

宿主细胞应答病毒感染的细胞 信号转导研究新进展*

阳 凯 王 琛**

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 机体如何识别以及清除入侵的病毒一直是分子免疫学研究的重点. 早期的研究揭示, 病毒的入侵可诱导表达大量的 $\text{IFN}\beta$, PKR 等抗病毒蛋白分子. 这些蛋白质分子通过多种方式造成被感染细胞表现出特殊的状态或迅速凋亡, 从而控制病毒的复制和传播, 同时诱导产生大量细胞因子和趋化因子等, 启动适应性免疫反应的进程. 但是, 该领域研究的一个重要瓶颈是对于病毒与宿主细胞相互作用的最早期信号事件了解甚微. 近几年的研究工作在先天性免疫系统如何识别早期病毒的入侵方面取得了重大进展. TLR3 和 RIG-I/MDA5 细胞信号转导通路, 是最近发现的宿主细胞识别与应答病毒的重要调节机制. 它们利用不同的细胞信号转导机制诱导先天性免疫反应, 主要参与脊椎动物细胞识别和清除 RNA 病毒的原发抗感染过程, 是机体先天免疫系统的一种重要反应机制, 直接影响后续适应性免疫系统的作用. 就这些细胞信号转导通路在先天性免疫应答中的研究进展做了概述与展望.

关键词 PRR, PAMP, TLR3, RIG-I, MDA5, 先天性免疫应答

学科分类号 Q939.91

病毒是一种寄生于宿主的简单生物体, 它依赖于利用宿主的分子与细胞环境达到复制与传播. 病毒感染过程是一个理想的系统生物学研究模型, 它不但涉及分子、细胞、器官以及个体与群体等不同的层面, 而且是一个在时间与空间上动态变化的复杂体系. 在病毒与宿主的共进化过程中, 宿主演化出先天性免疫(innate immunity)防御系统, 可以在病毒感染的第一时间控制病毒复制和传播, 然后再通过获得性免疫反应(adaptive immunity)来消灭病毒. 一般来说, 高致病性(high pathogenesis)病毒获得了一种能力, 能够反制宿主的这种限制, 使其自身能够迅速复制和传播, 对宿主造成严重损害. 病毒感染的最终结果是病毒与宿主双方的进攻与防御综合能力的体现. 因此, 研究病毒与宿主相互作用的分子机理具有非常重要的科学与应用意义.

先天性免疫系统是机体抵抗病毒侵染的第一道防线, 而识别入侵的病毒是激发有效先天性免疫反应的前提. 病毒在新陈代谢的过程中会产生大量病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 它们是病毒特有且不易改变的特殊分子结构(包括脂类, 糖类, 核酸和蛋白质成

分), 在动物细胞中不存在. 动物细胞、尤其是免疫细胞, 通过自身表达的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)可以识别各种不同的病毒分子模式, 最终诱导 I 型干扰素(type I interferon)、ISG15/56、PKR、Mx、IP10 和 OAS 等抗病毒蛋白的合成^[1]. I 型干扰素的合成是抗病毒先天性免疫反应中的关键一环, 合成的 $\text{IFN}\alpha$ 和 $\text{IFN}\beta$ 通过 JAK/STAT 细胞信号转导通路调节其他抗病毒蛋白与免疫调节因子的合成, 抑制病毒的复制与传播, 并激活获得性免疫系统进一步清除入侵的病毒(图 1).

大多数病毒(如 RNA 病毒)在侵染细胞的过程中会合成大量的双链 RNA(dsRNA, double strand RNA)中间体. 相应地, 宿主细胞进化出监测 dsRNA 存在的识别机制和应答信号转导途径. 早期的研究集中于 dsRNA 诱导的 I 型干扰素如何在宿主细胞建立抗病毒的特殊状态. 其中, 蛋白激酶 PKR 以及 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(OAS)的作用机

*国家自然科学基金资助项目(30570378).

** 通讯联系人. Tel: 021-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn

收稿日期: 2006-10-12, 接受日期: 2006-10-17

制得到了详细的阐述. PKR 和 OAS 均被干扰素强烈地诱导表达, 然后通过结合细胞内的 dsRNA 而激活. 激活的 PKR 可磷酸化并抑制蛋白质合成起始因子 eIF α 的活力, 在宿主细胞内引起非特异的蛋白质合成受阻, 从而抑制病毒的复制. 与 PKR 不同, OAS 识别 dsRNA 后, 引起自身构象的变化而激活. 活化的 OAS 通过合成 2'-5'寡聚腺苷酸最终激活 RNA 内切酶(RNase L), 导致非特异性的单链 RNA (ssRNA) 的降解, 抑制病毒的复制. 虽然 PKR 以及 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶需要 dsRNA 才能发挥功能, 但是它们处于干扰素介导的抗病毒反应的下游, 并不参与干扰素本身的基因表达的调控过程.

