

H7N9 流感病毒感染 A549 细胞蛋白质组学的初步研究

丁小满^{1,5}, 俞若曦², 王昕³, 武伟华³, 彭博³, 刘慧³, 耿一介³,
董方圆³, 陆家海¹, 俞慕华^{4*}, 房师松^{3*}

(1. 中山大学 公共卫生学院, 广州 510080; 2. 南方医科大学, 广州 510515;
3. 深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055; 4. 深圳市南山区疾病预防控制中心, 深圳 518054;
5. 济南市疾病预防控制中心, 济南 250021)

摘要:通过建立 H7N9 和 H1N1 流感病毒(H1N1pdm09)感染人肺癌上皮细胞(A549)模型,研究病毒感染细胞后细胞蛋白质组学差异变化,探讨 H7N9 流感病毒感染人类致病机制。将感染复数(MOI)为 0.001 的 H7N9、H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞 24h、48h、72h 后提取细胞总蛋白进行荧光双向差异凝胶电泳(2D-DIGE)和基质辅助激光解析串联飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS/MS)分析鉴定差异蛋白。质谱共鉴定出 H7N9 和 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞 24h、48h、72h 上调或下调的差异蛋白分别为 11、12、33 个。对差异蛋白进行功能分析发现与 H1N1pdm09 感染组相比,(纤)丝状肌动蛋白成帽蛋白 $\alpha 1$ (F-actin-capping protein subunit alpha-1, CapZ- $\alpha 1$)、鸟氨酸氨基转移酶(Ornithine aminotransferase, OAT)、Poly(rC)-binding protein 1(PCBP1)、真核翻译起始因子 5A-1(Eukaryotic translation initiation factor 5A-1, eIF5A)在 H7N9 感染 A549 细胞后表达量的下调加速了致细胞病变效应。血小板活化因子乙酰水解酶 I b 亚基 β (Platelet-activating factor acetylhydrolase Ib subunit beta, PAFAH1B2)在 H7N9 感染 A549 细胞后期表达量显著降低可能与该病毒感染患者的临床症状相关。

关键词:H7N9 流感病毒; A549 细胞; 荧光双向差异凝胶电泳; 蛋白质组学

中图分类号:R373.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2016)05-0574-08

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003023

2013 年 3 月,中国长江三角洲地区出现全球首次人感染 H7N9 流感病的病例^[1-2]。该病毒是一种全新的重配病毒,由早期的 H7N9、H7N3 和 H9N2 流感病毒重组而成^[3]。患者在感染 H7N9 流感病毒初期为一般流感症状,然而后期多出现严重的肺炎、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)以及多器官功能损伤、脑病、血象改变等^[4]。

通过以前的实验研究以及查阅文献发现,与空白对照组相比, H1N1 流感病毒(包括 H1N1pdm09)感染 A549 细胞并没有明显的差异蛋白谱改变^[5-8]。因此,本研究选择 H1N1pdm09 流感病毒感染作为 H7N9 流感病毒感染 A549 细胞蛋白质组学的对照,运用 2D-DIGE 和 MALDI-TOF-MS/MS 技术,找出两种亚型病毒感染 A549 后表达差异的蛋白,并进行鉴定。通过了解差异蛋白在病毒感染细胞过程中的功能,初步探讨 H7N9 流感病

毒感染人类的可能致病机制。

材料与方法

1 毒株及细胞 H7N9 流感病毒、H1N1pdm09 流感病毒、A549 细胞由深圳市疾病预防控制中心提供。

2 主要试剂 DMEM 培养液、胎牛血清购于 Gibco 公司; 2-D Quant Kit、2-D Clean-Up Kit、Urea、Thiourea、CHAPs、IPG 胶条(pH 3-11 NL, 24 cm)、荧光染料购于 GE Healthcare 公司; DL-Dithiothreitol(DTT)、Iodoacetamide(IAA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、TEMED 等购于 Sigma 公司。

3 细胞培养和病毒感染 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养 A549 细胞。将感染复数(MOI)为 0.001 的 H7N9 和 H1N1pdm09 流感病毒分别感染 $1.0 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7$ 个 A549 细胞(75cm² 细胞瓶,细胞密度约 95%)。病毒感染细胞维持液成分包含 0.25 μ g/mL TPCK 胰酶。H7N9 病毒细胞感染实验在深圳市疾病预防控制中心生物安全三级实验室(BSL-3)中进行。

4 细胞蛋白提取、定量和荧光标记 两种亚型流感病毒感染 A549 细胞 24h、48h、72h 后(每时间点重

收稿日期:2015-11-08;修回日期:2016-07-29

基金项目:深圳市科技计划项目(项目编号:JCYJ20140410-164811662、JCYJ20140416095154398)

作者简介:丁小满(1988-),女,硕士研究生,从事流感病毒方面的研究, Tel:18253152295, E-mail:dingxiaoman0318@163.com

