



动物病毒学专栏

猪圆环病毒 3 型衣壳蛋白(Cap)抑制宿主细胞天然免疫应答

赵振翔^{1,2} 朱紫祥² 杨帆² 曹伟军² 李莎莎² 康慧^{1,2} 杨孝朴^{*1} 郑海学^{*2}

1 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原学国家重点实验室 口蹄疫国家参考实验室
甘肃 兰州 730046

摘要:【背景】猪圆环病毒是引起猪圆环病毒病的病原，能够引起严重的免疫抑制和临床症状，给养猪业造成严重的经济损失。【目的】研究猪圆环病毒 3 型(Porcine circovirus 3, PCV3)衣壳蛋白(Capsid protein, Cap)对宿主天然免疫应答的调控作用，解析其免疫抑制机制对阐明猪圆环病毒致病机制具有重要意义。【方法】通过构建 Cap 真核表达质粒，利用 Western blotting 进行表达验证，实时荧光定量(RT-PCR)、双荧光素酶基因报告系统和 ELISA 探究 Cap 对 I 型干扰素通路活化的影响，通过免疫共沉淀探索其作用机制。【结果】真核表达质粒成功表达并且证实 Cap 可以抑制 DNA 模拟物 Poly(dA:dT)诱导的 I 型干扰素通路的活化；Cap 可以与天然免疫通路节点分子 MITA 相互作用。【结论】研究发现 PCV3 病毒 Cap 蛋白与干扰素通路节点分子 MITA 相互作用发挥免疫抑制作用，这为阐明 PCV3 免疫抑制机制提供了理论依据。

关键词: PCV3, 衣壳蛋白(Cap), 干扰素, 信号通路

Inhibition effect of PCV3 capsid protein on innate immune response of host cells

ZHAO Zhen-Xiang^{1,2} ZHU Zi-Xiang² YANG Fan² CAO Wei-Jun² LI Sha-Sha²
KANG Hui^{1,2} YANG Xiao-Pu^{*1} ZHENG Hai-Xue^{*2}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

2 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot and Mouth Diseases Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China

Abstract: [Background] Porcine circovirus causes porcine circovirus associated disease, severe immunosuppression and clinical symptoms in pigs, causing substantial economic losses. [Objective] To study the role of porcine circovirus 3 (PCV3) capsid protein (Cap) in regulating host innate immune response, we constructed a eukaryotic plasmid expressing PCV3 protein Cap. [Methods] The expression of Cap was verified by Western blotting. The real-time quantification PCR (RT-PCR), dual luciferase gene

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500702-2); Frontier Exploration Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (1610312017003)

*Corresponding authors: E-mail: YANG Xiao-Pu: yangxpu@gsau.edu.cn; ZHENG Hai-Xue: haixuezheng@163.com

Received: 02-03-2019; Accepted: 23-04-2019; Published online: 20-05-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500702-2); 中国农业科学院前沿探索项目(1610312017003)

*通信作者: E-mail: 杨孝朴: yangxpu@gsau.edu.cn; 郑海学: haixuezheng@163.com

收稿日期: 2019-03-02; 接受日期: 2019-04-23; 网络首发日期: 2019-05-20

reporting system and ELISA assay were used to study the effect of Cap on type I interferon pathway activation, and the Co-immunoprecipitation was done to study the involved antagonistic mechanism.

[Results] The expression of Cap was verified, suggesting that Cap was highly expressed in the transfected cells, and Cap inhibited the activation of type I interferon signaling pathway stimulated by a synthetic DNA, poly(dA:dT). The interaction of Cap with the adaptor protein MITA of innate immune signaling pathway was identified. **[Conclusion]** These results indicate that Cap plays an important role in inhibiting the innate immune response of host cells by interacting with MITA. Our study provides a theoretical basis for clarification of the molecular mechanisms for PCV3-mediated immune suppression.

Keywords: PCV3, Capsid protein (Cap), Interferon, Signal pathway

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是圆环病毒科圆环病毒属的重要成员之一,是目前报道的最小的无囊膜 DNA 病毒^[1-2]。成熟的病毒粒子是由 60 个衣壳蛋白质(Capsid protein, Cap)亚基组装成的正二十面体球形颗粒,直径为 17 nm–20 nm,病毒的基因组包裹于其中,是由 1 767–1 768 个碱基组成的单链环状 DNA,编码 3 个主要的开放阅读框(Open reading frames, ORFs): Cap、Rep 和 ORF3。Cap 是 PCV 唯一的结构蛋白质和主要抗原,Rep 是病毒复制相关的酶,而 ORF3 的功能不清楚^[3]。

在 2016 年前,PCV 仅报道有 PCV1 和 PCV2 两个基因型^[2]。PCV1 最初被鉴定为 PK-15 细胞培养物的污染物^[4],而且对猪无致病性^[5]。与 PCV1 不同,PCV2 感染猪并引起严重的临床症状,造成巨大的经济损失。PCV2 是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原^[6],与猪皮炎和肾病综合征(Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)^[7]、猪呼吸道疾病综合征(Porcine respiratory disease complex, PRDC)^[8]、繁殖障碍^[9]、增生性坏死性肺炎(Proliferative and necrotizing pneumonia, PNP)^[10]和肠炎^[11-12]等疾病密切相关,均为猪圆环病毒相关疾病(Porcine circovirus associated disease, PCVAD)^[13-14]。

2016 年 10 月,加州大学 San Francisco 分校 Phan 等和 Kansas 州立大学的 Palinski 等几乎在同一时间报道了一个新的 PCV 基因型,并将其命名为 PCV3^[15-16]。PCV3 是通过 PCR 和宏基因组测序从发生断奶仔猪多系统衰竭综合征等病症的母猪或仔猪体内检测到的,且发病猪 PCV-2 检测为阴性。