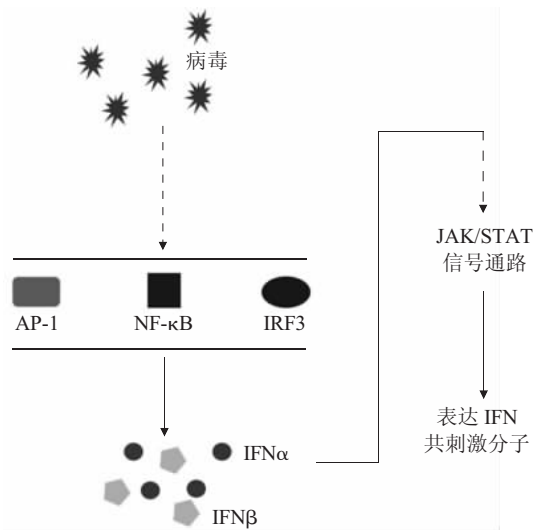


Fig. 1 Overview of innate immune response to virus

图 1 病毒激活先天性免疫反应的框架

病毒激活宿主先天性免疫反应的过程大致分为 3 个阶段: 病毒被宿主识别, 并通过一系列的信号转导事件激活转录因子 AP-1, NF- κ B 和 IRF3. 激活的 AP-1, NF- κ B 和 IRF3 转移至细胞核起始下游基因 IFN α , IFN β 的表达. IFN α , IFN β 分泌到细胞外再通过其受体激活 JAK/STAT 信号通路, 从而激发更多的 IFN α , IFN β 以及 IFN 共刺激因子的表达.

该领域研究的一个重要瓶颈, 是对于病毒与宿主细胞相互作用的最早期信号事件了解甚微. 近年来在宿主细胞如何识别 dsRNA、诱导干扰素的基因表达的分子机制研究方面取得了突破性进展. 研究发现: TLR3 和 RIG-I/MDA5 细胞信号转导通路(图 2)在识别 dsRNA、诱导 I 型干扰素大量表达的过程中发挥了举足轻重的作用. TLR3 是定位于细胞内涵体(endosome)膜上的 PRR, 主要表达于免疫细胞, 可识别通过内吞作用而进入细胞囊泡的病毒

dsRNA, 诱导 I 型 IFNs 的大量表达. RIG-I/MDA5 是定位于细胞质内的 PRR, 可识别细胞质内病毒复制产生的 dsRNA, 通过不依赖于 TLR3 的方式诱导 IFNs 的合成. 本综述基于目前对这些细胞信号转导通路的研究成果, 阐述了 TLR3 和 RIG-I/MDA5 识别 dsRNA、诱导 I 型 IFNs 基因表达过程中的主要分子事件, 以及宿主和病毒调控这些通路的分子机制.

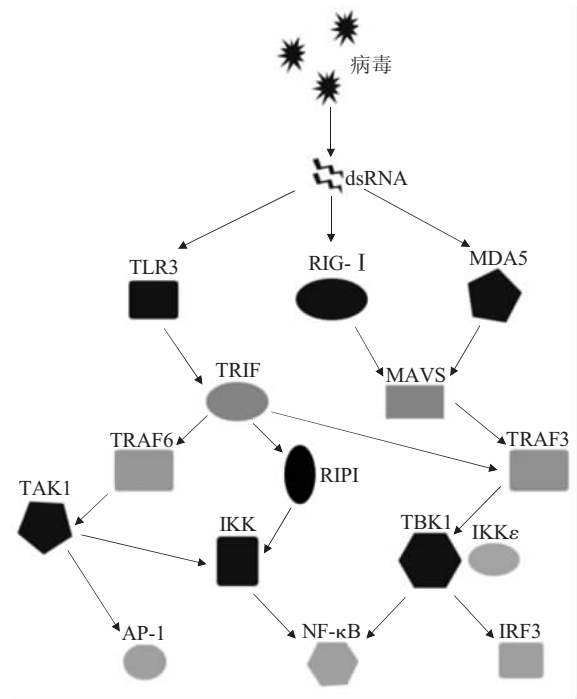


Fig. 2 TLR3 and RIG-I/MDA5 signaling pathways

图 2 TLR3 与 RIG-I/MDA5 信号通路

TLR3, RIG-I 以及 MDA5 可作为细胞内受体识别病毒产生的 dsRNA, 激活宿主先天性免疫反应. 在 TLR3 信号通路中, TLR3 识别 dsRNA 并通过招募配体分子 TRIF 介导下游信号的转导. TRIF 通过与多种配体信号分子相互作用调控不同转录因子的激活. 一方面, TRIF 可通过与 TRAF6 相互作用激活激酶 TAK1, 并进一步激活复合体 IKK, 最终导致 NF- κ B 的激活. TAK1 作为 MAPKKK 家族成员可通过 JNK 和 p38 激活 AP-1. TRIF 还可通过与 RIP1 相互作用激活 NF- κ B. 另一方面, TRIF 通过招募信号分子 TRAF3 并通过 TBK1/IKK ϵ 激活转录因子 IRF3. 在 RIG-I/MDA5 信号通路中, RIG-I, MDA5 各自识别 dsRNA, 并通过共同的配体分子 MAVS 招募 TRAF3. 激活的 TRAF3 通过 TBK1/IKK ϵ 激活转录因子 IRF3 和 NF- κ B.

