



柯萨奇病毒B组5型非结构蛋白抑制 NF- κ B 信号通路的作用机制研究*

张佳玉 滕培英 吕维民 杨帆 陈伟**

(昆明理工大学医学院, 昆明 650500)

摘要 目的 柯萨奇病毒B组5型 (CVB5) 是手足口病的重要病原体之一, 可导致发热、皮疹或疱疹等临床症状, 重症者出现神经系统疾病, 甚至死亡。天然免疫应答是机体抗病毒入侵的第一道防线, 其中核因子 κ B (NF- κ B) 是宿主天然免疫反应中的重要蛋白质, 然而关于 CVB5 感染后调控 NF- κ B 介导信号通路的研究尚鲜有报道。**方法** 本研究通过检测启动子活性、促炎因子水平以及通路中关键蛋白表达等, 阐明 CVB5 对 NF- κ B 信号通路的调控作用机制。**结果** CVB5 感染可抑制促炎因子表达和 p65 的磷酸化。CVB5 非结构蛋白 (NSP) 可抑制促炎因子表达以及重要蛋白 p65 和 I κ B α 的磷酸化。经 STRING11.1 数据库预测表明, CVB5 3CD 蛋白与宿主多聚胞嘧啶结合蛋白 1 (PCBP1) 具有相互作用, 且 PCBP1 可促进 I κ B α 和 p65 的磷酸化, 抑制病毒复制。**结论** CVB5 NSP 可负调控 NF- κ B 信号通路, 且与 3CD 相互作用的 PCBP1 蛋白可通过调控 NF- κ B 通路抑制 CVB5 复制。本研究探索病毒与宿主天然免疫应答的调控作用, 从而为研制抗 CVB5 感染的药物提供作用靶点。

关键词 柯萨奇病毒B组5型 (CVB5), 核因子 κ B (NF- κ B), 非结构蛋白 (NSP), 3CD, 多聚胞嘧啶结合蛋白 (PCBP1)

中图分类号 R373.2, R183.4

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0329

手足口病 (hand-foot-mouth disease, HFMD) 是由多种肠道病毒感染引起的儿童急性传染病。HFMD 的病原体为小核糖核酸病毒科, 有 20 多种 (型), 主要包括肠道病毒 71 型 (enterovirus type 71, EV71)、柯萨奇病毒 (coxsackievirus, CV) A 群和 B 群以及埃可病毒 (enteric cytopathic human orphan virus, ECHO) 等^[1]。近年来, 越来越多证据表明, 柯萨奇病毒 B 组 5 型 (coxsackievirus B5, CVB5) 逐渐成为手足口病的重要病原体之一^[2-3]。患者感染 CVB5 后, 出现发热、皮疹或疱疹等症状, 重症者还会出现以病毒性脑炎和无菌性脑膜炎为主要特征的神经系统疾病, 甚至死亡, 对婴幼儿健康造成严重威胁^[4]。

CVB5 为无包膜的单股正链 RNA (+ssRNA) 病毒, 基因组全长约 7 400 bp, 由 1 个开放阅读框及 2 个非翻译区构成, 可编码 2 194 个氨基酸的多聚蛋白前体, 并进一步水解为 3 个前体蛋白 (P1、P2、P3)。P1 前体蛋白基因编码 4 种结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4), 主要负责病毒核衣壳的组装, 其中 VP1 基因具有主要的中和抗原决定

簇, 是肠道病毒血清学分型的重要依据。P2 和 P3 基因区编码的 7 种非结构蛋白 (nonstructural protein, NSP) (2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D) 在病毒复制、细胞自噬和逃逸天然免疫中发挥了重要作用^[5] (图 1)。

核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是宿主天然免疫反应中的重要蛋白质, 由 5 个家族成员组成 (p65/RelA、RelB、cREL、p50 和 p52), 在宿主的炎症反应中发挥重要作用。在静止状态下, NF- κ B/Rel 转录因子与核因子 κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 形成复合物, 以非活性状态存在于细胞质中。当 RNA 病毒感染细胞后, 细胞表面特异性受体识别和激活, 活化下游接头蛋白, 激活 NF- κ B 介导的信号通路。I κ B α 在 Ser32 和

* 国家自然科学基金 (81860357), 云南省万人计划“青年拔尖人才”专项 (YNWR-QNBJ-2019-178) 和云南省科技厅 (2019FB108) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13529194917, E-mail: wchen@kust.edu.cn

