

非洲猪瘟病毒 E248R 蛋白抑制 cGAS-STING 介导的天然免疫

刘银光¹, 杨文萍¹, 文圆¹, 牛庆丽¹, 杨吉飞¹, 关贵全¹, 殷宏^{1,2}, 郑海学¹, 李丹¹, 刘志杰¹

1 中国农业科学院 兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 国家非洲猪瘟区域实验室 (兰州), 甘肃 兰州 730046

2 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

刘银光, 杨文萍, 文圆, 牛庆丽, 杨吉飞, 关贵全, 殷宏, 郑海学, 李丹, 刘志杰. 非洲猪瘟病毒 E248R 蛋白抑制 cGAS-STING 介导的天然免疫. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1837-1846.

LIU YG, YANG WP, WEN Y, NIU QL, YANG JF, GUAN GQ, YIN H, ZHENG HX, LI D, LIU ZJ. The E248R protein of African swine fever virus inhibits the cGAS-STING-mediated innate immunity. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1837-1846.

摘要: 为了探究 ASFV E248R 蛋白调控 cGAS-STING 信号通路的机制, 利用双荧光素酶报告系统验证 ASFV E248R 蛋白够剂量依赖性地抑制 cGAS-STING 和 HT-DNA 诱导的 IFN- β 的产生。通过相对定量 PCR 技术验证, 过表达 E248R 抑制 *IFNBI*、*RANTES*、*IL-6* 和 *TNF- α* 基因的转录水平。免疫共沉淀和激光共聚焦试验结果表明, E248R 与 STING 相互作用。通过蛋白印迹试验证实, 过表达 E248R 可抑制 STING 的表达。研究表明 ASFV E248R 蛋白通过抑制 STING 的表达拮抗天然免疫应答。该结果将扩展对 ASF 免疫逃逸的认知, 为疫苗的研制提供新的思路。

关键词: 非洲猪瘟病毒; E248R 蛋白; 天然免疫; cGAS-STING 信号通路

Received: May 28, 2021; **Accepted:** December 30, 2021

Supported by: Major Special Projects in Gansu Province, China (20ZD7NA006); State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology Major Achievements Cultivation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (SKLVEB2020CGPY02); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2019YJ07-02); Chinese Academy of Agricultural Science Innovation Project Program (CAAS-ASTIP-2016-LVRI, CAAS-XTCX16020)

Corresponding authors: LIU Zhijie. Tel: +86-931-8361874; E-mail: liuzhijie@caas.cn

LI Dan. Tel: +86-931-8342166; E-mail: lidan@caas.cn

基金项目: 甘肃省重大专项 (20ZD7NA006); 家畜疫病病原微生物国家重点实验室自主课题 (SKLVEB2020CGPY02); 中国农业科学院基本科研业务费专项 (Y2019YJ07-02); 农业科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2016-LVRI, CAAS-XTCX16020)

The E248R protein of African swine fever virus inhibits the cGAS-STING-mediated innate immunity

LIU Yinguang¹, YANG Wenping¹, WEN Yuan¹, NIU Qingli¹, YANG Jifei¹,
GUAN Guiquan¹, YIN Hong^{1,2}, ZHENG Haixue¹, LI Dan¹, LIU Zhijie¹

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/African Swine Fever Regional Laboratory of China (Lanzhou)/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 Jiangsu Co-Innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: We researched the mechanism of African swine fever virus (ASFV) protein E248R in regulating the cGAS-STING pathway. First, we verified via the dual-luciferase reporter assay system that E248R protein inhibited the secretion of IFN- β induced by cGAS-STING or HT-DNA in a dose-dependent manner. The relative quantitative PCR analysis indicated that the overexpression of E248R inhibited HT-DNA-induced transcription of *IFN- β* , *RANTES*, *IL-6*, and *TNF- α* in PK-15 cells. Next, we found that E248R interacted with STING by co-immunoprecipitation assay and laser confocal microscopy. Finally, we demonstrated that E248R inhibited the expression of STING protein by using Western blotting. We demonstrated for the first time that the E248R protein of ASFV suppressed the host innate immune response via inhibiting STING expression. The results are pivotal in extending the understanding of the ASFV immune escape and can guide the design of vaccines against ASFV.

