

# 小 RNA 病毒 3C 蛋白功能的研究进展

曹圣慧, 黄孝天

**摘要:** 小 RNA 病毒科是 RNA 病毒中体积最小的一个类群, 可引起人和动物的疾病。其中, 3C 蛋白是小 RNA 病毒一种重要的非结构蛋白。本文将对小 RNA 病毒 3C 蛋白在促进病毒复制, 调控细胞凋亡和逃避免疫应答方面的功能研究进展做出综述, 为防控小 RNA 病毒感染提供理论依据与新思路。

**关键词:** 小 RNA 病毒; 3C 蛋白; 蛋白酶

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2019)12-1130-04

## Research Progress on the function of picornavirus 3C protein

CAO Sheng-hui, HUANG Xiao-tian

(Department of Medical Microbiology, Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

**Abstract:** The picornaviridae is the smallest group of RNA virus, which can cause human and animal diseases. The 3C protein is an important non-structural protein of the picornavirus. This paper reviews recent advances in 3C proteins, including the functions of promoting viral replication, affecting apoptosis and evading host immune response, which provides a theoretical basis and a new solution for the prevention and control of picornavirus infection.

**Keywords:** picornavirus; 3C protein; protease

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.31660035); the Science and Technology Foundation of Jiangxi Province (No.20171ACB20003); the Innovation Fund Designated for Graduate Students of Nanchang University (No. CX2018173)

Corresponding author: Huang Xiao-tian, Email: xthuang@ncu.edu.cn

### 1 小 RNA 病毒科的基因组结构与致病性

1.1 小 RNA 病毒基因组结构 小 RNA 病毒科基因组为单正链 RNA, 大小为 6.7~10.1 kb, 病毒颗粒呈球形, 无被膜包被, 病毒衣壳为二十面体结构<sup>[1]</sup>。小 RNA 病毒基因组结构高度保守, 包括 5' 非编码区(5'-noncoding region, 5'-NCR)、开放阅读框、3' 非编码区(3'-NCR)和 3' 端的 polyA 尾。5'-NCR 包含多个 RNA 二级结构元件, 其中一个重要的二级结构元件是内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES), IRES 三叶草结构与细胞蛋白质相互作用后招募核糖体, 启动病毒基因组

的翻译。病毒基因组开放阅读框包括 3 个部分, 分别为 P1 区、P2 区和 P3 区。P1 区经翻译加工后形成结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4, 组成病毒的衣壳结构。P2 区和 P3 区分别翻译加工形成非结构蛋白 2A、2B、2C 以及 3A、3B、3C、3D。其中, 2A 蛋白和 3C 蛋白分别参与病毒蛋白的剪切。3'-NCR 和病毒的复制效率相关, 3' 端的 polyA 尾参与病毒的复制和翻译<sup>[2]</sup>。

1.2 常见小 RNA 病毒的致病性 小 RNA 病毒科包括 35 个属, 80 个种<sup>[1]</sup>。许多小 RNA 病毒可引起人和动物的脑部、心脏、肝脏、皮肤、胃肠道或上呼吸道疾病, 且目前无有效的疫苗用于治疗。常见的小 RNA 病毒包括肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV-71)、肠道病毒 D68 型(Enterovirus D68, EV-D68)、柯萨奇病毒(Coxsackievirus, CV)、脊髓灰质炎病毒(Poliiovirus, PV)、甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus, HAV)、鼻病毒(Human rhinovirus, HRV)、口

国家自然科学基金(No.31660035); 江西省自然科学基金项目(No. 20171ACB20003); 南昌大学研究生创新专项资金项目(No. CX2018173) 联合资助

通讯作者: 黄孝天, Email: xthuang@ncu.edu.cn;

ORCID: 0000-0003-4445-9844

作者单位: 南昌大学医学部微生物学教研室, 南昌 330006

蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV)、脑心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis virus, EMCV) 等。EV-71、CV-A2、CV-A16、CV-A6 和 CV-A10 可导致每年亚太国家数百万儿童患手足口病,甚至引起更严重的临床症状,如无菌性脑膜炎、急性迟缓性麻痹和神经呼吸系统综合征<sup>[3]</sup>。CV-B4 可引起新生儿心肌炎、I 型糖尿病以及神经性疾病<sup>[4]</sup>。EV-D68 可引起世界范围内人类呼吸道疾病的流行<sup>[5]</sup>。EMCV 可引起动物脑炎、心肌炎为主要特征的急性传染病,FMDV 可导致牛羊等动物口蹄疫的暴发流行,对农业生产造成重大的经济损失<sup>[6-7]</sup>。

