

PCBP2 促进口蹄疫病毒增殖的机制研究

何艳春¹, 杨文萍², 付绍祖², 郑海学^{2*}, 杨孝朴^{1*}

(1. 甘肃农业大学 动物医学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院 兰州兽医研究所
家畜疫病病原微生物学 口蹄疫流行病学国家重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 多聚胞嘧啶结合蛋白 2 (PCBP2) 是一个能特异性结合 RNA 和 DNA Poly(C) 片段的蛋白, 具有维持 mRNA 稳定和调节翻译的功能; 同时, PCBP2 能负调控 VISA 介导的信号转导通路, 抑制 I 型干扰素 (IFNs) 的产生。前期研究表明, PCBP2 能调节口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 的增殖, 但具体机制不清楚。作者对此进行了研究, 发现: 1) 免疫共沉淀和 GST pull-down 试验证实, PCBP2 能与 FMDV 结构蛋白 VP0、VP2、2B、2C 和 3D 相互作用; 2) 进一步用双荧光素酶报告系统试验证明, PCBP2 负调控 VISA 介导的信号通路, 并且 2C、3D、VP0 和 2B 促进 PCBP2 的负调控作用; 3) 通过 Western blot 试验表明, FMDV VP0 蛋白能促进 PCBP2 对 VISA 的特异性降解。总之, PCBP2 与 FMDV VP0 相互作用, 促进 PCBP2 降解天然免疫接头蛋白 VISA, 抑制 IFN- β 的产生, 从而有利于 FMDV 在细胞中的繁殖和生长。

关键词: 口蹄疫病毒; 天然免疫; 多聚胞嘧啶结合蛋白 2; VISA; VP0

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)07-1451-09

The Research on Molecular Mechanism of PCBP2

Promoting the Multiplication of Foot-and-mouth Disease Virus

HE Yan-chun¹, YANG Wen-ping², FU Shao-zu², ZHENG Hai-xue^{2*}, YANG Xiao-pu^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070;

2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot and Mouth

Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Poly (rC) binding protein 2(PCBP2) belongs to a class of proteins that bind to poly (C) stretches of both RNA and DNA. PCBP2 has roles in maintaining mRNA stability and regulating translation. Meanwhile PCBP2 is a negative regulator in VISA-mediated antiviral signaling to reduce production of IFN- β . Previous study have shown that PCBP2 can affect the multiplication of foot-and-mouth disease virus (FMDV), but the specific mechanism is unclear. Here, we investigated the molecular mechanisms about PCBP2 promoting the multiplication of FMDV. Results: 1) We found that FMDV structural protein VP0, 2B, VP2, 2C and 3D can interact with PCBP2 via Co-IP and GST pull-down tests. 2) Further study revealed that PCBP2 is a negative regulator in VISA-mediated antiviral signaling, and 2C, 3D, VP0 and 2B can promote the negative regulation of PCBP2 on VISA-mediated antiviral signaling via the Dual-Luciferase Reporter Assay. 3) Meanwhile we found that FMDV VP0 can increase specific degradation of VISA mediated by PCBP2 through Western blot. In a word, FMDV VP0 can increase degradation of VISA mediated

收稿日期: 2018-01-02

作者简介: 何艳春(1992-), 女, 河南洛阳人, 硕士, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: 1345302934@qq.com

* 通信作者: 杨孝朴, 教授, 主要从事动物病原分子生物学研究, E-mail: yangxpu@gsau.cn, Tel: 0931-7632509; 郑海学, 研究员, 主要从事口蹄疫病毒宿主嗜性变异和天然免疫应答分子机制研究, E-mail: haixuezheng@163.com

by PCBP2 via VP0-PCBP2 interaction to reduce the production of IFN- β , and enhance the FMDV activity in cell.

Key words: foot-and-mouth disease virus; innate immune; poly (rC) binding protein 2; mitochondrial antiviral signaling protein; VP0

口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 是一种单股正链 RNA 病毒, 能引起牛、猪等多种偶蹄动物发生口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD)^[1]。临床主要表现为患病动物的口、唇和蹄等部位出现水泡或烂斑。发病率达 100%, 死亡率低 (可引起幼畜较高的死亡率), 但可造成动物生产能力下降, 肉质受损, 且严重影响种用价值。FMDV 基因组包含 5' 非编码区 (UTR)、一个完整的开放阅读框 (ORF) 和一个带有 Poly(A) 尾巴的 3' UTR。ORF 编码一个多聚蛋白, 随后被切割成至少 13 个蛋白, 例如 VP1、VP2、VP3、VP4、先导蛋白酶 (L^{pro})、2A、2B、3A、3B1、3B2、3B3、3C pro 和 3D pro ^[2-3]。病毒衣壳是由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四个结构蛋白各 60 个分子构成, 其中 VP1、VP2 和 VP3 作为病毒衣壳的亚单位, 主要构成病毒衣壳的外表面。VP4 与 RNA 紧密连接, 与 FMDV 衣壳的内部结构有关, VP0 是 VP2 和 VP4 的前体蛋白, 其结构中, VP4 位于 VP2 氨基末端的延伸部位。前期研究表明 FMDV 蛋白可以调控干扰素的产生, 例如, L^{pro} 能抑制 poly(I:C) 诱导 IFN- λ 1 的启动子活性; 3C pro 通过影响 IRF-3/7 的活性来拮抗 IFN- α 1/ β 的启动子激活^[4]。VP1 与宿主蛋白可溶性耐药相关钙结合蛋白 (soluble resistance-related calcium-binding protein, Sorcin) 发生互作抑制 I 型干扰素的产生^[5]。VP3 通过降解 VISA 抑制 IFN- β 的活性^[4]。那么是否有宿主蛋白与 FMDV 蛋白互作通过天然免疫途径调控 FMDV 增殖? 本研究发现宿主蛋白 PCBP2 能与 FMDV VP0 互作, 并通过天然免疫途径调节 FMDV 增殖。

