

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.12

# 非洲猪瘟病毒入侵细胞机制的研究进展

彭国瑞<sup>1,2,3</sup>, 邹兴启<sup>1\*</sup>, 徐 嫵<sup>1</sup>, 徐小艾<sup>1</sup>, 朱元源<sup>1</sup>, 赵启祖<sup>1</sup>, 刘业兵<sup>1</sup>

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

[收稿日期] 2021-11-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 04-0071-05 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 病毒进入宿主细胞的途径和方式决定了病毒的趋向性和发病机制, 病毒感染细胞包括吸附、穿入、脱壳、复制、组装及子代病毒颗粒的释放等步骤, 对病毒入侵机制研究可以为开发有针对性的预防策略提供思路。非洲猪瘟病毒作为一种有囊膜双链 DNA 病毒, 其入侵宿主细胞的机制与其他病毒有一定的相似之处, 同样也有其特殊性。目前, 人们对非洲猪瘟病毒与宿主细胞相互作用, 特别是入侵机制的了解仍然非常有限。为此, 本文就 ASFV 入侵细胞的有关研究进展进行了综述, 以期对非洲猪瘟病毒致病机制相关研究提供参考。

**[关键词]** 非洲猪瘟病毒; 病毒入侵; 巨噬细胞; 细胞; 内化

## Research Progress on the Mechanism of African Swine Fever Virus Invading Cells

PENG Guo-rui<sup>1,2,3</sup>, ZOU Xing-qi<sup>1\*</sup>, XU Yuan<sup>1</sup>, XU Xiao-ai<sup>1</sup>, ZHU Yuan-yuan<sup>1</sup>,  
ZHAO Qi-zu<sup>1</sup>, LIU Ye-bing<sup>1</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Corresponding author: ZOU Xing-qi, E-mail: 382807314@qq.com

**Abstract:** The mechanism of the virus invading the host cells determines the tendency and pathogenesis of the virus. The steps of the virus infecting cells include adsorption, penetration, unpacking, replication, assembly and release of offspring virus particles. The study of the invasion mechanism of the virus can provide ideas for the development of targeted prevention strategies. The mechanism of African swine fever virus invading host cells is similar to other viruses, and it has the particularity as a capsule double-stranded DNA virus. At present, the knowledge of the interaction of the African swine fever virus with the host cells, especially the invasion mechanism, remains very limited. Accordingly, the research progress of ASFV invasion cells is reviewed in this paper.

**Key words:** African swine fever virus; virus invasion; macrophages; cells; internalization

**基金项目:** 国家重点研发计划“ASFV 适应性免疫应答机制”(2021YFD1800105); 中国兽药药品监察所“兽药行业公益性重点专项”(GY202101)

**作者简介:** 彭国瑞, 博士研究生, 助理研究员, 从事动物病原与生物制品学研究。

**通讯作者:** 邹兴启。E-mail: zouxingqi@163.com

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染引起猪的一种急性、烈性、高度接触性传染病。ASFV 可以感染家猪、野猪和钝缘蜚等。自 2018 年 8 月辽宁省报告我国首例非洲猪瘟疫情<sup>[1]</sup>以来,非洲猪瘟已给养猪业造成巨大经济损失<sup>[2]</sup>。到目前为止,针对 ASFV 还没有有效的疫苗和抗病毒策略。ASFV 是一种有囊膜双链 DNA 病毒,粒子直径约 250 nm,呈正二十面体对称结构,中央是包含基因组的核壳结构,被一层含有多种蛋白成分的核壳包裹,紧接着向外延伸,分别是内脂膜,二十面体蛋白衣壳和最外层的外脂膜<sup>[3]</sup>。巨噬细胞是 ASFV 感染的主要靶细胞,体外经适应后可在 PK15、Vero 细胞和其他细胞上生长<sup>[4]</sup>,病毒通过吸附、穿入和脱壳在细胞内完成复制、组装及子代病毒颗粒的释放。本文就 ASFV 入侵细胞的有关研究进展进行了综述。