## 2 小 RNA 病毒 3C 蛋白的结构

小 RNA 病毒的 3C 蛋白包含 175~253 个氨基酸,大小为 19~28 kD。3C 蛋白集丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶特性为一体。作为丝氨酸蛋白酶,3C 蛋白具有催化三联体 Cys-His-Glu/Asp<sup>[8]</sup>。作为半胱氨酸蛋白酶,3C 蛋白具有特征催化基序 Gly-X-Cys-Gly<sup>[9]</sup>。近年来,多种小 RNA 病毒如 HRV、PV、HAV 等的 3C 蛋白晶体结构显示,3C 蛋白都具有二个相同的、6 条反向平行链构成的、呈约 90° 的 β-桶状 (β-barrel) 结构域,二个结构域之间延伸出一个可结合底物的浅槽。其中,由十几个氨基酸残基构成的环状结构位于浅槽的上方,称为 β-折叠 (β-ribbon),它对底物的特异性识别具有重要作用<sup>[9]</sup> (图 1)。研究显示 HRV、PV、HAV、FMDV 中 3C 蛋白的 β-折叠为闭合构象,而 EV-71 中 3C 蛋白的 β-折叠是一种开放构象,位于 β-折叠基底的 Gly-123 和 His-133 控制着 β-折叠的灵活性<sup>[10]</sup>。

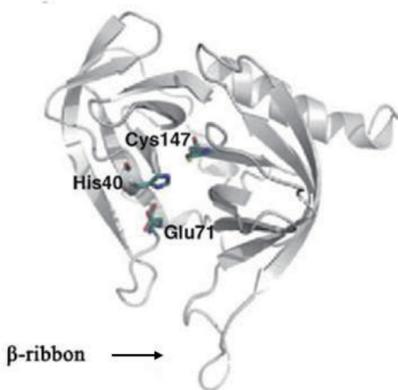


图 1 EV-71 的 3C 蛋白结构<sup>[10]</sup>

Fig.1 Structure of EV-71 3Cpro<sup>[10]</sup>

## 3 小 RNA 病毒 3C 蛋白的功能

近年来对于小 RNA 病毒 3C 蛋白的研究表明,

该蛋白参与病毒前体蛋白的剪切,与促进病毒复制、调控细胞凋亡以及逃避免疫应答等密切相关。

**3.1 促进病毒复制** 由于自身基因组的限制,许多病毒依赖于宿主细胞来完成自身的复制。研究发现 3C 蛋白可裂解多种蛋白如 poly-A 结合蛋白 (poly (A)-binding protein, PABP)、剪接因子脯氨酸和谷氨酰胺 (Splicing factor proline and glutamine rich, SFPQ)、蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR) 等。这些蛋白对病毒复制的影响是不同的。Sun 等研究表明鸭甲肝病毒 (duck hepatitis A virus, DHAV) 的 3C 蛋白可裂解 PABP 蛋白中 Q367 和 G368 之间的特异性位点,PABP 蛋白被裂解为 N 端片段和 C 端片段,N 端片段的存在于利于 DHAV 的复制,而 C 端片段则截然相反。C 端片段的功能被细胞所抑制的机制尚不清楚<sup>[11]</sup>。Kobayashi 等研究结果显示 EMCV 的 3C 蛋白可裂解 PABP 蛋白中的 Q437 和 G438 之间的特异性位点,导致一个 N 端 45 kD 的蛋白在病毒感染的细胞中累积,促进病毒的复制。而当 PABP 的裂解受到干扰时,病毒的复制明显受到抑制。因此,EMCV 的 3C 蛋白可通过裂解 PABP 而促进病毒复制<sup>[12]</sup>。此外,Dylan 等研究显示 HRV 的 3C/3CD 可裂解 SFPQ,而 SFPQ 水解片段的产生导致病毒复制以及病毒颗粒的增多<sup>[13]</sup>。Chang 等人发现 EV-71 感染宿主时,3C 通过裂解 PKR 增强了病毒的复制<sup>[14]</sup>。Yao 等发现槲皮素能够结合 EV-71 3C 蛋白的底物识别位点从而抑制其活性,以及抑制宿主体内的病毒复制,推断槲皮素抑制病毒复制的机制可能与 3C 蛋白的活性有关<sup>[15]</sup>。

