



口蹄疫病毒结构蛋白 VP0 抑制 I 型干扰素信号通路的激活

牟宏芳^{1,2}, 马旭升², 罗志宽², 张坚^{1*}, 郑海学^{2*}

¹兰州大学基础医学院, 甘肃省新药临床前研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

²中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃兰州 730046

摘要: 【目的】研究口蹄疫病毒(FMDV)结构蛋白 VP0 对 I 型干扰素信号通路的影响。【方法】通过反转录 PCR 构建 VP0 真核表达载体, 利用 Western blotting 验证 VP0 蛋白转染 HEK-293T 细胞后的表达情况; Real-time PCR 检测 VP0 蛋白对 FMDV 在 BHK 细胞上复制的影响, 检测 VP0 蛋白对 SeV 诱导的干扰素信号通路分子 RIG-I、IRF3、IFN- β 及下游刺激基因 ISG15、ISG20 表达的影响; 双荧光素酶报告基因检测系统检测 VP0 蛋白对 SeV 诱导的 IFN- β 和 NF- κ B 启动子激活以及对 RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptors, RLRs) 信号通路分子激活 IFN 启动子的影响; 免疫共沉淀检测 VP0 蛋白与 RLRs 信号通路中关键分子的相互作用。【结果】成功构建了 pCAGGs-VP0 真核表达载体, 可以在 HEK-293T 细胞中表达; FMDV 感染后的 4–6 h, VP0 蛋白显著促进 FMDV 在 BHK 细胞上的复制 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); VP0 蛋白明显抑制干扰素下游刺激基因的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。在双荧光素酶报告基因检测实验中, VP0 蛋白抑制 SeV 诱导 IFN- β 和 NF- κ B 的活化具有剂量依赖性 ($P < 0.01$), 并对 RIG-I、MDA5、VISA、TBK1 和 IRF3 介导的 IFN- β 产生具有抑制作用, 但是对 IRF7 没有明显的影响。免疫共沉淀显示 VP0 蛋白可与 IRF3 发生相互作用。【结论】证实 VP0 蛋白可以通过与 IRF3 相互作用来抑制 I 型干扰素信号通路的激活。

关键词: 口蹄疫病毒, VP0 蛋白, I 型干扰素, IRF3

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起偶蹄动物的一种急性、烈性、高度接触性传染病, 能造成严重的经济损失和社会影响。病毒衣壳呈正二十面体结构^[1], 该病毒已发现 7 个血清型: A 型、O 型、C 型、Asial 型、SAT1 型、SAT2

型和 SAT3 型, 各个血清型又有多个亚型, 各血清型之间无交叉保护现象。口蹄疫病毒的 RNA 由 8500 个核苷酸组成, 编码一个大的多聚蛋白复合体, 该复合体由自身编码的蛋白酶(L、3C)及少数宿主因子裂解后形成多个前体蛋白, 并最终裂解为成熟的 8 个非结构蛋白(L、2A、2B、2C、3A、

基金项目: 国家自然科学基金(31602037); 农业部 948 (2015-Z6)

*通信作者。张坚, Tel: +86-931-8623573, E-mail: zhangjian@lzu.edu.cn; 郑海学, Tel: +86-931-8342086, E-mail: haixuezheng@163.com

收稿日期: 2016-09-20; 修回日期: 2016-12-06; 网络出版日期: 2016-12-27

3B、3C、3D)和 3 个结构蛋白 VP0、VP1 和 VP3^[2]。VP0 蛋白作为 FMDV 衣壳蛋白被蛋白酶 3C 进一步裂解为 VP4 蛋白和 VP2 蛋白。

FMDV 属于小 RNA 病毒科,在感染宿主细胞的过程中,能够诱导天然免疫应答的产生。干扰素(interferons, IFNs)和干扰素诱导的细胞抗病毒反应是机体对抗病毒感染的初级防御体系。病毒在感染和复制的过程中产生一些病毒特有的保守结构,称为病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), PAMPs 能够被模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别,激活干扰素的产生^[3]。视黄酸诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)和黑色素瘤分化基因 5 (melanoma differentiation-associated gene-5, MDA5)可识别细胞内不同的病毒 RNA,是抗病毒天然免疫信号通路中重要的模式识别受体^[4],在感染病毒后被刺激活化的受体招募下游接头蛋白 VISA 和 MITA,去激活下游的 I κ B 激酶使干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor-3, IRF3)和 NF- κ B 活化,磷酸化的 IRF3 和 NF- κ B 进入细胞核中,直接诱导干扰素基因表达^[5]。

FMDV 在感染初期能逃避宿主免疫,从而高效迅速地复制。FMDV 可通过破坏天然免疫中关键蛋白分子的转录和表达进而促进病毒蛋白的合成^[6-7]。文献报道, FMDV L^{pro}可裂解宿主细胞中 eIF4G 分子以阻断宿主蛋白的合成,来抑制干扰素的产生^[8]。FMDV 3C 蛋白可通过切割 NEMO 从而影响干扰素等抗病毒分子的产生^[9]。FMDV VP1 蛋白通过与 sorcin 蛋白相互作用抑制干扰素的产生^[10]。VP0 蛋白是 FMDV 的主要结构蛋白,在 3C 蛋白酶的作用下裂解成 VP2 蛋白和 VP4 蛋白。VP2 蛋白上存在细胞表位,有一定的免疫活性。VP4 蛋白位于衣壳的内表面并且与病毒的 RNA 结合,

