

# IFIT1 负反馈上调干扰素 $\beta$ 表达促进抗 HSV-1 病毒保护

方义军, 胡 好, 蔡少丽, 丰志华, 傅雅娟\*

(福建师范大学南方生物医学研究中心, 福州 350000)

**摘要** I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)是危害人类健康的常见病原体之一,能够通过受损皮肤或黏膜感染宿主细胞并引起多种疾病。HSV-1 的侵入激活先天免疫模式识别受体,诱导干扰素  $\beta$ (IFN- $\beta$ )的产生,通过表达干扰素刺激基因(ISG)发挥抗病毒功能。近年来,干扰素诱导的四肽重复蛋白 1(IFIT1)在病毒感染过程中的作用引起了广大研究者的关注。然而,其具体机制尚未完全清楚。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了小鼠成纤维细胞(L929)IFIT1 敲除细胞株,免疫印迹方法检测敲除细胞株 IFIT1 在蛋白质水平的表达。转染 HT-DNA 和 Poly[I:C]刺激 L929 WT 和 IFIT1 敲除细胞株,实时定量 PCR 技术检测发现,HT-DNA 刺激敲除细胞时,IFN- $\beta$  及下游 ISGs 的表达量显著升高。IFN- $\beta$  的表达量比 L929-WT 组平均高出 13.4 倍,IFIT1 和趋化因子 10(CXC chemokine ligand-10,CXCL10)的表达量比 L929 WT 组分别平均高出 6.7 倍和 21 倍( $P<0.001$ ),而 Poly[I:C]刺激无明显变化( $P>0.05$ ),表明 IFIT1 是通过 DNA 信号通路来行使其负反馈调节作用。为研究 IFIT1 基因的抗病毒作用,利用 CRISPR/Cas9 技术改造的 HSV-1-VP26-mCherry 病毒感染该敲除细胞株,通过测定病毒荧光数及病毒拷贝数,发现 IFIT1 敲除细胞株与 L929 WT 细胞相比,存活率提高了 60%( $P<0.001$ ),病毒增殖能力在 48 h 后降低 28.6 倍( $P<0.001$ )。该结果表明,IFIT1 基因的缺失有利于抵抗 HSV-1 的感染。综上所述,IFIT1 通过 DNA 信号通路负反馈上调 IFN- $\beta$  及 ISG 的表达,IFIT1 的缺失对病毒入侵发挥了保护作用。该结果为后续研究开发治疗 HSV-1 感染相关的治疗药物提供了一个新思路。

**关键词** I 型单纯疱疹病毒; CRISPR/Cas9; 干扰素诱导的四肽重复蛋白 1; 干扰素  $\beta$

**中图分类号** Q291

## IFIT1 Deficiency Promotes Antiviral Protection Against HSV1 Infection by Enhancing Interferon $\beta$ Production

FANG Yi-Jun, HU Hao, CAI Shao-Li, FENG Zhi-Hua, FU Ya-Juan\*

(Southern Biomedical Research Center, Fujian Normal University, Fuzhou 350000, China)

**Abstract** Herpes simplex virus type I (HSV-1) is one of the common pathogens, which endanger human health and infect host cells through damaging skin or mucous membranes, therefore causing a variety of diseases. The invasion of HSV-1 activates innate immune pattern recognition receptors, induces the production of interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), which performs antiviral function by expressing interferon stimulation gene (ISG). In recent years, the role of interferon-induced protein with tetratricopeptide

收稿日期: 2019-09-26; 修回日期: 2019-11-06; 接受日期: 2019-11-17

福建省中青年教师教育科研项目 (No. JA15130); 福建省自然科学基金面上项目 (No. 2017J01621) 和福建师范大学创新团队计划 (No. IRTL1703) 资助

\* 通讯作者 Tel: 13799410834; E-mail: fuyajuan@fjnu.edu.cn

Received: September 26, 2019; Revised: November 6, 2019; Accepted: November 17, 2019

Supported by Education Scientific Foundation for Young and Middle-aged Teachers of the Fujian Province (No. JA15130); Natural Science Foundation of the Fujian Province, China (No. 2017J01621) and the Innovation Team Program of Fujian Normal University (No. IRTL1703)

\* Corresponding author Tel: 13799410834; E-mail: fuyajuan@fjnu.edu.cn

repeats 1 (IFIT1) family in the viral infection process has attracted the attention of researchers, but the details of mechanism remain unclear. This study constructed the mouse fibroblast (L929) *IFIT1* knockout cell line by the CRISPR/Cas9 technology and evaluated the expression of IFIT1 proteins by Western blotting in the knockout cell line. The mRNA levels of interferon- $\beta$  and downstream ISGs increased significantly in L929 *IFIT1* knockout cell line than WT cell line. IFN- $\beta$  was 13.4 fold higher than the control group on average, IFIT1 and CXCL10 were 6.7 fold higher and 21 fold higher than the control group, respectively,  $P < 0.001$ . When HT-DNA was transfected into cells, Poly [I: C] showed no significant change ( $P > 0.5$ ). The results indicated that IFIT1 exercised its negative feedback regulation through the DNA sensing signaling pathway. In order to study the antiviral effect of the *IFIT1* gene, the knockout cell line was infected with the CRISPR/ Cas9 technology-modified HSV-1-VP26-mCherry virus. By measuring the viral fluorescence number and the virus copy number, results indicated that the survival rate of *IFIT1* knockout cell line was 60% higher than that of L929 WT cell line ( $P < 0.001$ ). The results showed that the deletion of *IFIT1* gene was beneficial to resist HSV-1 infection. In conclusion, IFIT1 up-regulates the expression of IFN- $\beta$  and ISG through negative feedback of the DNA signaling pathway, thereby deletion of *IFIT1* protects cells from virus invasion. This result provides a new idea for further research and development of therapeutic drugs for the treatment of HSV-1 infection.

