

本文引用:刘月,宋迪,崔钰晗,等. 细胞内 DNA 识别受体与反转录病毒感染[J]. 新乡医学院学报,2018,35(7):554-557. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.07.002.

【国家自然科学基金专题述评】

细胞内 DNA 识别受体与反转录病毒感染

刘月, 宋迪, 崔钰晗, 王洁
(新乡医学院医学检验学院,河南 新乡 453000)

摘要:反转录病毒可以通过模式识别受体触发一系列固有免疫应答反应,反转录病毒复制过程中会产生一系列的 DNA 中间体,包括 RNA/DNA 杂合体、单链 DNA 和双链 DNA 等,这些不同形式的 DNA 可被不同的 DNA 识别受体所识别,激活固有免疫应答反应,从而抑制反转录病毒的复制。环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cGAS)、 γ 干扰素诱导蛋白 16(IFI16)及 Ku70 等细胞内 DNA 识别受体能够识别人类免疫缺陷病毒、成人 T 淋巴细胞病毒 I 型、猴免疫缺陷病毒及鼠白血病病毒等反转录病毒的 DNA 中间体,与下游干扰素相关基因刺激因子(STING)相结合,诱导 I 型干扰素(IFN)的产生及抗病毒免疫应答反应的启动。STING 与 TANK 结合激酶 1 结合可以磷酸化和激活干扰素调节因子 3,启动 IFN- β 和核因子 κ B 的转录,从而抑制反转录病毒感染。本研究主要对反转录病毒感染过程中 IFI16、cGAS、Ku70、STING 及 DExD/H 盒解螺旋酶 41 等细胞内 DNA 识别受体对反转录病毒感染的影响进行综述。

关键词: 固有免疫应答反应;细胞内 DNA 识别受体;反转录病毒

中图分类号: R363 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)07-0554-04

反转录病毒感染过程中非常重要的一个环节是 DNA 反转中间体的产生并整合入宿主细胞的染色体中,而 DNA 反转中间体可以被细胞内 DNA 识别受体所识别,从而诱导 I 型干扰素(interferon, IFN)的产生以及其他抗病毒应答反应,达到抑制病毒复制并最终清除病毒的目的。本文主要综述反转录病毒感染过程中细胞内 DNA 识别受体对反转录病毒感染的影响。

1 固有免疫应答反应

固有免疫对入侵病原体的识别和调控是近年来免疫学研究的热点领域。固有免疫系统主要通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)来识别各种病原体^[1]。机体内现已发现 6 种 PRR 家族: Toll 样受体家族、核苷酸寡聚结合域(nucleotide binding oligomerization domain, NOD)样受体家族、细胞内 RNA 识别受体家族、细胞内 DNA 识别受体家族、C 类凝集素受体家族及其他固有免疫特异性 PRR^[2]。这些 PRR 有些存在于细胞表面,有些存在于细胞质内,通过与选择性或特定性的信号分子结

合而激活不同的信号转导通路,实现对不同病原体的固有免疫调控。

目前, DNA 引起固有免疫反应的具体机制尚未完全清楚。近年来,病毒 DNA 识别受体的鉴定和机制研究取得了一些突破性的进展^[3],然而对于反转录病毒与固有免疫反应的相互作用和调节机制的研究还略滞后。研究显示,反转录病毒可以通过各种 PRR 选择性地引发一系列固有免疫反应。某些细胞内 DNA 识别受体可以检测到反转录病毒的入侵,如环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase, cGAS)、 γ 干扰素诱导蛋白 16(gamma-interferon-inducible protein 16, IFI16)及 Ku70 等 DNA 识别受体在反转录病毒感染期间可以诱导 IFN 抗病毒免疫应答和炎症反应的产生,在某些细胞中还能够触发细胞凋亡机制,使反转录病毒感染细胞凋亡,进一步抑制反转录病毒感染^[4]。

2 反转录病毒感染

反转录病毒是 RNA 病毒的一种,其遗传信息主要储存在 RNA 上。反转录病毒感染时,首先在其自身携带的反转录酶的作用下将 RNA 转变为 cDNA,新合成的 cDNA 插入宿主的核 DNA 中,随宿主 DNA 复制、转录、翻译而扩增,可表现为人和多种动物的恶性肿瘤和免疫缺陷病^[5]。由此可见,反转录过程中产生的反转录病毒 DNA 中间体对反转录病毒感染的初始识别至关重要。