2017 年 3 月,我国在广东省的猪群中首次检测到了 PCV3^[17]。

天然免疫系统是机体抵御病原微生物入侵的第一道防线。病原分子模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)是其重要的组成部分,PRRs 识别病原微生物,启动抗细菌或抗病毒反应,在天然免疫应答中发挥着极其重要的作用^[18]。病原微生物感染宿主细胞后,PRRs 通过识别病原微生物的病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular pattern, PAMPs),促进下游干扰素与细胞因子的分泌,激活大量抗菌或抗病毒蛋白的表达,抑制病原的复制,最终促进细胞对病原微生物的清除^[19]。目前人们已经发现并深入研究了 RIG-I 样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)、NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)和胞质 DNA 受体等 PRRs。其中胞质 DNA 受体中的 cGAS 是细胞识别 DNA 病毒的一类模式识别受体,其通过 cGAS-MITA 信号通路诱导 I 型干扰素和炎症因子的产生,在抗病毒天然免疫反应中发挥着重要的作用^[20]。

PCV-2 致病的一个重要原因是其感染猪后能够引起严重的免疫抑制,而关于 PCV3 对宿主的免疫抑制研究仍未见报道。Cap 作为 PCV-3 的衣壳蛋白,其对天然免疫应答的调控作用仍不清楚。本研究构建了 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒,对其表达情况进行了验证,并研究了 Cap 对 I 型干扰素通路活化的影响,证实其能够抑制 I 型干扰素通路的活化,抑制天然免疫应答,发挥免疫抑制作用。本研究为深入研究 PCV3 发挥免疫抑制的机制提供理论依据,为阐明 PCV3 的致病机制提

供新的研究数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞和质粒

PK-15 细胞、HEK-293T 细胞(ATCC 库), 双荧光素酶报告基因质粒 pGL-ISRE、Prl-TK 及真核表达质粒 pCAGGS、pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap (融合表达含有 FLAG 标签的 PCV3-Cap 蛋白)、pcDNA3.1-HA-cGAS、pRK-HA-MITA、pRK-HA-TBK1、pRK-HA-IRF3、pRK-HA-IRF7 (融合表达含有 HA 标签的各类宿主蛋白)均由本实验室保存。

1.1.2 抗体

小鼠抗 FLAG 单抗、小鼠抗 HA 单抗、小鼠抗 β -Actin 单抗, Sigma 公司; HRP 山羊抗小鼠 IgG, 北京博奥龙公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、1%青霉素和链霉素溶液、0.25%胰酶溶液, Gibco 公司; 胎牛血清, Biological Industries 公司; 质粒提取试剂盒, Omega 公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、反转录酶 M-MLV、RNA 酶抑制剂、GLOMAX 化学发光检测仪, Promega 公司; Oligo(dT)18 引物、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、SYBR Premix *Ex Taq*、DNA 限制性核酸内切酶, TaKaRa 公司; Poly(dA:dT)、脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000, Invitrogen 公司; 蛋白酶抑制剂和琼脂粉, Roche 公司; QuantiCyto[®]人 IFN- β ELISA 试剂盒, 欣博盛公司。凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; ABI 梯度 PCR 仪、CO₂ 恒温培养箱、QuanStudio5 定量 PCR 仪, Thermo 公司。

1.2 方 法

1.2.1 真核表达质粒的构建

参考 Porcine circovirus 3 strain 29160 毒株 (GenBank 登录号: KT869077)的 Cap 基因序列合成 Cap 基因片段, 在 PCV3-Cap 序列上、下游分别引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I, 连接于 pCAGGS 真核

表达载体上, 测序验证, 获得 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒。

1.2.2 Western blotting 检测

HEK-293T 细胞接种至细胞培养皿, 细胞密度达到 75%–90%时, 分别用脂质体转染相应的质粒, 36 h 后收取并处理细胞样品, 加入蛋白上样缓冲液, 98 °C 变性 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 随后转印至 NC 膜, 用 5%的脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜后, 加入小鼠抗 FLAG/HA/ β -Actin 的一抗, 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, HRP 山羊抗小鼠 IgG 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 化学发光液, 用蛋白发光印记仪曝光检测。

1.2.3 RNA 提取及 cDNA 合成

用 Trizol 裂解法提取总 RNA: 将 35 mm 细胞培养皿中的细胞用 PBS 洗一次后, 加入 1 mL Trizol 反复吹打裂解, 移入 1.5 mL 无 RNase Eppendorf 离心管中, 室温裂解 5 min, 加入 200 μ L 氯仿振荡混匀后 4 °C 放置 5 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 小心吸取上清至新的无 RNase 的 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 并加入等体积的异丙醇沉淀 RNA, -20 °C 放置 30 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 用 75% DEPC 处理水配制的乙醇洗涤离心管, 4 °C、7 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 再次离心 3 min, 小心吸取上清, 晾干, 加入 20 μ L 无 RNase 水溶解 RNA, 测定 RNA 浓度。

反转录反应体系(20 μ L): 5 \times First buffer 4 μ L, DTT (0.1 mol/L) 2 μ L, Oligo(dT)18 引物 (50 μ mol/L) 1 μ L, Random primer (100 μ mol/L) 0.5 μ L, RNA 酶抑制剂 RRI 1 μ L, M-MLV 反转录酶 1 μ L, dNTP mixture (10 mmol/L) 1 μ L, RNA 模板 4.5 μ L, DEPC 水 5 μ L。

参照王国庆等^[21]的方法设计反应条件: 25 °C 10 min, 37 °C 60 min, 72 °C 15 min, 4 °C 保存备用。

1.2.4 双荧光素酶基因报告系统

将 HEK-293T 细胞接种至 24 孔板中, 细胞密

度达到 75%–90%后, 每组样品设立 3 个平行孔, 每孔中分别转染萤火虫荧光素酶报告质粒 ISRE (Interferon-stimulated responsive element)-luc 100 ng、海肾荧光素酶内参报告质粒 PRL-TK 10 ng 和 pCAGGS 空载体或不同剂量的 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒(200、400、800 ng), 并保证每孔细胞接收相同的质粒(不够的用空载体补齐)。转染 24 h 后, 再次转染 1 μg /孔的 Poly (dA:dT), 20 h 后利用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光强度, 所有结果至少重复 3 次。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

