

引用本文:魏容,肖光军,刘艳婷,等.肠道病毒71型感染的星形胶质细胞中EV71 3C活性与NF- κ B信号转导效率的关联[J].安徽医药,2021,25(10):2022-2027.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.026.

◇临床医学◇



肠道病毒71型感染的星形胶质细胞中EV71 3C活性与NF- κ B信号转导效率的关联

魏容,肖光军,刘艳婷,杨娜

作者单位:遂宁市中心医院检验科,四川 遂宁 629000

通信作者:杨娜,女,副主任技师,研究方向为临床检验诊断学,Email:544534244@qq.com

基金项目:遂宁市科技计划项目(2015s15)

摘要: **目的** 探究肠道病毒71型感染的星形胶质细胞中肠病毒71(EV71)3C蛋白酶活性与核因子 κ B(NF- κ B)信号转导效率的关联。**方法** 本研究起止时间为2018年3月至2019年3月。通过将EV71病毒感染星形胶质细胞后,经过质粒提取、转化、定点突变、基因转变等步骤,将TANK结合激酶1(TBK1)复合体切割后,分别导入肿瘤坏死因子受体相关因子2(TRAF2)质粒和TANK结合激酶1(TBK1)质粒,观察其对NF- κ B表达的影响。同时,EV71感染后,通过RT-PCR和Western blotting法对细胞内相关基因表达,并对EV71 3C活性进行检测,得到蛋白酶活性与NF- κ B表达关系,判断其关联。**结果** EV71感染可诱导TBK1和其复合体蛋白TAB1/2/3的降解,并呈现时间依赖性(24h: TAB1: 125.86 $\pm$ 39.87; TAB2: 352.12 $\pm$ 42.36; TAB3: 195.20 $\pm$ 29.75),但对于肿瘤坏死因子受体相关因子2(TRAF2)和TANK结合激酶1(TBK1)表达无影响。同时,细胞内白细胞介素-6(IL-6)(19.4 $\pm$ 0.62)、白细胞介素-8(IL-8)(13.8 $\pm$ 2.89)、白细胞介素-12(IL-12)(13.0 $\pm$ 0.68)及IL-1 β (14.6 $\pm$ 0.96)的表达均在12h后显著提高;TAB2可诱导NF- κ B激活,而与3C共同表达时可显著抑制NF- κ B表达,3C亦可显著抑制由TAK1复合体作用诱导NF- κ B的激活。不同浓度EV71感染后,细胞内EV71 3C活性出现明显差异,而随着蛋白酶活性的增加,细胞内NF- κ B mRNA和蛋白的表达均成明显的下调趋势。**结论** 肠道病毒71型感染的星形胶质细胞中EV71 3C可通过调节TAK1蛋白表达,达到抑制NF- κ B信号转导的作用。

关键词: 肠道病毒感染; 星形细胞; EV71 3C蛋白; 转化生长因子 β 活化激酶-1; 核因子- κ B信号通路

Correlation between EV-type 3C protease activity and NF- κ B signal transduction efficiency in astrocytes infected with enterovirus 71

WEI Rong, XIAO Guangjun, LIU Yanting, YANG Na

Author Affiliation: Department of Clinical Laboratory, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629000, China

Abstract: **Objective** To investigate the association between the activity of enterovirus 71 type 3C protease and NF- κ B signal transduction efficiency in astrocytes infected with enterovirus 71. **Methods** The starting and ending time of this study was from March 2018 to March 2019. After infecting astrocytes with EV71 virus, the Tank-bound kinase 1 (TBK1) complex was cleaved after plasmid extraction, transformation, site-directed mutagenesis and gene transformation, and then transferred into the tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) plasmid and the TBK1 plasmid respectively to observe its effect on NF- κ B expression. At the same time, after EV71 infection, the expression of intracellular related genes and EV71 3C protease activity were detected by RT-PCR and Western blotting, and the correlation was determined according to the relationship between activity and NF- κ B expression. **Results** EV71 infection induced the degradation of TBK1 and its complex protein tab1/2/3 in a time-dependent manner (24h: tab1: 125.86 $\pm$ 39.87; TAB2: 352.12 $\pm$ 42.36; TAB3: 195.20 $\pm$ 75), but had no effect on the expression of TRAF2 and TBK1. At the same time, IL-6 (19.44 $\pm$ 0.62), IL-8 (13.80 $\pm$ 0.89), IL-12 (13.02 $\pm$ 0.68) and IL-1 β (14.6 $\pm$ 0.96) increased after 12 hours of infection; TAB2 could induce the activation of NF- κ B, but co-expression with 3C could significantly inhibit the expression of NF- κ B. 3C could also significantly inhibit the activation of NF- κ B induced by TAK1 complex. However, with the increase of protease activity, the expression of NF- κ B mRNA and protein decreased significantly. **Conclusion** Enterovirus 71 type 3C protease in astrocytes infected with enterovirus 71 can inhibit the transcription of NF- κ B by regulating the expression of TAK1 protein.

