



组织蛋白酶 S 抑制塞内卡病毒在 IBRS-2 细胞中的复制

史喜娟, 张婷, 杨博, 申超超, 张大俊, 陈学辉, 崔卉梅, 袁兴国, 赵登率, 张克山*, 郑海学*, 刘湘涛

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, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046

摘要: 【目的】本研究旨在探究猪源组织蛋白酶S (cathepsin S, CTSS)对塞内卡病毒(Seneca Valley virus, SVV)复制的影响。【方法】SVV感染IBRS-2细胞, 采用RT-qPCR在转录水平探究SVV感染对内源性CTSS表达的调控; 采用ELISA测定SVV感染对CTSS酶活性的影响; 通过Western blotting (WB)和RT-qPCR检测过表达CTSS对SVV复制及SVV诱导的抗病毒细胞因子的调控作用; 合成针对CTSS的特异性siRNA, 利用WB和RT-qPCR检测siRNA对CTSS的干扰效果以及CTSS被干扰后对SVV复制的影响。【结果】结果表明SVV感染IBRS-2细胞能显著上调内源性CTSS表达并增强CTSS酶活性; 过表达CTSS能显著抑制SVV在IBRS-2细胞中的复制, 同时促进宿主抗病毒细胞因子的表达; siRNA-2947下调内源性CTSS表达进而促进SVV复制。【结论】CTSS通过增强宿主抗病毒细胞因子上调表达而抑制SVV复制, 本研究为进一步深入探究宿主CTSS在抗SVV免疫应答中的作用及机制提供参考依据。

关键词: 组织蛋白酶 S, 塞内卡病毒, IBRS-2 细胞, 抗病毒功能

塞内卡病毒(Seneca Valley virus, SVV)是新出现的一种引起猪水泡病的病原体, SVV 是小 RNA 病毒科(Picornaviridae)塞内卡病毒属(Senecavirus)的唯一成员^[1-2]。该病毒基因组长度约为 7.3 kb, 包含一个开放阅读框(ORF), 编码一个大的多聚

蛋白前体, 随后被加工成各种成熟的病毒蛋白, ORF 分为 L 区、P1 区、P2 区和 P3 区, L 区从新生病毒多聚蛋白前体中自我裂解为前导蛋白(L^{pro}); P1 区产生 4 种病毒结构蛋白(VP1、VP2、VP3 和 VP4); P2 和 P3 区编码病毒非结构蛋白

基金项目: 国家自然科学基金(31972684); 新发塞内卡病毒应急防控关键技术研究及产品开发(19ZDNA001); 中国农业科学院重大科研任务(ZDRW202006)

*通信作者。张克山, Tel: +86-931-8342086, Fax: +86-931-8342052, E-mail: zks009@126.com; 郑海学, Tel: +86-931-8343307, Fax: +86-931-8342052, E-mail: zhenghaixue@caas.cn

收稿日期: 2021-01-20; 修回日期: 2021-04-16; 网络出版日期: 2021-08-04

(2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)，其中 2C 是非结构蛋白中最保守的蛋白^[3]。

SVV 于 2002 年首次在被污染的细胞中偶然发现，被认为可能是通过胎牛血清或猪胰蛋白酶引入细胞培养物中的污染物，由于其具有潜在的溶瘤活性，最初被用于治疗人类癌症，认为与特定病的病症无关^[4-5]。2007 年加拿大报道了 SVV 感染猪与特发性水泡病(PIVD)有关，时隔两年多美国又报道 SVV 可引起猪的口部、蹄部等皮肤黏膜出现水泡或溃疡病变^[6-7]。随后美国、巴西、泰国和中国等国家均报道猪群中出现了大量 SVV 感染^[8-11]。这表明 SVV 在不同地区发生着持续感染，意味着该病原存在暴发或大流行的潜在风险，可能导致巨大的经济损失，因此我们需要探究 SVV 的致病机制，为开发免受 SVV 感染的候选疫苗或治疗药物提供理论支撑。

初乳在抵抗病原感染中具有重要作用^[12]，猪的胎盘类型为上皮绒毛膜型，故不能通过胎盘传递免疫球蛋白，说明初乳是新生仔猪获得被动免疫的唯一途径，这一特性决定了初乳在仔猪免疫中具有更为重要的作用。本团队前期应用 iTRAQ 技术研究发现母猪初乳中组织蛋白酶 S (cathepsin S, CTSS) 的含量显著高于常乳。CTSS 是木瓜蛋白酶家族的半胱氨酸蛋白酶，主要在树突状细胞、B 细胞和巨噬细胞等抗原呈递细胞中表达^[13]，在抗原(Ag)加工和呈递、基质降解以及促进新生血管形成和肿瘤细胞侵袭转移中起重要作用，分泌的 CTSS 能够裂解膜结合的底物^[14-16]。CTSS 酶活性是其发挥功能的关键，如棕榈酸酯抑制组织蛋白酶诱导内皮细胞侵袭从而抗血管生成，部分是通过抑制 CTSL 和 CTSS 活性起作用的^[17]。CTSS 通过调节 p38 MAPK 和

