

阳佑天, 张琼, 张博越, 等. 狂犬病病毒 G 蛋白的过表达及对病毒的抑制[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(6): 10-17.

狂犬病病毒 G 蛋白的过表达及对病毒的抑制

阳佑天, 张 琼, 张博越, 刘文俊, 罗永文, 赵 静,
梅明珠, 张 莹, 罗 均, 郭霄峰
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探究 G 蛋白在狂犬病病毒 (Rabies virus, RABV) 复制中的作用, 以揭示携带双 G 基因的重组 RABV 的 Hep-dG 与亲代毒株 rHep-Flury 在神经母细胞瘤 (NA) 细胞中滴度差异的原因, 为 RABV 致病机制的研究奠定基础。【方法】通过病毒吸附、入侵、荧光定量 PCR、Western-blot 以及中和抗体阻断等试验, 检测 G 蛋白过表达对 *IFN-β* 以及相关因子转录的影响。【结果】Hep-dG 感染能显著上调 NA 细胞中 *IFN-β* mRNA 的表达, 激活了下游因子 STAT1 的表达与磷酸化, 在较低的感染复数 (MOI=0.01) 下, Hep-dG 感染后 24 h 即可显著促进 *IFN-β* 基因的表达, 36 h 达到最高水平 ($P<0.001$)。该病毒进入细胞后, 产生了更多的病毒 Leader RNA 和 *RIG-I* mRNA, 且与 *IFN-β* mRNA 的表达高度一致。抗体阻断 *IFN-β* 后, Hep-dG 在 NA 细胞中的病毒滴度显著上升 ($P<0.01$), 约为阻断前的 7.9 倍, 且与亲代毒株 rHep-Flury 无显著差异。与阴性对照比较, 5 μg 的 pH-G 质粒转染能刺激 *IFN-β* 的转录 ($P<0.05$), 表明真核表达 RABV G 蛋白能在一定程度上刺激 *IFN-β* 的转录。【结论】本研究初步揭示了 G 蛋白激活先天性免疫应答的原因和作用。RABV G 蛋白的过表达, 通过促进病毒 Leader RNA 的转录, 激活了 *RIG-I* 介导的 *IFN-β* 通路, 进而抑制了 Hep-dG 在 NA 细胞的繁殖。G 蛋白的过表达也对干扰素通路起到一定的作用。

关键词: 狂犬病病毒; G 蛋白; *IFN-β* 通路; β 干扰素; 病毒滴度
中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2018)06-0010-08

Over-expression of rabies virus G protein and its inhibitory effect on the virus in neuroblastoma cells

YANG Youtian, ZHANG Qiong, ZHANG Boyue, LIU Wenjun, LUO Yongwen, ZHAO Jing,
MEI Mingzhu, ZHANG Ying, LUO Jun, GUO Xiaofeng
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To explore the role of G protein in rabies virus (RABV) replication, reveal the reason for the difference of virus titer in neuroblastoma (NA) cells between the recombinant RABV Hep-dG with dual copy of G gene and the parental strain rHep-Flury, and lay a foundation for the study of RABV pathogenesis. 【Method】The effects of G protein over-expression on transcriptions of *IFN-β* and related factors were examined by the virus binding assay, virus entry assay, fluorescence quantitative PCR, Western-blot and neutralizing antibody blocking assay. 【Result】Hep-dG infection significantly increased the expression of *IFN-β* mRNA and activated the expression of the downstream factor STAT1 in NA cells. Under the low multiplicity of infection (MOI=0.01), the expression of *IFN-β* gene significantly increased at 24 h after Hep-dG infection and

reached the highest level at 36 h. After the virus entered the cells, there were more viral Leader RNA and *RIG-I* mRNA, which were highly consistent with the expression of *IFN-β* mRNA. The block of *IFN-β* expression by neutralizing antibody in NA cells significantly increased the virus titer of Hep-dG in cell culture supernatant($P<0.01$), which was 7.9 times before blocking. Meanwhile the virus titer of Hep-dG had no significant difference with the parental strain rHep-Flury. Compared with the negative control, transfection of 5 μg pH-G plasmid could stimulate the transcription of *IFN-β*($P<0.05$), which showed that eukaryotic expression of RABV G protein could stimulate *IFN-β* transcription to a certain extent. 【Conclusion】 This study preliminarily reveals the cause and role of G protein in activating innate immune response. Over-expression of RABV G protein activates the *RIG-I*-mediated *IFN-β* pathway by promoting transcription of the viral Leader RNA, which in turn inhibits Hep-dG replication in NA cells and finally results in the lower virus titer in NA cells.

Key words: rabies virus; glycoprotein; *IFN-β* pathway; interferon-β; virus titer

狂犬病是一种重大的人畜共患病,它是由弹状病毒科 *Rhabdoviridae* 狂犬病病毒属 *Lyssavirus* 的狂犬病病毒 (Rabies virus, RABV) 引起。RABV 基因组编码 5 种结构蛋白质,分别是核蛋白 (N 蛋白)、磷蛋白 (P 蛋白)、基质蛋白 (M 蛋白)、跨膜糖蛋白 (G 蛋白) 和病毒聚合酶蛋白 (L 蛋白)。病毒基因组 RNA 与核蛋白、磷蛋白和聚合酶蛋白缠绕组成核糖核蛋白 (RNP), 成为 RABV 的复制单位^[1-2]。M 蛋白在病毒装配和出芽过程中发挥重要作用,其在 G 蛋白的辅助作用下介导病毒粒子和细胞的分离,从而顺利出芽^[3-4]。G 蛋白是唯一一刺激机体产生中和抗体的表面抗原,同时也能诱导 T 细胞,刺激机体产生细胞免疫,不仅能在中枢神经系统 (CNS) 中清除病毒,也能诱导神经细胞发生凋亡^[5-7]。研究表明,RABV 感染后发生的细胞凋亡主要由 G 蛋白引起,且病毒的毒力越弱诱导的凋亡越严重^[8-10]。