1 TLR3 (Toll like receptor 3) 细胞信号转导通路

病毒裂解细胞后释放的大量复制中间体(dsRNA)可以激活先天性免疫系统的应答机制, 诱

导合成 I 型 IFN. 在研究 PKR^{-/-}和 RNase L^{-/-}小鼠的表型时发现: PKR 和 RNase L 的缺失只是影响 IFN 下游的抗病毒效应, 并不影响细胞识别 dsRNA, 诱导 IFN 的表达^[23]. 因此, 细胞内一定存在其他的系统参与早期识别病毒的 dsRNA. 探讨病毒与宿主细胞相互作用的机制, 不仅小鼠可以作为研究模型, 果蝇也是很好的模型. 在筛选微生物应答缺陷的果蝇时, Lemaitre 发现果蝇的 Toll 受体不仅可决定其早期胚胎发育的背腹分化, 而且还能识别多种 PAMP, 参与激活果蝇先天性免疫系统, 抵抗病原体的入侵. 果蝇 Toll 受体的哺乳动物同源蛋白 TLRs (toll like receptor) 相继被鉴定. TLRs 是单次跨膜受体, 可识别多种微生物相关的分子元件, 在哺乳动物先天性免疫反应中发挥了十分重要的作用. 到目前为止, 哺乳动物中已鉴定出 11 种 TLRs. 这些 TLRs 在结构上具有较大的相似性: a. 细胞外存在 LRRs (leucine-rich repeats) 结构域, 用于识别特定的 PAMP; b. 细胞内含有 TIR (Toll/IL-R) 信号传导结构域. 虽然所有的 TLRs 具有相似的结构, 但它们识别的微生物分子特征是不同的. 例如, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 可识别病毒核酸结构的 PAMP, 而 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 可识别细菌胞壁成分的 PAMP^[1]. TLRs 的胞外 LRR 结构域识别不同的 PAMP 引起其胞内 TIR 结构域的构象变化, 后者招募下游含 TIR 结构域的其他细胞信号转导分子向细胞核内传递信号. 目前已发现, MyD88、TRIF (TICAM-1)、TRAM、TIRAP (Mal) 4 种含 TIR 结构域的信号分子介导了 TLRs 信号通路调控的抗病原体基因的表达.

在已知的 TLRs 中, TLR3 是唯一可识别人工合成的 dsRNA (poly I : C) 和病毒的 dsRNA、诱导合成 I 型 IFN. TLR3 主要表达于 DC 细胞, 纤维原细胞也可以检测到表达. 在 DC 细胞中, TLR3 的亚细胞定位与 TLR7、TLR8、TLR9 相似, 主要定位于内涵体中^[4], 然而在纤维原细胞中 TLR3 定位于细胞表面^[5]. TLR3 的定位表现出细胞特异性, 暗示不同类型的细胞在生理条件下识别 dsRNA 的方式上可能存在差异. 人工合成的 poly I : C 可有效地模拟病毒的 dsRNA 诱导合成 IFN, 是研究 TLR3 信号转导通路的理想模型. 研究发现: dsRNA 可与 TLR3 发生直接的相互作用, 而且溶酶体成熟的抑制剂能显著地抑制 poly I : C 诱导的先天性免疫反应. 这暗示 TLR3 识别 dsRNA 需要酸性环境, 与 TLR3 在 DC 细胞的亚细胞定位相一致. dsRNA 与

TLR3 的结合可导致 TLR3 在结构和存在方式上发生变化. 首先, dsRNA 使得 TLR3 在膜上聚集, 多聚化的 TLR3 为信号的继续传递提供了平台^[6]. 其次, dsRNA 可导致 TLR3 C 端的多个 Tyr 位点发生磷酸化^[7], 不同位点的磷酸化可招募特异性的信号分子传递信号^[8]. 例如, 最近的研究发现, TLR3 的 759Tyr 位点的磷酸化可招募 PIK3 激活 Akt 激酶, 而 Akt 激酶的活化对 IRF3 完全磷酸化是必需的.