JNK1 途径参与 MP 诱导的细胞凋亡和自噬；通过激活 NF- κ B 和 Caspase-3 从而诱导肝癌细胞凋亡并增加其化学敏感性，也可激活 CD74 调控趋化因子 CCL2 的表达，从而对肿瘤微环境产生影响^[18]。目前对宿主 CTSS 在病原感染中的作用研究较少，而主要集中在自身免疫性疾病^[19]、心血管疾病^[20]及肿瘤相关疾病^[21]的研究。

SVV 与口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)同属于小 RNA 病毒科，感染猪表现为鼻部和蹄冠部出现水泡、溃烂等与 FMDV 相似的临床症状^[22]。我们已经证明了 CTSS 通过促进 FMDV 诱导的干扰素及其他抗病毒细胞因子产生而抑制 FMDV 复制，但宿主 CTSS 在 SVV 感染中的作用及其调控机制至今尚未阐明。为阐明宿主 CTSS 在 SVV 感染过程中发挥的作用，发现宿主 CTSS 能够抑制 SVV 在 IBRS-2 细胞中复制，而 SVV 复制增加了宿主 CTSS 的表达量及其酶活性，进一步研究发现过表达 CTSS 促进 SVV 诱导的抗病毒细胞因子 mRNA 水平，明确了宿主 CTSS 抑制 SVV 复制的初步原因。本研究结果为更深层次探究猪源 CTSS 在 SVV 触发的免疫应答中的作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

SVV 株 CH-FJ-2017 和 IBRS-2 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学团队保存；SVV 抗体由本实验室制备；兔多克隆抗体 CTSS 购于 Abcam 公司；鼠抗 Flag 单抗、鼠抗 Myc 单抗、鼠抗 β -actin 单抗、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗均购于 Thermo Scientific 公司。

RNA 抽提试剂 Trizol、5× Prime script RT Master Mix、SYBR Permixon Ex Taq II 和蛋白预染 Marker 均购于宝生物工程大连有限公司; Lipofectamine™ 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司; Opti-MEM、100×青霉素-链霉素溶液、0.25% EDTA 胰酶和胎牛血清(FBS)均购于 Gibco 公司; DMEM 培养基和 PBS 溶液购于健顺公司; ECL 显色剂购于 Thermo Scientific 公司; 细胞裂解液和 PMSF 购于碧云天公司; 组织蛋白酶 S 试剂盒(货号 ab65306)购于艾博抗(上海)贸易有限公司; CTSS 干扰序列由上海吉玛制药有限公司合成。

1.2 SVV 对内源性 CTSS mRNA 水平的影响

将 IBRS-2 细胞按 1×10^5 接种于 35 mm 小皿中, 培养至 80%–90%, 用 MOI 为 0.5 的 SVV 感染 IBRS-2 细胞, 接毒后 0、4、8、12、16 h 分别收取细胞样品。提取细胞总 RNA, 利用 RT-qPCR 方法检测 CTSS 的 mRNA 表达 (定量引物信息见表 1)。

1.3 CTSS 酶活性测定

将 IBRS-2 细胞按 1×10^4 接种于 48 孔板中, 培养至 70%–80%, 用 MOI 为 0.5 的 SVV 感染 IBRS-2 细胞, 接毒后 0、4、8、12、16 h 分别收取细胞样品。收集 1×10^6 – 5×10^6 个细胞, 取 CTSS 试剂盒(货号 ab65306, Abcam)中的 100 μ L 裂解液裂解细胞, 在微量离心机中以最高速度离心 5 min, 取 50 μ L 上清于 96 孔板, 加等量反应缓冲液和 10 mmol/L Ac-VVR-AFC (CTSS 底物), 根据试剂盒说明书进行处理。使用 SpectraMax M5 荧光计在 400 nm 激发波长和 505 nm 发射波长下测量荧光。

1.4 过表达 CTSS 对 SVV 复制影响的检测

IBRS-2 细胞消化后接种于细胞培养板中, 待细胞长至 70%–80%时, 将 CTSS 真核表达质粒与 Lip2000 试剂(DNA:Lip2000=1 μ g:2 μ L)分别加至 Opti-MEM 中, 混合后静置 15 min, 将 Opti-MEM 混合物直接加至细胞中, 培养 24 h 后

