; Published online: 08-01-2019

基金项目: 国家自然科学基金(81700446); 湖北省卫生和计划生育委员会面上项目(WJ2017M175); 武汉科技大学青年骨干教师基金(2018zx10)

\*通信作者: E-mail: lulili@wust.edu.cn

收稿日期: 2018-09-09; 接受日期: 2018-12-27; 网络首发日期: 2019-01-08

prognosis and even death of children. **[Objective]** To reveal the possible miRNA mechanism of EV71 increasing autophagy in human neuroblastoma cells, which might be related to EV71 induced neurological damage. **[Methods]** Western blot and qRT-PCR were used to demonstrate autophagy in EV71 infected SH-SY5Y cells. The differentially expressed miRNAs in SH-SY5Y cells with/without EV71 infection were detected by qPCR-Array. The functions of those miRNAs were analyzed by bioinformatics method. Then miRNA mimics was used to identify miRNAs associated with EV71-induced neuronal autophagy. **[Results]** EV71 could increase autophagy in SH-SY5Y cells and decrease the expression of miRNA29b in cells. Moreover, transfection of miRNA29b mimics in cells could not only reverse the down-regulated expression of miRNA29b induced by EV71, but also decrease the cellular autophagy induced by EV71 and the level of viral replication. **[Conclusion]** The results indicated that EV71 could induce autophagy in SH-SY5Y cells by down-regulating the expression of miRNA29b. Moreover, miRNA29b might be related to virus replication. Therefore, this study not only helps elucidate the specific molecular mechanism of neurological damage caused by EV71, but also lays a theoretical foundation for miRNA29b to become a new potential drug target for the treatment of EV71 infection.

**Keywords:** EV71, miRNA29b, Autophagy

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)属于小 RNA 病毒科 A 型肠道病毒属,可引起 5 岁以下儿童手足口病(Hand, foot, and mouth disease, HFMD),它是继柯萨奇病毒 A16 (Coxsackie virus A16, CVA16)之后引起手足口病的第二常见病原<sup>[1-2]</sup>。尽管 EV71 引起的手足口病发病率略低于 CVA16,但由于 EV71 病毒具有神经嗜性,因此感染 EV71 的患儿往往更容易出现神经系统并发症,严重时患儿甚至可能出现死亡,预后要显著差于 CVA16 感染的手足口病患儿<sup>[3]</sup>,因此,研究 EV71 感染所致神经系统损伤的机制很有必要。

关于 EV71 感染致神经系统损伤的具体机制,不少研究表明炎症反应<sup>[4-5]</sup>及凋亡<sup>[6-7]</sup>与 EV71 损伤神经系统有关,最近有研究发现自噬或许也参与到该过程中<sup>[8-9]</sup>。自噬(Autophagy)是细胞死亡的机制之一。在营养匮乏的应激状态下,细胞出现选择性去除错误折叠蛋白质和处理受损细胞器的自我降解过程。在此过程中,部分细胞质和蛋白质被自噬体吞噬,然后自噬体与溶酶体融合,内容物降解,降解所得产物可作为蛋白质合成和能量生产的底物。因此,自噬也是细胞的一种生存策略。自噬的发生始于细胞内粗面内质网上的双层膜脱落,包裹需降解的成分形成自噬体(Autophagosome),在这个阶段磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)与 Beclin-1 蛋白发挥了重要的作用;随后,自噬相关基因(Autophagy-related

genes, Atgs)招募 LC-3 蛋白,并将其剪切形成 LC3-II;自噬体与溶酶体融合后,其中所包裹的内容物被降解,以满足细胞代谢需要并实现某些细胞器的更新<sup>[10]</sup>。自噬对于机体的正常生理活动有着重要的意义,它参与了细胞新陈代谢、机体发育等过程。与此同时,越来越多的研究表明自噬也可参与到机体的病理过程中,与肿瘤的发生、微生物感染、神经系统退行性病变<sup>[11-12]</sup>等都有着极为密切的关系。

在前期研究中,我们运用芯片筛选 EV71 感染神经细胞前后差异表达的 miRNA,结果发现 miR29b 在 EV71 感染的神经细胞中出现异常的低表达;接着通过生物信息学方法预测出 miR29b 可能的生物学功能及其潜在的靶基因 *PLD1*;再结合文献分析推测, EV71 可能通过抑制 miR29b 表达,进而干扰其靶基因 *PLD1* 的表达,诱导神经细胞自噬出现异常增加,使神经细胞受损并最终导致神经系统功能紊乱,从而使重症 HFMD 的患儿出现严重的神经系统并发症。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用细胞系为人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y),购自中国医学科学院细胞库, EV71 病毒由武汉大学生命科学院吴建国教授惠赠。

LC3B 抗体购自 Cell Signaling Technology 公

司; PLD1 抗体购自 BOSTER 公司;  $\beta$ -Actin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 逆转录试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; Bulge-Loop<sup>TM</sup> miRNA qRT-PCR Primer 和 miRNA29b mimics 均购自广州锐博公司; siTran<sup>TM</sup> siRNA Transfection 试剂购自 Origene 公司。荧光定量 PCR 仪和凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司。