dsRNA 与 TLR3 结合后主要通过细胞信号转导通路激活 NF- κ B, IRF3 (IFN regulatory factor 3), AP-1 (activation protein 1) 等家族的转录因子, 后者在 IFN 基因的增强子上形成转录复合物, 诱导 I 型干扰素基因大量表达. 大多数 TLR 家族受体是通过 MyD88 (myeloid differentiation factor 88) 依赖的信号通路激活 NF- κ B, 然而 MyD88 的缺失并不会影响 dsRNA 通过 TLR3 诱导的 IFN 合成和炎症因子的表达^[9]. 这暗示 TLR3 可通过 MyD88 不依赖的途径发挥生理作用. 最近的研究揭示: TLR3 通过 TRIF (TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β) 依赖的信号通路激活 NF- κ B、AP-1 和 IRF3. TLR3 通过胞外 LRR 结构域识别 dsRNA, 引起其胞内 TIR 结构域发生变化, 进而与 TRIF 的 TIR 结构域发生相互作用. 随后, TLR3 招募的 TRIF 通过与多种配体信号分子相互作用调控不同转录因子的激活. 一方面, TRIF 可通过 N 端的 TRAF 识别结构域结合并激活 TRAF6^[10]. TRAF6 可激活激酶 TAK1, 活化的 TAK1 可进一步激活复合体 IKK, 最终导致 NF- κ B 的激活. TAK1 作为 MAKKK 家族成员可通过 JNK 和 p38 激活 AP-1. TRIF 还可通过其 C 端的 RIP 识别结构与 RIP1 相互作用激活 NF- κ B. 在 RIP1^{-/-}的 MEF 细胞中, poly I : C 诱导的 NF- κ B 通路激活严重削弱^[11]. 因此, 在 poly I : C 的刺激下, TLR3 可招募 TRIF、RIP1、TRAF6 和 TAK1 形成复合体激活 NF- κ B^[12]. 另一方面, TRIF 通过招募 TRAF3 激活转录因子 IRF3. TRAF3 作为分子桥梁既可以与 TRIF 相互作用, 又可与下游激酶 TBK1 或 IKK ϵ 相互作用^[13]. TRAF3^{-/-}的 MEF 细胞实验证明, TRAF3 对于 TLR3 介导的 IFN 的表达是必不可少的, 而 TRAF3 并不参与 NF- κ B 的激活^[13,14]. TRAF3 可导致 TBK1 或 IKK ϵ 的自激活. 活化的 TBK1 或 IKK ϵ 磷酸化 IRF3 C 端的多个氨基酸残基, 导致 IRF3 激活, 诱导 I 型 IFN 和相关基因的大量表达^[15]. 虽然, TRAF3 被证明在 TLR3 信号通路中发挥了重要的作用, 但 TRAF3 激活下游

激酶的分子机制还需进一步阐明。

TLR3在先天性免疫系统中的作用得到了广泛的研究和讨论。最初的研究发现, 人工合成的 poly I : C 以及 RNA 病毒的 dsRNA 都可激活 TLR3 信号通路。TLR3^{-/-}的小鼠明显地削弱了 poly I : C 诱导表达 I 型 IFNs, 炎症因子的产生以及树突细胞的成熟。同时, TLR3^{-/-}的小鼠可显著地抵抗 poly I : C 引起的小鼠死亡^[9]。因此, 人们推断 TLR3 在抗病毒的免疫反应中发挥了重要的作用。虽然有研究显示, TLR3 参与了免疫系统对几种病毒的应答^[9,16,17], 但 TLR3 在抗病毒免疫反应中的具体作用仍存在争议, 尤其在对 MCMV (murine cytomegalovirus) 侵染的认识上。Tabeta 等^[17]认为 MCMV 通过 TLR3 信号通路激活免疫系统, 因为缺失 TLR3 的小鼠对 MCMV 感染更敏感。然而, Edelmann 等^[18]则认为 MCMV 激活免疫系统不需要 TLR3 的存在。

2 RIG-I/MDA5 细胞信号转导通路

虽然 TLR3 可识别 dsRNA, 但 TLR3^{-/-}或 TRIF^{-/-}的细胞依然能应答 Sendai 等病毒的侵染^[18]。因此, 细胞内必然存在不依赖于 TLR3 识别 dsRNA 的受体。最近, 通过筛选能增强 dsRNA 对 IRF3 激活的 cDNA, 发现 RIG-I 可作为细胞内识别 dsRNA 的受体, 以不依赖于 TLR3 的方式在应答病毒侵染过程中起关键作用^[19]。RIG-I 是含有 DExD/H box 的 RNA 解旋酶家族成员, 以 ATPase 依赖的方式解旋 dsRNA。通过解旋酶结构域, RIG-I 能结合人工合成的 dsRNA 和病毒的 dsRNA。除了 C 端的解旋酶结构域, RIG-I 的 N 端含有 2 个 CARDs (Caspase recruitment domains)。过表达 N 端的 CARD 结构域就可充分激活 NK- κ B 和 IRF3。过表达全长的 RIG-I 不能直接激活 NK- κ B 和 IRF3, 但能增强 RNA 病毒导致的 NK- κ B 和 IRF3 的激活, 而不影响 poly (I : C) 的刺激。因此, RIG-I 结合 dsRNA 解除其自身抑制构象, 暴露 CARD 结构域来招募下游的信号分子。

RNAi 以及小鼠基因敲除的研究已经证实, RIG-I 在机体抗病毒免疫反应中发挥了关键性的作用。一方面, RNAi 小鼠纤维原细胞系 L929 的 RIG-I, 抑制了 RNA 病毒 NDV 诱导的 IRF3 激活及随后 I 型 IFN 的表达^[19]。另一方面, RIG-I 基因敲除的小鼠表现为生长缓慢, 并在出生后 3 周因肝坏死而死亡, 其机制目前仍不清楚^[20]。但在 RIG-I

缺失的 MEFs (mouse embryonic fibroblasts) 中, RNA 病毒无法诱导 IFN β 和 ISGs (interferon stimulated genes) 的产生。IFN β 预处理 RIG-I 缺失的 MEFs 可抵制 VSV 对其的侵染^[20]。这些结果表明, IFN β 的诱导表达需要 RIG-I, 而 RIG-I 并不参与 IFN β 下游的信号通路。