前期的研究发现,携带双 G 基因的重组 RABV Hep-dG 感染神经母细胞瘤 (Neuroblastoma, NA) 细胞后病毒滴度明显低于亲代毒株 rHep-Flury^[11],而在 BHK-21 细胞中没有相同现象^[8]。蛋白质组研究发现,Hep-dG 感染 NA 细胞后诱发干扰素通路上游和下游蛋白的大量上调,生物信息学预测结合 Western-blot 和荧光定量 PCR 证明干扰素通路仅在 Hep-dG 感染组强烈激活,表明 RABV 弱毒病毒 G 蛋白的过表达与干扰素的诱导呈高度的正相关^[11],由于 BHK-21 是 *RIG-I* 介导 *IFN* 通路的缺陷型细胞^[12],推测 2 株重组 RABV 在 BHK-21 细胞和 NA 细胞中的病毒滴度可能与干扰素通路的激活有关。在此基础上,本研究进一步研究重组 RABV 感染 NA 细胞诱导产生干扰素的原因,以揭示 G 蛋白与干扰素诱导之间的内在关系;并通过抗体阻断试验,证明干扰素诱导在 RABV 复制中的作用。

<http://xuebao.scau.edu.cn>

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 鼠 NA 细胞,购自武汉生物制品研究所,在含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中培养;亲代 RABV rHep-Flury 和携带双 G 基因的重组 RABV Hep-dG^[8],保存于华南农业大学兽医微生物实验室。

1.1.2 质粒 pH-G(含有狂犬病病毒 Hep-Flury 株的 G 基因),由日本国立传染病研究所 Dr. Morimoto 教授惠赠。pH-M 和 pH-GFP,均由华南农业大学兽医微生物实验室罗永文博士在 pcDNA3.2 插入了 Hep-Flury 的 M 基因和 GFP 基因而构建。

1.1.3 主要试剂 STAT1、p-STAT1 和 β-actin 单克隆抗体,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和绿色荧光 Dylight 488 标记的山羊抗鼠 IgG,均为美国 Bioworld 公司产品。小鼠抗 *IFN-β* 中和抗体和正常鼠源 IgG 阴性对照,购自美国 R&D 公司。Clontech Xfect 质粒转染试剂购自日本 TaKaRa 公司。荧光定量 PCR 试剂盒 (THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix) 购自日本东洋纺公司。抗 RABV G 蛋白和 M 蛋白单克隆抗体由华南农业大学兽医微生物实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量 PCR 检测 *IFN-β* mRNA 的表达 将 rHep-Flury 和 Hep-dG 以相同的感染复数 (MOI=0.01) 感染 6 孔板中的 NA 细胞,同时设未接毒的细胞为空白对照。在接毒后 12、24、36 和 48 h,用 1 mL 4 ℃ 预冷的 PBS(pH7.4, 0.01 mol·L⁻¹) 洗涤细胞 1 次,再加入 1 mL Trizol,抽提 RNA,定量检测不同时间 *IFN-β* mRNA 的表达。

1.2.2 Western-blot 检测 STAT1 和 p-STAT1 的表达 将 rHep-Flury 和 Hep-dG 以相同的感染复数

(MOI=0.01) 感染 6 孔板中的 NA 细胞, 同时设未接
毒的细胞作为空白对照。在接毒后 24 和 48 h, 分别
提取细胞蛋白, 进行 STAT1 和 p-STAT1 的蛋白定
量和 Western-blot 检测。

1.2.3 重组病毒吸附细胞能力的检测 将 rHep-Flury
和 Hep-dG 分别以 MOI 为 0.01、0.10 和 1.00 接种
6 孔板中的 NA 细胞, 同时设未接毒的细胞作为空

白对照。细胞在 4 ℃ 冰箱内放置 2 h 后, PBS 洗去
未结合的病毒粒子, 然后提取细胞 RNA, 以特异引
物 vRNA-F 和 vRNA-R(表 1) 进行荧光定量 PCR
(同时以 GAPDH-F 和 GAPDH-R 为参照) 检测细胞
表面病毒的基因组 vRNA, 由此可检测不同重组
RABV 的吸附能力^[13]。

表 1 荧光定量 PCR 检测引物
Table 1 Primers used for fluorescence quantitative PCR detection

被检基因	引物序列	引物名称	产物长度/bp
Leader RNA	Leader-F	5'-CCAGATGCTTGCGTCCT-3'	67
	Leader-R	5'-ACGCTTAACAACAAAACC-3'	
vRNA	vRNA-F	5'-GGAAAAGGGACATTTGAAAGAA-3'	130
	vRNA-R	5'-AGTCCTCGTCATCGGAGTTGAC-3'	
RIG-I	RIGI-F	5'-GCAAGTGCTTCCTCCTGACC-3'	142
	RIGI-R	5'-ATGCGGTGAACCGTCTTTCC-3'	
GAPDH	GAPDH-F	5'-AGAGTGTTTCCTCGTCCCGT-3'	199
	GAPDH-R	5'-CTGTGCCGTTGAATTTGCCG-3'	

