

DOI:10.13350/j.cjpb.220601

• 论著 •

CAPE对HUVEC中寨卡病毒复制的影响*

梁羽芃¹, 黄志刚¹, 何姿涵¹, 吴林凡¹, 蔡金泰², 张宝^{2**}, 肖维威^{1,2**}

(1. 广东医科大学公共卫生学院, 广东东莞 523808; 2. 南方医科大学公共卫生学院)

【摘要】 目的 研究 NF- κ B 抑制剂 CAPE 对寨卡病毒感染 HUVEC 细胞中复制的影响。方法 对 HUVEC 细胞进行不同浓度 CAPE 预处理后用不同 MOI 的寨卡病毒感染, 在不同时间点测量其细胞存活率, 收集细胞总 RNA 和蛋白, 采用 CCK-8 法检测 CAPE 对 HUVEC 细胞的毒性作用, 采用免疫荧光法检验 p65 入核情况, 应用实时荧光定量 PCR 检测 ZIKV E 和 NF- κ B 在 mRNA 水平的相对表达量, 应用 Western blot 检测蛋白表达。结果 HUVEC 细胞在 0~10 μ mol/L CAPE 作用下存活率均 >85%。寨卡病毒感染具有时间依赖性增加 NF- κ B 和 ZIKV E 的 mRNA 表达; 但 HUVEC 细胞经过 CAPE 预处理后再感染寨卡病毒, 显著抑制细胞内寨卡病毒的 mRNA 表达, 及 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达。MOI 为 0.1 的寨卡病毒感染 48 h 时, 5 μ mol/L CAPE 抑制了细胞内寨卡病毒 90% 的 mRNA 表达, 10 μ mol/L CAPE 抑制了细胞内寨卡病毒 96% 的 mRNA 表达; MOI 为 0.1 的寨卡病毒感染 72 h 时, 5 μ mol/L CAPE 抑制了细胞内寨卡病毒 80% 的 mRNA 表达, 10 μ mol/L CAPE 抑制了细胞内寨卡病毒 90% 的 mRNA 表达。CAPE 可以提高 15% 以上的 HUVEC 细胞存活率。结论 CAPE 具有强抗寨卡病毒复制作用, 其机制与抑制 NF- κ B 的激活有关。

【关键词】 寨卡病毒; CAPE; NF- κ B; 病毒复制

【中图分类号】 R373.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0621-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jun.; 17(6):621-625, 630.]

Effect of CAPE on Zika Virus Replication in HUVEC

LIANG Yu-peng¹, HUANG Zhi-gang¹, HE Zhi-han¹, WU Lin-fan¹, CAI Jin-tai², ZHANG Bao², XIAO Wei-wei^{1,2} (1. School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China; 2. School of Public Health, Southern Medical University)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of CAPE, an inhibitor of NF- κ B, on Zika virus (ZIKV) replication in HUVEC cells. **Methods** HUVEC cells were pre-incubated with different concentrations of CAPE, and infected with Zika virus with different MOIs. Then cellular survival rates were measured, and total RNA and protein were collected at different time points. The toxicity of CAPE on HUVEC cells was detected by CCK-8 assay. The extent of p65 nuclear entry was examined by immunofluorescence method. The relative expression of ZIKV E and NF- κ B at the mRNA level were detected by real-time PCR, while the protein level were detected by Western blotting assay. **Results** The survival rates of HUVEC cells with 0-10 μ mol/L CAPE treatment were greater than 85%. With Zika virus infection, the mRNA expression of NF- κ B and ZIKV E increased in a time-dependent manner. However, when HUVEC cells were pretreated with CAPE and then infected with Zika virus, it can significantly inhibit the mRNA expression of Zika virus and NF- κ B mRNA and protein expression. Intracellular RNA of ZIKV, mRNA and expression of NF- κ B was inhibited in HUVEC cells with CAPE pre-treatment. ZIKV with MOI 0.1 infected for 48 h, 5 μ mol/L CAPE inhibited 90% of the mRNA expression of intracellular ZIKV, and 10 μ mol/L CAPE inhibited 96% of the mRNA expression of intracellular ZIKV. ZIKV with MOI 0.1 infected for 72 h, 5 μ mol/L CAPE inhibited 90% of the mRNA expression of intracellular ZIKV, and 10 μ mol/L CAPE inhibited 96% of the mRNA expression of intracellular ZIKV. As a result, CAPE pre-treatment can improve the survival rate of HUVEC cell by more than 15%. **Conclusion** CAPE has a strong anti-Zika replication effect, and the mechanism is related to the inhibition of NF- κ B activation.

