

重组猪肺表面活性蛋白 A 在体外可抑制 PRRSV 感染宿主细胞

张峰¹, 仲飞^{1*}, 李秀锦², 王幸兴¹, 张考¹, 陈慧慧¹, 李振¹, 李文艳¹, 潘红丽¹, 韩冬梅¹

¹河北农业大学动物医学院基础兽医部, 农业部动物疫病病原生物学华北科学观测实验站, 保定 071001

²燕山大学环境与化学工程学院生物工程系, 秦皇岛 066004

摘要: 【目的】研究重组猪肺表面活性蛋白 A (SP-A) 在体外对猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染的抑制作用。【方法】采用 PCR 方法从含有猪 SP-A 基因的质粒中扩增 SP-A 基因, 并将其插入到含有人 CD5 信号肽序列的真核表达载体 pcDNA3.1A-CD5 中, 构建成 SP-A 基因的真核分泌型表达载体 pcDNA-CD5-SPA/MH。将重组表达载体通过磷酸钙介导转染 HEK293T 细胞进行瞬时表达, 通过 Western blot 方法鉴定表达产物, 采用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶亲和层析法从培养基中分离和纯化重组 SP-A 蛋白, 通过 ELISA 方法检测 SP-A 蛋白与 PRRSV 的结合活性。将 SP-A 蛋白与 PRRSV 孵育, 然后感染 MARC-145 细胞和猪肺泡巨噬细胞, 感染 72 h 后测定病毒滴度, 分析重组 SP-A 蛋白对 PRRSV 感染的抑制作用。【结果】结果表明构建的真核表达载体能够介导 SP-A 基因在 HEK293T 细胞中进行分泌表达; 表达的重组猪 SP-A 蛋白能够与 PRRSV 进行剂量依赖性结合; 用重组猪 SP-A 蛋白与 PRRSV 进行孵育, 然后感染 MARC-145 细胞和猪肺泡巨噬细胞, 结果显示 SP-A 处理的 PRRSV 感染细胞后的病变程度明显低于对照组。感染 72 h 后, SP-A 处理组的 PRRSV 在 MARC-145 细胞和猪肺泡巨噬细胞的滴度明显低于 SP-A 非处理组。【结论】重组猪 SP-A 在体外对 PRRSV 的感染有明显的抑制作用, 揭示 SP-A 具有抗 PRRSV 的活性。

关键词: 猪肺表面活性蛋白 A, 抗病毒活性, 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 真核表达

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 05-0654-07

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的妊娠母猪发热流产, 仔猪与育肥猪呼吸障碍为特征的传染病, 是目前危害养猪业最为严重的传染病之一^[1-2]。PRRSV 为动脉炎病毒属 (Arteriviruses) 的囊膜正链 RNA 病毒, 其宿主细胞为猪肺泡巨噬细胞 (Porcine Alveolar macrophage, PAM)^[3-4]。

PRRSV 感染的主要途径为呼吸道^[5], 侵入肺脏

的 PRRSV 可直接感染位于肺泡表面的 PAM, 在 PAM 中 PRRSV 大量复制, 干扰 PAM 的正常吞噬作用和抗原呈递功能, 抑制 PAM 抗病毒细胞因子的产生, 导致 PAM 的非特异性杀菌功能受到抑制, 随着病毒向全身扩散, 机体免疫力急剧下降, 从而引起免疫抑制和免疫干扰, 常导致严重的继发感染, 进而引起易感猪的高发病率和高死亡率^[6-8]。

PRRSV 侵染 PAM 是通过 PAM 膜上的唾液酸粘附素 (Sn)、CD163 和硫酸乙酰肝素 (HS) 受体介

基金项目: 国家自然科学基金 (31140093); 河北省自然科学基金 (C2008000244)

* 通信作者。Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com

作者简介: 张峰 (1984-), 男, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事基因工程与分子免疫学方面的研究。E-mail: zhangfeng2084@163.com

