



研究报告

猪瘟疫病毒 C 株共感染口蹄疫病毒影响口蹄疫病毒复制

康慧^{1,2} 朱紫祥² 杨孝朴^{*1} 郑海学^{*2}

1 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原学国家重点实验室 口蹄疫国家参考实验室
甘肃 兰州 730046

摘要:【背景】猪瘟疫(Classical Swine Fever)是由猪瘟疫病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)引起的猪高度接触性传染病,致死率极高。在临床中存在着 CSFV 与猪其他病原菌共感染的情况,例如 CSFV 与口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)的共感染。【目的】利用 CSFV 与 FMDV 共感染猪源宿主细胞,研究 CSFV 与 FMDV 共感染对 FMDV 病毒复制的影响。【方法】构建体外共感染细胞模型,在正常 PK-15 细胞上进行 CSFV 共感染 FMDV 实验,通过观察细胞病变效应(Cytopathic Effect, CPE)、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、Western Blot、间接免疫荧光检测 CSFV 和 FMDV 共感染及 FMDV 单独感染情况下 FMDV 复制水平的差异。利用 RT-qPCR 筛选鉴定能够影响 FMDV 复制的 CSFV 蛋白。【结果】CSFV C 株共感染 FMDV 能够抑制 FMDV 的复制,而且灭活的 CSFV 同样抑制 FMDV 的复制。通过筛选鉴定出 CSFV 的 C 蛋白能够抑制 FMDV 复制。【结论】研究发现 CSFV C 株共感染 FMDV 能够抑制 FMDV 复制,而其 C 蛋白具有抑制 FMDV 复制的能力。

关键词:猪瘟疫病毒,口蹄疫病毒,共感染

Co-infection of classical swine fever virus C strain and foot-and-mouth disease virus affects foot-and-mouth disease virus replication

KANG Hui^{1,2} ZHU Zixiang² YANG Xiaopu^{*1} ZHENG Haixue^{*2}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

2 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology; National Foot and Mouth Diseases Reference Laboratory; Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China

Abstract: [Background] Classical swine fever is caused by classical swine fever virus (CSFV), which is highly contagious and fatal to pigs. Co-infection of CSFV with other swine pathogens is present in clinical practice, such as, CSFV is co-infected with foot-and-mouth disease virus (FMDV) in pigs. [Objective]

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500100); Key Science and Technology Project of Gansu Province (19ZDNA001)

***Corresponding authors:** YANG Xiaopu: Tel: 86-931-7631229; E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn
ZHENG Haixue: Tel: 86-931-8342052; E-mail: haixuezheng@163.com

Received: 27-03-2020; **Accepted:** 20-05-2020; **Published online:** 15-09-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500100); 甘肃省科技重大专项(19ZDNA001)

***通信作者:** 杨孝朴: Tel: 0931-7631229; E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn

郑海学: Tel: 0931-8342052; E-mail: haixuezheng@163.com

收稿日期: 2020-03-27; **接受日期:** 2020-05-20; **网络首发日期:** 2020-09-15

The effects of co-infection of CSFV and FMDV in porcine host cells on replication of FMDV were studied. **[Methods]** We constructed an *in vitro* model of co-infection of CSFV and FMDV. The PK-15 cells were first infected with CSFV and then infected with FMDV. The replication of FMDV in FMDV-infected cells and the cells with co-infection of CSFV and FMDV was analyzed by cytopathic effect, real-time quantification PCR (RT-qPCR), Western Blot and indirect immunofluorescence assay, respectively. The CSFV proteins that included the inhibitive function on FMDV replication was subsequently screened by RT-qPCR analysis. **[Results]** Co-infection of CSFV C strain and FMDV inhibited the replication of FMDV. Meanwhile, the inactivated CSFV also showed inhibitive activity on FMDV replication. A detailed screening identified that CSFV C protein include the function to suppress FMDV replication. **[Conclusion]** We found that CSFV C strain infection could inhibit FMDV infection, and the C protein of CSFV included a function to inhibit FMDV replication.

Keywords: classical swine fever virus, foot-and-mouth disease virus, co-infection

猪瘟疫病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)成员,由其引起的猪瘟疫(Classical Swine Fever, CSF)是一种以出血综合征和免疫抑制为特征的烈性、高度接触性动物传染病^[1-2]。世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, OIE)将其列入 A 类法定传染病^[3]。CSFV 传播速度快、致死率高,不同年龄段的猪均可感染,发病率高、感染性强,病猪临床表现为发热体征、眼睛出现明显分泌物、畏寒,腹部、鼻、耳和四肢中部均会出现紫色出血点^[4]。CSFV 能够发生垂直传播,母猪感染极易传播给仔猪,可引发母猪流产、木乃伊胎儿形成以及畸形、死胎、有震颤症状的弱仔猪。临床中同时存在隐性感染无明显症状的仔猪,这些隐性感染猪成为猪瘟疫发生的潜在隐患点,这也是猪瘟疫一直难以完全清除的原因。然而猪瘟疫 C 株兔化弱毒接种猪只后,只会引发轻微的发热和病毒血症,并不引起发病和死亡,对猪能产生很好的免疫保护。有研究表明, C 株接种怀孕母猪并不会发生垂直传播,这对猪瘟疫的防控发挥了很大的作用^[5]。

CSFV 基因组全长约 12.3 kb,中间仅含有一个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),CSFV 所有的结构蛋白和非结构蛋白均由该 ORF 编码,在多聚蛋白上的编码序列为 NH₂-N^{pro}、C、E^{ms}、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、

NS5A、NS5B-COOH,其中 C、E^{ms}、E1、E2 为结构蛋白,其余均为非结构蛋白^[6]。CSFV 的 C 蛋白不具有二级结构,但具有高度碱性的氨基酸序列,会以较低的亲和性和特异性与 RNA 结合,能够结合病毒基因组 RNA,参与 RNA 包装,形成病毒核衣壳,CSFV C 蛋白还具有调节细胞转录的作用^[7]。此外,CSFV C 蛋白能够与宿主类泛素化(SUMOylation, SUMO 化)通路蛋白和 IQ-GAP1(IQ-Domain GTPase-Activating Protein 1)蛋白相互作用,从而影响 CSFV 的复制及其致病能力^[8-10]。

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性的烈性动物传染病^[11]。该病主要感染偶蹄类动物猪、牛、羊,病畜临床多呈现发热,在鼻部、蹄部和乳房等处形成水泡和溃烂等症状^[12]。口蹄疫曾在全球范围内多次暴发流行,发病率达 100%,死亡率低,但可造成动物生产能力下降、产奶量下降、肉质受损,而且严重影响种用价值,鉴于其严重的危害,OIE 将其列为必须报告的烈性动物传染病。FMDV 属小 RNA 病毒科(Picornaviridae)、口蹄疫病毒属(Aphthovirus),基因组全长约 8.5 kb,有 7 个血清型,在不同地区还存在不同的亚型^[13-14]。

最近的一项大数据分析研究表明,2006-2016 年间全球最重要的猪病毒是猪流感病毒(Swine Influenza Virus, SwIV)、伪狂犬病病毒

(Pseudorabies Virus, PRV)、口蹄疫病毒(FMDV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)、经典猪瘟病毒(CSFV)、非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus, ASFV)和猪圆环病毒 2 (Porcine Circovirus 2, PCV2)^[15]。CSFV 和 FMDV 对我国养猪业具有重大的危害, 都属于典型的免疫抑制型病毒, CSFV 感染猪后极易引发其他猪病病原的继发或并发感染(如猪圆环病毒、FMDV 等)^[16-17]。猪瘟和口蹄疫共感染之后临床观察发现, 临床表征加剧, 其背后机制仍不清楚。本研究通过构建共感染体外模型, 分析 CSFV 和 FMDV 共感染及 FMDV 单独感染情况下 FMDV 复制水平的差异, 并筛选鉴定影响 FMDV 复制的 CSFV 蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒

PK-15 细胞, 载体质粒 p3XFlag-CMV-7.1, CSFV C 株 NS4B、NS5A、E^{ms}、C、E2、E1、NS5B、N^{pro}、NS2、NS4A、P 病毒蛋白质粒均由本实验室保存。

1.1.2 病毒株和抗体

FMDV-O-MYA98、CSFV 疫苗株(C 株)、自制兔抗 FMDV-VP0 抗体和自制兔抗 CSFV 血清抗体均由本实验室保存。鼠抗 β -Actin 单抗抗体和鼠抗 FLAG 单抗抗体, Sigma 公司。HRP 山羊抗小鼠 IgG、HRP 山羊抗兔 IgG, 北京博奥龙免疫技术有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

MEM 培养基、100 \times 青霉素-链霉素溶液和 0.25% 胰酶溶液, Gibco 公司; 犊牛血清, Biological Industries 公司; 2 \times SYBR Premix Ex Taq、PCR 引物、RNA 逆转录 RT, TaKaRa 公司; 预染蛋白 Marker, Thermo Scientific 公司; 脂质体转染试剂 Lipofectamine2000, Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒, Omega 公司。

凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司; 荧光共聚焦仪, Leica 公司; CO₂ 恒温培养箱和 ABI 梯度 PCR 仪, Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 共感染体外模型的构建

将正常 PK-15 细胞铺于 35 mm 培养皿, 置 37 °C、5% 二氧化碳培养箱培养至细胞密度达到 80% 后, 分 2 组, 各 8 个培养皿, 一组接种 CSFV/灭活 CSFV (0.003 MOI) 孵育 2 h, 替换 1% 犊牛血清 MEM, 继续培养 48 h, 取其中 4 个培养皿继续接种 FMDV (0.01 MOI) 孵育 1 h, 然后换 1% 犊牛血清 MEM, 放置温箱继续培养 6、12、18、24 h, 另外 4 个用相同方法进行操作, 但不接种 FMDV。另外一组不接种 CSFV, 48 h 后取其中 4 个培养皿不接种 FMDV 作空白对照, 其余 4 个继续接种 FMDV 孵育 1 h, 然后换 1% 犊牛血清维持液, 放置温箱培养 6、12、18、24 h。

考虑到猪瘟病毒并不会引起 PK-15 细胞病变, 而且能够形成持续感染, 同时建立隐性携带 CSFV 的 PK-15 细胞。正常 PK-15 细胞待细胞在细胞瓶里密度达到 90%, 直接接种 CSFV 孵育 2 h, 然后换含 1% 犊牛血清 MEM 培养液, 置 37 °C、5% 二氧化碳培养箱培养 48 h (下文称为 CSFV-PK-15 细胞), 将 CSFV-PK-15 细胞连续传代后铺皿, 待细胞密度达到 80% 时, 接种 FMDV 孵育 1 h, 然后换含 1% 犊牛血清 MEM 培养液, 置培养箱继续培养 6、12、18、24 h^[18-19]。

1.2.2 灭活 CSFV

由于 CSFV 不耐热, 采用 56 °C、60 min 对 C 株 CSFV 进行灭活^[20]。

1.2.3 Western Blot 检测

PK-15 细胞接种至细胞培养皿, 细胞密度达到 80%–90% 时, 用 Lipofectamine2000 试剂转染相应的质粒 24 h (细胞密度达到 90%, 接种 CSFV 48 h), 继续接种 FMDV (0.01 MOI) 6、12、18、24 h 分别收取并进行细胞样品处理, 加入 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 100 °C、10 min 进行蛋白变性,

12 000 r/min 离心 10 min, 吸取离心管上层混合液 30 μ L, 上样加至凝胶样品槽内, 电泳至溴酚蓝染料位置下降至凝胶边缘, 100 V 1 h 转印至 0.2 μ m NC 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 1 \times TBST 洗膜后, 加入兔抗 FMDV-VP0 抗体/鼠抗 FLAG/ β -Actin 的一抗, 放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 用 1 \times TBST 清洗 NC 膜 3 次, 每次 10 min, 室温孵育二抗 1 h, 1 \times TBST 清洗 NC 膜 3 次, 每次 10 min, 最后将膜浸泡 ECL 发光液, 进行曝光。

1.2.4 RNA 提取及 cDNA 合成

用 Trizol 法提取总 RNA: PBS 清洗 3 次制备样品, 加入 1 mL Trizol 裂解液反复吹打, 转入无 RNase 的 EP 管中, 静置 5 min, 再加入 0.2 mL 氯仿, 涡旋振荡 15 s, 混匀后静置 5 min, 静置分层, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 小心吸取上层无色水相, 转入新的 1.5 mL EP 管中, 并加入等体积的异丙醇, 轻轻将管中液体混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 75% 乙醇(DEPC 水配制), 轻轻洗涤离心后的沉淀, 4 $^{\circ}$ C、7 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再次 7 500 r/min 离心 3 min, 小心吸取多余的 75% 乙醇, 室温晾干, 加入 30 μ L DEPC 水溶解沉淀。

反转录反应体系(20 μ L): RT Primer Mix 4 μ L, RNA 模板 4 μ L, RNase Freed H₂O 12 μ L。反转录反应条件: 50 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 10 s, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

PK-15 细胞接种至 35 mm 细胞培养皿中, 细胞密度达到 75%–85% 时, 分别用 Lipofectamine2000 试剂转染相应的质粒 24 h (细胞密度达到 80%, 接种 CSFV 48 h), 继续接种 FMDV (0.01 MOI) 6 h、12 h 分别收取细胞样品, 提取细胞的总 RNA 后继续转录成 cDNA, 并用对应的定量引物进行 PCR 检测(表 1)。

RT-qPCR 反应体系(20 μ L): 2 \times SYBR Premix Ex Taq 10 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L,

表 1 实时荧光定量(RT-qPCR)引物

Table1 The primers used for RT-qPCR

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
FMDV-qPCR-F	CACTGGTGACAGGCTAAGG
FMDV-qPCR-R	CCCTTCTCAGATTCCGAGT
CSFV-qPCR-F	GACACAAGCGCAGGCAATAG
CSFV-qPCR-R	AGTGGGTTCCAGGARTACAT
Pig-GAPDH-qPCR-F	ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA
Pig-GAPDH-qPCR-R	GATCGAGTTGGGGCTGTGACT

下游引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L, ddH₂O 8.2 μ L, cDNA 1 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共 40 个循环, 同时进行熔解曲线分析, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法, 对其进行分析。

1.2.6 间接免疫荧光

在玻底直径为 20 mm 的共聚焦小皿中铺 PK-15 细胞, 12 h 后接种 CSFV 感染 48 h, 继发接种 FMDV 6、12 h, 分别收取细胞, 1 \times PBS 清洗一次, 加入 4% 的甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, 1 \times PBS 重复清洗 3 次, 每次 5 min, 用 0.2% 的 Triton \times 100 透化细胞 10 min, 再次重复清洗 3 次, 每次 5 min, 5% 的 BSA 常温封闭 2 h, 加入 1% BSA 稀释 CSFV 兔抗血清抗体的一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 1 \times PBS 重复清洗 3 次, 每次 10 min, 加入 1% BSA 稀释的荧光二抗, 避光孵育 2 h, 1 \times PBS 重复清洗 3 次, 每次 10 min, 最后用 DAPI 染核 5 min, 1 \times PBS 重复清洗 3 次, 每次 5 min, 用荧光共聚焦仪进行分析。

