

研究报告

A 型塞内卡病毒 2C 蛋白通过 STING 调控 IFN β 、TNF- α 和 IL-6 的表达

王梦瑶¹, 张瑞¹, 谭小雨¹, 游青¹, 马潇雨¹, 周泷¹, 柏玲², 张志雄², 李彦敏^{*1}, 张志东^{*1}

1 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

2 中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

王梦瑶, 张瑞, 谭小雨, 游青, 马潇雨, 周泷, 柏玲, 张志雄, 李彦敏, 张志东. A 型塞内卡病毒 2C 蛋白通过 STING 调控 IFN β 、TNF- α 和 IL-6 的表达[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2087-2098.

WANG Mengyao, ZHANG Rui, TAN Xiaoyu, YOU Qing, MA Xiaoyu, ZHOU Long, BAI Ling, ZHANG Zhixiong, LI Yanmin, ZHANG Zhidong. Protein 2C of Senecavirus A regulates the expression of IFN β , TNF- α and IL-6 through STING[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2087-2098.

摘要:【背景】A 型塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA)是新发猪塞内卡病毒病的病原, 属于小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)塞内卡病毒属(Senecavirus)的单股正链 RNA 病毒。可引起新生仔猪死亡和成年猪口、蹄部出现水泡。先天免疫是宿主抵御病毒入侵的第一道防线, 但 SVA 与宿主抗病毒先天免疫的相互作用机制尚不清楚。【目的】探究 SVA 非结构蛋白 2C 在先天免疫应答中的作用机制。【方法】利用 SVA 感染和通过在猪 PK-15 细胞中过表达 SVA 2C 蛋白, 利用 RT-qPCR 和 Western blotting 分析 2C 蛋白对细胞因子表达及其关键信号通路的影响。【结果】RT-qPCR 检测发现, SVA 感染 PK-15 细胞导致 IFN β 、TNF- α 和 IL-6 表达的显著升高; 同时, SVA 感染导致 TBK1 和 NF- κ B 的磷酸化。进一步的研究发现, SVA 的 2C 蛋白能够激活 TBK1 和 NF- κ B 磷酸化, 并诱导 IFN β 、TNF- α 和 IL-6 的表达; 2C 蛋白能够激活抗 DNA 病毒感染关键蛋白干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)磷酸化, 敲除 STING 抑制 TBK1、NF- κ B 的磷酸化和 IFN β 、TNF- α 、IL-6 的表达。【结论】本研究初步揭示了 SVA 2C 蛋白通过激活 STING 诱导天然免疫应答的作用机制, 揭示了 STING 参与调控 RNA 病毒 SVA 介导的免疫应答的功能, 为抗病毒药物和疫苗的研发提供了理论基础。

关键词: A 型塞内卡病毒; 天然免疫应答; 2C 蛋白; 细胞因子; 干扰素基因刺激因子

资助项目: 中央高校基本科研业务费专项基金项目(2021115); 西南民族大学高层次人才科研专项基金项目(16011211013); 四川省自然科学基金(2022NSFSC0073); 甘肃省科技计划国际科技合作类项目(20YF3WA008)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2021115), the Southwest Minzu University Research Startup Funds (16011211013), the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0073), and the Gansu Province Science and Technology Project (20YF3WA008).

*Corresponding authors. E-mail: LI Yanmin, Liyanmin@swun.edu.cn; ZHANG Zhidong, Zhangzhidong@swun.edu.cn

Received: 2022-10-20; Accepted: 2022-12-27; Published online: 2023-02-07

Protein 2C of Senecavirus A regulates the expression of IFN β , TNF- α and IL-6 through STING

WANG Mengyao¹, ZHANG Rui¹, TAN Xiaoyu¹, YOU Qing¹, MA Xiaoyu¹, ZHOU Long¹, BAI Ling², ZHANG Zhixiong², LI Yanmin^{*1}, ZHANG Zhidong^{*1}

¹ College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

² State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Background] Senecavirus A (SVA) is a novel pathogen that causes an infectious viral disease in pigs. SVA, a member of the genus Senecavirus of the family Picornaviridae, has a single-stranded positive-sense RNA genome. SVA can infect pigs of all ages, causing neonatal mortality and blisters on the feet and in or around the mouth of pigs. Innate immunity is the first line of host defense against viral invasion, while the role of the mechanism of the interaction between SVA and host innate immune responses remains unknown. [Objective] To investigate the role of the 2C protein of SVA in innate immune responses. [Methods] RT-qPCR and Western blotting were employed to analyze the effect of 2C protein on cytokine expression and signaling pathway in host PK-15 cells overexpressing 2C protein or were infected with SVA. [Results] The infection of SVA significantly up-regulated the expression of interferon beta (IFN β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) in host PK-15 cells. Meanwhile, SVA infection resulted in the phosphorylation of TANK-binding kinase 1 (TBK1) and Nuclear factor-kappa B (NF- κ B). Further studies revealed that 2C protein activated TBK1 and NF- κ B and induced the expression of IFN β , TNF- α , and IL-6. In addition, 2C protein activated the stimulator of interferon genes (STING), a key protein against DNA virus infection. The knockout of STING suppressed the phosphorylation of TBK1 and NF- κ B as well as the expression of IFN β , TNF- α , and IL-6. [Conclusion] This study preliminary reveals that the 2C protein of SVA activates STING to induce the innate immune responses. The findings uncover the regulatory role of STING in the RNA virus SVA-mediated immune response, which provide a theoretical basis for the research and development of antiviral drugs and vaccines.

