

诱导表达人IFITM3的293细胞株的建立及其对H1N1型流感病毒侵染作用

侯志飞 蒋栋 赵学森 曾辉

【摘要】目的 建立诱导表达IFITM3蛋白的293细胞株,为进一步研究人IFITM3对H1N1型流感病毒侵染的作用及其分子机制提供细胞模型。**方法** 构建IFITM3/pcDNA5/FRT/TO expression vector质粒及诱导表达细胞株,建立H1N1型流感病毒假病毒评价系统,利用蛋白印迹(Western blot)和荧光素酶报告基因对筛选的诱导表达细胞株功能进行检测。**结果** 建立的293诱导表达细胞株能够很好表达目的蛋白,且诱导表达出来的IFITM3蛋白使H1N1型流感病毒假病毒感染率下降97% ($t = 38.08$, $P < 0.001$),使水泡性口炎假病毒(VSVpp)感染率下降68% ($t = 54.56$, $P < 0.001$),而阴性对照组小鼠白血病假病毒(MLVpp)感染率($t = 1.282$, $P = 0.2208$)和拉沙假病毒(LASVpp)感染率($t = 0.4814$, $P = 0.6377$)无显著影响。**结论** IFITM3蛋白诱导表达细胞株可以显著抑制H1N1型流感病毒感染,为进一步深入研究IFITM3抑制流感病毒感染的作用机制和分子机理提供了细胞模型和实验基础。

【关键词】 干扰素诱导跨膜蛋白3; H1N1型流感病毒; 假病毒; 诱导表达; 防御分子

Establishment of 293 cell line inducibly expressing human IFITM3 and its inhibition to viral entry of H1N1 influenza virus Hou Zhifei, Jiang Dong, Zhao Xuesen, Zeng Hui. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Zeng Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To establish FLP-IN T Rex 293 cell line inducibly expressing human interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) and provide a cell model to explore the mechanism of IFITM3 inhibiting viral entry of influenza virus. **Methods** Full-length IFITM3 cDNA was cloned into pcDNA5/FRT/TO expression vector. Then 293 cell line inducibly expressing human IFITM3 was established by co-transfection of IFITM3/pcDNA5/FRT/TO expression vector and pOG44 plasmid and following antibiotic screening. The inducible expression of IFITM3 in 293 cells was tested by Western blot and immunofluorescence. The inhibitory effect of viral entry by IFITM3 was examined with H1N1 influenza virus pseudotyped virus (H1N1pp). **Results** The established FLP-IN T Rex 293 cell line of IFITM3 was able to express the target protein well, and the induced IFITM3 protein decreased the infection rate of H1N1 influenza pseudovirus by 97% ($t = 38.08$, $P < 0.001$), and the infection rate of vesicular stomatitis pseudovirus (VSVpp) decreased by 68% ($t = 54.56$, $P < 0.001$). Negative control group mice leukemia pseudovirus (MLVpp) infection rate ($t = 1.282$, $P = 0.2208$) and Lashapseudovirus (LASVpp) infection rate ($t = 0.4814$, $P = 0.6377$) had no significant influence. **Conclusions** FLP-IN T Rex 293 cell line inducibly expressing human IFITM3 is a pivotal restriction factor inhibiting H1N1 influenza virus entry. This IFITM3-inducible expression cell line can provide a useful platform to study IFITM3 antiviral mechanism.