*通讯作者:俞慕华,房师松并列通讯作者。俞慕华(1964-),男,博士,从事微生物检验工作, Tel:13688801859, E-mail:1175461964@qq.com;房师松(1976-),男,博士,从事流感病毒方面的研究, Tel:13501580196, E-mail:szcdessf@aliyun.com

复三次), 去掉细胞培养瓶中的维持液, 用 4℃ 预冷的 PBS 冲洗细胞 3 遍, 加入 500 μ L 细胞裂解缓冲液 (7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris-HCl pH 8.8, 4% w/v CHAPS), 冰上静置 30min, 收集细胞样品到 1.5mL EP 管中, 冰浴超声 30s。然后在 4℃ 条件下, 14 000 \times g 离心 60min, 取蛋白样品上清液经纯化、定量后用于荧光标记。其中 25 μ g 内标由同一时间点三次生物学重复的蛋白样品等量混合而成, 用 200pmol Cy2 标记。25 μ g 两组蛋白样品用 200pmol 的 Cy3 或者 Cy5 标记。避光, 冰上孵育 30min 后加入 1 μ L 赖氨酸 (10mM) 终止反应 10min。将 Cy2、Cy3、Cy5 标记的样品混合, 加入与混合样品等体积的 2 \times 裂解缓冲液 (7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 2% w/v DTT, 2% v/v IPG buffer pH 3-11)。再加入水化液 (8M urea, 2% w/v CHAPS, 0.5% v/v IPG buffer pH 3-11, 0.5% w/v DTT, 0.002% w/v bromophenol blue) 补足 450 μ L。

5 2D-DIGE 及图像分析 将荧光标记的蛋白混合样品先进行等电聚焦, 程序为: 50V 18h; 300V 2h; 500V 2h; 1000V 2h; 8000V 8h (gradient); 8000V 8h。聚焦结束将含有样品的 IPG 胶条依次放入含 1% w/v DTT 的 SDS 平衡液 (6 M urea, 75 mM Tris-HCl PH 8.8, 29.3% v/v 甘油, 2% w/v SDS, 0.002% w/v bromophenol blue) 和 2.5% w/v IAA 的 SDS 平衡液各平衡 10min。平衡结束的胶条放于 12.5% Tris-Glycine-SDS 胶上方进行电泳, 程序为: 1W/1h; 11W/6h。Typhoon TRIO Imager 荧光扫描仪 (GE Healthcare) 对胶板进行扫描。扫描的图像采用 DeCyder 差异分析软件 (Version 6.5, GE Healthcare) 进行胶内差异分析和凝胶间的生物学差异分析, 经过 *t* 检验和单因素方差分析获得 H7N9 和 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞的差异蛋白点。

6 差异蛋白点的质谱鉴定 对样品进行普通双向电泳, 再根据软件分析出的差异蛋白点进行人工挖点。将含有差异蛋白的胶粒放入 EP 管中经清洗、超声脱色、脱水以及胰酶消化后点靶, 通过 MALDI-TOF-MS/MS 技术进行差异蛋白点鉴定。

7 差异蛋白的分类 搜索 PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), 通过输入差异蛋白的检索号 (accession) 对两种亚型流感病毒感染 A549 细胞 24h、48h、72h 后的差异蛋白进行分类。

结 果

1 2D-DIGE 以及质谱结果

通过 2D-DIGE 以及质谱技术分析鉴定出 H7N9 及 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞 24h、48h、72h 3 个时间点差异蛋白 (H7N9/H1N1 ≥ 1.5 或 ≤ -1.5 , $P < 0.05$) 个数分别为 11、12、33 个, 根据 P 值的大小对差异蛋白点进行编码, P 值越小, 差异蛋白点的编码越小 (图 1 和表 1、表 2、表 3)。

通过对 3 个时间点差异蛋白的分析发现: CapZ- $\alpha 1$ 、OAT 在 H7N9 感染 A549 的 3 个时间点的表达量均低于 H1N1pdm09 感染组; PCBP1 在 H7N9 感染 A549 后 24h、48h 的表达量低于 H1N1pdm09 感染组, 72h 时又高于 H1N1pdm09 感染组; eIF5A 在 H7N9 感染 A549 后 24h 不存在差异, 48h、72h 时出现差异, 其表达量均低于 H1N1pdm09 感染组; 值得注意的是, 与 H1N1pdm09 感染组相比, H7N9 感染 A549 后 72h, PAFAH1B2 的表达量急剧下降 (H7N9/H1N1 为 -15.52, $P < 0.000098$)。