天然免疫在保护宿主不被病原体入侵中起到关键性作用。I 型干扰素中 IFN- α 和 IFN- β 是先天抗病毒应答的核心成员。主要有两类模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原相关分子模式 (pathogens-associated molecular patterns, PAMPs), 分别为 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 和 RIG-I 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs)^[6-8]。RIG-I 和黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated protein, MDA5) 作为

胞质传感器, 能检测到细胞质中 RNA 病毒 (例如仙台病毒 SeV 和新城疫病毒 NDV 等)^[9]。在 RLRs 介导的抗病毒应答过程中, 入侵细胞内的病毒分子主要被 RIG-I 和 MDA5 识别, 并招募下游位于线粒体的接头蛋白 VISA (也称作 IPS-1、CARDIF 和 MAVS)^[10] 来激活下游通路^[11]。随后, VISA 通过激活蛋白激酶 TBK1 磷酸化修饰转录因子 IRF3, 使其形成二聚体, 进入细胞核中^[12-13]。活化的转录因子 IRF3 入核后结合到 *IFNB1* 基因启动子的干扰素刺激反应元件 ISRE 位点, 诱导 IFNs 和多种 ISGs 因子的产生, 并在其他效应因子的协同下发挥抗病毒功能。

多聚胞嘧啶结合蛋白 2 [poly(rC) binding protein 2, PCBP2] 是一种在人类和小鼠中广泛表达的宿主蛋白, 不仅参与 RNA 的复制和翻译^[14], 也参与到蛋白之间的相互作用^[15-17]。有研究报道 PCBP2 能与 VISA 特异性结合, 进而抑制细胞中 RIG-I 通路的抗病毒感染应答; 过表达 PCBP2 可特异性引起 VISA 蛋白的降解从而抑制 IFN- β 的产生^[18]。尽管 PCBP2 通过特异性降解 VISA 来抑制 RIG-I 通路的抗病毒免疫反应, 抑制细胞中 IFN- β 启动子活性, 进而增强病毒在细胞中的活性^[18], 但是 PCBP2 与 FMDV 蛋白通过天然免疫来调控 FMDV 增殖的机制还不清楚。作者利用免疫共沉淀试验、GST pull-down 试验、双荧光素酶报告系统试验和 Western blot 试验对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

pcDNA3.1/myc-HisA 载体由本实验室保存。pcDNA3.1-myc-PCBP2 质粒、HA-PCBP2 质粒和带 Flag 标签的且被克隆在 PCAGGS 载体上的各口蹄疫蛋白质粒, 均由本实验室构建保存, 且测序鉴定为正确。双荧光素酶报告系统所需质粒, 仙台病毒 (Sendai virus, SeV) 以及带 HA 标签的 VISA 质粒由武汉大学舒红兵院士馈赠。鼠抗 Flag、HA、Myc 单克隆抗体购于 Sigma 公司。兔抗 VISA 多克隆抗体购自 BETHYL 公司。兔抗 GST 多克隆抗体和

鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自 Thermo 公司。HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗和抗兔 IgG 二抗均购自 Santa Cruz 公司。人源胚胎肾细胞系 HEK293T 用含 10% 灭活胎牛血清(FBS, Gibco)的 DMEM 培养基(Gibco)在 37 °C、5%CO₂ 温箱中培养。

1.2 免疫共沉淀和蛋白印迹

HEK293T 细胞培养在 10 cm 培养皿中,待生长为 90%左右的单层细胞时,将 FMDV VP0、VP2、L、2B、2C、3A、3C 和 3D 分别与 PCBP2 质粒共同转染 HEK293T 细胞。24 h 后弃掉培养基,加入 NP-40 裂解液[50 mmol · L⁻¹ Tris (pH 8.0), 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 5 mmol · L⁻¹ EDTA, 1%NP-40, 2 mg · mL⁻¹ aprotinin, 2 mg · mL⁻¹ leupeptin, 1 mmol · L⁻¹ phenylmethanesulfonyl fluoride],冰上孵育 30 min 并收集液体,12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取适量上清加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min 后离心,进行 Western blot 试验;将剩余上清平分,加入 IgG 抗体和 Flag 或 HA 抗体,再加入 G 蛋白琼脂糖珠(Sigma),用裂解液补至 1 mL,4 °C 旋转摇床孵育 3 h。用裂解液清洗树脂 3 次,SDS-PAGE 裂解煮沸,进行 Western blot。

Western blot 试验方法,将质粒转入培养好的细胞,24 h 后收样并处理,煮沸 10 min 后 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。将处理好的样品加入蛋白胶孔,跑至底部,用浸泡过甲醇的 PVDF 膜转膜。将转好的膜用 5% 的脱脂奶粉封闭 30 min,之后加入一抗 4 °C 摇床过夜,回收抗体,洗三次,加入二抗,洗三次,随后曝光。

1.3 双荧光素酶报告试验

将 HEK293T 细胞培养于 24 孔板,待细胞生长至 70%左右,将 IFN- β -Luc/ISRE-Luc 报告质粒、PRL-TK 内参质粒以及 PCBP2 三种质粒共同转入细胞,用空载体确保每一个孔接收相同的质粒。24 h 后用 SeV(100 HAU · mL⁻¹)进行接毒试验,12 h 后处理细胞,用双荧光素酶报告基因试剂盒(Promega)照其说明书进行试验。

1.4 GST pull-down 试验

首先取 80 μ L GST 树脂于 EP 管中,10% BSA 封闭,于 4 °C 旋转摇床孵育 4~6 h。然后加入 TIF buffer(1.0 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 20 mmol · L⁻¹ Tris (pH 8.0), 0.1% Nonidet P-40, 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 10% glycerol, 0.1 mmol · L⁻¹ DTT)清洗树脂六次。在封闭好的树脂中分别加入纯化的

