

•综述•

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2016.09.01

猪流行性腹泻病毒与宿主抗病毒天然免疫抑制

郭存财, 刘炎, 黄耀伟*

(浙江大学动物科学学院 杭州 310058)

摘要 猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)能引起猪腹泻等肠道疾病,属于 α 属冠状病毒,它的爆发给很多国家养猪业造成了严重的经济损失。2010年以来, PEDV感染在中国出现大规模爆发,一种突变型 PEDV也于2013年在美国出现并迅速传播。RNA病毒能够通过Toll样受体通路3(TLR3)和RIG-I样受体通路(RLR)诱导I型干扰素的产生。但以往的研究表明, PEDV感染能抑制I型干扰素的合成。近年来有关 PEDV调节宿主天然免疫应答的研究取得了很大进展。PEDV主要通过编码作为干扰素拮抗剂的病毒蛋白以及隐藏病毒自身病原相关分子模式(PAMP)等两种方式逃逸宿主天然免疫应答。目前已报道, PEDV非结构蛋白1可通过降解CBP阻碍干扰素调节因子3(IRF-3)组装成增强子复合物;木瓜蛋白酶样蛋白酶可通过其去泛素化酶活性阻断天然免疫信号通路传递;3C样蛋白酶可通过剪切NEMO发挥干扰素拮抗剂活性;核衣壳蛋白通过结合TBK1抑制I型干扰素产生。PEDV也可通过合成加帽酶隐藏其病原相关分子dsRNA来避免激活天然免疫通路。PEDV抗病毒天然免疫机制阐明为研究 PEDV感染免疫和致病机制提供了重要的理论依据,为研发抗 PEDV新型疫苗和药物提供了基础。

关键词 猪流行性腹泻病毒;天然免疫;干扰素;拮抗剂

中图分类号 Q5

Inhibitory Mechanism of Host Antiviral Innate Immunity by Porcine Epidemic Diarrhea Virus

GUO Cun-Cai, LIU Yan, HUANG Yao-Wei*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), a genus- α coronavirus, can cause pig intestinal diseases-porcine epidemic diarrhea (PED) and has resulted in enormous economic loss in many countries. The large outbreak of PEDV in China has been reported since 2010 and in the United States since 2013. RNA viruses induce the production of type-I interferon (IFN) through toll-like receptor 3 (TLR3)- and RIG-I-like receptors (RLR)-dependent pathways. Previous studies have shown that PEDV infection inhibits the synthesis of type-I IFN. Great progress regarding the roles of PEDV in host innate immunity has been made in recent years. PEDV escapes innate immune response by two main ways, one is that PEDV encodes interferon antagonists and the other is that PEDV hides its pathogen-associated molecular patterns-dsRNA. At present, PEDV-encoded non-structural protein 1 (nsp1), papain-like protease, 3C-like protease and nucleocapsid protein have been identified as interferon antagonists. The enhanceosome assembly of IRF3 and CREB-binding protein (CBP) can be interrupted by nsp1 via degrading CBP. Type-I interferon pathway can be negatively regulated by papain-like protease through acting as a viral deubiquitinase. Innate immune signaling pathway can be antagonized by 3C-like protease via cleaving

收稿日期: 2016-03-29; 修回日期: 2016-04-26; 接受日期: 2016-05-14

国家自然科学基金(No. 31572518)资助

* 联系人 Tel: 0571-88982051; E-mail: yhuang@zju.edu.cn

Received: March 29, 2016; Revised: April 26, 2016; Accepted: May 14, 2016

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 31572518)

* Corresponding author Tel: 0571-88982051; E-mail: yhuang@zju.edu.cn

NEMO, and the production of type-I interferon can be inhibited by nucleocapsid protein via binding threonine-protein kinase 1 (TBK1). PEDV-encoded replicase synthesizes a cap-structure to its dsRNA to avert activating innate immune pathways. These results provide a theoretical basis to investigate the infection, immunity and pathogenicity by PEDV, which may help to develop new vaccines and drugs against PEDV.

Key words porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); innate immunity; interferon; antagonist

冠状病毒 (Coronavirus, CoV) 是具有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 表面有棒状突起, 含有 RNA 病毒中最大的基因组 RNA。冠状病毒能够引起哺乳动物和鸟类的一系列疾病^[1]。根据基因组结构相似性及血清型不同, 将目前已知的冠状病毒, 包括最新发现的猪丁型冠状病毒 (porcine coronavirus, PDCoV, 分离于美国猪)^[2], 分为甲 (α)、乙 (β)、丙 (γ)、丁 (δ) 4 个属; 其中 α 、 β 属为哺乳类冠状病毒, 包括猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 等; γ 属包括禽传染性支气管炎病毒 (infectious bronchitis virus, IBV) 等; δ 属有猪丁型冠状病毒 (PDCoV)。

1 PEDV 概述及基因组结构

PEDV 属于 α 属冠状病毒, 能引起猪流行性腹泻等肠道疾病, 临床主要表现为严重腹泻和脱水。自 1978 年 PEDV 在欧洲首次爆发以来^[3], 其疫情从未间断。并在 2010 年后, 相继在我国、韩国、菲律宾以及美国出现大规模爆发^[4-6], 给这些国家造成严重的经济损失。因此, 对 PEDV 致病机制的研究以及新型疫苗的研制日渐迫切。本实验室从 2013 年开展 PEDV 的研究以来, 已经对 PEDV 毒株在中国和美国的进化和分型进行了阐述^[6], 随后在构建 PEDV 反向遗传学系统上取得初步的进展 (待发表)。现对 PEDV 逃逸天然免疫信号通路的机制进行综述, 总结现有研究结果, 为后续研究提供思路。