### 1.2 病毒增殖及滴度测定

EV71 病毒的增殖是将病毒接种在 SH-SY5Y 细胞中, 待观察到约 80% 细胞出现细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE) 时, 收集细胞并保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中。使用前反复冻融 2 次, 短暂离心 (12 000 r/min, 15 s) 后收集上清液即为病毒原液, 分装保存至  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

病毒滴定采用的是物理方法测定病毒颗粒 (Viral particle, VP) 数量。具体方法是测定病毒悬液在 260 nm 处的吸光度值 ( $OD_{260}$ ), 然后利用公式  $VP$  (个/mL) =  $OD_{260} \times 1.2 \times 10^{10} \times$  稀释度来计算 VP 数量<sup>[13]</sup>。本研究中制备的病毒原液经上述方法测定后, 其病毒滴度为  $6 \times 10^6$  个/mL。

### 1.3 荧光定量 PCR 实验

将 SH-SY5Y 细胞接种至 12 孔板中, 待细胞生长至 70%–80% 后分两组, 其中空白对照组加入 2% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 病毒处理组接种 EV71, 接种量为 2 MOI (Multiplicity of infection)。病毒处理 48 h 后, 使用 Trizol 法 (Invitrogen<sup>TM</sup> TRIzol) 提取细胞总 RNA 并测定浓度, 使用逆转录试剂盒 (First Strand cDNA Synthesis) 来分别逆转相对应 miRNA 形成 cDNA, 再利用荧光定量 PCR (Quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术检测相关 miRNA 及 mRNA 的表达量。qRT-PCR 反应体系参照试剂盒说明书 (SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Tli RNaseH Plus), TaKaRa), 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  20 s,  $72^{\circ}\text{C}$  20 s, 40 个循环。

### 1.4 Western blot 实验

将 SH-SY5Y 细胞接种至 6 孔板中, 待细胞生

长至 70%–80%, 将细胞分为两组, 分别是空白对照组和病毒处理组。其中空白对照组加入 2% FBS 的 DMEM, 病毒处理组接种 2 MOI 的 EV71, 48 h 后弃去孔中的培养基, 将 6 孔板置于冰上, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  细胞裂解液, 静置 30 s, 然后用移液器反复吹打直至细胞全部悬于裂解液中, 吸取各孔的裂解液至 1.5 mL EP (Eppendorf, EP) 管中, 超声 (功率 200 W) 破碎细胞, 每次超声 5 s, 间隔 10 s 后再次超声, 直至细胞悬液清亮, 再低温冷冻离心 (12 000 r/min, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) 后取上清, 即为细胞总蛋白抽提液, 测定总蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。待电泳结束后进行转膜, 进行 Western blot 实验, 最后采用化学发光法显影。对显影所得蛋白条带进行光密度扫描分析, 光密度值与条带的蛋白含量成正比。

### 1.5 转染实验

将 SH-SY5Y 细胞接种至 24 孔板中, 待细胞生长至 50%–70%, 将细胞分为 3 组, 分别是空白对照组、转染 miR-n.c. 对照组和转染 pre-miR29b 组。按照转染试剂说明书要求操作, 转染 48 h 后弃去孔中的培养基, 收集细胞提取总 RNA, 检测 miRNA29b 表达水平变化情况。