GST 和 GST 融合蛋白,用 TIF buffer 补液,于 4 °C 旋转摇床孵育 2.5 h 后清洗树脂,然后在树脂中加入表达有目的质粒的 HEK293T 细胞裂解液,于 4 °C 旋转摇床孵育 4~6 h,清洗树脂,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,煮沸处理,进行 Western blot 试验。

1.5 数据分析

使用单因素方差分析法进行统计学分析(数据为三次独立试验的平均值)。差异显著性用“*”表示(*. $P < 0.05$, ** . $P < 0.01$, *** . $P < 0.001$)

2 结果

2.1 鉴定与 PCBP2 发生互作的 FMDV 蛋白

为了验证 PCBP2 与哪些口蹄疫病毒蛋白有相互作用,将 FMDV VP0、VP2、L、2B、2C、3A、3C 和 3D 分别与 PCBP2 表达质粒共同转染,免疫共沉淀试验显示 PCBP2 与 FMDV 的 VP2、2B、L、VP0、2C 和 3D 有相互作用(图 1a、b)。进一步用 GST pull-down 试验证实 PCBP2 与 FMDV 的 VP0、VP2、2B、2C 和 3D 有相互作用(图 1c、d)。

2.2 PCBP2 负调控 VISA 介导的细胞信号通路

为了探究猪源 PCBP2 是否对 I 型干扰素通路有影响,首先将 HEK293T 细胞铺于 24 孔细胞板,每组样品设置 4 个重复,16 h 后将重组质粒 Myc-PCBP2、100 ng IFN- β -Luc/ISRE-Luc 报告质粒、20 ng PRL-TK 内参质粒三种质粒共同转染 HEK293T 细胞,用相应空载体确保每一个孔细胞接收相同质粒,24 h 后用 SeV 刺激 4 个重复中的 2 个重复,剩下 2 个重复不做接毒处理,12 h 后收集样品进行双荧光素酶报告系统检测。结果表明,猪源 PCBP2 抑制 IFN- β 和 ISRE 的活性(图 2a、b)。

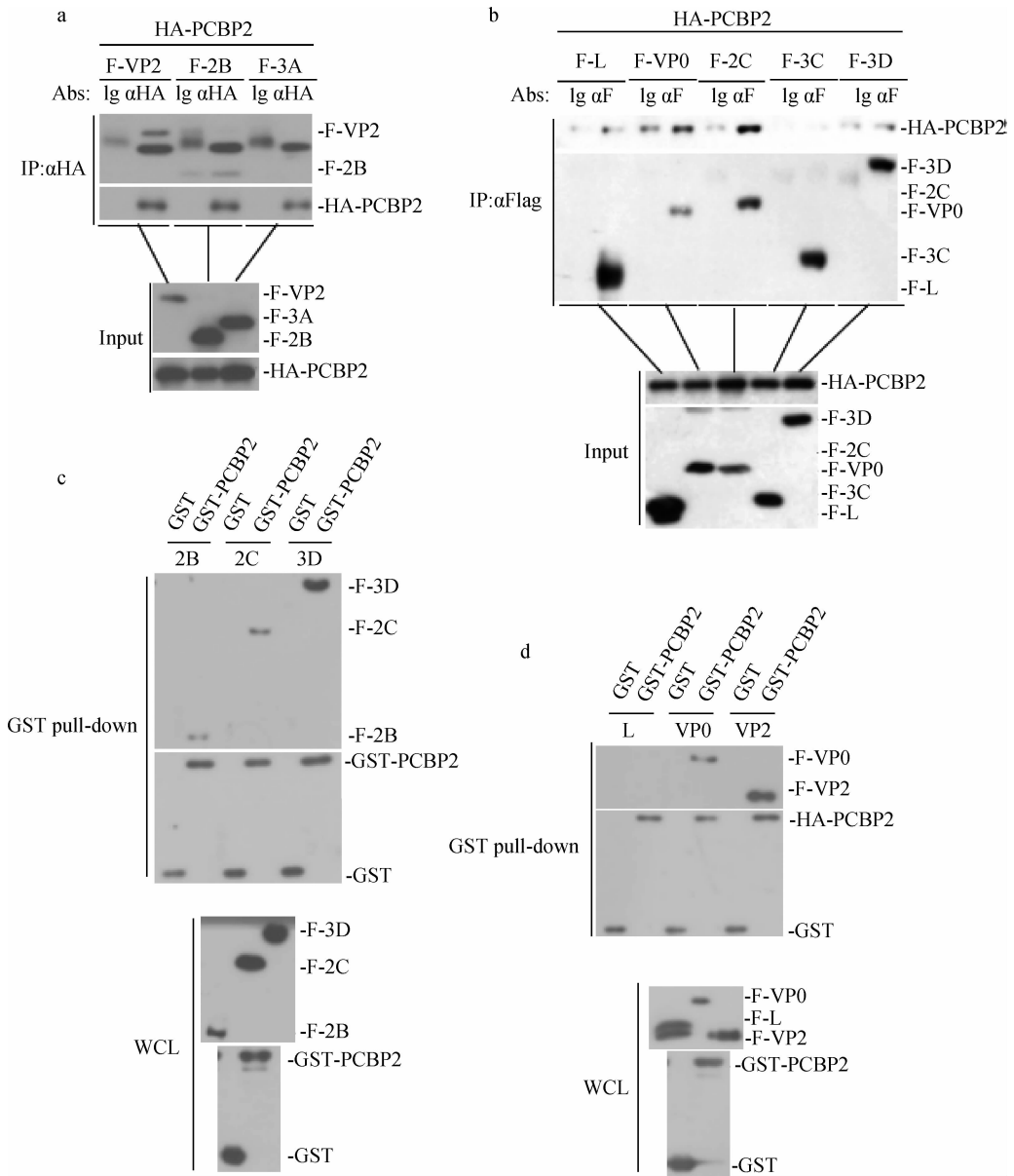
进一步将不同剂量 Myc-PCBP2(0、0.3、0.6、1.2 μ g)与 100 ng IFN- β -Luc/ISRE-Luc 报告质粒、20 ng PRL-TK 内参质粒以及 HA-VISA(0、2.5 ng)质粒共同转染 HEK293T 细胞,24 h 后进行双荧光素酶报告系统检测。结果表明,猪源 PCBP2 抑制 VISA 诱导的 IFN- β 和 ISRE 的活性(图 2c、d)。