收稿日期: 2022-07-18, 接受日期: 2022-10-14

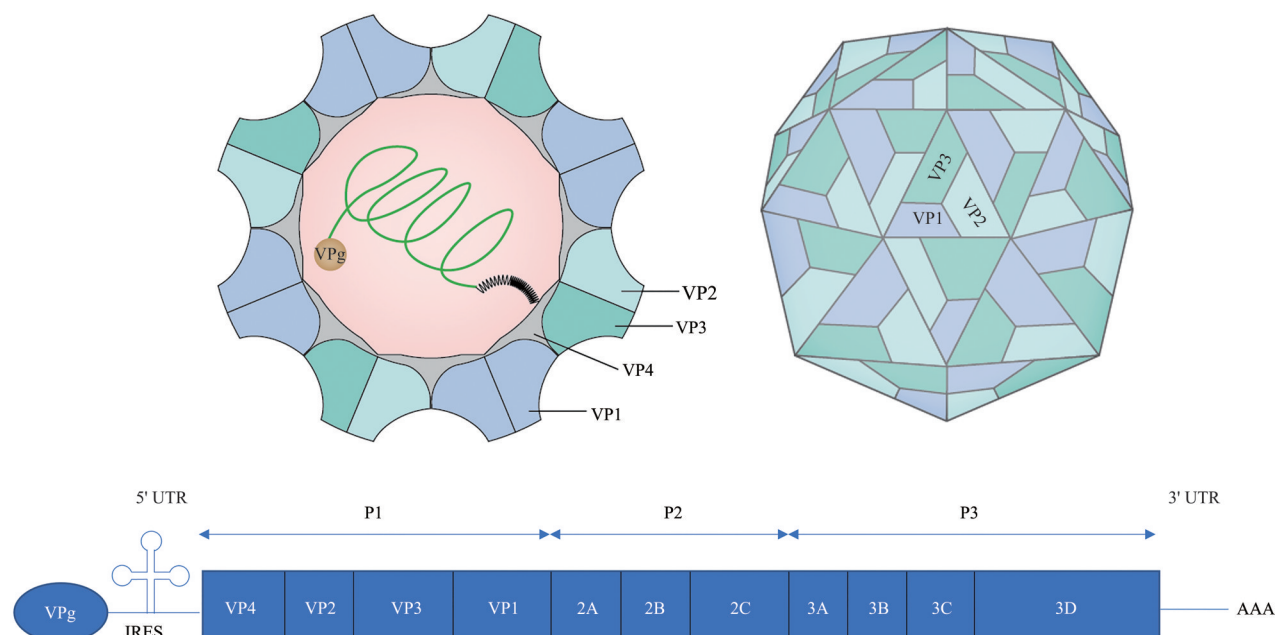


Fig. 1 CVB5 structure pattern and genome structure

Ser36位点发生磷酸化,进而被蛋白酶体降解,从而活化NF- κ B释放^[6]。激活的转录因子NF- κ B进入细胞核,从而促进下游炎性细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等)的表达,进而发挥抗病毒效应^[7-8]。

本研究将探索CVB5感染人恶性胚胎横纹肌瘤细胞(human rhabdomyoma cells, RD)后对NF- κ B信号通路的影响,并进一步阐明CVB5 NSP在通路中的调控作用,同时揭示与CVB5 3CD互作蛋白的初步功能。本研究不仅有助于探索CVB5对宿主天然免疫应答的调控作用,也为CVB5治疗性药物的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

RNAiso Plus (Takara公司); Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (翌圣生物科技上海股份有限公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 人白介素-6(IL-6) ELISA试剂盒、人肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA试剂盒、人白介素-1 β (IL-1 β) ELISA试剂盒(江苏酶免); 质粒提取试剂盒(Sigma); GAPDH抗体、 α -tubulin抗体、Flag抗体以及鼠/兔二抗(爱博泰克生物科

技有限公司); NF- κ B通路主要蛋白质抗体(p65、I κ B α 、p-p65、p-I κ B α 、p52、p100)(Cell Signaling Technology)。

1.2 细胞培养及病毒感染

RD细胞(American Type Culture Collection, CCL-136)在含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%抗生素的DMEM培养基中,于37℃、5% CO₂的条件下培养。

利用增殖状况良好的RD细胞接种不同稀释度的CVB5,在3~7 d后观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),根据Reed Mench法测定CVB5滴度^[9]。随后CVB5感染RD细胞9 h,感染复数(multiplicity of infection, MOI)为5,分别收取细胞上清及沉淀。

