



## ANXA1 促进 I 型干扰素表达抑制口蹄疫病毒的复制

罗志宽<sup>1,2</sup>, 马旭升<sup>2</sup>, 杨孝朴<sup>1\*</sup>, 郑海学<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

<sup>2</sup> 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

**摘要:** 【目的】研究膜联蛋白 A1(Annexin A1, ANXA1)对 I 型干扰素(I-IFN)表达及口蹄疫病毒(FMDV)复制的影响。【方法】开展过表达及 Knockdown 实验, 检测 ANXA1 对 FMDV 复制的影响。利用双荧光素酶报告系统检测 ANXA1 对 ISRE 和 IFN- $\beta$  启动子元件活化的影响。双荧光素酶报告系统鉴定 ANXA1 调控 I-IFN 通路活化靶分子。Western blotting 检测 ANXA1 对干扰素调解因子 3(IRF3)磷酸化的影响。Real-time PCR 检测 ANXA1 对干扰素刺激基因(ISGs)的影响。【结果】过表达 ANXA1 显著抑制 FMDV 的复制; 下调 ANXA1 表达促进 FMDV 复制( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); ANXA1 促 I 型干扰素通路活化, 呈现剂量依赖性( $P < 0.01$ )。ANXA1 显著增强 IRF3 的磷酸化, 促进 ISGs 的表达( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。【结论】ANXA1 促进 I-IFN 表达, 抑制 FMDV 的复制。

**关键词:** 膜联蛋白 A1, 口蹄疫病毒, I 型干扰素, IRF3 磷酸化

口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)属于微 RNA 病毒科中的口蹄疫病毒属, 其中心为一条单股正链 RNA, 基因组由 5'非编码区、1 个完整的开放阅读框(ORF)、3'非编码区和 1 个 poly(A)尾巴组成, 全长 8500 个核苷酸, 共编码 4 个结构蛋白和 9 个非结构蛋白<sup>[1]</sup>。动物感染 FMDV 后, 引起免疫抑制, 导致免疫能力下降, 给畜牧业带来危害<sup>[2]</sup>。

天然免疫是防御病毒入侵的第一道防线。在

抗 RNA 病毒天然免疫中, RIG-I 样模式识别受体(RIG-I-like receptors, RLRs)发挥着重要作用, 包括视黄酸诱导基因 I(retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)和黑色素瘤分化基因 5(melanoma differentiation-associated gene-5, MDA5), 识别进入细胞质的多种病毒 RNA<sup>[3-4]</sup>。首先, MDA5 通过识别 FMDV 的 RNA, 招募病毒诱导信号转导蛋白(virus-induced signaling adaptor, VISA)激活信号通路, 通过信号级联反应产生 I 型干扰素(type I

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

\*通信作者。杨孝朴, Tel: +86-931-8342086, E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn; 郑海学, Tel: +86-931-8342086, E-mail: haixuezheng@163.com

收稿日期: 2017-12-28; 修回日期: 2018-03-26; 网络出版日期: 2018-04-04

interferons, I-IFN)、趋化因子(chemokine)和炎症因子(inflammatory cytokines)等<sup>[5-6]</sup>。I-IFN 通过自分泌或者旁分泌结合相应的干扰素受体(IFN receptor, IFNR),通过酪氨酸激酶 JAK(Janus kinase)家族成员激活信号传导与转录激活子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)和 STAT2,活化后的 STAT1 和 STAT2 在细胞核内与干扰素调节因子 9(interferon-regulated factor 9, IRF9)形成聚合体复合物,结合到干扰素刺激反应原件(interferon-stimulated response element, ISRE)激活大量干扰素刺激基因(IFN-stimulated genes, ISGs)的表达,比如依赖双链 RNA 的蛋白激酶(double-stranded RNA activated protein kinase, PKR)、ISG56 和 ISG54,最终发挥抑制病毒增殖的作用,并诱导感染细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。

ANXA1 是一种钙依赖的磷脂结合脂蛋白,属于膜联蛋白超家族。之前的研究表明,ANXA1 增强糖皮质激素的激活;通过抑制磷脂酶 A2 和阻止白三烯等炎症介质,激活部分抗炎反应<sup>[9-10]</sup>。近期研究表明,ANXA1 与 TANK 整合激酶 1(TANK-binding kinase 1, TBK1)相互作用促进 TLRs 介导的 IFN- $\beta$  的产生<sup>[11]</sup>,参与细菌诱导的天然免疫应答,但 ANXA1 如何参与 RIG-I 通路的抗病毒天然免疫,目前还不清楚。本文通过研究发现 ANXA1 促进 RLRs 介导的 IFNs 的产生,抑制 FMDV 的复制,为探究 ANXA1 参与抗病毒天然免疫提供了新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系、细胞培养:** HEK-293T 细胞(ATCC 库), BHK21 细胞和 PK15 细胞(本实验室保存)。

DMEM 高糖培养基, MEM 培养基, 1%青霉素和链霉素溶液, 0.25%胰酶溶液(GIBCO); 胎牛血清(Biological Industries)。

**1.1.2 病毒:** 毒株 FMDV/O/Mya98/2010、仙台病毒(Sendai Virus, SeV)(本实验室保存)。

**1.1.3 抗体:** 抗 Myc 和抗  $\beta$ -Actin 小鼠单克隆抗体(Sigma), 抗 FMDV 多克隆抗体(本实验制备), 兔抗人源磷酸化 IRF3(Cell Signaling Technology), 二抗 HRP-IgG 辣根过氧化物酶(中杉金桥公司)。