表 1. 引物序列信息

Table 1. Informations of primer sequence

Genes	Primers (5'→3')
P-CTSS	Forward: ATGAGTTGCGTGAGAGTTCC Reverse: ACAAGAACCACAAGAACCCTG
P-GAPDH	Forward: ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA Reverse: GATCGAGTTGGGGCTGTGACT
P-IFN- β	Forward: GGCTGGAATGAAACCGTCAT Reverse: TCCAGGATTGTCTCCAGGTCA
P-IFN- γ	Forward: CATTCAAGTGCTGTCTGACATG Reverse: GATCGGTGTGCCTGCCTTC
P-IL-6	Forward: GGCATCACCTTTGGCATCTT Reverse: AGTTTTCTGCTTTCTGCAGCT
NF- κ B(p65)	Forward: TTCTTTCAAACAAGGACCAGA Reverse: GCAACCAAGTAACCCTTAAAG
SVV	Forward: GAATTTGGAAGCCATGCTC Reverse: AGCCAACATAGAR(A)ACCAGATTGC 3D: TTCAAACCAGGAACACTACTCCGAGA-BHQ1

感染 SVV。用无血清的 DMEM 清洗细胞,将 SVV 稀释至 MOI 为 0.5 时感染 IBRS-2 细胞,并设不感染对照组,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 1 h 之后,弃去病毒液,用含 2% FBS 的维持液继续培养。12 h 后收取两份细胞样品,一份提取总 RNA 用于 RT-qPCR 检测 SVV 拷贝数的变化,并以猪源 GAPDH 作为内参检测 CTSS 转录水平变化;一份用含 β-巯基乙醇的 5×SDS Loading Buffer 处理,用于 Western blotting (WB)检测 CTSS 和 SVV 蛋白水平的变化,并以 β-actin 为内参。

1.5 siRNA 干扰效果及其对 SVV 复制影响的检测

将状态良好的 IBRS-2 细胞按 1×10^4 接种于 12 孔板,培养至 70% 左右,转染 50 μmol、150 μmol siRNA-2947 以及 siRNA-NC, 36 h 后用 MOI 0.5 的 SVV 感染细胞,12 h 后收取细胞样品,一部分提取总 RNA,RT-qPCR 检测 SVV 拷贝数的变化,另一部分用于 WB 检测 CTSS 和 SVV 蛋白水平的变化。

1.6 抗病毒细胞因子 mRNA 水平检测

按 1.4 制备样品,提取 RNA,采用 RT-qPCR 检测猪源 IFN-γ、IL-6、NF-κB 转录水平的变化。

1.7 数据分析

所有实验至少重复 3 次,应用 GraphPad Prism 7 软件进行分析并作图,使用单因素方差分析进行统计学分析(*: $P < 0.05$ 表示数据具有统计学意义, **: $P < 0.01$ 表示数据具有显著性差异, ***: $P < 0.001$ 表示数据间具有极显著性差异)。

2 结果和分析

2.1 SVV 上调内源性 CTSS 的 mRNA 水平

将 IBRS-2 细胞接种于 35 mm 小皿中,待细

胞长至 80%–90%,用 0.5 MOI 的 SVV 感染 IBRS-2 细胞,在 0、4、8、12、16 h 后收取细胞样品,利用 RT-qPCR 方法检测内源性 CTSS 的变化。结果表明 SVV 感染 IBRS-2 细胞后内源性 CTSS 的 mRNA 水平升高(图 1),提示 SVV 感染促进宿主细胞内源性 CTSS 的表达。

2.2 SVV 感染能显著增强 CTSS 酶活性

转染 0.25 μg CTSS 重组质粒至 IBRS-2 细胞,20 h 后用 SVV (MOI=0.5)感染细胞,同时设不用病毒刺激的对照组,收取 0、4、8、12、16 h 细胞样品,裂解细胞用 Fluorometric Method 检测 CTSS 酶活性,结果表明 SVV 感染能显著增强 CTSS 酶活性,且随着 SVV 感染时间的增加,CTSS 的活性也随之增强(图 2)。

2.3 过表达 CTSS 抑制 SVV 复制

转染 0、1、3、5 μg pcDNA3.1-CTSS-Myc 至 IBRS-2 细胞,24 h 后用 SVV (MOI=0.5)感染细胞,并设 Mock 为对照,12 h 后收取细胞样品检测其对 SVV 复制的调控作用,发现随着 CTSS 表达量

