

沉默 A549 细胞中的 CD46 和 DSG2 可抑制人 3 型和 7 型腺病毒的侵入及 IL-8 的释放

杨中英, 付扬喜, 任洛, 陈诗懿, 刘恩梅, 臧娜

重庆医科大学附属儿童医院呼吸科//国家儿童健康与疾病临床医学研究中心//儿童发育与疾病教育部重点实验室//儿科学重庆市重点实验室//儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆 400014

摘要:目的 探讨沉默受体 CD46、桥粒芯蛋白(DSG2)对人 3 型腺病毒(HAdV-3)和 7 型腺病毒(HAdV-7)的侵入及炎症因子释放的影响。方法 通过 RNA 干扰技术沉默 A549 细胞中 CD46、DSG2 的表达。实验分为 HAdV-3 组、HAdV-3+siRNA-NC 组(siRNA 无关序列对照组)、HAdV-3+siRNA-CD46 组(转染 siRNA-CD46)、HAdV-3+siRNA-DSG2 组(转染 siRNA-DSG2); HAdV-7 组、HAdV-7+siRNA-NC 组(siRNA 无关序列对照组)、HAdV-7+siRNA-CD46 组(转染 siRNA-CD46)、HAdV-7+siRNA-DSG2 组(转染 siRNA-DSG2)。HAdV-3、7 感染 A549 细胞后 0.5、2 h, 通过激光共聚焦显微镜观察两种腺病毒与受体 CD46、DSG2 结合水平; 体外转染 siRNA-CD46、siRNA-DSG2 后不同时间点, qRT-PCR 技术检测 HAdV-3、7 拷贝数, ELISA 检测转染后 IL-8 表达情况。结果 腺病毒感染 A549 细胞后 0.5、2 h, HAdV-3、7 与其受体 CD46、DSG2 结合共定位; 腺病毒入胞后, 随时间延长, 病毒拷贝数增加, 转染 siRNA-CD46 后 2、6、12、24 h, HAdV+siRNA-CD46 组的病毒拷贝数较 HAdV 组降低(HAdV-3+siRNA-CD46 vs HAdV-3: 6 h, $P<0.05$; 12、24 h, $P<0.0001$; 2 h, 降低趋势无统计学差异; HAdV-7+siRNA-CD46 vs HAdV-7: 2 h, $P<0.01$; 6 h, $P<0.001$; 12、24 h, $P<0.0001$)。转染 siRNA-DSG2 后 2、6、12、24 h, 同样明显降低了病毒载量(HAdV-3+siRNA-DSG2 vs HAdV-3, HAdV-7+siRNA-DSG2 vs HAdV-7, $P<0.0001$)。HAdV-3、7 感染 A549 细胞后, 炎症因子 IL-8 释放增多($P<0.0001$), 沉默 CD46 和 DSG2 的表达后 2、6 h, 炎症因子 IL-8 水平降低($P<0.0001$)。结论 HAdV-3、7 与其受体 CD46、DSG2 结合后入胞, 病毒拷贝数随时间延长而增加, 沉默 CD46、DSG2 后, 抑制 HAdV-3、7 型腺病毒的侵入及 IL-8 释放。

关键词:人 3 型腺病毒; 人 7 型腺病毒; CD46; 桥粒芯蛋白

Silencing CD46 and DSG2 in host A549 cells inhibits entry of human adenovirus type 3 and type 7 and reduces interleukin-8 release

YANG Zhongying, FU Yangxi, REN Luo, CHEN Shiyi, LIU Enmei, ZANG Na

Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Chongqing 400014, China

Abstract: Objective To investigate the effect of silencing CD46 and desmoglein 2 (DSG2) in host A549 cells on the entry of human adenovirus type 3 (HAdV-3) and type 7 (HAdV-7) and host cell secretion of inflammatory cytokines. **Methods** RNA interference technique was used to silence the expression of CD46 or DSG2 in human epithelial alveolar A549 cells as the host cells of HAdV-3 or HAdV-7. The binding of the viruses with CD46 and DSG2 were observed with immunofluorescence staining at 0.5 and 1 h after viral infection. The viral load in the host cells was determined with qRT-PCR, and IL-8 secretion level was measured using ELISA. **Results** In infected A549 cells, immunofluorescent staining revealed colocalization of HAdV-3 and HAdV-7 with their receptors CD46 and DSG2 at 0.5 h and 2 h after infection, and the copy number of the viruses increased progressively after the infection in a time-dependent manner. In A549 cells with CD46 silencing, the virus titers were significantly lower at 2, 6, 12 and 24 h postinfection in comparison with the cells without gene silencing; the virus titers were also significantly decreased in the cells with DSG2 silencing. The secretion level of IL-8 increased significantly in A549 cells without siRNA transfection following infection with HAdV-3 and HAdV-7 ($P<0.0001$), but decreased significantly in cells with CD46 and DSG2 silencing ($P<0.0001$). **Conclusion** HAdV-3 and HAdV-7 enter host cells by binding to their receptors CD46 and DSG2, and virus titer and cytokines release increase with infection time. Silencing CD46 and DSG2 can inhibit virus entry and cytokine IL-8 production in host cells.