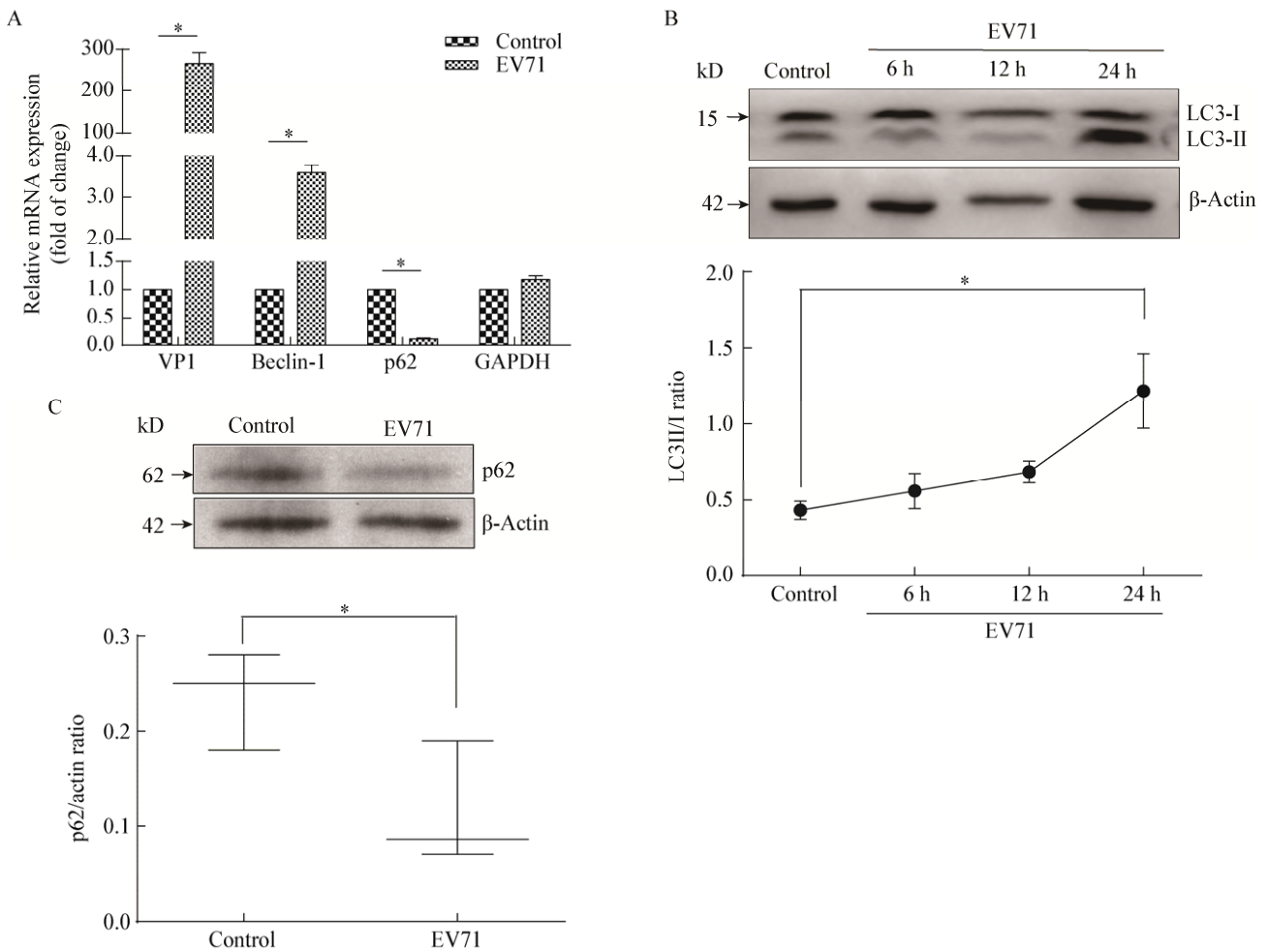
### 1.6 统计学分析

实验至少重复 3 次, 以均值  $\pm$  SD 进行统计。组间差异的统计学分析采用  $t$  检验或方差分析, 若  $P < 0.05$ , 则认为结果具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 EV71 可诱导 SH-SY5Y 细胞发生自噬

通过检测感染 EV71 后细胞内与自噬相关基因表达的变化情况, 判断病毒是否可以诱导 SH-SY5Y 细胞发生自噬。首先通过 qRT-PCR 的方法检测了 EV71 处理前后细胞内 *VP1*、*Beclin-1* 和 *p62* 这 3 个基因的表达变化情况。在 SH-SY5Y 细胞中, 与对照组相比, EV71 处理组 *VP1* 的表达水平明显上升, 说明 EV71 可成功感染 SH-SY5Y 细胞并在细胞内增殖。此外, 细胞自噬相关基因 *Beclin-1* 的表达水平明显上升, *p62* 的表达水平则显著下调, 结果见图 1A。



**图 1 EV71 感染 SH-SY5Y 后细胞自噬增加**  
**Figure 1 EV71 induced autophagy in SH-SY5Y cells**

注: A: 体外培养的 SH-SY5Y 细胞接种 EV71 后 48 h, 提取细胞总 RNA 进行 qRT-PCR 分析. 由图可知, EV71 感染后, 细胞内病毒结构蛋白基因 *VP1* 的 mRNA 表达量显著增强, 自噬相关基因 *Beclin-1* 的 mRNA 表达量显著上升, 而 *p62* 的 mRNA 表达量因 EV71 的感染出现明显的下降; B: SH-SY5Y 细胞接种 EV71 后, 选取 3 个不同的时间点提取细胞总蛋白进行 Western blot 实验, 检测自噬相关蛋白 LC3-II/I 表达, 由图可见 LC3-II/I 蛋白表达比值随病毒感染时间推移而逐渐增加; C: SH-SY5Y 细胞接种 EV71 后 48 h, 提取细胞总蛋白进行 Western blot 实验, 检测自噬相关蛋白 *p62* 的表达. \*:  $P < 0.05$ , 具有统计学意义.