2.3 FMDV 蛋白 2C、3D、VP0、2B 增加了猪源 PCBP2 对 IFN- β 启动子活性的抑制作用

为了探索哪些 FMDV 蛋白影响 PCBP2 负调控 VISA 介导的细胞信号通路。将 FMDV 蛋白 L、VP2、2C、3D、VP0、2B(均 100 ng)分别与 Myc-PCBP2(500 ng)、100 ng IFN- β -Luc 报告质粒、20 ng

PRL-TK 内参质粒以及 2.5 ng HA-VISA 质粒共同转染 HEK293T 细胞, 双荧光素酶报告系统试验验证

明, 2C、3D、VP0、2B 蛋白促进 PCBP2 对 IFN- β 的抑制作用(图 3)。

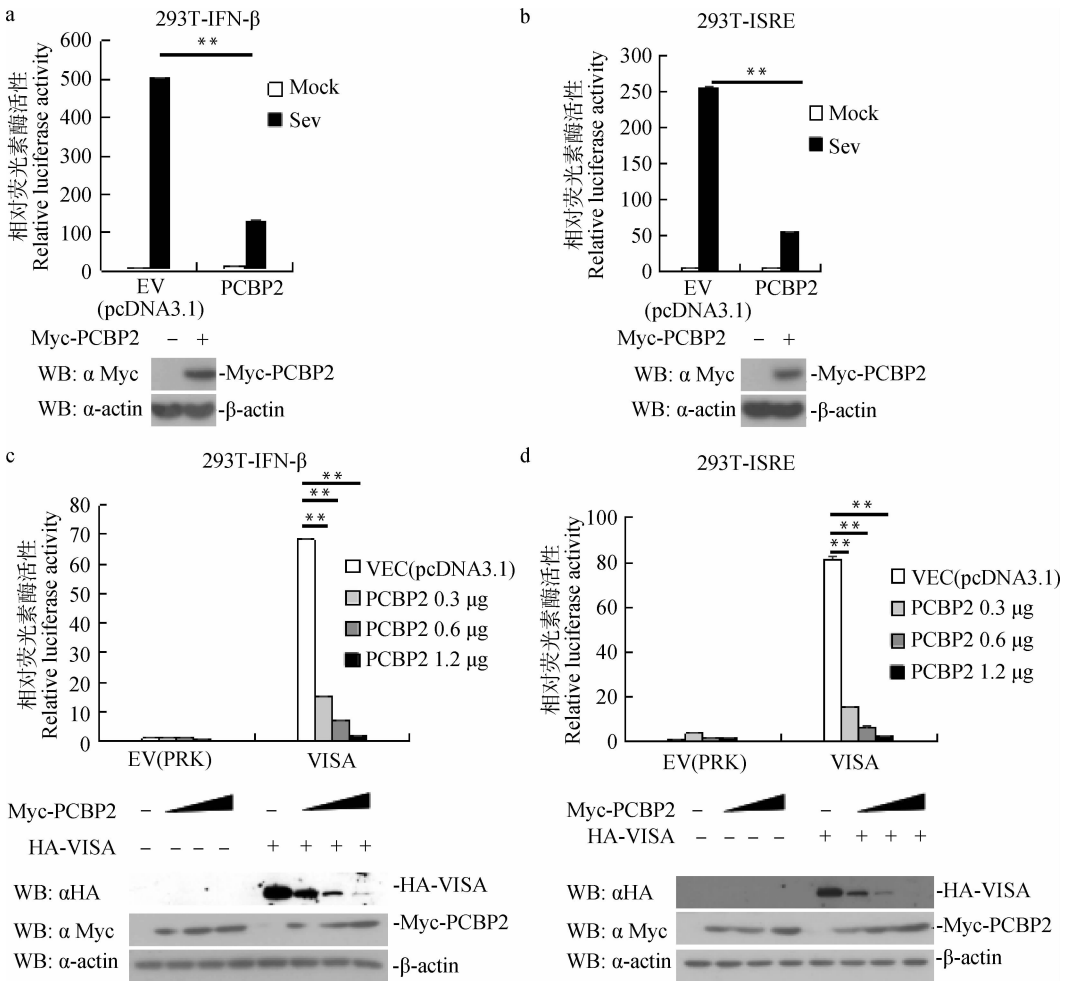


a, b. 将带 Flag 标签的 FMDV 蛋白 VP2、2B、3A、L、VP0、2C、3C 和 3D(10 μ g) 分别与 HA-PCBP2(10 μ g) 共同转入 HEK293T 细胞(2×10^6), 用 HA/IgG(a) 和 Flag/IgG(b) 抗体进行免疫共沉淀, 随后用 Flag/HA 进行蛋白印迹试验; c, d. 将带有 Flag 标签的口蹄疫病毒蛋白 L、VP0、VP2、2B、2C、3D(10 μ g) 进行转染, 24 h 后进行 GST pull-down 试验, 图上从左到右依次为 2B 分别与 GST、GST-PCBP2, 2C 分别与 GST、GST-PCBP2, 3D 分别与 GST、GST-PCBP2, L 分别与 GST、GST-PCBP2, VP0 分别与 GST、GST-PCBP2 以及 VP2 分别与 GST、GST-PCBP2 的 GST pull-down 试验, 随后用 Flag(上)、GST(中) 进行蛋白印迹试验, WCL(底部) 是用蛋白印迹试验验证蛋白表达