Keywords: human adenovirus type 3; human adenovirus type 7; CD46; desmoglein2

人腺病毒(HAdV)为无包膜的线性双链 DNA 病毒,其结构分为病毒核心及衣壳两部分,衣壳呈二十面

体结构,主要由五邻体、六邻体和纤毛蛋白 3 种蛋白构成^[1]。HAdV 为儿童急性呼吸道感染的常见病原之一,在世界范围内广泛流行^[2,3]。腺病毒肺炎是世界范围内小于 5 岁儿童患病率及死亡率最高的病毒性肺炎,死亡率最高可达 50%^[4]。腺病毒肺炎引起的持续性高热及呼吸衰竭的发生率占呼吸道常见病毒的首位,常伴有危及生命的严重并发症,如呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺出血、脑炎等^[5-7]。迄今为止,腺病毒分为

收稿日期:2022-04-07

基金项目:国家自然科学基金(32071123);重庆市自然科学基金(CSTC2020jcyj-msxmX0239)

Supported by National Natural Science Foundation of China (32071123).

作者简介:杨中英,在读硕士研究生,E-mail: 985699510@qq.com

通信作者:臧娜,博士,副主任医师,E-mail: zangna1214@126.com

7个亚属(A-G),包括100多个基因型;其中B亚属中的人腺病毒3型(HAdV-3)、人腺病毒7型(HAdV-7)是引起全球范围内儿童重症腺病毒肺炎的主要病原^[9-11]。然而,目前临床上尚无针对HAdV的特异性有效治疗方法,因此,对于腺病毒感染的病毒复制和炎症因子干预的相关机制研究对于制定抗腺病毒策略至关重要。

既往研究多重点关注病毒复制周期进入后的阶段,如对腺病毒入胞后早期、中期和晚期病毒基因(包括E1A、IVa2、hexon等)沉默对体外腺病毒复制的影响^[12,13]。同时,抗腺病毒药物(包括西多福韦)的设计也主要靶向病毒入胞后的复制^[14]。腺病毒纤毛蛋白与相应的受体结合后介导腺病毒粘附靶细胞,启动胞吞作用,促使HAdV入胞^[15],这是腺病毒感染致病的第一步。腺病毒的纤毛蛋白与受体结合入胞是病毒感染的关键环节,研究报道三价化合物ME0322能够有效地抑制37型腺病毒纤毛蛋白结合唾液酸受体^[16],茶素没食子酸酯(EGCG)可以通过与硫酸乙酰肝素或唾液酸部分竞争结合腺病毒粒子^[17]。但以上研究均未证明阻断受体与病毒结合后的效应以及具体机制。

CD46是识别B亚属腺病毒纤毛蛋白的受体之一,B亚属腺病毒纤毛蛋白与CD46结合触发了感染^[18]。早期研究认为CD46同时做为HAdV-3和HAdV-7的受体^[19]近年来桥粒芯蛋白(DSG2)被认为是与B亚属的3、7、11、14、55型腺病毒结合的主要高亲和力受体^[20,21]。HAdV-3和HAdV-7具有嗜气道上皮细胞特性,直接与宿主受体CD46、DSG2特异性结合,介导病毒的初始接触并促进入胞,从而触发后续细胞信号转导,引起呼吸道感染^[22]。本文以A549细胞为研究对象,并通过siRNA的干扰分析沉默CD46、DSG2对HAdV-3、HAdV-7的入胞及炎症因子释放的影响,说明CD46、DSG2是抗腺病毒感染的潜在靶点,为针对腺病毒与宿主细胞受体的结合设计抗腺病毒药物以及疫苗的设计和提供改进参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

A549细胞株(中国社会科学院上海细胞库),由重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所儿童呼吸病学研究室稳定传代后保存提供。DMEM培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素(Gibco)。氯化铯(默克),氯化铯离心柱(Bio-Rad)。病毒DNA提取试剂盒(Qiagen);HAdV-3、7标准品质粒和TaqMan荧光探针由Invitrogen公司设计合成,qRT-PCR引物由北京六合华大基因科技有限公司引物合成,SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。CD46、DSG2的siRNA干扰序列(siRNA-CD46、DGS2)及非特异性序列(siRNA-CD46、

DGS2 Nc)由Santa Cruz公司设计并合成,转染试剂及转染专用培养基(Santa Cruz),siRNA-CD46(h)(sc-35004),siRNA-DSG2(h)(sc-35226)。BCA蛋白定量试剂盒、一抗稀释液及快速封闭液(碧云天生物技术有限公司),全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)。一抗CD46(Abcam)、DSG2(成都正能生物技术有限责任公司);HAdV-3抗体、HAdV-7抗体为广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室赠予;Western blot山羊抗兔二抗(成都正能生物技术有限责任公司),免疫荧光山羊抗兔Cy3二抗(博士德生物工程有限公司)、驴抗小鼠555二抗(碧云天生物技术有限公司)。人IL-8 ELISA试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司)。

1.2 病毒分离与纯化

HAdV-3(CQ5291)、HAdV-7(CQ4411)临床株分离于重庆医科大学附属儿童医院呼吸科腺病毒感染的住院患儿鼻咽抽吸物(NPAs),长期液氮保存。采用氯化铯密度梯度离心法纯化病毒^[23],测定 A_{260} 值,计算病毒浓度(VP/mL)= $A_{260} \times \text{dilution} \times 10^{12}$ ^[10,24],本研究中的HAdV-3和HAdV-7滴度为 5×10^9 VP/mL和 3×10^{11} VP/mL。