将 HEK-293T 细胞或 PK-15 细胞接种至 35 mm 细胞培养皿中, 细胞密度达到 75%–90%后, 将 pCAGGS 空载体和 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒分别转染细胞, 24 h 后根据实验需要转染 Poly(dA:dT), 20 h 后收取细胞样品, 提取细胞的总 RNA, 按照反转录酶体系将 RNA 反转录成 cDNA, 用对应的定量引物进行 PCR 检测(表 1)。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 The primers used for real-time PCR

基因 Gene	引物序列 Primers sequence (5'→3')
Human-GAPDH	F: CGGGAAGCTTGTGATCAATGG R: GGCAGTGATGGCATGGACTG
Human-IFN- β	F: GACATCCCTGAGGAGATTAAG R: ATGTTCTGGAGCATCTCATAG
Human-ISG15	F: TGGACAAATGCGACGAACC R: CCCGCTCACTTGCTGCTT
Human-ISG54	F: ACGGTATGCTTGGAAACGATTG R: AACCCAGAGTGTGGCTGATG
Human-MXA	F: TCTTCATGCTCCAGACGTAC R: CCAGCTGTAGGTGTCCTTG
Porcine-GAPDH	F: ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA R: GATCGAGTTGGGGCTGTGACT
Porcine-IFN- β	F: CTAACAAGTGCATCCTCCAAA R: AGCACATCATAGCTCATGGAAAAGA
Porcine-ISG15	F: GATCGGTGTGCCTGCCTTC R: CGTTGCTGCGACCCTTGT
Porcine-ISG54	F: CACCTCTGGACTGGCAATAGC R: GTCAGGATTCAGCCGAATGG
Porcine-MXA	F: GCGTGGGAATCAGTCATG R: AGGAAGGTCTATGAGGGTCAGATCT

RT-PCR 反应体系(20 μL): SYBR Premix *Ex Taq* 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , DEPC 水 8.2 μL , cDNA 1 μL , 总体积 20 μL 。

RT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 共 40 个循环, 同时进行熔解曲线分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析不同基因相对表达量。

1.2.6 ELISA 实验

将 HEK-293T 细胞接种至 35 mm 细胞培养皿中, 细胞密度达到 75%–90%后, 将 pCAGGS 空载体和 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒分别转染细胞, 24 h 后根据实验需要转染 Poly(dA:dT), 20 h 后收取细胞培养上清, ELISA 检测 IFN- β 的分泌量。具体操作步骤如下: (1) 根据实验需要准备所需的板条; (2) 空白孔加标准品和通用稀释液, 其余相应孔中加标本或不同浓度的标准品(100 μL /孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 90 min; (3) 洗板 5 次; (4) 空白孔加生物素化抗体稀释液, 其余孔加入生物素化抗体工作液(100 μL /孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 60 min; (5) 洗板 5 次; (6) 空白孔加酶结合物稀释液, 其余孔加入酶结合物工作液(100 μL /孔), 用新封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光孵育 30 min; (7) 洗板 5 次; (8) 加入底物显色液(TMB) 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光孵育 15 min; (9) 加入终止液 100 μL /孔, 混匀后即刻测量 OD_{450} 值。

1.2.7 免疫共沉淀实验(Co-IP)

将 HEK-293T 细胞接种至 10 cm 细胞培养皿中, 细胞密度达到 75%–90%后, 将 pcDNA3.1-HA-cGAS、pRK-HA-MITA 真核表达质粒分别与 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒共同转染 HEK-293T 细胞。36 h 后吸掉培养基, 加入裂解液(50 mmol/L pH 8.0 Tris, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 2 mg/L Aprotinin, 2 mg/L Leupeptin, 1 mmol/L Phenylmethanesulfonyl fluoride), 冰上孵育 30 min

并收集液体, 12 000 r/min 离心 10 min。取适量上清加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min 后离心进行 Western blotting, 剩余上清加入 FLAG 或 HA 抗体 4 °C 旋转摇床孵育过夜, 再加入 G 蛋白琼脂糖珠, 4 °C 旋转摇床孵育 4 h, 用裂解液洗 3 次后加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸, 进行 Western blotting 检测。

2 结果与分析

2.1 PCV3-Cap 真核表达载体的构建

将合成并且测序正确的 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 质粒利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 内切酶进行双酶切鉴定, 利用 1% 琼脂糖凝胶核酸电泳检测到一条大小约为 700 bp 的插入序列, 而空载体未检测到插入序列(图 1)。将提取的质粒再次送样测序, 测序验证序列正确插入, 获得 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒。

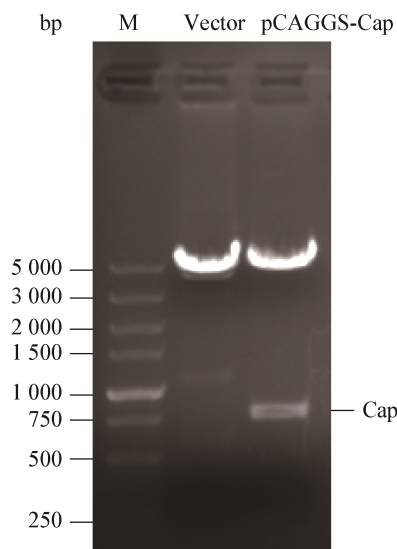


图 1 Cap 真核表达质粒的鉴定

Figure 1 Identification of Cap eukaryotic expression plasmid

注: 将 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 质粒和空载体利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 内切酶进行双酶切鉴定。

Note: The pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap was identified by double restriction enzyme digestion with *EcoR* I and *Xho* I endonuclease.

