

人轮状病毒 NSP4 蛋白的表达及其致小鼠腹泻作用的初步研究*

王大燕^{1,2}, 王健伟^{1**}, 魏 强¹, 屈建国¹, 于修平², 洪 涛¹

(1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京, 100052; 2. 山东大学医学院, 济南, 250012)

Expression of Human Rotavirus Nonstructural Protein NSP4 and Its Activity of Diarrhea Induction in New Borne Mouse

WANG Da-yan^{1,2}, WANG Jian-wei^{1**}, WEI Qiang¹, QU Jian-guo¹, YU Xiu-ping², HUNG Tao¹

(1. Institute of Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China; 2. Medical School of Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: To investigate the function of human rotavirus nonstructural protein NSP4 in the pathogenesis of rotavirus, the cDNA of NSP4 gene of a human rotavirus strain 97SZ8 was cloned and its 86-175 amino acid at the C terminal fused with GST was expressed in *E.coli* BL-21, the recombinant protein was then purified with Glutathione SepharoseTM 4B affinity chromatography. Purified NSP4 protein was administered to young (6d) inbred Balb/C mice by the intraperitoneal (IP) route (0.4nmol or 1.5nmol). IP administration of 0.4nmol recombinant protein induced diarrhea in just 1 of the 6 pups, while diarrhea was observed in all of the 12 pups when inoculated with 1.5nmol GST-NSP4_T and resulted in reduced weight gain (P<0.05). In this study, a mouse model of diarrhea induced by human rotavirus NSP4 was successfully developed, and can be used widely in the highlights on mechanisms of diarrhea, treatment and prevention of human rotaviruses.

Key Words: Rotavirus; Diarrhea; NSP4

摘要: 研究人轮状病毒非结构蛋白 NSP4 在轮状病毒致病性中的作用。分离得到我国人轮状病毒 97SZ8 株, 以谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白的形式在大肠杆菌 BL-21 中表达 NSP4 蛋白 C 端 86-175 氨基酸并用 Glutathione SepharoseTM 4B 亲和纯化。将纯化蛋白分别以 0.4nmol 和 1.5nmol 的剂量腹腔注射新生 Balb/C 乳鼠, 记录腹泻发生和体重变化情况。当注射 0.4nmol GST-NSP4_T 重组蛋白时, 有 1 只小鼠发生一过性腹泻 (1/6), 给予 1.5nmol 重组蛋白时, 实验组所有乳鼠都先后出现了腹泻, 存在一定的剂量依赖性。本研究初步在新生小鼠建立了一种人轮状病毒腹泻动物模型, 该模型有望在人轮状病毒的致腹泻机理、治疗和预防研究中发挥重要作用。

关键词: 轮状病毒; 腹泻; NSP4

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0217-04

轮状病毒 (Rotavirus, RV) 是全世界婴幼儿严重腹泻的最主要病因^[1], 轮状病毒基因组由 11 个双链 RNA 片段组成, 编码 6 个结构蛋白 (VP1~VP4、VP6、VP7) 及 5 个非结构蛋白 (NSP1~NSP5)^[2]。虽然已经进行了近 30 年的研究, 但 RV 致泻机制的许多环节尚未阐明。Ball 等^[3]首次报道猴轮状病毒

SA11 株 NSP4 可能与轮状病毒的毒力有关。但是这种相关性目前还存在争议^[4,5], 人轮状病毒 (HRV) NSP4 在致病中的作用尚有待进一步研究。NSP4 蛋白由基因 10 编码, 含有一个开放读码框架, 编码一个 175 氨基酸的蛋白。欲深入阐明 NSP4 在轮状病毒腹泻中的作用及其机制, 我们对一株从婴幼儿

收稿日期: 2002-12-26, 修回日期: 2003-02-20

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30000145); 国家“八六三”计划生物和现代农业技术领域资助项目 (2001AA215011, 2002AA206641)