是决定病毒抗原性的主要成分,发挥着重要的免疫原性作用^[11]。同时,VP4 蛋白也是宿主识别病毒的主要位点,在病毒的黏附和入侵方面具有重要的作用。但 VP0 蛋白在细胞中的作用机理仍不清楚,我们将通过试验探索 VP0 蛋白对干扰素信号通路的影响机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒: HEK-293T 细胞购自中国科学院上海细胞库,毒株 FMDV/O/Mya98/2010、仙台病毒(Sendai virus, SeV)和仓鼠肾细胞系(BHK)由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: Trizol 试剂、反转录酶 M-MLV、RNA 酶抑制剂(RRI)、Oligo (dT)引物、随机引物、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、LA Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Bgl* II、T4 DNA 连接酶、大肠杆菌 Trans5 α 感受态、SYBR Premix Ex Taq II 和蛋白预染 Marker 均购于宝生物工程大连有限公司;质粒 DNA 提取试剂盒与胶回收纯化盒子购于 OMEGA 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于 Promega 公司;鼠抗 HA 单抗、鼠抗 Flag 单抗、鼠抗 β -actin 单抗、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗购于 Santa Cruz 公司;LipofectamineTM 3000 转染试剂购于 Invitrogen 公司;Opti-MEM、0.25% EDTA 胰酶、新生牛血清(FBS)和 DMEM HIGH GLUCOSE 细胞培养液购于 Gibco BRL 公司;Tween 20、甲醛溶液、蛋白酶抑制剂、30%聚丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、 β -巯基乙醇和琼脂粉购于罗氏公司。

1.2 真核重组质粒的构建

参照 NCBI 上 FMDV/O/Mya98/2010 序列(登

录号: JN998085.1)用软件 Primer Premier5 设计扩增引物, 分别引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Bgl* II。上游引物: 5'-ATGGGAGCGAATTCATGATCGCG-3'; 下游引物: 5'-GGAAGATCTTCACTTGTCATCATCG-3'。

FMDV 感染 BHK 细胞后, 用 Trizol 法提取病毒液总 RNA, 反转录得到 cDNA, 以此为模板 PCR 扩增目的片段, 将扩增产物克隆于 pCAGGs 载体上, 双酶切鉴定, 送测序获得阳性重组质粒 pCAGGs-VP0。

1.3 Western blotting 检测

将 HEK-293T 细胞铺于细胞皿中, 待细胞至 70%–90% 时, 按照 Lipofectamine™ 3000 说明书进行转染。实验分为两组, 空载体组(pCAGGs)和重组质粒组(pCAGGs-VP0), 转染 48 h 后收样, 处理样品, 加入 1×SDS 蛋白上样缓冲液进行 SDS-PAGE, 转移至 NC 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 以抗 Flag 标签的鼠抗(1 : 1000) 4 °C 孵育过夜, 用山羊抗鼠 HRP-IgG (1 : 5000) 的二抗, 室温孵育 2 h, 用 ECL 化学发光液显色曝光。

1.4 总 RNA 的提取及荧光定量 PCR 检测

将 HEK-293T 细胞铺于 60 mm 细胞皿中, 设空载体组、空载体 SeV 刺激组、pCAGGs-VP0 重组质粒组、pCAGGs-VP0 重组质粒 SeV 刺激组, 用 Lipofectamine™ 3000 转染 24 h 后, 用 SeV 刺激 8 h, 收获细胞后, 按照 Trizol 法提取 RNA, 反转录为 cDNA, 按照以下体系: 10 μL SYBR Premix Ex *Taq* II, 0.4 μL 上游引物, 0.4 μL 下游引物, 8.2 μL DEPC 水和 1 μL cDNA, 进行荧光定量 PCR, 分别检测干扰素信号通路分子 RIG-I、IRF3、IFN-β 以及下游刺激基因 ISG15、ISG20 的 mRNA 表达变化(检测引物如表 1)。反应程序如下: 95 °C 变性 3 min, 95 °C 10 s, 60 °C 34 s, 40 个循环; 溶解曲线分析。

将 BHK 细胞铺于细胞皿中, 分别转染空载体和 pCAGGs-VP0 对照组以及空载体和 pCAGGs-VP0 接毒组, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 收样品。Trizol 法提取 RNA 后, 反转录获得 cDNA, 反应体系和程序同上, 荧光定量 PCR 检测 FMDV 的复制情况(检测引物如表 1)。

