

A 型流感病毒 NS1 蛋白研究进展

李建丽, 张万坡, 毕丁仁*

(华中农业大学动物医学院 湖北 武汉 430070)

摘 要 NS1 蛋白是 A 型流感病毒唯一的非结构蛋白, 是一种 RNA 结合蛋白, 具有重要的调节活性。NS1 蛋白仅存在于病毒感染的细胞内, 且在感染的早期, 大量存在于细胞核中, 而在感染的晚期, 也可出现于细胞浆中。NS1 蛋白具有 RNA 结合区和效应区, 在抑制宿主细胞蛋白质的合成、诱导细胞凋亡和拮抗干扰素 α/β 的产生等方面具有重要的作用。另外, NS1 蛋白在野毒感染的鉴别诊断、外源基因的载体及抗病毒药物的设计等方面, 均显示了良好的应用价值。

关键词: A 型流感病毒, NS1 蛋白, 应用

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0729-05

NS1 蛋白(Non-Structural 1 Protein, NS1)是 A 型流感病毒唯一的非结构蛋白, 由第 8 个基因编码的, 可编码 202 ~ 237 氨基酸(Amino Acid, aa), 不同毒株有差异, 是一个具有多种活性的调控因子。NS1 蛋白仅存在于病毒感染的细胞内, 且在感染的早期, 大量存在于细胞核中, 而在感染的晚期, NS1 蛋白也可出现于细胞浆中, 且能刺激机体产生抗 NS1 蛋白的抗体^[1]。近年来, 关于 NS1 蛋白的进化、结构、调节病毒的致病性及其应用等方面进行了深入研究, 进一步揭示了 A 型流感病毒的致病机理, 也为禽流感病毒感染人并引起死亡的机理提供重要的参考价值。

1 NS1 蛋白的分群及进化分析

关于 NS1 蛋白的分群, 根据不同的分类依据将有不同的分群。根据 NS1 基因核苷酸序列的同源性, 将其分为 A 和 B 两个等位基因群, 群内同源性高, 约为 90%, 群间同源性低, 仅为 72.3% 左右。Ludwig 等^[2]对 38 株 A 群和 10 株 B 群 A 型流感病毒的 NS1 基因进行了遗传分析, 结果表明, A 群包含禽源和哺乳动物流感病毒, 而 B 群只包含禽源流感病毒。Suarez 等^[3]对不同来源的 106 株 A 型流感病毒的 NS1 基因进行比较, 把基因 A 群分为 5 个分支, 而基因 B 群则分为两个分支。William G 等^[4]分析了 1999 ~ 2003 年间流行于意大利北部的 40 株禽流感病毒(H7N1 亚型)的 NS1 基因, 结果表明, NS1 基因相对保守, 但也有变异, 其中 16 株编码全长 230 aa, 6 株因 C-端缺失而编码 220 aa, 18 株因间隔性缺失而编码 224 aa, 并且所有的高致病性毒株都具有 C-端的间隔性缺失, 还发现, 所有的低致病性毒株的 NS1 蛋白在流行初期均是完整的, 而于流行后期就出现缺失现象。Banet-Noach C 等^[5]也有类似的报道, 他们分析了 2000 ~ 2006 年间流行于以色列的 21 株 H9N2 和 2 株 H5N1 亚型禽流感病毒, 指出所有

的 H9N2 亚型只属于 1 个群, 而按分离年代又分为 3 个亚群; 而所有的 H5N1 亚型均有 5 个氨基酸的缺失, 这些氨基酸的缺失与病毒毒力及流行时间的相关性, 还有待于进一步研究。