PEDV 基因组序列长度为 28 kb, 5' 端有帽结构, 3' 端有 Poly(A) 尾。其基因组由 5' 非编码区和 3' 非编码区以及 6 个开放阅读框 (open read frames, ORFs) 组成, 编码 17 个非结构蛋白 (nsp1 ~ nsp16、ORF3) 和 4 个结构蛋白 (S、E、M、N), 编码蛋白对应的基因组顺序为如图 1 所示^[7]。

PEDV 基因组编码的结构蛋白中, S 蛋白是识别宿主细胞上的入胞受体, 促进病毒与细胞膜融合的蛋白; M 蛋白可以和自身、S 蛋白和 N 蛋白相互作用完成病毒粒子的组装; E 蛋白为膜蛋白; N 蛋白是一种多功能蛋白, 与病毒复制有关, 并且在 N 端和 C 端都含有 RNA 结合域。最新研究^[8]表明, PEDV N 蛋白有拮抗 I 型干扰素产生的作用。非结构蛋白中, nsp1 具有干扰宿主基因合成的功能^[9]; nsp3 是病毒编码的最长的蛋白质, 含有 2 个木瓜酶样蛋白酶 PLP1 和 PLP2, PLP2 具有去泛素化酶活性^[10]; nsp5 编码 3C 样蛋白酶, 是病毒成熟必需的蛋白酶, 具有干扰素拮抗剂活性^[11]; nsp7 ~ nsp10 具有 RNA 结合活性, nsp12 具有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶活性, nsp13 ~ nsp16 具有 RNA 加工酶活性^[12]。

2 RNA 病毒激活的 I 型干扰素应答信号通路

天然免疫应答是宿主抵抗病原体入侵的第一道防线, 其中 IFN- α/β 是宿主抵抗病毒感染的关键因子。阐明宿主天然免疫应答激活产生 IFN- α/β 的过程对研究病毒如何拮抗宿主天然免疫应答有重要意义。

宿主的 I 型干扰素应答主要包括 3 个阶段: 病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 被模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别; I 型干扰素通过自分泌或旁分泌方式激活干扰素刺激基因 (interferon-stimulated gene, ISG) 表达; ISGs 表达一系列抗病毒蛋白, 使宿主进入抗病毒状态^[13]。在病毒复制过程产生的 dsRNA (double-stranded RNA) 是一种 PAMP, 可以激活 PRR 并诱导 IFN- α/β 的表达。宿主中主要负责识别病毒 dsRNA 的两种模式识别受体是 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 和 RIG-I 样受体 (retinoic acid-induced gene I-like receptor, RLR), 分别通过 TLR3/TRIF (Toll-interleukin (IL)-1-resistance (TIR) domain-containing adaptor inducing IFN- β) 和 RIG-I/MDA5 (melanoma differentiation gene 5/IPS-1 (IFN- β promoter stimulator 1) 通路介导 IFN- β 的表达 (Fig. 2)。

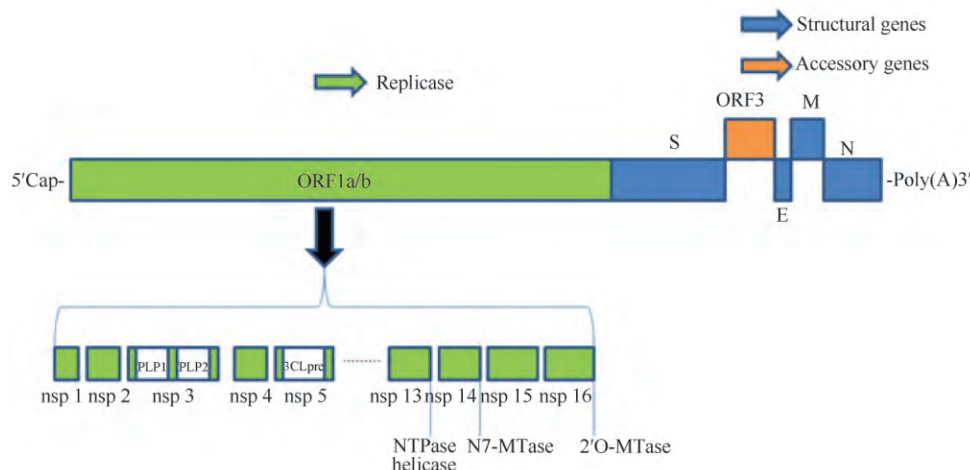


Fig. 1 PEDV genome organization Schematic representation of the PEDV genome and ORFs encoding for replicase (green boxes), structural proteins (blue boxes) and accessory proteins (orange boxes). The 5'-terminal of PEDV genome encodes replicase proteins (nsp1 to nsp16). Nonstructural protein nsp3 contains two papain-like proteases (PLP1 and PLP2). Nsp13, nsp14 and nsp16 encode NTPase helicase, N7-methyltransferase (N7-MTase) and 2'-O-methyltransferase (2'-O-MTase), respectively. The 5'-terminal of PEDV genome encodes four structural proteins: spike proteins (S), envelope proteins (E), membrane proteins (M), nucleocapsid proteins (N) and one accessory protein ORF3.

