

·基础研究·

基于NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎症小体信号筛选猴痘病毒调控炎症的关键蛋白

罗铭兴¹, 裴晨辰¹, 龚李云², 郑新雷², 钱军^{1,3,4}, 刘全², 郑君²

(1. 中山大学中山医学院, 广东广州 510080; 2. 广东省科学院动物研究所//广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东广州 510062; 3. 广东省高致病性病原微生物科学数据中心, 广东广州 510080; 4. 深圳市病原微生物与生物安全重点实验室, 广东深圳 518107)

摘要:【目的】筛选并鉴定猴痘病毒(MPXV)调控NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎症小体信号的关键蛋白。【方法】以MPXV国内流行毒株的基因组为模板,构建可能具有炎症调控功能的病毒基因表达质粒库(共82个)。将NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、含有荧光素酶报告基因的白细胞介素1 β 前体(pro-IL-1 β -Luc)蛋白的真核表达质粒以及病毒基因表达质粒共转染HEK293T细胞,通过检测细胞上清液中的荧光素酶活性来监测NLRP3炎症小体信号通路的活化,从而筛选明显抑制成熟IL-1 β 产生的病毒基因,通过蛋白质印迹(WB)等方法进一步鉴定其抑制作用,通过免疫共沉淀(Co-IP)等方法鉴定其与NLRP3炎症小体各组分的相互作用,通过关键位点突变的方法鉴定其相互作用的基序。【结果】成功构建并优化了NLRP3炎症小体信号筛选体系,使用该体系筛选MPXV表达质粒库,其中B10R抑制成熟IL-1 β 产生的效果最为明显($P < 0.0001$),其抑制作用呈现剂量依赖性,进一步鉴定发现B10R能够与pro-IL-1 β 结合,而B10R的C端基序突变体B10Rmut-C(T96A, Y97A, I98A)失去了与pro-IL-1 β 相互作用的能力。【结论】MPXV B10R蛋白能够与pro-IL-1 β 相互作用,进而抑制成熟IL-1 β 的产生,而B10R蛋白C端基序(T96, Y97, I98)对于其功能发挥至关重要。本研究为进一步解析MPXV调控NLRP3炎症小体信号的分子机制提供了线索和依据。

关键词: NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3;炎症小体;猴痘病毒;白细胞介素1 β ;B10R

中图分类号:R392 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2026)02-0259-10

DOI: 10.11714/jssysu.med.YX20250165

Screening of the Monkeypox Virus Key Proteins Regulating Inflammation Based on NOD-like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome Signaling

LUO Mingxing¹, PEI Chenchen¹, GONG Liyun², ZHENG Xinlei², QIAN Jun^{1,3,4},
LIU Quan², ZHENG Jun²

(1. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization // Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510062, China; 3. Guangdong Provincial Science Data Center for Highly Pathogenic Microbes, Guangzhou 510080, China; 4. Key Laboratory of Pathogenic Microorganisms and Biosafety, Shenzhen, 518107, China)

Correspondence to: QIAN Jun, E-mail: qianj9@mail.sysu.edu.cn; LIU Quan, E-mail: liuquan1973@hotmail.com;

ZHENG Jun, E-mail: zhengjundk@163.com

收稿日期:2025-11-11

录用日期:2026-03-04

基金项目:国家自然科学基金(32570624);广东省科学院发展专项(2022GDASZH-2022010106, 2024GDASZH-2024010101)

作者简介:罗铭兴,第一作者,研究方向:生物与医药, E-mail: luomx7@mail2.sysu.edu.cn;钱军,通信作者,教授,博士生导师, E-mail: qianj9@mail.sysu.edu.cn;刘全,通信作者,研究员,博士生导师, E-mail: liuquan1973@hotmail.com;郑君,通信作者,副研究员,硕士生导师, E-mail: zhengjundk@163.com

Abstract: 【Objective】 To screen and identify the key proteins of Monkeypox Virus (MPXV) that regulate the NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome. 【Methods】 Using the genomic sequence of the domestic epidemic strain of MPXV as a template to construct an expression plasmid library containing 82 viral genes. To screen for viral genes that significantly inhibit the production of interleukin-1 β (IL-1 β), the expression plasmids encoding NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cysteine protease-1 (Caspase-1), and pro-IL-1 β -Luc reporter gene were co-transfected into HEK293T cells, along with the viral gene plasmids. The signal of the NLRP3 inflammasome was monitored by measuring luciferase activity in the cell supernatant. The inhibition effects were further confirmed by Western Blot (WB), and the interactions between the viral proteins and the components of the NLRP3 inflammasome were determined by Co-immunoprecipitation (Co-IP). Additionally, site-directed mutagenesis was performed to identify the specific interaction motifs. 【Results】 An NLRP3 inflammasome signal screening system were successfully established and optimized. Screening the MPXV plasmids using this system revealed that B10R most significantly inhibits IL-1 β maturation in a dose-dependent manner ($P < 0.0001$). Further characterization demonstrated that B10R interacts directly with pro-IL-1 β . Notably, the C-terminal motif mutant of B10R (B10Rmut-C, T96A, Y97A, I98A) lost its ability to interact with pro-IL-1 β . 【Conclusions】 The MPXV B10R protein interacts with pro-IL-1 β , thereby inhibiting the IL-1 β maturation. The C-terminal motif (T96, Y97, I98) of the B10R protein is crucial for function. This study provides important clues and a foundation for further elucidating the molecular mechanisms by which MPXV regulates the NLRP3 inflammasome.

Key words: NOD-like receptor family pyrin domain containing 3; inflammasome; monkeypox virus; interleukin-1 β ; B10R

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2026, 47(2): 259-268]

猴痘病毒(monkeypox virus, MPXV)属于痘病毒科正痘病毒属,其形态为砖状或椭圆形,直径约200~250 nm,基因组由一条长度约197 kb的线性双链DNA组成,编码接近200种蛋白质。MPXV具有广泛的宿主范围,可通过飞沫、直接接触或传染性材料等传播,感染的病毒在宿主细胞质中复制,可引起一种人畜共患病—猴痘。自2022年5月以来,人类感染MPXV的比例急剧增加,促使世界卫生组织先后两次宣布“猴痘疫情为国际关注的突发公共卫生事件”^[1-3]。MPXV感染往往会引起患者发热、淋巴结肿大和皮肤病变等典型症状,对于孕妇、免疫功能低下的个体和儿童,则可能引起严重症状,如头痛、肌痛、癫痫、意识改变和脑炎等,并发症的出现是导致患者死亡的主要因素^[4]。然而我们对MPXV的感染与免疫逃逸机制仍然知之甚少。正痘病毒(orthopoxvirus, OPV)能够编码一系列防御蛋白来对抗宿主天然和适应性免疫^[5],这些蛋白往往以免疫应答和炎症信号传导过程的关键分子为靶点^[6],其中靶向炎症小体是正痘病毒调控炎症信号,从而介导病毒免疫逃逸的重要方式之一。炎症小体是一种胞质蛋白复合物,能够介导强效炎症介质(如白细胞介素IL-1 β 等)的激活,这些细胞因