1.5 双荧光素酶报告基因检测

将 HEK-293T 细胞铺至 24 孔板, 待细胞长至 60%–80% 后, 按照 Lipofectamine™ 3000 操作说明书进行转染, 分别设置空载体组、pCAGGs-VP0 重组质粒剂量依赖(50、100 和 200 ng)对照组以及 SeV 刺激组, 转染 24 h 后, 用 SeV 刺激 12 h 后, 按照双荧光素酶报告系统试剂盒说明书进行检测。

VP0 蛋白分别与 RIG-I、MDA5、VISA、TBK1、IRF3 和 IRF7 等 RLRs 信号通路分子共转染作为试验组; 空载体分别与信号通路分子共转染作为对照组。26 h 后收样检测, 转染和检测方法同上。

表 1. 荧光定量 PCR 用引物

Table 1. Primers for real-time PCR

Primers	Sequence of primer (5'→3')
IFN-β-forward	TTGTTGAGAACCTCCTGGCT
IFN-β-reverse	TGACTATGGTCCAGGCACAG
RIG-I-forward	CACCTCAGTTGCTGATGAAGGC
RIG-I-reverse	GTCAGAAGGAAGCACTTGCTACC
ISG20-forward	CCGTGGCCAGGCTAGAGAT
ISG20-reverse	CCGCTCATGTCTCTTTTCAGT
IRF3-forward	TCTGCCCTCAACCGCAAAGAAG
IRF3-reverse	TACTGCCTCCACCATTTGGTGTC
Human-GAPDH-forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
Human-GAPDH-reverse	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
FMDV-forward	ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA
FMDV-reverse	GCGAGTCCTGCCACGGA
Mouse-GAPDH-forward	CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAA CCA
Mouse-GAPDH-reverse	GCCAGTAGAGGCAGGGATGATG TTC

1.6 免疫共沉淀

将 HEK-293T 铺于 60 mm 细胞皿, 待细胞至 80%–90% 时, 按照 Lipofectamine™ 3000 说明书进行转染。实验分为实验组和对照组, 转染 36 h 后收样裂解, 裂解产物分为两部分: 一部分作为总蛋白样品 input; 另一部分加入抗 Flag 标签的一抗或非特异性 IgG, 分别和蛋白 A/G 琼脂糖珠 4 °C 过夜, 用裂解液将过夜后的免疫共沉淀复合物洗 3 次后, 加入 1×SDS 蛋白上样缓冲液煮沸样品, 然后进行 Western blotting 分析。

1.7 数据分析

用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量分析方法计算基因的相对表达量, 所有数据用 SPSS Statistics 18.0 进行统计分析。采用单因素方差分析法, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果和分析

2.1 pCAGGs-VP0 重组表达载体的酶切鉴定

将重组表达质粒 pCAGGs-VP0 用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切后, 可见 900 bp 左右的 VP0 条带和 5000 bp 左右的载体条带(图 1)。经测序后进一步证明重组表达质粒构建成功。

2.2 VP0 蛋白在 HEK-293T 细胞中的表达

将重组质粒 pCAGGs-VP0 转染 HEK-293T 细胞, 48 h 后收样处理进行 Western blotting 检测, 结果如图 2, VP0 蛋白在 34.4 kDa 处有特异性条带, 而空载体对照组未见相应的条带, 证明 VP0 可以在细胞中正常表达。

2.3 VP0 蛋白对 FMDV 复制的影响

为了确定 VP0 蛋白是否对 FMDV 复制有影响, pCAGGs-VP0 质粒转染 BHK 细胞后, FMDV

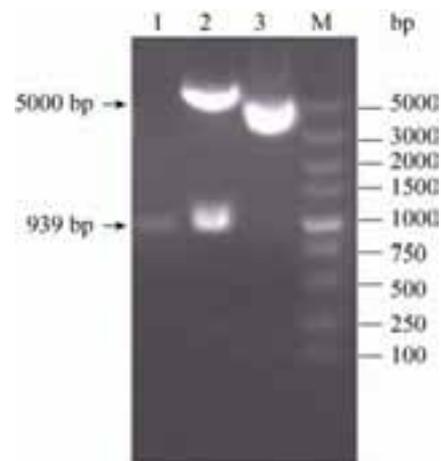


图 1. pCAGGs-VP0 重组质粒的酶切鉴定

Figure 1. Identification of the recombinant plasmid by *EcoR* I and *Bgl* II. M: DL5000 DNA marker; lane 1: PCR product of VP0 gene; lane 2: products from recombinant plasmid pCAGGs-VP0 digested with *EcoR* I and *Bgl* II; lane 3: the expression vector of pCAGGs.



图 2. Western blotting 分析 VP0 蛋白在 HEK-293T 细胞中的表达

Figure 2. Confirmatory expression of pCAGGs-VP0 by Western blotting. Mock: the expression vector of pCAGGs; VP0: the expression of pCAGGs-VP0 in the HEK-293T; β -actin: the reference control.