a, b. HEK293T cells (2×10^6) were transfected with the indicated plasmids (10 μ g each). Immunoprecipitation, with anti-Flag (HA) or control mouse immunoglobulin (IgG) of proteins from lysates and immunoblot were performed with anti-HA or anti-Flag; c, d. Flag-tagged FMDV proteins L, VP0, VP2, 2B, 2C, 3D transfected for 24 h with 10 μ g plasmid, tested by GST pull-down. GST pull-down (from left to right): 2B/GST, 2B/GST-PCBP2, 2C/GST, 2C/GST-PCBP2, 3D/GST, 3D/GST-PCBP2, L/GST, L/GST-PCBP2, VP0/GST, VP0/GST-PCBP2, VP2/GST, VP2/GST-PCBP2 and immunoblot were performed with anti-Flag (top) or anti-GST (middle), WCL (bottom), expression of proteins

图 1 与 PCBP2 发生互作的 FMDV 蛋白

Fig. 1 The FMDV proteins interact with PCBP2



a, b. 将重组质粒 Myc-PCBP2 (0, 500 ng)、100 ng IFN- β -Luc/ISRE-Luc 报告质粒、20 ng PRL-TK 内参质粒共同转染 HEK293T 细胞, 24 h 后用 SeV 刺激 12 h (右), 收集样品进行双荧光素酶报告系统检测; c, d. 将不同剂量 Myc-PCBP2 (0, 0.3, 0.6, 1.2 μ g) 与 100 ng IFN- β -Luc/ISRE-Luc 报告质粒、20 ng PRL-TK 内参质粒以及 HA-VISA (0, 2.5 ng) 质粒共同转染 HEK293T 细胞, 24 h 后进行双荧光素酶报告系统检测; EV、VEC 指相对应载体蛋白的空载体; 每组数据均为三次或者三次以上独立试验的结果; * * . $P < 0.01$ 为差异极显著

a, b. HEK293T cell were transfected with 100 ng reporter plasmid (IFN- β -Luc/ISRE-Luc), 20 ng pRL-TK and PCBP2 (0, 500 ng) and infected for 24 h with SeV (right), assessed as luciferase activity after 12 h; c, d. HEK293T cell were transfected with luciferase reporter constructs plus PCBP2 (0, 0.3, 0.6, 1.2 μ g), assessed as luciferase activity after 24 h. EV. Empty vector; VEC. Vector empty control; The results represent the means and standard deviations of data from three independent experiments. * * . $P < 0.01$

图 2 猪源 PCBP2 抑制 VISA 诱导的 IFN- β 和 ISRE 的产生

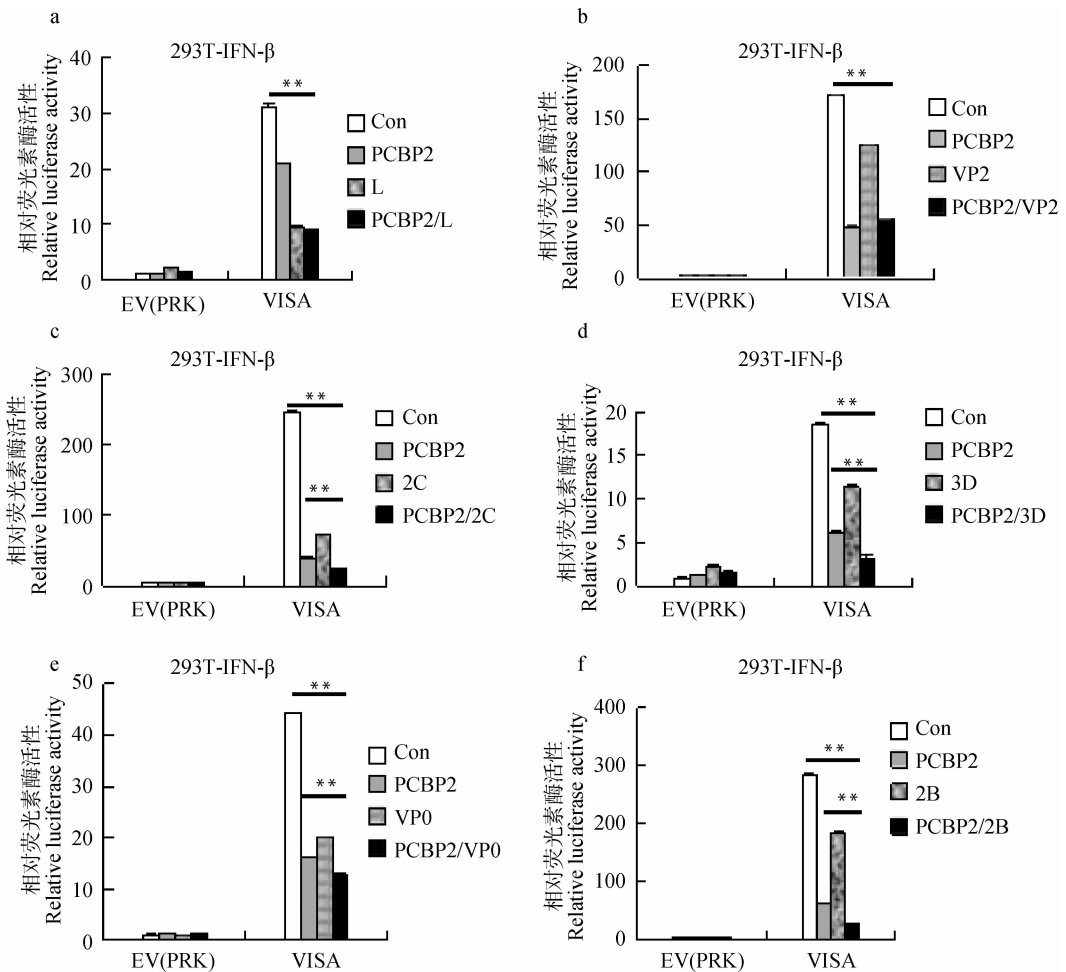
Fig. 2 Porcine PCBP2 inhibits VISA-induced IFN- β and ISRE