子具有引起发烧、血管扩张、吸引其他免疫细胞(如中性粒细胞)到感染或损伤部位等作用,是急性炎症反应的核心驱动力^[7]。痘苗病毒(Vaccinia virus, VACV)编码两种保守的蛋白B13和F1,用于靶向炎症小体的成分,以克服宿主防御。B13可以模拟Caspase-1的底物,从而抑制Caspase-1活性,阻断IL-1 β 的蛋白水解^[8];F1通过与NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白1(NOD-like receptor family pyrin domain containing 1, NLRP1)相互作用,并抑制NLRP1活化,进而抑制NOD样受体(NOD-like receptor, NLR)介导的白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的产生,增强VACV的毒力^[9]。正痘病毒还能够编码一些分泌蛋白,如VACV编码的B15R和C12L,这些蛋白能够模拟IL-1 β 和IL-18(interleukin-18, IL-18)的受体,从而有效地阻止进一步的炎症信号级联^[10-11]。在目前报道的炎症小体中,NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症小体的研究最为广泛。它是一种细胞内由NLRP3、ASC和效应蛋白Caspase-1组成的多蛋白复合物^[12]。Caspase-1在被募集到炎症小体复合物时通过邻近诱导的自催化切割后被激活,该复

合物能够将白细胞介素 1 β 前体蛋白 (pro-IL-1 β) 裂解,产生成熟且有活性的 IL-1 β 并分泌到细胞外侧。IL-1 β 的分泌需要两个步骤,一是炎症小体信号的启动,由核因子(NF- κ B)通路、细胞因子信号和炎症小体成分的翻译后修饰介导;二是炎症小体复合体的组装,此步骤可被多种刺激激活,包括线粒体功能障碍、离子通量(例如 K⁺外流)、溶酶体损伤等^[13-14]。因此在各种人类疾病中,包括病毒感染、自身炎症性疾病和自身免疫性疾病^[15],NLRP3 炎症小体的协调保护和病理反应要依靠微环境的变化。然而,MPXV 感染过程中操纵宿主 NLRP3 炎症小体的机制尚不清楚。本研究通过 NLRP3 炎症小体信号筛选体系鉴定出能够明显抑制 IL-1 β 成熟的关键分子 B10R,该蛋白可以通过结合 pro-IL-1 β 抑制 IL-1 β 成熟。本研究为进一步探究 MPXV 调控 NLRP3 炎症小体信号的分子机制奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞与质粒

HEK293T 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,THP-1 细胞保存于本实验室。质粒 pcDNA-Flag-NLRP3、pcDNA-Flag-ASC、pcDNA-Flag-pro-Caspase-1-1 由江汉大学万品博士惠赠。VR1012-Flag-pro-IL-1 β -Luc 质粒,MPXV 各蛋白表达质粒共 82 个(VR1012-3Flag 作为质粒骨架),VR1012-Flag-pro-IL-1 β ^{D116A}-Luc, pCAGGS-HA-B10Rmut-N, pCAGGS-HA-B10Rmut-C 和 pCAGGS-HA-B10Rmut-KTEL 质粒均由本实验室构建并保存。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括胎牛血清(ExCell, FSP500); DMEM 基础培养基(生物工程上海股份有限公司, E600003-0500); 2.5 g/L 胰蛋白酶-EDTA 消化液(Gibco, 25200-056); 青霉素和链霉素(Biotopped, Top0016); Lipofectamine 2000(Invitrogen, 11668019); Opti-MEM(Gibco, 31985062); Anti-NLRP3 抗体(Proteintech, 19771-1-AP); Anti-ASC 抗体(Proteintech, 10500-1-AP); Anti-Caspase-1 抗体(Proteintech, 22915-1-AP); Anti-IL-1 β 抗体(Proteintech, 16806-1-AP); Anti-GADPH 抗体(Proteintech, 60004-1-Ig); Anti-Flag 抗体(Proteintech,

20543-1-AP); Anti-HA 抗体(Proteintech, 81290-1-RR); 5 \times protein loading (Biotopped, Top0741-5ml)、细胞裂解液(Biosharp, BL504A); 100 \times 蛋白酶抑制剂 Cocktail(MCE, HY-K0010); 抗-FLAG[®] M2 亲和琼脂糖凝胶(Sigma-Aldrich, A4596); 罗氏(Roche) X-tremeGENE[™] HP DNA 转染试剂, 6366244001; HRP 显影液(雅酶, SQ203); 荧光素酶检测试剂盒(Promega, E2620)。主要仪器包括 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱(ESCO Lifesciences Group); 离心机(湘仪); 洗脱摇床(江苏荣华仪器制造有限公司); 电泳仪(森西赛智科技有限公司); 酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司)和高灵敏度化学发光成像仪(森西赛智科技有限公司)等。

1.3 细胞培养

使用添加了 100 ml/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 完全培养基于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 HEK293T 细胞,待细胞密度达 80%~90% 后,使用 2.5 g/L 胰蛋白酶 EDTA 消化液在 37 $^{\circ}$ C 下消化 2 min,加入等体积 DMEM 完全培养基中和胰酶,以 658 \times g 对细胞悬液离心 5 min。离心完全后,弃掉上层培养基,加入 1 mL 完全培养基重悬细胞,取 250 μ L 重悬液继代,剩余细胞计数并接种于相应的孔板中。

1.4 质粒转染

待接种到孔板中的 HEK293T 细胞密度达到 60%~70% 时进行转染工作。取 1/10 体积细胞培养液的 Opti-MEM 等体积分装于两个 1.5 mL Ep 管中,然后在其中一个 Ep 管中加入一定量的转染质粒,另一个 Ep 管中加入 Lipofectamine 2000 转染试剂,以 1 μ g 质粒对 3 μ L 转染试剂的比例分别加入管中并充分混匀,室温孵育 5 min,然后将稀释的质粒加入到稀释的转染试剂中,室温孵育 20 min。细胞转染时使用 Opti-MEM 培养基,将质粒与转染试剂的混合物沿孔板侧壁缓慢加入细胞中,并轻轻摇动混匀,将细胞置于培养箱中孵育 4~6 h,更换完全培养基,48 h 后收集细胞样品并进行后续实验。