**1.1.4 主要试剂与设备:** 质粒和 RNA 提取试剂盒(OMEGA); DNA 限制性内切酶和 DNA T4 连接酶(NEB); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、荧光素酶底物发光检测仪、反转录酶 M-MLV 和 RNA 酶抑制剂(PROMEGA); Oligo(dT)18 引物、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、DNA 聚合酶、SYBR Permixon Ex Taq、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态和蛋白 Marker (TaKaRa); 脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen); 蛋白酶抑制剂和琼脂粉(Roche); ECL 底物发光试剂盒(Pierce); PVDF 膜(Millipore)。实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

### 1.2 真核重组质粒的构建

猪源 ANXA1 基因序列,参考 NCBI 登录号(NM\_001163998.1),设计上下游引物,分别加入酶切位点 *Cla*I 和 *Xho*I,同时加入 Myc 标签。上游引物: 5'-ATGGCAATGGTATCTGAATTCCT-3'; 下游引物: 5'-TTAGTCTCCTCCACATAGAGCA-3'。FMDV 感染 PK15 细胞后,用 RNA 试剂盒提取细胞的 RNA,用反转录酶转化为 cDNA,以 cDNA 为模板,扩增 ANXA1 片段,将扩增产物连接于 pCAGGs 载体上,通过测序正确。

### 1.3 Western blotting 检测

HEK-293T 细胞接种至细胞培养板,细胞密度

达到 75%–90% 时, 分别用脂质体转染相应的质粒, 24 h 后收取并处理细胞样品, 加入蛋白上样缓冲液, 95 °C 煮 10 min, 进行 SDS-PAGE, 随后转印至 PVDF 膜, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 90 min, 用 TBST 洗过后孵育一抗 4 °C 过夜, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 90 min, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 化学发光液, 用蛋白发光印记仪器曝光。

#### 1.4 荧光素酶报告基因

将 HEK-293T 细胞接种至 24 孔板中, 细胞生长密度至 75%–90% 后, 每组样品设立 3 个平行孔, 每孔中分别转染萤火虫荧光素酶报告基因质粒 100 ng、海肾荧光素酶报告基因质粒 10 ng 和相应的空载体和 ANXA1 不同剂量质粒 (50、100、200 ng), 保证每孔样品转染的 DNA 总量一样 (不够的用空载体补齐), 24 h 后, SeV 感染细胞 12 h 后用双荧光素酶报告基因试剂盒检测, 所有结果至少重复 3 次。P < 0.05 差异有统计学意义。

#### 1.5 RT-PCR

将 HEK-293T 或 PK15 细胞接种至 60 mm 细胞培养皿中, 转染相应的质粒, 根据不同的实验需要, 感染 SeV 或 FMDV, 并收取不同时间点的细胞样品, 提取细胞的总 RNA, 按照反转录酶的体系把 RNA 反转录成 cDNA, 用对应的定量引物 (表 1) 进行 PCR 检测。RT-PCR 体系为: 10  $\mu$ L SYBR Green, 0.6  $\mu$ L 上游引物, 0.6  $\mu$ L 下游引物, 0.3  $\mu$ L ROXII, 7.5  $\mu$ L DEPC 水, 1.0  $\mu$ L cDNA; 反应设定程序如下: 95 °C 20 s; 95 °C 5 s、60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。

#### 1.6 数据分析

用  $2^{-\Delta\Delta C}$  分析方法计算不同试验的数值, 计算后的数据用 GraphPad Prism 5 进行分析。运用单因素方差分析法, P < 0.05 差异有统计学意义。

表 1. 荧光定量 PCR 用引物

Table 1. Primers for real-time PCR

Primers	Sequence of primer (5'→3')
IFN- $\beta$ -forward	TTGTTGAGAACCTCCTGGCT
IFN- $\beta$ -reverse	TGACTATGGTCCAGGCACAG
CXCL10-forward	GGTGAGAAGAGATGCTGAATCC
CXCL10-reverse	GTCCATCCTTGAAGCACTGCA
ISG20-forward	CCGTGGCCAGGCTAGAGAT
ISG20-reverse	CCGCTCATGTCCTCTTTCAGT
RNATES-forward	GGCAGCCCTCGCTGTCATCC
RNATES-reverse	GCAGCAGGGTGTGGTGTCCG
FMDV-forward	ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA
FMDV-reverse	GCGAGTCCTGCCACGGA
ISG54-forward	CACCTCTGGACTGGCAATAGC
ISG54-reverse	GTCAGGATTCAGCCGAATGG
ISG56-forward	GCCTTGCTGAAGTGTGGAGGAA
ISG56-reverse	ATCCAGGCGATAGGCAGAGATC
Human-GAPDH-forward	GAGTCAACGGATTTGGTCTGT
Human-GAPDH-reverse	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
Porcine-GAPDH-forward	ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA
Porcine-GAPDH-reverse	GATCGAGTTGGGGCTGTGACT

