



HMCES 蛋白促进猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞中的复制

温永强¹, 于瑞明², 张莉萍², 张中旺², 王永录², 潘丽², 刘霞^{1*}, 刘新生^{2*}

1 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046

温永强, 于瑞明, 张莉萍, 张中旺, 王永录, 潘丽, 刘霞, 刘新生. HMCES 蛋白促进猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞中的复制. 微生物学报, 2022, 62(8): 3152–3165.

Wen Yongqiang, Yu Ruiming, Zhang Liping, Zhang Zhongwang, Wang Yonglu, Pan Li, Liu Xia, Liu Xinsheng. HMCES protein promotes the replication of porcine epidemic diarrhea virus in Vero cells. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3152–3165.

摘要:【目的】鉴定能够调控猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)复制的关键宿主蛋白。【方法】利用 LC-MS/MS 技术结合串联质谱标签(tandem mass tag, TMT), 分析 PEDV 感染 Vero 细胞 36 h 后和未感染组的蛋白组学差异。鉴定筛选了 114 个显著差异表达蛋白, 其中宿主胚胎干细胞特异性 5-羟甲基胞嘧啶结合蛋白(5-hydroxymethylcytosine binding, ES cell-specific protein, HMCES)显著上调。进一步构建 HMCES 真核表达质粒, 通过蛋白免疫印迹和实时荧光定量 PCR 检测过表达 HMCES 对 PEDV 复制的影响; 合成针对 HMCES 基因的特异性 siRNA, 利用 Western blotting 和 RT-qPCR 检测 siRNA 对 HMCES 表达的干扰效果及 HMCES 被干扰后对 PEDV 复制的影响。【结果】过表达 HMCES 能显著促进 PEDV 在 Vero 细胞中复制, 并且复制水平随着 HMCES 的剂量递增呈现剂量依赖式增加; siRNA-341 下调内源性 HMCES 表达进而抑制 PEDV 复制。【结论】HMCES 促进 PEDV 复制, 本研究为进一步探究 HMCES 在抗 PEDV 免疫应答中的作用及机制提供了参考依据。

关键词: HMCES; 猪流行性腹泻病毒; 病毒复制; Vero 细胞

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2016YFD0501505)

Supported by the “Thirteenth Five-Year” National Key Research and Development Program of China (2016YFD0501505)

*Corresponding authors. E-mail: LIU Xinsheng, liuxinsheng@caas.cn; LIU Xia, liuxu@gsau.edu.cn

Received: 10 December 2021; Revised: 25 February 2022; Published online: 24 March 2022

HMCEs protein promotes the replication of porcine epidemic diarrhea virus in Vero cells

WEN Yongqiang¹, YU Ruiming², ZHANG Liping², ZHANG Zhongwang², WANG Yonglu², PAN Li², LIU Xia^{1*}, LIU Xinsheng^{2*}

1 College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Objective] To identify the key host protein that can regulate the replication of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). [Methods] We used liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technology combined with tandem mass tag (TMT) to analyze the proteomic differences between PEDV-infected Vero cells and the uninfected group at 36 h post inoculation. A total of 114 significantly differentially expressed proteins were identified, of which 5-hydroxymethylcytosine binding, ES cell-specific protein (HMCEs) was significantly up-regulated. The eukaryotic expression plasmid of HMCEs was further constructed, and the effect of HMCEs overexpression on PEDV replication was examined by Western blotting and real-time fluorescent quantitative PCR. The specific siRNA against HMCEs gene was synthesized, and Western blotting and RT-qPCR were employed to detect the effect of siRNA on HMCEs expression and the effect of interfered HMCEs on PEDV replication. [Results] Overexpression of HMCEs significantly promoted PEDV replication in Vero cells, and the level of replication increased in a dose-dependent manner. siRNA-341 down-regulated the expression of endogenous HMCEs to inhibit PEDV replication. [Conclusion] HMCEs promotes PEDV replication in Vero cells. This study provides a reference for further exploring the role and mechanism of HMCEs in the anti-PEDV immune response.

Keywords: HMCEs; porcine epidemic diarrhea virus; virus replication; Vero cells

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪流行性腹泻病(porcine epidemic diarrhea, PED)是当前一种流行性广、对仔猪高致死率的接触性猪肠道传染病^[1]。患病猪的临床症状主要为呕吐、腹泻、食欲不振、精神萎靡、严重脱水等,病理特征表现为肠上皮细胞坏死、肠绒毛萎缩、部分肠段发生炎症反应等^[1-3]。20世纪70年代PED首次出现于英格兰农场,当时称之为流行性病毒样腹泻(EVD)^[4-5]。2010年,亚洲出现了PEDV高致病性变异毒株,短期内给中国、泰国、越南等国家造成了严重的经济损失^[6-7],目前,PEDV仍

在全球各地广泛流行和传播,对全球生猪养殖业造成重大危害。

PEDV的复制是病毒与宿主因子相互作用的博弈过程,在这个过程中宿主因子对PEDV感染、致病、传播等生物学特性发挥重要影响^[8-10]。近年来,随着PED的不断暴发,国内外对PEDV与宿主因子相互作用的研究不断加强。Kaewborisuth等^[11]的研究表明,PEDV辅助蛋白ORF3可以和液泡蛋白分选相关蛋白36(VPS36)相互作用影响病毒自身的复制,过表达VPS36蛋白时,ORF3蛋白表达下调进而抑制PEDV复制,干扰内源性VPS36基因时,显著

增强 PEDV 增殖。Kong 等^[12]利用免疫共沉淀和 GST-pulldown 技术发现了一种 BST2 抑制病毒增殖的新途径：BST2 通过 BST2-MARCHF8-CALCOCO2-自噬小体途径降解病毒核衣壳 N 蛋白，进而抑制 PEDV 的增殖。上述研究思路为宿主蛋白与病毒互作研究指明了方向。PEDV 感染宿主细胞后，其结构蛋白和非结构蛋白与宿主细胞相关因子发生极其复杂的相互作用，进而调控 PEDV 的复制、转录和翻译^[13-15]。N 蛋白是 PEDV 的一个磷酸化结构蛋白，是 PEDV 感染宿主细胞后表达含量最高的病毒蛋白，在病毒基因组稳定性与生存力方面起到重要作用，因此，在研究 PEDV 的与宿主蛋白互作时，N 蛋白表达量变化代表了 PEDV 的增殖情况^[16-18]。

胚胎干细胞特异性 5-羟甲基胞嘧啶结合蛋白(5-hydroxymethylcytosine binding, ES cell-specific protein, HMCES)能够识别 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)，并且通过结合 5hmC 从而招募下游蛋白发挥功能，最终将 5mC 转换为普通的胞嘧啶^[19]。HMCES 是具有 SOS 响应相关肽酶结构域(SOS response-associated peptidase, SRAP)的超家族成员之一，并且是唯一一个具有该结构域的高度保守的哺乳动物蛋白质^[20-21]，该结构域具有肽酶活性，能通过自剪切来调控下游信号，这种特异性有助于自身作为一个分子开关来执行相应的生理功能^[22]。HMCES 蛋白在生命的所有领域都是进化保守的，生化特性与大肠杆菌同源，在某些细菌中高度保守^[23]。此外，HMCES 作为一种古老的 DNA 损伤识别蛋白，通过促进双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA)基本碱基位点的无错误修复来维持基因组的完整性^[22]。HMCES 缺陷细胞对电离辐射、紫外线和一些烷化剂(如甲基磺酸盐)等非常敏感，而这些因素都可以造成 DNA 碱基位点损伤，HMCES 则在此时发挥至关重要的作用来避