【Key words】 Interferon-induced transmembrane protein 3; H1N1 influenza virus; Pseudoviruses; Inducible expression; Restriction factor

流行性感冒病毒(influenza virus), 是正黏病毒科(Orthomyxoviridae)的代表株, 简称流感病毒, 包括人流感病毒和动物流感病毒(包括

猪流感病毒、马流感病毒以及禽流感病毒), 人流感病毒是流行性感冒的主要病原体, 可以分为甲、乙、丙3型^[1-2]。然而甲型流感病毒的抗原性极易发生突变, 因此由其所造成的人群病死率高, 疾病传播快, 多次引起世界性大流行, 对全社会和医学界带来严重挑战。由于此类传染病目前仍缺乏有效药物, 其转归及预后很大程度依赖机体

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.02.020

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81571976)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所

通信作者: 曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

自身免疫系统对病原体的清除。干扰素诱导跨膜蛋白3(interferon-inducible transmembrane protein 3, IFITM3)是机体内重要的抗病毒分子,通过抑制病毒与宿主细胞间膜融合限制多种病毒侵入,包括埃博拉病毒^[3-4],流感病毒^[5-10], SARS冠状病毒^[4, 11]等,而上述研究取得的成果多数基于IFITM3诱导表达细胞模型的建立,故该细胞模型对于IFITM研究有非常重要的实用性。本研究首先利用源于HEK293细胞的FLP-IN细胞株,建立IFITM3诱导表达细胞株,另外建立H1N1流感病毒的假病毒体外感染模型;在两者基础上,检测IFITM3诱导表达蛋白对H1N1型流感病毒的假病毒感染能力的影响,现报道如下。

材料与方法

一、主要试剂

DMEM高糖培养基购自美国Invitrogen公司(货号:11995-073);胎牛血清购自美国Corning公司(货号:R35-076-CF);Trypsin-EDTA(0.05%)与抗菌药物Penicillin-Streptomycin购自美国Invitrogen公司(货号分别为25300054和15140122);离心柱法小量提取质粒试剂盒购自SIGMA(货号:PLN350)、大量提取质粒试剂盒QIAGEN Plasmid Maxi Kit及QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit购自QIAGEN公司(货号分别为12162和12943);培养皿购自Corning公司;细胞转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司(货号:11668019);pNL4-3 Luc R⁻E⁻质粒(首都医科大学附属北京佑安医院陈德喜教授惠赠);pOG44质粒,血球凝集素(Hemagglutinin HA)质粒,神经氨酸酶(Neuraminidase NA)质粒(美国德雷塞尔大学郭巨涛教授惠赠);VSV-G包膜蛋白质粒,LASV包膜蛋白质粒,MLV包膜蛋白质粒(本实验室提供);Flp-In™ TREx™-293 Cell Line购自Invitrogen公司(货号:R780-07)。诱导表达细胞系建立所需筛选试剂Zeocin(货号:R25001),Blasticidin(货号:R21001),Hygromycin B(货号:10687010)均购自美国Invitrogen公司。唾液酸酶(sialidase)购自Sigma公司(货号:N2876)。荧光素酶Firefly luciferase报告基因检测试剂盒Promega公司(货号:E1501)。

二、实验方法

1. 构建IFITM3诱导表达质粒:①从UniProtKB网站获取人IFITM3蛋白的cDNA,并由其合成相

应的DNA序列,然后PCR扩增后利用BamH I和Not I酶切后纯化回收。从Invitrogen公司购买的pcDNA™5/FRT/TO expression vector质粒同时用BamH I和Not I双酶切,并纯化回收。②用T4 DNA连接酶在37℃下连接含有BamH I和Not I酶切位点的IFITM3核苷酸和pcDNA™5/FRT/TO expression vector质粒3 h,然后用Top10及DH5α感受态大肠埃希菌分别进行转化。③获取IFITM3/pcDNA™5/FRT/TO的诱导表达单克隆质粒后大量扩增,得到诱导表达质粒后分别电泳鉴定及测序鉴定,并测浓度和纯度。

