



非洲猪瘟病毒编码蛋白功能研究进展

王晓丽¹ 孙蕾² 刘文军² 商营利^{*1}

1 山东省动物生物工程与疫病防治重点实验室 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271018

2 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室 中国科学院微生物研究所 北京 100101

摘要: 非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染家猪或野猪引起的一种急性、出血性、高度接触性传染病,其特征是病程短、高热和出血性病变,急性感染死亡率高达100%,严重威胁全球养猪业但目前尚未开发出有效的疫苗和治疗方法。ASFV是非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属的唯一成员,为大型双链DNA病毒,主要在巨噬细胞胞质中复制,其基因组约170–193 kb,含有150–167个开放阅读框,编码150–200种蛋白质。目前已知功能的病毒编码蛋白约有50个,大部分为病毒的结构蛋白,仍有一半以上的ASFV编码蛋白功能尚不清楚。除结构蛋白以外,病毒含有完整的酶和与病毒转录有关的因子,编码调节宿主细胞功能及与病毒免疫逃逸相关的蛋白等。本文综述了ASFV的结构蛋白、非结构蛋白以及参与免疫逃逸等相关蛋白功能的研究进展,以期ASFV病毒蛋白研究及疫苗研发提供相关借鉴。

关键词: 非洲猪瘟病毒, 结构蛋白, 非结构蛋白, 病毒复制, 免疫逃逸

Advances in the functions of African swine fever virus-encoded proteins

WANG Xiao-Li¹ SUN Lei² LIU Wen-Jun² SHANG Ying-Li^{*1}

1 Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

2 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: African swine fever (ASF) is an acute, hemorrhagic and severe infectious disease caused by African swine fever virus (ASFV) in domestic or wild pigs, which is characterized by short course, high fever and hemorrhagic lesions as well as 100% mortality rate of acute infection. So far, there is no effective vaccine available for ASF. ASFV is a large, double stranded DNA virus and the only member of

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0840402); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2017MC021); Shandong "Double Tops" Program

***Corresponding author:** Tel: 86-538-8240680; E-mail: shangyl@sdau.edu.cn

Received: 06-01-2019; **Accepted:** 28-04-2019; **Published online:** 14-05-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0840402); 山东省自然科学基金(ZR2017MC021); 山东省“双一流”学科建设专项经费

***通信作者:** Tel: 0538-8240680; E-mail: shangyl@sdau.edu.cn

收稿日期: 2019-01-06; **接受日期:** 2019-04-28; **网络首发日期:** 2019-05-14

the *Asfarviridae* family, *Asfivirus* genus, which replicates predominantly in the cytoplasm of macrophages. The genome of ASFV ranges in length from 170 to 193 kb depending on the isolate and contains 150 to 167 open reading frames (ORFs), encoding 150 to 200 proteins. However, only about 50 encoded proteins are functionally known and most of them are viral structure proteins. In addition to structure proteins, ASFV also have a full complement of enzymes and factors or other nonstructural proteins that are involved in regulation of the viral transcription, viral DNA repair, viral invasion of host cells, and viral-mediated modification of host cell function and evasion from host defense. In this review, we summarize the current knowledge of functions of ASFV-encoded proteins and anticipate to provide valuable information for future study and vaccine development.

Keywords: African swine fever virus, Structural proteins, Non-structural proteins, Viral replication, Immune evasion

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染猪引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,病程短,发病率和死亡率高。ASF 于 1921 年首发于非洲肯尼亚并蔓延至非洲多个地区;1957 年传到欧洲的葡萄牙;1971 年由西欧传入南美洲的古巴,随后南美洲国家陆续暴发疫情;2007 年传入欧亚接壤的高加索地区,2017 年传播至俄罗斯远东地区^[1]。2018 年 8 月,我国在辽宁省沈阳市发现首例非洲猪瘟病例^[2],随后迅速蔓延至全国 23 个省份,给养猪业造成严重的经济损失^[1-2]。ASFV 是非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属的唯一成员,也是目前已知的唯一的 DNA 虫媒病毒。ASFV 的基因组约 170–193 kb,含有 150–167 个开放阅读框(Open reading frames, ORFs),编码 150–200 种蛋白质,其中约 50 多种是病毒的结构蛋白。同时 ASFV 基因组还编码 DNA 复制、基因转录和 RNA 修饰酶类,以及调节宿主细胞功能和参与病毒免疫逃逸的相关蛋白^[3-5]。然而,目前仍有约一半以上的 ASFV 基因编码的蛋白功能尚不清楚。本文就 ASFV 主要结构蛋白、非结构蛋白以及参与免疫逃逸等相关蛋白功能的最新研究进展进行综述。

1 ASFV 主要结构蛋白

1.1 囊膜蛋白

ASFV 病毒粒子为二十面体结构,直径约 200 nm,是由核壳蛋白包裹的病毒基因组 DNA、

病毒内囊膜、病毒衣壳和外囊膜组成的。囊膜蛋白是构成病毒颗粒的主要结构蛋白,也是重要的表面抗原,与宿主细胞嗜性、致病性与免疫原性密切相关。已知功能的 ASFV 囊膜蛋白主要有 CD2v、p54、p12、p30、p17 和 p22 等^[6]。