## 2 结果和分析

### 2.1 ANXA1-pCAGGs 重组质粒鉴定

重组质粒用限制性内切酶 *Cla* I 和 *Xho* I 双酶切后, 可见 1024 bp 为 ANXA1 条带, 5000 bp 为空载体条带 (图 1), 重组质粒的基因序列经测序证明正确。

### 2.2 ANXA1 在 HEK-293T 细胞中的表达

重组质粒转染 HEK-293T 细胞, 然后进行 Western-blotting 检测, 发现 39 kDa 处为 Myc-ANXA1 的目的条带 (图 2), 证明 Myc-ANXA1 在 HEK-293T 细胞中表达。

### 2.3 过表达 ANXA1 显著抑制 FMDV 的复制

为确定 ANXA1 对 FMDV 蛋白的影响, 结果如图 3 所示, 对照组随时间增加, FMDV 蛋白条带逐渐增强, 12 h 处条带最明显; 处理组随时间增加, FMDV 蛋白条带微弱, 说明在蛋白水平上, ANXA1 显著抑制 FMDV 的复制。

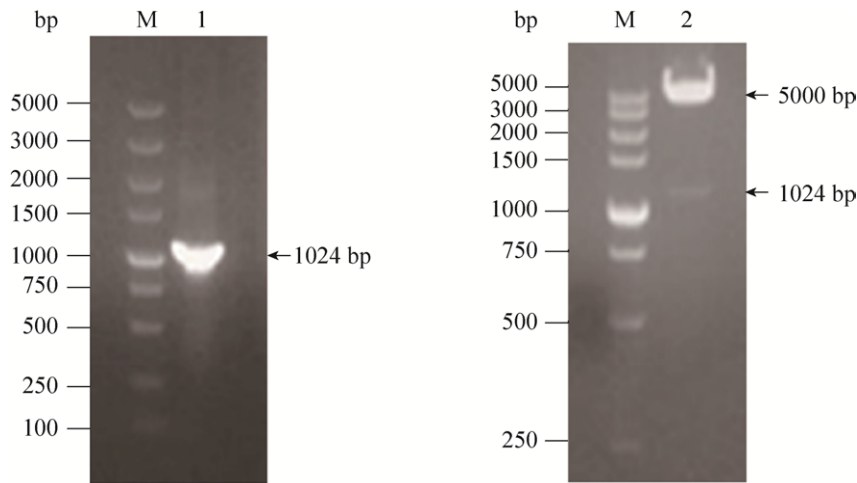


图 1. ANXA1-pCAGGs 重组质粒的酶切鉴定

Figure 1. Identification of ANXA1 recombinant plasmid. M: DL 5000 DNA marker; lane 1: PCR product of ANXA1 gene; lane 2: products from recombinant plasmid ANXA1-pCAGGs digested with *Cla* I and *Xho* I.

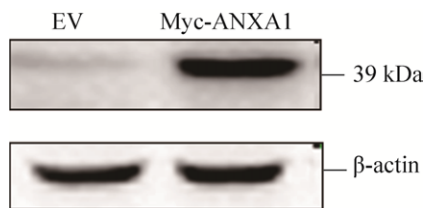


图 2. Western-blotting 分析 ANXA1 蛋白在细胞中的表达

Figure 2. Confirmatory the expression of Myc-ANXA1-pCAGGs by Western-blotting. EV: the expression vector of pCAGGs; Myc-ANXA1: the expression of Myc-ANXA1 in the HEK-293T;  $\beta$ -actin: the reference control.

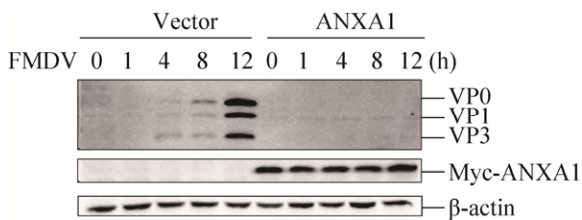


图 3. ANXA1 抑制 FMDV 在 PK15 细胞中的复制

Figure 3. ANXA1 inhibits FMDV replication in PK15 cells.

为确定 ANXA1 对 FMDV mRNA 复制的影响, 结果如图 4 所示, 在 BHK21 和 PK15 细胞上,

ANXA1 组与对照组相比, 随着 FMDV 感染时间的增加, 在 RNA 水平, ANXA1 显著抑制 FMDV 的复制( $P < 0.01$ )。

#### 2.4 ANXA1 沉默显著促进 FMDV 的复制

为确定 ANXA1 沉默对 FMDV mRNA 复制的影响, 结果如图 5 所示, 在 PK15 细胞上 ANXA1 siRNA 组与 NC siRNA 组相比, 随着 FMDV 感染时间的增加, 在 RNA 水平, 干扰 ANXA1 后显著促进 FMDV 的复制 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.5 ANXA1 促进 I 型干扰素的产生

为研究 ANXA1 如何抑制 FMDV 的复制, 检测 ANXA1 对 I 型干扰素表达是否有影响。结果如图 6 所示, 随 ANXA1 剂量的增加, SeV 诱导的 ISRE 和 IFN- $\beta$  启动子的表达逐步增强( $P < 0.01$ ), 说明 ANXA1 可以通过促进 I 型干扰素的表达, 从而抑制 FMDV 的复制。