收稿日期: 2012-02-25; 修回日期: 2012-03-18

导实现的^[9-11], 由于 PAM 存在于肺泡表面的液体中, 所以推测肺泡表面液体中的某些成分将影响 PRRSV 的感染过程。已知动物肺泡表面液体层主要由磷脂和 4 种表面活性蛋白 (Surfactant protein, SP) 即 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D 所组成。SP-A 和 SP-D 为模式识别分子, 能够识别和结合多种病原微生物, 是肺脏先天性免疫系统的第一道防线, 同时也是调节免疫的重要活性物质^[12]。其中 SP-A 含量最多^[13]。SP-A 为胶原凝集素 (collectin) 的成员, 属于钙依赖性凝集素 (C-type lectin)。其分子中的糖识别域 (Carbohydrate recognition domain, CRD) 和 Neck 区能够识别多种病原表面多糖分子, 包括糖蛋白, 有利于清除病毒和促进 PAM 对病原的结合和吞噬, 所以 SP-A 具有抗病原微生物的活性^[14]。然而 SP-A 是否具有抗 PRRSV 感染 PAM 的活性, 目前尚不清楚。

为此, 通过制备重组猪 SP-A 蛋白, 在体外分析了 SP-A 对 PRRSV 的抗感染活性, 结果表明重组猪 SP-A 蛋白在体外可明显抑制 PRRSV 对宿主细胞的感染。动物的先天性免疫系统在对病原菌早期侵入的防御方面起重要作用, 特别是对变异较大的某些 RNA 病毒, 由于没有有效的疫苗控制病毒的感染, 所以动物体的天然免疫系统对病毒的抵御作用显得异常重要。天然免疫系统不仅能及时清除外来的病毒, 同时也可促进或激活机体的获得性免疫系统。所以在目前尚无有效的 PRRS 疫苗的情况下, 研究 SP-A 抗 PRRSV 感染的作用有一定的理论价值和实践意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、毒株和细胞株: pT-SP-A 质粒为含有

猪 SP-A 成熟肽编码基因的质粒, 由荷兰 Utrecht 大学兽医学院 Henk P. Haagsman 教授惠赠; pcDNA3.1A-CD5 载体为含有人 CD5 信号肽序列的真核分泌型表达载体, 由本室构建^[15]; 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 为本实验室保存菌种; PRRSV 毒株 HB-Tsh1 (GenBank No. EU008758) 为河北分离的毒株 (属北美型毒株), 由河北农业大学动物医学院传染病实验室提供; 人胚肾细胞 HEK293T 用于表达重组猪 SP-A 蛋白, MARC-145 细胞为 PRRSV 易感细胞, 均购于中国医学科学院细胞库; 猪肺巨噬细胞由本实验室参考 Tahar Ait-Ali 等方法^[16] 从新鲜猪肺中分离获得。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、质粒小量提取试剂盒均购自美国 Promega 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 预染蛋白分子量 Marker 购自 Bio-Rad 公司; 低分子量蛋白 Marker、DNA Marker DL2,000 购自大连宝生物公司; Ni-NTA-Agarose 购自德国 Qiagen 公司; 兔抗 His 多克隆抗体、碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 均购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc。其它试剂均为国产分析纯。S1000 型 PCR 仪、Trans-Blot SD 型半干转膜仪为美国伯乐公司产品; MCO-15AC 型 CO₂ 恒温培养箱为日本三洋公司产品; BioTek 酶标仪为美国伯腾仪器有限公司产品; 3K15 型低温离心机为德国 SIGMA 公司产品; DYY-8C 型电泳仪为北京市六一仪器厂产品。

1.2 猪 SP-A 基因真核分泌型表达载体的构建

以含有猪 SP-A 成熟肽编码基因的 pT-SP-A 质粒为模板, 依据猪 SP-A 的序列 (NM_214265) 设计 1 对引物 (表 1)。

表 1 扩增猪 SP-A 基因的引物

Table 1 Primers for amplification of porcine SP-A gene

Primers	Sequence of primers (5'→3')	Sizes/bp	Restriction sites
pSPA2-F	CTAGCTAGCCGATGTGAAAGAAGTTTGTCTTG	708	<i>Nhe</i> I
pSPA2-R	GCCCTTCGAATGAAAACCTCACATATGGCCAGTC		<i>Sfu</i> I

The sizes of the amplified PCR products include the corresponding primers. The italic and underlined letters indicate restriction sites. The shadowed letters represent the complementary sequences against the template DNA.

