

研究报告



猪流行性腹泻病毒经其附属蛋白抑制细胞凋亡

王晨阳^{1,2} 司伏生^{2,3} 于瑞嵩^{2,3} 谢春芳^{2,3} 董世娟^{2,3} 宋增福¹ 李震^{*2,3}

1 水产科学国家级实验教学示范中心(上海海洋大学) 上海 201306

2 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106

3 上海农业遗传育种重点实验室 上海 201106

摘要:【背景】*orf3* 位于猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) *s* 基因与 *e* 基因之间,是目前发现的 PEDV 唯一一个附属基因,编码附属蛋白(ORF3 蛋白)。我们前期研究初步发现 ORF3 蛋白对 PEDV 诱导的细胞凋亡有影响。【目的】研究 ORF3 蛋白在 PEDV 侵染复制过程中的毒力作用机制。【方法】实验用 3 种 PEDV: rDR13^{att}-ΔORF3 (*orf3* 基因全部敲除)、DR13-ORF3^{att} (携带有 C 端截短 *orf3*)、rDR13^{att}-ORF3^{wt} (携带全长 *orf3* 基因)感染 Vero 细胞,观察病变情况,再用活细胞成像仪、流式细胞仪、DNA 断裂的原位末端标记法[terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL]等方法检测不同感染时间点的细胞凋亡情况,然后用蛋白质印迹方法分析 PEDV 感染宿主细胞中主要凋亡相关蛋白(如 Caspase-3)的活化或裂解,最后进行转录组测序研究病毒感染细胞中差异基因的表达情况,再用荧光定量 PCR 验证转录组结果。【结果】rDR13^{att}-ΔORF3 引起较多的细胞病变,活细胞成像仪的动态观察结果显示,3 种病毒侵染的细胞凋亡水平随着时间的延长均高于正常阴性细胞,但敲除 *orf3* 的病毒感染细胞后细胞凋亡率比其他两种病毒更高;敲除 *orf3* 病毒感染细胞凋亡率显著高于其他两种病毒;病毒 rDR13^{att}-ΔORF3 感染细胞后 TUNEL 阳性细胞数比 DR13-ORF3^{att} 和 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 更多;表达 ORF3 蛋白的重组 PEDV 可以抑制 Caspase-3 的活化;ORF3 蛋白对受感染细胞 Heat shock 70 kD protein 1B (HSP70)基因转录有促进作用,荧光定量 PCR 结果表明 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 感染细胞的 HSP70 表达量高于 rDR13^{att}-ΔORF3 感染细胞。【结论】PEDV 通过 ORF3 蛋白抑制细胞凋亡,而且这种作用可能是通过抑制 Caspase-3 的活化或增加 HSP70 的产生来完成的。

关键词: 猪流行性腹泻病毒, 附属 ORF3 蛋白, 功能, 抑制, 细胞凋亡

Foundation items: Shanghai Key Project on Agricultural Development (2015-6-1-9); National Natural Science Foundation of China (31572519); National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

Received: 10-02-2020; **Accepted:** 13-04-2020; **Published online:** 09-05-2020

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字[2015]第 6-1-9 号); 国家自然科学基金(31572519); 国家重点研发计划(2016YFD0500101)

***通信作者:** Tel: 021-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

收稿日期: 2020-02-10; **接受日期:** 2020-04-13; **网络首发日期:** 2020-05-09

Porcine epidemic diarrhea virus inhibits cellular apoptosis via their accessory protein

WANG Chen-Yang^{1,2} SI Fu-Sheng^{2,3} YU Rui-Song^{2,3} XIE Chun-Fang^{2,3}
DONG Shi-Juan^{2,3} SONG Zeng-Fu¹ LI Zhen^{*2,3}

1 National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China

2 Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

3 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

Abstract: [Background] *orf3* is located between the *s* and *e* genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) genome. It is the only accessory gene found in PEDV and encodes the ORF3 protein. Our earlier study showed that the ORF3 protein might have an effect on cell apoptosis induced by PEDV infection. [Objective] To study the virulence mechanism of ORF3 protein in the process of PEDV infection and replication. [Methods] Vero cells were infected with 3 different PEDVs, namely rDR13^{att}-ΔORF3 (with *orf3* deleted from the genome), DR13-ORF3^{att} (with a N-terminal 92 aa truncated *orf3*) and rDR13^{att}-ORF3^{wt} (with full length *orf3*). We observed cell pathogenic effect (CPE). Then different methods such as live cell imager, flow cytometry, TUNEL assay were used for apoptosis analysis of the cells at different time points of infection. Analysis of major apoptosis-related protein such as the cleaved Caspase-3 was also carried out by Western blotting in PEDV-infected cells. Finally, transcriptome sequencing was used to study the differential expression genes within the cells infected by the different viruses. Transcriptome results were further verified by real-time PCR. [Results] rDR13^{att}-ΔORF3 induced more CPEs in the infected cells than the other two viruses. Dynamic observation results of live cell imager showed all the three viruses induced obvious apoptosis in the infected cells. However, higher apoptotic level was detected in the cells infected with rDR13^{att}-ΔORF3 than the cells infected by the other two viruses ($P < 0.05$). The flow cytometry also checked the apoptotic difference with the cells infected with the viruses: higher proportion of apoptotic cells among the cells infected with rDR13^{att}-ΔORF3. The result was further confirmed by terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. There are more TUNEL staining cells among the cells infected with rDR13^{att}-ΔORF3 than the cells infected by the other two viruses. The result of Western blotting showed rDR13^{att}-ORF3^{wt} can inhibit Caspase-3 activation in the infected cells. Transcriptome analysis found there was a significantly higher-level heat shock 70 kD protein 1B (HSP70) transcription in cells infected with rDR13^{att}-ORF3^{wt} than in the cells infected with rDR13^{att}-ΔORF3. Real-time PCR showed the expression of HSP70 in cells infected by rDR13^{att}-ORF3^{wt} was higher than that of rDR13^{att}-ΔORF3. [Conclusion] ORF3 protein inhibited cellular apoptosis induced by porcine epidemic diarrhea virus infection. The effect may be through inhibition of Caspase-3 activation (cleavage) or promotion of HSP70 expression.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea virus, Accessory ORF3 protein, Function, Inhibition, Apoptosis

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是目前威胁全世界养猪业的主要肠道病原体之一。从 2010 年开始,猪流行性腹泻在中国大规模暴发,造成非常严重的经济损失。PEDV 的感染,特别是在新生仔猪中会导致严重的腹泻、脱水和死亡^[1-2]。PEDV 属于冠状病毒科 α 冠