DOI:10.7683/xyxyxb.2018.07.002

收稿日期:2018-03-20

基金项目:国家自然科学基金河南省联合基金项目(编号:U1504811)。

作者简介:刘月(1994-),女,河南南阳人,硕士研究生在读,研究方向:临床检验诊断学。

通信作者:王洁(1982-),女,河南滑县人,博士,副教授,研究方向:病毒感染免疫;E-mail:jiewang618@xxmu.edu.cn。

反转录病毒复制包括几个不同的阶段。反转录病毒感染的第1步涉及病毒包膜糖蛋白与宿主细胞上的细胞表面受体之间的特异性相互作用。病毒包膜与靶细胞膜的相互作用使病毒侵入细胞,病毒完成脱包膜并把病毒核心颗粒释放到细胞质中^[6]。病毒DNA合成是反转录病毒感染的核心过程,一般在感染细胞的细胞质中开始。在反转录复合物中,病毒单链RNA(single-stranded RNA, ssRNA)通过反转录酶作用,产生反转录病毒双链DNA(double stranded DNA, dsDNA)^[7]。反转录过程中的酶促反应是由反转录酶的2种不同的酶活性促进:(1)通过将合适的脱氧核糖核苷酸三磷酸掺入RNA或DNA模板中来延长引物的DNA聚合酶;(2)特异性降解RNA/DNA杂合体的RNA链的核糖核酸酶H活性。在细胞质中合成后,病毒反转录产物迁移至细胞核,在细胞核内作为前病毒模板整合到细胞基因组中^[8-9]。通过从人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV-1)感染细胞的细胞质中分离复制核蛋白复合物显示,复合物含有线性病毒DNA和整合酶,后者则是唯一能检测到的蛋白,这些观察表明整合酶是HIV-1整合前复合物的组成部分,且整合酶可能是整合反转录病毒DNA所需的唯一病毒蛋白^[10]。

3 反转录病毒与DNA识别受体

固有免疫系统主要通过识别病毒核酸来感知病毒。一般有2种感知病毒核酸的模式^[11]:(1)直接识别进入细胞质内的反转录病毒的ssRNA,如Toll样受体7/8可以直接识别反转录病毒的ssRNA;(2)识别病毒复制过程中产生的DNA中间体。因此,被感染的细胞可以通过细胞质中存在的PRR来识别病毒复制时产生的病毒核酸,包括RNA识别受体^[12]和DNA识别受体^[13-15]。PRR的参与导致促炎细胞因子和I型IFN转录激活。I型IFN和相邻细胞上的I型IFN受体结合,通过信号传导,促进IFN刺激基因(interferon-stimulated gene, ISG)的表达,从而阻断病毒复制和传播^[14-15]。

3.1 cGAS识别受体 研究显示,用细胞溶质病毒DNA刺激细胞,通过cGAS促使环磷腺苷合成新型的第二信使环鸟苷酸-腺苷酸(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, cGAMP), cGAMP通过结合和激活干扰素相关基因刺激因子(stimulator of IFN genes, STING)的方式刺激I型IFN产生^[16-17]。cGAS缺失可以抑制反转录病毒感

染引发的固有免疫应答反应,因此,cGAS是反转录病毒的关键识别受体^[18]。HIV-1、鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)、猿猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)以及人类T淋巴细胞白血病病毒I型(human T lymphotropic virus type I, HTLV-1)等反转录病毒均可激活cGAS产生cGAMP,随后结合并激活STING和I型IFN应答。通过敲除小鼠或人细胞系中的cGAS可阻断HIV、MLV和SIV感染所诱导的细胞因子的产生。另外,针对HIV反转录酶的抑制剂可以阻断HIV病毒感染诱导的IFN- β 的产生,这表明HIV病毒反转录出的DNA对触发固有免疫反应非常关键。研究表明,将HeLa细胞与MT2细胞(HTLV-1阳性T细胞系)共培养后,HeLa细胞中cGAS表达升高,而在HeLa细胞中过表达cGAS后,干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)和p65的磷酸化水平升高,IFN- β 、肿瘤坏死因子- α 表达增加,HTLV-1病毒蛋白表达下降。这些结果表明cGAS在HTLV-1感染的HeLa细胞中可能具有促进固有免疫应答并抑制HTLV-1病毒复制的功能^[19],cGAS是HIV和其他反转录病毒的细胞内识别受体。