通过 PCR 方法从该质粒中扩增 SP-A 成熟肽编码基因序列。热循环条件为: 94℃ 预变性 4 min;

94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共循环 30 次; 最后在 72℃ 继续延伸 10 min。用

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。然后通过 *NheI* 和 *SfuI* 位点将基因插入到 pcDNA3.1A-CD5 质粒的人 CD5 信号肽序列的下游,并与其融合,构建 5'端与 CD5 信号肽融合 3'端与 Myc/His (M/H) 融合的 SP-A 真核分泌型表达载体 pcDNA-CD5-SPA/MH。通过酶切对重组质粒进行鉴定,将酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工生物工程公司进行测序。

1.3 细胞的转染及重组 SP-A 的表达

细胞转染采用磷酸钙转染法。在转染前一天将 HEK293T 细胞传代于 T75 细胞瓶中,当细胞满度约为 80% 时,将培养基换成 4 mL 含 5% 血清的 DMEM 培养基,并将预先制备好的磷酸钙-pcDNA-CD5-SPA/MH 质粒复合物慢慢加入到 HEK293T 单层细胞表面,在 37℃,5% CO₂ 培养箱内转染 6 h。将培养基换成 DMEM 完全培养基,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 6-8 h。再将培养基换成 15 mL 表达培养基(100 μg BSA/mL DMEM),在 37℃,5% CO₂ 培养箱内表达 48-72 h。收集培养基待下一步重组蛋白的分离纯化。同时设空载体 pcDNA3.1A-CD5 转染 HEK293T 细胞作为阴性对照。

1.4 表达产物 SP-A 的鉴定

用 Western blot 方法对表达产物进行鉴定。取 1 mL 表达培养基,离心取上清,加入 100 μL 100% (w/v) 三氯乙酸(TCA),漩涡振荡 15 s,冰浴 30 min,13201 × g 离心 10 min,弃上清,加入 100 μL 丙酮洗涤沉淀,即先将沉淀吹打混匀,13201 × g 离心 10 min,弃去上清,再加丙酮重复洗涤沉淀 1 次。将样品管放入超净工作台风干,加入 15 μL PBS 溶解沉淀。将处理好的样品加入 10 μL 2 × 上样缓冲液,煮沸 3-5 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳后通过转膜仪将蛋白转至硝酸纤维素膜上,用封闭液(含有 5% 脱脂奶粉的 TBST) 4℃ 封闭过夜。用兔抗 His 标签多克隆抗体(一抗)在室温杂交 4 h,然后用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,再以碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG(二抗)室温杂交 2 h,洗膜后用 2 mL 显色液(NBT/BCIP)显色,当出现明显条带时,用水冲洗终止反应,用扫描仪记录显色结果。

1.5 表达产物 SP-A 的纯化

通过离心除去培养基中的细胞及其碎片,将离心后的上清转入 50 mL 离心管中,加入 Ni-NTA 琼脂糖胶粒悬浮液(0.02 mL 悬浮液/mL 培养基),在

4℃ 摇床吸附过夜。离心弃上清,琼脂糖胶粒用 700 μL 洗涤缓冲液悬浮,并转入到小型滤柱中。用 700 μL 洗涤缓冲液(20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗涤装有琼脂糖胶粒的滤柱 4 次。然后将滤柱转入 1.5 mL 离心管中,用 100 μL 洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗脱滤柱吸附的重组 SP-A 蛋白,连续洗脱 3-4 次,分别收集每次的洗脱液。洗脱的 SP-A 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,分析 SP-A 蛋白的纯化效果。