1.2.7 病毒增殖的测定

PK-15 细胞接种至 2 个 96 孔细胞培养板 (1 \times 10⁵ 个/mL), 12 h 后分别转染 p3 \times Flag-CMV-7.1 空载体和 C 株 CSFV 的 C 蛋白质粒, 0.2 μ g/孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 20–24 h, 将 FMDV-O 病毒原液稀释到 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 和 10⁻¹⁰, 分别取各梯度稀释液 0.1 mL 接种于细胞培养板内, 每个病毒稀释液接种 8 孔(按照从左到右、从高稀释度到低稀释度加样, 左右各留一竖排作为空白对照), 置 37 $^{\circ}$ C 温箱继续培养 72 h 后取出培养板, 显微镜下观察细胞病变情况。

以 Reed-Muench 法计算单位体积病毒悬液中病毒的半数细胞感染量($TCID_{50}$)。

1.2.8 死亡细胞数量测定方法

利用 Image J 软件对单独和共感染后记录下的细胞病变图片进行死亡细胞计数。

1.2.9 统计学分析

利用 Excel 进行统计学 t 检验(*: $P<0.05$; **: $P<0.01$)。

2 结果与分析

2.1 CSFV C 株共感染 FMDV 增强 PK-15 细胞的 CPE

为了研究 CSFV C 株共感染 FMDV 后对细胞 CPE 的影响, 通过 1.2.1 试验方法制备样品, 利用显微镜观察并记录细胞病变情况。

结果如图 1B 所示, 仅接种 CSFV 的细胞并没

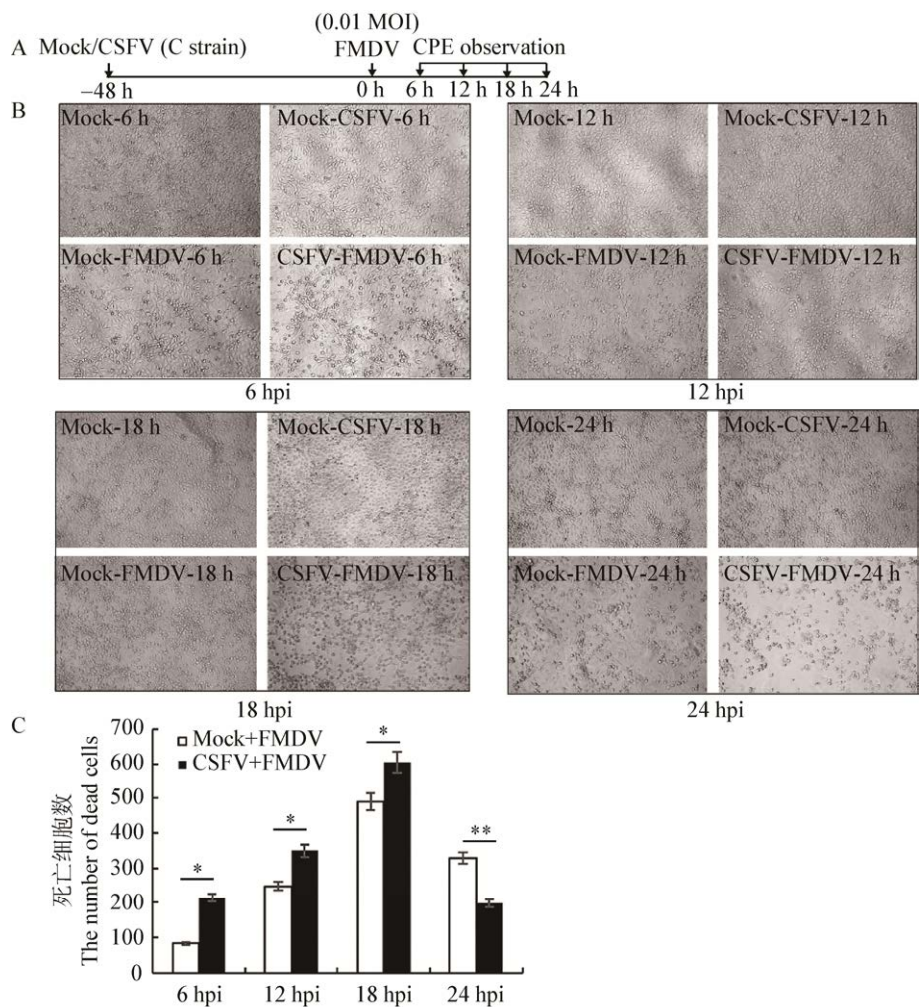


图 1 CSFV C 株共感染 FMDV 对细胞病变程度的影响

Figure 1 The effect of secondary infection of FMDV in CSFV-infected cells on cytopathic effect

注: A: CSFV 和 FMDV 共感染的感染模式图; B: CSFV 和 FMDV 共感染后, 在显微镜下对各培养皿中细胞进行观察并记录, 照片长度标尺为 400 μ m (Mock 为正常 PK-15 细胞, 未接种任何病毒; Mock+CSFV 为 PK-15 细胞仅接种 CSFV; Mock+FMDV 为 PK-15 细胞仅接种 FMDV; CSFV+FMDV 为 PK-15 细胞在接种 CSFV 后继发接种 FMDV); C: 对仅接种 FMDV、CSFV 与 FMDV 共感染细胞进行死亡细胞数统计分析。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$

Note: A: The strategy diagram for CSFV and FMDV infection in PK-15 cells; B: After co-infection of CSFV with FMDV for the indicated time, the cells were observed under the microscope, and the photo length scale was 400 μ m (Mock was normal PK-15 cells; Mock+CSFV was inoculated only CSFV in PK-15 cells; Mock+FMDV was inoculated only FMDV for PK-15 cells; CSFV+FMDV was the secondary infection with CSFV and FMDV in PK-15 cells); C: The number of dead cells were counted and compared. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

有发生细胞病变,而接种 CSFV 48 h 后共感染 FMDV 细胞出现明显病变,并且其与仅接种 FMDV 的细胞相比病变程度显著增加。对 FMDV 单独感染和 CSFV-FMDV 共感染细胞病变图,利用 Image J 软件进行死亡细胞数统计分析,结果如图 1C 所示,单独感染 FMDV 与共感染 CSFV-FMDV 在不同时间点均存在显著差异。说明 CSFV C 株共感染 FMDV 能够增强 PK-15 细胞的 CPE。

2.2 CSFV C 株共感染 FMDV 促进 CSFV 复制,抑制 FMDV 复制

为了进一步研究 CSFV 和 FMDV 共感染后 2 种病毒间复制的相互影响。通过 1.2.1 试验方法的样品制备过程,分组仅接种 CSFV、仅接种 FMDV、继发接种 CSFV 和 FMDV 以及空白对照,收取样品后提取细胞总 RNA,并转录为 cDNA,利用实时荧光定量 PCR 检测 CSFV 和 FMDV mRNA 的表达水平;同时制备另一批相同样品,收取样品后利用 Western Blot 检测 FMDV-VP0 蛋白表达水平,利用激光共聚焦检测并记录 CSFV 的复制情况。