Key words: Enterovirus infections; Astrocytes; EV71 3C protein; TGF- β activated kinase-1; NF- κ B signal pathway

肠道病毒71型(Enterovirus Type 71, EV71)是已知的可引发婴幼儿发生手足口病的主要病原体,是人类A型肠道病毒中属于核糖核酸病毒科中的肠

道病毒属^[1]。其基因组主要为单股正链的RNA,其长度可达到7 400个核苷酸, EV71最早发现于患有中枢神经系统障碍的加利福尼亚婴儿的粪便中^[2]。

报道指出, EV71 的分布区域主要是星形胶质细胞的细胞核和细胞浆内, 大部分分布于细胞浆, 少部分在细胞核^[3]; 脊髓前角炎症的炎症细胞和神经元、脑干等部位也有分布, 推测 EV71 可通过外周神经对中枢神经产生逆向感染^[4]。EV71 3C 是一种半胱氨酸蛋白酶, 由谷氨酸 (glu)、半胱氨酸 (cys147) 和组氨酸 (his40) 构成酶活性中心, 其活性中心与病毒的发展有关联^[5]。3C 蛋白参与了病毒复制的几乎所有过程, 其具有稳定、特殊的 β -折叠的空间结构, 可作用于丝氨酸/半胱氨酸 (Ser/Cys)^[6]。白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-8 (IL-8) 已知的两种重要因子, 其表达的下调可促进病原体的入侵^[7]。IL-6 主要在急性反应、造血调控、免疫应答等方面具有显著功效, 当其异常表达时可引发多种临床疾病; IL-8 主要是能够趋化炎症细胞, 促进一系列活性物质的释放, 导致炎症反应的发生, 达到促使异常细胞凋亡和杀菌的作用^[8]。目前, 对于肠道病毒 71 型感染的研究报道很多, 但对肠道病毒 71 型感染的星形胶质细胞中 EV71 3C 活性与细胞内相关信号的传导关系尚不明确, 因此, 2018 年 3 月至 2019 年 3 月进行本研究, 旨在探究肠道病毒 71 型感染的星形胶质细胞中 EV71 3C 活性与核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号转导效率的关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料 EV71 病毒于 2012 年从安徽阜阳病毒感染治疗实验室中一名重症 EV71 感染的男童呼吸道的血性分泌物中分离得到, 属于 C4 亚型, 其基因序列 EU812515.1。星形胶质细胞从本实验室分离获取 (注: 该毒株已经经过检验确立为标准毒株)。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的原代培养 取实验室新出生的 SD 乳鼠 1~3 d, 使用 75% 乙醇进行消毒浸泡 5 min 左右。眼科剪取出大脑皮质放置于含 Hanks 培养皿内, 剥离血管组织和脑膜, 将大脑皮质快速转移至含 DMEM 培养液的无菌培养皿中剪碎并过滤, 使用无菌玻璃器皿将脑组织进一步碾碎, 转移至无菌培养瓶中, 加入 DMEM 培养液后反复吹打使其形成单细胞悬液, 加入小牛血清保证终浓度为 20%, 细胞浓度为 2×10^5 个/毫升, 置于培养箱中进行差速粘附处理, 而后旋转培养瓶, 将细胞悬液接种于含鼠尾胶原包被的培养瓶内, 置于培养箱中继续培养, 并在倒置显微镜下观察其生长状态。

1.2.2 星形胶质细胞的传代培养 当细胞铺满培养瓶底部, 将原培养基弃除, 使用胰酶消化 1 min 左右, 迅速吸除胰酶, 加入已配制的完全培养基, 制成细胞悬液, 按照要求将其分别加入到新的无菌培养瓶内, 继续培养。

1.2.3 质粒提取和转染 质粒由深圳市默赛尔生物

医学科技发展有限公司构建, 利用氯化钙法进行感受态细胞制备, 通过转化和定点突变后, 随即进行基因转染, 其中质粒量和转染试剂的比值按照 1:2.5 进行。

1.2.4 病毒 TCID₅₀ 的测定 将星形胶质细胞按照 2×10^4 个/孔, 待其培养一天后接种病毒, 加入 10 mL 稀释液, 滴加入 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 当其共同生长 2 h 后吸除病毒液, 转用培养基进行培养。观察 1 周左右, 根据公式 $T=10^{1+d(s-0.5)}$ 进行病毒滴度计算。

