

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2019.01.006

• 综述 •

甲型流感病毒非结构蛋白 NS1 功能研究进展

刘瑞寒^{1,2}, 朱汝南², 钱渊^{1,2}

1. 北京协和医学院研究生院首都儿科研究所病毒研究室,北京 100730; 2. 首都儿科研究所病毒研究室,儿童病毒病原学北京市重点实验室,北京 100020

摘要: 甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)是每年季节性流感的主要病原体,也是全球儿童急性呼吸道感染的重要病毒性病原。非结构蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1)是由病毒基因组编码的蛋白,表达于被感染的细胞中,但不存在于病毒颗粒中。近年来,大量研究表明 NS1 是 IAV 的重要毒力因素,通过 NS1-RNA 之间、NS1-蛋白之间的相互作用,在拮抗宿主抗病毒反应、抑制宿主细胞凋亡、调节宿主及自身基因表达等多方面发挥作用。深入研究 NS1 与宿主细胞的相互作用,不仅可加深对 IAV 致病机制的理解,还可为预防和控制 IAV 的传播甚至暴发奠定理论基础,在新型抗病毒药物及疫苗研制中有着重要的应用价值。

关键词: 甲型流感病毒; 非结构蛋白 1; 干扰素; 天然免疫

Research progress on NS1 protein of influenza A viruses

LIU Ruihan^{1,2}, ZHU Runan², QIAN Yuan^{1,2}

1. Graduate School of Peking Union Medical College, Laboratory of Virology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100730, China; 2. Laboratory of Virology, Beijing Key Laboratory of Etiology of Viral Diseases in Children, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Abstract: Influenza A virus (IAV) is the dominant type of seasonal influenza and is also an important viral agent of acute respiratory tract infections in children worldwide. Nonstructural protein 1 (NS1) is a protein encoded by viral genome, expressed in the infected cells but not in virions. In recent years, large number of studies have shown that NS1 is an important virulence factor of IAV. NS1 plays multiple roles in antagonizing host antiviral response, inhibiting host cell apoptosis, and modifying host and itself gene expression via NS1-RNA and NS1-protein binding. In-depth study on interaction between NS1 and host cells can not only deepen the comprehending of the pathogenesis of IAV, but also lay a theoretical foundation for the prevention and control of IAV. It also has important application value in the development of new antiviral drugs and vaccines.

Keywords: Influenza A virus; Nonstructural protein 1; Interferon; Innate immunity

流感病毒(influenza virus)是正黏病毒科(Orthomyxoviridae)流感病毒属成员,为有包膜的单股负链分节段 RNA 病毒^[1]。其具有极强的传染性,可引起急性呼吸道传染病。根据病毒颗粒中核

蛋白(nucleoprotein, NP)和基质蛋白(matrix protein, M)抗原性的差异,流感病毒可分为甲(A)、乙(B)和丙(C)3 种型别。其中甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)是每年季节性流感的主要

基金项目:北京市科技计划(z111107056811041),北京市卫生计划和生育委员会项目(2060399PXM2017_026268_00005_00254486)

通信作者:钱渊

Correspondence to: QIAN Yuan E-mail: yqianbjc@263.net

病原体,自1918年起在全世界范围引起5次大的病原明确的暴发流行。IAV的非结构蛋白1(non-structural protein 1, NS1)与病毒-宿主相互作用关系最密切,是IAV感染过程中拮抗宿主天然免疫反应的主要病毒成分,也是影响流感病毒致病性和宿主适应性的关键毒力因素^[2]。

IAV的NS1是由病毒第8节段RNA编码的多功能调控蛋白,存在于病毒培养上清或被感染的细胞中,但不存在于病毒颗粒中。NS1通常含有215~237个氨基酸,包含两个功能结构域,即N端的RNA结合域(RNA-binding domain, RBD)和C端的效应结构域(effect domain, ED),两个结构域之间由7~12个氨基酸的连接区(linker region, LR)连接^[3]。NS1的功能主要依赖其蛋白-RNA、蛋白-蛋白相互作用,包括抑制干扰素(interferon, IFN)的转录表达;抑制IFN诱导的蛋白激酶R(protein kinase RNA-activated, PKR)和2',5'寡聚腺苷酸合成酶(2',5'-oligoadenylate synthetase, OAS)/核糖核酸酶L(ribonuclease L, RNase L)的抗病毒作用;激活磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路,抑制被感染细胞凋亡;调控病毒RNA合成及病毒RNA剪接,增强病毒蛋白质合成等;与宿主蛋白相互作用,调节病毒生物学特性。因此,深入了解NS1的生物学功能及其不同变异形式对功能的影响,将为设计新型抗病毒药物和减毒疫苗奠定基础。

