

cGAS/STING 信号通路参与猪圆环病毒 2 型诱导猪肺泡巨噬细胞产生 I 型干扰素

陈洪博¹, 李凤¹, 赖文琰¹, 方宇豪¹, 江铭涌¹, 段滇宁¹, 杨小燕^{1,2}

1 龙岩学院 生命科学学院, 福建 龙岩 364012

2 福建省预防兽医学与兽医生物技术重点实验室, 福建 龙岩 364012

陈洪博, 李凤, 赖文琰, 等. cGAS/STING 信号通路参与猪圆环病毒 2 型诱导猪肺泡巨噬细胞产生 I 型干扰素. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3201-3210.

Chen HB, Li F, Lai WY, et al. cGAS/STING signaling pathways induces the secretion of type I interferon in porcine alveolar macrophages infected with porcine circovirus type 2. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3201-3210.

摘 要: 为研究猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 感染的猪肺泡巨噬细胞 (Porcine alveolar macrophages, PAMs) 分泌 I 型干扰素信号通路, 以 PCV2 病毒感染 PAMs 为研究对象, 采用酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、实时荧光定量 PCR 和 Western blotting, 分析 PCV2 感染对 PAMs I 型干扰素的诱导、cGAS/STING 信号通路相关基因 mRNA 和蛋白表达的影响, 并应用靶向 cGAS 和 STING 特异性 siRNA、抑制剂 BX795 和 BAY 11-7082, 解析 cGAS、STING、TBK1 和 NF- κ B/p65 在 PAMs 生成 I 型干扰素中的作用。结果显示, PAMs 感染 PCV2 病毒 48 h 后 I 型干扰素的表达量显著升高 ($P < 0.05$), cGAS mRNA 的表达量在感染 48 h 和 72 h 后显著升高 ($P < 0.01$), STING mRNA 表达量在 PCV2 感染 72 h 后显著上升 ($P < 0.01$), TBK1 mRNA、IRF3 mRNA 感染 48 h 后显著升高 ($P < 0.01$)。PCV2 能够显著升高 PAMs 胞浆 STING、TBK1 和 IRF3 蛋白含量, 降低胞浆 NF- κ B/p65 的含量, 促进 NF- κ B/p65 和 IRF3 入核。敲低 PAMs 中 cGAS 或 STING 表达水平后, PCV2 感染 PAMs 48 h 后, I 型干扰素的表达水平显著下降 ($P < 0.01$); BAX795 抑制 TBK1 后, PCV2 感染 PAMs 48 h I 型干扰素的表达水平显著下降 ($P < 0.01$), BAY 11-7082 抑制 NF- κ B/p65 表达后, PCV2 感染 PAMs 48 h I 型干扰素的表达量与 PCV2 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明, PAMs 感染 PCV2 后通过 cGAS/STING/TBK1/IRF3 信号通路诱导 I 型干扰素分泌。

关键词: 猪圆环病毒 2 型, 猪肺泡巨噬细胞, I 型干扰素, 先天性免疫信号通路

Received: November 9, 2020; **Accepted:** March 8, 2021

Supported by: Major Project of Science and Technology Program of Fujian Province, China (No. 2019NZ09005), Special Projects for Local Science and Technology Development Guided by the Central Government, China (No. 2019L3011), Natural Science Foundation of Fujian Province, China (Nos. 2018J01461, 2019J01803), Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students, China (No. 202011312054).

Corresponding author: Xiaoyan Yang. Tel: +86-597-2797255; E-mail: lyxy1988@126.com

福建省科技重大专项 (No. 2019NZ09005), 中央引导地方科技发展专项项目 (No. 2019L3011), 福建省自然科学基金 (Nos. 2018J01461, 2019J01803), 大学生创新创业训练项目 (No. 202011312054) 资助。

cGAS/STING signaling pathways induces the secretion of type I interferon in porcine alveolar macrophages infected with porcine circovirus type 2

Hongbo Chen¹, Feng Li¹, Wenyan Lai¹, Yuhao Fang¹, Mingyong Jiang¹, Dianning Duan¹, and Xiaoyan Yang^{1,2}

¹ College of Life Sciences, Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China

² Fujian Provincial Key Laboratory for the Prevention and Control of Animal Infectious Diseases and Biotechnology, Longyan 364012, Fujian, China

Abstract: In order to study the signal pathway secreting type I interferon in porcine alveolar macrophages (PAMs) infected with porcine circovirus type 2 (PCV2), the protein and the mRNA expression levels of cGAS/STING pathways were analyzed by ELISA, Western blotting and quantitative reverse transcriptase PCR in PAMs infected with PCV2. In addition, the roles of cGAS, STING, TBK1 and NF- κ B/p65 in the generation of type I interferon (IFN-I) from PAMs were analyzed by using the cGAS and STING specific siRNA, inhibitors BX795 and BAY 11-7082. The results showed that the expression levels of IFN-I increased significantly at 48 h after infection with PCV2 ($P < 0.05$), the mRNA expression levels of cGAS increased significantly at 48 h and 72 h after infection ($P < 0.01$), the mRNA expression levels of STING increased significantly at 72 h after infection ($P < 0.01$), and the mRNA expression levels of TBK1 and IRF3 increased at 48 h after infection ($P < 0.01$). The protein expression levels of STING, TBK1 and IRF3 in PAMs infected with PCV2 were increased, the content of NF- κ B/p65 was decreased, and the nuclear entry of NF- κ B/p65 and IRF3 was promoted. After knocking down cGAS or STING expression by siRNA, the expression level of IFN-I was significantly decreased after PCV2 infection for 48 h ($P < 0.01$). BX795 and BAY 11-7082 inhibitors were used to inhibit the expression of IRF3 and NF- κ B, the concentration of IFN-I in BX795-treated group was significantly reduced than that of the PCV2 group ($P < 0.01$), while no significant difference was observed between the BAY 11-7082 group and the PCV2 group. The results showed that PAMs infected with PCV2 induced IFN-I secretion through the cGAS/STING/TBK1/IRF3 signaling pathway.