2. 建立IFITM3诱导表达细胞株:用IFITM3/pcDNA™5/FRT/TO expression vector质粒和pOG44质粒共转染Flp-In™T-Rex™细胞系:①细胞分盘:用0.05%胰酶消化Flp-In™T-Rex™细胞,计数 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 细胞/cm²的密度平铺于35 mm(六孔板)培养皿,每孔加2 ml含10%胎牛血清完全培养基,根据细胞贴壁情况于含5% CO₂的37℃孵箱中培养8~24 h,使细胞贴壁后所占总面积达到培养皿面积的70%~90%后转染。②制备DNA混合物:分别在AB两个1.5 ml EP管中加入Opti-MEM溶液250 μl,在A管中加入IFITM3/pcDNA™5/FRT/TO expression vector质粒和pOG44质粒各2 μg缓慢吹打混匀,在B管中加入Lipofectamine™ 2000转染试剂10 μl缓慢吹打混匀并静置5 min后把A管中的液体转移至B管中并缓慢吹打混匀之后静置20 min。③加样并再次细胞分盘:逐滴加入六孔板中并做好标记,此时最终六孔板的体积为2.5 ml,4~6 h后更换预热的10%胎牛血清完全培养基,每孔2 ml。次日把6孔板中的细胞分盘到100 mm的大皿中,24 h后弃去DMEM高糖培养基,并加入终浓度为250 μg/ml Hygromycin B,10 μg/ml Blasticidin的DMEM高糖培养基。④细胞筛选及建立:每隔3 d更换一次250 μg/ml Hygromycin B,5 μg/ml Blasticidin的DMEM高糖培养基,约1周细胞会迅速死亡,但在3~4周时IFITM3/pcDNA™5/FRT/TO诱导表达细胞系基本建成。

3. 建立H1N1型流感假病毒评价系统及阴性对照系统(假病毒的包装):①将Lenti-X 293T细胞用胰酶消化后,取 6×10^6 细胞平铺于100 mm细胞培养皿中并于10 ml DMEM高糖培养基中培养,待接种18 h后的细胞所占培养皿总面积达80%时进行转染。②每皿细胞利用氯化钙法转染20 μg pNL4-3 Luc R⁻E⁻质粒和10 μg血球凝集素(hemagglutinin, HA)表达质粒,10 μg神经氨酸酶(neuraminidase, NA)表达质粒,转染24 h

后更换新鲜DMEM高糖培养基。③每皿细胞利用氯化钙法分别转染20 μg pNL4-3 Luc R⁻E⁻质粒和10 μg VSV-G或LASV或MLV包膜蛋白(envelope protein)表达质粒。④转染后48 h收取含假病毒的培养基,病毒经0.45 μm PES滤器滤过后分装保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

4. 蛋白印迹(Western blot)检测蛋白表达:①消化并接种Flp-InTMT-RexTM IFITM3细胞于六孔板细胞培养皿,置于5% CO₂、饱和湿度的37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养过夜。②待细胞密度达到70%~90%时其中1个孔加入四环素(tetracycline)使DMEM高糖培养基终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,另外1个孔不做任何处理。③培养24 h后吸去培养基,用PBS洗涤细胞3次,尽量将液体吸干净,每个培养孔中加入500 μl 预冷的细胞裂解液(150 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris、1 mmol/L EDTA、1.0% Triton X-100、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶抑制剂,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 磷酸酶抑制剂)于4 $^{\circ}\text{C}$ 或冰上放置30 min,使细胞充分裂解后20 000转4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min(离心半径 $r=7\text{ cm}$),取上清并加入SDS变性上样缓冲液,99 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min。④蛋白印迹凝胶,用抗IFITM3抗体检测蛋白是否表达。

5. 免疫荧光检测蛋白定位:①Flp-InTMT-RexTM IFITM3细胞在24孔板中的爬片上生长密度到95%~100%时从孵箱中取出,用预温的1 \times PBS洗3次,5 min/次并弃去废液。②2%的甲醛室温固定30 min,用1 \times PBS洗3次,5 min/次并弃去废液。③0.2% Triton X-100透化30 min,用预温的1 \times PBS洗3次,5 min/次并弃去废液。④5% BSA室温封闭30 min,一抗(用5% BSA按1:500稀释)孵育,4度匀速摇晃过夜,用预温的1 \times PBS洗3次,10 min/次并弃去废液。⑤二抗和DAPI(5% BSA按1:1 000稀释)孵育90 min,闭光匀速摇晃,用1 \times PBS洗3次,10 min/次并弃去废液。⑥90%甘油封片后在免疫荧光显微镜下观察结果。