2 利用 PANTHER 软件对差异蛋白进行分类

通过 PANTHER 分析, 鉴定出的 11 个在 24h 的差异蛋白参与的生物过程包括: 凋亡 (3.8%)、生物调节 (7.7%)、细胞组分的组织或生物合成 (11.5%)、细胞生理过程 (15.4%)、发展过程 (19.2%)、定位 (7.7%)、代谢过程 (30.8%)、多细胞间的生物过程 (3.8%)。随着两种亚型流感病毒感染时间的延长, 差异蛋白参与的生物过程逐渐变多。12 个在 48h 的差异蛋白参与的生物过程除了凋亡 (4.0%)、生物调节 (4.0%)、细胞组分的组织或生物合成 (16.0%)、细胞生理过程 (16.0%)、发展过程 (12.0%)、定位 (8.0%)、代谢过程 (28.0%)、多细胞间的生物过程 (4.0%) 外, 又增加了细胞刺激反应 (4.0%) 和免疫系统反应过程 (4.0%)。33 个在 72h 的差异蛋白参与的生物过程与 48h 的差异蛋白参与的生物过程相同, 但比例发生了变化。其中 72h 时参与多细胞间生物过程的差异蛋白占总差异蛋白的比例为 8.1%, 比 48h 时增加了 1 倍 (图 2)。

讨 论

通过以上研究发现, 随着病毒感染细胞时间的发展, H7N9 和 H1N1pdm09 感染 A549 细胞整个过程中差异显著的蛋白主要有 CapZ- $\alpha 1$ 、OAT、

PCBP1、eIF5A、PAFAH1B2 这五种。

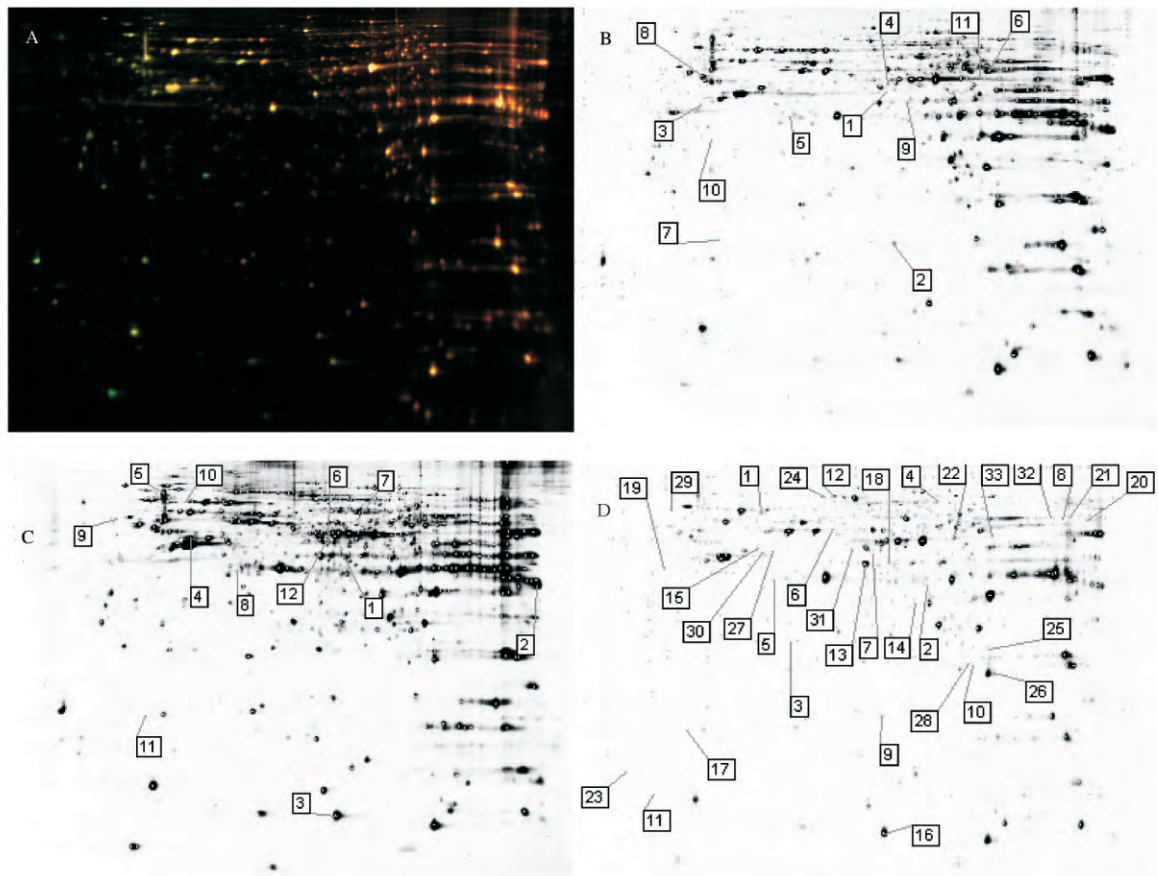


图 1 H7N9 和 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞的荧光双向差异凝胶电泳图(A)以及两种亚型流感病毒感染 A549 细胞 24h(B)、48h(C)、72h(D)差异蛋白点分布图

Figure 1 The 2D-DIGE image (A) and 2D-DIGE analysis of the differentially expressed proteins in A549 cells infected with H7N9 and H1N1pdm09 influenza virus at 24h (B), 48h (C) and 72h (D) post infection