2 NS1 蛋白的结构

目前认为 NS1 蛋白有两个重要的功能区, 即 RNA 结合区和效应区。RNA 结合区由 73 个 aa 组成, 核心区由 19 ~ 38 位 aa 构成, 能结合异源 RNA^[6]。RNA 结合区是由环连接的 3 个 α 螺旋构成, 3 个螺旋分别由第 1 ~ 30 位, 30 ~ 50 位, 50 ~ 73 位 aa 组成, 其中第二个螺旋 R38 和 K41 在 NS1 蛋白和 dsRNA 结合过程中发挥重要作用^[7, 8]。效应区位于羧基端 134 ~ 161 位 aa, 具有阻断宿主 mRNA 剪接、多聚腺苷酸化和核转运的功能^[9]。此外, NS1 蛋白还有 2 个核定位信号区, 第一个信号区位于 34 ~ 38 位 aa, 非常保守, 其顺序为 Asp-Arg-Leu-Arg-Arg, 所有的 A 型流感病毒均有该区, 第二个信号区位于 203 ~ 237 位 aa, 并非所有的 A 型流感病毒都含有该区。

随着技术的发展, NS1 蛋白的结构得到了更深入的认识, 其结构与功能的关系也更加清晰。Bornholdt 等^[10]利用 X 衍射技术对 NS1 蛋白的效应区的晶体结构进行了分析, 指出该区具有一个独特的折叠结构与 H5N1 亚型 AIV 的毒力有关。另外, NS1 蛋白还具有 eIF4GI(eukaryotic translation initiation factor 4GI)结合区域, 其位于第 81 ~ 113aa 之间, 该区能与真核细胞启动因子 eIF4F 的亚单位(eIF4GI)结合, 启动病毒蛋白的合成^[11]。Obenauer 等^[12]发现 NS1 蛋白的羧基端有 PDZ 结构的结合域, 即 ESEV 和 EPEV。PDZ 结构是一种标准的蛋白质间相互作用的结构, 而含有 PDZ 结构的蛋白在细胞信号传导通路上发挥重要功能。进一步分析发现, 绝大

基金项目: 湖北省禽流感应急专项(2005AA401D60)

* 通讯作者。Tel: 86-27-87280566, Fax: 86-27-87280208, E-mail: bidingren@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 李建丽(1978 -)男, 河南南阳人, 博士研究生, 主要从事兽医微生物研究。E-mail: lijianli1008@163.com

收稿日期: 2006-11-27, 接受日期: 2007-03-13, 修回日期: 2007-04-22

多数禽源 H5N1 亚型毒株含有 ESEV, 而高致病性人源 H5N1 亚型毒株具有 EPEV, 因此, 推测 NS1 蛋白可能通过该结合域调节流感病毒的致病性和毒力, 还有待于进一步研究。

3 NS1 蛋白与 A 型流感病毒的致病性

目前, A 型流感病毒的致病机制仍不甚清楚, 是多基因及其产物共同作用的结果。NS1 蛋白是一种多功能调节蛋白, 在调节流感病毒的致病性及毒力方面发挥着重要的作用。NS1 蛋白从宿主和病毒两个方面来调节病毒的致病性和毒力。在宿主方面, NS1 蛋白可通过抑制宿主细胞蛋白的合成、诱导细胞凋亡以及拮抗干扰素的产生等方式调节机体的抗病毒反应, 间接地发挥增强病毒致病性的功能; 另一方面, NS1 蛋白可通过增强病毒 mRNA 的翻译来提高病毒的复制, 直接增强 AIV 抵抗宿主的抗病毒反应的能力。

3.1 抑制宿主蛋白的合成

NS1 蛋白主要通过两种途径来抑制宿主蛋白的合成。其一, NS1 蛋白通过其 RNA 结合区与异源 RNA 结合而影响宿主基因的转录及转录后加工过程。异源 RNA 包括 mRNA 的 Poly(A) λ U₆ SnRNA、病毒 RNA、病毒 mRNA 5' 端非翻译区和 dsRNA。其机制可能有: ①与宿主 mRNA 的 Poly(A) 结合, 抑制宿主细胞 mRNA 的核输出^[13]; ②与 U₆ SnRNA 的特定区域结合, 阻断 pre-mRNA 的剪接过程^[14]; ③与 dsRNA 结合或直接作用于蛋白激酶 R (PKR), 阻碍 dsRNA 介导的 PKR 及 eIF-2 α 的激活, 抑制 PKR 诱导的翻译起始^[15]。其二, NS1 蛋白能与宿主的多种蛋白直接相互作用, 并产生生理活性, 在转录、转录后加工及翻译水平上影响宿主蛋白的表达。业已证明, NS1 蛋白能与 30kDa 的裂解与多聚腺苷酸特异性因子 (CPSF) 亚单位、Poly(A) 结合蛋白 II (PAB II) 和 NS1 结合蛋白 (NS1-BP) 相互作用, 影响了宿主蛋白的 pre-mRNA 3' 端的剪切、多聚腺苷酸化、mRNA 核输出, 从而抑制宿主蛋白的合成^[16-18]。

