

蓝舌病毒释放机制的研究进展

林俊泓, 王让, 赵瑶, 陈玉娟, 马鲜平, 易华山

西南大学 动物医学院, 重庆 402460

林俊泓, 王让, 赵瑶, 等. 蓝舌病毒释放机制的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3179-3189.

Lin JH, Wang R, Zhao Y, et al. Advances in the release mechanisms of bluetongue virus. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3179-3189.

摘 要: 蓝舌病毒 (Bluetongue virus, BTV) 作为由媒介昆虫库蠓传播的引起反刍动物蓝舌病 (Bluetongue, BT) 的病原微生物, 同时也是研究无囊膜病毒 (Non-enveloped virus) 释放机制的经典模型。文中以 BTV 感染细胞及组装为始, 对 BTV 诱导细胞自噬并通过多囊泡体以细胞外囊泡形式释放、BTV 诱导细胞凋亡而裂解释放、BTV 从质膜出芽释放的不同途径以及 BTV 关键非结构蛋白 NS3 在调控 BTV 释放过程中作用机制的研究进展进行综述, 为进一步了解 BTV 感染、增殖、释放的分子机制提供参考。

关键词: 蓝舌病毒, 细胞外囊泡, 裂解性释放, 非裂解性释放, NS3 蛋白

Advances in the release mechanisms of bluetongue virus

Junhong Lin, Rang Wang, Yao Zhao, Yujuan Chen, Xianping Ma, and Huashan Yi

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

Abstract: Bluetongue virus (BTV) causes Bluetongue (BT) of ruminants vectored by *culicoides* midges. It is also a classic model for studying the release mechanism of non-enveloped virus. This review begins with the infection and assembly of BTV, then summarizes the advances of different ways of releasing BTV. This includes BTV-induced autophagy and the release as extracellular vesicles via multivesicular bodies, BTV-induced apoptosis and the lytic release, as well as different pathways of release through budding via plasma membrane. The regulatory mechanisms of NS3 which is a key non-structural protein during the release of BTV are also discussed, providing a basis for further understanding the molecular mechanisms underpinning the infection, proliferation and release of BTV.

Keywords: bluetongue virus, extracellular vesicles, lytic release, non-lytic release, NS3 protein

Received: March 29, 2021; **Accepted:** June 1, 2021

Supported by: Chongqing Basic Research and Frontier Exploration Special Project Foundation, China (No. cstc2018jcyjAX0615), Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (Nos. XDJK2018C060, XDJK2018C059), National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFD0501705).

Corresponding authors: Xianping Ma. Tel: +86-23-46751714; E-mail: xianpingma@163.com

Huashan Yi. Tel: +86-23-46751714; E-mail: dyxyihuashan@swu.edu.cn

重庆市基础研究与前沿探索专项项目基金 (No. cstc2018jcyjAX0615), 中央高校基本科研业务专项基金 (Nos. XDJK2018C060, XDJK2018C059), 国家重点研发计划 (No. 2018YFD0501705) 资助。

网络出版时间: 2020-07-23

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200722.1004.001.html>

蓝舌病毒 (Bluetongue virus, BTV) 属于呼肠孤病毒科 (Reoviridae)、环状病毒属 (*Orbivirus*), 病毒粒子为核衣壳二十面体对称的圆形无囊膜颗粒, 由 10 条分节段的双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 编码 7 种结构蛋白 VP1-VP7 和至少 4 种非结构蛋白 NS1、NS2、NS3/NS3A、NS4 以及可能的 NS5 (S10-ORF2)^[1-2]。其中, VP2 与 VP5 组成外衣壳, VP2 锌指基序 CCCH 感知早期核内体 (Endosome) pH 后发生构象变化与细胞表面糖蛋白结合促进网格蛋白介导的病毒内吞作用, VP5 锚定结构域中组氨酸残基感知晚期核内体低 pH (-5.5) 获得膜融合性穿透宿主细胞膜而使病毒核心颗粒进入细胞质, 但 BTV-1 通过一种与巨胞饮作用相似的方式进入晚期核内体^[3-5]。核心颗粒由 VP3 与 VP7 组成的内衣壳包含 VP1 (RNA 依赖的 RNA 聚合酶)、VP4 (加帽酶)、VP6 (RNA 解旋酶) 及 10 条分节段 dsRNA^[6]。非结构蛋白 NS1 促进病毒蛋白质合成及聚合后在感染细胞内形成小管 (Tubular); NS2 招募单链 RNA (Single-stranded RNA, ssRNA) 转录本、VP1、VP4、VP6 以及内衣壳; NS3 作为 BTV 唯一具有膜结构域的非结构蛋白调控病毒成熟、转运和释放; NS4 拮抗细胞内干扰素的产生^[7-10]。目前, BTV 作为由媒介昆虫传播的世界范围流行的病原微生物, 同时也是无囊膜病毒研究的模型^[11]。因此, 笔者以近年来 BTV 侵染、病毒颗粒的组装, 成熟 BTV 颗粒通过细胞外囊泡释放、裂解性释放、出芽释放的不同方式及非结构蛋白 NS3 调控病毒释放机制的研究进展进行综述, 为深入研究 BTV 致病机制及相关的防控措施提供参考。

1 BTV 感染与组装

1.1 BTV 对细胞的感染性

BTV 通过媒介昆虫库蠓叮咬传播, 感染引起反刍动物蓝舌病 (Bluetongue, BT), 患病动物 (包括牛、鹿、骆驼、绵羊等, 绵羊病症最为典型) 出现舌部发绀、口唇充血肿胀等症状及病毒血症,