1.2.4 重组病毒入侵细胞能力的检测 将 rHep-Flury
和 Hep-dG 分别以 MOI 为 0.01、0.10 和 1.00 接种
6 孔板中的 NA 细胞, 同时设未接毒的细胞为空白
对照。细胞在 4 ℃ 冰箱内放置 2 h 后, PBS 洗去未
结合的病毒粒子, 继续在 37 ℃ 细胞培养箱放置 2 h。
用质量分数为 0.25% 不含 EDTA 的胰酶处理病毒
吸附的细胞膜, 去掉细胞膜表面 RABV, 然后提取
细胞 RNA, 用荧光定量 PCR 检测内部残余的病毒
基因组 vRNA, 即为入侵细胞的病毒量。

1.2.5 重组病毒 Leader RNA、vRNA 和 RIG-I 转录
水平的检测 将 rHep-Flury 和 Hep-dG 以 MOI=
0.01 接种 12 孔板中的 NA 细胞, 同时设未接毒的
NA 细胞作为空白对照。分别在感染后 12、24、36
和 48 h 取出细胞, 弃培养液。用 PBS 洗涤细胞 1 次,
每孔加入 500 μL Trizol 裂解液, 抽提样品 RNA。
以 5'-CCAGATGCTTGCGTCCTCTTTGCAACT
GACGATGT-3'和 5'-GGAAAAGGGACATTTG
AAAGAA-3'为反转录引物, 分别合成 RABV Leader
RNA 和 vRNA 的 cDNA。RIG-I 的反转录不需要特
异性的反转引物, 使用 ReverTra Ace® qPCR RT
Master Mix with gDNA Remover 逆转录反应试剂盒
进行反转录。以表 1 的特异引物将获得的 cDNA 进
行荧光定量 PCR 检测, 同时 GAPDH 作为内参引物。

1.2.6 重组病毒 Leader RNA 的二级结构分析 通
过 RNA fold Web SeVer 在线软件分析 2 株重组
RABV Leader RNA 的二级结构。

1.2.7 pH-G 与 pH-M 质粒在 NA 细胞上的表达
将 5 μg 质粒 DNA 用转染缓冲液稀释至最终体积
为 100 μL, 添加 1.5 μL Xfect Polymer, 在涡旋混匀
器中混匀 10 s。室温孵育 10 min 后, 加入到细胞汇
合度为 50%~70%、37 ℃ 培养了 12~16 h 的 NA 细
胞中。37 ℃ 继续培养 4 h 后, 更换培养液后, 放入 37 ℃
细胞培养箱, 分别在 24、48 和 72 h 后取出, 加入抗
G 和 M 蛋白抗体, 进行间接免疫荧光检测。

1.2.8 IFN-β 的转录水平和抗体阻断试验 将 pH-G
与 pH-M 质粒 DNA 按上述方法转染 NA 细胞, 在
合适的时间点取出, 提取 RNA, 荧光定量 PCR 检测
真核表达 G、M 蛋白后 IFN-β 的转录水平。

将 NA 细胞铺于 6 孔板中, 37 ℃ 培养 12~16 h。
待细胞汇合度为 80%, 弃培养液, 在各孔中加入
2 mL 无血清的 DMEM 和 Anti-IFN-β(10 mg·L⁻¹),
预处理细胞 1 h。将 rHep-Flury 和 Hep-dG 以
MOI=0.01 接种 NA 细胞, 在 37 ℃ 吸附 1 h, 同时设
未接毒的 NA 细胞作为空白对照。更换含有 Anti-
IFN-β 的新鲜培养基。在接毒后 48 h, 收集上清液,
检测 RABV 的病毒滴度。同时, 提取细胞 RNA, 用
荧光定量 PCR 检测 IFN-β 的阻断情况^[14]。

2 结果与分析

2.1 重组病毒感染 NA 细胞对 IFN-β 通路的影响
为了确定重组 RABV 感染对 NA 细胞产生
IFN-β 的影响, 在接毒后 12、24、36 和 48 h, 通过荧

光定量 PCR 分别对 rHep-Flury 和 Hep-dG 感染细胞和空白对照细胞 *IFN-β* 的转录水平进行了分析, 结果如图 1a 所示。在较低的感染复数 (MOI=0.01) 下, Hep-dG 感染后 24 h 即可显著促进 *IFN-β* 基因的表达, 36 h 达到最高水平 ($P<0.001$)。同时, Hep-dG

感染 24 和 48 h 均可激活 STAT1 的磷酸化, Hep-dG 感染组的 STAT1 的表达水平较亲代毒株 rHep-Flury 明显提高 (图 1b)。由此说明, 在 NA 细胞中, Hep-dG 感染能显著上调 *IFN-β* mRNA 的表达和激活干扰素下游因子 STAT1。

