DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20220104

非洲猪瘟病毒蛋白调控Ⅱ型干扰素信号通路的新机制

张敬，李丹，郑海学*

（中国农业科学院兰州兽医研究所，甘肃 兰州 730046）

【摘要】非洲猪瘟病毒（African Swine Fever Virus，ASFV）是一种大型DNA病毒，对家猪具有高度传染性和致病性，死亡率高达100%。然而，ASFV如何抑制JAK-STAT1信号传导以逃避免疫反应仍不清楚。在这项研究中，我们发现ASFV编码的蛋白MGF-505-7R抑制干扰素γ（Interferon γ，IFN-γ）介导的JAK-STAT1信号传导。从机制上讲，发现MGF-505-7R与JAK1和JAK2相互作用并介导二者的降解。进一步研究表明，MGF-505-7R分别通过上调E3泛素连接酶RNF125的表达和抑制Hes5的表达来促进JAK1和JAK2的降解。与野生型ASFV相比，缺失MGF-505-7R的ASFV始终诱导高水平的IRF1表达，并在原代猪肺泡巨噬细胞和猪中表现出复制受损。此外，缺失MGF-505-7R减弱了ASFV的毒力。因此，我们得出结论，敲除MGF-505-7R可作为开发针对ASFV的减毒疫苗的策略。

【关键词】非洲猪瘟病毒；疫苗；免疫抑制；MGF-505-7R

中图分类号：S855.3　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965(2022)01-0032-06

Novel mechanism of African swine fever virus protein regulating type Ⅱ interferon signaling pathway

Zhang Jing, Li Dan, Zheng Haixue*

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China)

【**Abstract**】African swine fever virus (ASFV) is a large DNA virus that is highly contagious and pathogenic in domestic pigs with a mortality rate up to 100%. However, how ASFV suppresses JAK-STAT1 signaling to evade the immune response remains unclear. In this study, we found that the ASFV-encoded protein MGF-505-7R inhibited proinflammatory IFN-γ-mediated JAK-STAT1 signaling. Mechanistically, MGF-505-7R was found to interact with JAK1 and JAK2 and mediate their degradation. Further study indicated that MGF-505-7R promoted degradation of JAK1 and JAK2 by upregulating the E3 ubiquitin ligase RNF125 expression and inhibiting expression of Hes5, respectively. Consistently, MGF-505-7R-deficient ASFV induced high levels of IRF1 expression and displayed compromised replication both in primary porcine alveolar macrophages and pigs compared with wild-type ASFV. Furthermore, MGF-505-7R deficiency attenuated the virulence of the ASFV. Thus, we conclude that deletion of MGF-505-7R may serve as a strategy to develop attenuated vaccines against the ASFV.

【**Keywords**】ASFV; The vaccine; Immunosuppression; MGF-505-7R

收稿日期：2022-01-07；**修回日期**：2022-03-09

基金项目：甘肃省科技重大专项(20ZD7NA006)；国家重点研发计划项目(2018YFC0840402)，国家自然科学基金项目(31941002)，中国农业科学院基础科学研究专项(Y2019YJ07-01)

通讯作者：郑海学（1979-），男，河南信阳人，博士生导师，主要从事口蹄疫与非洲猪瘟等新发病的基础理论和防控技术研究。E-mail：haixuezheng@163.com

非洲猪瘟病毒（African Swine Fever Virus, ASFV）是一种家猪致病性 DNA 虫媒病毒，死亡率接近100%[1]。ASFV 感染巨噬细胞并拮抗宿主先天免疫反应以增强其致病性。该病毒在非洲、欧洲和亚洲不断传播，迄今已爆发 160 多次[2-5]。该病首先于1921 年在肯尼亚爆发，随后在整个非洲的家猪和野猪中广泛流行。20 世纪 50 年代传入欧洲，整个欧洲用了 40 年消除该病。然而，该病自 2007 年再次从东非传入格鲁吉亚，随后便广泛在东欧散播，并于 2017 年传入俄罗斯远东地区伊尔库斯克。2018 年中国首次爆发非洲猪瘟（African Swine Fever, ASF），目前尚无预防 ASFV 感染的疫苗和治疗 ASFV 感染性疾病的药物[6]。因此，ASF 的传播给各个国家的养猪业和生态系统带来了巨大的经济损失[7]。