并产生多种细胞因子, 但对主要传播虫媒库蠓并不致病^[12]。BTV 体外感染不同的哺乳动物 (仓鼠、绵羊等) 细胞均引起严重的细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE), 但在库蠓衍生细胞系 KC 细胞中以高滴度复制但不引起 CPE 的方式形成长期的非致命感染 (Non-lethal infection), 且 KC 细胞感染 BTV 后能产生具有抗病毒作用的 21 nt 的病毒源小干扰 RNA (Virus-derived small interfering RNAs, viRNAs)^[13]。研究表明, 用胰蛋白酶处理形成的感染性亚病毒颗粒 (Infectious subviral particles, ISVPs) 和被库蠓唾液中蛋白酶降解而失去 VP2 的 BTV 颗粒在 KC 细胞与库蠓载体中均表现出高于成熟 BTV 颗粒的感染性, 但 NS3 基因的敲除可显著降低感染性^[14]。研究还表明, 自然生活的库蠓幼虫中编码 VP7 片段的检出率为 VP2 的两倍, 且内衣壳 VP7 的 RGD 基序可以结合在 KC 细胞的表面以促进 BTV 入胞^[15-16]。上述证据说明 BTV 感染及释放机制在哺乳动物及与虫媒间存在较大差异, 这种差异也见于同属成员非洲马瘟病毒, 因此针对虫媒病毒感染及释放差异性的研究为从传播途径切断疾病的流行提供了新的思路^[17]。

1.2 BTV 组装

BTV 的 10 个 RNA 节段 (0.8-3.95 kb) 可分为小、中、大 3 类, 每个 RNA 节段均具有两端为高度保守六核苷酸序列的短 5' 和 3' 未翻译区 (Untranslated regions, UTRs), 通过这些 UTRs 的招募, BTV 和其他相关的病毒开始分类募集各自基因组 ssRNA 节段^[18]。基因组的装配始于 VP1 以 ssRNA 为模板合成 dsRNA^[19]; VP6 解旋 dsRNA 并分离转录本与模板 RNA^[20]; VP4 在 RNA 三磷酸酶 (Rtase)、鸟苷转移酶 (Gtase)、鸟嘌呤-N7-甲基转移酶 (N7Mtase) 以及核苷-2'-O-甲基转移酶 (2'OMTase) 的作用下在 mRNA 的 5' 端形成 m7GpppGm 的帽子结构^[21]。感染细胞胞浆中病毒包涵体 (Virus inclusion bodies, VIBs) 是呼肠孤病毒科家族成员的标志以及病毒装配的功能位点, 由钙离子水平影响 NS2 的磷酸化水平而形成网格

状骨架并募集病毒 ssRNA、VP1、VP3、VP4、VP6 与 VP7^[22-23]。VP5 的募集也与 VIBs 相关, 但 VP2 的募集发生在 VIBs 之外且 VP2 能与细胞骨架成分之一的波形蛋白中间丝 (Vimentin intermediate filaments) 相互作用, 说明外衣壳的组装不全在 VIBs 中完成^[24-26]。VP1、VP4、VP6 在五重轴 (Five fold axis) 上与 VP3 组成不稳定的亚核心颗粒, 由三聚体 VP7 沉积形成稳定的核心颗粒, 新组装的核心颗粒在 VIBs 内获得 VP5 后, 离开 VIBs 并获得 VP2, 失去转录活性, 形成完整的病毒颗粒从感染细胞内释放^[6,25]。

2 BTV 的释放

细胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EVs) 是细胞来源的具有膜结构的高异质性囊泡, 作为细

胞间的一种通讯机制参与炎症、肿瘤生成等生命过程, 对 BTV 颗粒的电镜观察发现, BTV 可以在 EVs 内聚集释放 (图 1A-D)^[27-28]。此外, 囊膜病毒主要通过出芽 (Budding) 等非裂解性 (Non-lytic) 方式释放, 而无囊膜病毒主要通过细胞凋亡等裂解性 (Lytic) 方式释放, 但更多研究表明无囊膜病毒如 BK 多瘤病毒、脊髓灰质炎病毒等也存在非裂解性释放的方式^[29]。BTV 作为典型无囊膜病毒, 在侵染细胞并完成组装后, 既能观察到通过细胞膜非裂解性出芽释放的病毒颗粒 (图 1E-F), 也能观察到细胞裂解后释放的裸病毒颗粒 (图 1G-H)^[28]。研究表明, 抑制 BTV 非裂解性释放时, 病毒只能以较弱的毒性传播, 说明裂解性释放可能不是 BTV 释放的主要方式^[30-31]。

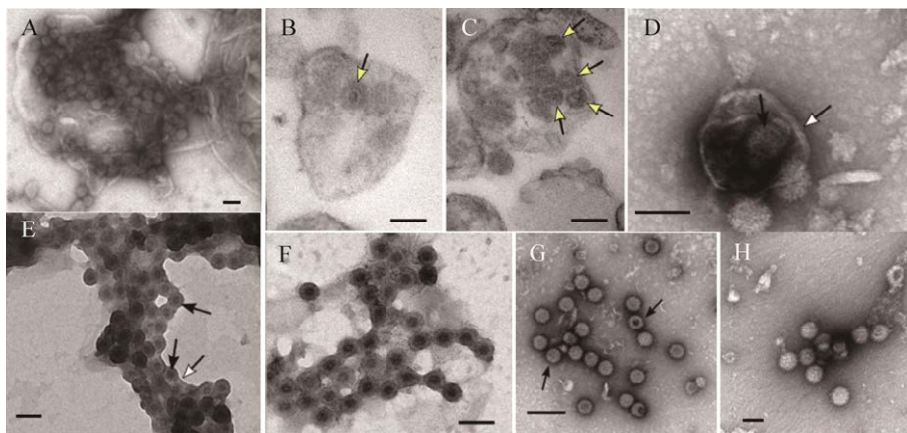


图 1 BTV 不同形式病毒颗粒的电镜观察^[28,32]

Fig. 1 Electron microscopic observation of different forms of BTV particles^[28,32]. (A-C^[28], D^[32]) BTV particles release via EVs. (E^[32], F^[28]) BTV particles release via budding. (G^[32], H^[28]) lytic releases of BTV particles (black and yellow arrows indicate BTV particles and white arrows indicate lipid membrane); Scale bar: 100 nm (scale bars of D, E, H are modified for consistency).