Keywords: Senecavirus A; innate immune responses; 2C protein; cytokine; stimulator of interferon genes

A型塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA)又称为塞内卡病毒(Seneca valley virus, SVV)在不同国家和地区引起猪的塞内卡病^[1-4],其临床症状与口蹄疫相似,在蹄部和口鼻部出现水泡、溃疡^[5]。SVA于2015年首次传入我国,给我国养猪业造成了重大经济损失,目前尚无商品化的SVA疫苗。SVA是一种无囊膜的单股正链RNA

病毒,具有20面体对称结构,属于小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)塞内卡病毒属(Senecavirus),SVA基因组全长7300 nt,由1个开放阅读框、5'端非编码区、3'端非编码区及1个poly(A)尾巴组成^[6]。病毒蛋白外壳由4个结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4)及非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D)组成^[7]。虽然最近的研究初

步阐明了 SVA 的致病过程并建立了有效的检测方法, 但关于该病毒与宿主抗病毒先天免疫相互作用的分子机制仍不清楚。在 SVA 所有非结构蛋白中 2C 蛋白是最保守的蛋白之一, 具有解旋酶活性, 参与病毒的复制, 研究发现 SVA 2C 蛋白可以通过激活 caspase-3 诱导细胞凋亡^[8], 但 SVA 的 2C 蛋白在诱导机体先天免疫应答中的作用机制及其对病毒复制的影响尚不清楚。

干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)是固有免疫反应的关键蛋白, 也称为跨膜蛋白 173 (transmembrane protein 173, TMEM173)、IRF-3 激活介质(mediator of IRF3 activation, MITA)、内质网 IFN 刺激物(an endoplasmic reticulum IFN stimulator, ERIS)。STING 在识别外源 DNA 介导的先天免疫应答中发挥重要作用^[9], 因此, STING 信号通路被认为是识别 DNA 病毒、启动天然免疫应答的主要传感途径。宿主通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病毒, 激活 STING 信号通路诱导 TANK-结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)和核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)的活化入核, 诱导干扰素(IFN)和其他细胞因子(IL-6, TNF- α 等)的表达, 从而在细胞中建立抗病毒状态^[10]。近年研究证实 STING 敲除的细胞或小鼠对多种 RNA 病毒如水疱口炎病毒(VSV)、仙台病毒(SeV)、登革热病毒(DENV)和西尼罗河病毒(WNV)等的敏感性显著提高^[9,11-12], 表明 STING 参与 RNA 病毒介导的天然免疫应答。

本研究初步探索 SVA 的 2C 蛋白与 STING 的关系, 通过检测细胞因子和干扰素表达初步探索 STING 参与调控 RNA 病毒 SVA 介导的免疫应答, 以期为抗病毒药物和疫苗的研发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪肾细胞(PK-15)和敲除 STING 的猪肾细胞(knockout STING, KO STING) PK-15, A 型塞内卡病毒(SVA)和 PEGFP-N1、pEASY-Blunt Zero-2C 质粒, SVA VP1 抗体, 均由本实验室保存。

荧光 PCR 仪, 鲲鹏基因有限公司; 凝胶成像仪, 广州博鹭腾生物科技有限公司。RNA 提取试剂盒、PhusionTM 高保真 DNA 聚合酶、PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix 试剂盒、Lipofectamine@2000 转染试剂、山羊抗鼠二抗和山羊抗兔二抗, 赛默飞世尔科技有限公司; 反转录试剂盒, TOYOBO 公司; DMEM 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清, GEMINI 公司; ECL 显色液, Affinity 公司; T4 连接酶, NEB 公司; EcoR I, Bgl II, TaKaRa 公司; 引物, 生工生物工程(成都)有限公司; NF- κ B 抗体、磷酸化 NF- κ B 抗体(P-NF- κ B)、TBK1 抗体、磷酸化 TBK1 抗体(P-TBK1)、STING 抗体、磷酸化 STING 抗体和 GAPDH 抗体, cell signaling technology 公司; GFP 抗体和 β -tubulin 抗体, Proteintech 公司。

1.2 引物设计和质粒构建

通过普通 PCR 方法, 以 pEASY-Blunt Zero-2C 质粒为模板, 以引物 F (5'-GAAGATCT GTTACGGACCCATGGACAAAGTCAAAGAC TG-3')和 R (5'-CCGGAATTCTCTGTAGAACCA GAGTCTGCATATTTC-3')为上、下游引物。PCR 反应条件和体系按照 PhusionTM 高保真 DNA 聚合酶试剂盒说明书操作扩增 SVA 的 2C 序列, 扩增后的产物经琼脂糖电泳并纯化回收。将 PEGFP-N1 载体和胶回收产物分别用 EcoR I 和 Bgl II 双酶切, 并利用 T4 连接酶进行连接。阳性重组质粒送至生工生物工程(成都)有限公司测

序,将测序正确的重组质粒命名为 PEGFP-N1-2C。

1.3 细胞培养和病毒感染

PK-15 细胞与敲除 STING 的 PK-15 细胞培养于含有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 三抗的 DMEM 中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。待 PK-15 细胞融合度达 90% 以上时用胰酶消化进行传代。取细胞融合度 80%–90% 的细胞进行六孔板的接种。取用 10 MOI 的 SVA 感染 PK-15 细胞,将病毒感染的 PK-15 细胞在培养箱中孵育 1 h 后,将培养基更换为含 2% FBS 的 DMEM 维持液继续培养。24 h 后分别收取细胞上清和细胞样品。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

将培养的细胞分别接种在 6 孔板中,接毒 24 h 后收取细胞样品,利用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,随后使用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA,利用表 1 引物按照 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 试剂盒说明书进行扩增,检测 SVA 复制水平及细胞因子表达水平。以 GAPDH 表达水平为内参值,2^{-ΔΔC_t} 法计算 IFNβ、IL-6 和 TNF-α 基因的 mRNA 水平。

1.5 转染

按照 1.3 的方法将细胞铺于 6 孔板中,第 2 天待细胞生长至 90% 汇合度时进行转染。按照 Lipofectamine@2000 转染试剂说明书分别将

4 μg PEGFP-N1-2C 重组质粒和空载体 PEGFP-N1 (对照)转入细胞。转染 6 h 后将含有质粒的 OPTI-MEM 培养基更换为完全培养基继续培养。转染后 24 h 分别收取上清和细胞样品进行后续实验。

1.6 Western blotting

收集感染 SVA 24 h 和 PEGFP-N1-2C 质粒转染 24 h 后的细胞样品,加入 RAPI 细胞裂解液(PMSF 与 RAPI 体积比例是 1:1 000)冰上裂解 1 min,300 W 超声破碎细胞 2 min,4 °C、16 500 r/min 离心 10 min,收集上清,加入蛋白 loading buffer (loading buffer 与上清稀释比是 1:1)。使用 10 μL 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,80 V 恒压电泳 30 min 之后 120 V 恒压电泳 50 min,200 mA 转膜 2 h,在 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h。使用 5% BAS 分别稀释一抗 TBK1 (稀释度 1:1 000),P-TBK1 (稀释度 1:1 000),NF-κB (稀释度 1:1 000),P-NF-κB (稀释度 1:1 000),SVA VP1 (稀释度 1:200),GFP (稀释度 1:10 000),4 °C 孵育过夜;次日,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,随后加入相应二抗,室温孵育 2 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,使用 ECL 化学发光显色液进行显色;最后通过凝胶成像仪观察结果。