感染细胞, 不同时间点收集感染后的细胞并提取总 RNA, Real time RT-PCR 方法检测 FMDV 在 BHK 细胞中的复制情况。结果如图 3, 第 0–2 小时试验组与对照组 FMDV 复制差异不显著($P > 0.05$), 4–6 h 试验组中 FMDV 复制水平显著高于对照组($P < 0.05$), 6 h 后试验组 FMDV 复制水平较对照组差异极显著($P < 0.01$)。

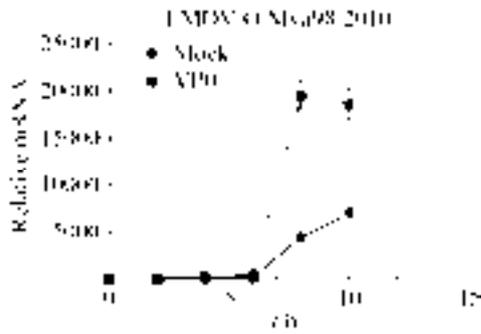


图 3. VP0 蛋白促进 FMDV 在 BHK 细胞中的复制
Figure 3. Promotion of FMDV replication by VP0 protein in BHK cells. $P < 0.01$.

2.4 VP0 蛋白抑制 I 型干扰素信号通路的活化

干扰素能够抑制病毒的复制, 为了确定 VP0 蛋白是否可以通过抑制干扰素的产生进而促进病毒复制, 通过双荧光素酶报告基因系统检测 VP0 蛋白在不同剂量条件下对 SeV 诱导的 IFN- β 和 NF- κ B 启动子的影响。结果如图 4 所示, 分别转染 pCAGGs 和 pCAGGs-VP0 50、100 和 200 ng 后, 随着 VP0 剂量的增加, VP0 蛋白可显著抑制 SeV 诱导的 IFN- β 的产生和 NF- κ B 的活性且具有剂量依赖性($P < 0.01$)。

图 4 表明, VP0 蛋白能够抑制 I-IFN 的产生。为了确定 VP0 蛋白在 I-IFN 产生通路中的作用节点, 将 VP0 分别与 RLRs 信号通路分子共转后,

使用双荧光素酶报告基因检测系统检测。结果如图 5, VP0 蛋白分别抑制 RIG-I、MDA5、VISA、TBK1 和 IRF3 等信号通路分子诱导的 IFN- β 的产生($P < 0.05$), 对 IRF7 诱导的 IFN- β 的产生没有显著影响。

2.5 VP0 蛋白抑制 I-IFN 通路基因及其下游刺激基因(IFN-stimulated genes, ISGs)的转录

Real-time RT-PCR 检测 VP0 蛋白对 SeV 诱导的 I-IFN 及其下游 ISGs 的影响, 结果如图 6 所示。VP0 转染组经 SeV 诱导后, 干扰素通路基因 RIG-I、IRF3、IFN- β 以及干扰素刺激基因 ISG15、ISG20 的相对表达量显著低于空载体的 SeV 处理组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。说明 FMDV VP0 蛋白可明显抑制 I 型干扰素效应分子的转录。

2.6 VP0 蛋白结合 RLRs 通路中的 IRF3 蛋白

双荧光素酶报告基因检测以及实时定量检测同时表明, VP0 蛋白抑制 I-IFN 的产生, 为了阐明 VP0 抑制 IFN 产生的分子机制, 使用免疫共沉淀检测 VP0 与 RLRs 信号通路分子的相互作用情况。结果如图 7, 将带有 Flag 标签的 VP0 分别与带有 HA 标签的 RIG-I、MDA5、VISA、TBK1、MITA

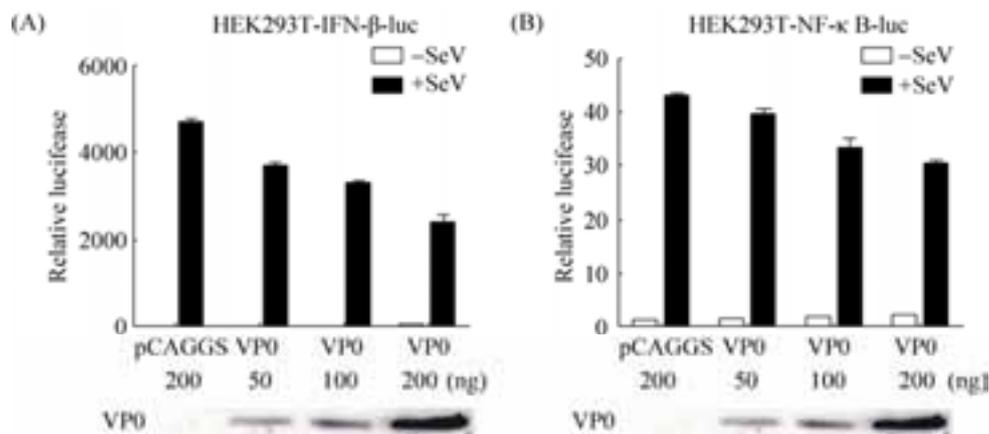


图 4. VP0 蛋白抑制 SeV 诱导的 IFN- β 的产生(A)和影响 NF- κ B 的活性(B)

Figure 4. VP0 protein inhibits SeV-induced activation of the IFN- β promoter (A) and interferes activation of the NF- κ B induced by SeV (B). $P < 0.01$.