表 1 H7N9 和 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞 24h 的差异蛋白质谱鉴定结果

Table 1 Identification of differentially expressed proteins in A549 cells infected with H7N9 and H1N1pdm09 at 24h post infection

Spots No	Name	Accession	AV. ratio (H7N9/H1N1)	P value(T-test)
* 1	Ornithine aminotransferase(OAT)	OAT_HUMAN	-2.04	0.00054
2	Cofilin-1	COF1_HUMAN	1.72	0.00055
3	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP_HUMAN	-2.14	0.0021
4	Annexin A7	ANXA7_HUMAN	-1.56	0.0038
* 5	F-actin-capping protein subunit alpha-1 (CapZ-α1)	CAZA1_HUMAN	-2.3	0.0042
6	Retinal dehydrogenase 1	ALIA1_HUMAN	1.64	0.0081
7	Eukaryotic translation initiation factor 1A	IF1AX_HUMAN	-2.13	0.011
8	Tubulin beta-2A chain	TBB2A_HUMAN	-1.6	0.018
* 9	Poly(rC)-binding protein 1(PCBP1)	PCBP1_HUMAN	-2.13	0.021
10	EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2_HUMAN	-1.75	0.022
11	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	1.63	0.041

* 该差异蛋白的表达在病毒感染 A549 细胞整个过程中存在显著差异并进行了重点讨论

* Indicates proteins that showed significant differential expression between H7N9 and H1N1pdm09 infection.

表 2 H7N9 和 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞 48h 的差异蛋白质谱鉴定结果

Table 2 Identification of differentially expressed proteins in A549 cells infected with H7N9 and H1N1pdm09 at 48h post infection

Spots No	Name	Accession	AV. ratio (H7N9/H1N1)	P value(T-test)
* 1	Poly(rC)-binding protein 1(PCBP1)	PCBP1_HUMAN	-1.82	0.0026
2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN	-1.57	0.0018
3	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2	LSM2_HUMAN	1.73	0.0018
4	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	-1.72	0.0041
5	Vimentin	VIME_HUMAN	-2.6	0.0047
* 6	Ornithine aminotransferase(OAT)	OAT_HUMAN	-2.09	0.0048
7	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	-2.31	0.0049
* 8	F-actin-capping protein subunit alpha-1(CapZ- α 1)	CAZA1_HUMAN	-3.26	0.0082
9	UV excision repair protein RAD23 homolog B	RD23B_HUMAN	-4.33	0.0098
10	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	-2	0.01
* 11	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1(eIF5A)	IF5A1_HUMAN	-4.5	0.011
12	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	ODPA_HUMAN	-2.64	0.012

* 该差异蛋白的表达在病毒感染 A549 细胞整个过程中存在显著差异并进行了重点讨论

* Indicates proteins that showed significant differential expression between H7N9 and H1N1pdm09 infection.

表 3 H7N9 和 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞 72h 的差异蛋白质谱鉴定结果

Table 3 Identification of differentially expressed proteins in A549 cells infected with H7N9 and H1N1pdm09 at 72h post infection

Spots No	Name	Accession	AV. ratio (H7N9/H1N1)	P value (T-test)
1	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	2.45	2.00E-05
2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRDL_HUMAN	-2.57	3.60E-05
* 3	Platelet-activating factor acetylhydrolase I b subunit beta (PAFAH1B2)	PA1B2_HUMAN	-15.52	9.80E-05
4	Prelamin-A/C	LMNA_HUMAN	2.26	0.00014
* 5	F-actin-capping protein subunit alpha-1(CapZ- α 1)	CAZA1_HUMAN	-4.27	0.00027
6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	1.66	0.00028
* 7	Ornithine aminotransferase(OAT)	OAT_HUMAN	-2.95	0.00029
8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB_HUMAN	-8.39	0.00065
9	Cofilin-1	COF1_HUMAN	-1.6	0.0008
10	Transgelin-2	TAGL2_HUMAN	1.97	0.0018
11	Transcription elongation factor B polypeptide 1	ELOC_HUMAN	-3.53	0.0027
12	Ezrin	EZRI_HUMAN	1.59	0.0028
13	Macrophage-capping protein	CAPG_HUMAN	1.53	0.0031
14	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_HUMAN	1.52	0.0044
15	Thioredoxin domain-containing protein 5	TXND5_HUMAN	-2.25	0.0058
16	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2	LSM2_HUMAN	1.93	0.0058
* 17	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1(eIF5A)	IF5A1_HUMAN	-5.96	0.0072
* 18	Poly(rC)-binding protein 1(PCBP1)	PCBP1_HUMAN	1.72	0.0078
19	Nucleophosmin	NPM_HUMAN	-3.33	0.0083
20	ATP synthase subunit alpha	ATPA_HUMAN	-2.61	0.0087
21	Aconitate hydratase	ACON_HUMAN	-3.57	0.0088
22	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	1.97	0.009
23	Myosin light polypeptide 6	MYL6_HUMAN	-3.29	0.0092
24	Gelsolin	GELS_HUMAN	1.6	0.013
25	Flavin reductase (NADPH)	BLVRB_HUMAN	1.5	0.014
26	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_HUMAN	1.58	0.016
27	Actin, aortic smooth muscle	ACTA_HUMAN	2.25	0.019
28	Superoxide dismutase [Mn]	SODM_HUMAN	4.23	0.019
29	Microfibrillar-associated protein 1	MFAP1_HUMAN	-2.19	0.021
30	Protein NDRG1	NDRG1_HUMAN	1.69	0.021
31	TAR DNA-binding protein 43	TADBP_HUMAN	1.61	0.023
32	Retinal dehydrogenase 1	AL1A1_HUMAN	-8.89	0.029
33	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP_HUMAN	1.68	0.036