为探究 ANXA1 是否通过调控 RLRs 通路的节点蛋白, 增强 I 型干扰素的产生。结果如图 7 所示, ANXA1 协同 RLRs 信号通路中节点蛋白促进

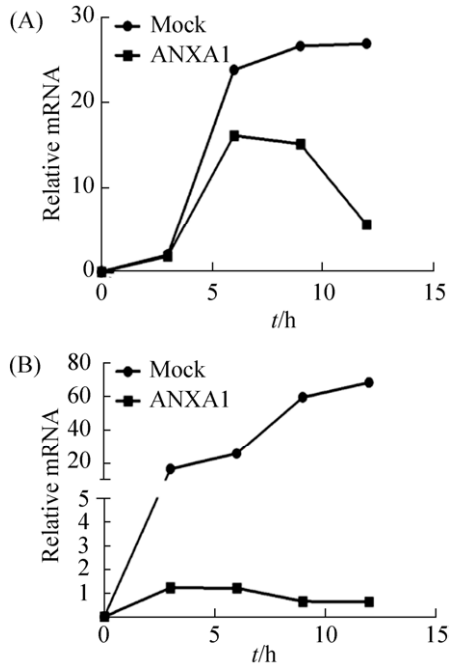


图 4. ANXA1 抑制 FMDV 在 BHK21(A)和 PK15(B) 细胞中的复制  
 Figure 4. ANXA1 inhibits FMDV replication in BHK21 (A) and PK15 (B) cells.

I 型干扰素表达, 而对 VISA 诱导的 I 型干扰素表达没有影响, 说明 ANXA1 促进 RLRs 节点蛋白介导的 I 型干扰素表达。

### 2.6 ANXA1 促进 SeV 诱导的 IRF3 的磷酸化

为研究 ANXA1 是否通过增强 IRF3 的磷酸化, 增加 I 型干扰素的表达。结果如图 8 所示, 在 HEK293T 细胞上, 随 SeV 感染时间的增加, ANXA1 组的 IRF3

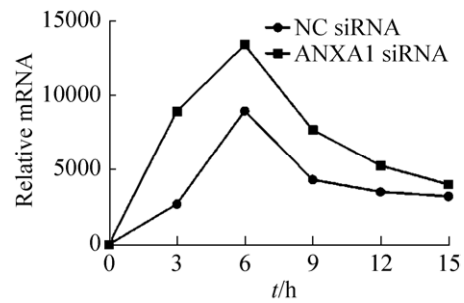


图 5. ANXA1 沉默促进 FMDV 在 PK15 细胞里的复制  
 Figure 5. Knockdown of ANXA1 promotes FMDV replication in PK15 cells.

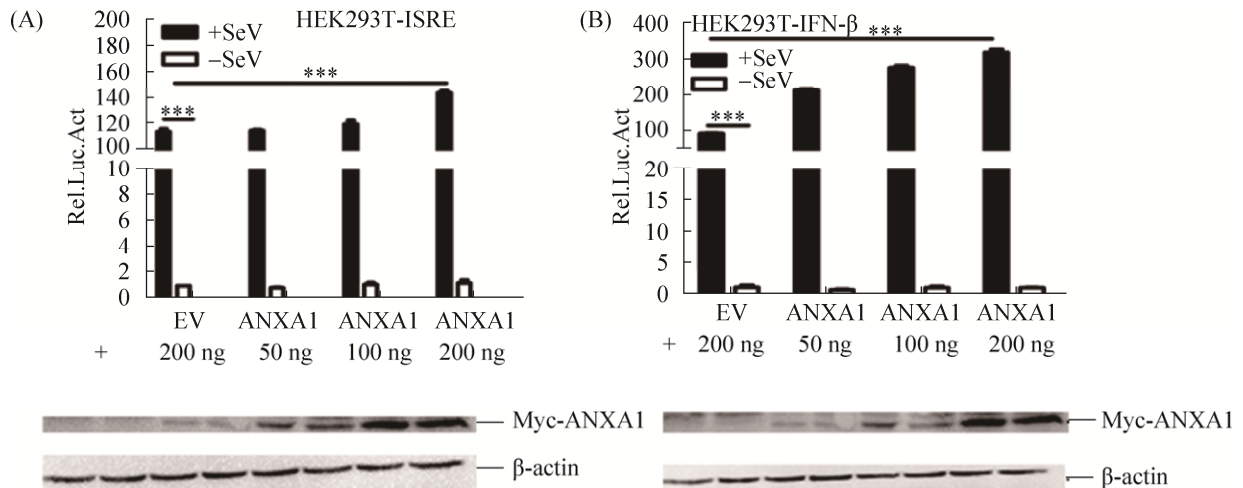


图 6. ANXA1 促进 SeV 诱导的 ISRE(A)和 IFN-β(B)的产生

Figure 6. ANXA1 enhances SeV-induced activation of the ISRE (A) and IFN-β (B) promoter. The results represent the means and standard deviations of data from three independent experiments.  $^{***}P < 0.01$  was considered very significant.