Keywords: African swine fever virus; E248R protein; innate immunity; cGAS-STING signaling pathway

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染家猪或野猪而引起的一种以高热和高死亡率为主要特征的烈性传染病^[1]。不同品种和不同年龄段的猪均易感染, 世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health, OIE) 将其列为必须申报的动物疫病, 我国将其列为一类动物疫病。ASFV 是非洲猪瘟相关病毒科 (Asfarviridae) 非洲猪瘟病毒属的成员^[2], 是一种虫媒 DNA 病毒, 钝缘蜱是 ASFV 的自然媒介, 该病毒亦可通过蚊蝇等节肢动物机械性传播^[3], 且目前尚无有效的疫苗对其进行防控, 因此, ASF 自然疫源地一旦形成, 防控极其困难。2018 年 8 月 2 日, 沈阳市沈北新区发生疑似

ASF 疫情, 8 月 3 日确诊为非洲猪瘟疫情^[4]。

ASFV 基因组超过 170 kb, 包含了超过 150 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 病毒粒子直径超过 200 nm, 病毒在细胞核周围形成病毒工厂, 进行病毒的复制和组装^[5-6]。ASFV 颗粒呈二十面体, 具有多层囊膜结构^[7]。ASFV 编码的蛋白在病毒组装、DNA 复制和修复以及基因表达方面发挥着重要作用。此外, ASFV 基因组编码许多与免疫逃逸相关的蛋白, 包括抑制 I 型干扰素和诱导细胞凋亡蛋白, 如 DP96R、MGF-505-7R 和 pE199L 等蛋白, 但大多数 ASFV 基因编码蛋白的功能还未见报道。

天然免疫是宿主识别和抵抗病原微生物入侵的第一道防线。哺乳动物利用模式识别受体

(pattern recognition receptors, PRRs) 识别内环境和细胞内的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 或损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs)^[8]。病原微生物在感染的过程中, DNA 很容易暴露于细胞质中, 作为一种典型的病原分子相关模式, 被宿主细胞识别^[9]。除了 TLR9 (toll-like receptor 9) 可以识别位于溶酶体中转运的外源 DNA^[10-11], 细胞内还存在多种 DNA 感受器, 包括 cGAS (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)、DDX41、DAI 和 RNA 聚合酶 III 等^[12-13]。cGAS 是细胞中重要的胞质 DNA 感受器^[14-15], 与病毒 DNA 结合, 形成以 cGAS: DNA 为 2: 2 的复合物^[16], 进而催化 ATP 和 GTP 合成 cGAMP (cyclic GMP-AMP, cGAMP)^[14]。cGAMP 结合并激活位于内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 的干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING)^[17-18], 活化后的 STING 通过 ER-Golgi 复合体自 ER 易位到核周区域^[19]。在此过程中, TBK1 和 IRF3 被募集到 STING 相关的复合物中, TBK1 自磷酸化后使 IRF3 磷酸化、二聚化, 活化后的 IRF3 入核, 启动相关抗病毒基因的转录, 发挥抗病毒效应^[20-21]。cGAS-STING 信号通路在空间和时间上受到严格和精细的调节, 以确保在清除病原体感染的同时, 避免因免疫反应不足或过度对机体造成损伤^[8]。cGAS-STING 信号通路在 DNA 病毒诱导的先天免疫反应中发挥着关键作用, 各种 DNA 病毒进化出逃避宿主天然免疫功能^[9]。Gui 等报道, 使用 ISD、HT-DNA 等处理可以激活 cGAS-STING 信号通路介导的自噬^[22]。此外, 有研究显示 STING 可通过多种形式激活下游信号途径, 包括激活 IRF3、NF- κ B、调节自噬和诱导溶酶体细胞死亡 (lysosomal cell death, LCD)^[22]; 此外, STING 还可以通过被磷酸化^[23]、泛素化^[24]和形成蛋白复合物等发

挥功能^[25-26], 介导病毒逃避天然免疫^[27]。

ASFV 蛋白表达具有明显的时空顺序, 在病毒感染的不同时期发挥着功能, 如病毒蛋白酶加工多肽 pp220 和 pp62 对于病毒核心的组装是必要的^[28]; 跨膜蛋白 p54 对于将膜前体募集到装配区域至关重要^[29-30]; ASFV 编码的早期表达蛋白 DP96R, 通过抑制 TBK1 和 IKK β 负调控 NF- κ B 的信号转导和 I 型 IFN 的表达, 进而介导病毒的免疫逃逸^[31]。ASFV MGF-505-7R 通过促进自噬相关蛋白 ULK1 的表达降解 STING, 负调控 STING 依赖性的抗病毒反应^[32]。ASFV E199L 通过与 PYCR2 相互作用, 通过下调 PYCR2 的表达诱导自噬^[33]。

有文献报道, ASFV Armenia/07 株拮抗 cGAS-STING 介导的 IFN 信号通路的转导, 抑制 IFN- β 的表达^[34]。ASFV 蛋白 E248R 是病毒晚期表达的结构蛋白, 位于病毒粒子的内膜, 介导病毒的膜融合^[35]。E248R 的缺陷病毒颗粒, 不影响病毒的组装和释放, 但该缺陷病毒的感染性和复制能力对比野生型病毒降低约 100 倍。然而, E248R 是否参与调控 cGAS-STING 通路还未见报道。本研究旨在探究 ASFV E248R 调控 I 型干扰素分泌的分子机制, 扩展对非洲猪瘟的免疫逃逸的认知, 为疫苗的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

pRK-HA-cGAS、pRK-HA-STING、pRK-HA-TBK1、pRK-HA-IRF3 和 pRK-HA-IRF7 表达质粒由武汉大学舒红兵教授馈赠; pCMV-Flag-E248R (GenBank No. MK333180.1) 和 pRL-TK、pIFN- β -Luc 和 IRF1-Luc 质粒由家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存; 小鼠抗 HA、Flag 和 β -actin 单克隆抗体购于 Merck 公