3.2 下调细胞凋亡

细胞凋亡 (Apoptosis) 是机体维持自身稳定的一种机制, 在自我平衡的保持以及抵御外界各种因素的干扰方面都起着非常关键的作用。研究发现, NS1 蛋白能够下调感染细胞凋亡, 可能是通过抑制 PKR-IFN 途径和 PI3K 激活途径来实现的。Zhirmov 等^[19]的研究表明, 流感病毒 NS1 蛋白可以下调被感染细胞的细胞凋亡。通过对野生型 (WT) 流感病毒株 A/PR/8/34 及其缺失了 NS1 基因的突变毒株, 对被感染细胞诱导凋亡作用的比较发现, 对能产生干扰素的宿主细胞, 例如 MDCK 细胞、鸡成纤维细胞、7 日龄的鸡胚, NS1 基因缺失突变株诱导的细胞凋亡比野生型病毒株更迅速和有效, 相反, 对于不能产生干扰素的宿主细胞, 例如 Vero 细胞, 野生型病毒株与 NS1 基因缺失突变株两者所诱导的细胞凋亡作用无明显差别, 因此, 认为流感病毒 NS1 蛋白能下调细胞凋亡, 且这种抗凋亡作用具有干扰素依赖性。研究显示, PKR

与 IRF-3 可通过活化“死亡诱导信号复合物”来促进细胞凋亡, 但 NS1 蛋白能抑制 PKR 和干扰素活化因子 IRF-3、NF- κ B 的活化, 因此, NS1 蛋白能上调“凋亡阈值”来延迟被感染细胞发生凋亡。另外, NS1 蛋白也可通过 PI3K 激活途径来调节感染细胞的凋亡。Ehrhardt C 等^[20]研究指出 NS1 蛋白可结合并激活 PI3K, 经一系列级联反应, 抑制感染细胞的凋亡, 从而确保病毒的有效复制。

国内的相关研究比较少, 孙博兴[△]首次观察到了 H9N2 亚型 AIV 的 NS1 蛋白能诱导 HeLa 细胞发生凋亡。余丹丹^{△△}用两株生物学特性不同的 H5N1 亚型 HPAI 进行了 NS1 蛋白诱导细胞凋亡的研究, 结果表明两株均能诱导 HeLa 细胞发生凋亡, 但差别不大, 而诱导鸡胚成纤维细胞发生的凋亡差异极显著, 且与毒力有关。因此, 进一步研究流感病毒诱导细胞凋亡, 可对其致病机制有更为深入的理解。

3.3 拮抗干扰素的产生

干扰素- α (β) (IFN- α / β) 在机体抗病毒过程中发挥重要作用, IFN- α / β 的产生需要 IRF-3、IRF-7、AP-1、NF- κ B 等多种调节因子在转录水平调节 IFN 基因 mRNA 的合成。NS1 蛋白能通过多种机制抑制 IFN- α / β 的产生和释放, 这主要与 NS1 蛋白的 RNA 结合区有关。这些机制主要有: 抑制抗病毒活性的 PKR 和 2'-5' 合成酶 (2'-5' oligoadenylate synthetase) 的激活; 阻止 dsRNA 活化的抗病毒信号传导通路; 抑制干扰素调节因子的激活等^[21, 22]。Stephan 等^[23]研究发现, NS1 蛋白能够抑制 JNK (Jun N-terminal Kinase) 和 AP-1 转录因子的激活。由于 AP-1 因子能转录活化多种抗病毒和炎性细胞因子的基因, 故其激活对机体在急性病毒感染时的初始免疫应答起重要作用。另外, NS1 蛋白个别位点氨基酸也影响 IFN- α / β 的产生, 如 R38、E92 和 A149。Min 等^[24]将 NS1 蛋白 38 位 Arg 突变为 Ala, 导致该突变株并不抑制 IFN- β 的 mRNA 的产生。Li Z 等^[25]证实 NS1 蛋白第 149 位的 Ala 与 NS1 蛋白拮抗干扰素效应有关。NS1 蛋白 92 位 Glu 的存在对于 NS1 蛋白拮抗 IFN 和 TNF 介导的抗病毒反应也具有决定性的作用^[26]。