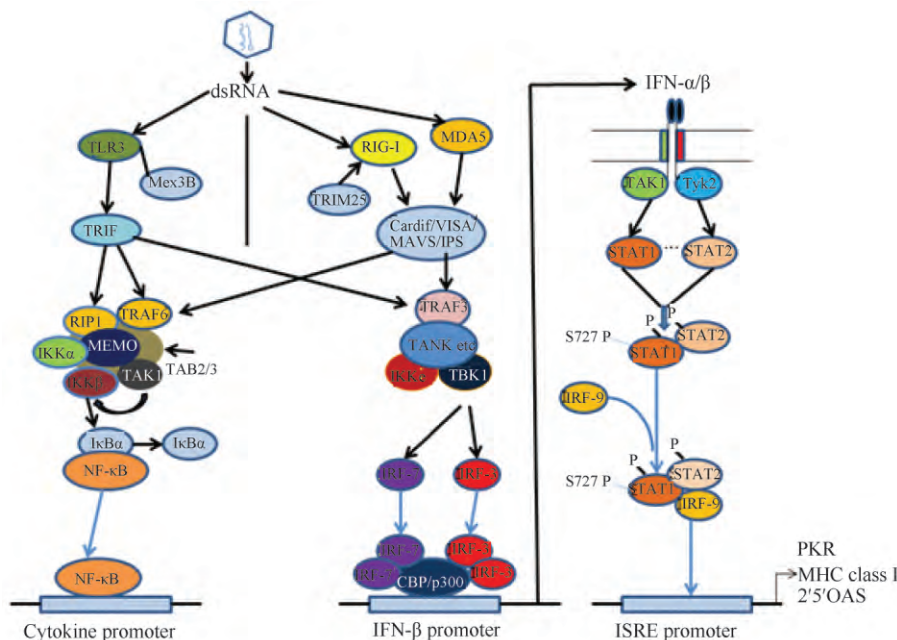


Fig. 2 TLR3/TRIF, RIG-I/MDA5/IPS-1 and Tyk2/JAK1 pathways DsRNA of the RNA viruses, as a PAMP, triggers the activation of TLR3/TRIF and RIG-I/MDA5/IPS-1 pathways and results in the production of type-I interferon and other cytokines. Extracellular IFN- α/β activates Tyk2/JAK1 pathway and induces the production of ISGs.

RIG-I/MDA5/IPS-1 是在细胞质中识别 dsRNA 后被激活的主要通路。RIG-I 和 MDA5 识别 dsRNA 后, 募集接头蛋白 IPS-1, IPS-1 能够直接与肿瘤坏死因子相关受体 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6) 和 TRAF3 相互作用, 然后激活下游信号分子 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 和 I κ B 激酶 ϵ (I κ B kinase, IKK ϵ) 抑制剂, 进

而磷酸化并激活 IFN 调节因子 3 (interferon-regulatory factor 3, IRF-3) 和 NF- κ B (nuclear transcription factor kappa B)。激活后的 IRF-3 和 NF- κ B 入核并结合到 IFN- β 的启动子上, 诱导 IFN- β 的转录^[14]。

TLR3/TRIF 通路主要通过细胞内识别 dsRNA 而被激活。dsRNA 被 TLR3 识别后将激活信

号向下游传递,TLR3 下游的接头分子为 TRIF(含有诱导 IFN- β 受体的 TIR 区),激活的 TRIF 募集 TRAF6 和 TRAF3,后续激活过程与 RIG-I/MDA5/MAVS 通路中 IPS-1 的下游通路相似。

泛素化和去泛素化过程是调节病毒诱导的 IFN 信号通路中的必要过程^[15]。例如,RIG-I 受体的激活过程需要泛素化后才能诱导胞内的信号传递过程^[16]。需指出的是,具有泛素化蛋白 E3 连接酶活性的 TRIM25(tripartite motif 25)对 RIG-I 的泛素化过程起关键的调节作用^[17]。最新研究发现,Mex3B 可作为 TLR3 的共受体,Mex3B 也可识别病毒侵入细胞后释放出的 dsRNA。Mex3B 和 TLR3 在核内体中结合,束缚 dsRNA,增加 TLR3 对 dsRNA 的结合活性。此外,Mex3B 还可促进 TLR3 的蛋白酶解过程,对 TLR3/TRIF 信号通路的激活比较关键^[18]。

被激活表达的 IFN- α/β 通过自分泌或旁分泌的方式作用于分泌细胞和周边细胞。分泌到细胞外的 IFN- α/β 被细胞膜上的干扰素受体 IFNAR 识别,进而通过激活 Tyk2(tyrosine kinase 2)/JAK1 通路(Fig. 2),最终诱导一系列干扰素刺激因子(ISGs)产生,这些 ISGs 能够直接或间接发挥抗病毒效应。

3 PEDV 通过编码干扰素拮抗蛋白拮抗 I 型干扰素产生

2015 年,Cao 等^[19]首次在猪小肠上皮细胞(intestinal epithelial cell,IEC)上证实,PEDV 通过抑制 RIG-I 激活的 IPS-1 表达,进而抑制 IEC 中产生 IFN- β 。目前为止,对 PEDV 编码蛋白拮抗天然免疫应答的研究已取得长足进展。