**Key words** herpes simplex virus I type (HSV-1); CRISPR/Cas9; interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1); interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ )

单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 是人类常见的病原体之一, 能够通过受损皮肤黏膜或唾液进行传播, 并且引起人类多种疾病的发生, 例如新生儿感染、生殖系统感染、疱疹病毒性脑炎和疱疹性角膜结膜炎等人类疾病, 人类感染率高达 80% ~ 90%<sup>[1]</sup>。单纯疱疹感染已经成为世界上第 4 大传染性疾 病, 具有难治愈和传播范围广等特点<sup>[2]</sup>。根据血清型可将 HSV 分为 HSV-1 (herpes simplex virus type I, HSV-1) 和 HSV-2 (herpes simplex virus type II, HSV-2) 两种类型。HSV-1 是一类双链 DNA 病毒, 主要在上皮细胞或黏膜细胞中感染, 并能在神经元中形成终身潜伏感染<sup>[3]</sup>。近些年研究表明: HSV-1 可能与阿尔兹海默症和多发性硬化的发病机制有关, 严重危害人类的生命与健康。

天然免疫系统对抵御病原微生物的入侵发挥重要作用, 由于 HSV-1 是双链 DNA 病毒, 因此 HSV-1 病毒感染细胞后, 其病毒双链 DNA 与 DNA 受体环鸟苷酸-腺苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) 结合, 产生第二信使 cyclic GMP-AMP (cGAMP)。cGAMP 结合干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 招募 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)。诱导干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 磷酸化后产生 I 型干扰素, 接着进一步诱导产生干扰素刺激基因 (interferon stimulates genes, ISG), 发挥抗病毒作用<sup>[4]</sup>。ISG 基因如何发挥抗病毒作用具有重要的研究意义和应用前景。近年来, 干扰素诱

导的四肽重复蛋白 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats, IFIT) 的抗病毒作用引起了广大研究者的关注。其作用方式主要有 IFIT 家族蛋白通过结合未加帽, 或不完全加帽的病毒 RNA 抑制翻译起始, 病毒蛋白质或 RNA 被隔离在细胞质中来抑制病毒感染<sup>[5]</sup>。*IFIT* 家族基因主要由干扰素  $\beta$  (interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ ) 诱导表达产生的一类 ISG, 通过不同的作用机制发挥功能, 主要有 4 个成员, 分别是 IFIT1、IFIT2、IFIT3 和 IFIT5。该家族基因均含有 2 个外显子和 1 个内含子, 其编码的蛋白质均在 47 ~ 56 kD, 并具有多个 TPR (tetratricopeptide repeat) 结构域<sup>[6]</sup>。目前, 研究已发现 ISG 中 IFIT3 通过招募 STING 和 TBK1 对视黄酸诱导基因 1 (retinoic acid inducible gene-1, RIG-1) 信号通路有正调控作用, 加强 IRF3 与核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路的活化, 促进 IFN- $\beta$  的表达, 限制病毒增殖, 最终发挥抗病毒作用<sup>[7]</sup>, 但 *IFIT* 基因家族中其他成员的抗病毒功能仍有待定义和证实。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了小鼠成纤维细胞 (L929) *IFIT1* 敲除细胞株, 发现 IFIT1 通过影响 DNA 信号通路对 IFN- $\beta$  存在显著负反馈调节作用。*IFIT1* 敲除细胞株感染 HSV-1 疱疹病毒后, HSV-1 疱疹病毒复制及增殖能力较 L929 WT 细胞株明显减弱。从 HSV-1 与干扰素相互作用角度出发, 寻找新的药物来抑制 IFIT1, 减弱病毒的复制及增殖能力, 为将来有效治疗 HSV-1 感染及其造成的人体疾病提供一个 新的解决思路。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究采用 L929 细胞系作为实验材料, L929 细胞为小鼠成纤维细胞, 培养基为高糖 DMEM 购自 Hyclone, 该细胞为贴壁细胞, 保存于本实验室。HSV-1-VP26-mCherry 由本实验室构建获得, 可表达带樱桃色的 HSV-1 病毒。pX459 质粒购自 Addgenes, 可用于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 质粒上携带嘌呤霉素抗性, 可用于转染后阳性细胞筛选。

1.2 试剂及仪器

*E. coli* Tran5α 购自 TransGene; Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (L000150) 购自赛默飞, *Bsa*I 限制性内切酶 (FD1014) 购自赛默飞; BCA 蛋白质测定试剂盒 (P0010) 购自 Beyotime; Anti-IFIT1 mAb (TDY041) 购自天德悦。其他使用的抗体、试剂还包括 800CW 驴抗鼠 Ab 购自 Proteintech group; Gbico 胎牛血清购自赛默飞, Opti MEM 培养基购自赛默飞, T4 DNA 连接酶购自 TransGene, PMSF 蛋白酶抑制剂购自赛默飞, Agarose 购自诺和致源等。

梯度 PCR 仪, 美国 ABI Veriti, PCR 仪; 美国 ABI2720 型, 实时荧光定量 PCR 仪, StepOneplus 美国 ABI; 微量紫外分光光度计, ND-2000C 赛默飞; 细胞二氧化碳培养箱、紫外生物超静工作台来自力康生物医疗控股有限公司; 超纯水系统, 湖南科尔顿水务有限公司; 槽式蛋白转膜仪, 美国 Hoefer TE42; Bio-RAD 蛋白凝胶成像系统; 德国 Zeiss Axio Observer A1 等。

1.3 sgRNA 的设计与合成

通过 <https://zlab.bio/guide-design-resources> 网站设计最优 sgRNA (Table 1), 由福州擎科生物有限公司合成获得。sgRNA 退火, 反应条件为 95 ℃, 10 min; 95 ℃ 降至 85 ℃, 2.5 ℃/s; 85 ℃ 降至 25 ℃, 25 ℃/s, 25 ℃, 5 min; 最终保存在 4 ℃;

Table 1 The IFIT1 gene knockout sgRNA sequence

Name	Name Sequences (5'→3')
sgRNA	IFIT1-2-F: AAGCTATGTCATTCGCTATG
	IFIT1-2-R: CATAGCGAATGACATAGCTT

1.4 IFIT1 敲除质粒的构建

pX459 质粒用 Fast Digest *Bbs*I 酶在 37 ℃ 反应 30 min, 配制 1% 琼脂糖凝胶, 未酶切的 pX459 质粒做对照, 琼脂糖凝胶电泳检测是否酶切成功。酶切后的 pX459 质粒与退火后的 sgRNA 用 T4 DNA

