

鲍诗骏, 陈彦直, 朱勇喆. ADP 核糖基化因子 6 在病原体感染中的作用 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 122-129.

BAO S J, CHEN Y Z, ZHU Y Z. The function of ADP ribosylation factor 6 in pathogen infection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 122-129.

ADP 核糖基化因子 6 在病原体感染中的作用

鲍诗骏^{1#}, 陈彦直^{2#}, 朱勇喆^{1*}

(1. 海军军医大学海军医学系, 上海 200433;

2. 重庆医科大学国际医学院, 重庆 401334)

摘要: ADP 核糖基化因子 6 (ADP ribosylation factor 6, Arf6) 是 Ras 超家族中的一个小分子 GTP 结合蛋白, 属于 Arf 亚家族成员, 在哺乳动物细胞中广泛表达, 是一种广泛参与分泌、内吞、吞噬、囊泡运输、细胞黏附、胞质分裂以及癌细胞侵袭等基本生物学过程的胞内调节因子。近年来发现 Arf6 参与了多种病原体的感染过程, 因此, 深入研究 Arf6 在细菌、病毒和胞内寄生虫感染中的功能和调控机制, 对于揭示病原体与宿主相互作用的机制以及发现新的病原体治疗干预靶点具有重要意义。本文介绍了 Arf6 的结构和功能, 并对 Arf6 在病原体感染中所发挥的功能与调控机制作一综述。

关键词: ADP 核糖基化因子 6; 病原体感染; 调控; 免疫逃逸

中图分类号: S865.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)10-0122-08

The function of ADP ribosylation factor 6 in pathogen infection

BAO Shijun^{1#}, CHEN Yanzhi^{2#}, ZHU Yongzhe^{1*}

(1. Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433, China;

2. International Medical College, Chongqing Medical University, Chongqing 401334, China)

Abstract: ADP ribosylation factor 6 (Arf6) is a small GTP-binding protein in the Ras superfamily, a member of the Arf subfamily, which shows universal expression in mammalian cells. It serves as an intracellular regulator involved in fundamental biological processes such as secretion, endocytosis, phagocytosis, vesicle transport, cell adhesion, cytoplasmic division and cancer cell invasion. In recent years, it has been found that Arf6 is involved in various pathogen infection processes; therefore, it is of great significance to elucidate the mechanism of the pathogen-host interaction of Arf6 and to explore its new therapeutic intervention targets by revealing its function in multitudinous species of pathogens. Here, we have introduced the structure and function of Arf6 and have reviewed its role and regulation mechanism during pathogen infection.

Keywords: ADP ribosylation factor 6; pathogen infection; immune escape

在对霍乱毒素的研究中, 人们发现了一种能够对霍乱毒素的异源三聚体 G 蛋白的 α -亚基的 ADP 核糖基化起到辅助作用的因子, 故命名为 ADP 核糖基化因子 (ADP ribosylation factor, Arf)。Arf 蛋白家族在序列和结构上属于 Ras 超家族成员, 是一类大小约 20 kDa 的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白。根据氨基酸序列的同源性, 6 种哺乳动物 Arf 蛋白可被分为三类: I 类 (Arf1~3)、II 类 (Arf4~5) 和 III 类 (Arf6)。它们的共同结构是在其 N 末端延伸了约 14 个氨基酸,

具有螺旋结构及肉豆蔻酰基化的共价修饰, 这有助于提高蛋白质的活性及其与膜的结合能力。Arf6 是唯一的 III 类成员, 具有独特的功能^[1]。

Arf6 不仅在调节膜转运通路中发挥重要作用, 还参与许多病原体的致病过程。本文就 Arf6 在病原体感染中的作用作一综述, 并对进一步研究和应用作出展望。

1 Arf6 的结构与功能

1.1 Arf6 的结构

Arf6 在生物进化中高度保守, 在 N 末端第 2 位的甘氨酸作为十四烷基化位点是特征性结构, 并且含有与 GTP 结合的结构域。Arf6 位于细胞质膜和内体膜上, 其活性主要依赖于与鸟嘌呤三核苷酸磷酸 (guanine trinucleotide phosphate, GTP) 或鸟嘌呤二核

收稿日期: 2023-08-28; 修回日期: 2024-08-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770187)

第一作者: 鲍诗骏, 男, 硕士研究生; 陈彦直, 男, 本科生。[#]共同第一作者

* 通信作者: 朱勇喆, 副教授, 主要从事病毒致病机理方面的研究, E-mail: zhuyongzhe1984@sina.com。

苷酸磷酸 (guanine dinucleotide phosphate, GDP) 结合的转换, 与 GTP 结合时保持激活状态, 而与 GDP 结合时则表现为失活状态^[2]。Arf6 发挥功能需要正确地在 Arf6-GTP/GDP 中转换, 所以许多 Arf6 介导的过程依赖于 Arf6-GTP/GDP 的循环, 而不仅是 Arf6-GTP 形式^[3]。Arf6 含有与 GTP 结合 (DVGG、NKQD 和 CAT) 以及 GTP 解离 (GXXXXGKT) 相关的特征序列^[4], 这些序列决定了 Arf6 的 GTP/GDP 结合结构域: N 末端含有一个 α 螺旋, 并且都具有 2 个相同的效应结构域 Switch1 与 Switch2, 二者之间有 2 个 β 折叠结构连接, 称为 inter-switch。当 N 末端的 α 螺旋发生延伸, inter-switch 区域中的 2 个氨基酸残基随之移动, 进而实现了 Arf6 由非活性构象向活性构象的转换^[5-6]。Arf6 的激活和失活分别受鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 和 GTPase 激活蛋白 (GTPase-activating proteins, GAP) 调控^[7]。