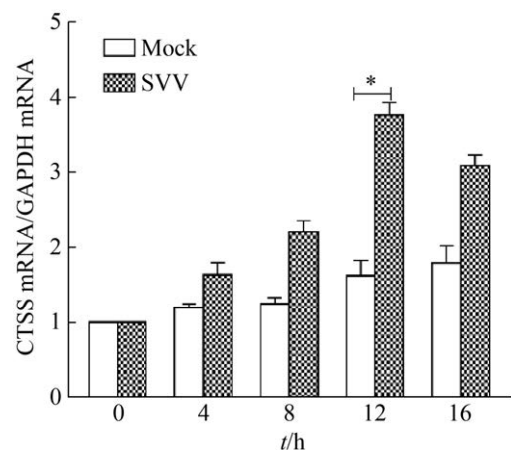


图 1. SVV 感染上调内源性 CTSS 的 mRNA 水平
Figure 1. The mRNA levels of endogenous CTSS was up-regulated by SVV infection.

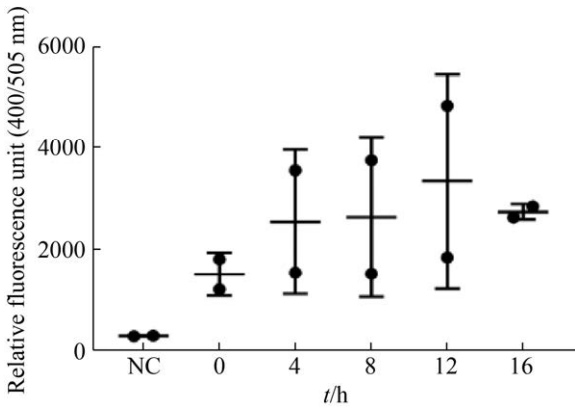


图 2. SVV 感染上调 CTSS 酶活性

Figure 2. The activity of CTSS was up-regulated by SVV infection.

增加(图 3-A, C), SVV 复制水平呈现剂量依赖性降低(图 3-B, C)。结果表明, 过表达 CTSS 抑制 SVV 在 IBRS-2 细胞中复制。

2.4 siRNA 敲低 CTSS 促进 SVV 复制

为进一步确定宿主 CTSS 对 SVV 复制的影响, 将 50、150 μmol siRNA-2947 转染至 IBRS-2 细胞, 以 siRNA-NC 为对照, 在 36 h 后用等量 SVV (MOI=0.5) 感染细胞, 用 RT-qPCR 和 WB 检测 siRNA-2947 对 CTSS 表达及 SVV 复制的影响, 结果表明 siRNA-2947 能下调宿主 CTSS 的表达

(图 4-A, 4-C)而促进 SVV 在 IBRS-2 细胞中复制(图 4-B, 4-C)。

2.5 过表达 CTSS 促进 SVV 诱导的宿主抗病毒细胞因子的转录

为明确 CTSS 抑制 SVV 复制的原因, 检测宿主 CTSS 是否影响 SVV 诱导的抗病毒细胞因子产生。在 IBRS-2 细胞中转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-CTSS-Myc, 24 h 后感染 SVV (MOI=0.5), 并设不接毒刺激的对照组, 12 h 后收集细胞处理样品, RT-qPCR 结果显示, 在 IBRS-2 细胞中能检测到 IFN- γ 、IL-6、NF- κB , CTSS 可促进 SVV 诱导的 IFN- γ 、IL-6、NF- κB 的上调表达实验结果表明宿主 CTSS 能激活 SVV 诱导的宿主抗病毒细胞因子的转录水平(图 5)。

3 讨论

CTSS 是一种溶酶体蛋白酶, 主要在抗原呈递细胞中表达, 其活性调节对于 MHC-II 信号传导及 CD4⁺ T 细胞介导的免疫反应激活非常重要。研究报道 CTSS 活性可以由肠道菌群调节, 共生体触发生理性 CTSS 活性, 而病原体引起病理性