2.2 PCV3-Cap 真核表达质粒的表达验证

将 2 μ g pCAGGS 空载体或 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 质粒分别转染 HEK-293T 细胞, 转染 36 h 后收取细胞, 利用 FLAG 单抗进行 Western blotting 检测, 结果检测到大约 35 kD 大小的蛋白条带(图 2), 与预期大小相符合, 表明 PCV3-Cap 蛋白成功表达。

2.3 PCV3-Cap 蛋白对 I 型干扰素通路活化的影响

为研究 Cap 对天然免疫应答的影响, 利用双荧光素酶基因报告系统检测 PCV3-Cap 蛋白对 I 型干扰素通路活化的影响。分别将 200、400、800 ng 的 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 质粒与 100 ng ISRE-luc 报告质粒和 10 ng PRL-TK 内参质粒共转染 HEK-293T 细胞, 用相应空载体确保每一个孔细胞接收相同量的质粒, 转染 24 h 后, 再次转染 1 μ g/孔的 Poly(dA:dT), 20 h 后利用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光强度。结果如图 3 所示, PCV3-Cap 蛋白可以显著抑制 Poly(dA:dT)诱导的 ISRE 启动子的活化, 说明 PCV3 病毒蛋白 Cap 能够抑制 I 型干扰素通路的激活。

为鉴定 PCV3-Cap 蛋白抑制 I 型干扰素通路活化靶向的节点分子, 利用双荧光素酶基因报告系统检测分析了 PCV3-Cap 蛋白对 cGAS 通路节点分子诱导的 ISRE 活化的影响。将 400 ng 的 pCAGGS-

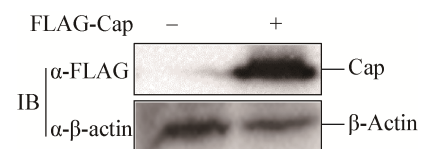


图 2 蛋白质印记法检测 Cap 蛋白的表达

Figure 2 The expression of Cap protein detected by Western blotting

注: HEK-293T 细胞转染 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 质粒后, 用抗 FLAG 抗体进行免疫印迹检测(α -FLAG 为用抗 FLAG 抗体检测, α - β -actin 为用抗 β -Actin 抗体进行检测)。

Note: HEK-293T cells were transfected with pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap plasmid and immunoblotted with anti-FLAG antibody (α -FLAG is detected by anti-FLAG antibody, α - β -actin for detection by anti- β -actin antibody).

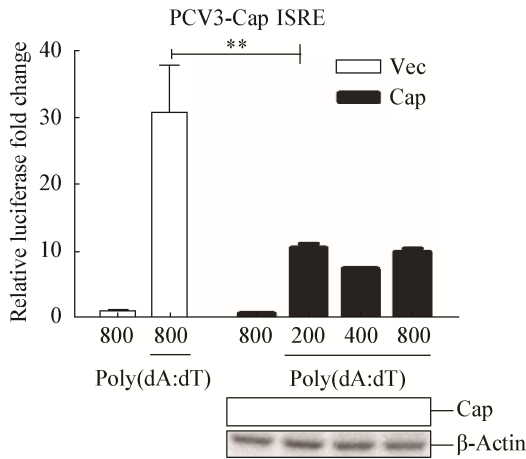


图3 Cap抑制Poly(dA:dT)诱导的ISRE启动子激活

Figure 3 Cap inhibited poly(dA:dT)-induced activation of the ISRE promoter

注：分别将不同质量的 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 质粒与 ISRE-luc 报告质粒和 PRL-TK 内参质粒共转染 HEK-293T 细胞，转染 24 h 后，Poly(dA:dT)刺激，20 h 后收取细胞样品，利用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光强度。

Note: Different quantity pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap plasmids were co-transfected into HEK-293T cells with ISRE-luc reporter plasmid and PRL-TK internal reference plasmid, and stimulated by poly(dA:dT) after 24 h. After 20 h, the cell samples were collected and the fluorescence intensity was detected using a dual luciferase reporter gene kit.

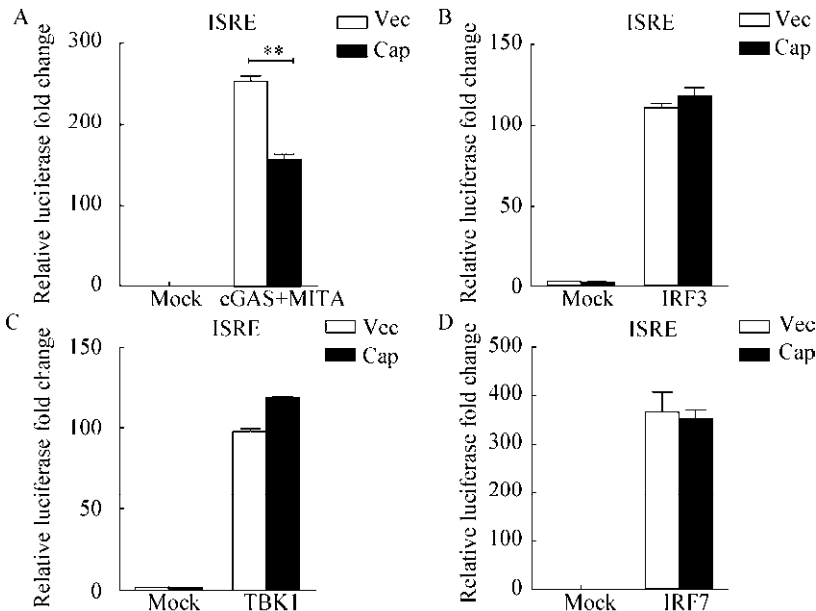


图4 Cap抑制cGAS+MITA诱导的ISRE启动子激活

Figure 4 Cap inhibited the activation of ISRE promoter induced by cGAS+MITA

注：将 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 质粒、ISRE-luc 报告质粒、PRL-TK 内参质粒分别和节点分子 cGAS-MITA、TBK1、IRF3 或 IRF7 真核表达质粒共转染 HEK-293T 细胞，利用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光强度。

Note: The pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap plasmid, the ISRE-luc reporter plasmid, the PRL-TK internal reference plasmid and the node molecule cGAS-MITA, TBK1, IRF3 or IRF7 plasmid were co-transfected into HEK-293T cells, and the fluorescence intensity was detected using a dual luciferase reporter gene kit.

FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒、100 ng ISRE-luc 报告质粒、10 ng PRL-TK 内参质粒分别和 100 ng 的节点分子 cGAS-MITA、TBK1、IRF3 或 IRF7 真核表达质粒共转染 HEK-293T 细胞，用相应空载体确保每一个孔细胞接收相同的质粒，转染 24 h 后利用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光强度。结果如图 4 所示，PCV3 病毒蛋白 Cap 通过 cGAS-MITA 通路中 cGAS-MITA 抑制 I 型干扰素的激活。

2.4 PCV3-Cap 蛋白对 I 型干扰素及相关细胞因子表达的影响

为进一步研究 Cap 是否通过抑制 I 型干扰素、促炎性因子及干扰素诱导的抗病毒基因(Interferon-stimulated genes, ISGs)的表达发挥免疫抑制效应。将 HEK-293T 细胞或 PK-15 细胞接种至 35 mm 细胞培养皿中，细胞密度达到 75%–90%后，将 pCAGGS 空载体和 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒分别转染细胞，转染 24 h 后，再次转染 3 μg/孔的 Poly(dA:dT)，20 h 后收取细胞样品，提取细

细胞的总 RNA, 在将 RNA 反转录成 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 检测; 同时收取细胞培养上清进行 ELISA 检测。如图 5 所示, 表明在 HEK-293T 细胞 (A-D) 和 PK-15 细胞 (E-H) 上, PCV3-Cap 蛋白能够显著抑制 I 型干扰素、干扰素诱导的抗病毒基因 ISG15、ISG54 及 MXA 的表达。

同时, 如图 6 所示, ELISA 检测结果表明在 HEK-293T 细胞上, PCV3-Cap 蛋白能够显著抑制 Poly(dA:dT) 诱导的 I 型干扰素 IFN- β 的分泌。

2.5 PCV3-Cap 蛋白对 cGAS 和 MITA 表达的影响

cGAS-MITA 为 PCV3-Cap 蛋白抑制 I 型干扰素

通路活化的潜在靶点, 为了进一步研究 PCV3-Cap 蛋白对 cGAS 和 MITA 的调控机制, 研究了 PCV3-Cap 蛋白对 cGAS 和 MITA 的表达影响。将 pCAGGS 空载体和 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒分别与 pcDNA3.1-HA-cGAS 和 pRK-HA-MITA 真核表达质粒共同转染细胞, 转染 36 h 后收取细胞, 利用 Western blotting 和实时荧光定量 PCR 分别检测 cGAS 和 MITA 蛋白及 mRNA 的表达水平。结果如图 7 所示, PCV3-Cap 蛋白对 cGAS 和 MITA 蛋白及 mRNA 表达均没有抑制作用, 表明 PCV3 病毒蛋白 Cap 抑制 I 型干扰素的表达不是通过抑制 cGAS 和 MITA 的表达实现的。