【Key words】 Zika Virus; CAPE; NF- κ B; Virus Replication

*** 寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是一种节肢动物传播的虫媒病毒,属于黄病毒属黄病毒科。1947年该病毒首次从发热恒河猴中分离,1954年在尼日利亚(非洲)首次描述了人类 ZIKV 感染^[1-2]。2016年2月,世界卫生组织宣布寨卡疫情为国际关注的突发公共卫生事件,截至2019年7月,全球有87个国家和地区记录

* **【基金项目】** 广东省科技计划项目(No. 2018B020207006), 广东省科技计划重点项目(No. 2021B1212030014)。

** **【通讯作者】** 肖维威, E-mail: xwwei74@126.com; 张宝, E-mail: zhang20051005@126.com

【作者简介】 梁羽芃(1996-),男,湖南衡阳人,硕士。主要研究方向:病毒学。E-mail:1055411405@qq.com

了 ZIKV 的本土蚊媒传播^[3]。人感染 ZIKV 多无症状或轻度头痛、发烧、皮疹、非化脓性结膜炎以及关节和肌肉疼痛等症状,但其嗜神经性可能引起胎儿小头畸形、格林巴利综合征等严重的神经系统疾病^[4-5]。目前,暂无有效的疫苗治疗,亟待研发有效药物用于临床应用^[6-7]。

NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 是一种与 DNA 转录、细胞因子产生和细胞存活有关的蛋白复合物。经典的 NF-κB 通路包括 IKKα、IKKβ、p50 和 p60, 但非经典的 NF-κB 通路也参与 MDA5/RIG-I 通路, 通过激活 IFN 刺激应答元件 (ISRE) 和 IFN 刺激基因 (ISGs) 产生 I 型 IFN, 保护宿主细胞免受病毒侵袭^[8]。NF-κB 在病原体感染的免疫反应中起重要作用, 是抵抗病毒感染的免疫应答中的关键因素之一, 其失调参与了病毒感染的癌症、慢性炎症性疾病和病理发展, 并诱导促炎细胞因子、趋化因子、粘附分子、基质金属蛋白酶 (MMP)、环氧合酶 2 (COX2) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的转录^[9-10]。ZIKV 感染 Muller 细胞后, ERK、p38MAPK、NF-κB、JAK/STAT3 等多种炎症信号通路被激活, 产生许多炎症因子, 其中 NF-κB 参与炎症小体激活、自噬和细胞死亡之间的交互作用^[11-13]。咖啡酸苯乙酯 (Caffeic acid phenethyl ester, CAPE) 是蜜蜂蜂巢制备的蜂胶中的一种活性成分, 具有与黄酮类化合物相似的结构, 具有多功能特性, 包括抗炎、抗病毒、抗癌和免疫调节活性, 而且还抑制内源性和病毒蛋白的酶活性和 NF-κB 的转录活性^[14]。目前, NF-κB 在许多炎症疾病中和病毒感染中扮演重要角色, 本研究拟探讨 NF-κB 的抑制剂 CAPE 在寨卡病毒复制中所起到的作用, 为抗寨卡病毒药物筛选和治疗提供新思路。

材料与方 法

1 材料

1.1 细胞和病毒株 人脐静脉内皮细胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) 为本实验室保存, 寨卡病毒株 Z16006 为广东省疾病预防控制中心柯昌文提供。

1.2 主要试剂及器材 DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 逆转录试剂盒和 SYBR Green 酶购自宝生物工程有限公司; Taqman 探针法实时荧光定量试剂盒购自德国 DBI 公司; DMSO 购自美国 MP 公司; 细胞裂解液、快速制胶试剂盒、PMSF 购自西安晶彩生物科技有限公司; PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司; 异丙醇、无水乙醇购自广州捷倍斯生物科技有限公司; BCA 试剂盒、鼠二抗、兔二抗及显影剂

购自美国 Bioworld 公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司; p65 抗体、p-p65 抗体购自美国 CST 公司; 鼠抗人 β-actin 抗体购自 Proteintech 公司 (中国)。

2 方法

2.1 细胞培养 HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 细胞均培养于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中。