2.4 VP0 促进 PCBP2 对 VISA 的特异性降解

为了验证哪些 FMDV 蛋白促进 PCBP2 降解 VISA, 将 FMDV 2C、3D、VP0 和 2B 蛋白 (600 ng) 分别与猪源 PCBP2 (1 μ g)、VISA (800 ng) 共转染, Western blot 试验显示 FMDV VP0 和 3D 促进 PCBP2 特异性降解外源 VISA (图 4a~d)。进一步试验表明, 只有 VP0 促进 PCBP2 对内源 VISA 的特异性降解 (图 4e, f)。

3 讨论

口蹄疫是由口蹄疫病毒引起的一种急性、接触性传染的动物疫病, 是国家乃至全球经济贸易的最大羁绊。由于 FMDV 广泛的宿主范围, 高效的变异频率^[19-20], 从而有利于 FMDV 逃避宿主免疫监视, 建立持续性感染^[21]。宿主细胞作为 FMDV 生命活动载体, 在其生活周期中, 发现有多种宿主细胞蛋白



a, b, c, d, e, f. 将 FMDV 蛋白 L、VP2、2C、3D、VP0、2B(0、100、0、100 ng) 分别与 Myc-PCBP2 (0、0、500、500 ng)、100 ng $IFN-\beta$ -Luc 报告质粒、20 ng PRL-TK 内参质粒以及 HA-VISA(0、2.5 ng) 共同转染 HEK293T 细胞, 24 h 后进行双荧光素酶报告系统试验。EV 指相对载体蛋白的空载体; Con. VP0 载体蛋白相对应的空载体是 PCAGGS, Myc-PCBP2 对应的空载体是 pcDNA3.1; 每组数据均为三次或者三次以上独立试验的结果; * * . $P < 0.01$ 为差异极显著

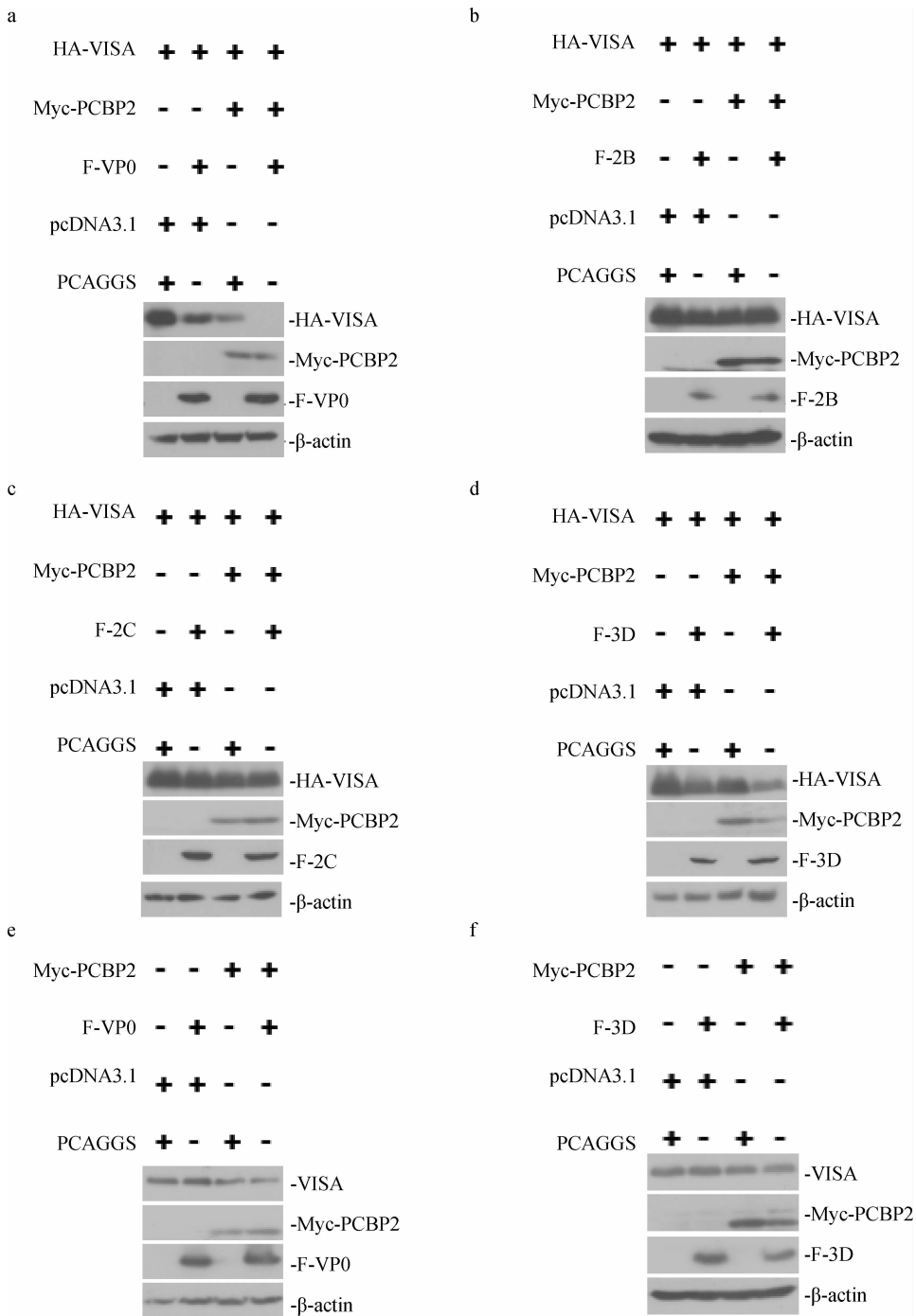
a, b, c, d, e, f. HEK293T cell were transfected with 100 ng reporter plasmid, 20 ng pRL-TK, HA-VISA (0, 2.5 ng) various FMDV plasmids (0, 100, 0, 100 ng) and Myc-PCBP2 (0, 0, 500, 500 ng) for 24 h, assessed as luciferase activity. EV. Empty vector; Con. The corresponding empty vector of VP0 is PCAGGS, the corresponding empty vector of Myc-PCBP2 is pcDNA3.1; The results represent the means and standard deviations of data from three independent experiments. * * $P < 0.01$