ASFV 是一种大型二十面体 DNA 病毒，病毒颗粒的直径在 260~300 nm 之间。包含一个线性 dsDNA 基因组 (170~190 kbp)，编码 165 个基因，包括 68 个结构蛋白和超过 100 个非结构蛋白[8]。据研究[9]，有近 150 种病毒蛋白在 ASFV 感染的巨噬细胞中表达，其中包括参与病毒复制、病毒-宿主相互作用和宿主先天免疫反应调节的蛋白（见图 1）。例如，据信 MGF360 和 MGF505/530 可抑制 I 型干扰素及其下游抗病毒干扰素刺激基因的诱导[10]。ASFV 的 DP96R 靶向 TBK1 和 IKKβ，以负向调节抗病毒细胞因子的诱导[11]。此外，ASFV Armenia/07 通过在感染期间削弱 STING 激活来抑制 cGAS-STING 通路[12]。最近，有研究[13]发现 ASFV MGF-505-7R 与 STING 相互作用并通过促进自噬相关蛋白 ULK1 的表达将其降解。由于大多数研究都集中在 ASFV 如何拮抗 I 型干扰素反应，Ⅱ型干扰素信号通路在 ASFV 逃避宿主先天免疫反应中的作用仍不清楚。因此，我们探索了 ASFV 是否能调控Ⅱ型干扰素信号通路及其调控分子机制。

Ⅱ型干扰素信号通路是天然免疫系统的主要组

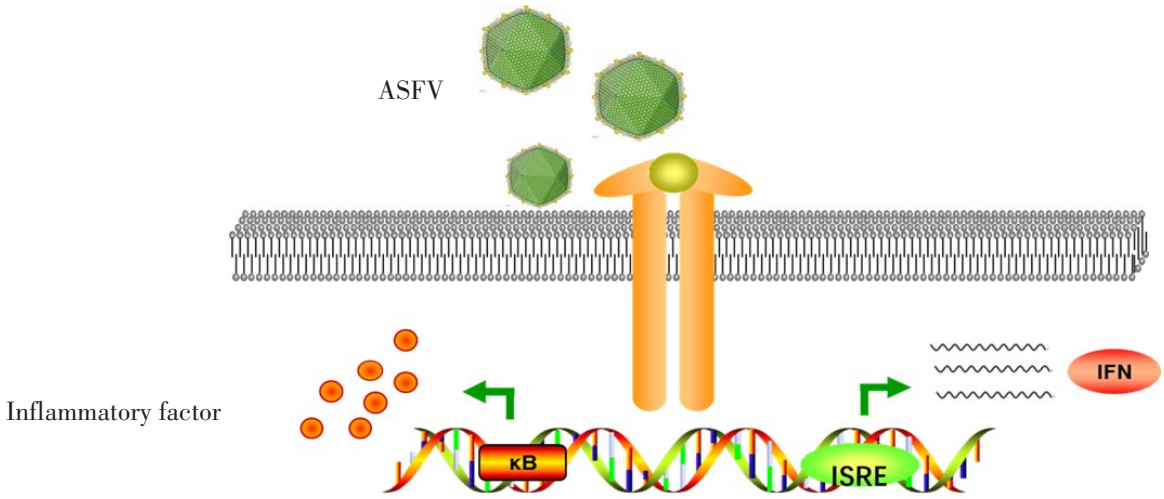


图 1　ASFV 入侵宿主调节干扰素和炎性因子

成部分，在宿主抵抗病原微生物中发挥了重要的作用。当外界的 IFN-γ 与受体 IFNGR 结合后，IFN-γ 与 IFNGR1 和 IFNGR2 形成受体复合物。二者的结合引起 IFNGR 发生寡聚化，导致与之相耦联的 JAK1/2 磷酸化并被激活。活化的 JAK1/2 磷酸化 IFNGR1 胞质端第 440 位酪氨酸，受体磷酸化后发生构象改变，为 STAT1 提供结合位点。随后，JAK1 和 JAK2 的激活协同导致 STAT1 磷酸化。磷酸化的 STAT1 形成同源二聚体，进入细胞核调控靶基因的表达从而诱导参与免疫应答和细胞增殖的各种基因的转录。

1　ASFV 抑制 IFN-γ 诱导的下游基因转录

为了探索 ASFV 对 IFN-γ 的影响，我们用猪肺泡巨噬细胞（Porcine Alveolar Macrophage，PAM）感染 ASFV 并用 IFN-γ 处理，并通过 RT-PCR 分析下游基因的转录。结果发现，感染后 IFN-γ 处理的 PAM 细胞中 Stat1、Cxcl9、Irf1 和 Gbp1 基因转录较 IFN-γ 处理后显著减少。此外，与 IFN-γ 处理的细胞相比，ASFV 感染降低了 PAM 细胞中 IFN-γ 诱导的 STAT1 磷酸化。这些结果表明，ASFV 能负调控 IFN-γ 诱导的信号通路。