1 NS1抑制IFN的转录表达

宿主细胞产生IFN是一种可有效限制病毒复制及传播的抗病毒机制。病毒感染细胞后,经自分泌或旁分泌途径产生的IFN可诱导宿主细胞产生300多种具有抗病毒作用的基因表达^[4]。IAV的NS1抵抗宿主抗病毒应答效应主要表现在抑制IFN的合成及抑制IFN诱导表达的抗病毒基因ISG(interferon-stimulated gene)激活两方面。这两种功能主要由NS1的C端ED区执行,由于ED区存在多种变异形式,不同毒株的NS1对IFN合成及相关功能的抑制机制不同^[5]。在自然环境或实验室传代过程中,NS1可丢失这些机制中的一种或全部。

1.1 NS1抑制IFN基因相关转录活化因子,降低IFN转录

病毒感染宿主细胞时,宿主细胞中的RNA解螺旋酶维甲酸诱导基因I(retinoic acid-inducible

gene I, RIG-I)可识别并结合至细胞内双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)或5'端含有三磷酸基团的单链RNA(single-stranded RNA, ssRNA),使自身发生ATP依赖的构象改变而暴露其N端CARD结构域(caspase recruiting domain)^[6],后者可被泛素连接酶TRIM25(tripartite motif-containing protein 25)^[7]或Riplet/RNF135(RING finger protein 135)^[8]泛素化,也可与TRIM25合成的多聚泛素链结合^[9]。经泛素化修饰的RIG-I CARD随后与线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral signaling, MAVS)的CARD结合,激活MAVS并使其发生低聚反应,进而激活其下游的多个激酶信号通路,最终导致细胞质中转录因子如干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)、核因子κB(nuclear factor κB, NF-κB)及c-Jun/活化转录因子2(activating transcription factor 2, ATF-2)的磷酸化激活及向胞核内的转运^[10]。这些转录活化因子在细胞核内的出现可大大增加IFN的转录表达。H5N1、2009 H1N1 pandemic(H1N1pdm)及2009年以前的部分H1N1亚型流感病毒的NS1,通过与TRIM25的卷曲螺旋域相互作用阻止其寡聚化而减少了RIG-I的泛素化,进而抑制宿主细胞中IRF3、NF-κB及c-Jun/ATF-2的活化来减少IFN基因的转录^[7]。当NS1出现S42P突变时,IAV在细胞培养中的增殖能力降低,不能发挥抑制宿主细胞表达IFN及降低IRF3磷酸化水平的作用^[11]。

Kuo等发现,H3N2亚型流感病毒NS1虽然也可有效结合TRIM25,但不能抑制IRF3的激活及IFN的转录起始,表明NS1与TRIM25的结合并不是抑制IRF3激活所必需的^[12],因此NS1与TRIM25结合可能抑制了另外的由TRIM25激活的抗病毒信号通路。Riplet与NS1的结合仅在NS1可抑制IRF3活化的流感病毒亚型中出现,且NS1与Riplet的结合表现出明显的种属限制性,人流感病毒NS1仅能与人类表达的Riplet结合而抑制RIG-I的泛素化,不能与猪或禽源Riplet结合^[13]。此外,ATP依赖的RNA解螺旋酶LGP2(laboratory of genetics and physiology 2)也含有与RIG-I相似的可识别并结合病毒RNA的结构域,但LGP2缺乏用来激活下游IRF3的可被泛素化的CARD。在无法抑制IRF3激活和IFN合成的H3N2亚型流感病毒感染的细胞中过表达LGP2,发现STAT1转录活化因子的激活受到抑