司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠的 IgG 购于 Santa Cruze 公司; 激光共聚焦 20 mm 培养皿购自 NEST 公司; Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 594 小鼠抗体、Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 594 兔源抗体均购自 Cell Signaling 公司; 人胚胎肾细胞 (HEK293)、猪肾细胞 (PK-15) 和人宫颈癌细胞 (HeLa) 购自 ATCC; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega) 和 HT-DNA 购自 Sigma 公司。

1.2 双荧光素酶报告系统试验 (dual-luciferase reporter assay system)

将 HEK293 细胞使用 0.05% 胰酶处理后, 加入适量培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM; 10% fetal bovine serum, FBS) 铺 48 孔板, 在 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养, 待细胞融合度在 75% 左右时, 将 pRK-HA-cGAS (100 ng)、pRK-HA-STING (100 ng)、pRL-TK (20 ng)、pIFN- β -Luc (100 ng) 和 pCMV-Flag-E248R (图 1A) 或空载体共转染至 HEK293 细胞中, 24 h 后收集样品处理, 检测样品。

使用 HEK293 细胞 (DMEM, 10%FBS) 铺 48 孔板, 培养约 10 h 后, 将 pRL-TK (20 ng)、pIFN- β -Luc (100 ng) 和 pCMV-Flag-E248R (图 1B) 或空载体共转染至 HEK293 细胞中, 16 h 后转染 HT-DNA (500 ng), 再培养 8 h, 处理并检测样品。

将 pRL-TK (20 ng)、pIRF1-Luc (100 ng) 和 pCMV-Flag-E248R (图 1C) 或空载体共转染至 HEK293 细胞中 (48 孔板), 16 h 后转染 IFN- γ (50 ng/mL), 再培养 12 h, 进行双荧光报告系统检测。

1.3 免疫共沉淀试验

将 HEK293 使用 0.05% 胰酶消化后, 加入适量培养基充分混匀, 转移至培养皿 (100 mm) 中培养, 待单层细胞融合度在 75% 左右时, 将 pCMV-Flag-E248R (2 μ g) 分别与 pRK-HA-cGAS

(4 μ g)、pRK-HA-STING (3 μ g)、pRK-HA-TBK1 (6 μ g)、pRK-HA-IRF3 (2 μ g) 或 pRK-HA-IRF7 (5 μ g) 共转染至 HEK293 细胞中; 24 h 后弃去上层培养基, 收集细胞。加入 NP-40 裂解液 (50 mmol/L Tris (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 2 mg/mL aprotinin, 2 mg/mL leupeptin, 1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride), 4 °C 旋转摇床裂解 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。吸取 80 μ L 离心取上清, 加入 20 μ L 5 \times 上样缓冲液, 置于 100 °C 金属浴中加热 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 置于 -20 °C 备用; 剩余上清平均分为两份, 加入适量 IgG 或 HA 抗体, 加入 50 μ L Protein G, 加入 NP-40 裂解液补至 1 mL, 4 °C 旋转摇床孵育 3 h, 使用 0.5 mol/L NaCl NP40 裂解液清洗 G 蛋白琼脂糖珠, 清洗 3 次; 加入 60 μ L 2 \times 上样缓冲液, 置于 100 °C 金属浴中加热后离心, 进行 Western blotting 检测。

1.4 免疫印迹分析

将 pRK-HA-STING (200 ng)、pCMV-Flag-E248R (0、3 和 6 μ g) 或空载体质粒转染至 HEK293 细胞 (6 孔板), 24 h 后弃去上清, 收集细胞样品, 加入 100 μ L 缓冲液, 100 °C 金属浴加热 10 min, 之后 12 000 r/min 离心 10 min。将处理后的样品上样, 进行 SDS-PAGE。电泳后将蛋白转印至 NC 膜。随后用 5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 然后加入一抗 4 °C 水平摇床孵育过夜, 使用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 暗室显影。

将 pCMV-Flag-E248R (0、2、4 和 6 μ g) 或空载体转染至 HeLa 细胞中 (6 孔板), 24 h 后收取细胞, 加入 100 μ L 缓冲液, 置于 100 °C 金属浴作用 10 min, 随后 12 000 r/min 离心 10 min。将样品加入 SDS-PAGE 梳孔中, 先使用 60 V 电泳 30 min, 再使用 150 V 电泳至条带合适。转膜时, 调整电压为 100 V 转膜 60 min, 随后将