**3.2 调控细胞凋亡** 病毒感染宿主后可导致宿主细胞发生凋亡。研究表明小 RNA 病毒的 3C 蛋白可通过激活半胱天冬酶 (caspase) 活性,裂解 PinX1 蛋白、真核翻译起始因子 (eukaryotic translation initiation factor 4GI, eIF4GI) 和受体相互作用蛋白激酶 I (Receptor-interacting protein kinase-1, RIPK1) 调控细胞凋亡<sup>[16]</sup>。Li 等研究结果显示,当神经细胞表达 EV-71 的 3C 蛋白时,细胞以 DNA 片段化和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) 裂解的形式发生凋亡。其中,PARP 裂解是 caspase 被激活的特异性标志,说明 3C 蛋白可激活 caspase 诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>。Song 等发现 EV-71 感染宿主后,3C 蛋白可与 caspase -8,9 相互作用而激活 caspase-3 诱发凋亡,当 3C 失去水解活性后,细胞 caspase -8,9 活性明显降低,细胞凋亡明显减少<sup>[18]</sup>。Chau 等发现 CV-B3 的 3C 蛋白裂解宿主细胞的 eIF4GI,导致细胞翻译

过程受到抑制,最终细胞发生形态改变,皱缩等形式的凋亡<sup>[19]</sup>。Li 等研究表明当 EV-71 感染宿主细胞时,3C 蛋白能裂解 PinX1 蛋白中 Q50-G51 的特异性位点,PinX1 表达降低可使细胞 DNA 损伤,增加细胞凋亡的易感性<sup>[20]</sup>。与上述不同的是,Sarah 等发现 HRV-16 的 3C 蛋白和 caspase 8 能裂解外在凋亡途径的关键中间体,即 RIPK1。二者裂解 RIPK1 的位点和功能不同,caspase 8 裂解 RIPK1 产生一个 38 kD 的蛋白,促进细胞发生早期凋亡,而 3C 蛋白进一步裂解 38 kD 的蛋白产生 C 末端 23 kD 的片段,抑制了凋亡的进一步发展<sup>[21]</sup>。

**3.3 逃避免疫应答** 病毒感染宿主后,宿主启动固有免疫应答,如产生干扰素(interferon,IFN)和免疫因子抵御感染,而病毒通过一些策略逃避免疫清除。研究表明 3C 蛋白通过抑制 IFN 的产生和核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路逃避免疫应答(图 2)。Rui 等研究发现 CV-A6、CV-A16、和 EV-D68 等小 RNA 病毒感染细胞,3C 蛋白能与黑色素瘤分化相关基因(Melanoma differentiation-associated gene 5,MDA5)、维甲酸诱导基因-1(Retinoic acid-inducible gene 1,RIG-I)相互作用,破坏了 RIG-I 和 MDA5 与通路下游线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral signaling protein,MAVS)的结合,从而使 MDA5、RIG-I 介导的 IFN I 的产生受到抑制。3C 蛋白还可抑制 IRF3 的磷酸化,从而抑制 IFN I 的产生<sup>[22]</sup>。Lei 等研究表明 EV-71 的 3C 蛋白与 RIG-I 的 N 端相互作用,抑制 RIG-I 与 MAVS 形成复合物,同时 3C 蛋白与  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白(TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ , TRIF)相互作用后诱导 TRIF 裂解,3C 蛋白还可直接裂解 IRF7 Q189 和 S190 之间的位点,最终上述现象都抑制 IFN I 产生<sup>[23-25]</sup>。

NF- $\kappa$ B 通路对于宿主抵抗病毒感染也至关重要。病毒感染后宿主可通过激活 NF- $\kappa$ B 通路,刺激机体产生抗病毒相关的免疫因子与细胞因子。3C 蛋白可通过裂解 TRAF 家族与转化生长因子激酶 1(transforming growth factor- $\beta$ activating kinase 1, TAK1)、TRIF、NF- $\kappa$ B 相关激活因子(TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator, TANK)抑制 NF- $\kappa$ B 通路活性。Lei 等研究发现 EV-71 的 3C 蛋白裂解 TAK1、TAK1 结合蛋白 1(TAK1 binding protein 1, TAB1)、TAB2 和 TAB3,破坏 TAK1 与 TAB1、TAB2 和 TAB3 形成复合物,从而抑制 TAK1 复合物对 NF- $\kappa$ B 通路的激活和细胞因子的产生<sup>[26]</sup>。Xiang 等研究表明在 EV-D68 中,作为半胱