Keywords: porcine circovirus type 2, porcine alveolar macrophages, type I interferon, innate immune signaling pathway

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 是无囊膜的单股环状负链 DNA 病毒, 自 1997 年发现以来, 已在世界各地广泛传播^[1-2]。PCV2 入侵猪机体宿主细胞后, 如猪肺泡巨噬细胞 (Porcine alveolar macrophages, PAMs), 宿主细胞能通过模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 识别入侵病毒, 并诱导多种先天性免疫以及抗病毒基因、干扰素、趋化因子和促炎细胞因子的产生, 这些产物协同抑制并控制病毒感染^[3-5]。胞质 DNA 传感器 cGAS (cGMP-ATP synthase, cGAS) 能够识别 DNA 病毒和逆转录病毒的胞内 DNA, 与 STING (Stimulator of interferon genes, STING) 结合并激活 STING, 诱导干扰素 (Interferon, IFN) 产生, 引起机体抗病毒免疫反

应^[6-7], 那么 PCV2 是否能够通过此信号通路诱导 PAMs 免疫应答及 I 型干扰素产生, 到目前为止未见报道。

天然免疫是动物机体阻止病原体入侵并抑制其在体内复制的第一道屏障, 天然免疫会利用 PRRs 识别一些非自我、病原相关分子模式 (Pathogen associated molecule patterns, PAMPs), 在识别病原体后, 机体会产生多种抗病毒基因、IFNs、趋化因子和促炎因子等, 这些产物协同抑制并控制病毒感染, 之后激活自身免疫系统来清除对机体产生伤害的物质^[8-10]。干扰素是动物机体分泌的一种细胞因子, 具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用, 与机体内的细胞受体结合后, 一方面诱导组织细胞分泌抗病毒蛋白, 激活 2'-5'寡

聚腺苷酸合成酶 (2'-5' oligoadenylates synthesis, OAS)、磷酸二酯酶、蛋白激酶,促使病毒 mRNA 降解,抑制病毒蛋白翻译,导致病毒蛋白合成受阻,进而抑制病毒复制;另一方面,通过促进细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) 增殖、激活自然杀伤细胞 (Natural killer cell, NK) 杀伤功能、增强巨噬细胞吞噬功能,增强免疫清除能力,进而发挥清除病毒的作用。cGAS 是识别 DNA 病毒的最主要的模式识别受体,STING 是 DNA 模式识别受体共同经过的一个跨膜接头蛋白。cGAS 能感知细胞质中的外源性 DNA 时,会催化 GTP 和 ATP 之间发生化学反应,并生成环鸟腺苷酸 (cyclic GMP-AMP, cGAMP),cGAMP 作为先天免疫系统的信使,结合并激活 STING,STING 被激活后随 TBK1 从内质网一起转位至核周围高尔基体,TBK1 激酶磷酸化并激活干扰素调节因子 (IFN regulatory factor, IRFs) 和 NF- κ B 等基因,后者诱导 I 型干扰素和其他免疫应答反应^[11-12]。

试验以 PAMs 为模型,采用 siRNA 干扰技术抑制 cGAS 和 STING 基因表达,或抑制 cGAS/STING 信号通路下游分子 TBK1 或 NF- κ B,检测 IFN- α 和 IFN- β 表达量,研究 cGAS/STING 在 PCV2 感染 PAMs 后生成 I 型干扰素中的作用,为研究 PCV2 与宿主模式识别受体相互作用模式及其发病机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 病毒及材料

PCV2-SH (AY686763) 病毒滴度为 $1 \times 10^{-5.5}$ TCID₅₀/mL,由龙岩学院生命科学学院保存;Total RNA Extraction Reagent、HiScript III RT SuperMix 和 SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;兔抗 NF- κ B/p65 多克隆抗体、兔抗 STING 多克隆抗体、兔抗 TBK1 多克隆抗体和兔抗 IRF3 多克隆抗体购自北京博

奥森公司;兔抗 β -actin 单克隆抗体、兔抗 Histone H3 多克隆抗体、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒和 NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082 购自上海碧云天生物公司;Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 购自 Invitrogen™;TBK1 抑制剂 BX795 购自 InvivoGen;猪干扰素- α (Swine IFN- α) 和猪干扰素- β (Swine IFN- β) 的 ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技股份有限公司;根据文献[13]设计 sicGAS 和 siSTING 序列,由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2 猪肺泡巨噬细胞的制备