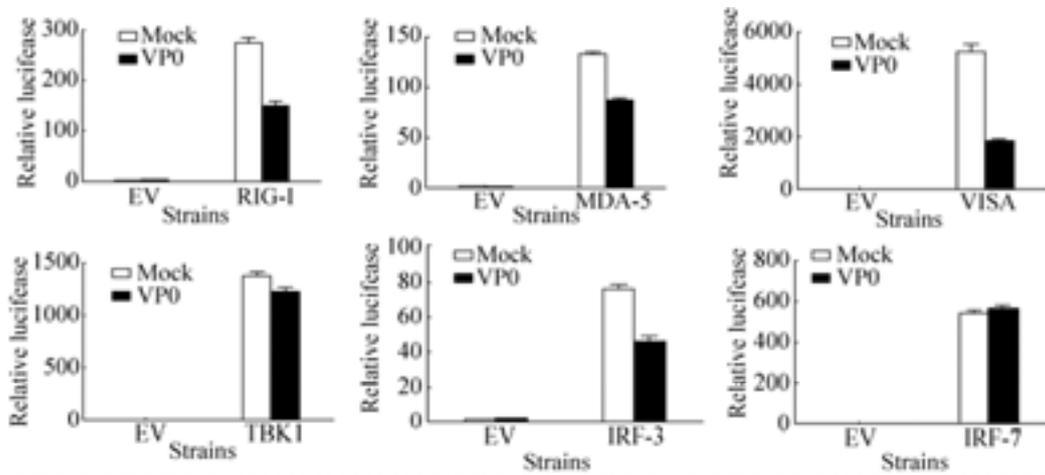


图 5. VP0 蛋白通过 IRF3 抑制 IFN 的产生

Figure 5. VP0 protein disrupts the IRF3-mediated IFN signaling pathway. The interferon regulatory factor 3 (IRF3)-activated IFN- β promoter and its upstream components, RIG-I, MDA5, VISA and TBK1 were also down-regulated in the presence of VP0 protein, but IRF7 was not observed. $P < 0.05$.

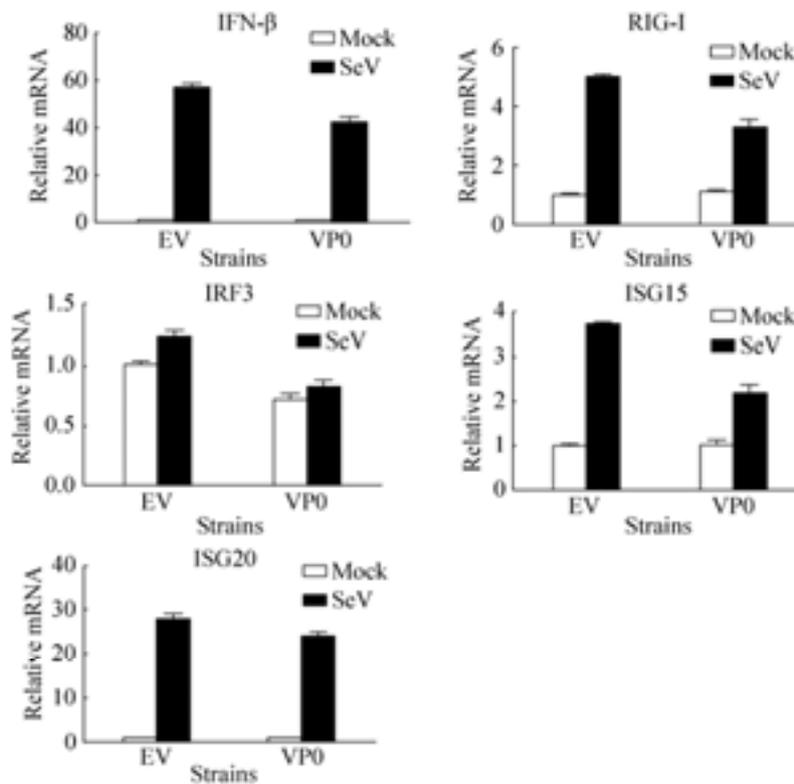


图 6. VP0 蛋白显著抑制干扰素刺激基因的表达

Figure 6. VP0 inhibits the transcription of various ISGs. VP0 protein clearly inhibited the gene expression level of IFN- β , RIG-I, ISG15, ISG20 and IRF3 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), respectively.