## 1 病毒的吸附

1.1 受体介导的吸附 一般认为病毒颗粒感染细胞的首要条件是吸附细胞表面的受体。Alcamí A 等<sup>[5]</sup>通过定量电子显微镜形态学分析发现,ASFV 在感染的早期通过受体介导的内吞机制进入 Vero 细胞。之后,又用<sup>3</sup>H 标记的 ASFV 与细胞结合,发现在质膜上存在饱和结合位点,从而使 ASFV 能够在 Vero 细胞中启动生产性感染。利用相同的方法,对于天然宿主巨噬细胞,病毒与细胞特定的饱和部位结合,通过受体介导的内吞机制进入细胞<sup>[6]</sup>。在平衡状态下,结合数据 Scatchard 分析表明,每个细胞大约有  $10^4$  个细胞受体位点,解离常数 ( $K_d$ ) 为 70 pM<sup>[7]</sup>。通过 ASFV 与非易感动物的巨噬细胞相互作用试验发现,ASFV 颗粒可以利用非饱和结合位点介导进入兔巨噬细胞,并能够合成一些早期病毒蛋白,但病毒 DNA 合成没有发生,病毒复制被终止,提示这些细胞中不产生生产性感染,可能与缺乏特异性受体有关,并在其他不易感动物的巨噬细胞中也发现了类似的流产感染<sup>[8]</sup>。

1.2 病毒上的粘附蛋白 用非离子洗涤剂处理 ASFV 颗粒,释放出蛋白 p12 (p17 经巯基乙醇处理

后) 能够与 Vero 细胞结合,不能与非洲猪瘟不易感的细胞结合,并且这种结合能够被病毒颗粒特异性的阻断,由此认为 p12 作为粘附蛋白参与细胞受体的识别<sup>[9]</sup>。然而,尽管通过自然感染和接种灭活病毒或重组蛋白 p12 的动物,可以诱导出针对 p12 蛋白的特异性抗体,但这些抗血清不能抑制病毒与宿主细胞的结合或中和病毒的传染性<sup>[10]</sup>。此外,位于病毒颗粒类脂外膜的结构蛋白 p54、p30 能够与猪肺泡巨噬细胞结合,用康复期猪或用重组 p54 或 p30 免疫猪获得的抗体,能够特异性的抑制这些蛋白与细胞的结合,同时,在易感细胞上 p54 和 p30 有着不同的饱和结合位点,且以剂量依赖的方式独立地阻止病毒感染。用重组 p54 或 p30 蛋白的抗体,可以抑制病毒对易感细胞的附着或内化。然而,对免疫后的猪攻毒并没有实现保护,病程也没有改变。与此相反,用 p54 和 p30 蛋白组合免疫猪可以刺激产生对病毒的中和效应,并极大地改变病程,从延迟发病到完全阻止病毒感染产生了不同程度的免疫保护。p54 阻断了病毒颗粒与巨噬细胞的特异性结合,而蛋白 p30 阻断了病毒的内化,二者都有助于抗体介导的保护性免疫反应<sup>[11]</sup>。

1.3 细胞上的膜蛋白受体 目前,对于 ASFV 的细胞受体仍不明确。鉴于 p12 与病毒吸附 Vero 细胞相关,用不同的酶和凝集素处理细胞表面,其中有几种蛋白酶能够抑制 p12 与细胞的结合,但没有糖苷酶或脂肪酶,因此推断该细胞受体由蛋白质组成,而没有碳水化合物或脂类参与病毒的吸附;受体活性的恢复需要合成新的蛋白,而不是糖基化,因此,ASFV 的受体是一种细胞表面的膜蛋白<sup>[12]</sup>。有学者就推测巨噬细胞标记物 CD163 可能是受体,用抗 CD163 的抗体作用巨噬细胞可以抑制 ASFV,但对巨噬细胞上完全敲除 CD163 的猪,攻击 ASFV 基因 2 型的 Georgia 2007/1 株后,敲除型猪和野生型猪都被感染,临床症状、死亡率、病理或病毒血症等都没有差异;体外感染巨噬细胞试验也没有差异<sup>[13]</sup>,这项研究排除了 CD163 在 ASFV 感染中的重要作用。