1.6 重组 SP-A 蛋白与 PRRSV 的结合实验

采用 ELISA 方法。首先用 100 mmol/L (pH 9.6) 碳酸钠缓冲液稀释 PRRSV 病毒液至滴度约为 10⁵ TCID₅₀/mL,然后按每孔 100 μL 包被 96 孔板,4℃ 过夜。次日弃去孔内液体,每孔加入 100 μL 封闭液,在 37℃ 下封闭 1 h,用 PBST 洗 2 次,每次 3 min。加入 100 μL 2 倍比稀释的带 Myc/His 标签的重组 SP-A 蛋白,同时设 BSA 为阴性对照,37℃ 孵育 2 h,再用 PBST 洗 2 次。然后加入按 1:1000 稀释的兔抗 His 多克隆抗体 100 μL,37℃ 孵育 2 h,PBST 洗涤 3 次,再加入 100 μL 按 1:2000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 杂交 1 h,再用 PBST 洗 3 次。加入新鲜配制的底物溶液(TMB)于 37℃ 显色反应 10-20 min,加终止液终止反应后,用酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。分析重组 SP-A 蛋白与 PRRSV 的结合特性。

1.7 重组 SP-A 蛋白抗 PRRSV 感染的分析

将 MARC-145 细胞传代于 96 孔板中,使细胞增殖至满度为 90%;将分离的猪肺泡巨噬细胞按 3 × 10⁴ 细胞/孔接于 96 孔板中。将 10 μL 病毒滴度为 10^{5.25} TCID₅₀/mL 的 PRRSV 与 40 μL 浓度为 50 μg/mL 的 SP-A 或 BSA 混合,室温作用 30 min。将上述 50 μL 混合液分别加入到培养 MARC-145 细胞和猪肺泡巨噬细胞的 96 孔板中,重复 4 孔。在 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养 1-2 h,换 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基继续培养 48-72 h,随时观察细胞病变。测定感染 72 h 后各分组细胞中 PRRSV 的病毒滴度。

1.8 病毒滴度的测定

采用半数细胞培养物感染量(TCID₅₀)方法在各分组细胞中测定病毒滴度,并使用 SPSS18.0 统计软件,对测定结果中的数据按照 t 检验方法进行显著

性检验。

2 结果

2.1 SP-A 基因的真核表达载体的构建

为制备具有生物活性的重组 SP-A 蛋白和便于 SP-A 蛋白的分离纯化, 将利用人胚胎肾细胞 (HEK293T) 通过分泌表达的方式表达重组 SP-A 蛋白, 为此构建了猪 SP-A 真核分泌型表达载体。首先以含有猪 SP-A 成熟肽编码基因 (NM_214265) 的质粒 pT-SP-A 为模板, 利用设计的 1 对引物通过 PCR 方法扩增 SP-A 成熟肽编码基因 (约 708 bp), 扩增的 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定。由图 1 可见, 扩增的 DNA 片段与预期的大小一致。然后利用 *Nhe*I 和 *Sfu*I 酶切位点将扩增的 SP-A 基因片段插入到 pcDNA3.1A-CD5 载体上, 构建成 SP-A 基因的真核分泌型表达载体 pcDNA-CD5-SPA/MH (图 2-A)。表达载体经 *Xba*I 酶切, 切出预期的 327 bp 的片段 (图 2-B)。通过测序证实扩增的 SP-A 基因序列与模板序列一致, 在载体中 SP-A 基因的插入位点正确。

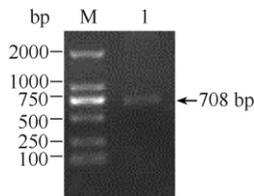


图 1 SP-A 基因的 PCR 扩增片段

Fig. 1 SP-A gene fragment amplified by PCR

M, DL2000 DNA Marker; Lane 1, SP-A gene fragment.