CD2v 是 ASFV 外膜蛋白中唯一特征性病毒蛋白^[6],由 ORF EP402R 基因编码,也称为 pEP402R,蛋白大小约 45.3 kD。该蛋白类似于 T 淋巴细胞表面粘附受体 CD2,是由信号肽、跨膜区和两个免疫球蛋白样结构域组装而成的糖蛋白。由于猪红细胞表面具有 CD2 配体,因此 ASFV 能够非常容易地吸附到红细胞上。从病毒基因组中删除 EP402R 基因并不影响病毒感染猪引起的死亡率,但能够延迟病毒血症的发生和病毒向组织的传播,ASFV 感染细胞所致的红细胞吸附现象基本消失,表明 CD2v 介导红细胞吸附有助于病毒在宿主体内的扩散^[7]。另外,CD2v 胞质结构域一个显著特征是存在数目可变的富含脯氨酸重复序列,且不同分离株之间长度不同。已有研究发现,在 ASFV 感染的细胞中,该重复序列能够与肌动蛋白衔接蛋白 SH3P7 相互作用,共定位于核周病毒工厂周围区域,参与细胞囊泡转运和信号转导等^[8]。目前对于此串联重复序列变异的生物学意义尚不十分清楚,有研究发现 EP402R 基因的串联重复序列数量在不同毒株之间差异显著,提示这种遗传差异性可以作为一种新的遗传标记^[9],用于分析来自不同地区的 ASFV 毒株和建立基于 CD2v 蛋白胞外区的毒株

的血清群分类,从而跟踪病毒传播^[10]。CD2v 具有良好的免疫原性,可以用于 ASFV 亚单位疫苗研发的抗原蛋白^[11]。研究表明,人工缺失 CD2v 的 BA71ΔCD2 株能产生针对亲本病毒和异源病毒的交叉免疫保护,且能产生特异性 CD8⁺T 淋巴细胞,进一步证实了 CD2v 具有抑制淋巴细胞增殖的功能,为研制具有交叉免疫保护效果的疫苗提供了新的思路^[12]。

p54 是 ASFV 表达的早期膜蛋白,由 ORF E183L 基因编码,蛋白大小约 19.9 kD。p54 蛋白含跨膜结构域,定位于内质网衍生的内膜前体,在病毒吸附易感细胞和入侵过程中发挥重要作用^[13-15]。研究发现,ASFV 结构蛋白 p54 过表达可以促进细胞凋亡。深入研究表明 p54 能与胞质动力蛋白轻链 LC8 特异性相互作用,实现病毒在胞质内的转运。p54 与 LC8 相互作用的结构域含有一个 13 个氨基酸残基序列,该序列与促凋亡蛋白 Bim 具有一定的相似性。当 ASFV 感染后,p54-LC8 复合物能够利用该序列结合抗凋亡蛋白 Bcl-2,进而消除 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用,导致 Caspase-9、Caspase-3 活化,介导细胞凋亡^[16]。这是 ASFV 编码蛋白中首次被证实能诱导细胞凋亡的蛋白。另外,有研究表明 p54 具有免疫原性,能够刺激机体产生针对该蛋白的抗体^[17-18],可能是理想的 ASFV 亚单位疫苗抗原。

p12 是 ASFV 感染晚期表达的膜蛋白,由 ORF O61R 基因编码,蛋白大小为 6.7 kD,位于病毒内囊膜^[19]。纯化的 p12 能抑制 ASFV 与易感细胞特异性结合,表明 p12 和 ASFV 病毒颗粒都识别 Vero 细胞中的相同受体,p12 介导 ASFV 病毒颗粒与易感细胞的附着,但其作为附着蛋白的作用机制仍有待进一步研究^[15]。另外,利用 HEK293 细胞表达 p12 蛋白,纯化后免疫猪能产生针对 p12 的特异性抗体,表明 p12 具有一定的免疫原性^[11]。

p30 是 ASFV 表达的早期膜蛋白,由 ORF CP204L 基因编码,蛋白大小为 23.6 kD,通常在

感染后 2-4 h 产生,在整个感染期间持续表达,与病毒入侵宿主细胞有关^[20],p30 是 ASFV 重要的结构蛋白。目前 p30 被广泛用于 ASFV 血清学检测,基于重组蛋白 p30 的 ELISA 及免疫印迹法可以准确检测 ASFV 抗体,具有极高的特异性和灵敏性^[21-22]。基于 p30 的 DNA 疫苗能够刺激机体产生体液免疫和细胞免疫,表明 p30 是重要的抗原蛋白,可用于 ASF 疫苗研制^[17,23]。

p17 是 ASFV 表达的晚期膜蛋白,由 ORF D117L 基因编码,蛋白大小为 13.1 kD,位于病毒内膜的跨膜蛋白^[6]。与早期膜蛋白 p54 一样,p17 是病毒前体膜形成二十面体过程中所必需的中间体,而且对于病毒活力至关重要^[7]。当 p17 表达受抑制时,pp220 和 pp62 的蛋白水解加工被阻断,pp220 和 pp62 不能被切割成成熟的病毒蛋白,不能组装到含 DNA 的类核壳中,导致病毒组装成核壳缺陷的二十面体颗粒^[24]。

除以上主要蛋白以外,还有许多病毒蛋白包括 p22 (pKP117R)、pE248R、pE199L 以及 pH108R 等均位于病毒内囊膜上,其中 pE248R 和 pE199L 与病毒的入侵有关^[6]。