2.2 CCK-8 法检测 CAPE 的细胞毒性 将 HUVEC 接种于 96 孔板, 加入 100 μL 完全培养基培养, 12~16 h 后每孔加入 100 μl 完全培养基稀释的梯度浓度 CAPE; 到检测时间前 2 h 加入 1/10 体积的 CCK-8 溶液, 混匀, 继续培养 2~4 h, 用酶标仪检测各孔 A₄₅₀ 值。将 HUVEC 接种 96 孔板, 12~16 h 后每孔加入 5 μmol/L, 10 μmol/L 浓度 CAPE 预处理 6 h, 再以寨卡病毒 MOI 为 1, 10 感染, 每 24 h 更换一次药物培养基, 在 48 h 和 72 h 加入 CCK-8 试剂, 最后在酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

2.3 免疫荧光 将 HUVEC 接种于激光共聚焦皿, 12~16 h 后每孔加入 10 μmol/L 浓度 CAPE 预处理 6 h, 再以寨卡病毒 MOI 为 1 感染, 每 24 h 更换一次药物培养基, 48 h 后用甲醛固定, 用 Triton-100 穿孔后封闭, 用 p65 一抗孵育和红色荧光二抗染色, 抗体染色完成后孵育 DAPI 染液, 最后用抗荧光淬灭封片剂封片, 共聚焦显微镜拍摄。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测目的基因表达 将 HUVEC 铺于 12 孔板中, 12~16 h 后每孔加入 5 μmol/L, 10 μmol/L 浓度 CAPE 预处理 6 h, 再以寨卡病毒 MOI 为 0.1, 1 感染, 每 24 h 更换一次药物培养基, 培养 48 h 和 72 h 结束后收集细胞, 用 Trizol 法提取总 RNA, 根据说明书进行逆转录反应, Taqman Probe 法检测寨卡病毒的 mRNA 表达水平, SYBR Green 法检测 GAPDH 和其他基因的 mRNA 表达水平, 结果用 2^{-ΔΔCt} 计算各目的基因相对于 GAPDH 增加或减少的倍数。引物及探针序列如表 1。

表 1 引物和探针
Table 1 Primers and probe sequences

| 引物及探针 Primer and probe | 序列 (5'-3') Sequence (5'-3') |
|---------------------------|--------------------------------|
| ZIKV E 基因 F | CVGACATGGCTTCGGACAGY |
| ZIKV E 基因 R | CCCARCCTCTGTCCACYAAAYG |
| ZIKV E 基因探针 | AGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCARTCA |
| GAPDH-F | GTCAAGGCTGAGAACGGGAA |
| GAPDH-R | AAATGAGCCCCAGCCTTCTC |
| NF-κB-F | GTTACACAGACCTGGCATCCG |
| NF-κB-R | AGCATGGGCTCAGTTGTGTG |

2.5 Western blot 检测目的蛋白表达 将 HUVEC 分别铺于 6 孔板中, 12~16 h 后每孔加入 5 μmol/L,

10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 CAPE 预处理 6 h,再以寨卡病毒 MOI 为 0.1,1 感染,每 24 h 更换一次药物培养基,培养 48 h 收蛋白。用细胞裂解混合液(含 10% PMSF)裂解细胞,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,BCA 法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h;加入稀释的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入 2.5% 脱脂奶粉稀释的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后进行显影。

2.6 统计学分析 计量资料采用 spss 单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 最小显著性差异方法,方差不齐时采用多重比较调节邦弗伦尼法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,用 GraphPad Prism 5 作图。

结果

1 CAPE 的细胞毒性

将 HUVEC 接种于 96 孔板,设置 CAPE 浓度梯度 0、2.5、5、7.5、10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$,培养时间 48 h 和 72 h,用 CCK-8 法测定细胞毒性,结果见图 1。当 CAPE 的浓度范围为 0-10 $\mu\text{mol/L}$,48 h HUVEC 细胞存活率 $> 97\%$,72 h HUVEC 细胞存活率 $> 85\%$ 。因此,本研究中对 HUVEC 进行预处理的 CAPE 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