状病毒属,是一种大型的包膜病毒,具有约 28 kb 的单链正链 RNA 基因组,可编码病毒复制酶多蛋白(pp1a 和 pp1ab)、刺突(S)、附属蛋白(ORF3)、包膜(E)、膜(M)和核衣壳(N)蛋白。

orf3 位于 PEDV 基因组中 *s* 基因与 *e* 基因之间,是目前发现的 PEDV 唯一的附属基因,编码

224 个氨基酸约为 25 kD 的蛋白质,但是在适应细胞培养的 PEDV 中该基因容易发生 49–51 个核苷酸的缺失突变^[3-4],导致翻译终止在 274 核苷酸处,产生一个由 92 个氨基酸组成的自然截短的 ORF3 蛋白,称为 ORF3^{att},携带该基因的毒株比较典型的是弱毒的 DR13 (本研究中命名为 DR13-ORF3^{att})。另一类型的 *orf3* 突变体存在于 PEDV 85-7 和 AVCT12 株中,在其 5'端有 30 个核苷酸的缺失,导致截短的 ORF3 蛋白在其 N 端缺失了 70 个残基^[5-6]。携带更长缺失 *orf3* 的野外分离株也有文献报道^[7]。

有文献报道 PEDV 感染后在体外和体内均可诱导细胞凋亡^[8];有数据表明,Caspase-3 参与 PEDV 诱导的细胞凋亡^[8-9];S1 基因表达产物是诱导细胞凋亡的关键蛋白;也有文献报道,瞬时转染过表达 ORF3 蛋白后对细胞凋亡没有影响^[9]。在我们早期利用携带不同 *orf3* 的重组 PEDV 所进行的 ORF3 蛋白功能研究^[10]中,发现携带 *orf3* 的重组病毒所致细胞病变要轻于不携带该基因的重组病毒,因此推测 ORF3 蛋白对于 PEDV 感染后的细胞状态和凋亡有影响。本研究利用携带 3 种不同 *orf3* 基因的 PEDV 感染细胞,用多种方法,如活细胞成像、流式细胞术、DNA 断裂的原位末端标记法[terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL]和转录组分析等研究 ORF3 蛋白与病毒诱导细胞凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与毒株

非洲绿猴肾细胞(Vero)、PEDV DR13 弱毒株(GenBank 登录号为 JQ023162)、以 PEDV DR13 弱毒株(GenBank 登录号为 JQ023162)为骨架,*orf3* 缺失的重组 PEDV rDR13^{att}-ΔORF3 和 *orf3* 被 PEDV DR13 强毒株 *orf3* (ORF3^{wt})替换的重组 PEDV rDR13^{att}-ORF3^{wt},均为本实验室构建,其构建和拯救方法参考文献[10]。

1.1.2 主要试剂和仪器

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD 公司;山羊封闭血清,北京索来宝生物有限公司;兔抗 GAPDH、DAPI 和 Alexa Flour 647 标记羊抗兔 IgG,上海碧云天生物技术有限责任公司;兔抗 PEDV S 蛋白 IgG 和兔抗 ORF3 IgG 为实验室保存;Alexa Flour 594 标记羊抗兔 IgG,赛默飞世尔科技有限公司;Cleaved Caspase-3(Asp175)(5A1E) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG,生工生物工程(上海)股份有限公司;TUNEL 试剂盒,南京诺唯赞生物科技有限公司;Easstep® Super 总 RNA 提取试剂盒,上海普洛麦格生物有限公司。

正置显微镜,卡尔 ZEISS 公司;显微镜, Nikon Corporation 公司;流式细胞仪, BD 公司;细胞成像仪, BioTek 公司;全自动细胞计数分析仪, Nexcelom 公司;凝胶电泳仪、半干转膜仪, Bio-Rad 公司;ChemiScope 6200T 成像仪, Clinx 科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒感染后观察细胞病变

Vero 细胞以 1.5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板, CO₂ 培养箱 37 °C 培养 24 h;病毒 rDR13^{att}-ΔORF3、DR13-ORF3^{att} 和 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.5 感染 Vero 细胞, 37 °C 吸附 1 h 后弃病毒接种液, PBS 洗 2 次, 每孔加入 2 mL DMEM 培养液继续培养 24 h;显微镜下观察并采集图像。

1.2.2 免疫荧光(immunofluorescence, IFA)

Vero 细胞以 1.5×10^5 个/mL 的细胞密度接种于爬片上, CO₂ 培养箱 37 °C 培养 24 h; PEDV 病毒 rDR13^{att}-ΔORF3、DR13-ORF3^{att} 和 PEDV rDR13^{att}-ORF3^{wt} 以 MOI 为 1 和 0.5 感染 Vero 细胞, 37 °C 吸附 1 h 后弃病毒接种液, PBS 洗 2 次, 每孔加入 2 mL DMEM 培养液继续培养 24 h 后免疫荧光分析。具体步骤: PBS 洗 2 次, 用 4%多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗 3 次, 每孔加入 200 μL 0.1%

Triton X-100, 15 min后弃0.1% Triton X-100, 以封闭液(5%羊血清)洗1次, 每孔加入200 μ L封闭液室温封闭1 h; 以兔抗S蛋白IgG (1:200)或兔抗ORF3多抗为一抗(1:50)室温孵育1 h, 用含0.1% 吐温-20的PBS洗3次; 以Alexa Flour 594标记羊抗兔IgG (1:50)或Alexa Flour 647标记的山羊抗兔IgG (1:14)为二抗孵育1 h, PBST洗3次, 用DAPI (1:1 000)复染核, 常温下孵育15 min, PBS洗3次, 洗去多余的DAPI, 再用双蒸水漂洗1次, 洗去表面的盐分, 避光风干后封片, 荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.3 活细胞成像

在96孔板中的90%融合Vero细胞中接种rDR13^{att}-ORF3^{wt}、DR13-ORF3^{att}和rDR13- Δ ORF3(MOI为0.1), 用Annexin V-FITC/PI染料在8、16、24、32、40、48和56 hours post infection (h.p.i.)分析细胞凋亡。具体方法为: 在接种后的每个时间点, 在每个孔中加入Annexin V-FITC/PI混合溶液。检测标记有绿色荧光(Annexin V 阳性)或红色荧光(PI 阳性)的细胞, 并分别通过细胞成像多模式阅读器和Gene 5软件进行计数。在测试中, 未标记的细胞被分类为正常存活; 仅标记为绿色荧光的细胞被分类为早期凋亡; 仅标记为红色荧光的细胞被分类为坏死; 具有双重荧光标记的细胞被归为晚期凋亡。