1.3 细胞培养及转染

将存放于液氮的A549细胞系复苏传代,DMEM高糖培养基添加10%胎牛血清和1%双抗,置于37℃、5%CO₂培养箱内培养,待细胞长至70%~80%时,做传代和转染处理。A549细胞以适当密度接种于孔板中,配制如下溶液:溶液A:5 μL siRNA-CD46(10 μL siRNA-DSG2)、5 μL siRNA-CD46 Nc(10 μL siRNA-DSG2 Nc)加入到100 μL siRNA transfection Medium。溶液B:5 μL siRNA transfection reagent加入到100 μL siRNA transfection Medium。然后将配制好的溶液A直接加入到溶液B中,轻轻混匀后室温孵育45 min。将0.8 mL siRNA transfection Medium直接加入到溶液A和溶液B的混合液中,轻轻混匀后分别加入到siRNA-CD46(siRNA-DSG2)处理孔、siRNA-Nc阴性对照孔,空白对照孔则只加DMEM培养基,每孔加入所需培养基的一半。7 h后将剩余一半DMEM培养基(20%胎牛血清和2%抗生素)加入到孔板中的每一孔并孵育24 h,24 h后更换新的(10%胎牛血清和1%抗生素)DMEM培养基,根据实验设计的时间点进行转染后的实验。

1.4 Western blot 法检测转染 siRNA 后 CD46、DSG2 表达

A549细胞(2.5×10^5 /孔)铺于6孔板,转染siRNA-CD46 24 h,siRNA-DSG2 48 h后,用凯基全蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,并以BCA蛋白浓度检测试剂盒检测各组总蛋白浓度。蛋白质在10% SDS-PAGE凝胶上分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,快

速封闭液封闭 15 min 后, 孵育一抗(CD46, 1: 5000; DSG2, 1: 2000)于 4 °C 过夜, 取出膜以 TBST 洗脱后, 室温孵育二抗(GAPDH, 1: 10 000), 使用化学发光(ECL)法获得蛋白条带, 用于比较分析。

1.5 免疫荧光检测病毒与受体结合情况

将细胞爬片置于 12 孔板, A549 细胞(2.5×10^5 /孔)转染 siRNA-CD46 24 h, siRNA-DSG2 48 h 后吸弃旧液, 以 MOI=2000 vp/cell 接种 HAdV-3、HAdV-7 后, 用 2%FBS 的 DMEM 培养基于 37 °C, 5% CO₂ 孵育 0.5、2 h, 然后用 PBS 漂洗 10 min × 3 次, 在室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 5% BSA 封闭 30 min, 随后加入 CD46 兔单克隆抗体(1: 200 稀释)或 DSG-2(AH12.2)兔多克隆抗体(1: 100 稀释), 50 μL 的 HAdV3(3E6-FITC)单抗(1: 50 稀释)或 HAdV7(6F3-FITC)单抗(1: 100 稀释)并放入湿盒中, 4 °C 孵育过夜; 第 2 天用 PBS 漂洗 10 min × 3 次, 山羊抗兔 Cy3 二抗(1: 500 稀释)或驴抗小鼠 555

二抗(1: 500 稀释), 室温避光孵育 1 h; 经 DAPI 复染后, 贴片, 封片, 然后在激光共聚焦扫描显微镜下采集图像。

1.6 qRT-PCR 检测人 3、7 型腺病毒拷贝数

A549 细胞(2.5×10^5 /孔)铺于 6 孔板, 转染 siRNA-CD46 24 h, siRNA-DSG2 48 h 后, 以 MOI 为 1 vp/cell 分别接种 HAdV-3、HAdV-7 后, 用 2%FBS 的 DMEM 培养基于 37 °C, 5% CO₂ 孵育 2、6、12、24 h, 然后按照 Qiagen DNA 提取试剂盒的说明书提取病毒 DNA, qRT-PCR 检测病毒拷贝数。腺病毒 qRT-PCR 的引物和探针序列、循环条件分别参照文献[25, 26]。引物、探针序列(表 1)。配制 qRT-PCR 反应体系: HAdV-3: mix 10 μL, 上游引物 0.6 μL, 下游引物 1.2 μL, 探针 0.4 μL, DNA 2.0 μL, dd H₂O 5.8 μL, 合计 20 μL。HAdV-7: mix 10 μL, 上游引物 1.2 μL, 下游引物 0.6 μL, 探针 0.1 μL, DNA 2.0 μL, dd H₂O 6.1 μL, 共计 20 μL。qRT-PCR 反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s; 60 °C 1 min(重复 44 个循环)。

表 1 腺病毒的探针和引物序列
Tab.1 Sequence of primers and probes for adenovirus

Adenovirus		Primers/Probes (5'→3')
HAdV-3	F	GGGAGACAATATTACTAAAGAAGGTTTGC
	R	CAACTTGAGGCTCTGGCTGATA
	P	6-CFDA-CACTAC"TT"GAAGGAGAAGAAAAGCCCATTTATGCC- Phosphorylation
HAdV-7	F	GAGGAGCCAGATATTGATATGGAATT
	R	AATTGACATTTTCCGTGTAAAGCA
	P	FAM -AAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCTGA- BHQ1

F: Forward primer; R: Reverse primer; P: Probe.