NC 膜置于 5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中封闭 30 min, 加入一抗室温 1 h 或 4 °C 慢摇床过夜, 使用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗, 室温慢摇床 1 h, 使用 TBST 洗涤 3 次后, 暗室显影。

1.5 相对定量 PCR

使用 SYBR 方法进行相对定量 PCR 检测。收集细胞样品, 用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 以其为模板 (100 ng) 进行反转录获取 cDNA。将反转录后的 cDNA 进行适当稀释, 以 GAPDH 作为内参基因, 检测相应细胞因子的转录水平。将 pCMV-Flag-E248R (3 μg) 或空载体转染至 PK-15 细胞中 (12 孔板) 培养 12 h, 之后转染 HT-DNA (2 μg) 再培养 12 h, 收集细胞提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 进行相对定量 PCR 检测。反应程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 3 s; 60 °C 10 s, 40 个循环。相对定量引物 (猪源) 序列如表 1 所示 (引物由兰州天启基因公司合成), 应用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 mRNA 的转录水平变化。

1.6 激光共聚焦实验

将 HEK293 细胞消化后转移至共聚焦皿中培养, 将 pRK-Flag-E248R (3 μg) 质粒和 pRK-HA-STING 质粒 (2 μg) 共转染至 HEK293 细胞中, 置于 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养 18 h 后, 收集细胞样品。弃去上清, 用 PBS

清洗 2 次; 4% 多聚甲醛作用 10 min; 用 0.02% Triton X-100 处理细胞 15 min; 用 5% BSA 封闭 30 min; 分别用 Flag 或 HA 标签抗体孵育, 4 °C 过夜, 用 PBST 洗 3 次, 5 min/次。再用抗兔和抗鼠染色, 室温作用 1 h, 加入 PBST 洗 3 次。最后用 DAPI 染色 15 min, 随后用 PBST 洗 3 次。样品处理完成后使用显微镜扫描成像。

2 结果与分析

2.1 E248R 蛋白抑制 cGAS-STING 或 HT-DNA 诱导的 IFN-β 的激活

为探究 ASFV E248R 蛋白是否作用于 cGAS-STING 信号通路, 在 HEK293 细胞中共转染了 pRK-Flag-E248R 或空载体、pRK-HA-cGAS (100 ng)、pRK-HA-STING (100 ng)、pRL-TK (20 ng)、pIFN-β-Luc (100 ng), 24 h 后收取细胞样品, 进行检测分析发现, E248R 抑制 cGAS-STING 诱导的 IFN-β 启动子的活化。将 pCMV-Flag-E248R 或空载体、pRL-TK (20 ng)、pIFN-β-Luc (100 ng) 转染至 HEK293 细胞中, 16 h 后转染 HT-DNA (500 ng) 作用 8 h, 收取细胞样品, 进行检测分析发现, E248R 抑制 HT-DNA 诱导的 IFN-β 启动子的活化。将 pCMV-Flag-E248R 或 pCMV-Flag 空载、pRL-TK (20 ng)、pIRF1-Luc (100 ng) 质粒转染至 HEK293 细胞中,

表 1 相对定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for relative quantitative PCR in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	
<i>GAPDH</i>	Forward:	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	Reverse:	GACAAGCTTCCC GTTCTCAG
<i>IFNB1</i>	Forward:	TTGTTGAGAACCTCCTGGCT
	Reverse:	TGACTATGGTCCAGGCACAG
<i>RANTES</i>	Forward:	GGCAGCCCTCGCTGTCATCC
	Reverse:	GCAGCAGGGTGTGGTGTCCG
<i>TNF-α</i>	Forward:	GCCAAGGACTCAGATCATC
	Reverse:	GGCATTGGCATACCCACTCT
<i>IL-6</i>	Forward:	CTGCTTCTGGTGATGGCTACTG
	Reverse:	GGCATCACCTTTGGCATCTT

16 h 后加入 IFN- γ (50 ng/mL), 使其终浓度为 50 ng/mL, 再孵育 12 h。收取细胞样品, 进行双荧光素酶报告系统检测, 结果显示, E248R 对 IFN- β 诱导的 IRF1 启动子的激活没有明显作用。结果显示, E248R 可明显地抑制 cGAS-STING 和 HT-DNA 所诱导的 IFN- β 启动子的活化 (图 1A、B), 但对 IFN- γ 诱导的 IRF1 启动子的活化无抑

制作用 (图 1C)。在 PK-15 细胞中转染 (12 孔板) pCMV-Flag-E248R (3 μ g) 质粒或者 pCMV-Flag 空载体, 培养 18 h, 之后转染 HT-DNA (2 μ g) 刺激 12 h, 发现在 PK-15 细胞中过表达 E248R 后, 可显著地抑制 *IFNBI*、*RANTES*、*IL-6* 和 *TNF- α* 基因的转录水平 (图 1D)。以上结果表明, 过表达 E248R 蛋白可抑制 cGAS-STING 信号通路。