已有的报道显示,PEDV 主要通过两种方式拮抗宿主天然免疫应答。一种是编码具有拮抗干扰素应答功能的病毒蛋白来阻断通路中分子信号的传递

(Fig. 3),另一种是通过隐藏病毒的 PAMP 来避免对天然免疫信号通路的激活。

3.1 PEDV nsp1 通过依赖蛋白酶体的途径降解 CREB-binding protein(CBP)从而抑制 I 型干扰素产生

Zhang 等^[20]从 PEDV 各基因编码蛋白中筛选了具有抑制干扰素应答功能的病毒蛋白质。通过双荧光素酶报告试验,鉴定出非结构蛋白 nsp1、nsp3、nsp7、nsp14、nsp15 和 nsp16,以及结构蛋白 E、M 和 N 蛋白可抑制 Poly(I:C)对 IFN- β 和 IRF3 启动子控制的报告基因的激活作用,并且能够降低 Poly(I:C)激活表达的 IFN- β 的 mRNA 水平,表现出干扰素拮抗剂活性。在这些鉴定出的干扰素拮抗剂中,nsp1 表现出最强的抑制作用。报道显示, α CoV 和 β CoV 中已发现多种病毒的 nsp1 具有拮抗干扰素应答的特性(Table 1)。因此,多选用 nsp1 来研究 PEDV 对干扰素抑制的分子机制。PEDV 的 nsp1 可分布在细胞质和核中,不影响 p-IRF3 的表达量和入核,表明 nsp1 可能在细胞核内介导对 IFN 产生的抑制作用。IRF3 入核后,二聚化的 IRF3 结合 CBP 形成诱导转录的增强子复合体。然而,通过免疫共沉淀试验发现,nsp1 并不能与 IRF3 和 CBP 结合,但在 nsp1 表达的细胞中 CBP 的表达量降低 80%。另外,用对 CBP 降解有抑制作用的 MG132 处理细胞后,能中止 nsp1 对 CBP 的降解作用,表明 nsp1 可能通过蛋白酶体依赖的途径降解 CBP,进而阻碍增强子复合体的形成,抑制 I 型干扰素转录。抑制剂 MG132 的使用是一个亮点,可以从侧面证明 nsp1 诱导的蛋白酶降解活性。但是,利用反向遗传学工具构建含有失活 nsp1 的 PEDV 突变株去感染 HeLa 细胞,检测 PEDV 突变株能否缓解对 CBP 的降解作用,会更科学和有说服力。

Table 1 References showing inhibition of innate immune response by coronavirus nsp1

Nsp1	Number of amino acids	Mode of action	References
α -CoV			
PEDV	110	Degradation of CBP, inhibition of ISGs expression	[20]
TGEV	110	Inhibition of intracellular protein translation	[21]
β -CoV			
MHV	245	Suppression of interferon signaling	[22]
SARS-CoV	180	Promote degradation of host mRNA, inhibition of host protein synthesis	[23, 24] [25]
Bat-CoV: Rm1	180	Inhibition of type-I interferon and ISGs expression	[26]
Bat-CoV: 133	195		
Bat-CoV: HKU9-1	175		

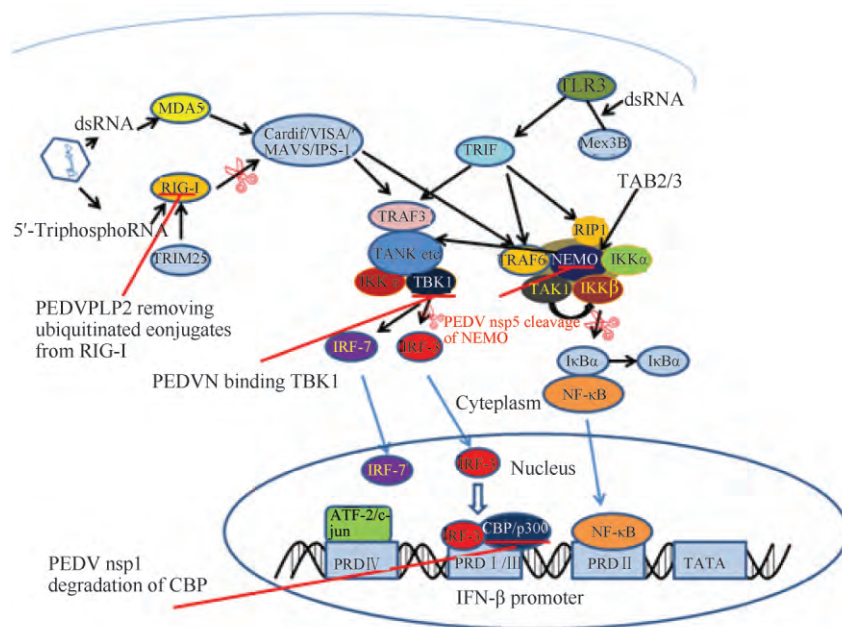


Fig. 3 Modes of action of PEDV interferon antagonists PEDV encoded-proteins disturb innate immunity by binding and degrading proteins of innate immune pathways

PEDV encoded-proteins disturb innate immunity by binding and degrading proteins of innate immune pathways

最新研究^[9]表明,SARS-CoV nsp1 通过与 PEDV nsp1 不同的作用机制抑制宿主 IFN- β 应答 (Fig. 4)。首先,它通过结合 40S 核糖体亚单位,阻止 40S 和 60S 核糖体亚单位结合成 80S 起始复合体,从而阻碍胞内 mRNA 翻译;另一方面,SARS-CoV nsp1 募集胞内的核酸内切酶并诱导其剪切宿主 mRNA 的 5'-UTR,被剪切后的 mRNA 中间体被胞内 Xrn1 介导的 mRNA 5'-3' 外切作用降解。通过整体抑制宿主的翻译功能,SARS-CoV nsp1 能够有效地抑制宿主的干扰素应答。多种冠状病毒的 nsp1 对宿主细胞内的天然免疫信号分子具有降解作用。因此,接