1.7 统计学方法

使用 Graphpad Prism8.0 软件进行统计分析, 计量资料用均数±标准差表示; 多组比较用采用单因素方差分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒与受体 CD46、DSG2 结合促进病毒的入胞

激光共聚焦显微镜观察结果显示, 在感染早期, HAdV-3、HAdV-7 与 CD46、DSG2 明显共定位(图 1), HAdV-3、HAdV-7 直接与其受体 CD46、DSG2 结合进入细胞。

2.2 转染 siRNA-CD46、siRNA-DSG2 降低腺病毒拷贝数

siRNA-CD46、siRNA-DSG2 分别转染 A549 细胞 24、48 h 后, siRNA-CD46 和 siRNA-DSG2 组与相应的 siRNA-NC 组比较, 以及 Control 组比较, CD46、DSG2 表达水平下调, 而 siRNA-NC 组与 Control 组的 CD46、DSG2 表达无明显差异(图 2A)。

HAdV-3、HAdV-7 感染 A549 细胞后, 病毒拷贝数呈时间依赖性增加(P<0.01, 图 2B-E), 且 HAdV-7 的病毒拷贝数高于 HAdV-3。转染 siRNA-CD46 后 6、12、24 h, HAdV-3、HAdV-7 病毒滴度均下降(HAdV-3: 6 h, P<0.05; 12、24 h, P<0.0001; HAdV-7: 2 h, P<0.01; 6 h, P<0.001, 12、24 h, P<0.0001, 图 2B、C)。在各时间点, 与 HAdV-3、HAdV-7 组相比, siRNA-CD46 Nc 组的病毒拷贝数无明显变化。与 HAdV-3、HAdV-7 组相比, siRNA-DSG2 Nc 组的病毒拷贝数与病毒组差异无统计学意义(P>0.05), 而干扰 DSG2 后 2、6、12、24 h 显著降低了 HAdV-3、HAdV-7 的病毒拷贝数(P<0.0001, 图 2D~E)。沉默 CD46、DSG2, HAdV-7 的拷贝数降低比例均大于 HAdV-3; 沉默 CD46, HAdV-7 的拷贝数在 2、6、12、24 h 分别减低 75.54%、72.36%、81.97%、88.18%, HAdV-3 的拷贝数在 2、6、12、24 h 分别减低 65.71%、69.16%、67.09%、73.71%; 沉默 DSG2, HAdV-7 感染后 2、6、12、24 h 的拷贝数分别降低 88.42%、87.17%、86.38%、87.78%, HAdV-3 的拷贝数在对应时间点分别降低