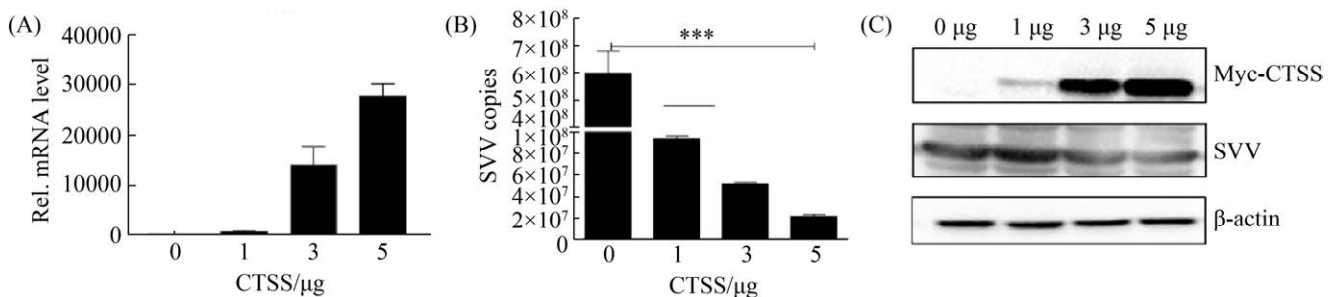


图 3. 过表达 CTSS 抑制 SVV 的复制

Figure 3. SVV replication was inhibited by overexpression CTSS. A: the mRNA level of CTSS was detected by qPCR; B: copies number of SVV was detected by RT-qPCR; C: the Protein level of CTSS and SVV was detected.

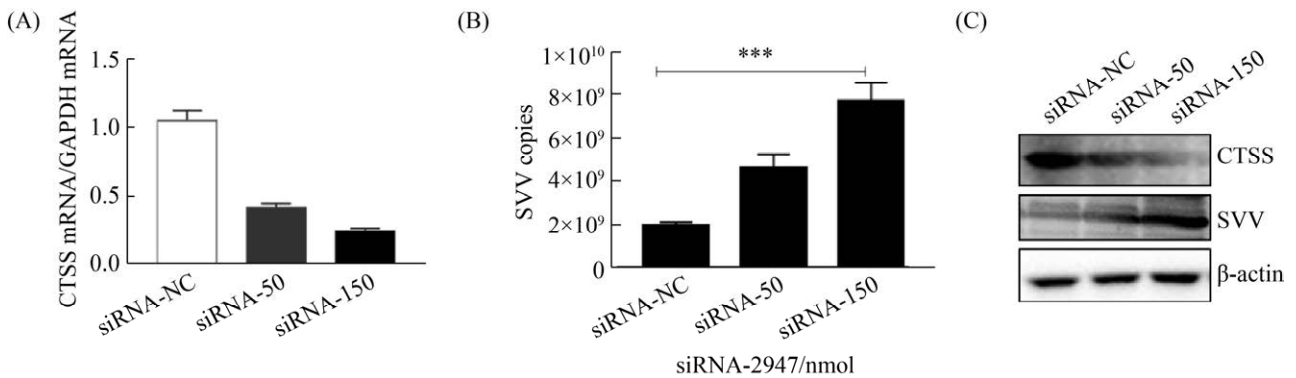


图 4. siRNA 敲低 CTSS 促进 SVV 复制

Figure 4. SiRNA knocked down CTSS to promote SVV replication. A: the mRNA level of CTSS was detected by RT-qPCR; B: copies number of SVV was detected by RT-qPCR; C: WB to detect the changes of CTSS and SVV protein levels.

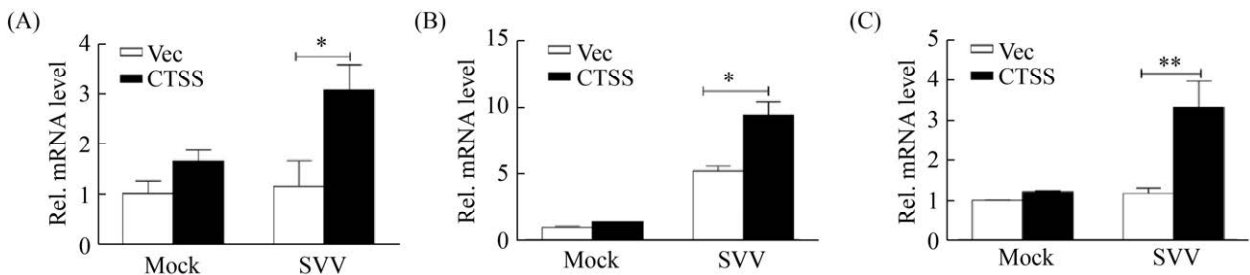


图 5. 过表达 CTSS 促进 SVV 诱导的抗病毒细胞因子的上调表达

Figure 5. Overexpression of CTSS promoted up-regulation of antiviral cytokines induced by SVV. A: the mRNA level of IFN- γ was detected by RT-qPCR; B: the mRNA level of IL-6 was detected by RT-qPCR; C: the mRNA level of NF- κ B was detected by RT-qPCR.

