

猪丁型冠状病毒非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 抑制 IFN- β 的表达

刘思雨^{1,2}, 赵 硕^{1,2}, 欧阳康², 何 颖¹, 卢冰霞¹, 赵 武¹, 段群棚¹, 许心婷¹,
全琛宇¹, 许艺兰¹, 李 斌¹, 程 珂^{2,3*}, 秦毅斌^{1,2*}

(1. 广西壮族自治区兽医研究所 广西兽医生物技术重点实验室 农业农村部中国(广西)-东盟跨境动物疫病防控重点实验室, 广西 南宁 530001; 2. 广西大学 动物科学技术学院 广西高校动物疫病预防与控制重点实验室 广西壮族自治区兽用生物制品工程研究中心, 广西 南宁 530005;
3. 广西农垦永新畜牧集团有限公司, 广西 南宁 530016)

摘要: 为探究猪丁型冠状病毒(PDCoV)非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 对宿主细胞 I 型干扰素(IFN- β)的调控作用,在 293T 细胞中过表达 NSP9、NSP16,通过双荧光素酶报告系统和 qRT-PCR 评估 NSP9、NSP16 对仙台病毒(SeV)诱导产生的 IFN- β 的影响,再通过 qRT-PCR、Western-blot 检测 NSP9、NSP16 对 RIG- β 样受体(RLRs)信号通路的影响。结果显示,NSP9、NSP16 能显著抑制和降低 SeV 诱导的 IFN- β 启动子活性、IFN- β 与干扰素刺激基因 15(ISG15)的转录水平。同时,过表达 NSP9 可以显著降低 RLRs 信号通路中视黄酸诱导基因 I (RIG- β)、黑色素瘤分化相关基因 5(MDA5)、TANK 结合激酶 1(TBK1)和干扰素调节因子 3(IRF3)的转录水平,并显著抑制 RIG- β 、MDA5、线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)和 TBK1 的表达;而过表达 NSP16 可以显著降低 RIG- β 和 MDA5 的转录水平,并显著抑制 RIG- β 的表达和 IRF3 的磷酸化。结果表明,PDCoV 的非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 可能通过调控 RLRs 信号通路来抑制 IFN- β 产生,为阐明 PDCoV 的致病机制、寻找新的治疗靶点、开发新型抗病毒药物奠定了理论基础。

关键词: 猪丁型冠状病毒;NSP9 蛋白;NSP16 蛋白;I 型干扰素

Inhibition of IFN- β production by nonstructural proteins NSP9 and NSP16 of porcine deltacoronavirus

LIU Siyu^{1,2}, ZHAO Shuo^{1,2}, OUYANG Kang², HE Ying¹, LU Bingxia¹, ZHAO Wu¹, DUAN Qunpeng¹, XU Xinting¹,
QUAN Chenyu¹, XU Yilan¹, LI Bin¹, CHENG Ke^{2,3*}, QIN Yibin^{1,2*}

(1. Key Laboratory of China (Guangxi)-ASEAN Cross-border Animal Disease Prevention and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Veterinary Biotechnology of Guangxi/Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Engineering Research Center of Veterinary Biologics/Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Prevention and Control for Animal Disease, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 3. Guangxi Nongken Yongxin Animal Husbandry Group Co., Nanning 530016, China)

Abstract: This study was to investigate the regulatory effect of porcine deltacoronavirus (PDCoV) nonstructural proteins NSP9 and NSP16 in the regulation of interferon- β (IFN- β) in host cells. NSP9 and

收稿日期:2024-06-24;修回日期:2024-08-08

基金项目: 国家现代农业产业技术体系广西创新团队建设专项(nycytgxgxttd-2023-15-02);南宁市科技重大专项(20232039);广西基本科研业务费专项(桂科专项 23-3/22-4/22-3/24-7/24-3/24-11);广西兽医生物技术重点实验室开放基金项目(22-035-32-B-02,23-035-32-B-02,23-035-32-B-01);广西农业科技自筹经费项目(Z2023034,Z202225);广西桂垦牧业科学研究与技术开发项目(桂垦牧科 2022004)

作者简介: 刘思雨(1998-),女,河南平顶山人,硕士,专业为预防兽医学,E-mail:1767641525@qq.com。*通讯作者:秦毅斌,广西临桂人,高级兽医师,主要从事动物传染病学研究,E-mail:qinyibin5188@163.com;程珂,河南南阳人,兽医师,主要从事动物传染病学等研究,E-mail:605807524@qq.com。

NSP16 were overexpressed in 293T cells. The effects of NSP9 and NSP16 on Sendai virus (SeV)-induced IFN- β were assessed by dual luciferase reporter system and qRT-PCR and the RIG- I -like receptors (RLRs) signaling pathway were detected through qRT-PCR and Western-blot. The results showed that NSP9 and NSP16 significantly inhibited and decreased SeV-induced IFN- β promoter activity, transcriptional levels of IFN- β and interferon stimulated gene 15 (ISG15). Overexpression of NSP9 significantly reduced the transcriptional levels of retinoic acid-inducible gene 1 (RIG- I), Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5), Tank-binding kinase 1 (TBK1) and interferon regulatory factor 3 (IRF3) in RLRs, and significantly inhibited the expression of RIG- I , MDA5, MAVS and TBK1. Overexpression of NSP16 reduces the transcriptional levels of RIG- I and MDA5, and significantly inhibits RIG- I expression and IRF3 phosphorylation. The results indicate that NSP9 and NSP16 of PDCoV may inhibit IFN- I production by regulating RLRs, and provide a theoretical basis for elucidating the pathogenic mechanism of PDCoV, searching for new therapeutic targets, and developing new antiviral drugs.

