

STING 在宿主天然免疫信号通路中的调节作用 *

郑 洋^{1, 2)} 邢雅玲²⁾ 陈晓娟²⁾ 杨星星²⁾ 王 凯²⁾ 陈忠斌^{2)**}

(¹⁾ 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124; (²⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 STING(stimulator of interferon genes)是天然免疫信号通路中一种新发现的蛋白质, 在防御病毒及胞内细菌感染、介导 I 型 IFN 产生过程中发挥重要功能。来自病原体的 B 型 DNA 与 5'-3p dsRNA 暴露在宿主细胞中后被相应的模式识别受体识别, 通过不同的通路传递信号给 STING。STING 随后通过相似的机制招募 TBK1 激活 IRF3, 诱导干扰素表达。对细菌中的环二核苷酸 c-di-GMP 和 c-di-AMP, STING 则可以直接作为模式识别受体引发 I 型干扰素反应。此外 STING 还能激活 STAT6 诱导特异趋化因子产生, 吸引各种免疫细胞抵抗病毒感染。本文通过对 STING 的发现、结构、定位、功能、机理以及调节机制进行综述, 以期揭示病毒逃逸天然免疫调节机制和抗病毒新型免疫调节剂提供新的思路。

关键词 天然免疫, I 型干扰素, STING, dsRNA, dsDNA

学科分类号 R392, Q257

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00099

天然免疫对于识别病原感染, 建立有效的宿主防御非常重要。宿主细胞通过种系编码的模式识别受体(pathogen-recognition receptors, PRRs)监测保守的病原相关分子模型(pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 激活宿主的天然免疫应答, 诱导 I 型干扰素、促炎性细胞因子等产生, 进而抑制感染的扩散。病原体感染宿主过程中产生的各种类型核酸就属于宿主细胞的病原相关分子模式。目前已发现三类能够识别病原核酸并诱导 I 型干扰素的模式识别受体, 分别为识别 RNA 的 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)、RIG- I 样受体(RIG- I like receptors, RLRs)以及尚不明晰的 DNA 识别受体^[1]。尽管 PRRs 识别 PAMPs 激活 I 型干扰素表达的机制已经取得了研究进展, 但是仍有不少问题有待深入阐明, 如: 病原 DNA 的 PRRs 还有哪些, 如何传递信号, 哪些蛋白质在此过程中发挥作用, 又如: 各种诱导 I 型干扰素表达的信号是如何传递给磷酸激酶 TBK1(TANK-binding kinase 1)的, 等等。2008 年起多个研究小组围绕新鉴定出的一个干扰素刺激因子, 即 STING(stimulator of interferon genes)进行研究。该分子位于 TBK1 上游、能够对 B 型 dsDNA 与 5'-3p dsRNA 产生应答、激活 IRF3(interferon regulatory factor 3)信号通

路或 I 型干扰素通路。对该分子的研究结果已为上述问题揭示了部分答案, 本文拟对这些研究结果加以综述。

1 STING 的发现、结构与定位

细胞的天然免疫系统对于识别病原感染, 建立有效的宿主防御十分重要。鉴别出在天然免疫系统中起促进作用的关键蛋白质是认识这个系统的前提。为了进一步探知天然免疫信号机制, 寻找细胞中存在激活 I 型干扰素表达的未知蛋白质, 2008 年, 两个独立的研究小组分别从人或鼠的 cDNA 表达文库克隆中用报告基因 IFN- β -Luc 或 IRF-E-Luc 筛选出同一个激活转录因子 IRF3 的克隆, 分别命名为 STING^[2]和 MITA(mediator of IRF3

* 国家自然科学基金(81273231, 30972761, 81172799, 30870536, 81102478), 国家科技重大专项(2008ZX10004-015), 北京市自然科学基金(7092075, 7132165)和教育部留学回国人员科研启动基金(2009)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66930297

E-mail: chenzb@bmi.ac.cn or chenzhongbin@yahoo.com

收稿日期: 2012-02-27, 接受日期: 2012-06-01

activation)^[3]. 随后另有两个研究小组也独立将其鉴定出来, 并分别命名为 MPYS(基于蛋白质 N 端的氨基酸残基缩写命名)^[4] 和 ERIS (endoplasmic reticulum interferon stimulator)^[5]. 为简便起见, 本文采用最常用的名称 STING 进行叙述.

人源 STING 基因编码 379 个氨基酸, 蛋白质产物分子质量约为 42 ku, 与鼠源 STING 基因(编码 378 氨基酸)相似性为 81%. STING 的 C 端是一个球状的 C 端结构域 CTD (C-terminal helicase domain), 可能包含有多种信号 motif, 位于细胞质中^[4]. STING 的 N 端含有多个 TM(transmembrane) 结构域, 研究结果尚未统一. Shu Hong-Bing 小组预测 STING 含有 4 个 TM, 定位于线粒体外膜上, 其中第 3 个 TM 负责将 STING 靶向线粒体^[3, 5]; Cambier 小组结果与其一致又有补充, 认为 STING 含有 4 个 TM 结构域, 除了大部分定位在线粒体

上, 还有少量出现在质膜上^[6]; 北京大学 Jiang Zheng-Fan 小组也认为 STING 有 4 个 TM 结构域, 但 N 端 TM 结构域前为信号肽序列, 蛋白质中间含有 2 个内质网滞留序列(分别为 R76Y77R78 和 R178I179R180), 整个蛋白质定位在内质网上^[6]; Ishikawa 小组^[2]则预测 STING 的 N 端含有 5 个 TM 结构域, 氨基端含有一个信号肽序列, 21~139 位氨基酸是一段富含亮氨酸的区域, 静息状态下 STING 主要定位在内质网上, 且在内质网与线粒体相邻的区域 MAMs (mitochondria-associated membranes) 上也有分布. 根据以上对 STING 结构的描述, 我们绘制出一幅人 STING 蛋白的结构示意图(图 1). 不同实验室对 STING 细胞定位(包括内质网膜、线粒体外膜、质膜)的分歧, 提示 STING 的功能与作用机制可能具有多样性和复杂性.