制,且 IFN 的转录水平明显降低;在可抑制 IRF3 激活和 IFN 合成的 H1N1 亚型流感病毒感染的细胞中过表达 LGP2,却没有表现出相同的作用^[14]。因此,NS1 可抑制 IFN 基因相关的转录活化因子,减少 IFN 转录毒株亚型的差异及宿主差异,但具体机制仍不明确,需进一步研究。

1.2 NS1 抑制宿主细胞 pre-mRNA 的加工成熟,减少胞质中 IFN 翻译模板

剪切和多聚腺苷酸化特异性因子(cleavage and polyadenylation specificity factor,CPSF)的相对分子质量为 30 000 的亚基即 CPSF30,具有在细胞核内裂解宿主 pre-mRNA 并对裂解的 pre-mRNA 进行聚腺苷酸化的作用,是宿主细胞内 pre-mRNA 3'端加工成熟的必要蛋白酶^[15]。随后,多聚腺苷酸结合蛋白 2 [poly(A)-binding protein 2, PABP2] 和 poly(A)聚合酶共同对带有 10~12 个腺苷酸尾的 pre-mRNA 进行进一步的加 A 延伸,完成对细胞核内 pre-mRNA 的加工^[16]。NS1 可通过以下 3 种方式抑制宿主细胞 pre-mRNA 的加工成熟,减少胞质中 IFN 翻译模板,从而降低被感染细胞中 IFN 的表达。首先,NS1 的 ED 区与 CPSF30 的锌指结构 F2F3 结合,使后者不能与 pre-mRNA 结合^[17],未加工的 pre-mRNA 在细胞核中大量聚集,胞质中成熟 mRNA 大量减少,其中包括 IFN 及多种具有抗病毒作用蛋白的 mRNA^[18];其次,ED 区与 PABP2 结合影响 poly(A)延伸,造成 pre-mRNA 多以 10~12 个腺苷酸为尾部结构的现象,无法进行核输出而聚集在细胞核内;最后,NS1 与 PABP2 结合也能抑制 3'端已完成加工的 mRNA 的核输出,导致更多的宿主 mRNA 滞留在细胞核内^[16]。

NS1 与 CPSF30 相互作用的区域为第 184~188 位氨基酸,第 184 位甘氨酸被精氨酸置换后,NS1 与 CPSF30 的结合能力消失;第 187 位疏水性色氨酸是 ED 区形成二聚体的必需氨基酸位点,不直接影响两者的结合,但可通过改变 ED 的空间构象影响 NS1 的功能;在两者结合区域外的第 103 位苯丙氨酸和第 106 位蛋氨酸虽然不直接参与 NS1 与 CPSF30 的结合,但可使 NS1 与 CPSF30 的结合更稳定^[19]。

不同亚型的流感病毒其 NS1 与 CPSF30 的结合抑制 pre-mRNA 加工成熟的作用也存在差异。H3N2 和 H2N2 亚型流感病毒的 NS1 虽不能抑制宿主细胞中 IRF3 等 IFN 相关转录活化因子的激活,但其与 CPSF30 结合可抑制 IFN pre-mRNA 的

成熟而减少宿主细胞内 IFN 的合成^[12]。相反,H1N1pdm 亚型流感病毒中,前面提到的 3 个位点的氨基酸均不利于 NS1 与 CPSF30 结合,各位点发生相应氨基酸突变后,大大降低了该亚型流感病毒在小鼠体内的致病力及复制能力^[20]。1997 年,在中国香港地区分离得到的 H5N1 亚型流感病毒 NS1 中,第 103 位和第 106 位氨基酸分别是亮氨酸和异亮氨酸,将两个位点的氨基酸分别用苯丙氨酸和蛋氨酸替代后,体外细胞培养中病毒的复制能力提高了近 20 倍^[21]。