3 头 28 日龄血清 PCV2 和 PRRSV 抗体阴性,PCV2、PRRSV、PRV 和 CSFV 抗原检测阴性的断奶仔猪,自由采食饮水饲养 5 d 消除机体应激反应,根据文献[14]采用肺泡灌洗法无菌分离收集猪肺泡巨噬细胞 (PAMs),用 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL,备用。

1.3 试验设计

将 PAMs 贴壁 24 h 后分成空白对照组和 PCV2 组,每组设置 3 个重复,PCV2 组接种 PCV2 (MOI=1),感染后 6、12、24、48、72 h 收集细胞及上清液。将 PAMs 分成 PCV2+siNC 组、PCV2+sicGAS 组和 PCV2+siSTING 组,每组设置 3 个重复,PCV2+sicGAS 组和 PCV2+siSTING 组按照转染试剂说明书操作如下:用 125 μ L 不含血清培养基 Opti-MEM 稀释 5 μ L 的 20 μ mol/L siRNA,轻轻混匀;用 125 μ L 不含血清培养基 Opti-MEM 稀释 5 μ L 的 Lipofectamine 3000 转染试剂,轻轻混匀;将两管混匀,室温孵育 10–15 min;PAMs 弃培养基,PBS 洗 2 遍,换成含 1% 血清的维持液,将 siRNA-Lipo3000 混合液加入细胞孔中,轻轻混匀,转染 24 h 后接种 PCV2 (MOI=1),48 h 后收集细胞及上清液。将 PAMs 分成 PCV2 组、PCV2+BX795 组、PCV2+BAY 11-7082 组,每组设置 3 个重复,PCV2 组处理同上,PCV2+BX795 组和

PCV2+BAY 11-7082 组分别用 0.5 μmol BX795、5 μmol BAY 11-7082 处理 1 h, 然后接种 PCV2 (MOI=1), 48 h 后收集细胞及上清液。

1.4 ELISA

根据试剂盒说明书, 采用 ELISA 法测定培养上清中 IFN- α 和 IFN- β 的水平, 根据标准曲线将每个样品的 OD 值转换为相应的浓度, 并用平均浓度 (pg/mL) 表示。

1.5 qPCR

使用 Total RNA Extraction Reagent 提取 PAMs 总 RNA, HiScript III RT SuperMix 逆转录试剂盒操作步骤简述如下: RNA 1 μg 、4 \times gDNA wiper mix 4 μL 、ddH₂O 至 16 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 加入 5 \times HiScript III qRT SuperMix 4 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 反转录成 cDNA, qPCR 反应体系由 2 μL cDNA、10 μL SYBR Green、0.6 μL 上游引物、0.6 μL 下游引物和 6.8 μL 双蒸馏水组成, 以 β -actin 为内参, 检测 mRNA 变化, 引物序列见表 1。qPCR 数据分析根据 C_t 值计算目的基因的相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法), 其中 $\Delta\Delta C_t = [\text{实验组}(C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})] - [\text{对照组}(C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})]$ 。

1.6 Western blotting

取 48 h 空白对照组和 PCV2 组 PAMs, 使用细胞核蛋白提取试剂盒提取淋巴细胞胞浆和胞核蛋白, 具体步骤参考试剂盒说明书, BCA 法测定

样品蛋白浓度, -80°C 保存备用。细胞质或细胞核蛋白样品与 5 \times SDS 变性缓冲液混合煮沸变性 5 min, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转印到 0.22 μm PVDF 膜, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中 5% 脱脂乳封闭 2 h 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育一抗 (1:1 000 稀释) 过夜, 室温孵育二抗 (1:10 000 稀释) 2 h, 加 ECL 显影液上机检测, 采用 Quantity one 软件对蛋白条带灰度值分析。

1.7 数据分析

所有数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计采用 SPSS20.0 软件, 用单因素方差分析和多重比较法分析各组之间的差异。 $*P < 0.05$ 表示差异显著, $**P < 0.01$ 表示差异极显著, ns 表示无显著差异。

2 结果与分析

2.1 PAMs 感染 PCV2 后上清液中 IFN- α 和 IFN- β 含量的变化

PAMs 上清液中 IFN- α 和 IFN- β 含量变化如图 1 所示, PCV2 感染 PAMs 后 IFN- α 分泌增强。感染后 48 h, PCV2 组与空白对照组相比 IFN- α 含量极显著升高 ($P < 0.01$), 随着时间延长, IFN- α 含量出现下降趋势, 但仍显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1A)。感染后 48 h 和 72 h, PCV2 组与空白对照组相比 IFN- β 含量极显著升高 ($P < 0.05$) (图 1B)。

表 1 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
cGAS	Sense: TACCCAAGCATGCCAAGGAAGGAAGT	365
	Anti-sense: GGCCAGTTGTTCTGTCTTGAGGCAC	
STING	Sense: CTCATTGTCTACCAGGAACCC	141
	Anti-sense: GGACAGCGTGGAGGAAGTG	
TBK1	Sense: CCGTCATTAGTGCCTCAGTTCT	229
	Anti-sense: ACAGATTTTGGTGCAGCCAG	
IRF3	Sense: TGGGCAGGTCGGGCTTAT	83
	Anti-sense: GCAGGAGGACTTCGGCATCT	
β -actin	Sense: CTCCATCATGAAGTGCGACGT	114
	Anti-sense: GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC	