CTSS 活性增加, 病理性 CTSS 活性增加导致 T 细胞活化和增殖, 进而加速宿主免疫反应^[23]。本研究用 SVV 感染 IBRS-2, WB 和 RT-qPCR 检测发现 SVV 感染上调内源性 CTSS 的表达, SVV 感染也能使 CTSS 活性增加, 其具体机制还有待进一步探究。

病原微生物通过入侵宿主后破坏宿主防御系统, 从而达到成功感染宿主的目的, 当然其生命周期也受不同宿主因素影响。有研究报道 SVV

3C^{pro} 可以通过切割或降解天然免疫接头蛋白以逃避宿主抗病毒天然免疫反应^[24]; SVV 3C^{pro} 也可以通过去泛素化关键信号分子 RIG-I、TBK1 和 TRAF3 负调节 I 型 IFN 从而逃避先天免疫反应^[25]。SVV 3D^{pro} 是一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶, 对于病毒复制是必不可少的^[26], E2 泛素结合酶 UBE2L6 通过泛素化 SVV 3D 从而促进 SVV 感染^[27]。本研究发现过表达 CTSS 抑制 SVV 在 IBRS-2 细胞中复制, 而下调内源性 CTSS 能促进

SVV 复制。作者又探究了宿主 CTSS 对 SVV 诱导的抗病毒细胞因子产生的影响, 有报道称 CTSS 通过加强结合膜 CX3CL1 脱落并生成可溶性 CX3CL1, 使 CX3CL1 与 CX3CR1 相互作用, 将免疫细胞募集到炎症部位, 从而增加 CX3CL1 脱落进入间质, 改变自身免疫性泪腺炎和泪腺分泌^[28]。SVV 感染还会诱导明显的 T 细胞反应, 研究表明感染后第 10 天观察到与 IFN- γ 产生相关的 CD8⁺ 和双阳性 CD4⁺ CD8⁺ T 细胞增加^[29]。干燥综合征患者泪液中 CTSS 活性升高可诱导促炎细胞因子上调表达^[30], 这提示 CTSS 可能与炎症有关。因此我们随后检测了 CTSS 对促炎细胞因子产生的影响, RT-qPCR 结果显示 CTSS 可促进 SVV 诱导的 IL-6、IFN- γ 、NF- κ B 的 mRNA 表达。研究表明 CTSS 在体外能够切割 IL-6R, 释放的 sIL-6R 具有生物活性, 并能诱导 IL-6 反式信号转导, 这说明 CTSS 在炎症方面有相当重要的作用^[31]。天然杀伤细胞(NKT)可调节多种免疫反应, NKT 细胞分泌 Th1 细胞因子(IFN- γ)和 Th2 细胞因子(包括 IL-4), 它们募集并激活其他先天免疫细胞以加剧肝脏中的炎症反应, CTSS 和 CTSS 抑制剂可降低 LPS 诱导的炎症过程中 NKT 细胞的活化^[32]。先天免疫是宿主抵抗病原体感染的第一道防线, 据报道 RIG-I 对 SVV 发挥重要的抗病毒作用, 它主要负责 SVV 感染过程中 I 型干扰素信号通路的激活。这表明 CTSS 促进 SVV 诱导的抗病毒细胞因子的表达, 可能是宿主 CTSS 抑制 SVV 复制的原因之一, 具体详细机制还需要进一步研究。

本研究首次证明了 CTSS 在 SVV 感染过程中

发挥抗病毒作用的新功能, 为宿主 CTSS 拮抗 SVV 感染提供了依据, 为下一步探究宿主 CTSS 在 SVV 触发的免疫应答中的作用积累了素材; 同时也提示 CTSS 可能作为抑制 SVV 复制的潜在靶点发挥作用。

4 结论

CTSS 可调节多种生理和病理过程, 本研究通过 WB 和 RT-qPCR 检测发现 SVV 感染能上调内源性 CTSS 的表达, 利用过表达和特异性 siRNA 实验证明了 CTSS 能抑制 SVV 在 IBRS-2 细胞中复制, SVV 感染细胞过程中宿主 CTSS 能上调 SVV 诱导的抗病毒细胞因子表达, 从而抑制 SVV 复制, 这说明 SVV 感染与宿主 CTSS 之间存在相互调节作用。

参考文献

- [1] Zhang JQ, Piñeyro P, Chen Q, Zheng Y, Li GW, Rademacher C, Derscheid R, Guo BQ, Yoon KJ, Madson D, Gauger P, Schwartz K, Harmon K, Linhares D, Main R. Full-length genome sequences of *Senecavirus A* from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in US swine. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): e01270-15.
- [2] 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. *The Journal of General Virology*, 2008, 89(Pt 5): 1265-1275.
- [3] Venkataraman S, Reddy SP, Loo J, Idamakanti N, Hallenbeck PL, Reddy VS. Structure of Seneca valley virus-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus. *Structure*, 2008, 16(10): 1555-1561.
- [4] Coffin RS. From virotherapy to oncolytic immunotherapy: where are we now? *Current Opinion in Virology*, 2015, 13: 93-100.