Note: A: SH-SY5Y cells were infected with/without EV71 for 48 h, and then total RNA was extracted and analyzed by qRT-PCR. The results indicated that mRNA of *VP1*, one of virus structural genes, was increased dramatically after EV71 infection, and mRNA of *Beclin-1* was also increased significantly. While *p62* mRNA was decreased in EV71 infected cells. B: Total protein of infected cells was extracted at three different time points and the expression of LC3-II/I was detected by Western blot. The ratio of LC3-II/I increased gradually with the time lapse of EV71 infection; C: SH-SY5Y cells were inoculated with EV71 for 48 h, protein extracts were prepared. And the expression of autophagy related protein *p62* was analyzed by Western blot. \*:  $P < 0.05$ , and differences were considered statistically significant at a value of  $P < 0.05$ .

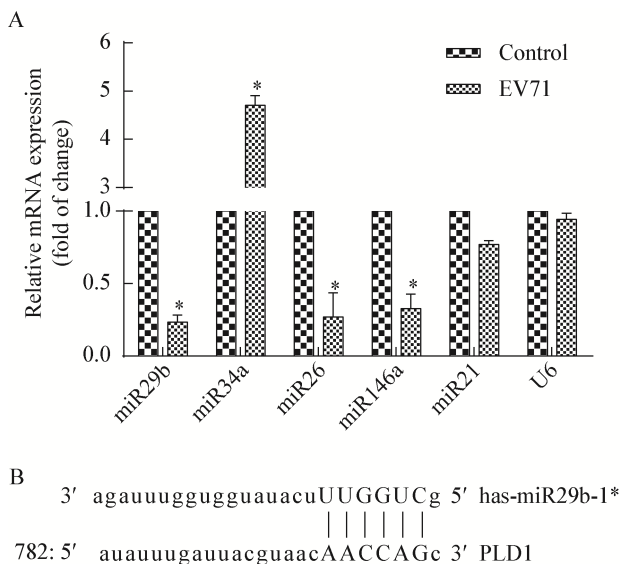
自噬发生时, LC3 会由胞浆型 LC3 (LC3-I) 转变为膜型 LC3 (LC3-II), 因此可通过 LC3-II/I 比值大小来估计自噬水平的高低. 与此同时, 随着自噬体逐步成熟, 与 LC3 结合的 *p62* 蛋白被降解, 表达水平下降. 因此, 为了进一步确认 EV71 感染 SH-SY5Y

细胞确实可诱导自噬的发生, 运用 Western blot 技术检测细胞在感染 EV71 后细胞内 LC3-II/I 比值的变化情况及 *p62* 蛋白表达情况. 结果发现, 随着 EV71 感染时间的延长, 细胞内 LC3-II/I 蛋白表达比值逐渐增加(图 1B); 在 EV71 感染的细胞中, *p62*

的表达水平有所下降,如图 1C 所示。

## 2.2 EV71 感染可影响 SH-SY5Y 细胞内多种 miRNAs 的表达

在前期研究中,我们运用 qPCR-Array 技术检测了人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞在感染 EV71 前后 miRNA 的变化情况,结果发现有多种 miRNAs 的表达在细胞感染 EV71 后出现了明显改变,从中选取了部分变化幅度较大的 miRNAs 分子进行 qRT-PCR 验证,结果发现,miR29b、miR26、miR146a 表达水平明显下降,miR34a 表达水平显著上升,这与芯片结果一致,而 miR21 的表达变化则无显著差异,如图 2A 所示。



**图 2 EV71 感染后细胞内 miRNAs 分子表达变化情况**  
**Figure 2 Changes of cellular miRNAs expression after EV71 infection**

注: A: 体外培养的 SH-SY5Y 细胞接种 EV71 后 24 h, 提取细胞总 RNA 后, 使用特定引物逆转录, 进一步 qRT-PCR 分析。由图可知, EV71 感染后, 细胞内 miR29b、miR26、miR146a 出现明显下调, miR34a 出现显著上调。\*:  $P < 0.05$ , 具有统计学意义; B: 通过 microRNA.org、miRanda 分析发现, miR29b 与 *PLD1* 基因的 3'UTR 区域存在互补。

Note: A: SH-SY5Y cells were inoculated with EV71 for 24 hours. Total RNA was extracted for further qRT-PCR analysis. It could be indicated from the figure that intracellular miR29b, miR26, miR146a were significantly down-regulated, and miR34a was significantly up-regulated after EV71 infection. \*:  $P < 0.05$ , which was considered to be statistically significant. B: Analysis of microRNA.org and miRanda indicated that miR29b was complementary to the 3'UTR region of *PLD1* gene.