1.2 Arf6 的功能

Arf 家族中其他成员均位于细胞质中, 仅有 Arf6 特异性地定位于质膜和内体膜上, 其定位与 Arf6 作为分泌、内吞、吞噬、囊泡运输等细胞膜活动的重要调节因子有关。Arf6 可以直接激活磷酸肌醇-4-磷酸-5-激酶 (phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase, PIP5K), 生成磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, PIP₂)^[8]。PIP₂ 在内吞、吞噬、肌动蛋白聚合、囊泡运输中发挥重要作用。Arf6 还参与多种细胞货物分泌, 例如葡萄糖转运体 4 型 (glucose transporter type 4, GLUT4), 突触囊泡和胃酸等^[9-11]; Arf6 也可以在细胞黏附、胞质分裂等细胞活动中作为胞内调节因子发挥作用^[12-13]。此外, 近年来还发现 Arf6 在中性粒细胞能量代谢^[14], 肿瘤细胞侵袭、迁移及增殖^[15], 神经轴突再生^[16]以及肿瘤细胞耐药性^[17]等事件中扮演重要角色。

2 Arf6 在病原体感染中的作用

Arf6 在病原体感染过程中通过多种途径发挥作用, 包括: 1) 通过调节宿主细胞质膜上的肌动蛋白聚合, 加快病原体内吞进入宿主细胞; 2) 通过抑制吞噬细胞对病原体或其组分的吞噬作用, 减少机体免疫应答, 协助病原体免疫逃逸; 3) 通过重定位囊泡, 将宿主细胞的病原体或其组分阻隔于囊泡中而无法释放 (或是无法组装), 进而抑制病原体增殖; 4) 通过将白细胞分化抗原 59 (CD59)、主要组织相容性复合体 1 型 (major histocompatibility complex-1, MHC-1) 等免疫相关膜表面蛋白内化形成核内体,

抑制免疫 T 细胞的功能, 减少宿主对病原体的免疫反应; 5) 在病原体营养获取中发挥作用; 6) 参与抑制胞质分裂, 延缓感染细胞更替, 稳定病原体复制生态位。

2.1 病毒感染

2.1.1 人免疫缺陷病毒

人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 又称艾滋病病毒, 是造成人类免疫系统缺陷的一种逆转录病毒。Arf6 参与 HIV-1 感染的多个阶段, 包括病毒入侵、组装、释放以及免疫逃逸^[18]。

CD4⁺ T 淋巴细胞数目减少是 HIV-1 感染的关键标志^[19]。在入侵阶段, HIV-1 的外膜糖蛋白 gp120 与 T 细胞 CD4 高亲和力结合, 启动了病毒内吞^[20]。有研究发现, 采用荧光素酶标记的复制缺陷 HIV-1 病毒颗粒进行感染, Arf6 抑制会阻断 CD4 依赖性的病毒内吞, 在全内反射荧光显微镜下可以观察到, HIV-1 病毒可以正常吸附于淋巴细胞表面, 但进入细胞的病毒数量减少^[21]。同时, Arf6 抑制还减弱了原代人 CD4⁺ T 淋巴细胞间 HIV-1 的传播。但 HIV-1 感染胎盘滋养层细胞却不依赖 Arf6^[22]。这表明 Arf6 介导 HIV-1 的内吞与细胞种类有关。

Arf6 能够影响 HIV-1 的病毒组装。HIV-1 的结构蛋白 Gag 可以与病毒的基因组 RNA (genomeRNA, gRNA) 结合, 靶向定位于质膜, 最终组装形成病毒颗粒。研究表明在 HIV-1 复制的组装过程中, 质膜上的 PIP₂ 含量升高, Gag 蛋白随之定位在质膜上, 这表明 PIP₂ 决定了 Gag 蛋白的靶向定位^[18]。将正常 Arf6 蛋白第 67 位的谷氨酰胺突变为亮氨酸可得到 Arf6-Q67L, 这是一种 Arf6 持续激活突变体 (constitutively active Arf6 mutant), 可表达出始终保持 GTP 结合形式且不具有 GTPase 活性的 Arf6 蛋白。转染了 Arf6-Q67L 的细胞内出现许多富含 PIP₂ 的囊泡, 导致 Gag 蛋白错误地定位到这些囊泡中, 组装过程错误地在这些囊泡中进行, 从而阻碍了病毒释放的过程。然而, 在 Gag 蛋白缺失突变体中, 转染 Arf6-Q67L 对病毒释放的影响大大减少, 这排除了 Arf6-Q67L 因整体细胞毒性而减少病毒释放的可能。

