



研究报告

B19 病毒非结构蛋白 11 kD 对 p6 启动子和细胞因子启动子的调控作用

王媛¹ 柯峰² 戈勇² 殷焦¹ 黄玉^{4,5} 董衍明^{*3}

1 湖北文理学院医学院 湖北 襄阳 441053

2 襄阳市中心医院 湖北 襄阳 444102

3 湖北大学生命科学学院 湖北 武汉 430062

4 华大海洋研究院 广东 深圳 518083

5 Department of Biological Sciences, George Washington University, Washington DC 20052, USA

摘要:【背景】人细小病毒 B19 是可以感染并引起人类疾病的两种细小病毒科成员之一。B19 病毒的唯一启动子 p6 负责病毒 RNA 的转录。研究表明 p6 启动子活性与其转录因子结合位点以及 B19 病毒 NS1 蛋白的调节有关。但是,关于其他重要位点和 B19 病毒蛋白是否也具有影响 p6 启动子活性的作用还未有报道。【目的】探究影响 p6 启动子活性的重要因素,并明确 B19 病毒 11 kD 蛋白与 p6 启动子及细胞因子启动子的调控关系。【方法】通过生物信息方法预测分析 p6 启动子转录结合位点及其 CpG 位点,利用体外甲基化分析 CpG 位点对 p6 启动子活性的影响。同时,利用增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)和荧光素酶报告系统分析影响 p6 启动子活性的转录因子结合区域以及 11 kD 蛋白对 p6 启动子和细胞因子启动子的影响。【结果】p6 启动子在不同非敏感细胞系中均有较高活性,并且其 302–479 区段的转录结合位点 CCCTC 结合因子(CCCTC-binding factor, CTCF)、阴阳因子(Yin Yang 1, YY1)、信号传导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、Sp1/3 和 E2F 转录调节因子 7 (E2F transcription factor 7, E2F7)对维持启动子活性很重要。同时, p6 启动子活性可被其 CpG 位点的甲基化修饰所抑制,但不被 11 kD 蛋白所调控。然而 11 kD 蛋白却能显著上调肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素 6 (interleukin 6, IL6)、STAT3 启动子的活性。【结论】本研究明晰了 B19 病毒 p6 启动子的潜在转录因子结合位点和 CpG 位点对维持其启动子活性的重要性,并进一步揭示了非结构蛋白 11 kD 与 p6 启动子以及细胞内因子启动子的关系,推测 11 kD 蛋白可能通过影响细胞内相关因子的表达,进而在 B19 病毒与细胞相互作用过程中扮演重要角色。

关键词: B19 病毒, 11 kD 蛋白, p6 启动子, 细胞因子启动子

Foundation items: Xiangyang Science and Technology Research and Development Project (2017-32); Natural Science Foundation of Hubei Province (2017CFB241); China Postdoctoral Science Foundation (2019M650176)

***Corresponding author:** E-mail: dym615@icloud.com

Received: 19-08-2019; **Accepted:** 24-12-2019; **Published online:** 31-03-2020

基金项目: 襄阳市科技研究与开发项目(襄科计) [(2017) 32 号]; 湖北省自然科学基金面上项目(2017CFB241); 中国博士面上项目(2019M650176)

***通信作者:** E-mail: dym615@icloud.com

收稿日期: 2019-08-19; **接受日期:** 2019-12-24; **网络首发日期:** 2020-03-31

Regulation of viral p6 and cytokine promoter by Parvovirus B19 nonstructural protein 11 kD