3.4 NS1 蛋白与宿主蛋白相互作用

NS1 蛋白可与宿主蛋白相互作用, 以改变宿主蛋白的重新分布及增强病毒蛋白的表达等方式, 增强病毒的致病性和毒力。这些蛋白主要有 Staufen 蛋白、真核生物翻译起始因子 4G (eIF4GI)、NS1 结合因子 (NS1-I)、Poly(A) 结合蛋白 I (PAB I)、Falc6n A 等^[27]证实 NS1 蛋白能与 Staufen 蛋白特异性地结合, 且二者的结合有助于病毒 mRNA 定位于适当的位置, 以利于病毒蛋白的有效合成。Tomás 等^[28]研究表明 NS1 蛋白能与 eIF4GI 相互作用, 使 eIF4GI 特异的结合于病毒 mRNA 5'-UTR, 竞争宿主 mRNA 的翻译起始, 从而利于病毒 mRNA 的优先翻译。Wolff T 等^[29]证明了 NS1-I 能与 NS1 蛋白结合, 而该蛋白与 NS1 蛋白的结合能够抑制机体的抗病毒反应, 增强病毒的复制, 在流感病毒的生活周期中具有重要作用, 其机理可能是通过调节感染细胞中的类固醇激素的水

[△] 孙博兴. H9N2 亚型禽流感非结构蛋白 NS1A 基因的克隆表达及其诱导 HeLa 细胞凋亡的研究. 吉林大学博士学位论文. 2005.

^{△△} 余丹丹. 两株 H5N1 亚型禽流感病毒诱导的细胞凋亡研究. 南京农业大学硕士学位论文. 2005. <http://journals.im.ac.cn>

平来完成的。另外, NS1 蛋白、PAPB I 和 eIF4GI 三者结合形成的翻译起始复合物, 能使病毒 mRNA 的 5' 端更有效地游走于核糖体, 从而促进病毒 mRNA 的翻译。基于以上的研究成果, 本实验室正欲利用细菌双杂交系统从构建的 AIV 感染鸡的脾组织 cDNA 文库中, 试图筛选能与 NS1 蛋白相互作用的宿主蛋白, 从而探讨 NS1 蛋白调节病毒致病性和毒力的新的途径和作用方式。

4 NS1 蛋白的应用

4.1 NS1 蛋白在禽流感鉴别诊断上的应用

禽流感, 尤其是高致病性禽流感在全球流行, 并引起了人的感染和死亡, 赋予了禽流感更大的公共卫生意义。目前, 在我国多采用灭活疫苗免疫和扑杀相结合的措施控制禽流感的流行, 并取得一定的成效, 但疫苗免疫不仅干扰了血清学监测, 且不利于国际贸易。如何有效区分疫苗免疫和野毒感染, 如何鉴别疫苗接种的动物是否感染了禽流感病毒, 成为当前禽流感鉴别诊断的当务之急。