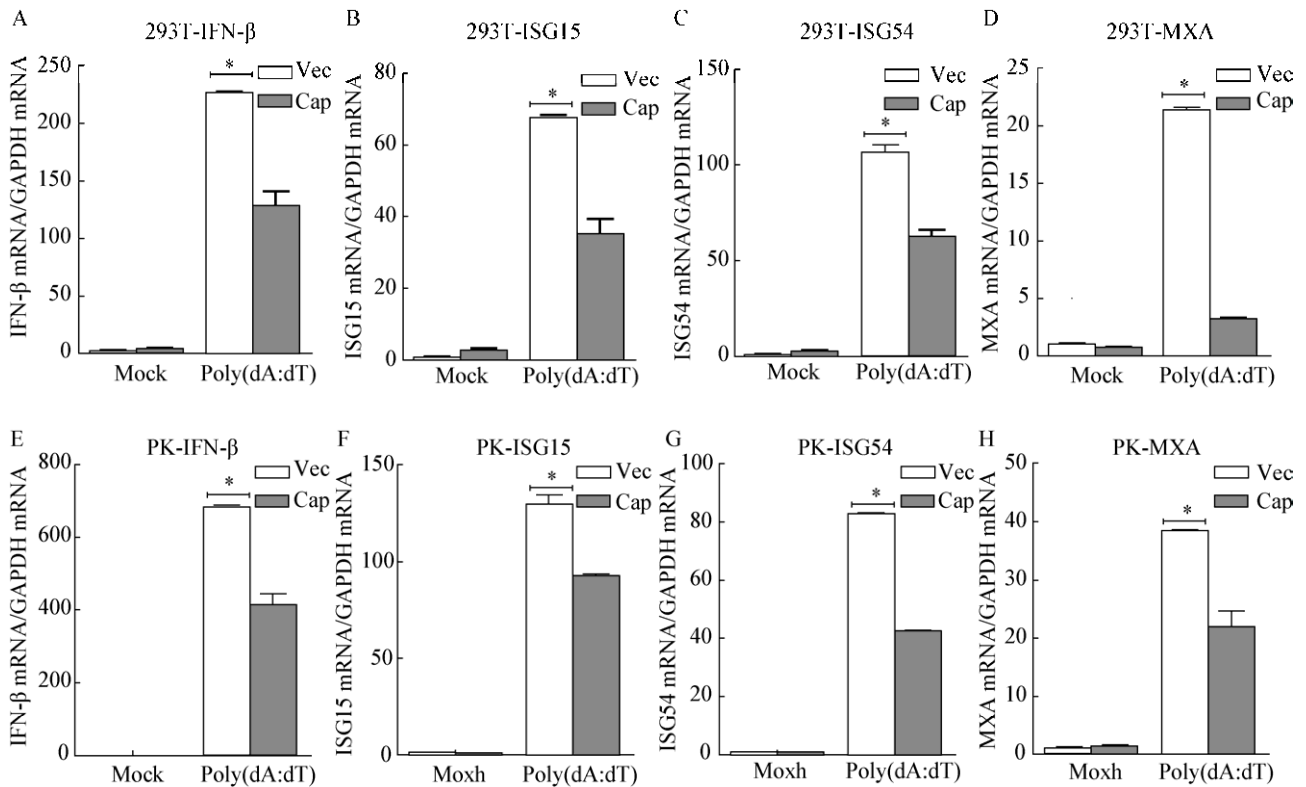


图 5 Cap 对 Poly(dA:dT) 诱导的 I 型干扰素及相关细胞因子表达的影响

Figure 5 The inhibitory effect of Cap on the expression of type I IFN and ISGs

注: 将 pCAGGS 空载体和 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒分别转染细胞, 转染 24 h 后, Poly(dA:dT) 刺激, 20 h 后收取细胞样品, 提取细胞总 RNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测。

Note: The pCAGGS empty vector and the pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap eukaryotic expression plasmid were transfected into the cells, and stimulated by poly(dA:dT) after 24 h. After 20 h, the cell samples were collected and the total RNA of the cells was extracted for real-time quantitative PCR.

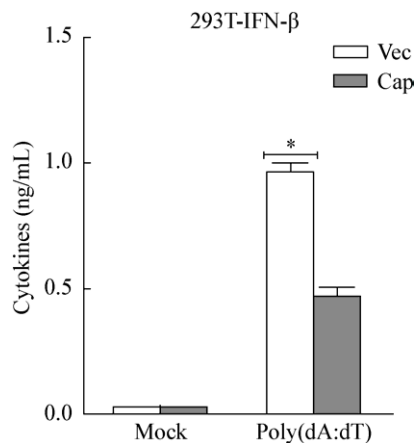


图6 Cap对Poly(dA:dT)诱导的IFN- β 蛋白表达的影响
Figure 6 Evaluation of the inhibitory effect of Cap on the production of IFN- β induced by poly(dA:dT)

注: 将pCAGGS空载体和pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap真核表达质粒分别转染细胞, 转染24 h后, Poly(dA:dT)刺激, 20 h后收取细胞培养上清, 进行ELISA检测。

Note: The pCAGGS empty vector and the pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap eukaryotic expression plasmid were transfected into cells independently, and stimulated by poly(dA:dT) after 24 h. After 20 h, the cell culture supernatant was collected for ELISA.

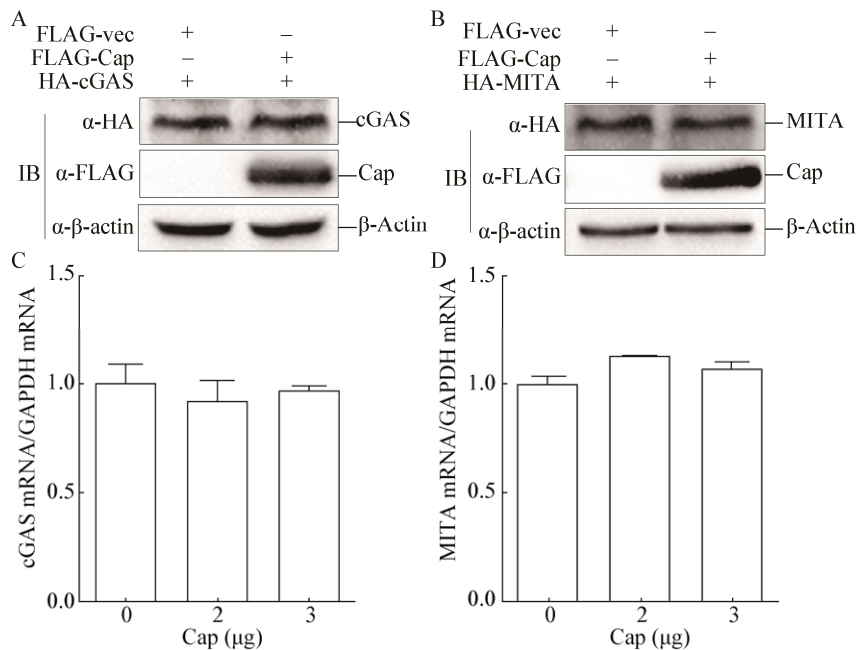


图7 Cap对cGAS和MITA蛋白及mRNA表达水平的影响

Figure 7 The effect of Cap on the protein and mRNA expression of cGAS and MITA

注: 将pCAGGS空载体和pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap真核表达质粒分别与pcDNA3.1-HA-cGAS和pRK-HA-MITA真核表达质粒共同转染细胞, 用抗FLAG、HA抗体进行免疫印迹检测(α -FLAG为用抗FLAG抗体检测, α -HA为用抗HA抗体检测, α - β -actin为用抗 β -Actin抗体进行检测), 且通过实时荧光定量PCR检测mRNA表达变化。

Note: The pCAGGS empty vector and pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap eukaryotic expression plasmid were transfected into pcDNA3.1-HA-cGAS and pRK-HA-MITA eukaryotic expression plasmids respectively, and immunoblotted with anti-FLAG and anti-HA antibody (α -FLAG is detected by anti-FLAG antibody, α -HA is detected by anti-HA antibody, α - β -actin for detection by anti- β -actin antibody) and detection of mRNA expression changes by real-time fluorescent quantitative PCR.

