

猪水疱病病毒致病和免疫的分子基础*

孙世琪, 郭慧琛, 刘湘涛**, 谢庆阁

(中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽病毒学重点实验室, 甘肃兰州, 730046)

Molecular Basis of Pathogenesis and Immunity of Swine Vesicular Disease Virus

SUN Shi-qi, GUO Hui-chen, LIU Xiang-tao**, XIE Qing-ge

(Key Laboratory of Animal Virology, Ministry of Agriculture/ Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China)

关键词: 猪水疱病病毒; 抗原表位; 受体

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)04-0450-05

猪水疱病病毒(Swine vesicular disease virus, SVDV)属于小RNA病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(Enterovirus),其抗原特性与柯萨奇病毒B5(Coxsackievirus B5, CVB5)关系密切,被认为是CVB5的一个猪变种或亚种^[1]。SVDV只有一个血清型,但对其分离株进行系统发生分析可进一步分为4个抗原群或基因群^[2,3]。第1群包含SVDV早期分离株(ITL/1/66),第2群包含1972~1981年间欧洲和日本分离株,第3群包含意大利1988年12月~1992年6月间的分离株,第4群包含1987~1994年间,罗马尼亚、荷兰、意大利和西班牙的分离株。

1 SVDV的基因结构及其编码蛋白的功能

1.1 SVDV的基因组结构和功能

SVDV的基因组为一单股正链RNA分子,既是mRNA,又是负链RNA的模板,全长约为7400个核苷酸(nt)(poly(A)尾除外)^[4,5],与其他小RNA病毒相似,其基因组的碱基组成中,腺嘌呤(A)含量较高,G-C碱基对出现频率较低;5端共价连接小分子蛋白VPg(3B),其基因组结构从5端到3端依次为5非编码区(Non-coding region, NCR)、单一的开放读码框(Open reading frame, ORF)、3非编码区(3-NCR)和poly(A)尾结构。SVDV核酸具有感

染性,目前已经构建了3株SVDV的全长感染性分子克隆^[6-8],并利用其对SVDV的毒力和抗原表位等进行了研究^[8-12]。

SVDV的5 NCR长约742个核苷酸^[4,5],在5末端与VPg相连的是一高度保守的10个核苷酸的序列UUAAAACAGC,其中5末端的两个U是以VPg-pUpU的形式在无模板的条件下先合成后结合到病毒RNA的5末端的。5 NCR具有丰富的二级结构或高级结构,没有帽子结构,但有一个内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)和调控病毒复制与装配的信号,如5 NCR的两个特异序列,即碱基U丰富区(562~576nt)和8个碱基保守序列(CUUAUGGU, 587~594nt)可能就是维持病毒复制率的重要信号。

SVDV的ORF包括P1、P2和P3区,其中P1区为结构蛋白编码区,编码1A(VP4)、1B(VP2)、1C(VP3)和1D(VP1)4种结构蛋白。1B、1C和1D为外壳蛋白基因,也是病毒中和性抗原基因编码区;P2和P3为非结构蛋白编码区。P2编码2A、2B和2C 3种蛋白,P3编码3A、3B、3C和3D 4种蛋白。值得一提的是,1D-2A编码区为主要的毒力基因编码区^[10]。

SVDV的3 NCR包括以终止密码子UAA开始长约103nt的序列和poly(A)尾,与其他小RNA病毒一样,3 NCR含有负链RNA复制所需的顺式

收稿日期:2005-01-05,修回日期:2005-02-04

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2003AA241110)

作者简介:孙世琪(1972-),男,甘肃通渭籍,助理研究员,博士生,主要从事动物病毒分子生物学与免疫方面的研究。E-mail: shiqi_sun21@hotmail.com

** 通讯作者:刘湘涛(1962-),男,湖南衡阳籍,研究员,主要从事动物病毒学研究。

Corresponding author. Tel: 0931-8342710, fax: 0931-8340977, E-mail: hnxiantao@hotmail.com

作用信号,末端的 A 残基作为模板与尿苷酸化的引物 VPg-pUpU 结合,以合成病毒基因组的负链 RNA。Saiz 等的研究发现,缺失 3' NCR(保留完整的 PolyA)的口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)全长 cDNA 克隆丧失了其感染性,以 SVDV 的 3' NCR 替代 FMDV 3' NCR 的全长 cDNA 克隆虽然在转染后能形成低拷贝的重组病毒,但仍无复制能力,表明 3' NCR 的主要功能是参与病毒的复制^[13]。