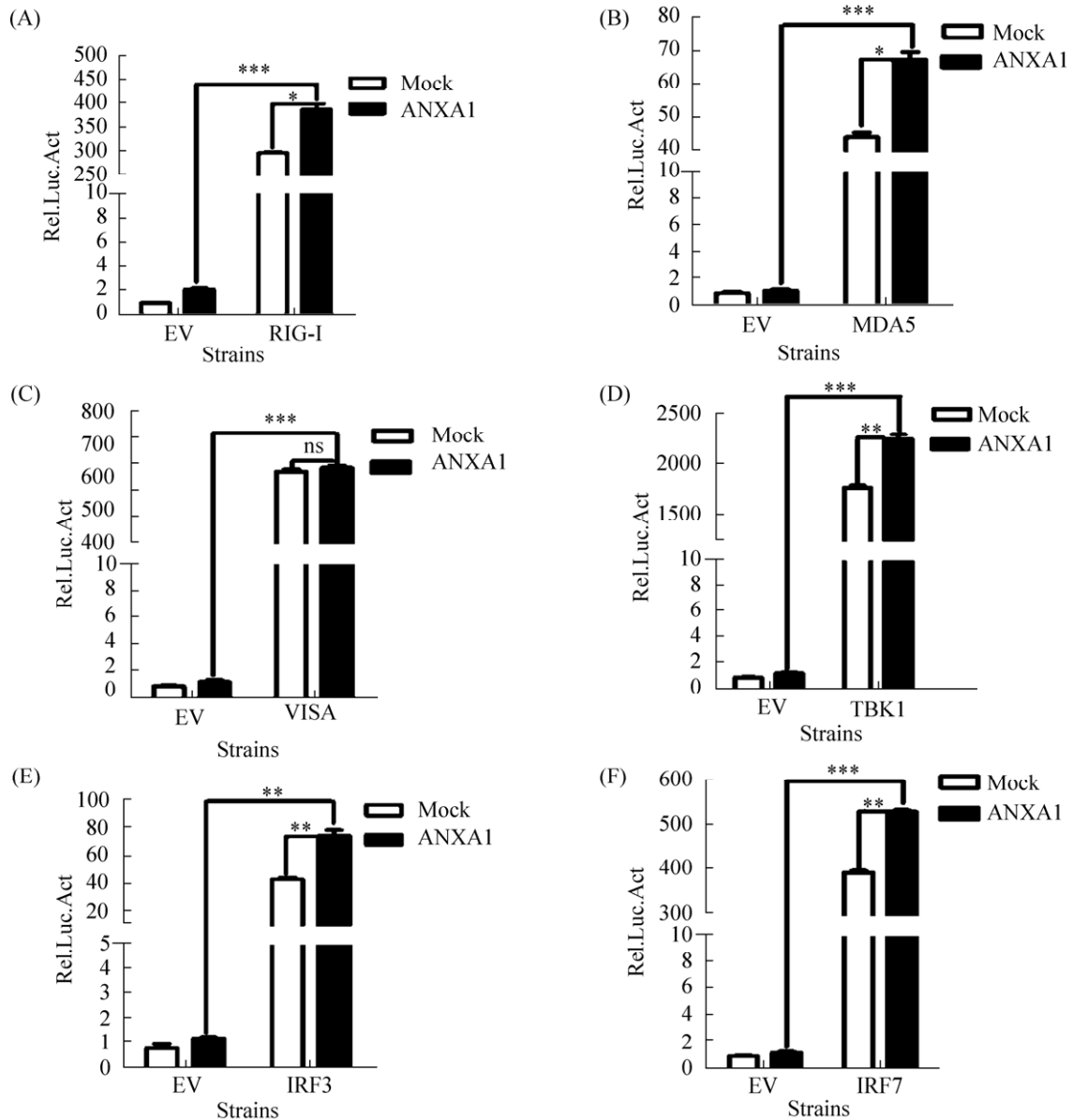


图 7. ANXA1 促进 RIG-I、MDA5、TBK1、IRF3、IRF7 诱导的 IFN-β 的产生, 对 VISA 诱导的 IFN-β 的产生没有影响  
 Figure 7. ANXA1 increases the activation of IFN-β promoter induced by RIG-I(A), MDA5(B), TBK1(D), IRF3(E) and IRF7(F), but VISA(C) was not observed. The results represent the means and standard deviations of data from three independent experiments. \* $P < 0.05$  was considered significant; \*\* $P < 0.01$  was considered very significant.

磷酸化条带明显强于空载体组, 说明 ANXA1 能够通过增强 IRF3 的磷酸化, 进而促进 I 型干扰素的表达。

### 2.7 ANXA1 在 RNA 水平促进 I 型干扰素刺激基因(ISGs)的产生

研究 ANXA1 是否通过增强 ISGs 的产生, 抑

制 FMDV 复制。结果如图 9 所示, ANXA1 组的 IFN-β、RNATES、CXCL10、ISG54、ISG56 的 mRNA 表达量显著高于对照组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 说明 ANXA1 明显促进 ISGs mRNA 的表达, 发挥抗病毒功能。

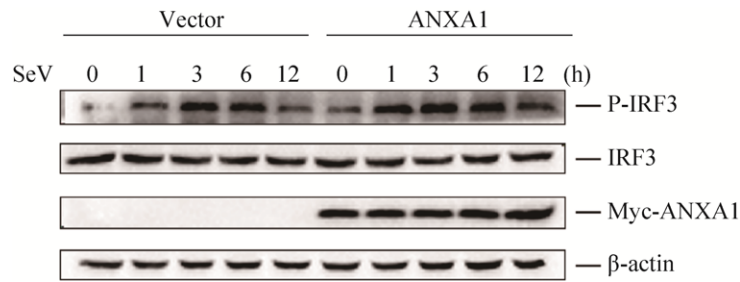


图 8. ANXA1 增加 IRF3 的磷酸化

Figure 8. ANXA1 promotes phosphorylation of IRF3 during SeV infection.