1.7 统计学分析

试验均进行 3 次独立重复,应用 GraphPad Prism 8 软件作图和统计学分析,采用独立样本 *t*-test 检验进行显著性分析,数据用均数±标准差表示,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SVA 感染 PK-15 细胞诱导 IFNβ、TNF-α 和 IL-6 的表达

为检测 SVA 感染对先天免疫应答的影响,在用 SVA 感染 PK-15 细胞后 24 h 收取细胞样品,利用 RT-qPCR 检测 IFNβ、TNF-α 和 IL-6

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primer used in our study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
SVA	F: GTGGGAAGGTATCTTTTCGTG R: TCATAGTGGTGAGACTTTGGGC
IFNβ	F: TGCAACCACCACAATTCCAGAAGG R: TGACGGTTTCATTCCAGCCAGTG
TNF-α	F: CCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTC R: GATGCGGCTGATGGTGTGAGTG
IL-6	F: GCTGCTTCTGGTGATGGCTACTG R: AGAGCATTTTGTCTGAGGTGGCATC
GAPDH	F: GTCGGTTGTGGATCTGACCT R: AGCTTGACGAAGTGGTCGTT

的 mRNA 表达情况, 结果表明 SVA 感染 PK-15 细胞导致 IFN β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 水平显著上调(图 1A-1C)。

2.2 SVA 感染引起 TBK1 和 NF- κ B 的磷酸化

为探究 SVA 感染 PK-15 细胞后通过何种途

径调控细胞因子的表达, 利用 Western blotting 检测 SVA 感染 PK-15 细胞中 TBK1 及 NF- κ B 的磷酸化水平, 结果显示, SVA 感染 PK-15 细胞能够诱导 TBK1 ($P<0.01$) 和 NF- κ B ($P<0.001$) 的磷酸化(图 2)。

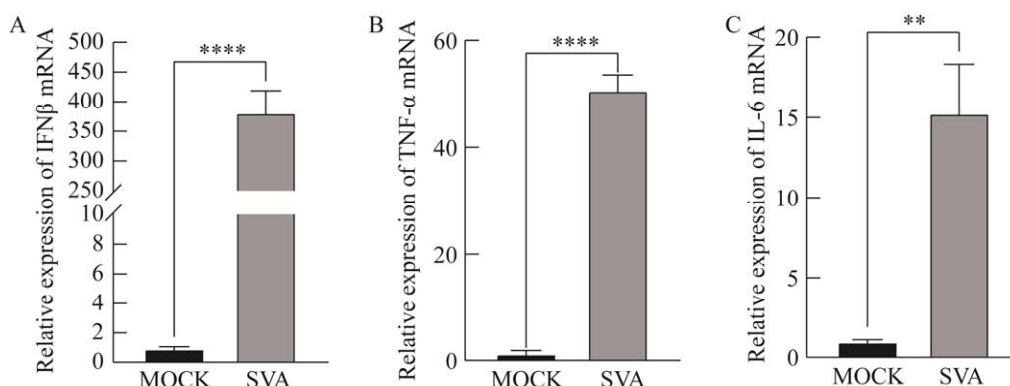


图 1 SVA 感染 PK-15 细胞 IFN β 及细胞因子表达 A: SVA 感染 PK-15 24 h 极显著诱导 IFN β 产生. B: SVA 感染 PK-15 24 h 极显著诱导 TNF- α 产生. C: SVA 感染 PK-15 24 h 显著诱导 IL-6 产生. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$

Figure 1 Expression of IFN β and cytokines in PK-15 cells infected with SVA. A: PK-15 infection with SVA significantly induced IFN β production at 24 h. B: TNF- α production was highly significantly induced by SVA infection with PK-15 for 24 h. C: IL-6 production was significantly induced by SVA infection with PK-15 for 24 h. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

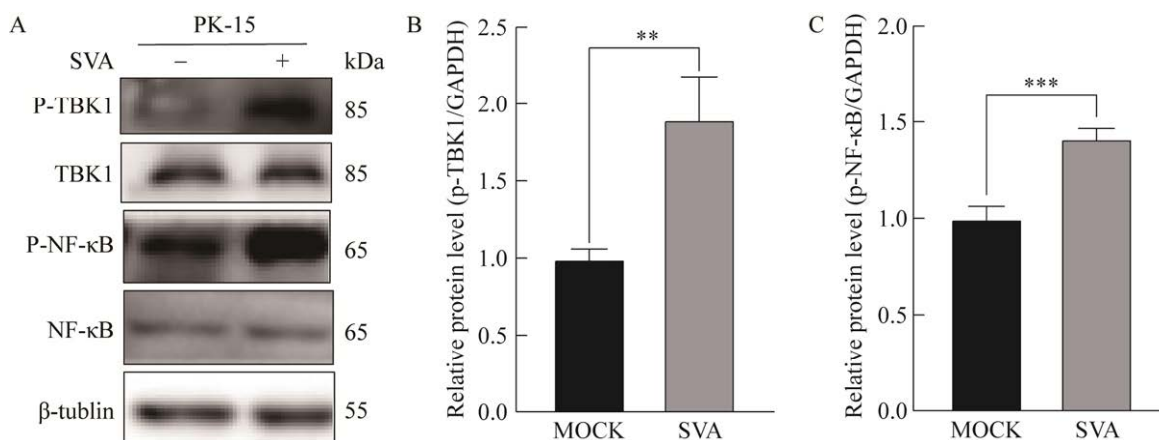


图 2 SVA 感染 PK-15 细胞 TBK1 和 NF- κ B 的磷酸化水平 A: SVA 感染 PK-15 细胞后 P-TBK1 和 P-NF- κ B 蛋白表达. B、C: P-TBK1/GAPDH 和 P-NF- κ B/GAPDH 灰度扫描, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 2 Phosphorylation levels of TBK1 and NF- κ B in SVA infected PK-15 cells. A: P-TBK1 and P-NF- κ B protein expression in PK-15 cells infected with SVA. B, C: P-TBK1/GAPDH, P-NF- κ B/GAPDH gray scale scans, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