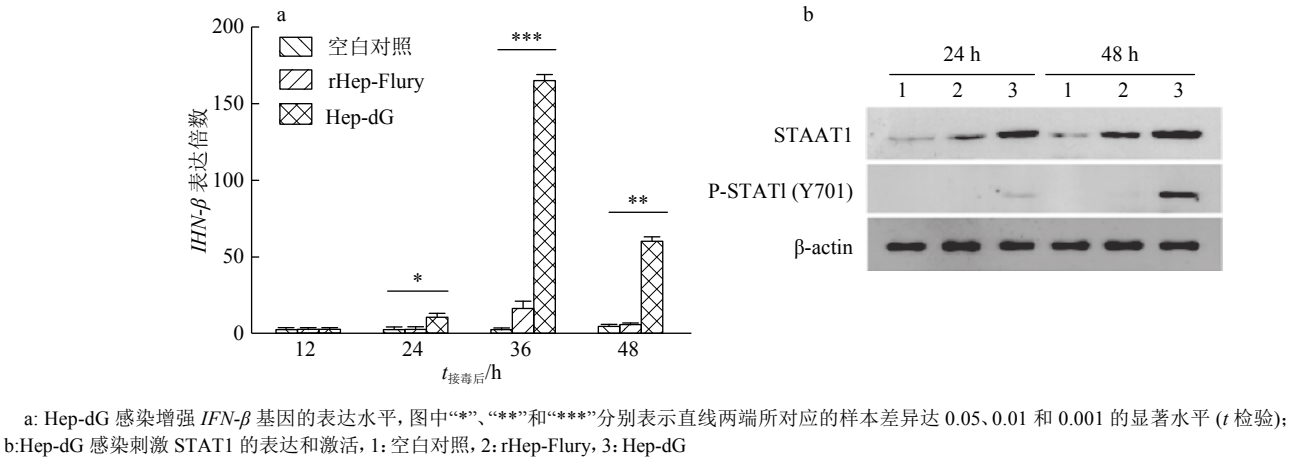


图 1 Hep-dG 感染 NA 细胞激活 *IFN-β* 信号通路
Fig. 1 Hep-dG infection activated the *IFN-β* signaling pathway in NA cells

2.2 重组病毒对 NA 细胞的吸附能力和入侵能力分析

为了比较 G 蛋白过表达的 Hep-dG 株与亲代毒株 rHep-Flury 对 NA 细胞的吸附能力, 我们模拟了病毒吸附 NA 细胞的过程, 并用荧光定量 PCR 检测了细胞表面病毒。结果 (图 2a) 表明, Hep-dG 在不同感染复数下对 NA 细胞的吸附能力均高于 rHep-Flury。在很低的感染复数 (MOI=0.01) 下, Hep-dG 对 NA 细胞的吸附能力也明显高于 rHep-Flury ($P<0.01$)。为了比较 G 蛋白过表达的 Hep-dG 与 rHep-Flury 对 NA 细胞的入侵能力, 我们模拟了病毒进入 NA 细胞的过程, 并用荧光定量 PCR 检测了入侵细胞的病毒量。结果 (图 2b) 表明, 在较高感染复数 (MOI=1.00) 下, Hep-dG 进入 NA 细胞的

能力显著高于 rHep-Flury ($P<0.01$); 而在很低的感染复数 (MOI=0.01) 下, Hep-dG 进入 NA 细胞的能力与 rHep-Flury 无显著性差异。表明在较高的感染复数下, G 蛋白的过表达显著提高了 RABV 对神经细胞的吸附与入侵能力。

2.3 重组病毒 Leader RNA 和 vRNA 与 *RIG-I* 基因的关系

为了研究重组 RABV 在细胞内 Leader RNA 的表达差异, 将 Hep-dG 与 rHep-Flury 以相同的感染复数 (MOI=0.01) 感染 NA 细胞, 利用荧光定量 PCR 检测了不同时间点细胞内 Leader RNA 的含量, 同时检测了病毒基因组 vRNA 和 *RIG-I* 基因的转录水平, 结果见图 3。图 3a 显示, 在感染后的不同时间点, Hep-dG Leader RNA 在 NA 细胞中的含

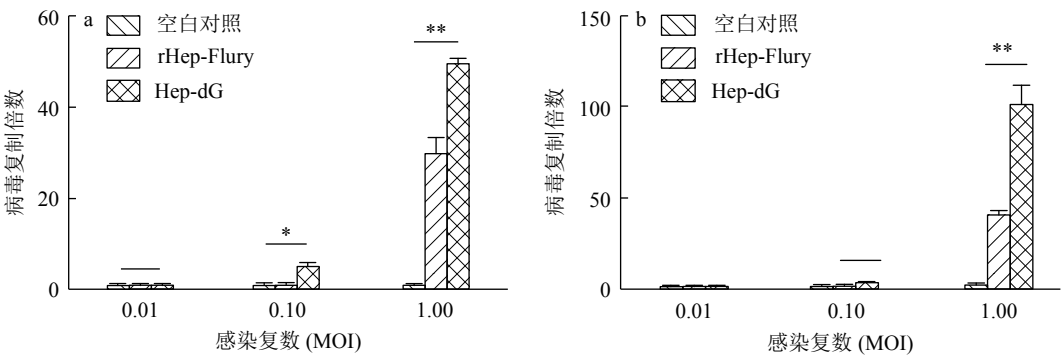
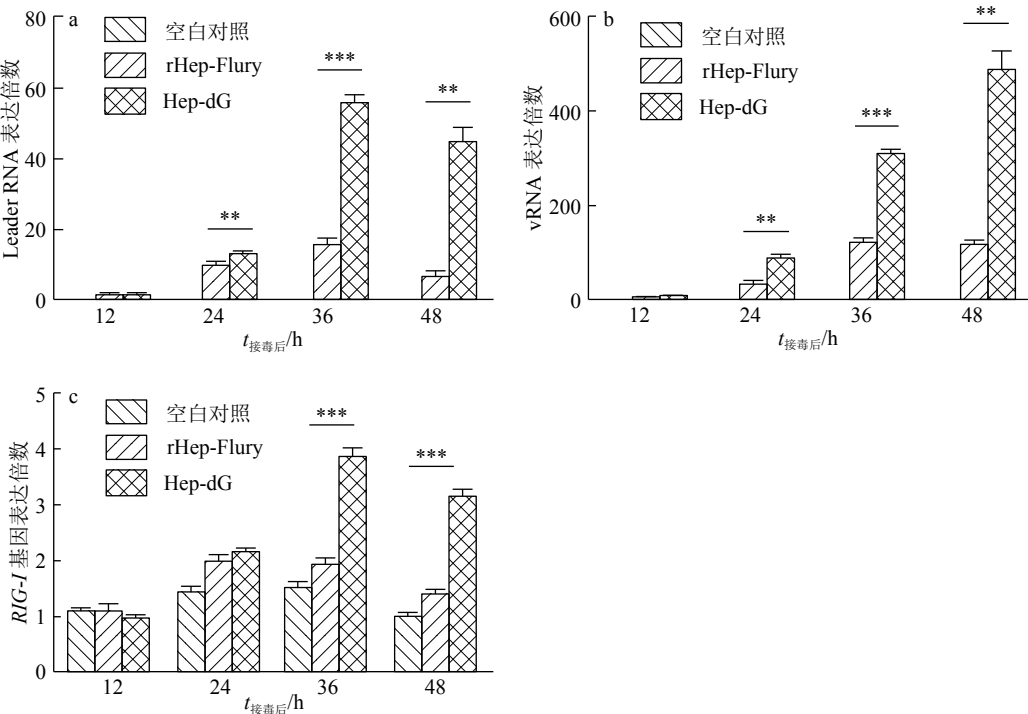