1.2 病毒编码蛋白及其功能

SVDV 的 ORF 编码一条由 2185 个氨基酸组成的多聚蛋白,经初级裂解产生 P1、P2 和 P3, P1 进一步裂解产生 4 种结构蛋白(VP4、VP2、VP3 和 VP1),组成 20 面体对称的病毒衣壳。P2 和 P3 裂解产生 7 种非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D),参与病毒的复制。

1.2.1 结构蛋白: SVDV 编码的结构蛋白有 4 种,即 1A(VP4, 69aa)、1B(VP2, 261aa)、1C(VP3, 238aa) 和 1D(VP1, 283aa),分别由 SVDV 基因组 P1 区的 1A、1B、1C 和 1D 区编码,是组成 SVDV 粒子衣壳的基本结构单位, SVDV 的抗原表位位于外壳蛋白 VP2、VP3 和 VP1 上^[8,14~17],且 VP1 的第 132 位氨基酸与毒力强弱有关^[10]。

1.2.2 非结构蛋白: SVDV 的 2A 是一种蛋白酶,其可能的功能活性区在 C 端附近的 107~119 残基(PGDCGGXLXCXHG)。2A 蛋白酶的功能主要有:(1)多聚蛋白的初级裂解过程中,在 1D/2A 间切割(切割位点是 T/G);(2)它是 SVDV 的一个毒力决定因子,诱导细胞蛋白酶裂解 eIF4G,抑制细胞(帽依赖)蛋白质的合成。Kanno 等的研究表明 VP1-132 和 2A-20 共同决定了 SVDV 的毒力,但 2A-20 是主要的毒力决定因素^[10];(3)激活 IRES 的活性,促进 IRES 依赖的蛋白质的合成^[12]。

SVDV 2B 和 2C 蛋白的功能还不清楚。但从其他肠病毒的研究结果来看,它们与病毒 RNA 的合成有关。2C 可能是一种解旋酶(helicase),在病毒的复制过程中参与 RNA 链的分离^[18]。

SVDV 3A 和 3B 的功能还不清楚,但研究发现脊髓灰质炎病毒(PV)的 3A 突变可影响 3B(VPg)的尿苷化,并选择性地抑制病毒正链 RNA 的起始合成。大量的疏水性 3AB 蛋白在与膜结合的病毒 RNA 合成复合体中极有可能是既作锚定(anchor)又作 VPg 供体(donor)^[19]。3B 蛋白是一个小肽分子,又称 VPg,即病毒基因组连接蛋白(Viral genome-linked protein),共价结合于 SVDV 基因组 5

端的 pU 上。在病毒 RNA 复制起始时, RNA 聚合酶 3D 使 VPg 尿苷酸化,随后尿苷酸化的 VPg 引导病毒 RNA 从 3' Poly(A) 处开始复制。VPg 也是一个包装信号,能自身催化连接到新生的正链病毒 RNA 上。

和其他的小 RNA 病毒一样, SVDV 的 3C 蛋白也是一种半胱氨酸蛋白酶,催化多聚蛋白前体的大部分成熟裂解,除了 2A 对 P1-P2 的裂解和 1AB 自身裂解外,其他所有的裂解过程都是由 3C^{pro} 或其前体 3CD 完成的,其切割位点在 Q/G 处。脊髓灰质炎病毒的 3C 还能裂解转录因子 IID 的 TATA 结合蛋白亚基和转录因子 IIIC,使它们失活,从而抑制细胞 3 种 RNA 聚合酶的转录活性。

3D 蛋白是一种依赖 RNA 模板的 RNA 聚合酶,以 VPg-pU-pU 为引物催化合成病毒基因组 RNA。

2 SVDV 的衣壳结构和抗原特性

SVDV 的衣壳具有小 RNA 病毒衣壳的典型结构,由 60 个亚单位或原体构成,每个亚单位由 4 个不同的多肽(VP1、VP2、VP3 和 VP4)形成,这些亚单位自我组装形成二十面体对称(T=1)结构,并包裹一条单股正链 RNA。

在成熟的病毒粒子中,VP1、VP2 和 VP3(分别为 33kDa、32kDa 和 29kDa)位于表面形成一紧密的蛋白外壳,而 VP4 位于衣壳内,与病毒 RNA 相互作用。VP1、VP2 和 VP3 呈现三级结构,在小 RNA 病毒中高度保守且在八链桶中形成一疏水中心,这些链按其出现顺序,以字母从 B 到 I 命名。桶由两个四链片组成,即 BIDG 和 CHEF,大多数连接这些链的环,即三条多肽的 C 末端暴露在衣壳表面,而其 N 端朝里。另外还有两条内部螺旋(名为 A 和 B),分别位于 D 片和 F 片之前。