WANG Yuan¹ KE Feng² GE Yong² YIN Jiao¹ HUANG Yu^{4,5} DONG Yan-Ming^{*3}

1 Medical College of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441053, China

2 Xiangyang Central Hospital, Xiangyang, Hubei 444102, China

3 School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan, Hubei 430062, China

4 BGI-Marine, Shenzhen, Guangdong 518083, China

5 Department of Biological Sciences, George Washington University, Washington DC 20052, USA

Abstract: [Background] Human Parvovirus B19 (B19 virus) is a member of the two Parvoviridae families that cause human diseases. The unique viral p6 promoter in B19 virus controls all the viral mRNA transcription. Previous research shows that some transcription factor binding sites (TFBSs) within p6 and nonstructural protein NS1 of B19 virus are both involved in regulation of p6 activity. However, effects of other TFBSs or viral proteins on p6 activity have not been reported. [Objective] Here, we investigate the roles of 11 kD protein in regulation of the activities of B19 p6 promoter as well as some cytokine promoters. [Methods] Based on bioinformatics methods, we predicted some new TFBSs and identified the CpG island in p6 region. *In vitro* methylation assay was carried out to study the effect of CpG on p6 activity. Meanwhile, EGFP and luciferase reporter system were employed to detect the activities of p6 and other cytokine promoters. [Results] Consistent with previous research, p6 shows similar high activity in different non-permissive cells. The truncated p6 mutation assay indicated that CTCF, YY1, STAT3, Sp1/3 and E2F7 binding sites at nt. 302–479 played significant roles in maintaining p6 promoter activity. In addition, *in vitro* methylation assay demonstrated that CpG methylation on p6 inhibited its promoter activity. Interestingly, though 11 kD protein did not regulate p6 activity, it increased the promoter activity of TNF- α , IL6, STAT3 significantly. [Conclusion] Our findings imply that the newly discovered TFBSs and CpG island in p6 are essential for the maintenance of p6 promoter activity. Meanwhile, the association between nonstructural protein 11 kD and cytokine promoter suggests that 11 kD may participate in B19 virus host interaction by regulating the cytokine factor expression.

Keywords: Parvovirus B19, Nonstructural protein 11 kD, p6 promoter, Cytokine promoter

人细小病毒 B19 (Human Parvovirus B19, B19 virus)属于细小病毒亚科(Parvoviridae)红细胞病毒属(Erythrovirus),由 Cossart 等在筛检献血者乙型肝炎病毒表面抗原时发现并命名为 B19 病毒^[1]。目前, B19 病毒和人博卡病毒(Human Bocavirus)是已发现能引起人类疾病的仅有的两种细小病毒^[1]。

B19 病毒基因组结构简单,是全长约 5.6 kb 的单链 DNA 病毒,基因组 DNA 左端含有单一的启动子 p6,其 180–490 区域含有大量增强子元件序列^[1]。研究发现,该区域的 Sp1/3、YY1 转录因子结合位点以及 Ets 蛋白家族的核心基序对于增强 p6 启动子活性很重要,它们主要通过 Sp3 的结合影响启动子活性^[2]。同时,存在于 ITR 内部(nt. 337–354)的 NS1 结合元件(NSBEs) (5'-CCGGC

GGC-3')也具有增强 p6 启动子的功能^[1]。另外,研究表明,基因启动子内部 CpG 位点的甲基化修饰可抑制基因表达,该现象与部分人类肿瘤中抑癌基因的沉默相关^[3]。关于 B19 病毒 p6 启动子区 CpG 对其启动子活性的影响并未完全明晰。除两端的 ITR 结构外, B19 病毒基因组中间为 4 568 bp 长的编码区,主要存在 3 个几乎覆盖全长基因组的阅读框(open reading frame, ORF),第 1 个 ORF 编码较小的非结构蛋白 7.5 kD 和两个结构蛋白 VP1 (84 kD)和 VP2 (58 kD)以及潜在的 X 蛋白,第 2 个 ORF 主要编码非结构蛋白 11 kD,第 3 个 ORF 主要编码非结构蛋白 NS1^[1]。研究发现,NS1 蛋白不仅是病毒复制所必需的,也具有调节病毒启动子活性的功能,更是 B19 病毒引起细胞凋亡和细胞损伤

中的重要蛋白^[1]。最新研究显示, 11 kD 蛋白不仅在 B19 病毒引起 CD36+EPC 细胞的凋亡中起关键作用, 也是 B19 病毒复制所需的重要蛋白^[4-6]。但是, 11 kD 蛋白是否如同 NS1 蛋白一样具有调控 p6 启动子和细胞内因子启动子的作用目前尚不完全清楚。

本实验明晰了 B19 病毒 p6 启动子的潜在转录因子及 CpG 位点对启动子活性的影响, 并揭示了非结构蛋白 11 kD 与 p6 启动子以及细胞因子启动子的关系, 为后续深入研究 B19 病毒的基因表达调控及其与宿主细胞的相互作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾上皮细胞 HEK-293T/293、兔肾细胞 RK-13、人子宫颈癌细胞 HeLa、人恶性胚胎横纹肌瘤细胞 RD 均为本实验室保存; RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购自 Hyclone 公司; B19 病毒感染性克隆(pB19-4244)由 Tijssen 教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 α 、荧光素酶报告质粒 pGL3-basic-luc、内参质粒 pRL-TK-luc 以及细胞因子启动子报告质粒 IFN β /STAT3/TNF- α /IL-6-P-luc 为本实验室保存; 双荧光素酶检测试剂盒, Promega 公司; CpG 甲基转移酶 M.Sss I, NEB 公司; 转染试剂 jetPEI, Polyplus 公司; PrimeSTAR[®] HS Premix, TaKaRa 公司。