作者简介: 王大燕 (1975-), 女, 山东省籍, 病毒病所与山东大学联合培养博士生, 主要从事分子病毒学研究。

** 通讯作者: 王健伟 (1968-), 男, 山东省籍, 副研究员, 研究方向为分子病毒学与基因工程。Correspondence author.

腹泻粪便样品中分离得到的 HRV NSP4 基因的 86~175 氨基酸编码区进行了表达 (NSP4_T, truncated NSP4), 在小鼠上初步建立了其致腹泻模型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌菌株 BL-21 (DE3) 购自 Novagen 公司, 质粒 pGEX-5X-1 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品, 实验所用工具酶购自 TaKaRa 公司。含有轮状病毒 97SZ8 株全长 NSP4 基因片段的克隆质粒 pUCm-T-NSP4 由本室构建^[6], 其 GenBank 序列号为 AY159649。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IgG 抗体购自中山公司, 还原型谷胱甘肽购自 Serva 公司, Glutathione SepharoseTM 4B 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。实验用轮状病毒抗体阴性的 Balb/C 孕鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 表达质粒 pGEX-5X-NSP4_T 的构建

PCR 扩增 NSP4_T, 在扩增片段的上下游引物分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 引物序列为: beg5'gctgaattcatgaaagagcaggttactactaaaga3', end5'ct-cctcgagtcacatggatgcagtcacttc3', PCR 产物连于 pcDNA- II 载体, 经双酶切定向克隆入表达载体 pGEX-5X-1, 转化大肠杆菌 BL-21, 筛选得到重组质粒。

1.3 重组融合蛋白 GST-NSP4_T 的诱导表达与纯化

挑取含重组质粒的菌落接种于含 100μg/mL 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 取菌液按 1:100 比例接种于新鲜的含 Amp 的 LB 液体培养基, 37℃ 培养至 OD₆₀₀=0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 27℃ 低温振荡培养 8h, 离心收集菌体, 冰浴中超声破碎, 使用 Glutathione SepharoseTM 4B 作为纯化介质, 对可溶性蛋白进行纯化。用 pGEX-5X-1 转化 BL21, 同法诱导表达, 纯化 GST 蛋白。所有纯化蛋白脱盐后经冻干-20℃ 保存备用。

1.4 蛋白免疫印迹检测

将收集的菌体按 0.2g/mL 重悬于 PBS, 冰浴中超声破碎, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 并对表达产物进行 Western blot 检测, 一抗为豚鼠抗 NSP4 多肽抗体 (美国 Wyeth 公司惠赠), 二抗为 HRP 标记的羊抗豚鼠 IgG 抗体。

1.5 NSP4_T 诱导腹泻模型的建立

将冻干 GST-NSP4_T 及 GST 蛋白以无菌注射用水溶解后, 用 BCA 试剂盒 (Pierce 公司) 进行蛋白定量检测。新生乳鼠 (6d) 分为 0.4nmol 重组蛋白

组 (6 只), 1.5nmol 重组蛋白组 (12 只), 1.5nmol GST 对照组 (9 只)。乳鼠腹腔注射纯化蛋白, 注射后前 12h 内, 每隔 3h 左右观察一次, 此后每 6h 左右一次持续观察 72h, 接着每 12h 一次观察 1d, 每次用手指轻轻按摩乳鼠腹部, 观察腹泻产生情况, 腹泻的判断参照文献^[7], 即: 分为 4 级, 1 级为松软的黄色粪便, 4 级为完全的水样便, 2 级 (水样粘液便带有固体松软粪便) 及以上的才判为腹泻, 腹泻的判断由同一人完成。观察腹泻情况的同时称取记录乳鼠的体重。我们将同一母鼠喂养的乳鼠分为不同的组, 以排除母乳喂养可能造成的干扰。