对于 qRT-PCR 验证的这 4 个变化显著的 miRNA 分子, 通过生物信息学软件及文献分析预测其可能的生物学功能, 并最终选择 miR29b 作为本研究的研究对象。通过 miRNA 靶标预测数据库 (microRNA.org, miRanda) 发现, miR29b 与磷脂酶 D1 (*PLD1*) 基因的 3'UTR 区域存在互补, 其软件分析评分如下: mirSVR score:  $-0.0302$ , PhastCons score:  $0.5817$ , 如图 2B 所示。有研究表明 *PLD1* 与细胞自噬有着密切关系, 甚至有研究者把 *PLD1* 作为判断细胞发生自噬的标志物之一<sup>[14]</sup>。这说明 miR29b 分子有可能通过调控靶基因 *PLD1* 而参与到 EV71 诱导人神经细胞 SH-SY5Y 自噬这一分子事件中去。

## 2.3 EV71 可通过 miR29b 途径诱导 SH-SY5Y 细胞发生自噬

为了确认 miR29b 的表达下调与 EV71 病毒诱导细胞发生自噬之间存在相关性, 使用 miRNA29b mimics 工具上调细胞内 miR29b 的表达水平, 看其对 EV71 诱导细胞自噬作用的影响。

用 pre-miR29b 转染 SH-SY5Y 细胞, 通过 qRT-PCR 检测转染 pre-miR29b 后细胞内 miR29b 表达水平的变化。结果表明, 与 miR-n.c. 组相比较, 转染 pre-miR29b 组细胞内 miR29b 表达水平显著上调 (图 3A)。这说明本研究中所用的 miRNA29b mimics 工具能够有效地上调细胞内 miR29b 的表达水平。

在 EV71 感染的 SH-SY5Y 细胞中转染 pre-miR29b, 上调细胞中 miR29b 的表达量, 用 qRT-PCR 技术检测细胞内自噬相关基因的表达情况。结果发现, 转染 pre-miR29b 后可逆转 EV71 对细胞内 miR29b 的下调作用, 而且随着细胞内 miR29b 水平的上调, *Beclin-1* 的表达量显著下降, *p62* 的表达水平则明显上调, 与此同时, EV71 的 *VPI* 基因表达量显著下降, 结果如图 3B 所示。

为进一步明确上调 miR29b 的表达水平能够逆转 EV71 对 SH-SY5Y 细胞自噬的诱导作用, 通过 Western blot 技术检测了转染 pre-miR29b 后细胞内 LC3-II/I 比值的变化情况。细胞感染 EV71 后 24 h,

通过转染 pre-miR29b 来上调细胞内 miR29b 的水平, 与 miR-n.c.组相比较, 转染 pre-miR29b 组的 LC3-II/I 比值明显降低, 结果如图 3C 所示。

### 2.4 miR29b 影响细胞自噬的分子机制初探

之前我们通过 miRNA 靶标预测数据库找到了 miR29b 潜在的可能靶基因 *PLD1*。为了证明通过上述生物信息学手段寻找到的 *PLD1* 基因是 miR29b

的靶基因, 首先通过 miRNA29b mimics 工具来调节细胞内 miR29b 的表达水平, 观察 *PLD1* 基因的 mRNA 及蛋白表达水平的变化。结果发现, 无论是在 mRNA 水平(图 4A)还是在蛋白水平(图 4B), *PLD1* 基因的变化与 miR29b 是一致的, 即它的表达水平随着细胞内 miR29b 水平的升高而升高, 这个结果和我们的预期不一致。