1.2.5 EV71 3C 活性测定 将细胞以 3×10^5 个/孔接种于 24 孔板中, 当细胞生长铺满瓶底成片时, 即可进行细胞转染基因质粒, 分别为 NF- κ B、激活子蛋白-1 (AP-1) 和报告基因 (pRL-SV40) 基因质粒, 对照组采用空载体进行代替。转染后收集细胞, 加入细胞瘤裂解液, 室温下放置 30 min, 吸取 30 μ L 的裂解液加入 96 孔板内, 进行 EV71 3C 活性检测。反应体系 (100 μ L): 荧光底物浓度分别为 0、5、25、50、80、100、120 μ mol/L, 3C 蛋白酶浓度为 1 μ mol/L, 混匀后立即进行动力学检测, 得到底物浓度与荧光强度的关系。根据每一组反应前 10 min 对应的荧光值选取计算反应初速度, 定义酶反应初速度为单位时间内切割荧光底物产生的荧光强度。以底物浓度的倒数为横坐标, 酶反应速率的倒数为纵坐标建立米氏方程的模拟形式。通过作散点图得到仿米氏方程一般式为 $y=2.4481x+0.04$, $R^2=0.925$ 。选取荧光底物浓度为 20 μ mol/L, 3C 蛋白酶浓度为 1 μ mol/L 进行动力学反应, 荧光强度与时间的线性关系为 $y=10.242x+5.0303$ 。

1.2.6 RNA 提取和反转录 PCR 根据细胞内 RNA 提取试剂盒说明书操作步骤进行细胞内 RNA 提取, 并采用脱氧核糖核酸酶 (DNase) 处理以去除 DNA 残留。按照 Invitrogen 反转录试剂盒进行反转录, 得到最终产物 cDNA。反转录反应体系: Prime ScriptTM RT Enzyme Mix 1 μ L; 5 $\times$ Prime ScriptTM Buffer 4 μ L; Total RNA 1 μ L; Oligo 50UM 1 μ L; DdH₂O 13 μ L; Total 20 μ L。将反转录产物 cDNA 作为底物模板, 进行 PCR 反应, 并按照 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 5 s, 68 $^{\circ}$ C 5 s, 65~95 $^{\circ}$ C 5 s 递增的程序进行产物扩增。PCR 体系: PCR Reverse Primer 1 μ L; PCR Forward Primer 1 μ L; SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μ L; CDNA 1.5 μ L; DdH₂O 9 μ L; Total 25 μ L。

1.2.7 免疫共沉淀 收集细胞, 加入裂解液冰浴裂解 30 min, 20 000 r/min 离心 15 min。取上清液, 按 5:1 比例进行加入上清液和上样缓冲液, 加热变性。剩余上清中加入琼脂糖珠 (含偶联抗体), 4 $^{\circ}$ C 震荡 12 h。洗涤琼脂糖珠后加入 RIPA 裂解液 (RIPA Lysis Buffer), 将其平分到样品中, 用 PBS 洗涤 4 次, 加入上样缓冲液, 随即进行热变性。

免疫共沉淀具体步骤:①转染后 24~48 h 可收获细胞,加入适量细胞裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解 30 min,细胞裂解液于 4 ℃,最大转速离心 30 min 后取上清;②取少量裂解液以备 Western blotting 分析,剩余裂解液加 1 μg 相应的抗体加入到细胞裂解液,4 ℃缓慢摇晃孵育过夜;③取 10 μL protein A 琼脂糖珠,用适量裂解缓冲液洗 3 次,每次 3 000 r/min 离心 3 min;④将预处理过的 10 μL protein A 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中 4 ℃缓慢摇晃孵育 2~4 h,使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶连;⑤免疫沉淀反应后,在 4 ℃以 3 000 r/min 速度离心 3 min,将琼脂糖珠离心至管底;将上清小心吸去,琼脂糖珠用 1 mL 裂解缓冲液洗 3~4 次;加入 2×SDS 上样缓冲液,沸水煮 5 min;⑥聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),Western blotting 或质谱仪分析。通过免疫共沉淀确定结合蛋白。

1.2.8 Western blotting 实验检测蛋白表达 将上述处理的样品加入提前配制并凝固的电泳胶内,进行 PAGE 电泳。当其条带出现离底部 1 cm 左右,停止电泳,进行蛋白转膜实验。转膜过程中保持低温环境,当蛋白转移完全后,立即进行封闭、抗体孵育,待抗体孵育后,可将其洗涤 3 次,加入显色液,置于化学发光成像仪下进行成像。

1.3 统计学方法 本研究中数据全部采用 SPSS 20.0 进行处理;计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或者重复测量的方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料采用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 分析;采用 Person 线性相关分析数据间的相关性; $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 引物设计结果 利用 NCBI 软件,遵循引物设计原则进行引物设计,其结果如表 1 所示。