2.2 PAMs 感染 PCV2 后模式识别受体和接头蛋白 mRNA 变化

PAMs 感染 PCV2 后 cGAS/STING 通路相关 mRNA 变化如图 2 所示, DNA 模式识别受体 cGAS 的 mRNA 表达量在 24 h、48 h、72 h 都极显著升高 ($P<0.01$) (图 2A)。模式识别受体下游信号通路中的接头蛋白 STING 的 mRNA 表达量在 24 h 升高, 但无显著差异 ($P>0.05$), 72 h 极显著升高

($P<0.01$) (图 2B)。信号通路下游分子 IRF3 和 TBK1 的 mRNA 表达量在 48 h 和 72 h 显著升高 ($P<0.05$) 或呈极显著升高 ($P<0.01$) (图 2C、D)。

2.3 PAMs 感染 PCV2 后对细胞质中 STING、TBK1、NF- κ B/P65 和 IRF3 表达的影响

PAMs 感染 PCV2 48 h 后细胞浆中 STING、TBK1、NF- κ B/P65 和 IRF3 表达如图 3A、B 所示, 与 48 h 对照组相比, PCV2 感染组中 STING 和

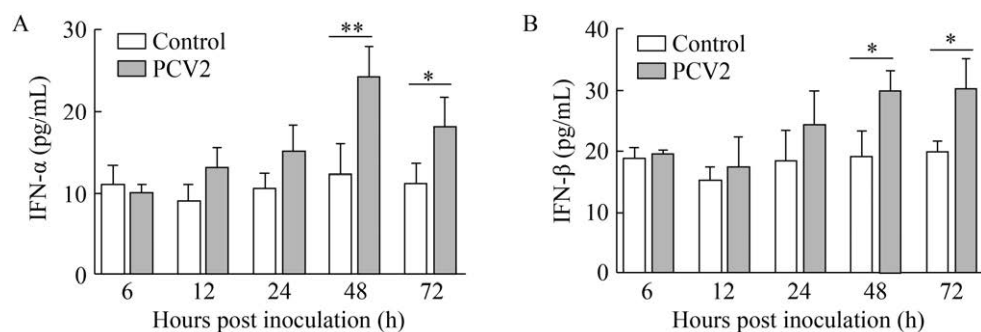


图 1 PCV2 感染后不同时间 PAMs 细胞培养上清液中 IFN- α 和 IFN- β 的浓度

Fig. 1 The levels of IFN- α (A) and IFN- β (B) in cell culture supernatant infected with PCV2.

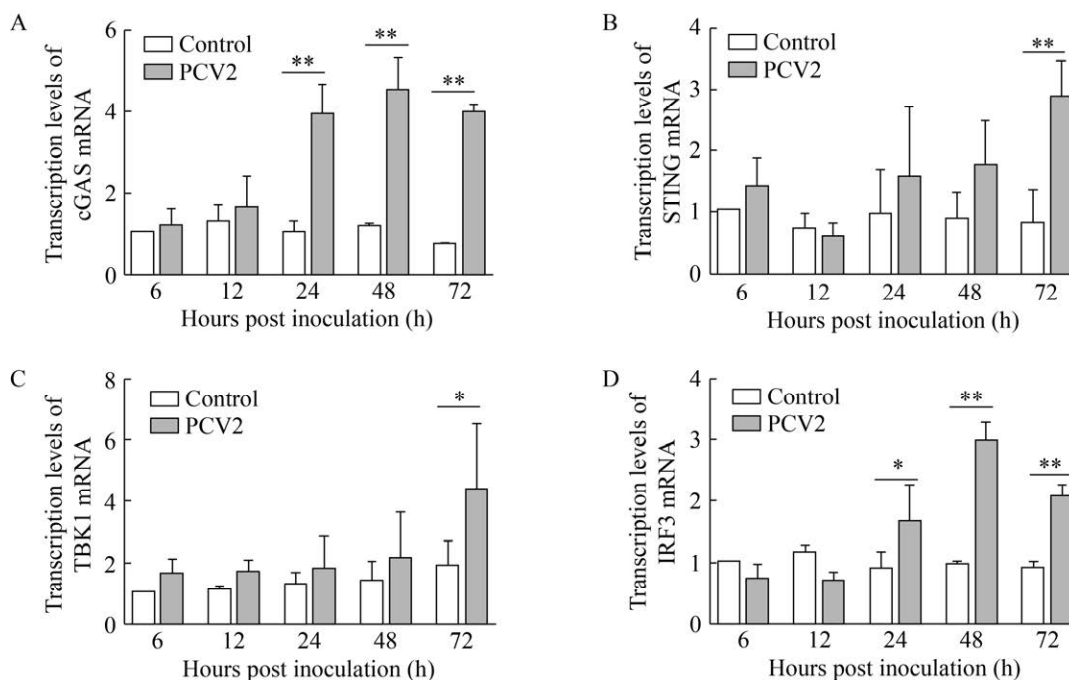


图 2 PCV2 感染后 PAMs 细胞中 mRNA 变化

Fig. 2 The mRNA levels of cGAS (A), STING (B), TBK1 (C), and IRF3 (D) in PAMs infected with PCV2.