图 2 狂犬病病毒吸附和入侵 NA 细胞的分析

Fig. 2 Analyses of RABVs adsorbing and invading NA cells under different infection multiplicities



a: Leader RNA 的表达, b: vRNA 的表达, c: *RIG-I* 基因的表达; 各图中“**”和“***”分别表示直线两端所对应的样本差异达 0.01 和 0.001 的显著水平 (*t* 检验)

图 3 狂犬病毒感染对 Leader RNA、vRNA 和 *RIG-I* 基因表达的影响

Fig. 3 Effects of rabies virus infections on expressions of Leader RNA, vRNA and *RIG-I* gene

量明显高于亲代毒株 rHep-Flury, 其趋势与 *IFN-β* 基因的表达 (图 1a) 一致。Hep-dG Leader RNA 的表达量在接毒后 36 h 达到最高水平, 48 h 有所下降, 但仍然显著高于亲代毒株 rHep-Flury ($P<0.01$)。在感染 36 h 前, 细胞内 Leader RNA 与病毒基因组 vRNA 的含量趋势一致; 在感染 36 h 后, Leader RNA 的表达水平开始下降, 而 NA 细胞内 vRNA 的含量继续升高 (图 3b)。同时, RABV 感染后, 细胞内 *RIG-I* 基因的变化趋势与 Leader RNA 一致; 在接毒后 36 和 48 h, Hep-dG 感染的 NA 细胞中 *RIG-I* 基因的表达量显著高于亲代毒株 rHep-Flury (图 3c, $P<0.001$)。表明 Hep-dG 感染 NA 细胞后, 病毒的 Leader RNA 和 vRNA 升高, 诱导 *RIG-I* mRNA 增多, 导致了 *IFN-β* mRNA 增多。

2.4 重组病毒 Leader RNA 的二级结构预测

基于自由能最小的预测算法, 通过在线软件 RNAfold Web Sever 分析重组病毒 Leader RNA 的二级结构。箭头所示为 RNA 的 5' 端, 颜色越偏向红色, 代表对应处碱基处于配对的概率越大; 颜色越偏向紫色, 代表对应处碱基处于配对的概率越小, 结果如图 4 所示。由图 4 可见, rHep-Flury 与 Hep-dG 具有完全相同的 Leader RNA 序列和二级结构, 其最小自由能为 $-13.02 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。说明 2 株 RABV 毒株的 Leader RNA 在结构上没有差异,

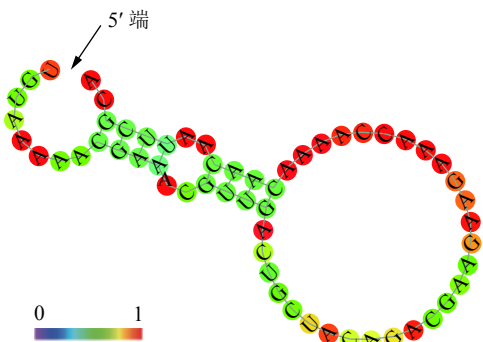


图 4 基于最小自由能的狂犬病毒 rHep-Flury 和 Hep-dG Leader RNA 的二级结构

Fig. 4 The secondary structure of rabies viruses rHep-Flury and Hep-dG Leader RNA based on the minimum free energy

IFN-β 表达量的增加是由于 Leader RNA 的转录水平提高而引起。

2.5 G、M 蛋白真核表达对 NA 细胞中 *IFN-β* 转录的影响

为了研究 G 蛋白和 M 蛋白本身的过表达对 *IFN-β* 转录的影响, 首先摸索 pH-G 和 pH-M 质粒转染细胞后表达的最佳时间点。分别将 $5.0 \mu\text{g}$ 的 pH-G 和 pH-M 重组表达质粒转染 NA 细胞, 转染相同质量的 pH-GFP 质粒作为阳性对照, 设空白细胞作为阴性对照。结果显示, 在转染后 24、48 和 72 h, pH-G、

pH-M 和 pH-GFP 质粒在 NA 细胞上均有效表达, 48 h 的荧光强度最大 (图 5a)。依据试验摸索的最佳时间, 将 pH-G 和 pH-M 质粒以 5.0 和 2.5 μg 分别转染 NA 细胞, 设空白细胞为阴性对照、空载体转染的细胞为阳性对照, 在转染后 48 h, 提取细胞 RNA, 用荧光定量 PCR 检测 *IFN- β* 的转录水平。结