2.2 EV71 感染对 TAK1 相关蛋白的影响 TGF-β 活化激酶-1(TAK1)是已知介导 NF-κB 通路的主要调节蛋白, EV71 3C 可用于 TAK1 蛋白的切割。EV71 感染对细胞内 TAK1 蛋白与其复合体蛋白的表达见图 1。

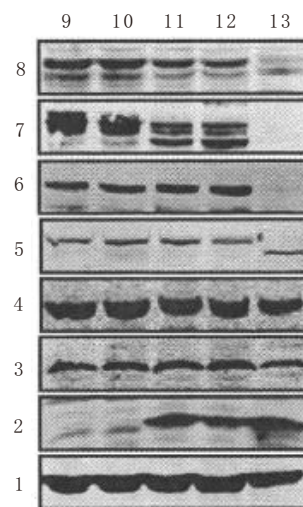
由图 1 可知, EV71 感染可诱导 TAK1 和其复合体蛋白 TAB1\2\3 的降解,并呈现时间依赖性, 24h: TAB1 (125.86±39.87), TAB2 (352.12±42.36), TAB3 (195.20±29.75)。但对于 TRAF2 和 TBK1 表达无影响。

2.3 EV71 感染对星形胶质细胞内细胞因子 mRNA 表达的作用 EV71 感染后,细胞内 IL-6、IL-8、IL-12 及 IL-1β 的表达均在 12 h 后显著提高。见表 2, 3。

表 1 引物序列

引物名称	序列	片段长度/bp
IL-6	正向引物:CTCGGTTCTGAACACATTAAAGC 反向引物:GTTCAGTCGTGATCAGTCCGGTA	156
IL-8	正向引物:GGCTGATGACGACGTACGTGTTT 反向引物:CTGTGTACGTGATTGCTTCGGCTG	179
IL-12	正向引物:CAACTGTGACCAGCAGCTCAGT 反向引物:GGCTGTACCATTGGACATCACA	142
IL-1β	正向引物:GATCTTATTTGTCACGCTTGACTG 反向引物:CTACGGACGTGTCCACGGTCA	171
TAK1	正向引物:TAGGTCAGTCGTGACACGGTTC 反向引物:GTTGCTGTCAACGTACTGCAGTG	162
NF-κB	正向引物:CCTGCTTGCGACGTGCACTGCT 反向引物:ACTAGCTGACTTGACTGACTGA	153
β-actin	正向引物:GTACTGCCGTAGTCAGCATCGT 反向引物:TGACTGTGTTACGGTCGTACCTT	168

注:IL-6 为白细胞介素-6, IL-8 为白细胞介素-8, IL-12 为白细胞介素-12, IL-1β 为白细胞介素-1β, TAK1 为 TGF-β 活化激酶-1, NF-κB 为核因子 κB, β-actin 为肌动蛋白。



注:1—内参 β-actin; 2—肠病毒 71(EV71)3C 蛋白酶(3C); 3—肿瘤坏死因子受体相关因子 2(TRAF2); 4—TANK 结合激酶 1(TBK1); 5—TANK 结合激酶 1 复合体蛋白 TAB3; 6—TANK 结合激酶 1 复合体蛋白 TAB1; 7—TGF-β 活化激酶-1(TAK1); 8—TANK 结合激酶 1 复合体蛋白 TAB2; 9—Mock; 10—4 h; 11—8 h; 12—12 h; 13—24 h。

图 1 EV71 感染对星形胶质细胞内 TAK1 蛋白复合体的影响

2.4 EV71 3C 切割导致 TAK1 复合体缺失对 NF-κB 的影响 TAB2 可诱导 NF-κB 激活,而与 3C 共同表达时可显著抑制 NF-κB 表达。EV71 3C 可显著抑制由 TAK1 复合体作用诱导 NF-κB 的激活。见表 4。

2.5 EV71 3C 活性与 NF-κB mRNA 和 NF-κB 蛋白表达的影响 不同浓度 EV71 感染后细胞内 EV71 3C 活性及其细胞内 NF-κB 表达见表 5、图 2 和图 3。当不同浓度的 EV71 感染细胞后,细胞内 EV71 3C 活性出现明显差异,而随着蛋白酶活性的增加,细胞