IRF3 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$), TBK1 蛋白水平极显著升高 ($P<0.01$), NF- κ B/P65 蛋白水平极显著降低 ($P<0.01$)。表明 PAMs 感染 PCV2 后激活 cGAS-STING 信号通路, 诱导细胞质中信号通路分子 STING、TBK1 和 IRF3 表达, PCV2 降低 PAMs 细胞质中 NF- κ B/P65 含量, 促进其入核。

2.4 PAMs 感染 PCV2 后对细胞核中 IRF3 和 NF- κ B 表达的影响

PAMs 感染 PCV2 48 h 后细胞核中 NF- κ B/P65 和 IRF3 表达如图 4 所示, 与 48 h 对照组相比, PCV2 感染组 IRF3 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$), NF- κ B/P65 蛋白水平极显著升高 ($P<0.01$), 表明 PAMs 感染 PCV2 后促进 IRF3 和 NF- κ B/P65 入核。

2.5 sicGAS 和 siSTING 序列验证

为验证 cGAS 和 STING 在 PAMs 产生 I 型干扰素中的作用, 合成 sicGAS 和 siSTING 后用 sicGAS、siSTING 和 siNC 转染细胞, 48 h 后收集细胞, 结果如图 5 所示, 与 siNC 组相比, sicGAS

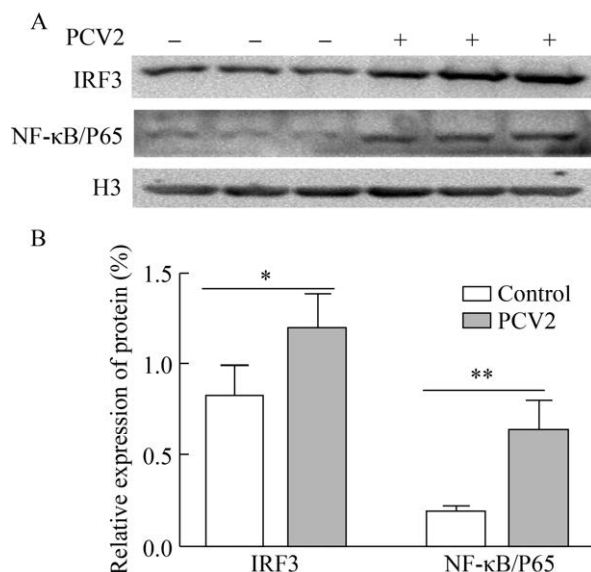


图 3 PCV2 感染后 PAMs 细胞胞浆蛋白的变化

Fig. 3 Changes of cytoplasmic proteins in PAMs infected with PCV2. (A) The levels of STING, TBK1, IRF3 and NF- κ B/P65 in PAMs cytoplasm were examined by Western blotting. (B) Quantity one software was used to analyze immunoblots.

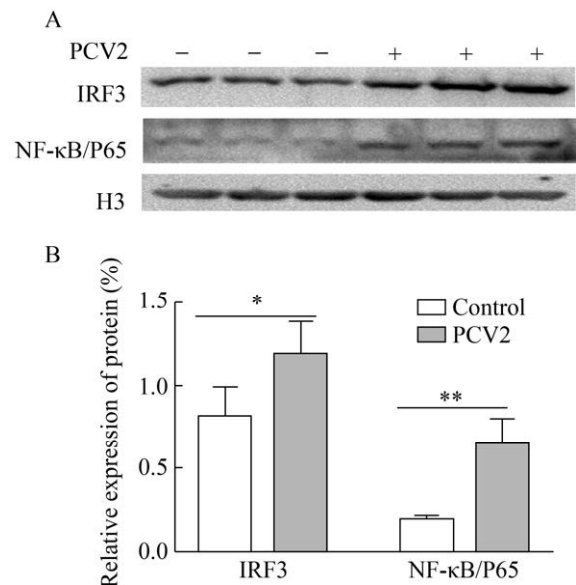


图 4 PCV2 感染后 PAMs 细胞核蛋白的变化

Fig. 4 Changes of nuclear proteins in PAMs infected with PCV2. (A) The levels of IRF3 and NF- κ B/P65 in PAMs nucleus were examined by Western blotting. (B) Quantity one software was used to analyze immunoblots.

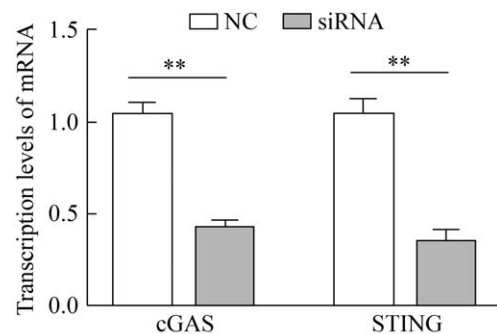


图 5 转染 siRNA 后 PAMs 细胞中 cGAS 和 STING 的表达

Fig. 5 The expression levels of cGAS and STING in PAMs cells after the siRNA transfection.