1.3 NS1 的组蛋白模拟功能抑制宿主基因转录

1989 年以后分离的 H3N2 亚型流感病毒 NS1 的 C 端第 226~229 位氨基酸为 ARSK 序列,该氨基酸序列与组蛋白 H3K4 的 N 端 ARTK 序列相似,因此宿主细胞内的甲基化酶会错误地识别 NS1 的 ARSK 序列,且甲基化其最后一位赖氨酸^[22]。甲基化修饰后的 NS1 具有模拟组蛋白的功能,与 hPAF1C 结合,抑制 hPAF1C 介导的转录延伸机制,抑制包括抗病毒基因在内的一些诱导表达基因的转录。NS1 的 C 端缺失 ARSK 序列后,便丧失了该功能。NS1 的组蛋白模拟功能抑制基因转录在一定程度上弥补了 H3N2 亚型流感病毒 NS1 缺失的通过 IRF3 途径抑制 IFN 表达的作用^[23]。

2 NS1 抑制 IFN 诱导的 PKR 和 OAS 活化

NS1 抗 IFN 抗病毒作用除表现在其对 IFN 转录前及转录后的抑制作用外,还可与 IFN 诱导表达的 ISG 产物直接结合,抑制 ISG 的抗病毒作用。目前研究较多的两种 ISG 分别是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PKR 及 RNase L 通路活化的 OAS。

2.1 NS1 抑制 IFN 诱导的 PKR 活化

PKR 是一种在哺乳动物细胞中构成性表达并依赖 dsRNA 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,IFN 会增加其表达水平^[24]。PKR 可被 dsRNA 或细胞内 PACT(PKR-associated activator)激活,解除 PKR 的自我抑制使其自身发生磷酸化,随后将包括真核起始因子 2(eukaryotic initiation factor 2,eIF2) α 亚基(eIF2 α)在内的靶蛋白进行磷酸化^[25]。磷酸化的 eIF2 α 功能失活,被病毒感染的细胞中所有蛋白的合成均受到抑制,病毒自身蛋白质的合成也受到抑制。但 IVA 感染细胞中 PKR 没有表现出激活形式^[26],RBD 缺失的 NS1 毒株感染细胞后 PKR 依然没有表现出激活的作用,因此研究者推测 NS1 ED 区可直接结合 PKR,以不依赖 dsRNA 的方式抑制

PKR 的构象向活化形式改变^[27]。Min 等则报道, NS1 第 123~127 位氨基酸与 PKR 的连接区相互作用, 抑制了由 dsRNA 或 PACT 引起的 PKR 构象改变^[28]。

2.2 NS1 抑制 IFN 诱导的 OAS 活化

含有 2'-5' 磷酸二酯基团的寡核苷酸是病毒复制的副产物, OAS 可将 ATP 聚合进入这些副产物, 合成 2'-5' 寡腺苷酸链 (2'-5' A)。细胞中的 dsRNA 可活化 OAS, 使其发挥在 2'-5' 磷酸二酯键后加入多聚腺苷酸链的作用。随后 2'-5' A 可结合并活化细胞中构成性表达的 RNase L, 后者能裂解病毒及宿主细胞中的 ssRNA, 从而抑制病毒复制; 同时, RIG-I 可识别并结合经 RNase L 裂解产生的小片段 RNA, 进而增加 IFN 的转录表达, 形成对 IFN 表达的正反馈^[29]。流感病毒 NS1 的 RBD 与 dsRNA 的结合能力稍强, 可与 OAS 竞争性结合 dsRNA, 而抑制 OAS/RNase L 信号通路激活。当 NS1 的 RBD 第 38 位氨基酸由精氨酸突变为丙氨酸时, 丧失了与 OAS 竞争性结合 RNA 的能力, 病毒复制减少^[30]。