1.3 真核表达载体的构建及转染

利用Trizol法提取CVB5基因组RNA,根据CVB5 NSP特异性引物(表1),通过RT-PCR方法、酶切、琼脂糖凝胶回收和连接转化等方法构建pcDNA3.1-2B、pcDNA3.1-2C、pcDNA3.1-3AB、pcDNA3.1-3C和pcDNA3.1-3D 5个真核表达载体,并进行测序鉴定。

RD细胞以2 $\times$ 10⁶个/孔的密度接种6孔板,分别转染上述构建成功的CVB5 NSP真核表达质粒24 h(以pcDNA3.1空载为对照)后,CVB5(MOI=5)感染9 h,分别收取细胞上清及沉淀。

Table 1 Primers used in this study

Gene name	Primer sequence (5'→3')
<i>GAPDH</i>	F: GAGTCAACGGATTGGTCTGT R: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
<i>2B</i>	F: CGGATCCACCAIGGGAGGTGTGAAGGACTACGTG R: CGGAATTCTTGAGCTCAGCCATGGGT
<i>2C</i>	F: CGGGATCCACCATCGGAAACAACGGGTGGCTCAAGAAATTCACGGAAATGACCAAT R: CGGAATTCTTGGAACAGCGCTCAAGGGT
<i>3AB</i>	F: CGGGATCCACCATGGGAGGCCCGCCAGTTTACAGGGAG R: CGGAATTCTTGACCTTGGCTTGTCTTAG
<i>3C</i>	F: CGGGATCCACCATGGGAGGTCCCGCTTTTGAGTTTGC R: CCGCTCGAGACCTTGCTCATCATTAAGT
<i>3D</i>	F: CGGGATCCACCATGGGAGAGATAGAGTTCGTCGAAAG R: CCGCTCGAGAAAGGAGTCCAGCCAT
<i>TNF-α</i>	F: GCCACCACGCTCTTCTGTCTAC R: GGGTCTGGGCCATAGAACTGAT
<i>IL-1β</i>	F: ACCTTCCAGGATGAGGACATGA R: CTAATGGGAACGTCACACACCA
<i>IL-6</i>	F: CACATGTTCTCTGGGAAATCG R: TTGTATCTCTGGAAGTTTCAGATTGTT
<i>p65</i>	F: TGCTGTGCGGCTCTGCTTCC R: AGGCTGGGGTCTGCGTAGGG
<i>PCBP1</i>	F: TCCATGACCAACAGTACCGC R: TACACCCGCCTTCCCAATC
<i>CVB5 VP1</i>	F: CCAGTGCCACGAAATAAA R: TTGCCTATGCTGATGAACGGT

1.4 促炎因子表达的检测

利用 Trizol 法提取细胞沉淀中总 RNA。RNA 逆转录为 cDNA 的步骤参照 Hifair® III SuperMix，程序为：42℃ 2 min 去除 DNA，25℃ 5 min→55℃ 15 min→85℃ 5 min 进行逆转录；逆转录产物进行 qPCR，程序为预变性 95℃ 5 min，95℃ 10 s→60℃ 34 s（40 个循环），以 GAPDH 作为内参基因（引物序列见表 1）；同时，采用 ELISA 试剂盒，对上清液中促炎因子的含量进行定量分析。

1.5 免疫印迹（Western blot）法检测蛋白质的表达

利用 RIPA 裂解液提取细胞沉淀中总蛋白质，BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转到 PVDF 膜，使用 5% 脱脂牛奶或 2%BSA 封闭 2 h，TBST 清洗 3 次；一抗 4℃ 孵育过夜，TBST 清洗 3 次；常温中二抗孵育 2 h，TBST 清洗 3 次；ECL 试剂进行显影。

1.6 NF-κB 启动子活性检测

将报告基因质粒（p-NF-κB-Luc 与 pRL-TK 以 10：1 混合）与 CVB5 NSP 真核表达质粒共转染

RD 细胞后，CVB5（MOI=5）感染 9 h。采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒，以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值为标准，检测 NF-κB 启动子的活性。

1.7 蛋白质相互作用的预测与分析

利用 STRING 11.0 数据库（<https://string-db.org/>）进行蛋白质-蛋白质相互作用分析，选出与 CVB5 3CD 的互作候选蛋白。同 1.3 节，通过 PCR 方法、Kpn I/Not I 酶切、琼脂糖凝胶回收和连接转化等方法构建 pCDNA3.1-PCBP1 真核表达载体，并测序验证。利用 1.4 和 1.5 节检测其对 CVB5 VP1 表达的影响，同时检测互作蛋白对 NF-κB 通路的影响。

