

肝 癌

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001641

RNA编辑酶 ADAR1 在 Huh7.5.1 细胞中
抑制 HCV 复制的研究袁 琳¹, 杨生永², 胡 源¹, 胡接力¹, 段晓琼³, 林温育³, 黄爱龙¹, 涂 增²

(1. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 基础医学院病原生物学教研室, 重庆 400016;

3. 哈佛大学医学院麻省总医院肝病和胃肠病研究中心, 美国马萨诸塞州 02114)

【摘要】目的:探究干扰素在 Huh7.5.1 细胞中对 RNA 编辑酶(adenosine deaminases acting on RNA 1, ADAR1)表达的影响, 以及 ADAR1 对丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)复制的调控作用。**方法:**干扰素(IFN- α , 30 IU/mL)刺激 Huh7.5.1 细胞后, 利用 real-time PCR 和 Western blot 检测 ADAR1 表达水平的变化, 同时 HCV 以一定滴度(0.2 MOI)感染 Huh7.5.1 细胞, 观察 IFN- α 对 HCV 复制的影响; 利用 siRNA 降低 ADAR1 表达, 过表达质粒(ADAR1 p110 和 p150)增加 ADAR1 表达, 并进一步利用基因编辑技术建立 ADAR1 稳定敲除细胞株, 明确 ADAR1 与 HCV 的复制关系。**结果:**IFN- α 诱导 Huh7.5.1 细胞 ADAR1 p150 表达(48 h: $t=10.400$, $P=0.007$; 72 h: $t=19.390$, $P=0.002$), 而不影响 ADAR1 p110 表达(48 h: $t=0.806$, $P=0.472$; 72 h: $t=1.929$, $P=0.133$), 同时 IFN- α 可显著抑制 HCV 复制(48 h: $t=10.170$, $P=0.001$; 72 h: $t=35.810$, $P=0.000$)。ADAR1 p110 和 p150 过表达 48 h 后, HCV 病毒核酸和蛋白水平均明显低于空白对照($P=0.004$, $P=0.015$); ADAR1 siRNA 干扰后, HCV 复制增加了 2 倍以上, 差异显著($t=13.530$, $P=0.000$); 利用 Crispr-cas9 技术敲除掉 Huh7.5.1 中的 ADAR1 后, HCV 复制也明显增加($t=5.259$, $P=0.023$); ADAR1 干扰后 IFN- α 仍然存在对 HCV 明显的抑制作用($t=9.146$, $P=0.001$)。**结论:**IFN 诱导蛋白 ADAR1 可以抑制 HCV 复制, 且 ADAR1 部分介导了 IFN- α 对 HCV 复制的抑制。

【关键词】丙型肝炎病毒; RNA 腺苷脱氨酶(ADAR1); Huh7.5.1 细胞; 干扰素**【中图分类号】**R979.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-08-04

ADAR1 mediated-inhibition of HCV replication in Huh7.5.1 cells

Yuan Lin¹, Yang Shengyong², Hu Yuan¹, Hu Jieli¹, Duan Xiaoqiong³, Lin Wenyu³, Huang Ailong¹, Tu Zeng²

(1. The Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Molecular Medicine and Tumor Research Center; Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University; 3. Liver Center and Gastrointestinal Division, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School)

【Abstract】Objective: To explore the effect of interferon(IFN- α) on expression of adenosine deaminases acting on RNA 1(ADAR1) in Huh7.5.1 cells and the regulation of ADAR1 on HCV replication. **Methods:** The expressions of ADAR1 were measured in Huh7.5.1 cells post-treatment by IFN- α (30 IU/mL), and the effects of IFN- α modulation were determined through addition of IFN- α following addition of infectious JFH HCV (0.2 MOI) to Huh7.5.1 cells. ADAR1 siRNA knockdown, overexpression and knockout in Huh7.5.1 cells were incorporated to testify the relation of ADAR1 and HCV replication. **Results:** IFN- α induced the significant expression of ADAR1 p150 on both RNA and protein level (48 h: $t=10.400$, $P=0.007$; 72 h: $t=19.390$, $P=0.002$), while the level of ADAR1 p110 remain stable (48 h: $t=0.806$, $P=0.472$; 72 h: $t=1.929$, $P=0.133$), and the level of HCV RNA decreased significantly (48 h: $t=10.170$, $P=0.001$; 72 h: $t=35.810$, $P=0.000$). Overexpression of ADAR1 p110 and p150 inhibited HCV replication on the level of RNA and protein ($P=0.004$, $P=0.015$). The replication of HCV increased by two folds after ADAR1 siRNA knockdown ($t=13.530$, $P=0.000$).