Key words: porcine deltacoronavirus; NSP9 protein; NSP16 protein; type I interferon

***Corresponding authors:** QIN Yibin, E-mail: qinyibin5188@163. com; CHENG Ke, E-mail: 605807524@qq. com

猪丁型冠状病毒 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 是近年来规模猪场流行的一种猪肠道冠状病毒^[1], 主要引起感染猪只水样腹泻、轻度至中度呕吐、脱水和死亡, 且感染猪日龄越小, 死亡率越高, 给世界养猪业造成巨大的经济损失^[2-3]。PDCoV 属于丁型冠状病毒属, 基因组全长约为 25.4 kb, 主要编码 4 种结构蛋白 (S、E、M 和 N)、15 种非结构蛋白 (NSP2~NSP16) 和 3 种辅助蛋白 (NS6、NS7 和 NS7a)^[4]。冠状病毒的非结构蛋白 NSP9 是重要的核酸结合蛋白, 对病毒核苷酸和其他病毒蛋白的结合以及病毒复制是必需的^[5]; NSP16 蛋白具有 2'-O-甲基转移酶活性, 在冠状病毒逃避先天免疫识别和促进病毒复制等方面都具有重要作用^[6-7]。

I 型干扰素 (Interferon- I , IFN- I) 应答作为宿主先天免疫反应的重要组成部分, 在抵抗病毒生长增殖和免疫调节方面具有重要作用^[8]。已有研究表明, 冠状病毒编码的多种蛋白可以参与调节宿主的先天免疫反应^[9-10]。PDCoV 以及其编码的非结构蛋白 (如 NSP5、NSP10 和 NSP15) 已被证明可以拮抗宿主细胞 IFN- I 的产生^[11-13], 但目前关于 PDCoV 非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 在宿主先天免疫方面的作用尚无报道。本研究通过过表达 PDCoV 的 NSP9 和 NSP16, 初步探索 PDCoV 非结构蛋白对 IFN- I 的产生及对病毒体外复制的影响, 为理解 PDCoV 的致病机制奠定理论基础, 为寻找新的治疗靶点、开发新型抗病毒药物提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株和质粒

293T 细胞、仙台病毒 (Sendai virus, SeV)、pCAGGS-

HA 载体、pCAGGS-HA-NSP9 质粒、pCAGGS-HA-NSP16 质粒、含荧光素酶基因的 IFN- β 启动子报告质粒 pIFN- β -Luc、内控 pRL-TK 质粒均由广西壮族自治区兽医研究所病毒室保存。

1.2 主要试剂和仪器

FBS 购自以色列 BI 公司。转染试剂购自上海碧云天生物技术有限公司。脱脂奶粉 (Skim milk) 购自美国 BD 公司。DMEM 细胞培养基、5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、Color Prestained Protein Marker (8~195 kDa)、10 \times Tris-glycine SDS-PAGE 缓冲液、免冰浴快速转膜缓冲液均购自武汉赛维尔生物技术有限公司。0.45 μ m PVDF 膜购自安徽 Biosharp 公司。PBS、Tris、甘氨酸、SDS、NaCl 均购自北京索莱宝科技有限公司。细胞裂解液购自江苏康为世纪生物技术有限公司。蛋白酶抑制剂购自广西吉运生物技术有限公司。qRT-PCR 荧光染料、定量八连管均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。Dual-Lumi 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海百赛技术有限公司。

荧光定量 PCR 仪 QuantStudio5 购自美国 Thermofisher 公司。SDS-PAGE 电泳仪 DYY-6C 购自美国 BIO-RAD 公司。蛋白免疫印迹成像仪、转印电泳仪 SVT-2 均购自武汉赛维尔生物技术有限公司。多功能发光酶标仪 INFINITE 200 PRO 购自瑞士 TECAN 公司。

1.3 细胞转染

取形态良好、汇合度达到 70%~90% 的 12 孔板 293T 细胞, PBS 洗一次后加入新的含 100 mL/L FBS 的 DMEM, 按照 Lipo8000 转染试剂说明书每孔需加入 50 μ L Opti-MEM、2 μ g DNA 和 3.2 μ L 转染

试剂的量计算出各组分所需要体积,依次将各组分加入到无菌离心管中并混匀,静置 15 min 后均匀逐滴加入细胞培养板中,并轻轻摇动细胞培养板,随后置于 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 4~6 h,弃上清换成含 20 mL/L FBS 的 DMEM。

1.4 蛋白表达产物的 Western-blot 鉴定

取单层长满 12 孔板的 293T 细胞加入细胞裂解液,在冰上裂解 30 min。将裂解样品收集于 1.5 mL EP 管中,12 000 r/min 离心 10 min,取上清加入 5× 上样缓冲液吹吸混匀,95 °C 煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE,转印目的蛋白到 PVDF 膜后,用 50 g/L 的脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h。用 TBST 漂洗封闭完成的 PVDF 膜 3 次,每次 5 min,然后一抗(1:2 000 稀释)4 °C 孵育过夜。孵育完成后,用 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 5 min,然后二抗(1:4 000 稀释)37 °C 孵育 1 h。孵育完成后用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 min。在避光条件下,按 ECL 发光试剂盒说明书配制好显影液,将显影液浸润 PVDF 膜 30 s,在蛋白免疫印迹显影仪中显影扫描,并记录保存实验结果。

1.5 双荧光素酶报告基因系统检测

取生长至 60%~70% 汇合度时的 12 孔板 293T 细胞,按照 Lipo8000 转染试剂使用说明书配制转染试剂与重组质粒混合液,其中加入质粒的比例参照试剂盒说明书, m 表达目的基因的重组质粒: $m_{\text{IFN-}\beta}$ 启动子报告质粒: $m_{\text{内控pRL-TK质粒}}=10:10:1$,以 1.05 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 的总量转染 24 h,随后接种 SeV,12 h 后收集裂解细胞,置于 -80 °C 冰箱保存。后续使用双荧光素酶检测试剂盒检测各荧光参数值,以海肾荧光素酶活性作为内参进行数据校准。

1.6 荧光定量 RT-PCR

使用 TaKaRa 公司的 One Step TB Green Prime-Script RT-PCR Kit 进行 qRT-PCR,检测细胞内外特定基因 mRNA 表达水平。在荧光定量八连管中配制好反应体系(20 μL),每个样品做 3 个重复,然后将八连管放置于荧光定量 PCR 仪中,具体反应体系:2× One Step TB Green RT-PCR 缓冲液 4 10 μL ,Prime-Script 1 Step Enzyme Mix 2 0.8 μL ,PCR 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$,表 1)各 0.8 μL ,ROX Reference Dye or Dye II (50×) 0.4 μL ,总 RNA 2 μL ,用 ddH₂O 补足 20 μL 。反应程序:42 °C 5 min,95 °C 10 s;95 °C 5 s,60 °C 20 s,40 个循环。溶解曲线;95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 1 s。

1.7 统计学分析

所有实验的数据结果均来自 3 个独立的平行实验,数据表示采用平均值±标准误差(SEM)的形式,并通过 Graph Pad Prism7.0 软件进行实验数据分析,采用 one-way ANOVA 方法进行统计学分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequence of primers for qRT-PCR