1.8 数据分析

采用 GraphPad Prism 9 统计软件进行分析。采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行组间的比较，采用独立样本 t 检验进行组内两两比较，P<0.05 为差异有统计学意义（*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1）。

2 结 果

2.1 CVB5负调控NF- κ B信号通路

CVB5感染RD细胞，NF- κ B亚基p65的mRNA

表达以及细胞内p65蛋白的磷酸化水平降低（图2a）；同时，对NF- κ B通路下游的促炎因子检测发现，TNF- α 、IL-1 β 和IL-6表达量均呈现下调趋势（图2b）。综上所述，CVB5感染宿主细胞后，可负调控NF- κ B介导的天然免疫信号通路。

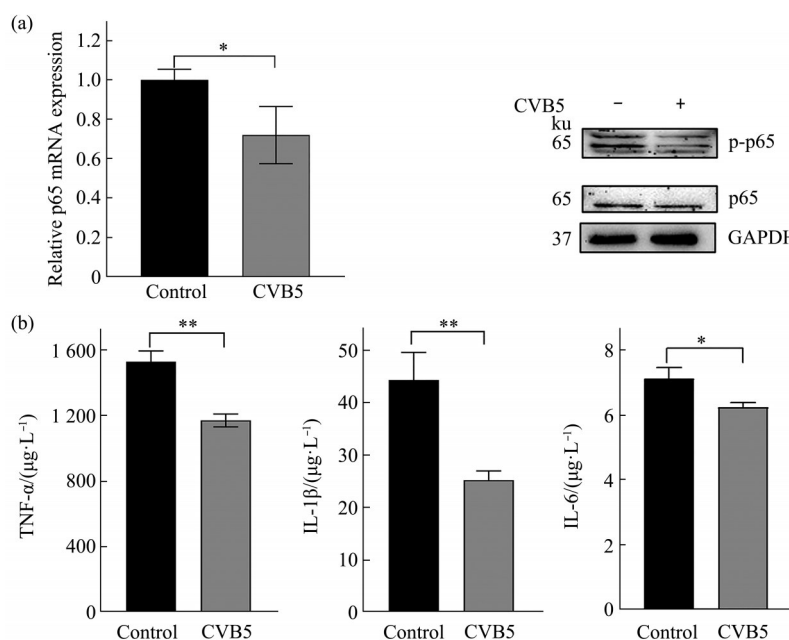


Fig. 2 CVB5 negatively regulates NF- κ B signaling pathway

(a) The mRNA and protein expressions of p65 were detected after CVB5 ($MOI=5$) infected RD cells for 9 h. (b) After CVB5 ($MOI=5$) infected RD cells for 9 h, the expression of pro-inflammatory factors was detected. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.2 成功构建CVB5 NSP真核表达载体

如图3所示：pcDNA3.1-2B、pcDNA3.1-2C、pcDNA3.1-3AB 3个真核表达载体采用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切验证，酶切后片段大小分别为294 bp、987 bp、333 bp，与目的序列大小相符；pcDNA3.1-3C和pcDNA3.1-3D两个真核表达载体采用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切验证，酶切后片段大小分别为552 bp和1 386 bp。同时，上述5个真核表达载体测序结果正确。上述结果表明，CVB5 NSP 真核表达载体构建成功。

2.3 CVB5 NSP抑制NF- κ B信号通路

为进一步阐明CVB5 NSP在NF- κ B通路中的作用，我们分别从启动子活性、促炎因子表达以及蛋白质水平进行检测。如图4a结果所示，CVB5 NSP均可抑制NF- κ B通路的启动子活性，其中2C和3C对通路启动子活性的抑制作用较为显著；qRT-PCR检测促炎因子水平表明，非结构蛋白较为显著的抑制促炎因子的表达（图4b-d）；通过Western blot对