免碱基损伤造成基因组信息的丢失^[22]。

目前，HMCES 的相关研究主要报道了关于 DNA 损伤修复及肿瘤方面，而在病毒感染方面的报道较少，HMCES 在 PEDV 增殖过程中是否具有调控作用尚未可知。本研究应用 LC-MS/MS 结合 TMT 标签技术，分析 PEDV 感染 Vero 细胞 36 h 后和未感染组的蛋白组学差异，鉴定筛选出具有显著表达差异的 HMCES，研究 HMCES 在 PEDV 复制中的调控作用，以期探究 PEDV 在宿主细胞中的复制机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒、载体、抗体

非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)、PEDV CH/HNPJ/2017(GIIB)毒株^[24]和真核表达载体 pcDNA3.1(+)由兰州兽医研究所口蹄疫防控技术创新团队保存；鼠抗 HA 标签单克隆抗体购自 Abmart 公司；兔抗 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司的产品。

1.1.2 主要试剂

普通小量质粒提取试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自 OMEGA 公司；二硫苏糖醇、碘代乙酰胺、尿素和三己基碳酸氢铵(TEAB)购自 Sigma 公司；Strata X C₁₈ 购自 Phenomenex 公司；TMT 标记试剂盒购自 Thermo 公司；限制性核酸内切酶 *Xba* I、*Not* I 及 T4 DNA Ligase 购自 NEB 公司；高 GC PCR 扩增试剂盒、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司；One Step TB Green[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit II、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自 TaKaRa 公司；Quick Start Bradford 1 \times Dye Reagent 购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司(Bio-Rad)；Protein

Marker 购自上海雅酶生物科技有限公司; 4×蛋白上样缓冲液购自上海碧云天生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基、Opti-MEM 培养基、0.25%胰酶溶液购自 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS) 购自 Biological Industries 公司; 脂质体转染试剂 Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司; siRNA 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 质谱样品制备与数据分析

样品制备与质谱流程:(1) 以病毒感染复数 MOI 为 0.5 的 PEDV CH/HNPJ/2017(GIIB)毒株感染生长状态良好的 Vero 细胞, 同时正常 Vero 细胞作为对照, 36 h 后收集细胞样品, 裂解细胞提取细胞总蛋白并定量;(2) 在蛋白溶液中依次加入二硫苏糖醇、碘代乙酰胺降低样品中尿素含量, 以 1:50 质量比(胰酶:蛋白) 37 °C 温箱酶解过夜; 再以 1:100 质量比(胰酶:蛋白) 37 °C 酶解 4 h;(3) 胰酶酶解后的肽段采用 Strata X C₁₈ 进行除盐冷冻干燥, 并以 0.5 mol/L TEAB 溶解肽段; 根据 TMT 试剂盒说明书操作标记肽段;(4) 标记过的肽段用高 pH 反向高效液相色谱仪(high-performance liquid chromatographer, HPLC)分级, 采用 Agilent 300Extend C₁₈ 色谱柱;(5) HPLC 分级后的肽段利用液相色谱流动相 [0.1% (V/V) 甲酸水溶液] 溶解后使用 EASY-nLC 1000 超高液相系统进行分离, 通过一级、二级质谱扫描获得数据。

数据分析:(1) 二级质谱数据通过 Maxquant (v1.5.2.8) 进行分析并检索 UniProt chlorocebus 数据库, 确定 PEDV 感染 Vero 细胞后的差异表达蛋白(DEPs);(2) 根据蛋白质丰度水平对蛋白进行定量后, 以 *P*-value 值小于 0.05 且差异倍数(fold change)≥1.2 为标准, 即认定为是差异显著蛋白;(3) 对鉴定出的差异蛋白进行 gene ontology (GO) 注释分析, 对细胞组分、分子功能和生物进程 3 个方面进行注释。质谱样品

6 次重复, 送往杭州景杰生物科技股份有限公司进行分析。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 数据库中已公布的猴源 HMCES 基因序列(XM_007985398.1)设计特异性 PCR 扩增引物, 上游引物添加 *Xba* I 酶切位点和 HA 标签序列, 下游引物添加 *Not* I 酶切位点; 设计 PEDV CH/HNPJ/2017(GIIB)毒株 N 基因 RT-qPCR 引物、主要差异基因 *HMCES*、*SOD2*、*TGFB2*、*RASA2*、*TIMM29*、*IFT57*、*NCK1* 和 *CCNT1* RT-qPCR 引物、内参基因 *β-actin* RT-qPCR 引物; 针对 HMCES 基因序列设计 3 对特异性 siRNA 干扰序列。上述引物序列均由上海生工生物工程股份有限公司合成, 相关序列信息见表 1。

1.4 重组质粒构建

提取 Vero 细胞总 RNA, 经反转录生成 cDNA 为 PCR 扩增模板, 利用特异性引物扩增 *HMCES* 基因, 克隆至 pcDNA3.1(+)真核表达载体中, 构建真核表达质粒 HA-HMCES-pcDNA3.1。用 *Xba* I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证, 测序正确质粒命名为 HA-HMCES-pcDNA3.1。

1.5 过表达 HMCES 对 PEDV 复制的影响

依据 Lipofectamine3000 操作说明将 2.5 μg 去内毒素质粒 HA-HMCES-pcDNA 3.1 转染至 Vero 细胞, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 36 h 后, 以 MOI=0.5 接种 PEDV CH/HNPJ/2017 (GIIB)毒株。分别于病毒感染后 0、6、12、24、36 h 各收集 2 份细胞样品。其中一份样品超声处理后, 采用 Bradford 法进行蛋白定量。裂解细胞样品与 4×蛋白上样缓冲液按照 3:1 混匀后, 煮沸 10 min 后经 10% SDS-PAGE 电泳, 转移至 NC 膜上, 然后分别用鼠源抗 N 蛋白单抗(1:5 000

表 1 本研究所用引物序列信息

Table 1 Primer sequences information used in this study

Primer	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
HMCEs	ATTTGCGGCCGCGCCACCATGGGCTACCCATACGAC GTCCCAGACTACGCTATGTGTGGGCGAACATCCTG	GCTCTAGATCACTGGCTGTAAGGACGCTT
RT-PEDV-N	TCGTAACCAGTCCAAGAACAGAAACC	CATCCTTGACAGCAGCCACCAG
RT-β-actin	TGGTGGGCATGGGTCAGAAGG	ATGGGGTACTTCAGGGTGAGGATG
RT-HMCEs	GTTCTCACGAGAGCTTGCGC	ACTGGGCTGTTGGACTGAGG
RT-SOD2	GTCACCGAGGAGAAGTACCAGGAG	TCCACCACCATTAGGGCTGAGG
RT-TGFB2	ATTGCTGCCTACGTCCGCTTTAC	CCTGCTGTGCTGAGTGTCTGAAC
RT-RASA2	TCCAGGTGGAAGAGGAGGACATTG	GCAAGTACCAGGCTTGATGAGAGG
RT-TIMM29	CTGCGACATCAACGACGACG	CGTTGGTCTCGGAATGCAGC
RT-IFT57	CAACAGGGAAACGGAGGAGTAACG	ATCTTCACCAAAGGAGCACCATCAG
RT-NCK2	GACCGCATCTACGACCTCAACATC	CTTCACCAGGGACAGCTCATCTTC
RT-CCNT1	ATCATCCAGCCAAGATTGCCAAGAG	CTGAGCCATTGTAGGAAGTGAAGGG
NC siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
HMCEs-737	GGGAGAAAGUCUGGGACAATT	UUGUCCCAGACUUUCUCCCTT
HMCEs-341	GGAGAGACCCUGAUAGUATT	UACUUAUCAGGGUCUCUCCTT
HMCEs-1012	GUGAACAAACUCGCGAAACATT	UGUUUCGCGAGUUGUUCACTT