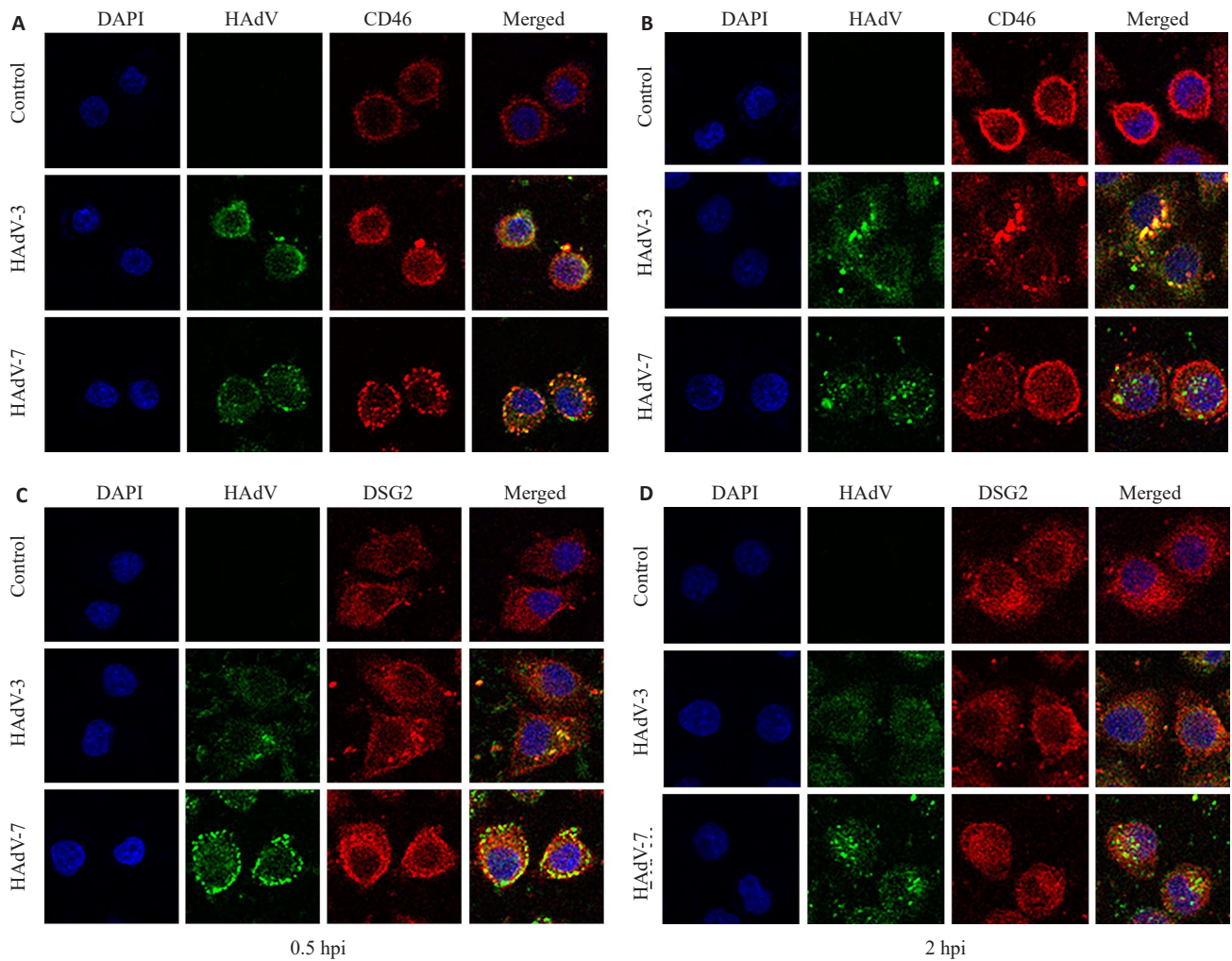


图1 腺病毒与CD46、DSG2结合的免疫荧光检测

Fig.1 Immunofluorescent detection of CD46 and DSG2 binding to HAdV-3 and HAdV-7 (Original magnification: $\times 200$). A, B: Binding assay of CD46 at 0.5 h and 2 h postinfection (green signals for HAdV-3 and HAdV-7 and red signals for CD46 and DSG2). C, D: Binding assay of DSG2 at 0.5 h and 2 h postinfection. Hpi: Hours postinfection.

55.85%、77.57%、78.10%、73.56%。

2.3 转染 siRNA-CD46、siRNA-DSG2 抑制腺病毒感染诱导的 IL-8 产生

HAdV-3、HAdV-7 感染 A549 细胞后 2、6 h，与非感染 Mock infection 组比较，炎症因子 IL-8 随时间延长释放增加 ($P < 0.0001$, 图 3)；且 HAdV-7 感染后较 HAdV-3 产生更高水平 IL-8。siRNA 干扰 CD46 后降低 HAdV-3、HAdV-7 感染诱导的 IL-8 释放 ($P < 0.0001$, 图 3A、B)。同时，转染 siRNA-DSG2 后，IL-8 的产生也明显下降 ($P < 0.0001$, 图 3C、D)。

3 讨论

人腺病毒是儿童呼吸道感染最常见的病毒病原之一，而 3、7 型腺病毒通常与重症感染和严重暴发有关^[27, 28]。腺病毒纤毛蛋白与其受体结合启动了病毒感染靶细胞的过程^[29]，B 亚属的 3、7 型腺病毒主要是纤毛

蛋白通过与受体 CD46、DSG2 结合作用进入宿主细胞^[30-32]。课题组前期研究发现 HAdV-7 和 HAdV-3 基因序列差异主要在纤毛蛋白上^[33]。为此，本研究从病毒与受体结合角度进一步探讨沉默受体 CD46、DSG2 对 3、7 型腺病毒感染的影响。

免疫荧光实验结果显示在腺病毒感染早期，HAdV-3、HAdV-7 与其主要粘附受体 CD46、DSG-2 结合后，腺病毒在胞浆、胞核共定位均增加，胞浆尤为明显，表明 HAdV-3、HAdV-7 与细胞表面受体 CD46、DSG-2 结合是腺病毒内化的关键步骤。由于病毒受体不存在变异的特性，阻断宿主细胞受体与病毒的结合以及抑制病毒蛋白的入胞可能是一个有效的治疗靶点。在其他病毒研究中发现，莲花清瘟可能通过阻断病毒与宿主受体结合发挥抗病毒作用^[34]；CXCR 拮抗剂 Plerixafor (AMD3100) 能够阻断 HIV 与其共受体 CXCR4 相互作用而抑制 HIV 感染^[35]；抗精神病药物，尤