下来可探究其他冠状病毒 nsp1 是否具有干扰素拮抗剂活性,并且对比不同 nsp1 作用机制的区别。

3.2 PEDV 木瓜蛋白酶样蛋白酶 (PLP) 通过去泛素化酶活性影响宿主天然免疫应答

PEDV 编码的木瓜蛋白酶样蛋白酶 (papain-like protease, PLP) 具有阻碍宿主天然免疫应答的作用,可运用去泛素化酶 (deubiquitinase, DUB) 活性拮抗 I 型干扰素的产生。张百灵等^[10,27]通过双荧光素酶报告实验发现,PEDV 感染并不能诱导 Vero E6 细胞产生 IFN- β ,反而能抑制 Poly(I:C) 诱导的 IFN- β 产生。根据 PLP 的功能域可划分成 PLP1 和 PLP2 两

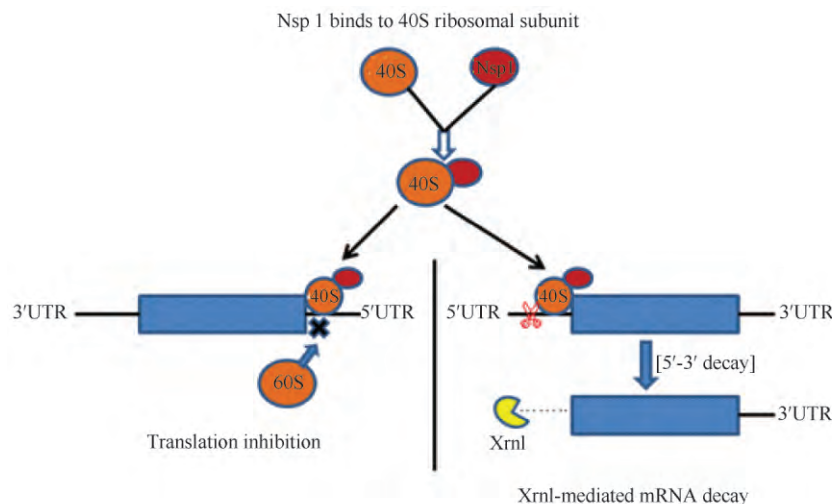


Fig. 4 Two strategies by which SARS-CoV nsp1 inhibits protein synthesis of the host SARS-CoV nsp1 binds the 40S subunit of ribosome and mediates endonucleolytic mRNA cleavage by Xrn1, resulting in termination of host protein synthesis

种蛋白(Fig. 1) ,只有 PLP2 具有拮抗宿主天然免疫应答的活性。根据 PLP2 的催化位点构造 3 个点突变质粒 PEDV PLP C1729A、H1888A、D1901A ,将突变质粒与泛素化酶 Ub-K48 和 Ub-K63 分别共转后 ,免疫沉淀结果显示 ,PLP2 能够降解 48 位和 63 位赖氨酸泛素化酶(Ub-K48 和 Ub-K63) ,突变质粒完全丧失干扰素拮抗剂作用 ,表明 PLP2 具有依赖酶催化活性位点的 DUB 活性。

在表达 PLP2 的细胞中 ,泛素化连接的 RIG-I 和 STING(stimulator of IFN genes) 大量的减少 ,表明 PLP2 的 DUB 活性可以去除与 RIG-I 和 STING 连接的泛素化酶 ,阻碍天然免疫信号的传递。既然 PLP2 对 RIG-I 和 STING 有 DUB 的活性 ,研究 PLP2 是否

对其他信号分子具有去泛素化作用能更全面反映 PLP2 的功能。探究 PEDV PLP2 是否通过与 RIG-I 和 STING 相互作用阻碍信号的传递过程也值得思考。

冠状病毒科其他成员的 PLP 也能通过与 PEDV PLP 相似的机制来干扰天然免疫应答。目前的研究结果表明 ,冠状病毒科的 SARS-CoV PLpro、HCoV-NL63 PLP2、TGEV PLP1、MERS-CoV PLpro、MHV PLP2 以及与 Coronaviridae 亲缘较近的动脉炎病毒科(Arteriviridae) 的 EAV(Equine arteritis virus) PLP2 和 PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) PLP2 都可以运用相关蛋白的 DUB 活性发挥拮抗干扰素产生的作用(Table 2) 。

Table 2 References showing inhibition of innate immune response by coronavirus PLpro

PLpro	Mode of action	References
α -CoV		
PEDV PLP2	Inhibition of type-I interferon , deubiquitination of RIG-I	[10]
TGEV PLP1	Deubiquitination of lys63- and lys48-linked polyubiquitin chains	[28]
HCoV-NL63 PLP2	Blockage of RIG-I-mediated IFN- β , activity of deubiquitination enzyme	[29]
β -CoV		
SARS-CoV PLpro	Blockage of IFN- β , deISGylation	[30] [31]
MERS-CoV PLpro	Inhibition of IFN- β , deISGylation and activity of deubiquitination enzyme	[32] [33] [34]
MHV PLP2	Inhibition of IFN- β , deubiquitination of TBK1 and IRF-3	[35]
Arteriviridae		
EAV PLP2	Deubiquitination of RIG-I and activity of deubiquitination enzyme	[36 , 37]
PRRSV PLP2	Inhibition of IFN- β , deISGylation and activity of deubiquitination enzyme	[38 , 39]