将 THP-1 以 1 \times 10⁶ cells/孔接种到 6 孔板中,加入 PMA 至培养基中至终浓度为 10 μ mol/L,处理 24 h 以后进行转染,收样前 2 h 以终浓度 10 μ mol/L 的尼日利亚菌素进行刺激感染,48 h 以后收取细胞培养上清进行 ELISA 实验,收集细胞进行 WB。

1.5 NLRP3炎症小体信号系统的优化

根据文献公布的在 HEK293T 细胞中构建 NLRP3 炎症小体信号的实验信息,我们整理了 3 种不同的转染组别,分别设计对照组:转染体系不加入 IL-1 β 和实验组:转染体系加入 IL-1 β 。统计 3 种组别的对照组与实验组细胞培养上清的荧光值。

1.6 MPXV 抑制 NLRP3 炎症小体信号蛋白的筛选

将 HEK293T 细胞接种到 48 孔板中(5×10^4 cells/孔),每孔转染炎症小体表达质粒 pcDNA-Flag-NLRP3(62.5 ng)、pcDNA-ASC(6.25 ng)、pcDNA-pro-Caspase-1(31.25 ng)、VR1012-pro-IL-1 β -Luc(62.5 ng)以及猴痘蛋白表达质粒(31.25 ng),每个猴痘蛋白分别设定 3 个平行重复孔,以空质粒与炎症小体表达质粒共转的细胞作为阴性对照,以全部空质粒共转的细胞作为空白对照。转染 48 h 后分别收集细胞培养液,1 645 $\times g$ 离心 10 min 以去除细胞碎片等杂质,上清液即为待检样品,其中含有融合表达荧光素酶的成熟 IL-1 β (IL-1 β -Luc),后续使用荧光素酶检测试剂盒定量上清液中 IL-1 β -Luc 含量。

1.7 蛋白印迹检测

转染 48 h 后的细胞使用 PBS 清洗,然后收集细胞至 1.5 mL Ep 管中,9 870 $\times g$ 离心 5 min,去除上清,加入预冷的 RIPA 细胞裂解液和蛋白酶抑制剂量充分重悬,冰上裂解 30 min。随后 9 870 $\times g$ 离心 10 min,取上清液加入对应量的蛋白上样缓冲液(5 \times),金属浴 95 $^{\circ}C$ 加热 10 min。使用 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,再以 300 mA 恒流转膜 1h,将蛋白转移到孔径为 0.45 μm 的 PVDF 膜上,使用 PBST(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl 和 100 $\mu L/mL$ Tween-20)配制的含 50g/L 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1h,一抗 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜, PBST 洗膜 3 遍,每遍 10 min,再用对应的二抗分别室温孵育 1h, PBST 再次洗膜 3 遍,每遍 10 min,最后加入 HRP 显影液,使用化学发光成像仪进行蛋白条带显影。

1.8 免疫共沉淀

将 HEK293T 细胞接种于 10 cm 培养皿中,转染质粒 48 h 后, PBS 洗涤并收集细胞至 1.5 mL Ep 管中,822.5 $\times g$ 离心 5 min,去除上清,加入 300 μL 预冷的 IP 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 300 mol/L NaCl, 10 ml/L Triton-X 100, 5 mmol/L EDTA 和 10 ml/L 甘油)、3 μL 蛋白酶抑制剂(100 \times),

混匀后冰上裂解 30 min,9 870 $\times g$ 离心 10 min。先取 100 μL 裂解产物,加入 25 μL 蛋白上样缓冲液(5 \times),金属浴 95 $^{\circ}C$ 加热 10 min,该样品作为实验的 Input 组。剩余 200 μL 裂解液转移至新的 1.5 mL Ep 管中,分别加入 20 μL 抗-FLAG[®] M2 亲和琼脂糖凝胶(Sigma),放入旋转仪 4 $^{\circ}C$ 冰箱过夜孵育,822.5 $\times g$ 离心 1 min 收集琼脂糖凝胶,分别使用 IP 裂解液洗涤 3 次,随后加入 100 μL 裂解液和 25 μL 蛋白上样缓冲液(5 \times),金属浴 95 $^{\circ}C$ 加热 10 min 进行蛋白变性。分别取 10 μL 样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳以及蛋白印迹(western blot, WB)转膜,使用相应的一抗和二抗进行孵育,加入显影液显色并采集照片。

1.9 荧光素酶检测

按照荧光素酶检测试剂盒说明书,将 Bright-Glo[™] 缓冲液与底物混合配制检测试剂,向白色不透明 96 孔酶标板中加入 100 μL 待检样品,随后立即加入荧光素酶检测试剂 100 μL 并混匀,在 5 min 内放入多功能酶标仪中,选择化学发光检测模式进行读数,并对结果进行统计分析。

1.10 ELISA 检测

按照 ELISA 检测试剂盒说明书,将洗涤缓冲液、IL-1 β 一抗、HRP 偶联二抗分别进行稀释备用。收取转染后 48 h THP-1 培养上清,1 645 $\times g$ 离心 10 min,随后依据说明书完成其余操作,最后使用酶标仪在 450 nm 进行读数,并对结果进行统计分析。

1.11 统计分析

试验结果使用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析,对实验所得数据通过 *t* 检验(*t*-test)或 One-way ANOVA 计算得到 *p* 值,差异有统计学意义用“*”表示,其含义分别是:* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