1.2.4 流式细胞术

Vero细胞以 1.5×10^5 个/mL的细胞密度接种于6孔板, CO₂培养箱37 °C培养24 h; 病毒rDR13^{att}- Δ ORF3、DR13-ORF3^{att}和PEDV rDR13^{att}-ORF3^{wt}以MOI为5感染Vero细胞, 37 °C吸附1 h后弃病毒接种液, PBS洗2次, 每孔加入2 mL DMEM液培养液; 分别在18 h和24 h终止感染, 胰酶消化, 收集细胞, 加入100 μ L Binding buffer悬浮细胞; 再加入5 μ L AnnexinV-FITC和5 μ L 碘化丙啶(PI)混匀, 室温避光15 min, 用流式细胞仪进行检测。

1.2.5 TUNEL

病毒rDR13^{att}- Δ ORF3、DR13-ORF3^{att}和PEDV rDR13^{att}-ORF3^{wt}以MOI为3感染Vero细胞, 37 °C吸附1 h后弃病毒接种液, PBS洗2次, 每孔加入2 mL DMEM培养液; 感染24 h, 终止感染, 按照TUNEL说明书对细胞进行处理: 用4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS洗2次, 0.2% Triton X-100室温孵育5 min, PBS洗2次, 以兔抗S多抗为一抗(1:200)孵育1 h, PBS洗3次, 标记液里混入Alexa Flour 594标记山羊抗兔(1:30), 黑暗室温条件下孵育1 h, PBS洗3次, DAPI (1:1 000)染核, 常温下孵育15 min, PBS洗3次, 洗去多余的DAPI, 再用双蒸水漂洗1次, 洗去表面的盐分, 封片后4 °C避光保存过夜, 荧光显微镜下观察并采集图像。

显微镜下观察, DAPI染核为蓝色, TUNEL细胞核染色成绿色, PEDV S蛋白染色成红色, 3种颜色叠加的细胞为TUNEL染色阳性的凋亡细胞, 随机计数3个视野中TUNEL染色阳性细胞数和总细胞数^[11], 计算阳性细胞百分比, 进行差异性统计分析。

1.2.6 SDS-PAGE及Western blotting

Vero细胞以 1.5×10^5 个/mL的细胞密度接种于6孔板, CO₂培养箱37 °C培养24 h; 病毒rDR13^{att}- Δ ORF3、DR13-ORF3^{att}和PEDV rDR13^{att}-ORF3^{wt}以MOI为0.1感染Vero细胞, 37 °C吸附1 h后弃病毒接种液, PBS洗2次, 每孔加入2 mL DMEM培养液, 感染48 h终止; 处理细胞制成蛋白样品, 进行SDS-PAGE及Western blotting检测。SDS-PAGE结束后将蛋白以12 V恒压半干转移65 min至PVDF膜上, 转印膜以10%的脱脂奶粉封闭5 h, 加入一抗[cleaved Caspase-3(Asp175)(5A1E) Rabbit mAb, 1:1 000或GAPDH, 1:2 000]4 °C孵育过夜, TBST洗3次, 二抗(HRP标记山羊抗兔IgG, 1:10 000)室温孵育1 h, TBST洗4次, ECL显色, 化学发光CCD成像系统显影。

1.2.7 转录组测序

Vero 细胞以 1.5×10^5 个/mL 的细胞密度接种于 6 孔板里, CO₂ 培养箱 37 °C 培养 24 h; 病毒 rDR13^{att}-ΔORF3 和 PEDV rDR13^{att}-ORF3^{wt} 以 MOI 为 5 感染 Vero 细胞, 37 °C 吸附 1 h 后弃病毒接种液, PBS 洗 2 次, 每孔加入 2 mL DMEM 培养液, 感染 12 h 终止; 每个样本做 3 个重复, 按 Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒说明处理细胞, 提取 RNA, 将总 RNA 送至广州基迪奥生物科技有限公司测序, 在样本符合转录组测序要求之后进行后续操作。

1.2.8 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 所使用的 RNA 样品与转录组测序所使用的 RNA 样品为相同样品, 一直在 -80 °C 冰箱保存, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行荧光定量 PCR, 每个样品均做了 3 次重复, 确保实验结果的准确性。其中, 扩增管家基因 (GAPDH) 的引物是 qF2 (5'-GTGAAGGCTGAGAA CGGGAA-3') 和 qR2 (5'-AAATGAGCCCCAGCCT TCTC-3'), 扩增产物为 158 bp, 目的基因 (Hsp70) 引物是 Fn (5'-CATCAGCCAGAACAAGCGAG-3') 和 Rn (5'-CCTGGTGATGGACGTGTAGAAG-3'), 扩增产物为 142 bp。cDNA 样品作为模板稀释 10 倍, PCR 反应体系 (20 μL): 2×Master Mix 10 μL, 引物 F 和引物 R (10 μmol/L) 各 0.4 μL, Template

(cDNA) 2 μL, ddH₂O 7.2 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 个循环, 扩增程序结束; 进行溶解曲线分析, 从 72 °C 到 95 °C 50 s, 之后降至 60 °C 1 min, 然后温度逐渐上升至 95 °C, 每升高 0.3 °C 用时 15 s 采集一个点, 最后 95 °C 再持续 10 s。

1.3 数据分析

每个实验均重复 3 次, 采用 SPSS 19.0 对所得数据统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 转录组测序每组样本做 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 细胞病变差异

以 MOI 为 0.5 的 3 种 PEDV 感染 Vero 细胞 24 h 后通过普通显微镜观察各孔细胞病变 (cell pathogenic effect, CPE), 图 1 结果显示感染 rDR13^{att}-ΔORF3 的细胞病变明显比 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 和 DR13-ORF3^{att} 多。因为 3 种病毒具有相同的遗传背景, 推测敲除 *orf3* 后引起严重的细胞病变可能与 ORF3 蛋白抑制细胞凋亡有关。

2.2 病毒 S 蛋白和 ORF3 蛋白的表达

为了确认上述 CPE 的形成是由 PEDV 感染造成的, 检测了感染后细胞内病毒主要抗原的表达情况。3 种 PEDV 感染 Vero 细胞 24 h 后终止感染, 免疫荧光检测 PEDV S 蛋白和 ORF3 蛋白的表达。结果显示, 感染后 24 h PEDV S 蛋白能在所有被感

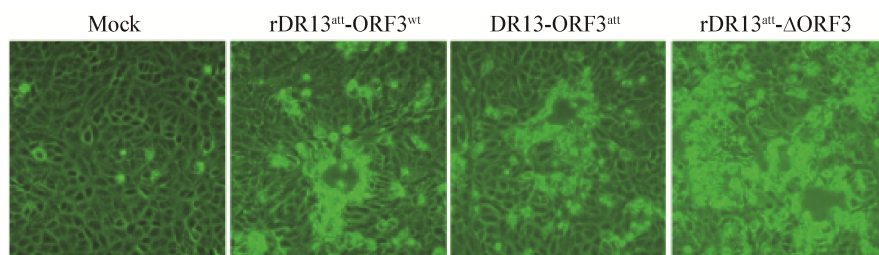


图 1 不同 PEDV 感染细胞 24 h 后的细胞病变

Figure 1 Cell pathogenic effect (CPE) in the cells infected with the viruses at 24 h.p.i.

