

# 流感病毒非结构蛋白对 TBK-1 的抑制作用

周国平 陈吉庆 吴升华 陈晓禹 陈辉

**【摘要】目的** 流感病毒非结构蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1)抑制干扰素调节因子(interferon regulatory factors, IRF) 3 的机制未明, TANK 结合激酶 1(TANK-binding kinase 1, TBK-1)能使 IRF-3 活化, 研究 NS1 是否对 TBK-1 有抑制作用。**方法** 亚克隆 IRF-3、NS1 和 TBK-1 至 pcDNA3.1-flag 构建 flag-IRF-3、flag-NS1 和 flag-TBK-1 质粒; 用 TBK-1 对 TBK-1 + NS1 以及 IRF-3 + TBK-1 对 IRF-3 + TBK-1 + NS1 两组实验, 分别共转染人胚胎肾上皮 293 细胞, 用抗 flag 抗体作 Western blot 分析, 鉴定 IRF-3、NS1 和 TBK-1 的表达, 观测 NS1 对 TBK-1 活化 IRF-3 的抑制作用; 荧光素酶功能分析方法观测 NS1 对 TBK-1 诱导的干扰素  $\beta$ (IFN- $\beta$ ) 启动子-pGL-2B 荧光素酶活性的影响。**结果** IRF-3、NS1 和 TBK-1 均有高表达。TBK-1 能使 IRF-3 活化, Western blot 分析显示: TBK-1 转染的细胞出现迁移较慢的 IRF-3 III 和 IV 型, NS1 共转染可使 IRF-3 III 和 IV 型几乎消失; 荧光素酶功能分析显示, NS1 能抑制 TBK-1 活化内源性 IRF-3 所诱导的 IFN- $\beta$  启动子活性, 约为对照组的 1/4, TBK-1 + IRF-3 共转染可使 IFN- $\beta$  启动子活性增高近 1000 倍, NS1 可使 TBK-1 活化外源性 IRF-3 所诱导的 IFN- $\beta$  启动子的活性降至对照组的约 1/2 至 1/3。**结论** 流感病毒 NS1 可抑制 TBK-1 所致的 IRF-3 活化, 功能分析提供了 NS1 显著抑制 TBK-1 诱导的 IFN- $\beta$  启动子活性的证据, 首次阐明了流感病毒 NS1 抑制 IRF-3 因而抑制干扰素  $\beta$  产生的机制之一是通过 TBK-1 信号通路所取得, 为新的抗病毒治疗及新药开发战略提供了基础。

**【关键词】** 干扰素调节因子 3(IRF-3); TANK 结合激酶 1(TBK-1); 非结构蛋白 1(NS1)

**The inhibitory function of influenza nonstructural protein 1 to TBK-1** ZHOU Guo-ping, CHEN Ji-qing, WU Sheng-hua, CHEN Xiao-yu, CHEN Hui. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**Corresponding author:** ZHOU Guo-ping, Email: gpzhou2003@yahoo.com.cn

**【Abstract】Objective** To explore whether NS1 is able to inhibit the activity of TBK-1. **Methods** IRF-3, NS1 and TBK-1 were subcloned into pcDNA3.1-flag respectively. TBK-1 vs TBK-1 + NS1 were transfected into HEK 293 cells. Cell extracts were analysed by Western blot and then probed with monoclonal flag antibody. Luciferase assay was carried out by co-transfection of reporter plasmid, interferon- $\beta$  promoter-pGL-2B, with two groups of cDNA expression plasmids: TBK-1 vs TBK-1 + NS1; and IRF-3 + TBK-1 vs IRF-3 + TBK-1 + NS1. Cells were collected and assayed for luciferase activity 24 hours after transfection. As positive control, cells were transfected with or without NS1 and then infected with Sendai virus for 8 hours after 16 hours' transfection. **Results** IRF-3, NS1 and TBK-1 were strongly expressed. TBK-1 can activate IRF-3, NS1 inhibited the luciferase activity of IFN- $\beta$  promoter. TBK-1 and IRF-3 co-transfection induced a 1000-fold stimulation of IFN- $\beta$  promoter. NS1 induced a 1/2 to near 1/3 inhibition of luciferase activity of IFN- $\beta$  promoter compared with control. **Conclusion** Influenza NS1 protein can inhibit the phosphorylation of IRF-3 activated by TBK-1. Functional analysis provides evidence that NS1 can significantly inhibit the luciferase activity of IFN- $\beta$  promoter induced by TBK-1. The results have important impact on antiviral therapeutic strategy and pharmaceutical development.