Compared to intact cells, ADAR1 knockout Huh7.5.1 cells enhanced HCV replication ($t=5.259$, $P=0.023$). IFN- α still showed significant inhibitory effect even after ADAR1 knockdown by siRNA ($t=9.146$, $P=0.001$). **Conclusion:** ADAR1 induced by IFN- α inhibits HCV replication in Huh7.5.1 cells, and ADAR1 may partially mediate the inhibitory effect of IFN- α on HCV replication.

【Key words】hepatitis C virus; adenosine deaminases acting on RNA 1 (ADAR1); Huh7.5.1 cells; interferon

作者介绍: 袁 琳, Email: yuanlinchy@163.com,

研究方向: 肝炎病毒及其复制调控。

通信作者: 涂 增, Email: tuz1980@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81501751, 81201948); 重庆市科委前沿与应用基础研究资助项目 (编号: cstc2015jcyjA10006); 重庆市博士后科学基金资助项目 (编号: Xm2014006); 重庆市九龙坡区科技计划资助项目 (2014.05, 2015.02)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180514.0906.007.html> (2018-05-14)

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)为有包膜的正链 RNA 病毒,属黄病毒科黄病毒属。75%~85%的 HCV 感染者发展为慢性肝病,HCV 是慢性肝炎和肝硬化及肝癌的重要病因,严重危害人类的健康和生命。目前口服直接抗病毒药物对 HCV 有效率达 95%以上,使得丙型肝炎变成可以治愈的疾病^[1]。虽然如此,治愈的基础依然依赖于宿主免疫力维持和提高,因此明确宿主抵抗 HCV 感染的机制仍然具有重要意义。干扰素(interferon, IFN)是宿主抵抗 HCV 感染的天然免疫反应中的重要分子。目前研究发现,IFN 诱导蛋白如内质网关联病毒抑制蛋白(viperin)、干扰素刺激基因-20(interferon-stimulated gene-20, ISG20)和鸟苷酸结合蛋白-1(guanine nucleotide-binding regulatory protein-1, GBP1),可以抑制 HCV 复制,并调节 IFN 反应^[2]。RNA 编辑酶(adenosine deaminases acting on RNA, ADAR1)可将 RNA 的腺嘌呤脱氨基修饰,导致基因组发生变化从而影响病毒复制。哺乳动物细胞中,ADAR1 主要有 2 种形式,干扰素诱导表达型 p150 和组成性表达型 p110^[3-4]。目前,ADAR1 调节 HCV 复制的结论并不相一致。Taylor^[5]和 Upadhyay^[6]等发现在 HCV 亚基因组复制子细胞中干扰或竞争性抑制 ADAR1 表达促进了 HCV 复制,而 Schoggins 等^[7]利用慢病毒过表达 ADAR1 后并没有检测到其对 HCV 复制的明显抑制,甚至有促进作用,同时 Jiang 等^[8]也未检测到 ADAR1 的抗 HCV 作用。上述结论的差异可能在于不同背景的 HCV 亚基因组复制子和细胞环境变化大,并不能有效模拟 HCV 自然感染系统。JFH1 HCV 体外细胞感染系统的建立为研究者提供了 HCV 与宿主相互作用的技术平台^[9]。基于此,本研究利用 JFH1 HCV 感染系统在肝癌细胞系 Huh7.5.1 中检测 ADAR 与 HCV 之间关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料

DMEM/F12 培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(FBS, Gibco, 美国);青霉素、链霉素(Life Technologies, 美国);鼠抗 ADAR1(Santa Cruz, 美国)、HCV Core 抗体和鼠抗 Actin(Sigma, 美国);ADAR1 质粒(重庆医科大学基础医学院杨生永老师馈赠),siADAR1 及 siRNA 阴性对照(si-NEG, GE Dharmacon, 美国),ADAR1 Crispr gRNA (GenScript, USA), G418 (Promega, 美国),转染试剂 Lipofectamine LTX 和 RNAiMax (Life Technologies, 美国),Western blot 裂解液(RIPA)及蛋白酶抑制剂(Sigma, 美国);RNA 提取 QIA Shredder and RNeasy

kit(Qiagen, 美国),实时荧光 PCR 仪 QuantStudio® 3 system (Applied Biosystems, 美国),SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.2 细胞培养及 HCV 感染