2.3 SVA 的 2C 蛋白能够诱导 IFN β 、TNF- α 和 IL-6 表达

SVA 的 2C 蛋白作为非结构蛋白,是最保守的蛋白之一,与病毒复制有关。为了探究 SVA 的 2C 蛋白是否参与诱导上述细胞因子的表达,我们构建 PEGFP-N1-2C 重组质粒转染细胞。Western blotting 结果显示 PEGFP-N1-2C 质粒转染 PK-15 细胞 24 h 后能检测到 GFP 表达(图 3A),证实 PEGFP-N1-2C 成功在转染细胞中表达。RT-qPCR 检测 IFN β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 水平的结果表明,SVA 的 2C 蛋白能够诱导 IFN β

($P<0.05$)、TNF- α ($P<0.05$)和 IL-6 ($P<0.05$)的表达(图 3B–3D)。

2.4 SVA 的 2C 蛋白能够激活 TBK1 和 NF- κ B

为探究 SVA 非结构蛋白 2C 影响细胞因子表达的途径,通过 Western blotting 检测 TBK1 和 NF- κ B 的磷酸化情况,结果显示,将过表达的 2C 质粒转染 PK-15 细胞能够激活 TBK1 和 NF- κ B (图 4A)。过表达 2C 质粒转染 PK-15 细胞能够诱导 TBK1 ($P<0.05$)和 NF- κ B ($P<0.001$)的磷酸化(图 4B、4C)。

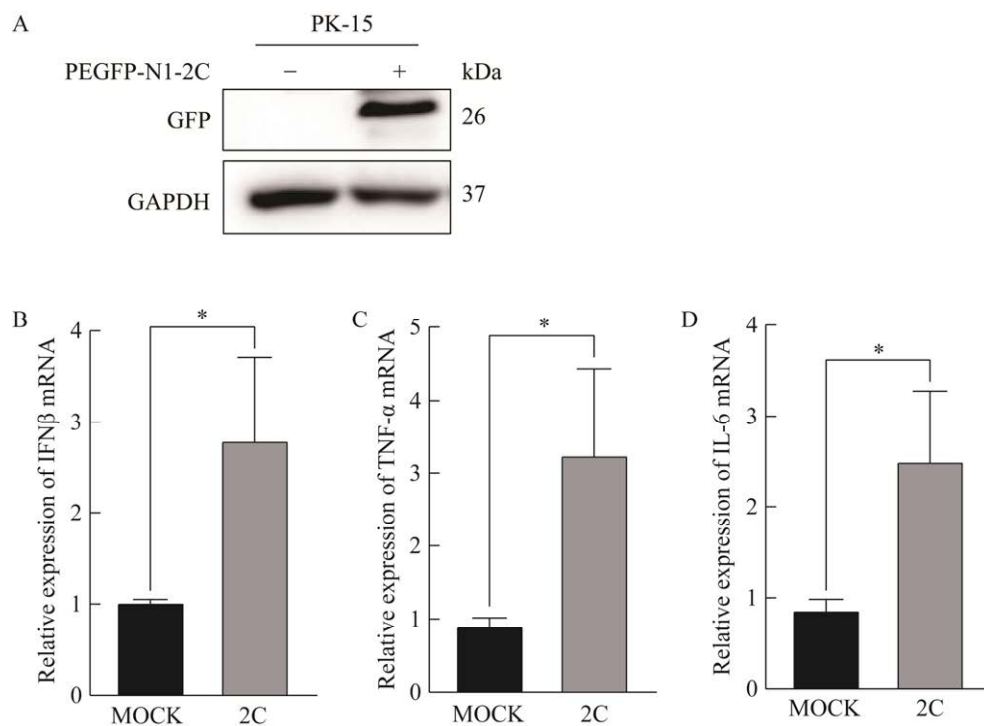


图 3 2C 蛋白转染 PK-15 细胞 IFN β 及细胞因子的表达 A: PEGFP-N1-2C 转染 PK-15 细胞 GFP 表达. B: PEGFP-N1-2C 质粒转染 PK-15 24 h 极显著诱导 IFN β 产生. C: PEGFP-N1-2C 质粒感染 PK-15 24 h 极显著诱导 TNF- α 产生. D: PEGFP-N1-2C 转染 PK-15 24 h 显著诱导 IL-6 产生. *: $P<0.05$

Figure 3 The expression of IFN β , TNF- α and IL-6 in PK-15 cells transfected with 2C. A: GFP expression in PEGFP-N1-2C transfected PK-15 cells. B: Transfection of PEGFP-N1-2C plasmid with PK-15 for 24 h significantly induced IFN β production. C: Transfection of PEGFP-N1-2C plasmid with PK-15 for 24 h significantly induced TNF- α production. D: Transfection of PEGFP-N1-2C plasmid into PK-15 for 24 h significantly induced IL-6 production. *: $P<0.05$.

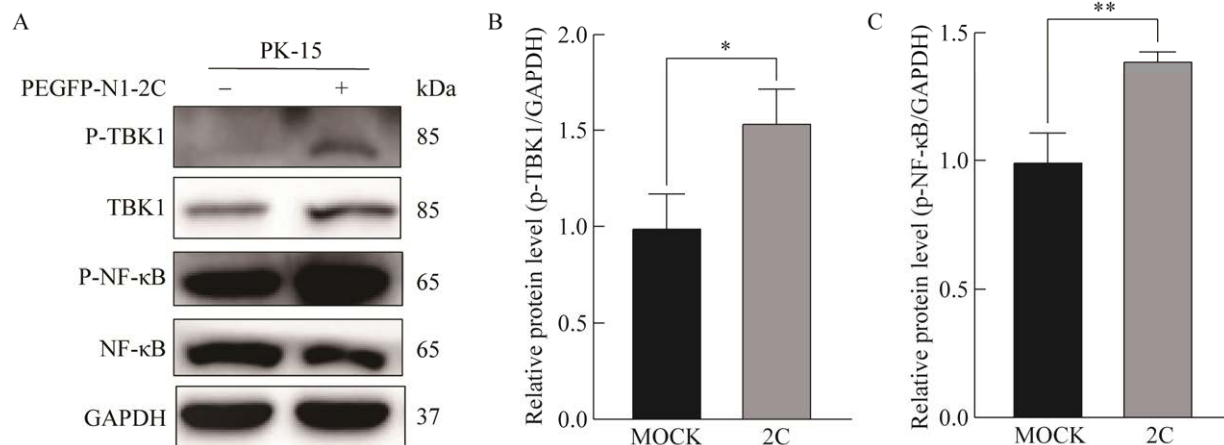


图 4 PEGFP-N1-2C 转染 PK-15 细胞 TBK1 和 NF- κ B 的磷酸化表达 A: PEGFP-N1-2C 转染 PK-15 细胞后 P-TBK1 和 P-NF- κ B 蛋白表达. B、C: P-TBK1/GAPDH 和 P-NF- κ B/GAPDH 灰度扫描, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 4 Phosphorylated expression of TBK1 and NF- κ B in PEGFP-N1-2C transfected PK-15 cells. A: P-TBK1 and P-NF- κ B protein expression in PK-15 cells transfected with PEGFP-N1-2C. B, C: P-TBK1/GAPDH, P-NF- κ B/GAPDH gray scale scans, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.5 敲除 STING 抑制 SVA 感染诱导的 IFN β 、IL-6 和 TNF- α 表达