2 ASFV MGF-505-7R 是调控 IFN-γ 信号通路的关键基因

2.1 ASFV MGF-505-7R 负调控 IFN-γ 信号通路

以往研究已经表明，IFN-γ 刺激诱导了 IFN 调节因子 1 (Interferon Regulatory Factor 1，IRF1) 基因的表达[14]。为了鉴定参与 IFN-γ 触发信号调节的 ASFV 蛋白，利用人胚胎肾细胞（293T）中的报告基因检测筛选了 168 个可能抑制 IRF1 启动子的单个 ASFV 基因。结果表明，ASFV MGF-505-7R 呈剂量依赖的方式抑制了由 IFN-γ 诱导的 IRF1 启动子的激活。此外，ASFV MGF-505-7R 的过表达抑制了 293T 细胞中 IFN-γ 诱导的 STAT1 磷酸化。这些数据表明，ASFV MGF-505-7R 蛋白负向调节 IFN-γ 触发的信号通路。

2.2 ASFV MGF-505-7R 与 JAK1 和 JAK2 相互作用

为了确定 ASFV MGF-505-7R 是否调节 IFN-γ 信号通路中的关键分子。在 293T 细胞中进行了免疫共沉淀实验。结果显示，ASFV MGF-505-7R 与 JAK1 和 JAK2 相互作用，但不与 STAT1 相互作用。为了确定在病毒感染后是否存在相同的情况，在病毒感染 PAM 细胞后进行免疫共沉淀实验，结果表明，MGF-505-7R 确实与受感染的 PAM 细胞中的内源性 JAK1 和 JAK2 蛋白相互作用。综上所述，这些发现证实 JAK1 和 JAK2 与 ASFV MGF-505-7R 蛋白相互作用。

2.3 MGF-505-7R 通过上调 RNF125 表达降解 JAK1

我们接下来研究了 ASFV MGF-505-7R 如何在 IFN-γ 诱导的信号传导中调节 JAK1。通过使用 MGF-505-7R 和 JAK1 的重组质粒共转染 293T 细胞，验证 MGF-505-7R 是否影响 JAK1 的表达。结果显示 MGF-505-7R 过表达降低了 JAK1 的表达并呈剂量依赖性。为了探索 ASFV 感染对 JAK1 表达的影响，用 ASFV 感染 PAM 细胞指定的时间并使用各自的抗体检测。结果表明，ASFV 感染抑制了 PAM 中 JAK1 蛋白的表达。在病毒感染期间至少通过三种途径损害宿主细胞蛋白质功能，包括泛素-蛋白酶体、溶酶体和自噬体途径。为了剖析 MGF-505-7R 影响 JAK1 稳定性的机制，我们用指定的质粒转染 293T 细胞，并用各种蛋白质降解途径抑制剂处理细胞。MGF-505-7R 或 ASFV 介导的 JAK1 降解被蛋白酶体抑制剂 MG132 完全抑制，但不能被溶酶体抑制剂 NH_4Cl 或自噬体抑制剂 3-MA 抑制。以上结果表明 MGF-505-7R 通过蛋白酶体途径降解 JAK1，因此，接下来检查了 MGF-505-7R 是否促进 JAK1 泛素化增加，在瞬时转染和免疫共沉淀实验中，发现过表达 MGF-505-7R 和感染 ASFV 增加了 JAK1 泛素化。哪个 E3 泛素连接酶参与 MGF-505-7R 介导的 JAK1 的降解？有研究报告 JAK1 与 E3 泛素连接酶 RNF125 相互作用 [15]；因此，我们研究 RNF125 是否参与 MGF-505-7R 介导 JAK1 的降解。为了验证这种可能性，利用感染和未感染 ASFV 的 PAM 细胞进行免疫共沉淀，结果表明，MGF-505-7R 与 RNF125 相互作用。同时也发现在感染 ASFV 的 PAM 细胞中 RNF125 的表达升高以剂量依赖性方式，而 RNF125 抑制 JAK1 的表达。此外，沉默 RNF125 后 MGF-505-7R 对 JAK1 的降解消失。这些数据表明 MGF-505-7R 通过上调 RNF125 表达来降解 JAK1（见图 2）。