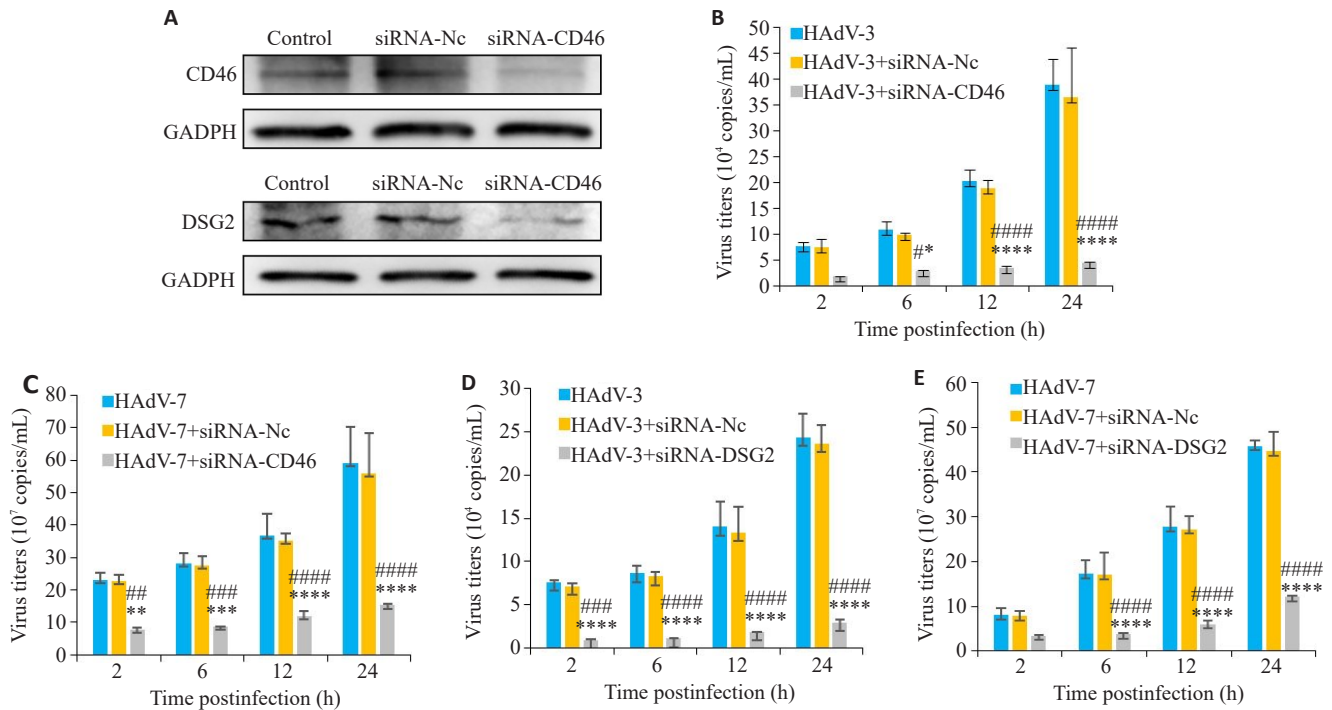


图2 干扰CD46和DSG2后对腺病毒复制的影响

Fig.2 Effects of siRNA-mediated knockdown of CD46 and DSG2 on adenovirus replication. **A:** Expression levels of CD46 and DSG2 after siRNA-mediated knockdown of CD46 and DSG2. **B-E:** qRT-PCR for viral genome copy number in different groups ($n=3$). * $P<0.05$ vs HAdV-3 groups; $^{\#}P<0.05$ vs siRNA-Nc groups; **** $P<0.0001$ vs HAdV-3 or HAdV-7 groups; **** $P<0.0001$ vs siRNA-Nc groups; ** $P<0.01$ vs HAdV-7 groups; $^{\#}P<0.01$ vs siRNA-Nc groups; *** $P<0.001$ vs HAdV-7 groups; $^{\#}P<0.001$ vs siRNA-Nc groups.

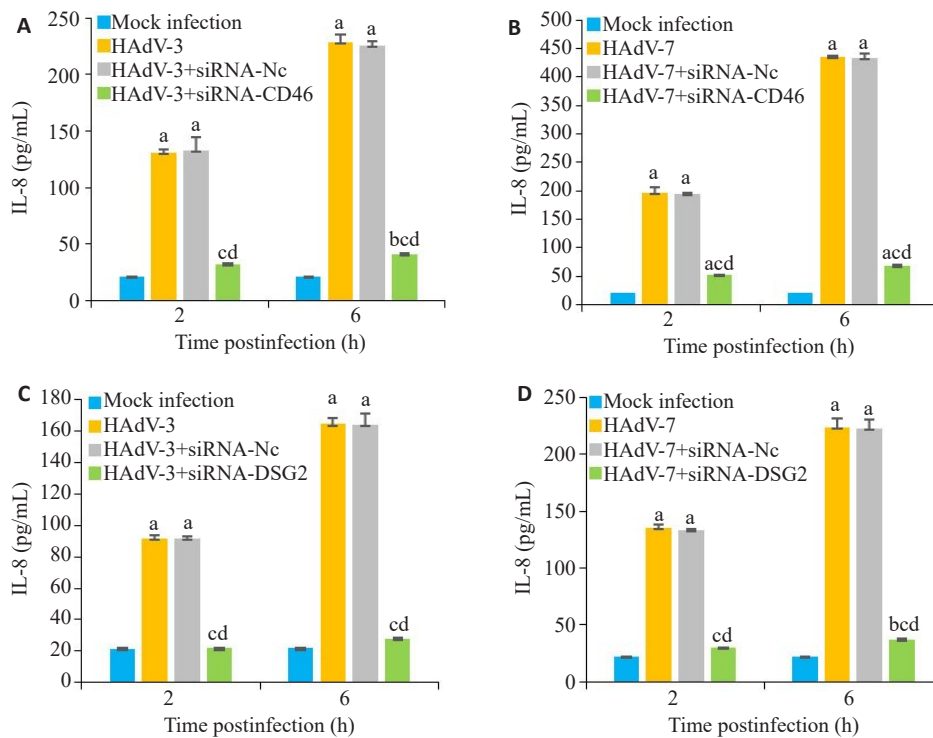


图3 ELISA 检测A549细胞各组IL-8的表达水平

Fig.3 ELISA measurement of IL-8 levels in different groups ($n=3$). $^aP<0.0001$ vs Mock infection; $^bP<0.01$ vs Mock infection; $^cP<0.0001$ vs HAdV-3 or HAdV-7 groups; $^dP<0.0001$ vs HAdV+siRNA-Nc groups.

其是吩噻嗪类药物,可以显著阻断 SARS-CoV-2 与 ACE2 的结合可能是防治 SARS-CoV-2 感染的有效药物^[36]。本研究通过特异性的 siRNA 干扰实验,有效沉默 A549 细胞膜表面的受体 CD46、DSG2 后感染 HAdV-3、HAdV-7, 研究显示无论是使用 siRNA-CD46 还是 siRNA-DSG2 后,腺病毒拷贝数较沉默前均明显下降,结果说明 siRNA-CD46、siRNA-DSG2 有效阻断 HAdV-3、HAdV-7 与其受体结合,从而使病毒入胞减少。腺病毒感染靶细胞同时还启动了炎症反应,在某些情况下,过度的细胞因子释放,如 IL-6、IL-8 或 TNF- α , 可引起严重的全身炎症反应甚至多器官功能障碍^[22,37]。本研究中,HAdV-3、HAdV-7 感染 A549 细胞后,病毒拷贝数及 IL-8 的产生明显增加,且 HAdV-7 感染后在 A549 中病毒拷贝数及 IL-8 的水平高于 HAdV-3,这与我们前期发现 HAdV-7 比 HAdV-3 感染更易引起重症肺炎和严重的细胞因子反应^[10]及研究报道的 HAdV-7 感染人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 细胞诱导产生的 IL-8 比 HAdV-3 多^[38]一致。本研究发现沉默 CD46、DSG2 后能够显著抑制 HAdV-3、HAdV-7 诱导的 IL-8 产生;另外,沉默 CD46、DSG2 后,HAdV-7 干扰组产生 IL-8 水平仍较 HAdV-3 干扰组高,这一结果可能有助于解释 HAdV-7 感染后病情重于 HAdV-3 感染这一临床现象。