干扰素基因刺激因子(STING)作为固有免疫反应的关键蛋白,在 DNA 病毒介导的天然免疫应答中发挥重要作用。已有研究证明 STING 位于 TBK1 上游,STING 活化激活 TBK1 磷酸化,启动病毒介导的下游信号通路,产生干扰素和 IL-6、TNF- α 等细胞因子^[9]。我们的研究发现 SVA 2C 蛋白过表达组 STING 的磷酸化水平显著高于对照组,提示 2C 蛋白能够激活 STING (图 5)。为进一步探究 STING 在 SVA 介导的先天免疫中的作用,我们构建了敲除 STING 的 PK-15 细胞,随后利用 SVA 分别感染野生型 PK-15 细胞和敲除 STING 的 PK-15 细胞,感染后 24 h 收集细胞样品,通过 RT-qPCR 检测 IL-6、TNF- α 和 IFN β 的表达。结果表明,敲除 STING 的 PK-15 细胞感染 SVA 24 h 后 IL-6、TNF- α 和 IFN β mRNA 水平均显

著下降(图 6A–6C)。

2.6 敲除 STING 抑制 SVA 的 2C 蛋白过表达诱导的 IFN β 、IL-6 和 TNF- α 表达

为进一步探究 STING 在 SVA 的 2C 蛋白介导的 IFN β 、IL-6 和 TNF- α 表达中的作用,将 PEGFP-N1-2C 质粒转染野生型 PK-15 细胞和敲

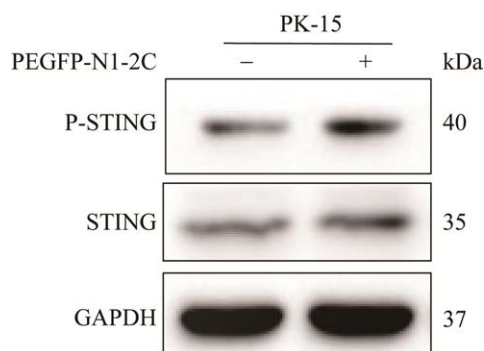


图 5 PEGFP-N1-2C 转染 PK-15 细胞 STING 的磷酸化水平

Figure 5 Phosphorylation level of STING in PEGFP-N1-2C transfected PK-15 cells.

除 STING 的 PK-15 细胞, 通过 RT-qPCR 检测 IL-6、TNF- α 和 IFN β 的表达。结果表明, 与野生型 PK-15 细胞相比, 敲除 STING 的 PK-15 细胞转染 PEGFP-N1-2C 质粒 24 h 后 IL-6

($P<0.05$)、TNF- α ($P<0.05$) 和 IFN β ($P<0.05$) mRNA 水平均显著下降(图 7), 表明 STING 是 SVA 的 2C 蛋白诱导 IFN β 、IL-6 和 TNF- α 表达所必需的。

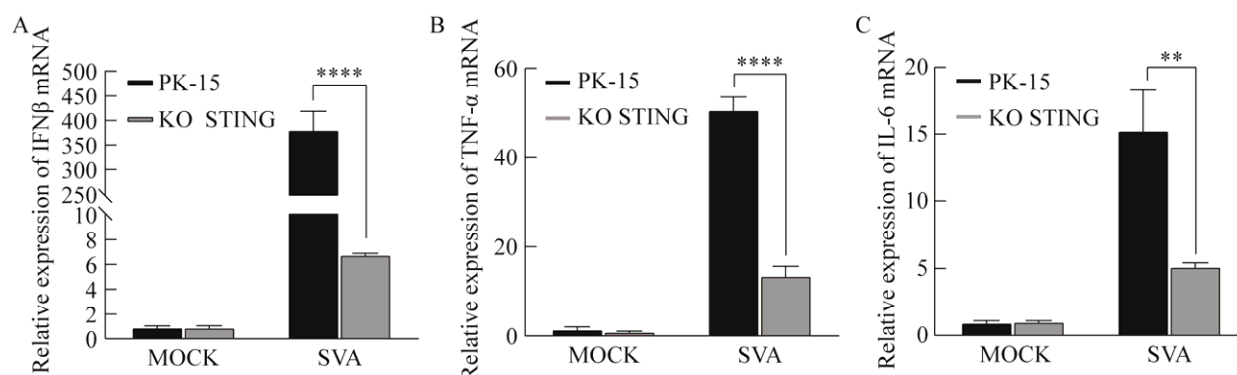


图 6 STING 敲除的 PK-15 细胞感染 SVA 后 IFN β 及细胞因子表达 A: RT-qPCR 检测敲除 STING PK-15 IFN β 表达降低. B: RT-qPCR 检测敲除 STING PK-15 TNF- α 表达降低. C: RT-qPCR 检测敲除 STING 的 PK-15 IL-6 表达降低. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$

Figure 6 Expression of IFN β and cytokines in knockout STING PK-15 cells infected with SVA. A: Decreased expression of knockout STING PK-15 IFN β detected by RT-qPCR. B: Decreased expression of knockout STING PK-15 TNF- α detected by RT-qPCR. C: Decreased expression of PK-15 IL-6 in knockout STING detected by RT-qPCR. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