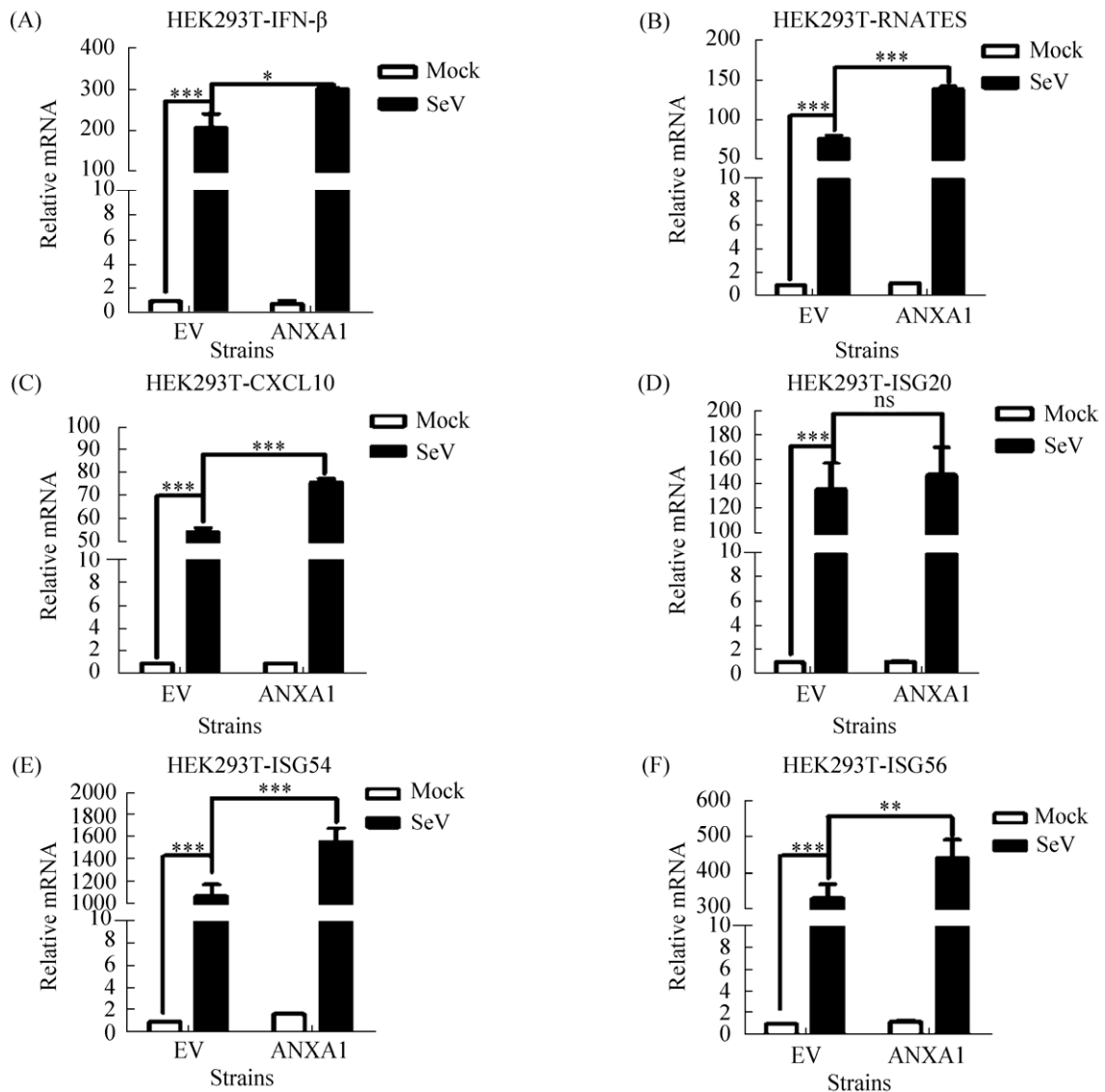


图 9. ANXA1 显著促进干扰素刺激基因的表达

Figure 9. ANXA1 promotes the transcription of various ISGs. ANXA1 clearly promoted the gene expression level of IFN- $\beta$ (A), RNATES(B), CXCL10(C), ISG54(E) and ISG56(F), but ISG20(D) was not observed. The results represent the means and standard deviations of data from three independent experiments. \* $P < 0.05$  was considered significant; \*\* $P < 0.01$  was considered very significant.