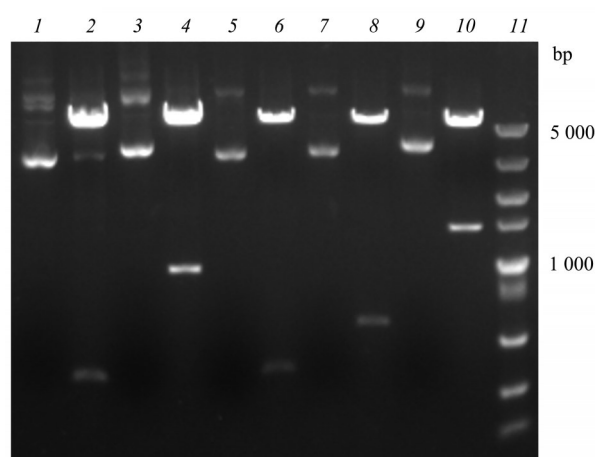


Fig. 3 Digestion validation of eukaryotic expression vector plasmid pcDNA3.1-2B/2C/3AB/3C/3D

Lane 1, 3, 5, 7, 9 were pcDNA3.1-2B, pcDNA3.1-2C, pcDNA3.1-3AB, pcDNA3.1-3C, pcDNA3.1-3D plasmid, respectively; lane 2, 4, 6, 8, 10 were PCDNA3.1-2B, pcDNA3.1-2C, pcDNA3.1-3AB, pcDNA3.1-3C, pcDNA3.1-3D double enzyme digestion product, respectively; lane 11 was DL5000 DNA marker.

NF-κB 信号通路中的关键蛋白 (p65、IκBα、p-p65、p-IκBα) 检测表明 (图 4e), 3C 和 3D 蛋白显著下调了通路中关键蛋白 p65 和 IκBα 的磷酸化水平。

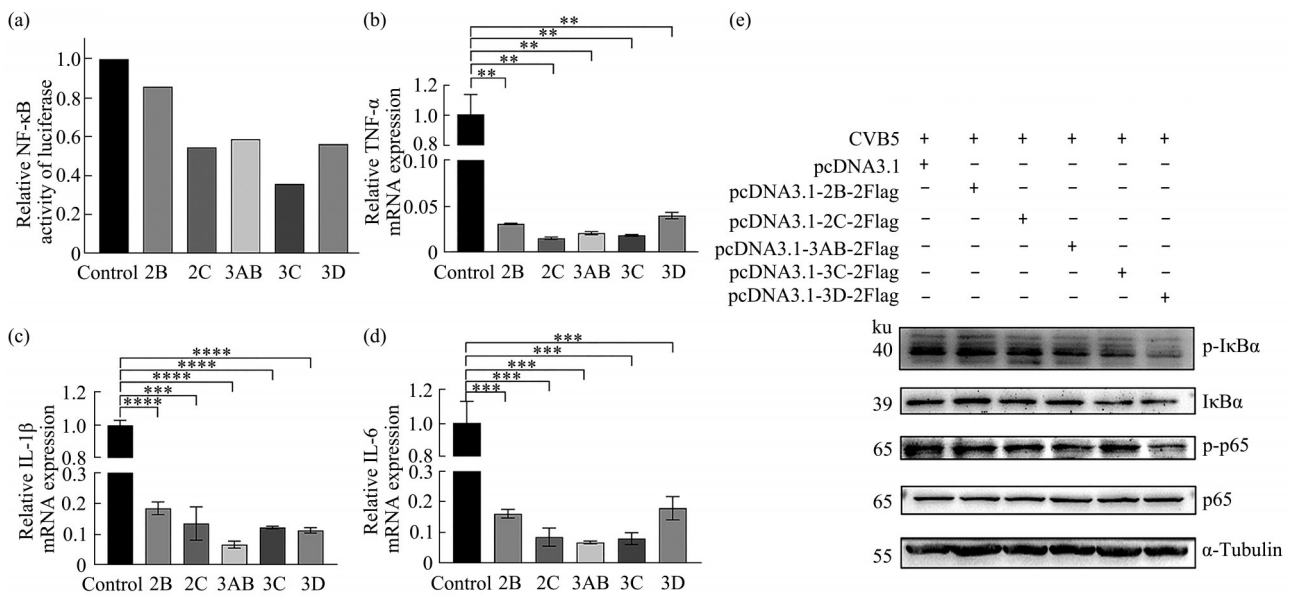


Fig. 4 Effects of CVB5 NSP on NF-κB pathway

(a) Effect of CVB5 NSP on promoter activity of NF-κB pathway. (b-d) Effects of CVB5 NSP on the expression of pro-inflammatory factors. (e) Effects of CVB5 NSP on NF-κB pathway protein detected by Western blot. ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.000 1.