1.2 衣壳蛋白

病毒衣壳能保护病毒核酸免受环境中核酸酶或其他理化因素破坏,同时参与病毒的感染过程且具有良好的免疫原性,诱发机体的体液免疫和细胞免疫,这些免疫应答不仅有免疫防御作用,而且可引起免疫病理损伤,与病毒本身的致病性有关。ASFV 编码的衣壳蛋白目前已知的有 p72、p49 (pB438L)和 p14.5 (pE120R)。

p72 产生于病毒感染晚期,由 ORF B646L 基因编码,蛋白大小为 73.2 kD。p72 作为 ASFV 的重要抗原蛋白,是病毒二十面体的主要成分,对于病毒衣壳的形成至关重要^[19]。在病毒组装过程中,p72 从细胞质转移到内质网衍生内膜面上,当细胞质处于还原态内环境时,p72 与特定病毒伴侣分子 CAP80 相互作用并进行折叠。伴随着病毒的成熟,

p72 抗氧化能力增强^[15],这可能为病毒从细胞中释放做准备。p72 蛋白序列高度保守,并具有良好的抗原性。除可利用 p72 的单克隆抗体对病毒进行血清学检测外^[25],利用反向遗传操作构建表达 ASFV p72 的重组新城疫病毒(rNDV-p72)免疫小鼠后,能够产生较高滴度的 p72 特异性 IgG 抗体,还引发 T 细胞增殖和 IFN- γ 、IL-4 等细胞因子的分泌^[26]。

p49 也称为 pB438L,由 ORF B438L 基因编码,该蛋白没有疏水区,可能通过与病毒内膜上的蛋白相互作用结合到病毒的内膜上,表现为完整的膜蛋白。当缺乏 p49 时病毒所形成的病毒颗粒虽具有管状结构,但二十面体对称性丧失,通过免疫电镜对完整的病毒体或病毒颗粒进行观察,发现 p49 位于衣壳顶点附近,表明该蛋白在构建或稳定病毒颗粒的二十面体顶点过程中起重要作用^[6]。

p14.5 也称为 pE120R,表达于 ASFV 感染晚期,由 ORF E120R 基因编码,蛋白分子位于病毒工厂中。p14.5 与 p72 共同组成病毒颗粒的衣壳,在 ASFV 扩散时发挥重要作用。在病毒感染期间,p14.5 的 N-末端丙氨酸残基会被乙酰化,可能与 ASFV 生命周期有关^[7,27]。

1.3 核壳蛋白

ASFV 核衣壳形成于病毒的内膜下方,随后病毒 DNA 和核蛋白被包装并浓缩形成类核。在已知的 110 个 ASFV 高度保守的 ORFs 中,ORF CP2475L 和 CP530R 分别编码多聚蛋白前体 pp220 和 pp62,它们可以被蛋白酶水解切割成成熟的病毒蛋白,共同组装到含 DNA 的类核的核壳中^[6-7]。

多聚蛋白 pp220 是一个 N-豆蔻酰化的前体多肽,其肉豆蔻酰基部分可以起到膜锚定信号的作用,可以将发育中的核壳结合到病毒内部囊膜上,可作为内部核质体和核外层之间的蛋白质支架,促发空壳体的装配,因此 pp220 是核壳组装的必需成分^[23]。pp220 在 SUMO1 样蛋白酶水解加工后产生主要结构蛋白包括 p150、p37、p34、p14 及最近鉴定的 p5 等^[6]。pp62 是病毒 DNA 复制的

晚期表达蛋白,在病毒复制、病毒颗粒核芯的正确组装和成熟过程中发挥重要作用,抑制 pp62 表达则会导致出现大部分空的病毒粒子^[28]。pp62 可以被 S273R 蛋白酶水解切割成成熟的病毒体蛋白 p35、p15 及最近鉴定的 p8,其中 p5 和 p8 均为 ASFV 病毒颗粒的结构组分,它们随其他多聚蛋白成熟产物共同被包装到核芯中^[6]。多聚蛋白的加工过程与病毒组装同时发生,pp220 和 pp62 的加工依赖于主要衣壳蛋白 p72 的表达,而 pp62 的加工则需要 pp220 前体的表达,表明两种多聚蛋白前体彼此相互作用有利于形成核壳样病毒结构域^[29]。

1.4 DNA 结合蛋白

ASFV 病毒基因组被蛋白包裹形成病毒的类核。免疫电镜显示两种 DNA 结合蛋白 p10 (pK78R) 和 pA104R 均位于成熟的病毒粒子的类核中,可能在病毒类核的组装过程发挥作用^[6]。其中 pA104R 是一个类组蛋白的蛋白,可能参与病毒的转录、DNA 复制及基因组包装等过程^[30]。

2 ASFV 编码的复制酶和修饰酶

除主要结构蛋白外,ASFV 病毒颗粒内还含有多种转录因子和修饰酶类。目前认为,约 20% 的 ASFV 基因组用来编码参与其 mRNA 转录和修饰的酶及因子,这种转录机制使 ASFV 相对于宿主细胞具有显著的独立性,可以使病毒自身的基因在准确时间和位置表达。目前已知的可能参与 ASFV mRNA 合成的 RNA 聚合酶亚基主要有 pNP1450L (RP1)、pEP1242L (RP2)、pH359L (RP3)、pD205R (RP5)、pC147L (RP6)和 pD339L (RP7)等。此外,还有 mRNA 修饰酶如加帽酶 pNP868R、甲基转移酶 pEP424R 和多聚腺苷聚合酶 pC475L 等。另外,转录因子 pG1340L 和解旋酶 pD1133L,以及含解旋酶结构域的 pB962L 和 pQ706L 也可能参与病毒转录的起始和终止^[6]。ASFV 病毒颗粒中还含有碱基切除修复系统,包括 II 类脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 pE296R、DNA 连接酶 pNP419L 和 DNA X 型聚合酶 pO174L 等。这些酶类可以纠正宿主巨噬细

胞强氧化环境中诱导的 DNA 损伤, 以确保病毒基因组的完整性^[31-32]。病毒 dUTP 酶 pE165R 确保基因组复制高度保真的酶, 可以在低 dUTP 浓度下减少脱氧尿苷错误掺入到病毒 DNA 的几率。除此之外, DNA B 型聚合酶 pG1207R、DNA 引物酶 pC962R 和 DNA II 型拓扑异构酶 p1192R 等均与病毒 DNA 复制有关^[6]。