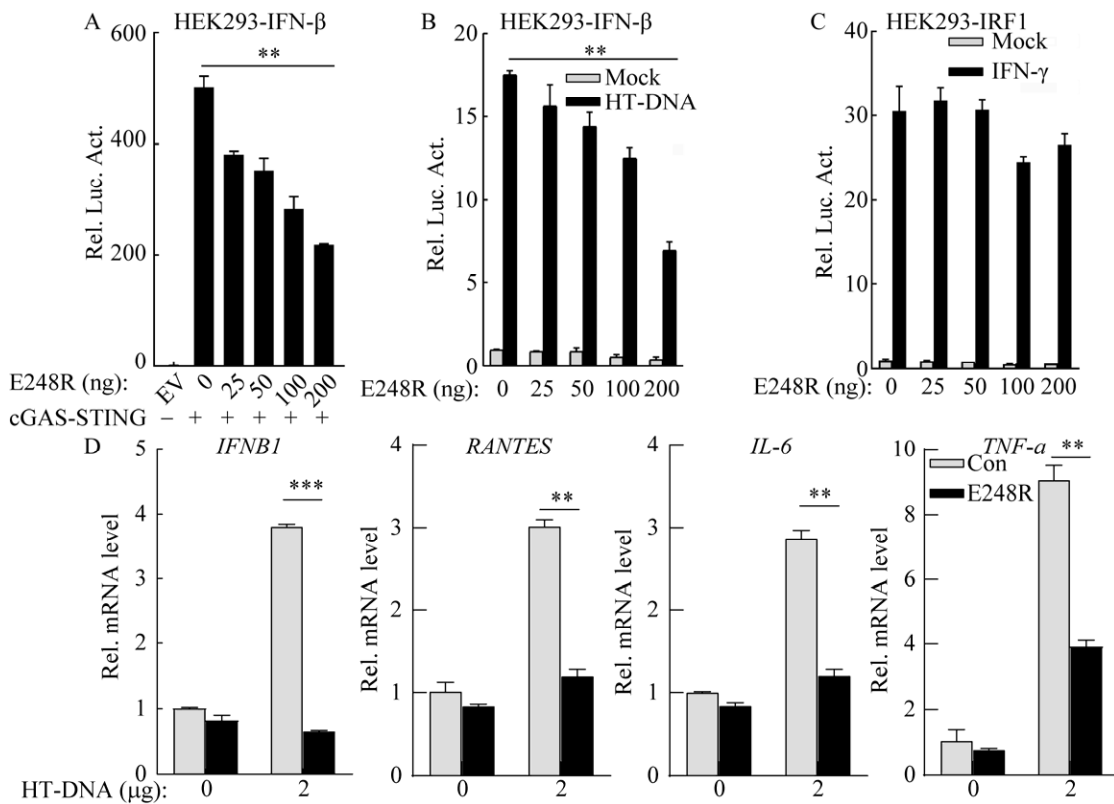


图 1 E248R 蛋白抑制 cGAS-STING 和 HT-DNA 诱导的 IFN- β 的激活

Figure 1 E248R inhibited the activation of IFN- β induced by cGAS-STING or HT-DNA. (A) E248R inhibited cGAS-STING-induced IFN- β activation in a dose-dependent manner. HEK293 cells were transfected with pIFN- β -Luc (100 ng), pRL-TK-Luc (20 ng) reporter plasmid, pRK-HA-cGAS (100 ng), pRK-HA-STING (100 ng), and increased amounts of the pCMV-Flag-E248R for 24 h followed by luciferase assays. (B) E248R inhibited HT-DNA-induced IFN- β activation in a dose-dependent manner. HEK293 cells were transfected with pIFN- β -Luc and pRL-TK-Luc reporter plasmid and increased amounts of the pCMV-Flag-E248R for 18 h. Then transfected HT-DNA (500 ng) for 8 h by luciferase assays. (C) HEK293 cells were transfected with pIRF1-luc and pRL-TK-luc reporter plasmid and increased amounts of the pCMV-Flag-E248R for 18 h. Then added IFN- γ (50 ng/mL) for 12 h followed by luciferase assays. (D) E248R inhibited HT-DNA-induced transcription of antiviral genes in PK-15 cells. PK-15 cells were transfected with pCMV-Flag-E248R (3 ng) or vector for 18 h, then transfected HT-DNA (500 ng) for 12 h followed by relative quantitative PCR analysis. All of the above experiments were repeated three times with similar results. EV: empty vector; Mock: control; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.2 E248R 与 STING 相互作用