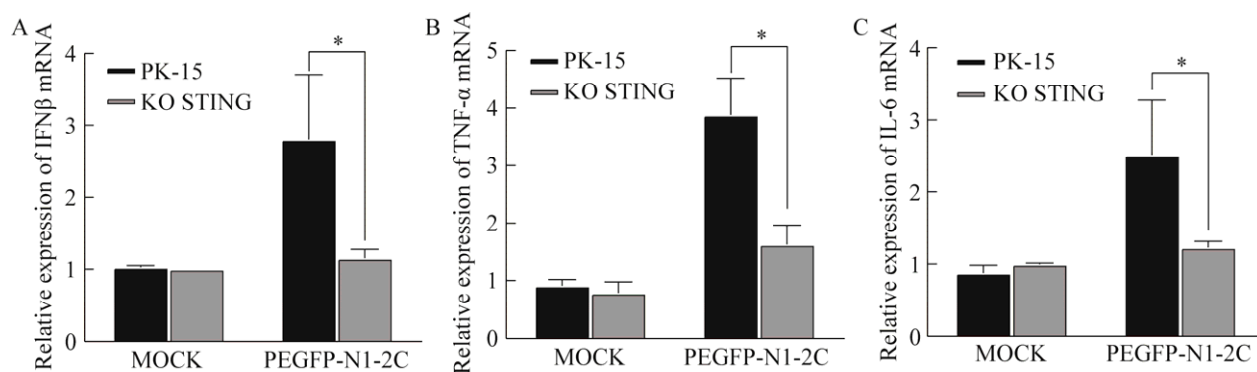


图 7 STING 敲除的 PK-15 细胞转染 PEGFP-N1-2C 质粒后 IFN β 及细胞因子表达 A: RT-qPCR 检测敲除 STING PK-15 IFN β 表达降低. B: RT-qPCR 检测敲除 STING PK-15 TNF- α 表达降低. C: RT-qPCR 检测敲除 STING 的 PK-15 IL-6 表达降低. *: $P<0.05$

Figure 7 Expression of IFN β and cytokines in knockout STING PK-15 cells transfected with PEGFP-N1-2C plasmid. A: Knockout STING PK-15 decreased IFN β expression by RT-qPCR. B: Knockout STING PK-15 decreased TNF- α expression by RT-qPCR. C: Knockout STING PK-15 decreased IL-6 expression by RT-qPCR. *: $P<0.05$.

2.7 敲除 STING 抑制 SVA 诱导的 TBK1 和 NF- κ B 磷酸化

为进一步探究 STING 调控 SVA 感染诱导的细胞因子表达的途径, 利用 Western blotting 检测了敲除 STING 的 PK-15 细胞中 TBK1 和 NF- κ B 的激活情况, 结果发现, 敲除 STING 的 PK-15 细胞中 TBK1 ($P<0.01$) 和 NF- κ B ($P<0.01$) 的磷酸化水平显著降低(图 8), 表明 STING 是 SVA 感染激活 TBK1 和 NF- κ B 的必需上游分子。

2.8 敲除 STING 抑制 SVA 的 2C 蛋白诱导的 TBK1 及 NF- κ B 磷酸化

为进一步研究 STING 在 SVA 的 2C 蛋白诱导的 TBK1 和 NF- κ B 激活中的作用, 利用 Western blotting 检测了敲除 STING 的 PK-15 细胞中 TBK1 和 NF- κ B 的磷酸化情况(图 9A)。结果发现, 与对照组相比, 过表达 SVA 的 2C 蛋白在敲除 STING 的 PK-15 中 TBK1 ($P<0.05$) 和 NF- κ B ($P<0.05$) 磷酸化水平显著降低(图 9B、9C)。

3 讨论与结论

猪塞内卡病最早发现于 2007 年的美国某屠宰场^[13], 随后在世界各地均有发现。SVA 作为新发病, 针对 SVA 的疫苗仍在研发阶段^[14-15], 目前市场上尚无商品化的 SVA 疫苗, SVA 对养猪业健康发展造成较大威胁, 因此有必要进一步深入研究 SVA 的致病机制, 以便于更有效地防控该病。细胞因子在抵抗疫病和免疫调节中发挥重要作用, 是机体抵御病毒感染的重要屏障。有研究表明, SVA 感染 ST 细胞会引起 IL-6 和 TNF- α 水平上升^[16], SVA 感染 3D4/21 细胞引起 IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 等炎症因子分泌水平上升^[17]。我们的研究表明, SVA 感染宿主 PK-15 细胞 24 h 后能够引起 IL-6、TNF- α 和 IFN β 的表达显著上调, 并且可以激活 TBK1 和 NF- κ B 磷酸化。

SVA 的 2C 蛋白作为非结构蛋白, 具有解旋酶活性, 是参与 RNA 合成的类解旋酶多肽,

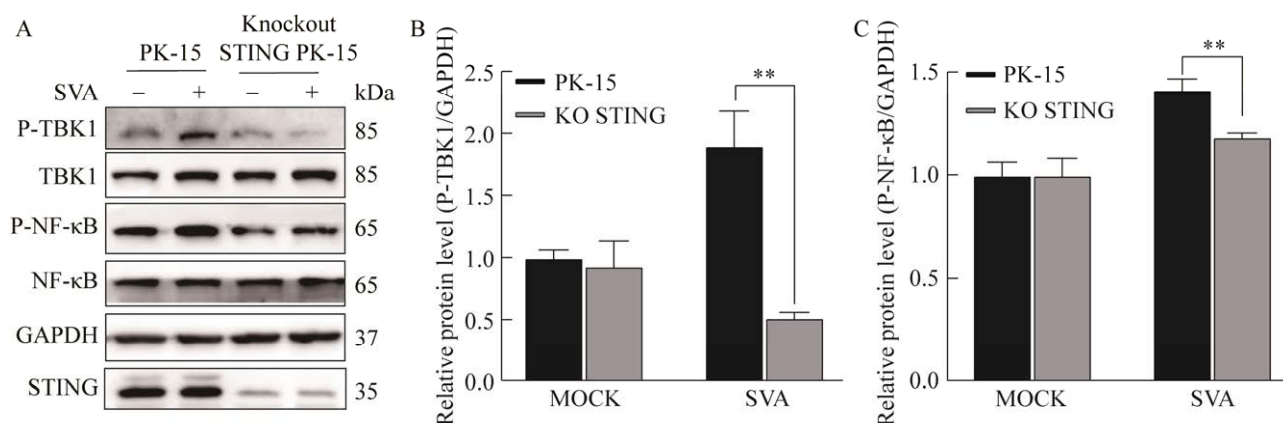


图 8 SVA 感染敲除 STING 的 PK-15 细胞 P-TBK1 和 P-NF- κ B 蛋白表达 A: SVA 感染敲除 STING 的 PK-15 细胞后 P-TBK1 和 P-NF- κ B 蛋白表达. B: P-TBK1/GAPDH 灰度扫描. C: P-NF- κ B/GAPDH 灰度扫描. **: $P<0.01$

Figure 8 Infection with SVA could not activate TBK1 and NF- κ B in knockout STING PK-15 cells. A: P-TBK1 and P-NF- κ B protein expression in STING knockdown PK-15 cells infected with SVA. B: P-TBK1/GAPDH gray scale scan. C: P-NF- κ B/GAPDH gray scale scan. **: $P<0.01$.