2.2 SP-A 基因在 HEK293T 细胞中的表达

为制备重组 SP-A 蛋白, 采用磷酸钙转染方法将 pcDNA-CD5-SPA/MH 转染 HEK293T 细胞, 通过瞬时分泌表达策略制备了与 Myc/His 标签融合重组猪 SP-A 蛋白。为证实重组 SP-A 蛋白的表达, 首先利用兔抗 His 标签多克隆抗体通过 Western blot 对培养基中的表达产物进行鉴定, 结果显示在分子量约为 35 kDa 处出现特异的杂交条带 (图 3-A)。根据理论计算, SP-A 分子量约为 25 kDa, 由于 SP-A 含有一个潜在的 N-糖基化位点 (N₁₈₇YT), 所以 Western blot 显示杂交带的分子量大于它的理论计算值。而空载体对照未见特异杂交带, 表明 SP-A 基因在 HEK293T 细胞中得到表达。

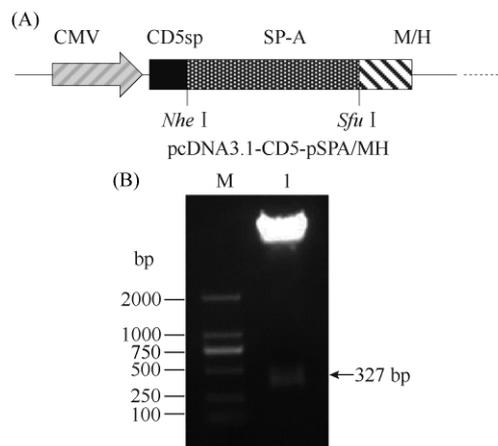


图 2 SP-A 表达载体结构及酶切鉴定

Fig. 2 Structure of SP-A expression vector and its restriction analysis. A: pcDNA-CD5-SPA/MH structure: SP-A gene was driven by CMV promoter and fused by human CD5 signal peptide at N-terminus and Myc/His at c-terminus. B: Restriction analysis: M, DL2000 DNA Marker; Lane 1, pcDNA-CD5-SPA/MH digested by *Xba*I.

确定重组 SP-A 蛋白分泌表达后, 利用 Ni-NTA 琼脂糖吸附层析法从表达培养基中分离和纯化了重组 SP-A 蛋白, 图 3-B 为纯化前和纯化后 SDS-PAGE 的分析结果。由图可见, 纯化前培养基样品中的蛋白主要是 BSA, 经过 Ni-NTA 琼脂糖胶粒纯化, 样品的蛋白主要为重组 SP-A 蛋白。

2.3 重组 SP-A 蛋白与 PRRSV 的结合实验

为探讨重组 SP-A 蛋白的抗 PRRSV 感染活性, 首先要确定重组 SP-A 蛋白能否与 PRRSV 病毒结合, 为此我们利用 ELISA 方法检测了重组 SP-A 蛋白与 PRRSV 的结合活性。将一定滴度的 100 μ L PRRSV 病毒液包被于 96 孔板中, 分别加入 100 μ L 2 倍比稀释的重组 SP-A 蛋白和 BSA (阴性对照), 使其与 PRRSV 结合, 再利用兔抗 His 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 检测重组 SP-A 蛋白与 PRRSV 结合活性 (用 OD_{450} 值表示) (图 4)。

由图 4 可见, 当 PRRSV 含量一定时, SP-A 与 PRRSV 的结合能力随 SP-A 浓度的增加而增加, 由此可见, SP-A 蛋白能够与 PRRSV 进行特异结合, 这为下一步分析 SP-A 抗 PRRSV 的感染提供了实验依据。