2.4 3CD互作蛋白PCBP1功能分析

以对促炎因子表达具有显著调控作用的CVB5 3CD为候选蛋白, 使用STRING分析得出与3CD

互作的候选蛋白多聚胞嘧啶结合蛋白 (PCBP1)。在体外, PCBP1的过表达成功 (图 5a); 同时检测其对 CVB5 病毒复制的影响, 如图 5b 和 5c 所示,

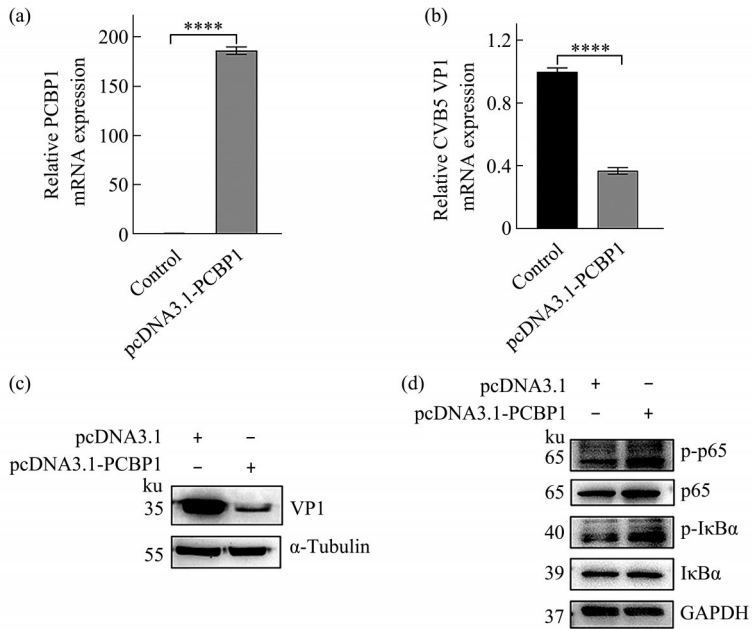


Fig. 5 Effect of PCBP1 on virus replication

(a) The overexpression of PCBP1 was verified by RT-qPCR. (b) The effect of PCBP1 on CVB5 replication was detected by RT-qPCR. (c) The effect of PCBP1 on CVB5 replication was detected by Western blot. (d) The effect of PCBP1 on NF-κB signaling pathway was detected by Western blot. *****P*<0.000 1.

PCBP1可抑制病毒复制。同时,进一步检测了PCBP1对NF- κ B通路的影响(图5d),PCBP1可促进p65以及I κ B α 的磷酸化水平,对NF- κ B起正调控作用,提示PCBP1可能促进NF- κ B信号通路的激活以抑制病毒复制。

3 讨 论

CVB5可通过粪口途径感染机体,从而导致了不同类型的疾病。此外,据报道,CVB5也可通过呼吸道感染人体,引起肺炎和哮喘,同时可分泌细胞因子RANTES、IL-8和MCP-1。这3种细胞因子基因启动子的上游均含有转录因子NF- κ B的结合位点,并受NF- κ B的调控^[10-12]。那么,关于CVB5感染细胞后是否能够调控NF- κ B信号通路?本研究结果表明,CVB5感染RD细胞后,可以降低细胞内的NF- κ B亚基p65的mRNA拷贝数及蛋白质表达,同时抑制NF- κ B信号通路下游促炎因子的表达。由此可知,CVB5能够抑制NF- κ B激活的天然免疫信号通路。

病毒的感染和宿主的免疫应答是一场博弈,其中天然免疫是维持机体内环境平衡清除感染的病毒的第一步。病毒感染细胞后,其核酸开始复制和翻译,合成了具有酶活性的NSP,从而可阻断受体识别的信号通路,使病毒逃逸天然免疫应答^[13]。如对于引起HFMD的重要病原体EV71和CVA16的NSP研究表明,EV71 3C^{pro}可通过与视黄酸诱导基因I (retinoic acid-induced gene I, RIG-I)结合,从而阻断与下游接头蛋白的结合,进而抑制促炎因子的产生,使病毒逃逸天然免疫应答^[14],CVA16 3C蛋白与RIG-I N端结构域结合,破坏RIG-I与线粒体抗病毒信号蛋白之间相互作用,降低了IRF3的激活,从而导致IFN-I信号被阻断^[15-16]。此外,对于其他病毒如蓝舌病毒(BTV)的NS3^[17]、流感病毒的NS1^[18]等非结构蛋白也具有类似的功能。因此,本文对CVB5 NSP在NF- κ B通路中的作用进行了初步探讨。结果表明, CVB5 NSP具有抑制NF- κ B通路的作用。由于非结构蛋白对促炎因子的影响显著,因此,本文选取了对蛋白质表达影响最为显著的3C和3D蛋白的前体蛋白3CD作为候选蛋白,筛选与其互作的蛋白质。