注: 病毒以 MOI 为 0.5 感染 Vero 细胞, 感染 24 h 后采集图像 (200×).

Note: The cells were infected by the viruses at an MOI of 0.5, and images were collected 24 hours after infection (200×).

染的细胞内表达(图 2)。此外,除 rDR13^{att}-ΔORF3 感染组外,ORF3 蛋白也都能在被感染的细胞内表达(图 3)。这些结果证实 3 种病毒能够成功感染 Vero 细胞。

2.3 感染后不同时期的细胞凋亡与坏死

取 3 种 PEDV (rDR13^{att}-ORF3^{wt}、DR13-ORF3^{att} 和 rDR13^{att}-ΔORF3) 以 MOI 为 0.1 感染 Vero 细胞,在感染后不同时间点进行活细胞染色后对细胞凋亡程度(早期凋亡、晚期凋亡和坏死细胞)进行分析,发现与 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 相比, rDR13^{att}-ΔORF3 感染细胞 16 h 后早期凋亡显著增加(图 4A),在感染后 32 h 显著出现晚期凋亡,持续到感染后 48 h (图 4B); 比较细胞坏死程度发现, rDR13^{att}-ΔORF3 感染后细胞坏死程度更严重(图 4C)。该结果初步表明, ORF3 蛋白对 PEDV 感染后的细胞凋亡程度具有保护作用。

2.4 细胞凋亡种类

为了进一步证实上述结果,采用流式细胞术检测不同时间的细胞凋亡百分比。结果显示, rDR13^{att}-ΔORF3 感染的细胞与 rDR13^{att}-ORF3^{wt}、DR13-ORF3^{att} 相比,早期凋亡和晚期凋亡细胞比例更高,随着感染时间的延长,晚期凋亡差异更加显著(图 5A、B)。该结果进一步证明 ORF3 蛋白能够抑制细胞凋亡。

2.5 细胞凋亡形态

为了在形态学上验证以上结果,用 TUNEL 检测 PEDV 不同毒株感染的细胞凋亡情况。发现几种病毒诱导感染细胞发生凋亡,表现为细胞皱缩、产生凋亡小体,且发现 rDR13^{att}-ΔORF3 TUNEL 阳性细胞数显著高于 DR13-ORF3^{att} 和 rDR13^{att}-ORF3^{wt} ($P \leq 0.01$) (图 5C、D)。

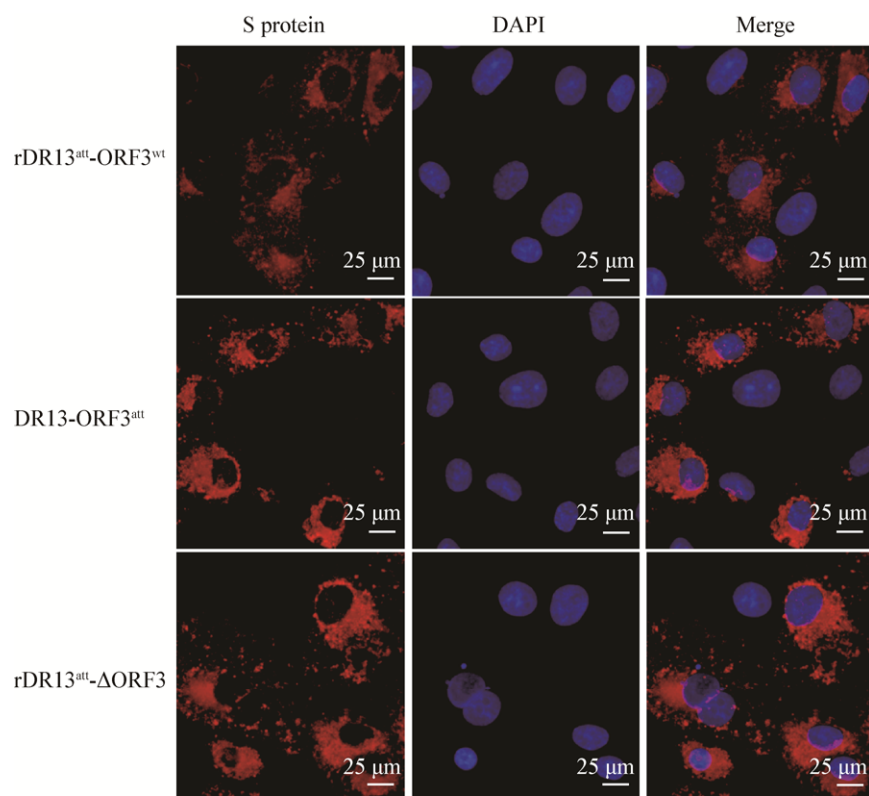


图 2 细胞感染不同 PEDV 后 S 蛋白的免疫荧光照片(400×)

Figure 2 IFA analysis of PEDV S protein in the cells infected with the different viruses (400×)

注: PEDV 感染细胞 24 h, MOI=1.

Note: The cells were infected by the viruses for 24 h, MOI=1.