* 该差异蛋白的表达在病毒感染 A549 细胞整个过程中存在显著差异并进行了重点讨论

* Indicates proteins that showed significant differential expression between H7N9 and H1N1pdm09 infection.

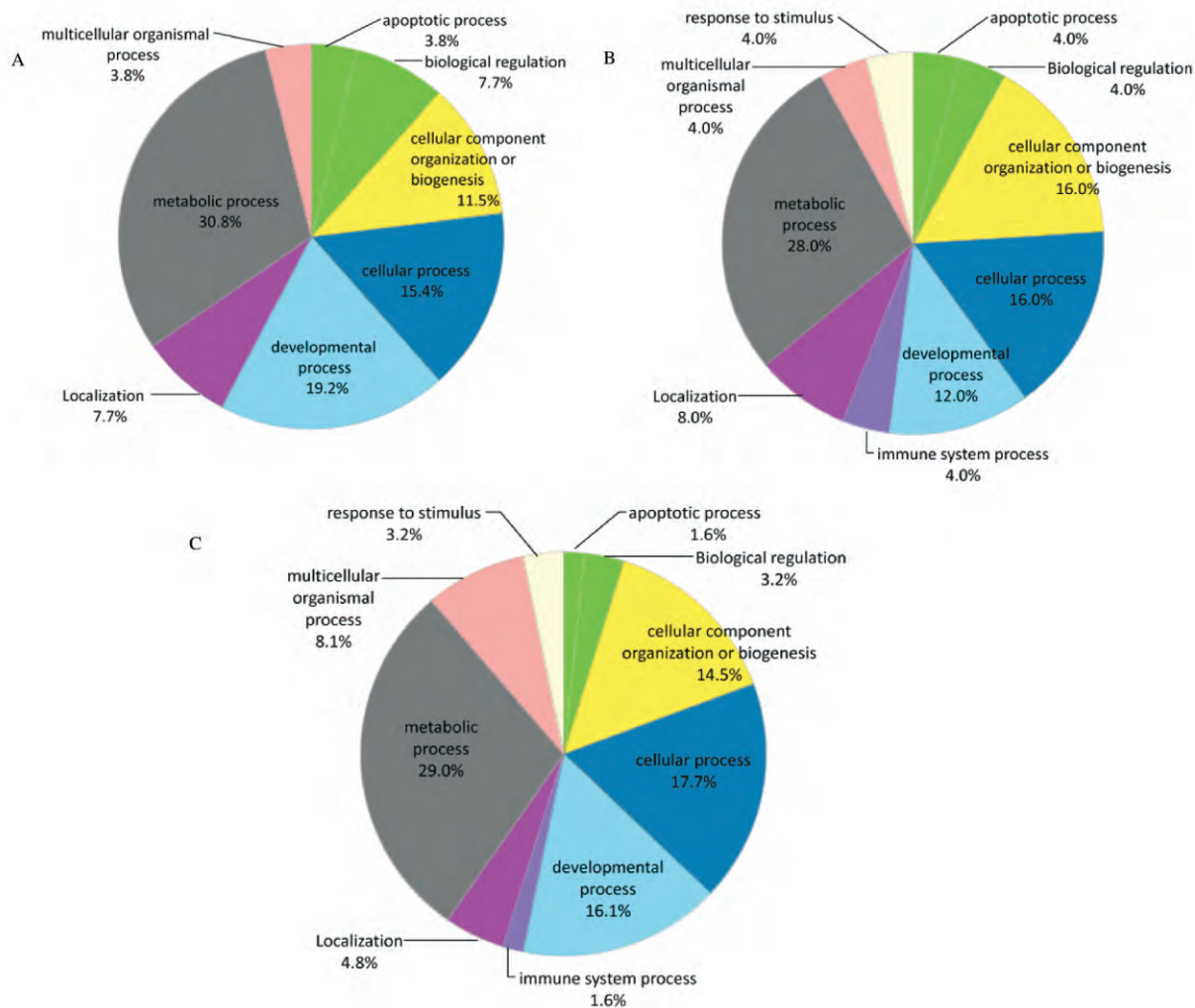


图2 PANTHER 软件对 24h(A)、48h(B)、72h(C) 差异蛋白参与的生物过程分类
Figure 2 Functional classifications of the identified proteins according to their biological processes at 24h (A), 48h (B) and 72h (C) by PANTHER