3 NS1 激活 PI3K/Akt 信号通路, 抑制病毒感染引起的细胞凋亡

PI3K 是一种由相对分子质量分别为 85 000 的调节亚基 (p85) 和 110 000 的催化亚基 (p110) 组成的异二聚体脂质激酶^[31]。PI3K 活化后, 可产生胞内第二信使——三磷酸磷脂酰肌醇 [phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate, PIP3], 随后 PIP3 募集胞膜上一系列下游信号蛋白。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 是 PIP3 结合的 PI3K 效应器。PI3K/Akt 信号通路的激活抑制了凋亡蛋白 Caspase-9 和调控细胞代谢的 GSK-3β 的活化, 进而抑制细胞的凋亡程序^[32]。NS1 的 ED 区与 p85β-SH2 及 p110 结合, 解除了 p85β 对 p110α 的抑制, 激活了 PI3K/Akt 信号通路, 抑制了流感病毒感染诱导的细胞凋亡程序, 为病毒在宿主细胞内复制提供了有利条件^[33]。将第 89 位保守表达的酪氨酸替换为苯丙氨酸后, NS1 失去了与 p85β 结合及活化 PI3K/Akt 的能力^[34], 细胞被感染后很快进入凋亡程序, 不利于流感病毒在细胞中复制。此外, NS1 还可与 Crk/CrkL 的 N 端 SH3 结构域结合激活 PI3K, 进而对 Akt 进行磷酸化激活, 该相互作用需 NS1 第 215 位氨基酸为脯氨酸, 多见于禽流感病毒^[35]。因此, IAV 感染宿主细胞时, NS1 可在

PI3K/Akt 信号通路中多环节调节宿主细胞对病毒感染的应答。

4 NS1 促进病毒 mRNA 和蛋白的合成

NS1 可使大量宿主 pre-mRNA 滞留在细胞核内, 病毒的帽依赖性内切酶可将宿主 pre-mRNA 上多腺苷酸帽切下来, 作为合成病毒 mRNA 的引物, 促进病毒 mRNA 的合成^[36]。流感病毒感染宿主后, 其 NS1 可特异性识别并结合含有 5'-非翻译区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 的病毒 mRNA, 大量转录病毒 mRNA。NS1 的 N 端第 81~113 位氨基酸可与转录起始因子 eIF4GI 结合, 将 eIF4GI 募集并结合到病毒 mRNA 的 5'-UTR 区以增强病毒 mRNA 的转录^[37]。同时, NS1 的 N 端第 81 位氨基酸可与 PABP1 结合, PABP1 与 eIF4GI 有协同作用, 三者形成 NS1-PABP1-eIF4GI 复合物, 共同促进病毒 mRNA 的转录^[38]。hStanfen 是一种可以与 dsRNA 及微管蛋白结合的蛋白, 通过其微管运输功能将病毒 mRNA 运输至翻译场所, 如多聚核糖体^[39]。因此, NS1 通过与病毒 mRNA 5'-UTR、eIF4GI、PABP1 和 hStanfen 的相互作用, 募集病毒 mRNA, 形成多蛋白的转录起始复合物, 增强病毒 mRNA 的转录。近期有研究发现, NS1 还可与 DDX21 结合, 后者是细胞表达的解螺旋酶, 可通过结合 PB1 抑制病毒聚合酶复合体的形成而发挥抑制病毒基因复制的功能, 但 NS1 与 DDX21 的结合解除了其对病毒复制的抑制作用^[40]。

5 NS1 C 端 PDZ 结合基序影响毒株毒力

大规模序列分析发现, 禽流感病毒 NS1 的 C 端最后 4 个氨基酸 XSXV/XTXV 是潜在的 PDZ (postsynaptic density protein) 结合基序 (PDZ-binding motif, PBM)^[41]。含 PDZ 区域的蛋白通过蛋白-蛋白识别模式可整合调控多条信号通路, 特异性结合 4~5 个氨基酸的短的 C 端短肽类基序, 进而结合一系列靶蛋白或将蛋白低聚化形成分支。含 PDZ 区域的蛋白功能涉及多方面, 包括物质运输、定位、分子信号复合物的组装、组织细胞极性、受体结合和下游效应器激活^[42]。IAV 的 NS1 可与含 PDZ 区域的 Scribble 和 Dlg1 蛋白结合, 抑制病毒感染过程中的天然免疫反应^[43]。90% 的人流感病毒 NS1 的 C 端 PBM 为 RSKV/RSEV, 而禽流感病毒则为 ESEV/EPEV。目前已知的可与禽流感病毒 NS1 PBM 结合的含 PDZ 的蛋白质约有 30 种,