2.4 MGF-505-7R 通过下调 Hes5 表达降解 JAK2

通过上面的研究我们发现，MGF-505-7R 不仅能降解 JAK1 同时还能降解 JAK2，MGF-505-7R 如何在 IFN-γ 诱导的信号传导中调节 JAK2？利用 2.3 中的三种抑制剂处理后发现 MGF-505-7R 或 ASFV 介导的 JAK2 降解被三种抑制剂（MG132、NH_4Cl、3-MA）抑制。MGF-505-7R 是否在 JAK2 的转录过程中发挥作用？据报道，转录因子 Hes5 与 JAK2 相互作用并增加其表达[16]，因此，我们研究 Hes5 是否参与 MGF-505-7R 介导 JAK2 的降解。为了验证这种可能性，利用感染和未感染 ASFV 的 PAM 细胞进行免疫共沉淀，结果表明，MGF-505-7R 与 Hes5 相互作用。同时也发现在感染 ASFV 的 PAM 细胞中 Hes5 的表达细胞被抑制并剂量依赖性，而 Hes5 促进 JAK2 的表达。此外，沉默 Hes5 后 MGF-505-7R 对 JAK2 的降解消失。这些数据表明 MGF-505-7R 通过下调 Hes5 表达来降解 JAK2（见图 2）。

2.5 缺失 MGF-505-7R 促进 IFN-γ 信号通路激活

为了进一步验证上述结果，我们构建了 MGF-505-7R（ASFV-Δ7R）缺失毒株。随后发现 ASFV 和 ASFV-Δ7R 在非免疫细胞 MA-104 中的复制相近。在感染 ASFV-Δ7R 后，下游分子 STAT1 的磷酸化较感染 ASFV 后有显著的升高，JAK1/2 和 Hes5 在感染 ASFV-Δ7R 后较感染 ASFV 后也有不同程度的升高，而 RNF125 在感染 ASFV-Δ7R 后较感染 ASFV 后表达减弱。为了证明 RNF125 和 Hes5 是 MGF-505-7R 降解 JAK1/2 必需的，通过免疫共沉

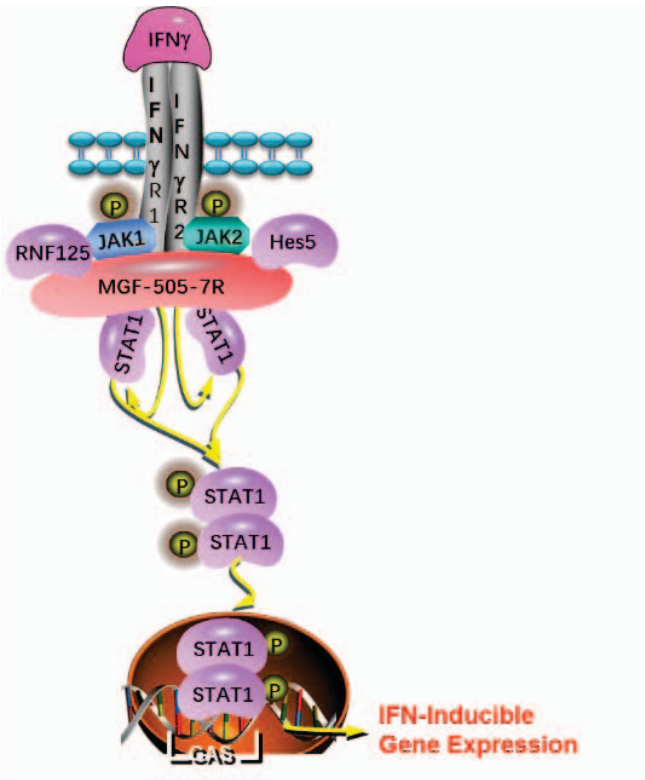


图2　ASFV MGF-505-7R抑制IFN-γ诱导的JAK1/2的表达

淀实验发现，在感染ASFV-Δ7R后，JAK1-RNF125和JAK2-Hes5的二聚体的结合被抑制。这些结果表明，与ASFV相比，ASFV-Δ7R感染增强了IFN-γ信号通路激活。