除 RIG-I 外, MDA5 是另一个可通过结合 dsRNA、激活 IRF3、诱导 IFN 大量表达的信号分子。MDA5 最早发现可促进黑色素瘤细胞的分化, 其表达主要受 IFN β 的调控^[21]。与 RIG-I 相似, MDA5 具有 N 端 CARD 结构域和 C 端 dsRNA 结合的 DExD/H box RNA 解旋酶结构域。全长的 MDA5 过表达不能诱导 IRF3 的激活和 IFN 的表达, 只有当 C 端的 DExD/H box RNA 解旋酶结构域结合 dsRNA 后, MDA5 才激活。过表达 MDA5 的 N 端 CARD 结构域激活 IRF3 的能力明显地弱于 RIG-I 的 N 端 CARD 结构域^[22]。虽然, MDA5 和 RIG-I 结构上具有较多的相似性, 但它们在功能上并不是冗余的。首先, MDA5 和 RIG-I 共表达不显示协同性地激活 IRF3。其次, MDA5 可识别 dsRNA, 并通过 MAVS 激活 IRF3 和 NF- κ B。另外, 仙台病毒编码的 V 蛋白选择性与 MDA5 相互作用, 并抑制 MDA5 导致的 IRF3 的激活^[22]。因此, RIG-I 和 MDA5 更可能是互相平行的信号分子, 识别不同结构的 dsRNA。最近的研究结果显示 RIG-I 和 MDA5 可作为细胞内不同的分子受体识别不同的病毒的侵染^[23]。

RIG-I 在先天性免疫反应中发挥了重要作用, 那么它是如何传递信号的呢? 最近, 研究发现, MAVS (mitochondrial anti-viral signaling protein^[24], 又名 IPS-1 IFN- β promoter stimulator 1)^[25], VISA (virus-induced signaling adaptor)^[26], CARDIF (CARD adaptor inducing IFN- β)^[27]在 RIG-I 信号通路中发挥了重要作用。与 RIG-I 的分子结构相似, MAVS 的 N 端具有一个 CARD 结构域, C 端含有疏水的跨膜结构。通过 N 端的 CARD 结构域, MAVS 和 RIG-I 在过表达的情况可发生相互作用^[26], 但内源的 MAVS 和 RIG-I 是否以病毒依赖的方式发生相互作用还未有明确的结论。与 RIG-I 的 CARD 结构域不同, MAVS 的 CARD 结构域单独表达不能诱导 IFN β 。而 C 端疏水跨膜结构则帮助 MAVS 定位于细胞线粒体的外膜。MAVS 的细胞定位在传导上游信号的过程中发挥了十分重要的作用, 因为改变 MAVS 的细胞定位严重地损害 MAVS 诱导 I 型

IFN的能力. 同时, 这也暗示线粒体可能参与了对RNA病毒的先天性免疫应答. CARD结构域和跨膜结构对MAVS功能具有充分必要性. 一方面, 只存在CARD结构域和跨膜结构的融合体就可激活MAVS下游的信号通路. 另一方面, 缺失CARD结构域或缺失跨膜结构的MAVS突变体都会抑制下游通路的激活. RNA干扰^[24]以及基因敲除^[28]的研究均表明MAVS在RIG-I的下游信号通路中发挥重要作用. 一方面, RNA干扰MAVS的表达可抑制RNA病毒引起的NK- κ B和IRF3的激活, 使细胞对VSV的感染更敏感, 但不影响dsRNA对TLR3信号通路的激活. 而且, MAVS表达的缺失可抑制RIG-I以及MDA5^[29]对下游通路的激活, 但不影响TBK1对下游通路的激活. 因此, MAVS作为RIG-I和MDA5下游的信号分子将信号传递给IKK ϵ 和TBK1^[24]. 另一方面, MAVS^{-/-}的多种细胞无法应答RNA病毒入侵, 不能诱导IFN产生, 使得细胞抵御病毒入侵的能力大大降低^[28]. 另有研究报道MAVS缺失的细胞还可抑制ds-DNA以及B型DNA对IRF3的激活^[29]. 由此可见, MAVS是RIG-I和MDA5介导的信号通路中的重要信号分子. MAVS通过招募TRAF3^[30]继续将信号传递给激酶IKK ϵ 和TBK1, 进而激活IRF3. 除此之外, 最近我们研究发现热休克蛋白Hsp90参与了RNA病毒激活IRF3的过程. Hsp90与IRF3, TBK1形成一个复合物, 不仅调节了TBK1的稳定性, 还通过拉近TBK1与IRF3分子距离促使IRF3的快速活化^[31].