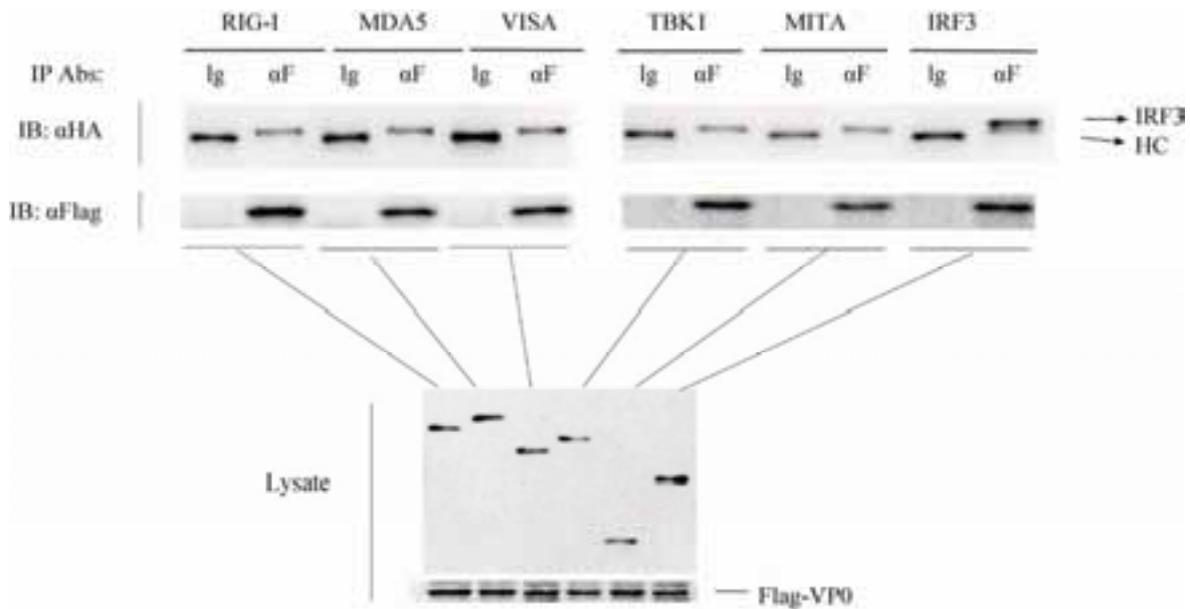


图 7. VP0 蛋白与 IRF3 蛋白相互作用

Figure 7. FMDV VP0 protein interacts with IRF3 protein.

和 IRF3 共同转染后, 在 IRF3 的 59 Da 处出现一条明显条带, 证明 IRF3 和 VP0 发生相互作用。在蛋白水平上, 进一步证明 VP0 可能通过与 IRF3 相互作用从而影响干扰素信号通路。

3 讨论

宿主细胞通过模式识别受体识别外来病原分子模式, 进而激活天然免疫应答, 产生大量抗病毒因子如抗病毒天然免疫的关键组成部分 IFNs、pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 等, 最终清除病原。

宿主细胞模式识别受体包括 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)、RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptors, RLRs) 和 NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLRs)。TLRs 和 RLRs 主要识别 RNA 病毒核酸, 通过信号级联放大, 最终产生 I-IFN。FMDV 能够诱导 RLRs 介导的天然免疫应答, 同时, 病毒在进化过程中, 形成了一系列的策略抑制天然免疫系统应答, 如病毒通过不同蛋白分子结合 IFN 产生信号通路中的关键分子,

导致信号传导的终止; 或者, 病毒通过不同病毒蛋白降解信号通路中的节点分子, 导致信号传导的失活。本实验室已发现 FMDV 3A 蛋白通过结合 RLRs 信号通路中的 3 种关键分子 RIG-I、MDA5 和 VISA, 最终抑制 IFNs 的产生, 为 FMDV 的复制增殖提供合适的内部环境^[12]。FMDV VP3 蛋白通过与 VISA 相互作用, 并降解 VISA, 最终抑制干扰素信号的激活^[13]。FMDV VP3 蛋白也可以通过结合降解 JAK1 (Janus kinase 1) 进而抑制 IFN 介导的信号转导^[14]。如图 8 所示, 本文通过筛选发现 FMDV VP0 蛋白能够抑制 IFN 的产生, VP0 蛋白可以明显提高 FMDV 在 BHK 细胞上的增殖能力, 说明 VP0 蛋白可能通过影响干扰素以及抗病毒因子的产生促进病毒的复制。通过剂量依赖实验证实 VP0 蛋白对 RLRs 介导的 IFNs 产生的抑制作用。实时荧光定量和双荧光素酶检测系统的结果显示 VP0 蛋白能够抑制 RIG-I、MDA5、VISA、TBK1 和 IRF3 介导的 IFN 活化作用, 然而对于 IRF7 诱导的 IFNs 的产生没有抑制