3　缺失MGF-505-7R为ASFV疫苗提供理论依据

为了研究缺失MGF-505-7R（ASFV-Δ7R）在猪体内是否减弱病毒毒性，我们给猪肌肉注射了10个50%红细胞吸附（Hemadsorption，HAD）剂量(HAD 50)的基因缺失病毒或野生型ASFV，结果显示，所有接种野生型ASFV的猪均在15天内死亡，而接种ASFV-Δ7R的猪在3周观察期内均存活并保持健康。接种野生型ASFV的所有7头猪均出现发热症状，最高温度达到41.6°C。感染ASFV-Δ7R病毒的猪的血液中病毒载量远低于感染野生型ASFV的猪。感染ASFV-Δ7R病毒的猪在感染后几天比感染野生型ASFV的猪产生更高水平的血清CXCL9和IFN-γ。注射ASFV猪的大体器官病理变化明显比注射ASFV-Δ7R的猪严重。我们还发现感染ASFV-Δ7R病毒的存活猪在感染后期表现出更高水平的p30抗体。表明减毒的ASFV-ΔMGF-505-7R病毒诱导了更好的抗体反应。这些数据表明，ASFV-Δ7R的致病性在猪中显著减弱，并且在10个HAD 50时对猪完全非致死性。

4　总结和展望

迄今为止，多项研究表明ASFV通过调节I型IFN逃避宿主先天免疫反应[17-19]。然而，IFN-γ信号通路在ASFV逃避宿主先天免疫反应中的作用仍不清楚。众所周知，大多数Ⅱ型IFN表达是由入侵病原体诱导的[20]。Ⅱ型IFN在感染的早期阶段由NK细胞或巨噬细胞[21,22]，在后期由活化的T淋巴细胞产生[23]，或者通过受体介导的刺激（通过T或NK细胞受体）或与早期产生的细胞因子有关，例如IL-12、IL-18和IFN-α/β[22]。尽管其他细胞可以在感染后期被感染，但ASFV主要在感染早期的单核细胞和巨噬细胞中复制[24,25]。根据目前的研究结果，我们推测ASFV感染与Ⅱ型IFN反应之间存在相关性。

控制ASF的主要障碍之一是没有合适的商业化疫苗。使用减毒株是目前开发有效ASF疫苗的最合理方法。与使用自然减毒分离株相比，通过基因编辑合理开发减毒株是一种有效安全的替代方法。通过基因编辑敲除单个基因或一组基因已被证明是针对亲本病毒攻击的有效方法[26-32]。先前的几

项研究表明，通过基因操作产生减毒的 ASFV 重组病毒是一种有效的疫苗开发方法。例如：敲除 9GL (B119L)基因、敲除 MGF360 和 530 中的一组六个基因或删除 I177L 已被证明可以完全抵消高毒力 ASFV Georgia 分离株的毒力[28, 31-33]。我们的研究发现 ASFV MGF-505-7R 的缺失显著减弱了猪体内的病毒。这一发现为ASFV疫苗的开发提供了理论依据。

综上所述，ASFV MGF-505-7R 通过抑制 IFN-γ 介导的 JAK1 和 JAK2 激活来促进 ASFV 的复制，因此MGF-505-7R是 ASFV 致病性的关键因素。本文的研究为DNA 病毒的免疫逃避机制提供了重要线索。将 MGF-505-7R 鉴定为ASFV致病性的关键因素，为开发ASFV 减毒疫苗提供了可能性。

参 考 文 献

[1] ZHANG D Q, LIU R Q, ZHANG X F, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China[J]. Emerging Microbes & Infections, 2019, 8(1): 438-447.

[2] WEN X X, HE X J, ZHANG X, et al. Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of African swine fever virus in China in 2018[J]. Emerging Microbes & Infections, 2019, 8(1): 303-306.

[3] LE V P, JEONG D G, YOON S W, et al. Outbreak of African swine fever, vietnam, 2019[J]. Emerging Infectious Diseases, 2019, 25(7): 1433-1435.

[4] GE S, LI J, FAN X, et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018[J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(11): 2131-2133.

[5] KIM H J, CHO K H, LEE S K, et al. Outbreak of African swine fever in South Korea, 2019[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2020, 67(2): 473-475.

[6] THOMSON G R, BIGALKE R D. The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa [J]. 1985 Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 1985, 52(3): 201-209.

[7] TAO D P, SUN D P, LIU Y M, et al. One year of African swine fever outbreak in China[J]. Acta Tropica, 2020, 211: 105602.

[8] AFONSO C L, DICCONE M E, ZAFFUTO K M, et al. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response[J]. Journal of Virology, 2004, 78(4): 1858-1864.