3 TLR3信号通路和RIG-I信号通路在免疫应答过程中的不同作用

研究发现, TLR3或TRIF的缺失不会影响RIG-I信号通路的激活^[32,33], TLR3信号通路和RIG-I信号通路利用不同受体识别胞内和胞外的dsRNA, 通过不同的上游信号分子传导信号, 最终激活NK- κ B、IRF3、AP-1, 诱导I型IFN的表达. 虽然这两条通路都可识别产生dsRNA的病毒对机体的感染, 诱导先天性免疫应答, 但它们在不同的细胞中的功能存在差异. 在先天性免疫系统中, DC细胞在识别病原体产生细胞因子以及I型IFN的过程中起到十分重要的作用. DC细胞可粗略地分为cDCs (conventional DCs)和pDCs (plasmacytoid DCs). 用病毒分别刺激来自RIG-I^{-/-}和TLR3^{-/-}的骨髓来源的不同DC细胞, 其IFN α 的诱导情况具有明显的差异性. 研究发现: 在病毒刺激下,

RIG-I^{-/-}的cDCs细胞诱导IFN- α 的产生被严重地抑制, TLR3^{-/-}的cDCs细胞诱导IFN- α 的产生没受影响. 这说明cDC细胞是通过RIG-I信号通路来应答RNA病毒刺激诱导I型IFN的产生. 相反地, 在大量产生IFN α 的pDC细胞中, IFN α 的表达在缺失RIG-I的pDCs细胞中表现为正常, 在缺失TLR3的pDC细胞中受抑制^[20]. 因此, pDC细胞是通过TLR3信号通路识别dsRNA诱导I型IFN的产生. 与此一致的是, RIG-I下游分子MAVS^{-/-}的cDCs失去了诱导IFN α 的能力, 而MAVS^{-/-}的pDCs则没有影响^[28]. 另外, 有证据显示, 纤维原细胞应答病毒的感染, 诱导I型IFN的合成不通过TLR3信号通路^[18], 而是依赖于RIG-I信号通路^[20]. 综上所述, 纤维原细胞以及cDCs细胞通过RIG-I信号通路识别dsRNA诱导I型IFN的产生, 在局部范围内建立抑制病毒复制的环境, 而pDCs细胞通过TLR3识别被病毒感染的细胞裂解释放的dsRNA, 诱导大量I型IFN的产生, 在较广的范围里建立抗病毒的环境.

4 TLR3信号通路和RIG-I信号通路的负调控

TLR3信号通路和RIG-I信号通路的过度激活会导致I型IFN的过量表达, 大量的I型IFN对机体将造成严重的免疫损伤. 因此, 宿主细胞必然具有对TLR3和RIG-I信号通路进行下调的分子系统, 严格控制IFN的表达. 目前, 研究发现, 宿主细胞可通过多种蛋白质在不同的信号水平上对这两条通路的进行调控. Lgp2是一个病毒诱导表达的蛋白质, 可选择性地负调控RIG-I介导的信号通路而不影响TLR3介导的信号通路^[34]. 与RIG-I和MDA5的结构相似, Lgp2具有结合dsRNA的DEXD/H box RNA解旋酶结构域, 但缺少向下游传递信号的CARD结构域. 因此, Lgp2作为负反馈调控因子, 在病毒的刺激下通过竞争结合dsRNA, 抑制RIG-I介导IRF3和NF- κ B的激活. A20是NF- κ B调控表达的蛋白质, 它负反馈性地促进RIP1降解, 从而下调TNF α 导致的NF- κ B的激活^[35]. 最近的研究发现, A20在病毒的入侵时大量表达, 可通过不同的分子机制参与负调控TLR3和RIG-I信号通路. 一方面, A20通过与TBK1相互作用来抑制由TLR3和RIG-I介导的IRF3和NF- κ B的激活. RNA干扰A20的表达可明显提高病毒和polyI:C诱导的IRF3激活^[36]. 另一方面,

A20还可以破坏 TRIF 的稳定性来抑制 TLR3 介导的信号通路^[37]. 虽然已经确认 A20 可抑制 IRF3 的激活, 但其具体的分子机制还需进一步的阐述. 不同的 IKK 激酶为 IRF3 和 NF- κ B 的激活提供了反应平台, 宿主细胞可通过一些分子选择性地抑制 IKK 激酶活力来调节信号通路. 例如, SIKE 是通过酵母双杂交鉴定的与 IKK ϵ /TBK1 相互作用的蛋白质, 通过阻止 TBK1 与 TRIF 和 IRF3 的相互作用, 选择性地抑制 dsRNA 和病毒诱导的 IRF3 的激活而不影响 NF- κ B 的激活^[38]. 另外, 宿主细胞还可通过降低 IRF3 的稳定性对 TLR3 和 RIG-I 信号通路进行负调控. 肽脯基异构酶 Pin1 可调节 IRF3 的稳定性. 研究发现, Pin1 以依赖于 IRF3 Ser³⁹⁹ 磷酸化的方式与 IRF3 发生相互作用, 引起 IRF3 的构象发生变化, 最终 IRF3 发生多聚泛素化并被蛋白酶体降解. RNA 干扰 Pin1 的表达明显增强 IRF3 的稳定性, 提高 IFN β 的表达量以及对病毒侵染的抵抗能力^[39].