引物名称 Primers name	引物序列(5'→3') Primers sequence
hIFN- β -F	TTGCTCTCCTGTTGTGCTT
hIFN- β -R	GCAGTATTCAAGCCTCCATTG
hISG15-F	GTGGACAAATGCGACGAACCTC
hISG15-R	TCGAAGGTCAGCCAGAACAG
hRIG-I-F	CTGACTGCCTCGGTTGGTGTG
hRIG-I-R	CTTGCTCCAGTTCCTCCAGATTGTG
hMDA5-F	TCCGCTATCTCATCTCGTCTTCA
hMDA5-R	AACGATGGAGAGGGCAAGTC
hMAVS-F	GATCTGTGAGCTGTCTGATCTC
hMAVS-R	CTCATCTCTCTGTAGCCATTG
hTBK1-F	CTGCGATGGCTGGATGAA
hTBK1-R	TAAAGATGCGCGAGTCGGA
hIRF3-F	CGGAGTTTGAAGCGGTTTTTTT
hIRF3-R	CATGCGCCAATTCGCCGTCT
hGADPH-F	TTCAACGGCAGTCAAGGCA
hGADPH-R	CCACCACATACTCAGCACCAGC

2 结果

2.1 NSP9 和 NSP16 蛋白在 293T 细胞中的表达和鉴定

通过 Western-blot 验证 NSP9 和 NSP16 在 293T 细胞中的表达产物。结果显示,实验孔在约 13 kDa (NSP9) 和 35 kDa (NSP16) 处有与预期大小相符的目的蛋白条带(图 1),而空载体 pCAGGS-HA 对照孔未见条带,表明重组真核表达质粒转入 293T 细胞后能成功表达 NSP9 和 NSP16。

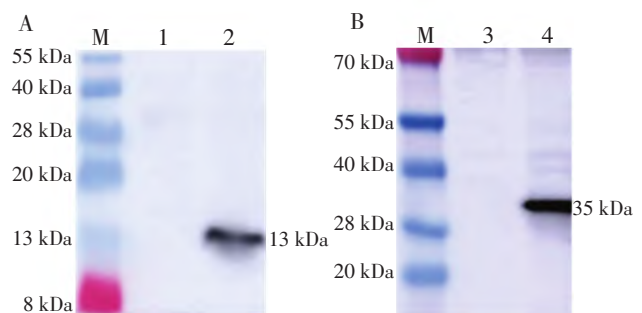


图 1 用 Western-blot 鉴定 NSP9 和 NSP16 蛋白在 293T 细胞中的表达产物

Figure 1 Western-blot identification of NSP9 and NSP16 protein expression in 293T cells

A,B: NSP9 蛋白(A)和 NSP16 蛋白(B)在 293T 细胞中的表达;M:蛋白质分子质量标准;1:pCAGGS-HA;2:pCAGGS-HA-NSP9;3:pCAGGS-HA;4:pCAGGS-HA-NSP16。

A: NSP9 protein expression in 293T cells; B: NSP16 protein expression in 293T cells. M: Protein molecular weight Marker; 1: pCAGGS-HA; 2: pCAGGS-HA-NSP9; 3: pCAGGS-HA; 4: pCAGGS-HA-NSP16.

2.2 NSP9 和 NSP16 蛋白抑制 SeV 诱导的 IFN- β 启动子活性

通过双荧光素酶报告系统探究 NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白对 IFN- β 启动子活性的影响。结果(图

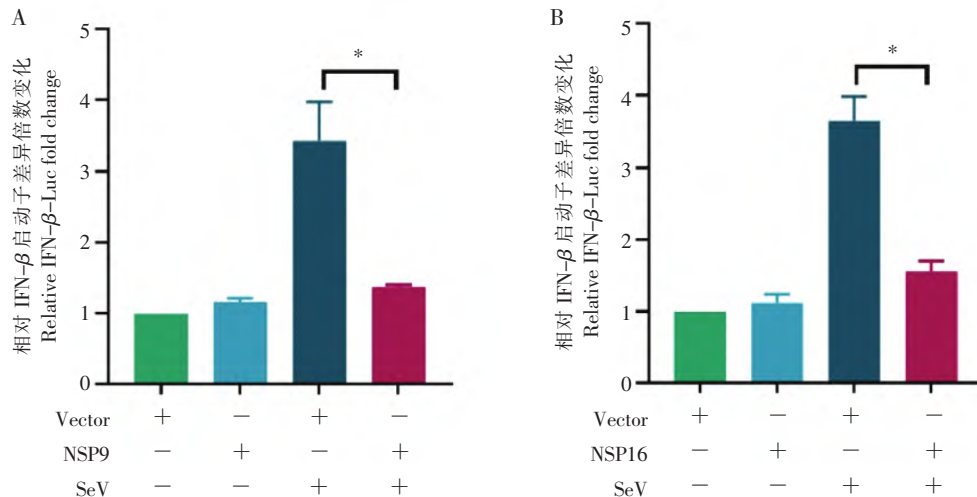


图 2 转染后 NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白对 IFN- β 启动子活性的影响

Figure 2 Effect of NSP9 protein and NSP16 protein on IFN- β promoter activity after transfection

A: 过表达 NSP9 对 IFN- β 启动子活性的影响; B: 过表达 NSP16 对 IFN- β 启动子活性的影响。*: $P < 0.05$ 。

A: Effect of overexpression of NSP9 on IFN- β promoter activity; B: Effect of overexpression of NSP16 on IFN- β promoter activity. *: $P < 0.05$ 。

2.3 NSP9 和 NSP16 蛋白抑制 SeV 诱导的 IFN- β 和 ISG15 的转录

通过 qRT-PCR 测定进一步探究 NSP9 和 NSP16 对 IFN- β 相关因子转录水平的影响。结果显示:空载体 pCAGGS-HA 转染+SeV 刺激 293T 细胞中 IFN- β 和干扰素刺激基因 15 (ISG15) mRNA 转录水平显著上调;与空载体 pCAGGS-HA 转染+SeV 刺激组相比,过表达 NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白+SeV 刺激 293T 细胞中 IFN- β 和 ISG15 mRNA 转录水平会显著下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 3)。结果表明, PDCoV 非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 能够有效地抑制 SeV 诱导的 IFN- β 和 ISG15 mRNA 转录水平,拮抗宿主抗病毒先天免疫。