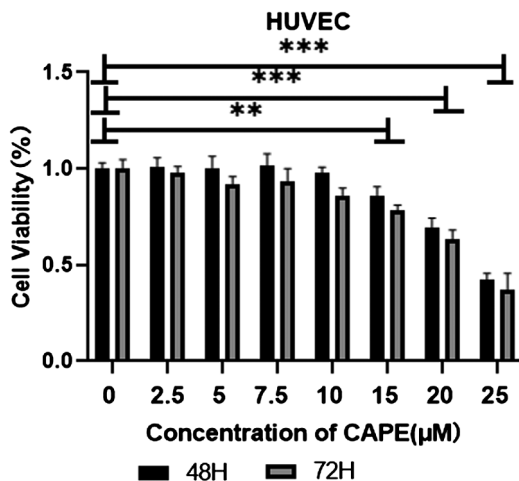


图 1 CAPE 对 HUVEC 细胞的毒性
Fig. 1 The toxicity of CAPE to HUVEC cells

2 不同浓度 CAPE 作用下寨卡病毒对 HUVEC 的不同时间细胞存活率影响

将 HUVEC 接种于 96 孔板,经过 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CAPE 预处理 HUVEC 后,以寨卡病毒 MOI 为 1,10 感染,每 24 h 更换一次药物培养基,48 h 和 72 h 的 HUVEC 细胞存活率结果见图 2。随着寨卡病毒 MOI 的增大,细胞存活率逐渐降低,48 h HUVEC 细胞存活率分别为 75%,67% ($F = 36.7, P =$

0.000);72 h HUVEC 细胞存活率分别为 46%,22% ($F = 851.1, P = 0.000$)。寨卡病毒感染 48 h 后,MOI 为 10 时,5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 预处理后, HUVEC 细胞存活率提高了 9% 和 16% ($F = 7.2, P$ 分别为 0.03 和 0.000)。72 h 时,在寨卡病毒 MOI 为 1 时,5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 处理后感染寨卡病毒组都提高了将近 20% 的 HUVEC 细胞存活率 ($F = 66.6, P = 0.000$),当寨卡病毒 MOI 为 10 时,5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 处理后感染寨卡病毒组分别提高了 15% 和 22% 的 HUVEC 细胞存活率 ($F = 66.6, P = 0.000$),这种保护作用具有浓度依赖性,差异均有统计学意义。

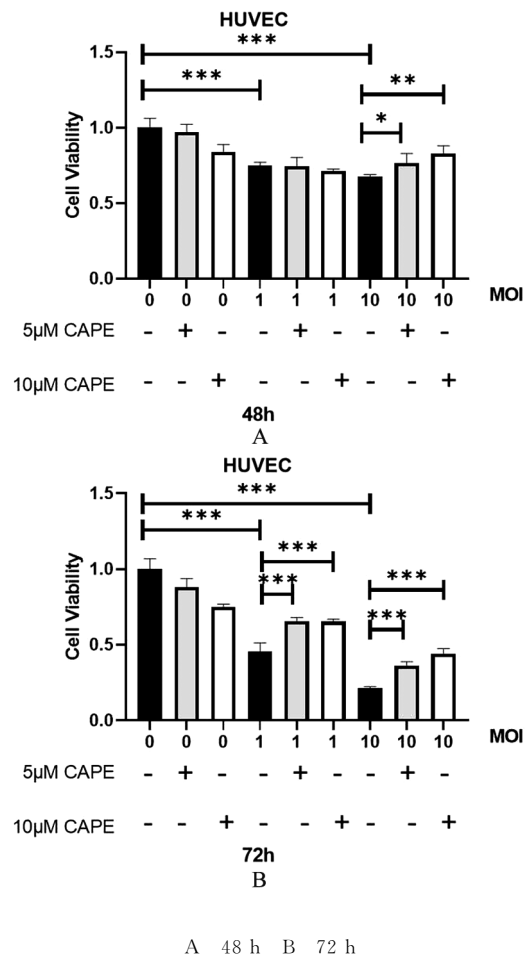
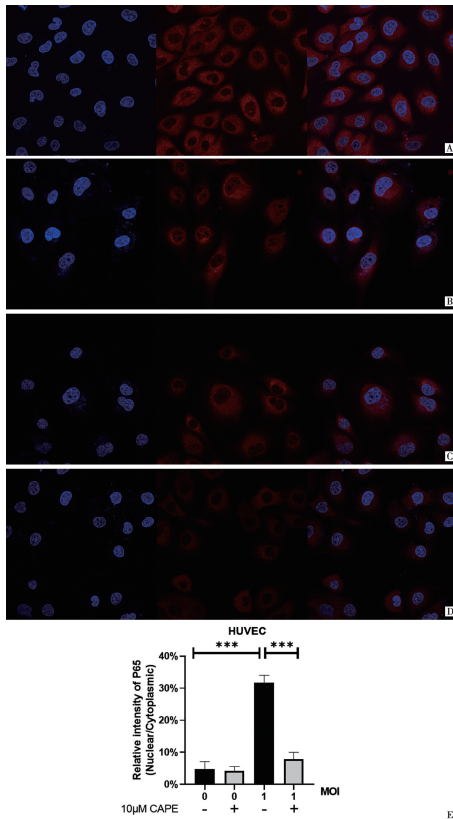