3C蛋白是糜蛋白酶样的半胱氨酸蛋白酶,负责病毒多聚蛋白的切割过程^[19]。晶体结构和诱变研究表明,与3C蛋白结合的裂缝存在一个包含 β 结构的非极性表面环,有助于底物的识别和的催化

活性^[20]。3D蛋白是病毒编码的RNA依赖型RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp),是RNA复制合成基因组的催化成分,在小RNA病毒的生命周期中发挥着重要作用^[21-22]。3CD是由小RNA病毒主要加工途径产生的多功能前体蛋白,具有蛋白酶和RNA结合活性,可参与复制细胞器的形成和病毒颗粒的组装^[23]。本研究通过STRING数据库预测分析,筛选得到与3CD蛋白互作的候选蛋白PCBP1。PCBP1是一种RNA结合蛋白,此前有报道其可与丙型肝炎病毒基因组的5'非翻译区结合,并可以抑制丙型肝炎病毒粒子的组装和分泌^[24]。本研究进一步验证发现,PCBP1可促进I κ B α 和p65磷酸化,抑制病毒复制。

4 结 论

本研究构建了CVB5 NSP的真核表达载体,并初步研究了CVB5 NSP对NF- κ B信号通路的调控作用。同时进一步揭示了与CVB5 3CD互作的PCBP1蛋白抑制病毒复制作用机制,从而为进一步探究CVB5感染机制的研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Esposito S, Principi N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, **37**(3): 391-398
- [2] Chen Y C, Yang S L, Yang H, *et al.* Clinical characteristics of echovirus 11 and coxsackievirus B5 infections in Taiwanese children requiring hospitalization. *J Microbiol Immunol Infect*, 2021, **54**(4): 581-587
- [3] Kang H J, Yoon Y, Lee Y P, *et al.* A different epidemiology of enterovirus A and enterovirus B co-circulating in Korea, 2012-2019. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2021, **10**(4): 398-407
- [4] Hu Y F, Yang F, Du J, *et al.* Coxsackievirus B5, associated with neurological hand, foot and mouth disease, China. *J Infect*, 2012, **65**(2): 189-191
- [5] Rezig D, Ben Yahia A, Ben Abdallah H, *et al.* Molecular characterization of coxsackievirus B5 isolates. *J Med Virol*, 2004, **72**(2): 268-274
- [6] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016, **8**(3): 227-241
- [7] Fitzgerald K A, Kagan J C. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*, 2020, **180**(6): 1044-1066
- [8] Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell Mol Immunol*, 2021, **18**(3): 539-555
- [9] Bessmertnyi B S. Statistical method in experimental research in microbiology and immunology. II. Determination of average