但与人流感病毒 NS1 PBM 结合的含 PDZ 的蛋白质还未被发现^[41]。Jackson 等为验证以上两类 NS1 PBM 的功能差异,利用反向遗传技术将 1918 H1N1 和高致病性禽流感病毒 H5N1 的 PBM 表达于 A/WSN/33 毒株,发现与野生型 A/WSN/33 相比,改造后的毒株表现出对小鼠更强的致病性和更高的致死率^[44]。

6 NS1 与抗病毒药物和减毒活疫苗研制

NS1 在拮抗宿主抗病毒反应和促进病毒自身基因转录表达方面均表现出重要作用,成为近年来抗病毒药物及减毒活疫苗研制的主要方向。目前,研究者可通过计算机预测和识别大量来自不同亚型毒株的 NS1 结构及潜在的化学抑制剂结合位点,同时也有多种方法可检测抑制剂的效果。通过比较不同亚型不同毒株 NS1 基因和蛋白,研究者发现 NS1 结合 dsRNA 的能力是其最保守的功能。Cho 等和 Maroto 等分别用荧光和放射性元素标记 RNA,监测在不同抑制剂作用下 NS1 与 RNA 结合的能力是否受影响,结果证明 EGCG 和³⁵S-vNSZ 两种化学物质均可有效抑制 NS1 与 dsRNA 的结合而发挥各自的抗病毒作用^[45-46]。Basu 等使用以酵母为基础的表型互补实验,识别酵母中有多个可逆转 NS1 调控的抑制复制的小分子化学物质^[47]。其中一个小分子化合物 JJ3297 表现出明显的抗病毒活性,允许在表达 NS1 基因的流感病毒感染的细胞中表达 IFN 和激活 RNase L^[48],但其抗病毒作用是直接抑制病毒感染过程中的 NS1 功能还是通过其他机制尚无定论。

NS1 基因表达完全缺失或表达截短的 NS1 基因均可使病毒在宿主体内的复制能力降低,但并不影响病毒本身诱发宿主产生强烈的天然免疫反应^[49]。这种因 NS1 表达缺陷而表现为毒力减弱、复制能力降低及免疫反应诱导作用较强的毒株的发现,为通过改造 NS 基因研制减毒活疫苗的想法提供了理论依据。一系列利用反向遗传技术表达 NS1 C 端缺失的减毒活疫苗在小鼠、猪、马、禽类、雪貂和猕猴中均表现出良好的保护作用^[50]。近期一项禽流感疫苗研究表明,于鼻内接种表达 NS1 缺陷的减毒活疫苗后再皮下接种灭活疫苗,不仅能增强黏膜抗体反应,升高血清抗体效价,还能增强抗体与异种抗原的交叉反应,提供更好的异源性保护^[51]。在 15~50 岁健康志愿者中进行 NS1 表达缺陷疫苗的 I 期临床试验中,该疫苗同样表现出良好的安全性

及有效的免疫原性^[52]。

7 结语

NS1 除与上述宿主细胞表达的蛋白相互作用,亦可与病毒自身表达的多种蛋白相结合,在宿主适应^[53]和流感病毒的空气传播^[54]过程中发挥不容忽视的作用。针对 NS1 拮抗宿主抗病毒作用机制的相关研究已持续了十几年,这个相对分子质量仅为 26 000 的小蛋白几乎参与了流感病毒感染宿主细胞的各阶段,因此有必要对 NS1 进行更深入的系统研究,以期为更好地预防和控制流感病毒传播甚至暴发奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: The viruses and their replication [M]. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 1449-1496.
- [2] Ayllon J, García-Sastre A. The NS1 protein: a multitasking virulence factor [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2015, 386: 73-107.
- [3] Bornholdt ZA, Prasad BV. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain [J]. Nat Struct Mol Biol, 2006, 13(6): 559-560.
- [4] García-Sastre A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses [J]. Virus Res, 2011, 162(1-2): 12-18.
- [5] Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense [J]. Curr Opin Virol, 2015, 12: 1-6.
- [6] Luo D, Ding SC, Vela A, Kohlway A, Lindenbach BD, Pyle AM. Structural insights into RNA recognition by RIG-I [J]. Cell, 2011, 147(2): 409-422.
- [7] Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, Inn KS, Liang C, Cui S, Myong S, Ha T, Hopfner KP, Jung JU. Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(43): 16743-16748.
- [8] Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection [J]. Cell Host Microbe, 2010, 8(6): 496-509.
- [9] Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity [J]. Cell, 2010, 141(2): 315-330.
- [10] McWhirter SM, Tenover BR, Maniatis T. Connecting mitochondria and innate immunity [J]. Cell, 2005, 122(5): 645-647.
- [11] Cheng J, Zhang C, Tao J, Li B, Shi Y, Liu H. Effects of the S42 residue of the H1N1 swine influenza virus NS1