### 3 讨论

宿主细胞 RLRs 识别胞内病毒 RNA, 进而募集 VISA 蛋白启动信号传导, 最终导致 I-IFN 的表达。因此, 调控 RLRs 信号通路应答的外源或者宿主分子对于天然免疫抗病毒应答及其靶向治疗提供了思路。RLRs 信号通路蛋白能够被宿主蛋白调节进而发挥不同的生理功能, 线粒体 NOD 样受体 X1 (mitochondrial NOD-like receptor X1, NLRX1) 是最初发现能够与 RIG-I 竞争结合 VISA 的 RLRs 通路负调控的宿主蛋白; 线粒体膜翻译延伸因子 (mitochondrial TU translation elongation factor, TUFM) 能够促进 TUFM-VISA-RIG-I-Atg5-Atg12 复合体的形成, 进而抑制 I-IFN 的产生并增强 VSV 的复制, 搭建起天然免疫和自噬的桥梁; 线粒体融合蛋白 2 通过结合 VISA 的跨膜区, 抑制 RLRs 的信号转导<sup>[12-14]</sup>。泛素调节 X 结构域蛋白 1 (ubiquitin-regulatory-X-domain-containing protein 1, UBXN1) 也可以在病毒感染时, 与 TNF 受体相关因子 3/6 (TNF receptor associated factor, TRAF3/6) 竞争结合到 VISA, 导致 RLRs 信号通路抑制。而 LSM14A 通过结合 RIG-I 和 VISA 促进 SeV 诱导 I-IFN 的表达, VSV 空斑试验表明 LSM14A 有效抑制病毒在细胞内的复制<sup>[15]</sup>。RLRs 通路中 IRF3 也能够被磷酸酶基因消除 Ser97 的磷酸化, 进而发挥正调控功能, 同时 DNA-PK 磷酸化 IRF3 的 Thr135, 从而维持 IRF3 的活性。本实验结果表明猪源 ANXA1 能够促进 SeV 诱导的 ISRE 和 IFN- $\beta$  的激活, 显著抑制 FMDV 的复制。比对猪源与人源 IRF3 显示两者在进化上是保守的, 主要的蛋白结构域保持不变; 同时 ANXA1 猪源与人源的序列同源性 88.7%, 同源性也非常高, 其主要的蛋

白结构域 46-111 aa、118-183 aa、201-267 aa、277-342 aa 保持不变。ANXA1 前期研究显示具有参与抗炎症和抗迁移的生物学功能, 本文证实 ANXA1 能够通过影响 RNA 病毒诱导的 IRF3 磷酸化进而影响 I-IFN 的产生, 这说明 ANXA1 对于 RLRs 依赖的抗病毒应答可能存在重要调节功能, 同时本文发现 ANXA1 能够活化炎症因子 CXCL10 的大量表达以及诱导趋化因子 RNATES 的升高, RNATES 参与激活 T 细胞, 这些说明 ANXA1 可能存在协同 RNA 病毒诱导的前期炎症因子的表达以及参与调节细胞免疫。Bist 等的研究主要集中于 LPS 介导的 TLRs 信号通路, 证实 ANXA1 能够结合 NEMO 和 TBK1 促进 TLRs 通路的信号转导<sup>[16]</sup>, 本文研究显示 ANXA1 能够作为重要的宿主蛋白参与调控 RLRs 信号通路转导。过表达 ANXA1 能够影响 IRF3 的分子效应, 促进 IRF3 诱导的 I-IFN 的产生, 不仅仅存在于 TBK1 的水平, 这说明 ANXA1 可能作为重要的宿主蛋白参与调节影响 TBK1 和 IRF3 的复合体, 进而影响抗病毒天然免疫信号通路, 同时, ANXA1 既能够影响 TLRs 信号通路, 也能影响 RLRs 信号通路, 后期对于 ANXA1 如何影响 IRF3 的磷酸化需要进行深入的研究。RNA 病毒能够诱导 RLRs 依赖的 I-IFN 的表达升高, 同时病毒蛋白也能够调控 RLRs 信号通路转导, 如 A 型流感病毒 NS1 蛋白通过拮抗雌激素反应指状蛋白 25 (Tripartite motif-containing protein 25, TRIM25) 介导的 RIG-I CARD 区域的泛素化, 进而拮抗 I-IFN 的产生<sup>[17]</sup>; 丙肝病毒的 NS3/4A 蛋白酶通过酶切 VISA<sup>[18]</sup>, 进而抑制 I-IFN 的产生, 本实验室以前研究显示 FMDV 的 2B 蛋白通过降解 RIG-I, 阻止 RIG-I 样受体信号传导, 抑制 I-IFN 的产生<sup>[19]</sup>, 因此 FMDV