- lethal dose according to Reed's and Muench's method and equilization of empirical indices of lethality. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 1957, **28**(5): 120-125
- [10] Edwards MR, Hewson CA, Laza-Stanca V, *et al.* Protein kinase R, IkappaB kinase-beta and NF-kappaB are required for human rhinovirus induced pro-inflammatory cytokine production in bronchial epithelial cells. Mol Immunol, 2007, **44**(7): 1587-1597
- [11] Oda T, Ueda A, Shimizu N, *et al.* Suppression of monocyte chemoattractant protein 1, but not IL-8, by alprazolam: effect of alprazolam on c-Rel/p65 and c-Rel/p50 binding to the monocyte chemoattractant protein 1 promoter region. J Immunol, 2002, **169**(6): 3329-3335
- [12] Prescott JA, Mitchell JP, Cook SJ. Inhibitory feedback control of NF-kappaB signalling in health and disease. Biochem J, 2021, **478**(13): 2619-2664
- [13] Sun M, Lin Q, Wang C, *et al.* Enterovirus A71 2B inhibits interferon-activated JAK/STAT signaling by inducing caspase-3-dependent karyopherin-alpha1 degradation. Front Microbiol, 2021, **12**: 762869
- [14] Lei X, Liu X, Ma Y, *et al.* The 3C protein of enterovirus 71 inhibits retinoid acid-inducible gene I-mediated interferon regulatory factor 3 activation and type I interferon responses. J Virol, 2010, **84**(16): 8051-8061
- [15] Mukherjee A, Morosky S A, Delorme-Axford E, *et al.* The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. PLoS Pathog, 2011, **7**(3): e1001311
- [16] Rui Y, Su J, Wang H, *et al.* Disruption of MDA5-mediated innate immune responses by the 3C proteins of coxsackievirus A16, coxsackievirus A6, and enterovirus D68. J Virol, 2017, **91**(13): e00546-17
- [17] Li Z, Lu D, Yang H, *et al.* Bluetongue virus non-structural protein 3 (NS3) and NS4 coordinatively antagonize type interferon signaling by targeting STAT1. Vet Microbiol, 2021, **254**: 108986
- [18] Zeng Y, Wang R, Wang F, *et al.* Interaction of influenza A virus NS1 and cytoskeleton scaffolding protein alpha-actinin 4. Virus Genes, 2022, **58**(1): 15-22
- [19] Yi J, Peng J, Yang W, *et al.* Picornavirus 3C - a protease ensuring virus replication and subverting host responses. J Cell Sci, 2021, **134**(5): jcs253237
- [20] Yang J, Leen E N, Maree F F, *et al.* Crystal structure of the 3C protease from Southern African Territories type 2 foot-and-mouth disease virus. PeerJ, 2016, **4**: e1964
- [21] Sun Y, Wang Y, Shan C, *et al.* Enterovirus 71 VPg uridylation uses a two-molecular mechanism of 3D polymerase. J Virol, 2012, **86**(24): 13662-13671
- [22] Wang Z, Wang Y, Wang S, *et al.* Coxsackievirus A6 induces cell cycle arrest in G0/G1 phase for viral production. Front Cell Infect Microbiol, 2018, **8**: 279
- [23] Winston D S, Boehr D D. The picornavirus precursor 3CD has different conformational dynamics compared to 3C(pro) and 3D (pol) in functionally relevant regions. Viruses, 2021, **13**(3): 442
- [24] Cousineau S E, Rheault M, Sagan S M. Poly(rC)-binding protein 1 limits hepatitis C virus virion assembly and secretion. Viruses, 2022, **14**(2): 291

Inhibition of NF- κ B Signaling Pathway by Non-structural Protein of Coxsackie Virus Group B Type 5*

ZHANG Jia-Yu, TENG Pei-Ying, LÜ Wei-Min, YANG Fan, CHEN Wei**

(Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract Objective Coxsackie virus group B type 5 (CVB5) is one of the causative agents of hand-foot-mouth disease, which can cause clinical symptoms such as fever, rash or herpes, and neurological complications or even fatalities. The innate immune response is the first line of defense against the viral infection, and the nuclear factor- κ B (NF- κ B) is a master regulator in the control of immune responses. However, little research has been reported on the regulation of the NF- κ B mediated signaling pathway after CVB5 infection. This study explores the regulatory mechanism of virus and the host innate immune response, providing targets for the development of drugs against CVB5 infection. **Methods** In this study, promoter activity, proinflammatory factor and key proteins expression were detected to investigate the regulatory mechanism of CVB5 on NF- κ B signaling. **Results** CVB5 infection inhibited the expression of proinflammatory factors and the phosphorylated p65 protein expression. Non-structural protein (NSP) of CVB5 inhibited the expression of proinflammatory factor and important proteins, such as the phosphorylated p65 and I κ B α . CVB5 3CD interacted with the host polycytosine binding protein 1 (PCBP1) was performed *via* the STRING 11.1 database, and the PCBP1 inhibited viral replication by promoting the phosphorylation of I κ B α and p65. **Conclusion** These results showed that CVB5 NSP negatively regulated NF- κ B signaling pathway, and the PCBP1 protein which interacted with 3CD could inhibit CVB5 replication through activate the NF- κ B pathway.

Key words coxsackie virus group B type 5 (CVB5), nuclear factor- κ B (NF- κ B), non-structural protein (NSP), 3CD, polycytosine binding protein (PCBP1)

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0329

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81860357), Young Talents Support Program of Ten Thousand People Plan of Yunnan Province (YNWR-QNBJ-2019-178), and Yunnan Fundamental Research Projects (2019FB108).

** Corresponding author.

Tel: 86-13529194917, E-mail: wchen@kust.edu.cn

Received: July 18, 2022 Accepted: October 14, 2022