## 2 病毒的穿入

病毒的吸附穿入是一个能量依赖的过程,可以通过多种方式进行;即便是同一种病毒也可以采用不同的内吞方式,这取决于细胞的类型、病毒的多样性和生长条件。目前,对于 ASFV 进入细胞的方式仍存在很多争议,包括依赖液泡 pH 和温度的受体介导内吞<sup>[5]</sup>,或是通过网格蛋白(clathrin)介导内吞,还有人认为除了受体介导内吞外,病毒还可以同时以吞噬作用(phagocytosis)<sup>[3,14]</sup>或是大型胞饮(macropinocytosis)<sup>[4,15]</sup>进入细胞。

**2.1 网格蛋白(clathrin)介导的内吞** Valdeira M L 等<sup>[16]</sup>利用电镜研究 ASFV 与 Vero 早期相互作用时,发现病毒粒子附着在细胞表面后,被内陷的凹窝包裹,由内吞小体进入细胞,最后出现在溶酶体中,并没有出现在包被囊泡(Coated vesicles)中,也没有见到病毒直接穿过质膜的现象。与牛痘病毒(VV)不同,ASFV 通过发动蛋白依赖和网格蛋白介导的内吞作用进入猪巨噬细胞,强烈依赖 pH, Bernardes C 等<sup>[17]</sup>发现清除胆固醇或用胆固醇氧化酶处理的 Vero 细胞在结合或内化病毒的能力上都没有改变,但 ASFV 的融合和随后的病毒复制却被阻断,因此,细胞膜中的胆固醇,而非脂筏或凹陷,是实现 ASFV 感染的必要条件。但是, Bruno Hernaez 等<sup>[18]</sup>认为网格蛋白覆盖的凹窝成分 Eps15 为感染相关细胞因子,以及发动蛋白 GTPase 活性、肌动蛋白依赖的内吞作用和磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)活性等都参与了病毒的侵入<sup>[19]</sup>。

**2.2 大型胞饮** Elena G Sa'chez 等<sup>[15]</sup>将光学显微镜和电子显微镜结合,发现适应于 Vero 细胞生长的 ASFV 强毒株 Ba71 和强毒株 E70 可以引起细胞质膜扰动,起泡和褶皱。病毒粒子内化依赖于肌动蛋白重新组合、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换器的活性等典型的大胞饮内吞机制的信号,而且病毒进入细胞似乎直接刺激右旋糖酐摄取、肌动蛋白极化和 EGFR、PI3K - Akt、Pak1 和 Rac1 的激活,而抑制这些重要的大胞饮调节因子,以及使用药物乙基异丙基氨基

吡咪(EIPA)治疗,可以显著减少 ASFV 的进入和感染<sup>[4]</sup>。但是,针对这观点 Bruno Hernaez 等发现  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  离子通道抑制剂和肌动蛋白聚合抑制没有显著改变 ASFV 感染,认为大胞饮并不是 ASFV 的主要进入途径<sup>[18]</sup>。

**2.3 巨噬细胞内吞** Sameh Basta 等<sup>[14]</sup>发现在病毒与细胞作用的过程中,二价阳离子依赖活性特别重要,这与内吞和内涵体处理所需的微管组装的病毒需求有关。肌动蛋白依赖的内吞作用和涉及微管活性的内吞流通也密切相关,因此,认为受体介导内吞作用不是病毒进入感染宿主细胞 M $\phi$  的唯一方法,更像病毒是通过吞噬进入细胞的。Germán Andrés 等<sup>[3]</sup>则认为 ASFV 通过巨噬细胞吞噬和网格蛋白介导的内吞两种途径进入巨噬细胞。