Huh7.5.1 和 HCV 重组体 J6/JFH1 质粒为哈佛大学医学院附属麻省总医院馈赠;细胞系培养于完全培养基(DMEM、10%FBS 和 1%双抗),置于 37 ℃、5%CO₂ 恒温恒湿培养箱中培养。感染 Huh7.5.1 细胞的重组体 J6/JFH1 为 HCV 2a 基因型,病毒液感染滴度为 0.2 感染复数(multiplicity of infection, MOI),于转染后第 2 天逐滴加入。

1.3 siRNA 转染

Huh7.5.1 细胞用胰酶消化后重悬,铺板 6 孔板,每孔 2×10^5 个细胞。参照 Lipofectamine RNAiMax 转染试剂说明,分别制备 siRNA 阴性对照(siNeg)和 siADAR 与 RNAiMax 混悬液,静置后逐滴加入 6 孔板。si-ADAR1 终浓度为 20 nmol/L。根据需要更换培养基,收集细胞,转染后 72 h 检测 mRNA 和蛋白表达。

1.4 ADAR1 敲除细胞株(ADAR1-KO Huh7.5.1)的获得

Crispr gRNA 序列克隆进表达载体 pGS-gRNA-Neo 后,用 LTX 转染试剂共转染 pGS-gRNA-Neo 和 Cas9 表达质粒至 Huh7.5.1 细胞中,后经 G418 筛选获得 ADAR1-KO Huh7.5.1 细胞,并进行 mRNA 和蛋白水平验证。取等量的 ADAR1-KO Huh7.5.1 细胞和原始 Huh7.5.1 细胞培养后感染 HCV JFH1,感染后第 3 天收集细胞,提取 mRNA 和蛋白,检测 HCV 复制情况。

1.5 ADAR1 过表达

Huh7.5.1 细胞铺板后,用 Lipofectamine LTX DNA 转染试剂转染 ADAR1 质粒(p150、p110)和对照质粒 pCMV,每孔 2 μg,操作按说明书进行。

1.6 RNA 提取和 qRT-PCR

转染后第 3 天收集细胞,完全按照 Qiagen RNA 提取试剂盒(Shredder and RNeasy kit)进行。以随机引物根据 cDNA 逆转录试剂盒说明书进行 mRNA 逆转录(High-capacity cDNA reverse transcription kits),cDNA 于-20 ℃保存待用。实时荧光 PCR 仪 QuantStudio® 3 system 进行 PCR 反应,循环条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s。GAPDH 为内参,目的基因和 GAPDH 引物序列见表 1。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因相对表达量。

表 1 qRT-PCR 检测所用引物
Tab.1 Primers for qRT-PCR detection

基因	引物序列(5'-3')
ADAR1 p110	上游:GGCAGCCTCCGGGTG
	下游:CTGTCTGTGCTCATAGCCTTGA
ADAR1 p150	上游:CTTCCAGTCGCGAGTAGCG
	下游:CTGTCTGTGCTCATAGCCTTGA
GAPDH	上游:TGTGGCATCAATGGATTTCG
	下游:ACACCATGTATTCCGGTCAAT
HCV JFH	上游:CTGTCTTCACGCAGAAAGCG
	下游:TCGCAACCCAACGCTACTCG

1.7 Western blot

收集对数生长期细胞,4℃预冷 PBS 洗 2 遍,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液,冰上裂解 20 min,4℃ 12 000 g 离心 15 min,取上清于新 EP 管,BCA 法测蛋白浓度。取 30 mg 蛋白,加入上样缓冲液,煮沸变性 10 min。以 NuPAGE Novex pre-cast 4%~12%预制 SDS-PAGE 胶分离蛋白,蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC)上,5%脱脂奶封闭 3 h 后孵育一抗,4℃过夜。次日以 TBST 洗膜(10 min×3 次)后,二抗孵育 1 h,TBST 漂洗后用 ECL 试剂显色观察。

1.8 数据分析

数据资料采用 GraphPad Prism 7.00 进行统计学分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组数据间差异性采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IFN- α 抑制 HCV 复制,同时诱导 ADAR1 的表达