TS100 型倒置显微镜, Nikon 公司; 多功能酶标仪, BioTek 公司。

1.2 p6 启动子转录因子结合位点分析

B19 病毒 p6 启动子在病毒基因组上的区域为 nt. 198–630 (GenBank 登录号为 AY386330)。根据验证的转录因子结合位点数据库 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>)以及转录因子结合位点预测软件 TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), 选取相对阈值 (relative profile score threshold)在 80%–100%的范围并且匹配正链 DNA 序列的转录因子结合位点, 分析并预

测 p6 启动子区的主要 DNA 顺式作用元件。如图 1A 所示, p6 启动子区的转录因子结合位点既包括已被证实的 DNA 顺式作用元件, 如 3 个 YY1 结合基序(nt. 320–325、418–423、612–623), 1 个 *Ets* 结合位点(EBS) (nt. 258–267), 以及 4 个 Sp1/3 结合位点 GC 框(nt. 337–347、396–403、473–479、485–491); 还包括新预测的 DNA 顺式作用元件, 如 E2F7 结合位点(nt. 393–406、484–494), 3 个 ATF/CREB 结合位点(nt. 263–276、278–291、293–316), 4 个 CTCF 结合位点(nt. 199–204、220–225、412–417、472–477)和 6 个 STAT3 结合位点(nt. 240–250、270–280、285–295、369–379、432–442、545–555), 以及 1 个新的 Sp1/3 结合位点(nt. 249–259)。

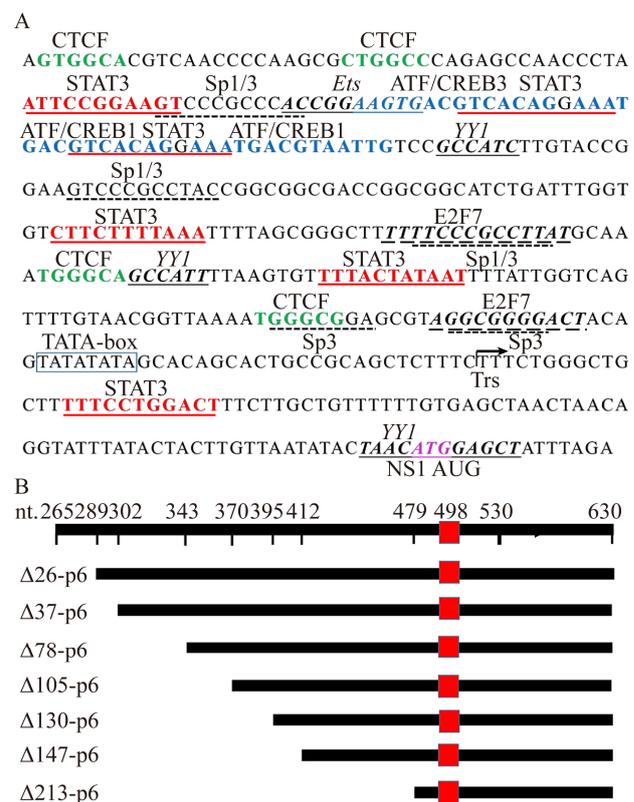


图 1 p6 启动子转录因子结合位点(TFBSs)分析与预测 (A)及 p6 启动子截短突变体质粒构建策略(B)
Figure 1 Analysis and prediction of TFBSs in p6 promoter (A) and deletions in the p6 promoter region (B)

1.3 重组载体的构建

(1) p44/p6 启动子重组载体 pGL3-p44/p6-luc 及 pGL3-Δ213/Δ147/Δ130/Δ105/Δ78/Δ37/Δ24-p6-luc 的构建。PCR 反应体系(50 μL): 模板 pB19-4244 (50 ng/μL) 1 μL, 正、反向引物(10 μmol/L) (表 1) 各 1 μL, 2×PrimeSTAR[®] HS Premix 25 μL, 灭菌水补足至 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。扩增得到 p44 和 p6 启动子全长及截短片, 经 *Kpn* I/*Hind* III 酶切后连入 pGL3-basic, 转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 提取质核经酶切鉴定后测序。

(2) pGL3-p6-EGFP 的构建。PCR 反应体系 (50 μL): 2×PrimeSTAR[®] HS Premix 25 μL, 模板 pEGFP-C1 (50 ng/μL) 1 μL, EGFP 正、反向引物 (10 μmol/L) (表 1) 各 1 μL, 灭菌水补足至 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 20 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物经

Nco I/*Xba* I 双酶切处理后, 替换上述构建好的含 p6/44 及 p6 截短突变体的荧光素酶报告质粒中的荧光素酶基因(*luc*), 转化大肠杆菌 DH5α 菌, 提取质粒并经双酶切鉴定后测序, 重组载体具体构建策略见图 1B。