2.1 BTV 诱导细胞自噬与 EVs 释放

细胞自噬 (Autophagy) 是细胞通过溶酶体选择性回收、更新胞内物质从而保持稳态的一种保护性机制, 细胞以自噬作为其免疫防御机制清除入侵的病原微生物, 但也被病原微生物利用以促进其自身增殖与复制, 呼肠孤病毒科的轮状病毒与流行性出血症病毒均可诱发自噬^[33-36]。研究

表明, BTV 抑制蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB), 活化钙离子相关的单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-activate d protein kinase, AMPK), 下调哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Mammalian target of rapamycin, mTOR) 磷酸化水平启动细胞自噬, 且 BTV 感染引起的能量代谢中断有助于细胞自噬, 而抑制自噬能减缓 NS3 与 VP2 的积累从而抑

制 BTV 的复制^[37-39]。病毒粒子的整体传播 (En bloc transmission) 指若干病毒粒子聚集于具有膜结构的封闭囊泡内释放与传播的形式, 如小核糖核酸病毒的颗粒在内质网衍生的 EVs 中释放; 甲型肝炎病毒以类外泌体的形式被宿主细胞源的膜覆盖而释放; 呼肠孤病毒科成员轮状病毒在可能来自质膜的 EVs 中释放等, 是病毒增强传染性和适应环境变化的方式^[40-42]。对 BTV 感染细胞的上清液与 BTV 感染牛的血液中纯化 EVs 的电镜观察表明, 在胞内与胞外的囊泡中均可观察到 BTV 颗粒的聚集, 进一步的研究发现以 EVs 释放的 BTV 颗粒感染性高于以裂解释放的裸病毒颗粒, 且抑制多囊泡体 (Multivesicular bodies, MVBs) 和自噬溶酶体均能减少 EVs 的释放^[32]。此外, BTV 感染引起膜上自噬相关的溶酶体相关膜蛋白 1 (Lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1) 表达以及溶酶体 pH 值升高^[28]。研究表明, BTV 还通过 NS3 与神经前体细胞表达的发育下调蛋白 4 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4, NEDD4) 泛素连接酶作用参与 MVBs 形成且抑制这种相互作用可抑制病毒成熟与释放^[43]。以上研究表明, BTV 诱导自噬, 通过 MVBs 进入溶酶体, 随后被运送至细胞膜上以整体传播的 EVs 形式释放。

2.2 BTV 诱导细胞凋亡与裂解性释放

细胞凋亡是细胞主动、程序性清除衰老、损伤或有害细胞的自主死亡方式, 细胞通过凋亡抵抗病毒侵染, 也被某些病毒诱导以促进其裂解细胞释放, 如呼肠孤病毒科的非洲马瘟病毒、轮状病毒等均可诱导细胞凋亡^[44-45]。丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶 (Mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, MAPK/ERK) 通路调控细胞的凋亡, BTV 感染激活 MAPK 通路, 并通过 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 与 p38 调节线粒体中细胞色素 C 的释放与半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)

的激活诱导细胞凋亡, 进一步的研究表明, BTV 是通过其非结构蛋白 NS3 与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B-Raf 作用而激活 MAPK 通路及下游的 ERK1/2 和真核起始因子 4E (Eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E), 与 BTV 不同, 同为环状病毒属的流行性出血症病毒、非洲马瘟病毒的 NS3 蛋白不具有该作用^[46-47]。此外 BTV 感染还可诱导 Caspase-7、Caspase-8、Caspase-9 与核因子 κ B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B) 表达, 但 NF- κ B 由 NF- κ B 抑制物 α (Inhibitor of NF- κ B α , I κ B α) 而非 I κ B β 控制, 这种短暂而非持续的激活表明 NF- κ B 在 BTV 感染引起的凋亡中不占据主导地位^[48-49]。与哺乳动物细胞中仅表达 BTV 外衣壳就能诱发细胞凋亡不同, BTV 感染库蠓并不引起凋亡, 这种差异性使 BTV 更易在虫媒中传播而增加其感染哺乳动物的机会与能力^[17,48]。综上, BTV 感染诱导的凋亡是引发 BTV 裂解性释放的主要形式。

2.3 BTV 从质膜出芽释放

内吞体分选转运复合体 (Endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 是存在于细胞胞浆中具有自噬、胞质分裂、核内体成熟、膜修复等功能的异多聚体蛋白^[50]。人类免疫缺陷病毒等典型囊膜病毒在宿主细胞膜表面以出芽获得囊膜, 形成成熟的病毒颗粒的过程通常由 ESCRT 介导, 而无囊膜呼肠孤病毒科的轮状病毒以及 BTV 均能与 ESCRT 作用从而促进释放^[19,51-52]。研究发现, 纯化的 BTV 裸病毒颗粒通过细胞膜的“挤压”(Extrusion) 释放, 而另一部分裸病毒颗粒被感染细胞内短暂存在的囊膜包围后在细胞膜处出芽释放^[25,32]。Hyatt 等利用杆状病毒系统对 BTV 的出芽释放进行了研究, 表达由 BTV 内外衣壳蛋白 (VP2、VP5、VP3、VP7) 组成的病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 和仅由内衣壳蛋白 (VP3、VP7) 组成的核样颗粒 (Core-like particles, CLPs), 在 NS3 的参与下, VLPs 与细胞骨架相作