2.4 重组 SP-A 蛋白抑制 PRRSV 感染细胞的分析

为研究重组 SP-A 蛋白是否具有抑制病毒感染宿主细胞的活性, 将 10 μ L 病毒滴度为 $10^{5.25}$

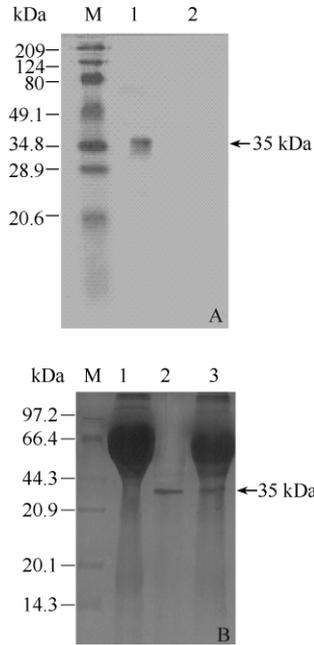


图3 重组 SP-A 蛋白的 Western blot 检测和分离纯化的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 3 Western blot and SDS-PAGE analyses for recombinant SP-A protein (A) Western blot: M, prestained protein marker; Lane 1, the sample from pcDNA-CD5-SPA/MH-transfected cells; Lane 2, the sample from pcDNA3.1A-CD5-transfected cells; (B) SDS-PAGE: M, protein molecular weight marker; Lane 1, sample flowed through Ni-NTA-Agarose beads; 2, purified sample by Ni-NTA-Agarose beads; 3, un-purified sample.

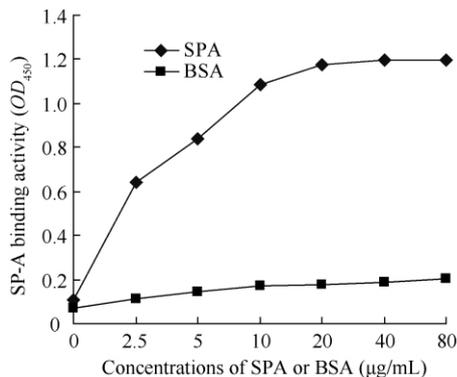


图4 重组 SP-A 蛋白与 PRRSV 结合的活性分析

Fig. 4 Binding activity of SP-A with PRRSV.

TCID₅₀/mL 的 PRRSV 与 40 μL 浓度为 50 μg/mL 的 SP-A 或 BSA 混合,在 37°C 孵育 30 min 然后加入到在 96 孔板中培养的 MARC-145 细胞和猪肺泡巨噬细胞,感染后在不同时间观察细胞的病变情况。当感染 72 h 时收集病毒,测定不同处理组病毒的滴度。上述实验重复 3 次。结果显示 SP-A 处理组

MARC-145 细胞和 PAM 细胞 PRRSV 的病毒滴度分别为 10^{4.5} TCID₅₀/mL 和 10^{4.2} TCID₅₀/mL,明显低于相应的非处理组 (10^{6.6} TCID₅₀/mL 和 10^{6.2} TCID₅₀/mL) 和 BSA 处理组 (10^{6.5} TCID₅₀/mL 和 10^{6.1} TCID₅₀/mL)。上述结果表明,重组 SP-A 蛋白对 PRRSV 的感染有明显 (p < 0.01) 的抑制作用 (图 5)。

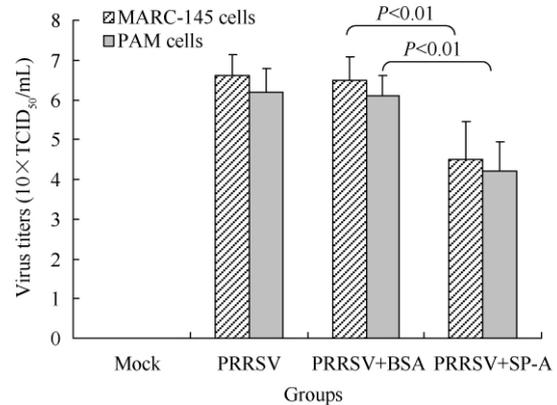


图5 重组 SP-A 对 PRRSV 病毒滴度的影响

Fig. 5 The effect of recombinant SP-A on titers of PRRSV.

3 讨论

动物的非特异免疫系统和非特异性天然防御活性物质在清除侵入机体的病原微生物过程中起重要作用。SP-A 和 SP-D 是动物肺泡表面重要的天然抗病原微生物的活性物质,由于 SP 的 CRD 能够识别病原菌表面的多糖或糖蛋白,使病原菌发生聚集,从而抑制病原菌通过肺脏侵入体内,如 SP-A 分子中的 CRD 和 Neck 区能够识别流感病毒的血凝素^[17],使流感病毒聚集,降低其感染性。研究表明 SP 还具有促进肺泡巨噬细胞对病原菌的吞噬作用和杀伤作用,如 SP-A 能够使吞噬细胞内的超氧自由基和 NO 含量增加,从而促进杀菌作用^[18]。