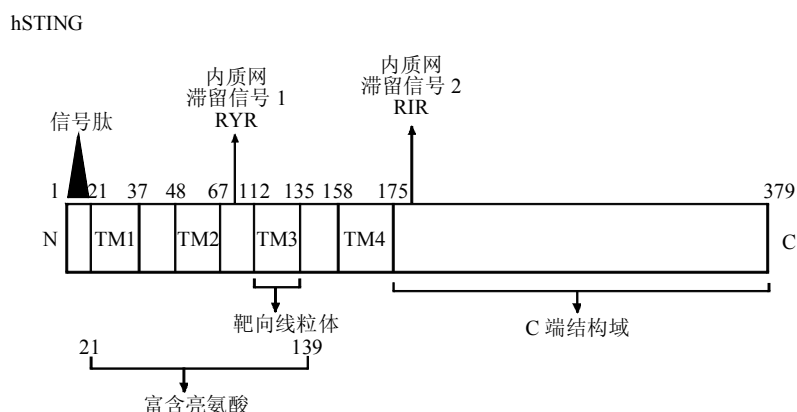


Fig. 1 The structure of hSTING

图 1 人源 STING 的结构

2 STING 在宿主天然免疫信号通路中的功能及作用机理

STING 作为一种 IFN 刺激因子被发现, 并在大量组织多种细胞中广泛表达, 提示其在免疫调节方面可能具有十分重要的功能^[2-3]. Ishikawa 等^[2]用各种 DNA 配体在 STING 野生型和缺陷型的 MEFs 中诱导 I 型干扰素, 结果显示 STING 对于转染的病毒 DNA(腺病毒 AD5、单纯疱疹病毒 HSV-1、HSV-2)、纯化的大肠杆菌 DNA、小牛胸腺 DNA 以及干扰素刺激 DNA ISD(45 bp 不含 CpG 的双链寡

核苷酸)诱导 IFN- β 产生都是必需的. 用人工合成的双链 DNA poly(dG:dC)刺激, 缺失 STING 使 MEFs 完全丧失诱导 IFN- β 的能力, 而 poly(dA:dT)也只能诱导出少量的 IFN- β , 可能是通过 RIG-I 通路中不依赖 STING 的支路产生^[2, 7-8]. 在 STING 缺陷型的抗原递呈细胞, 如巨噬细胞中转染 ISD 或者 HSV-1 或是单核增生李斯特菌, I 型干扰素的产生急剧降低. 进一步研究发现 STING 对于 GM-DCs 和 pDCs (FLT3-ligand-induced dendritic cells, FLT3-DCs)中 DNA 诱导的 I 型干扰素产生也是必需的. 然而, 内源性 CpG DNA 在 STING

缺陷型细胞中仍然可以诱导 I 型干扰素, 提示 TLR9 发挥作用独立于 STING. STING 对 CMV(巨细胞病毒), 痘苗病毒 VVDE3L 和杆状病毒激活 I 型干扰素通路似乎也是必需的. Sharma 等^[9]发现疟原虫 DNA 被一种未知的 DNA 识别受体识别, 经 STING/TBK1/IRF 通路介导 I 型干扰素的产生. 以上研究说明 STING 介导胞内病毒 DNA、细菌 DNA 甚至寄生虫 DNA 诱导的天然免疫反应中举足轻重.

为了检测 STING 在病原 RNA 感染中是否也发挥作用, Ishikawa 等^[2]用负链病毒 VSV 感染 STING 缺陷型的 HEK293 细胞, 结果发现这些细胞对于病毒的感染和复制变得极为敏感. 用 VSV 感染 STING 缺陷型的 MEFs, 同对照相比, 缺失 STING 的 MEFs 中产生的病毒后代更多. 相同的实验换用负链病毒 SeV 来感染, STING 缺陷型细胞表现出 I 型干扰素产生能力下降. 通常脑细胞中是检测不到 STING 表达的, 但最近有研究发现神经元细胞系被 JEV RNA 病毒感染后能用免疫组化实验检测出 STING 表达, 而且敲除 STING 后, 病毒载量增加, I 型干扰素表达下降^[10]. 以上研究说明 STING 在病原 RNA 介导的 I 型干扰素产生的通路中也发挥作用.

由于 STING 分子中并不存在 DNA 结合结构域, STING 本身不太可能直接与 DNA 相互作用, 而需要借助细胞内其他模式识别受体, 所以 STING 主要作为通路的中间分子发挥作用. 不过最近有研究表明 STING 可直接作为环二核苷酸的模式识别受体诱导 I 型干扰素的表达^[11]. 此外, STING 还被报道有参与死亡信号的转导功能^[4].

从以上的研究可以看出 STING 的功能主要是介导天然免疫, 诱导 I 型干扰素产生. 目前人们已经对 STING 在这些天然免疫信号通路中作用的机制有了较深的认识.

2.1 STING 介导 dsDNA 诱导的信号通路

dsDNA 模式识别受体分为膜上受体和胞内受体两类. dsDNA 膜上模式识别受体主要为 TLR 家族的 TLR9, 它能够识别广泛存在于病毒和细菌中未甲基化的 CpG DNA(高等动物 CpG DNA 中的 C 被高度甲基化, 不能被 TLR9 识别), 通过 MyD88 转导信号, 激活 IFN- β ^[12-13]. 近期发现 TLR8 也能识别结合 dsDNA, 经 MyD88 介导天然免疫^[14]. 这两个膜上 PRRs 介导的通路都不依赖 STING. 与之相反, 目前发现的胞内诱导 dsDNA 产生 I 型干

扰素的 PRRs 都依赖 STING 发挥作用. 这些受体包括: DAI(DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors, 又称 ZBP1, DML-1)、RNA 聚合酶 III、PYHIN 蛋白家族成员 IFI16 以及最近发现的 DE_xD/H 解旋酶家族成员 DDX41.