连接酶 16 ℃ 连接过夜。最后将连接产物转化到 *E. coli* Tran 5α 中, 测序鉴定阳性克隆。

1.5 敲除质粒的转染及敲除细胞株的筛选

L929 细胞培养在 10 cm<sup>2</sup> 培养皿中, 待贴壁细胞汇合达到 80% 时进行转染, 脂质体 Lipofectamine 2000 与敲除质粒 1:1 混合转染 L929 细胞。转染 48~72 h, 用 pX459 质粒上携带的嘌呤霉素 (puromycin) 进行筛选, 设置未转染组为阴性对照, 加入的 Puro 为 8 μg/mL, 筛选到阴性对照组的细胞死光为止。筛选后的细胞有限稀释, 培养在 48 孔板, 提取基因组测序, 通过 DNA 和氨基酸序列与 L929 WT 细胞株比较, 初步鉴定为 *IFIT1* 敲除细胞株。

1.6 免疫印迹验证敲除细胞株在蛋白质水平的表达

待细胞在培养皿中长到 3×10<sup>6</sup> 个细胞数时, 提取总蛋白质, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗残余的培养基, 加入 70 μL 蛋白质裂解液, 无菌干净的细胞刮刀快速将细胞从培养皿中刮下, 转移到 1.5 mL 离心管, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度, 免疫印迹技术鉴定 *IFIT1* 敲除细胞株。

1.7 实时定量 PCR 检测 IFN-β 及 ISG 的表达量

HT-DNA 和 Poly[I:C] 分别刺激 *IFIT1* 敲除细胞株, 6 h 时 TRIzol 提取细胞总 RNA, 微量紫外分光光度计测其浓度, 定量后逆转录为 cDNA。IFN-β 及其 ISG 的表达量通过实时定量 PCR 方法测定, 其原理为在 PCR 扩增过程中, 通过检测荧光信号的强度对 PCR 进程进行实时检测, 计算出变化量。反应条件为等待阶段 95 ℃ 10 min; PCR 阶段 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环; 熔解曲线阶段 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s。PCR 引物使用 Primer 5 设计并由福州擎科生物有限公司合成 (Table 2)。

Table 2 Verify primer sequences for real-time fluorescence quantitative PCR

Name	Name Sequences (5'→3')
M-HPRT-F	CAGTCCCAGCGTCGTGATTAG
M-HPRT-R	AAACACTTTTTCCAAATCCTCGG
M-IFNβ-F	TCCGAGCAGAGATCTTCAGGAA
M-IFNβ-R	TGCAACCACCACTCATTCGTAG
M-IFIT1-F	TGGCGGTTTCCTACAGTT
M-IFIT1-R	TCCTCCAAGCAAAGGACTTC
M-CXCL10-F	GCCGTCATTTTCTGCCTCA
M-CXCL10-R	CGTCCTTGCAGAGGGGATC

1.8 实时定量 PCR 测定 HSV-1-VP26-mCherry 病毒的拷贝数

为了更直观地观察细胞生死情况, 选用本室保



存的 HSV-1-VP26-mCherry 病毒。VP26 是 HSV-1 疱疹病毒核衣壳组成中最小的蛋白质,本室利用 CRISPR/Cas9 技术在其终止密码子前加入可以表达樱桃色的 mCherry 蛋白序列,构建 HSV-1-VP26-mCherry 融合表达蛋白。该融合蛋白几乎不会对病毒的毒力和侵袭造成影响,而且方便后续研究有关疱疹病毒的相关疾病,是一种间接检测病毒的方法<sup>[8]</sup>。取 10  $\mu$ L 浓缩后的 HSV-1-VP26-mCherry 病毒液提取全基因组,测其基因组浓度。然后,以 HSV-1-VP26-mCherry 病毒基因组和 pcDNA 3.1-GL 质粒作为模板(GL 是 HSV-1 病毒中已经被命名的一种糖蛋白质,作为一个活性单位促进病毒囊膜与宿主细胞膜结合),设计引物(GL-F:CTCGGAATGGGGATTTTG;GL-R:CTAGTGGATTAGAGGCGCC)实时定量 PCR,最后病毒拷贝数的计算:(1)计算出作为模板的 pcDNA 3.1-GL 质粒的摩尔数;摩尔数=总质量/分子量;(2)根据实时定量 PCR 结果,计算 HSV-1-VP26-mCherry 病毒相比于 pcDNA 3.1-GL 质粒表达的倍数,将倍数乘 pcDNA 3.1-GL 质粒表达的拷贝数;(3)计算出 10  $\mu$ L HSV-1-VP26-mCherry 病毒的拷贝数。

1.9 感染 IFIT1 敲除细胞株检测病毒的复制及增殖能力

成功构建 IFIT1 敲除细胞株后,HSV-1-VP26-mCherry 病毒感染 L929 WT、IFIT1 敲除细胞,倒置荧光显微镜观察细胞形态变化情况和台盼蓝细胞计数检测活细胞数目,以验证 IFIT1 基因缺失对 HSV-1 感染宿主细胞的影响。将 L929 WT、IFIT1 敲除细胞分别计数,取  $4\times10^5$  个细胞铺于 6 孔板中,根据感染细胞所加病毒量的浓度梯度,确定感染 L929 WT 细胞株的最佳 HSV-1-VP26-mCherry 病毒量(MOI=2)。待细胞贴壁后,每孔加入 MOI=2 的 HSV-1-VP26-mCherry 病毒量,8 h 后更换新鲜的培养基,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 中继续培养,每隔 24 h 用荧光显微镜记录细胞死亡情况。随着病毒侵染时间延长,细胞形态逐渐变圆漂浮在培养基中,表明细胞已经死亡。荧光越多表示病毒感染的细胞越多。在 24 h、48 h、72 h 连续拍照观察细胞荧光数变化情况及使用台盼蓝计数测定活细胞数目。

1.10 数据处理及统计学分析

每次实验至少重复 3 次,免疫印迹结果用 Bio-RAD 软件处理,实时定量 PCR 结果将 CQ 值转换为 2<sup>- $\Delta\Delta$ Cq</sup> 值后进行比较,应用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析并作图,\* $P<0.05$  具有统计学