表2 EV71感染对细胞内相关因子 mRNA 表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

时间	重复次数	TAB 2	TAK 1	TAB 1	TAB 3	TBK 1	TRAF 2	3C	β -actin
0 h	3	895.56±99.63	721.26±75.62	665.39±56.89	423.15±65.49	452.64±56.97	496.87±68.45	205.47±55.96	306.56±56.98
4 h	3	750.14±80.15	602.35±52.12	502.96±62.10	367.14±51.20	391.15±49.63	450.69±67.67	234.27±42.75	320.15±69.28
8 h	3	686.39±85.23	489.68±49.89	442.03±51.32	326.88±43.26	345.29±40.25	425.98±45.29	356.78±52.36	362.31±75.85
12 h	3	550.12±76.96	352.19±36.99	324.78±42.75	280.65±32.47	311.26±31.25	395.26±42.92	378.65±68.96	326.96±59.71
24 h	3	352.12±42.36	186.53±45.29	125.86±39.87	195.20±29.75	306±25.63	365.74±39.78	385.99±57.65	320.74±65.24
F 值		56.326	75.110	25.997	36.710	51.367	50.238	26.352	37.115
P 值		0.016	0.005	0.023	0.019	0.015	0.015	0.031	0.012

表3 EV71感染对细胞内相关因子 mRNA 表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	IL-6	IL-8	IL-12	IL-1 β
对照组	3	1.02±0.01	1.05±0.03	1.11±0.02	1.03±0.02
0 h		1.01±0.03	1.06±0.01	1.09±0.01	1.02±0.03
4 h		1.02±0.01	1.01±0.04	1.02±0.01	1.01±0.02
8 h		1.06±0.02	1.03±0.02	1.01±0.04	1.01±0.01
12 h		1.03±0.01	1.05±0.01	1.02±0.03	1.03±0.04
24 h		1.02±0.01	1.05±0.03	1.11±0.02	1.03±0.02
实验组	3	1.12±0.02	1.13±0.01	1.31±0.05	1.25±0.04
0 h		3.63±0.08	1.34±0.03	2.21±0.14	1.53±0.06
4 h		4.62±0.11 ^①	2.01±0.12	3.02±0.09 ^①	1.82±0.01
8 h		6.13±0.13 ^①	3.23±0.14 ^①	3.51±0.13 ^①	2.63±0.09 ^①
12 h		19.42±0.62 ^①	13.80±2.89 ^①	13.06±0.68 ^①	14.61±0.96 ^①
24 h		1.12±0.02	1.13±0.01	1.31±0.05	1.25±0.04
整体分析 (HF 系数)		4.369	5.529	6.602	5.550
组间 F, P 值		21.073, 0.001	25.368, 0.001	28.665, 0.001	17.996, 0.001
时间 F, P 值		16.529, 0.001	33.252, 0.001	37.102, 0.001	28.880, 0.001
交互 F, P 值		22.885, 0.001	26.519, 0.001	26.315, 0.001	25.319, 0.001

注:IL-6 为白细胞介素-6,IL-8 为白细胞介素-8,IL-12 为白细胞介素-12,IL-1 β 为白细胞介素-1 β , β -actin 为肌动蛋白。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。

表4 TAB2质粒导入或者TAK1复合体质粒导入对NF-kB蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

EEV71 3C 质粒浓度	重复 次数	NF-kB/ β actin (TAB2质粒导入)	NF-kB/ β actin(TAK1复合 体质粒导入)
0 ng/ μ L	3	32.37±1.35	143.22±9.63
3 ng/ μ L	3	31.19±2.34	139.19±8.68
6 ng/ μ L	3	26.09±1.62	76.25±5.31 ^②
9 ng/ μ L	3	22.23±1.96 ^①	58.32±3.67 ^②
12 ng/ μ L	3	18.12±2.13 ^①	43.30±1.96 ^②
F 值		25.302	19.755
P 值		0.009	0.001

注:①与无EV71 3C质粒导入组相比, $P<0.05$ 。②与无EV71 3C质粒导入组相比, $P<0.05$ 。

内NF-kB mRNA的表达成明显的下调趋势。不同浓度EV71感染后细胞内EV71 3C活性及其细胞内NF-kB蛋白表达见表5。由表5可知,当不同浓度的EV71感染细胞后,细胞内EV71 3C活性出现明显差异,而随着蛋白酶活性的增加,细胞内NF-kB蛋白的表达成明显下降(酶活性1 μ mol/L时NF-kB蛋白/ β actin为0.23±0.06)。

表5 EV71 3C活性对NF-kB mRNA的表达/ $\bar{x} \pm s$

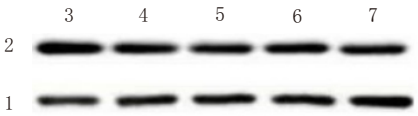
不同酶活性	重复次数	NF-kB	NF-kB蛋白
(60.25±2.69) μ mol/L	3	3.55±0.11 ^①	2.42±1.24 ^①
(120.63±6.38) μ mol/L	3	2.63±0.09 ^①	1.63±0.12
(200.17±6.98) μ mol/L	3	1.01±0.06	1.01±0.04
(250.82±10.33) μ mol/L	3	0.53±0.02 ^①	0.63±0.07
(301.26±9.64) μ mol/L	3	0.13±0.00 ^①	0.23±0.06 ^①
F 值		23.715	15.679
P 值		0.019	0.021