3.2 γ -干扰素诱导蛋白16(γ -interferon-inducible protein 16, IFI16) IFI16是一种DNA识别受体,属于PYHIN家族成员,包含2个能够结合DNA的HIN结构域。研究证明,IFI16在识别HIV-1来源的dsDNA中具有重要功能^[20]。HIV-1的dsDNA、ssDNA固有免疫应答反应的诱导依赖于DNA结构中的茎环结构,而不是DNA序列,而这种应答反应依赖于IFI16对DNA的识别以及与STING的共定位^[21]。将dsDNA或ssDNA转染入原代人巨噬细胞可以激活IFI16-STING-TBK1-IRF3/7途径,沉默巨噬细胞中的IFI16以后,HIV-1感染诱导产生的I型IFN水平明显降低,说明IFI16可以识别HIV-1复制周期中产生的DNA序列,通过调节干扰素的产生来影响巨噬细胞中的HIV-1复制^[22]。此外,反转录酶活性抑制剂齐多夫定也可以降低IFN应答,表明IFI16识别的是反转录病毒的反转中间体。也有研究表明,小鼠IFI203、IFI204基因是IFI16的同源蛋白,含有2个C-末端Hind结构域,敲除这2个分子以后可明显抑制细胞对DNA的免疫应答反应^[23]。STAVROU等^[24]研究表明,MLV感染诱导快速IFN- β 应答,用特异的siRNA处理NR-9456细胞24h,并与缺乏病毒糖基化Gag蛋白表达的MLV变体温育2h,发现IFI203、cGAS和STING沉默均可

降低病毒感染后 24 h 的 IFN- β 应答;进一步研究发现,反转录病毒感染细胞后,IFI203 由细胞核转移到细胞质,直接与病毒 DNA 相互作用,启动抗病毒反应。

3.3 Ku70 识别受体 ZHANG 等^[25]首次证明 Ku70 是一种新型的细胞内 DNA 识别受体,在人胚肾 293 细胞中,Ku70 主要借助 IRF1 和 IRF7 来诱导 III 型 IFN 的产生,对 I 型 IFN 的产生无明显影响。但也有研究表明,在小鼠胚胎成纤维细胞中,Ku70 通过 STING-TBK1-IRF3 信号途径对痘病毒、改良型痘苗病毒安卡拉株和 1 型单纯疱疹病毒等多种 DNA 病毒进行响应,诱导产生 I 型 IFN^[26]。研究表明,HTLV-1 感染可诱导 Ku70 高表达,Ku70 过表达可抑制 HTLV-1 蛋白表达,而 Ku70 沉默促进了 HTLV-1 蛋白表达;另外,Ku70 与 HTLV-1 的 DNA 反转中间体 ssDNA90 存在相互作用,ssDNA90 刺激能够诱导 Ku70 表达,且 Ku70 可以促进 ssDNA90 触发的固有免疫应答反应;同时还发现,HTLV-1 感染增强了 Ku70 与 STING 的结合,STING 在 Ku70 介导的抗 HTLV-1 感染的宿主防御中非常关键^[27]。

3.4 DExD/H 盒解螺旋酶 41 (DExD/H-box helicase 41, DDX41) DEXDc 解旋酶家族成员 DDX41 是髓系来源的树突状细胞(myeloid dendritic cells, mDC)中的细胞内 DNA 识别受体。研究表明,利用 shRNA 沉默 DDX41 后可以显著抑制 mDC 对 DNA 和 DNA 病毒的固有免疫应答反应;DDX41 和 STING 过表达在促进 IFN- β 启动子活性方面具有协同效应,DDX41 结合 DNA 和 STING 并与 STING 在细胞质中一起定位,沉默 DDX41 表达则能阻断 B 型 DNA 激活 TBK1、核因子 κ B 和 IRF3^[28]。LEE 等^[29]研究表明,Bruton 酪氨酸蛋白激酶(Bruton tyrosine kinases, BTK)与 STING 和 DDX41 相互作用,BTK 磷酸化 DDX41, BTK 在激活 DDX41 和 STING 信号传导中起关键作用。STAVROU 等^[30]研究证明,DDX41 可识别 MLV 病毒核酸,激活 STING 信号,导致 IRF3 生产增加,诱导 IFN 产生。