2 结 果

2.1 NSP4_T 的 PCR 扩增与重组质粒 pGEX-5X-NSP4_T 的酶切鉴定

PCR 扩增出 270bp 的 NSP4_T 特异性产物, 插入克隆载体 pcDNA- II 后, DNA 序列分析表明完全正确, 再次插入 pGEX-5X-1 的 *EcoR* I 和 *Xho* I 位点, 酶切分析表明重组质粒 pGEX-5X-NSP4_T 构建正确 (图 1)。

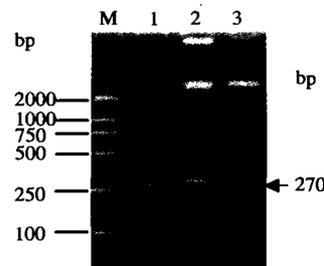


图 1 NSP4_T PCR 结果及 pGEX-5x-NSP4_T 酶切鉴定

M DNA Molecular weight standards (DL 2000)

1, PCR amplification of NSP4_T; 2, pGEX-5X-NSP4_T digested with *EcoR* I and *Xho* I; 3, pGEX-5X-1 digested with *EcoR* I and *Xho* I

2.2 GST-NSP4_T 在 *E. Coli* 中的表达及检测

pGEX-5X-NSP4_T 转化 *E. Coli* BL-21 后用 IPTG 诱导表达, 发现在 37kDa 位置出现特异性表达条带, 表达量在诱导后 8h 左右达到高峰, 经紫外扫描分析表明重组蛋白表达量占菌体总蛋白的 30% 左右 (图 2), Western blot 证明该条带可与 NSP4 抗体反应, 提示该蛋白得到正确表达 (图 2)。

2.3 重组蛋白的纯化

虽然部分表达产物以包涵体形式存在, 但重组蛋白也大量存在于超声破菌离心后的上清中, 为了纯化方便, 我们仅对可溶性蛋白部分进行纯化, SDS-PAGE 和紫外扫描分析表明经过 Glutathione

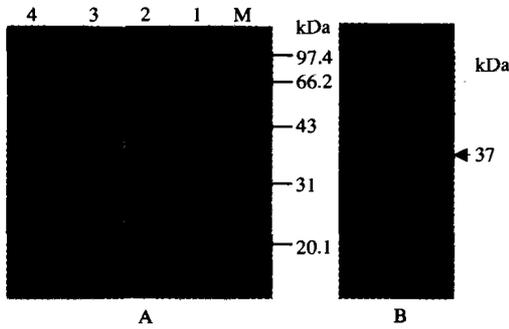


图 2 重组蛋白表达及纯化

Fig.2 expressed and purified recombinant protein

A: SDS-PAGE, M, Protein molecular weight standard (middle range); 1, Cell lysate of BL21/pGEX-5x-NSP4_T before induction; 2, Cell lysate of BL21/pGEX-5x-NSP4_T 8h after IPTG induction; 3, pGEX-5x-NSP4_T purified by Glutathione Sepharose™ 4B; 4, Cell lysate of BL21/pGEX-5x-1 8h after IPTG induction. B: Western blot analysis.

Sepharose™ 4B 亲和纯化后的重组蛋白纯度达到 90% 以上, 完全可以满足动物实验的要求。

2.4 NSP4_T 致小鼠腹泻作用

当注射 0.4nmol GST-NSP4_T 重组蛋白时, 仅有 1 只小鼠发生一过性腹泻 (1/6), 加大蛋白用量, 给予 1.5nmol 重组蛋白时, 实验组所有乳鼠都先后出现了腹泻: 腹泻最早出现在注射后 3h (2 只), 24h 时有 4 只, 到第 48h 时已经有 11 只出现过腹泻, 第 54h 时所有乳鼠均已出现过腹泻 (有 3 只此时腹泻停止), 而在 72h 后多数已经停止腹泻 (图 3)。在