Arf6 还参与了 HIV-1 的免疫逃逸。MHC-I 是细胞抗原呈递的关键分子之一, 能够结合胞内病原体肽段形成 MHC-抗原复合体, 并在膜表面供 T 细胞识别。研究发现 HIV-1 感染细胞后, 其 Nef 蛋白激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K), PI3K 通过招募 Arf 核苷酸结合位点开放子 (Arf nucleotide binding site opener, ARNO) 激活 Arf6。Arf6 激活后促进细胞表面的 MHC-I 分子内吞, 向胞内反式高尔基体网状结构转运, 导致细胞膜表面的

MHC-I 数量减少, 从而阻碍了 T 细胞识别并杀伤受感染细胞^[23]。Arf6 在 HIV-1 感染过程中的作用如图 1 所示, Arf6 在 HIV-1 入侵环节抑制 CD4⁺ 与 gp120

介导的内吞, 在病毒组装与释放环节通过诱导 PIP₂ 囊泡使 Gag 蛋白错误定位, 在免疫呈递环节介导 MHC-I 从膜上向胞内反式高尔基体运输。

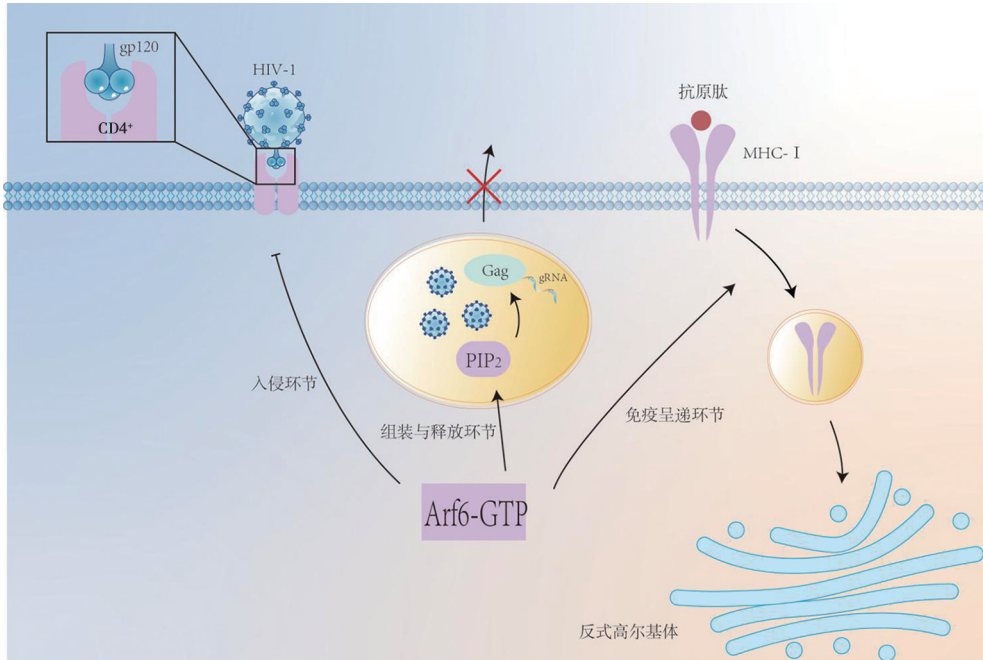


图 1 Arf6 在 HIV-1 感染过程中的作用

2.1.2 柯萨奇病毒与肠道病毒 71 型

柯萨奇病毒 (Coxsackie virus, CV) 与肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 是引起手足口病的主要病原, 均属于微 RNA 病毒科肠道病毒属。CV 主要通过粪-口途径传播, 根据其对小鼠致病的性质被分为 CVA 组和 CVB 组^[24]。

Arf6 在不同亚型 CV 感染中的作用不同。Arf6 能够促进 CVA9 感染。Arf6-T27N 是一种 Arf6 显性抑制体 (dominant negative Arf6 mutant), 可表达出缺乏核苷酸结合能力的 Arf6 蛋白, 其生理功能与 Arf6-GDP 相仿。Heikkilä 等^[25] 发现过表达 Arf6-T27N 会导致 CVA9 感染率降低, 而使用特异性 siRNA 降低细胞中 Arf6 的表达水平, 也能显著抑制 CVA9 的感染。然而 Arf6 则限制了 CVB3 感染。Marchant 等^[26] 研究发现在非极化的 HeLa 细胞中, 通过 Arf6 依赖的内化作用使 CVB3 错误地定位到不能繁殖的区室 (non-productive compartment) 内, 从而抑制了其感染。与野生型 HeLa 细胞相比, 过表达 Arf6 或 Arf6-Q67L 均可降低 CVB3 的感染率。

Arf6 同样能够抑制 EV71 的感染。Zhu 等^[27] 发现 Arf6 的 siRNA 转染能够显著降低人脑微血管内皮细胞对 EV71 易感性。Arf6 通过介导一种非经典的新型内吞途径来调控 EV71 的入侵, 而非网格蛋白和小窝