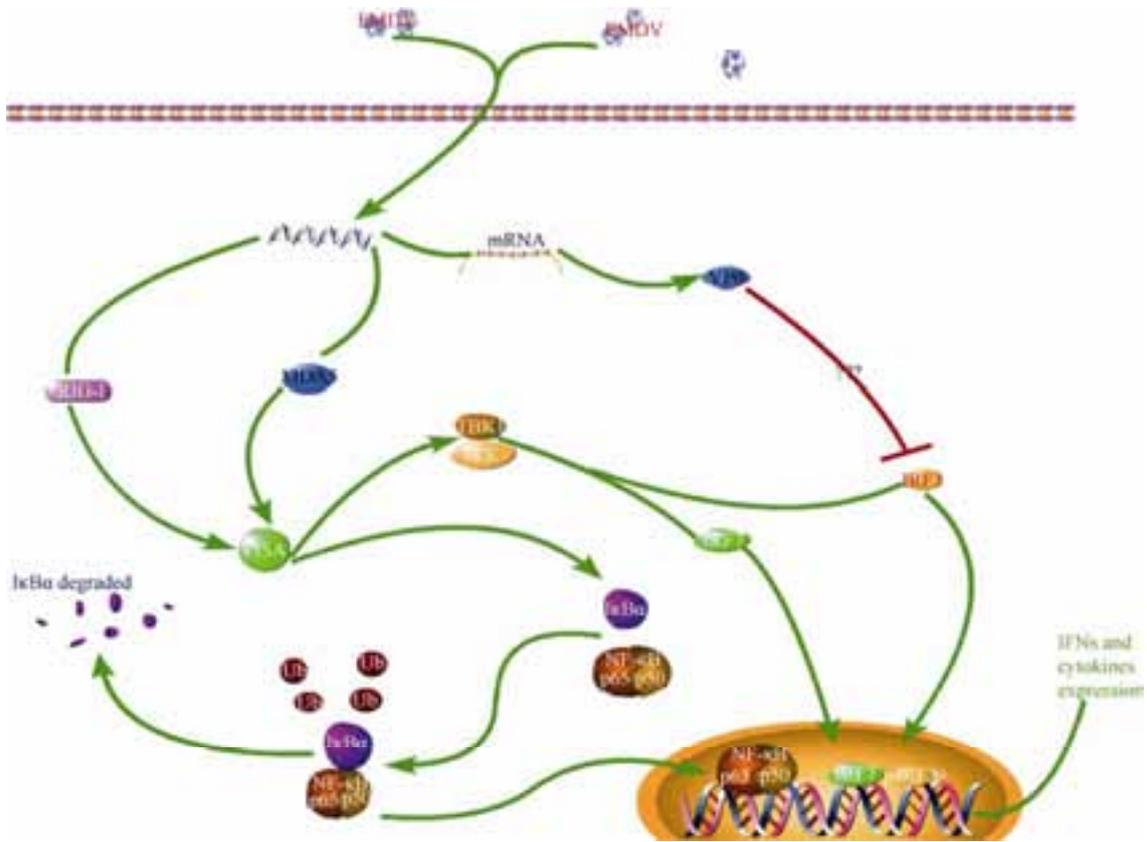


图 8. VP0 抑制 RLRs 介导的抗病毒天然免疫信号通路

Figure 8. VP0 impedes RLRs mediated antiviral natural immune signaling pathways.

效果,这说明 VP0 蛋白抑制 RLRs 介导的 IFNs 产生的水平在 IRF3 节点或者 IRF3 的下游节点。使用免疫共沉淀发现 VP0 蛋白能够结合 IRF3 蛋白,这说明 VP0 蛋白可能通过结合 IRF3 蛋白进而抑制 IFNs 的产生。本文首次探讨了 FMDV VP0 蛋白对于 RLRs 介导的 IFNs 产生的影响,同时发现 VP0 蛋白能够通过结合 IRF3 节点蛋白,进而抑制 IFNs 的产生,是对 FMDV 抑制天然免疫分子机制的补充。IRF3 属于 IRF 家族成员,是干扰素信号通路的关键转录因子,在病毒感染早期 I-IFN 的激活过程中起着重要的作用,因此很多病毒都通过影响 IRF3 来抑制干扰素的产生。典型猪热病病毒