然而对某些以肺泡巨噬细胞为宿主细胞的病毒或细菌来讲,SP-A 或 SP-D 对病原菌的感染显示抑制作用还是促进作用尚不清楚。为此,通过制备重组猪 SP-A 蛋白,利用 MARC-145 细胞和猪肺巨噬细胞分析了 SP-A 对 PRRSV 感染的影响,结果显示 SP-A 对 PRRSV 的感染有明显的抑制作用,由此可见 SP-A 具有抗 PRRSV 的活性。有关 SP-A 抑制 PRRSV 感染的详细机制还有待于进一步探讨。

为制备具有生物活性的 SP-A 重组蛋白(属于

糖蛋白), 利用真核表达系统(人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞) 通过瞬时分泌表达的方式表达了重组 SP-A 蛋白, 为便于重组 SP-A 蛋白的分离和纯化, 在构建表达载体时在 C-端融合了 His 标签, 这利于通过 Ni-NTA 琼脂糖凝胶亲和层析法从培养基中纯化重组 SP-A 蛋白。实验表明通过融合 His 标签, 不仅利于重组 SP-A 的纯化, 同时也利于通过 Western blot 对重组 SP-A 的鉴定。通过实验证实 His 标签的融合对重组 SP-A 与 PRRSV 的结合没有明显影响。

本文初步分析了 SP-A 对 PRRSV 感染宿主细胞的抑制作用, 这为进一步研究 SP-A 的抗 PRRSV 的机制提供了重要的实验数据, 同时也为研究机体非特异性免疫系统的抗病毒作用探讨了新途径。本文仅就重组猪 SP-A 对 PRRSV 感染的影响进行了初步分析, 有关猪 SP-D 对 PRRSV 感染的影响也有待于进一步研究。

致谢 感谢荷兰 Utrecht 大学兽医学院 Henk P. Haagsman 教授惠赠质粒, 以及对本研究的热情指导。

参考文献

- [1] Benfield DA , Nelson E , Collins JE , Harris L , Goyal SM , Robison D , Christianson WT , Morrison RB , Gorcyca D , Chladek D. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , 1992 , 4(2) : 127-133.
- [2] Dea S , Gagnon CA , Mardassi H , Pirezadeh B , Rogan D. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology* , 2000 , 145(4) : 659-688.
- [3] Voicu IL , Silim A , Morin M , Elazhary MA. Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Veterinary Record* , 1994 , 134(16) : 422-423.
- [4] Zhang H , Guo X , Ge X , Chen Y , Sun Q , Yang H. Changes in the cellular proteins of pulmonary alveolar macrophage infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus by proteomics analysis. *Journal of Proteome Research* , 2009 , 8(6) : 3091-3097.
- [5] Oleksiewicz MB , Nielsen J. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function. *Veterinary Microbiology* , 1999 , 66: 15 - 27.
- [6] 磨美兰, 杨汉春, 郭鑫, 吕艳丽, 周双海, 陈艳红, 查振林. 猪繁殖与呼吸综合征病毒感染对猪肺泡巨噬细胞外源性抗原加工递呈相关分子和共刺激分子的影响. *畜牧兽医学报 (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)* , 2007 , 38 (6) : 568 ~ 573.
- [7] Genini S , Delputte PL , Malinverni R , Cecere M , Stella A , Nauwynck HJ , Giuffra E. Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* , 2008 , 89(Pt 10) : 2550-2564.
- [8] Liu D , Zhou R , Zhang J , Zhou L , Jiang Q , Guo X , Ge X , Yang H. Recombination analyses between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vivo. *Virus Research* , 2011 , 155(2) : 473-486.
- [9] Delputte PL , Costers S , Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *Journal of General Virology* , 2005 , 86 (Pt 5) : 1441-1445.
- [10] Van Gorp H , Van Breedam W , Delputte PL , Nauwynck HJ. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* , 2008 , 89 (Pt 12) : 2943-2953.
- [11] Delputte PL , Vanderheijden N , Nauwynck HJ , Pensaert MB. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *Journal of Virology* , 2002 , 76(9) : 4312-4320.
- [12] Kingma PS , Whittsett JA. In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Current Opinion in Pharmacology* , 2006 , 6(3) : 277-283.
- [13] Hoppe H J , Reid K B. Collectins-soluble proteins containing collagenous regions and lectin domains and their roles in innate immunity. *Protein Science* , 1994 , 3: 1143-1158.
- [14] Shepherd VL , Lopez JP. The role of surfactant-associated protein A in pulmonary host defense. *Immunologic Research* , 2001 , 23(2-3) : 111-120.
- [15] 王微, 李秀锦, 仲飞, 王幸兴, 韩冬梅, 靳慧君, 潘素敏, 李巍. 犬细小病毒 VP2 蛋白在真核细胞中的分泌表达及特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* , 2009 , 49 (5) : 648-652.