除了机体自身对 IFN 的表达严格调控外, 许多病毒都编码了特异的蛋白质分子针对不同的信号分子, 抑制 TLR3 和 RIG-I 介导的 IFN 的表达, 逃避宿主免疫系统的清除. 与细胞负反馈调控相似, 病毒蛋白的调控也是在多个水平进行的. Influenza A 病毒入侵机体只能诱导少量的 IFN 的表达. 研究发现, Influenza A 病毒编码的非结构蛋白 NS1 可与细胞内的 PRR 竞争结合病毒产生的 dsRNA, 从而抑制 IRF3 的激活, 缺失 NS1 表达的 Influenza A 病毒可大量诱导 IFN 的产生^[40]. HCV (hepatitis C virus) 的 NS3/4A 蛋白是另一个研究比较清楚的病毒蛋白. NS3/4A 具有丝氨酸蛋白酶活力, 在 HCV 建立持续侵染过程中起到了十分重要的作用. NS3/4A 可切割两种重要的信号分子, 严重地抑制 IFN 的表达. 一方面, NS3/4A 可切割信号分子 TRIF, 抑制 TLR3 介导的 IRF3 的激活^[41]. 另一方面, NS3/4A 可切割 MAVS 的跨膜结构, 破坏 MAVS 的线粒体定位, 抑制 RIG-I 信号通路诱导 IFN β 的产生^[27]. 除此之外, Ebola 病毒编码的 VP35 蛋白可通过抑制 IRF3 的磷酸化, 影响 IRF3 诱导的 IFN 的表达^[42]. Rotavirus 的 NSP1 可与 IRF3 直接相互作用, 通过诱导 IRF3 的降解抑制 IFN 的表达^[43]. 还有报道, Papillomavirus 编码的 E6 蛋白可与 IRF3 相互作用抑制 IRF3 的激活. 虽然 E6 是泛素系统的连接酶, 但是并不引起 IRF3 的降解^[44], 目前对该抑制机制不清楚.

5 结语与展望

dsRNA作为病毒复制相关的特殊生物分子, 在病毒侵染过程中可激活宿主先天性免疫系统. 在先天性免疫系统如何识别病原体的研究中, 识别 dsRNA 的信号通路成为目前研究的热点. 早期发现的 TLR3 已不是识别 dsRNA 的唯一受体. 目前, 大量的研究事实表明, TLR3, RIG-I, MDA5 可作为细胞内的 dsRNA 识别受体, 通过不同的信号通路激活先天性免疫反应, 在抵御病毒的侵染过程中发挥了重要作用. TLR3 主要表达于 pDC 细胞中, 通过识别被内吞的病毒 dsRNA 诱导表达大量的 IFN- β . 而大多数细胞通过 RIG-I 信号通路检测细胞内的 dsRNA 激活先天性的免疫反应. 最近, 有研究发现 RIG-I 和 MDA5 可介导不同病毒导致的 IFN- β 表达. 可见, dsRNA 受体细胞表达的特异性以及 dsRNA 的分子结构特性决定了哪条通路被激活. 虽然, 近几年的研究结果勾勒出这些信号通路的大致轮廓, 但还存在许多的问题需要进一步地阐述, 包括在信号传递中的具体分子事件以及这些通路的信号调控. 例如, 细胞内是否存在其他的 dsRNA 受体识别不同的病毒 dsRNA? 细胞如何来区别自身的 mRNA 和危险的 dsRNA? mRNA 的高级结构可形成双链, 有研究发现, 细胞自身的 mRNA 存在甲基化的修饰, 以此来避免激活先天性免疫反应^[45]. 而坏死细胞的 mRNA 可导致 IFN β 的表达, 其具体的分子机制需进一步阐述. 在 RIG-I 信号通路中, 虽然已经证明 MAVS 作为中间信号分子连接了 RIG-I 到 IKK 和 TBK1 的激活, 但 MAVS 如何被 RIG-I 调控以及 MAVS 如何激活 IKK 和 TBK1 的机制仍不清楚, MAVS 在线粒体的细胞定位与其传导上游信号中如何发挥作用以及线粒体在这个过程中扮演的角色, TLR3 和 RIG-I 信号通路之间通过何种方式交流等问题. 解决这些问题需要发现新的参与这两条信号通路的信号分子, 相信随着研究的深入会被很快鉴定. TLR3 和 RIG-I 信号通路聚焦在 TBK1 以下的信号分子, 暗示其上游信号传导的调控复杂性. 认识和理解这些调控分子的作用机制具有重要的理论与应用意义. 一方面, 有助于我们建立分析模型, 预测病毒侵入后导致的结果, 控制甚至清除病毒的入侵. 另一方面, 建立 TLR3 和 RIG-I 信号通路的调控网络, 还可以提供有价值的药物靶标.