及其病毒蛋白是否参与调控 ANXA1 介导的 RLRs 信号通路转导有待于进一步研究。

综上所述, 本文首次探讨了 ANXA1 蛋白对于 RLRs 介导的 I-IFN 产生的影响, 同时发现 ANXA1 蛋白能够通过影响 IRF3 节点蛋白的磷酸化, 进而促进 I-IFN 的产生, 是对宿主蛋白调控 RLRs 信号通路分子机制的补充。宿主蛋白调控天然免疫机制复杂, 对于 ANXA1 是如何调控 IRF3 的磷酸化, 通过何种途径调控, 调控 RLRs 依赖的 IRF3 的磷酸化是否有 TBK1 的参与, ANXA1 是否存在前期诱导炎症, 后期抗炎症的双向功能, 将进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3D<sup>pol</sup>) *in vitro*. *Journal of Virology*, 2005, 79(12): 7698–7706.
- [2] Diaz-San Segundo F, Rodriguez-Calvo T, De Avila A, Sevilla N. Immunosuppression during acute infection with foot-and-mouth disease virus in swine is mediated by IL-10. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5659.
- [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] Bamming D, Horvath CM. Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(15): 9700–9712.
- [6] Hüsser L, Alves MP, Ruggli N, Summerfield A. Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference. *Virus Research*, 2011, 159(1): 9–16.
- [7] Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates viral RNA replication of hepatitis C virus. *Acta Medica Okayama*, 2015, 69(2): 71–78.
- [8] Xu L, Wang WS, Li YL, Zhou XY, Yin YB, Wang YJ, e Man RA, Van Der Laan LJW, Huang F, Kamar N, Peppelenbosch MP, Pan QW. RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production. *Hepatology*, 2017, 65(6): 1823–1839.
- [9] Chatterjee BE, Yona S, Rosignoli G, Young RE, Nourshargh S, Flower RJ, Perretti M. Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration *in vivo* and increased responsiveness *in vitro*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2005, 78(3): 639–646.
- [10] Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *The FASEB Journal*, 2007, 21(4): 968–975.
- [11] Bist P, Shu S, Lee H, Arora S, Nair S, Lim JY, Dayalan J, Gasser S, Biswas SK, Fairhurst AM, Lim LH. Annexin-A1 regulates TLR-mediated IFN-beta production through an interaction with TANK-binding kinase. *Journal of Immunology*, 2013, 191(8): 4375–4382.
- [12] Lei Y, Wen HT, Yu YB, Taxman DJ, Zhang L, Widman DG, Swanson KV, Wen KW, Damania B, Moore CB, Giguère PM, Siderovski DP, Hiscott J, Razani B, Semenkovich CF, Chen X, Ting JPY. The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity*, 2012, 36(6): 933–946.
- [13] Moore CB, Bergstralh DT, Duncan A, Lei Y, Morrison TE, Zimmermann AG, Accavitti-Loper MA, Madden VJ, Sun LJ, Ye ZM, Lich JD, Heise MT, Chen ZJ, Ting JPY. NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature*, 2008, 451(7178): 573–577.
- [14] Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, Kawabata S, Koshiba T. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling*, 2009, 2(84): ra47.
- [15] Li Y, Chen R, Zhou Q, Xu ZS, Li C, Wang S, Mao AP, Zhang XD, He WW, Shu HB. LSM14A is a processing body-associated sensor of viral nucleic acids that initiates cellular antiviral response in the early phase of viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(29): 11770–11775.
- [16] Bist P, Leow SC, Phua QH, Shu S, Zhuang Q, Loh WT, Nguyen TH, Zhou JB, Hooi SC, Lim LH. Annexin-1

- interacts with NEMO and RIP1 to constitutively activate IKK complex and NF- $\kappa$ B: implication in breast cancer metastasis. *Oncogene*, 2011, 30(28): 3174–3185.
- [17] Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, Farzan M, Inoue S, Jung JU, Garcia-Sastre A. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host & Microbe*, 2009, 5(5): 439–449.
- [18] Anggakusuma, Brown RJP, Banda DH, Todt D, Vieyres G, Steinmann E, Pietschmann T. Hepacivirus NS3/4A proteases interfere with MAVS signaling in both their cognate animal hosts and humans: implications for zoonotic transmission. *Journal of Virology*, 2016, 90(23): 10670–10681.
- [19] Zhu ZX, Wang GQ, Yang F, Cao WJ, Mao RQ, Du XL, Zhang XL, Li CT, Li D, Zhang KS, Shu H, Liu XT, Zheng HX. Foot-and-mouth disease virus viroporin 2B antagonizes RIG-I-mediated antiviral effects by inhibition of its protein expression. *Journal of Virology*, 2016, 90(24): 11106–11121.

## Annexin-1 promotes type I interferon production and inhibits foot-and-mouth disease virus replication

Zhikuan Luo<sup>1,2</sup>, Xusheng Ma<sup>2</sup>, Xiaopu Yang<sup>1\*</sup>, Haixue Zheng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

<sup>2</sup> 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, Gansu Province, China

**Abstract:** [Objective] We studied the regulatory effect of Annexin-1 (ANXA1) on type I interferon (I-IFN) production and foot-and-mouth disease virus (FMDV) replication. [Methods] We used overexpression and knockdown assays to determine the role of ANXA1 in FMDV-infected cells. Then we evaluated the influence of ANXA1 on ISRE and IFN- $\beta$  promoter activation by dual luciferase reporter assays. To confirm the regulatory role of ANXA1 on type I IFN pathway, IFN regulatory factor 3 (IRF3) phosphorylation was detected by Western blotting. Expression of interferon-stimulated genes (ISGs) was measured by RT-PCR to investigate the effect of ANXA1 on ISGs expression. [Results] Overexpression of ANXA1 significantly suppressed FMDV replication and knockdown of ANXA1 expression enhanced virus replication, showing an antiviral role of ANXA1 in FMDV-infected cells ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). ANXA1 promoted the activation of type I IFN pathway in a dose-dependent manner. Overexpression of ANXA1 enhanced IRF3 phosphorylation and ISGs expression ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). [Conclusion] ANXA1 enhances type I IFN production and suppresses FMDV replication.

**Keywords:** annexin A1, foot-and-mouth disease virus, type I interferon, phosphorylation 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. Xiaopu Yang, Tel: +86-931-8342086, E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn; Haixue Zheng, Tel: +86-931-8342086, E-mail: haixuezheng@163.com

Received: 28 December 2017; Revised: 26 March 2018; Published online: 4 April 2018