[9] DIXON L K, ISLAM M, NASH R, et al. African swine fever virus evasion of host defences[J]. Virus Research, 2019, 266: 25-33.

[10] GOLDING J P, GOATLEY L, GOODBOURN S, et al. Sensitivity of African swine fever virus- to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505[J]. Virology, 2016, 493: 25-33.

[11] WANG X X, WU J, WU Y T, et al. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 506(3): 437-443.

[12] GARCÍA-BELMONTE R, PÉREZ-NÙÑEZ D, PITTAU M, et al. African swine fever virus armenia/07 virulent strain controls interferon beta production through the cGAS-STING pathway[J]. Journal of Virology, 2019, 93 (12): e02298-18.

[13] LI D, YANG W P, LI L L, et al. African swine fever virus MGF-505-7R negatively regulates cGAS-STING-mediated signaling pathway[J]. The Journal of Immunology, 2021, 206(8): 1844-1857.

[14] SIMS S H, CHA Y, ROMINE M F, et al. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter[J]. Molecular and Cellular Biology 1993, 13(1): 690-702.

[15] KIM H, FREDERICK D T, LEVESQUE M P, et al. Downregulation of the ubiquitin ligase RNF125 underlies resistance of melanoma cells to BRAF inhibitors via JAK1 deregulation[J]. Cell Reports, 2015, 11(9): 1458-1473.

[16] KAMAKURA S, OISHI K, YOSHIMATSU T, et al. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling[J]. Nature Cell Biology, 2004, 6: 547-554.

[17] GOLDING J P, GOATLEY L, GOODBOURN S, et al. Sensitivity of African swine fever virus to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505[J]. Virology, 2016, 493: 154-161.

[18] AFONSO C L, PICCONE M E, ZAFFUTO K M, et al. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response[J]. J Virol, 2004, 78 (4): 1858-1864.

[19] WANG X X, WU J, WU Y T, et al. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 506(3): 437-443.

[20] CORREIA S, VENTURA S, PARKHOUSE R M.

Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV[J]. Virus Res, 2013, 173 (1): 87-100.

[21] DARWICH L, COMA G, PEÑA R, et al. Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL) -12 plus IL-18[J]. Immunology, 2009, 126(3): 386-393.

[22] MALMGAARD L. Induction and regulation of IFNs during viral infections[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2004, 24(8): 439-454.

[23] BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, et al. Cellular responses to interferon-gamma[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 749-795.

[24] PÉREZ J, RODRÍGUEZ F, FERNÁNDEZ A, et al. Detection of African swine fever virus protein VP73 in tissues of experimentally and naturally infected pigs[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1994, 6 (3): 360-365.

[25] RAMIRO-IBÁÑEZ F, ESCRIBANO J M, ALONSO C. Application of a monoclonal antibody recognizing protein p30 to detect African swine fever virus-infected cells in peripheral blood[J]. J Virol Methods, 1995, 55(3): 339-345.

[26] LEWIS T, ZSAK L, BURRAGE T G, et al. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine[J]. J Virol, 2000, 74(3): 1275-1285.

[27] MOORE D M, ZSAK L, NEILAN J G, et al. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine[J]. J Virol, 1998, 72(12):10310-10315.

[28] O'DONNELL V, HOLINKA L G, KRUG P W, et al. African swine fever virus georgia 2007 with a deletion of virulence-associated gene 9GL (B119L), when administered at low doses, leads to virus attenuation in swine and induces an effective protection against homologous challenge[J]. J Virol, 2015, 89(16): 8556-8566.

[29] ZSAK L, LU Z, KUTISH G F, et al. An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene[J]. J Virol, 1996, 70(12): 8865-8871.

[30] ZSAK L, CALER E, LU Z, et al. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine[J]. J Virol, 1998, 72(2): 1028-1035.

[31] BORCA M V, RAMIREZ-MEDINA E, SILVA E, et al. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain[J]. J Virol, 2020, 94(7): e02017-19.

[32] O'DONNELL V, HOLINKA L G, GLADUE D P, et al. African swine fever virus georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus[J]. J Virol, 2015, 89(11): 6048-6056.

[33] O'DONNELL V, RISATTI G R, HOLINKA L G, et al. Simultaneous deletion of the 9GL and UK genes from the African swine fever virus georgia 2007 isolate offers increased safety and protection against homologous challenge[J]. J Virol, 2017, 91(1): e01760-16.