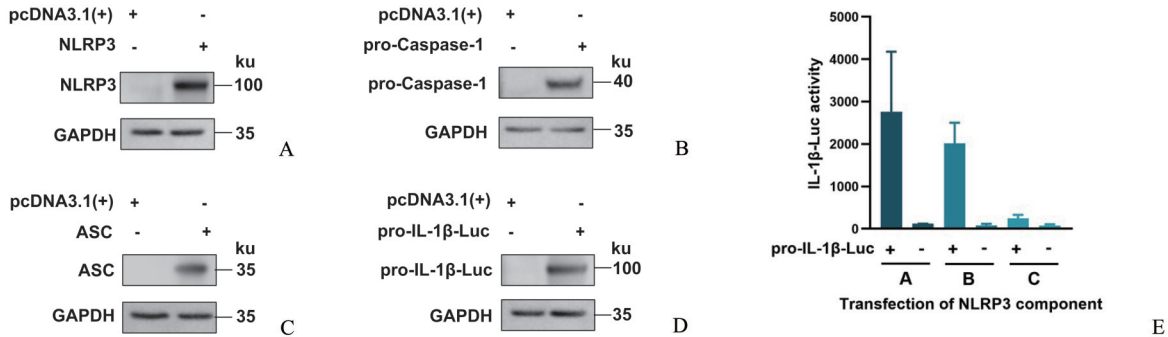
2 结果

2.1 NLRP3 炎症小体筛选体系的构建与优化

将 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、pro-IL-1 β -Luc 以及空载质粒分别转染至 HEK293T 细胞中,48 h 后提取细胞总蛋白,通过 WB 检测炎症小体各元件的表达情况,结果表明各质粒对应的蛋白均成功表达(图 1 A-D)。为了有效检测细胞上清液中成熟 IL-1 β -Luc 的分泌,我们对 NLRP3 炎症小体信

号筛选体系各组分的转染比例进行了优化,结果显示,A组细胞上清中IL-1 β -Luc的分泌量最高(图1E),而未加入IL-1 β -Luc的对照组中,均未检测到

IL-1 β -Luc的分泌(图1E)。因此本研究选用A组转染比例进行了后续NLRP3炎症小体信号调控蛋白的筛选。



A-D: The expression of each component in the NLRP3 inflammasome signal screening system. E: Detection of secreted IL-1 β -Luc after transfecting NLRP3 inflammasome signal screening system plasmids in different proportions.

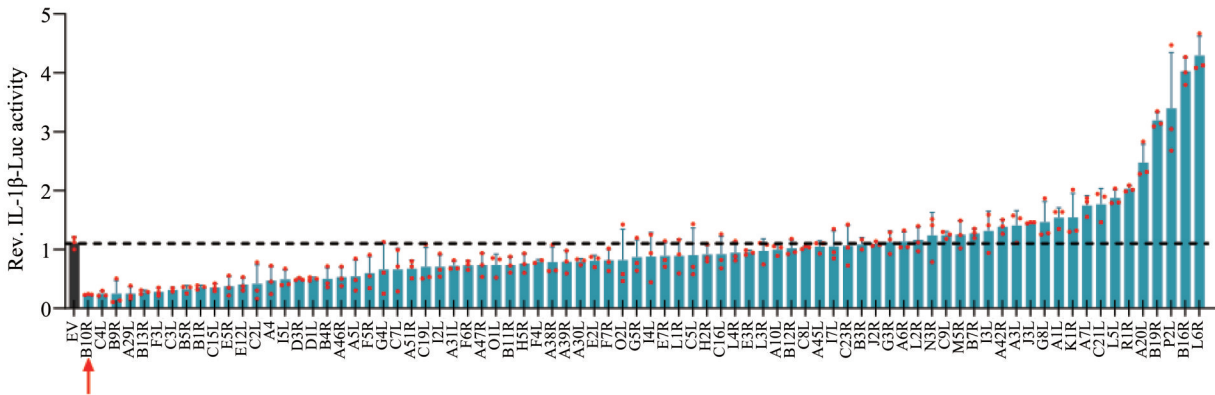
图1 NLRP3炎症小体信号筛选体系的构建与优化

Fig. 1 Construction and optimization of the NLRP3 inflammasome signal screening system

2.2 MPXV抑制NLRP3炎症小体信号关键蛋白的筛选

本实验室以分离纯化的近期国内MPXV流行毒株基因组(广州医科大学附属市八医院刘林娜教授惠赠)为模板,构建了可能具有炎症调控功能的

病毒基因表达质粒共82个,以此为基因库筛选明显抑制NLRP3炎症小体信号的病毒蛋白。结果表明MPXV B10R抑制IL-1 β -Luc产生最为明显(图2)。



NLRP3 inflammasome signal screening system plasmids and MPXV viral expression plasmids (82 in total) were co-transfected in HEK293T cell, and luciferase levels in cell supernatant were detected after 48 hours transfection, $n=3$. The levels of luciferase activity show the effect of the viral protein on the NLRP3 inflammasome signal screening system. B10R ($P < 0.0001$).