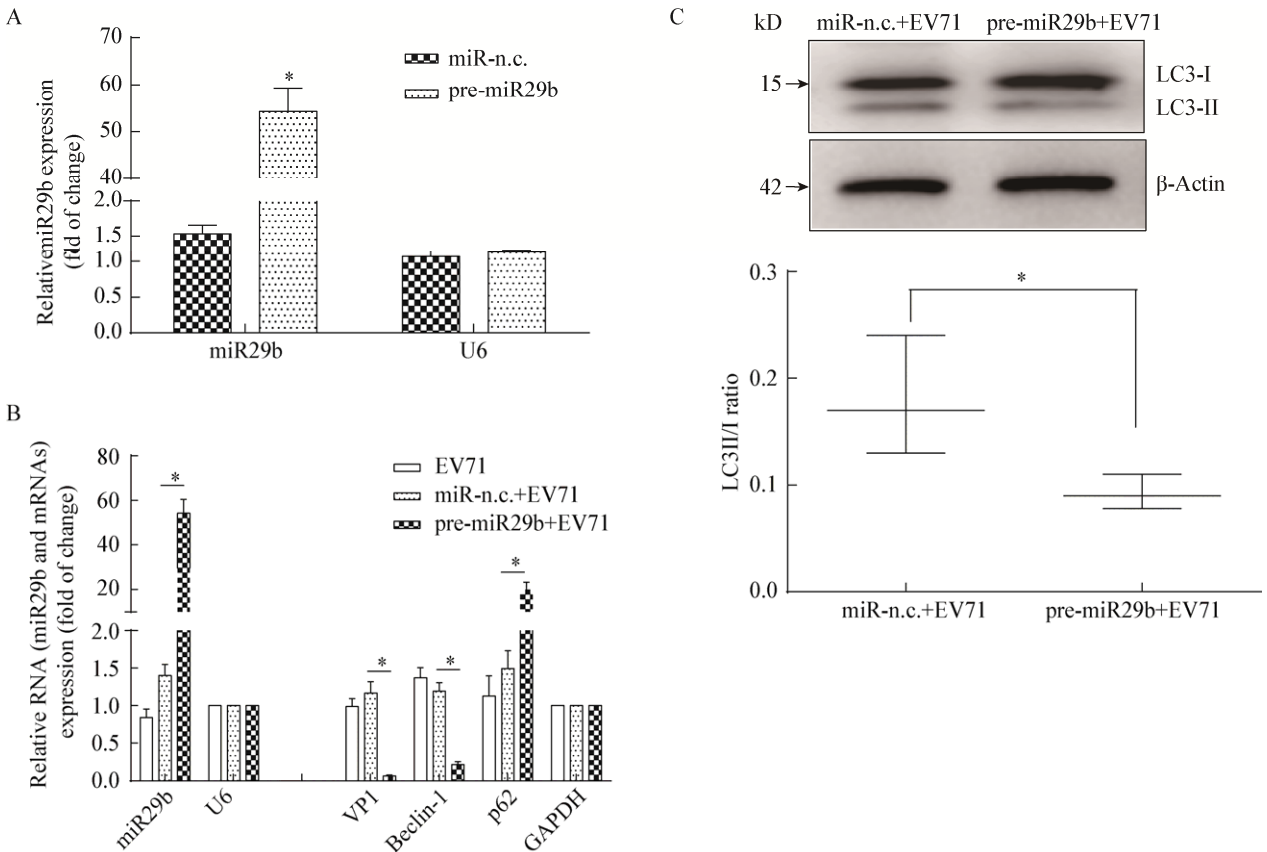


图 3 EV71 通过下调 miR29b 来诱导细胞自噬

Figure 3 EV71 induced autophagy by down-regulating miR29b

注: A: 在体外培养的 SH-SY5Y 细胞中转染 pre-miR29b, 24 h 后提取细胞总 RNA 进行 qRT-PCR 分析. 由图可知, 与转染 miR-n.c. 组相比较, 转染 pre-miR29b 组中的 miR29b 水平明显上调; B: 在感染 EV71 的 SH-SY5Y 细胞中转染 pre-miR29b, 24 h 后提取细胞总 RNA 进行 qRT-PCR 分析. 与 EV71 处理组及转染 miR-n.c.+EV71 处理组相较, 转染 pre-miR29b+EV71 处理组中的 miR29b 水平明显上调, *VP1* 及 *Beclin-1* 的 mRNA 水平明显下调, *p62* 的 mRNA 表达量则显著增加; C: 在感染 EV71 的 SH-SY5Y 细胞中转染 pre-miR29b, 48 h 后提取细胞总蛋白进行 Western blot 分析. 通过光密度扫描分析 LC3 II/I 比值变化情况, 结果显示 pre-miR29b 处理组的 LC3 II/I 比值较对照组显著下降. \*:  $P < 0.05$ , 具有统计学意义.

Note: A: SH-SY5Y cells were transfected with pre-miR29b or miR-n.c. for 24 h. Total RNA was extracted and analyzed by qRT-PCR. Compared with the miR-n.c. group, the expression of miR29b in pre-miR29b group was significantly up-regulated. B: The EV71 infected cells were transfected with pre-miR29b or miR-n.c. for 24 h. Total RNA was extracted and analyzed by qRT-PCR. Compared with the EV71 group and EV71+miR-n.c. group, the expressions of miR29b and *p62* mRNA were significantly up-regulated in EV71+pre-miR29b group, while mRNA levels of *VP1* and *Beclin-1* were down-regulated dramatically. C: The EV71 infected cells were transfected with pre-miR29b or miR-n.c. for 48 h. Total protein was extracted and analyzed by Western blot. LC3 II/I ratio was analyzed by optical density scanning. Compared with the control, the ratio of LC3 II/I decreased in pre-miR29b group. \*:  $P < 0.05$ .