蛋白等经典内吞途径。

2.1.3 新型冠状病毒

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 是在 2019 年底出现一种具有高传染性和高致病性的新型冠状病毒, 能够引起 2019 冠状病毒病 (COVID-19), 导致严重的呼吸道症状。Arf6 参与了 SARS-CoV-2 的内吞过程。CD147 是新发现的 SARS-CoV-2 感染受体, SARS-CoV-2 可通过 CD147 介导的内吞作用进入宿主细胞内^[28]。Zhou 等^[29] 发现 Arf6 参与了 SARS-CoV-2 刺突蛋白-CD147 复合物介导的病毒内吞过程。以荧光素报告酶来表征病毒入侵数目, 与对照组相比, 在野生型细胞中敲除 Arf6 能显著抑制 SARS-CoV-2 假病毒的感染; 但在 CD147 敲除细胞中, 这种抑制作用消失。同时, 在荧光染色中观察到 Arf6 与 CD147 明显共定位, 随后加入 SARS-CoV-2 假病毒, 发现 Arf6、CD147 和 SARS-CoV-2 刺突蛋白三者共定位。这表明 Arf6 在刺突蛋白-CD147 介导的 SARS-CoV-2 内吞途径中发挥了重要作用。

2.2 细菌感染

细菌的毒力蛋白能够参与调节胞内信号通路, 干扰宿主细胞正常功能, 是细菌侵袭与发挥致病作用的关键。感染过程中, 细菌与细胞膜接触形成吞噬体,

通过分泌系统向胞内分泌毒力蛋白，利用 Arf6 介导的相关通路来协助内吞或免疫逃逸。

2.2.1 鼠伤寒沙门菌

鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella Typhimurium*) 是一种重要的人畜共患病原菌，是沙门菌属中引起食源性疾​​病最常见的血清型之一^[30]。研究发现鼠伤寒沙门菌在入侵宿主细胞时，会释放出毒力蛋白 SopB 与 SopE，SopB 利用 Arf6 介导的肌动蛋白聚合形成内吞体的过程协助沙门菌入胞^[31]。肌动蛋白相关蛋白质 2/3 复合物 (actin-related proteins 2/3 complex, Arp2/3 complex) 与 WAVE 调节复合物 (WAVE regulated complex, WRC) 是胞内 2 种蛋白复合体，二者的相互作用直接引发肌动蛋白聚合^[32]。WRC 只有在激活状态才能与 Arp2/3 结合，而激活 WRC 需要 Rac1-GTP 与 Arf1-GTP 协同作用。激活 ARNO 需要 2 个关键分子磷脂酰肌醇三磷酸 (phosphatidylinositol-3,

4, 5-trisphosphate, PIP₃) 与 Arf6。ARNO^{K336A} (一种不能结合 Arf6 的 ARNO 突变体) 感染沙门菌后，相较于野生型 HeLa 细胞，ARNO 的募集降低了约 46%；ARNO^{R279C} (一种不能结合 PIP₃ 的 ARNO 突变体) 感染沙门菌后，相较于野生型 HeLa 细胞，ARNO 的募集降低了约 79%；进一步使用 SopB 缺陷的沙门菌感染正常海拉细胞，相较于野生型沙门菌，宿主细胞 ARNO 募集下降约 56%。而 SopB 能够调节 PIP₃ 的生成，这表明 SopB 通过调节 PIP₃ 与 Arf6 协同作用激活 ARNO，进而激活 Arf1。同时，PIP₃ 的产生也依赖 Arf6 激活 PIP5K^[33]。此外，SopE 可直接激活 Rac1^[34]，也参与了内吞过程。鼠伤寒沙门菌利用 Arf-GPT 促进入侵的作用机制如图 2 所示，虚线框内表示 Arf6 与 PIP₃ 协同激活 ARNO，进而激活 Arf1 参与后续通路，SopB 参与 PIP₃ 的形成；Arf6 还参与了 PIP5K 的激活。