图2 MPXV抑制NLRP3炎症小体信号关键蛋白的筛选

Fig. 2 Screening of the MPXV key proteins inhibit NLRP3 inflammasome signal

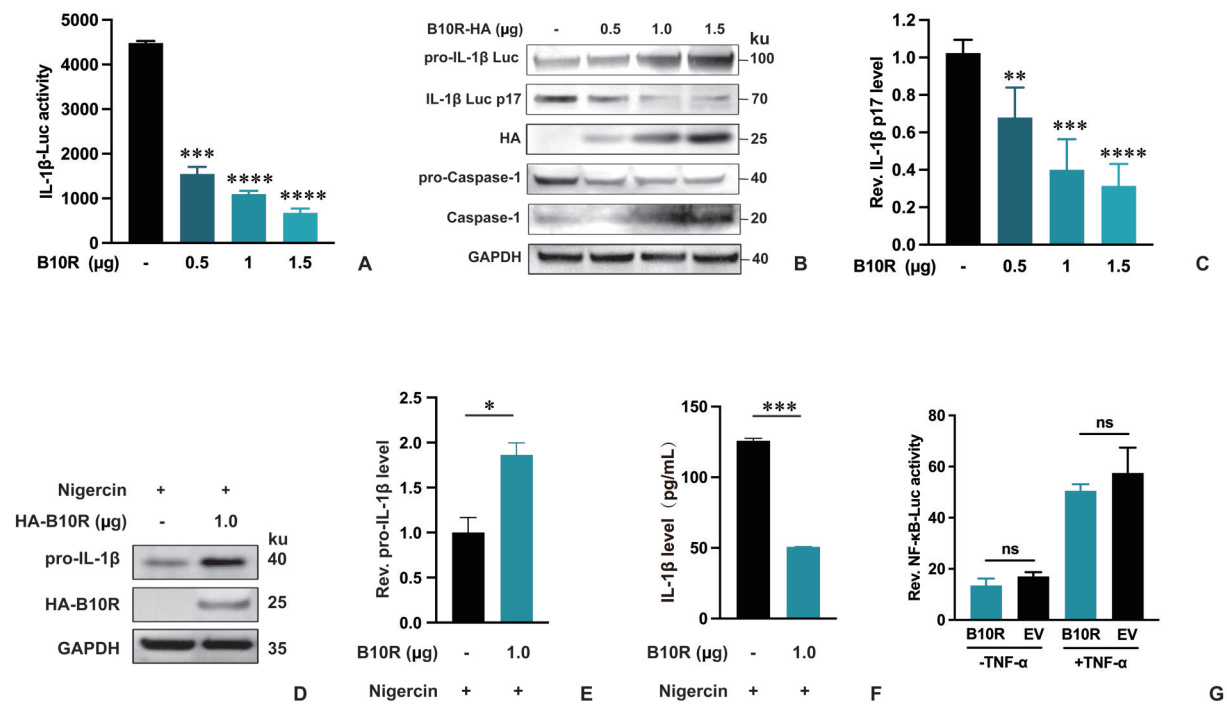
2.3 MPXV B10R抑制成熟IL-1 β 释放的进一步鉴定

为了验证MPXV B10R对成熟IL-1 β 释放的抑制作用,本研究将不同量的B10R梯度转染HEK293T细胞,转染48h后对细胞上清进行荧光

素酶活性检测。结果显示,B10R明显抑制了IL-1 β -Luc的释放,且呈现剂量依赖性(图3A)。通过WB检测发现,随着B10R表达量的增多,pro-Caspase-1的丰度逐渐减少,成熟Caspase-1丰度逐渐增加,IL-1 β -Luc的丰度逐渐增多,而成熟IL-1 β -Luc的

丰度逐渐下降,且表现出剂量依赖性(图3B,C),这说明B10R的表达对Caspase-1的活化有一定的促进作用,导致pro-IL-1 β -Luc的胞内积累,同时抑制了成熟IL-1 β -Luc的释放。为了验证B10R对细胞内源性IL-1 β 成熟的影响,将B10R转染至THP-1细胞中。WB结果显示,在尼日利亚菌素刺激条件下,pro-IL-1 β 明显发生了累积;而ELISA检测结果

显示IL-1 β 的水平明显降低(图3D,F)。NF- κ B是pro-IL-1 β 合成的重要调控信号,因此本研究进一步鉴定了B10R对NF- κ B活性的影响。双荧光素酶检测数据显示,B10R的表达对NF- κ B的活性没有产生影响(图3G)。这些结果表明,B10R的表达促进了pro-IL-1 β 的累积,抑制了IL-1 β 的成熟,而这种抑制作用并不是通过调控NF- κ B信号实现的。



A: NLRP3 inflammasome system plasmids and monkeypox virus protein B10R were co-transfected, then the luciferase levels in cell supernatant were detected 48 hours after transfection, the levels of luciferase activity decrease as the amount of B10R increase, $n=3$. Analysis of variance (ANOVA) reveals a statistically significant difference among the four groups ($F=9.210$, $P=0.0148$). Pairwise comparisons using the t -test method show that the differences between the B10R transfection groups and the negative control group are all statistically significant, specifically: when transfected with $0.5 \mu\text{g}$ ($P=0.0004$), $1.0 \mu\text{g}$ ($P<0.0001$), and $1.5 \mu\text{g}$ ($P<0.0001$) of B10R. B: The cell lysates for WB were collected. C: Significant difference analysis of WB results, $n=6$. Analysis of variance (ANOVA) reveals a statistically significant difference among the four groups ($F=3.695$, $P=0.0222$). Pairwise comparisons using the t -test method show that the differences between the B10R transfection groups and the negative control group are all statistically significant, specifically: when transfected with $0.5 \mu\text{g}$ ($P=0.0004$), $1.0 \mu\text{g}$ ($P=0.0003$), and $1.5 \mu\text{g}$ ($P<0.0001$) of B10R. D-F: B10R-HA plasmid were transfected into PMA stimulated THP-1 cells for 24 h, cells for WB and cell culture for IL-1 β ELISA tests were collected, $n=3$. G: NF- κ B-Luc plasmid, Renilla-Luc plasmid and B10R/EV were co-transfected. After 40 hours after transfection, TNF- α was added to a final concentration at $10 \mu\text{mol/L}$, stimulating for 8 hours, then cells for Dual luciferase test were collected, $n=3$. Pairwise comparisons using the t -test method show that the differences between the B10R transfection group and the negative control group are not statistically significant, specifically: when TNF- α was not added ($P=0.1436$) and when TNF- α was added ($P=0.2629$).