稀释)、鼠源抗 HA 标签一抗(1:5 000 稀释)和兔源 β-actin 单抗(1:2 000 稀释), HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:5 000 稀释)和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 稀释), Western blotting 检测 HMCEs 和 PEDV N 蛋白水平变化;另一份样品用于 RT-qPCR, 检测 PEDV N mRNA 水平变化, 均以基因 β-actin 作为内参。RT-qPCR 反应体系: 2×One Step TB Green RT-PCR Buffer 12.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, 模板 RNA 2 μL, RNase Free ddH₂O 7.5 μL。反应条件: 第一步反应, 42 °C 5 min, 95 °C 10 s; 第二步反应, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。每个待测样本设置 3 个重复。

为了更加直观地体现 HMCEs 对 PEDV 复制的过程性影响, 于 Vero 细胞转染 HMCEs 质粒 36 h 后, 感染 MOI=0.5 PEDV, 病毒感染后 24、27、30、33、36 h 收集样品, 运用 WB 和 RT-qPCR 方法分别检测 PEDV N 蛋白水平和 mRNA 水平的变化, 具体操作流程同上, 每个待测样本设置 3 个重复。

1.6 不同 HMCEs 表达量对 PEDV 复制的影响

将质粒 HA-HMCEs-pcDNA 3.1 以 0、0.5、1.5、3.0 μg 不同剂量转染至 Vero 细胞, 转染后 36 h, 以 MOI=0.5 接种 PEDV CH/HNPJ/2017 (GIIB)毒株。分别于病毒感染后 36 h 各收集 2 份细胞样品。其中 1 份样品进行 Western blotting 检测 PEDV N 蛋白水平变化, 另一份样品用于 RT-qPCR, 检测 PEDV N 转录水平变化, 均以基因 β-actin 作为内参, 具体参考 1.5。

1.7 干扰内源性 HMCEs 表达对 PEDV 复制的影响

将 20 pmol/μL 的 3 条针对宿主基因 HMCEs 设计的 siRNA 及一条 NC siRNA 按照 Lipofectamine 3000 操作说明分别转染至 Vero 细胞, 干扰内源性基因 HMCEs 24 h 后, 以 MOI=0.5 的 PEDV CH/HNPJ/2017(GIIB)毒株感染 Vero 细胞, 在感染后 0、6、12、24、36 h 各收集 2 份细胞样品, 分别检测 PEDV N 蛋白

水平变化和 mRNA 水平变化,均以 β -actin 作为内参基因,具体参考 1.5。

1.8 数据处理

所有试验重复 3 次,应用 Graphpad 软件通过 Student's *t* 检验和方差进行分析, *ns*: $P > 0.05$ 表示数据无显著差异性, *: $P < 0.05$ 表示数据具有统计学意义, **: $P < 0.01$ 表示数据具有显著性差异, ***: $P < 0.001$ 表示数据具有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 差异表达蛋白的表征

通过蛋白质组学定量分析和数据库检索并根据差异表达蛋白 (DEPs) 的差异倍数 (fold change) 变化 ≥ 1.2 及 P -value < 0.05 的标准,在 PEDV 感染 Vero 细胞 36 h 后和未感染中鉴定出 114 个 DEPs, 包括 18 个上调蛋白和 96 个下调

蛋白(图 1)。应用 GO 和 Uniprot 数据库分析 DEPs 的生物学过程、细胞成分、分子功能和亚细胞定位。PEDV 感染 Vero 细胞中 18 个显著上调蛋白主要定位于细胞核(38.89%)、细胞质(27.78%)、细胞外(16.67%)和线粒体(5.56%)(图 2A); 而感染细胞中 96 个显著下调蛋白主要定位于细胞核(42.71%)、质膜(14.58%)、细胞质(10.42%)和线粒体(9.38%)(图 2B)。114 个差异蛋白功能聚类分析结果显示, 差异蛋白质主要参与细胞、单细胞个体、代谢过程、刺激应答等生物学过程; 细胞成分注释表明, 差异蛋白主要定位于细胞、细胞器、细胞膜、分子复合物及胞外区; 分子功能注释表明, 差异蛋白主要参与整合、催化活性、运输活动、核酸转录、结构分子活动、分子功能调控等。表 2 所示为 18 个上调蛋白及个别下调蛋白信息。图 3 为部分主要差异表达蛋白体外 RT-qPCR 验证。

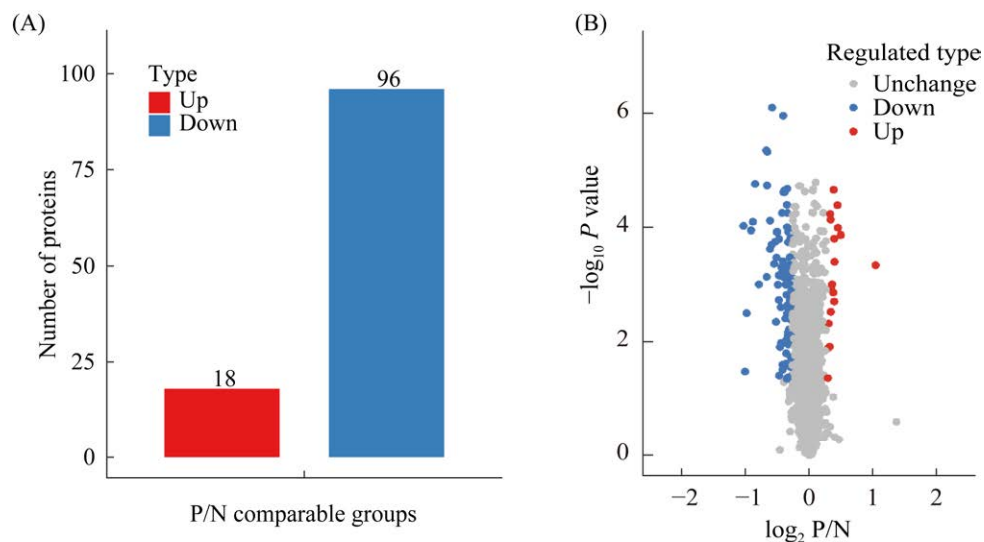


图 1 鉴定差异表达蛋白

Figure 1 Identification of differently expressed proteins. A: distribution of differently expressed proteins on different groups; B: quantitative volcanic map of differently expressed proteins (blue dots show down-regulated proteins, red dots show up-regulated proteins, and grey dots show proteins with no statistically significant difference between the control and test group).