DAI 识别 Z-DNA 和富含 AT 的 B-DNA, 可激活 IRF3 或 IRF7 诱导 I 型干扰素产生^[15]. 研究发现, 人巨细胞病毒 HCMV 以 DAI 为模式识别受体, 通过一种需要 STING 的未知机制激活 TBK1, 进而磷酸化 IRF3, 导致 IFN- β 转录^[16]. 然而 DAI 介导 DNA 诱导 IFN- β 产生具有细胞特异性, 并且在 DAI 缺陷型的 MEFs 和单核细胞能够正常应答 poly(dA-dT)^[17-18]. 这说明细胞中还存在其他应答富含 AT 的 dsDNA 模式识别受体. RNA 聚合酶 III 是一种新型的 DNA 模式识别受体, 也识别胞内富含 AT 的 dsDNA.

RNA 聚合酶 III 以 dsDNA 为模板, 将其转录成 5'-3p dsRNA(该产物是 RNA 模式识别 RIG-I 的配体), 进而通过 RNA 介导的 RIG-I/MAVS/STING 信号通路诱导抗病毒天然免疫反应, 诱导 I 型干扰素产生^[7-8].

最近有研究发现 DE_xDc 解旋酶 DDX41 在树突细胞和单核细胞(monocytes)中可作为 DNA 的 PRR 激活 STING 依赖的天然免疫反应. DDX41 通过 DEADc box 直接结合 B 型或 Z 型的 dsDNA 及内质网膜上的 STING, STING 进而与 TBK1 一起从内质网经高尔基体移位到核周区域, IRF3 和 IRF7 在此被 TBK1 磷酸化, 入核诱导 I 型干扰素和其他天然免疫分子基因的转录^[19].

除了以上三种, PYHIN 蛋白家族成员 IFI16 也能直接与病毒 DNA 相互作用, 在 MEFs 和巨噬细胞中都可以通过 STING、TBK1、IRF3 介导 IFN- β 产生. 但是关于具备哪些特征的 dsDNA 能与 IFI16 相互作用以及 dsDNA 如何刺激 IFI16 招募 STING 还不是很明确^[20].

综上所述, 胞内 dsDNA 模式识别受体几乎都依赖 STING 激活 IRF3、诱导 I 型干扰素产生, 但 STING 如何活化自身并激活下游通路却不是很清楚. 最近这部分机制有了较大进展. 具体机制如下: 随着 dsDNA 刺激, STING 会发生二聚化、泛素化和磷酸化, 不过磷酸化修饰现在已经被认为是活化的 STING 激活 TBK1 过程中发生的^[16, 2, 21]. Jiang 小组采取香豆霉素诱导化学二聚化系统诱导 ERIS-GryB 融合蛋白发生二聚化, 结果 IFN- β 启动

子有明显激活,表明 STING 二聚化能激活自身及下游信号通路^[6]。另外 Tsuchida 小组^[22]发现, E3 泛素连接酶 TRIM56 能够与 STING 相互作用并对其 K63 连接的泛素化修饰。这种修饰可以促进 STING 的二聚化,进而激活下游通路。与此一致的是,我们实验室在研究冠状病毒木瓜样蛋白酶 PLP 时发现: PLP 具有 DUB 活性,其在去除 STING 连接的 K63 多聚泛素链的同时,抑制 STING 激活的干扰素通路^[23]。以上结果提示 STING 在体内的活化可能是通过二聚化、泛素化实现的。

活化 STING 随后发生膜运输,经过高尔基体,最终到达胞质中核周的点状结构(一种膜结构)^[24-26]。这个膜运输过程伴随着 Atg9 的共定位转移,并且可能与泛素化相关^[3,26]。在点状结构上 STING 作为一个支架招募 IRF3 和 TBK1 到它的 C 端。激活的 TBK1 使 STING 的多个丝氨酸位点磷酸化(hSTING Ser358, Ser353, Ser379),增强了 STING 对 IRF3 的亲合性,并刺激 TBK1 磷酸化 IRF3,从而诱导 IRF3 二聚化入核^[21]。STING 对 IRF3 与 TBK1 的招募与活化并非偶联在一起。STING 的 Ser366A 或 Leu374A 突变不会影响结合激活 TBK1,但会使其丧失与 IRF3 结合的能力,从而阻止 TBK1 对 IRF3 的磷酸化^[21]。近来有研究发现 hSTING 上 3 个非同义 SNPs: R71H、G230A 和 R293Q。HAQ 突变体与野生型 STING 对 IRF3 具有相似程度相互作用,但是 HAQ STING 对 IFN- β 的刺激能力下降超过 90%。因而推测 STING 介导 TBK1 激活 IRF3 可能还存在其他未知机制^[27]。

Ishikawa 小组揭示了另一种 STING 激活 TBK1 的可能机制。这一机制中涉及到易位子, TRAP (the translocon-associated protein) 复合体和 exocyst 复合体。易位子由 3 个亚基(SEC61 α 、SEC61 β 和 SEC61 γ)组成,调控蛋白质的折叠和分泌。TRAP 复合体以四聚体形式存在,帮助翻译后的蛋白进入内质网。exocyst 复合体是一个进化上保守的八聚体,促进膜泡运输。STING 与易位子的 SEC61 β 亚基以及 TRAP 复合体成员之一 SSR2 相互作用。胞内 DNA 刺激后,STING 与 TBK1 相互作用,两者以共定位的方式进行膜运输,因为易位子可与 exocyst 复合体相互作用,所以 STING 与 TBK1 从内质网经高尔基体最后转移到含有 Sec5(exocyst 复合体的成员之一)的核周内质网上。Sec5 能够招募激活 TBK1,进而诱导 I 型 IFN 合成^[2,28]。用

siRNA 沉默 Sec5 或 SEC61 β 或 SSR2 确实能够降低 STING 激活 IFN- β 启动子的能力。提示 STING 激活 TBK1 的机制可能有多种^[2]。