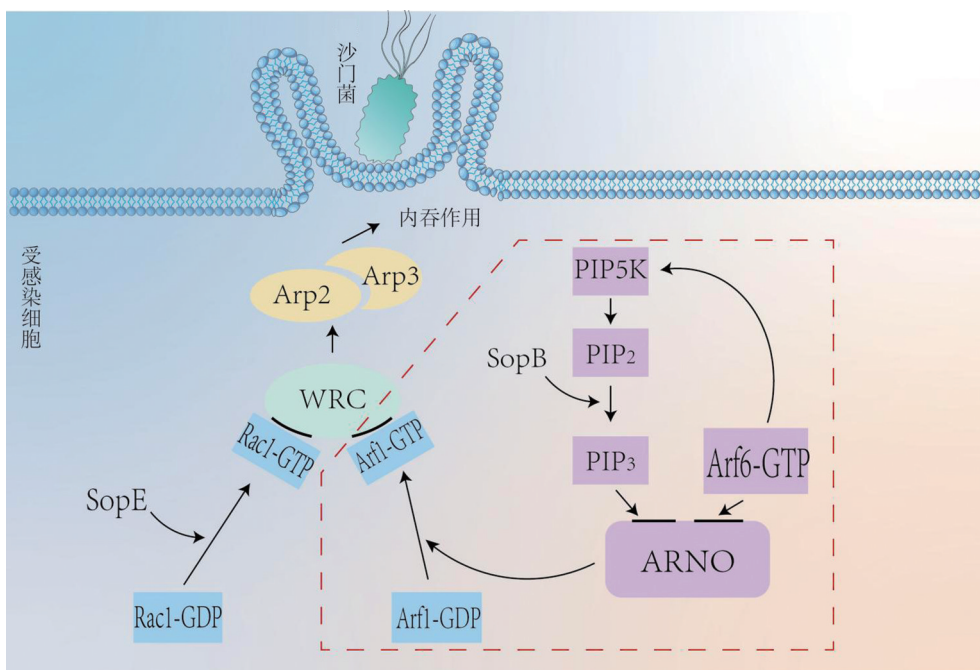


图 2 鼠伤寒沙门菌利用 Arf6-GTP 促进入侵的作用机制

2.2.2 鼠疫耶尔森菌

耶尔森氏菌 (*Yersinia*) 是一类革兰阴性杆菌，主要引起小肠结肠炎。研究发现耶尔森菌侵袭素与 $\beta 1$ 整联蛋白结合后，Arf6 会被募集到新形成的吞噬体中，激活 PIP5K，引发吞噬体内 PIP₂ 增多，从而促进耶尔森菌的侵入^[35]。以 Arf6 突变体为工具，验证了 Arf6 与耶尔森氏菌感染之间的联系，发现过表达 Arf6 或 Arf6-Q67L 均增高了耶尔森氏菌的感染率，转染 Arf6-N122I (表达核苷酸结合缺陷的 Arf6 蛋白的质粒)，入侵水平呈浓度依赖性降低。随后使用

PIP₂ 特异性磷酸酶降低 PIP₂ 浓度，发现耶尔森氏菌入侵水平也呈浓度依赖性降低。突变体感染和特异性酶降解试验均支持 Arf6 通过调节 PIP₂ 介导在耶尔森氏菌入侵。此外，具有 RhoGAP 结构域、ankyrin 重复序列和 PH 结构域 2 的 Arf GAP (ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2, ARAP2) 能够抑制 Arf6 的活性^[36]，ARAP2 能够促进耶尔森菌入侵，这表明完整的内吞需要无活性的 Arf6，内吞全过程可能依赖 Arf6-GTP/GDP 循环。

2.2.3 李斯特菌

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种革兰阳性食源性致病菌, 能够引起胃肠炎、脑膜炎或流产。Arf6 持续激活会降低李斯特菌的感染效率, 而抑制 Arf6 的活性能够促进李斯特菌入侵。宿主的 Arf GAP ARAP2 能够使 Arf6 水解为 GDP 结合形式, 而 ARAP2 的一种突变体不能够正常水解与 Arf6 结合的 GTP, 导致 Arf6 的持续激活。研究发现该突变体会造成李斯特菌感染率的降低, 而在转染了该突变体质粒的细胞中敲除 Arf6, 李斯特菌感染率可以恢复^[37]。这表明 ARAP2 通过抑制 Arf6 活性来促进李斯特菌的入侵。但是李斯特菌采用何种途径激活

ARAP2 尚无报道。Ireton 等^[38] 猜测由于李斯特菌入侵过程中能够诱导 PIP₃ 积累, 而 PIP₃ 与 ARAP2 的 PH 结构域相互作用可以激活 GAP 活性。此外, 由于 Arf6 可以通过激活 PIP5K 诱导 PIP₂ 的增加^[39-40], 而 PIP₂ 是 PIP₃ 的前体, 因此猜测 PIP₃ 的积累可能也与 Arf6 有关, 这形成了一个负反馈机制。ARAP2 通过抑制 Arf6 活性参与李斯特菌入侵过程如图 3 所示, ARAP2 通过抑制 Arf6 活性来促进李斯特菌入侵; 李斯特菌入侵时诱导 PIP₃ 产生, 激活了 ARAP2 的 GAP 活性; Arf6 可能通过激活 PIP5K 诱导 PIP₂ 的增加, 作为 PIP₃ 的底物, 形成负反馈调节。