意义。

2 结果

2.1 CRISPR/Cas9-IFIT1 基因敲除质粒及敲除细胞株的鉴定

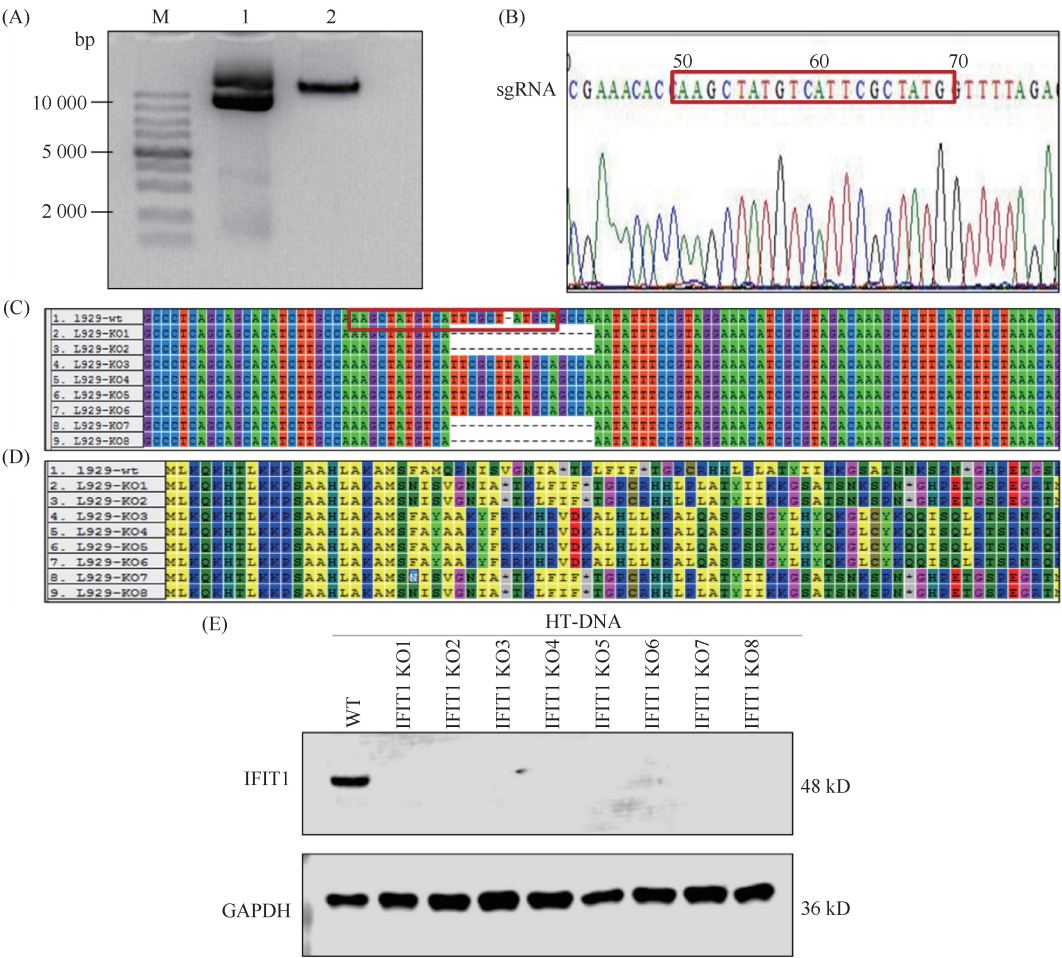
根据 pX459 质粒的多克隆位点, Fast Digest Bbs I 将其酶切,未酶切的 pX459 质粒作为对照。因为酶切后质粒由原来的超螺旋变为线性结构,经琼脂糖凝胶电泳检测,pX459 质粒成功被酶切(Fig.1A)。在设计好的 sgRNA 序列前填加 Bbs I 酶切位点,酶切位点为 5'→3' GAAGAC。sgRNA 退火后,利用 T4 DNA 连接酶的“缝合”作用,将其构建到酶切成功的 pX459 质粒内。将连接产物转化到 Tran5 $\alpha$  中,挑单克隆菌株测序鉴定是否正确连接。测序结果表明,Cas9/sgRNA 敲除质粒被成功构建(Fig.1B)。为获得 IFIT1 敲除细胞株,将构建好的敲除质粒转染 L929 细胞 48 h,利用嘌呤霉素筛选,获得 Cas9/sgRNA 阳性表达的细胞。对 sgRNA 相应的靶基因序列测序分析发现套峰(验证引物 Table 3),说明 sgRNA 有效实现了基因序列突变。用有限稀释法挑取 L929 单克隆细胞,进一步对单克隆细胞进行基因测序鉴定。以克隆 5 为例,TA 克隆及蛋白质水平验证基因突变情况。由于 L929 细胞是三倍体,选取克隆 5 的 8 个亚克隆测序检测,有插入 1 个碱基和缺失 14 个碱基的两种敲除方式(Fig.1C)。利用生物学软件 MEGA5 比对氨基酸发现,其蛋白质序列完全紊乱(Fig.1D)。HT-DNA 刺激后,免疫印迹结果发现,敲除细胞株 IFIT1 蛋白均不表达,而 L929 WT 细胞 IFIT1 蛋白有明显条带(Fig.1E)。以上结果均表明,已成功在 L929 细胞株构建了 IFIT1 敲除细胞株。

Table 3 sgRNA validation primer sequences	
Name	Name Sequences(5'→3')
sgRNA	IFIT1-F:GCAGTCGTAGCCTATCGC
	IFIT1-R:TGCACTTCAGCCATGCAAAAC

2.2 实时定量 PCR 检测 IFIT1 基因的缺失上调 IFN- $\beta$  及 ISG 的表达量

为进一步研究 IFIT1 对先天免疫通路的作用,随机挑选 4 株 IFIT1 敲除细胞株 4、5、6、8,分别用 HT-DNA 和 Poly[I;C] 处理细胞株,实时定量 PCR 测定其 mRNA 相对表达量(Fig.2)。结果显示,HT-DNA 处理 6 h 时,4 株 L929 IFIT1 敲除细胞株中 IFN- $\beta$  及下游 ISG 的 mRNA 表达量均显著升高,IFIT1 敲除细胞 IFN- $\beta$  的表达量比 L929-WT 组平均





**Fig.1 Construction of knockout plasmids and validation of monoclonal cell lines** (A) *Bbs* I digestion results of the plasmid pX459 vector. M: 10 000 bp DNA marker; 1: Plasmid pX459 vector before *Bbs* I digestion; 2: Plasmid pX459 vector after *Bbs* I digestion. (B) sgRNA was successfully cloned into the vector for sequencing; (C) Sanger sequencing revealed indelible information at the sgRNA recognition site of L929 clone 5. sgRNA sequence is shown in red. (D) Amino acid sequence analysis of L929 clone 5. (E) IFIT1 protein expression was detected by Western blotting. IFIT1 deleted cells were subject to immunoblot analysis with antibodies to IFIT1 and GAPDH. L929 cells were transfected with HT-DNA, and protein was isolated after 12 hours