2.2 STING 介导 RNA 诱导的信号通路

胞内模式识别受体 RIG- I 识别的对象主要是含有短的双链 5'-3p RNA。双链可以来自 dsRNA,也可以是 ssRNA 内部配对形成^[8-9]。受到病毒刺激后, RIG- I 构象发生变化, CARD 结构域暴露出来,并通过与 MAVS (mitochondrial antiviral signaling, 也称 IPS-1, VISA, Cardif)的 CARD 相互作用向下传递信号。MAVS 的 C 端含有一个 TM 结构域,主要定位在线粒体上, N 端含有多个结构域,可与下游有多种接头蛋白相互作用^[29-32]。如 TRAF3/5 (tumor-necrosis factor receptor-associated factor 3/5), TANK (TRAF family member-associated NF- κ B activator)等,形成多条支路调节干扰素的产生^[33-35]。新发现的 STING 也是 MAVS 下游的接头蛋白,并且通过 TBK1 介导 IRF3 的激活。

Shu 小组认为 STING 定位在线粒体上,并且发现静息状态下 STING 与 MAVS 持续相互作用^[9]。尽管大部分数据支持 STING 定位在内质网上,但是由于 MAMs (mitochondria-associated membranes) 处内质网与线粒体融为一体,很难明确地说 STING 在此处的亚细胞定位。而且 STING 上既有内质网的滞留信号又有线粒体的定位信号,很可能 STING 与 MAVS 就是在这里持续相互作用的。病毒刺激加强了这种相互作用。Shu 小组还发现, STING 与 IRF3 也持续相互作用,病毒感染后 STING 将 TBK1 (TANK-binding kinase 1) 招募至线粒体,并且 STING 与 IRF3 相互作用的区域和 STING 与 TBK1 相互作用的区域相同,提示 STING 通过二聚化可以拉近 IRF3 与 TBK1 的距离。STING 与 TBK1 相互作用使自身的第 358 位丝氨酸磷酸化,从而增强 TBK1 与 IRF3 间的相互作用,介导 IRF3 的磷酸化,促进干扰素表达^[3,9]。由于 5'-3p dsRNA 诱导的 STING 激活干扰素的下游通路没有更为精细的报道,而 STING 与 TBK1、IRF3 三者的位置关系与 DNA 诱导的通路非常相似,所以我们猜想 RNA 诱导的 STING 激活 TBK1 与 IRF3 的机制可能与 DNA 诱导的类似,只是前者在 MAMs 上进行,而后者在点状的膜结构上进行。

目前不同研究小组在“STING 是否激活 NF- κ B 和 IFN- β ”这个问题上存在分歧。Jiang 和 Ishikawa 小组的结果都表明 STING 既可激活 IRF3

启动子又可激活 NF- κ B 和 IFN- β 启动子^[2, 6]. 而 Shu 小组采用相同方法却发现 STING 仅仅激活 IRF3 而不激活 NF- κ B 和 IFN- β , 但是敲除 STING 却会抑制病毒引起的 NF- κ B 激活. 对于这个结果 Shu 的解释是病毒引起的 IRF3 通路与 NF- κ B 激活在 STING 水平可能存在未知的 cross-talk^[3]. 我们实验室也做了相关的实验, 结果是: STING 明显激活 IFN- β 和 IRF3 却不激活 NF- κ B. 尽管转录因子 IRF3/IRF7 和 NF- κ B 结合在 IFN- β 的增强子上对于病毒诱导的 IFN- β 转录很重要^[36-37], 但是后来有研究发现, IRF3/IRF7 在诱导 IFN- β 转录的过程中发挥主要作用, 而 NF- κ B 却是非必需的^[38-39], 所以我们支持 STING 能够激活 IFN- β 但不激活 NF- κ B. 另外, 尽管 Jiang 小组的结果显示过表达 STING 可以激活 NF- κ B 启动子, 但激活倍数远远小于对 IFN- β 启动子的激活^[6]. 根据这些结果, 我们推测 STING 在 RIG-I 信号通路中主要通过激活 IRF3 来诱导 IFN- β 表达.

最近 Jiang 研究小组发现 STING 除了介导 IFN- β 表达, 还能介导趋化因子产生. 在适应性免疫中发挥功能的 STAT6 (signal transducer and activator of transcription-6) 在天然免疫通路中也有重要作用, 并且是依赖于 STING、MAVS 及 TBK1 而不依赖 JAK-STAT 途径的新通路^[40]. 研究发现 RNA 病毒感染后, STING 与定位于 MAMs 或过氧化物酶体上的 MAVS 相互作用^[41]. 被激活的 STING 离开 MAVS 后招募 STAT6 和 TBK1 到内质网, 使 STAT6 第 407 位丝氨酸被 TBK1 磷酸化, 而后另一个酪氨酸激酶又将 STAT6 第 641 位酪氨酸磷酸化. 磷酸化的 STAT6 发生同源二聚化并入核, 启动靶基因转录, 诱导产生 CCL2、CCL20 和 CCL26 等趋化因子. 这些趋化因子招募免疫细胞抵御病毒感染^[40].

2.3 STING 参与其他病原体介导的天然免疫反应

I 型干扰素不仅仅是应答病毒时才产生的细胞因子, 大多数的细菌性病原体也能够通过胞内的各种模式识别受体诱导 I 型干扰素产生. 细菌性病原体产生的病原相关分子模型主要为细菌的 DNA, 此外还有细菌产生的第二信使环二核苷酸.