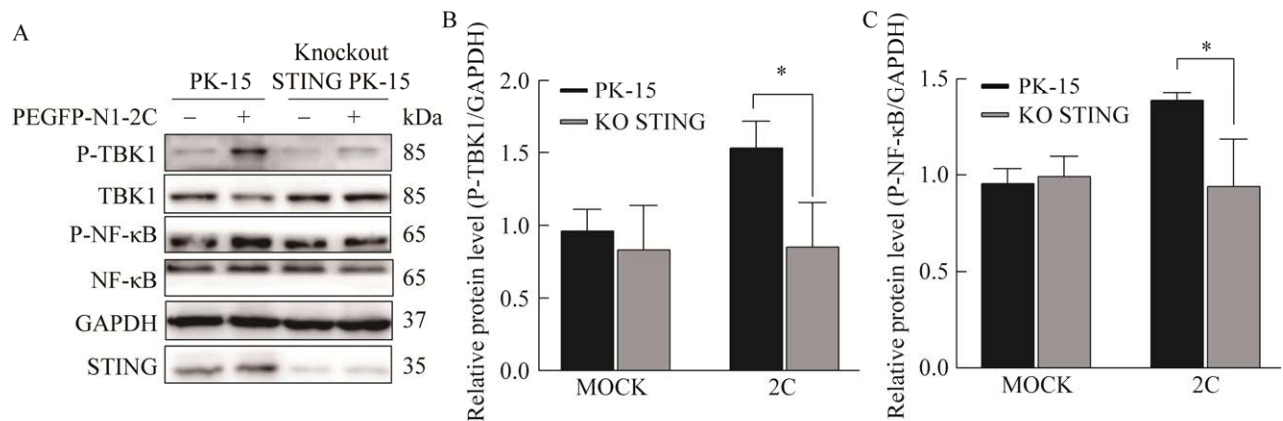


图9 PEGFP-N1-2C转染敲除STING的PK-15细胞P-TBK1和P-NF-κB蛋白表达 A: PEGFP-N1-2C转染敲除STING的PK-15细胞后P-TBK1和P-NF-κB蛋白表达. B: P-TBK1/GAPDH灰度扫描. C: P-NF-κB/GAPDH灰度扫描. *: $P < 0.05$

Figure 9 P-TBK1 and P-NF-κB protein expression in PEGFP-N1-2C transfected knockout STING PK-15 cells. A: P-TBK1 and P-NF-κB protein expression after PEGFP-N1-2C transfection into knockout STING PK-15 cells. B: P-TBK1/GAPDH gray scale scan. C: P-NF-κB/GAPDH gray scale scan. *: $P < 0.05$.

在病毒复制中具有重要作用^[18]。为进一步研究SVA诱导先天性免疫反应的作用途径,我们构建了PEGFP-N1-2C表达载体,将质粒转染PK-15细胞中过表达2C蛋白。结果发现,与SVA感染PK-15细胞相同,过表达SVA的2C蛋白也会引起细胞因子TNF-α、IL-6和IFNβ的表达上升,同时也激活了细胞因子通路上游分子TBK1和NF-κB。另外,2C蛋白转染PK-15细胞诱导的细胞因子和干扰素表达水平与病毒感染相比显著降低,可能的解释有:(1)2C蛋白可能与其他病毒蛋白共同作用调控细胞因子的表达,但2C蛋白可能不是SVA诱导PK-15细胞中这些细胞因子上调的主因;(2)2C蛋白的作用可能具有细胞类型特异性;(3)转染后24 h PK-15细胞中2C的表达量比SVA感染24 h低,导致其诱导的细胞因子和干扰素表达水平与感染组相比显著下降。综上所述,SVA 2C蛋白可以激活固有免疫TBK1通路及NF-κB细胞通路,诱导IFNβ、TNF-α和IL-6的表达,激活

先天免疫,在此过程中发现2C蛋白可以激活磷酸化STING。

STING通常在DNA病毒介导的天然免疫应答中发挥重要作用。DNA病毒被模式识别受体识别后激活STING及下游信号通路,产生干扰素和其他促炎性细胞因子(IL-6、TNF-α等),抑制病原在宿主体内的增殖。STING被激活后会从内质网转运至内质网-高尔基体中间区,在迁移过程中STING招募TBK1,招募的TBK1会磷酸化STING,而磷酸化的STING对于干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF3)亲和力上升,活化IRF3诱导I型IFN表达;STING与TBK1结合后激活下游信号通路,并进一步活化NF-κB使其磷酸化,诱导I型IFN和多种炎性因子的产生和分泌^[19-20]。在STING抵抗DNA病毒的研究中,非洲猪瘟病毒(ASFV)感染会激活STING,刺激干扰素水平升高^[21]。

除了抵抗DNA病毒感染,越来越多的研究表明,STING也参与调控RNA病毒介导的免

疫应答。在 RNA 病毒感染早期, STING 影响炎症细胞因子和干扰素的产生, STING 缺陷会引起 VSV 和 SeV 诱导的 IFN 表达水平下降^[22], 但 STING 是否影响 SVA 感染和细胞因子和 IFN 的表达目前尚无报道。我们上一步研究发现 SVA 感染 PK-15 细胞能够诱导 TBK1 与 NF- κ B 发生磷酸化, 导致 TBK1 和 NF- κ B 激活。进一步 SVA 感染敲除 STING 的 PK-15 细胞系, 与感染 PK-15 细胞相比 TNF- α 、IL-6 和 IFN β 表达下降。同时敲除 STING 的 PK-15 细胞感染 SVA 后 TBK1 和 NF- κ B 磷酸化均未被激活, 提示 STING 参与调控 SVA 感染诱导的先天免疫应答; 并且本研究发现 2C 蛋白可以激活 PK-15 中的 STING 磷酸化, 进一步在敲除 STING 的 PK-15 细胞过表达 2C 蛋白, 发现与野生组相比, 敲除 STING 过表达 2C 蛋白 IL-6、TNF- α 和 IFN β 表达被抑制, TBK1 及 NF- κ B 磷酸化未被激活。本研究揭示了 SVA 的 2C 蛋白通过 STING 调控宿主细胞天然免疫应答的作用机制, 丰富了 STING 调控 RNA 病毒复制的作用机制, 为疫病的防御提供了新的理论基础和参考。