6. 荧光素酶(Luciferase)报告基因检测蛋白表达:①消化并接种Flp-InTMT-RexTM IFITM3细胞于96孔细胞培养皿,置于5% CO₂、饱和湿度的37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养过夜。②待细胞密度达到70%~90%时加入四环素(tetracycline)使DMEM高糖培养基终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,诱导表达24 h后按总体积10%加入制备好的假病毒,感染48 h后弃去培养基。③每个培养孔中加入30 μl 的荧光素酶试剂盒中的细胞裂解液,然后在摇床上匀速(300 r/min)晃动15 min后,每个培养孔各加入50 μl 的底物发光液,迅速混

匀后在荧光素发光仪上读数。

三、统计学处理

实验数据使用软件GraphPad Prism 5进行统计分析及绘图,各实验组数据呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、HIV/Luc(NL4-3 R⁻E⁻Luc)报告基因载体在Top10感受体细胞中有效扩增

HIV/Luc(NL4-3 R⁻E⁻Luc)报告基因载体是基于HIV NL4-3毒株基因组改造的含有荧光素酶(firefly luciferase)报告基因载体,其env和vpr蛋白编码区分别经限制性内切酶切割后,经缺口不平后引入移码突变,使此载体不能表达包膜蛋白和vpr蛋白。另外,在nef编码区插入荧光素酶基因(图1A)。故HIV/Luc载体为复制缺陷病毒,与编码外源包膜蛋白质粒共转染细胞时,包装出的假病毒仅能完成第一轮感染,而不能继续复制。本研究利用DH5 α 和TOP10两种感受态细胞制备此载体,HIV/Luc载体在DH5 α 和TOP10扩增,随机分别从DH5 α 和TOP10选取5个克隆,分别经Not I/Xho I双酶切表明,TOP10扩增获得的DNA含有1.7 kb的荧光素酶基因,而由DH5 α 扩增获得的DNA不含有此基因(图1B)。另外,将HIV/Luc载体转染293T细胞,24 h后检测荧光素酶活性,由TOP10扩增获得的DNA成功表达荧光素酶,而由DH5 α 扩增获得的DNA不表达荧光素酶(图1C)。以上结果表明,HIV/Luc可以在TOP10菌株有效扩增,而DH5 α 菌株对HIV/Luc载体的扩增可能导致慢病毒载体基因片段的丢失。

二、IFITM3诱导表达细胞系建立成功并能持续诱导表达目的蛋白。

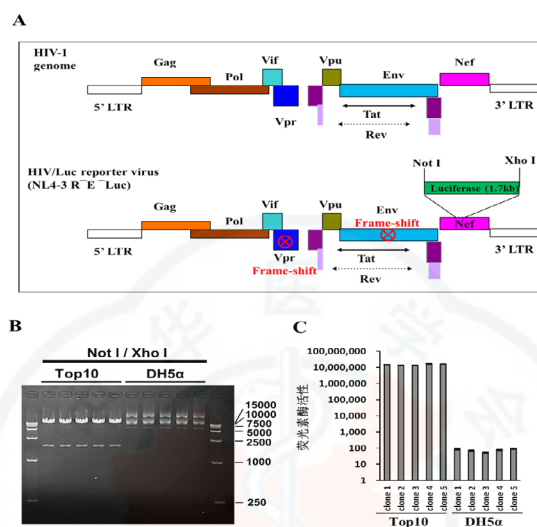
按照Invitrogen提供的说明书,本研究将IFITM3/pcDNATM5/FRT/TO expression vector质粒和pOG44质粒共转染Flp-InTMT-RexTM细胞系,经Hygromycin B筛选两周后,建立IFITM3诱导表达细胞株(细胞系构建流程见图2A)。此细胞经四环素刺激1 d后,收取细胞总蛋白经Western blot检测,用FLAG单抗检测到带有FLAG标签的IFITM3显著表达,而未经四环素处理的细胞未能检测到IFITM3表达(图2B)。利用免疫荧光反应,亦可检测出四环素诱导293细胞表达带有FLAG标签的