(纤)丝状肌动蛋白成帽蛋白(CapZ),是由 α 、 β 亚基组成的异源二聚体,可以选择性的以高亲和力覆盖在肌动蛋白微丝的钩端,限制肌动蛋白微丝的生长、组装^[9-10]。当 CapZ 蛋白含量降低或者发生变异时,细胞内的肌动蛋白微丝会快速生长积累,使肌动蛋白无法进行正确定位,肌动蛋白结合活动的调控也会发生改变,还会影响细胞运动、细胞极性,扰乱细胞信号传导活动,导致细胞裂解死亡^[11-12]。本研究中与 H1N1 pdm09 感染组相比, H7N9 感染 A549 细胞 24h、48h 和 72h 后, CapZ- α 1 亚型的表达量均降低,表明 H7N9 流感病毒可能严重影响到了细胞内 CapZ- α 1 的合成,进而影响肌动蛋白的正常功能。

鸟氨酸氨基转移酶(OAT)是一种线粒体酶,以同源四聚体的形式存在于线粒体基质^[13-14],在氨基

酸的生物合成和转化过程中发挥着重要作用^[15-17]。先前研究表明 OAT 可能参与多种恶性肿瘤的发生和发展,在信号转导、转录和分子转运等方面也发挥一定的作用。Wang^[18] 等研究发现 OAT 是肿瘤细胞纺锤体组装的必需成分,通过抑制 OAT,可干扰细胞有丝分裂,诱导肿瘤细胞死亡。本研究中与 H1N1pdm09 感染组相比, H7N9 感染 A549 细胞三个时间点 OAT 表达量的降低加速了 A549 细胞的死亡。

PCBP1 属于异质核糖核蛋白家族(hnRNP),含有 3 个 KH 结构域和两个核定位信号^[19]。该蛋白作为 RNA 以及 DNA 结合蛋白,其功能涉及到 mRNA 在细胞核与胞浆间的穿梭、mRNA 的稳定性、转录、翻译以及蛋白之间的相互作用等生物过程^[20-21]。Huo^[22] 等研究发现 PCBP1 表达升高时,与

细胞周期和抗凋亡相关的分子出现上调以及 P53 出现下调,提示 PCBP1 可以正向调控细胞周期和抗凋亡。本研究中 H7N9 感染 A549 细胞 24h、48h 时 PCBP1 表达量均低于 H1N1pdm09 感染组,提示 H7N9 感染组 PCBP1 的下调影响了 A549 细胞周期,促进了细胞凋亡。

真核翻译起始因子 5A-1(eIF5A)是唯一的包含高赖氨酸[N ϵ -(4-amino-2-hydroxybutyl) lysine]结构的蛋白,对真核细胞的蛋白翻译过程、细胞稳定性等起着至关重要的作用^[23-24]。Maier^[25]等研究发现 eIF5A 可参与炎症反应的调控。该蛋白还是控制细胞增殖与死亡平衡的一个主要因子^[26],当 eIF5A 的活性受到抑制将会明显影响人类各种细胞系的增殖,引起细胞周期阻滞^[27-28]。本研究中与 H1N1pdm09 感染组相比,H7N9 感染组在 48h、72h 时,eIF5A 的表达量显著降低,说明 A549 细胞增殖出现了明显的抑制。

血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)可催化水解血小板活化因子(Platelet-activating factor, PAF)_{sn-2} 位置上的酰基,调节 PAF 的含量,介导前炎症反应。该酶包括一种分泌型(细胞外)和四种细胞内同工酶(I a、I b、II 和红细胞型)。其中 PAF-AH I b 属于 G 蛋白类复合物,包括两个催化亚基 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和一个调节亚基 β (LIS1 基因产物),主要参与抑制细胞内 PAF 的功能,控制 PAF 分泌等过程^[29-32]。PAF 在病理条件下可引起血小板、中性粒细胞聚集和释放大量炎性介质,参与了血管通透性的升高、血栓形成、肺动脉高压、心脑血管微循环障碍等过程^[29]。本研究中发现与 H1N1pdm09 感染组相比,H7N9 感染 A549 后 72h,PAF-AH I b 亚基 β (PAFAH1B2)含量急剧下降,细胞内 PAF 含量会随之升高,这与 H7N9 感染患者后期发生的肺炎、ARDS、脑病、血象改变等紧密相关,可能为 H7N9 流感病毒感染患者提供了新的治疗方向。

本研究利用蛋白质组学相关技术对 H7N9 以及 H1N1pdm09 流感病毒感染 A549 细胞的差异蛋白谱进行了初步研究,发现了与 H7N9 流感病毒感染细胞后致病性相关的蛋白。为了进一步验证这些差异蛋白,本课题组将开展动物实验,进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Yamayoshi S, Fukuyama S, Yamada S, Zhao D, Murakami S, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Neumann

G, Kawaoka Y. Amino acids substitutions in the PB2 protein of H7N9 influenza A viruses are important for virulence in mammalian hosts [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8039.