综上所述, SVA 感染 PK-15 细胞后 2C 蛋白能够通过 STING 激活 TBK1 和 NF- κ B, 诱导 IL-6、TNF- α 和 IFN β 的表达。

REFERENCES

- [1] CANNING P, CANON A, BATES JL, GERARDY K, LINHARES DL, PIÑEYRO PE, SCHWARTZ KJ, YOON KJ, RADEMACHER CJ, HOLTKAMP D, KARRIKER L. Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with *Senecavirus A* in a U.S. sow farm[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(4): 373-378.
- [2] LIU J, REN X, LI Z, XU G, LU R, ZHANG K, NING Z. Genetic and phylogenetic analysis of reemerged novel seneca valley virus strains in Guangdong Province, 2017[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(3): 614-617.
- [3] SAENG-CHUTO K, RODTIAN P, TEMEEYASEN G, WEGNER M, NILUBOL D. The first detection of *Senecavirus A* in pigs in Thailand, 2016[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 285-288.
- [4] VANNUCCI FA, LINHARES DL, BARCELLOS DN, LAM HC, COLLINS J, MARTHALER D. Identification and complete genome of Seneca valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 589-593.
- [5] JOSHI LR, FERNANDES MHV, CLEMENT T, LAWSON S, PILLATZKI A, RESENDE TP, VANNUCCI FA, KUTISH GF, NELSON EA, DIEL DG. Pathogenesis of *Senecavirus A* infection in finishing pigs[J]. *The Journal of General Virology*, 2016, 97(12): 3267-3279.
- [6] HALES LM, KNOWLES NJ, REDDY PS, XU L, HAY C, HALLENBECK PL. Complete genome sequence analysis of seneca valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus[J]. *The Journal of General Virology*, 2008, 89(Pt 5): 1265-1275.
- [7] SEGALÉS J, BARCELLOS D, ALFIERI A, BURROUGH E, MARTHALER D. *Senecavirus A*[J]. *Veterinary Pathology*, 2017, 54(1): 11-21.
- [8] LIU TT, LI XM, WU MG, QIN LX, CHEN HC, QIAN P. Seneca valley virus 2C and 3C^{pro} induce apoptosis via mitochondrion-mediated intrinsic pathway[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1202.
- [9] ISHIKAWA H, BARBER GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling[J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 674-678.
- [10] 熊思东. 抗病毒感染的固有免疫机制[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(3): 179-180.
XIONG SD. Inherent immune mechanism of antiviral infection[J]. *Current Immunology*, 2011, 31(3): 179-180 (in Chinese).
- [11] AGUIRRE S, MAESTRE AM, PAGNI S, PATEL JR, SAVAGE T, GUTMAN D, MARINGER K, BERNAL-RUBIO D, SHABMAN RS, SIMON V, RODRIGUEZ-MADOZ JR, MULDER LCF, BARBER GN, FERNANDEZ-SESMA A. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(10): e1002934.
- [12] WUERTZ KM, TREUTING PM, HEMANN EA, ESSER-NOBIS K, SNYDER AG, GRAHAM JB, DANIELS BP, WILKINS C, SNYDER JM, VOSS KM,

- OBERST A, LUND J, GALE M Jr. STING is required for host defense against neuropathological west nile virus infection[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(8): e1007899.
- [13] PASMA T, DAVIDSON S, SHAW SL. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba[J]. The Canadian Veterinary Journal, 2008, 49(1): 84-85.
- [14] SHARMA B, FERNANDES MHV, de LIMA M, JOSHI LR, LAWSON S, DIEL DG. A novel live attenuated vaccine candidate protects against heterologous *Senecavirus a* challenge[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2660.
- [15] YANG F, ZHU ZX, CAO WJ, LIU HN, ZHANG KS, TIAN H, LIU XT, ZHENG HX. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated cell culture-derived seneca valley virus vaccine in pigs[J]. Vaccine, 2018, 36(6): 841-846.
- [16] ZHU MY, CAI YC, ZHAO W, HE CX, YANG YC, GAO Q, SU S. Long non-coding RNAs are associated with seneca valley virus infection[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 246: 108728.
- [17] 李媛媛, 马旭升, MOHIUDDIN, 郑海学, 刘湘涛, 马永华. A 型塞内卡病毒激活炎症因子表达及诱导细胞焦亡[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(5): 586-594.
- LI YY, MA XS, MOHIUDDIN, ZHENG HX, LIU XT, MA YH. *Senecavirus A* activates the expression of inflammatory factors and induces pyroptosis[J]. Chinese Veterinary Science, 2022, 52(5): 586-594 (in Chinese).
- [18] NORDER H, de PALMA AM, SELISKO B, COSTENARO L, PAPAGEORGIOU N, ARNAN C, COUTARD B, LANTEZ V, de LAMBALLERIE X, BARONTI C, SOLÀ M, TAN JZ, NEYTS J, CANARD B, COLL M, GORBALENYA AE, HILGENFELD R. Picornavirus non-structural proteins as targets for new anti-virals with broad activity[J]. Antiviral Research, 2011, 89(3): 204-218.
- [19] ANDREEVA L, HILLER B, KOSTREWA D, LÄSSIG C, de OLIVEIRA MANN CC, JAN DREXLER D, MAISER A, GAIDT M, LEONHARDT H, HORNUNG V, HOPFNER KP. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders[J]. Nature, 2017, 549(7672): 394-398.
- [20] CHEN Q, SUN LJ, CHEN ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing[J]. Nature Immunology, 2016, 17(10): 1142-1149.
- [21] GARCÍA-BELMONTE R, PÉREZ-NÚÑEZ D, PITTAU M, RICHT JA, REVILLA Y. African swine fever virus Armenia/07 virulent strain controls interferon beta production through the cGAS-STING pathway[J]. Journal of Virology, 2019, 93(12): e02298-e02218.
- [22] SUN WX, LI Y, CHEN L, CHEN HH, YOU FP, ZHOU X, ZHOU Y, ZHAI ZH, CHEN DY, JIANG ZF. *ERIS*, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(21): 8653-8658.