**【Key words】** Interferon regulatory factor 3(IRF-3); TANK-binding kinase 1(TBK-1); Nonstructural protein 1(NS1)

流行性感冒病毒在人群中的流行估计可导致全世界每年 50 万人的死亡<sup>[1]</sup>, 它似乎有无穷的逃避人类机体免疫反应的能力, 因而是研究病原与机体相互作用的经典研究工具, 专家们担心禽流感病毒 H5N2 将来可能会进化或重组成能在人群中传播的

病毒而引起大流行<sup>[2]</sup>, 所以对流感病毒基因分子结构与人体防御系统相互作用的研究应提上日程。流感病毒 A 有一负链 RNA 基因组, 编码 8 个 RNA 片段和由于不同拼接所致的 10 或 11 种蛋白, 第 8 片段可编码一种蛋白, 称为非结构蛋白 1(nonstructural protein1, NS1), NS1 蛋白通过多个机制抑制宿主的抗病毒反应, 这些机制包括抑制 PKR 激酶, 通过阻止 NF- $\kappa$ B 和干扰素调节因子(interferon regulatory fac-

作者单位: 210029 南京医科大学第一附属医院儿科

通讯作者: 周国平, Email: gpzhou2003@yahoo.com.cn, 电话: 025-83718836-8401

tors, IRF)3 的激活而阻断干扰素  $\beta$  的产生<sup>[3]</sup>。一种名为 PR8 的病毒(野生型流感病毒 A)能抑制 IRF-3 的激活及 IRF-3 所诱导的 IFN- $\beta$  mRNA 的产生,而缺失 NS1 的 delNS1 同源病毒却无这些作用。NS1 与 H5N1 流感病毒对干扰素和肿瘤坏死因子  $\alpha$  的耐受相关<sup>[4]</sup>,然而 NS1 抑制 IRF-3 激活的机制尚未阐明。

最近 I $\kappa$ B 激酶(I $\kappa$ B kinase, IKK)相关通路在干扰素抗病毒中的作用研究方面取得突破性成果<sup>[5]</sup>,首次证明 IKK 相关通路 TBK-1 和 IKK $\epsilon$  是病毒激活激酶的成分,可磷酸化从而活化 IRF-3 和 IRF-7。TNF 受体相关因子(TNF receptor associated factor, TRAF)家族成员相关的 NF- $\kappa$ B 激活因子(TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator, TANK)结合激酶 1(TBK-1),与 IKK $\epsilon$  均为新发现的 IKK 成员,研究发现它可磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  的 36 位丝氨酸而不是 32 位丝氨酸<sup>[6]</sup>。TBK-1 在各组织中广泛分布,而 IKK $\epsilon$  主要分布在淋巴组织。由于 TBK-1 可激活 IRF-3,而 NS1 能抑制 IRF-3 的激活,本研究试图探索 NS1 是否通过抑制 TBK-1 这一信号通路来抑制 IRF-3 的激活。

### 材料和方法

**质粒构建:** TBK-1 cDNA 购自 Origene 公司,用作 PCR 模板,特异性的引物为:上游引物 5'-GCGGC-CGCGATGCAGAGCACTTCTAATCATC-3',下游引物 5'-TCTAGAGCTAAAGACAGTCAACGTTGC-3', IRF-3 和 NS1 的 PCR 方法参照文献[3,7],NS1 的 PCR 模板来自野生型流感病毒 A/PR8 病毒,亚克隆 IRF-3、NS1 和 TBK-1 PCR 产物至 pcDNA3.1-flag 构建 flag-IRF-3、flag-NS1 和 flag-TBK-1 质粒。

**细胞培养:** 人胚胎肾(HEK)293 细胞用修饰的培养液(Gibco-BRL 公司)加 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素培养。

**转染和荧光素酶分析:** 在布满 60% ~ 80% HEK293 细胞的 12 孔培养板中用磷酸钙共沉淀方法进行转染,用于荧光素酶功能分析的报告质粒为 IFN- $\beta$ -PGL-3 报告子(萤火虫荧光素酶,实验报告子)和 pRLTK 报告子(Renilla-荧光素酶,内对照报告子),每孔用 10 ng pRLTK 报告子,50 ng IFN- $\beta$ -PGL-3 报告子与 0.1  $\mu$ g 表达质粒 pcDNA3.1-flag-TBK-1 和/或 0.1  $\mu$ g pcDNA3.1-flag-IRF-3 和/或 0.5  $\mu$ g、1.5  $\mu$ g 或 2.0  $\mu$ g pcDNA3.1-flag-NS1 共转染,转染后 24 h 收集细胞,表达质粒分组有 2 种方法:①检测 NS1 对 TBK-1 活化内源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性:TBK-1 和 TBK-1 + NS1;②检测 NS1 对 TBK-1 活