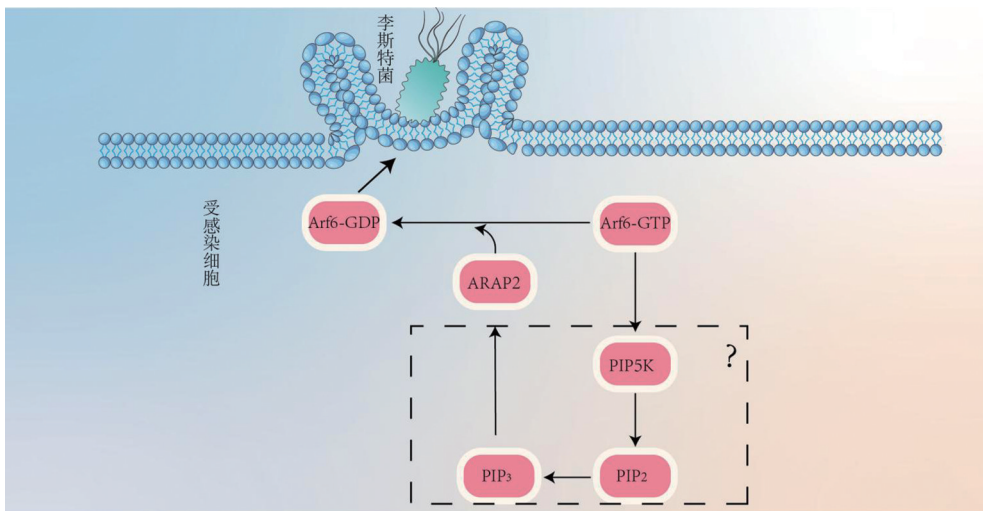


图 3 ARAP2 通过抑制 Arf6 活性参与李斯特菌入侵过程

2.2.4 肠致病性和肠出血性大肠杆菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是一种革兰阴性菌, 在一定条件下可以引起人和多种动物发生胃肠道感染或尿道等多种局部组织器官感染。肠致病性大肠杆菌 (EPEC) 和肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 是大肠杆菌的 2 种亚型, 二者均能够产生毒力蛋白 EspG, 可以与吞噬细胞内的 Arf6 相互作用, 从而影响吞噬细胞的吞噬功能。

Humphreys 等^[41] 报道 EPEC 和 EHEC 均可分泌毒力蛋白 EspG, 构建了 EspG 突变体大肠杆菌, 该突变体的 EspG 不能够结合 Arf 蛋白, 用突变体大肠杆菌感染细胞, 发现相较于野生型大肠杆菌, 侵入率显著降低, 且只有在突变体和阴性对照中能够使用蛋白免疫印迹法检测出 ARNO, 而野生型大肠杆菌的 ARNO 表达显著减少。这表明 EspG 竞争性抑制 Arf6, 阻碍了对 ARNO 的信号传递, 使 WRC 无法激活。此外, EspG 还被报道竞争性抑制 Arf1, 阻碍了 Arf1 与 Rac1 的协作, 从而抑制了 WRC 的招募和激活。上述 2 种

机制均会导致 WRC 不能激活, 导致肌动蛋白聚合过程异常, 吞噬细胞摄取外来抗原的功能减弱, 从而使吞噬细胞的免疫功能大大降低。

2.3 寄生虫感染

寄生虫中有一类属于胞内寄生原虫, 其生活史中含有胞内繁殖的阶段, Arf6 在这些胞内寄生原虫的入侵与繁殖中起到重要作用。

2.3.1 杜氏利什曼原虫

杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 是一种细胞内寄生原虫, 可引起人类多种疾病, 包括自愈性皮肤病变和致命性内脏病变。因宿主不同而有 2 个不同的生活阶段, 在人和哺乳动物或体外 37 °C 下培养的巨噬细胞中为无鞭毛体 (amastigote)^[42]。Lodge 等^[43] 采用 Arf6-T27N 转染细胞并感染利什曼原虫, 发现抑制 Arf6 的功能能够明显阻碍无鞭毛体的感染。

2.3.2 弓形虫

弓形虫 (*Toxoplasma*) 是一种广泛传播的专性胞内寄生虫, 据估计全球有 30% 的人口被其慢性感

染^[44]。由于弓形虫能够在体外入侵所有有核的宿主细胞,曾有学者认为其入侵机制不需要任何宿主受体或蛋白质^[45]。在入侵过程中,弓形虫拖拽宿主细胞膜向内凹陷,形成一个寄生液泡 (parasitophorous vacuole, PV), 弓形虫在其中进行无性繁殖。

研究发现在非洲绿猴肾细胞中, Arf6 被招募至 PV, 通过激活 PI3K 与招募 PIP₂ 和 PIP₃ 发挥重要作用, 提示 Arf6 可能与 PV 的形成或维持感染有关^[46]。有报道发现弓形虫 PV 与 Arf6 阳性囊泡存在相互作用, 并提出 Arf6 可能参与的 2 种机制: 1) 阻止胞质分裂, 稳定弓形虫复制生态位。弓形虫可以在胃肠道定殖并在肠道上皮细胞中复制^[47]。而肠道上皮细胞能够通过胞质分裂自我更新, 消除受感染的细胞, 阻止病原体的定殖。在正常的胞质分裂中, 支架蛋白 FIP3 与 FIP4 介导 Rab11 循环内体运输至卵裂沟, 并与质膜上的 Arf6 相互作用^[13], Arf6 在其中参与调节细胞分裂时的体积大小^[48]。而在弓形虫感染的情况下, Arf6 被大量招募至 PV, 阻断了胞质分裂过程而导致细胞自我更新障碍, 更加利于弓形虫定殖^[49]。2) 提供弓形虫复制所需的胆固醇和鞘脂。在弓形虫感染的细胞中, 可以观察到宿主内吞循环小室 (endocytic recycling compartment, ERC) 被拖向 PV。ERC 是一类 Arf6 阳性膜结构, 携带大量的胆固醇和鞘脂^[50], 可能是弓形虫繁殖所需营养的重要来源, 提示 Arf6 相关的核内体可能在弓形虫营养获取中发挥作用。

3 小结与展望

Arf6 参与多种病原体感染的途径, 涵盖了细胞内信号传导、囊泡运输、细胞分裂和病原体营养获取多个方面。通过多种机制共同参与调节赋予 Arf6 非常广谱、强效的感染调控能力, 因此 Arf6 有望成为治疗干预各类传染病的新靶点。针对该靶点, 除了实验室常用的基因表达干预手段, Arf6 的特异性小分子抑制剂能够简单地实现对靶点的干预, 为以 Arf6 为靶点的临床药物设计提供了有力的基础。目前, Arf6 抑制剂 NAV-2729 已经被报道展现出与临床一线药物相当的抗病毒作用^[27,51]。但值得注意的是, NAV-2729 的靶标谱目前暂未完全阐明, 用于人体治疗亟需进一步研究^[52]。