2.6 PCV3-Cap蛋白与cGAS和MITA相互作用检测

为进一步挖掘PCV3-Cap蛋白抑制cGAS和MITA介导的I型干扰素通路活化机制, 采用免疫共沉淀实验检测PCV3-Cap蛋白与cGAS及MITA的相互作用。将pCAGGS空载体和pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap真核表达质粒分别与pcDNA3.1-HA-cGAS和pRK-HA-MITA真核表达质粒共同转染细胞, 转染36 h后收取细胞, 进行Western blotting检测。如图8所示, 免疫共沉淀结果表明, PCV3-Cap蛋白不与cGAS发生相互作用(图8A), 但能够与MITA发生相互作用(图8B), 说明PCV3病毒蛋白Cap可能通过与MITA相互作用, 进而抑制天然免疫信号通路的活化。

3 讨论

猪圆环病毒(PCV)是引起断奶仔猪多系统衰竭

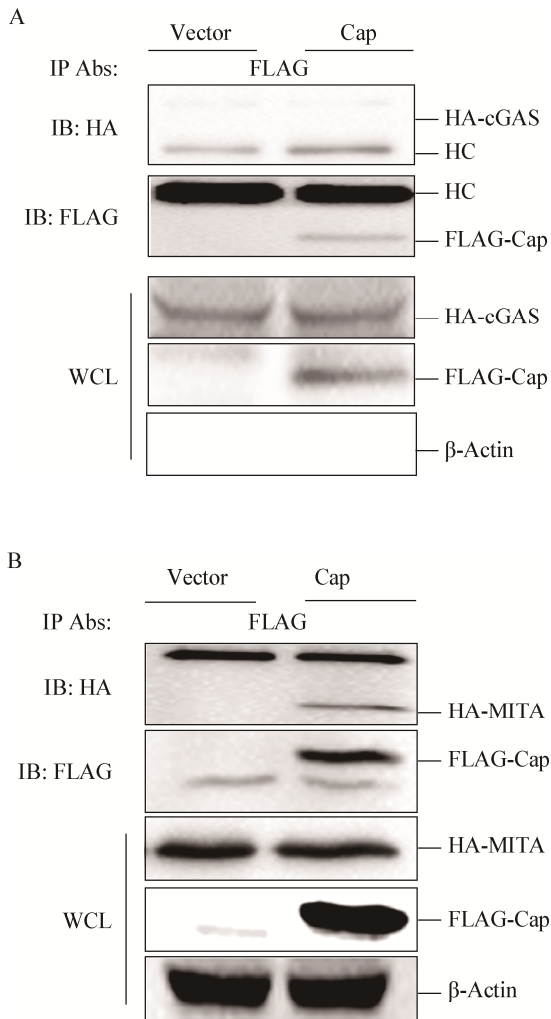


图 8 Cap 与 cGAS 及 MITA 相互作用检测

Figure 8 Assay of interactions between Cap and cGAS or MITA

注: 将 pCAGGS 空载体和 pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap 真核表达质粒分别与 pcDNA3.1-HA-cGAS 和 pRK-HA-MITA 真核表达质粒共同转染细胞, 裂解细胞, 用抗 FLAG 抗体进行免疫沉淀并用抗 FLAG、抗 HA 抗体进行免疫印迹分析(α -FLAG 为用抗 FLAG 抗体检测, α -HA 为用抗 HA 抗体检测, α - β -actin 为用抗 β -Actin 抗体进行检测).

Note: The pCAGGS empty vector and the pCAGGS-FLAG-PCV3-Cap eukaryotic expression plasmid were co-transfected with pcDNA3.1-HA-cGAS and pRK-HA-MITA eukaryotic expression plasmid, respectively. These cells were lysed and subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG antibody prior to immunoblot analysis with anti-FLAG and anti-HA antibodies (α -FLAG is detected by anti-FLAG antibody, α -HA is detected by anti-HA antibody, α - β -actin for detection by anti- β -actin antibody).

综合征(PMWS)的主要病原, 其中 PCV1 不致病, PCV2 已经被证实可以通过 cGAS-MITA 信号通路抑制天然免疫反应^[22]。PCV3 已成为世界养猪产业面临的一个新的威胁, 但其致病力、流行病学、分子生物学研究等处于初步研究阶段。关于 PCV3 感染的机制至今仍然未有报道, 本研究通过构建 PCV3 衣壳蛋白(PCV3-Cap)的真核表达质粒, 开展了 PCV3-Cap 蛋白对天然免疫应答的调控研究。结果证实 PCV3-Cap 具有抑制 I 型干扰素通路活化的功能, 其能够抑制 IFN- β 、ISG15、ISG54、和 MXA 等细胞因子的表达, 说明 PCV3-Cap 会造成细胞的天然免疫应答抑制, 这也暗示了感染 PCV3 的仔猪为何会经常伴随着猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)、猪肺炎支原体、细菌性败血症和肺炎等其他疾病的发生。张冰晨^[22]研究发现 PCV2 病毒可以抑制 cGAS-MITA 通路, 分别在未感染和感染 PCV2 的猪睾丸细胞 ST 中加入 cGAMP 刺激, 发现感染了 PCV2 的细胞相对于未感染细胞中的 IFN- β 表达显著降低, 对 IRF3 磷酸化水平的检测也发现, PCV2 感染会抑制 IRF3 的磷酸化, 导致下游级联反应减弱, 从而使干扰素表达水平降低, 进而表明 PCV2 对 cGAS-MITA 通路存在抑制作用, 但其分子机制并不清楚。近期研究已成功拯救了猪 PCV3 型病毒, 并证实其感染 4-8 周龄小猪后可引起典型的临床症状, 而在病原与 KLH 共同接种动物后, KLH 并不能有效增强免疫保护作用。虽然在感染猪只体内检测到了大量干扰素的表达, 但此时病毒已经大量复制, 突破了天然免疫的限制, 引发了严重的病变。因此, 病原可能在早期限制了天然免疫应答, 促进病原大量复制, 后期即使干扰素表达水平上升, 也不能完全限制病毒的复制^[23]。