目前, 在疫苗免疫和野毒感染禽的鉴别诊断(Differentiate Infected from Vaccinated Animals, DIVA) 方面有四种不同策略^[30]。一是免疫群内安插未免疫过的哨兵禽; 二是采用亚单位疫苗免疫定向检测血凝素蛋白; 三是接种与野毒血凝素同源而神经氨酸酶异源的疫苗; 四是检测非结构蛋白 NS1 的抗体。由于 NS1 蛋白自身的特点, 在鉴别诊断灭活疫苗免疫动物与自然感染病毒动物方面有着广阔的应用前景。首先, NS1 蛋白相对保守。用多克隆抗血清对 NS1 的抗原性进行研究发现, 不同亚型毒株之间存在明显的交叉反应。从人、猪、马分离的 A 型流感病毒, 其 NS1 的抗原性非常相似, 一般方法难以区分。其次, NS1 蛋白是非结构蛋白, 仅存在于流感病毒感染的细胞内, 且能刺激机体产生针对该蛋白的抗体, 而灭活疫苗免疫的动物不会产生针对 NS1 蛋白抗体, 故 NS1 蛋白及其抗体可以作为病毒感染的一个重要标记, 已成为区分 AIV 野毒感染重要工具。

目前鉴别诊断方法主要是 ELISA, 通过检测 NS1 蛋白的抗体来达到鉴别诊断的目的。Birch-Marchini^[31] 和 Ozaki 等^[32] 分别应用 ELISA 技术 NS1 抗体, 成功地区分流感病毒感染马和灭活疫苗免疫马。Tumpey 等^[33] 用重组 NS1 蛋白和人工合成的 NS1 多肽(NS1₂₉₋₄₁ 和 NS1₃₆₋₄₈) 作为抗原, 成功地建立了区分野毒感染鸡群和灭活疫苗免疫鸡群。赵思亭等^[34] 也利用表达的 NS1 蛋白建立了鉴别野毒感染的间接 ELISA, 显示了良好的应用前景。作者也成功建立了区分野毒感染的间接 ELISA 方法。除了 ELISA 方法外, 本实验室采用免疫金技术建立了一种快速、方便、经济的检测 NS1 抗体的胶体金检测试纸条(专利正在申报中), 达到鉴别诊断的目的。

上述鉴别诊断有其不足之处。其一, 该方法灵敏度不高。可能是因为病毒感染细胞产生的 NS1 蛋白的量不高, 导致其抗体水平也不高。其二, 存在较低的干扰现象。主要是由于当前使用的禽流感疫苗纯度不高, 有低剂量 NS1 蛋白的污染, 导致灭活疫苗免疫的群体中也存在低水平的 NS1 抗体, 干扰了该方法的特异。尽管免疫群体中也存在 NS1 抗

体, 但野毒感染会产生更高水平的 NS1 抗体, 因此, 该方法能够区分野毒感染和疫苗免疫群体。

另外, 研究发现, NS1 蛋白部分缺失可致弱病毒, 但不影响其免疫原性, 且免疫后检测不到已修饰的 NS1 蛋白的抗体, 因此通过检测该抗体的有无, 也可判断是否有野毒感染。Richt 等^[35] 研究发现用只表达含 126 个氨基酸的 NS1 蛋白的猪流感弱毒株(TX98) 免疫四周龄猪, 不仅能抵抗同型和异型毒株的感染, 且免疫猪检测不到其 NS1 抗体, 这提示, 可以利用 TX98 弱毒株作为疫苗, 并通过检测 NS1 抗体的有无来鉴别免疫动物是否感染野毒。该方法避免了当前灭活疫苗中由于低剂量的 NS1 蛋白的存在而导致非特异性的问题, 但也存在弱毒反强的风险。

4.2 可作为携带外源基因的载体

研究发现, NS1 蛋白可作为携带外源基因的载体。主要有两个原因, 其一, 由于 NS1 基因在流感病毒的 8 个基因中最短, 便于反向遗传操作; 其二, NS1 蛋白能够接受超过 250 个氨基酸的外源片段, 且能在感染细胞中大量产生, 并诱导产生较强的针对外源蛋白的免疫反应。Kittel 等^[36] 在 NS1 蛋白 N-端的 125 位氨基酸处插入了绿色荧光蛋白(GFP), 并获得了表达。Sabine 等^[37] 在 NS1 蛋白 N-端的 125 位氨基酸处插入了结核分支杆菌的 ESAT-6 蛋白, 免疫小鼠后, 产生了结核分支杆菌特异的 CD4⁺ 免疫反应; 免疫的小鼠和猪均能抵抗结核分支杆菌的感染。因此, 我们可利用 NS1 蛋白能够接纳外源蛋白特点, 可以将不同病原微生物的保护性蛋白与 NS1 蛋白融合表达, 构建基因重组活载体疫苗, 达到“一针多防”的目的。