Arf6 作为治疗靶点仍需克服潜在的脱靶效应, 由于 Arf6 广泛参与许多重要的生命活动, 例如白细胞能量代谢等^[14]和神经系统发育^[16]等, 全身性广泛直接抑制 Arf6 可能会带来诸多非治疗效应。下一步研究应聚焦在如何在利用 Arf6 干预病原体入侵和免疫的同时, 避免或减少其他不可控的生物学效应, 可

考虑利用抗体-药物偶联、靶向肽偶联、点击化学修饰、纳米酶递送系统等方案提高其靶向性。

参考文献:

- [1] D'SOUZA-SCHOREY C, CHAVRIER P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7 (5): 347-358.
- [2] GASCHET J, HSU V W. Distribution of ARF6 between membrane and cytosol is regulated by its GTPase cycle [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (28): 20040-20045.
- [3] DONALDSON J G, JACKSON C L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12 (6): 362-375.
- [4] SAITOH O, OSHIMA T, AGATA K, et al. Molecular cloning of a novel ADP-ribosylation factor (ARF) expressed in planarians [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1309 (3): 205-210.
- [5] PASQUALATO S, MÉNÉTREY J, FRANCO M, et al. The structural GDP/GTP cycle of human Arf6 [J]. *EMBO Reports*, 2001, 2 (3): 234-238.
- [6] MÉNÉTREY J, PERDERISET M, CICOLARI J, et al. Structural basis for ARF1-mediated recruitment of ARHGAP21 to Golgi membranes [J]. *The EMBO Journal*, 2007, 26 (7): 1953-1962.
- [7] HONGU T, KANAHO Y. Activation machinery of the small GTPase Arf6 [J]. *Advances in Biological Regulation*, 2014, 54: 59-66.
- [8] DONALDSON J G. Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (43): 41573-41576.
- [9] MILLAR C A, POWELL K A, HICKSON G R, et al. Evidence for a role for ADP-ribosylation factor 6 in insulin-stimulated glucose transporter-4 (GLUT4) trafficking in 3T3-L1 adipocytes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (25): 17619-17625.
- [10] TAGLIATTI E, FADDA M, FALACE A, et al. Arf6 regulates the cycling and the readily releasable pool of synaptic vesicles at hippocampal synapse [J]. *eLife*, 2016, 5: e10116.
- [11] MATSUKAWA J, NAKAYAMA K, NAGAO T, et al. Role of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in gastric acid secretion [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (38): 36470-36475.
- [12] SABE H. Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion [J]. *Journal of Biochemistry*, 2003, 134 (4): 485-489.
- [13] FIELDING A B, SCHONTEICH E, MATHESON J, et al. Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis [J]. *The EMBO journal*, 2005, 24 (19): 3389-3399.
- [14] GAMARA J, DAVIS L, LEONG A Z, et al. Arf6 regulates energy metabolism in neutrophils [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2021, 172: 550-561.
- [15] LI R, PENG C, ZHANG X, et al. Roles of Arf6 in cancer cell invasion, metastasis and proliferation [J]. *Life Sciences*, 2017, 182: 80-84.
- [16] NIEUWENHUIS B, EVA R. ARF6 and Rab11 as intrinsic regulators of axon regeneration [J]. *Small GTPases*, 2020, 11 (6):