2.3.1 STING 参与病原体 DNA 介导的天然免疫反应.

细菌诱导的 IFN 通路与病毒 DNA 诱导的 IFN 通路大同小异, 不同细菌的 DNA 可能采取不同的通路诱导 IFN- β 产生.

肺炎链球菌(革兰氏阳性菌)是引起细菌性肺炎的主要原因. 肺炎链球菌能够产生一种自溶酶. 细菌自溶时, 肺炎链球菌 DNA 会被胞质中的特异性受体 DAI 识别结合, 通过 DAI/STING/TBK1/IRF3 的通路激活 IFN- β 表达. 而在 STING-/- 骨髓巨噬细胞中转染肺炎球菌的 DNA, 细胞则完全不能产生 IFN- β ^[42]. 布鲁氏菌(革兰氏阴性菌)的 DNA 能够在巨噬细胞和脾细胞中诱导 IFN- β 表达. 该 DNA 分子被一个未知的受体识别, 依赖 RNA 聚合酶 III 的转录, 经 MyD88 和 STING 介导产生 IFN- β . 这是首次报道细菌的 DNA 可以为 RNA 聚合酶 III/STING 信号通路介导产生 IFN- β 的^[43]. 沙眼衣原体感染宿主也可诱导 IFN- β , RNA 干扰实验表明 IFN- β 衣原体诱导 IFN 依赖 STING, 但具体机制还不清楚, 可能是一种新机制^[44].

由此可见, 细菌诱导宿主产生干扰素与细菌种类无明显关系, 主要与病原菌暴露到细胞质中的 DNA 种类有关.

2.3.2 STING 参与环二核苷酸介导的天然免疫反应.

环二核苷酸(c-di-GMP)是细菌中一种保守的信号分子, 能够诱导 STING 依赖性的 I 型干扰素反应. 但是一直没有发现环二核苷酸在哺乳动物中的 PRRs. 最近 Dara 等证明在 c-di-GMP 诱导的天然免疫反应中, 起到 PRRs 作用的就是 STING 分子. STING 通过其 CTD 结合 c-di-GMP. 化学计量学数据显示, 两分子 STING 结合一分子 c-di-GMP, 这与文献报道的 STING 二聚化后诱导 I 型干扰素表达的结论一致. 此外, 该小组还发现, STING 对 DNA 和环二核苷酸的应答功能是分开的: STING 突变体 R231A 能结合 c-di-GMP, 在 STING 缺陷型小鼠的骨髓巨噬细胞中介导 DNA 诱导的干扰素表达, 但是不能对环二核苷酸应答^[6]. 最近有小组从单核增生李斯特菌分泌物中鉴定出一种新型第二信使 c-di-AMP. 该分子能够诱导 IFN 产生^[45]. 同 c-di-GMP 一样, STING 在其诱导产生 I 型 IFN 反应中也是必需的^[46].

综上所述可以看出 STING 调节通路对于宿主防御通过 DNA 致病的病原菌是极其重要的.

目前文献报道的 STING 功能主要集中在天然免疫, 除此之外, STING 也可以与 MHC-II 相互作用介导死亡信号的转导. 定位在细胞膜表面 STING 的 C 端位于细胞质中, 其上含有丰富的蛋白质-蛋白质相互作用位点, 包括 ITIMs 结构域

(能够招募抑制信号效应因子 SHP-1 和 SHIP). MHC-II 聚合或 STING 过表达时, STING 发生酪氨酸磷酸化, 招募 SHP-1 和 SHIP, 一方面抑制钙离子的动员, 使细胞在生产过程中处于竞争劣势, 另一方面激活胞外的 SRK 信号通路诱导细胞死亡^[4].

3 STING 相关信号通路的负调控

过度免疫会引发自身免疫病, 宿主为了避免过度免疫会采取一系列策略负调控 IFN- β 信号通路, 有些病毒也会为了更有利于自己生存进化出一些阻碍信号通路转导的机制. 目前针对 STING 介导的 IFN- β 通路的负调节机制研究还不多, 已发现的负调控因子及机制总结如下:

3.1 Atg9a

dsDNA 刺激后, STING 与 Atg9a 及 LC3(microtubule-associated protein 1 light chain)共定位, 以一种依赖 Atg9a 的方式进行膜运输. 缺失 Atg9a 将极大地提高 dsDNA 诱导的 STING 与 TBK1 在胞质点状结构上的装配, 导致 IRF3 通路异常激活, 重新转入 Atg9a-GFP 后, Atg9a 破坏 STING 与 TBK1 的装配, IFN- β 的表达量恢复正常, 因此, Atg9a 是 dsDNA 刺激的天然免疫的负调节因子, 通过调控 STING 与 TBK1 的装配限制天然免疫反应^[25-26].

3.2 Trex1

始于病毒核酸监测的 I 型干扰素反应不仅对抗病毒很重要, 与某些自身免疫病也有关联. 人 3'修复外切核酸酶(Trex1)突变引起与 IFN 相关的自身免疫病 AGS (Aicardi-Goutie` res syndrome). IRF3、I 型干扰素及核外 DNA 在 Trex1 缺陷细胞中的积累是 Trex1 缺陷型小鼠发病的必需条件. 将 Trex1-/- 小鼠与 MAVS-/- 或 STING-/- 小鼠杂交, 发现 Trex1-/-、MAVS-/- 小鼠同 Trex1-/- 死于相同的自身免疫病, 而 Trex1-/-、STING-/- 小鼠完全免于自身免疫组织受伤, 情况甚至好于 Trex1-/-、Irf3+/- 小鼠. 提示 Trex1 是 STING 介导的抗病毒反应的必需负调控因子^[47].