病毒 PLP 相似的功能和作用机制说明亲缘关系较近的病毒在进化过程中的保守性。胞内存在一种与泛素化功能相似的 ISG 化过程 ,这个过程通过蛋白质与 ISG15 的共轭进行。研究发现 ,ISG 化能够影响 JAK/STAT 通路的激活^[40]。SARS-CoV PLP、MERS-CoV PLP 和 PRRSV PLP2 可以通过去 ISG 化来拮抗干扰素应答。

在病毒感染的过程中 ,病毒的去泛素化蛋白能否任意对胞内的所有蛋白质去泛素化以及利用反向遗传学的工具构建突变去泛素化活性蛋白活性位点的变异病毒 ,探究其对胞内蛋白的去泛素化作用仍需进一步的探究。

3.3 PEDV 3C-like protease 通过剪切 NF- κ B essential modulator (NEMO) 抑制天然免疫应答

PEDV 的 nsp5 是一种 3C 样蛋白酶 ,具有特异的蛋白水解功能。Wang 等^[11]发现 ,nsp5 能够降低

仙台病毒(Sendai virus ,SEV) 以及 RIG-I、MDA5 和 IPS-1 诱导的 IFN- β 的产量 ,但不抑制 TBK1 诱导的 IFN- β 的产量。实验发现 ,nsp5 能剂量依赖性降低 NEMO ,并且能够检测到 nsp5 切割 NEMO 后产生的 24 kD 的片段。PEDV 3CLpro 能在 231 位谷氨酸残基处切割 NEMO。单独转染切割后的 NEMO 片段不能诱导通路的激活 ,表明 nsp5 的切割使 NEMO 丧失了通路中应有的作用。这种剪切作用大大削弱 NEMO 激活下游信号和作为 RIG-I/MDA5 通路受体分子的能力。

除了 PEDV 3CLpro 可切割 NEMO 拮抗天然免疫应答外 ,许多病毒的 3CLpro 通过剪切干扰素通路中的信号分子来拮抗天然免疫应答(Table 3) 。小 RNA 病毒科(Picornaviridae) 的甲肝病毒(Hepatitis A virus ,HAV) 、口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus ,FMDV) 以及动脉炎病毒科

(Arteriviridae) 的猪繁殖与呼吸道综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 的 3CLpro 都可通过剪切 NEMO 来抑制天然免疫应答^[41-43]; 小 RNA 病毒科的科萨奇 B3 病

毒 (Coxsackievirus B3, CVB3) 3CLpro 通过剪切 MAVS 和 TRIF, 肠道 71 型病毒 (Enterovirus 71, EV71) 3CLpro 通过剪切 TRIF 和 TAK1/TAB 复合体来抑制 I 型干扰素表达^[44-46]。

Table 3 References showing inhibition of innate immune response by Coronaviridae, Picornaviridae and PRRSV 3CLpro

3CLpro	Mode of action	References
PEDV	Cleavage of NEMO	[11]
HAV	Cleavage of NEMO	[41]
FMDV	Cleavage of NEMO	[42]
CVB3	Cleavage of MAVS and TRIF	[43]
EV73	Cleavage of TRIF/TAK1/TAB complex	[44, 45]
PRRSV	Cleavage of NEMO	[46]

病毒逃逸宿主天然免疫应答的策略中, 切割通路中信号受体分子是一种有效抑制抗病毒免疫应答的方法。PEDV 3CLpro 切割的 NEMO 是天然免疫信号传递中的聚合点, 这种关键分子的减少会极大地削弱宿主的抗病毒免疫应答。然而, 不同实验室的结果有些矛盾。Wang 等^[11]用 SEV 诱导干扰素筛选出 nsp5, 而 Zhang 等^[20]通过 Poly(I:C) 诱导 IFN- β 并没有筛选出 nsp5 是干扰素拮抗剂。本课题组通过 SEV 诱导 IFN- β 时筛选出 nsp5 可作为干扰素拮抗剂。因此, 还需要更多的实验来明确 nsp5 的作用。

此外, NEMO 剪切位点的结构基础还未被阐明, 蛋白酶活性在 PEDV nsp5 介导的 NEMO 剪切过程中具有重要作用, 但是不能排除 nsp5 中非活性位点对剪切过程的作用。PEDV 3CLpro NEMO 是否会竞争性与 PEDV 自身蛋白争夺 PEDV 3CLpro 的作用靶点将成为下一步探究的重点。

3.4 PEDV 核衣壳蛋白 (nucleocapsid, N) 通过结合 TBK1 拮抗宿主天然免疫应答

冠状病毒核衣壳蛋白是病毒感染细胞中含量最丰富的病毒蛋白。Ding 等^[8]发现, 核衣壳蛋白能够降低仙台病毒诱导的 IFN- β 及干扰素通路效应分子 ISG15、ISG54、ISG56 的 mRNA 产量, 能显著抑制 TBK1 及其上游分子 RIG-I、MDA5、IPS-1 和 TRAF3 诱导的 IFN- β 产生, 但不抑制 IRF-3 诱导的 IFN- β 产生, 表明核衣壳蛋白作用的靶信号分子可能是 TBK1, 而且实验证实, 核衣壳蛋白可以结合 TBK1 分子。TBK1 是 IFN 信号传递中的节点, TLR 和 RLR 通路都通过 TBK1 磷酸化 IRF, 进而引起 IRF 入核诱导 I 型 IFN 的转录^[47]。对通路中 TBK1 的抑制将有效地抑制通路中信号的传递。