Huh7.5.1 细胞铺板 24 h 后,逐滴加入 JFH1 HCV 感染细胞,4 h 后添加 IFN- α (终浓度 30 IU/mL),之后 48 h 和 72 h 收集细胞,Western blot 和 qRT-PCR 分别在核酸和蛋白水平检测 ADAR1、HCV RNA 和 HCV 核心蛋白的变化。结果显示,ADAR1 和 HCV RNA 随 IFN- α 处理时间不同呈现不同变化。ADAR1 p110 mRNA 表达量在 IFN- α 处理前后保持相对稳定,差异无统计学意义(48 h: $t=0.806$, $P=0.472$;72 h: $t=1.929$, $P=0.133$);而 ADAR1 p150 mRNA 表达量明显升高,IFN- α 刺激 48 h 和 72 h 与未处理相比较,ADAR1 p150 分别增加 4.97 倍(48 h: $t=10.400$, $P=0.007$)和 6.53 倍(72 h: $t=19.390$, $P=0.002$)。HCV RNA 表达量明显受到抑制,与空白对照组相比,HCV RNA 水平分别下降至 32.30%(48 h: $t=10.170$, $P=0.001$)和 25.00%(72 h: $t=35.810$, $P=0.000$)(表 2)。上述实验结果表明 IFN- α 上调 ADAR1 p150 表达,并显著抑制 HCV 复制。Western blot 检测 ADAR1 和 HCV core 蛋白表现出相同的趋势(图 1)。

2.2 过表达 ADAR1 抑制 HCV 复制

Huh7.5.1 细胞中转染 ADAR1 表达质粒(ADAR1 p110 和 p150),并设定 pCMV 质粒转染为阴性对照质粒,24 h 感

染 JFH1,而后继续培养 48 h 收集细胞,提取 RNA 和蛋白质,qRT-PCR 及 Western blot 检测 HCV RNA 和蛋白。结果显示,ADAR1 过表达后,HCV 在 Huh7.5.1 中复制降低。方差分析提示,ADAR1 p110 和 p150 过表达后,细胞中 HCV RNA 相对表达量与空载体对照比较差异具有统计学意义($F=14.350$, $P=0.005$)。进一步利用 Dunnett-*t* 两两比较表明,与阴性对照相比,HCV RNA 水平分别下降了 46.63%(p110; $P=0.004$)和 60.01%(p150; $P=0.015$)(表 3),同时 Western blot 显示 ADAR1 过表达后 HCV Core 蛋白呈现相似下降趋势(图 2)。上述实验结果表明 ADAR1 p110 和 p150 可以抑制 HCV 复制。

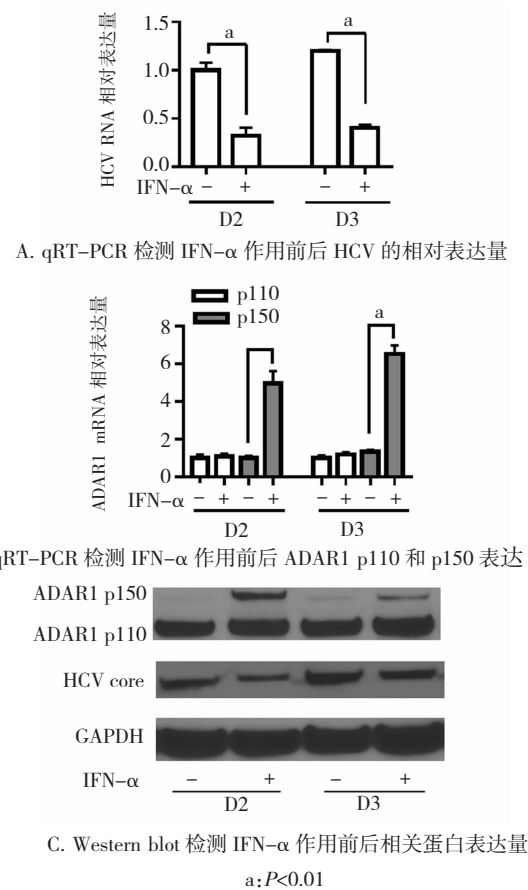


图 1 IFN- α 作用后 HCV Core 和 ADAR1 的表达

Fig.1 Expression of HCV Core and ADAR1 in Huh7.5.1 cells after IFN-treatment

表 2 IFN- α 作用后 HCV RNA 和 ADAR1 的相对表达量 ($n=3$)