和 siSTING 均能够显著下调相应的 mRNA 水平 ($P<0.01$), 基因的沉默率分别为 42% 和 34%。

2.6 sicGAS 和 siSTING 处理对 PAMs 分泌 I 型干扰素的影响

用 sicGAS、siSTING 或 siNC 转染细胞, 24 h 后接种 PCV2, 感染后 48 h 收集细胞上清液, 检测 cGAS 和 STING 表达下降后, I 型干扰素表达

结果如图 6 所示, PAMs 的 IFN- α 表达水平与转染 siNC 相比, 转染 sicGAS 和转染 siSTING 再接种 PCV2 48 h 后均极显著降低 ($P<0.01$); PAMs 的 IFN- β 表达水平与转染 siNC 相比, 转染 sicGAS 和转染 siSTING 再接种 PCV2 48 h 后显著降低 ($P<0.05$) 或极显著降低 ($P<0.01$)。

2.7 TBK1 和 NF- κ B 抑制剂处理对 PAMs 分泌 I 型干扰素的影响

用 BX795 或 BAY 11-7082 处理细胞 1 h 后接种 PCV2, 检测 TBK1 和 NF- κ B 抑制表达后, I 型干扰素表达结果如图 7 所示, 与 PCV2 组相比, PCV2+BX795 组 IFN- α 的表达水平极显著降低 ($P<0.01$), PCV2+BAY 11-7082 组 IFN- α 的表达水平有降低趋势, 但无显著差异; PCV2+BX795 组和 PCV2+BAY 11-7082 组 IFN- α 的表达水平有显著差异 ($P<0.05$); 与 PCV2 组相比, PCV2+BX795 组 IFN- β 的表达水平显著降低 ($P<0.05$), PCV2+BAY 11-7082 组 IFN- β 的表达水平有降低趋势, 但无显著差异; PCV2+BX795 组和 PCV2+BAY 11-7082 组 IFN- β 的表达水平无显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

先天性免疫又称为固有免疫, 指动物机体先

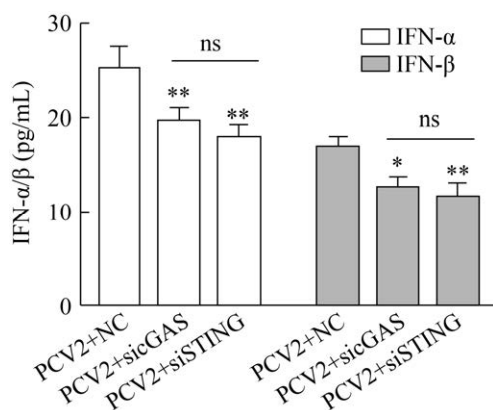


图 6 siRNA 处理对 PAMs 细胞感染 PCV2 后生成 I 型干扰素的影响

Fig. 6 The effect of different siRNA on the levels of type I IFN in PAMs cells infected with PCV2.

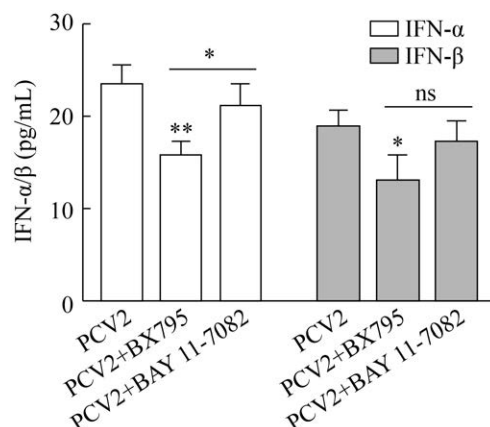


图 7 抑制剂处理对 PAMs 细胞感染 PCV2 后生成 I 型干扰素的影响

Fig. 7 The effect of different inhibitor on the levels of IFN-I in PAMs cells infected with PCV2.

天具有的正常的生理防御功能, 由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成, 对各种入侵的病原微生物能快速反应, 同时在特异性免疫的启动和效应过程也起着重要作用^[5]。巨噬细胞作为一种免疫细胞在先天性免疫中起重要作用, 具有趋化性定向运动、吞噬作用、抗原呈递作用和分泌作用, 例如溶菌酶、补体、干扰素等, 其中干扰素主要以其抗病毒活性著称^[15]。干扰素根据其氨基酸序列不同, 分为 3 种类型, 分别是 I 型、II 型和 III 型干扰素, 其中 I 型干扰素又包括 IFN- α 和 IFN- β , 主要由病毒感染直接引起^[4]。机体受到病原微生物刺激后干扰素与其受体 (异二聚体 IFNAR1 和 IFNAR2) 结合, 激活 STAT 转录因子的转录, 从而激活干扰素刺激基因 (Interferon-stimulated genes, ISGs) 翻译。ISGs 编码的蛋白质 (例如 MX1、OAS 和 ISG-15) 可以在周围细胞中建立抗病毒状态, 从而限制病毒的复制和传播^[16]。PAMs 是猪机体抵抗多种病原的天然屏障, 是 PCV2 的靶细胞^[17]。天然免疫细胞细胞表面或细胞质内存在多种抗原识别受体即 PRRs, 参与病原体或损伤分子识别和早期应答阶段的经典信号通路包括 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 信号通路、C 型凝集素受体 (CLR) 信号通路、炎