3.3 RNF5

RNF5 是一个 E3 泛素连接酶. 静息状态下, RNF5 与 STING 是各自分开的, 病毒感染后两者则持续相互作用, 用 SeV 感染细胞, 6 h 后 STING 含量开始下降, 9 h 后恢复正常, 而 RNF5 的量在感染前后均没有变化. 研究发现 RNF5 能够对 STING 的 Lys150 进行 K48 连接的泛素化修饰, 介

导 STING 进入蛋白酶体降解. 说明 RNF 是通过调节 STING 降解负调控天然免疫反应的^[3].

3.4 活性氧

活性氧在调控天然免疫反应方面具有重要作用, 活性氧信号的强度决定了反应的结果. 用鱼藤酮处理细胞使其持续产生活性氧, STING 介导的 IFN- β 通路被抑制, 可能由于 STING 关键位点的半胱氨酸被不可逆修饰, 在同源二聚体间形成了二硫键. NLRX1 是一个抗病毒反应的负调控因子, 能够强烈地产生活性氧. 由于 NLRX 和 STING 都可以出现在线粒体, 所以 STING 的活性有可能被 NLRX1 通过产生强烈的活性氧负调控^[21].

3.5 NS4B

登革热病毒的一个产物 NS4B 能够抑制 STING 介导的 IFN- β 激活. 由于 NS4B 与 STING 的氨基端同源性很高, 所以人们推测 NS4B 是通过与 STING 直接相互作用来负调控干扰素通路的^[2].

4 总结与展望

本文主要回顾了 STING 分子的发现、结构、在天然免疫中的功能、作用机制及目前已知的调控机制(图 2). 这些研究使人们对 STING 分子有了较为深入的了解: STING 是一个多结构域的跨膜蛋白, 可能在内质网、MAMs、质膜等均有不同程度的分布, 能够特异性介导 5' -3p dsRNA 诱导的 RIG-I 信号通路, 几乎参与所有胞内 B 型 dsDNA 模式识别受体介导的 IFN- β 通路, 并且可以直接作为模式识别受体介导环二核苷酸 c-di-GMP、c-di-AMP 诱导的 IFN 表达. 这些通路汇集到 STING, 导致其发生二聚化、泛素化等修饰从而活化自身, 通过相似的机制激活下游 TBK1 对 IRF3 磷酸化, 诱导 IFN- β 表达. STING 也能招募 STAT6 诱导产生趋化因子. 对这些过程机制的揭示有助于我们进一步研究病毒与宿主的相互调节. 如: 我们实验室在研究冠状病毒 NL63 木瓜样蛋白酶 PLP2 逃避天然免疫的机制时探究了 PLP2 对 STING 的影响, 发现 PLP2 能去除 STING 的泛素化酶修饰并破坏 STING 的二聚化, 揭示了 PLP2-TM 负调控天然免疫的一个新机制^[48].

尽管如此, 人们对 STING 的功能与作用机理的认识还有待深入. 如: PRRs 传递信号到 STING 的机制还未阐明, 无论是 DNA 通路还是 RNA 通路. STING 激活 TBK1 的分子生物学机制也不清

楚. 另外, 目前对于 STING 的调控, 以及病毒抑制 STING 逃避天然免疫的例子了解的还不多. 这些问题的揭示将帮助我们进一步探明抗病毒信号通

路的分子机制及病毒逃避宿主天然免疫的机制, 为治疗病毒引起的疾病提供新的靶点和思路.