3 ASFV 非结构蛋白及免疫逃逸相关蛋白

ASFV 主要通过网格蛋白介导的内吞作用或巨胞饮作用感染猪单核-巨噬细胞等免疫细胞^[33]。为了适应宿主细胞, ASFV 编码蛋白通过多种方式抑制宿主细胞的免疫系统和抗病毒系统, 调控细胞的转录, 抑制宿主细胞的蛋白质合成, 调节细胞凋亡, 从而为病毒自身在感染宿主细胞内的繁殖及扩散创造最有利的条件^[34-35]。

ASFV 编码的多个多基因家族蛋白, 包括 MGF100、MGF110、MGF300、MGF360 和 MGF505/530 等, 其中 MGF360 和 MGF505/530 决定了 ASFV 的细胞嗜性, 与病毒在巨噬细胞内的复制密切相关, 是 ASFV 的毒力决定因素^[36-37]。另外, MGF360 和 MGF505/530 还参与抑制宿主干扰素(Interferons, IFN)的产生和调控促炎性细胞因子表达, 并通过延长感染细胞的存活时间来提高病毒在宿主细胞内的增殖效率和数量^[38]。如 MGF360 家族成员 pA276R 通过抑制干扰素调节因子 IRF3 的磷酸化来抑制 Poly(I:C)刺激的 IFN- β 的产生, 而对核转录因子 NF- κ B 的活化和 IFN 诱导的 JAK-STAT 信号通路没有影响。同样地, MGF505 家族成员 pA528R 能抑制 Poly(I:C)诱导的 IRF3 和 NF- κ B 的活性来抑制 IFN 表达。与 pA276R 不同, pA528R 能明显抑制 IFN- β 和 IFN- γ 诱导 ISRE 或 GAS 的启动子活性, 表明 pA528R 也能抑制 IFN 诱导的 JAK-STAT 信号通路^[39]。MGF110 家族成员 pDP148R 为 ASFV 表达的早期蛋白, 该蛋白免疫猪后能诱导针对同源病毒的攻毒保护, 推测 pDP148R 可能在病毒逃逸宿主防御

中发挥作用^[40-41]。

除多基因家族蛋白外, ASFV 编码的其他蛋白也能抑制 I 型 IFN 产生而进行免疫逃逸。最新的研究表明, ASFV 中国株 pDP96R 可以通过抑制 TBK1 和 IKK β 活化而抑制 cGAS/STING 介导的 I 型干扰素表达和 NF- κ B 活化, 表明 pDP96R 是 ASFV 的一个重要免疫抑制蛋白^[42]。pI329L 是由 ORF I329L 基因编码的序列相对保守、高度糖基化的 I 型跨膜蛋白, 是病毒感染晚期表达的蛋白, 主要分布于感染细胞的细胞膜及病毒囊膜表面^[43]。pI329L 为 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)蛋白家族同源蛋白, 其胞外区结构域富含亮氨酸的重复序列, 是蛋白质之间相互作用的重要基序。研究发现, pI329L 可以抑制 TLR 下游的重要接头蛋白 TRIF 的活性, 进而阻断 IRF3 和 NF- κ B 的活化以及下游基因的转录, 从而拮抗 TLR3 介导的信号通路活化和抑制 IFN 产生^[39,43]。

病毒感染后过早的细胞凋亡不利于病毒自身的繁殖与扩散, 因而 ASFV 会编码一些蛋白抑制宿主细胞过早凋亡, 如 pA224L、pA179L、pEP153R 等。在病毒感染早期, pA238L 对 NF- κ B 信号通路产生抑制作用, 而随着感染进程的推进, ASFV 感染细胞晚期表达的凋亡抑制蛋白 pA224L 能够激活 NF- κ B 信号通路, 通过抑制细胞凋亡促进 ASFV 感染细胞的存活^[16]。pA179L 是基因序列高度保守的 Bcl-2 家族成员, 在病毒感染的早期和晚期均有表达, 主要定位于线粒体或内质网, 能通过与 Beclin-1 相互作用调节细胞自噬, 并抑制自噬体的形成^[44]。另外, pA179L 在多种细胞中表达后或与促凋亡蛋白家族的蛋白相互作用后均能抑制细胞凋亡^[16,45]。pEP153R 又称为 C 型凝集素蛋白, 在病毒感染的早期和晚期均有表达, 是一个多功能蛋白, 能够抑制细胞凋亡, 降低细胞 MHC-I 表达, 且参与 ASFV 感染细胞后的血细胞吸附过程。在 Vero 或 Cos 细胞中, pEP153R 能作用于转录因子 p53 并将其积聚到细胞核中, 从而使其活性被部分抑制, 最终抑制病毒感染诱导的细胞凋亡^[16,46]。另

外, pEP153R 还能介导特异性血清学反应并诱导同源毒株免疫保护^[10], 提示 pEP153R 是重要的保护性抗原。最近鉴定的 pEP153R 的 T 淋巴细胞表位为开发 pEP153R 亚单位疫苗奠定了基础^[47]。

除以上蛋白外, ASFV 基因组还编码一些其他蛋白可能参与调节宿主细胞功能及病毒免疫逃逸。如 ASFV 表达 A238L 能够抑制宿主细胞核转录因子 NF- κ B 和 NFAT 的活化^[39], 从而调节宿主基因表达; 而 ASFV pDP71L 则能促进翻译起始因子 eIF2a 磷酸化, 使细胞不能关闭蛋白合成, 从而促进病毒在细胞内的大量复制^[16,48]。