(3) 非结构蛋白重组载体的构建。PCR 反应体系(50 μL): 2×PrimeSTAR[®] HS Premix 25 μL, 模板 pB19-4244 (50 ng/μL) 1 μL, 正、反向引物 (10 μmol/L) (表 1) 各 1 μL, 灭菌水补足至 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。扩增含 Flag-tag 的 NS1 以及 HA-tag 的 11 kD 和 X 基因, 分别经 *Bam*H I/*Xho* I 以及 *Hind* III/*Xho* I 酶切后连入 pcDNA3.1(+), 重组载体转化大肠杆菌 DH5α 菌株, 提取质粒并经双酶切鉴定后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 细胞培养与 DNA 转染

Hela 细胞培养于 37 °C、5% CO₂、含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养基中。转染时细胞汇合度约为 60%–80%, 以 1:3 的质量比(质粒 DNA/jetPEI)进行转染。

1.5 EGFP 观察及荧光素酶活性测定

利用转染试剂 jetPEI 将截短突变体质粒 pGL3-Δ213/Δ147/Δ130/Δ105/Δ78/Δ37/Δ24-p6-EGFP 及 pGL3-p6/p44-EGFP 转染非敏感细胞系, 48 h 后, 荧光显微镜观察 EGFP 表达情况。荧光素酶活性的检测通过转染 pGL3-p6-luc 及细胞因子启动子报告质粒 IFNβ/STAT3/TNF-α/IL6-P-luc 和内参质粒 pRL-TK 共转染于 Hela 细胞, 其中空载体 pGL3-Basic 共转染组为阴性对照, 转染 48 h 后弃掉培养基, 按照荧光素酶检测试剂盒的操作说明书检测荧光素酶活性, 并利用荧光素酶和海肾荧光素酶比值表征启动子的活性。

1.6 p6 启动子体外甲基化

将 pGL3-p6-EGFP 质粒分为两组: 一组加入 CpG 甲基转移酶 M.Sss I 甲基化后, 于 37 °C 孵育 18 h; 对照组不加 M.Sss I, 仅加 SAM, 待反应完

表 1 构建表达载体和 p6 启动子截短突变体引物
Table 1 Primers used to construct expressing vectors and truncated p6 promoter

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
F-Δ213	CGGGGTACCGAGCGTAGGCGGGGACTA
F-Δ147	CGGGGTACCTGGGCAGCCATTTTAAG
F-Δ130	CGGGGTACCTTCCC GCCTTATGCAAATG
F-Δ105	CGGGGTACCTTCTTTTAAATTTTAGCGG
F-Δ78	CGGGGTACCGCGACCGGCGGCATCTG
F-Δ37	CGGGGTACCAATTGTCCGCCATCTTG
F-p6	CGGGGTACCGTGACGTCACAGAAATG
F-Δ24	CGGGGTACCCAGGAAATGACGTAATTGT
R-p6	CCCAAGCTTTCTAAATAGCTCCAGGTTA
F-NS1	CGGGATCCACCATGGAGCAGAAACTCATCT
	CTGAAGAGGATCTGCGAGCTATTTAG
R-NS1	CCGCTCGAGTTACTCATAATCTACAAAGCTTT
F-X	CCGCTCGAGGACAGTTATCTGACCACCC
R-X	CCCAAGCTTTTAAAGCGTAATCTGGAACATC
	GTATGGGTACCCTTCCCAACTTAGCC
F-EGFP	CGCCCATGGACCATGGTGAGCAAGGGC
R-EGFP	CTAGTCTAGATTACTTGTACAGCTCG
F-p44	CGGGGTAACCCCGGGACCAGTTCAGGAG
R-p44	CCCAAGCTTGACAAAGTCCCAAGCCTCC
F-11 kD	CCGCTCGAGACCATGCAGAATAACACTA
R-11 kD	CGCGGATCCTTAAGCGTAATCTGGAAC
	ATCGTATGGGTATTTTCCAGGTTCTG

成后, 于 65 °C 加热 20 min 使 M.Sss I 失活。

2 结果与分析

2.1 B19 病毒全长 p6 启动子在不同非敏感细胞系中的活性检测

为了探究 p6 启动子在 B19 病毒非敏感细胞系中的活性, 比较了 pGL3-p6/p44-EGFP 以及 pEGFP-N1 转染非敏感细胞后 EGFP 蛋白的表达情况。如图 2A 所示, CMV 和 p6 启动子转染组均能检测到较强的绿色荧光, 这表明 p6 启动子在非敏感细胞系中具有很强的活性。相对于其他组, HEK-293 和 HEK-293T 细胞转染组观察到大量 EGFP 的表达, 其原因在于细胞转染效率的差别。然而 293T 细胞相较于 293 细胞, 前者亮于后者, 这表明 p6 启动子区具有类似于 SV40 复制起始位点的序列, 该序列可以被 293T 细胞内的 SV40 大 T 抗原识别并促进质粒 DNA 的起始复制。然而, 转染 B19 病毒潜在启动子 p44 的非敏感细胞中观察不到任何绿色荧光(结果未给出), 表明 p44 在上述细胞中不具有活性。同时, 利用荧光素酶报告系统进一步比较了在不同非敏感细胞系中 p6 启动子的活性, 实验结果与 EGFP 观察结果一致(图 2B)。同时, 与 CMV 相比, 除了 HeLa 细胞之外, p6 启动子在不同非敏感细胞系中的相对荧光素酶活性均低于阳性对照 CMV, 并且在 CMV 中的活性约为 p6 启动子活性的 1.0–1.5 倍。