高出 13.4 倍 (\*\*\*  $P < 0.001$ ) (Fig.2A)。CXCL10 和 *IFIT1* 的表达量比 L929-WT 组分别平均高出 21 倍和 6.7 倍 (\*\*\*  $P < 0.001$ ) (Fig.2B, 2C), 而 Poly[I:C] 处理后则无明显变化 ( $P > 0.05$ )。该结果说明, *IFIT1* 的缺失会提高 *IFN-β* 及下游 *ISG* 的表达量, 并且说明 *IFIT1* 是通过 DNA 信号通路来负反馈调节增加 *IFN-β* 及下游 *ISG* 的表达。

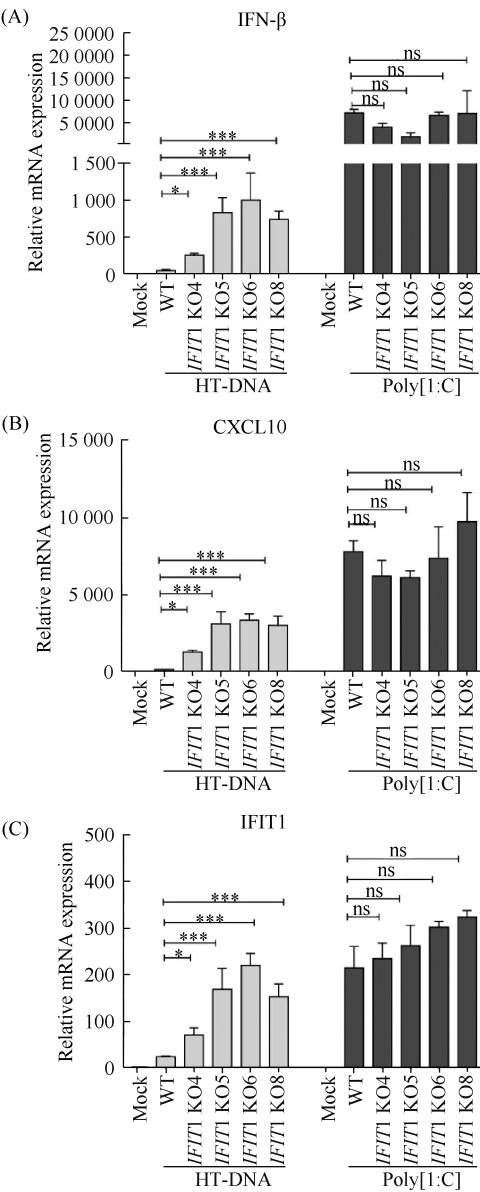
2.3 HSV-1-VP26-mCherry 病毒浓度测定

为测定病毒在细胞中复制情况, 需要检测其拷贝数变化来间接反映。GL 是病毒稳定表达的一种糖蛋白质, 根据已知拷贝数的 pcDNA3.1-GL 质粒做标准曲线, 浓度梯度稀释为 1、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.00001 ng/μL, 根据病毒 GL 基因与 pcDNA 3.1-GL 基因的量比值, 计算出所用模板病毒的拷贝数, 进而计算出总的病毒拷贝数。

pcDNA3.1-GL 的拷贝数 = pcDNA 3.1 质粒为 5 428 bp + GL 基因 674 bp × 660, 即  $6\,102 \times 660\text{ g/mol}$ ,  $0.15\text{ ng pcDNA 3.1-GL 质粒拷贝数} = 6.02 \times 10^{23} \times 0.15 \times 10^{-9} / (6\,102 \times 660) = 2.2 \times 10^7$  拷贝数。根据 Fig.3 同理计算出每毫升 HSV-1-VP26-mCherry 病毒的拷贝数为  $3.5 \times 10^7$ 。

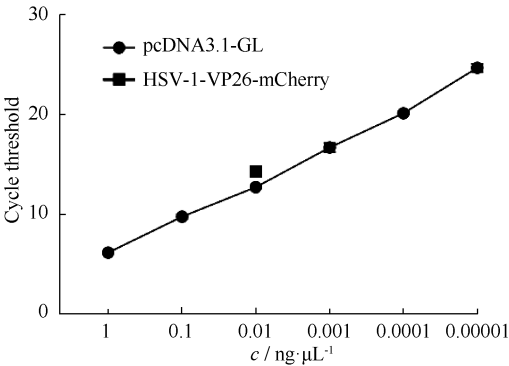
2.4 IFIT1 基因缺失抑制 HSV-1 病毒的增殖

将 HSV-1-VP26-mCherry (MOI = 2) 病毒感染 L929 WT 和 *IFIT1* 敲除细胞, 表达的 mCherry 红色荧光间接反映 HSV-1 病毒的感染及复制能力。荧光越多则病毒感染及复制能力越强, 反之亦然 (Fig.4A)。L929 WT 出现红色荧光, 而 *IFIT1* 敲除细胞无红色荧光。该结果说明, HSV-1 病毒成功感染 L929 细胞并进行表达, 但并未在 *IFIT1* 敲除细胞中表达。对红色荧光个数进行生物学统计 (Fig.4B)。感染



**Fig.2** *IFIT1* deletion enhanced type I interferon and downstream ISG mRNA expression *IFIT1* deletion increased *IFN- $\beta$*  and *ISG* gene expression. L929 WT and L929 *IFIT1* KO cells ( $4\times10^5$ ) were plated in 6-well culture dishes. HT-DNA or Poly [I:C] were transfected into WT and *IFIT1* KO cells for six hours. Then cells were collected and RNA were extracted. The cDNA quantification of each group of experiments was 1 000 ng. *IFN- $\beta$*  (A), *CXCL10* (B) and *IFIT1* (C) expression was analyzed by RT-PCR. \*  $P<0.05$ , \*\*\*  $P<0.001$ ,  $n=3$