结果如图 2 所示,RT-qPCR 结果表明,共感染后 CSFV mRNA 水平上升,FMDV mRNA 水平下降(图 2A、2B)。Western Blot 结果表明,共感染后,FMDV-VP0 蛋白水平逐渐下降且随着时间的增加下降程度越明显(图 2C)。激光共聚焦结果表明,共感染后 CSFV 在细胞周围的复制程度明显增强(图 2D),说明 CSFV C 株共感染 FMDV-O 能够促进 CSFV 复制,抑制 FMDV 复制。

2.3 FMDV 感染隐性携带 CSFV 的 PK-15 细胞,促进 CSFV 复制但抑制 FMDV 复制

为了研究隐性携带 CSFV 的 PK-15 细胞对 FMDV 复制的影响,将 CSFV-PK-15 细胞铺于 35 mm 培养皿,待细胞密度为 80%–90% 时,接种 FMDV (0.01 MOI)后 6、12、18、24 h 收取样品,分别进行实时荧光定量 PCR 检测、Western Blot 检测及间接免疫荧光检测。

如图 3 所示,RT-qPCR 结果表明,CSFV mRNA 水平增高,FMDV mRNA 水平下降(图 3B、

3C)。Western Blot 结果表明,CSFV-PK-15 细胞感染 FMDV 相比正常 PK-15 细胞感染 FMDV,前者的 FMDV-VP0 蛋白水平低于后者(图 3D)。激光共聚焦结果表明,CSFV-PK-15 细胞感染 FMDV 后明显增强了 CSFV 复制程度(图 3E),说明 CSFV-PK-15 细胞感染 FMDV 能够促进 CSFV 复制但抑制 FMDV 复制。

2.4 灭活 CSFV C 株共感染 FMDV 不影响 PK-15 细胞的 CPE

将灭活后的 CSFV C 株和 FMDV 共感染 PK-15 细胞,观察并记录细胞病变程度。结果如图 4 所示,接种灭活 CSFV 48 h 后共感染 FMDV 与仅接种 FMDV 相对比,二者 CPE 并无明显差别,说明灭活 CSFV C 株共感染 FMDV 不影响 PK-15 细胞的 CPE。

2.5 灭活 CSFV C 株共感染 FMDV 抑制 FMDV 复制

为了进一步研究灭活 CSFV 共感染 FMDV 是否能够影响 FMDV 复制。将灭活 CSFV 接种至 35 mm 培养皿中 2 h,更换 1% 细胞维持液,置温箱 48 h 后,继续接种 FMDV (0.01 MOI)后 6、12 h 后收取样品,分别进行实时荧光定量 PCR、Western Blot 以及间接免疫荧光检测。

如图 5 所示,RT-qPCR 结果表明,FMDV mRNA 的表达水平依旧呈抑制趋势(灭活 CSFV 未测出 CSFV mRNA) (图 5A)。Western Blot 结果表明,共感染的样品相较于仅感染 FMDV 的样品,FMDV-VP0 的蛋白表达水平更低(图 5B)。激光共聚焦结果表明,灭活 CSFV 后显微镜下未能观察到 CSFV 蛋白表达。说明灭活 CSFV C 株共感染 FMDV 依旧能够抑制 FMDV 复制。

2.6 CSFV C 株 C 蛋白抑制 FMDV 的复制

为了进一步研究 CSFV 共感染 FMDV 抑制 FMDV 复制,是否 CSFV 某些病毒蛋白在其抑制 FMDV 复制的过程中发挥相关作用。将 PK-15 细胞接种至 35 mm 细胞培养皿中,待细胞密度达到 75%–85% 后,将 p3XFlag-CMV7.1 空载体和 CSFV C 株各病

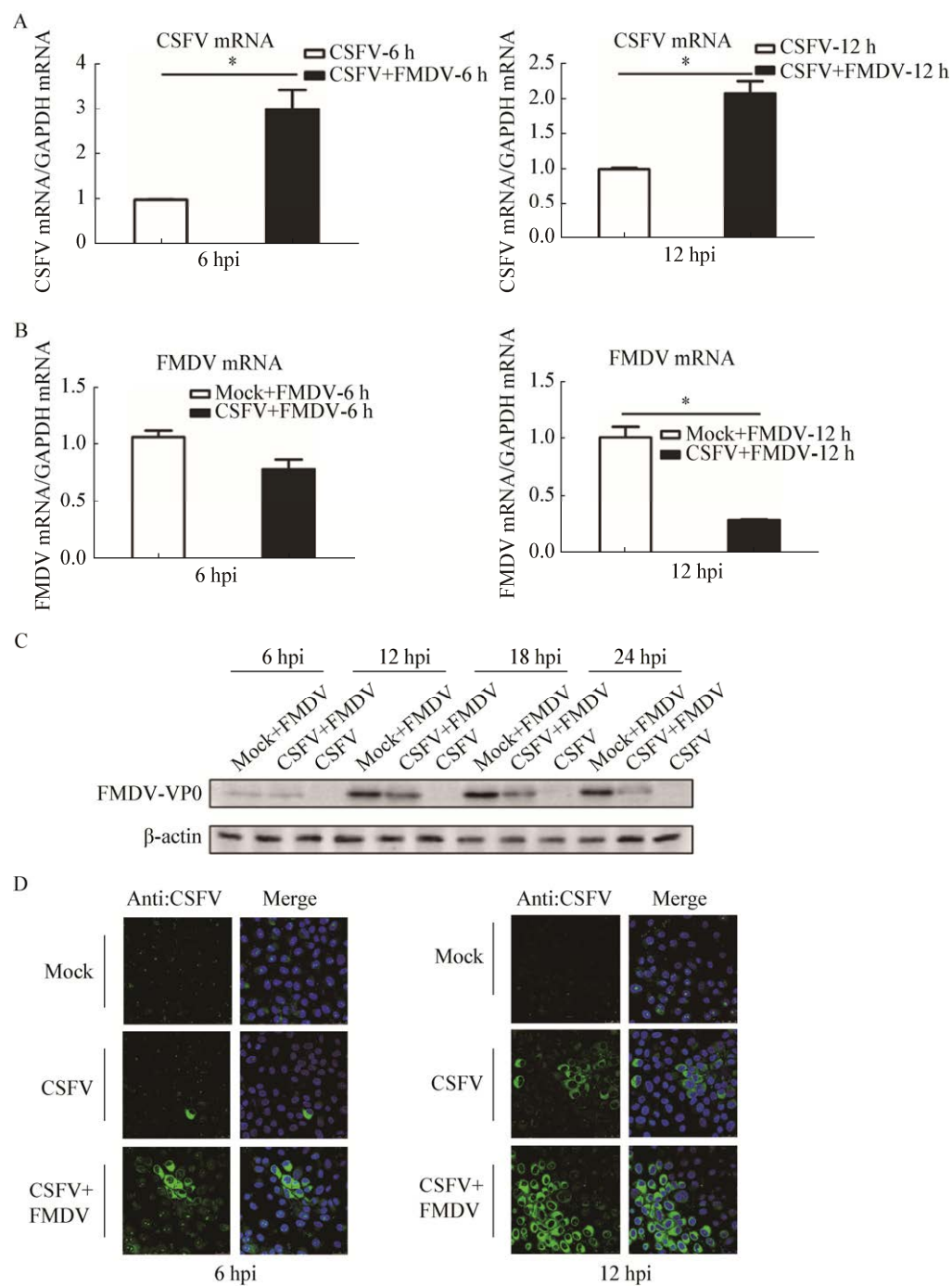


图 2 CSFV C 株共感染 FMDV 对 CSFV 和 FMDV 复制的影响

Figure 2 The effect of reinfection of CSFV C strain and FMDV on viral replication of CSFV and FMDV