图 3 2C、3D、VP0、2B 蛋白促进 PCBP2 对 $IFN-\beta$ 的抑制作用

Fig. 3 The effect of $IFN-\beta$ inhibited by PCBP2 is promoted by 2C, 3D, VP0, 2B proteins

参与其中。由于 FMDV 是一种 RNA 病毒, 这些细胞蛋白里有一部分是 RNA 结合蛋白(RNA binding protein, RBP), 例如多聚嘧啶结合蛋白(PTB)^[22]、La 自身抗原(La autoantigen)^[23]、核糖体 40S 亚基(40S ribosomal subunit)^[24]、突触结合胞质 RNA 相互作用蛋白(NSAP1)^[25-26] 以及核不均一核糖核蛋白(hnRNP)^[27] 等, 而 PCBP2 细胞蛋白是属于特异性结合 RNA 胞嘧啶富集片段的 HnRNP^[28-30]。已有研究报道 PCBP2 能够调控细胞的免疫应答反应^[18], 促进 FMDV 的增殖^[31], 那么阐明 PCBP2 在

FMDV 引起免疫抑制中的分子机制, 则有利于对 FMD 进行有效的防控提供科学依据。本文首先验证出与 PCBP2 发生互作的 FMDV 蛋白(VP2、2B、VP0、2C、3D)。接着阐明 PCBP2 负调控细胞的免疫应答。将互作蛋白分别与 PCBP2 共转染, 双荧光素酶报告试验初步证实 2C、3D、VP0 和 2B 进一步抑制 $IFN-\beta$ 的产生。据文献报告, PCBP2 能够通过 E3 泛素连接酶 AIP4 泛素化降解 VISA, 以达到对细胞免疫应答的负调控作用^[32], 随后将 2C、3D、VP0 和 2B 分别与 PCBP2 共转染, Western blot 试



a, b, c, d. 将 FMDV 2C、3D、VP0 和 2B 蛋白 (600 ng) 分别与猪源 Myc-PCBP2 (1 μ g)、HA-VISA (800 ng) 转入 HEK293T 细胞, 24 h 后进行 Western blot 试验; e, f. 将 FMDV VP0 和 3D 蛋白 (600 ng) 分别与猪源 Myc-PCBP2 (1 μ g) 转入 HEK293T 细胞, 24 h 后进行 Western blot 试验

a, b, c, d. Immunoblot analysis of HEK293T cells transfected with plasmids encoding HA-tagged VISA (800 ng), Myc-tagged PCBP2 (1 μ g) and various FMDV plasmids (600 ng) for 24 h; e, f. Immunoblot analysis of HEK293T cells transfected with plasmids encoding Myc-tagged PCBP2 (1 μ g) and various FMDV plasmids (600 ng) for 24 h

图 4 VP0 加速 PCBP2 对 VISA 的特异性降解

Fig. 4 VP0 accelerate the specific degradation of VISA from PCBP2

验检测内、外源 VISA 的降解情况。结果表明, VP0 和 PCBP2 共转染能增加 VISA 的降解, 从而减少免

疫应答中 IFN- β 的产生, 增强 FMDV 在宿主细胞中的活性。前言中提到 VP3 也能降解 VISA, 抑制

IFN- β 的产生,但 VP3 是通过影响 VISA 的 RNA 水平达到降解 VISA 蛋白的目的,抑制细胞的免疫应答;而 VP0 对 VISA 转录水平的影响将在后续试验中进行,目前推测 VP0 可能通过泛素化途径直接或间接降解 VISA,以达到对 IFN- β 启动子活性的抑制,促进 FMDV 的增殖,这些猜想还需要进一步验证。对于 VP0、PCBP2 和 VISA 三者之间的具体关系,也需要我们继续深入研究下去。

4 结 论

PCBP2 能够与 FMDV 蛋白 VP0、VP2、2B、2C 和 3D 发生相互作用,且负调控 I 型干扰素产生的信号通路,同时 PCBP2 能特异性降解 VISA 并呈剂量依赖效应;双荧光素酶报告试验证实 VP0、2B、2C 和 3D 蛋白可以促进 PCBP2 对 IFN- β 启动子活性的抑制作用,其中只有 VP0 蛋白能协助 PCBP2 进一步引起 VISA 的特异性降解。由此可知,PCBP2 通过与 FMDV VP0 蛋白相互作用,引起通路蛋白 VISA 的进一步降解,导致宿主细胞中 IFN- β 分泌减少,从而保护 FMDV 在细胞中的繁殖和生长。

参考文献 (References):

[1] ZHU Z X, WANG G Q, YANG F, et al. Foot-and-mouth disease virus viroporin 2B antagonizes RIG-I-mediated antiviral effects by inhibition of its protein expression[J]. *J Virol*, 2016, 90(24):11106-11121.