用以出芽形式释放,但 CLPs 无法进行该过程^[53]。此外,用免疫胶体金标记的 NS3 蛋白定位于 BTV 病毒颗粒出芽部位的细胞膜上,与病毒释放过程中的细胞膜扰动 (Membrane perturbation) 有关^[30,32]。上述证据表明, BTV 能以出芽方式释放,且其内外衣壳之间的相互作用及 NS3 蛋白的调控均是 BTV 出芽必不可少的条件。

3 NS3 调控 BTV 释放

NS3 由 BTV 基因组的第 10 节段编码,以糖基化和非糖基化两种形式存在,翻译后位于内质网腔内,通过内质网到达高尔基体,在反式高尔基体网络 (Trans-Golgi network, TGN) 的分选下到达 MVBs、溶酶体及细胞膜^[54]。NS3 可分为 25.5 kDa 的全长 NS3 和 24 kDa 的从 N 端第 14 位第 2 个起始密码子开始翻译的截短亚型 NS3A,前 13 个氨基酸的缺失造成 NS3A 中膜联蛋白 II (Annexin II) 与 S100A10 结合域的缺失。此外, NS3、NS3A 中均存在卷曲螺旋基序 (Coil-coil motif, CCM)、晚期结构域 (Late domain, LD) 基序 PPRY 与 PSAP、两个多碱基基序 (Polybasic motifs, PBMs)、两个跨膜结构域 (Transmembrane domain, TM)、糖基化位点 (Glycosylation) 以及 VP2 结合域 (图 2), NS3 通过上述的功能结构域利用宿主细胞不同成分调控 BTV 的释放^[43]。NS3 的氨基酸序列在不同血清型中均较为保守,与 VP2 同为 BTV 毒力的决定因素,毒力的减弱可能与 NS3 第 24 位脯氨酸的变化有关^[26,55-56]。

3.1 NS3 的 N 端结构域

作为依钙蛋白复合物 (Calpactin complex) 组分之一的膜联蛋白 II (Annexin II) 参与囊膜病毒如麻疹病毒和丙型肝炎病毒的成熟与释放^[57-59]。NS3 N 端的前 13 个氨基酸可以形成结合 annexin II 的双亲分子螺旋 (Amphipathic helix), 也能与依钙蛋白复合物的另一组分 S100A10/p11 作用,抑制 NS3 与 annexin II 的作用能减少 BTV 的释放,而含有 NS3A 的突变体 BTV 在毒力减弱的同时甚至直接失去出胞能力而分散在细胞质中^[9,60]。此外,与轮状病毒 NSP4 的功能类似,在细菌中纯化表达的 NS3 可能通过其 N 端预测的 CCM 形成二聚体,具有诱导质膜通透的病毒孔蛋白 (Viroporin) 活性,但 NS3 在真核细胞中的具体形式还有待进一步研究^[61-63]。

3.2 NS3 的 LDs

作为 ESCRT- I 复合物组分之一的肿瘤易感基因 101 (Tumor susceptibility gene 101, TSG101) 调节囊泡运输,参与 MVBs 的形成,与 Annexin II 类似能被囊膜病毒如人类免疫缺陷病毒等募集以促进病毒释放^[64-65]。研究表明, BTV 的释放也与 TSG101 相关,小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 对 TSG101 的抑制减少了 BTV 的释放,进一步的研究发现 BTV 通过其 NS3 蛋白上的 LD 基序 PSAP 与 TSG101 结合,将成熟的 BTV 颗粒从细胞膜上“截断” (Pinch off)^[66]。Celma 等应用基于 T7 转录的 BTV 反向遗传系统对 PSAP 基序双突变体 (由 PSAP 变为 GAAP) 进行研究,发现该

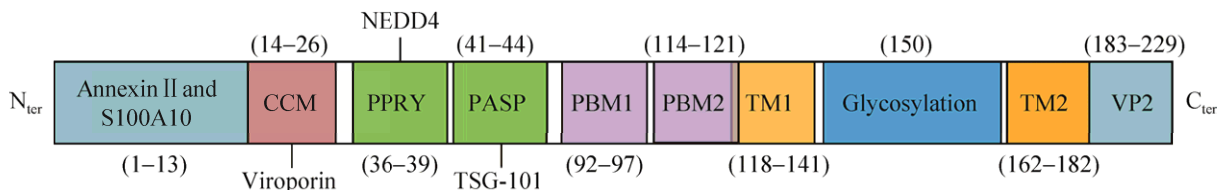


图 2 NS3 功能域模式图

Fig. 2 Structure of the functional domains of NS3.