化外源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性:IRF-3 + TBK-1 和 IRF-3 + TBK-1 + NS1,转染 pcDNA 3.1-flag 或 0.5  $\mu$ g、1.5  $\mu$ g pcDNA3.1-flag-NS1 后 16 h,感染 Sendai 病毒(SV,血凝单位 25 HAU/10<sup>6</sup>)8 h,然后收集细胞,用荧光素酶分析仪(Promega 公司)按厂家说明做活性分析。根据需要可用 pcDNA3.1-flag 补充使转染的总 DNA 维持一致。部分转染细胞用于 Western blot 鉴定蛋白表达。

**Western blot 分析:** 为证实 pcDNA3.1-flag-TBK-1, pcDNA3.1-flag-IRF-3 以及 pcDNA3.1-flag-NS1 的表达,用转染细胞的全细胞提取物 20  $\mu$ g 上样于含 10% 的聚丙烯酰胺的凝胶做 SDS-PAGE,经硝酸纤维素膜(Amersham 公司)转移和膜封闭后,用 1:3000 抗 flag 单克隆抗体 M2(Sigma 公司)室温孵育 1 h, PBS 洗膜,10 min  $\times$  4,然后与 1:2500 山羊抗小鼠抗体进行反应,反应用加强的化学发光(ECL)测定系统(Amersham 公司)按说明曝光观测。

### 结 果

**1. NS1 对磷酸化的 IRF-3 III 和 IV 型的作用:** IRF-3、NS1 和 TBK-1 均有高表达。TBK-1 能使 IRF-3 活化,表现为用抗 flag 的 Western blot 分析,显示用 TBK-1 转染的细胞出现迁移较慢的磷酸化 IRF-3 III 和 IV 型,NS1 共转染可使 IRF-3 III 和 IV 型几乎消失(图 1)。

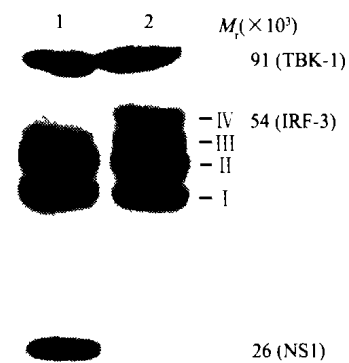


图 1 NS1 对 TBK-1 所诱导的磷酸化 IRF-3 III 和 IV 型的作用

Fig 1. The effect of NS1 to phosphorylation form III and IV of IRF-3 resolved by SDS-PAGE in cells transfected with TBK-1 in Western blot analysis by  $\alpha$ -flag

1: IRF-3 + TBK-1 + NS1; 2: IRF-3 + TBK-1

**2. NS1 对 TBK-1 活化内源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子荧光素酶功能分析:** 如图 2 所示, NS1 能抑制 TBK-1 活化内源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性,约为对照组的 1/4, NS1 对 SV 所诱

导的 IFN- $\beta$  启动子活性的抑制作用更明显,约为对照组的 1/8, TBK-1 活化内源性 IRF-3 使诱导的 IFN- $\beta$  启动子活性增高 397 倍。

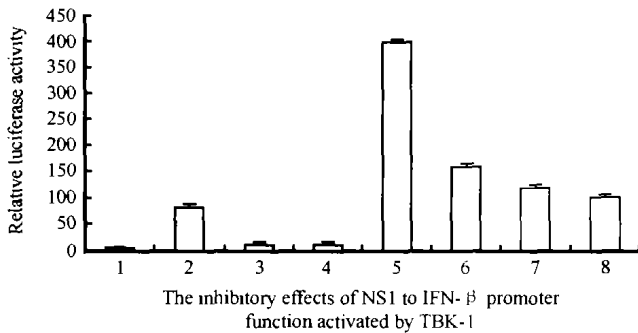


图 2 NS1 对 TBK-1 活化内源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子荧光素酶的功能分析

Fig 2. The functional luciferase activity analysis of inhibition of NS1 to IFN- $\beta$  promoter, which was induced by endogenous IRF-3 activated by TBK-1