2.4 NSP9 蛋白对 RLRs 信号通路关键蛋白的影响

为了进一步探究 NSP9 是否通过影响介导 IFN- β 产生的 RLRs 信号通路关键信号蛋白而抑制 IFN- β 产生,通过 qRT-PCR 检测视黄酸诱导基因 I (RIG-I)、黑色素瘤分化相关基因 5 (MDA5)、线粒体抗病毒信号蛋白 (MAVS)、TANK 结合激酶 1 (TBK1) 和干扰素调节因子 3 (IRF3) 的转录水平。结果显示,与空载体 pCAGGS-HA 转染+SeV 刺激组相比,过表达 NSP9 蛋白+SeV 刺激的 293T 细胞中的 RIG-I、MDA5、TBK1 和 IRF3 的 mRNA 转录水平显著下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而信号蛋白 MAVS 的 mRNA 转

录水平无显著变化(图 4)。通过 Western-blot 检测各信号蛋白的表达水平,结果显示,与空载体 pCAGGS-HA 转染+SeV 刺激的组相比,过表达 NSP9 蛋白+SeV 刺激的组 RIG-I、MDA5、MAVS 和 TBK1 的蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 IRF3 蛋白的表达水平未见显著差异(图 5)。

2.5 NSP16 蛋白对 RLRs 信号通路关键蛋白的影响

为了进一步探究 NSP16 是否对介导 IFN- β 产生的 RLRs 信号通路关键蛋白产生影响,通过 qRT-PCR 检测 RIG-I、MDA5、MAVS、IRF3、TBK1 的转录水平。结果显示,与空载体 pCAGGS-HA 转染+SeV 刺激组相比,过表达 NSP16 蛋白+SeV 刺激的 293T 细胞中 RIG-I 和 MDA5 的 mRNA 转录水平显著下调 ($P < 0.05$),而其他信号因子的 mRNA 转录水平无显著变化(图 6)。通过 Western-blot 检测各信号蛋白的表达水平。结果显示,与空载体 pCAGGS-HA 转染+SeV 刺激组相比,过表达 NSP16 蛋白+SeV 刺激组的 RIG-I 和 IRF3 的蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 MDA5、MAVS 和 TBK1 蛋白表达水平未见显著差异(图 7)。

2.6 PDCoV 非结构蛋白抑制 SeV 诱导的 IRF3 的激活

为了探究 NSP9 和 NSP16 是否通过抑制 IRF3 的激活来抑制 IFN- β 产生,通过 Western-blot 检测

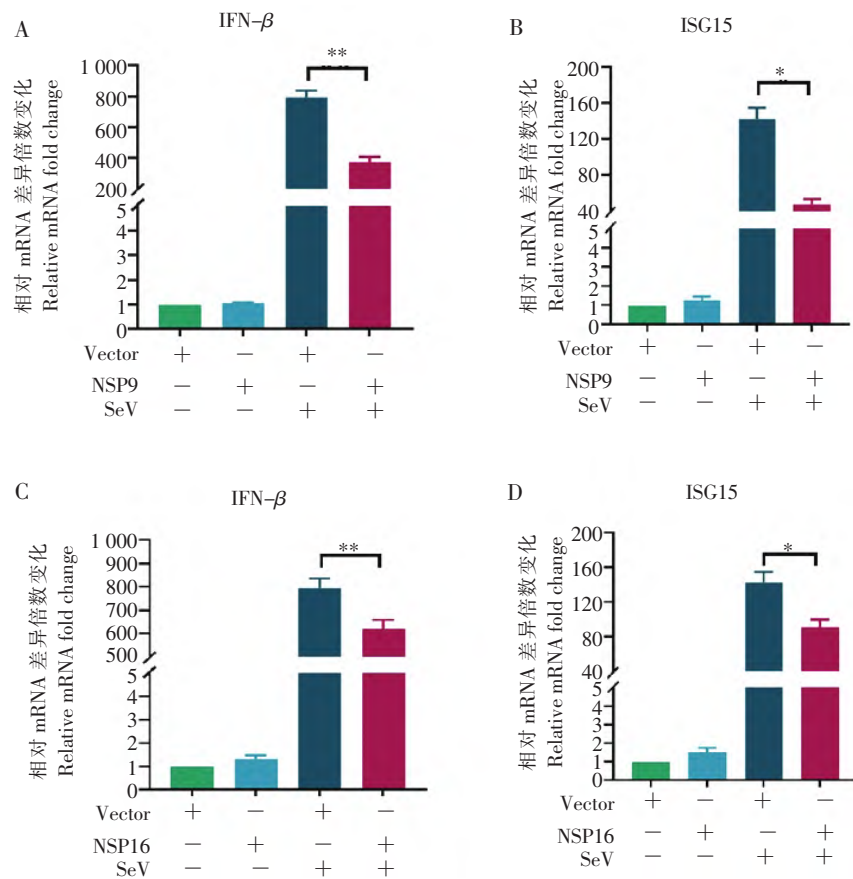


图 3 NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白过表达后对 IFN-β 和 ISG15 转录水平的影响

Figure 3 Effect of overexpression of NSP9 protein and NSP16 protein on the transcriptional levels of IFN-β and ISG15

A~B:过表达 NSP9 对 IFN-β 和 ISG15 转录水平的影响;C~D:过表达 NSP16 对 IFN-β 和 ISG15 转录水平的影响。*:P<0.05;**P<0.01。

A—B;Effects of overexpression of NSP9 on the transcriptional levels of IFN-β and ISG15;C—D;Effects of overexpression of NSP16 on the transcriptional levels of IFN-β and ISG15.*:P<0.05;**P<0.01.