3.5 STING STING 在固有免疫中发挥着重要作用,几乎所有的 DNA 受体均要通过 STING 蛋白将信号向下游传递。同时,STING 也可直接或间接识别 DNA。SZE 等^[31]研究发现,在 HTLV-1 刺激的单核细胞中,磷酸化的信号转导和激活转录因子 1、磷酸化 IRF3、ISG56 表达增强,而用 siRNA 沉默 STING 后,磷酸化 IRF3、ISG56 以及 Bax 表达明显下降;进一步发现,STING 与 HTLV-1 的反转中间体 ssD-

NA90 或 dsDNA90 在原代培养的单核细胞中有直接的相互作用;这说明 STING 通过识别反转录病毒的反转中间体而激活 IRF3,从而诱导 I 型 IFN 的免疫应答反应;同时还发现,在转染了 ss/dsDNA90 的细胞中,STING 可以促进 IRF3-Bax 凋亡复合物的形成,从而诱导线粒体依赖性细胞凋亡。

4 结束语

细胞对反转录病毒的抗病毒固有免疫应答反应仍有很大的研究空间,例如,DNA 识别受体是否可以区分不同的反转中间体,不同 DNA 识别受体对病原体识别的相对贡献如何,它们之间是否存在协同作用等。值得注意的是,敲除这些 DNA 识别受体中的任何一个均会影响 I 型 IFN 产生,表明这些 DNA 识别受体在反转录病毒感染诱发的抗病毒固有免疫信号传导中均具有重要作用。敲除 IFI16、cGAS 或 STING 均可以增加人单核细胞中 HIV-1 的复制,表明这些 DNA 识别受体在控制髓系来源细胞中 HIV 复制方面发挥着至关重要的作用^[32]。由于 IFI16、cGAS、Ku70 及 DDX41 这些 DNA 识别受体均使用接头蛋白 STING,它们介导的 DNA 识别与下游信号通路之间可能存在交叉反应。这些识别受体在不同的反转录病毒感染不同的细胞中的功能仍有待进一步研究。抗病毒固有免疫应答对即时抑制反转录病毒的复制和扩散至关重要,而适应性免疫应答对消除病毒感染和长期免疫记忆至关重要。了解反转录病毒感染与 DNA 识别受体的关系,有利于感染者在病毒感染初期做出有效的应对措施。有研究表明,IFI16 不仅通过 STING 诱导 I 型 IFN 应答反应,还诱导 CD4⁺T 细胞中分泌白细胞介素-1 β ^[33]。该项研究不仅揭示了 IFI16 在感知 HIV-1 复制中间体中的新作用,还强调了通过相同识别受体在不同细胞类型中激活下游的抗病毒和细胞死亡途径的差异。将先天性免疫与适应性免疫结合,详细了解人体免疫机制可能有助于发现精确治疗靶点,对新型治疗药物的研发、阻断反转录病毒复制、诱导感染细胞凋亡或死亡有重要意义。

参考文献:

- [1] MATSUMOTO M, TAKEDA Y, TATEMATSU M, et al. Toll-like receptor 3 signal in dendritic cells benefits cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1897.
- [2] KIGERL K A, DE RIVERO VACCARI J P, DIETRICH W D, et al. Pattern recognition receptors and central nervous system repair [J]. *Exp Neurol*, 2014, 258:5-16.