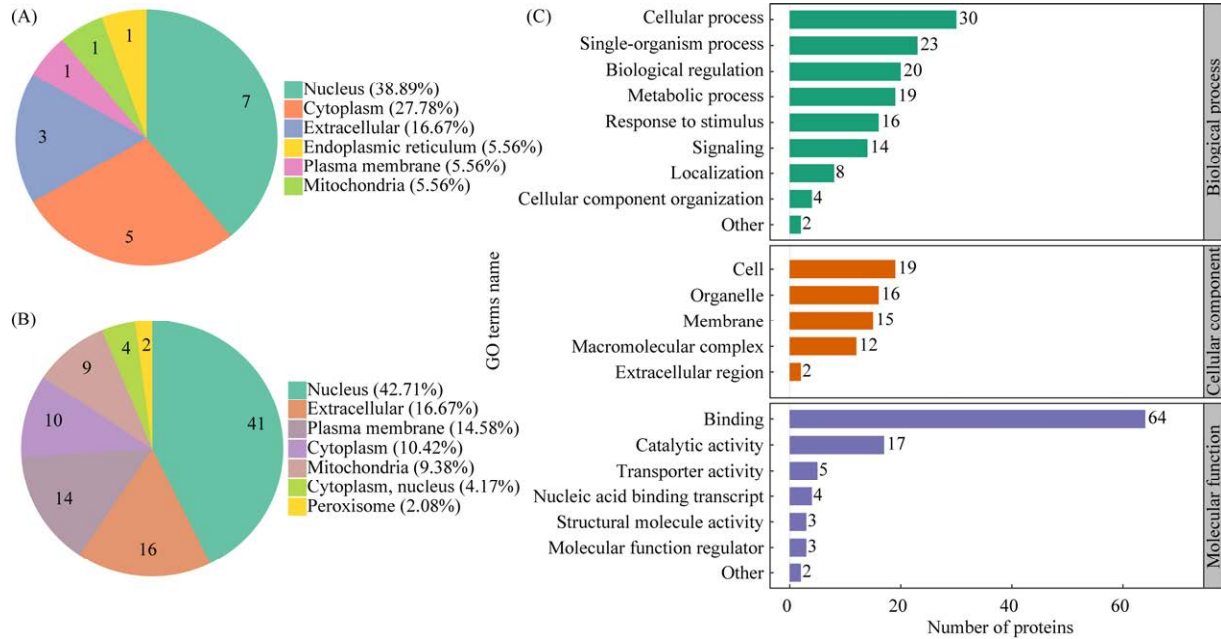


图 2 差异表达蛋白亚细胞定位分析和 GO 富集分析

Figure 2 The analysis of subcellular localization and gene ontology enrichment of differentially expressed proteins. A: significantly up-regulated protein subcellular localization; B: significantly down-regulated protein subcellular localization; C: the annotation of differentially expressed protein using gene ontology.

表 2 部分差异表达蛋白

Table 2 Partial differentially expressed proteins

Protein IDs	Name	Unique peptides	Sequence coverage/%	Regulated type	Fold change
A0A0D9RPFM5	RASA2	6	8.8	Up	2.0
A0A0D9RY56	PIEZO2	1	0.4	Up	1.3
A0A0D9REJ8	LMCD1	6	12.9	Up	1.3
A0A0D9RYZ3	CYP3A5	22	39.0	Up	1.3
A0A0D9RRZ5	ATP5ME	2	27.5	Up	2.0
A0A0D9RJI9	SOD2	9	44.6	Up	1.3
A0A0D9SCL7	HIST1H1C	3	35.2	Up	1.3
A0A0D9RP10	SEMA7A	10	23.4	Up	1.3
A0A0D9RT60	TGFB2	2	5.8	Up	1.3
A0A0D9QZG4	NFKB2	11	14.9	Up	1.3
A0A0D9REI1	CFLAR	2	4.4	Up	1.2
A0A0D9RZJ3	SERPINE1	9	28.6	Up	1.2
A0A0D9R9E7	HMCES	3	8.2	Up	1.2
A0A0D9R6K3	PYROXD1	1	3.6	Up	1.2
A0A0D9SCL0	N/A	1	25.0	Up	1.2
A0A0D9RD19	FOSL2	1	3.7	Up	1.2
A0A0D9RTU6	PBK	2	7.5	Up	1.2
A0A0D9QWA0	N/A	3	7.6	Up	1.2
A0A0D9RNK3	IFT52	2	6.8	Down	2.0
A0A0D9RRZ5	ATP5ME	2	27.5	Down	2.0
A0A0D9S8X6	VWA1	1	3.0	Down	1.5
A0A0D9RNK3	IFT52	2	6.8	Down	1.5
A0A0D9S404	CADM3	10	33.0	Down	1.3
A0A0D9RT60	CCNT1	2	2.3	Down	1.3
A0A0D9RWX0	NCK2	2	6.8	Down	1.3
A0A0D9R1X4	IFT57	1	2.6	Down	1.2
A0A0D9RI15	STAT4	5	6.4	Down	1.2
A0A0D9R3J3	TIMM29	2	8.1	Down	1.2

N/A is a protein with unknown function.

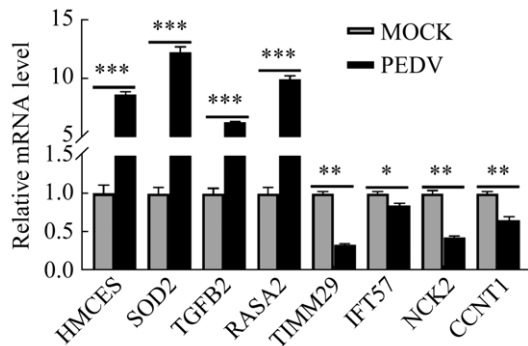


图 3 主要差异表达蛋白 RT-qPCR 验证
Figure 3 Verification of major differentially expressed proteins by RT-qPCR.

2.2 过表达 HMCES 促进 PEDV 复制

在 Vero 细胞中过表达 HMCES 后, 再感染 PEDV, 然后收集细胞样品检测 PEDV N 蛋白水平和转录水平变化。Western blotting 结果显示, 与对照组相比, 试验组 HMCES 蛋白的表达水

平随着时间延长而递增(图 4A); 在 PEDV 感染后的 36 h 时, 试验组 PEDV N 蛋白表达水平明显高于对照组(图 4A), 灰度分析表明差异显著(图 4B); RT-qPCR 结果表明, 过表达 HMCES, PEDV N 基因转录水平明显增加, 与对照组相比, 差异显著(图 4C)。为了进一步验证该结论, 将 24–36 h 区间进行更为细致的划分。分别在病毒感染后的 24、27、30、33、36 h 获取细胞蛋白样品和 RNA 样品, Western blotting 及 RT-qPCR 验证 HMCES 对 PEDV 复制的影响。Western blotting 结果显示, 与对照组相比, 试验组 PEDV N 蛋白表达水平随时间递增而显著高于对照组(图 5A–B); RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, 试验组 PEDV N mRNA 水平显著升高(图 5C)。该结果进一步证明了过表达 HMCES 可显著促进 PEDV 的增殖。