2.2 B19 病毒 p6 启动子及其截短体在 HeLa 细胞内活性比较

为了进一步分析预测的 p6 启动子区转录结合位点对启动子活性的影响, 通过荧光显微镜观察 p6 系列突变体在 HeLa 细胞中 EGFP 的表达水平来表征转录因子结合位点对启动子活性的影响。如图 3 所示, 随着截短片长度的增加, 截短体 p6 启动子的活性逐渐变弱。当截掉 213 个碱基时, $\Delta 213$ -p6 启动子活性基本丧失, 但是当 N 端截掉 147 个碱基时, $\Delta 147$ -p6 启动子活性相较于 $\Delta 213$ -p6 增强许多, 这表明 CTCF (nt. 412–417, 472–477)、YY1 (nt. 418–423)、STAT3 (nt. 432–442)

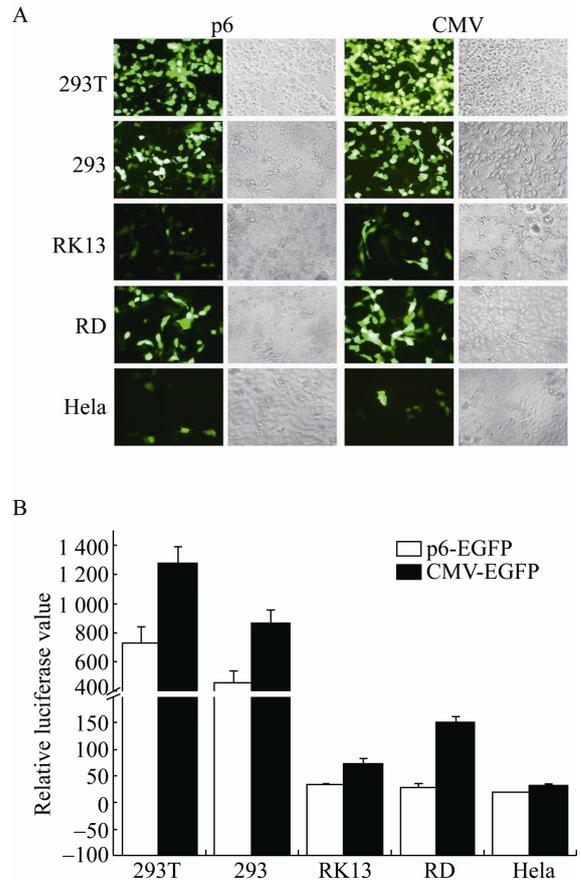


图 2 p6/CMV 启动子活性的荧光显微镜观察比较(A)和荧光素酶检测比较(B)

Figure 2 Comparison of p6 and CMV promoter activities with fluorescence microscope (A) and luciferase assay (B)

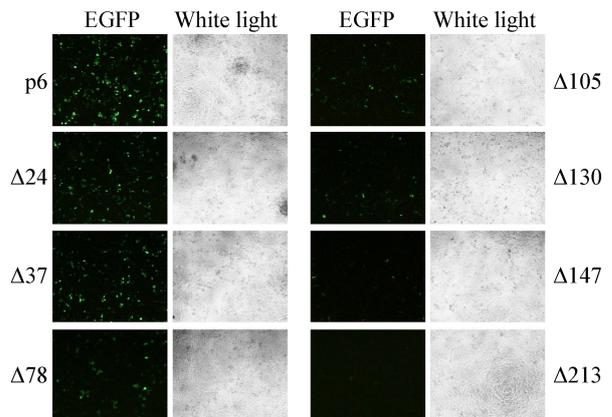


图 3 B19 病毒 p6 启动子及截短片启动子活性比较

Figure 3 Comparison of the full length and truncated p6 promoter activities in HeLa cells