图 2 CAPE 对感染寨卡病毒的 HUVEC 细胞存活率影响
Fig. 2 The effect of CAPE on the survival rate of HUVEC infected with Zika virus

3 CAPE 抑制寨卡病毒引起 NF- κB 中 p65 的入核

将 HUVEC 接种于激光共聚焦皿,12~16 h 后用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CAPE 预处理 HUVEC 后,然后以寨卡病毒 MOI 为 1 感染,每 24 h 更换一次药物培养基,分组为对照组,MOI1 的病毒组,10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 的药物组,10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 处理后 MOI1 的病毒组,48 h 拍照观察细胞核内/核外 p65 情况,结果见图 3A、图

3B、图 3C、图 3D、图 3E。p65 主要存在于细胞质中,当寨卡病毒 MOI 为 1 时,相比于对照组,可见核内/核外 p65 明显增加,分别增加了 6.6 倍 ($F = 38.8, P = 0.000$),表明寨卡病毒通过 p65 的入核激活了 NF- κ B,差异具有统计学意义。而当寨卡病毒 MOI 为 1 时,经过 10 μ mol/L CAPE 预处理后再感染寨卡病毒,核内/核外 P65 降低了 4 倍 ($F = 13.6, P = 0.000$),表明 CAPE 是通过抑制 p65 入核来抑制 NF- κ B 的激活,差异均有统计学意义。



A 对照组 B MOI=1 的病毒组 C 10 μ mol/L CAPE 的药物组 D 10 μ mol/L CAPE 处理后 MOI1 的病毒组 E CAPE 对 ZIKV 诱导 p65 入核情况

图 3 CAPE 抑制寨卡病毒引起 NF- κ B 中 p65 的入核

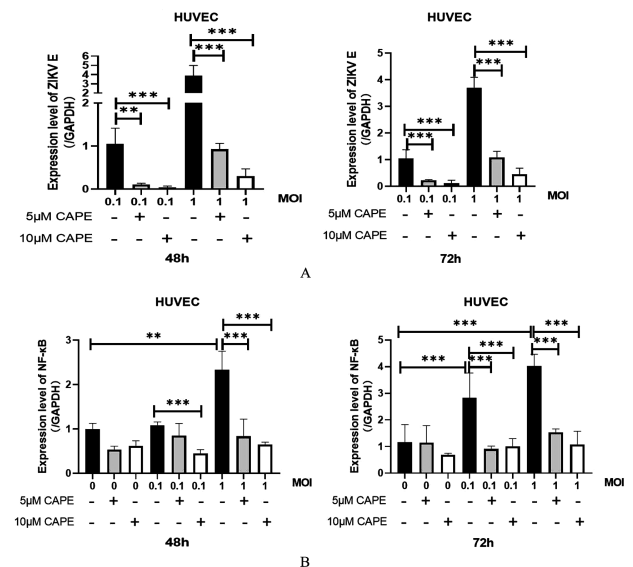
A Control group B Virus MOI=1 group C Drug group of 10 μ mol/L CAPE D Virus MOI=1 group after treatment with 10 μ mol/L CAPE E ZIKV-induced p65 nuclear entry by CAPE

Fig. 3 CAPE inhibits Zika virus-induced nuclear entry of p65 in NF- κ B

4 CAPE 对寨卡病毒感染的 HUVEC 中 ZIKV E 和 NF- κ B 的 mRNA 表达

将 HUVEC 接种于 12 孔板,12~16 h 后用 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 的 CAPE 预处理 HUVEC,然后以寨卡病毒 MOI 为 0.1,1 感染,每 24 h 更换一次药物培养基,48 h 和 72 h 收样后用荧光定量 PCR 检测 ZIKV E(图 4A)和 NF- κ B(图 4B)的表达情况。48 h 在寨卡病毒 MOI 为 0.1 时,5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 的 CAPE 处理后感染病毒组是病毒组的 10% 和 4% ($F = 24.5, P$ 为 0.002 和 0.001);MOI 为 1 时,仅为