最新研究^[48]发现, 埃博拉病毒 VP35 蛋白结合

IKK ϵ 和 TBK1 拮抗干扰素的产生, VP35 蛋白也能够被 TBK1 或 IKK ϵ 磷酸化。生物信息学分析 (<http://www.phosphosite.org/>) 揭示, PEDV 核衣壳蛋白能够被 TBK1 磷酸化, 因此, PEDV 核衣壳蛋白的功能可能受 TBK1 影响, 进而影响 PEDV 致病性。这种病毒致病性能根据宿主发生调整的生物学意义很值得探究。

4 PEDV 编码的蛋白质通过隐藏自身的 dsRNA 避开天然免疫应答

冠状病毒运用的另一种逃逸宿主天然免疫应答方式是隐藏其 PAMP dsRNA, 避免激活 TLR3/TRIF 和 RIG-I/MDA5/IPS-1 通路。真核生物宿主细胞会在翻译之前对自身 mRNA 进行组装, 这些 RNA 的 5' 端在转录时被酶修饰成带有 N7-甲基化和 2' O-甲基化的帽结构, 5' 端没有帽结构或者有未甲基化和未完全甲基化帽结构的 RNA 会被 RLR 识别, 而真核宿主细胞的 RNA 通常不能被 RLR 识别。仿照宿主细胞 RNA 加工过程, 冠状病毒的复制酶复合体上含有 3 种加帽酶, 分别是 nsp13 编码的 RNA 三磷酸化酶 (NTPase helicase)、nsp14 编码的 N7 甲基转移酶 (N7-MTase) 和 nsp16 编码的 2' O 甲基转移酶 (2' O-MTase)^[49-51], 这些酶能使病毒的 mRNA 带有和宿主细胞 mRNA 相似的 N7-甲基化和 2' O-甲基化的帽结构, 避免被 RLR 识别激活 RLR/IPS-1 通路。通过隐藏自身 RNA 的策略, 冠状病毒可以逃避 RLR 的识别^[52], 避免对天然免疫的激活。病毒隐藏自身 PAMP 是病毒拮抗宿主免疫应答一种有效方式, 能够从起始部位避免激活宿主天然免疫应答。

5 问题与展望

冠状病毒科中许多病毒能够避开宿主天然免疫应答。SARS-CoV 可编码至少 11 种具有干扰素拮

抗剂的蛋白质, PEDV 编码的蛋白质中也已经鉴定出 11 种可作为干扰素拮抗剂。冠状病毒中存在多种干扰素拮抗剂的原因可能是由于冠状病毒的基因组是已知 RNA 病毒中最大的, 进化出多种干扰素拮抗剂会增加其进化上的优势。

PEDV 编码的干扰素拮抗剂蛋白 nsp7、nsp14、nsp15、ORF3、E 蛋白、M 蛋白具体作用机制尚未被报道。已初步了解功能的蛋白质如 nsp1、PLP2、nsp5、N 蛋白等, 仍需要考虑这些蛋白质是否还会通过其他方式拮抗干扰素效应。例如, N 蛋白是 dsRNA 分子伴侣蛋白, 可以探究其是否可以结合宿主 dsRNA 来阻碍 I 型干扰素产生; nsp5 是病毒水解蛋白酶, 其在病毒自身和宿主中作用的先后顺序也值得探究。与 SARS-CoV 的干扰素拮抗剂研究的深入程度相比, PEDV 还需要更深入的探究。

参考文献(References)

- [1] Helena JM, Erica B, Paul B. Coronaviruses-Methods and Protocols [M]. New York: Humana Press, 2015: 13-14
- [2] Li G, Chen Q, Harmon KM, et al. Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734 [J]. Genome Announc, 2014, 2(2): e00278-14
- [3] Chasey D, Cartwright SF. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea [J]. Res Vet Sci, 1978, 25(2): 255-256
- [4] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(1): 161-163
- [5] Chung HC, Nguyen VG, Moon HJ, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus during outbreaks in South Korea, 2013-2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(12): 2238-2240
- [6] Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States [J]. MBio, 2013, 4(5): e00737-13
- [7] Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(6): 439-450
- [8] Ding Z, Fang L, Jing H, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Nucleocapsid Protein Antagonizes Beta Interferon Production by Sequestering the Interaction between IRF3 and TBK1 [J]. J Virol, 2014, 88(16): 8936-8945
- [9] Narayanan K, Ramirez SI, Lokugamage KG, et al. Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression [J]. Virus Res, 2015, 202: 89-100
- [10] Xing Y, Chen J, Tu J, et al. The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase [J]. J Gen Virol, 2013, 94(Pt7): 1554-1567
- [11] Wang D, Fang L, Shi Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving NEMO [J]. J Virol, 2015, 90(4): 2090-2101
- [12] Frieman M, Baric R. Mechanisms of severe acute respiratory syndrome pathogenesis and innate immunomodulation [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, 72(4): 672-685
- [13] Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection [J]. Immunol Rev, 2009, 227(1): 75-86
- [14] Thanos D, Maniatis T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome [J]. Cell, 1995, 83(7): 1091-1100
- [15] Isaacson MK, Ploegh HL. Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection [J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(6): 559-570
- [16] Zeng W, Sun L, Jiang X, et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity [J]. Cell, 2010, 141(2): 315-330
- [17] Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity [J]. Nature, 2007, 446(7138): 916-920
- [18] Yang Y, Wang SY, Huang ZF, et al. The RNA-binding protein Mex3B is a coreceptor of Toll-like receptor 3 in innate antiviral response [J]. Cell Res, 2016, 26(3): 288-303
- [19] Cao L, Ge X, Gao Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon- β production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway [J]. Virol J, 2015, 12: 127
- [20] Zhang QZ, Shi K, Yoo D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1 [J]. Virology, 2016, 489: 252-268
- [21] Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, et al. Alphacoronavirus transmissible gastroenteritis virus nsp1 protein suppresses protein translation in mammalian cells and in cell-free HeLa cell extracts but not in rabbit reticulocyte lysate [J]. J Virol, 2011, 85(1): 638-643
- [22] Lei L, Ying S, Baojun L, et al. Attenuation of mouse hepatitis virus by deletion of the LLRKxGxKG region of Nsp1 [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61166
- [23] Kamitani W, Narayanan K, Huang C, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(34): 12885-12890
- [24] Kamitani W, Huang C, Narayanan K, et al. A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein [J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(11): 1134-1140
- [25] Narayanan K, Huang C, Lokugamage K, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells [J]. J Virol, 2008, 82(9): 4471-4479
- [26] Tohya Y, Narayanan K, Kamitani W, et al. Suppression of host gene expression by nsp1 proteins of group 2 bat coronaviruses [J]. J Virol, 2009, 83(10): 5282-5288
- [27] 张百灵, 陈建飞, 邢雅玲, 等. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)与抗病毒天然免疫 [J]. 中国生物化学与分子生物学报(Zhang BL, Chen JF, Xing YL, et al. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and host antiviral innate immunity [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2011, 27(6): 516-523
- [28] Wojdyla JA, Manolaridis I, Van-Kasteren PB, et al. Papain-like protease 1 from transmissible gastroenteritis virus: Crystal structure and enzymatic activity toward viral and cellular substrates [J]. J Virol, 2010, 84(19): 10063-10073
- [29] Clementz MA, Chen Z, Banach BS, et al. Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases [J]. J Virol, 2010, 84(9): 4619-4629
- [30] Lindner HA, Lytvyn V, Qi H, et al. Selectivity in ISG15 and ubiquitin recognition by the SARS coronavirus papain-like protease [J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 466(1): 8-14
- [31] Devaraj SG, Wang N, Chen Z, et al. Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. J Biol Chem, 2007, 282(44): 32208-32221
- [32] Mielech AM, Kilianski A, Baez-Santos YM, et al. MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities [J]. Virology, 2014, 450-451: 64-70
- [33] Yang X, Chen X, Bian G, et al. Proteolytic processing, deubiquitinase and interferon antagonist activities of middle east