参 考 文 献

- 1 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*, 2004, **4** (7): 499~511
- 2 Smith E J, Marie I, Prakash A, *et al.* IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem*, 2001, **276** (12): 8951~8957
- 3 Zhou A, Paranjape J, Brown T L, *et al.* Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 20, 50-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J*, 1997, **16** (21): 6355~6363
- 4 Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*, 2003, **171** (6): 3154~3162
- 5 Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, *et al.* Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293** (5): 1364~1369
- 6 de Bouteiller O, Merck E, Hasan U A, *et al.* Recognition of double-stranded RNA by human Toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem*, 2005, **280** (46): 38133~38145
- 7 Sarkar S N, Smith H L, Rowe T M, *et al.* Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 2003, **278** (7): 4393~4396
- 8 Sarkar S N, Peters K L, Elco C P, *et al.* Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11** (11): 1060~1067
- 9 Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, **413** (6857): 732~738
- 10 Sato S, Suqiyama M, Yamamoto M, *et al.* Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, 2003, **171** (8): 4304~4310
- 11 Meylan E, Burns K, Hofmann K, *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, 2004, **5** (5): 503~507
- 12 Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee T H, *et al.* Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- {kappa}B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*, 2005, **280** (44): 36560~36566
- 13 Oganessian G, Saha S K, Guo B, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 2006, **439** (7073): 208~211
- 14 Hacker H, Redecke V, Blagojev B, *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 2006, **439** (7073): 204~207
- 15 Fitzgerald K A, McWhirter S M, Faia K L, *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 2003, **4** (5): 491~496
- 16 Wang, T, Town T, Alexopoulou L, *et al.* Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med*, 2004, **10** (12): 1366~1373
- 17 Tabeta K, Georgel P, Janssen E, *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (10): 3516~3521
- 18 Edelmann K H, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, *et al.* Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?. *Virology*, 2004, **322** (2): 231~238
- 19 Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, 2004, **5** (7): 730~737
- 20 Kato H, Sato S, Yoneyama M, *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, 2005, **23** (1): 19~28
- 21 Kang D C, Gopalkrishnan R V, Wu Q, *et al.* mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (2): 637~642
- 22 Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, *et al.* Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 2005, **175** (5): 2851~2858
- 23 Kata H, Takeuchi O, Sato S, *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 2006, **441** (7089): 101~105
- 24 Seth R B, Sun L, Ea C K, *et al.* Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*, 2005, **122** (5): 669~682
- 25 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
- 26 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
- 27 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
- 28 Sun Q, Sun L, Liu H H, *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity*, 2006, **24** (5): 633~642
- 29 Kumar H, Kawai T, Kato H, *et al.* Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med*, 2006, **203** (7): 1795~1803
- 30 Saha S K, Pietras E M, He J Q, *et al.* Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J*, 2006, **25** (14): 3257~3263
- 31 Yang K, Shi H, Qi R, *et al.* Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected

- cells. *Mol Biol Cell*, 2006, **17** (3): 1461~1471
- 32 Diebold S S, Montoya M, Unger H, *et al.* Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*, 2003, **424**(6946): 324~328
- 33 Hoebe K, Janssen E M, Kim S O, *et al.* Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol*, 2003, **4** (12): 1223~1229
- 34 Rothenfusser S, Goutaqny N, DiPerna G, *et al.* The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*, 2005, **175**(8): 5260~5268
- 35 Wertz I E, O'Ourke K M, Zhou H, *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 2004, **430** (7000): 694~699
- 36 Saitoh T, Yamamoto M, Miyagishi M, *et al.* A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol*, 2005, **174** (3): 1507~1512
- 37 Lin R, Yang L, Nakhaei P, *et al.* Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J Biol Chem*, 2006, **281**(4): 2095~2103
- 38 Huang J, Liu T, Xu L G, *et al.* SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *EMBO J*, 2005, **24** (23): 4018~4028
- 39 Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol*, 2006, **7** (6): 598~605
- 40 Talon J, Horvath C M, 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
- 41 Li K, Foy E, Ferreón J C, *et al.* Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(8): 2992~2997
- 42 Basler C F, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, *et al.* The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, 2003, **77** (14): 7945~7956
- 43 Barro M, Patton J T. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (11): 4114~4119
- 44 Ronco L V, Karpova A Y, Vidal M, *et al.* Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, 1998, **12** (13): 2061~2072
- 45 Kariko K, Buchstein M, Ni H, *et al.* Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 2005, **23** (2): 165~175

Recent Advance on Cellular Signal Transduction in Response to Virus Infections*

YANG Kai, WANG Chen**

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract How the hosts recognize and clear invading viruses is one of the key issues in molecular immunology. Previous studies uncovered that many early antiviral proteins, such as Type I interferons and PKR, are strongly induced upon virus infection. These proteins not only limit virus replication and spread or cause infected cells to undergo apoptosis, but also induce consequently expression of cytokines and chemokines to initiate acquired immunity. However, the immediate-early signaling events among host and virus interaction were largely unknown. In the past few years, there are great breakthroughs in this rapidly evolving field. TLR3 and RIG-I/MDA5 signaling pathways were shown to play a crucial regulatory role in antiviral processes. These pathways are essential for the vertebrate immune system to recognize and clear RNA virus with different strategies, which are integral parts of innate immune response and directly affect later-stage acquired immunity. The recent know-how on TLR3 and RIG-I/MDA5 signal transduction pathways and their roles in antiviral immunity were summarized.

Key words PRR, PAMP, TLR3, RIG-I, MDA5, innate immune response

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30570378).

**Corresponding author . Tel: 86-21-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn

Received: October 12, 2006 Accepted: October 17, 2006