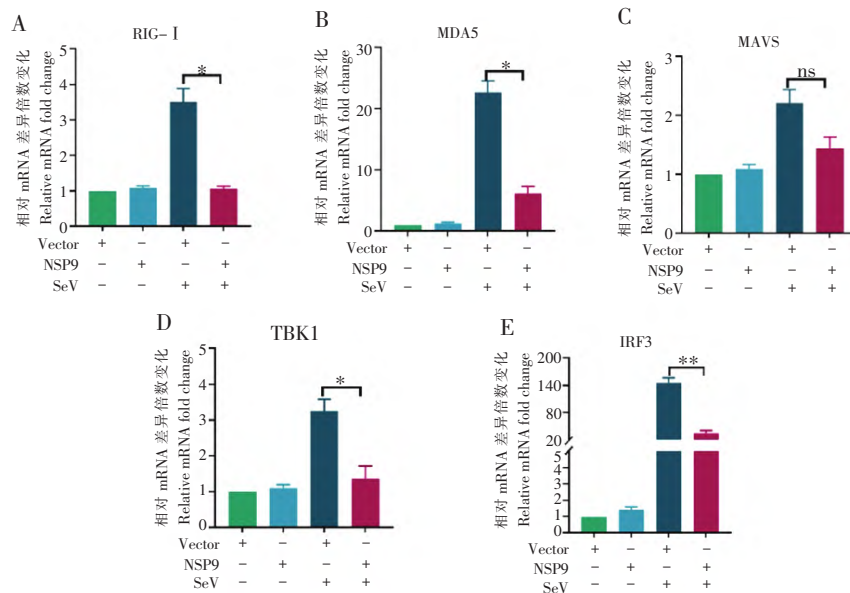


图 4 NSP9 对 RLRs 信号通路上关键信号因子 mRNA 水平的影响

Figure 4 Effect of NSP9 on mRNA levels of key signalling factors on the RLRs signalling pathway

A~E:NSP9 蛋白转染后 RIG- I (A)、MDA5(B)、MAVS(C)、TBK1(D)、IRF3(E)mRNA 的转录水平。*:P<0.05;**P<0.01;ns:无显著差异。

A—E;Transcriptional levels of RIG- I (A),MDA5 (B),MAVS(C),TBK1 (D),and IRF3 (E)mRNA after transfection with NSP9 protein.*:P<0.05; **:P<0.01;ns:no significant difference.

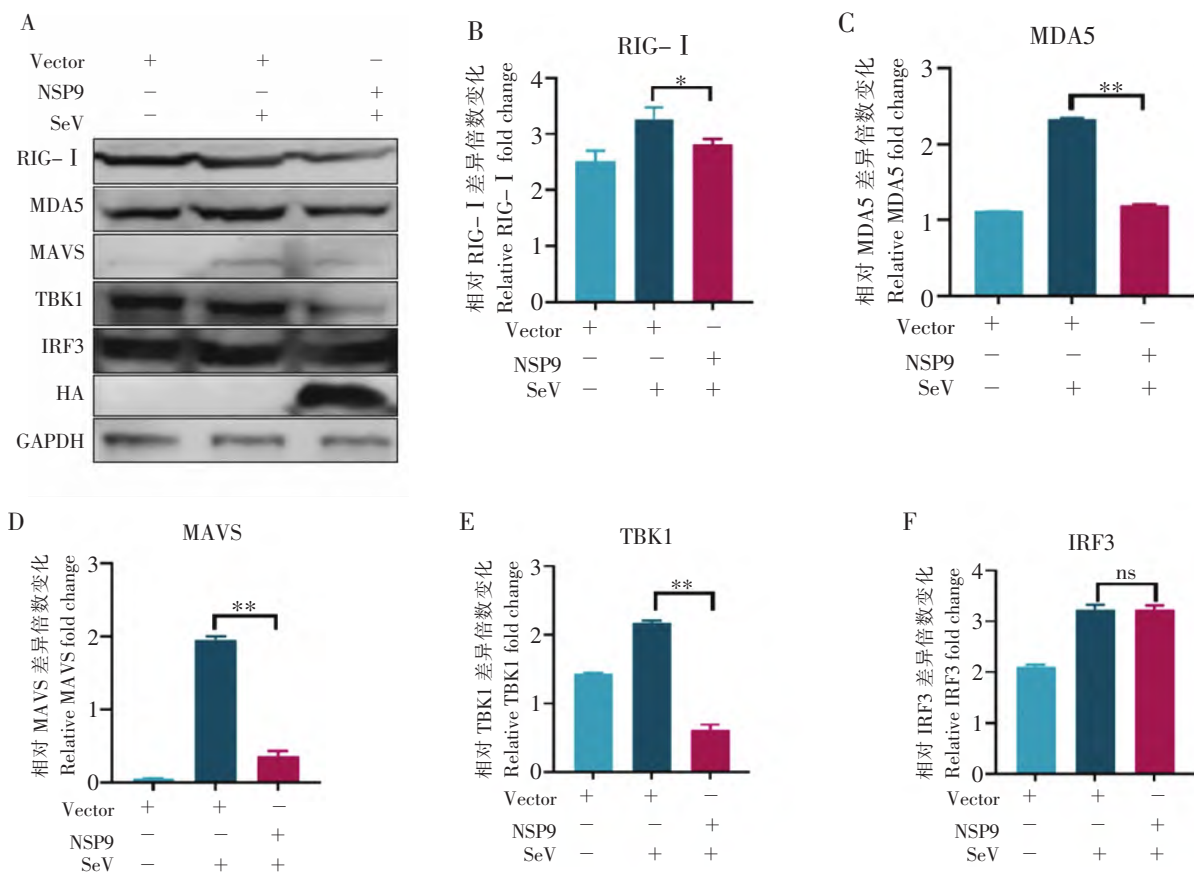


图 5 NSP9 对 RLRs 信号通路上关键信号蛋白表达水平的影响

Figure 5 Effect of NSP9 on the expression level of key signalling proteins on RLRs signalling pathway

A: NSP9 蛋白转染后 RLRs 信号通路各关键信号蛋白表达水平的 Western-blot 检测; B~F: RIG- I (B)、MDA5 (C)、MAVS (D)、TBK1 (E)、IRF3 (F) 蛋白的 Western-blot 条带灰度分析。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: 无显著差异。

A: Western-blot detection of the expression level of each key signalling protein in the RLRs signalling pathway after transfection with NSP9 protein; B~F: Grey scale analysis of Western-blot bands for RIG- I (B), MDA5 (C), MAVS (D), TBK1 (E), and IRF3 (F) proteins. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: no significant difference.