注:①与酶活性为中间值(200.17±6.98) μ mol/L时相比, $P<0.05$ 。



注:1—内标,2—酶活性(60.25±2.69 μ mol/L),3—酶活性(120.63±6.38 μ mol/L),4—酶活性(200.17±6.98 μ mol/L),5—酶活性(250.82±10.33 μ mol/L),6—酶活性(301.26±9.64 μ mol/L)。

图2 NF-kB的mRNA表达水平(M:GAPDH分子量146kD)



注:1—核因子 κ B;2—肌动蛋白;3—酶活性(60.25±2.69) μ mol/L;4—酶活性(120.63±6.38) μ mol/L;5—酶活性(200.17±6.98) μ mol/L;6—酶活性(250.82±10.33) μ mol/L;7—酶活性(301.26±9.64) μ mol/L。

图3 NF-kB的蛋白表达水平

3 讨论

EV71是肠道病毒属中一种小RNA病毒科,其RNA主要为单股正旋,具有较强的耐酸和耐热特性,决定了EV71能通过粪、口传播和自我复制的高

耐热功能^[9]。其致病属于是多分子、多因素、多途径的作用过程,病毒的免疫结果和机体的抗免疫功能决定了病毒的感染结果,然而,儿童的不健全、不成熟的免疫系统极易使其成为感染机体^[10]。当病儿感染EV71后症状较轻,但当其成为重症病例时,可导致神经系统和呼吸感染、循环功能障碍。星形胶质细胞是神经胶质细胞的一种,具有独立的结构域,和神经元之间具有明显、广泛的形态学交互作用,其主要功能是摄取和清除突触前由神经元释放的神经递质如 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸等用于再循环^[11]。同时,星形胶质细胞通过清理存在的神经递质达到预防由谷氨酸诱导产生的神经毒性,并能通过摄取金属离子来维持神经元内的电化学平衡。报道称,星形胶质细胞在一定条件下可释放信号传导分子如胶质递质^[12]。近年来,EV71多次流行,基因也在不断的进化,致使儿童致残、致死的病例不断出现^[13]。

EV71 3C可通过将宿主炎症因子水解或抑制其表达,达到DNA修复功能和宿主细胞内蛋白质的合成系统被关闭,进而降低了天然免疫系统对宿主细胞的攻击^[14]。当其活性位点发生改变,会造成病毒包装的失败。细胞因子具有多种特定的生物学作用,如调节和介导炎症反应和免疫应答,参与炎症发生的病理损害等^[15]。本研究发现EV71感染可诱导TAK1和其复合体蛋白TAB1\23的降解,并呈现时间依赖性,但对于TRAF2和TBK1表达无影响。同时,细胞内IL6、IL8、IL12及IL1 β 的表达均在24h后显著提高;TAB2可诱导NF- κ B激活,而与3C蛋白共同表达时可显著抑制NF- κ B表达,3C蛋白亦可显著抑制由TAK1复合体作用诱导NF- κ B的激活。不同浓度EV71感染后,细胞内EV71 3C活性出现明显差异,而随着蛋白酶活性的增加,细胞内NF- κ B mRNA和蛋白的表达均成明显的下调趋势。EV71 3C功能与RNA结合功能在宿主和病毒的相互作用及病毒复制中具有重要影响,3C蛋白的酶活性中心在病毒的生命周期和复制过程中均发挥着重要作用^[15]。研究表明,当3C蛋白酶的活性位点发生突变后,则病毒就不能成功的复制出来,因此可作为众多抗病毒药物的重要筛选途径^[16]。EV71 3C能在抑制模式下识别RIG-I受体及其下游MAVS效应分子结合,抑制IFN β 产生。同时,EV71 3C可通过切割TLR3信号通路中的TRIF关键蛋白损坏TLR3介导作用,抑制NF- κ B激活和IRF3磷酸化^[17]。本研究推测,3C亦可通过作用与NF- κ B上游分子TAK1,达到阻碍NF- κ B信号通路^[18]。