本研究通过双荧光素酶报告系统筛选发现, Cap 通过 cGAS-MITA 通路抑制干扰素报告基因的表达, 进一步发现 Cap 不会抑制 cGAS 和 MITA 在蛋白和 mRNA 水平的表达, 通过 Co-IP 实验发现 Cap 不与 cGAS 发生相互作用, 而与 MITA 发生相

互作用。有研究报道显示病毒蛋白通过作用于 MITA 进而抑制 MITA-TBK1-IRF3 复合体或者 MITA 二聚体、寡聚体的形成,从而抑制天然免疫反应,逃避抗病毒免疫^[24-26];也有报道显示病毒蛋白通过抑制 MITA 的 K63 泛素化从而逃避天然免疫反应^[27]。Cap 是通过抑制 MITA-TBK1-IRF3 复合体的形成,还是通过抑制 MITA 泛素化从而抑制天然免疫反应还需要进一步深入研究。

虽然关于 PCV3 感染后其病毒 DNA 抑制 I 型干扰素表达的机制仍不清楚,但本实验初步证实 PCV3-Cap 通过作用于 cGAS-MITA 通路中的 MITA 抑制 I 型干扰素通路的活化,进而抑制天然免疫抗病毒反应,这为深入开展 PCV3 致病机制研究奠定了理论基础,为 PCV3 防控提供了新的视角。

4 结论

本文首先构建了 PCV3-Cap 的真核表达质粒并验证其成功表达,通过双荧光素酶报告系统筛选发现 Cap 蛋白能够抑制 I 型干扰素通路的激活,并且是通过 cGAS-MITA 通路中的 cGAS-MITA 实现的;进一步实验发现 Cap 抑制 I 型干扰素的表达不是通过抑制 cGAS 和 MITA 的表达实现的,而是通过与 MITA 相互作用抑制天然免疫信号通路的活化。

REFERENCES

- [1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA[J]. *Nature*, 1982, 295(5844): 64-66
- [2] Ellis J. Porcine circovirus: a historical perspective[J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(2): 315-327
- [3] Chen GH, Sun Y, Zhou L, et al. Prokaryotic expression of porcine circovirus 3 Cap and preparation of monoclonal antibodies against PCV3[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(1): 13-19 (in Chinese)
陈桂华, 孙媛, 周玲, 等. 猪圆环病毒 3 型 Cap 蛋白的表达纯化及单克隆抗体的制备[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(1): 13-19
- [4] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines[J]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 1974, 226(2): 153-167
- [5] Tischer I, Mielsch W, Wolff D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[J]. *Archives of Virology*, 1986, 91(3/4): 271-276
- [6] Baekbo P, Kristensen CS, Larsen LE. Porcine circovirus diseases: a review of PMWS[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2012, 59 (Suppl 1): 60-67
- [7] Phaneuf LR, Ceccarelli A, Laing JR, et al. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome associated with porcine circovirus 2 infection in a Yorkshire pig[J]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2007, 46(3): 68-72
- [8] Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex[J]. *The Veterinary Journal*, 2003, 166(3): 251-256
- [9] Karuppappan AK, Ramesh A, Reddy YK, et al. Emergence of porcine circovirus 2 associated reproductive failure in southern India[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(3): 314-320
- [10] Levente S, Csaba S. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2008, 56(1): 101-109
- [11] Opriessnig T, Madson DM, Roof M, et al. Experimental reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated enteritis in pigs infected with PCV2 alone or concurrently with *Lawsonia intracellularis* or *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2011, 145(2): 261-270
- [12] Kim J, Ha Y, Jung K, et al. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2004, 68(3): 218-221
- [13] Ge XN, Wang F, Guo X, et al. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China[J]. *Virus Research*, 2012, 164(1/2): 100-106
- [14] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases[J]. *The Veterinary Journal*, 2005, 169(3): 326-336
- [15] Phan TG, Giannitti F, Rossow S, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 184
- [16] Palinski R, Piñeyro P, Shang P, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure[J]. *Journal of Virology*, 2016, 91(1): 01879-16
- [17] Shen H, Liu X, Zhang P, et al. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 264-266
- [18] Nürnberger T, Brunner F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4): 318-324
- [19] Rohmann K, Tschernig T, Pabst R, et al. Innate immunity in the human lung: pathogen recognition and lung disease[J].

- Cell & Tissue Research, 2011, 343(1): 167-174
- [20] Woo SR, Fuertes M, Corrales L, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors[J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 830-842
- [21] Wang GQ, Zhu ZX, Cao WJ, et al. Construction of porcine RIG-I eukaryotic expressing plasmid and its antiviral effects research against foot and mouth disease virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(4): 600-607 (in Chinese)
王国庆, 朱紫祥, 曹伟军, 等. 猪 RIG-I 真核表达载体的构建及其抗口蹄疫病毒作用研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(4): 600-607
- [22] Zhang BC. Studies on the immune regulation of cGAS-STING-STAT6 pathway in response to PCV2 invasion[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2017 (in Chinese)
张冰晨. cGAS-STING-STAT6 通路对猪圆环病毒 II 型免疫调控的初步研究[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2017
- [23] Jiang HJ, Wang D, Wang J, et al. Induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in piglets by infection with porcine circovirus type 3[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(4): e02045-18
- [24] Fu YZ, Su S, Gao YQ, et al. Human cytomegalovirus tegument protein ul82 inhibits STING-mediated signaling to evade antiviral immunity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2017, 21(2): 231-243
- [25] Qiang D, Cao XZ, Jie L, et al. Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity[J]. *Journal of Hepatology*, 2013, 59(1): 52-58
- [26] Choi HJ, Park A, Kang S, et al. Human cytomegalovirus-encoded US9 targets MAVS and STING signaling to evade type I interferon immune responses[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 125
- [27] Wang J, Yang S, Liu L, et al. HTLV-1 Tax impairs K63-linked ubiquitination of STING to evade host innate immunity[J]. *Virus Research*, 2017, 232: 13-21