以及 Sp3 (nt. 473-479)能影响启动子的活性;截短 105 个和 130 个碱基的启动子片段时, Δ105-p6 和 Δ130-p6 启动子活性与 Δ78-p6 类似,但是相较于 Δ213-p6 和 Δ147-p6,其启动子活性有了显著提高,表明 Sp1 (nt. 395-405)和 E2F7 (nt. 393-406)对于增强启动子活性具有重要作用;当截掉 78 个碱基时, Δ78-p6 活性与 Δ37-p6 相比降低了很多,表明 Sp1/3 (nt. 337-347)和 YY1 (nt. 310-315)也是影响 p6 启动子活性的重要因子。由于 Δ24-p6 和 Δ37-p6 与野生型相比活性降低并不明显,表明 265-302 区段的 ATF/CREB1/3 (nt. 265-343)和 STAT3 结合位点(nt. 240-250, 270-280, 285-295)等主要转录因子对于维持 p6 启动子活性作用较弱。上述结果表明,302-479 区段的 CTCF、YY1、STAT3、Sp1/3 和 E2F7 结合位点是影响 p6 启动子活性的主要区域。

2.3 CpG 岛甲基化对 p6 启动子活性的影响

为了探讨 B19 病毒 p6 启动子是否存在 CpG 位点,利用 CpG 岛在线预测软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>),对大部分细小病毒科成员进行了 CpG 岛的预测,结果发现细小病毒亚科大部分成员的基因组两端或者基因组中部的结构基因前端存在明显的 CpG 岛,分析显示该区域主要位于病毒启动子区(表 2)。图 4A 所示仅为 B19 病毒 CpG 位点预测结果,其 p6 启动子区存在显著的 CpG 岛(nt. 49-383)。

为了探究 CpG 甲基化修饰是否具有抑制 B19 病毒启动子活性的作用,利用 CpG 甲基转移酶 M.Sss I 处理 pGL3-p6-EGFP 质粒,取等量的质粒分别转染 HeLa 细胞,48 h 后于荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况。如图 4B 所示,经过 M.Sss I 处理后,表达 EGFP 的细胞数量明显减少。该结果表明 p6 启动子区 CpG 岛的体外甲基化能够显著影响其下游基因的表达水平,推测 p6 启动子 CpG 位点在 B19 病毒基因表达过程中扮演重要的角色。

表 2 细小病毒科代表成员启动子区 CpG 岛预测

Table 2 The prediction of CpG island in prototype of Parvovirus promoter region

病毒启动子	CpG 岛	启动子区域
Viral promoter	CpG island	Promoter region
HBoV1-p5	49-118, 279-343	97-351
MVMp-p4	50-117	1-209
MVMp-p38	1 946-2 075	1 840-2 030
ParV4-p6	49-443	1-262
ParV4-p38	1 908-2 008	1 670-1 965
B19-p6	49-383	198-630

A

```

AAGATGGCGGACAATTACGTCATTTCCCTGTGACGTCATTC
CTGTGACGTCACTTCCGGTGGGCGGGACTTCCGGAATTAG
GGTTGGCTCTGGGCCAGCTTGCTTGGGGTTGCCTTGACAC
TAAGACAAGCGGCGCGCCGCTTGATCTTAGTGGGCACTCA
CTCF CREB3/3L1
ACCCCAAGCGCTGGCCAGAGCCAACCCTAATTCCGGAA
CTCF STAT3
Sp1/3 Ets ATF/CREB3 STAT3 ATF/CREB1
GTCCCGCCACCGGAAGTGACGTACAGGAATGACGTC
STAT3 ATF/CREB1 YY1
ACAGGAAATGACGTAATTGTCCGCCATCTTGTACCGGAA
Sp1/3
GTCCCGCCTACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTTGGT
STAT3
GTCTTCTTTAAATTTT
    
```

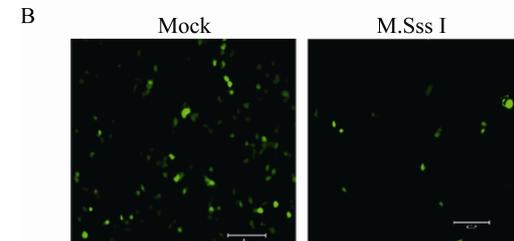


图 4 B19 病毒 CpG 岛预测(A)及甲基化修饰对 p6 启动子活性的影响(B)

Figure 4 The prediction of CpG islands in B19 viral genome (A) and the methylation modification effects on p6 promoter activity (B)

Note: Scale bar=100 μm.