病毒可通过多种途径调节TAK1复合体,达到调控NF- κ B通路的目的,最终用于调控细胞因子和

转录的产生。其中TAK1是调控NF- κ B信号传导过程的关键因子^[19]。当TAK1受到异常刺激后,即可发生泛素化和磷酸化,与TAB1/2/3之间形成复合体,用于下游信号通路的调节,激活MF- κ B、JNK、ERK和P38信号通路^[20]。许多病毒可通过调节TAK1信号通路来调控NF- κ B通路^[21]。HTLV的Tax蛋白在受到外界刺激时,细胞内的信号通路便会激活,Tax与RelA、TAB2之间形成复合物,促使NF- κ B的活化^[22]。

综上所述,肠道病毒71型感染的星形胶质细胞中EV71 3C可通过调节TAK1蛋白表达,达到抑制NF- κ B信号转导的作用。

参考文献

- [1] WANG MG, SUN HM, LIU XM, et al. Clinical analysis of 59 children with hand foot and mouth diseases due to enterovirus EV71 and concomitant viral encephalitis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(4 Suppl):43-49.
- [2] 戚宇华, 吴涛, 朱小娟, 等. 肠道病毒71型感染人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)的miRNA表达谱[J]. 国际病毒学杂志, 2017, 24(5):289-295.
- [3] LIANG Z, PAN H, WANG X, et al. Histopathological features and viral antigen distribution in the lung of fatal patients with enterovirus 71 infection[J]. Virol Sin, 2018, 33(3):278-281.
- [4] 孟君, 何雅青, 杨洪, 等. ARRDC4通过NF- κ B和MAPK信号通路促进EV71诱导的IL-6产生[J]. 军事医学, 2017, 41(7):576-580.
- [5] 肖汉森, 谢茜, 钟家禹, 等. 波形蛋白对EV71感染小鼠脑组织引起NLRP3炎性小体活化的影响[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(6):704-710.
- [6] 刘国涛, 刘民. 柯萨奇病毒A组6型与肠道病毒71型感染所致手足口病临床特征比较[J]. 国际病毒学杂志, 2017, 24(2):127-130.
- [7] 冉飞, 郭青青, 钟龙青, 等. 肠道病毒71型感染手足口病患者白细胞介素-21水平变化及其作用机制[J]. 中华传染病杂志, 2018, 36(3):176-178.
- [8] BOISVERT MM, ERIKSON GA, SHOKHIREV MN, et al. The aging astrocyte transcriptome from multiple regions of the mouse brain[J]. Cell Rep, 2018, 22(1):269-285.
- [9] MANNINEN T, HAVELA R, LINNE M L. Computational models for calcium-mediated astrocyte functions[J]. Frontiers in Computational Neuroscience, 2018, 12:14-16.
- [10] 徐艳华, 刘泉波, 张祯祯. 肠道病毒71型(EV71)通过网格蛋白介导的内吞途径入侵神经母细胞瘤SK-N-SH细胞[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(6):761-766.
- [11] LI X H, LIU S J, LIU X Y, et al. Expression of SIRT3 in various glial cell types in the periventricular white matter in the neonatal rat brain after hypoxia[J]. Tissue & Cell, 2018, 52:1-8.
- [12] 宋杰, 胡雅洁, 黄星, 等. CV-A16和EV-A71感染对肠道上皮细胞间连接分子排布和表达的影响[J]. 病毒学报, 2017, 33(6):861-867.
- [13] ZHANG J, LI Q, SHAO Q, et al. Effects of panax notoginseng saponin on the pathological ultrastructure and serum IL-6 and IL-8 in pulmonary fibrosis in rabbits[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(10):8410-8418.
- [14] STAMPANONI BASSI M, IEZZI E, LANDI D, et al. Delayed

- treatment of MS is associated with high CSF levels of IL-6 and IL-8 and worse future disease course[J]. J Neurol, 2018, 265(11): 2540-2547.
- [15] 尹凤荣, 魏民华, 雷蕾, 等. 巨细胞病毒感染和抗病毒治疗对溃疡性结肠炎患者预后影响的 meta 分析[J]. 胃肠病学, 2018, 23(4): 231-237.
- [16] FU Y, ZHANG L, ZHANG F, et al. Exosome-mediated miR-146a transfer suppresses type I interferon response and facilitates EV71 infection [J/OL]. PLoS Pathog, 2017, 13(9): e1006611. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006611.
- [17] WANG Y, QIN Y, WANG T, et al. Pyroptosis induced by enterovirus 71 and coxsackievirus B3 infection affects viral replication and host response[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2887.
- [18] LI B, YUE Y, ZHANG Y, et al. A novel Enterovirus 71 (EV71) virulence determinant: the 69th residue of 3C protease modulates pathogenicity[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 26.
- [19] YANG Z, GAO F, WANG X, et al. Development and characterization of an enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLPs) vaccine produced in *Pichia pastoris* [J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 16(7): 1602-1610.
- [20] IRIONDO O, LIU Y, LEE G, et al. TAK1 mediates microenvironment-triggered autocrine signals and promotes triple-negative breast cancer lung metastasis[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1994.
- [21] HUI B, ZHANG L, ZHOU Q, et al. Pristimerin inhibits LPS-triggered neurotoxicity in BV-2 microglia cells through modulating IRAK1/TRAF6/TAK1-mediated NF- κ B and AP-1 signaling pathways in vitro[J]. Neurotox Res, 2018, 33(2): 268-283.
- [22] HLEIHLEH R, KHOSHNOOD B, DACKLIN I, et al. The HTLV-1 oncoprotein Tax is modified by the ubiquitin related modifier 1 (Urm1) [J]. Retrovirology, 2018, 15(1): 33.
- (收稿日期: 2019-11-05, 修回日期: 2019-12-03)