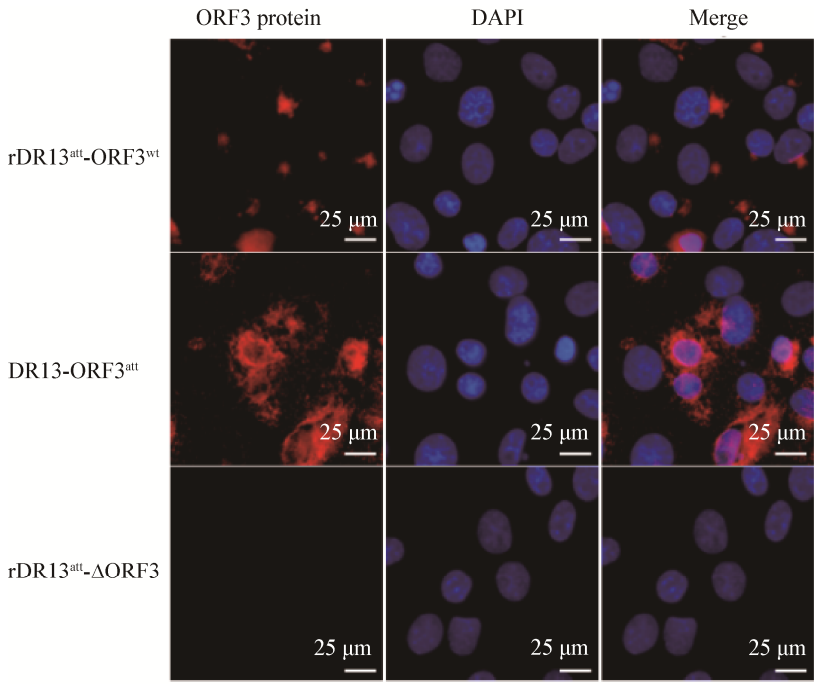


图 3 细胞感染不同 PEDV 后 ORF3 蛋白的免疫荧光照片(400×)
Figure 3 IFA analysis of PEDV ORF3 protein in the cells infected with the different viruses (400×)
注: PEDV 感染细胞 24 h, MOI=0.5.
Note: The cells were infected by the viruses for 24 h, MOI=0.5.

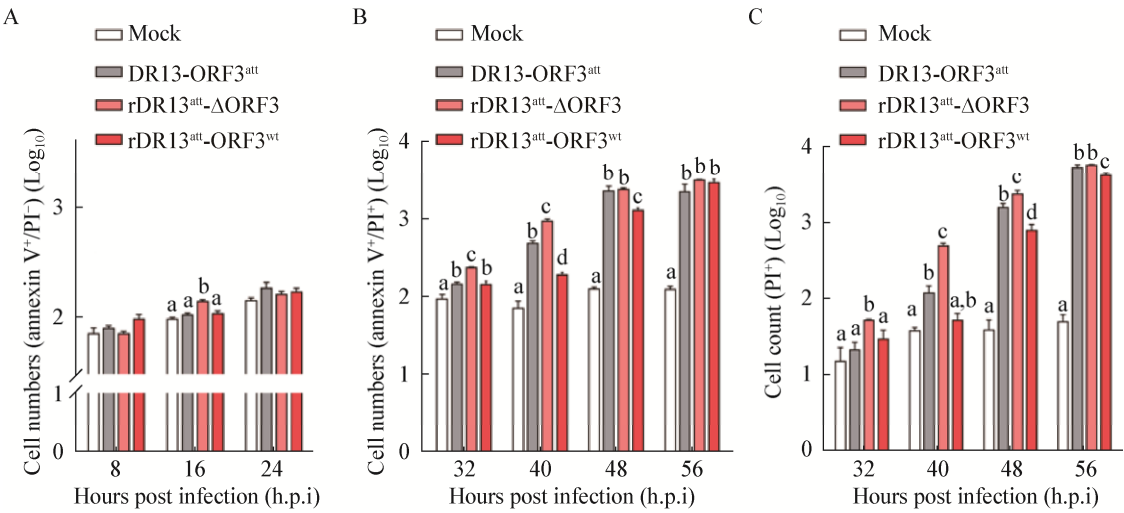


图 4 活细胞成像检测 PEDV 感染 Vero 细胞的早期凋亡(A)、晚期凋亡(B)和坏死细胞数(C)
Figure 4 Detection of the early apoptosis (A), late apoptosis (B) and the number of necrotic cells (C) in PEDV-infected Vero cells with live cell imaging
注: 病毒以 MOI 为 0.1 感染细胞, 图中字母相同代表差异不显著, 字母不同代表差异显著($P<0.05$).
Note: The cells were infected by the viruses at an MOI of 0.1. In the figures, the same letters represent no significant difference, and different letters represent significant differences ($P<0.05$).