- 392–401.
- [17] GENG D, WU H. Abrogation of ARF6 in promoting erastin-induced ferroptosis and mitigating capecitabine resistance in gastric cancer cells [J]. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2022, 13 (3): 958–967.
- [18] ONO A, ABLAN S D, LOCKETT S J, et al. Phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101 (41): 14889–14894.
- [19] MOIR S, CHUN T W, FAUCI A S. Pathogenic mechanisms of HIV-disease [J]. *Annual Review of Pathology*, 2011, 6: 223–248.
- [20] SATTENTAU Q J, MOORE J P. The role of CD4 in HIV binding and entry [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 1993, 342 (1299): 59–66.
- [21] GARCÍA-EXPÓSITO L, BARROSO - GONZÁLEZ J, PUIGDOMÈNECH I, et al. HIV-1 requires Arf6-mediated membrane dynamics to efficiently enter and infect T lymphocytes [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22 (8): 1148–1166.
- [22] VIDRICAIRE G, TREMBLAY M J. Rab5 and Rab7, but not ARF6, govern the early events of HIV-1 infection in polarized human placental cells [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175 (10): 6517–6530.
- [23] BLAGOVESHCHENSKAYA A D, THOMAS L, FELICIANGELI S F, et al. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway [J]. *Cell*, 2002, 111 (6): 853–866.
- [24] NEKOUA M P, HOBER D. Coxsackievirus infection and associated diseases [J]. *Microorganisms*, 2022, 10 (8): 1566.
- [25] HEIKKILÄ O, SUSI P, TEVALUOTO T, et al. Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by β 2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84 (7): 3666–3681.
- [26] MARCHANT D, SALL A, SI X, et al. ERK MAP kinase-activated Arf6 trafficking directs coxsackievirus type B3 into an unproductive compartment during virus host-cell entry [J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90 (4): 854–862.
- [27] ZHU Y, WANG X, HE Z, et al. Enterovirus 71 enters human brain microvascular endothelial cells through an ARF6-mediated endocytic pathway [J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95 (7): e28915.
- [28] WANG K, CHEN W, ZHANG Z, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5 (1): 283.
- [29] ZHOU Y Q, WANG K, WANG X Y, et al. SARS-CoV-2 pseudovirus enters the host cells through spike protein-CD147 in an Arf6-dependent manner [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11 (1): 1135–1144.
- [30] HERRERO-FRESNO A, OLSEN J E. *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host: a mini-review [J]. *Food Microbiology*, 2018, 71: 98–110.
- [31] HUMPHREYS D, DAVIDSON A C, HUME P J, et al. Arf6 coordinates actin assembly through the WAVE complex, a mechanism usurped by *Salmonella* to invade host cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110 (42): 16880–16885.
- [32] BIELING P, ROTTNER K. From WRC to Arp2/3: collective molecular mechanisms of branched actin network assembly [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2023, 80: 102156.
- [33] HONDA A, NOGAMI M, YOKOZEKI T, et al. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation [J]. *Cell*, 1999, 99 (5): 521–532.
- [34] HUMPHREYS D, DAVIDSON A, HUME P J, et al. *Salmonella* virulence effector SopE and Host GEF ARNO cooperate to recruit and activate WAVE to trigger bacterial invasion [J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 11 (2): 129–139.
- [35] WONG K W, ISBERG R R. Arf6 and phosphoinositide 4-phosphate 5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for β 1 integrin-mediated bacterial uptake [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198 (4): 603–614.
- [36] DOWD G C, BHALLA M, KEAN B, et al. Role of host type IA phosphoinositide 3-kinase pathway components in invasion-mediated internalization of *Yersinia enterocolitica* [J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84 (6): 1826–1841.
- [37] GAVICHERLA B, RITCHEY L, GIANFELICE A, et al. Critical role for the host GTPase-activating protein ARAP2 in InlB-mediated entry of *Listeria monocytogenes* [J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (11): 4532–4541.
- [38] IRETON K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells [J]. *Cellular Microbiology*, 2007, 9 (6): 1365–1375.
- [39] BACH A S, ENJALBERT S, COMUNALE F, et al. ADP-ribosylation factor 6 regulates mammalian myoblast fusion through phospholipase D1 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate signaling pathways [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21 (14): 2412–2424.
- [40] CHANG L C, HUANG T H, CHANG C S, et al. Signaling mechanisms of inhibition of phospholipase D activation by CHS-111 in formyl peptide-stimulated neutrophils [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 81 (2): 269–278.
- [41] HUMPHREYS D, SINGH V, KORONAKIS V. Inhibition of WAVE regulatory complex activation by a bacterial virulence effector counteracts pathogen phagocytosis [J]. *Cell Reports*, 2016, 17 (3): 697–707.
- [42] PEDERIVA M M C, SANTOS S M D, RIVAROLA L G S, et al. Asymptomatic *Leishmania* infection in humans: a systematic review [J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2023, 16 (2): 286–294.
- [43] LODGE R, DESCOTEAUX A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation [J]. *European Journal of Immunology*, 2006, 36 (10): 2735–2744.
- [44] ZHAO X Y, EWALD S E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2020, 130 (7): 3370–3380.
- [45] KOCHANOWSKY J A, KOSHY A A. *Toxoplasma gondii* [J]. *Current Biology*, 2018, 28 (14): R770–R771.
- [46] DA SILVA C V, DA SILVA E A, CRUZ M C, et al. ARF6, PI3-kinase and host cell actin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii* cell invasion [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378 (3): 656–661.

- [47] MATTA S K, RINKENBERGER N, DUNAY I R, et al. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19 (7): 467-480.
- [48] OPALKO H E, MILLER K E, KIM H S, et al. Arf6 anchors Cdr2 nodes at the cell cortex to control cell size at division [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2022, 221 (2): e202109152.
- [49] HARTMAN E J, ASADY B, ROMANO J D, et al. The Rab11-family interacting proteins reveal selective interaction of mammalian recycling endosomes with the *Toxoplasma parasitophorous* vacuole in a Rab11-and Arf6-dependent manner [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2022, 33 (5): ar34.
- [50] SCHWEITZER J K, PIETRINI S D, D'SOUZA - SCHOREY C. ARF6-mediated endosome recycling reverses lipid accumulation defects in Niemann-Pick Type C disease [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (4): e5193.
- [51] MIRABELLI C, BRAGAZZI CUNHA J, WOTRING J W, et al. ARF6 is a host factor for SARS-CoV-2 infection *in vitro* [J]. *Journal of General Virology*, 2023, 104 (6): 001868.
- [52] ROSENBERG E M, JIAN X, SOUBIAS O, et al. The small molecule inhibitor NAV-2729 has a complex target profile including multiple ADP-ribosylation factor regulatory proteins [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299 (3): 102992.