24 h 时, L929 WT 红色荧光数比 *IFIT1* 敲除组高 9 倍 (\*\*\*  $P<0.001$ )。随着培养时间的增加, 第 72 h 时, L929 WT 红色荧光数比 *IFIT1* 敲除组高 15 倍 (\*\*\*  $P<0.001$ )。利用台盼蓝细胞计数检测存活的细胞数 (Fig.4C)。结果显示, L929 WT 细胞随着感染时间延长, 活细胞数目明显降低, 而 *IFIT1* 敲除细



**Fig.3** **Determination of HSV-1-VP26-mCherry virus copy numbers** The pcDNA3.1-GL Plasmid concentration was diluted by gradient (1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). According to the RT-QPCR results, the standard plasmid concentration is plotted on the abscissa, and the cycle threshold value of the standard plasmid is plotted on the ordinate. A standard curve is drawn. The copy number of the virus was calculated with the known copy number of pcDNA 3.1-GL plasmid

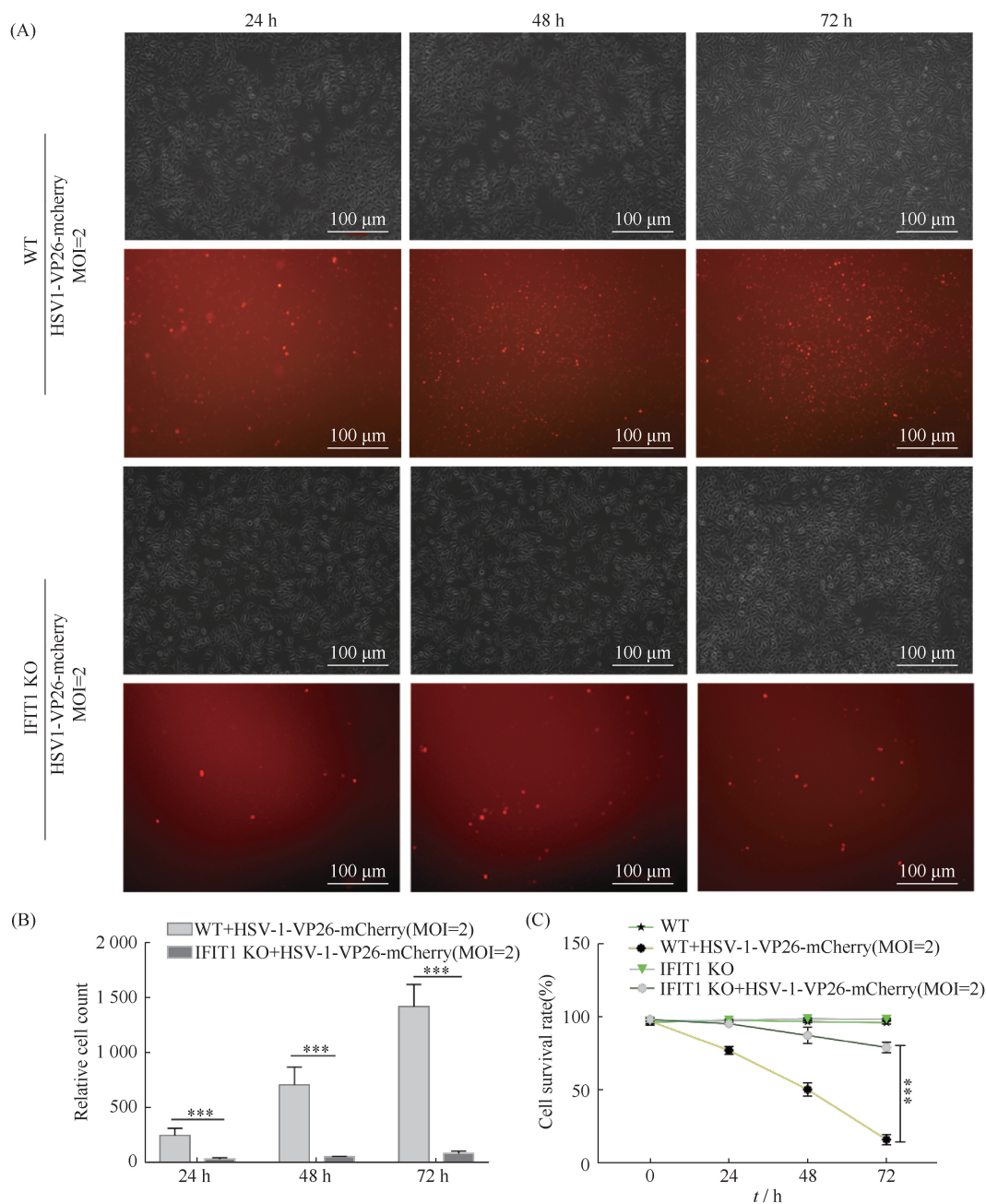
胞数无明显变化。感染 72 h 后, L929 WT 细胞几乎全部死亡, 而 *IFIT1* 敲除细胞仍有 80% 细胞存活, 与 L929 WT 细胞的存活率相比提高了 60% (\*\*\*  $P<0.001$ )。上述结果均表明, HSV-1-VP26-mCherry 病毒可以正常感染 L929 细胞, 而且随着感染时间的增加, 其复制及增殖能力加强, 而 *IFIT1* 敲除细胞病毒的复制及增殖能力明显减弱。

**2.5 *IFIT1* 基因缺失抑制 HSV-1 病毒的拷贝数**

为检测病毒的复制能力, 在 L929 WT 细胞和 *IFIT1* 敲除细胞中, 加入 HSV-1-VP26- mCherry 病毒, 设置 0 h、3 h、12 h、24 h、48 h、60 h 时间梯度, 检测该病毒拷贝数的变化。在病毒感染 3 h 后, L929 WT 和 *IFIT1* 敲除细胞中病毒的拷贝数无显著性差异 ( $P>0.05$ )。延长培养时间显示, 在 L929 WT 细胞中, 病毒拷贝数逐渐增加, 48 h 到达最高峰, 每微升病毒拷贝数为 56 231, 而 *IFIT1* 敲除细胞中, 病毒拷贝数变化较小, 在 48 h 每微升病毒拷贝数为 1 966, 较 L929 WT 组相比病毒拷贝数降低了 28.6 倍 (\*\*\*  $P<0.001$ )。继续延长培养时间到 60 h, 发现 L929 WT 和 *IFIT1* 敲除细胞中病毒的拷贝数均开始降低 (Fig.5)。该结果说明, *IFIT1* 基因的缺失显著抑制了 HSV-1-VP26-mCherry 病毒的复制。