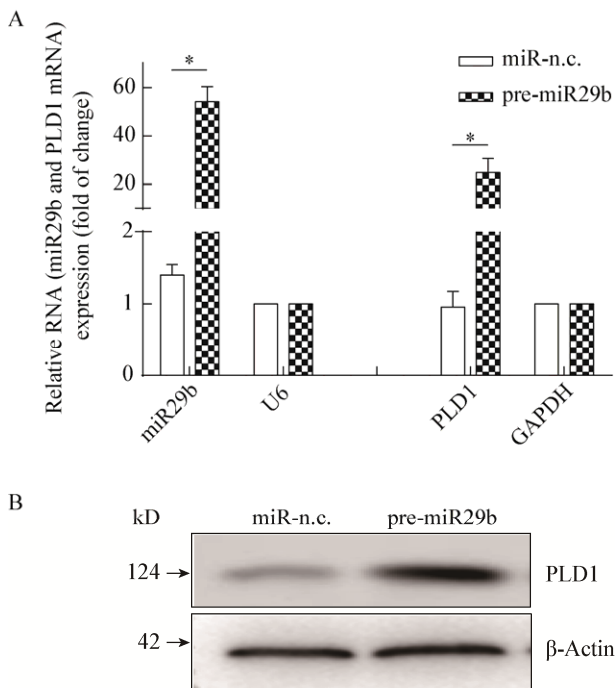


图4 PLD1变化趋势与miR29b相一致

Figure 4 Expression of PLD1 was consistent with miR29b

注: A: 在体外培养的SH-SY5Y细胞中转染pre-miR29b, 24 h后提取细胞总RNA进行qRT-PCR分析. 由图可知, 与转染miR-n.c.的对照组相比较, 转染pre-miR29b组中的miR29b及PLD1的mRNA水平明显上调; B: 在体外培养的SH-SY5Y细胞中转染pre-miR29b, 48 h后提取细胞总蛋白进行Western blot分析. 与对照组相比较, 转染pre-miR29b的处理组中PLD1蛋白水平明显上调. \*:  $P < 0.05$ , 具有统计学意义.

Note: A: SH-SY5Y cells were transfected with pre-miR29b or miR-n.c. for 24 h. Total RNA was extracted and analyzed by qRT-PCR. Compared with the miR-n.c. group, the expression of miR29b and PLD1 mRNA in pre-miR29b transfected group was up-regulated. B: Total protein was extracted for Western blot 48 h later after transfection. The expression level of PLD1 protein in pre-miR29b group was much higher than that in the control group. \*:  $P < 0.05$ .

### 3 讨论与结论

自噬是真核生物中细胞内物质维持动态平衡的重要方式, 细胞可利用自噬来消除细胞内错误折叠的蛋白质、某些长寿蛋白、老化损伤的细胞器或者侵入细胞的微生物<sup>[10]</sup>. 病毒感染是诱发自噬的重要因素之一, 越来越多的证据表明, 病毒感染与细胞的自噬之间存在密切的关系. 在病毒感染入侵的刺激之下, 细胞通过增强自噬来清除入侵的病毒成分, 是机体保护自身的机制之一. 但是随着研究的

深入, 研究者们渐渐发现, 自噬与病毒的关系具有双面性和复杂性. 自噬不仅仅具有抗病毒的作用, 很多时候, 自噬也可以促进病毒复制繁殖. 至于究竟是哪种作用占据主导, 这往往与病毒的种类、细胞的类型、细胞环境等多种因素有关, 甚至是在同一病毒感染不同阶段也可能呈现不同的作用效应<sup>[15]</sup>.

本研究发现EV71病毒可以感染人神经细胞SH-SY5Y, 并诱导该细胞出现自噬. 细胞感染EV71后, *Beclin-1* 基因的表达显著上调(图1A). 在自噬体的形成过程中, *Beclin-1* 与 *atg14*、*Vps34* 等多种自噬相关蛋白结合, 促进自噬体的形成、成熟及与溶酶体的融合, 因此, *Beclin-1* 水平的上调往往提示细胞内自噬水平增加. 此外, 还有研究表明 *Bcl-2* 蛋白可通过与 *Beclin-1* 结合从而抑制自噬体的形成<sup>[16]</sup>. 在我们的另一项研究中发现, 随着EV71感染的发展, *Bcl-2* 蛋白的表达水平出现显著下调(结果未附上), 这意味着EV71不仅可以通过上调 *Beclin-1* 的表达水平来促进自噬, 还可能通过下调 *Bcl-2* 的蛋白表达水平减少其与 *Beclin-1* 结合来促进SH-SY5Y细胞自噬的发生. 从图1A、C中还可以观察到 *p62* 表达水平出现下调. *p62* 蛋白是通过直接与 *LC3* 结合而选择性地结合到自噬体中, 之后会随着自噬体的成熟而降解, 其表达水平随着自噬的发展逐渐下降. 因此在EV71诱导细胞自噬过程中 *p62* 的表达水平下调(图1A和C). 除了 *Beclin-1* 和 *p62* 基因之外, *LC3* 蛋白是自噬发生和发展的另一重要指示分子. *LC3* 前体蛋白会在 *atg4* 的剪切作用下形成 *LC3-I*, 在自噬信号刺激下 *LC3-I* 会酶解掉一小段多肽转变为 *LC3-II*, 因此 *LC3-II/I* 比值的大小可估计自噬水平的高低. 在本研究中, *LC3-II/I* 比值随着EV71感染时间的推移逐渐增加(图1B). 以上的实验结果都提示EV71病毒感染可诱导人神经细胞SH-SY5Y自噬增加.