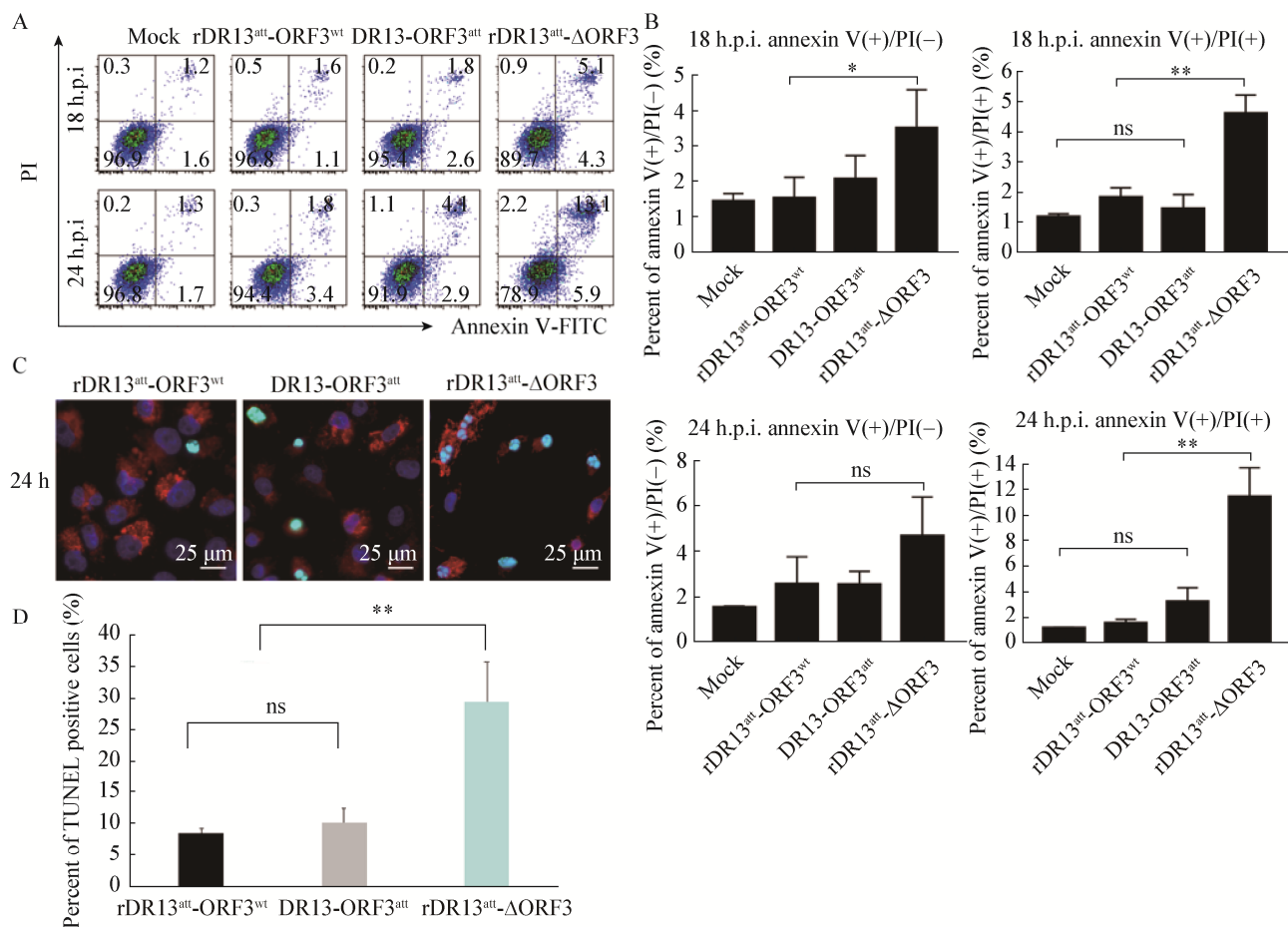


图5 不同 PEDV 病毒感染 Vero 细胞后凋亡指标检测

Figure 5 Apoptosis check of cells infected with the different PEDVs

注: A: 流式检测结果, 病毒以 MOI=5 感染细胞; B: 不同时间点流式结果用柱状图表示, *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P\leq 0.01$); C: 不同 PEDV 病毒感染 Vero 细胞后 TUNEL 染色, 病毒以 MOI=3 感染细胞, 感染 24 h 后处理细胞, 采集图像 (25 μ m, 400 \times); D: TUNEL 阳性细胞数百分比柱状图, **表示差异极显著($P\leq 0.01$).

Note: A: Flow detection results, the cells were infected by the viruses at MOI of 5; B: Histogram presentation of flow results at different time points, * indicates that the difference is significant ($P<0.05$), ** indicates that the difference is extremely significant ($P\leq 0.01$); C: TUNEL staining of cells infected with the different PEDVs, the cells were infected by the viruses at MOI of 3 for 24 h, then cells were treated for image capturing (25 μ m, 400 \times); D: Percent presentation of TUNEL positive cells infected by the viruses, ** indicates that the difference is extremely significant ($P\leq 0.01$).

2.6 细胞中 Caspase 蛋白活化

为了研究 ORF3 蛋白是否对 Caspase-3 的活化 (裂解 Caspase-3) 产生影响, 检测了 PEDV 感染后裂解 Caspase-3 的产生水平。检测结果表明, 与阴性对照相比, rDR13^{att}-ORF3^{wt}、DR13-ORF3^{att}、rDR13^{att}-ΔORF3 感染 Vero 细胞后, 细胞内裂解 Caspase-3 的产生水平显著提高 (图 6), 但 rDR13^{att}-ΔORF3 感染细胞中裂解 Caspase-3 的产生水平为最高。该结果表明, ORF3 蛋白对裂解 Caspase-3 的产生可能有一定的抑制作用 (图 6)。

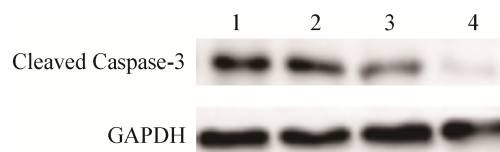


图6 Western blotting 检测病毒感染细胞后裂解 Caspase-3 的表达

Figure 6 Western blotting detected the expression of cleaved Caspase-3 in cells infected with the different PEDVs

注: 病毒以 MOI 为 0.1 感染细胞 48 h, 收取蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 得到蛋白条带。1: rDR13^{att}-ΔORF3; 2: DR13-ORF3^{att}; 3: rDR13-ORF3^{wt}; 4: Mock。

Note: The cells were infected by the viruses at an MOI of 0.1 for 48 h, then cellular samples were collected and SDS-PAGE and Western blotting analysis were performed. 1: rDR13^{att}-ΔORF3; 2: DR13-ORF3^{att}; 3: rDR13-ORF3^{wt}; 4: Mock.

2.7 转录组差异

为了寻找与凋亡有关差异表达基因,进行了感染细胞的转录组测序。首先用 MOI 为 5 的 rDR13^{att}-ΔORF3 和 rDR13-ORF3^{wt} 感染细胞,感染 12 h 后收集细胞并提取细胞总 RNA,实验保证组间的平行性很好(图 7A),组内重复性很好(图 7B)。结果显示, rDR13^{att}-ΔORF3 中 Heat shock 70 kD protein 1B (HSP70)基因表达水平下调(图 7C),说明 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 相较于 rDR13^{att}-ΔORF3 其 HSP70 基因表达更多,且 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 相较于 rDR13^{att}-ΔORF3 其 HSP70 基因表达有显著性差异(图 7D、E)。提示带有 *orf3* 基因的 PEDV 病毒 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 其 HSP70 基因表达受到保护。

2.8 荧光定量 PCR

通过荧光定量 PCR 进一步验证上述转录组结果,由图 8 可以看出,在 HSP70 基因转录相对定量结果中, rDR13^{att}-ORF3^{wt} 感染细胞的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值比 rDR13^{att}-ΔORF3 高出 21%,与转录组结果趋势相符。

3 讨论与结论

orf3 是所有冠状病毒里唯一的一个附属基因,在感染或复制过程中,其表达产物的作用还知之不多。就 PEDV ORF3 而言,大多数研究是关于基因序列分析,部分则是关于其对病毒增殖或离子通道活性的作用。PEDV 被证实可以诱导感染细胞凋亡,Chen 等研究证实猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白是细胞凋亡的关键诱导基因^[9],但他们认为 ORF3 蛋白对细胞凋亡没有作用。

凋亡是一种程序性细胞死亡,其通过消灭被病毒感染的细胞来破坏病毒复制,因此,为了避免凋亡,病毒也有多种应对机制阻止细胞死亡,提高子代病毒产量^[12]。另一方面,许多病毒都有诱导细胞凋亡的能力,促进子代病毒在相邻细胞之间扩散,这种促凋亡作用的结果是病毒在体外感染引起细胞病变,在体内引起组织损伤。特别是冠状病毒^[13-14],已经被证实 PEDV 通过激活线粒体凋亡诱导因子,在体内(仔猪的肠道)、体外(Vero