4 总结及展望

ASFV 复制主要在巨噬细胞内进行, 是一个高度受调控的过程。早期感染阶段, ASFV 通过巨胞

饮、网格蛋白小窝或粘附于红细胞进入巨噬细胞后, 通过微管被导向细胞核周围, 随后进入细胞核启动病毒复制, 开始表达早期基因并在核周边形成病毒工厂, 最终进行高效病毒复制。在病毒感染晚期, 病毒 DNA、膜组分和结构蛋白以及某些宿主蛋白被波形蛋白和线粒体包裹, 同时病毒 RNA 也被招募至病毒工厂, 最后包装完整的病毒子沿微管被运送至细胞膜并通过出芽释放到细胞外^[49]。ASFV 的基因组编码多种结构和非结构蛋白, 其中构成病毒的结构蛋白分布在病毒粒子的不同结构区域(图 1)。病毒编码的结构和非结构蛋白在病毒感染周期的各个阶段中发挥不同的作用, 并参与调控宿主免疫系统和病毒的免疫逃逸, 为病毒自身的增殖及扩散创造条件(表 1)。近年来, 随着对 ASFV

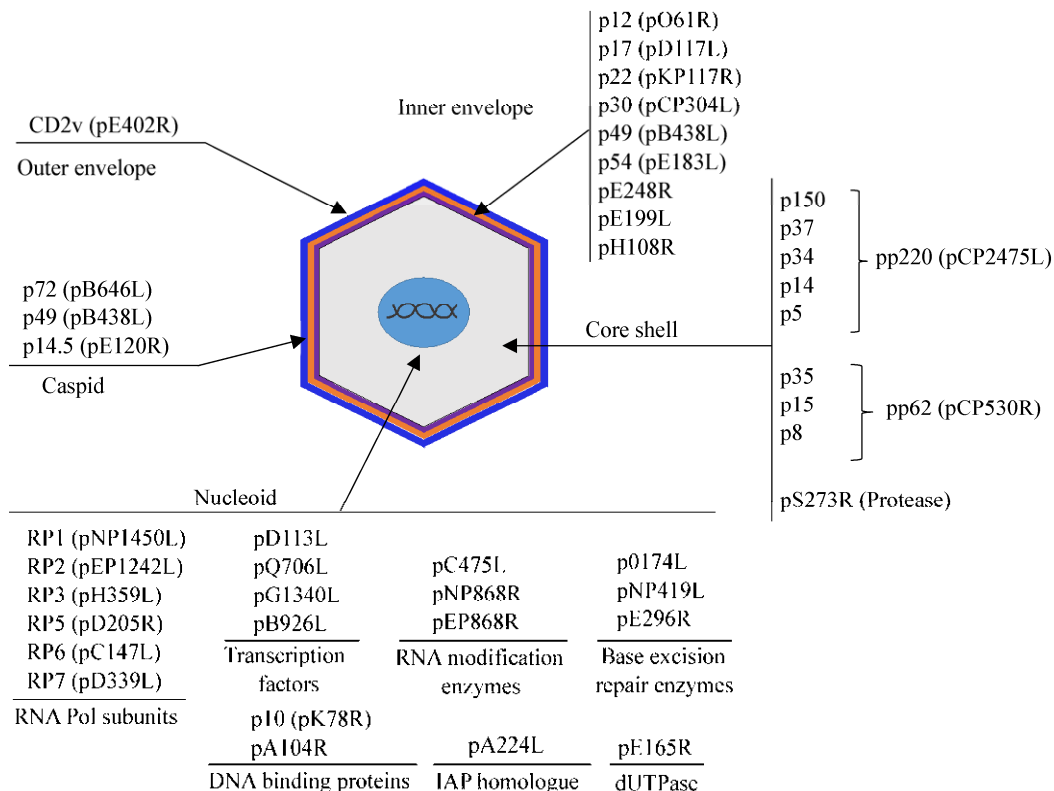


图 1 非洲猪瘟病毒编码结构蛋白分布示意图

Figure 1 Distribution of ASFV-encoded proteins

注: ASFV 病毒粒子从内至外由类核、核壳、内囊膜、衣壳和外囊膜 5 个结构组成, 病毒编码蛋白分布在病毒结构的区域。

Note: Five structure domains of ASFV particle including nucleoid, core shell, inner envelope, capsid and outer envelope are shown as above and the subviral localization of viral proteins were marked in the five structure domains.