IRF3 蛋白磷酸化水平。结果显示,与空载体转染组相比,SeV 刺激可以显著促进 IRF3 的磷酸化,过表达 NSP16 蛋白可以显著抑制 SeV 诱导的 IRF3 磷酸化 ($P < 0.01$),但过表达 NSP9 蛋白对 SeV 诱导的 IRF3 磷酸化没有显著影响(图 8A~D)。

3 讨论

PDCoV 属于套式病毒目、冠状病毒科、丁型冠状病毒属成员,是一类有囊膜的单股正链 RNA 病毒,可以在仔猪中引起以腹泻为主的典型肠道疾病^[14]。PDCoV 在美国暴发流行后,在全球多个国家出现,且常与猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒等病原混合感染,给全球养猪业造成了巨大的经济损失^[15]。先天免疫系统是保护宿主不受外来病原微生物破坏不可缺少的一部分。当病毒感染宿主时,宿主细胞对外来核酸的感应导致先天免疫反应的激活,产生 IFN- I 应答,建立抵御病毒感染的第

一道防线^[16-17]。目前缺乏针对 PDCoV 的商品化疫苗和有效治疗药物,因此,深入探索 PDCoV 与宿主先天免疫 IFN- I 应答具有重要意义。

冠状病毒已被证明演化出了多种策略来抑制宿主细胞产生 IFN,例如,甲型冠状病毒属的猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、乙型冠状病毒属的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)、小鼠肝炎病毒(Mouse hepatitis virus, MHV)和丙型冠状病毒属的禽传染性支气管炎病毒(Infected bronchitis virus, IBV)都被证明可以通过多种方式拮抗 IFN- I 反应^[18-20],同时 Luo 等^[21]也已经在先前的研究中证明了 PDCoV 可以通过靶向 RIG- I 抑制 IFN- β 的产生。本研究为了进一步探究 PDCoV 非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 对宿主细胞 IFN- I 产生的影响,将 NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白的真核表达质粒转染至 293T 细胞,高效表达 NSP9 蛋

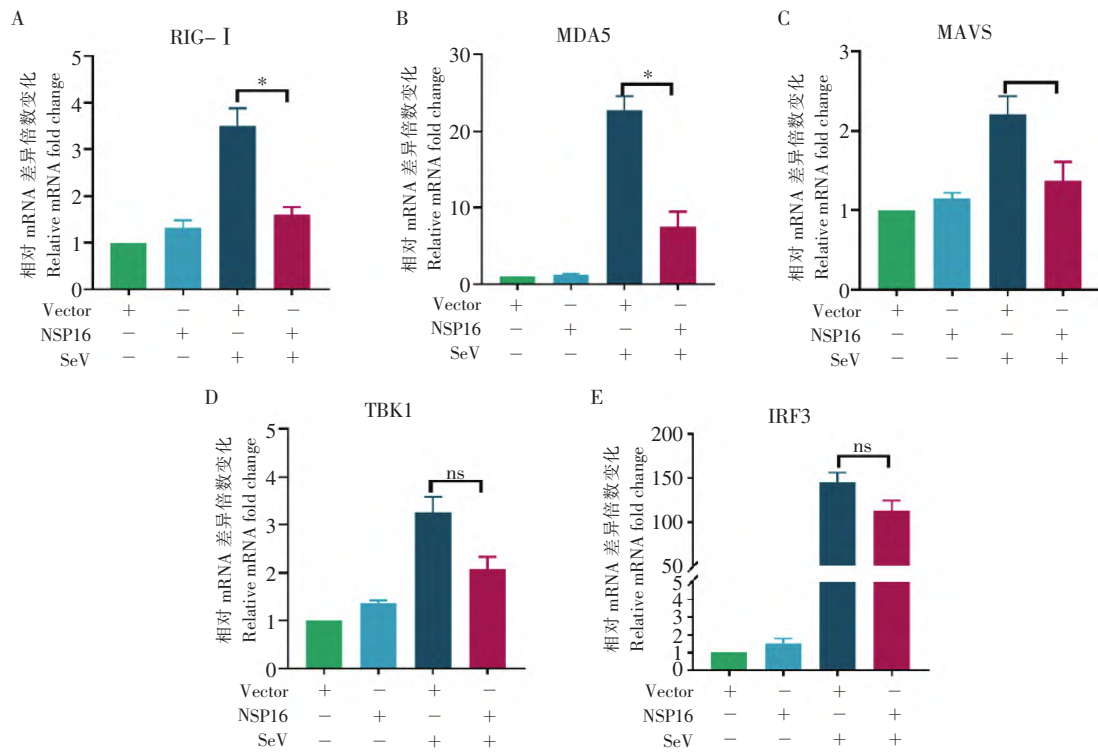


图 6 NSP16 对 RLRs 信号通路上关键信号因子 mRNA 水平的影响

Figure 6 Effect of NSP16 on mRNA levels of key signalling factors on the RLRs signalling pathway

A~E: NSP16 蛋白转染后 RIG- I (A), MDA5 (B), MAVS (C), TBK1 (D), IRF3 (E) mRNA 的转录水平。*: $P < 0.05$; ns: 无显著差异。

A~E: Transcriptional levels of RIG-I (A), MDA5 (B), MAVS (C), TBK1 (D), and IRF3 (E) mRNA after transfection with NSP16 protein. *: $P < 0.05$; ns: no significant difference.