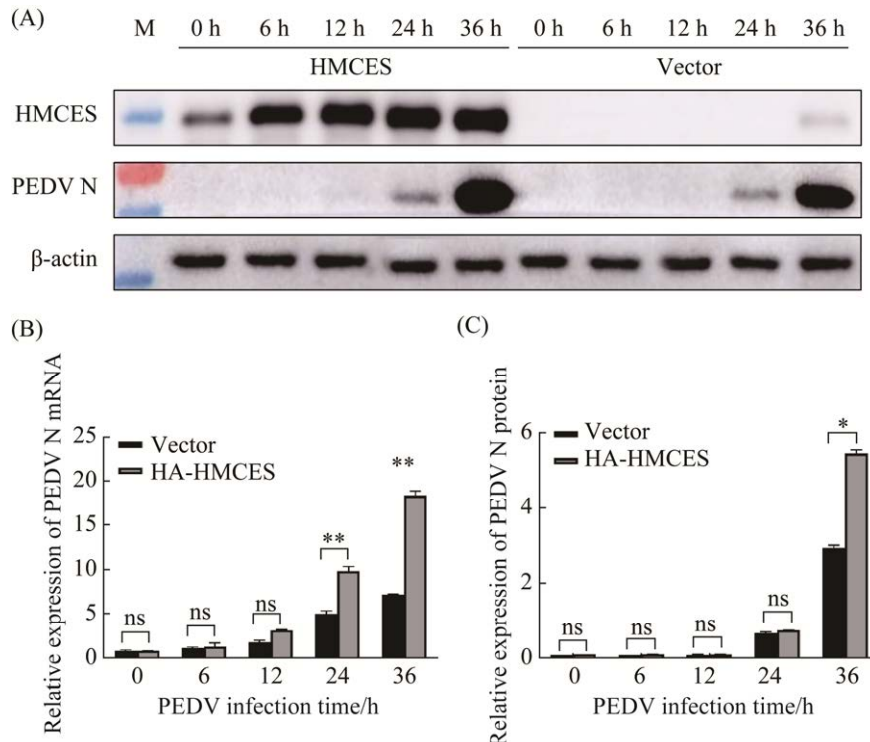


图 4 HMCES 过表达促进 PEDV 复制

Figure 4 HMCES overexpression promotes PEDV replication. A: effect of HMCES overexpression on the expression of PEDV N protein levels were detected by Western blotting; B: the histogram of HMCES protein; C: effect of HMCES overexpression on the expression of PEDV N mRNA levels were detected by RT-qPCR. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

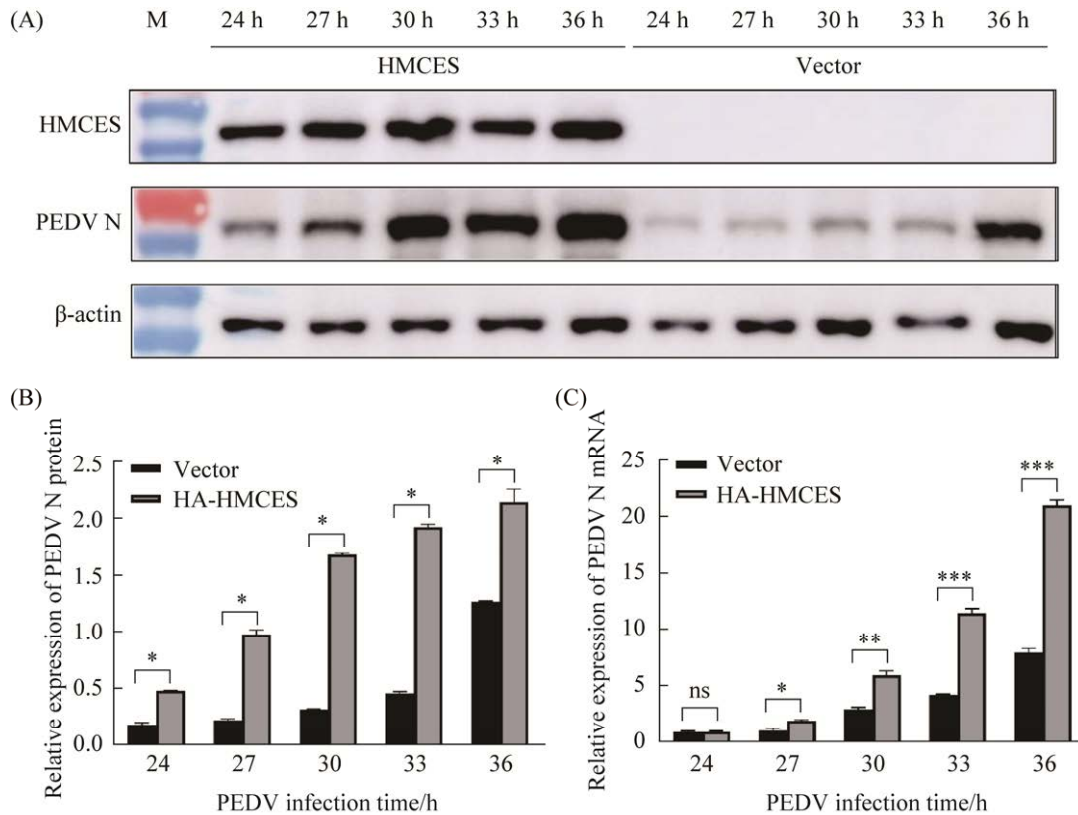


图 5 24–36 h 过表达 HMCES 对 PEDV 复制的影响

Figure 5 The effect of 24–36 h overexpression of HMCES on PEDV replication. A: effect of HMCES overexpression on the expression of PEDV N protein levels were detected by Western blotting at 24–36 h post-infection; B: the histogram of PEDV N protein; C: effect of HMCES overexpression on the expression of PEDV N mRNA levels were detected by RT-qPCR at 24–36 h. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.3 PEDV 对 HMCES 蛋白的剂量依赖性研究

将 0、0.5、1.5、3.0 μg 质粒 HA-HMCES-pcDNA 3.1 转染至 Vero 细胞, 转染 36 h 后, 以 MOI=0.5 的 PEDV 感染细胞, 在感染后 36 h 收集细胞样品, 分别进行 Western blotting 和 RT-qPCR 检测。Western blotting 结果显示, 使用不同量的 HMCES 转染细胞, HMCES 表达量具有显著规律(图 6A); 灰度分析表明, 不同量 HMCES 作用下, PEDV N 蛋白表达量差异显著(图 6B); 并且与对照组相比, 试验组 PEDV N 蛋白表达水平随着 HMCES 转染剂量的增加而

显著升高(图 6C); 在 mRNA 水平, PEDV N 基因表达量随着 HMCES 的剂量递增呈现剂量依赖性增加(图 6D)。

2.4 干扰内源性 HMCES 表达对 PEDV 复制的影响

将合成的 siRNA (341、737、1012) 和对照 NC siRNA 分别转染 Vero 细胞, 24 h 后以 MOI=0.5 的 PEDV 感染细胞, 于接毒感染后 0、6、12、24、36 h 分析病毒复制情况来检测干扰效果。Western blotting 结果显示, 只有 siRNA-341 具有特异性干扰效果(图 7A), 对 siRNA-341 干扰组的蛋白条带进行灰度分析后发现, 干扰内