表 1 非洲猪瘟病毒编码主要蛋白及其功能

Table 1 The known functions of the major ASFV-encoded proteins

病毒蛋白 Viral protein	开放阅读框 Open reading frame	描述及功能 Description and function
CD2v	EP402R	类 CD2 蛋白, 主要外膜蛋白和重要抗原蛋白, 介导病毒吸附 ^[8] , 病毒血清型鉴定标志蛋白 ^[9-10] Similar to host CD2, major outer membrane protein and antigen protein, required for viral particles to bind to red blood cells ^[8] , genetic marker for identification of different ASFV strains ^[9-10]
p54	E183L	跨膜蛋白, 招募病毒囊膜前体蛋白至病毒工厂, 与动力蛋白轻链相互作用, 参与病毒侵入 ^[15] , 诱导细胞凋亡 ^[16] Transmembrane protein, recruits envelope precursors to the viral factory, interacts with light chain of dynein, contributes to virus entry ^[15] and induces apoptosis ^[16]
p12	O61R	有免疫原性 ^[11] , 促进病毒粘附至宿主细胞 ^[15] Antigen protein ^[11] , participates in virus adhesion to host cells ^[15]
p30 (p32)	CP204L	主要的内膜蛋白, 重要抗原蛋白, 参与病毒侵入 ^[15,20] Major inner membrane protein and key antigen protein, contributes to virus entry ^[15,20]
p17	D117L	促进病毒的十二面体颗粒形成 ^[7,24] Requirement for precursor membranes to form viral icosahedral particles ^[7,24]
p72	B646L	主要衣壳蛋白, 免疫原性好, 参与病毒侵入 ^[15] Major capsid protein with good immunogenicity, contributes to virus entry ^[15]
p14.5	E120R	与病毒生命周期有关 ^[7] , 参与病毒迁移扩散 ^[27] Related to viral life cycle ^[7] and required for virus migration to plasma membrane ^[27]
p49	B438L	促进形成和稳定病毒颗粒十二面体顶点 ^[6] Requirement for formation of vertices in viral icosahedral capsid and stabilizes the vertices ^[6]
pp220	CP2475L	p150、p37、p34、p14 和 p5 前体蛋白, 促进病毒核芯包装 ^[6] Polyprotein precursor of p150, p37, p34, p14, and p5, requirement for packaging of nucleoprotein core ^[6]
pp62	CP530R	p35、p15 和 p8 前体蛋白 ^[6] , 校正病毒类核蛋白芯的组装和成熟 ^[28] Polyprotein precursor of p35, p15 and p8 ^[6] , corrects assembling and maturation of the nucleoprotein core of the viral particles ^[28]
p10	K78R	DNA 结合蛋白, 参与病毒基因组包装 ^[6] DNA binding protein, participates in virus packaging ^[6]
pA104R	A104R	DNA 结合蛋白, 参与病毒转录、DNA 复制及基因组包装 ^[30] DNA binding protein, participates in viral transcription, DNA replication and genome packaging ^[30]
pA276R	MGF360	抑制 IRF3 磷酸化和 IFN 产生 ^[39] Inhibits phosphorylation of IRF3 and IFN-β production ^[39]
pA528R	MGF505	抑制 IFN 产生和 JAK-STAT 信号通路活化 ^[42] Inhibits IFN induction and suppresses activation of JAK-STAT signaling pathway ^[42]
pDP148R	DP148R	与病毒毒力有关 ^[41] Related to virulence of the virus ^[41]
pDP96R	DP96R	抑制 I 型 IFN 表达和 NF-κB 活化 ^[42] Suppression of type I IFN expression and NF-κB signaling ^[42]
pI329L	I329L	TLR3 同源类似物, 抑制 TLR3 诱导的 IFN 产生 ^[39,43] TLR3 homologue, inhibits the induction of IFNs ^[39,43]
pA224L	A224L	抑制早期感染阶段宿主细胞凋亡 ^[16] Inhibits apoptosis in the early stages of infection ^[16]
PA179L	A179L	抑制细胞凋亡和自噬 ^[16,44-45] Inhibits apoptosis and autophagy of infected cells ^[16,44-45]
pEP153R	EP153R	C 型凝集素蛋白, 下调 MHC-I 表达, 抑制细胞凋亡, 参与吸附红细胞过程 ^[16,24] C-type lectin protein, decreases expression of MHC-I, inhibits apoptosis and participates in binding red blood cells ^[16,24]
pA238L	A238L	抑制核转录因子 NFAT 和 NF-κB 活化 ^[39,50] Inhibits activation of NFAT or NF-κB ^[39,50]
pDP71L	DP71L	促进细胞蛋白合成, 抑制宿主细胞凋亡 ^[16,48] Promotes cellular protein synthesis, inhibits apoptosis of host cells ^[16,48]

编码蛋白鉴定和蛋白功能的深入研究,人们对 ASFV 与宿主相互作用机制有了更清晰的认识。但 ASFV 基因组结构庞大,编码蛋白中已知功能的数量相对较少,深入研究 ASFV 编码蛋白的功能将有助于全面了解 ASFV 致病机理。最近 Alejo 等对 ASFV 细胞适应株(BA71V 株)的病毒颗粒进行的蛋白质组学分析检测到了 68 种病毒组成蛋白,其中有 20 多种未知功能新鉴定病毒蛋白^[6]。

ASFV 的复制主要在巨噬细胞内完成。为了完成复制,ASFV 可能通过多种机制来拮抗宿主抗病毒免疫反应,进而实现免疫逃逸。但天然免疫信号活化是一个复杂的多层级调控过程,包括转录及转录后调控、翻译及翻译后修饰及染色体表观修饰等,以及受到其他细胞信号调控^[51-52],ASFV 编码蛋白是否参与这些多层次的调控有待于进一步研究。除巨噬细胞之外,ASFV 也感染树突状细胞(Dendritic cell, DC)^[53],但 ASFV 感染如何影响 DC 功能尚不清楚。浆样树突状细胞(Plasmacytoid DC, pDC)是宿主响应病毒感染而分泌 I 型 IFNs 的主要细胞^[54-55],ASFV 编码蛋白是否影响 pDC 中 IFNs 产生尚无报道。总之,目前对 ASFV 的研究仍存在巨大的未知领域,特别是病毒的免疫逃逸机制。深入研究 ASFV 编码蛋白与宿主细胞的相互作用机制,将有助于阐明 ASFV 的免疫逃逸机制,为研发 ASF 疫苗提供理论基础。

迄今为止,国际上尚未开发出针对 ASF 的有效疫苗。研究表明,绝大部分 ASF 灭活疫苗无保护作用,即使添加新型免疫佐剂后也不能提高灭活疫苗的保护力,这可能与 ASFV 复杂的免疫逃逸机制和 ASFV 的成熟方式有关^[56-57]。ASFV 编码的结构蛋白如 CD2v、p72、p54、p30 等均具有良好的抗原性。虽然重组 p54 和 p72 蛋白免疫能诱导中和抗体产生,但对致死剂量的 ASFV 感染仅有部分保护作用。同样地,重组 CD2v 蛋白或表达 p54-p30 融合蛋白的 DNA 疫苗仅有 30%–50% 的免疫保护作用^[23,58-59]。以上研究表明核酸疫苗和亚单位疫苗虽然均能激活宿主体液和细胞免疫应