- respiratory syndrome coronavirus papain-like protease [J]. *J Gen Virol*, 2014, **95**(Pt 3): 614-626
- [34] Wang G, Chen G, Zheng D, *et al.* PLP2 of mouse hepatitis virus A59 (MHV-A59) targets TBK1 to negatively regulate cellular type I interferon signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(2): e17192
- [35] Zheng D, Chen G, Guo B, *et al.* PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production [J]. *Cell Res*, 2008, **18**(11): 1105-111
- [36] Van-Kasteren PB, Beugeling C, Ninaber DK, *et al.* Arterivirus and nairovirus ovarian tumor domain-containing deubiquitinases target activated RIG-I to control innate immune signaling [J]. *J Virol*, 2012, **86**(2): 773-785
- [37] Van-Kasteren PB, Bailey-Elkin BA, James TW, *et al.* Deubiquitinase function of arterivirus papain-like protease 2 suppresses the innate immune response in infected host cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(9): e838-847
- [38] Sun Z, Chen Z, Lawson SR, *et al.* The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions [J]. *J Virol*, 2010, **84**(15): 7832-7846
- [39] Sun Z, Li Y, Ransburgh R, *et al.* Nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits the antiviral function of interferon-stimulated gene 15 [J]. *J Virol*, 2012, **86**(7): 3839-3850
- [40] Malakhova OA, Zhang DE. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283**(14): 8783-8787
- [41] Wang D, Fang L, Wei D, *et al.* Hepatitis A virus 3C protease cleaves NEMO to impair induction of beta interferon [J]. *J Virol*, 2014, **88**(17): 10252-10258
- [42] Wang D, Fang L, Li K, *et al.* Foot-and-mouth disease virus 3C protease cleaves NEMO to impair innate immune signaling [J]. *J Virol*, 2012, **86**(17): 9311-9322
- [43] Mukherjee A, Morosky SA, Delorme-Axford E, *et al.* The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling [J]. *PLoS Pathog*, 2011, **7**(3): e1001311
- [44] Lei X, Sun Z, Liu X, *et al.* Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3 [J]. *J Virol*, 2011, **85**(17): 8811-8818
- [45] Lei X, Han N, Xiao X, *et al.* Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex [J]. *J Virol*, 2014, **88**(17): 9830-9841
- [46] Huang C, Zhang Q, Guo XK, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 antagonizes beta interferon expression by targeting the NF- κ B essential modulator [J]. *J Virol*, 2014, **88**(18): 10934-1095
- [47] Clark K, Pegg M, Plater L, *et al.* Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity [J]. *Biochem J*, 2011, **434**(1): 93-104
- [48] Prins KC, Cárdenas WB, Basler CF. Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK1 [J]. *J Virol*, 2009, **83**(7): 3069-3077
- [49] Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, *et al.* Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase [J]. *J Virol*, 2004, **78**(11): 5619-5632
- [50] Chen Y, Cai H, Pan J, *et al.* Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(9): 3484-3489
- [51] Chen Y, Su C, Ke M, *et al.* Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex [J]. *PLoS Pathog*, 2011, **7**(10): e1002294
- [52] Zuest R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, *et al.* Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5 [J]. *Nat Immunol*, 2011, **12**(2): 137-143