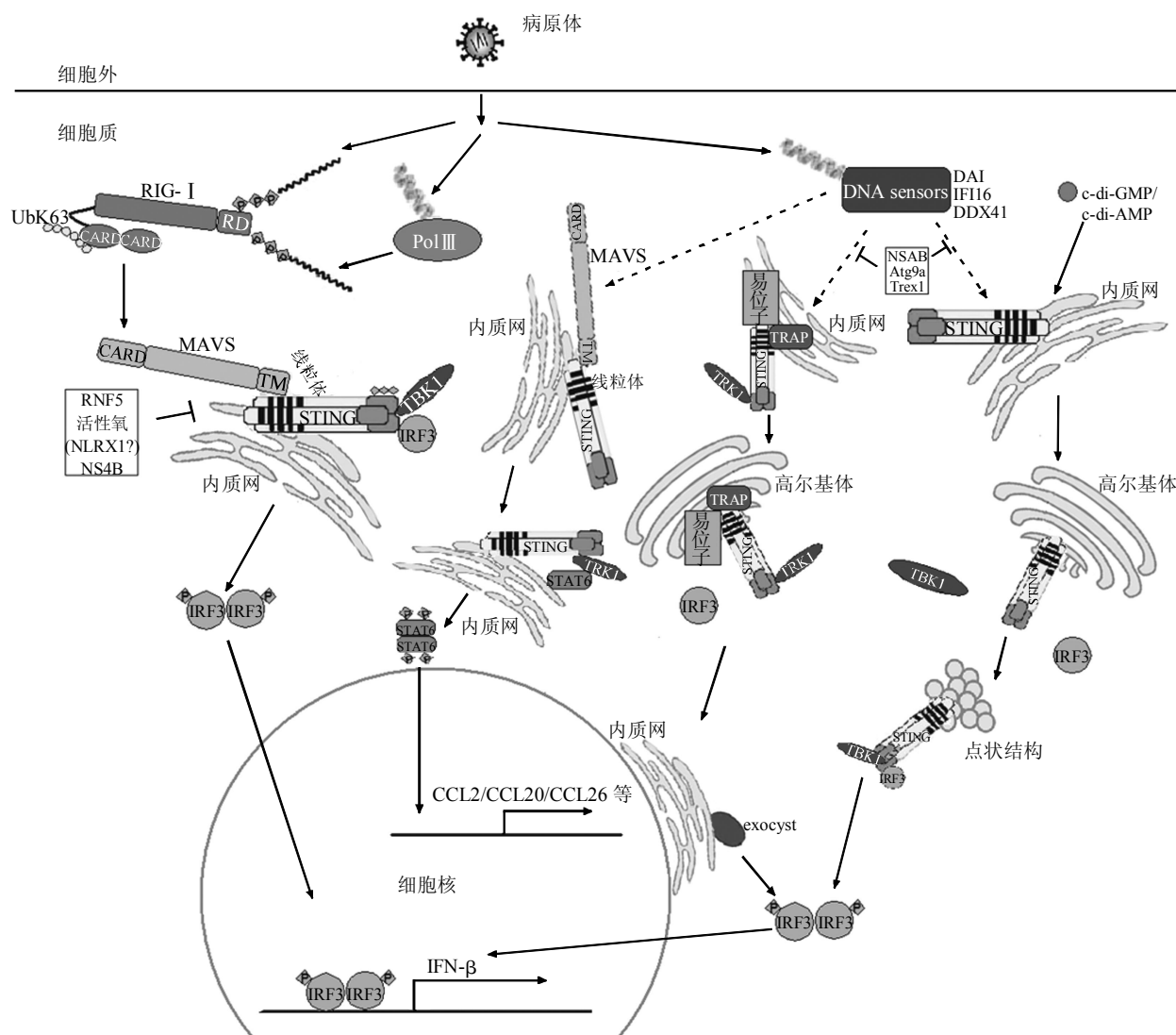


Fig. 2 Activation and regulation of innate immunity pathway mediated by STING

图 2 STING 介导的天然免疫信号激活与调控

病毒及细菌等病原体在细胞中产生的 5'-3p dsRNA 或 dsDNA 被相应的模式识别受体识别后立即激活天然免疫系统, 建立抗病毒状态. 5'-3p dsRNA 由 RIG-I 负责识别. RIG-I 与配体结合后, 构象即发生改变, 暴露出其 N 端串联的 2 个 CARD 结构域, 同时其 CARD 结构域会被细胞中的泛素连接酶催化连接 K63 多聚泛素链, 激活 RIG-I. 活化的 RIG-I 与下游 MAVS 通过彼此的 CARD 结构域相互作用传递信号. 位于线粒体上的 MAVS 与位于 MAMs 处的 STING 相互作用, 促进 STING 发生二聚化、泛素化等修饰而活化. 活化的 STING 通过 C 端结构域招募 IRF3 与 TBK1 并被 TBK1 磷酸化. 磷酸化的 STING 进而促进 TBK1 磷酸化 IRF3, 诱导其发生二聚化、入核促进 IFN 的转录. dsDNA 被发现由 POL III、DAI、IFI16、DDX41 等多种胞内 dsDNA 模式识别受体识别. 其中 POL III 识别 dsDNA 后将其转录成 5'-3p, 进而激活 RIG-I 信号通路, 后 3 种则是通过尚不清楚的机制将信号传递到 STING. STING 进而也是通过招募 TBK1 磷酸化其自身再促进 TBK1 磷酸化 IRF3. 但是此过程发生的空间与 RIG-I 信号通路不同. 位于内质网上的 STING 经高尔基体移位到核周的点状结构上介导该催化过程. 另外, STING 还能在易位子和 TRAP 复合体介导下经高尔基体运动到核周含有 exocyst 复合体的内质网上, 通过 exocyst 复合体招募激活 TBK1, 进而促进 TBK1 对 IRF3 的磷酸化. 除了介导产生 IFN, dsDNA 还能通过 MAVS 激活 STING, 促使其招募 TBK1 与 STAT6, 进而促进 STAT6 磷酸化入核, 诱导 CCL2、CCL20 和 CCL26 等趋化因子产生.