## 3 在内吞小体脱壳

ASFV 感染的早期阶段,病毒内吞进入细胞后一小时内脱壳,首先涉及到外层衣壳层的脱落,随后是病毒内膜与内吞小体的融合<sup>[15]</sup>,其中,内吞小体的酸化对病毒的成功感染十分必要,逐步在低 pH 驱动下内吞小体分解<sup>[20]</sup>,再将裸的基因组核心释放到细胞质中。这一过程中由 Rab 蛋白和 PIs 协调的 EE 和 LE 隔间以及内吞小体成熟通路的完整性发挥了核心作用<sup>[21]</sup>。病毒蛋白 pE248R 是病毒颗粒的晚期结构成分,具有分子内二硫键,氨基酸序列包含一个推定的肉豆蔻酰化位点和靠近其羧基末端的疏水跨膜区域,pE248R 在感染过程中被肉豆蔻酰化,并与被感染细胞的膜部分结合成为一个完整的膜蛋白。pE199L 是一个富含半胱氨酸完整的跨膜多肽,也具有分子内二硫键。研究表明,pE199L 和 pE248R 不是病毒组装、释放以及病毒与细胞结合和内吞所必需的,而是膜融合和病毒基因组进入细胞所必需的,缺少这两个基因的突变毒株,早期和晚期基因表达将受到损害,感染性大幅降低<sup>[22]</sup>。可以推断,ASFV 基因组进入细胞依赖于由 pE248R 和 pE199L 组成的融合机制,病毒在细胞内脱壳过程,这两个蛋白发挥了与内吞小体的融合作用<sup>[23]</sup>。

#### 4 病毒的生物合成

一旦 ASFV 脱壳脱离了内吞溶酶体复合体后,病毒就绕过成熟的溶酶体,包括自噬体-溶酶体传递,避免了被降解。然而,病毒的复制显然还要依赖于某些溶酶体功能,即对丙胺敏感的活性是病毒所必需的,而长春碱和亮肽酶素敏感的功能仅部分影响病毒的复制<sup>[14]</sup>。而且,病毒需要通过内溶酶体、微管细胞骨架运输系统转运到生物合成的场所,已知的病毒编码酶的合成、蛋白质合成都发生在细胞质的不同位置,而病毒基因组复制在细胞核内开始,而大部分的复制和组装主要发生在细胞核周离散区域,即病毒工厂。在相关生物合成因子的研究方面,通过绿色荧光蛋白融合和 MYC 标记蛋白的重叠试验结果表明,ASFV p37 和 p14 蛋白具有核质转运活性<sup>[24]</sup>。p14 蛋白的作用是输入到细胞核,p37 蛋白在感染的早期阶段存在于细胞核的局部,后期只在细胞质中<sup>[25]</sup>,参与病毒 DNA 在细胞核内外的转运<sup>[26]</sup>。待病毒基因组和蛋白质合成后组装成子代病毒粒子,沿着微管被运送到质膜,在那里它们通过出芽或由肌动蛋白推动离开被感染的细胞,病毒的进入和退出,都依赖于细胞骨架的各种成分<sup>[6]</sup>。与此同时,ASFV 通过细胞内的通路诱导了感染细胞的凋亡<sup>[27]</sup>。

#### 5 展望

病毒进入细胞的途径和方式决定了病毒的趋向性和发病机制。ASFV 作为一种重要的动物传染病病原体,对其入侵的阻断是预防和治疗非洲猪瘟的重要研究目标,对 ASFV 与宿主细胞相互作用的研究,可深入揭示病毒致病和机体免疫的机制,为开发针对该病毒的新预防策略提供研究思路。但是,目前对 ASFV 入侵机制的了解仍然非常有限,特别是关于细胞受体、病毒穿入细胞的方式仍处于争议之中,普遍认为 ASFV 通过多种方式穿入细胞。同时,病毒与天然宿主巨噬细胞和适应性 Vero 细胞的相互作用可能存在一定的区别。因此,进一步揭示 ASFV 的宿主细胞受体、穿入细胞的方式以及脱