果显示, 与空白细胞比较, 5 μg 的 pH-G 质粒转染能刺激 *IFN- β* 的转录 ($P<0.05$); 而转染 pH-M 质粒均不能刺激 *IFN- β* 的转录 (图 5b)。说明 G 蛋白真核表达能在一定程度上刺激 *IFN- β* 的转录, 这种刺激不依赖于 *RIG-I* 的识别, 可能对 Hep-dG 激活干扰素通路起到一定的作用。

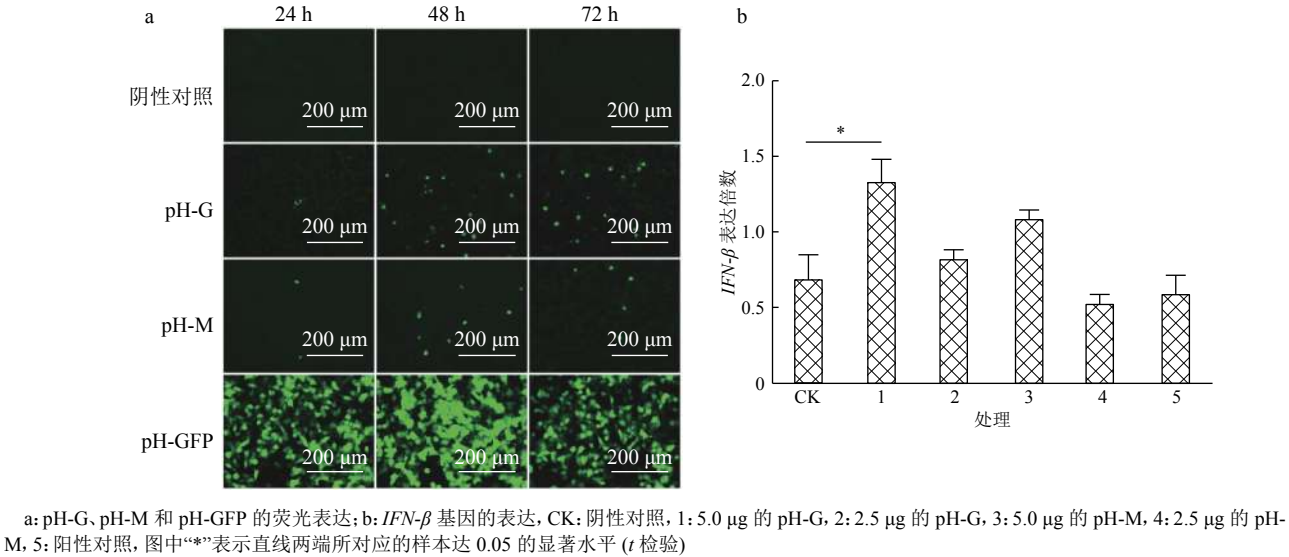


图 5 G 蛋白的真核表达对 NA 细胞中 *IFN- β* 转录的影响
Fig. 5 Effect of G protein eukaryotic expression on *IFN- β* transcription in NA cell

2.6 阻断 *IFN- β* 对重组狂犬病病毒复制的影响

为了明确 *IFN- β* 对重组狂犬病病毒复制的影响, 我们用 *IFN- β* 特异性中和抗体 (质量浓度为 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 NA 细胞以阻断 *IFN* 信号通路, 同时将正常鼠源 IgG 阴性血清处理的细胞和不做处理的细胞作为对照。结果 (图 6a) 显示, *IFN- β* 特异性中和抗体能阻断大部分 β 干扰素的转录。在阻断抗体处理后, rHep-Flury 与 Hep-dG 感染的 NA 细胞中 *IFN- β* 基因的表达均显著下调, 其中

rHep-Flury 阻断组比正常感染组下调了 1.8 倍 ($P<0.05$), 而 Hep-dG 阻断组比正常感染组下调了 3.2 倍 ($P<0.01$)。在接毒后 48 h, 收集细胞上清液, 检测抗体处理组和未处理组 2 株 RABV 的病毒滴度。结果 (图 6b) 表明, *IFN- β* 抗体处理对 NA 细胞培养上清液中 rHep-Flury 的子代病毒并无显著性影响, 而 Hep-dG 的病毒滴度显著上调 ($P<0.01$), 约为阻断前的 7.9 倍。阻断后, Hep-dG 的病毒滴度与亲代毒株 rHep-Flury 没有显著性差异。正常鼠源