注: CSFV C 株感染 PK-15 细胞 48 h 后, 共感染 FMDV (0.01 MOI) 6、12、18、24 h, 收取样品。A、B: 6、12 h 样品做 RT-qPCR 检测 CSFV mRNA 和 FMDV mRNA; C: 6、12、18、24 h 样品做 Western Blot 检测 FMDV-VP0; D: 6、12 h 共聚焦培养皿通过间接免疫荧光检测 CSFV, 激光共聚焦显微镜下观察并记录, Mock 为正常 PK-15 细胞, 作为空白对照。*: $P < 0.05$

Note: PK-15 cells were infected by CSFV C strain for 48 h, and were secondary infected with FMDV for 6, 12, 18, 24 h. A, B: CSFV mRNA and FMDV mRNA were detected by RT-qPCR with 6 h, 12 h samples; C: VP0 protein of FMDV was detected by Western Blot with 6, 12, 18, 24 h samples; D: The expression of CSFV protein were detected by IFA with 6, 12 h confocal petri dishes samples, observed and recorded using laser confocal microscope, and normal PK-15 cells was used as mock control. *: $P < 0.05$

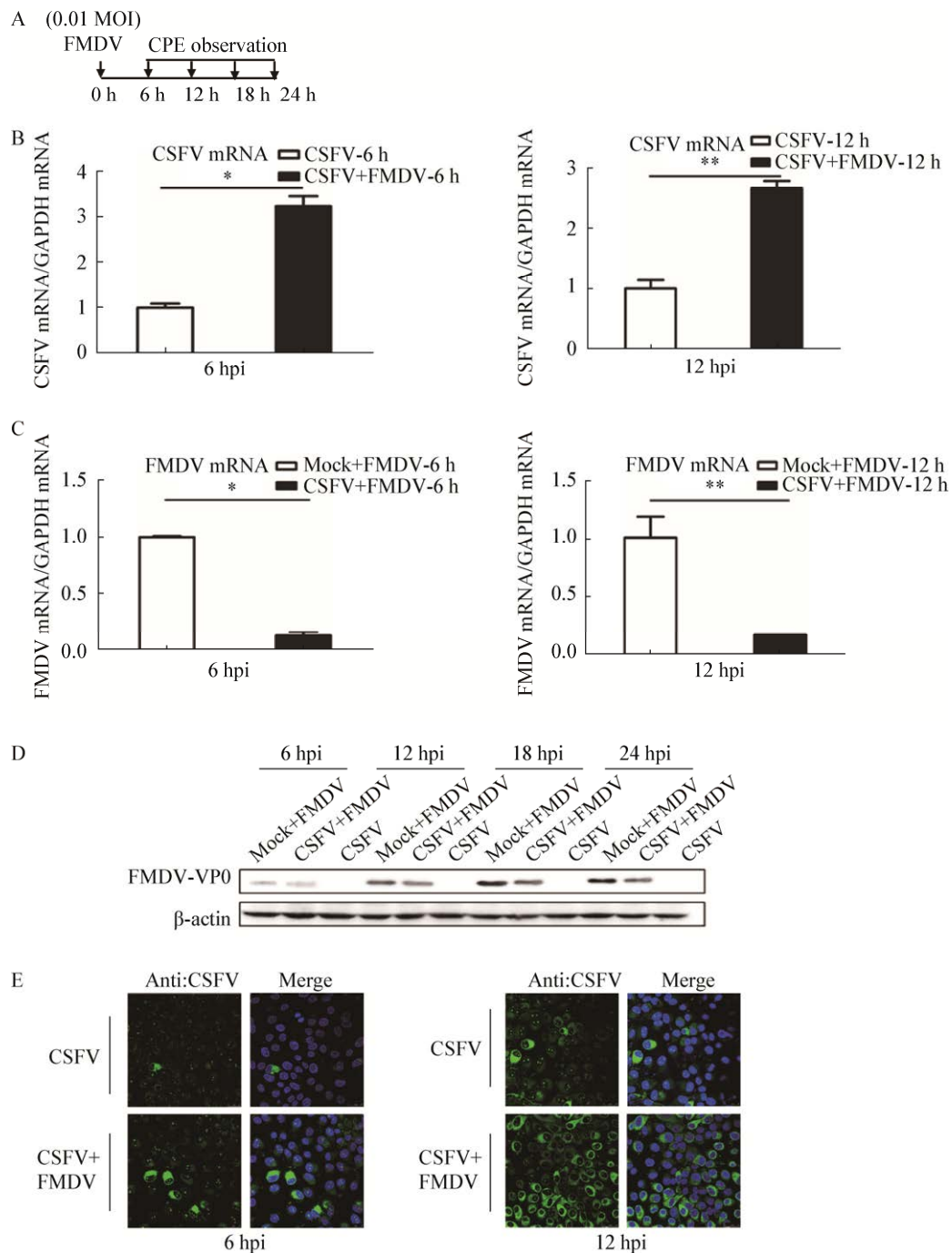


图3 CSFV-PK-15 细胞感染 FMDV 对细胞病变程度的影响

Figure 3 Evaluation of viral replication in FMDV-infected CSFV-PK-15 cells

注: A: CSFV-PK-15 感染 FMDV 的感染模式图; B、C: CSFV-PK-15 细胞接种 FMDV (0.01 MOI) 6、12 h, 收取样品, 利用 RT-qPCR 检测 CSFV mRNA 及 FMDV mRNA 水平; D: 在 FMDV 感染 6、12、18、24 h 后, 利用 Western Blot 检测 FMDV-VP0 蛋白表达量; E: FMDV 感染 6、12 h 后, 利用间接免疫荧光检测 CSFV 蛋白表达水平。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Note: A: The strategy diagram for FMDV infection in CSFV-PK-15 cells; B, C: CSFV-PK-15 cells were infected with FMDV (0.01 MOI) for 6, 12 h, CSFV mRNA and FMDV mRNA were detected by RT-qPCR; D: VP0 protein of FMDV was detected by Western Blot at 6, 12, 18, 24 h; E: The expression of CSFV protein was detected by IFA at 6, 12 h. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