20% 和 7% (F 值 24.5, P 值均为 0.000);72 h 寨卡病毒 MOI 为 0.1 时,CAPE 处理后感染病毒组分别是病毒组的 20% 和 10% ($F = 67.8, P = 0.000$);MOI 为 1 时,仅为 30% 和 10% ($F = 67.8, P = 0.000$),CAPE 具有浓度依赖性显著抑制寨卡病毒的复制,差异均有统计学意义。48 h 当寨卡病毒 MOI 为 1 时,NF- κ B 增加了 2.3 倍 ($F = 33.5, P = 0.000$),但是 10 μ mol/L 的 CAPE 处理后感染病毒组是病毒 MOI 为 0.1 组的 40% 倍 ($F = 20.7, P = 0.000$);5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 的 CAPE 处理后感染病毒组是病毒 MOI 为 1 组的 40% 和 30% 倍 ($F = 20.7, P = 0.000$);72 h 寨卡病毒 MOI 为 0.1 和 1 时,NF- κ B 增加了 2.8 和 4 倍 ($F = 29.6, P$ 分别为 0.007 和 0.000),但 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 的 CAPE 处理感染病毒组是同为病毒 MOI 为 0.1 组的 30% 和 30% 倍 ($F = 11.9, P = 0.000$),是病毒 MOI 为 1 组的 40% 和 30% 倍 ($F = 11.9, P = 0.000$),表明 ZIKV 激活了 NF- κ B,CAPE 具有浓度依赖性抑制了其激活,差异均有统计学意义。



A ZIKV mRNA B NF- κ B mRNA
图 4 CAPE 对感染寨卡病毒的 HUVEC 中 ZIKV E 和 NF- κ B 的 mRNA 表达影响

Fig. 4 The effect of CAPE on the mRNA expression of ZIKV E and NF- κ B in HUVEC infected with ZIKV

5 CAPE 作用下对寨卡病毒感染的 HUVEC 中 NF- κ B 相关蛋白表达量变化

将 HUVEC 接种于 6 孔板,12~16 h 后用 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 的 CAPE 预处理 HUVEC,然后以寨卡病毒 MOI 为 0.1,1 感染,每 24 h 更换一次药物培养基,48 h 收蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(图 5)。随着病毒 MOI 的增加,p-p65 蛋白条带有明显的增强,但在 CAPE 预处理作用下,具有浓度依赖性明显减弱 P-P65 蛋白条带。p65 蛋白未发现明显趋势。

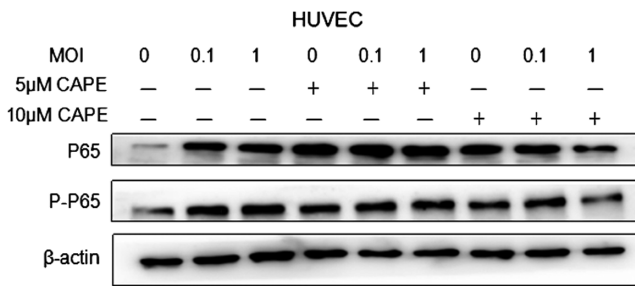


图5 CAPE作用下对感染寨卡病毒的HUVEC中NF-κB的表达影响
Fig. 5 The effect of CAPE on the relative expression of NF-κB in HUVEC infected with ZIKV

讨论

目前,艾滋病病毒(HIV-1)、人类嗜T细胞病毒(HTLV-1)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、EB病毒(EBV)和流感病毒都可激活NF-κB促进病毒复制,防止病毒诱导的细胞凋亡,并介导对入侵病原体的免疫反应^[15]。NF-κB在多种炎症性疾病的炎症反应和病毒复制起关键作用,靶向NF-κB信号通路代表了一种有吸引力的抗炎和抗病毒治疗方法^[16]。免疫荧光实验和荧光定量实验都表明CAPE是一种NF-κB高效的抑制剂,主要通过阻碍了p65的核移位,从而抑制NF-κB信号通路,影响病毒复制所需要的酶或蛋白,最终具有浓度依赖性显著抑制病毒复制,这与Gao等^[17]的研究结果相一致。在黄病毒中,登革病毒和日本脑炎病毒都可导致NF-κB激活,缺乏NF-κB激活的细胞中,日本脑炎病毒诱导的I型IFN产生显著减少^[18-19]。表明NF-κB可能还介导I型IFN产生从而起到抗病毒作用。NF-κB的抑制剂CAPE具有抑制HIV-1整合酶活性,从而起到抗HIV病毒作用;对COVID-3CL-蛋白酶的活性位点结合阻断酶活性从而抑制病毒复制^[20-21]。总而言之,ZIKV激活NF-κB途径的方式以及其蛋白在NF-κB激活过程中的参与方式目前尚不清楚,CAPE应用在黄病毒方面的研究较少,因此探究其对寨卡病毒复制的影响是有必要的。