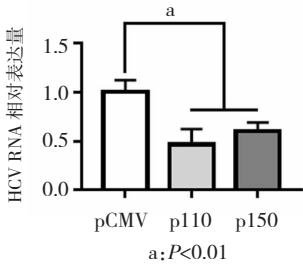
Tab.2 Relative quantity of HCV RNA and ADAR1 after IFN-treatment ($n=3$)

处理	HCV RNA 相对表达量		ADAR1			
			p110		p150	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
空白组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.15	1.35 ± 0.12	1.35 ± 0.10
IFN组	0.32 ± 0.08	0.25 ± 0.03	1.11 ± 0.13	1.21 ± 0.11	4.97 ± 0.65	6.53 ± 0.45
<i>t</i> 值	10.170	35.810	0.806	1.929	10.400	19.390
<i>P</i> 值	0.001	0.000	0.472	0.133	0.007	0.002

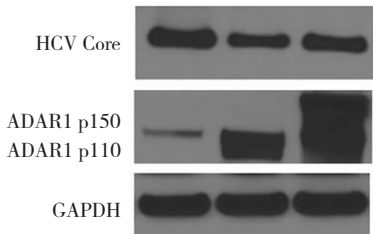
表 3 ADAR1 过表达后 HCV RNA 的相对表达量 ($n=3$)

Tab.3 Relative quantity of HCV RNA after ADAR1 overexpression ($n=3$)

组别	HCV RNA 相对表达量
pCMV	1.00 ± 0.12
p110	0.47 ± 0.16
p150	0.60 ± 0.09
<i>F</i> 值	14.350
<i>P</i> 值	0.005



A. qRT-PCR 检测 ADAR1 过表达后 HCV RNA 表达



B. Western blot 检测 ADAR1 过表达后 HCV Core 蛋白的表达

图 2 ADAR1 过表达后 HCV mRNA 和 Core 蛋白表达水平检测

Fig.2 The level of HCV mRNA and Core protein after ADAR1 overexpression

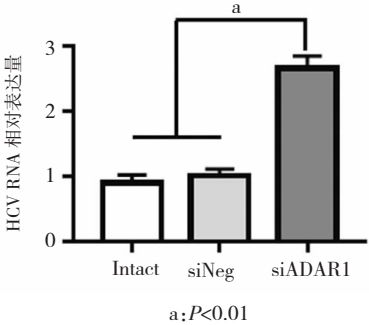
2.3 干扰 ADAR1 促进 HCV 复制

化学合成的 ADAR1 siRNA 转染 Huh7.5.1 细胞后第 3 天,采用实时定量 PCR 检测和 Western blot 检测 ADAR1 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达。表 4 方差分析显示,3 组间 ADAR1 的表达存在统计学差异 (p110: $F=21.110$, $P=0.002$; p150: $F=82.700$, $P=0.000$)。进一步利用 Dunnett- t 两两比较表明,与 siNeg 对照相比,siRNA 干扰后,ADAR1 p110 和 p150 蛋白在 mRNA 水平分别降低至 29.40%和 27.00%,差异有统计学意义 ($P=0.000$, $P=0.000$)。ADAR1 siRNA 干扰效果在蛋白水平也得到验证(图 3B)。Huh7.5.1 细胞中 ADAR1 干扰后第 2 天感染 HCV JFH1,72 h 后检测 HCV mRNA 和蛋白表达水平。方差分析显示,处理前后 3 组间存在统计学差异 ($F=147.800$, $P=0.000$)。Dunnett- t 两两比较表明,ADAR1 干扰后 HCV 的 RNA 水平较 siNeg 对照组高 2.66 倍,差异具有统计学意义 ($P=0.000$)。蛋白水平显示相同趋势,说明 ADAR1 干扰后 HCV 复制增加(图 3B)。综上所述表明,ADAR1 抑制 HCV 复制。

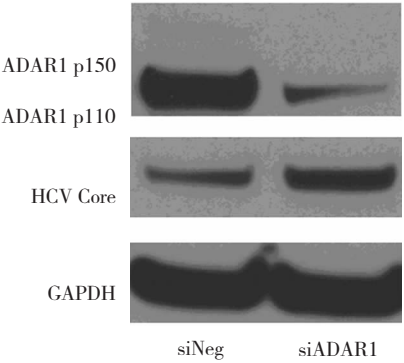
表 4 ADAR1 干扰后 HCV RNA 相对表达量 ($n=3$)