氨酸酶的 3C 蛋白可裂解 TRIF 的 312 和 653 位点,而导致 TRIF 失活。失活的 TRIF 抑制对 NF- $\kappa$ B 通路的激活,最终抑制宿主的免疫应答<sup>[27]</sup>。Huang 等人研究 EMCV 发现 3C 蛋白能裂解 TANK 蛋白的 197 和 291 谷氨酰胺位点。TANK 即 TRAF 家族与 NF- $\kappa$ B 相关激活因子(TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator, TANK),是 NF- $\kappa$ B 的关键调控因子。3C 蛋白对 TANK 的裂解破坏这种抑制作用,可抑制 TRAF-6 介导的 NF- $\kappa$ B 通路的激活,这是一种新的小 RNA 病毒逃避宿主免疫的策略<sup>[28]</sup>。总而言之,小 RNA 病毒通过 3C 蛋白逃避免疫应答较为复杂,对 3C 蛋白的功能的探索有助于进一步阐明小 RNA 病毒的致病机制。

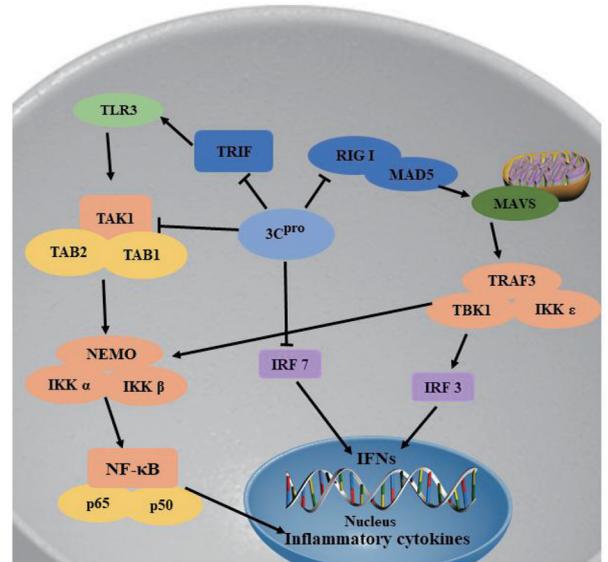


图 2 小 RNA 病毒 3C 蛋白调控免疫应答的机制

Fig.2 Mechanisms of picornavirus 3C protein regulate the immune response

#### 4 展望

3C 蛋白在小 RNA 病毒自身复制和与宿主的相互作用中发挥了重要作用。目前,3C 蛋白抑制剂的研究是抗病毒药物的热点,研究小 RNA 病毒 3C 蛋白的功能,不仅能为深入研究小 RNA 病毒的致病机制奠定基础,还可为研发病毒疫苗以及抗病毒药物提供新的思路。

**利益冲突:** 无

**引用本文格式:** 曹圣慧,黄孝天.小 RNA 病毒 3C 蛋白功能的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2019,35(12):1130-1133. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.158