细胞)诱导细胞凋亡^[8]。虽然在感染的后期凋亡有利于病毒粒子的释放,但是在感染早期,细胞凋亡对病毒是不利的,细胞死亡速度过快将会减少病毒复制的时间和速度,因此 PEDV 本身有可能进化了这样的机制或功能,而这项功能有可能是通过 ORF3 蛋白或其他病毒蛋白实现的。

本研究采用弱毒 DR13 以及实验室已经拯救成功的携带有 *orf3* 基因或 *orf3* 基因被完全敲掉的 PEDV 进行研究,这几种病毒除 *orf3* 外,骨架基因完全相同,可以用于 ORF3 蛋白细胞内定位及功能研究。将这些病毒感染 Vero 细胞,通过凋亡标志蛋白 Annexin V 分析、细胞核染色质的 TUNEL 分析以及凋亡过程活性蛋白 Caspase-3 分析,确定 ORF3 蛋白可以抑制 PEDV 引起的细胞早期凋亡和晚期凋亡。进一步验证了 PEDV 自身带有抑制细胞凋亡的机制,防止细胞过早凋亡,有利于病毒在细胞内增殖。在我们前期已发表文章中,证明了带有 *orf3* 的重组病毒具有更强的增殖能力^[10]。因此我们推断,ORF3 蛋白促进病毒增殖很可能是通过抑制细胞凋亡实现的。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是由机体受损、受寒、紫外线暴露、组织修复等各种应激诱导表达的蛋白,与提高细胞对损伤的耐受和应激能力有关,存在于大多数生物体内,主要是由一定强度的刺激诱导而产生的。HSP70 是 HSP 家族蛋白中含量最多的热应激蛋白,其主要功能体现在耐受细胞免疫、先天免疫反应、抗氧化、抗细胞凋亡和分子伴侣^[15],也有文献证实 HSP70 与细胞凋亡有关:如师婷等研究中证明 Ghrelin 可通过促进 ERK1/2 磷酸化上调 HSP70 的表达,进而抑制氧化应激诱导的 PC12 细胞凋亡,对细胞产生保护作用^[16]。此外,计红等研究中证实 HSP70 可抑制 Caspase-3 的激活,最终保护细胞,减少凋亡^[17]。在本研究中, rDR13^{att}-ORF3^{wt} 感染细胞的 Caspase-3 激活程度较之 rDR13^{att}-ΔORF3 有一定程度降低,同时 HSP70 表达上升;由此我们推断可能存在 ORF3 蛋白促进 HSP70 表达且同时 HSP70 可以抑制 Caspase-3 激活

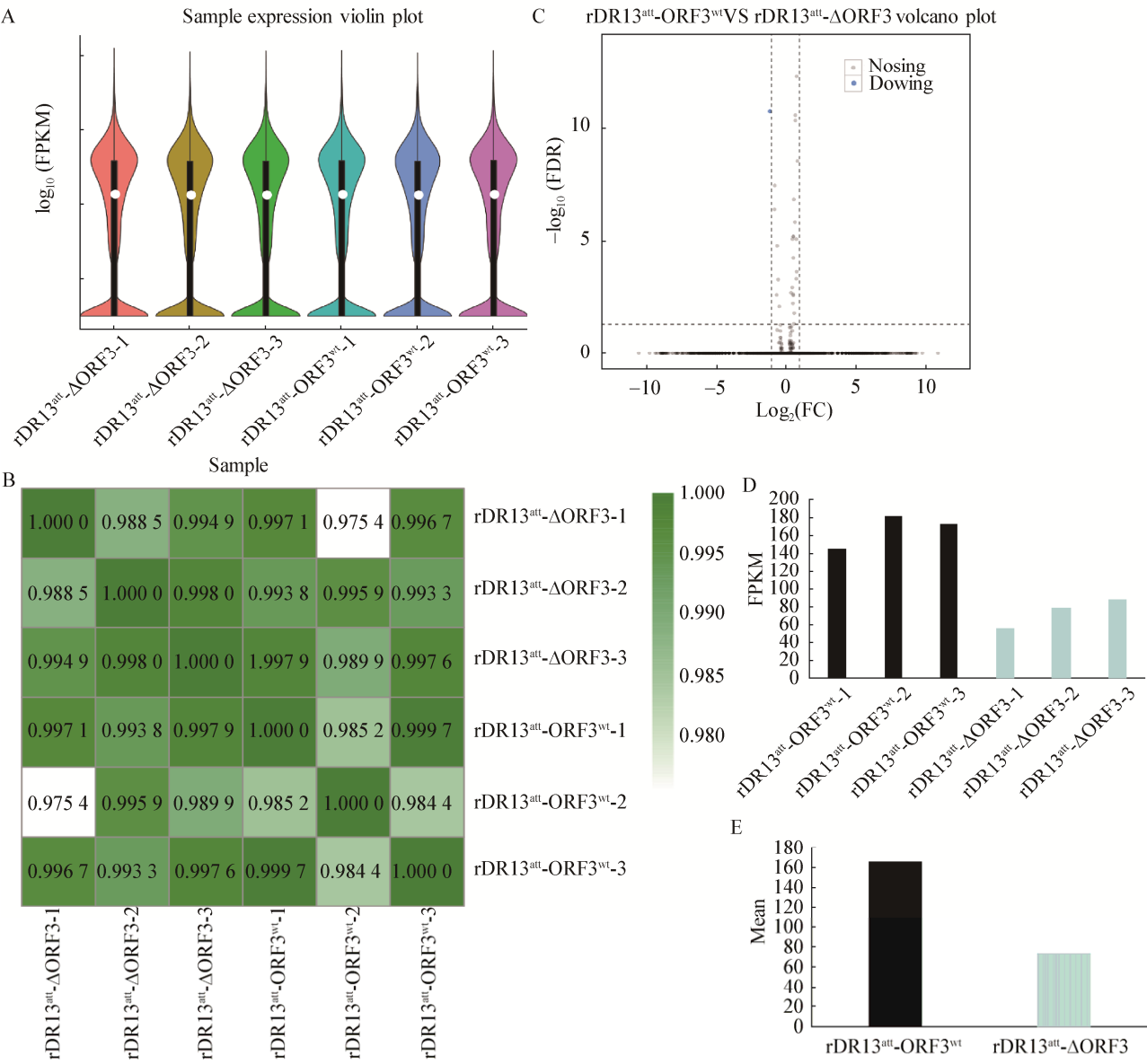


图 7 重组病毒 rDR13^{att}-ΔORF3 和 rDR13^{att}-ORF3^{wt} 感染细胞的转录组序列变化
Figure 7 Transcriptome analysis of cells infected with rDR13^{att}-ΔORF3 and rDR13^{att}-ORF3^{wt}