**3 讨论**

HSV-1 是疱疹病毒科最广泛传播的病毒之一, 能引起常见的口腔、唇部和面部疱疹, 以及疱疹性角膜炎<sup>[9]</sup>, 并且 HSV-1 病毒反复激活与阿尔兹海默症

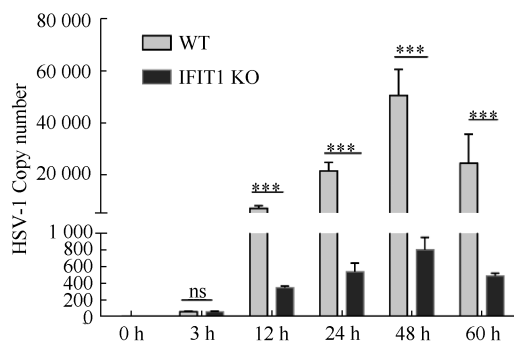


**Fig.4** *IFIT1* deletion inhibited HSV-1-VP26-mCherry virus proliferation and restored cell viability (A, B) *IFIT1* deletion inhibited HSV-1-VP26-mCherry virus proliferation. L929 WT and L929 *IFIT1* KO cells ( $4 \times 10^5$ ) were plated in 6-well culture dishes. The HSV-1-VP26- mCherry virus was added into medium for 72 hours. The red fluorecence signals were observed each day under a microscope. Three replicates were included in this experiment. The number of cells that emit red fluorecence were counted and compared with the control group. (C) *IFIT1* deletion restored cell viability. L929 WT and L929 *IFIT1* KO cells ( $4 \times 10^5$ ) were plated in 6-well culture dishes. The HSV-1-VP26-mCherry virus was added into medium for 72 hours. The cell number was counted using trypan blue staining. The survival rate of the WT group and the *IFIT1* KO group did no change over time within 72 hours, while compared with the WT HSV-1-VP26-mCherry group, the survival rate of *IFIT1* KO HSV-1-VP26-mCherry group increased by 60%. \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 3$

的发生有关<sup>[10]</sup>。最新研究发现,cGAS-STING 介导的 I 型干扰素信号通路在宿主抵御病毒发挥了非常重要的作用。因此,一类 DNA 病毒也进化出多种机制来逃避宿主抗病毒,促进病毒感染和复制<sup>[4,11]</sup>。

胞质 DNA 与 cGAS 结合后传递至第二信使 cGAMP,二聚化的 STING 与 cGAMP 结合,构象发生变化。通过自噬小体经内质网、高尔基体再到内体,期间被泛素化后募集 TBK1 蛋白,磷酸化并激活干扰素调





**Fig.5 Effects of *IFIT1* knockout on the HSV-1 copy number** L929 WT and *IFIT1* KO cells ( $4\times10^5$ ) cells were plated in 6-well plate dishes. The HSV-1-VP26-mCherry virus was added into medium for 60 hours. Virus copies were measured by qPCR. HSV-1 copies were represented by the ratio of the amount of virus to pcDNA 3.1-GL plasmids containing GL, in a similar way as Fig.3, with time as the horizontal coordinate, and the copy number of the virus as the vertical coordinate, comparison of the copy number of L929 WT and *IFIT1* KO cells. \*\*\*  $P<0.001$ ,  $n=3$

节因子 (IRFs) 和 NF- $\kappa$ B。后者诱导 I 型干扰素和其他免疫应答基因表达。卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 通过膜蛋白开放读码框 52 (ORF52), 直接与 cGAS 结合, 阻断 STING-TBK1 相互作用, 抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素信号通路进行免疫逃逸<sup>[12]</sup>。郑春福团队研究表明, 小基质蛋白 VP24 通过阻断 TBK1 和 IRF3 之间的相互作用抑制 cGAS-STING 信号通路, 同时该团队也发现病毒基因组独特区中的 41 号开放读码框架蛋白 (UL41), 通过靶向几个 ISG 降解 cGAS 的 mRNA, 降低 cGAS 的表达来介导免疫逃逸<sup>[13,14]</sup>。IFIT 家族分子中的 *IFIT3* 基因通过与 UL41 蛋白结合来发挥其功能, 使病毒成功发生免疫逃逸<sup>[14,15]</sup>。而该家族基因在细胞中表达量较低, 干扰素、病毒感染和脂多糖 (LPS) 等刺激可诱导其强烈表达<sup>[9]</sup>。目前, 对该基因家族个体基因的功能及作用机制仍未完全证实。有文献报道, *IFIT1* 可以在病原体感染细胞后直接被 IRF 家族蛋白诱导产生<sup>[16]</sup>。多个团队研究表明, 在 I 型干扰素刺激后, 细胞内的 *IFIT1*、*IFIT2*、*IFIT3* 之间有较强的相互结合作用<sup>[17]</sup>。也有研究称, *IFIT2* 敲除后, *IFIT1* 的表达量升高, 反之亦然, 提示 *IFIT1* 和 *IFIT2* 之间有相互补充的作用<sup>[18]</sup>。这些结果均表明, *IFIT* 家族分子参与 I 型干扰素产生的具体机制仍有待进一步阐释。