目前关于腺病毒的研究中临床研究占大多数,对于其基础实验的研究报道较少,以往对抗腺病毒的研究主要在对腺病毒早期基因和晚期基因的干扰方面^[12,13,39],而腺病毒与受体结合是感染的第一步,针对病毒进入的抗病毒药物可以从源头上防止病毒感染细胞,而且还避免了细胞内药物输送的需要,防止腺病毒与受体结合可以有效阻止病毒感染、细胞损伤和后续的细胞因子释放^[40]。本研究通过 A549 细胞系实验,证明阻断腺病毒结合的受体从而阻止病毒进入细胞并降低炎症因子的产生,由此,可针对 siRNA 或者其他分子干预阻断腺病毒与宿主细胞的结合设计抗腺病毒药物;同时,病毒蛋白中的受体结合区相对不变,也可以对其设计或改进疫苗作为预防感染的靶点。然而,这些防治方法亟需我们更深入地了解病毒与受体的相互作用机制,包括确定复杂的蛋白质结构等仍待深入研究。此外,缺乏体内实验也是本研究的局限性之一,这主要是由于人腺病毒感染宿主具有高度的种属特异性,只能在自然宿主细胞中进行有效复制,而人腺病毒的复制和表达在其他种属细胞中往往受到限制。故缺乏可支持腺病毒感染/致病的动物模型也是抗腺病毒药物研究及致病机制研究进展缓慢的主要原因之一^[41,42]。近年来有中国树鼩^[11]以及一些人类细胞、组织和干细胞人源化小鼠^[43]作为允许感染动物模型进行人腺病毒相关研究。本课题组也在积极构建人源化 CD46 小鼠肺部感染模型,本实验结果仍待

运用动物模型进一步验证。

综上所述,本研究通过体外实验证明沉默 CD46、DSG2 表达后阻断了 HAdV-3、HAdV-7 的病毒侵入以及感染诱导的 IL-8 释放,以期作为选择抗病毒药物靶点、设计新型疫苗提供思路。

参考文献:

- [1] Kulanayake S, Tikoo SK. Adenovirus core proteins: structure and function[J]. *Viruses*, 2021, 13(3): 388-43.
- [2] Chu VT, Simon E, Lu XY, et al. Outbreak of acute respiratory illness associated with human adenovirus type 4 at the United States coast guard academy, 2019[J]. *J Infect Dis*, 2022, 225(1): 55-64.
- [3] Ko JH, Woo HT, Oh HS, et al. Ongoing outbreak of human adenovirus-associated acute respiratory illness in the Republic of Korea military, 2013 to 2018[J]. *Korean J Intern Med*, 2021, 36(1): 205-13.
- [4] Lynch JP 3rd, Kajon AE. Adenovirus: epidemiology, global spread of novel serotypes, and advances in treatment and prevention [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(4): 586-602.
- [5] Abeysekera RA, Kularatne SAM, Noordeen E, et al. Fatal pulmonary haemorrhage following adenovirus infection [J]. *Ceylon Med J*, 2013, 58(2): 84-6.
- [6] Pfortmueller CA, Barbani MT, Schefold JC, et al. Severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) induced by human adenovirus B21: Report on 2 cases and literature review[J]. *J Crit Care*, 2019, 51: 99-104.
- [7] Zhang XF, Tan CB, Yao ZX, et al. Adenovirus infection-associated central nervous system disease in children[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2021, 40(3): 205-8.
- [8] Zhong HQ, Dong XY. Analysis of clinical characteristics and risk factors of severe adenovirus pneumonia in children [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 566797-805.
- [9] Chen SY, Tian XG. Vaccine development for human mastadenovirus [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(Suppl 19): S2280-94.
- [10] Fu YX, Tang ZZ, Ye ZX, et al. Human adenovirus type 7 infection causes a more severe disease than type 3[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 36-43.
- [11] Li X, Zhou ZC, Liu WK, et al. Chinese tree shrew: a permissive model for *in vitro* and *in vivo* replication of human adenovirus species B[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1): 424-38.
- [12] Kneidinger D, Ibršimović M, Lion T, et al. Inhibition of adenovirus multiplication by short interfering RNAs directly or indirectly targeting the viral DNA replication machinery[J]. *Antivir Res*, 2012, 94(3): 195-207.
- [13] Nikitenko NA, Speiseder T, Lam E, et al. Regulation of human adenovirus replication by RNA interference[J]. *Acta Naturae*, 2015, 7(3): 100-7.
- [14] Dodge MJ, MacNeil KM, Tessier TM, et al. Emerging antiviral therapeutics for human adenovirus infection: recent developments and novel strategies[J]. *Antivir Res*, 2021, 188: 105034-40.
- [15] Lee JN, Choi EH, Lee HJ. Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991-2007)[J]. *J*