IFITM3蛋白(图2C)。

三、IFITM3诱导表达能够抑制H1N1型流感假病毒的感染

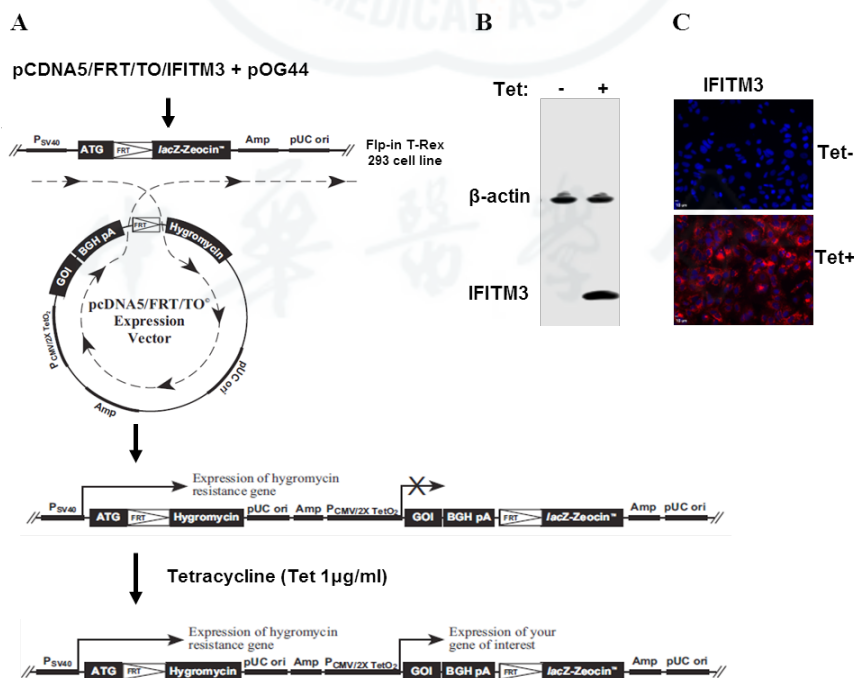
利用HIV/Luc 报告基因病毒载体和H1N1流感病毒(A/WSN/33)的两种刺突蛋白质质(血凝素及神经氨酸酶)共转染假病毒包装细胞Lenti-X

293细胞制备流感病毒(A/WSN/33)的假病毒(H1N1pp)。鉴于流感病毒利用唾液酸作为病毒侵染的受体, Huh7细胞经唾液酸酶处理后感染H1N1pp, 荧光素酶活性检测结果表明, 经唾液酸酶处理后的Huh7细胞对H1N1pp的易感性显著降低($t = 98.92$ 、 $P < 0.001$) (图3A)。以上结果表



注: A: HIV-1基因组结构和HIV/Luc报告基因结构; B: HIV/Luc克隆质粒酶切和非酶切鉴定结果; C: HIV/Luc克隆转染后荧光素酶活性测定结果

图1 HIV/Luc报告基因模式图及荧光素酶活性



注: A: IFITM3诱导表达细胞株构建流程; Tetracycline: 四环素; B: IFITM3四环素诱导表达蛋白印迹结果; C: IFITM3四环素诱导表达免疫荧光结果