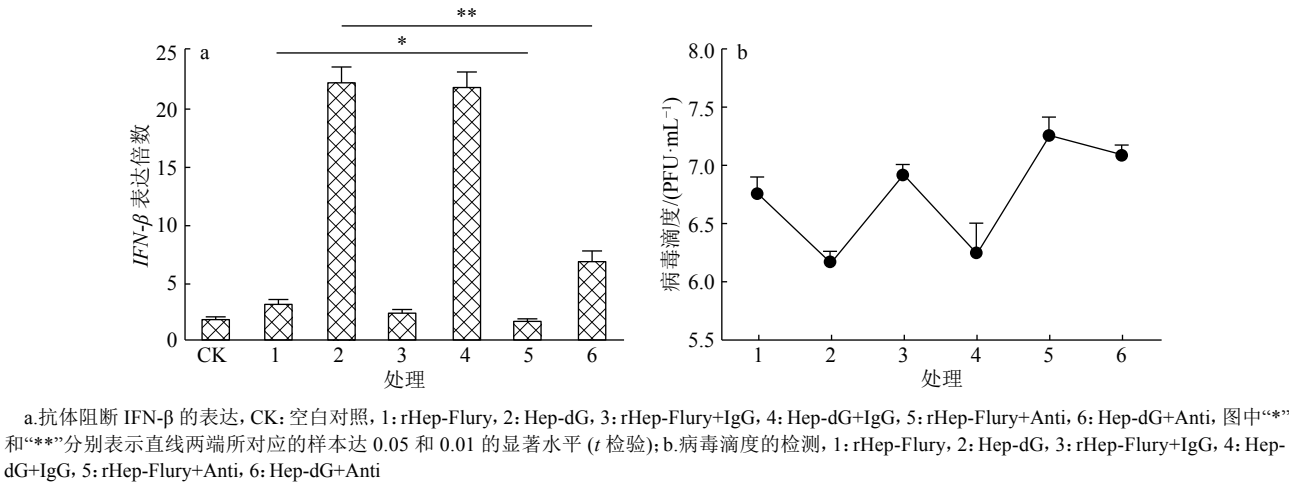


图 6 阻断 *IFN- β* 通路对狂犬病病毒复制的影响
Fig. 6 Effect of blocking *IFN- β* pathway on rabies virus replication

IgG 阴性血清处理对 2 个感染组的病毒滴度均没有显著影响。说明 NA 细胞中 IFN 通路的激活可能是 Hep-dG 滴度下降的主要原因之一。

3 讨论与结论

本实验室前期的研究发现携带双 G 基因的重组狂犬病病毒 (RABV)Hep-dG 感染 NA 细胞后滴度明显低于亲代毒株 rHep-Flury, 而在 BHK-21 细胞中没有相同现象。前期的蛋白质组研究表明, RABV 弱毒病毒 G 蛋白的过表达与干扰素的诱导呈高度的正相关^[11]。本研究检测了不同时间点 *IFN-β* mRNA 的表达和干扰素下游因子 STAT1 的表达和磷酸化水平, 结果发现, Hep-dG 在感染 NA 细胞后, 能显著上调 *IFN-β* 基因的表达, 并激活下游因子 STAT1 的表达和磷酸化。由于 BHK-21 是 *RIG-I* 介导 IFN 通路的缺陷型细胞^[12], 推测 2 株重组 RABV 在 BHK-21 细胞和 NA 细胞中的病毒滴度差异可能与干扰素通路的激活有关。

RABV 感染细胞后, 为了逃逸干扰素的作用, 通常会采取 2 种策略: 一是通过聚合酶“加帽”^[15], 或在入侵细胞后基因组 RNA 始终被 N 蛋白缠绕, 致使病毒核酸无法释放, 从而逃逸 PRRs 的识别和结合^[16-17]; 二是通过病毒 P 蛋白抑制 IRF-3 的磷酸化, 拮抗干扰素的产生^[18-20], 或阻止 STAT1 的入核, 从而抑制干扰素刺激基因的表达^[21-22]。然而, RABV 转录第一步生成的 Leader RNA 为 5' 端三磷酸化、不加帽、不加尾的 58 nt 单链 RNA, 能被 *RIG-I* 特异性识别并诱导 *IFN-β* 的释放^[23-25]。Yang 等^[13]证明, 抑制 G 蛋白表达量可降低 RABV 的入侵能力, 因其减少了 RABV Leader RNA 的复制量, 从而避免了 DCs 的激活而逃逸了宿主的免疫识别。本研究检测了不同感染复数 (MOI) 下 RABV 的吸附和入侵能力, 结果发现, 当 MOI 为 0.10 和 1.00 时, Hep-dG 对 NA 细胞的吸附能力和入侵能力均明显高于亲代毒株 rHep-Flury, 说明 G 蛋白的过表达显著提高了 RABV 对神经细胞的吸附和穿入能力。然而, 与 Yang 等^[13]的推测不同, 当 MOI 为 0.01 时, Hep-dG 进入 NA 细胞的能力与亲代毒株 rHep-Flury 无显著性差异, Leader RNA 表达量却显著高于 rHep-Flury, 说明 G 蛋白的过表达通过其他机制促进了 RABV Leader RNA 的复制量。此外, 检测病毒基因组 vRNA 和 *RIG-I* 基因的表达水平发现, 在感染 36 h 前, 细胞内 Leader RNA 与病毒基因组 vRNA 的含量趋势一致; 在感染 36 h 后, NA 细胞内 vRNA 的含量继续升高, 而 Leader RNA 的表达水平开始下

降。在接毒后 36 和 48 h, Hep-dG 感染的 NA 细胞中 *RIG-I* mRNA 的含量显著高于亲代毒株 rHep-Flury。细胞内 *RIG-I* 的变化趋势与 Leader RNA 一致, 且都与 *IFN-β* mRNA 的表达高度一致。由于, rHep-Flury 与 Hep-dG 具有完全相同的 Leader RNA 序列和二级结构, 说明过表达 G 蛋白通过促进 RABV Leader RNA 的转录水平, 从而激活了 *RIG-I* 介导的 I 型干扰素的激活。