壳机制的研究仍然是未来的研究方向,也具有十分重要的现实意义。

#### 参考文献:

- [1] Ge S Q, Li J M, Fan X X, *et al.* Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(11): 2131-2133.
- [2] 中国动物疫病预防控制中心. 非洲猪瘟实验室诊断技术手册[M]. 北京:中国农业出版社, 2020.  
China Animal Disease Control Center. Laboratory diagnostic technical manual for ASF [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020.
- [3] Andrés Germán. African swine fever virus gets undressed: New insights on the entry pathway [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(4): e01906-16.
- [4] Sánchez E G, Quintas A, Pérez-Núñez D, *et al.* African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells [J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(6): e1002754.
- [5] Antonio Alcamí, Carrascosa A L, Viñuela E. The entry of African swine fever virus into Vero cells [J]. *Virology*, 1989, 168(2): 393-398.
- [6] Netherton C L, Wileman T E. African swine fever virus organelle rearrangements [J]. *Virus Research: An International Journal of Molecular and Cellular Virology*, 2013, 173(1): 76-86.
- [7] Alcamí A, Carrascosa A L, Viñuela E. Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells [J]. *Virology*, 1989, 168(2): 393-398.
- [8] Alcamí A, Carrascosa A L, Viñuela E. Interaction of African swine fever virus with macrophages [J]. *Virus research*, 1990, 17(2): 93-104.
- [9] Carrascosa A L, Saastre I, González P, *et al.* Localization of the African swine fever virus attachment protein P12 in the virus particle by immunoelectron microscopy [J]. *Virology*, 1993, 193(1): 460-465.
- [10] Angulo A, Viñuela E, Alcamí A. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12 [J]. *Journal of Virology*, 1993, 67(9): 5463-5471.
- [11] Paulino Gómez-Puertas, Fernando Rodríguez, José M Oviedo, *et al.* The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response [J]. *Virology*, 1998, 243(2): 461-471.

- [12] Inmaculada Galindo, Eladio Viñuela, Angel L Carrascosa. Protein cell receptors mediate the saturable interaction of African swine fever virus attachment protein p12 with the surface of permissive cells [J]. *Virus Research*, 1997, 49 (2): 193 - 204.
- [13] Luca Popescu, Natasha N Gaudreault, Kristen M Whitworth, *et al.* Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1 [J]. *Virology*, 2017, 501: 102 - 106.
- [14] Sameh Basta, Heidi Gerber, Alexander Schaub, *et al.* Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1/2): 9 - 17.
- [15] Sánchez Elena G, Pérez - Núñez Daniel, Revilla Yolanda. Mechanisms of entry and endosomal pathway of African swine fever virus [J]. *Vaccines*, 2017, 5(4): 42.
- [16] Valdeira M L, Geraldine A. Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells [J]. *Biology of the Cell*, 1985, 55(1/2): 35 - 40.
- [17] Bernardes C, António A, Pedroso de Lima M C, *et al.* Cholesterol affects African swine fever virus infection [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1393(1): 19 - 25.
- [18] Hernaez Bruno, Alonso Covadonga. Dynamin - and clathrin - dependent endocytosis in African swine fever virus entry [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(4): 2100 - 2109.
- [19] Inmaculada Galindo, Miguel Angel Cuesta - Geijo, Karolina Hlavova, *et al.* African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin - and cholesterol - dependent endocytosis [J]. *Virus Research*, 2015, 200: 45 - 55.
- [20] Covadonga Alonso, Inmaculada Galindo, Miguel Angel Cuesta - Geijo, *et al.* African swine fever virus - cell interactions: from virus entry to cell survival [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 42 - 57.
- [21] Miguel A Cuesta - Geijo, Inmaculada Galindo, Bruno Hernández, *et al.* Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48853.
- [22] Rodríguez Irene, Nogal María L, Redrejo - Rodríguez Modesto, *et al.* The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(23): 12290 - 12300.
- [23] Matamoros Tania, Alejo Alí, Rodríguez Javier María, *et al.* African swine fever virus protein pE199L mediates virus entry by enabling membrane fusion and core penetration [J]. *mBio*, 2020, 11(4): e00789 - 20.
- [24] Eulálio A, Nunes - Correia I, Carvalho A L, *et al.* Two African swine fever virus proteins derived from a common precursor exhibit different nucleocytoplasmic transport activities [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(18): 9731 - 9739.
- [25] Eulálio Ana, Nunes - Correia Isabel, Carvalho Ana Luísa, *et al.* Nuclear export of African swine fever virus p37 protein occurs through two distinct pathways and is mediated by three independent signals [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(3): 1393 - 1404.
- [26] Ana Eulálio, Isabel Nunes - Correia, José Salas, *et al.* African swine fever virus p37 structural protein is localized in nuclear foci containing the viral DNA at early post - infection times [J]. *Virus Research*, 2007, 130(1/2): 18 - 27.
- [27] Angel L Carrascosa, María Bustos, María L Nogal, *et al.* Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into Vero cells does not require virus replication [J]. *Virology*, 2002, 294(2): 372 - 382.

(编辑:李文平)