图2 IFITM3诱导表达细胞株构建流程图及蛋白表达

明, H1N1pp能够反映流感病毒侵染特性。

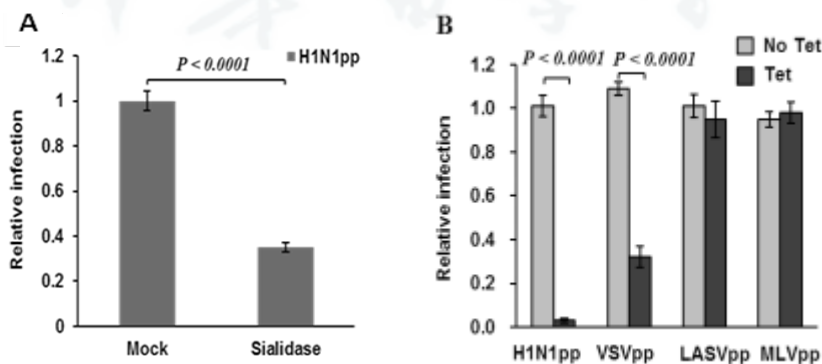
本研究利用构建的IFITM3诱导表达的293细胞评价IFITM3对流感病毒侵染的影响。此细胞经四环素处理24 h后感染H1N1pp, 感染后48 h检测荧光素酶活性。结果表明H1N1pp对四环素诱导组细胞的感染降低了97% ($t = 38.08$ 、 $P < 0.001$), 而VSVpp对四环素诱导组细胞的感染降低了68% ($t = 54.56$ 、 $P < 0.001$)。四环素处理对小鼠白血病毒病的假病毒(MLVpp)和拉沙病毒的假病毒(LASVpp)感染无显著影响($t = 1.282$ 、 $P = 0.2208$, $t = 0.4814$ 、 $P = 0.6377$) (图3B)。以上结果提示IFITM3的诱导表达可以显著抑制流感病毒(A/WSN/33)和VSV病毒对细胞的侵染。

讨 论

在过去的近十年中, IFITM蛋白被广泛认为是细胞内源性限制病毒感染的重要组成部分, 其不仅能够限制包膜蛋白病毒, 例如黄病毒科的登革热病毒和西尼罗病毒; 丝状病毒科的玛堡病毒和埃博拉病毒; 冠状病毒科的SARS病毒和229E病毒等, 还可以限制非包膜蛋白病毒的感染^[12-17]。其中IFITM3蛋白在控制人严重性流感中发挥着极其重要的作用^[12-18]。IFITM3蛋白主要定位在内体或溶酶体膜上, 但在细胞质膜表面也有表达, 且主要以II型跨膜结构蛋白存在^[18]。以甲型流感病毒为模型研究IFITM蛋白抑制病毒感染的大量研究证实, IFITM蛋白主要作用于病毒进入(entry)阶段, 可能通过抑制病毒与细胞膜或病毒与内涵体(endosome)膜融合进而抑制病毒进入^[19-23], 但具

体机制目前仍不太清楚。最近几年, 针对IFITM3蛋白抑制病毒进入的作用机制, 提出了多种设想。这些假设大致分为4种假说: 第一种假说认为IFITM3蛋白的表达使得细胞质膜或内体及溶酶体膜的流动性降低, 从而使病毒的感染率降低, 即所谓的“膜钢化假说”^[24]。第二种假说认为IFITM3蛋白的表达使得内涵体或溶酶体的胆固醇大量聚集, 抑制影响了病毒的感染效率^[25]。第三种假说认为IFITM蛋白在形成半融合之前就已经抑制病毒膜融合, 并且表明其可以通过降低膜流动性并在细胞膜的外叶中形成阳性自发曲率来实现这一点^[24-26]。第四种则是相关受体下调假说^[12]。以上的假说都不能完全解释病毒进入细胞的机制, 虽然在IFITM作用机制方面取得了很多进展, 但具体的作用机制有待进一步深入研究。