## 参考文献:

- [1] Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, et al. ICTV virus taxonomy profile: picornaviridae[J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(10):2421-2422. DOI:10.1099/jgv.0.000911
- [2] Bedard KM, Semler BL. Regulation of picornavirus gene expression[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(7):702-713. DOI:10.1016/j.micinf.2004.03.001
- [3] Koh WM, Badaruddin H, La H, et al. Severity and burden of hand, foot and mouth disease in Asia: a modelling study[J]. *BMJ Global Health*, 2018, 3(1):e000442. DOI:10.1136/bmjgh-2017-000442
- [4] Bissel SJ, Winkler CC, Deltondo J, et al. Coxsackievirus B4 myocarditis and meningoencephalitis in newborn twins[J]. *Neuropathology*, 2014, 34(5):429-437. DOI: 10.1111/neup.12121
- [5] Esposito S, Bosis S, Niesters H, et al. Enterovirus D68 Infection [J]. *Viruses*, 2015, 7(11): 6043-6050. DOI:10.3390/v7112925
- [6] Knight-Jones TJD, Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease—What are they, how big are they and where do they occur[J]. *Prev Vet Med*, 2013, 112(3/4):161-173. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.07.013
- [7] Carocci M, Bakkali-Kassimi L. The encephalomyocarditis virus [J]. *Virulence*, 2012, 3(4):351-367. DOI:10.4161/viru.20573
- [8] Wang J, Fan T, Yao X, et al. Crystal structures of enterovirus 71 3C protease complexed with rupintrivir reveal the roles of catalytically important residues [J]. *J Virol*, 2011, 85(19): 10021-10030. DOI:10.1128/jvi.05107-11
- [9] Birtley JR, Knox SR, Jaulent AM, et al. Crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease: new insights into catalytic mechanism and cleavage specificity[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12):11520-11527. DOI:10.1074/jbc.M413254200
- [10] Cui S, Wang J, Fan T, et al. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease[J]. *J Mol Biol*, 2011, 408(3): 449-461. DOI:10.1016/j.jmb.2011.03.007
- [11] Sun D, Wang M, Wen X, et al. Cleavage of poly(A)-binding protein by duck hepatitis A virus 3C protease [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):16261. DOI:10.1038/s41598-017-16484-1
- [12] M Kobayashi M, Arias C, Garabedian A, et al. Site-specific cleavage of the host poly(A) binding protein by the encephalomyocarditis virus 3C proteinase stimulates viral replication[J]. *J Virol*, 2012, 86(19): 10686-10694. DOI:10.1128/jvi.00896-12
- [13] Flather D, Nguyen JHC, Semler BL, et al. Exploitation of nuclear functions by human rhinovirus, a cytoplasmic RNA virus [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(8): e1007277. DOI:10.1371/journal.ppat.1007277
- [14] Yu-Hsiu C, Seng LK, Rei-Lin K, et al. dsRNA binding domain of PKR is proteolytically released by enterovirus A71 to facilitate viral replication [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 284. DOI:10.3389/fcimb.2017.00284
- [15] Yao C, Xi C, Hu K, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication and viral 3C protease by quercetin[J]. *Virol J*, 2018, 15(1): 116. DOI:10.1186/s12985-018-1023-6
- [16] Amitava M, Morosky SA, Elizabeth DA, et al. The coxsackievirus B 3Cpro protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(3): e1001311. DOI:10.1371/journal.ppat.1001311
- [17] Li ML, Hsu TA, Chen TC, et al. The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis[J]. *Virology*, 2002, 293(2): 386-395. DOI:10.1006/viro.2001.1310
- [18] Fengmei S, Xiaoyan Y, Ting Z, et al. Caspase-3 Inhibition attenuates the cytopathic effects of EV71 infection[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 817. DOI:10.3389/fmicb.2018.00817
- [19] Chau DHW, Yuan J, Zhang H, et al. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1 [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(3):513-524. DOI: 10.1007/s10495-006-0013-0
- [20] Li J, Yao Y, Chen Y, et al. Enterovirus 71 3C promotes apoptosis through cleavage of PinX1, a telomere binding protein[J]. *J Virol*, 2017, 91(2):JVI.02016-16. DOI:10.1128/JVI.02016-16
- [21] Croft SN, Walker EJ, Ghildyal R. Human Rhinovirus 3C protease cleaves RIPK1, concurrent with caspase 8 activation[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1569. DOI:10.1038/s41598-018-19839-4
- [22] 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]. *J Virol*, 2017, 91(13): JVI.00546-17. DOI: 10.1128/jvi.00546-17
- [23] 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]. *J Virol*, 2010, 84(16): 8051-8061. DOI:10.1128/jvi.02491-09
- [24] Lei X, Xiao X, Xue Q, et al. Cleavage of interferon regulatory factor 7 by enterovirus 71 3C suppresses cellular responses[J]. *J Virol*, 2013, 87(3): 1690-1698. DOI:10.1128/jvi.01855-12
- [25] Lei X, Sun Z, Liu X, et al. Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3 [J]. *J Virol*, 2011, 85(17): 8811-8818. DOI:10.1128/jvi.00447-11
- [26] Lei X, Han N, Xiao X, et al. Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex [J]. *J Virol*, 2014, 88(17): 9830-9841. DOI: 10.1128/jvi.01425-14
- [27] Xiang Z, Li L, Lei X, et al. Enterovirus 68 3C protease cleaves TRIF to attenuate antiviral responses mediated by toll-like receptor 3 [J]. *J Virol*, 2014, 88(12): 6650-6659. DOI:10.1128/jvi.03138-13
- [28] Huang L, Liu Q, Zhang L, et al. Encephalomyocarditis virus 3C protease relieves TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) Inhibitory effect on TRAF6-mediated NF- $\kappa$ B signaling through cleavage of TANK [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(46): 27618-27632. DOI:10.1074/jbc.M115.660761