参 考 文 献

- [1] Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol*, 2010, **20**(1): 4–22
- [2] Ishikawa H, Barber G N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 2008, **455**(7213): 674–678
- [3] Zhong B, Yang Y, Li S, *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*, 2008, **29**(4): 538–550
- [4] Jin L, Waterman P M, Jonscher K R, *et al.* MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(16): 5014–5026
- [5] Zhong B, Zhang L, Lei C, *et al.* The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity*, 2009, **30**(3): 397–407
- [6] Sun W, Li Y, Chen L, *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(21): 8653–8658
- [7] Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, *et al.* RIG-I-dependent sensing of poly (dA: dT) through the induction of an RNA polymerase III -transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*, 2009, **10**(10): 1065–1072
- [8] Chiu Y H, Macmillan J B, Chen Z J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG- I pathway. *Cell*, 2009, **138**(3): 576–591
- [9] Sharma S, DeOliveira R B, Kalantari P, *et al.* Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity*, 2011, **35**(2): 194–207
- [10] Nazmi A, Mukhopadhyay R, Dutta K, *et al.* STING mediates neuronal innate immune response following japanese encephalitis virus infection. *Sci Rep*, 2012, **2**: 347
- [11] Burdette D L, Monroe K M, Sotelo-Troha K, *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, 2011, **478**(7370): 515–518
- [12] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, **408**(6813): 740–745
- [13] Lund J, Sato A, Akira S, *et al.* Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, 2003, **198**(3): 513–520
- [14] Martinez J, Huang X, Yang Y. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(14): 6442–6447
- [15] Takaoka A, Wang Z, Choi M K, *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 2007, **448**(7152): 501–505
- [16] DeFilippis V R, Alvarado D, Sali T, *et al.* Human cytomegalovirus induces the interferon response *via* the DNA sensor ZBP1. *J Virol*, 2010, **84**(1): 585–598
- [17] Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, *et al.* IFN β responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol*, 2008, **10**(12): 2579–2588
- [18] Ishii K J, Kawagoe T, Koyama S, *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*, 2008, **451**(7179): 725–729
- [19] Zhang Z Q, Yuan B, Bao M S, *et al.* The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*, 2011, **12**(10): 959–965
- [20] Unterholzner L, Keating S E, Baran M, *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol*, 2010, **11**(11): 997–1004
- [21] Tanaka Y, Chen Z J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal*, 2012, **5**(214): ra20
- [22] Tsuchida T, Zou J, Saitoh T, *et al.* The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity*, 2010, **33**(5): 765–776
- [23] 孙 莉, 刘殿波, 杨宇东, 等. 人类冠状病毒调节宿主抗病毒天然免疫分子机制. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(3): 239–244
Sun L, Liu D B, Yang Y D, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(3): 239–244
- [24] Ishikawa H, Ma Z, Barber G N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 2009, **461**(7265): 788–792
- [25] Saitoh T, Fujita N, Yoshimori T, *et al.* Regulation of dsDNA-induced innate immune responses by membrane trafficking. *Autophagy*, 2010, **6**(3): 430–432
- [26] Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, *et al.* Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(49): 20842–20846
- [27] Jin L, Xu L G, Yang I V, *et al.* Identification and characterization of a loss-of-function human MPYS variant. *Genes Immun*, 2011, **12**(4): 263–269
- [28] Chien Y, Kim S, Bumeister R, *et al.* RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell*, 2006, **127**(1): 157–170
- [29] Seth R B, Sun L, Ea C K, *et al.* Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signalling protein that activates NF-kB and IRF3. *Cell*, 2005, **122**(5): 669–682
- [30] Kawai T, Takahashi K, Sato S, *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG- I - and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, 2005, **6**(10): 981–988
- [31] Xu L G, Wang Y Y, Han K J, *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*, 2005, **19**(6): 727–740
- [32] Meylan E, Curran J, Hofmann K, *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 2005, **437**(7062): 1167–1172
- [33] Paz S, Vilasco M, Werden S J, *et al.* A functional C-terminal

- TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response. *Cell Res*, 2011, **21** (6): 895–910
- [34] Tang E D, Wang C Y. TRAF5 is a downstream target of MAVS in antiviral innate immune signaling. *PLoS One*, 2010, **5**(2): e9172
- [35] Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem*, 2007, **282**(16): 11817–11826
- [36] Thanos D, Maniatis T. Virus induction of human IFN gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell*, 1995, **83**(7): 1091–1100
- [37] Merika M, Williams A J, Chen G, *et al.* Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell*, 1998, **1**(2): 277–287
- [38] Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 2006, **25**(3): 349–360
- [39] Wang X, Hussain S, Wang E J, *et al.* Lack of essential role of NF-kappa B p50, RelA, and cRel subunits in virus-induced type I IFN expression. *J Immunol*, 2007, **178**(11): 6770–6776
- [40] Chen H, Sun H, You F, *et al.* Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell*, 2011, **147**(2): 436–446
- [41] Dixit E, Boulant S, Zhang Y, *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*, 2010, **141**(4): 668–681
- [42] Parker D, Martin F J, Soong G, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* DNA initiates type I interferon signaling in the respiratory tract. *MBio*, 2011, **2**(3): e00016–11
- [43] de Almeida L A, Carvalho N B, Oliveira F S, *et al.* MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN- β induction in response to brucella abortus infection. *PLoS One*, 2011, **6**(8): e23135
- [44] Prantner D, Darville T, Nagarajan U M. Stimulator of IFN gene is critical for induction of IFN- β during chlamydia muridarum infection. *J Immunol*, 2010, **184**(5): 2551–2560
- [45] Woodward J J, Iavarone A T, Portnoy D A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*, 2010, **328** (5986): 1703–1705
- [46] Sauer J D, Sotelo-Troha K, von Moltke J, *et al.* The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the *in vivo* interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect Immun*, 2011, **79**(2): 688–694
- [47] Gall A, Treuting P, Elkon K B, *et al.* Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses *via* lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity*, 2012, **36**(1): 120–131
- [48] Sun L, Xing Y, Chen X, *et al.* Coronavirus papain-like proteases negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated signaling. *PLoS ONE*, 2012, **7**(2): e30802

Regulation of Innate Immunity Signaling by STING, a Stimulator of Interferon Genes*

ZHENG Yang^{1,2}, XING Ya-Ling², CHEN Xiao-Juan², YANG Xing-Xing², WANG Kai², CHEN Zhong-Bin²**

¹ College of Life Science and Bio-engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;

² Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract STING (stimulator of interferon genes) is a novel regulatory protein in innate immune signaling pathways, which has been shown to be essential for the production of type I interferon in response to certain viruses and intracellular bacteria. B type dsDNA and 5'-3p dsRNA are detected by the corresponding pattern recognition receptors (PRRs) after exposing to host cells, which pass signals to STING. STING then recruits TBK1 to activate IRF3 and induce IFN by the similar mechanism. Besides, STING can be a PRR of the cyclic dinucleotides, such as c-di-GMP and c-di-AMP in bacteria, to induce type I interferon response. Except IFN, STING also activates STAT6 to induce some specific chemokines capable of attracting various immune cells. Here, we review recent studies on STING's structure, location, function, and regulatory mechanisms in the innate immune pathway, which provide an important theoretical guidance for the development of new antiviral immunotherapy.

Key words innate immune, type I interferon, STING, dsRNA, dsDNA

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00099

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81273231, 30972761, 81172799, 30870536, 81102478), National Mega- projects of Science Research(2008ZX10004-015), Beijing Natural Science Foundation(7092075, 7132165) and Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry(2009).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66930297, E-mail: chenzb@bmi.ac.cn or chenzhongbin@yahoo.com

Received: February 27, 2012 Accepted: June 1, 2012