Tab.4 Relative quantity of HCV RNA after ADAR1 knockdown ($n=3$)

	HCV RNA 相对表达量	ADAR1	
		p110	p150
空白对照	0.90 ± 0.12	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.10
siNeg 阴性对照	1.01 ± 0.10	0.93 ± 0.14	0.87 ± 0.01
siADAR1	2.66 ± 0.19	0.29 ± 0.07	0.27 ± 0.08
<i>F</i> 值	147.800	21.110	82.700
<i>P</i> 值	0.000	0.002	0.000



A. qRT-PCR 检测 ADAR1 干扰后 HCV RNA 的表达



B. Western blot 检测 ADAR1 干扰后 HCV Core 蛋白的表达

图 3 siRNA 干扰 ADAR1 的表达促进 HCV 复制

Fig.3 siRNA knockdown of ADAR1 promoted the replication of HCV

2.4 Crispr/cas9 敲除 ADAR1 后 HCV 复制增加

为进一步证实 ADAR1 调控 HCV 复制,基于 Crispr/cas9 技术,本研究成功获得了 1 株 ADAR1 敲除 Huh7.5.1 细胞株 (gRNA-KO Huh7.5.1)。细胞株 ADAR1 mRNA 和蛋白水平明显降低(图 4A),其中 ADAR1 的 mRNA 减少 94.52%,差异有统计学意义 (表 5, $t=35.810$, $P=0.005$)。在此基础上,将原始细胞株和 ADAR1 敲除细胞株相同数目铺板,24 h 后感染 HCV,收集细胞,计数相同的细胞数目,后检测病毒复制。结果显示,与原始细胞株比较,gRNA-KO Huh7.5.1 细胞中 HCV 复制增加 3.26 倍 ($t=5.270$, $P=0.023$),进一步证实 ADAR1 在 Huh7.5.1 中抑制 HCV 复制(图 4B)。

表 5 ADAR1 敲除后 HCV RNA 的相对表达量 ($n=3$)Tab.5 Relative quantity of HCV RNA after ADAR1 knockout ($n=3$)

处理	HCV RNA 相对表达量	ADAR1 p110
空白对照(Intact)	1.000 ± 0.220	1.000 ± 0.050
ADAR1 敲除(gRNA KO)	3.263 ± 0.710	0.055 ± 0.014
t 值	5.270	35.810
P 值	0.023	0.005