前文已经证实, E248R 可以抑制 cGAS-STING 信号通路, 为探究 E248R 作用于 cGAS-STING 通路的靶标蛋白, 我们将 pCMV-Flag-E248R 分别与 pRK-HA-cGAS、pRK-HA-STING、pRK-HA-TBK1、pRK-HA-IRF3 或 pRK-HA-IRF7 共转染至 HEK293 细胞 (100 mm 细胞培养皿), 24 h 后收取细胞样品进行处理。通过免疫共沉淀试验发现, E248R 与 STING 存在相互作用 (图 2A)。将 HEK293 细胞消化后转移至共聚焦

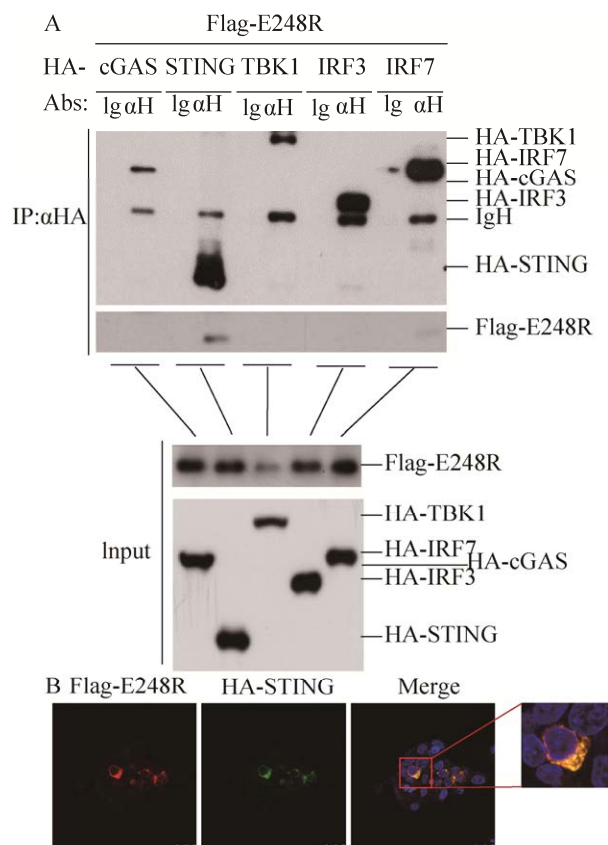


图 2 E248R 与 STING 相互作用

Figure 2 Interaction between E248R and STING. (A) HEK293 cells were transfected with pE248R and HA-cGAS, HA-STING, HA-TBK1, HA-IRF3, or HA-IRF7 for 24 h followed by coimmunoprecipitation and immunoblot analysis with the indicated antibodies. (B) Colocalization E248R with STING. HEK293 cells were transfected with Flag-E248R and HA-STING for 18 h followed by confocal microscopy.

小皿培养, 置于温箱中培养约 10 h, 共转染 pCMV-Flag-E248R (3 μ g) 质粒和 pRK-HA-STING 质粒 (2 μ g), 18 h 后收取样品处理。通过激光共聚焦试验发现, E248R 与 STING 存在共定位现象 (图 2B)。以上结果表明, E248R 与 STING 相互作用。

2.3 过表达 E248R 抑制 STING 蛋白的表达

STING 蛋白经修饰后, 其特性和功能发生改变, 在天然免疫过程中起着重要作用。上述试验证明 E248R 与 STING 相互作用, 为探究 E248R 与 STING 的作用机制, 我们进行了以下试验。在 HEK293 细胞 (12 孔板) 中转染 pRK-HA-STING (200 ng) 和不同剂量的 pCMV-Flag-E248R (0、3 或 6 μ g) 或空载体, 通过蛋白免疫印迹分析发现, 随着 Flag-E248R 转染量的增加, HA-STING 蛋白条带明显减弱 (图 3A); 此外, 在 HeLa 细胞中 (12 孔板) 转染不同剂量的 pCMV-Flag-E248R (0、2、4 或 6 μ g), 通过蛋白印迹分析, 显示内源性 STING 的蛋白条带明显减弱, 与图 3A 结果一致 (图 3B)。以上结果显示, E248R 可抑制 STING 的表达。

3 讨论

ASFV 是一种严重危害生猪养殖业的烈性传染病, 感染猪只死亡率高, 目前没有商品化的疫苗或特效药物对其进行防治, 防控难度大。ASFV 基因组大, 编码蛋白多, 其复杂的免疫逃逸策略增加了疫苗研发的困难。据文献报道, ASFV MGF360-12L 可以通过阻断核转运蛋白和 NF- κ B 信号通路的相互作用进而抑制 I 型 IFN 的产生^[36]; ASFV E199L 和 E248R 在膜融合和核心渗透过程中发挥着关键作用, 但缺失 E248R 不影响病毒的组装和释放^[37-38]。Rodríguez 等报道, E248R 对形成感染性的子代病毒是必