- [2] Hai R, Schmolke M, Leyva-Grado V H, Thangavel R R, Margine I, Jaffe E L, Krammer F, Solórzano A, García-Sastre A, Palese P, Bouvier NM. Influenza A (H7N9) virus gains neuraminidase inhibitor resistance without loss of in vivo virulence or transmissibility[J]. *Nat Comms*, 2013,4:2854.
- [3] Van Ranst M, Lemey P. Genesis of avian-origin H7N9 influenza A viruses[J]. *Lancet*, 2013, 381(9881):1883-1885.
- [4] Zeng H, Belser J A, Goldsmith C S, Gustin K M, Veguilla V, Katz J M, Tumpey T M. A(H7N9) virus results in early induction of proinflammatory cytokine responses in both human lung epithelial and endothelial cells and shows increased human adaptation compared with avian H5N1 virus[J]. *J Virol*, 2015,89(8):4655-4667.
- [5] Fang S, Zhang K, Wang T, Wang X, Lu X, Peng B, Wu W, Zhang R, Chen S, Zhang R, Xue H, Yu M, Cheng J. Primary study on the lesions and specific proteins in BEAS-2B cells induced with the 2009 A (H1N1) influenza virus[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98(23): 9691-9701.
- [6] Vester D, Rapp E, Gade D, Genzel Y, Reichl U. Quantitative analysis of cellular proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian cell lines[J]. *Proteomics*, 2009, 9(12): 3316-3327.
- [7] Cheung C Y, Chan E Y, Krasnoselsky A, Purdy D, Navare A T, Bryan J T, Leung C K, Hui K P, Peiris J S, Katze M G. H5N1 virus causes significant perturbations in host proteome very early in influenza virus-infected primary human monocytoid derived macrophages [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(5): 640-645.
- [8] Simon P F, McCorrister S, Hu P, Chong P, Silaghi A, Westmacott G, Coombs K M, Kobasa D. Highly pathogenic H5N1 and novel H7N9 influenza A viruses induce more profound proteomic host responses than seasonal and pandemic H1N1 strains[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(11):4511-4523.
- [9] Lee S K, Kim Y, Kim S S, Lee J H, Cho K, Lee S S, Lee Z W, Kwon K H, Kim Y H, Suh-Kim H, Yoo J S, Park Y M. Differential expression of cell surface proteins in human bone marrow mesenchymal stem cells cultured with or without basic fibroblast growth factor containing medium[J]. *Proteomics*, 2009,9(18):4389-