答,但单纯依靠一种或几种蛋白质很难达到免疫预防效果。最新的研究发现,联合应用 22 种 ASFV 抗原的 DNA 疫苗和重组痘病毒疫苗免疫后能够显著降低病毒在血液和淋巴组织中的病毒量,提示多种保护性抗原协同免疫可以提高疫苗的免疫保护水平^[59]。与以上结果相似,利用痘病毒、腺病毒、伪狂犬病毒等病毒载体表达 ASFV 保护性抗原,再通过“鸡尾酒”式混合免疫后,虽然还不能提供完全保护,但能够诱导机体产生强烈体液免疫和细胞免疫反应^[60]。另外,通过删除 ASFV 的毒力基因(如 TK、UK、9GL 和 CD2v)或者免疫逃逸相关基因等构建基因缺失疫苗也是当前 ASF 疫苗研究的热点^[12,36,61-63]。已有的研究表明,大部分基因缺失疫苗针对亲本毒株的攻击具有同源保护作用^[41-43,62-63],部分也具有一定的异源保护作用^[64]。因此,ASFV 基因缺失疫苗免疫保护效果相对较为理想,可能是短期内最有希望研制成功的疫苗。但由于 ASF 为法定的一类动物传染病,需要高度重视 ASFV 基因缺失疫苗的生物安全性。考虑到生物安全因素,构建 ASFV 复制必需基因缺失的突变病毒^[31,65],获得复制缺陷型疫苗可能是未来 ASF 疫苗研发的重要方向。

REFERENCES

- [1] Wang T, Sun Y, Luo YZ, et al. Prevention, control and vaccine development of African swine fever: challenges and countermeasures[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(12): 1931-1942 (in Chinese)
王涛,孙元,罗玉子,等.非洲猪瘟防控及疫苗研发:挑战与对策[J].生物工程学报,2018,34(12):1931-1942
- [2] Ge SQ, Li JM, Fan XX, et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018[J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(11): 2131-2133
- [3] Reis AL, Netherton C, Dixon LK. Unraveling the armor of a killer: evasion of host defenses by African swine fever virus[J]. Journal of Virology, 2017, 91(6): e02338-16
- [4] Wang XX, Chen Q, Chen HJ, et al. Research progress on immune evasion proteins of African swine fever virus[J]. Chinese Journal of Virology, 2018, 34(6): 929-935 (in Chinese)
王西西,陈青,陈鸿军,等.非洲猪瘟病毒免疫逃逸相关蛋白研究进展[J].病毒学报,2018,34(6):929-935
- [5] Galindo I, Alonso C. African swine fever virus: a review[J]. Viruses, 2017, 9(5): E103
- [6] Alejo A, Matamoros T, Guerra M, et al. A proteomic atlas of the

- African swine fever virus particle[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(23): e01293-18
- [7] Jia N, Ou YW, Pejsak Z, et al. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2017, 61(2): 135-143
- [8] Goatley LC, Dixon LK. Processing and localization of the African swine fever virus CD2v transmembrane protein[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(7): 3294-3305
- [9] Sanna G, Giudici SD, Bacciu D, et al. Improved strategy for molecular characterization of African swine fever viruses from Sardinia, based on analysis of p30, CD2v and *I73R/I329L* variable regions[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1280-1286
- [10] Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman ER, et al. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(7): 1670-1675
- [11] Lopera-Madrid J, Osorio JE, He YQ, et al. Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2017, 185: 20-33
- [12] Monteagudo PL, Lacasta A, López E, et al. BA71ΔCD2: A new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(21): e01058-17
- [13] García-Mayoral MF, Rodríguez-Crespo I, Bruix M. Structural models of DYNLL1 with interacting partners: African swine fever virus protein p54 and postsynaptic scaffolding protein gephyrin[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(1): 53-57
- [14] Sánchez EG, Quintas A, Nogal M, et al. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 58-75
- [15] Sánchez EG, Pérez-Núñez D, Revilla Y. Mechanisms of entry and endosomal pathway of African swine fever virus[J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(4): 42
- [16] Dixon LK, Sánchez-Cordón P, Galindo I, et al. Investigations of pro- and anti-apoptotic factors affecting African swine fever virus replication and pathogenesis[J]. *Viruses*, 2017, 9(9): 241
- [17] Lacasta A, Ballester M, Monteagudo PL, et al. Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(22): 13322-13332
- [18] Argilagué JM, Pérez-Martín E, López S, et al. BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus[J]. *Antiviral Research*, 2013, 98(1): 61-65
- [19] Salas ML, Andrés G. African swine fever virus morphogenesis[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 29-41
- [20] Lithgow P, Takamatsu H, Werling D, et al. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(2/4): 413-419
- [21] Cubillos C, Gómez-Sebastian S, Moreno N, et al. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 159-167
- [22] Kazakova AS, Imatdinov IR, Dubrovskaya OA, et al. Recombinant protein p30 for serological diagnosis of African swine fever by immunoblotting assay[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(5): 1479-1492
- [23] Argilagué JM, Pérez-Martín E, Nofrarias M, et al. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e40942
- [24] Suárez C, Gutiérrez-Berzal J, Andrés G, et al. African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(15): 7484-7499
- [25] Heimerman ME, Murgia MV, Wu P, et al. Linear epitopes in African swine fever virus p72 recognized by monoclonal antibodies prepared against baculovirus-expressed antigen[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2018, 30(3): 406-412
- [26] Chen XX, Yang JF, Ji YH, et al. Recombinant Newcastle disease virus expressing African swine fever virus protein 72 is safe and immunogenic in mice[J]. *Virologica Sinica*, 2016, 31(2): 150-159
- [27] Andrés G, García-Escudero R, Viñuela E, et al. African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(15): 6758-6768
- [28] Suárez C, Salas ML, Rodríguez JM. African swine fever virus polyprotein pp62 is essential for viral core development[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(1): 176-187
- [29] Andrés G, Alejo A, Salas J, et al. African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(24): 12473-12482
- [30] Frouco G, Freitas FB, Coelho J, et al. DNA-binding properties of African swine fever virus pA104R, a histone-like protein involved in viral replication and transcription[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(12): e02498-16
- [31] Redrejo-Rodríguez M, Salas ML. Repair of base damage and genome maintenance in the nucleo-cytoplasmic large DNA viruses[J]. *Virus Research*, 2014, 179: 12-25
- [32] Redrejo-Rodríguez M, Rodríguez JM, Suárez C, et al. Involvement of the reparative DNA polymerase pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability *in vivo*[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(17): 9780-9787
- [33] Andrés G. African swine fever virus gets undressed: new insights on the entry pathway[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(4): e01906-16
- [34] Portugal R, Leitão A, Martins C. Modulation of type I interferon signaling by African swine fever virus (ASFV) of different virulence L60 and NHV in macrophage host cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 216: 132-141
- [35] Hoffmann HH, Schneider WM, Rice CM. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions[J]. *Trends in Immunology*, 2015, 36(3): 124-138
- [36] O'Donnell V, Holinka LG, Sanford B, et al. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge[J]. *Virus Research*, 2016, 221: 8-14
- [37] O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, et al. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection

- against challenge with virulent parental virus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(11): 6048-6056
- [38] Golding JP, Goatley L, Goodbourn S, et al. Sensitivity of African swine fever virus to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505[J]. *Virology*, 2016, 493: 154-161
- [39] Correia S, Ventura S, Parkhouse RM. Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 87-100
- [40] Keßler C, Forth JH, Keil GM, et al. The intracellular proteome of African swine fever virus[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 14714
- [41] Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, et al. Deletion of the African swine fever virus gene *DP148R* does not reduce virus replication in culture but reduces virus virulence in pigs and induces high levels of protection against challenge[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(24): e01428-17
- [42] Wang XX, Wu J, Wu YT, et al. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 506(3): 437-443
- [43] de Oliveira VL, Almeida SCP, Soares HR, et al. A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV)[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(4): 597-609
- [44] Hernaez B, Cabezas M, Muñoz-Moreno R, et al. A179L, a new viral Bcl2 homolog targeting Beclin 1 autophagy related protein[J]. *Current Molecular Medicine*, 2013, 13(2): 305-316
- [45] Banjara S, Caria S, Dixon LK, et al. Structural insight into African swine fever virus A179L-mediated inhibition of apoptosis[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(6): e02228-16
- [46] Hurtado C, Maria JB, Granja AG, et al. The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(2): 219-234
- [47] Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman ER, et al. Identification of T-cell epitopes in African swine fever virus CD2v and C-type lectin proteins[J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(2): 259-265
- [48] Barber C, Netherton C, Goatley L, et al. Identification of residues within the African swine fever virus DP71L protein required for dephosphorylation of translation initiation factor eIF2 α and inhibiting activation of pro-apoptotic CHOP[J]. *Virology*, 2017, 504: 107-113
- [49] Netherton CL, Wileman T. African swine fever virus organelle rearrangements[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 76-86
- [50] Hu XY, Chakravarty SD, Ivashkiv LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms[J]. *Immunological Reviews*, 2010, 226(1): 41-56
- [51] Shang YL, Coppo M, He T, et al. The transcriptional repressor Hes1 attenuates inflammation by regulating transcription elongation[J]. *Nature Immunology*, 2016, 17(8): 930-937
- [52] Shang YL, Smith S, Hu XY. Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease[J]. *Protein & Cell*, 2016, 7(3): 159-174
- [53] Franzoni G, Graham SP, Sanna G, et al. Interaction of porcine monocyte-derived dendritic cells with African swine fever viruses of diverse virulence[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 216: 190-197
- [54] Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(8): 471-485
- [55] Liu F, Liu CX, Hu XY, et al. MicroRNA-21: a positive regulator for optimal production of type I and type III interferon by plasmacytoid dendritic cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 947
- [56] Blome S, Gabriel C, Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation[J]. *Vaccine*, 2014, 32(31): 3879-3882
- [57] Arisa M, de la Torre Ana, Dixon L, et al. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines[J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(4): 35
- [58] Argilaguuet JM, Pérez-Martín E, Gallardo C, et al. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells[J]. *Vaccine*, 2011, 29(33): 5379-5385
- [59] Jancovich JK, Chapman D, Hansen DT, et al. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank African swine fever virus immunogenic and protective proteins[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(8): e02219-17
- [60] Lokhandwala S, Waghela SD, Bray J, et al. Adenovirus-vectored novel African swine fever virus antigens elicit robust immune responses in swine[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177007
- [61] O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, et al. African swine fever virus Georgia 2007 with a deletion of virulence-associated gene *9GL* (B119L), when administered at low doses, leads to virus attenuation in swine and induces an effective protection against homologous challenge[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(16): 8556-8566
- [62] O'Donnell V, Risatti GR, Holinka LG, et al. Simultaneous deletion of the *9GL* and *UK* genes from the African swine fever virus Georgia 2007 isolate offers increased safety and protection against homologous challenge[J]. *Journal of Virology*, 2016, 91(1): e01760-16
- [63] Sánchez-Cordón PJ, Jabbar T, Berrezaie M, et al. Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus Benin Δ MGF by different doses and routes[J]. *Vaccine*, 2018, 36(5): 707-715
- [64] Gallardo C, Sánchez EG, Pérez-Núñez D, et al. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses[J]. *Vaccine*, 2018, 36(19): 2694-2704
- [65] Coelho J, Martins C, Ferreira F, et al. African swine fever virus ORF P1192R codes for a functional type II DNA topoisomerase[J]. *Virology*, 2015, 474: 82-93