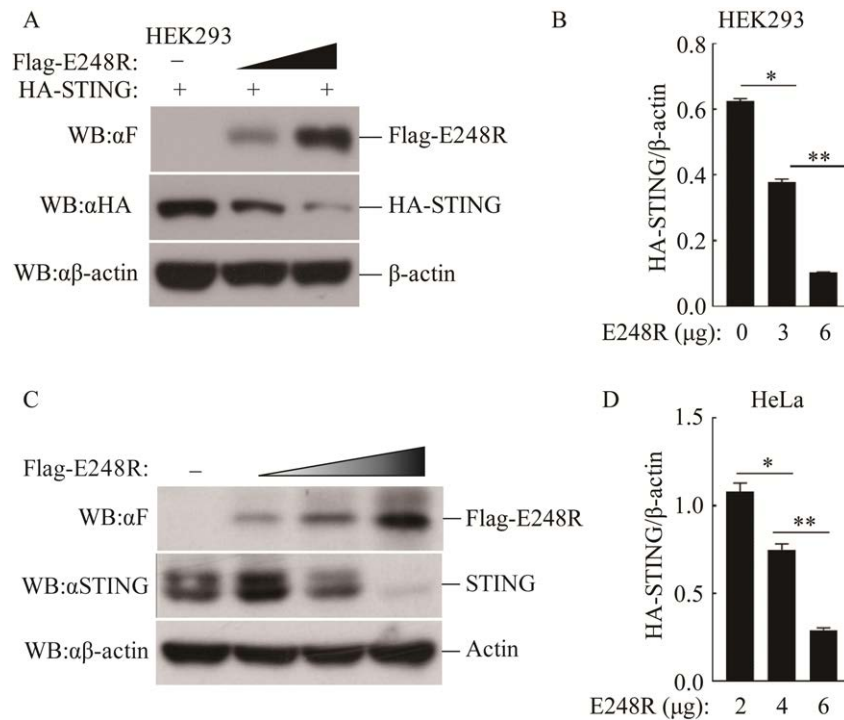


图3 过表达 E248R 抑制 STING 蛋白的表达

Figure 3 Overexpression of E248R inhibited the expression of STING. (A) pRK-HA-STING and increased amounts of pCMV-Flag-E248R were co-transfected to HEK293 cells, and collected the cells after 24 h for Western blotting analysis. (B) The ratio of HA-STING/ β -actin in HEK293 cells from three independent experiments. (C) Transfected increased amounts of pCMV-Flag-E248R into HeLa cells for 24 h and the cell were collected for Western blotting analysis. (D) The ratio of STING/ β -actin in HeLa cells from three independent experiments. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

需的,野生型病毒的感染性是缺失 E248R 病毒的 100 倍^[37]。因此,探究 ASFV E248R 蛋白调控天然免疫的机制,扩展对病毒致病机制的认知,对疫苗的研制具有重要意义。

ASFV E248R 与痘病毒 L1 蛋白在功能上具有相似性, L1R 是一种位于感染性病毒粒子表面的豆蔻酰化蛋白,含有分子内二硫键,是中和抗体的重要靶标蛋白^[39]。本研究证实,过表达 E248R 抑制 cGAS-STING 和 HT-DNA 诱导的 IFN- β 启动子的激活水平,过表达 E248R 抑制 IFNB1 等相关抗病毒基因的转录水平。试验结果表明, E248R 通过 cGAS-STING 信号通路发挥抑制天然免疫的功能;通过免疫共沉淀试验发现, E248R 与 STING 存在相互作用;激光共

聚焦试验提示,二者存在共定位现象,这表明, E248R 是通过靶标蛋白 STING 作用于 cGAS-STING 信号通路;过表达试验证实, E248R 剂量依赖性地抑制 STING 表达,与在 HeLa 细胞中的试验结果一致,结果表明, E248R 抑制 STING 的表达。

本研究证实, E248R 通过抑制 STING 蛋白的表达,进而抑制 cGAS-STING 信号通路介导的天然免疫反应,揭示了 ASFV 逃避宿主天然免疫应答的新策略。

REFERENCES

- [1] Wang N, Zhao D, Wang J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly.