[2] MA X Q, LI P H, SUN P, et al. Construction and characterization of 3A-epitope-tagged foot-and-mouth disease virus [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 31: 17-24.

[3] NAYAK A, GOODFELLOW I G, BELSHAM G J. Factors required for the uridylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)) *in vitro* [J]. *J Virol*, 2005, 79(12):7698-7706.

[4] LI D, YANG W P, YANG F, et al. The VP3 structural protein of foot-and-mouth disease virus inhibits the IFN- β signaling pathway [J]. *FASEB J*, 2016, 30(5):1757-1766.

[5] LI X Y, WANG J C, LIU J, et al. Engagement of soluble resistance-related calcium binding protein (sorcin) with foot-and-mouth disease virus (FMDV) VP1 inhibits type I interferon response in cells [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 166(1-2):35-46.

[6] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Patho-

gen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124(4):783-801.

[7] LIAO Z W, WAN Q Y, SU H, et al. Pattern recognition receptors in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: I. Organization and expression analysis of TLRs and RLRs [J]. *Dev Comp Immunol*, 2017, 76: 93-104.

[8] BHATELIA K, SINGH K, SINGH R. TLRs: Linking inflammation and breast cancer [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(11):2350-2357.

[9] KATO H, TAKEUCHI O, SATO S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses [J]. *Nature*, 2006, 441 (7089):101-105.

[10] LI W W, ZHU Z X, CAO W J, et al. Esterase D enhances type I interferon signal transduction to suppress foot-and-mouth disease virus replication [J]. *Mol Immunol*, 2016, 75:112-121.

[11] WU Y B, WU X Q, WU L H, et al. The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy [J]. *Transl Res*, 2017, 190:51-60.

[12] LIN D D, ZHANG M, ZHANG M X, et al. Induction of USP25 by viral infection promotes innate antiviral responses by mediating the stabilization of TRAF3 and TRAF6 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(36):11324-11329.

[13] SHU H B, WANG Y Y. Adding to the STING [J]. *Immunity*, 2014, 41(6):871-873.

[14] REN C, ZHANG J, YAN W S, et al. RNA-binding protein PCBP2 regulates p73 expression and p73-dependent antioxidant defense [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(18):9629-9337.

[15] YANATORI I, RICHARDSON D R, TOYOKUNI S, et al. The iron chaperone poly(rC)-binding protein 2 forms a metabolon with the heme oxygenase 1/cytochrome P450 reductase complex for heme catabolism and iron transfer [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(32): 13205-13229.

[16] WAN C G, GONG C, ZHANG H F, et al. β 2-adrenergic receptor signaling promotes pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) progression through facilitating PCBP2-dependent c-myc expression [J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(1):67-76.

[17] BEDARD K M, DAIJOGO S, SEMLER B L. A nucleocytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation [J]. *EMBO J*, 2007,

- 26(2):459-467.
- [18] YOU F P, SUN H, ZHOU X, et al. PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(12):1300-1308.
- [19] ROBINSON L, KNIGHT-JONES T J D, CHARLESTON B, et al. Global Foot-and-Mouth disease research update and gap analysis:7 - pathogenesis and molecular biology[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(S1):63-71.
- [20] KNOWLES N J, SAMUEL A R. Molecular epidemiology of Foot-and-Mouth disease virus [J]. *Virus Res*, 2003, 91(1):65-80.
- [21] ROBINSON L, KNIGHT-JONES T J D, CHARLESTON B, et al. Global Foot-and-Mouth disease research update and gap analysis:6 - immunology[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(S1):56-62.
- [22] KATOCH A, GEORGE B, IYYAPPAN A, et al. Interplay between PTB and miR-1285 at the p53 3' UTR modulates the levels of p53 and its isoform $\Delta 40p53\alpha$ [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(17):10206-10217.
- [23] MAHONY R, BROADBENT L, MAIER-MOORE J S, et al. The RNA binding protein La/SS-B promotes RIG-I-mediated type I and type III IFN responses following Sendai viral infection [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:14537.
- [24] KIEFT J S, ZHOU K H, GRECH A, et al. Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation [J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(5):370-374.
- [25] EL-HAGE N, LUO G X. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 10):2761-2769.
- [26] CHOI K S, MIZUTANI A, LAI M M C. SYNCRIP, a member of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family, is involved in mouse hepatitis virus RNA synthesis [J]. *J Virol*, 2004, 78(23):13153-13162.
- [27] CHENG M H K, JANSEN R P. A jack of all trades: the RNA-binding protein vigilin[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017, 8(6):e1448.
- [28] JI X J, PARK J W, BAHRAMI-SAMANI E, et al. α CP binding to a cytosine-rich subset of polypyrimidine tracts drives a novel pathway of cassette exon splicing in the mammalian transcriptome[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(5):2283-2297.
- [29] TANG S L, GAO Y L, CHEN X B. MicroRNA-214 targets PCBP2 to suppress the proliferation and growth of glioma cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10):12571-12576.
- [30] GHANEM L R, KROMER A, SILVERMAN I M, et al. The Poly(C) binding protein Pcbp2 and its retrotransposed derivative Pcbp1 are independently essential to mouse development [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 36(2):304-319.
- [31] GAO Y, SUN S Q, GUO H C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements[J]. *Virology*, 2016, 13:107.
- [32] JACOBS J L, COYNE C B. Mechanisms of MAVS regulation at the mitochondrial membrane[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(24):5009-5019.

(编辑 白永平)