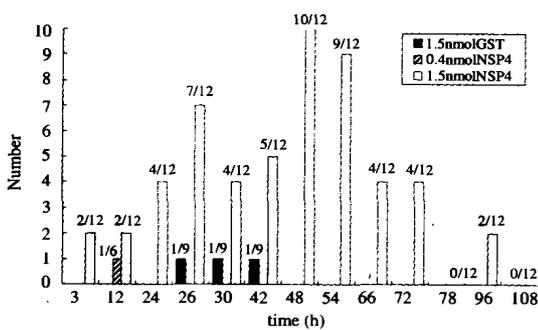


图 3 给药后不同时间腹泻小鼠的数目

Fig.3 The number of mice with diarrhea at different time after administration

此过程中我们观察到一个现象, 在 1.5nmol 组 12 只乳鼠中仅有一只是持续性腹泻, 而其余 11 只是间歇性的, 即: 在第一次腹泻持续一段时间后 (平均 8h), 停止腹泻, 而在经过一个 12~24h 的间歇

期后, 又发生了一次腹泻, 平均持续时间较第一次短暂, 此后多数小鼠恢复正常, 仅有 4 只又曾出现松软黄便 (1 级)。GST 对照组有 1 只 (1/9) 曾出现过腹泻, 一只出现松软的黄便, 与实验组差别有显著性。在这期间对照组平均体重增长了 2.90g, 而实验组平均体重增长了 2.35g, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明腹泻影响了小鼠的生长。

3 讨论

轮状病毒导致腹泻的机制尚未最后阐明, 曾推测病毒感染造成肠粘膜破坏, 引起吸收不良和水电解质紊乱, 导致腹泻, 但这无法解释腹泻可出现在明显组织病理改变之前的现象。轮状病毒非结构蛋白 NSP4 可以诱发细胞内储存钙释放, 同时也伴随细胞外 Ca^{2+} 内流进入细胞^[8], Ca^{2+} 升高可导致氯离子分泌, 并且 NSP4 可特异性破坏细胞间隙^[9], 这些现象提示 NSP4 可能与腹泻发生有关。有研究显示 NSP4 的基因变异与轮状病毒致病性改变有关^[10], 但是这种相关性目前还存在争议^[4,5,11]。发展抗 RV 药物, 寻找新的治疗方案及有效的疫苗都需要对轮状病毒 NSP4 蛋白的功能作进一步的研究。为此, 本文表达了我们的分离的一株婴幼儿腹泻轮状病毒的 NSP4 蛋白, 并对其致泻作用进行了初步研究。

我们曾经尝试使用多种原核表达载体和不同的宿主菌来表达全长 NSP4 蛋白, 但是均未获得成功, 而真核表达系统又难以满足以后大规模实验所需的蛋白用量。从计算机分析结果看, 完整的 NSP4 蛋白其 N 端含有较多的疏水性氨基酸 (图 4), 因

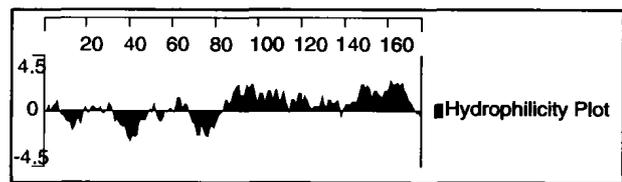


图 4 NSP4 亲疏水性质

Fig4. The hydrophilicity of NSP4

该曲线根据 Kyte&Doolittle 对数绘制, 向上的表示亲水性, 向下的表示疏水性。

Made by Kyte&Doolittle logarithm, those upwards means hydrophilic region and downwards means hydrophobic region.