2.1 构象依赖型中和表位

抗单克隆抗体突变体(MAR mutant)普遍用于鉴定病毒的抗原表位,用该方法已鉴定出 SVDV 的 8 个中和表位^[14,15,17],其中 6 个表位可分为 3 个主要抗原位点,位点 1 靠近 SVDV 三维模型结构的 5 重轴,由 VP1 BC 环 87-88 位氨基酸残基和 C 末端 261 位氨基酸残基两个表位构成。位点 2 由两个独立的表位 2a 和 2b 组成,它们分别位于 VP2 EF 环的 163 位和 154 位氨基酸残基。位点 3 是一个复杂的位点,由 3a 和 3b 组成,其组成表位位于 3 个不同的结构蛋白上,其中 3a 包括 VP1 C 末端的 272 和 275 位氨基酸残基和 VP3 B 结节的 60 位氨基酸残

基。3b 包括 VP2 HI 环上 233 位、VP3 BC 环上 73 和 76 位以及 VP2 BC 环上 70 位氨基酸残基。第 7 个表位位于 VP3 C 末端 234 位,是 SVDV 特有的中和位点,在其他小 RNA 病毒中未曾见过^[15]。第 8 个表位包括 VP1 95 位和 98 位氨基酸残基,是已知 SVDV 中和表位中唯一一个与 CVB5 共有的表位^[17]。另外,利用融合 PCR (Fusion PCR) 技术构建的嵌合病毒 (Chimeric virus) 也是研究抗原表位的理想方法^[20],Rebel 等 (2000) 用该法已鉴定出 SVDV 的两个新抗原表位,它们均位于结构蛋白 VP1 上,其一包括 C 末端的 258 位和 266 位氨基酸残基,其二包括 HI 环的 225 位残基。以上 10 个抗原表位(表 1)均位于 SVDV 结构蛋白上,是构象依赖型表位^[8]。

2.2 线型表位

尽管构象依赖型非连续表位是 SVDV 的功能表位,但在其他小 RNA 病毒中,线型表位也参与体

液免疫应答。目前已经用多肽扫描 (pepscan) 技术鉴定了 SVDV 的数个线型表位,而且用大肠杆菌表达的重组蛋白 P1 能够被 SVDV 阳性血清识别且能诱导产生 SVDV 特异的细胞和体液免疫反应^[21]。Jimenez-Clavero 等 (2000) 用感染 SVDV 的猪血清与合成肽反应后发现,在 SVDV 的结构蛋白上至少有 7 个抗原区(表 1)。计算机三维模型分析表明,只有 4 区和 7 区位于衣壳表面,其他抗原区均位于衣壳内。只有 4 区与中和位点 3a 重叠^[16]。Borrego 等用大肠杆菌表达的重组蛋白 P1 的单抗揭示了 5 个线型抗原区,其中 VP3 N 末端和 VP1 51-60 位残基位于衣壳内,而且这两个抗原区在 SVDV 和 CVB5 间保守。而其他三个抗原区,即 VP2 142-161、VP3 61-70 和 VP1 C 末端位于衣壳外表面,并且具有抗原易变性。SVDV 阳性血清不能阻断单抗与相关表位的结合,这 5 个抗原区不参与病毒感染的中和作用,这提示线型表位的免疫原性弱^[22]。

表 1 SVDV 的主要抗原表位

Table 1 Major antigenic sites identified in the capsid of SVDV

Strategy	Name	Protein	Amino acid	Structure location	Reported by	
MAR mutants	Site 1	VP1	87,88	B- C loop	Kanno <i>et al</i> ,1995 ; Nijhar <i>et al</i> ,1999	
	Site 2a	VP2	163	E- F puff		
	Site 2b	VP2	154	E- F puff		
	Site 3a	VP1	272,275	C-terminus		
	Site 3b	VP3	60	B knob	Borrego <i>et al</i> ,2002 Rebel <i>et al</i> ,2000	
			VP2	70		B- C loop
		VP2	233	H- I loop		
		VP3	73,76	B- C loop		
		ND	VP1	261		C-terminus
		ND	VP3	234		C-terminus
Chimeric virus	ND	VP1	95,98	N-terminus	Rebel <i>et al</i> ,2000	
	ND	VP1	225	H- I loop		
Pepsan	Region 1	Vp2	42-61	N-terminus	Jimenez-Clavero <i>et al</i> , 2000	
	Region 2	VP2	82-121	A- D and part of D- E loop		
	Region 3	Vp3	1-40	N-terminus		
	Region 4	VP3	51-70	vB knob		
	Region 5	VP3	91-120	A- D		
	Region 6	VP1	1-40	N-terminus		
	Region 7	VP1	201-220	G2- H loop		