- 4405.
- [10] Matsuo K, Xiang Y, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Noyori K, Nishioka K, Saito T, Kato T. Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006,8(6):R175.
- [11] Hug C, Jay P Y, Reddy I, McNally J G, Bridgman P C, Elson E L, Cooper J A. Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in dictyostelium [J]. *Cell*, 1995,81(4):591-600.
- [12] Delalle I. Mutations in the drosophila orthologs of the F-actin capping protein α - and β -subunits cause actin accumulation and subsequent retinal degeneration[J]. *Genetics*, 2005,171(4):1757-1765.
- [13] Funck D, Stadelhofer B, Koch W. Ornithine-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis[J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 40.
- [14] Doimo M, Desbats M A, Baldoin M C, Lenzini E, Basso G, Murphy E, Graziano C, Seri M, Burlina A, Sartori G, Trevisson E, Salviati L. Functional analysis of missense mutations of OAT, causing gyrate atrophy of choroid and retina[J]. *Hum Mutat*, 2013, 34 (1): 229-236.
- [15] da Rocha I M, Vitorello V A, Silva J S, Ferreira-Silva S L, Viégas R A, Silva E N, Silveira J A. Exogenous ornithine is an effective precursor and the δ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves[J]. *J Plant Physiol*, 2012,169(1):41-49.
- [16] Juncosa J I, Lee H, Silverman R B. Two continuous coupled assays for ornithine- δ -aminotransferase[J]. *Anal Biochem*, 2013,440 (2):145-149.
- [17] Seiler N. Ornithine aminotransferase, a potential target for the treatment of hyperammonemias[J]. *Curr Drug Targets*, 2000,1(2):119-153.
- [18] Wang G, Shang L, Burgett A W, Harran P G, Wang X. Diazonamide toxins reveal an unexpected function for ornithine delta-amino transferase in mitotic cell division [J]. *PNAS*, 2007,104(7):2068-2073.
- [19] Wagener R, Aukema S M, Schlesner M, Haake A, Burkhardt B, Claviez A, Drexler H G, Hummel M, Kreuz M, Loeffler M, Rosolowski M, López C, Möller P, Richter J, Rohde M, Betts M J, Russell R B, Bernhart S H, Hoffmann S, Rosenstiel P, Schilhabel M, Szczepanowski M, Trümper L, Klapper W, Siebert R. The PCBP1 gene encoding Poly(rC) binding protein 1 is recurrently mutated in burkitt lymphoma [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2015, 54 (9): 555-564.
- [20] Shi Z, Zhang T, Long W, Wang X, Zhang X, Ling X, Ding H. Down-regulation of Poly(rC)-binding protein 1 correlates with the malignant transformation of hydatidiform moles[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012,22(7): 1125-1129.
- [21] Shi Z, Zhao C, Yang Y, Teng H, Guo Y, Ma M, Guo X, Zhou Z, Huo R, Zhou Q. Maternal PCBP1 determines the normal timing of pronucleus formation in mouse eggs[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015,72(18):3575-3586.
- [22] Huo L, Zhong N. Identification of transcripts and translantants targeted by overexpressed PCBP1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008,1784(11):1524-1533.
- [23] Lee S B, Park J H, Kaewel J, Sramkova M, Weigert R, Park M H. The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2009,383(4):497-502.
- [24] Cracchiolo B M, Heller D S, Clement P M, Wolff E C, Park M H, Hanauske-Abel H M. Eukaryotic initiation factor 5A-1 (eIF5A-1) as a diagnostic marker for aberrant proliferation in intraepithelial neoplasia of the vulva[J]. *Gynecol Oncol*, 2004,94(1):217-222.
- [25] Maier B, Ogihara T, Trace A P, Tersey S A, Robbins R D, Chakrabarti S K, Nunemaker C S, Stull N D, Taylor C A, Thompson J E, Dondero R S, Lewis E C, Dinarello C A, Nadler J L, Mirmira R G. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice[J]. *J Clin Invest*, 2010,120(6):2156-2170.
- [26] Hwang H H, Moon P G, Lee J E, Kim J G, Lee W, Ryu S H, Baek M C. Identification of the target proteins of rosiglitazone in 3T3-L1 adipocytes through proteomic analysis of cytosolic and secreted proteins [J]. *Mol Cells*, 2011,31(3):239-246.
- [27] Lu Z, Song Q, Yang J, Zhao X, Zhang X, Yang P, Kang J. Comparative proteomic analysis of anti-cancer mechanism by periplocin treatment in lung cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014,33(3):859-868.
- [28] Zanelli C F, Valentini S R. Is there a role for eIF5A in translation ? [J]. *Amino Acids*, 2007,33(2):351-358.
- [29] Tjoelker L W, Stafforini D M. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1488(1-2):102-123.
- [30] Riera J, Rodríguez R, Carcedo M T, Campa V M, Ramos S, Lazo PS. Isolation and characterization of nudC from mouse macrophages, a gene implicated in

the inflammatory response through the regulation of PAF-AH(I) activity[J]. *Febs Lett*, 2007, 581(16): 3057-3062.

[31] Livnat I. PAF-AH catalytic subunits modulate the Wnt pathway in developing GABAergic neurons[J]. *Front Cell Neurosci*, 2010, 4:1-12.

[32] Manya H, Aoki J, Kato H, Ishii J, Hino S, Arai H, Inoue K. Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(45): 31827-31832.

Proteome Profiling of A549 Cells Infected with Influenza H7N9 Virus

DING Xiaoman^{1,5}, YU Ruoxi², WANG Xin³, WU Weihua³, PENG Bo³,
LIU Hui³, GENG Yijie³, DONG Fangyuan³, LU Jiahai¹, YU Muhua^{4*}, FANG Shisong^{3*}

(1. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China; 4. Nanshan Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518054, China; 5. Jinan Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250021, China)

Abstract: To explore the mechanisms of influenza H7N9 virus pathogenesis, influenza H7N9 virus and H1N1 influenza A virus (H1N1pdm09)-infected A549 cellular models were established, and differential protein expression in A549 cells infected with the two strains were investigated. A549 cells were infected with H7N9 and H1N1pdm09 influenza virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001. The temporal response of A549 cells infected with the two strains was evaluated using the proteomics approaches (2D-DIGE combined with MALDI-TOF-MS/MS) at 24, 48 and 72 hours post infection (hpi). There were 11, 12 and 33 proteins with significantly different expression at 24, 48 and 72 hpi, respectively. Compared with H1N1pdm09 infection, functional analysis revealed that the down-regulation of proteins in H7N9 infection including F-actin-capping protein subunit alpha-1 (CapZ- α 1), ornithine aminotransferase (OAT), poly (rC)-binding protein 1 (PCBP1) and eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF5A) produced cytopathic effects. The down-regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase Ib subunit beta (PAFAH1B2) in H7N9-infection may be related to the clinical symptoms of patients infected by the influenza H7N9 virus.

Key words: influenza H7N9 virus; A549 cells; fluorescent two dimensional difference gel electrophoresis; proteomics

* Corresponding author: YU Muhua, E-mail: 1175461964@qq.com; FANG Shisong, E-mail: szcdcscf@aliyun.com