Yang 等^[11]前期研究发现, G 蛋白的过表达也促进了 M 蛋白的表达。为了证明病毒蛋白本身过表达对干扰素通路的影响, 本研究将 pH-G 和 pH-M 质粒以 5.0 和 2.5 μg 分别转染 6 孔板 NA 细胞。结果发现, 5 μg 的 pH-G 质粒转染能刺激 *IFN-β* 的转录, 而 5.0 和 2.5 μg 的 pH-M 质粒均不能刺激 *IFN-β* 的转录。说明 G 蛋白的真核表达在一定程度上也刺激了 *IFN-β* 的转录, 可能对 Hep-dG 激活干扰素通路起到一定的作用, 而具体作用的机制需要进一步研究。*IFN-β* 特异性抗体处理 NA 细胞后, rHep-Flury 的繁殖无显著影响, 而 Hep-dG 的病毒滴度显著上升, 且滴度与亲代毒株 rHep-Flury 无显著差异。说明 NA 细胞中干扰素通路的激活是 Hep-dG 滴度下降的主要原因之一。

RABV G 蛋白的过表达通过促进 RABV Leader RNA 的转录, 激活了 *RIG-I* 介导的 *IFN-β* 通路, 进而抑制了 Hep-dG 在 NA 细胞的繁殖。此外, G 蛋白本身的过表达也对干扰素通路起到一定的作用。本研究初步揭示了 G 蛋白激活先天性免疫应答的原因和作用, 为 RABV 致病机制的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 王朝, 周明, 傅振芳, 等. 狂犬病病毒逃逸宿主天然免疫反应的研究进展[J]. 生命科学, 2017(3): 237-244.
[2] 张旭, 纪森林, 赵雯, 等. 狂犬病病毒致病机制的最新研究进展[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(3): 295-304.
[3] MEBATSION T, KONIG M, CONZELMANN K K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein[J]. Cell, 1996, 84(6): 941-951.
[4] MEBATSION T, WEILAND F, CONZELMANN K K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G[J]. J Virol, 1999, 73(1): 242-250.
[5] MACFARLAN R I, DIETZSCHOLD B, WIKTOR T J, et al. T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides[J]. J Immunol, 1984, 133(5): 2748-2752.
[6] 汪孟航, 朱洪伟, 何民辉, 等. 狂犬病病毒糖蛋白生物学功能研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2016(12): 3349-3355.
[7] FISHER C R, STREICKER D G, SCHNELL M J. The

- spread and evolution of rabies virus: Conquering new frontiers[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(4): 241-255.
- [8] LIU X, YANG Y, SUN Z, et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87105.
- [9] PREHAUD C, LAY S, DIETZSCHOLD B, et al. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis[J]. *J Virol*, 2003, 77(19): 10537-10547.
- [10] FABER M, PULMANAUSAHAKUL R, HODAWADEKAR S S, et al. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response[J]. *J Virol*, 2002, 76(7): 3374-3381.
- [11] YANG Y, LIU W, YAN G, et al. iTRAQ protein profile analysis of neuroblastoma (NA) cells infected with the rabies viruses rHep-Flury and Hep-dG[J/OL]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 691. doi: 10.3389/fmicb.2015.00691.
- [12] HABJAN M, PENSKI N, SPIEGEL M, et al. T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(9): 2157-2166.
- [13] YANG Y, HUANG Y, GNANADURAI C W, et al. The inability of wild-type rabies virus to activate dendritic cells is dependent on the glycoprotein and correlates with its low level of the de novo-synthesized leader RNA[J]. *J Virol*, 2015, 89(4): 2157-2169.
- [14] WU J, MA C, WANG H, et al. A MyD88-JAK1-STAT1 complex directly induces SOCS-1 expression in macrophages infected with Group A *Streptococcus*[J]. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(3): 373-383.
- [15] OGINO T, YADAV S P, BANERJEE A K. Histidine-mediated RNA transfer to GDP for unique mRNA capping by vesicular stomatitis virus RNA polymerase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(8): 3463-3468.
- [16] GERLIER D, LYLES D S. Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: Towards a rational model[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(3): 468-490.
- [17] MOYER S A, ABRAHAM G, ADLER R, et al. Methylated and blocked 5' termini in vesicular stomatitis virus *in vivo* mRNAs[J]. *Cell*, 1975, 5(1): 59-67.
- [18] BRZOZKA K, FINKE S, CONZELMANN K K. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: Phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3[J]. *J Virol*, 2005, 79(12): 7673-7681.
- [19] RIEDER M, CONZELMANN K K. Interferon in rabies virus infection[J]. *Adv Virus Res*, 2011, 79: 91-114.
- [20] 王林栋, 张守峰, 刘晔, 等. 基于 RIG-I 的狂犬病病毒免疫逃逸机制[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013(10): 1517-1521.
- [21] VIDY A, CHELBI-ALIX M, BLONDEL D. Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways[J]. *J Virol*, 2005, 79(22): 14411-14420.
- [22] VIDY A, EL B J, CHELBI-ALIX M K, et al. The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1[J]. *J Virol*, 2007, 81(8): 4255-4263.
- [23] PLUMET S, HERSCHKE F, BOURHIS J M, et al. Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response[J]. *PLoS One*, 2007, 2(3): e279.
- [24] FAUL E J, WANJALLA C N, SUTHAR M S, et al. Rabies virus infection induces type I interferon production in an IPS-1 dependent manner while dendritic cell activation relies on IFNAR signaling[J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(7): e1001016.
- [25] KATZ I, GUEDES F, FERNANDES E R, et al. Immunological aspects of rabies: A literature review[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(11): 3251-3268.

【责任编辑 周志红】