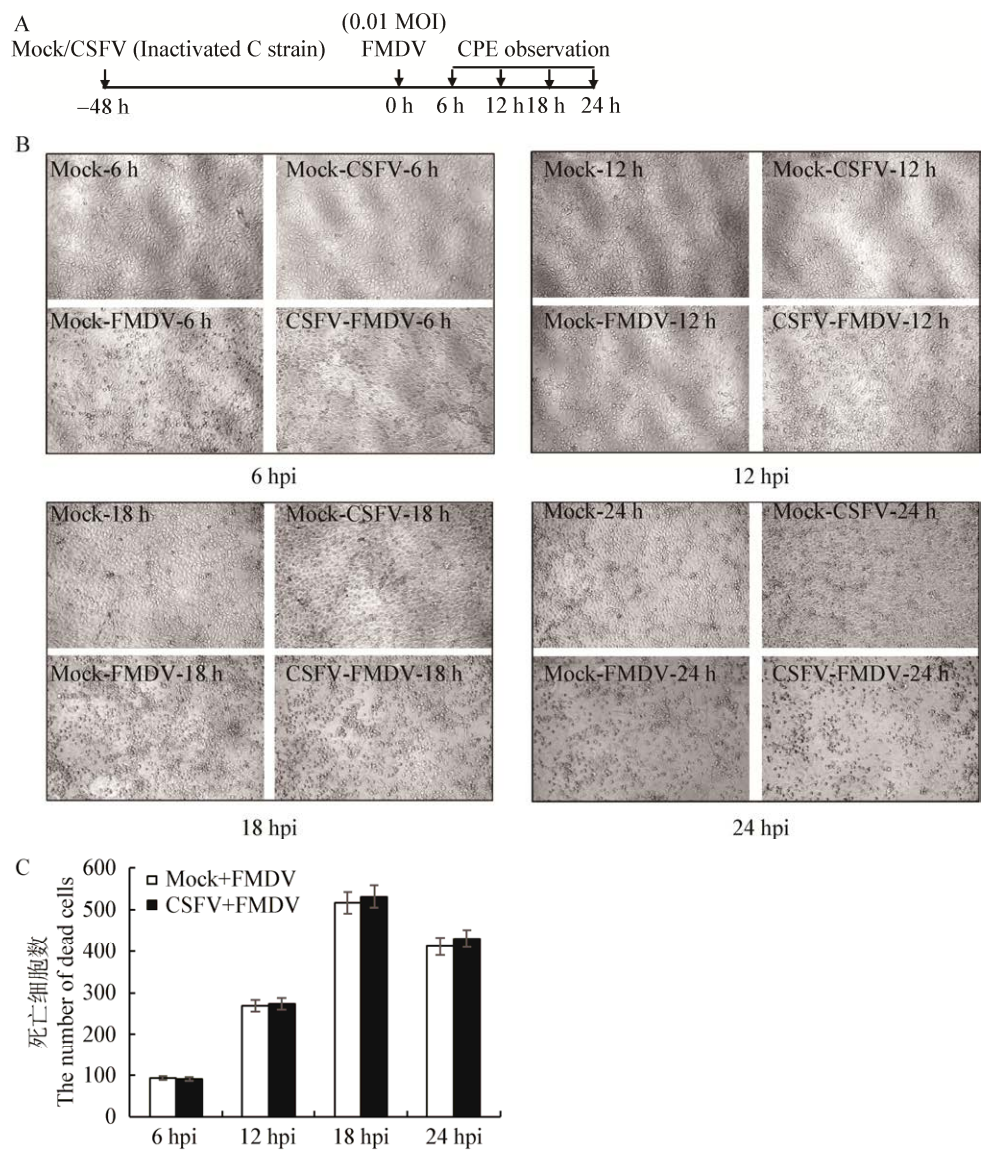


图 4 灭活 CSFV C 株共感染 FMDV 对细胞病变程度的影响

Figure 4 The effect of reinfection of FMDV with inactivated CSFV C strain on the CPE formation

注：A：灭活 CSFV 和 FMDV 共感染的感染模式图；B：灭活 CSFV 和 FMDV 共感染后，在显微镜下对各培养皿中细胞进行观察并记录，照片长度标尺为 400 μm ；C：对仅接种 FMDV 及利用灭活 CSFV 与 FMDV 共感染细胞，进行死亡细胞数计数统计分析

Note: A: The strategy diagram of mixed infection of inactivated CSFV and FMDV in PK-15 cells; B: After co-infection of CSFV with FMDV for the indicated time, the cells were observed under the microscope, and the photo length scale was 400 μm ; C: The number of dead cells were counted and compared

毒蛋白表达质粒(NS4B、NS5A、E^{ms}、C、E2、E1、NS5B、N^{pro}、NS2、NS4A、P)分别转染 PK-15 细胞，转染 24 h 后，感染 FMDV-O (0.01 MOI) 12 h 收取样品，进行 Western Blot 检测，结果表明转染 C 蛋白能够明显抑制 FMDV 表达(图 6A)。再将 C 蛋白质粒呈剂量递增转染至 35 mm

PK-15 细胞，转染 24 h 后接种 FMDV，12 h 后收取样品进行实时荧光定量 PCR 及 Western Blot 检测，结果表明 C 蛋白抑制 FMDV 复制且呈剂量依赖关系(图 6B、C)。同时按实验方法 1.2.7 操作，测定得 $\lg\text{TCID}_{50}(\text{Vec}+\text{FMDV})=-8.275\ 9$ ， $\lg\text{TCID}_{50}(\text{C}+\text{FMDV})=-6.714\ 3$ (图 6D)，结果表明 C 蛋白能够降低 FMDV

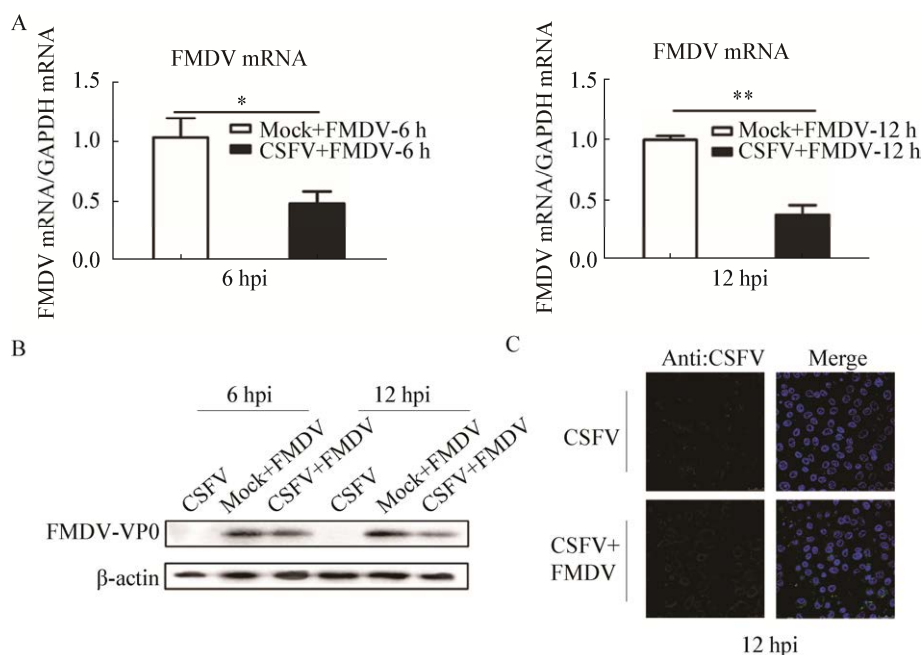


图5 灭活 CSFV C 株共感染 FMDV 对 CSFV 和 FMDV 复制的影响

Figure 5 The effect of mixed infection of inactivated CSFV C strain and FMDV on viral replication of CSFV and FMDV

注：灭活 CSFV C 株接种 PK-15 细胞 48 h 后，共感染 FMDV 6、12 h 后，收取样品。A：利用 RT-qPCR 检测 FMDV mRNA 表达水平；B：利用 Western Blot 检测 FMDV VP0 表达水平；C：利用间接免疫荧光实验检测分析 CSFV 蛋白的表达情况。*： $P < 0.05$ ；**： $P < 0.01$ 。
Note: PK-15 cells were incubated with inactivated CSFV C strain for 48 h, and were then infected FMDV for 6, 12 h. A: FMDV mRNA expression was detected by RT-qPCR; B: FMDV VP0 protein was detected by Western Blot; C: The expression of CSFV protein was detected by IFA. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