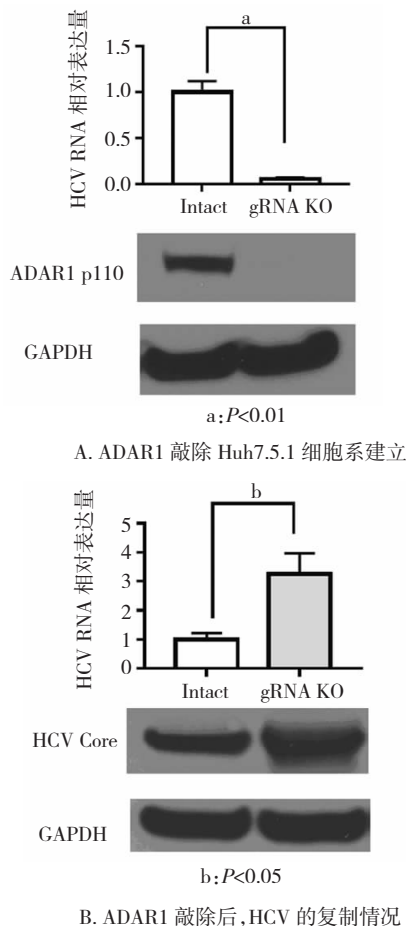


图 4 ADAR1 敲除促进 HCV 复制

Fig.4 Knockout of ADAR1 by Cripsr-cas9 system promoted HCV replication

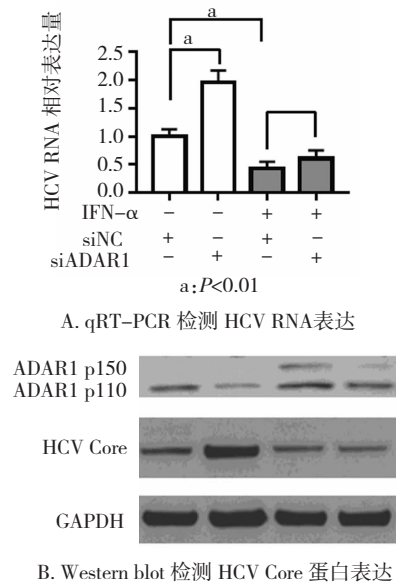
2.5 IFN 抑制 HCV 部分通过 ADAR1 发挥作用

为进一步研究 ADAR1 在 IFN- α 介导的抗丙型肝炎病毒中的作用, ADAR1 敲低 24 h 后 IFN- α 处理(浓度 30 IU/mL), 转染后 72 h, 核酸和蛋白水平检测 HCV 表达。表 6 显示, IFN- α 处理后, 未干扰对照(siNC)和 siADAR1 处理组中 HCV RNA 和蛋白水平明显受到抑制($t=6.724, P=0.005$; $t=9.146, P=0.001$); 而预先 IFN- α 处理, 再干扰 ADAR1 后 HCV mRNA 和蛋白水平差异无统计学意义($t=1.627, P=0.182$)。这说明干扰 ADAR1 影响了 IFN- α 的抗病毒作用, 但 ADAR1 并不

是 IFN- α 的抗病毒作用调控的关键, 提示除了 ADAR1 外, 其他因子和途径也会参与 IFN- α 对 HCV 的抑制作用(图 5)。

表 6 ADAR1 干扰后 IFN- α 对 HCV RNA 水平的影响 ($n=3$)Tab.6 Effect of IFN- α on mRNA expression of HCV following ADAR1 knockdown ($n=3$)

处理	siNC	siADAR1	t 值	P 值
空白组	1.000 ± 0.130	1.960 ± 0.210	6.724	0.005
IFN 组	0.437 ± 0.116	0.610 ± 0.143	1.627	0.182
t 值	5.669	9.146		
P 值	0.005	0.001		

图 5 IFN- α 通过 ADAR1 抑制 HCV 复制Fig.5 ADAR1 mediated the inhibition of HCV replication by IFN- α

3 讨论

ADAR1 是一种 RNA 编辑酶, 参与 RNA 转录后的调控。ADAR1 能导致 RNA 特定位点腺嘌呤(A)脱氨转变为次黄嘌呤(I), 进一步被识别为 G, 引起细胞和病毒基因发生 A 到 G 的转变, 从而调节细胞生物学过程和病毒感染^[8-9]。本文利用 JFH1 HCV 体外细胞感染系统研究肝癌细胞系 Huh7.5.1 中 ADAR 与 HCV 之间关系, 结果证实 ADAR1 可以抑制 HCV 复制, 且介导了 IFN- α 对 HCV 复制的抑制作用。

ADAR1 有 2 种剪切异构体, 从不同转录起始位点转录并翻译为分子量大约 110 kD 和 150 kD 2 种蛋白, p110 为组成性表达, 而 p150 为干扰素诱导

表达型^[3-4]。p150 主要分布在细胞核和细胞质中, p110 主要定位于细胞核, 且其在肝脏中含量较丰富, 以肝脏为主要侵犯部位的病毒, 在复制过程中将受到宿主 ADAR1 调控, 如 HCV 和丁型肝炎病毒 (HDV)^[8-9]。本文证实, ADAR1 p150 和 p110 在 Huh7.5.1 细胞中都可以抑制 HCV 复制, 之前研究结果的不一致可能是先前研究普遍利用了 HCV 亚基因组复制子, 而不是自然感染模型。ADAR1 具有 3 个结构域, N 末端的 Z-DNA 结合结构域、双链 RNA 序列结合结构域和 C 端脱氨酶结构域。ADAR1 不同结构域在参与病毒复制调节作用不一致, 下一步可将不同结构域突变失活, 明确 ADAR1 在 Huh7.5.1 中抑制 HCV 复制的功能结构域。