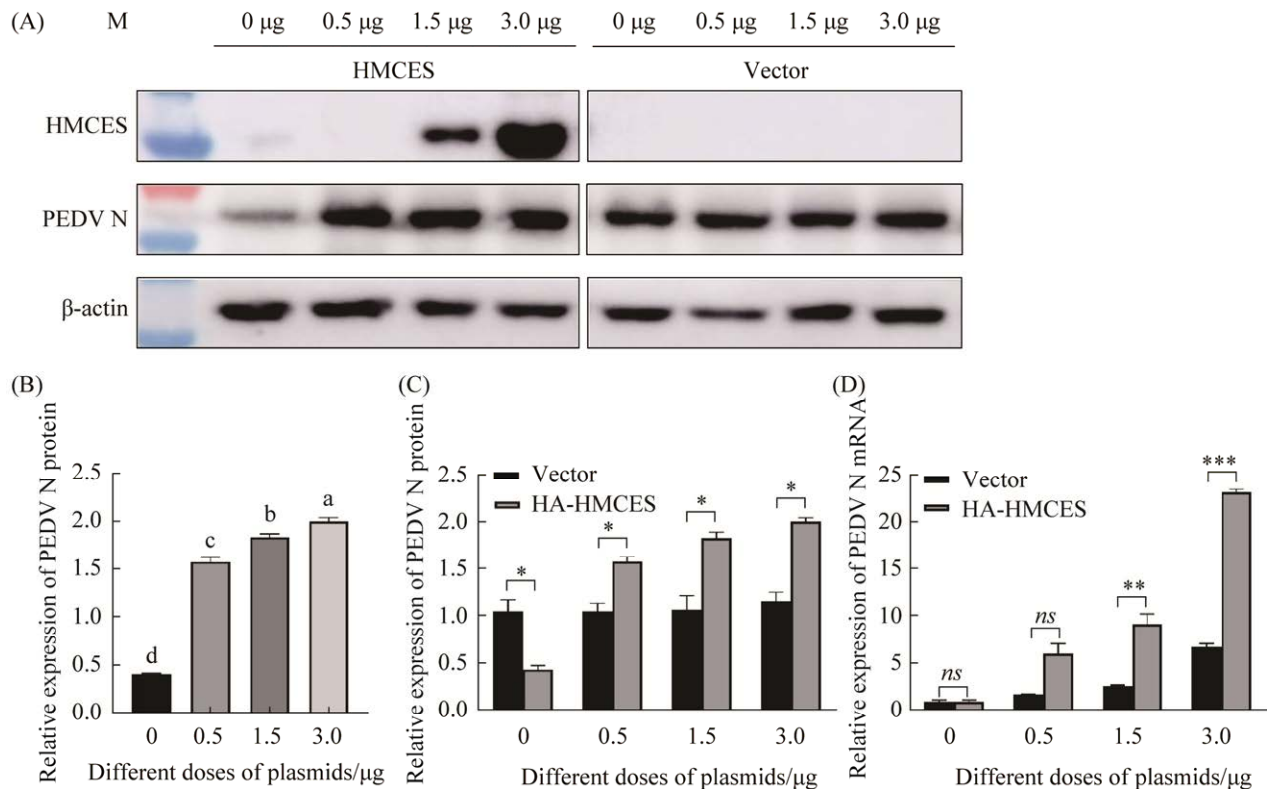


图 6 剂量梯度过表达 HMCES 36 h 对 PEDV 复制的影响

Figure 6 Effect of dose gradient overexpression of HMCES on PEDV replication in 36 hours. A: the effect of dose gradient overexpression of HMCES on PEDV N protein level were detected by Western blotting at 36 hours; B, C: the histogram of PEDV N protein; D: the effect of dose gradient overexpression of HMCES on PEDV N mRNA level were detected by RT-qPCR at 36 hours. Columns with different letters are significantly different ($P < 0.05$), columns with same letters are no significantly different ($P > 0.05$). ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

源性 HMCES 基因表达后 PEDV N 蛋白的表达水平在 36 h 时显著低于对照组(图 7B); RT-qPCR 结果显示, siRNA341 可以沉默内源性 HMCES 基因的表达进而抑制 PEDV 在 Vero 细胞中复制(图 7C)。

3 讨论

病毒感染可引起宿主细胞内相关蛋白质表达水平发生变化, 进而影响宿主生理功能与病毒活性, 而蛋白质组学技术有利于深入揭示病毒与宿主之间互作关系及致病机理, 现已成为一种广泛的病毒-宿主研究手段^[25-26]。本研究基

于 LC-MS/MS 和 TMT 蛋白组学技术研究 PEDV 感染 Vero 细胞后对蛋白表达影响与相互作用, 以其中的上调蛋白 HMCES 为研究对象, 展开相关研究。此前, HMCES 相关研究集中于 DNA 修复与肿瘤方面, 在病毒方面鲜有报道。Viktorovskaya 等^[27]首次证明了 HMCES 参与病毒感染, 利用 qTUX-MS 技术检测与登革热病毒(Dengue virus, DENV)相关的宿主因子时发现, HMCES 是 DENV 增殖所必需的, 当敲低宿主 HMCES 基因表达时, 细胞活力并不受影响, 但 DENV 复制水平被显著抑制。本研究结果显示, 过表达 HMCES, PEDV 复制加强, 且

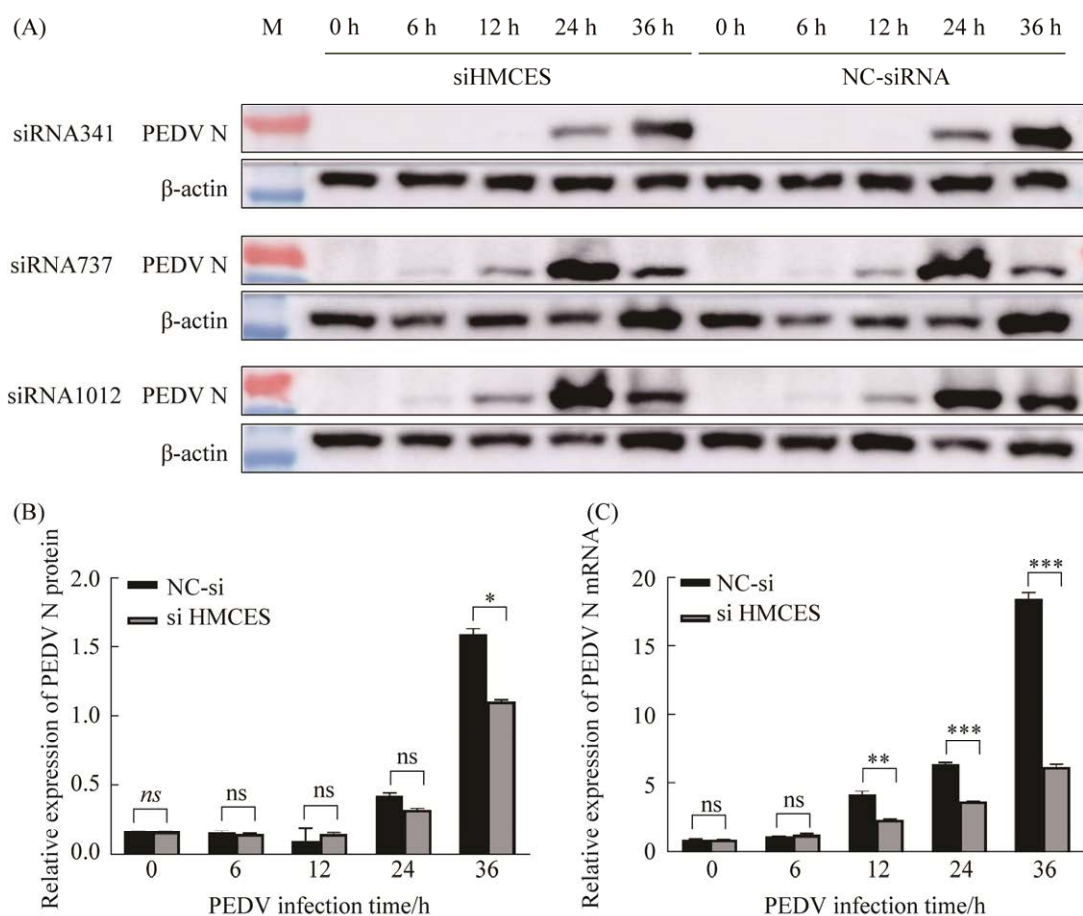


图7 干扰 HMCES 抑制 PEDV 复制

Figure 7 HMCES knockdown inhibits PEDV replication. A: effect of HMCES knockdown on the expression of PEDV N protein levels were detected by Western blotting; B: the histogram of PEDV N protein; C: effect of HMCES knockdown on the expression of PEDV N mRNA levels were detected by RT-qPCR. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