CRISPR/Cas9 是目前基因编辑的强大工具, 可

以对基因进行精确的定点编辑, 是研究各种基因功能的重要研究手段<sup>[19]</sup>。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 建立 *IFIT1* 基因敲除细胞株, 发现在 HT-DNA 处理后, 其 IFN- $\beta$  及下游 ISG 的表达量显著高于 L929 WT 细胞株, 而 Poly [I:C] 处理无显著性差异, 说明 *IFIT1* 是通过 DNA 信号通路来负反馈调节 IFN- $\beta$  及下游 ISG 的表达量, 但其作用的靶点仍有待进一步研究。可能该基因的存在会抑制 DNA 信号通路中的某个蛋白质, 或者通过结合病毒某些成分使病毒发生免疫逃逸。其中, *IFIT1*-KO4 细胞株在蛋白质水平未检测到 *IFIT1* 蛋白的表达, 但其 IFN- $\beta$  及下游 ISG 的 mRNA 表达量与 WT 相比显著性较少, 表明该单克隆细胞可能已经产生细胞免疫耐受或其他原因, 其他克隆株均有显著性差异。有研究证实, 在临床方面发现, I 型干扰素的增加与癌症的免疫反应有良好的相关性, 并且在自发肿瘤排斥反应或各种其他抗肿瘤治疗中, 启动抗肿瘤 T 细胞反应是必不可少的<sup>[20]</sup>, 同时 I 型干扰素的增加也被报道可以激活病毒感染时的记忆 T 细胞<sup>[21]</sup>。从 I 型干扰素与肿瘤的相互作用方面出发, 通过抑制 *IFIT1* 基因来提高 I 型干扰素的表达, 起到抗肿瘤的作用。但是, I 型干扰素的能力有限且副作用严重, 在临床治疗中一直谨慎使用。HSV-1 病毒感染细胞后, 随着时间的延长, L929 WT 细胞株 48 h 病毒拷贝数达到最高峰, 72 h 细胞几乎全部死亡, 但 *IFIT1* 敲除细胞株随着时间的延长, 病毒的拷贝数和细胞的存活率无明显变化, 表明 *IFIT1* 基因的敲除通过 DNA 信号通路负反馈调节 IFN- $\beta$  及下游 ISG 的表达量, 增加的 ISG 发挥主要的生物学功能, 抑制病毒的复制情况及其增殖。

综上所述, *IFIT1* 基因的缺失会通过 DNA 信号通路增加 IFN- $\beta$  及下游 ISG 的表达量, 实现抗病毒的功能, 但其在 DNA 信号通路的作用靶点及作用方式有待进一步研究。从 HSV-1 与干扰素相互作用角度出发, 通过某种药物来阻断 *IFIT1* 基因的表达, 避免病毒的免疫逃逸, 或者增强 IFN- $\beta$  及下游 ISG 的表达量, 减弱病毒的复制及增值能力, 为后续彻底治疗 HSV-1 病毒感染提供一个新思路, 同时也为阐明 *IFIT1* 基因的作用机制提供参考意义。

参考文献 (References)

[ 1 ] Zenner HL, Mauricio R, Banting G, et al. Herpes simplex virus 1 counteracts tetherin restriction via its virion host shutoff activity [J]. J Virol, 2013, 87(24): 13115-13123  
[ 2 ] Su C, Zhan G, Zheng C. Evasion of host antiviral innate

- immunity by HSV-1, an update [J]. *Virol J*, 2016, **13**: 38
- [ 3 ] Kondel R, Shafiq N, Kaur IP, *et al.* Effect of acyclovir solid lipid nanoparticles for treatment of Herpes Simplex Virus (HSV) infection in an animal model of HSV-1 infection [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2019, **7**(5): 389-403
- [ 4 ] Su C, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Abrogates the cGAS/STING-Mediated Cytosolic DNA-Sensing Pathway via Its Virion Host Shutoff Protein, UL41 [J]. *J Virol*, 2017, **91**(6).pii: e02414-02416
- [ 5 ] Mears HV, Sweeney TR. Better together: the role of IFIT protein-protein interactions in the antiviral response [J]. *J Gen Virol*, 2018, **99**(11): 1463-1477
- [ 6 ] Mears HV, Emmott E, Chaudhry Y, *et al.* Ifit1 regulates norovirus infection and enhances the interferon response in murine macrophage-like cells [J]. *Wellcome Open Res*, 2019, **4**: 82
- [ 7 ] Li D, Swaminathan S. Human IFIT proteins inhibit lytic replication of KSHV: A new feed-forward loop in the innate immune system [J]. *PLoS Pathog*, 2019, **15**(2): e1007609
- [ 8 ] Hogue IB, Bosse JB, Engel EA, *et al.* Fluorescent Protein Approaches in Alpha Herpesvirus Research[J]. *Viruses*, 2015, **7**(11): 5933-5961
- [ 9 ] Mehmood A, Kaushik AC, Wei DQ. Prediction and validation of potent peptides against herpes simplex virus type 1 via immunoinformatic and systems biology approach [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2019, **94**(5): 1868-1883
- [ 10 ] Johnson N. First-ever HSV-1 recurrence following superficial facial chemical peel after 30-year latency following neonatal primary infection [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2019, doi: 10.1111/jocd.12975. [Epub ahead of print]
- [ 11 ] McFarlane S, Orr A, Roberts APE, *et al.* The histone chaperone HIRA promotes the induction of host innate immune defences in response to HSV-1 infection [J]. *PLoS Pathog*, 2019, **15**(3): e1007667
- [ 12 ] Sun C, Luecke S, Bodda C, *et al.* Cellular Requirements for Sensing and Elimination of Incoming HSV-1 DNA and Capsids [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2019, **39**(4): 191-204
- [ 13 ] Huang J, You H, Su C, *et al.* Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein VP22 Abrogates cGAS/STING-Mediated Antiviral Innate Immunity [J]. *J Virol*, 2018, **92**(15).pii: e00841-18
- [ 14 ] Shen G, Wang K, Wang S, *et al.* Herpes simplex virus 1 counteracts viperin via its virion host shutoff protein UL41 [J]. *J Virol*, 2014, **88**(20): 12163-12166
- [ 15 ] Jiang Z, Su C, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein UL41 Counteracts IFIT3 Antiviral Innate Immunity [J]. *J Virol*, 2016, **90**(24): 11056-11061
- [ 16 ] Kimura T, Flynn CT, Alirezai M, *et al.* Biphasic and cardiomyocyte-specific IFIT activity protects cardiomyocytes from enteroviral infection [J]. *PLoS Pathog*, 2019, **15**(4): e1007674
- [ 17 ] Fensterl V, Sen GC. The ISG56/IFIT1 gene family [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, **31**(1): 71-78
- [ 18 ] Zhou X, Michal JJ, Zhang L, *et al.* Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense [J]. *Int J Biol Sci*, 2013, **9**(2): 200-208
- [ 19 ] Zhang J, Chen L, Zhang J, *et al.* Drug Inducible CRISPR/Cas Systems [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, **17**:1171-1177
- [ 20 ] Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, *et al.* Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells [J]. *Science*, 2002, **295** (5553): 338-342
- [ 21 ] Yang X, Zhang X, Fu ML, *et al.* Targeting the tumor microenvironment with interferon-beta bridges innate and adaptive immune responses [J]. *Cancer Cell*, 2014, **25**(1): 37-48