5 结语

NS1 蛋白通过多种机制参与流感病毒逃避宿主的抗病毒应答, 因此, 颇显 NS1 蛋白的功能, 在 A 型流感病毒的防治方面具有重要的应用价值。另外, 近年来关于 NS1 蛋白与宿主蛋白相互作用的研究较深入, 但多见于人源蛋白, 而其与禽源蛋白的相互作用还未见报道, NS1 蛋白与禽源蛋白互作研究不仅有助于进一步阐明 AIV 感染禽类的致病机理, 还可以揭示其感染人并致人死亡的机制, 这一点应值得关注。在临床应用方面, NS1 蛋白在鉴别诊断中的应用已受到广泛关注, 但目前的鉴别诊断还存在不足之处, 因此研究更加灵敏、特异、快速、经济的鉴别诊断方法, 将是今后的重点研究方向。另外, NS1 蛋白在活载体疫苗的研制和抗病毒药物靶点的设计方面也显示了良好应用的前景。

参 考 文 献

- [1] Krug RM, Yuan W, Noah DL, et al. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, 2003, **309**(2): 181-189.
- [2] Ludwig S, Schultz U, Mandler J, et al. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology*, 1991, **183**(2): 566-577.

- [3] Suarez DL, Perdue ML. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res*, 1998, **54**(1): 59 – 69.
- [4] William GD, Adelaide M Giovanni C, *et al.* Progressive truncation of the Non-Structural 1 gene of H7N1 avian influenza viruses following extensive circulation in poultry. *Virus Res*, 2006, **119**(2): 171 – 176.
- [5] Banet-Noach C, Panshin A, Golender N, *et al.* Genetic analysis of nonstructural gene (NS1 and NS2) of H9N2 and H5N1 viruses recently isolated in Israel. *Virus Genes*, 2007, **34**(2): 157 – 168.
- [6] Enami M, Enami K. Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system. *J Virol*, 2000, **74**(12): 5556 – 5561.
- [7] Chien C, Tejero R, Huang Y, *et al.* A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**(11): 891 – 895.
- [8] Liu J, Lynch, PA, Chien C, *et al.* Crystal structure of the unique multifunctional RNA binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Bio*, 1997, **4**(11): 896 – 899.
- [9] Falcón AM, Marión RM, Zürcher TZ, *et al.* Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive Influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol*, 2004, **78**(8): 3880 – 3888.
- [10] Bornholdt ZA, Prasad BV. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(6): 559 – 560.
- [11] Idoia B, Tomás A, Juan O, *et al.* PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *Journal of General Virology*, 2003, **84**(12): 3263 – 3274.
- [12] Obenauer JC, Denson J, Perdeep K. Large-Scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006, **311**(5767): 1576 – 1580.
- [13] Qiu Y, Krug RM. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol*, 1994, **68**(4): 2425 – 2432.
- [14] Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM, *et al.* The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 SnRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 SnRNA interactions during splicing. *RNA*, 1995, **1**(3): 304 – 316.
- [15] Bergmann M, Garcia-Sastre A, Camero E, *et al.* Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-Mediated inhibition of replication. *J Virol*, 2003, **74**(13): 6203 – 6206.
- [16] Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, *et al.* Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell*, 1998, **1**(7): 991 – 1000.
- [17] Chen Z, Li Y, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 39-end processing machinery. *EMBO J*, 1999, **18**(8): 2273 – 2283.
- [18] Wolff T, O'Neill R E, Palese P. NS1-binding protein(NS1-BP) : a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is delocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol*, 1998, **72**(9): 7170 – 7180.
- [19] Zhirnov OP, Konakova TE, Wolff T, *et al.* NS1 protein of influenza A virus down regulates apoptosis. *J Virol*, 2002, **76**(4): 1617 – 1625.
- [20] Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, *et al.* The influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol*, 2007, **81**(7): 3058 – 3067.
- [21] Smith, EJ, Mari I, Prakash A, *et al.* IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or IkkapB kinase but is blocked by vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem*, 2001, **276**(12): 8951 – 8957.
- [22] Fernandez-Sesma A, Svetlana M, Barbara JE, *et al.* Influenza Virus Evades Innate and Adaptive Immunity via the NS1 Protein. *J Virol*, 2006, **80**(13): 6295 – 6304.
- [23] Stephan L, Wang XY, Christina E, *et al.* The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-Terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol*, 2002, **76**(21): 11166 – 11171.
- [24] Min JY, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells : Inhibiting the 2'-5' oligo(A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, **103**(18): 7100 – 7105.
- [25] Li Z, Jiang Y, Jiao P, *et al.* The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*, 2006, **80**(22): 11115 – 11123.
- [26] Basler CF, Reid AH, Dybing J, *et al.* Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci*, **98**(5): 2746 – 2751.
- [27] Falcón A, Fortes P, Marión RM, *et al.* Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res*, 1999, **7**(11): 2241 – 2247.
- [28] Tomás A, Susana de la Luna, Isabel N, *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, **20**(17): 6259 – 6268.
- [29] Wolff T, O'Neill R E, Palese P. Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses. *J Virol*, 1996, **70**(8): 5363 – 5372.
- [30] Overview of avian influenza DIVA test strategies. *Biologicals*, 2005, **33**(4): 221 – 226.
- [31] Birch-Machin I, Rowan A, Pick J, *et al.* Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus : detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera. *J Virol Methods*, 1997, **65**(2): 255 – 263.
- [32] Ozaki H, Sugiura T, Sugita S, *et al.* Detection of antibodies to the nonstructural protein(NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Vet Microbiol*, 2001, **82**(2): 111 – 119.
- [33] Tumpey TM, Alvarez R, Swayne, DE, *et al.* Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *J*