本实验构建了IFITM3蛋白的诱导表达细胞株, 建立了H1N1型流感假病毒评价系统, 并利用蛋白印迹, 免疫荧光, 荧光素酶等检测系统, 证明了四环素能够诱导IFITM3蛋白表达, 且诱导出的IFITM3蛋白能够很好的抑制H1N1型流感病毒感染, 其抑制率达到97%, 并且对阴性对照组LASV, MLV无抑制作用。IFITM3对不同病毒的抑制率有明显差别, 此现象与不同病毒侵入细胞的路径及膜融合位点的差异密切相关。本研究结果表明IFITM3不能抑制MLV的感染。由于MLV主要经细胞膜侵入, 但IFITM3在细胞膜上几乎无分布, 因而不影响MLV的侵入。H1N1主要在晚期内体侵入细胞, VSV却在早期内体侵入细胞, 虽然IFITM3在早期晚期内体都有表达, 但主要在晚期内体中富集, 因此IFITM3抑制H1N1更为明显。虽然LASV在溶酶体发生侵



注: A: Huh7细胞经唾液酸酶处理后, H1N1假病毒感染结果; H1N1pp: H1N1甲型流感病毒假病毒颗粒; B: IFITM3抑制H1N1、VSV、LASV、MLV假病毒感染结果; VSVpp: 水泡性口炎病毒假病毒颗粒; LASVpp: 拉沙病毒假病毒颗粒; MLVpp: 小鼠白血病毒假病毒颗粒; Relative infection: 相对感染率

图3 IFITM3诱导表达蛋白抑制H1N1型流感假病毒感染

入, IFITM3也在溶酶体表达, 但IFITM3并不能抑制LASV的感染。可能是由于LASV从细胞膜转运到溶酶体的过程与H1N1的转运有所差异, 至于精确机制仍需进一步研究。

本研究利用假病毒颗粒和建立的诱导细胞模型发现, IFITM3对IAV的侵入有明显的抑制作用。并且假病毒颗粒多用于包膜病毒侵入阶段的机制研究。本实验利用含报告基因的慢病毒载体成功地包装出流感病毒等多种假病毒颗粒, 为本研究提供了有效试验体系。此慢病毒载体的复制关键基因Env及Vpr已被突变, 因此包装出复制缺陷型假病毒颗粒。而Nef区插入的荧光素酶基因(Luc)的表达可反映假病毒的感染能力。本研究发现HIV/Luc质粒在DH5 α 和TOP10大肠埃希菌中分别扩增后, 由DH5 α 扩增获得的DNA不含1.7 kb的荧光素酶基因, 并且转染后荧光素酶活性接近空白对照, 因此DH5 α 菌株对HIV/Luc质粒的扩增可能导致慢病毒载体基因片段的丢失。用此菌株制备的质粒无法用于假病毒颗粒的包装制备。而TOP10制备的质粒完整, 可用于假病毒颗粒的包装制备。

目前多数研究取得的成果基于诱导表达细胞株的建立, 并且诱导表达细胞株的建立有着非常重要的实用性。比如某些细胞株如U87、MRC-5和A549等在瞬时转染时, 因转染试剂不同, 转染者手法不同, 细胞密度及生长状态的不同等影响细胞的转染效率, 可能会影响实验的真实性, 稳定性和可重复性。因此建立的IFITM3诱导表达细胞株就显得尤为重要, 为进一步深入研究IFITM3蛋白抑制流感病毒感染的作用机制和分子机理提供了细胞模型和实验基础。

参 考 文 献

- [1] Paules C and Subbarao K. Influenza[J]. Lancet, 2017, 390(10095): 697-708
- [2] Moghadami M. A narrative review of influenza: A seasonal and pandemic disease[J]. Iran J Med Sci, 2017, 42(1): 2-13.
- [3] Bailey CC, Zhong G, Huang I, et al. Ifitm-family proteins: The cell's first line of antiviral defense[J]. Annu Rev Virol, 2014, 1(1): 261-283.
- [4] Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, et al. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(1): e1001258.
- [5] 于媛媛, 时国朝. 干扰素诱导跨膜蛋白抗甲型流感病毒感染的作用及其机制[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(4): 294-297.
- [6] 陈永坤, 朱闻斐, 舒跃龙. 干扰素诱导的跨膜蛋白抗病毒作用的研究进展[J]. 病毒学报, 2016, 32(2): 222-228.
- [7] Compton AA, Roy N, Porrot F, et al. Natural mutations in IFITM3 modulate post-translational regulation and toggle antiviral

specificity[J]. EMBO Rep, 2016, 17(11): 1657-1671.