2.4 B19 病毒非结构蛋白对 p6 启动子的调控作用

研究证实 B19 病毒 NS1 蛋白可激活 p6 启动子活性。11 kD 以及 X 蛋白是否也具有类似的功能?按照前述方法,通过相对荧光素酶的活性来表征 B19 病毒非结构蛋白对病毒 p6 启动子活性的影响,结果如图 5 所示。与对照组相比,NS1 和 X 蛋白均能上调 p6 启动子的活性,但是 11 kD 蛋白

不能上调 p6 启动子的活性。

2.5 B19 病毒非结构蛋白 11 kD 对细胞内因子 TNF- α 、IL6、STAT3 启动子的调控作用

研究显示,人细小病毒 B19 的主要非结构蛋白 NS1 可激活细胞内因子 IL6、TNF- α 、STAT3、IFN β 等的表达^[1]。11 kD 蛋白作为 B19 病毒重要的非结构蛋白是否具有类似的功能?本研究通过荧光素酶报告系统对 11 kD 蛋白与相关细胞因子启动子的关系进行了探究,结果发现 11 kD 蛋白均能显著上调细胞因子 IL6、TNF- α 和 STAT3 启动子的活性,而 IFN β 启动子的活性不能被激活(图 6)。

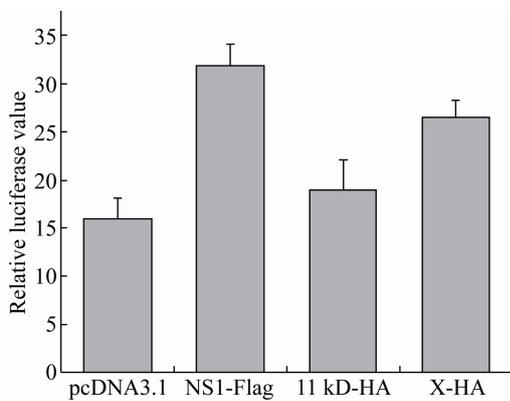


图 5 NS1、11 kD 和 X 蛋白对 p6 启动子调控作用比较
Figure 5 Differential regulatory effects of NS1, 11 kD and X protein on p6 promoter in HeLa cells

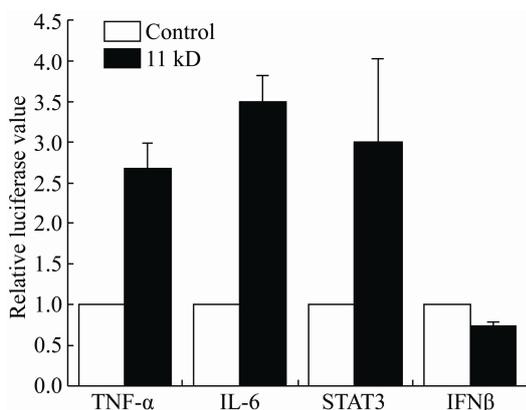


图 6 11 kD 蛋白对细胞内因子启动子的调控
Figure 6 Regulation of cellular factor promoter by 11 kD protein

3 讨论与结论

B19 病毒具有细胞趋性,主要感染来源于骨髓的红细胞祖母细胞(human erythroid progenitor cells, hEPCs)和胚胎的造血干细胞(fetal haemopoietic cells)^[1]。与 CMV 等启动子相比,B19 病毒 p6 启动子在上述来源的细胞系中活性最高。研究表明 p6 启动子在 HeLa、BJAB、CEM、K562 等细胞中仍然具有较高的活性^[7]。本研究发现 p6 启动子在 HeLa、HEK-293T/293、RD、RK13 等非敏感细胞系中也具有和 CMV 启动子类似的较高活性,而对于 B19 病毒的潜在启动子 p44 并未检测到活性,这与以前的报道^[8]一致。另外,和其他细小病毒科成员的启动子一样,p6 启动子也受细胞内的转录因子调控,如 Sp1/3、YY1 和 EBS。本研究中,我们通过预测分析及相应的截短实验,鉴定了影响启动子活性的关键区域及重要转录因子结合位点为 nt. 302-479 区段;该区域为 CTCF、YY1、STAT3 和 Sp1/3 的转录结合位点(图 1、2)。由于病毒基因组的 CTCF 结合位点可通过激活或抑制病毒的转录影响病毒基因的表达和病毒的复制^[9]。因此,B19 病毒 p6 启动子的 CTCF 位点可能在病毒 RNA 转录过程中扮演重要角色。如图 3 所示,p6 启动子中 CTCF 区段的截短能显著降低其活性,初步表明 CTCF 可能通过上调 p6 启动子转录活性而影响 B19 病毒的转录和复制。

本研究通过荧光素酶报告系统发现 11 kD 蛋白不能上调 p6 启动子活性,这与以前关于 11 kD 蛋白不影响 B19 病毒 RNA 转录的研究结果一致,但 11 kD 蛋白却能上调细胞内因子 TNF- α 、IL6、STAT3 启动子的活性。我们前期研究发现,11 kD 蛋白通过激活细胞内 NF- κ B 信号途径上调相关启动子的活性^[10],而 NF- κ B 所调节的大量炎性因子和趋化因子,包括 IL6、IL8、趋化因子 CXCL1 等在自身免疫性疾病中起重要作用^[11]。同时,B19 病毒作为引起自主性免疫疾病的重要病原,主要依赖于 NS1 蛋白激活的 IL6 和 TNF- α 等细胞因子以