3 病毒受体和细胞内化

普遍认为,包括作为 CVB5 亚种的 SVDV 在内的所有 B 组柯萨奇病毒 (CVB1-6) 利用共同的表面分子 4/4 柯萨奇病毒 - 腺病毒受体 (CAR),作为宿主细胞受体,Martino 等的研究进一步证实了这一观点^[23]。CAR 是一 46kDa 的跨膜糖蛋白,具有两个细胞外免疫球蛋白样结构域,它也是腺病毒纤维

蛋白的黏附分子^[24]。Martino 等研究表明,持续表达 CAR 的细胞系对 SVDV 参考毒株、临床分离株和所有其他柯萨奇 B 组病毒易感,而不表达 CAR 的细胞系对这些病毒不易感。而且,若对柯萨奇 B 组病毒和 SVDV 不易感的细胞系转染表达 CAR 时,该细胞系对这些病毒变得易感了。而该研究中的对照(病毒包括柯萨奇 A9 和艾柯病毒 9)不感染任何细胞系(无论表达 CAR 与否)。另外,某些 B

组柯萨奇病毒株以衰变加速因子(DAF, CD55)作为共受体,DAF是一70kDa蛋白,参与补体的同源裂解。在Hela细胞中,CAR单抗可降低SVDV噬斑形成约75%,在同样的细胞系中抗DAF单抗可达同样的结果,这表明CAR和DAF均可作为SVDV的受体^[23]。

硫酸粘多糖(GAGs)尤其是乙酰肝素糖原在许多病毒与细胞间的相互作用中起作用。通常,结合有硫酸乙酰肝素(HS)的病毒易于吸附到细胞上并与细胞受体结合^[25],Escribano-romero等用亲和色谱法比较分析了包括肝素和硫酸乙酰肝素在内的几种粘多糖(GAGs)结合SVDV的能力,用可溶性硫酸乙酰肝素、肝素和硫酸软骨素B(CS-B)处理病毒或用酶消化细胞表面的GAGs均可抑制SVDV对IB-RS-2细胞的感染,对感染过程的分析表明,SVDV利用HS结合到细胞表面,该作用发生在病毒内化前的吸附过程。通过对体外筛选的对肝素抑制作用不敏感的变异株的序列分析,提示有两个氨基酸残基(A2135V和I1266K)参与肝素/硫酸乙酰肝素的作用。在三维结构模型中,这些残基集中在衣壳外露区。以上研究提示,SVDV和细胞GAGs的结合介导病毒-细胞相互作用的早期阶段,有利于其受体(如CAR等)随后的识别^[26]。

SVDV进入细胞的机理尚未完全弄清,和其他小RNA病毒一样,病毒受体分子的存在是病毒入侵细胞的先决条件,在病毒的感染过程中起着重要的作用。SVDV与其受体相互作用时,其衣壳发生一系列构象改变,VP1 N末端外露,VP4丢失,这些改变导致其结构和抗原性改变,变为A粒子。A粒子是感染早期病毒在细胞内最丰富的形式,似乎是小RNA病毒脱衣壳和将RNA释放入胞浆的必需阶段,但其发生的方式仍然不祥。