- [8] Fu B, Wang L, Li S, et al. ZMPSTE24 defends against influenza and other pathogenic viruses[J]. J Exp Med, 2017, 214(4): 919.
- [9] Gerlach T, Hensen L, Matrosovich T, et al. Ph-optimum of hemagglutinin-mediated membrane fusion determines sensitivity of influenza A viruses to the interferon-induced antiviral state and IFITMs[J]. J Virol, 2017, 91(11): e00246-17.
- [10] Wang HF, Chen L, Luo J, et al. KLF5 is involved in regulation of IFITM1, 2, and 3 genes during H5N1 virus infection in A549 cells[J]. Cell Mol Biol, 2016, 62(13): 65-70.
- [11] Florian W, Michael W, Stefan P. IFITM proteins inhibit entry driven by the MERS-coronavirus spike protein: evidence for cholesterol-independent mechanisms[J]. Viruses, 2014, 6(9): 3683-3698.
- [12] Huang IC, Benita Y, John SP, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus[J]. Cell, 2009, 139(7): 1243-1254.
- [13] John SP, Chin CR, Perreira JM, et al. The cd225 domain of ifitm3 is required for both iftm protein association and inhibition of influenza A virus and dengue virus replication[J]. J Virol, 2013, 87(14): 7837-7852.
- [14] Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, et al. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(1): e1001258.
- [15] Jiang D, Weidner JM, Qing M, et al. Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections[J]. J Virol, 2010, 84(16): 8332.
- [16] Perreira JM, Chin CR, Feeley EM, et al. IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses[J]. J Mol Biol, 2013, 425(24): 4937-4955.
- [17] Wrensch F, Karsten CB, Gnirb K, et al. Interferon-induced transmembrane protein-mediated inhibition of host cell entry of ebolaviruses[J]. J Infect Dis, 2015, 212(Suppl 2): S210.
- [18] Bailey CC, Zhong G, Huang I, et al. IFITM-family proteins: The cell's first line of antiviral defense[J]. Annu Rev Virol, 2014, 1(1): 261-283.
- [19] Li K, Markosyan RM, Zheng YM, et al. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(1): e1003124.
- [20] Poddar S, Hyde J L, Gorman M J, et al. The interferon-stimulated gene ifitm3 restricts infection and pathogenesis of arthritogenic and encephalitic alphaviruses[J]. J Virol, 2016, 90(19): 8780.
- [21] Gorman M J, Poddar S, Farzan M, et al. The interferon-stimulated gene ifitm3 restricts west nile virus infection and pathogenesis[J]. J Virol, 2011, 90(18): 8212.
- [22] Wrensch F, Hoffmann M, Gärtner S, et al. Virion background and efficiency of virion incorporation determine susceptibility of simian immunodeficiency virus env-driven viral entry to inhibition by iftm proteins[J]. J Virol, 2016, 91(2): JVI.01488-16.
- [23] Diamond M S and Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(1): 46-57.
- [24] Li K, Markosyan R M, Zheng Y M, et al. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(1): e1003124.
- [25] Aminibavilolyae S, Choi Y J, Lee J H, et al. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry[J]. Cell Host Microbe, 2013, 13(4): 452-464.
- [26] Desai TM, Marin M, Chin CR, et al. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(4): e1004048.

(收稿日期: 2017-04-01)

(本文编辑: 孙荣华)

侯志飞, 蒋栋, 赵学森, 等. 诱导表达人IFITM3的293细胞株的建立及其对H1N1型流感病毒侵染作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(2): 198-203.