突变体使病毒粒子无法释放出胞而存在于细胞膜上,但并不影响 dsRNA 合成或蛋白表达等病毒复制行为,表明 PSAP 前两位氨基酸可能是该基序调控 BTV 释放而非复制的关键功能位点^[67]。

研究表明,囊膜病毒如马尔堡病毒、埃博拉病毒等中鉴定的 LD 基序 PPXY 能与 E6AP C 端同源 (Homologous to E6AP C-terminus, HECT) E3 泛素连接酶 NEDD4 家族结合以促进病毒释放,在 BTV 中的 LD 基序同样具有该功能,但该基序第 3 位为精氨酸 (即 PPRY) 而非常见的脯氨酸, BTV 中 PPRY 的缺失使病毒颗粒分布在囊泡外,影响 BTV 以 EVs 形式释放^[43, 68-69]。

3.3 NS3 的 C 端结构域及 PBMs

Celma 等和 Bhattacharya 等对 BTV NS3 C 端构建的多位点突变体研究表明,NS3 通过 C 端结构域与外衣壳 VP2 相作用并促进病毒的释放,但不影响病毒复制及蛋白表达等行为^[67,70]。PBMs 介导蛋白质通过 TGN 转运,参与高尔基体与内质网间的信号转导,在病毒蛋白如爬行动物呼肠孤病毒融合相关小跨膜 (Fusion-associated small transmembrane, FAST) 蛋白 P14 和尼帕病毒融合蛋白 (Fusion protein) 中作为膜融合与膜输出信号参与病毒的转运与释放^[71-73]。Labadie 等在 BTV NS3 的氨基酸序列中发现两个由赖氨酸、精氨酸、组氨酸组成的在环状病毒属病毒中保守的 PBMs,其中 PBM1 决定 NS3 在内质网的集中分布,且 PBM1 的缺失使 BTV 核心颗粒只存在于 VIBs 附近,表明 PBM1 是一种内质网保留信号 (ER retention signal)。另一基序 PBM2 的缺失使核心颗粒分散在细胞质中,降低了 NS3 从高尔基体转运至胞膜的效率和 NS3 的胞膜表达量,表明 PBM2 是一种膜输出信号 (Membrane export signal)。此外, PBMs 的缺失还影响 BTV 外衣壳 VP2 与 VP5 的组装,从而形成缺乏感染性的核心颗粒,也减少了病毒的释放,表明 NS3 的 PBMs 可促进 BTV 的成熟^[30]。

3.4 NS3 与脂筏的作用

研究表明,除 VP2 外,NS3 还能与存在于 VIBs 内的 VP5 相作用,VP5 通过 WHXL 基序与在多种囊膜病毒的出芽释放中发挥重要作用的脂筏结构域 (Lipid raft domain) 相联系,通过胆固醇提取对脂筏的破坏进一步证实了 NS3-VP5-脂筏之间的作用,表明 NS3 可能通过 VP5 与脂筏相联系从而调控 BTV 的转运^[25,70]。此外,研究还发现 BTV 的 NS3 和 VP5 与在囊膜病毒如流感病毒和人类免疫缺陷病毒的出芽中发挥重要作用的调控因子磷脂酰肌醇(4,5)二磷酸 (Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate, PI(4,5)P2) 共定位,且 PI(4,5)P2 的缺失影响了 BTV 的成熟与释放^[74-76]。以上研究表明,BTV NS3 通过外衣壳与脂筏产生联系,与具囊膜的流感病毒通过 HA、NA、M1、M2 等蛋白与脂筏作用的出芽存在相似性,为 BTV 非裂解性释放与脂筏间作用的研究提供了新的思路。

3.5 NS3 拮抗宿主天然免疫

研究表明,宿主天然免疫系统产生的干扰素能诱导骨髓基质细胞抗原 2 (Bone marrow stromal cell antigen 2, BST2) 在脂筏富集,通过其 N 端的 TM 结构域与 C 端的糖基磷脂酰肌醇 (Glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定蛋白将病毒限制在胞膜表面从而抑制囊膜病毒如人类免疫缺陷病毒的释放,该作用同时可被人类免疫缺陷病毒附属病毒蛋白 u (Viral protein u, Vpu) 所拮抗^[77-78]。在无囊膜的 BTV 中,NS3 与 NS4 通过靶向 Janus 酪氨酸激酶-信号转导子和转录活化子 (Janus tyrosine kinases-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 通路中 STAT1 的肉瘤 (Sarcoma, Src) 基因同源结构域 2 (Src homology domain 2, SH2) 结构域并抑制其磷酸化、二聚化及核内转位等拮抗宿主天然免疫应答^[79]。笔者实验室对 BTV NS4 基因进行的克隆及序列特征分析发现其以亮氨酸拉链 (Leucine zipper, LZ) 结构的二聚体形式存在。在此基础上,

验证了 NS4 蛋白在 HEK-293T 细胞的细胞浆、细胞核内分布,且胞浆内主要沿细胞核膜分布的特征,还通过抑制干扰素通路上游的维甲酸诱导基因 I (Retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)、黑色素瘤相关分化基因 5 (Melanoma differentiation associated gene 5, MDA5)、干扰素调节因子 9 (Interferon regulatory factor 9, IRF9) 等基因抑制下游干扰素 β 以及干扰素刺激基因 (Interferon-stimulated gene, ISGs) 等的表达,初步探究了 NS4 拮抗宿主天然免疫应答的机制。有鉴于机体通过天然免疫系统抑制囊膜病毒释放、BTV 类似囊膜病毒能以出芽释放、NS3 与 NS4 协同拮抗宿主天然免疫、笔者实验室基于 NS4 基因拮抗宿主免疫应答而建立的 ELISA 抗体诊断方法等研究,探究 NS4 与 NS3 在 BTV 释放过程中的协同作用及作用的功能区域是本实验室即将开展的工作。

4 总结与展望

综上, BTV 作为一种重要的 dsRNA 虫媒病毒和无囊膜病毒研究的模型系统,通过 EVs、凋亡裂解或出芽等不同方式释放。BTV 非结构蛋白 NS3 通过内质网与 VIBs 相互作用,促进核心颗粒被 VP2 包裹,进而从 VIBs 运输至出胞位点以不同的方式释放 (图 3)。NS3 中发现的 PPRY、PASP、PBM 等功能结构域在 BTV 成熟与释放中扮演着关键的调控作用。