参考文献

- [1] Zhang G,Wilsden G,Knowles N J, *et al.* Complete nucleotide sequence of a Coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus [J]. *J Gen Virol*,1993,74:845-853.
- [2] Brocchi E,Berlinzani A,Gamba D, *et al.* Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease [J]. *J Virol Methods*,1995,52:155-167.
- [3] Zhang G,Haydon D T,Knowles N J, *et al.* Molecular evolution of swine vesicular disease virus [J]. *J Gen Virol*,1999,80:639-651.
- [4] Seechurn P,Knowles N J,McCauley J W, *et al.* The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus [J]. *Virus Res*,1990,16:255-274.
- [5] Inoue T,Yamaguchi S,Kanno T, *et al.* The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus isolated in Japan (J173) and phylogenetic analysis [J]. *Nucleic Acid Res*,1993,21:3896-3896.
- [6] Inoue T,Yamaguchi S,Saeki T, *et al.* Production of infectious swine vesicular disease virus from cloned cDNA in mammalian cells [J]. *J Gen Virol*. 1990 71 (Pt 8):1835-18358.
- [7] Kanno T,Inoue T,Mackay D, *et al.* Viruses produced from complementary DNA of virulent and avirulent strains of swine vesicular disease viruses retain the in vivo and in vitro characteristics of the parental strain [J]. *Arch Virol*. 1998;143(6):1055-1062.
- [8] Rebel J M,Leendertse C H,Dekker A, *et al.* Construction of a full-length infectious cDNA clone of swine vesicular disease virus strain NET/1/92 and analysis of new antigenic variants derived from it [J]. *J Gen Virol*. 2000,81(Pt 11):2763-2769.
- [9] Kanno T, Mackay D, Inoue T, *et al.* Mapping the genetic determinants of pathogenicity and plaque phenotype in swine vesicular disease virus [J]. *J Virol*,1999,73(4):2710-2716.
- [10] Kanno T, Mackay D, Wilsden G, *et al.* Virulence of swine vesicular disease virus is determined at two amino acids in capsid protein VP1 and 2A protease [J]. *Virus Res*,2001,28;80(1-2):101-107.
- [11] Rebel J M, Leendertse C H, Dekker A, *et al.* Effects of mutations in the VP2/VP4 cleavage site of Swine vesicular disease virus on RNA encapsidation and viral infectivity [J]. *Arch Virol*,2003,148(9):1747-1756.
- [12] Sakoda Y, Ross-Smith N, Inoue T, *et al.* An attenuating mutation in the 2A protease of swine vesicular disease virus, a picornavirus, regulates cap- and internal ribosome entry site-dependent protein synthesis [J]. *J Virol*,2001,75(22):10643-10650.
- [13] Saiz M, Gomez S, Martinez-Salas E, *et al.* Deletion or substitution of the aphthovirus 3 NCR abrogates infectivity and virus replication [J]. *J Gen Virol*,2001,82(Pt 1):93-101.
- [14] Kanno T, Inoue T, Wang Y F. Identification of the location of antigenic sites of swine vesicular disease virus with neutralization-resistant mutants [J]. *J Gen Virol*,1995,76:3099-3106.
- [15] Nijhar S K, Mackay D K, Brocchi E, *et al.* Identification of neutralizing epitopes on a European strain of swine vesicular disease virus [J]. *J Gen Virol*,1999,80 (Pt 2):277-282.
- [16] Jimenez-Clavero M A, Douglas A, Lavery T, *et al.* Immune recognition of swine vesicular disease virus structural proteins: novel antigenic regions that are not exposed in the capsid[J]. *Virology*,2000,270(1):76-83.
- [17] Borrego B,Carra E,Garcia-Ranea J A, *et al.* Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus [J]. *J Gen Virol*. 2002,83(Pt 1):35-44.
- [18] Teterina N L, Kean K M, Gorbalenya A E, *et al.* Analysis of the functional significance of amino acid residues in the putative NTP-binding pattern of the poliovirus 2C protein [J]. *J*

- Gen Virol, 1992, 73:1977-1986.
- [19] Gachetti C, Semler B L. Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific mutation of poliovirus RNA synthesis [J]. J Virol, 1991, 65:2647-2654.
- [20] Dekker A, Leendertse C H, van Poelwijk F, *et al.* Chimeric swine vesicular disease viruses produced by fusion PCR: a new method for epitope mapping [J]. J Virol Methods, 2000, 86(2):131-141.
- [21] Jimenez-Clavero M A, Escibano-Romero E, Sanchez-Vizcaino JM, *et al.* Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus [J]. Virus Res, 1998, 57(2):163-170.
- [22] Borrego B, Garcia-Ranea J A, Douglas A, *et al.* Mapping of linear epitopes on the capsid proteins of swine vesicular disease virus using monoclonal antibodies [J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 6):1387-1395.
- [23] Martino TA, Petric M, Weingartl H, *et al.* The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus [J]. Virology, 2000, 271(1):99-108.
- [24] Roelvink P W, Lizonova A, Lee J G, *et al.* The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F [J]. J Virol, 1998, 72:7909-7915.
- [25] Haywood A M. Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure [J]. J Virol, 1994, 68:1-5.
- [26] Escibano-Romero E, Jimenez-Clavero M A, Gomes P, *et al.* Heparan sulphate mediates swine vesicular disease virus attachment to the host cell [J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 3):653-663.
- [27] Tsang S K, Danthi P, Chow M, *et al.* Stabilization of poliovirus by capsid-binding antiviral drugs is due to entropic effects [J]. J Mol Bio, 2000, 296:335-340.