与 HMCES 剂量存在正相关性；干扰内源性 HMCES 基因表达可显著抑制 PEDV 复制。该结果与 HMCES 影响 DENV 作用相似，也是首次证明了 HMCES 正调控 PEDV 在 Vero 细胞中复制。

Viktorovskaya 等^[27]采用 qTUX-MS 技术所鉴定的细胞蛋白是 hnRNP，包括一大类 RNA 结合蛋白，这些蛋白定位于细胞核或在细胞核和细胞质之间穿梭，以便在 RNA 代谢中执行多种功能，从转录到 RNA 转换，更重要的是，这些蛋白中绝大多数在病毒感染或在调节抗病毒

的宿主机制中扮演重要角色^[28-29]。HMCES 是一类 DNA 识别蛋白，具有肽酶活性^[22]，干扰内源性 HMCES 基因的表达均导致 RNA 病毒-DENV 和 PEDV RNA 减少，说明 HMCES 很可能在病毒翻译、复制或从翻译到复制的转换过程中发挥重要作用。值得注意的是，此次研究结果显示，HMCES 促进 PEDV 的复制，但组学结果表明 PEDV 感染 Vero 细胞宿主蛋白 HMCES 差异倍数较小，仅为 1.2，造成这一差异的原因可能不仅与 HMCES 自身肽酶活性自剪切功能^[22]有关，而且与 PEDV 感染时间长短

有关。病毒感染 36 h 时, HMCES 对 PEDV 的复制效率最为显著;在 24–36 h 区间时, HMCES 对 PEDV 的复制效率逐渐加强, 猜测在该过程中由于 HMCES 的自我剪切功能导致其差异倍数变小, 但具体的作用机制仍有待进一步研究。此外, 在许多类似的宿主蛋白与病毒互作研究中, 感染前后差异倍数较大的宿主蛋白不一定在后续验证过程中得到确认, 因为生物信息学分析只是一个初步的结论, 存在一定比例的误差, 并不能反映百分之百真实结果, 因此还需要后续蛋白质免疫印迹试验进一步验证。

自噬被认为是 RNA 病毒复制的平台, 例如猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和轮状病毒(RV), 利用细胞膜用于复制的自噬体样囊泡来进行病毒自我复制^[30–32]。2017 年, Guo 等^[33]首次通过使用自噬调节剂和 RNA 干扰证实 Vero 细胞自噬有益于 PEDV 复制; 此外, 自噬可能与炎性细胞因子的表达有关, 并且在 PEDV 感染期间与 NF- κ B 信号通路具有正反馈回路。Lin 等^[34]研究发现, PEDV nsp6 和 ORF3 在 IPEC-J2 细胞中主要通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导自噬, 加速了 PEDV 的感染及发病速率。在该研究中, HMCES 促进 PEDV 复制的机制中是否其本身参与了诱导自噬发生? 这一问题仍然需要进一步深究。

此外, 研究发现 HMCES 在大多数肿瘤组织中表达水平很高, 包括肝癌、宫颈癌、肺鳞癌、胰腺腺癌、淋巴癌、胸腺癌和葡萄膜黑色素瘤等^[35], HMCES 在这些肿瘤组织异常高表达提示, HMCES 可能是一个潜在的肿瘤标志物^[36], 这些研究拉近了宿主 HMCES 与病毒的关系。已有间接研究表明, HMCES 借助自身特殊结构与病毒存在微妙联系, HMCES 基因结构除了 SRAP 结构域外, 在其羧基端延伸序列中含有 3 个串联的 PCNA 结合肽段基序, 可以介

导 HMCES 与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)或其他 DNA 修复蛋白的结合, 并发挥氨基端自剪切蛋白酶的自主抑制功能^[37]。Feng 等^[38]在研究肝癌肿瘤发生过程时发现, 增殖细胞核抗原 PCNA 极有可能发挥重要作用, 结果显示, 过表达 PCNA 显著上调乙型肝炎病毒(HBV)在 HepaRG 细胞和 HepG2-NTCP 细胞中复制, 进而促进肝癌肿瘤生长; 沉默内源性 PCNA 基因表达显著下调 HBV 的复制从而抑制肝癌肿瘤生长。结合 HMCES 与 PCNA 结构特点, PCNA 在调控 HBV 增殖进而控制肿瘤生长过程中 HMCES 是否发挥作用及直接参与调控病毒增殖, 目前没有文献支撑, 需要进一步验证。但本研究结果表明, 宿主 HMCES 参与了 PEDV 复制过程, 但二者具体相互作用机制模式仍需要利用免疫共沉淀、蛋白抑制剂增补或相应信号通路关键因子检测等各种措施, 在蛋白水平与转录水平进一步深入研究。

本研究首次开启了 HMCES 与 PEDV 研究之旅, HMCES 可能是 PEDV 复制的正调控因子, 过表达 HMCES 可以促进 PEDV 的复制, 存在剂量依赖正向效应。相反, 干扰 Vero 细胞内源性 HMCES 基因的表达后可以显著抑制 PEDV 的复制。这一研究结果为深入研究宿主与病毒互作奠定了基础, 同时提示宿主 HMCES 可能作为促进 PEDV 复制的潜在靶点发挥作用。

参考文献

- [1] Jung K, Saif LJ, Wang QH. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): an update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Research*, 2020, 286: 198045.
- [2] Sun DB, Wang XY, Wei S, Chen JF, Feng L. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 78(3): 355–363.