1: Vector; 2: SV; 3: SV + 0.5  $\mu$ g NS1; 4: SV + 1.5  $\mu$ g NS1; 5: TBK-1; 6: TBK-1 + 0.5  $\mu$ g NS1; 7: TBK-1 + 1.5  $\mu$ g NS1; 8: TBK-1 + 2.0  $\mu$ g NS1

3. NS1 对 TBK-1 活化外源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子荧光素酶功能分析: TBK-1 + IRF-3 共转染可使 IFN- $\beta$  启动子活性增高近 1000 倍, NS1 可使这种 TBK-1 活化外源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性降至对照组的约 1/2 到 1/3, NS1 的作用随 NS1 转染量的增加而增加, 呈剂量与效应关系(图 3)。

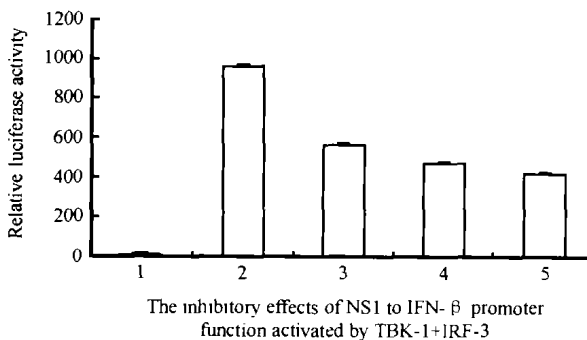


图 3 NS1 对 TBK-1 活化转染的外源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子荧光素酶功能分析

Fig 3. The functional luciferase activity analysis of inhibition of NS1 to IFN- $\beta$  promoter, which was induced by transfected extrinsic IRF-3 activated by TBK-1

1: Vector; 2: TBK-1 + IRF-3; 3: TBK-1 + IRF-3 + 0.5  $\mu$ g NS1; 4: TBK-1 + IRF-3 + 1.5  $\mu$ g NS1; 5: TBK-1 + IRF-3 + 2.0  $\mu$ g NS1

## 讨 论

细胞有通过激活干扰素系统而对入侵病毒产生

快速反应的潜力,这种反应须通过像 IRF-3 这种细胞本身具有的转录调节因子的活化所取得。IRF-3 在非感染细胞存在于细胞浆中,病毒感染后所形成的病毒活化激酶(virus-activated kinase, VAK)使 IRF-3 的 C-端的丝氨酸和苏氨酸磷酸化而使 IRF-3 发生构型改变和双聚,双聚的 IRF-3 转移至细胞核内而与有关启动子包括干扰素  $\beta$  启动子结合<sup>[8]</sup>, TBK-1 和 IKK $\epsilon$  是病毒激活激酶的成分<sup>[5]</sup>, IRF-3 在启动天然抗病毒免疫反应中的重要性近年来被人们所认识<sup>[9-12]</sup>,它是调节干扰素  $\alpha$  和  $\beta$  基因表达的关键调节因子。

病毒逃避人体免疫攻击的机制中有许多是通过攻击 IRF-3 而取得的, Foy 等<sup>[12]</sup>的研究显示,丙型肝炎 NS3/4A 丝氨酸蛋白酶阻断 IRF-3 的磷酸化和效应作用而使感染持续,用变异或抑制剂的方法打断 NS3/4A 蛋白酶可使该阻断作用减缓而恢复 IRF-3 的磷酸化,因而 NS3/4A 蛋白酶代表了一种具有双重作用的治疗靶,抑制它既可阻断病毒复制,又可恢复 IRF-3 控制丙型肝炎感染的作用。流感病毒 A 的 NS1 蛋白也可抑制 IRF-3 的磷酸化,尽管有一学说认为病毒感染时产生的双股 RNA 能激活 IRF-3,而 NS1 也能与病毒感染时产生的双股 RNA 相结合,因而 NS1 与双股 RNA 竞争而抑制 IRF-3 的激活<sup>[3]</sup>,但该学说未获普遍接受,细节也有待进一步阐明。