- [3] HÄRTLOVA A, ERTTMANN S F, RAFFI F A, *et al.* DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity [J]. *Immunity*, 2015, 42(2):332-343.
- [4] BROWNE E P. An interleukin-1 beta-encoding retrovirus exhibits enhanced replication *in vivo* [J]. *J Virol*, 2015, 89(1):155-164.
- [5] ZHANG X, MA X, JING S, *et al.* Non-coding RNAs and retroviruses [J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1):20.
- [6] POLETTI V, MAVILIO F. Interactions between retroviruses and the host cell genome [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 8:31-41.
- [7] HILDITCH L, TOWERS G J. A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 4(2):32-36.
- [8] VAN MONTFOORT N, OLAGNIER D, HISCOTT J. Unmasking immune sensing of retroviruses: interplay between innate sensors and host effectors [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25(6):657-668.
- [9] TIAN L, KIM M S, LI H, *et al.* Structure of HIV-1 reverse transcriptase cleaving RNA in an RNA/DNA hybrid [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(3):507-512.
- [10] ESPOSITO F, TRAMONTANO E. Current drugs targeting HIV-1 integrase and reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity: single and dual active site inhibitors [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2014, 23(4):129-144.
- [11] ALTFELD M, GALE M J R. Innate immunity against HIV-1 infection [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(6):554-562.
- [12] 王国庆, 朱紫祥, 曹伟军, 等. RNA病毒阻断RIG-I样受体识别dsRNA机制研究进展 [J]. *病毒学报*, 2014, 30(6):704-712.
- [13] LIU F, NIU Q, FAN X, *et al.* Priming and activation of inflammasome by canarypox virus vector ALVAC via the cGAS/IFI16-STING-type I IFN pathway and AIM2 sensor [J]. *J Immunol*, 2017, 199(9):3293-3305.
- [14] LI W. Investigation of Type I interferon signaling in the cellular response and host defense [D]. Sydney: University of Sydney School of Molecular Bioscience, 2014.
- [15] CHEN K, LIU J, CAO X T. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: a comprehensive review [J]. *J Autoimmun*, 2017, 83:1-11.
- [16] CAI X, CHIU Y H, CHEN Z J. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling [J]. *Mol Cell*, 2014, 54(2):289-296.
- [17] CHEN Q, SUN L, CHEN Z J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(10):1142-1149.
- [18] 谢欣, 王孝伟, 刘俊义. 免疫途径抗HIV信号通路: cGAS-STING研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2014, 41(5):528-532.
- [19] 马玲玲, 郭志祥, 宋迪, 等. cGAS通过调控固有免疫应答抑制HTLV-1在HeLa细胞中复制 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(11):822-826.
- [20] JAKOBSEN M R, OLAGNIER D, HISCOTT J. Innate immune sensing of HIV-1 infection [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2015, 10(2):96-102.
- [21] THOMPSON M R, SHARMA S, ATIANAND M, *et al.* Interferon γ -inducible protein (IFI) 16 transcriptionally regulates type I interferons and other interferon-stimulated genes and controls the interferon response to both DNA and RNA viruses [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(34):23568-23581.
- [22] NISSEN S K, HØJEN J F, ANDERSEN K L D, *et al.* Innate DNA sensing is impaired in HIV patients and IFI16 expression correlates with chronic immune activation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 177(1):295-309.
- [23] 许云龙. 小鼠p200蛋白家族基因的表达模式 [D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [24] STAVROU S, BLOUCH K, KOTLA S, *et al.* Nucleic acid recognition orchestrates the anti-viral response to retroviruses [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(4):478-488.
- [25] ZHANG X, BRANN T W, ZHOU M, *et al.* Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor and induces type-III IFN rather than Type-I IFN [J]. *J Immunol*, 2011, 186(8):4541-4545.
- [26] SUI H, ZHOU M, IMAMICHI H, *et al.* STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN- λ in response to exogenous DNA [J]. *Sci Signal*, 2017, 10(488):5054.
- [27] WANG J, KANG L, SONG D, *et al.* Ku70 senses HTLV-1 DNA and modulates HTLV-1 replication [J]. *J Immunol*, 2017, 199(7):2475-2482.
- [28] 郭若一, 韩嫣, 胡洁, 等. 胞质DNA受体及其对于干扰素调控作用研究进展 [J]. *国际免疫学杂志*, 2014, 37(6):479-484.
- [29] LEE K G, KIM S S, KUI L, *et al.* Bruton's tyrosine kinase phosphorylates DDX41 and activates its binding of dsDNA and STING to initiate type I interferon response [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(7):1055-1065.
- [30] STAVROU S, BLOUCH K, KOTLA S, *et al.* Nucleic acid recognition orchestrates the anti-viral response to retroviruses [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(4):478-488.
- [31] SZE A, BELGNAOUI S M, LIN R, *et al.* Host restriction factor SAMHD1 limits human T-cell leukemia virus (HTLV-1) infection of primary monocytes via the innate immune sensor STING [J]. *Retrovirology*, 2014, 11(Suppl 1):19.
- [32] HERZNER A M, HAGMANN C A, GOLDECK M, *et al.* Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(10):1025-1033.
- [33] MONROE K M, YANG Z, JOHNSON J R, *et al.* IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV [J]. *Science*, 2014, 343(6169):428-432.

(本文编辑:徐自超)