文中综述的 BTV 释放方式与许多经典囊膜病毒如人类免疫缺陷病毒等的释放方式相似,与其同科或同属的病毒之间也存在相同或相异之处。此外,还强调了 BTV 感染以及释放在虫媒以及宿主之间存在差异。然而,上述虫媒-宿主间差异性产生的具体机制、BTV 诱导细胞凋亡与其特异性溶瘤功能的关系^[80]、未知的 NS3 分子结构与 NS3

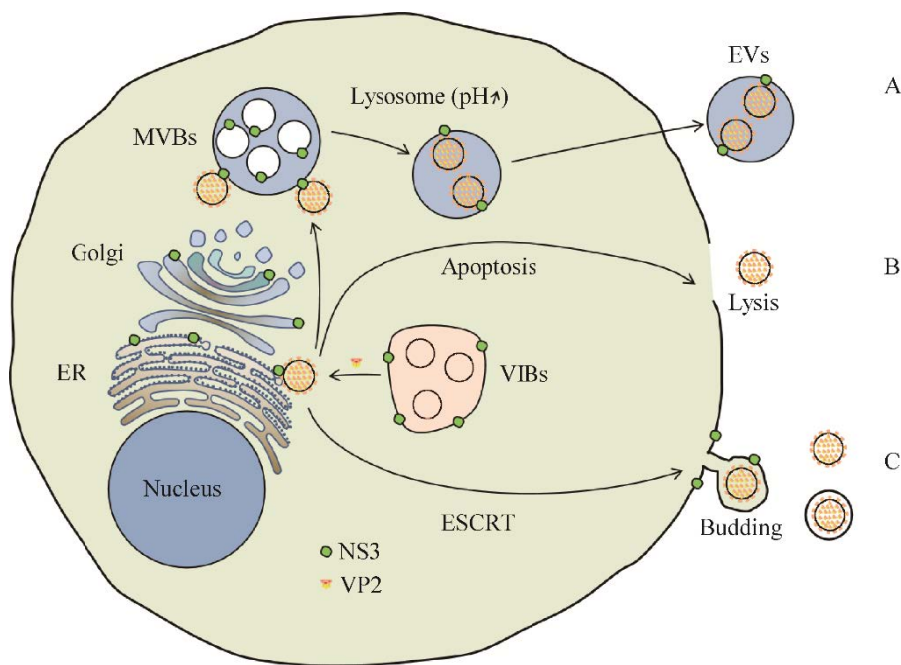


图 3 BTV 释放模型

Fig. 3 Model of BTV releases. (A) After assembly in VIBs, BTV is shipped to MVBs by NS3 and secretes as EVs. (B) BTV releases by apoptosis and lysis. (C) BTV interacts with ESCRT and buds via plasma membrane.

可能具有的病毒孔蛋白活性的关系、NS3-VP5-脂筏间的作用与病毒释放的关系等问题仍有待研究。其中,笔者认为探究 NS3、NS4 调控 BTV 的释放与其他的结构/非结构蛋白和宿主细胞间的联系具有重要意义,也是本课题组即将进行的工作。总之,上述问题的深入研究能更好地理解 BTV 感染、复制、释放及致病的分子机制,从而为 BTV 新型疫苗的研发提供新的思路,对 BT 防控具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Stewart M, Hardy A, Barry G, et al. Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *J Gen Virol*, 2015, 96(11): 3280-3293.
- [2] Ratnien M, Caporale M, Golder M, et al. Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog*, 2011, 7(12): e1002477.
- [3] Wu WN, Celma CC, Kerviel A, et al. Mapping the pH sensors critical for host cell entry by a complex nonenveloped virus. *J Virol*, 2018, 93(4): e01897-18.
- [4] 易华山, 赵瑶, 马鲜平, 等. 蓝舌病毒结构与组装机制研究进展. *家畜生态学报*, 2020, 41(7): 79-84.
Yi HS, Zhao Y, Ma XP, et al. Advance in structure and assembly mechanism of bluetongue virus. *J Domest Animal Ecol*, 2020, 41(7): 79-84 (in Chinese).
- [5] Gold S, Monaghan P, Mertens P, et al. A clathrin independent macropinocytosis-like entry mechanism used by bluetongue virus-1 during infection of BHK cells. *PLoS ONE*, 2010, 5(6): e11360.
- [6] Lourenco S, Roy P. *In vitro* reconstitution of bluetongue virus infectious cores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13746-13751.
- [7] Kerviel A, Ge P, Lai M, et al. Atomic structure of the translation regulatory protein NS₁ of bluetongue virus. *Nat Microbiol*, 2019, 4(5): 837-845.
- [8] Butan C, Tucker P. Insights into the role of the non-structural protein 2 (NS₂) in bluetongue virus morphogenesis. *Virus Res*, 2010, 151(2): 109-117.
- [9] Beaton AR, Rodriguez J, Reddy YK, et al. The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS₃ and mediates virus release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13154-13159.
- [10] Ratnien M, Shaw AE, Barry G, et al. Bluetongue virus NS₄ protein is an interferon antagonist and a determinant of virus virulence. *J Virol*, 2016, 90(11): 5427-5439.
- [11] Pascall DJ, Nomikou K, Bréard E, et al. "Frozen evolution" of an RNA virus suggests accidental release as a potential cause of arbovirus re-emergence. *PLoS Biol*, 2020, 18(4): e3000673.
- [12] Maclachlan NJ. Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev Vet Med*, 2011, 102(2): 107-111.
- [13] Schnettler E, Ratnien M, Watson M, et al. RNA interference targets arbovirus replication in *Culicoides* cells. *J Virol*, 2013, 87(5): 2441-2454.
- [14] Feenstra F, Drolet BS, Boonstra J, et al. Non-structural protein NS₃/NS_{3a} is required for propagation of bluetongue virus in *Culicoides sonorensis*. *Parasit Vectors*, 2015, 8: 476.
- [15] Tan BH, Nason E, Staeuber N, et al. RGD tripeptide of bluetongue virus VP₇ protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *J Virol*, 2001, 75(8): 3937-3947.
- [16] White DM, Wilson WC, Blair CD, et al. Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *J Gen Virol*, 2005, 86(2): 453-462.
- [17] Vermaak E, Maree FF, Theron J. The *Culicoides sonorensis* inhibitor of apoptosis 1 protein protects mammalian cells from apoptosis induced by infection with African horse sickness virus and bluetongue virus. *Virus Res*, 2017, 232: 152-161.
- [18] Roy P. Bluetongue virus structure and assembly. *Curr Opin Virol*, 2017, 24: 115-123.
- [19] Mohl BP, Roy P. Bluetongue virus capsid assembly and maturation. *Viruses*, 2014, 6(8): 3250-3270.
- [20] Sung PY, Vaughan R, Rahman SK, et al. The interaction of bluetongue virus VP₆ and genomic RNA is essential for genome packaging. *J Virol*, 2018, 93(5): e02023-18.
- [21] Sutton G, Grimes JM, Stuart DI, et al. Bluetongue virus VP₄ is an RNA-capping assembly line. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(5): 449-451.