图3 MPXV B10R明显抑制了IL-1 β 的成熟

Fig. 3 MPXV B10R significantly inhibits the IL-1 β maturation

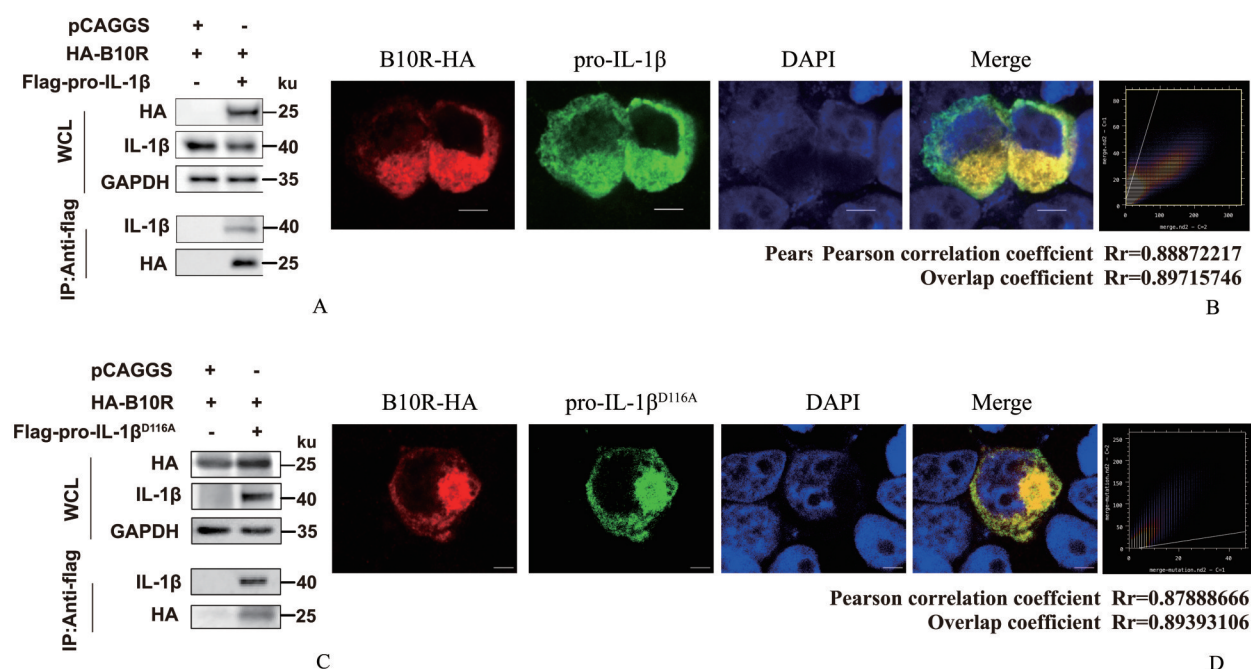
2.4 MPXV B10R与pro-IL-1 β 存在相互作用

为明确MPXV B10R抑制IL-1 β 成熟的分子机制,本研究通过Co-IP探索了B10R与NLRP3炎症

小体中各组分的相互作用。实验结果表明,B10R能够与pro-IL-1 β 结合(图4A),而与NLRP3、ASC、pro-Caspase-1未检测到相互作用(结果未展示)。

为进一步验证 B10R 与 pro-IL-1 β 的结合,进行了细胞免疫荧光共定位实验。结果显示,B10R 与 pro-IL-1 β 共定位于胞质中(图 4B)。这些结果表明,B10R 能够与 pro-IL-1 β 蛋白相互作用。IL-1 β 的成熟依赖其前体第 116 位天冬氨酸被 Caspase-1 的识别和切割,为了验证该位点是否影响 B10R 与

pro-IL-1 β 的相互作用,构建了 pro-IL-1 β ^{D116A} 突变体。实验结果显示,B10R 仍能够与 pro-IL-1 β ^{D116A} 结合,且共定位情况仍然存在(图 4C, D)。这些结果表明,B10R 与 pro-IL-1 β 存在相互作用,这与 pro-IL-1 β 的切割位点无关。



A: IL-1 β was co-transfected with B10R, cell lysates for Co-Immunoprecipitation (Co-IP) were collected after 48 hours of transfection, then samples for WB were prepared. B: B10R co-localizes with IL-1 β . HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing B10R and IL-1 β . Indirect immunofluorescence staining was performed using specific antibodies against B10R (red) and IL-1 β (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The merged image demonstrates significant cytoplasmic co-localization of B10R and IL-1 β , as indicated by the yellow signal. Scale bar: 5 μ m. C: Co-transfected IL-1 β ^{D116A} with B10R, collected cell lysate for Co-Immunoprecipitation (Co-IP) after 48 hours of transfection, then prepare samples for WB. D: B10R co-localizes with IL-1 β ^{D116A}. HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing B10R and IL-1 β ^{D116A}. Indirect immunofluorescence staining was performed using specific antibodies against B10R (red) and IL-1 β (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The merged image demonstrates significant cytoplasmic co-localization of B10R and IL-1 β ^{D116A}, as indicated by the yellow signal. Scale bar: 5 μ m.

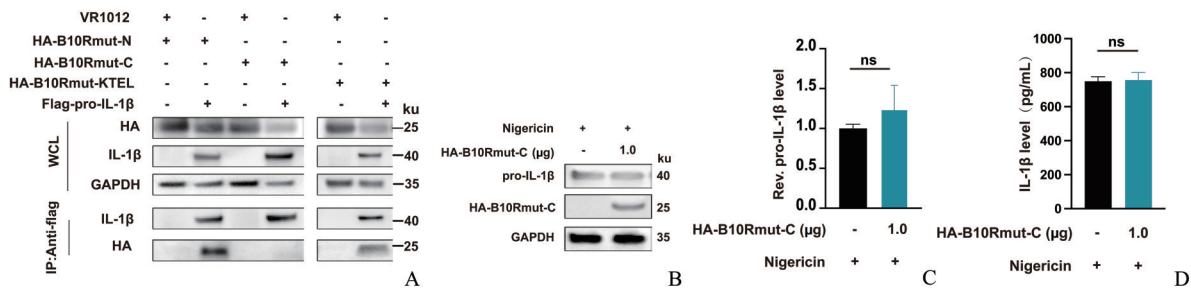
图4 MPXV B10R与IL-1 β 存在相互作用

Fig. 4 MPXV B10R interacts with IL-1 β

2.5 MPXV B10R的C端基序是抑制IL-1 β 成熟的关键

B10R具有痘病毒T4蛋白的特征性结构域,即N端序列(29-76位氨基酸)、C端序列(80-210位氨基酸)和C末端的KTEL序列(Uniprot: Q8V4R8)。由于B10R蛋白较小(25 ku),构建截短突变体的检测较为困难,为了鉴定B10R抑制IL-1 β 成熟的功能基序,我们对B10R的结构进行了预测和分析(网站Dynamut2等),筛选了暴露在结构表面且突变最有可能引发结构变化的基序,设计了B10Rmut-N(D49A, S49A)和B10Rmut-C(T96A, Y97A, I98A)

突变质粒。KTEL为内质网定位的信号序列,因此也设计了B10Rmut-KTEL(K217A, T218A, E219A, L220A)突变质粒。Co-IP鉴定结果显示,只有B10Rmut-C失去了与pro-IL-1 β 的相互作用(图5A)。为了验证B10Rmut-C对IL-1 β 成熟的影响,转染B10Rmut-C质粒到THP-1人单核细胞中,WB结果显示,在尼日利亚菌素刺激下,B10Rmut-C不再引起pro-IL-1 β 的胞内积累,上清中IL-1 β 的水平也无变化(图5B-D)。这些结果表明,B10R的C端基序(T96, Y97, I98)在介导与pro-IL-1 β 相互作用并抑制IL-1 β 成熟的过程中起到了关键作用。



A: IL-1 β with B10R mutants were co-transfected, cell lysates for Co-Immunoprecipitation (Co-IP) were collected after 48 hours of transfection, then samples for WB were prepared. B-D: B10R plasmids were transfected into PMA stimulated THP-1 cells for 24 h, cells for WB and cell culture for IL-1 β ELISA tests were collected, $n=3$.