寨卡病毒感染宿主后激活先天免疫反应,宿主免疫系统会通过IFN和细胞因子激活NF-κB,随后生成促炎细胞因子。而先天免疫反应的一个基本组成部分是促炎细胞因子IL-1β的产生和释放,但核因子NF-κB调节Pro-IL-1β mRNA的转录^[22]。CCK-8结果显示,CAPE浓度为5 μmol/L和10 μmol/L预处理过后,再以ZIKV MOI为1和10感染,HUVEC细胞病变反应得到显著减轻,具有浓度依赖性提高了将近20%的HUVEC细胞存活率。这可能是由于CAPE抑制了病毒复制和促炎症因子释放引起的细胞死亡。在荧光定量和蛋白免疫印迹试验结果显示NF-κB转

录和蛋白表达水平上调,表明ZIKV通过影响p-p65蛋白转录和表达增强自身复制或逃离宿主免疫反应。

寨卡病毒对人群的健康仍具有较大的威胁并会产生严重的疾病负担,而病毒复制带来的炎症在其中起着重要作用,本研究得出NF-κB可能是抗炎和抗病毒治疗中的有希望的靶点,为今后更好地了解NF-κB在ZIKV感染复制和发病机制中的作用打下了基础。

【参考文献】

- [1] Musso D, Gubler DJ. Zika Virus[J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(3):487-524.
- [2] Plourde AR, Bloch EM. A Literature review of Zika virus[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(7):1185-1192.
- [3] Landry ML, St George K. Laboratory diagnosis of Zika virus infection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(1):60-67.
- [4] Morabito KM, Graham BS. Zika virus vaccine development[J]. J Infect Dis, 2017, 216(suppl_10):S957-S963.
- [5] Liu Y, Liu J, Du S, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in Aedes aegypti mosquitoes[J]. Nature, 2017, 545(7655):482-486.
- [6] Saiz JC, Mart n-Acebes MA. The race to find antivirals for Zika virus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(6):e00411-17.
- [7] Sharma S, Tandel K, Dash PK, et al. Zika virus: A public health threat[J]. J Med Virol, 2017, 89(10):1693-1699.
- [8] Lee JY, Nguyen TTN, Myoung J. Zika virus-encoded NS2A and NS4A strongly downregulate NF-κB promoter activity[J]. J Microbiol Biotechnol, 2020, 30(11):1651-1658.
- [9] Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1):7-11.
- [10] Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10):725-734.
- [11] Zhu S, Luo H, Liu H, et al. p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Muller cells following Zika virus infection[J]. Antiviral Res, 2017(145):70-81.
- [12] Wang W, Li G, De Wu, et al. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1β secretion[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):106.
- [13] Afonina IS, Zhong Z, Karin M, et al. Limiting inflammation—the negative regulation of NF-κB and the NLRP3 inflammasome[J]. Nat Immunol, 2017, 18(8):861-869.
- [14] Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus[J]. PLoS One, 2013, 8(12):e82299.
- [15] Hiscott J, Kwon H, Genin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway[J]. J Clin Invest, 2001, 107(2):143-51.
- [16] Liu T, Zhang L, Joo D, et al. NF-κB signaling in inflammation [J]. Signal Transduct Target Ther, 2017(2):17023.

程度的正相关作用,且作用趋势相同,均在4 h时表达量达到最大值,其中可能由于 α 毒素作为A型Cp菌主要的毒素,所以KdpD/E系统对其调控作用相对要突出。以上表明KdpD/E双组份信号系统对A型产气荚膜梭菌主要毒素基因的表达具有一定的调控作用。建议在此基础上构建A型Cp菌kdpD/E基因缺失菌株,进一步了解KdpD/E双组份信号系统对Cp菌的调控机制,从而为A型Cp菌新型活苗的研究提供理论支撑。