注：A：小提琴图用于基因的丰度表达的可视化；B：样本相关性热图，颜色深浅表示两样本的相关性系数大小，越接近绿色表示相关性越大，越接近白色，相关性越小；C：差异比较火山图，蓝色(表达量下调)的点表示基因的表达量有差异(判断标准为 FDR<0.05，且差异倍数两倍以上)，黑色的点为没有差异；D：FPKM 柱状图，感染两种病毒的细胞中 HSP70 的表达量；E：Mean 值柱状图，每组样品 3 个重复之间的 FPKM 值。P 值为 4.36×10^{-15} ，FDR 值为 1.80×10^{-11} 。

Note: A: The violin diagram is generally used for the visualization of gene abundance expression; B: Sample correlation heat map. The color depth indicates the correlation coefficient between the two samples. The darker the green color, the closer the correlation; C: Difference comparison volcano map, the blue (down-regulated) points indicate that there is a difference in gene expression (the judgment criterion is FDR<0.05, and the difference is more than twice the difference), the black dot is no difference; D: FPKM histogram, HSP70 expression in cells infected with both viruses; E: Mean value histogram, FPKM values between three replicates of each group of samples. P value is 4.36×10^{-15} , FDR value is 1.80×10^{-11} .

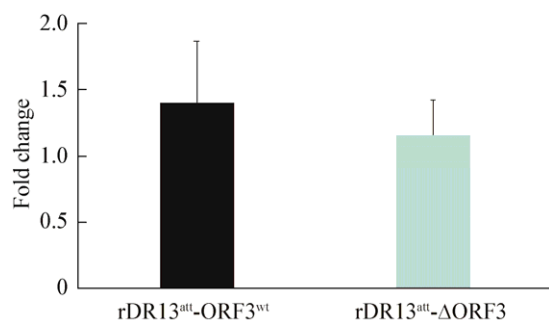


图8 rDR13^{att}-ORF3^{wt}与rDR13^{att}-ΔORF3感染细胞的HSP70基因转录相对定量结果

Figure 8 Relative quantitative analysis of HSP70 gene expression in cells infected with rDR13^{att}-ΔORF3 and rDR13^{att}-ORF3^{wt}

注：图中rDR13^{att}-ORF3^{wt}和rDR13^{att}-ΔORF3的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值无生物学统计差异($P>0.05$)。

Note: There are no significant differences in the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values with the cells infected with rDR13^{att}-ORF3^{wt} and rDR13^{att}-ΔORF3 in the figure ($P>0.05$).

的机制。为此,需要进一步研究 ORF3 蛋白对于 Caspase-3 和 HSP70 的直接或间接调控作用,以便更好地了解 ORF3 蛋白调控 PEDV 感染细胞凋亡的机制。

REFERENCES

- [1] Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777[J]. American Journal of Veterinary Research, 1980, 41(2): 219-223
- [2] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163
- [3] Park SJ, Moon HJ, Luo YZ, et al. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses[J]. Virus Genes, 2008, 36(1): 95-104
- [4] Chen JF, Wang CB, Shi HY, et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Archives of Virology, 2010, 155(9): 1471-1476
- [5] Jengarn J, Wongthida P, Wanasen N, et al. Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea virus recovered from a full-length infectious cDNA clone[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(8): 2206-2218
- [6] Sun M, Ma JL, Yu ZQ, et al. Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways[J]. Veterinary Research, 2017, 48(1): 44
- [7] Chen X, Zeng LL, Yang JX, et al. Sequence heterogeneity of the ORF3 gene of porcine epidemic diarrhea viruses field samples in Fujian, China, 2010-2012[J]. Viruses, 2013, 5(10): 2375-2383
- [8] Kim Y, Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. Virology, 2014, 460-461: 180-193
- [9] Chen YF, Zhang ZB, Li J, et al. Porcine epidemic diarrhea virus S1 protein is the critical inducer of apoptosis[J]. Virology Journal, 2018, 15(1): 170
- [10] Hu XX, Yu RS, Si FS, et al. ORF3 protein promotes the proliferation of porcine epidemic diarrhea virus on Vero cells[J]. Microbiology China, 2018, 45(7): 1508-1517 (in Chinese)
- 胡晓霞, 于瑞嵩, 司伏生, 等. ORF3 蛋白促进猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞上的增殖[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1508-1517
- [11] Ferreira-da-Silva A, Valacca C, Rios E, et al. Mitochondrial dynamics protein Drp1 is overexpressed in oncocyctic thyroid tumors and regulates cancer cell migration[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0122308
- [12] Thomson BJ. Viruses and apoptosis[J]. International Journal of Experimental Pathology, 2001, 82(2): 65-76
- [13] Ren LL, Yang RQ, Guo L, et al. Apoptosis induced by the SARS-associated coronavirus in Vero cells is replication-dependent and involves caspase[J]. DNA and Cell Biology, 2005, 24(8): 496-502
- [14] Zhao XM, Song XJ, Bai XY, et al. miR-27b attenuates apoptosis induced by Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) infection via targeting runt-related transcription factor 1 (RUNX1)[J]. PeerJ, 2016, 4: e1635
- [15] Peng QF, Chen L, Ma XM, et al. Research progress on HSP70 family function of heat shock protein[J]. Gansu Animal and Veterinary Sciences, 2019, 49(5): 18-20 (in Chinese)
- 彭乔烽, 陈朗, 马小梅, 等. 热休克蛋白 HSP70 家族功能研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医, 2019, 49(5): 18-20
- [16] Shi T, Song WF, Sun CW, et al. Role of ghrelin in cell protection by up-regulating HSP70 through ERK1/2 signaling pathway in PC12 cells[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2019, 35(6): 1095-1100 (in Chinese)
- 师婷, 宋维芳, 孙长伟, 等. Ghrelin 通过 ERK1/2 磷酸化上调 HSP70 发挥细胞保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(6): 1095-1100
- [17] Ji H, Zhang WH, Lian S, et al. Effect of overexpression of heat shock protein 70 in BRL cells on expression of caspase 3 induced by hydrogen peroxide[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2016, 29(2): 129-133 (in Chinese)
- 计红, 张伟宏, 连帅, 等. 热休克蛋白 70 过表达对过氧化氢诱导 BRL 细胞 Caspase 3 表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(2): 129-133