图5 MPXV B10R C端基序是与pro-IL-1 β 互作的关键区域

Fig. 5 MPXV B10R C terminal motif is the key area that interacts with pro-IL-1 β

3 讨论

近年来猴痘疫情的暴发使得该病成为了全球关注的重要疫病之一。MPXV是一种核质双链大DNA病毒,其结构复杂,编码蛋白众多,目前人们对该病毒的感染与免疫逃逸机制仍然知之甚少。炎症小体是天然免疫系统的重要组成部分,可以识别细胞应激和感染^[16-17]。而炎症小体级联信号的失衡是病毒逃避宿主免疫监视的关键策略。已有报道显示,一些DNA病毒通过抑制NLRP3炎症小体的活化下调促炎细胞因子的表达。如人类疱疹病毒8型编码的ORF63蛋白可以与NLRP3相互作用,并抑制不同NLRP3激动剂诱导的THP-1细胞炎症小体的活化^[18]。Epstein-Barr病毒(EBV)编码的miR-BART15可以靶向NLRP3 mRNA的3'非翻译区的转录后效应,从而控制NLRP3水平,并随后控制炎症小体依赖的信号^[19]。一种痘病毒——黏液瘤病毒编码的pyrin结构域蛋白能够与ASC-1相互作用并抑制其功能,进而抑制宿主NLRP3炎症小体介导的炎症免疫反应^[20]。非洲猪瘟病毒编码的pB318L蛋白能够通过抑制NF- κ B激活和NLRP3炎症小体的形成来抑制炎症反应,从而促进病毒的复制^[21]。本研究以MPXV对NLRP3炎症小体的调控为切入点,参考广泛使用的体外NLRP3炎症小体信号筛选体系^[22],对MPXV编码蛋白的质粒库进行了系统性的筛选,获得了很多具有调控NLRP3炎症小体信号的病毒蛋白,这为进一步研究MPXV调控炎症的分子机制提供了思路。

本研究利用荧光素酶报告基因筛选系统,发现MPXV B10R蛋白能够显著抑制成熟IL-1 β 的生

成。从结构上看,B10R蛋白具有痘病毒T4蛋白的N端序列、C端序列和C末端KTEL序列(Uniprot: Q8V4R8)。M-T4蛋白是黏液瘤病毒(myxoma virus, MV)有效感染淋巴细胞所必需的分子,该蛋白能够与宿主细胞的钙网蛋白共定位,表明M-T4保留在内质网中^[23]。但从M-T4中去除RDEL基序并不影响该蛋白在内质网中的定位,只是降低了突变蛋白的稳定性,提示C末端RDEL基序不是M-T4定位到内质网的唯一决定因素^[23]。M-T4基因缺失病毒的动物感染实验显示,该蛋白可能具有保护感染淋巴细胞免于凋亡和调节病毒感染的炎症反应的双重功能^[24]。本研究发现,MPXV B10R蛋白能够通过直接与pro-IL-1 β 直接相互作用,进而阻碍IL-1 β 的成熟和验证反应信号的发生。由于B10R蛋白分子质量较小,通过截短鉴定关键作用的功能结构域较为困难,因此本研究采用软件分析结合位点突变的方式对关键作用基序进行初步鉴定。结果显示,B10R-C端基序(T96, Y97, I98)的突变导致其无法结合pro-IL-1 β 并失去了抑制成熟IL-1 β 分泌的作用,说明该基序是B10R调控IL-1 β 成熟的关键。软件分析显示,该基序很可能在维持B10R蛋白结构上起到了重要作用,因此推测其突变体可能是由于蛋白构象的改变导致其失去了调控IL-1 β 成熟的作用。

抑制IL-1 β 成熟和分泌是病毒调控宿主炎症反应、实现胞内持续复制的关键机制之一。该机制涵盖了直接靶向pro-IL-1 β 的竞争性抑制,以及间接作用于Caspase-1或炎症小体组装的上游信号,其中间接作用是当前发现的主流策略。如牛痘病毒CrmA与黏液瘤病毒Serp2,二者均属于丝氨酸蛋

白酶抑制剂超家族,可通过其特有的抑制结构域与 Caspase-1 的催化活性中心形成不可逆结合,使 Caspase-1 丧失对 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 等底物的切割能力^[25-26];再如单纯疱疹 1 型(HSV-1)编码的 ICP27 蛋白,它能够结合 IKK β ,进而抑制 NF- κ B 活性,ICP27 缺失突变毒株感染的巨噬细胞中,NF- κ B 活性显著增强,pro-IL-1 β 和 NLRP3 的表达水平明显升高,Caspase-1 的活化与切割效率也显著增加^[27]。病毒通过间接调控 IL-1 β 成熟的机制具有作用效率高、调控范围广的特点,且在多种病毒中高度保守。本研究鉴定了 MPXV B10R 蛋白与 NLRP3 炎症小体各组成蛋白的相互作用,结果显示,B10R 只能够与 pro-IL-1 β 发生特异性结合。而对炎症上游 NF- κ B 信号通路的鉴定结果显示,B10R 的表达并未影响 NF- κ B 的活性,可见 B10R 对 IL-1 β 成熟的调控并不是通过间接作用,而是通过直接与 pro-IL-1 β 相互作用实现的。

Caspase-1 对 pro-IL-1 β 的切割具有严格的底物识别特异性,其结合与催化依赖对 pro-IL-1 β 上保守天冬氨酸(D116)切割位点及周边基序的精准识别,该位点的突变会直接破坏 Caspase-1 结合靶点的局部空间构象,导致无法形成稳定的酶-底物复合物,也就无法完成肽键的切割。病毒蛋白与 pro-IL-1 β 的结合位点也有多紧邻 Caspase-1 切割位点的,这种结合便于其发挥竞争性抑制切割的作用。如塞内卡病毒(Seneca Valley virus) 3C 蛋白结合 pro-IL-1 β 的位点为 LQ,该基序位于 Caspase-1 切割位点的上游侧翼区域,当 Caspase-1 切割位点发生突变时,与 Caspase-1 和病毒蛋白的双重相互作用都会同时受到影响^[28]。本研究中,pro-IL-1 β 的 D116 位点突变后,B10R 与 pro-IL-1 β 的相互作用依然存在,这表明 B10R 抑制 pro-IL-1 β 切割作用或许并非是通过竞争性抑制切割位点来实现的。推测 B10R 是结合在 pro-IL-1 β 的某个特定结构域,进而通过变构效应、修饰障碍、空间位阻等影响了 pro-