- protein on interferon responses and virus replication [J]. *Virol J*, 2018, 15(1): 57. doi: 10.1186/s12985-018-0971-1.
- [12] Kuo RL, Zhao C, Malur M, Krug RM. Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon- β transcription [J]. *Virology*, 2010, 408(2): 146-158.
- [13] Rajsbaum R, Albrecht RA, Wang MK, Maharaj NP, Versteeg GA, Nistal-Villán E, García-Sastre A, Gack MU. Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(11): e1003059.
- [14] Malur M, Gale M Jr, Krug RM. LGP2 downregulates interferon production during infection with seasonal human influenza A viruses that activate interferon regulatory factor 3 [J]. *J Virol*, 2012, 86(19): 10733-10738.
- [15] Nemерoff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W, Krug RM. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs [J]. *Mol Cell*, 1998, 1(7): 991-1000.
- [16] Chen Z, Li Y, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery [J]. *EMBO J*, 1999, 18(8): 2273-2283.
- [17] Twu KY, Noah DL, Rao P, Kuo RL, Krug RM. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target [J]. *J Virol*, 2006, 80(8): 3957-3965.
- [18] Noah DL, Twu KY, Krug RM. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs [J]. *Virology*, 2003, 307(2): 386-395.
- [19] Das K, Ma LC, Xiao R, Radvansky B, Aramini J, Zhao L, Marklund J, Kuo RL, Twu KY, Arnold E, Krug RM, Montelione GT. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 13093-13098.
- [20] Hale BG, Steel J, Medina RA, Manicassamy B, Ye J, Hickman D, Hai R, Schmolke M, Lowen AC, Perez DR, García-Sastre A. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein [J]. *J Virol*, 2010, 84(14): 6909-6922.
- [21] Twu KY, Kuo RL, Marklund J, Krug RM. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells [J]. *J Virol*, 2007, 81(15): 8112-8121.
- [22] Marazzi I, Ho JS, Kim J, Manicassamy B, Dewell S, Albrecht RA, Seibert CW, Schaefer U, Jeffrey KL, Prinjha RK, Lee K, García-Sastre A, Roeder RG, Tarakhovsky A. Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic [J]. *Nature*, 2012, 483(7390): 428-433.
- [23] Li D, Cutillas V, Wei T. Novel viral evasion tactic found from influenza virus H3N2 [J]. *Future Virol*, 2012, 7(7): 649-651.
- [24] García MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(4): 1032-1060.
- [25] Zhang S, Sun Y, Chen H, Dai Y, Zhan Y, Yu S, Qiu X, Tan L, Song C, Ding C. Activation of the PKR/eIF2 α signaling cascade inhibits replication of Newcastle disease virus [J]. *Virol J*, 2014. doi: 10.1186/1743-422X-11-62.
- [26] Chien CY, Xu Y, Xiao R, Aramini JM, Sahasrabudhe PV, Krug RM, Montelione GT. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(7): 1950-1962.
- [27] Li S, Min JY, Krug RM, Sen GC. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA [J]. *Virology*, 2006, 349(1): 13-21.
- [28] Min JY, Li S, Sen GC, Krug RM. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis [J]. *Virology*, 2007, 363(1): 236-243.
- [29] Silverman RH. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response [J]. *J Virol*, 2007, 81(23): 12720-12729.
- [30] Min JY, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'.5'oligo(A) synthetase/RNase L pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 7100-7105.
- [31] Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(8): 606-619.
- [32] Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, Schmolke M, Ludwig S. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses [J]. *J Virol*, 2007, 81(7): 3058-3067.
- [33] Hale BG, Batty IH, Downes CP, Randall RE. Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 β suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1372-1380.
- [34] Hale BG, Kerry PS, Jackson D, Precious BL, Gray A, Killip MJ, Randall RE, Russell RJ. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(5): 1954-1959.
- [35] Heikkinen LS, Kazlauskas A, Melén K, Wagner R, Ziegler