此在大肠杆菌中可能难以表达, 在其他实验室中也遇到这种情况^[12]。现有的研究认为 NSP4 的功能活性区主要在其 C 端^[8,10], 因此考虑放弃表达完整的 NSP4 蛋白, 首先表达 NSP4 蛋白的部分区域

(NSP4_T), 据此及计算机软件分析结果, 我们去除了 N 端疏水区的 85 个氨基酸, 对剩余的 86-175 氨基酸编码区进行了表达, 结果获得了成功。进而对表达蛋白的功能进行了实验研究。当注射 0.4nmol GST-NSP4_T 重组蛋白时, 仅有 1 只小鼠发生一过性腹泻 (1/6), 加大蛋白用量, 给予 1.5nmol 重组蛋白时, 实验组乳鼠都先后出现了腹泻, 与对照组差别有显著性。表明我们表达的人轮状病毒 NSP4 蛋白在新生小鼠具有致腹泻的作用, 并且有一定的剂量依赖性。

在实验中我们观察到一个现象, 在 1.5nmol 组 12 只乳鼠中仅有一只是持续性腹泻, 而其余 11 只是间歇性的, 即: 在第一次腹泻持续一段时间后, 停止腹泻, 而在经过一个间歇期后, 又发生了一次腹泻, 平均持续时间较第一次短暂。对于这个现象尚无确切的解释。对新生小鼠 RV 肠炎的研究表明, 部分分泌反应是由于肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 激活引起的^[13], 我们推测可能是 ENS 的参与继续了 NSP4 引起的初期腹泻。

本研究成功表达了我国人轮状病毒 97SZ8 株非结构蛋白 NSP4 基因, 动物实验证明可以引起新生乳鼠腹泻, 初步在新生小鼠建立了人轮状病毒腹泻动物模型, 为进一步研究人轮状病毒的致病机理及治疗和预防策略打下了基础。

参考文献

- [1] Glass R I, Kilgore P E, Holman R C, *et al.* The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden [J]. *J Infect Dis*, 1996, 174 (suppl.1): 5-11.
- [2] Estes M K. Rotavirus and their replication [A]. Fields B N, Fields Virology [M]. 3rd ed, New York: Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, 1625.
- [3] Ball J M, Tian P, Zeng C Q Y, *et al.* Age-dependent diarrhea induced by a rotavirus nonstructural glycoprotein [J]. *Science*, 1996, 272: 101-104.
- [4] Lee C N, Wang Y L, Kao C L, *et al.* NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 4471-4477.
- [5] Oka T, Nakagomi T, Nakagomi O. A lack of consistent amino acid substitutions in NSP4 between rotaviruses derived from diarrheal and asymptotically-infected kittens [J]. *Microbiol Immunol*, 2001, 45: 173-177.
- [6] 王大燕, 王健伟, 徐焕荣, 等. 中国轮状病毒非结构蛋白 NSP4 基因变异特征的分析 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(1):10-14.
- [7] Horie Y, Nakagomi O, Koshimura Y, *et al.* Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system [J]. *Virology*, 1999, 262 (2): 398-407.
- [8] Zhang M, Zeng C Q Y, Dong Y, *et al.* Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence [J]. *J Virol*, 1998, 72: 3666-3672.
- [9] Tafazoli F, Zeng C Q, Estes M K, *et al.* NSP4 Enterotoxin of Rotavirus Induces Paracellular Leakage in Polarized Epithelial Cells [J]. *J Virol*, 2001, 75:1540-1546.
- [10] Kirkwood C D, Palombo E A. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4 [J]. *Virology*, 1997, 236: 258-265.
- [11] 徐焕荣, 王健伟, 董京芳, 等. 人轮状病毒 NSP4 基因变异与功能关系的初步研究 [J]. *病毒学报*, 2002, 18: 113-117.
- [12] Pereboeva L A, Pereboev A V, Wang L F. Hepatitis C epitopes from phage-displayed cDNA libraries and improved diagnosis with a chimeric antigen [J]. *J Med Virol*, 2000, 60:144-151.
- [13] Lundgren O, Timar P A, Persson K, *et al.* Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea [J]. *Science*, 2000, 287:491-495.