及细胞对 NS1 蛋白的过量免疫保护反应导致的损伤^[1,12]。鉴于 11 kD 蛋白也能够激活细胞因子 IL6 和 TNF- α 启动子的活性(图 6), 我们推测 11 kD 蛋白在 B19 病毒引起机体自主性免疫疾病方面起着和 NS1 蛋白类似的作用, 并且该过程可能主要依赖于 NF- κ B 信号途径。此外, 11 kD 蛋白通过其脯氨酸基序与生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 互作并降低细胞内细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)活性, 进而促进 B19 病毒的复制^[6], 这表明 11 kD 蛋白促进 B19 病毒的复制需要其他辅助细胞因子的协助。本文中, 我们预测并初步发现 p6 启动子区存在能影响其启动子活性的 STAT3 结合位点, 结果表明 11 kD 蛋白还可通过上调胞内 STAT3 的表达影响 p6 启动子的活性, 并促进相关病毒蛋白的表达, 进而调控病毒基因组的复制。因此, 上述发现的 11 kD 蛋白作用于细胞因子启动子激活的功能, 将为研究 B19 病毒与宿主细胞的相互作用提供新的思路和方向, 具有重要的意义。

研究表明, 启动子区 CpG 岛的高甲基化不仅是导致抑癌基因失活的重要因素, 还与病毒的复制周期相关。例如: 单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)的潜伏期与重新激活阶段, 艾滋病毒(human immunodeficiency virus, HIV)或者人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的病毒基因组整合到宿主基因组阶段都会伴随 CpG 岛的高甲基化^[3,13]。本文中, 我们通过软件分析预测发现主要细小病毒的启动子区都含有 CpG 岛(表 2), 并且实验结果显示 p6 启动子 CpG 岛的甲基化能够降低下游外源基因的表达(图 4)。另外, 研究发现超过 41% 的 CTCF 位点对于 CpG 甲基化敏感^[14]。因此, 鉴于 p6 启动子区 CTCF 位点以及 CpG 岛的甲基化在维持 p6 启动子活性方面的作用, 我们推测 B19 病毒 p6 启动子的 CpG 岛甲基化效应可能与其存在的众多转录因子结合位点有关, 而且这种效应可能通过影响病毒启动子的活性调控病毒的转录和基因表达, 进而影响病毒的复制增殖, 引起病毒持续性

感染。

REFERENCES

- [1] Qiu JM, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human parvoviruses[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30(1): 43-113
- [2] Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, et al. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3[J]. *Virology*, 2002, 293(1): 86-93
- [3] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes[J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1546-1558
- [4] Ganaie SS, Chen AY, Huang C, et al. RNA binding protein RBM38 regulates expression of the 11-kilodalton protein of parvovirus B19, which facilitates viral DNA replication[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(8): e02050-17
- [5] Chen AY, Zhang EY, Guan WX, et al. The small 11kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells[J]. *Blood*, 2010, 115(5): 1070-1080
- [6] Xu P, Chen AY, Ganaie SS, et al. The 11-kilodalton nonstructural protein of human parvovirus B19 facilitates viral DNA replication by interacting with Grb2 through its proline-rich motifs[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(1): e01464-18
- [7] Gareus R, Gigler A, Hemauer A, et al. Characterization of *cis*-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(1): 609-616
- [8] Doerig C, Hirt B, Antonietti JP, et al. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription[J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(1): 387-396
- [9] Pentland I, Parish JL. Targeting CTCF to control virus gene expression: a common theme amongst diverse DNA viruses[J]. *Viruses*, 2015, 7(7): 3574-3585
- [10] Dong YM, Huang Y, Peng JX, et al. Regulatory effect of 11kDa protein of parvovirus B19 on NF- κ B pathway in HeLa cells[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(7): 965-973 (in Chinese)
董衍明, 黄玉, 彭建新, 等. B19 病毒 11 kDa 蛋白对 HeLa 细胞内 NF- κ B 信号通路的影响[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(7): 965-973
- [11] Sen R, Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism[J]. *Cell*, 1986, 47(6): 921-928
- [12] Kerr JR. The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of autoimmunity and autoimmune disease[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2016, 69(4): 279-291.
- [13] Blazkova J, Trejbalova K, Gondois-Rey F, et al. CpG methylation controls reactivation of HIV from latency[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(8): e1000554
- [14] Wang H, Maurano MT, Qu HZ, et al. Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation[J]. *Genome Research*, 2012, 22(9): 1680-1688