- Med Virol, 2010, 82(4): 624-31.
- [16] Spjut S, Qian WX, Bauer J, et al. A potent trivalent sialic acid inhibitor of adenovirus type 37 infection of human corneal cells[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2011, 50(29): 6519-21.
- [17] Colpitts CC, Schang LM. A small molecule inhibits virion attachment to heparan sulfate-or sialic acid- containing glycans [J]. J Virol, 2014, 88(14): 7806-17.
- [18] Trinh HV, Lesage G, Chennampampil V, et al. Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection[J]. J Virol, 2012, 86(3): 1623-37.
- [19] Fleischli C, Sirena D, Lesage G, et al. Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor[J]. J Gen Virol, 2007, 88 (Pt 11): 2925-34.
- [20] Tian XG, Fan Y, Liu ZW, et al. Broadly neutralizing monoclonal antibodies against human adenovirus types 55, 14p, 7, and 11 generated with recombinant type 11 fiber knob[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 1-12.
- [21] Wang HJ, Li ZY, Liu Y, et al. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14[J]. Nat Med, 2011, 17(1): 96-104.
- [22] 樊慧峰, 徐雪花, 卢根. 人腺病毒感染免疫防御机制研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(24): 1917-20.
- [23] Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus[J]. Jpn J Med Sci Biol, 1994, 47(3): 157-66.
- [24] Chikhalya A, Dittmann M, Zheng YT, et al. Human IFIT3 protein induces interferon signaling and inhibits adenovirus immediate early gene expression[J]. mBio, 2021, 12(6): e0282921-9.
- [25] Heim A, Ebnet C, Harste G, et al. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR[J]. J Med Virol, 2003, 70 (2): 228-39.
- [26] Lu XY, Trujillo-Lopez E, Lott L, et al. Quantitative real-time PCR assay panel for detection and type-specific identification of epidemic respiratory human adenoviruses [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(4): 1089-93.
- [27] Wang RH, Zhang H, Zhang Y, et al. Development and evaluation of recombinase- aided amplification assays incorporating competitive internal controls for detection of human adenovirus serotypes 3 and 7 [J]. Virol J, 2019, 16(1): 86-95.
- [28] Dai H, Xi HL, Huang L, et al. Molecular epidemiology and clinical features analysis of respiratory adenovirus infections reveals correlations between genotype, inflammatory biomarkers, and disease severity[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 4357910-7.
- [29] Iacobelli-Martinez M, Nemerow GR. Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses[J]. J Virol, 2007, 81(3): 1305-12.
- [30] Yang M, Yang CS, Tao YK, et al. Combination therapy with F5/35 fiber chimeric conditionally replicative adenoviruses expressing IL-24 enhances the antitumor effect of temozolomide against melanoma [J]. Cancer Med, 2018, 7(12): 5928-42.
- [31] Mach N, Gao J, Schaffarczyk L, et al. Spectrum-wide exploration of human adenoviruses for breast cancer therapy[J]. Cancers, 2020, 12 (6): 1403-9.
- [32] Persson BD, John L, Rafie K, et al. Human species D adenovirus hexon capsid protein mediates cell entry through a direct interaction with CD46[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(3): e2020732118-25.
- [33] 徐祝菲. 3、7型腺病毒纤毛与六邻体基因序列分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
- [34] Yang CG, Wang YT, He JY, et al. Lianhua-Qingwen displays antiviral and anti-inflammatory activity and synergistic effects with oseltamivir against influenza B virus infection in the mouse model [J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2020, 2020: 3196375-86.
- [35] Veenstra M, Williams DW, Calderon TM, et al. Frontline Science: CXCR7 mediates CD14⁺CD16⁺ monocyte transmigration across the blood brain barrier: a potential therapeutic target for NeuroAIDS[J]. J Leukoc Biol, 2017, 102(5): 1173-85.
- [36] Lu JY, Hou YJ, Ge S, et al. Screened antipsychotic drugs inhibit SARS-CoV-2 binding with ACE2 *in vitro* [J]. Life Sci, 2021, 266: 118889-95.
- [37] Sun JP, Xiao YJ, Zhang MY, et al. Serum inflammatory markers in patients with adenovirus respiratory infection [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 3848-55.
- [38] Yoon JS, Kim HH, Lee Y, et al. Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells [J]. Pediatr Pulmonol, 2007, 42(3): 277-82.
- [39] Eckstein A, Gröbl T, Geisler A, et al. Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions[J]. Antivir Res, 2010, 88(1): 86-94.
- [40] Casasnovas JM. Virus-receptor interactions and receptor-mediated virus entry into host cells[J]. Sub Cell Biochem, 2013, 68: 441-66.
- [41] McKenna MK, Rosewell-Shaw A, Suzuki M. Modeling the efficacy of oncolytic adenoviruses In vitro and In vivo: current and future perspectives[J]. Cancers, 2020, 12(3): 619-26
- [42] 孙西魁, 刘兴龙, 冯立强. 人腺病毒感染动物模型的研究进展[J]. 病毒学报, 2016, 32(6): 810-6.
- [43] Rodríguez E, Ip WH, Kolbe V, et al. Humanized mice reproduce acute and persistent human adenovirus infection [J]. J Infect Dis, 2016, 215(1): 70-9.

(编辑:林萍)