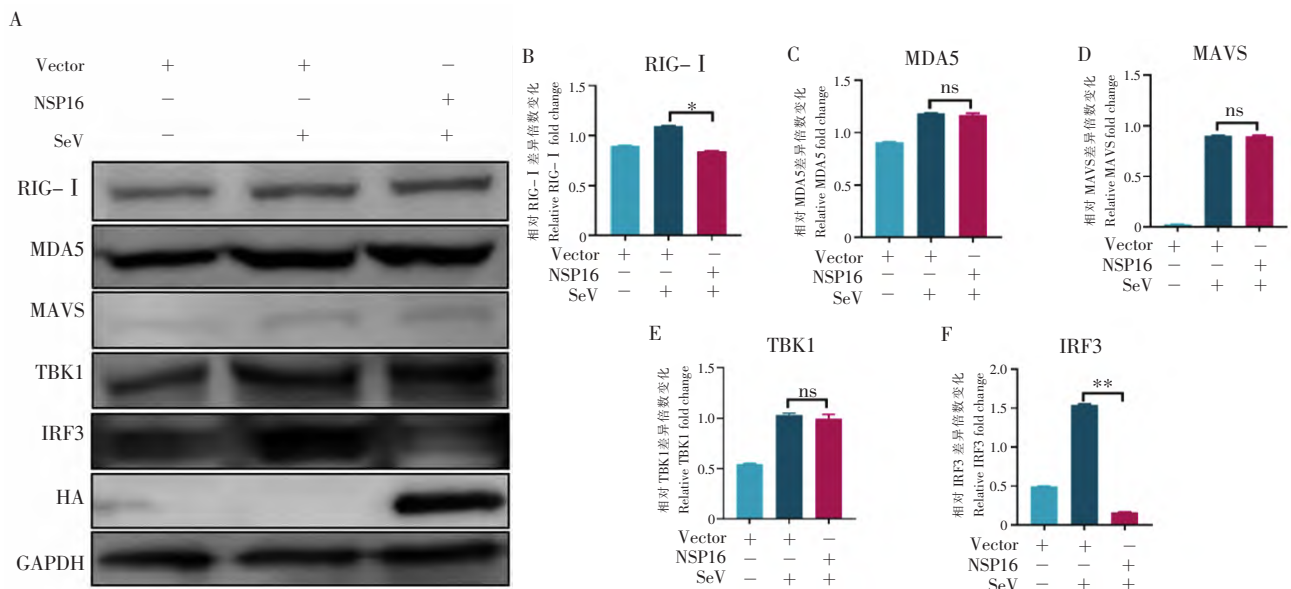


图 7 NSP16 对 RLRs 信号通路上关键信号蛋白表达水平的影响

Figure 7 Effect of NSP16 on the expression level of key signalling proteins on RLRs signalling pathway

A: NSP16 蛋白转染后 RLRs 信号通路各关键信号蛋白表达水平的 Western-blot 检测; B~F: RIG- I (B), MDA5 (C), MAVS (D), TBK1 (E), IRF3 (F) 蛋白的 Western-blot 条带灰度分析。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: 无显著差异。

A: Western-blot detection of the expression level of each key signalling protein in the RLRs signalling pathway after transfection with NSP16 protein; B~F: Grey scale analysis of Western-blot bands for RIG- I (B), MDA5 (C), MAVS (D), TBK1 (E), and IRF3 (F) proteins. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: no significant difference.

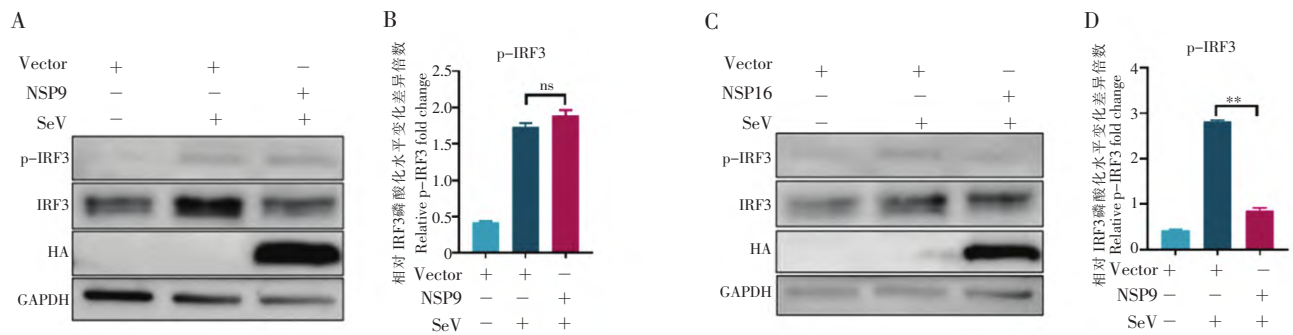


图 8 PDCoV 非结构蛋白对 SeV 诱导的 IRF3 磷酸化的影响

Figure 8 Effect of PDCoV non-structural proteins on SeV-induced IRF3 phosphorylation

A~B: NSP9 蛋白过表达后 IRF3 磷酸化水平的 Western-blot 检测 (A) 和条带灰度分析 (B); C~D: NSP16 蛋白过表达后 IRF3 磷酸化水平的 Western-blot 检测 (C) 和条带灰度分析 (D)。**: $P < 0.01$; ns: 无显著差异。

A—B: Western-blot detection (A) and grey scale analysis of bands (B) of IRF3 phosphorylation level after overexpression of NSP9 protein; C—D: Western-blot detection (C) and grey scale analysis of bands (D) of IRF3 phosphorylation level after overexpression of NSP16 protein. **: $P < 0.01$; ns: no significant difference.

白和 NSP16 蛋白后, 分别通过双荧光素酶系统和 qRT-PCR 分析, 发现 NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白均能在启动子活性水平和 mRNA 转录水平上显著抑制 SeV 诱导的 IFN- β 产生, 同时也能显著抑制 IFN- β 通路下游信号分子 ISG15 的 mRNA 转录水平。Fang 等^[12]研究也发现 PDCoV NSP16 蛋白可以抑制 SeV 诱导的 IFN- β 产生, 与本研究结果一致。以上结果提示, NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白是 IFN- β 的拮抗剂, 可能通过抑制 IFN- β 产生来逃避宿主先天免疫应答。

RLRs 是一类在细胞内起关键作用的模式识别受体, 它们能够识别病毒入侵时产生的特定分子模式, 从而激活机体的先天免疫应答。为了进一步探究 PDCoV NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白是否是通过影响 RLRs 信号通路而对 IFN- β 产生抑制作用, 本研究分别通过 qRT-PCR 和 Western-blot 检测过表达 NSP9 蛋白和 NSP16 蛋白时 RLRs 信号通路关键信号蛋白 RIG- I 、MDA5、MAVS、TBK1 和 IRF3 的 mRNA 水平和蛋白表达水平产生的变化, 结果表明: NSP9 蛋白可以显著抑制 RLRs 信号通路关键信号蛋白 RIG- I 、MDA5 和 TBK1 的表达; 而过表达 NSP16 蛋白可以显著抑制信号蛋白 RIG- I 的表达。RIG- I 、MDA5 是 RLRs 信号通路上游重要的接头蛋白, 研究表明多种冠状病毒编码的蛋白例如 SARS-CoV-2 的 N 蛋白^[22]、NSP7 蛋白^[23]和 NSP8 蛋白^[24], 以及 PEDV 的 E 蛋白^[25]都可以通过作用于 RIG- I 和 MDA5 蛋白而拮抗 IFN- β 的产生。Shi 等^[26]也研究发现, PEDV NSP16 蛋白可以通过下调 RIG- I 和 MDA5 的活性来抑制 IFN- β 的产生。因为研究表明

IRF3 蛋白作为激活 IFN- β 启动子活性的重要转录因子, 磷酸化是其激活的重要过程^[27]。为了进一步了解 NSP9 和 NSP16 蛋白是否对 IRF3 蛋白的激活产生影响, 我们通过 Western-blot 检测了 SeV 刺激后 IRF3 的磷酸化, 结果表明 NSP16 蛋白可以显著抑制 SeV 诱导的 IRF3 蛋白的磷酸化, 因此, 推测 NSP16 蛋白可能是通过抑制转录因子 IRF3 的激活, 从而进一步抑制 IFN- β 启动子的激活。