在我们的前期研究中, 通过miRNA芯片及qRT-PCR技术找到了与EV71感染有关的一些miRNAs(图2A), 通过生物信息学软件分析及文献查阅, 我们推测miR29b很可能在EV71诱导

SH-SY5Y 细胞自噬过程中发挥重要作用。该假设通过 miR29b mimics 工具得到证实。当细胞转染 pre-miR29b 后, 细胞内 miR29b 的表达水平显著上调(图 3A), 伴随 miR29b 水平变化的是细胞内的 *Beclin-1* 表达水平下降而 *p62* 上升, LC3II/I 比值下降(图 3B、C), 这都表明 EV71 诱导的细胞自噬作用被 miR29b mimics 逆转, 提示 miR29b 在 EV71 诱导细胞自噬过程中发挥了重要作用。不少研究表明 *PLD1* 与自噬关系密切, 但是 *PLD1* 对自噬究竟是抑制作用还是促进作用并无定论<sup>[17]</sup>。我们初步探索了 *PLD1* 作为 miR29b 的靶基因在 EV71 诱导自噬中发挥作用的可能性。在本研究中, EV71 感染后诱导细胞自噬增加, 细胞内 *PLD1* 表达水平下调, 由此可见, *PLD1* 在 EV71 诱导 SH-SY5Y 自噬这一事件中可能是发挥负调控的作用。生物信息学软件分析提示它可能是 miR29b 的靶分子, 但是通过调节细胞内 miR29b 的表达水平, 我们观察到 *PLD1* 的基因表达水平与 miR29b 的变化方向一致(图 4)。由于 miRNA 对靶基因的调节往往是通过抑制转录或者抑制转录后翻译来实现的, 这与本实验中 *PLD1* 水平与 miR29b 的变化一致的结果相悖, 因此我们推测在本研究中 *PLD1* 很可能不是作为 miR29b 的靶分子发挥作用。

在研究中我们还发现, 当通过转染 pre-miR29b 来上调细胞内 miR29b 的表达水平时, 细胞中 EV71 的结构基因 *VPI* 表达水平显著下降(图 3B), 提示病毒的复制受到抑制, 这说明 miR29b 的功能可能不仅仅与病毒诱导细胞自噬有关, 还可能与病毒本身的复制繁殖密切相关。因为有研究表明 EV71 可以通过诱导细胞自噬来促进病毒自身的复制<sup>[8]</sup>, 所以 miR29b 对 EV71 复制的促进作用或许是通过增加细胞自噬水平实现的。

通过研究我们初步认识到 miR29b 在 EV71 感染造成的神经系统病变中发挥了重要的作用, 它未来有可能作为治疗或预防 EV71 感染所致神经系统并发症的药物靶标。在下一步的研究中, 我们将继续寻找在 EV71 感染诱导自噬的分子事件中位于 miR29b 下游的信号分子, 为阐明 EV71 通过 miR29b

途径诱导人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞自噬的具体机制奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. *New England Journal of Medicine*, 1999, 341(13): 929-935
- [2] Lee MS, Lin TY, Chiang PS, et al. An investigation of epidemic enterovirus 71 infection in Taiwan, 2008: clinical, virologic, and serologic features[J]. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2010, 29(11): 1030-1034
- [3] Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998[J]. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 1999, 18(12): 1092-1096
- [4] Wang SM, Lei HY, Liu CC. Cytokine immunopathogenesis of enterovirus 71 brain stem encephalitis[J]. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 2012: 876241
- [5] Chang CY, Li JR, Ou YC, et al. Enterovirus 71 infection caused neuronal cell death and cytokine expression in cultured rat neural cells[J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(10): 789-800
- [6] Du XL, Wang HP, Xu FH, et al. Enterovirus 71 induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells through stimulation of endogenous microRNA let-7b expression[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(1): 953-959
- [7] Wang CY, Zhou RM, Zhang ZR, et al. Intrinsic apoptosis and proinflammatory cytokines regulated in human astrocytes infected with enterovirus 71[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(10): 3010-3022
- [8] Chen DY, Feng CH, Tian XY, et al. Promyelocytic leukemia restricts Enterovirus 71 replication by inhibiting autophagy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1268
- [9] Song J, Hu YJ, Li JQ, et al. Suppression of the toll-like receptor 7-dependent type I interferon production pathway by autophagy resulting from enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections facilitates their replication[J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(1): 135-144
- [10] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. *Nature Cell Biology*, 2013, 15(7): 713-720
- [11] Bingol B. Autophagy and lysosomal pathways in nervous system disorders[J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2018, 91: 167-208
- [12] Weng KF, Chen LL, Huang PN, et al. Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection[J]. *Microbes and Infection*, 2010, 12(7): 505-510
- [13] Baker JL, Ward BM. Development and comparison of a quantitative TaqMan-MGB real-time PCR assay to three other methods of quantifying vaccinia virions[J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 196: 126-132
- [14] Dall'Armi C, Hurtado-Lorenzo A, Tian HS, et al. The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy[J]. *Nature Communications*, 2010, 1: 142
- [15] Viret C, Rozières A, Faure M. Autophagy during early virus-host cell interactions[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(12): 1696-1713
- [16] Fernández AF, Sebtí S, Wei YJ, et al. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice[J]. *Nature*, 2018, 558(7708): 136-140
- [17] Yoon MS. Vps34 and PLD1 take center stage in nutrient signaling: their dual roles in regulating autophagy[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2015, 13: 44