- T, Julkunen I, Saksela K. Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9): 5719-5727.
- [36] Enami M, Enami K. Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system [J]. *J Virol*, 2000, 74(12): 5556-5561.
- [37] Aragón T, de la Luna S, Novoa I, Carrasco L, Ortín J, Nieto A. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (17): 6259-6268.
- [38] Burgui I, Aragón T, Ortín J, Nieto A. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84 (Pt 12): 3263-3274.
- [39] Falcón AM, Fortes P, Marión RM, Beloso A, Ortín J. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(11): 2241-2247.
- [40] Chen G, Liu CH, Zhou L, Krug RM. Cellular DDX21 RNA helicase inhibits influenza A virus replication but is counteracted by the viral NS1 protein [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(4): 484-493.
- [41] Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, Xu X, Wang J, Ma J, Fan Y, Rakestraw KM, Webster RG, Hoffmann E, Krauss S, Zheng J, Zhang Z, Naeve CW. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates [J]. *Science*, 2006, 311 (5767): 1576-1580.
- [42] Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 1-29.
- [43] Barreda D, Sánchez-Galindo M, López-Flores J, Navarro Castro KE, Bobadilla K, Salgado-Aguayo A, Santos-Mendoza T. PDZ proteins are expressed and regulated in antigen-presenting cells and are targets of influenza A virus [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103(4): 731-738.
- [44] Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(11): 4381-4386.
- [45] Cho EJ, Xia S, Ma LC, Robertus J, Krug RM, Anslyn EV, Montelione GT, Ellington AD. Identification of influenza virus inhibitors targeting NS1A utilizing fluorescence polarization-based high-throughput assay [J]. *J Biomol Screen*, 2012, 17(4): 448-459.
- [46] Maroto M, Fernandez Y, Ortín J, Pelaez F, Cabello MA. Development of an HTS assay for the search of anti-influenza agents targeting the interaction of viral RNA with the NS1 protein [J]. *J Biomol Screen*, 2008, 13 (7): 581-590.
- [47] Basu D, Walkiewicz MP, Frieman M, Baric RS, Auble DT, Engel DA. Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function [J]. *J Virol*, 2009, 83(4): 1881-1891.
- [48] Walkiewicz MP, Basu D, Jablonski JJ, Geysen HM, Engel DA. Novel inhibitor of influenza non-structural protein 1 blocks multi-cycle replication in an RNase L-dependent manner [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 1): 60-70.
- [49] Schmolke M, García-Sastre A. Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus [J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12(7): 873-880.
- [50] Richt JA, García-Sastre A. Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 333: 177-195.
- [51] Jang H, Elaish M, Kc M, Abundo MC, Ghorbani A, Ngunjiri JM, Lee CW. Efficacy and synergy of live-attenuated and inactivated influenza vaccines in young chickens [J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195285.
- [52] Wacheck V, Egorov A, Groiss F, Pfeiffer A, Fuereder T, Hoeflmayer D, Kundi M, Popow-Kraupp T, Redlberger-Fritz M, Mueller CA, Cinatl J, Michaelis M, Geiler J, Bergmann M, Romanova J, Roethl E, Morokutti A, Wolschek M, Ferko B, Seipelt J, Dick-Gudenus R, Muster T. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1 [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(3): 354-362.
- [53] Chauché C, Nogales A, Zhu H, Goldfarb D, Ahmad Shanizza AI, Gu Q, Parrish CR, Martínez-Sobrido L, Marshall JF, Murcia PR. Mammalian adaptation of an avian influenza A virus involves stepwise changes in NS1 [J]. *J Virol*, 2018, 92 (5): e01875-17. doi: 10.1128/JVI.01875-17.
- [54] Watanabe T, Imai M, Kawaoka Y. NS1 is the fluid for “flu-transmission” [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114 (42): 11012-11014.

(收稿日期:2018-08-21)