- [3] Wang QH, Vlasova AN, Kenney SP, Saif LJ. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Current Opinion in Virology*, 2019, 34: 39–49.
- [4] Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *The Veterinary Record*, 1977, 100(12): 243–244.
- [5] Chasey D, Cartwright SF. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, 1978, 25(2): 255–256.
- [6] Shi W, Jia S, Zhao HY, Yin JY, Wang XN, Yu ML, Ma ST, Wu Y, Chen Y, Fan WL, Xu YG, Li YJ. Novel approach for isolation and identification of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) strain NJ using porcine intestinal epithelial cells. *Viruses*, 2017, 9(1): 19.
- [7] Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ. Emergence of porcine epidemic diarrhoea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(5): 649–654.
- [8] De Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, Van Hemert MJ. Host factors in coronavirus replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2018, 419: 1–42.
- [9] Jiang YL, Qin YL, Chen MZ. Host-pathogen interactions in measles virus replication and anti-viral immunity. *Viruses*, 2016, 8(11): 308.
- [10] Hyodo K, Okuno T. Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. *Current Opinion in Virology*, 2016, 17: 11–18.
- [11] Kaewborisuth C, Yingchutrakul Y, Roytrakul S, Jongkaewwattana A. Porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) ORF3 interactome reveals inhibition of virus replication by cellular VPS36 protein. *Viruses*, 2019, 11(4): 382.
- [12] Kong N, Shan TL, Wang H, Jiao YJ, Zuo YW, Li LW, Tong W, Yu LX, Jiang YF, Zhou YJ, Li GX, Gao F, Yu H, Zheng H, Tong GZ. BST2 suppresses porcine epidemic diarrhoea virus replication by targeting and degrading virus nucleocapsid protein with selective autophagy. *Autophagy*, 2020, 16(10): 1737–1752.
- [13] Van Diep N, Sueyoshi M, Norimine J, Hirai T, Myint O, Teh APP, Izzati UZ, Fuke N, Yamaguchi R. Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013–2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 96.
- [14] Su YF, Liu YC, Chen YM, Zhao BL, Ji PC, Xing GX, Jiang DW, Liu C, Song YP, Wang GQ, Li DL, Deng RG, Zhang GP. Detection and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhoea virus in central China based on the ORF3 gene and the S1 gene. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 192.
- [15] Guo JH, Fang LR, Ye X, Chen JY, Xu SG, Zhu XY, Miao YM, Wang D, Xiao SB. Evolutionary and genotypic analyses of global porcine epidemic diarrhoea virus strains. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(1): 111–118.
- [16] 王理想. TRIM56 抑制猪流行性腹泻病毒复制的分子机制研究. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
- [17] McBride R, Van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, 2014, 6(8): 2991–3018.
- [18] 李向茸, 李倩, 冯若飞. 冠状病毒的研究进展. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(1): 22–38.
- Li XR, Li Q, Feng RF. Research progress of coronaviruses. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2021, 37(1): 22–38. (in Chinese)
- [19] Shukla V, Halabelian L, Balagere S, Samaniego-Castruita D, Feldman DE, Arrowsmith CH, Rao A, Aravind L. HMCES functions in the alternative end-joining pathway of the DNA DSB repair during class switch recombination in B cells. *Molecular Cell*, 2020, 77(2): 384–394.e4.
- [20] Aravind L, Anand S, Iyer LM. Novel autoproteolytic and DNA-damage sensing components in the bacterial SOS response and oxidized methylcytosine-induced eukaryotic DNA demethylation systems. *Biology Direct*, 2013, 8: 20.
- [21] Kweon SM, Zhu B, Chen YB, Aravind L, Xu SY, Feldman DE. Erasure of Tet-oxidized 5-methylcytosine by a SRAP nuclease. *Cell Reports*, 2017, 21(2): 482–494.
- [22] Mohni KN, Wessel SR, Zhao RX, Wojciechowski AC, Luzwick JW, Layden H, Eichman BF, Thompson PS, Mehta KPM, Cortez D. HMCES maintains genome integrity by shielding abasic sites in single-strand DNA. *Cell*, 2019, 176(1/2): 144–153.e13.
- [23] Hu PZ, Janga SC, Babu MH, Díaz-Mejía JJ, Butland G, Yang WH, Pogoutse O, Guo XH, Phanse S, Wong P, Chandran S, Christopoulos C, Nazarians-Armavil A, Nasserli NK, Musso G, Ali M, Nazemof N, Eroukova V, Golshani A, Paccanaro A, Greenblatt JF, Moreno-Hagelsieb G, Emili A. Global functional atlas of

- Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biology*, 2009, 7(4): e96.
- [24] Liu XS, Zhang QL, Zhang LP, Zhou P, Yang J, Fang YZ, Dong ZL, Zhao DH, Li WY, Feng JX, Cui BF, Zhang YG, Wang YL. A newly isolated Chinese virulent genotype GIIb porcine epidemic diarrhea virus strain: biological characteristics, pathogenicity and immune protective effects as an inactivated vaccine candidate. *Virus Research*, 2019, 259: 18–27.
- [25] Li L, Xue M, Fu F, Yin LD, Feng L, Liu PH. IFN-lambda 3 mediates antiviral protection against porcine epidemic diarrhea virus by inducing a distinct antiviral transcript profile in porcine intestinal epithelia. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2394.
- [26] Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, Westphall MS, Coon JJ. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(11): 1475–1488.
- [27] Viktorovskaya OV, Greco TM, Cristea IM, Thompson SR. Identification of RNA binding proteins associated with dengue virus RNA in infected cells reveals temporally distinct host factor requirements. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016, 10(8): e0004921.
- [28] Li Y, Masaki T, Shimakami T, Lemon SM. hnRNP L and NF90 interact with hepatitis C virus 5'-terminal untranslated RNA and promote efficient replication. *Journal of Virology*, 2014, 88(13): 7199–7209.
- [29] Sola I, Mateos-Gomez PA, Almazan F, Zuñiga S, Enjuanes L. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biology*, 2011, 8(2): 237–248.
- [30] Pei JJ, Zhao MQ, Ye ZD, Gou HC, Wang JY, Yi L, Dong XY, Liu WJ, Luo YW, Liao M, Chen JD. Autophagy enhances the replication of classical swine fever virus *in vitro*. *Autophagy*, 2014, 10(1): 93–110.
- [31] Sun MX, Huang L, Wang R, Yu YL, Li C, Li PP, Hu XC, Hao HP, Ishag HA, Mao X. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces autophagy to promote virus replication. *Autophagy*, 2012, 8(10): 1434–1447.
- [32] Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *Journal of Virology*, 2006, 80(12): 6061–6071.
- [33] Guo XZ, Zhang MJ, Zhang XQ, Tan X, Guo HK, Zeng W, Yan GK, Memon AM, Li ZH, Zhu YX, Zhang BZ, Ku XG, Wu MZ, Fan SX, He QG. Porcine epidemic diarrhea virus induces autophagy to benefit its replication. *Viruses*, 2017, 9(3): 53.
- [34] Lin HX, Li B, Liu MX, Zhou H, He KW, Fan HJ. Nonstructural protein 6 of porcine epidemic diarrhea virus induces autophagy to promote viral replication via the PI3K/Akt/mTOR axis. *Veterinary Microbiology*, 2020, 244: 108684.
- [35] Luo H, Ma C, Shao JP, Cao J. Prognostic implications of novel ten-gene signature in uveal melanoma. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 567512.
- [36] 张慧颖. HMCES 在非小细胞肺癌中的功能及机制研究. 浙江大学博士学位论文, 2021.
- [37] Mehta KPM, Lovejoy CA, Zhao RX, Heintzman DR, Cortez D. HMCES maintains replication fork progression and prevents double-strand breaks in response to APOBEC deamination and abasic site formation. *Cell Reports*, 2020, 31(9): 107705.
- [38] Feng JY, Yang G, Liu YX, Gao YE, Zhao M, Bu YN, Yuan HF, Yuan Y, Yun HL, Sun MM, Gao HW, Zhang SQ, Liu ZX, Yin M, Song XJ, Miao ZC, Lin ZQ, Zhang XD. LncRNA PCNAPI modulates hepatitis B virus replication and enhances tumor growth of liver cancer. *Theranostics*, 2019, 9(18): 5227–5245.

(本文责编 李磊)