(classical swine fever virus, CSFV)的 N^{pro} 通过与 IRF3 蛋白的单体和二聚体相互作用,诱导 IRF3 的泛素化降解^[15];高致病性 PRRSV 可以影响细胞质内 IRF3 磷酸化的水平进而抑制干扰素的产生^[16]。病毒分子抑制天然免疫的机制非常复杂,对于 VP0 通过何种途径结合 IRF3,进而抑制 IFNs 的产生;VP0 结合 IRF3 的关键位点;是否影响 IRF3 的磷酸化水平;对 IRF3 磷酸化酶是否具有抑制作用,后期我们将继续进行研究。同时对于 FMDV VP0 是否通过 TLR 受体抑制 IFNs 的产生,通过何种分子机制产生影响,也有待于进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(2): 465–493.
- [2] Belsham GJ. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1993, 60(3): 241–260.
- [3] Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(1): 36–49.
- [4] Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews*, 2009, 227(1): 54–65.
- [5] Ramos HJ, Gale Jr M. RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Current Opinion in Virology*, 2011, 1(3): 167–176.
- [6] Guzylack-Piriou L, Bergamin F, Gerber M, McCullough KC, Summerfield A. Plasmacytoid dendritic cell activation by foot-and-mouth disease virus requires immune complexes. *European Journal of Immunology*, 2006, 36(7): 1674–1683.
- [7] de los Santos T, Segundo FDS, Grubman MJ. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *Journal of Virology*, 2007, 81(23): 12803–12815.
- [8] Liu YQ, Zhu ZX, Zhang MT, Zheng HX. Multifunctional roles of leader protein of foot-and-mouth disease viruses in suppressing host antiviral responses. *Veterinary Research*, 2015, 46: 127.
- [9] Wang D, Fang LR, Li K, Zhong HJ, Fan JX, Ouyang C, Zhang H, Duan EZ, Luo R, Zhong ZM, Liu XT, Chen HN, Xiao SB. Foot-and-mouth disease virus 3C protease cleaves NEMO to impair innate immune signaling. *Journal of Virology*, 2012, 86(17): 9311–9322.
- [10] Li XY, Wang JC, Liu J, Li ZH, Wang YQ, Xue YF, Li XQ, Cao H, Zheng SJ. Engagement of soluble resistance-related calcium binding protein (sorcin) with foot-and-mouth disease virus (FMDV) VP1 inhibits type I interferon response in cells. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(1/2): 35–46.
- [11] Fry EE, Lea SM, Jackson T, Newman JW, Ellard FM, Blakemore WE, Abu-Ghazaleh R, Samuel A, King AMQ, Stuart DI. The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *The EMBO Journal*, 1999, 18(3): 543–554.
- [12] Li D, Lei CQ, Xu ZS, Yang F, Liu HN, Zhu ZX, Li S, Liu XT, Shu HB, Zheng HX. Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3A inhibits the interferon- β signaling pathway. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21888.
- [13] Li D, Yang WP, Yang F, Liu HN, Zhu ZX, Lian KQ, Lei CQ, Liu XT, Zheng HX, Shu HB. The VP3 structural protein of foot-and-mouth disease virus inhibits the IFN- β signaling pathway. *Faseb Journal*, 2016, 30(5): 1757–1766.
- [14] Li D, Wei J, Yang F, Liu HN, Zhu ZX, Cao WJ, Li Shu, Liu XT, Zheng HX, Shu HB. Foot-and-mouth disease virus structural protein VP3 degrades Janus kinase 1 to inhibit IFN- γ signal transduction pathways. *Cell Cycle*, 2016, 15(6): 850–860.
- [15] Gottipati K, Holthausen L M F, Ruggli N, Choi KH. Pestivirus N^{pro} directly interacts with interferon regulatory factor 3 monomer and dimer. *Journal of Virology*, 2016, 90(17): 7740–7747.
- [16] Ren YW, Khan FA, Pandupuspitasari NS, Li SF, Hao XJ, Chen X, Xiong JJ, Yang LG, Fan MX, Zhang SJ. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates interferon- β expression mainly through attenuating interferon-regulatory factor 3 phosphorylation. *DNA and Cell Biology*, 2016, 35(9): 489–497.

Structural protein VP0 of foot-and-mouth disease virus inhibits type I interferon signaling pathway

Hongfang Mou^{1,2}, Xusheng Ma², Zhikuan Luo², Jian Zhang^{1*}, Haixue Zheng^{2*}

¹Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

²State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To explore the effects of foot-and-mouth disease virus (FMDV) structural protein VP0 in type I IFN signaling. [Methods] A recombinant VP0 protein was constructed and expressed in eukaryotic cells followed by FMDV infection. The influence of VP0 protein during FMDV replication in BHK cells was determined by RT-PCR and the mRNA levels of IFN- β , RIG-I, ISG15, ISG20 and IRF3 was assessed. The dose-dependent effects of VP0 protein on Sendai virus (SeV)-triggered activation of IFN- β and NF- κ B promoter as well as on RLRs-mediated activation of IFN- β promoter were examined by luciferase assay. Co-immunoprecipitation was done to detect the interaction of VP0 protein and the components of the RLRs signaling pathway. [Results] The recombinant VP0 protein was successfully expressed in HEK-293T cells and confirmed by Western blotting. At 4-6 h post-infection, VP0 protein significantly promoted the replication of FMDV in BHK cells ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). VP0 protein clearly inhibited the gene expression level of IFN- β , RIG-I, ISG15, ISG20 and IRF3 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), respectively. In luciferase assays, FMDV VP0 protein distinctly inhibited SeV-triggered activation of the IFN- β and NF- κ B promoters in a dose-dependent manner. The interferon regulatory factor 3 (IRF3)-activated IFN- β promoter and its upstream components, RIG-I, MDA5, VISA and TBK1 were also down-regulated in the presence of VP0 protein. The inhibition of IFN- β promoter induced by IRF7 was not observed. Furthermore, Co-immunoprecipitation showed that VP0 interacted with IRF3 protein in HEK-293T cells. [Conclusion] Our results indicated that VP0 may inhibit the activation of type I IFN signaling pathway *via* interaction with IRF3.

Keywords: foot-and-mouth disease virus, VP0 protein, IFN- β , IRF3

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Chinese National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (31602037) and by the Chinese Agriculture Ministry 948 (2015-Z6)

*Corresponding author. Jian Zhang, Tel: +86-931-8623573, E-mail: zhangjian@lzu.edu.cn; Haixue Zheng, Tel: +86-931-8342086, E-mail: haixuezheng@163.com

Received: 20 September 2016; Revised: 6 December 2016; Published online: 27 December 2016