由于 TBK-1 能磷酸化而活化 IRF-3<sup>[5]</sup>,使我们自然联想到 NS1 是否可作用于 TBK-1 从而抑制 IRF-3? 本研究试图从 TBK-1 这一通路寻找 NS1 抑制 IRF-3 活化的机制,结果证实了 NS1 可抑制 TBK-1 所致的 IRF-3 的活化,功能分析提供了 NS1 可显著抑制 TBK-1 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性的证据,首次阐明了流感病毒 NS1 抑制 IRF-3 因而抑制干扰素  $\beta$  产生的机制之一是通过 TBK-1 信号通路所取得。由于 NS1 抑制 TBK-1 活化内源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性约为对照组的 1/4, NS1 对 SV 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性的抑制作用更明显,约为对照组的 1/8,因而推测 NS1 通过抑制 TBK-1 这一信号通路可能为 NS1 抑制 IRF-3 总作用的一部分, NS1 与 SV 病毒感染时产生的双股 RNA 相结合而抑制 IRF-3 的机制可能同时存在。

NS1 使 TBK-1 活化外源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性下降幅度较内源性 IRF-3 所诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性下降幅度低,造成这种现象的原因可能为 NS1 对 TBK-1 的抑制无放大作用,而 TBK-1 对 IRF-3 的作用却不同,即使少量的 TBK-1 也

可使过度表达的 IRF-3 大量磷酸化,本研究中已显示 TBK-1 活化内源性 IRF-3 使诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性增高 397 倍(图 2),而 TBK-1 活化外源性 IRF-3 后使诱导的干扰素  $\beta$  启动子活性增高 963 倍(图 3),与我们以前的报道一致<sup>[5]</sup>。NS1 的该作用随感染量的增加而增加,呈剂量与效应关系,这一证据也可支持上述推测。

总之,本研究首次阐明了流感病毒 NS1 蛋白抑制 IRF-3 因而抑制干扰素  $\beta$  产生的通路之一是通过 TBK-1 信号通路所取得这一新机制。这对抗病毒治疗有潜在意义,今后对易发生病毒感染者可设法提高其 TBK-1 的表达。正如其它新机制对药物学的潜在含义一样<sup>[3]</sup>,在抗病毒新药开发方面,方向之一是可设计阻止 NS1 与 TBK-1 结合的化学复合物,对于流感病毒将来可能会进化或重组能在人群中流行的病毒学监测方面<sup>[2]</sup>可关注变异的 NS1 与 TBK-1 的结合能力的改变。

#### 参 考 文 献

- Smith DJ, Lapedes AS, Jong JC, et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 2004, 305 (5682): 371-376.
- Normile D, Enserink M. Avian influenza makes a comeback, reviving pandemic worries. *Science*, 2004, 305 (5682): 321-323.
- Talon J, Horvath CM, Polley R, et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, 2000, 74 (17): 7989-7996.
- Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature Med*, 2002, 8(9): 950-954.
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, 2003, 300 (5622): 1148-1151.
- Kishore N, Huynh QK, Mathialagan S, et al. IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2. *J Biol Chem*, 2002, 277(16): 13840-13847.
- Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, et al. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 2986-2996.
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(4): 2465-2474.
- Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, et al. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*, 1998, 17: 1087-1095.
- Sato M, Tanaka N, Hata N, et al. Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett*, 1998, 425: 112-116.
- Sato M, Suemori H, Hata N, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 2000, 13: 539-548.
- Foy E, Li K, Wang C, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 2003, 300: 1145-1148.

(收稿日期:2004-08-23)

## 《中华微生物学和免疫学杂志》征订启事

《中华微生物学和免疫学杂志》为中华医学会主办。1981 年创刊,主要报道医学微生物学和免疫学方面的研究论文、简报、评论、综述、国内外学术动态、书评及消息等。

本刊辟有:细菌学、病毒学、分子微生物学、临床微生物学、疫苗学、感染免疫、基础免疫学、临床免疫学、分子免疫学、免疫遗传学、肿瘤免疫学、中药与免疫、免疫学技术、检测技术等栏目。

本刊为基础医学、生物学两学科的核心期刊,是中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据、中国医学微生物学文献数据(英文版)、中国学术期刊文摘、中国医学文摘等的来源期刊。被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、荷兰医学文摘(EM)、Medline 等国外著名检索期刊收录。

读者对象:医学微生物学和免疫学专业的科研人员、教师和卫生、防疫、检验工作者以及医学院校学生。

本刊为月刊,大 16 开,每期 80 页,每册定价 10.00 元,于每年 11 月开始征订,国内由全国各地邮电局发行。国外由中国国际图书贸易公司(中国国际书店)发行。如错过邮局征订,亦可直接向编辑部订购(款从邮局寄本刊编辑部,邮政编码:100024,电话:010-65756595。E-mail: cjmib@public.bta.net.cn)。

邮发代号:2-55 国外刊号:M507