4 结论

本研究发现, PDCoV 的非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 均能显著抑制 SeV 诱导的 IFN- β 的产生, 其中 NSP9 可以显著抑制 RLRs 信号通路关键信号蛋白 RIG- I 、MDA5 和 TBK1 的表达, 而 NSP16 可以显著抑制 RLRs 信号通路上游信号蛋白 RIG- I 的表达和 IRF3 的磷酸化, 表明 PDCoV 的非结构蛋白 NSP9 和 NSP16 可能是通过影响 RLRs 信号通路来抑制 IFN- β 的产生, 从而达到免疫逃逸的目的。

参考文献 (References)

- [1] QIN P, DU E Z, LUO W T, *et al.* Characteristics of the life cycle of porcine deltacoronavirus (PDCoV) *in vitro*: replication kinetics, cellular ultrastructure and virion morphology, and evidence of inducing autophagy[J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 455.
- [2] WANG H J, QIN Y B, ZHAO W, *et al.* Genetic characteristics and pathogenicity of a novel porcine deltacoronavirus Southeast Asia-like strain found in China[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 701612.

- [3] HE W T,JI X,HE W, *et al.* Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020,37(9):2641-2654.
- [4] LI Z,DUAN P,QIU R, *et al.* HDAC6 degrades nsp8 of porcine deltacoronavirus through deacetylation and ubiquitination to inhibit viral replication [J]. *Journal of Virology*, 2023,97(5):e37523.
- [5] 曾哲. 冠状病毒 nsp9 二聚体形成及其核酸结合特性的分子机制研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2018.
ZENG Zhe. The mechanisms of coronavirus nsp9 dimerization and nucleic acid binding[D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [6] CHANG L J,CHEN T H. NSP16 2'-O-MTase in coronavirus pathogenesis: possible prevention and treatments strategies[J]. *Viruses*, 2021,13(4):538.
- [7] DAFFIS S,SZRETTTER K J,SCHRIEWER J, *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members [J]. *Nature*, 2010,468(7322):452-456.
- [8] MA F,LI B,LIU S Y, *et al.* Positive feedback regulation of type I IFN production by the IFN-inducible DNA sensor cGAS[J]. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(4):1545-1554.
- [9] ROJAS J M,ALEJO A,MARTIN V, *et al.* Viral pathogen-induced mechanisms to antagonize mammalian interferon (IFN) signaling pathway[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021,78(4):1423-1444.
- [10] LIU Y Z,QIN C,RAO Y L, *et al.* SARS-CoV-2 Nsp5 demonstrates two distinct mechanisms targeting RIG- I and MAVS to evade the innate immune response [J]. *mBio*, 2021,12(5):e233521.
- [11] ZHU X Y,WANG D,ZHOU J W, *et al.* Porcine deltacoronavirus nsp5 antagonizes type I interferon signaling by cleaving STAT2[J]. *Journal of Virology*, 2017,91(10):e00003-17
- [12] FANG P X,HONG Y Y,XIA S J, *et al.* Porcine deltacoronavirus nsp10 antagonizes interferon-beta production independently of its zinc finger domains[J]. *Virology*, 2021,559:46-56.
- [13] LIU X R,FANG P X,FANG L R, *et al.* Porcine deltacoronavirus nsp15 antagonizes interferon- β production independently of its endoribonuclease activity[J]. *Molecular Immunology*, 2019,114:100-107.
- [14] MA Y M,ZHANG Y,LIANG X Y, *et al.* Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States[J]. *mBio*, 2015,6(2):e00064-15.
- [15] 方谱县,方六荣,董男,等. 猪 δ 冠状病毒的研究进展 [J]. 病毒学报, 2016,32(2):243-248.
- FANG Puxian,FANG Liurong,DONG Nan, *et al.* Research advances in the porcine deltacoronavirus [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016,32(2):243-248. (in Chinese)
- [16] 张宁. PEDV Nsp15 蛋白抑制 I 型干扰素信号通路的作用研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2022.
ZHANG Ning. Effect of PEDV Nsp15 protein on type I interferon signaling pathway [D]. Daqing:Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [17] ZHANG Q Z,SHI K C,YOO D W. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhoea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1[J]. *Virology*, 2016,489:252-268.
- [18] CAO L Y,GE X Y,GAO Y, *et al.* Porcine epidemic diarrhoea virus inhibits dsRNA-induced interferon-beta production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG- I -mediated pathway [J]. *Virology Journal*, 2015,12:127.
- [19] KINT J,FERNANDEZ-GUTIERREZ M,MAIER H J, *et al.* Activation of the chicken type I interferon response by infectious bronchitis coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2015,89(2):1156-1167.
- [20] RASHID F,XIE Z X,SULEMAN M, *et al.* Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022,13:940756.
- [21] LUO J Y,FANG L R,DONG N, *et al.* Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection suppresses RIG- I -mediated interferon-beta production [J]. *Virology*, 2016,495:10-17.
- [22] CHEN K,XIAO F,HU D W, *et al.* SARS-CoV-2 nucleocapsid protein interacts with RIG- I and represses RIG-mediated IFN-beta production[J]. *Viruses*, 2020, 13(1):47.
- [23] DENG J,ZHENG Y,ZHENG S N, *et al.* SARS-CoV-2 NSP7 inhibits type I and III IFN production by targeting the RIG- I /MDA5,TRIF, and STING signaling pathways[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023,95(3): e28561.
- [24] DENG J,ZHENG S N,XIAO Y, *et al.* SARS-CoV-2 NSP8 suppresses type I and III IFN responses by modulating the RIG- I /MDA5,TRIF, and STING signaling pathways[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023,95(4):e28680.
- [25] ZHENG L,WANG X H,GUO D X, *et al.* Porcine epidemic diarrhoea virus E protein suppresses RIG- I signaling-mediated interferon-beta production[J].

- Veterinary Microbiology*, 2021, 254:108994.
- [26] SHI P D, SU Y X, LI R Q, *et al.* PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation[J]. *Virus Research*, 2019, 265:57-66.
- [27] FANG P X, FANG L R, XIA S J, *et al.* Porcine delta-coronavirus accessory protein NS7a antagonizes IFN- β production by competing with TRAF3 and IRF3 for binding to IKK ϵ [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10:257.

(责任编辑 胡志敏)