ADAR1 调控病毒复制机制比较复杂, 大体分为 2 种, RNA 编辑依赖和非 RNA 编辑依赖^[9]。ADAR1 通过 RNA 编辑酶活性诱导 HCV、麻疹病毒和流感病毒发生 A-to-I 编辑, 进而降解病毒 RNA 发挥抗病毒作用^[3,10-11], 同时 RNA 编辑酶活性也会帮助 HDV 包装, 促进 HDV 感染^[12]; 另外, ADAR1 可抑制 IFN 产生、蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR) 及干扰素调节因子-3 (interferon regulatory factor-3, IRF3) 的激活等进而影响病毒感染的宿主反应, 调控病毒复制^[9]。本文研究发现, Huh7.5.1 细胞中过表达 ADAR1 后, HCV 复制降低, 利用 siRNA 干扰掉 ADAR1 后, HCV 复制增加, 证明 ADAR1 在 Huh7.5.1 细胞中抑制 HCV 复制。结合 Taylor 等^[5]的研究, ADAR1 可能经编辑 HCV 的 RNA 而发挥抗病毒作用。

细胞培养模型中 IFN- α 的抗 HCV 作用效果显著, 但机制未明。IFN- α 诱导产生的效应因子参与其中, 发挥关键作用^[2,5,13]。本文结果发现 ADAR1 虽然为 IFN- α 诱导, 并发挥抑制 HCV 作用, 但并不是 IFN- α 发挥抗 HCV 作用决定因子。IFN- α 刺激细胞后产生的效应因子颇多, 目前很多效应因子被认定为干扰素刺激表达基因, 但 IFN- α 的效应是总体效应因子和宿主因素共同的结果, 单一效应因子的作用可能并不明显。有研究发现 IFN- α 效应因子可发挥抗病毒和促病毒的双重作用, 同时这些效应因子并不一定介导 IFN- α 的抗病毒作用^[2,5,13]。而且, 病毒复制过程产生的结构蛋白和非结构蛋白可显著抑制 IFN- α 活性, 如乙型肝炎病毒聚合酶^[14]、HCV 非结构蛋白^[15]和流感病毒 NS1 蛋白等^[16]。这些凸显了 IFN- α 抗病毒机制的复杂性, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Falade-Nwulia O, Suarez-Cuervo C, Nelson DR, et al. Oral direct-acting agent therapy for hepatitis C virus infection: a systematic review [J]. *Ann Intern Med*, 2017, 166(9): 637-648.
- [2] Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions [J]. *Curr Opin Virol*, 2011, 1(6): 519-525.
- [3] Song C, Sakurai M, Shiromoto Y, et al. Functions of the RNA editing enzyme ADAR1 and their relevance to human diseases [J]. *Genes*, 2016, 7(12): E129.
- [4] Samuel CE. ADARs: viruses and innate immunity [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2012, 353: 163-195.
- [5] Taylor DR, Puig M, Darnell ME, et al. New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1 [J]. *J Virol*, 2005, 79(10): 6291-6298.
- [6] Upadhyay A, Dixit U, Manvar D, et al. Affinity capture and identification of host cell factors associated with hepatitis C virus (+) strand subgenomic RNA [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(6): 1539-1552.
- [7] Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse array of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response [J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 481-485.
- [8] Jiang D, Guo H, Xu C, et al. Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus [J]. *J Virol*, 2008, 82(4): 1665-1678.
- [9] Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture [J]. *Science*, 2005, 309(5734): 623-626.
- [10] Okonski KM, Samuel CE. Stress granule formation induced by measles virus is protein kinase PKR dependent and impaired by RNA adenosine deaminase ADAR1 [J]. *J Virol*, 2013, 87(2): 756-766.
- [11] Suspène R, Petit V, Puyraimond-Zemmour D, et al. Double-stranded RNA adenosine deaminase ADAR-1-induced hypermutated genomes among inactivated seasonal influenza and live attenuated measles virus vaccines [J]. *J Virol*, 2011, 85(5): 2458-2462.
- [12] Casey JL. RNA editing in hepatitis delta virus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 307: 67-89.
- [13] Metz P, Dazert E, Ruggieri A, et al. Identification of type I and type II interferon-induced effectors controlling hepatitis C virus replication [J]. *Hepatology*, 2012, 56(6): 2082-2093.
- [14] Chen J, Wu M, Zhang X, et al. Hepatitis B virus polymerase impairs interferon- α -induced STAT activation through inhibition of importin- α 5 and protein kinase C- δ [J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 470-482.
- [15] Hiet MS, Bauhofer O, Zayas M, et al. Control of temporal activation of hepatitis C virus-induced interferon response by domain 2 of nonstructural protein 5A [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4): 829-837.
- [16] Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo YM, et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus [J]. *J Virol*, 2007, 81(2): 514-524.

(责任编辑: 冉明会)