症小体及细胞焦亡信号通路、RIG-I-MAVS 信号通路和 cGAS-STING 信号通路, cGAS-STING 信号通路主要识别病毒 DNA^[10]。前期研究报道发现 PCV2 感染猪后能引起血清中 I 型干扰素表达升高^[2]; PAMs 感染 PCV2 后激活 TLRs-MyD88 依赖的通路, 激活 RIG-I/MDA-5/MAVS/IRF3 信号通路诱导 I 型干扰素表达^[18]; PAMs 感染 PCV2 后可通过 MyD88-IRFs 信号途径上调 IFN 的表达^[20]。cGAS-STING 在 DNA 病毒侵染动物体后产生干扰素过程中起重要作用, 然而其在 PAMs 感染 PCV2 后生成干扰素中的作用机制尚未见报道, 试验结果发现, 原代 PAMs 在体外接受 PCV2 感染 48 h 后 I 型干扰素表达显著升高, 这与其他研究报告一致^[19], 试验结果表明 PAMs 在体外可分泌 IFN- α 和 IFN- β , 并且主要在感染后期大量表达。

cGAS 作为 DNA 传感器, 其在识别各种外源 DNAs 中具有重要作用, 很多 DNA 病毒能够通过 cGAS 被识别并启动 cGAS-cGAMP-STING 介导的抗病毒反应, 包括疱疹病毒^[20]、非洲猪瘟病毒^[21]和痘病毒^[22]等。cGAS 酶感知到本不应出现在细胞质的 DNA 时, 胞质 DNA 与 cGAS 结合后传递至第二信使环磷酸鸟苷-磷酸腺苷 (Cyclin GMP-AMP, cGAMP), cGAMP 作为第二信使直接活化 STING, 二聚化的 STING 与 cGAMP 结合, 构象发生变化, 通过自噬小体经内质网、高尔基体再到内体, 期间被泛素化后募集 TBK1 蛋白, 磷酸化并激活干扰素调节因子 IRF3 和 NF- κ B, 后者激活后入核并诱导 I 型干扰素和其他免疫应答基因表达。STING 全称干扰素基因刺激蛋白, 是一种介导胞内 DNA 诱导固有免疫应答的重要接头蛋白, 在感知 dsDNA 的反应中扮演了中心轴的作用, 是 I 型干扰素的强刺激基因^[23]。STING 二聚化后, 从内质网经过高尔基体转移到核外周小体上, SCAP 从内质网转移聚集到核外周小体, 并将转录因子 IRF3 招募到 STING 信号

复合体上, TBK1 也会同时聚集到核外周小体上并被激活, 激活后的 TBK1 磷酸化 IRF3, 随后 IRF3 发生二聚化, 入核起始靶基因的表达; 去掉 STING C-末端的 9 个氨基酸, STING 就失去活力, 去掉这些氨基酸后 STING 不能与 TBK1 共定位, STING 突变后不能结合 TBK1, 且这些突变影响干扰素的表达^[3,12,24]。STING 也能激活激酶 IKK, 使转录因子 NF- κ B 的抑制剂 I κ B 家族磷酸化, 磷酸化的 I κ B 蛋白能通过蛋白酶体途径被降解, 释放 NF- κ B 进入细胞核, 诱导干扰素和炎症细胞因子如 TNF、IL-1 β 和 IL-6 的表达^[11,25]。qPCR 试验结果显示, PAMs 感染 PCV2 后, cGAS-STING 信号通路中模式识别受体 cGAS 被激活, mRNA 表达量显著升高 ($P<0.01$), 接头蛋白 STING 的 mRNA 表达量显著升高 ($P<0.01$), 下游信号分子 TBK1 和 IRF3 的 mRNA 表达量也显著升高 ($P<0.01$)。Western blotting 结果显示 PAMs 感染 PCV2 后, 细胞质中 STING、TBK1 和 IRF3 表达显著升高, 而 NF- κ B/P65 含量降低, 细胞核中 NF- κ B/P65 和 IRF3 表达量显著升高。两部分实验结果表明, PAMs 感染 PCV2 后能激活 cGAS-STING 信号通路, 但通过何种下游信号分子——NF- κ B/P65 或 IRF3 来诱导干扰素表达需进一步研究。为验证 cGAS 和 STING 在 PAMs 产生 I 型干扰素中的作用, 应用 siRNA 技术, 设计特异性 sicGAS 和 siSTING 靶向 cGAS 和 STING, 结果显示抑制 cGAS 或 STING 表达后, I 型干扰素的表达极显著降低 ($P<0.01$), 特别是 STING 被抑制后 IFN- α 和 IFN- β 均极显著降低, 表明 STING 作为识别 DNA 病毒感染的接头蛋白在 I 型干扰素产生中起重要作用。为进一步验证下游分子的变化, 分别使用 TBK1 和 NF- κ B 的抑制剂 BX795^[26]和 BAY 11-7082^[27]处理 PAMs 后接种 PCV2, 结果显示 TBK1 抑制表达后 IFN- α 和 IFN- β 均极显著降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 而 NF- κ B 抑制表达后 IFN- α 和 IFN- β 表达量与对照相比无显著差异, 试验结

果表明, PAMs 感染 PCV2 后生成的 I 型干扰素与 cGAS/STING/TBK1/IRF3 信号通路关系密切。虽然 PCV2 感染 PAMs 后促进 NF- κ B 入核, 但与 I 型干扰素表达无关。研究表明, PAMs 感染 PCV2 后多种 TLRs 被激活, NF- κ B/P65 入核增多, IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 等炎症细胞因子分泌增加, NF- κ B 被激活后改变机体急性期蛋白、病毒复制和多种白细胞介素的表达^[28], 而与干扰素表达无明显作用。本实验对 cGAS/STING/TBK1/IRF3 信号通路在 PCV2 感染 PAMs 后 I 型干扰素表达中的作用进行探究, 为揭示 PCV2 感染和机体先天性免疫的关系奠定基础。