- [34] Zhao S , Jin M , Li H , *et al.* Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of avian influenza viruses allows distinction between vaccinated and infected chickens. *Avian Disease* , 2005 , **49**(4) : 488 – 493.
- [35] Richt JA , Lekcharoensuk P , Lager KM , *et al.* Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. *J Virol* , 2006 , **80**(22) : 11009 – 11018.
- [36] Kittel C , Sereinig S , Ferko B , *et al.* Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *J Virol* , 2004 , **324**(1) 67 – 73.
- [37] Sabine S , Marina S , Natalia Z , *et al.* Influenza virus NS vectors expressing the Myco-bacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol* , 2006 , **13**(8) : 898 – 904.

Study progress of NS1 protein of influenza A virus

LI Jian-li , ZHANG Wan-po , BI Ding-ren *

(College of Veterinary Medicine , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)

Abstract : NS1 protein is the only non-structural protein of influenza A virus , which is encoded by the collinear mRNA transcribed from the viral RNA segment 8 . It is a RNA-binding protein which has important posttranscriptional regulatory activity . It accumulates in the nucleus of the infected cell at early times but is also present in the cytoplasm later in the infection , Two functional domains have been identified in the NS1 protein : a RNA-binding domain at the N-terminus , and an effector domain at the C-terminus , which are associated with the inhibiting host cellular protein synthesis , inducing apoptosis and resisting the production of interferon- α/β . In addition , NS1 protein could provide a means for the distinction between vaccinated and virus-infected poultry and act as a vaccine vector because it can tolerate large inserts of foreign sequences . Moreover , it might be an attractive target for antiviral drug design . All of these demonstrate that NS1 protein have the potential application benefits .

Keywords : influenza A virus ; NS1 protein ; application

Foundation item : Special fund for avian influenza emergency , Hubei province (2005AA401D60)

* Corresponding author . Tel 86-27-87280566 ; Fax 86-27-87280208 ; E-mail : bidingren@mail.hzau.edu.cn

Received : 27 November 2006 / Accepted : 3 March 2007 / Revised : 22 April 2007 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>