【参考文献】

- [1] 龚霄,陈盼. 革兰氏阳性食源性致病菌[J]. 肉类研究,2008(05):52-60.
- [2] 董洁,张红垒,许信刚,等. 产气荚膜梭菌 β 毒素研究进展[J]. 动物医学进展,2012,33(8):81-85.
- [3] Rood JI. Virulence genes of *Clostridium Perfringens*[J]. Ann Rev Microbiol,1998(52):333-360.
- [4] Takehara M, Bandou H, Kobayashi K, et al. *Clostridium perfringens* α -toxin specifically induces endothelial cell death by promoting ceramide-mediated apoptosis [J]. Anaerobe, 2020, 65: 102262.
- [5] Alwis PA, Treerat P, Gong L, et al. Disruption of the *Burkholderia pseudomallei* two-component signal transduction system BbeR-BbeS leads to increased extracellular DNA secretion and altered biofilm formation[J]. Vet Microbiol,2020(242):108603.
- [6] 陈宝花,邹婷婷,黄运红,等. 嗜根考克氏菌双组分信号转导系统的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2020,39(8):3524-3531.
- [7] James AH. Two-component and phosphorelay signal transduction [J]. Current Opinion Microbiol,2000,3(2):165-170.
- [8] 郝艳华,张维,陈明. 细菌双组分系统的研究进展[J]. 中国农业科技导报,2012,14(2):67-72.
- [9] 李雷,卫科科,姜卫红,等. 细菌双组分系统应答调控蛋白调控策略的多样性[J]. 中国科学:生命科学,2017,47(5):462-469.
- [10] 李亮. 结核分枝杆菌双组分调控系统 KdpD/E 基因缺失株的构建及功能的初步研究[D]. 华中农业大学,2016.
- [11] Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K homeostasis and virulence[J]. PLoS pathogens,2013,9(3):e1003201.
- [12] Damn JB, Apell HJ. Role of protons in the pump cycle of Kdp-FABC investigated by time-resolved kinetic experiments[J]. Biochemistry,2014,53(19):3218-3228.
- [13] Iqbal Z, Seleem MN, Hussain HI, et al. Comparative virulence studies and transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals[J]. Scientific Reports,2016(6):35442.
- [14] Parish T, Smith DA, Kendall S, et al. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Infect Immun,2003b,71(3):1134-1140.
- [15] Haydel SE, Clark-Curtiss JE. Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages [J]. FEMS Microbiol Lett,2004,236(2):341-347.
- [16] Yang RL, Deng CY, Wei JW, et al. A large-scale mutational analysis of two-component signaling systems of *Lonsdalea quercina* revealed that KdpD-KdpE regulates bacterial virulence against host poplar trees[J]. Mol Plant-Microbe Interact,2018,31(7):724-736.
- [17] 张华伟,于丽佳,张春民,等. 外泌体 miRNA 的生物学功能及其在肺纤维化疾病中的调控作用[J]. 生物化学与生物物理进展,2019,46(11):1073-1084.
- [18] Capra EJ, Laub MT. Evolution of two-component signal transduction systems[J]. Ann Rev Microbiol,2012(66):325-347.
- [19] Xie MQ, Wu MY, Han AD. Structural insights into the signal transduction mechanism of the K⁺-sensing two-component system KdpDE[J]. Sci Signaling,2020,13(643):eaaz2970.
- [20] Mei X, Muhammad AR, Yi G, et al. The KdpD/KdpE two-component system contributes to the motility and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Res Vet Sci,2020,131:24-30.
- [21] 赵丽萍. 金黄色葡萄球菌 AI-2 群体感应系统的调控[D]. 中国科学技术大学,2010.
- [22] Xue T, You Y, Hong D, et al. The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K⁺ sensing and Agr signaling to infection programming. Infect Immun. 2011,79(6):2154-67.
- [23] 张燕飞,庞欢瑛,简纪常,等. 溶藻弧菌双组分调控系统 KdpDE 减毒活疫苗的构建及其免疫效果评价[J]. 水产学报,2015,39(10):1558-1568.
- [17] Gao J, Chen J, Lu W, et al. Construction of an infectious clone of Zika virus stably expressing an EGFP marker in a eukaryotic expression system[J]. Virol J,2021,18(1):151.
- [18] Cheng YL, Lin YS, Chen CL, et al. Dengue virus infection causes the activation of distinct NF- κ B pathways for inducible nitric oxide synthase and TNF- α expression in RAW264.7 cells[J]. Mediators Inflamm,2015(2015):274025.
- [19] Abraham S, Nagaraj AS, Basak S, et al. Japanese encephalitis virus utilizes the canonical pathway to activate NF- κ B but it utilizes the type I interferon pathway to induce major histocompatibility complex class I expression in mouse embryonic fibroblasts [J]. J Virol,2010,84(11):5485-5493.
- [20] Refaat H, Mady FM, Sarhan HA, et al. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19[J]. Int J Pharm,2021(592):120028.
- [21] Burke TR Jr, Fesen MR, Mazumder A, et al. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase[J]. J Med Chem,1995,38(21):4171-4178.
- [22] de Sousa JR, Azevedo RSDS, Martins Filho AJ, et al. In situ inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases[J]. Cytokine,2018(111):255-264.

【收稿日期】 2022-02-11 【修回日期】 2022-05-05

【收稿日期】 2022-03-10 【修回日期】 2022-05-16

(上接 625 页)