REFERENCES

- [1] Koinig HC, Talker SC, Stadler M, et al. PCV2 vaccination induces IFN- γ /TNF- α co-producing T cells with a potential role in protection. *Vet Res*, 2015, 46: 20.
- [2] Fort M, Fernandes LT, Nofrarias M, et al. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 129(1/2): 101-107.
- [3] Zhao BY, Du FL, Xu PB, et al. A conserved PLPLRT/SD motif of STING mediates the recruitment and activation of TBK1. *Nature*, 2019, 569(7758): 718-722.
- [4] Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature*, 2014, 505(7485): 691-695.
- [5] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [6] Suschak JJ, Wang SX, Fitzgerald KA, et al. A cGAS-independent STING/IRF7 pathway mediates the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol*, 2016, 196(1): 310-316.
- [7] Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, et al. Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. *EMBO J*, 2018, 37(8): e97858.
- [8] 孙文香, 蒋争凡. 病毒感染引发天然免疫细胞信号转导研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(5): 563-573.
Sun WX, Jiang ZF. Innate immune detection and activation to viral infection. *Chin J Cell Biol*, 2013, 35(5): 563-573 (in Chinese).
- [9] Cheng WY, He XB, Jia HJ, et al. The cGAS-STING signaling pathway is required for the innate immune response against ectromelia virus. *Front Immunol*, 2018, 9: 1297-1310.
- [10] Du MJ, Chen ZJ. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science*, 2018, 361(6403): 704-709.
- [11] Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal*, 2012, 5(214): ra20.
- [12] Chen W, Li SL, Yu HS, et al. ER adaptor SCAP translocates and recruits IRF3 to perinuclear microsome induced by cytosolic microbial DNAs. *PLoS Pathog*, 2016, 12(2): e1005462.
- [13] Huang B, Zhang LL, Lu MQ, et al. PCV2 infection activates the cGAS/STING signaling pathway to promote IFN- β production and viral replication in PK-15 cells. *Vet Microbiol*, 2018, 227: 34-40.
- [14] Liu Q, Bai J, Lu Q, et al. Two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling approach revealed first proteome profiles of pulmonary alveolar macrophages infected with porcine circovirus type 2. *J Proteomics*, 2013, 79: 72-86.
- [15] Li J, Wada S, Weaver LK, et al. Myeloid folliculin balances mTOR activation to maintain innate immunity homeostasis. *JCI Insight*, 2019, 4(6): e126939.
- [16] Cerboni S, Jeremiah N, Gentili M, et al. Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. *J Exp Med*, 2017, 214(6): 1769-1785.
- [17] Segalés J, Rosell C, Domingo M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol*, 2004, 98(2): 137-149.
- [18] 赵其岭, 张新晨, 陈萌萌, 等. PCV2 人工感染对

- 猪肺泡巨噬细胞干扰素信号通路的调控研究. 畜牧兽医学报, 2016, 47(3): 587-594.
- Zhao QL, Zhang XC, Chen MM, et al. Regulation of interferon signaling pathway in alveolar macrophages of piglets infected with porcine circovirus type 2. Acta Vet Zootechn Sin, 2016, 47(3): 587-594 (in Chinese).
- [19] Chen MM, Han JY, Zhang YQ, et al. Porcine circovirus type 2 induces type I interferon production via MyD88-IKK α -IRFs signaling rather than NF- κ B in porcine alveolar macrophages *in vitro*. Res Vet Sci, 2016, 104: 188-194.
- [20] Jia MT, Qin DH, Zhao CY, et al. Redox homeostasis maintained by GPX4 facilitates STING activation. Nat Immunol, 2020, 21(7): 727-735.
- [21] 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.
- [22] Meade N, King M, Munger J, et al. mTOR dysregulation by vaccinia virus F17 controls multiple processes with varying roles in infection. J Virol, 2019, 93(15): e00784-19.
- [23] Ahn J, Xia TL, Capote AR, et al. Extrinsic phagocyte-dependent STING signaling dictates the immunogenicity of dying cells. Cancer Cell, 2018, 33(5): 862-873.e5.
- [24] Kumar V. A STING to inflammation and autoimmunity. J Leukocyte Biol, 2019, 106(1): 171-185.
- [25] Dobbs N, Burnaevskiy N, Chen DD, et al. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease. Cell Host Microbe, 2015, 18(2): 157-168.
- [26] Clark K, Plater L, Pegg M, et al. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and I κ B kinase ϵ : a distinct upstream kinase mediates ser-172 phosphorylation and activation. J Biol Chem, 2009, 284(21): 14136-14146.
- [27] El-Khattouti A, Selimovic D, Hannig M, et al. Imiquimod-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by ER stress-dependent Noxa induction and enhanced by NF- κ B inhibition. J Cell Mol Med, 2016, 20(2): 226-286.
- [28] Han JY, Zhang SX, Zhang YQ, et al. Porcine circovirus type 2 increases interleukin-1 β and interleukin-10 production via the MyD88-NF- κ B signaling pathway in porcine alveolar macrophages *in vitro*. J Vet Sci, 2017, 18(2): 183-191.

(本文责编 郝丽芳)