引用本文: 李隽, 尹霜霜, 谭为聪, 等. 牙种植体周围黏膜炎龈沟液中低氧诱导因子-1 α 、基质金属蛋白酶-2的水平及意义[J]. 安徽医药, 2021, 25(10): 2027-2031. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.027.

◇ 临床医学 ◇



牙种植体周围黏膜炎龈沟液中低氧诱导因子-1 α 、基质金属蛋白酶-2的水平及意义

李隽, 尹霜霜, 谭为聪, 余留先

作者单位: 湖南中医药大学高等专科学校附属第一医院口腔科, 湖南 株洲 412000

摘要: **目的** 检测牙种植体周围黏膜炎病人龈沟液中低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达水平, 探讨两者在种植体周围黏膜炎发病程度中的关系及作用。**方法** 选取2017年9月至2019年6月湖南中医药大学高等专科学校附属第一医院收治的种植体周围黏膜炎病人46例作为研究对象, 选取种植体周围炎病人48例、种植体周围牙龈健康者50例作为对照。分别采集种植体周围黏膜炎病人和健康体检者龈沟液, 利用酶联免疫吸附法(ELISA)检测龈沟液中HIF-1 α 、MMP-2、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、核因子- κ B(NF- κ B)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的表达水平, 观察记录种植体周围菌斑指数(PLI)、牙龈指数(GI)、龈沟出血指数(SBI)、探诊深度(PD)值; 采用Pearson法分析种植体周围黏膜炎病人龈沟液中HIF-1 α 、MMP-2水平与IL-1 β 、NF- κ B、SOD、MDA水平、PLI、GI、SBI、PD值的相关性。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析HIF-1 α 、MMP-2对种植体周围黏膜炎的预测价值。**结果** 随着种植体周围黏膜炎的发生及发展, 病人种植体周围龈沟液中HIF-1 α 、MMP-2、NF- κ B、MDA、PLI、GI、SBI、PD值明显升高, 周围炎组、黏膜炎组、健康组HIF-1 α 分别为(587.32 $\pm$ 123.11) μ g/L、(503.24 $\pm$ 116.54) μ g/L、(289.67 $\pm$ 97.68) μ g/L(P <0.05), SOD水平分别为(185.29 $\pm$ 15.82) μ g/L、(218.82 $\pm$ 18.63) μ g/L、(234.25 $\pm$ 29.88) μ g/L(P <0.05), IL-1 β 水平分别为(22.03 $\pm$ 3.34) μ g/L、(21.18 $\pm$ 3.29) μ g/L、(19.51 $\pm$ 2.72) μ g/L(P <0.05); 种植体周围黏膜炎病人龈沟液中HIF-1 α 、MMP-2水平与IL-1 β 、NF- κ B水平、PLI、GI、SBI、PD值, MMP-2水平与MDA水平均明显正相关(P <0.05), HIF-1 α 、MMP-2水平与SOD水平均明显负相关(P <0.05); ROC曲线分析结果显示, 龈沟液HIF-1 α 、MMP-2水平检测的ROC曲线下面积为0.799(95%CI: 0.708~0.890), 敏感度为68.8%, 特异性为87.0%。**结论** 龈沟液中HIF-1 α 、MMP-2表达水平可能与牙种植体周围黏膜炎的发生发展有关, 且与炎症因子、氧化应激相关物质、种植体周围指标关系密切, 可能对种植体周围黏膜炎的发展具有一定的预测价值。

关键词: 牙种植体; 牙周炎; 种植体周围黏膜炎; 龈沟液; 低氧诱导因子-1 α ; 基质金属蛋白酶-2

Detection levels and significance of HIF-1 α and MMP-2 in gingival crevicular fluid of peri-implant mucositis

LI Jun, YIN Shuangshuang, TAN Weicong, YU Liuxian

Author Affiliation: Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Zhuzhou, Hunan 412000, China