- [22] Rahman SK, Kerviel A, Mohl BP, et al. A calcium sensor discovered in bluetongue virus nonstructural protein 2 is critical for virus replication. *J Virol*, 2020, 94(20): e01099-20.
- [23] Matsuo E, Roy P. Minimum requirements for bluetongue virus primary replication *in vivo*. *J Virol*, 2013, 87(2): 882-889.
- [24] Bhattacharya B, Noad RJ, Roy P. Interaction between bluetongue virus outer capsid protein VP₂ and vimentin is necessary for virus egress. *Virol J*, 2007, 4: 7.
- [25] Mohl BP, Kerviel A, Labadie T, et al. Differential localization of structural and non-structural proteins during the bluetongue virus replication cycle. *Viruses*, 2020, 12(3): 343.
- [26] Janowicz A, Caporale M, Shaw A, et al. Multiple genome segments determine virulence of bluetongue virus serotype 8. *J Virol*, 2015, 89(10): 5238-5249.
- [27] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-228.
- [28] Labadie T, Roy P. A non-enveloped arbovirus released in lysosome-derived extracellular vesicles induces super-infection exclusion. *PLoS Pathog*, 2020, 16(10): e1009015.
- [29] Owusu IA, Quaye O, Passalacqua KD, et al. Egress of non-enveloped enteric RNA viruses. *J Gen Virol*, 2021, 102(3): 001557.
- [30] Labadie T, Jegouic S, Roy P. Bluetongue virus nonstructural protein 3 orchestrates virus maturation and drives non-lytic egress via two polybasic motifs. *Viruses*, 2019, 11(12): 1107.
- [31] van Gennip RG, van de Water SG, van Rijn PA. Bluetongue virus nonstructural protein NS₃/NS_{3a} is not essential for virus replication. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85788.
- [32] Labadie T, Sullivan E, Roy P. Multiple routes of bluetongue virus egress. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 965.
- [33] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [34] Shai B, Schmukler E, Yaniv R, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus induces and benefits from cell stress, autophagy, and apoptosis. *J Virol*, 2013, 87(24): 13397-13408.
- [35] Zhou Y, Geng P, Liu Y, et al. Rotavirus-encoded virus-like small RNA triggers autophagy by targeting IGF1R via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(1): 60-68.
- [36] 王招弟, 丁红雷. 细菌与自噬的抗争——死亡或重生. *生物工程学报*, 2020, 36(8): 1471-1483.
Wang ZD, Ding HL. Fighting between bacteria and autophagy——death or rebirth. *Chin J Biotech*, 2020, 36(8): 1471-1483 (in Chinese).
- [37] Lv S, Xu Q, Sun E, et al. Impaired cellular energy metabolism contributes to bluetongue-virus-induced autophagy. *Arch Virol*, 2016, 161(10): 2807-2811.
- [38] 吕爽. 蓝舌病毒病毒感染诱导细胞自噬的作用和机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
Lv S. The effect and mechanism of cellular autophagy induction during bluetongue virus infection[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese).
- [39] Lv S, Xu Q, Sun E, et al. Autophagy activated by bluetongue virus infection plays a positive role in its replication. *Viruses*, 2015, 7(8): 4657-4675.
- [40] Chen YH, Du W, Hagemeijer MC, et al. Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell*, 2015, 160(4): 619-630.
- [41] Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*, 2013, 496(7445): 367-371.
- [42] Santiana M, Ghosh S, Ho BA, et al. Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal viral transmission. *Cell Host Microbe*, 2018, 24(2): 208-220.e8.
- [43] Bhattacharya B, Celma CC, Roy P. Influence of cellular trafficking pathway on bluetongue virus infection in ovine cells. *Viruses*, 2015, 7(5): 2378-2403.
- [44] Stassen L, Huismans H, Theron J. African horse sickness virus induces apoptosis in cultured mammalian cells. *Virus Res*, 2012, 163(1): 385-389.
- [45] Sato A, Iizuka M, Nakagomi O, et al. Rotavirus double-stranded RNA induces apoptosis and diminishes wound repair in rat intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(3): 521-530.
- [46] Mortola E, Larsen A. Bluetongue virus infection:

- activation of the MAP kinase-dependent pathway is required for apoptosis. *Res Vet Sci*, 2010, 89(3): 460-464.
- [47] Kundlacz C, Pourcelot M, Fablet A, et al. Novel function of bluetongue virus NS₃ protein in regulation of the MAPK/ERK signaling pathway. *J Virol*, 2019, 93(16): e00336-19.
- [48] Mortola E, Noad R, Roy P. Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *J Virol*, 2004, 78(6): 2875-2883.
- [49] Stewart ME, Roy P. Role of cellular caspases, nuclear factor-kappa B and interferon regulatory factors in bluetongue virus infection and cell fate. *Viol J*, 2010, 7: 362.
- [50] Vietri M, Radulovic M, Stenmark H. The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 25-42.
- [51] Silva-Ayala D, López T, Gutiérrez M, et al. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in *Rotavirus* cell entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(25): 10270-10275.
- [52] Votteler J, Sundquist WI. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe*, 2013, 14(3): 232-241.
- [53] Hyatt AD, Zhao Y, Roy P. Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS₃/NS₃A. *Virology*, 1993, 193(2): 592-603.
- [54] Bhattacharya B, Roy P. Role of lipids on entry and exit of bluetongue virus, a complex non-enveloped virus. *Viruses*, 2010, 2(5): 1218-1235.
- [55] Pudupakam RS, Raghunath S, Pudupakam M, et al. Genetic characterization of the non-structural protein-3 gene of bluetongue virus serotype-2 isolate from India. *Vet World*, 2017, 10(3): 348-352.
- [56] Ftaich N, Ciancia C, Viarouge C, et al. Turnover rate of NS₃ proteins modulates bluetongue virus replication kinetics in a host-specific manner. *J Virol*, 2015, 89(20): 10467-10481.
- [57] Aliyu IA, Ling KH, Md Hashim N, et al. Annexin A2 extracellular translocation and virus interaction: a potential target for antiviral-drug discovery. *Rev Med Virol*, 2019, 29(3): e2038.
- [58] Koga R, Kubota M, Hashiguchi T, et al. Annexin A2 mediates the localization of measles virus matrix protein at the plasma membrane. *J Virol*, 2018, 92(10): e00181-18.
- [59] Saxena V, Lai CK, Chao TC, et al. Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol*, 2012, 86(8): 4139-4150.
- [60] Celma CC, Roy P. Interaction of calpactin light chain (S100A10/p11) and a viral NS protein is essential for intracellular trafficking of nonenveloped bluetongue virus. *J Virol*, 2011, 85(10): 4783-4791.
- [61] Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, et al. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP₄ viroporin activity. *mBio*, 2010, 1(5): e00265-10.
- [62] Chacko N, Mohanty NN, Biswas SK, et al. A coiled-coil motif in non-structural protein 3 (NS₃) of bluetongue virus forms an oligomer. *Virus Genes*, 2015, 51(2): 244-251.
- [63] Han Z, Harty RN. The NS₃ protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem*, 2004, 279(41): 43092-43097.
- [64] Bänfer S, Schneider D, Dewes J, et al. Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(19): E4396-E4405.
- [65] Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 2001, 107(1): 55-65.
- [66] Wirblich C, Bhattacharya B, Roy P. Nonstructural protein 3 of bluetongue virus assists virus release by recruiting ESCRT- I protein Tsg101. *J Virol*, 2006, 80(1): 460-473.
- [67] Celma CC, Roy P. A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *J Virol*, 2009, 83(13): 6806-6816.
- [68] Urata S, Yasuda J. Regulation of Marburg virus (MARV) budding by Nedd₄.1: a different WW domain of Nedd₄.1 is critical for binding to MARV and Ebola virus VP₄₀. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 1): 228-234.
- [69] Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, et al. Nedd₄ regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J Virol*, 2003, 77(18): 9987-9992.
- [70] Bhattacharya B, Roy P. Bluetongue virus outer capsid protein VP₅ interacts with membrane lipid rafts via a

- SNARE domain. *J Virol*, 2008, 82(21): 10600-10612.
- [71] Parmar HB, Barry C, Duncan R. Polybasic trafficking signal mediates Golgi export, ER retention or ER export and retrieval based on membrane-proximity. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e94194.
- [72] Hamard-Peron E, Juillard F, Saad JS, et al. Targeting of murine leukemia virus gag to the plasma membrane is mediated by PI(4, 5)P₂/PS and a polybasic region in the matrix. *J Virol*, 2010, 84(1): 503-515.
- [73] Aguilar HC, Matreyek KA, Choi DY, et al. Polybasic KKR motif in the cytoplasmic tail of Nipah virus fusion protein modulates membrane fusion by inside-out signaling. *J Virol*, 2007, 81(9): 4520-4532.
- [74] Curthoys NM, Mlodzianoski MJ, Parent M, et al. Influenza hemagglutinin modulates phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate membrane clustering. *Biophys J*, 2019, 116(5): 893-909.
- [75] Beaumelle B, Tóth P, Malak OA, et al. Phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate-mediated pathophysiological effect of HIV-1 Tat protein. *Biochimie*, 2017, 141: 80-85.
- [76] Bhattacharya B, Roy P. Cellular phosphoinositides and the maturation of bluetongue virus, a non-enveloped capsid virus. *Virol J*, 2013, 10: 73.
- [77] Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell*, 2009, 139(3): 499-511.
- [78] Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 2008, 451(7177): 425-430.
- [79] Li ZR, Lu DF, Yang H, et al. Bluetongue virus non-structural protein 3 (NS₃) and NS₄ coordinatively antagonize type I interferon signaling by targeting STAT1. *Vet Microbiol*, 2021, 254: 108986.
- [80] Li JK. Oncolytic bluetongue viruses: promise, progress, and perspectives. *Front Microbiol*, 2011, 2: 46.

(本文责编 郝丽芳)