- [5] Reddy PS, Burroughs KD, Hales LM, Ganesh S, Jones BH, Idamakanti N, Hay C, Li SS, Skele KL, Vasko AJ, Yang JP, Watkins DN, Rudin CM, Hallenbeck PL. Seneca valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2007, 99(21): 1623–1633.
- [6] Pasma T, Davidson S, Shaw SL. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can Vet J*, 2008, 49(1): 84–85.
- [7] Corner S SK. Seneca valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 2012, 3(6). DOI: 10.4172/2157-7579.1000123.
- [8] Leme R, Alfieri A, Alfieri A. Update on *Senecavirus* infection in pigs. *Viruses*, 2017, 9(7): 170.
- [9] Zhao X, Wu Q, Bai Y, Chen G, Zhou L, Wu Z, Li Y, Zhou W, Yang H, Ma J. Phylogenetic and genome analysis of seven *Senecavirus* A isolates in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(6): 2075–2082.
- [10] Leme RA, Oliveira TES, Alcântara BK, Headley SA, Alfieri AF, Yang M, Alfieri AA. Clinical manifestations of *Senecavirus* A infection in neonatal pigs, Brazil, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(7): 1238–1241.
- [11] Saeng-Chuto K, Rodtian P, Temeeyasen G, Wegner M, Nilubol D. The first detection of *Senecavirus* A in pigs in Thailand, 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 285–288.
- [12] Imus JK, Lehmkuhl HD, Woods LW. Resistance of colostrum-deprived domestic lambs to infection with deer adenovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2019, 31(1): 78–82.
- [13] Wiener JJM, Wickboldt AT Jr, Wiener DK Jr, Lee-Dutra A Jr, Edwards JP Jr, Karlsson L Jr, Nguyen S Jr, Sun SQ Jr, Jones TK Jr, Grice CA Jr. Discovery and SAR of novel pyrazole-based thioethers as cathepsin S inhibitors. Part 2: Modification of P3, P4, and P5 regions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(7): 2375–2378.
- [14] Fonović UP, Jevnikar Z, Kos J. Cathepsin S generates soluble CX3CL1 (fractalkine) in vascular smooth muscle cells. *Biological Chemistry*, 2013, 394(10): 1349–1352.
- [15] Thanei S, Theron M, Silva AP, Reis B, Branco L, Schirmbeck L, Kolb FA, Haap W, Schindler T, Trendelenburg M. Cathepsin S inhibition suppresses autoimmune-triggered inflammatory responses in macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 146: 151–164.
- [16] Olson OC, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nature Reviews Cancer*, 2015, 15(12): 712–729.
- [17] Zhang J, Shan Y, Li Y, Luo XP, Shi HM. Palmitate impairs angiogenesis via suppression of cathepsin activity. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(6): 3644–3650.
- [18] Riese RJ, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*, 1996, 4(4): 357–366.
- [19] Kim SJ, Schätzle S, Sohail Ahmed S, Haap W, Jang SH, Gregersen PK, Georgiou G, Diamond B. Increased cathepsin S in Prdm1^{-/-} dendritic cells alters the T_H cell repertoire and contributes to lupus. *Nature Immunology*, 2017, 18(9): 1016–1024.
- [20] Figueiredo JL, Aikawa M, Zheng CY, Aaron J, Lax L, Libby P, de Lima Filho JL, Gruener S, Fingerle J, Haap W, Hartmann G, Aikawa E. Selective cathepsin S inhibition attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with chronic renal disease. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(4): 1156–1166.
- [21] Kim S, Jin HE, Seo HR, Lee HJ, Lee YS. Regulating BRCA1 protein stability by cathepsin S-mediated ubiquitin degradation. *Cell Death & Differentiation*, 2019, 26(5): 812–825.
- [22] Leme RA, Zotti E, Alcântara BK, Oliveira MV, Freitas LA, Alfieri AF, Alfieri AA. *Senecavirus* A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 603–611.
- [23] Steimle A, Gronbach K, Beifuss B, Schäfer A, Harmening R, Bender A, Maerz JK, Lange AN, Michaelis L, Maurer A,