病毒滴度。说明 CSFV C 株 C 蛋白能够抑制 FMDV 复制。

3 讨论

近年来，国内外学者发现猪病毒以各种不同共感染形式侵染猪体，共感染后有的存在协同作用，有的存在相互干扰，相对于单病毒感染，可能会改变其致病能力和生命周期等，也会使临床表现变得更为复杂^[21-24]。明确 2 种病毒共感染后有何相互调控作用，对防治宿主共感染具有重要意义。本研究通过构建 CSFV-FMDV 共感染体外细胞模型，对这 2 种病毒共感染后的相互作用进行初步探索，结果发现 CSFV C 株共感染 FMDV 能够促进 CSFV 复制而抑制 FMDV 复制。显微镜下观察共感染 PK-15 的 CPE 明显加强，而单独感染 CSFV 并

不会引起 PK-15 细胞发生病变。共感染后 FMDV 蛋白和 mRNA 表达水平降低，却会加强 PK-15 的 CPE，这可能是因为 FMDV 与 CSFV C 株共感染发生协同作用改变了 CSFV 的致病性所致。对 CSFV C 株进行热灭活后共感染，结果发现热灭活 CSFV 不会引起 PK-15 细胞的 CPE 有显著变化，但仍旧对 FMDV 的复制存在抑制作用。CSFV 作为囊膜病毒，灭活对囊膜造成破坏，是无法与宿主细胞膜进行融合使病毒蛋白及病毒 RNA 基因组释放到宿主细胞内，从 IFA 结果也可看出这一点。然而，在 CSFV 不进入细胞内的情况下，依旧能够对共感染的 FMDV 存在抑制作用，这可能是因为 CSFV 在被灭活后虽然囊膜遭到破坏，但能够吸附于细胞表面，刺激宿主细胞释放某种因子对共感染的 FMDV 增殖进行调节。

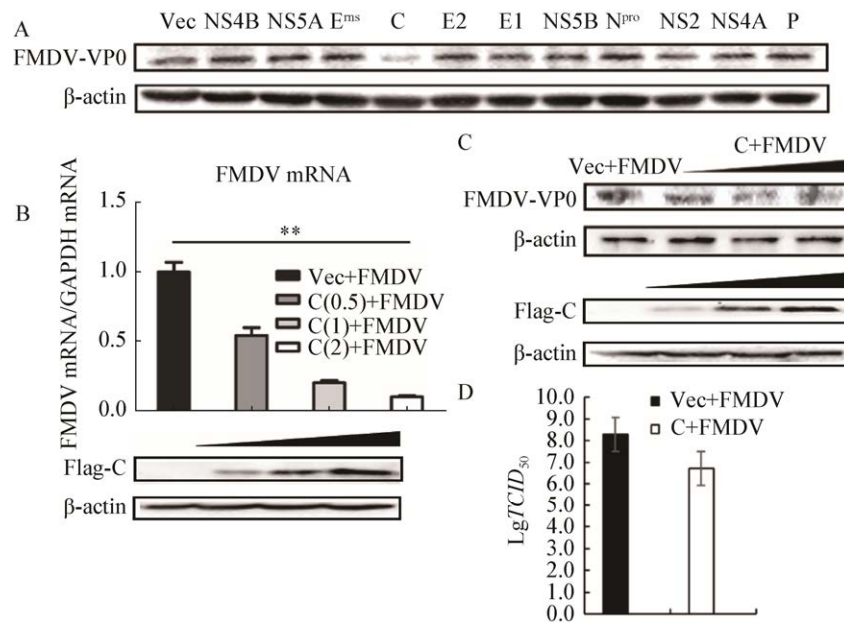


图 6 过表达 CSFV C 株 C 蛋白对 FMDV 复制的影响

Figure 6 The effect of C protein of CSFV C strain on FMDV replication

注: A: CSFV C 株各病毒蛋白质粒转染 PK-15 细胞 24 h 后, 接种 FMDV 12 h, 利用 Western Blot 检测 FMDV 复制变化; B, C: 将不同剂量 C 蛋白真核表达质粒转染 PK-15 细胞 24 h (0.5 μ g、1 μ g、2 μ g/孔)后, 接种 FMDV 12 h, 分别利用 RT-qPCR 及 Western Blot 检测 FMDV 复制水平变化; D: p3XFlag-CMV-7.1 空载体和 C 蛋白转染至 96 孔细胞培养板, 0.2 μ g/孔, 接种 FMDV 72 h, 做病毒滴度检测

Note: A: The plasmids expressing various viral proteins of CSFV C strain were transfected into PK-15 cells for 24 h, the cells were then infected with FMDV for 12 h, and FMDV VP0 protein was detected by Western Blot; B, C: C protein was transfected into PK-15 cells for 24 h (0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g/well), and then, FMDV was infected into PK-15 cells for 12 h, FMDV mRNA was detected by RT-qPCR. FMDV VP0, Flag-C were detected by Western Blot; D: The p3XFlag-CMV-7.1 empty vector and C protein were transfected into 96-well cell culture plate, 0.2 μ g/hole, FMDV was then infected into it for 72 h, were detected by tissue culture infective dose

同时有研究表明, PCV2 和 CSFV 共感染时, PCV2 介导的细胞凋亡可能是影响 CSFV 复制的主要原因^[18]。CSFV 和 FMDV 作为免疫抑制性病毒, 均可以在病毒感染过程中诱导细胞凋亡及自噬^[25-26]。因此推测, CSFV 和 FMDV 共感染对两者之间的相互作用可能与细胞凋亡有关。

同时, 本研究筛选出的 CSFV 核心蛋白 C 蛋白能够抑制 FMDV 复制, 而且通过实时荧光定量 PCR、Western Blot 检测分析进一步确认 C 蛋白对 FMDV 复制具有显著的抑制作用。核心蛋白 C 蛋白是 CSFV 的衣壳蛋白, 是基因组编码的第一个结构蛋白, 也是最小的结构蛋白, 参与调节 CSFV 活力, 同时参与转录调节。FMDV 3D 蛋白作为决定 FMDV 基因转录的关键蛋白, 推测 C 蛋白通过与

FMDV 3D 蛋白互作, 进而在转录过程中抑制其复制。影响 FMDV 复制的具体机制, 有待于进一步深入研究。

虽然关于 CSFV 和 FMDV 共感染后, CSFV 通过何种方式、何种途径去抑制 FMDV 复制尚不清楚, 但本研究初步证明 CSFV C 株共感染 FMDV 能够抑制 FMDV 复制, 同时筛选出 CSFV 核心蛋白 C 蛋白能够抑制 FMDV 复制, 这为研究 CSFV 和 FMDV 共感染的分子机制奠定了基础。

4 结论

本文首先建立了共感染 PK-15 细胞模型, 将 CSFV C 株/灭活 CSFV C 株/CSFV-PK-15 细胞与 FMDV 共感染后, 比较 PK-15 细胞病变程度进行统计学分析, 同时通过实时荧光定量、Western Blot、

间接免疫荧光检测证实二者共感染后, 能够促进 CSFV 复制但抑制 FMDV 复制, 进一步实验发现筛选出的 C 蛋白能够显著抑制 FMDV 复制且呈剂量依赖性抑制作用。