IL-1 β D116 位点所处的微环境,使其不易被 Caspase-1 接近或识别,从而实现抑制切割功能。此前有文献报道,pro-IL-1 β 中第 133 位的赖氨酸(K133)的泛素化修饰及其与第 129 位天冬氨酸(D129)形成的盐桥相互作用,对于维持 pro-IL-1 β 的稳定性及其对 Caspase-1 切割的敏感性具有关键调控作用^[29]。K133 位点的缺失或 K133:D129 静电相互作用的破坏,都能使 pro-IL-1 β 构象更趋稳定,从而抵抗切割。这为我们进一步研究 B10R 的抑制切割机制提供了新的视角,即 B10R 与 pro-IL-1 β 的结合是否是通过直接或间接地稳定了 K133:D129 这一关键的盐桥结构,或者影响了 K133 附近的构象,从而在更上游的环节“锁定”了 pro-IL-1 β ,使其难以被 Caspase-1 加工。当然,B10R 是否以及如何影响 pro-IL-1 β 的翻译后修饰(如泛素化)及其结构,这为我们进一步研究 B10R 的抑制切割机制提供了线索。

基于以上分析,本研究初步揭示了猴痘病毒 B10R 调控宿主天然免疫的分子策略,更加引出了一系列待解答的、具有重要科学价值的机制问题。未来研究的核心方向应该是在更接近生理状态的病毒感染模型中精确鉴定 B10R 与 pro-IL-1 β 的相互作用,以及所必需的关键氨基酸,解析 B10R 与 pro-IL-1 β 复合物的三维结构,从而清晰展示 B10R 的结合表位,同时对炎症小体激活全流程进行系统性筛查,明确 B10R 是否也会干预炎症小体激活的其他步骤。总之,本研究为阐明病毒调控宿主炎症的分子策略提供了新的线索。通过后续对 B10R 与 pro-IL-1 β 互作界面的验证、复合物结构的解析及其在炎症小体信号网络中功能的系统性探究,有望全面解析一种病毒调控 IL-1 β 成熟的新型机制。这不仅能够加深我们对痘病毒与宿主相互作用的理解,也可能为开发针对炎症反应的治疗策略提供新的靶点与思路。

参考文献

- [1] Hraib M, Jouni S, Albitar MM, et al. The outbreak of monkeypox 2022: an overview [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2022, 79: 104069.
 - [2] Alakunle EF, Okeke MI. Monkeypox virus: a neglected zoonotic pathogen spreads globally [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(9): 507-508.
 - [3] 周建,任雪梅,王馨,等.猴痘病毒实验室检测技术研究进展 [J]. *重庆医科大学学报*, 2024, 49(11): 1367-1371.
- Zhou J, Ren XM, Wang X, et al. Research advances in laboratory detection techniques for monkeypox virus [J]. *J*

- Chongqing Med Univ, 2024, 49(11): 1367–1371.
- [4] Sepehrinezhad A, Ashayeri AR, Sahab-Negah S. Monkeypox virus from neurological complications to neuroinvasive properties: status and future perspectives[J]. *J Neurol*, 2023, 270(1): 101–108.
- [5] Rahman MM, McFadden G. Role of cytokines in poxvirus host tropism and adaptation [J]. *Curr Opin Virol*, 2022, 57: 101286.
- [6] Chathuranga K, Weerawardhana A, Dodantenna N, et al. Regulation of antiviral innate immune signaling and viral evasion following viral genomes sensing [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(11): 1647–1668.
- [7] Boys IN, Johnson AG, Quinlan MR, et al. Structural homology screens reveal host-derived poxvirus protein families impacting inflammasome activity[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(8): 112878.
- [8] Yu H, Bruneau RC, Brennan G, et al. Battle royale: innate recognition of poxviruses and viral immune evasion [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(7): 765.
- [9] Gerlic M, Faustin B, Postigo A, et al. Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(19): 7808–7813.
- [10] Born TL, Morrison LA, Esteban DJ, et al. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18 and inhibits NK cell response[J]. *J Immunol*, 2000, 164(6): 3246–3254.
- [11] Spriggs MK, Hruby DE, Maliszewski CR, et al. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein[J]. *Cell*, 1992, 71(1): 145–152.
- [12] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspase-1 and processing of pro-IL-1 β [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2): 417–426.
- [13] Yu JW, Lee MS. Mitochondria and the NLRP3 inflammasome: physiological and pathological relevance [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(11): 1503–1518.
- [14] Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114–2127.
- [15] Xu J, Nunez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48(4): 331–344.
- [16] Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(7): 387–400.
- [17] Mangan M, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(8): 588–606.
- [18] Gregory SM, Davis BK, West JA, et al. Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome [J]. *Science*, 2011, 331(6015): 330–334.
- [19] Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, et al. Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production [J]. *J Immunol*, 2012, 189(8): 3795–3799.
- [20] Johnston JB, Barrett JW, Nazarian SH, et al. A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection [J]. *Immunity*, 2005, 23(6): 587–598.
- [21] Liu X, Ye G, Zeng Y, et al. African swine fever virus pB318L suppresses inflammatory response by inhibiting NF- κ B activation and NLRP3 inflammasome formation [J]. *PLoS Pathog*, 2025, 21(10): e1013558.
- [22] Pan P, Shen M, Yu Z, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4664.
- [23] Barry M, Hnatiuk S, Mossman K, et al. The myxoma virus M-T4 gene encodes a novel RDEL-containing protein that is retained within the endoplasmic reticulum and is important for the productive infection of lymphocytes [J]. *Virology*, 1997, 239(2): 360–377.
- [24] Hnatiuk S, Barry M, Zeng W, et al. Role of the C-terminal RDEL motif of the myxoma virus M-T4 protein in terms of apoptosis regulation and viral pathogenesis [J]. *Virology*, 1999, 263(2): 290–306.
- [25] Ray CA, Black RA, Kronheim SR, et al. Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA [J]. *Cell*, 1992, 69(4): 597–604.
- [26] Turner PC, Sancho MC, Thoennes SR, et al. Myxoma virus Serp2 is a weak inhibitor of granzyme B and interleukin-1 β -converting enzyme in vitro and unlike CrmA cannot block apoptosis in cowpox virus-infected cells [J]. *J Virol*, 1999, 73(8): 6394–6404.
- [27] Zhou Y, Wang X, Zhang L, et al. HSV-1 ICP27 represses NF- κ B activity by regulating Daxx sumoylation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1–12.
- [28] Yan Y, et al. Species-specific IL-1 β is an inflammatory sensor of Seneca valley virus 3C protease [J]. *PLoS Pathog*, 2024, 20(8): e1012398.
- [29] Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, et al. Mutation of a new gene encoding a putative-pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and muckle-wells syndrome [J]. *Nat Genet*, 2001, 29(3): 301–305.

(编辑 孙慧兰)