- Menz S, McCoy K, Autenrieth IB, Kalbacher H, Frick JS. Symbiotic gut commensal bacteria act as host cathepsin S activity regulators. *Journal of Autoimmunity*, 2016, 75: 82–95.
- [24] Qian SH, Fan WC, Liu TT, Wu MG, Zhang HW, Cui XF, Zhou Y, Hu JJ, Wei SZ, Chen HC, Li XM, Qian P. Seneca valley virus suppresses host type I interferon production by targeting adaptor proteins MAVS, TRIF, and TANK for cleavage. *Journal of Virology*, 2017, 91(16): e00823-17.
- [25] Xue Q, Liu HS, Zhu ZX, Yang F, Xue QH, Cai XP, Liu XT, Zheng HX. Seneca Valley Virus 3C protease negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *Antiviral Research*, 2018, 160: 183–189.
- [26] Kempf BJ, Barton DJ. Picornavirus RNA polyadenylation by 3Dpol, the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Research*, 2015, 206: 3–11.
- [27] Li L, Bai J, Fan H, Yan JF, Li SH, Jiang P. E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2L6 promotes *Senecavirus A* proliferation by stabilizing the viral RNA polymerase. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(10): e1008970.
- [28] Fu RZ, Guo H, Janga S, Choi M, Klinngam W, Edman MC, Hamm-Alvarez SF. Cathepsin S activation contributes to elevated CX3CL1 (fractalkine) levels in tears of a Sjögren's syndrome murine model. *Scientific Reports*, 2020, 10: 1455.
- [29] Maggioli MF, Lawson S, de Lima M, Joshi LR, Faccin TC, Bauermann FV, Diel DG. Adaptive immune responses following *Senecavirus A* infection in pigs. *Journal of Virology*, 2018, 92(3): e01717-17.
- [30] Klinngam W, Fu RZ, Janga S, Edman M, Hamm-Alvarez S. Cathepsin S alters the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9, partially through protease-activated receptor-2, in human corneal epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3530.
- [31] Flynn CM, Garbers Y, Düsterhöft S, Wichert R, Lokau J, Lehmann CHK, Dudziak D, Schröder B, Becker-Pauly C, Rose-John S, Aparicio-Siegmund S, Garbers C. Cathepsin S provokes interleukin-6 (IL-6) trans-signaling through cleavage of the IL-6 receptor *in vitro*. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21612.
- [32] De Mingo Pulido Á, de Gregorio E, Chandra S, Colell A, Morales A, Kronenberg M, Marí M. Differential role of cathepsins S and B in hepatic APC-mediated NKT cell activation and cytokine secretion. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 391.

The replication of Seneca Valley virus in IBRS-2 cells was inhibited by cathepsin S

Xijuan Shi, Ting Zhang, Bo Yang, Chaochao Shen, Dajun Zhang, Xuehui Chen, Huimei Cui, Xingguo Yuan, Dengshuai Zhao, Keshan Zhang*, Haixue Zheng*, Xiangtao Liu

State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agriculture Science, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] The purpose was to explore the effect of porcine cathepsin S (cathepsin S, CTSS) on SVV (Seneca Valley virus, SVV) replication. [Methods] IBRS-2 cells were infected with SVV, and the regulation of endogenous CTSS expression by SVV infection was investigated by RT-qPCR at transcriptional levels. The effect of SVV infection on CTSS enzyme activity was determined by ELISA. The regulatory effects of overexpressed CTSS on SVV replication and antiviral cytokines induced by SVV were detected by Western blotting (WB) and RT-qPCR. The specific siRNA for CTSS was synthesized and the interference effect of siRNA on CTSS and the effect of CTSS interference on SVV replication were detected by WB and RT-qPCR. [Results] The expression of endogenous CTSS and the activity of CTSS enzyme were markedly up-regulated in IBRS-2 cells infected with SVV. SVV replication in IBRS-2 cells was significantly inhibited and the expression of host antiviral cytokines host antiviral cytokines was up-regulated by CTSS overexpression. siRNA-2947 down-regulate the expression of endogenous CTSS to promote SVV replication. [Conclusion] CTSS inhibits SVV replication by enhancing the up-regulated expression of host antiviral cytokines. This study provided the reference basis for further exploring the role and mechanisms of host CTSS in anti-SVV innate immune response.

Keywords: cathepsin S, Seneca Valley virus, IBRS-2 cell, antiviral function

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31972684), by the Research and Product Development of Key Technologies for Emergency Prevention and Control of Newly Developed Seneca Virus (19ZDNA001) and by the Collaborative Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (ZDRW202006)

*Corresponding authors. Keshan Zhang, Tel: +86-931-8342086, Fax: +86-931-8342052, E-mail: zks009@126.com; Haixue Zheng, Tel: +86-931-8343307, Fax: +86-931-8342052, E-mail: zhenghaixue@caas.cn

Received: 20 January 2021; Revised: 16 April 2021; Published online: 4 August 2021