REFERENCES

- [1] Blome S, Staubach C, Henke J, Carlson J, Beer M. Classical swine fever-an updated review[J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 86
- [2] Moennig V. The control of classical swine fever in wild boar[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1211
- [3] Edwards S, Fukusho A, Lefèvre PC, Lipowski A, Pejsak Z, Roehe P, Westergaard J. Classical swine fever: the global situation[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 73(2/3): 103-119
- [4] Luo YZ, Li S, Sun Y, Qiu HJ. Classical swine fever in China: a minireview[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(1/2): 1-6
- [5] Qiu HJ, Tong GZ, Shen RX. The lapinized Chinese strain of classical swine fever virus: a retrospective review spanning half a century[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(8): 1675-1685 (in Chinese)
仇华吉, 童光志, 沈荣显. 猪瘟疫兔化弱毒疫苗: 半个世纪的回顾[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1675-1685
- [6] Li S, Wang JH, Yang Q, Anwar MN, Yu SX, Qiu HJ. Complex virus-host interactions involved in the regulation of classical swine fever virus replication: a minireview[J]. *Viruses*, 2017, 9(7): 171
- [7] Liu JJ, Wong ML, Chang TJ. The recombinant nucleocapsid protein of classical swine fever virus can act as a transcriptional regulator[J]. *Virus Research*, 1998, 53(1): 75-80
- [8] Zhou N. Proteome analysis of the coinfection of porcine circovirus Type 2 and classical swine fever virus *in vitro*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
周姝. 猪圆环病毒 2 型-猪瘟疫病毒共感染细胞的蛋白质组研究[D]. 杭州: 浙江大学博博士学位论文, 2016
- [9] Hou YZ, Zhao DT, Liu GY, He F, Liu B, Fu SY, Hao YQ, Zhang WG. Research progress in the core proteins of the classical swine fever virus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2015, 31(5): 579-584 (in Chinese)
侯玉臻, 赵丹彤, 刘国英, 贺番, 刘斌, 付绍印, 郝永清, 张文广. 猪瘟疫病毒核心蛋白研究进展[J]. *病毒学报*, 2015, 31(5): 579-584
- [10] Dong H, Li D, Chen JN, Li S, He WR, Feng S, He F, Liao YJ, Sun Y. Identification of the interaction between classical swine fever virus c protein and porcine β -actin[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2014, 45(12): 1995-1999 (in Chinese)
董泓, 李丹, 陈佳宁, 李素, 何文瑞, 冯烁, 贺番, 廖亚金, 孙元. 猪瘟疫病毒 C 蛋白与宿主 β -actin 相互作用的鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(12): 1995-1999
- [11] Murphy MLP, Forsyth MA, Belsham GJ, Salt JS. Localization of foot-and-mouth disease virus RNA by *in situ* hybridization within bovine tissues[J]. *Virus Research*, 1999, 62(1): 67-76
- [12] Thomson GR, Vosloo W, Bastos ADS. Foot and mouth disease in wildlife[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 145-161
- [13] Jamal SM, Belsham GJ. Foot-and-mouth disease: past, present and future[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 116
- [14] Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, Lu Z, Carreno A, Vagnozzi A, Kutish GF, Rock DL. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(10): 6487-6504
- [15] VanderWaal K, Deen J. Global trends in infectious diseases of swine[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(45): 11495-11500
- [16] Zhang YD, Wang JK, Zhang Q. Study on the immune suppression caused by classical swine fever virus[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2009, 48(6): 1519-1522 (in Chinese)
张云德, 王建科, 张强. 猪瘟疫病毒引起免疫抑制的研究[J]. *湖北农业科学*, 2009, 48(6): 1519-1522
- [17] Pulido MR, Sáiz M. Molecular mechanisms of foot-and-mouth disease virus targeting the host antiviral response[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 252
- [18] Zhou N, Xing G, Zhou JW, Jin YL, Liang CQ, Gu GY, Hu BL, Liao M, Wang Q, Zhou JY. *In vitro* coinfection and replication of classical swine fever virus and porcine circovirus Type 2 in PK15 Cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139457
- [19] Wang Z, Lu Y, Zhou PC, Zhai ZH, Ding MX. The morphological structure of Classical Swine Fever Virus and some characteristics of its multiplication[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(3): 189-195 (in Chinese)
王镇, 陆宇, 周鹏程, 翟中和, 丁明孝. 猪瘟疫病毒在 PK 细胞和 MPK 细胞中繁殖过程的研究[J]. *微生物学报*, 1999, 39(3): 189-195
- [20] Wang Q, Tu CC. Classical Swine Fever[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 5 (in Chinese)
王琴, 涂长春. 猪瘟疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 5
- [21] Gu SL, Gao L, Rong JG, Wu DL, Cai H, Li C. Studies on mixed infection of viruses by electron microscopy[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2000, 19(3): 331-332 (in Chinese)
谷守林, 高磊, 荣骏弓, 吴东来, 蔡虹, 李成. 应用电镜技术对病毒混合感染的研究[J]. *电子显微学报*, 2000, 19(3): 331-332
- [22] Cecere TE, Meng XJ, Pelzer K, Todd SM, Beach NM, Ni

- YY, LeRoith T. Co-infection of porcine dendritic cells with porcine circovirus type 2a (PCV2a) and genotype II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells *in vitro*[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 160(1/2): 233-239
- [23] Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, Ellis JA, Connor TJ, McNair I, Krakowka S, Kennedy S. A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation[J]. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 2000, 47(2): 81-94
- [24] Dobrescu I, Levast B, Lai K, Delgado-Ortega M, Walker S, Banman S, Townsend H, Simon G, Zhou Y, Gerdts V, Meurens F. *In vitro* and *ex vivo* analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 169(1/2): 18-32
- [25] Ma SM, Mao Q, Yi L, Zhao MQ, Chen JD. Apoptosis, autophagy, and pyroptosis: immune escape strategies for persistent infection and pathogenesis of classical swine fever virus[J]. Pathogens, 2019, 8(4): 239
- [26] Fan XX, Gao Y, Guo HC, Sun SQ. Foot and mouth disease virus induced autophagy in PK-15 cells[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(16): 160-163 (in Chinese)
- 范许许, 郜原, 郭慧琛, 孙世琪. 口蹄疫病毒诱导 PK-15 细胞发生自噬的研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(16): 160-163

2021 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-2)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
12	第 18 届全国微生物学教学和科研及成果产业化学术研讨会	中国微生物学会普通微生物学专业委员会、微生物教学工作委员会	2021 年 7 月	200	贵州 贵阳	翁庆北 15285912021
13	全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	2021 年 8 月	500	广东 广州	欧阳浩森 010-64807420
14	第十八届全国微生物培养基学术研讨会	中国微生物学会生物制品专业委员会	2021 年 8 月	70	福建 漳州	赵贵明 13701210443
15	干扰素与细胞因子产业化新进展	中国微生物学会干扰素与细胞因子专业委员会	2021 年 8 月	200	浙江 杭州	倪健 13818096617
16	医学真菌学基础知识提高班	中国微生物学会真菌学专业委员会	2021 年 8 月	50	北京	宋营改 18311041378
17	人兽共患病学术交流研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	2021 年 8-9 月	200	待定	蒋毅 13520419382
18	第十二届中国临床微生物学大会暨《医学参考报》微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	2021 年 9 月	500	陕西 西安	吕宝霞 0574-87035856
19	第十二届青年微生物学工作者学术研讨会	中国微生物学会普通微生物学专业委员会	2021 年 9 月 11-12 日	300	山东 青岛	李越中 李盛英 13583118964 15066181927
20	第十四届全国病毒学研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	2021 年 10 月	1 000	湖北 武汉	吴莹 15901455682
21	2021 猪瘟国际学术研讨会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	2021 年 10 月	150	北京	朱良全 丁家波 010-62103675
22	第三届微生物及昆虫转化有机废弃物研究与应用国际研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	2021 年 10 月	150-200	湖北 武汉	张吉斌 zhangjb@mail.hzau.edu.cn