- Science, 2019, 366(6465): 640-644.
- [2] Baranwal VK, Singh P, Jain RK, et al. First report of garlic virus X infecting garlic in India. *Plant Dis*, 2011, 95(9): 1197.
- [3] Kleiboeker SB, Scoles GA, Burrage TG, et al. African swine fever virus replication in the midgut epithelium is required for infection of *Ornithodoros ticks*. *J Virol*, 1999, 73(10): 8587-8598.
- [4] 王清华, 任炜杰, 包静月, 等. 我国首例非洲猪瘟的确诊. *中国动物检疫*, 2018, 35(9): 1-4.
Wang QH, Ren WJ, Bao JY, et al. The first outbreak of African swine fever was confirmed in China. *China Animal Heal Insp*, 2018, 35(9): 1-4 (in Chinese).
- [5] Galindo I, Alonso C. African swine fever virus: a review. *Viruses*, 2017, 9(5).
- [6] Hernaez B, Escribano JM, Alonso C. Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera. *Virology*, 2006, 350(1): 1-14.
- [7] Breese SS, Jr., Deboer CJ. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, 1966, 28(3): 420-428.
- [8] Hu MM, Shu HB. Cytoplasmic mechanisms of recognition and defense of microbial nucleic acids. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2018, 34: 357-379.
- [9] Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 927-974.
- [10] Beutler B, Jiang Z, Georgel P, et al. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 353-389.
- [11] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650.
- [12] Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, et al. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*, 2009, 10(10): 1065-1072.
- [13] Zhang Z, Yuan B, Bao M, et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*, 2011, 12(10): 959-965.
- [14] Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 2013, 339(6121): 786-791.
- [15] Li XD, Wu J, Gao D, et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science*, 2013, 341(6152): 1390-1394.
- [16] Song ZM, Lin H, Yi XM, et al. KAT5 acetylates cGAS to promote innate immune response to DNA virus. *PNAS*, 2020, 117(35): 21568-21575.
- [17] Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 2009, 461(7265): 788-792.
- [18] Zhong B, Yang Y, Li S, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*, 2008, 29(4): 538-550.
- [19] Almine JF, O'hare CA, Dunphy G, et al. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat Commun*, 2017, 8: 14392.
- [20] Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(9): 501-521.
- [21] Zhu H, Zheng C. The race between host antiviral innate immunity and the immune evasion strategies of herpes simplex virus 1. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2020, 84(4).
- [22] Gui X, Yang H, Li T, et al. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*, 2019, 567(7747): 262-266.
- [23] Wang S, Wang L, Qin X, et al. ALDH2 contributes to melatonin-induced protection against APP/PS1 mutation-prompted cardiac anomalies through cGAS-STING-TBK1-mediated regulation of mitophagy. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 119.
- [24] Tian M, Liu W, Zhang Q, et al. MYSM1 represses innate immunity and autoimmunity through suppressing the cGAS-STING pathway. *Cell Rep*, 2020, 33(3): 108297.
- [25] Chen X, Yang X, Zheng Y, et al. SARS coronavirus papain-like protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-TRAF3-TBK1 complex. *Protein Cell*, 2014, 5(5): 369-381.
- [26] Fu YZ, Su S, Gao YQ, et al. Human cytomegalovirus tegument protein UL82 inhibits STING-mediated signaling to evade antiviral immunity. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(2): 231-243.
- [27] Hu MM, Shu HB. Innate immune response to

- cytoplasmic DNA: mechanisms and diseases. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 79-98.
- [28] Andrés G, Alejo A, Salas J, et al. African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell. *J Virol*, 2002, 76(24): 12473-12482.
- [29] Neilan JG, Zsak L, Lu Z, et al. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, 2004, 319(2): 337-342.
- [30] Petrovan V, Murgia MV, Wu P, et al. Epitope mapping of African swine fever virus (ASFV) structural protein, p54. *Virus Res*, 2020, 279: 197871.
- [31] Wang X, Wu J, Wu Y, et al. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(3): 437-443.
- [32] Li D, Yang W, Li L, et al. African swine fever virus MGF-505-7R negatively regulates cGAS-STING-mediated signaling pathway. *J Immunol*, 2021, 206(8): 1844-1857.
- [33] Chen S, Zhang X, Nie Y, et al. African swine fever virus protein E199L promotes cell autophagy through the interaction of PYCR2. *Viol Sin*, 2021, 36(2): 196-206.
- [34] García-Belmonte R, Pérez-Núñez D, Pittau M, et al. African swine fever virus Armenia/07 virulent strain controls interferon beta production through the cGAS-STING pathway. *J Virol*, 2019, 93(12): e02298-18.
- [35] Hernández B, Guerra M, Salas ML, et al. African swine fever virus undergoes outer envelope disruption, capsid disassembly and inner envelope fusion before core release from multivesicular endosomes. *PLoS Pathog*, 2016, 12(4): e1005595.
- [36] Zhuo Y, Guo Z, Ba T, et al. African swine fever virus MGF360-12L inhibits type I interferon production by blocking the interaction of importin α and NF- κ B signaling pathway. *Viol Sin*, 2021, 36(2): 176-186.
- [37] Rodríguez I, Nogal ML, Redrejo-Rodríguez M, et al. The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event. *J Virol*, 2009, 83(23): 12290-12300.
- [38] Matamoros T, Alejo A, Rodríguez JM, et al. African swine fever virus protein pE199L mediates virus entry by enabling membrane fusion and core penetration. *Mbio*, 2020, 11(4): e00789-00720.
- [39] Senkevich TG, White CL, Koonin EV, et al. Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *PNAS*, 2002, 99(10): 6667-6672.

(本文责编 陈宏宇)