- [16] Ait-Ali T , Wilson AD , Westcott DG , Clapperton M , Waterfall M , Mellencamp MA , Drew TW , Bishop SC , Archibald AL. Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. *Viral Immunology* , 2007 ,20(1) : 105-118.
- [17] Teclé T , White MR , Crouch EC , Hartshorn KL. Inhibition of influenza viral neuraminidase activity by collectins. *Archives of Virology* , 2007 , 152 (9) : 1731-1742.
- [18] Hickman-Davis JM , Fang FC , Nathan C , Shepherd VL , Voelker DR , Wright JR. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology* , 2001 , 281 (3) : L517-L523.

Recombinant porcine lung surfactant protein A inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection into host cells *in vitro*

Feng Zhang¹ , Fei Zhong^{1*} , Xiujin Li² , Xingxing Wang¹ , Kao Zhang¹ , Huihui Chen¹ , Zhen Li¹ , Wenyan Li¹ , Hongli Pan¹ , Dongmei Han¹

¹Department of Basic Veterinary Medicine , College of Veterinary Medicine , Agricultural University of Hebei , North China Research Center of Animal Epidemic Pathogen Biology , Ministry of Agriculture of China , Baoding 071001 , China

²Department of Biotechnology , College of Environmental and Chemical Engineering , Yanshan University , Qinhuangdao 066004 , China

Abstract: [Objective] To investigate the antiviral activity of porcine lung surfactant protein A (SP-A) to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *in vitro*. [Methods] The SP-A gene was amplified by PCR from the plasmid containing porcine SP-A gene , and subcloned into pcDNA3.1A-CD5 vector containing the human CD5 signal peptide to generate SP-A eukaryotic expression vector pcDNA-CD5-SPA/MH. The recombinant expression vector was transfected into HEK293T cells mediated with calcium phosphate. The expressed recombinant SP-A was identified by Western blot and purified from culture medium by Ni-NTA-Agarose beads. The binding activity of SP-A with PRRSV was identified by ELISA. The antiviral activity of SP-A to PRRSV was analyzed by viral titer reduction assays on MARC-145 cells and porcine alveolar macrophages (PAM). [Results] The results showed that the eukaryotic expression vector of SP-A gene could mediate SP-A expression in HEK293T cells , the expressed SP-A could bind PRRSV in a dose dependent manner. The PRRSV incubated in advance with SP-A showed the lower infective activity compared with no-SP-A-incubated PRRSV on both MARC-145 cells and porcine alveolar macrophages. The SP-A-treated PRRSV titers in MARC-145 cells and PAM cells were significantly lower than that of SP-A-untreated PRRSV at 72 h post-infection. [Conclusion] Recombinant porcine SP-A significantly inhibit the infection of PRRSV to the host cells *in vitro* , which indicates that recombinant SP-A possesses anti-PRRSV activity.

Keywords: recombinant porcine lung surfactant protein A , antiviral activity , porcine reproductive and respiratory syndrome virus , eukaryotic expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31140093) and by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2008000244)

* Corresponding author. Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com

Received: 25 February 2012/Revised: 18 March 2012