

· 其 他 ·

猪流行性腹泻病毒 nsp1 对 I 型干扰素应答的影响

王晓雪, 李红杰, 李永涛, 高冬生, 陈陆, 常洪涛, 刘红英, 王川庆, 赵军

河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002

王晓雪, 李红杰, 李永涛, 等. 猪流行性腹泻病毒 nsp1 对 I 型干扰素应答的影响. 生物工程学报, 2017, 33(8): 1325-1334.
Wang XX, Li HJ, Li YT, et al. Effect of porcine epidemic diarrhea virus nsp1 on type I interferon response. Chin J Biotech, 2017, 33(8): 1325-1334.

摘要: 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 能抑制宿主 I 型干扰素及其诱导的细胞抗病毒免疫应答, 但是 PEDV 抑制 I 型干扰素应答的分子机制尚不明了, 尤其是 PEDV 非结构蛋白 (Nonstructural proteins, nsps) 在 I 型干扰素应答中的调控作用研究不多。为研究 PEDV 非结构蛋白 1 (nsp1) 对细胞 I 型干扰素应答的影响, 构建了真核表达载体 pCAGGS-nsp1, 采用 Western blotting 和间接免疫荧光试验确定 nsp1 在细胞中的表达。通过报告基因法、ELISA 以及病毒复制抑制试验评估 nsp1 对 I 型 IFN 的影响。结果显示, nsp1 在转染细胞和病毒感染细胞中均高效表达。双荧光报告基因试验结果表明, nsp1 能显著抑制 IFN- β 启动子活性, 且具有剂量依赖性。ELISA 结果显示, nsp1 能显著抑制 IFN- β 蛋白的表达。水泡性口炎病毒 (VSV) 复制抑制试验结果显示, nsp1 明显抑制 poly(I:C) 介导的 I 型 IFN 的抗病毒作用。结果提示, nsp1 作为 PEDV 的保守蛋白, 具有拮抗 I 型干扰素启动子活性和应答的功能, 为揭示 PEDV 逃逸宿主天然免疫应答的机制和研发新型高效抗 PEDV 疫苗奠定基础。

关键词: 猪流行性腹泻病毒, 非结构蛋白 1, I 型干扰素

Received: February 24, 2017; **Accepted:** May 31, 2017

Supported by: Program for Science & Technology Innovation Team in the Universities of Henan Province (No. 14IRTSTHN015), Key Scientific Research Project of Henan Higher Education (No.16A230002), International Cooperation and Exchange Project for Zhengzhou City (No. 153PGJHZ203).

Corresponding author: Jun Zhao. Tel/Fax: +86-371-63558529; E-mail: zhaoj@henau.edu.cn

河南省高校科技创新团队支持计划 (No. 14IRTSTHN015), 河南省高等学校重点科研项目 (No. 16A230002), 郑州市国际合作交流项目 (No. 153PGJHZ203) 资助。

网络出版时间: 2017-07-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170705.1420.005.html>

Effect of porcine epidemic diarrhea virus nsp1 on type I interferon response

Xiaoxue Wang, Hongjie Li, Yongtao Li, Dongsheng Gao, Lu Chen, Hongtao Chang, Hongying Liu, Chuanqing Wang, and Jun Zhao

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) inhibits the host type I interferon and cellular antiviral response, but its inhibition mechanism is unclear, and the roles of PEDV nonstructural proteins in regulating type I interferon responses have been seldom studied. To study the effect of nsp1 on type I interferon response, nsp1 gene was cloned into a eukaryotic expression vector pCAGGS. The expression of nsp1 in transfected cells was determined by Western blot and indirect immunofluorescence assay. The effects of nsp1 on the induction of type I interferon were evaluated by dual luciferase reporter gene assay, ELISA and VSV bioassay. Western blot and indirect immunofluorescence assay showed that nsp1 was highly expressed in transfected cells and PEDV-infected cells. Dual luciferase reporter gene assay results indicated that nsp1 strongly inhibited the IFN- β promoter activity, and the inhibitory effect was nsp1 dose-dependent. ELISA results showed that nsp1 significantly inhibited the expression of IFN- β in protein level. And VSV replication-inhibition bioassay revealed that nsp1 significantly inhibited type I IFN antiviral activities induced by poly(I:C). Our results implied that nsp1 was a highly conserved protein of PEDV and exhibited antagonistic function on interferon promoter activity. The results have laid a foundation for further understanding the immune evasion mechanism of PEDV and for developing new effective vaccine against PEDV.

Keywords: PEDV, nonstructural protein 1, type I interferon

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种急性、高度传染性的肠道疾病, 以感染猪呕吐、脱水和水样腹泻以及仔猪的高死亡率为主要特征^[1]。PED 在中国的流行于 1984 年得到证实, 随后由于灭活苗的广泛使用使疫情得到有效控制^[2-4]。2010 年下半年以来, PEDV 再次在中国大规模暴发, 此次流行对 2 周龄以内的哺乳仔猪影响较大, 死亡率可高达 100%, 感染仔猪发病急, 腹泻 3-4 d 后严重脱水死亡^[5-6]。2013 年美国历史上也首次暴发 PED, 并很快蔓延至其他的北美国家^[7-8],

PED 的流行已经对世界各国的养猪业造成了巨大损失。

PEDV 属于冠状病毒科 (Coronaviridae) α 冠状病毒属 (α -CoV) 的成员, 为单股正链 RNA 病毒, 5'端有一个帽子结构, 3'端有一个 poly(A)尾。病毒基因组全长 28 kb, 包含 ORF1a、ORF1b、S、ORF3、E、M 和 N 等 7 个开放阅读框。ORF1a 编码复制酶多聚蛋白 (Polyprotein) PPla, ORF1b 编码的是一个融合蛋白 PPla/b, 融合蛋白包含 16 个非结构蛋白 (Nsps), 从 nsp1 到 nsp16, 这些非结构蛋白经病毒蛋白酶酶切后, 参与病毒 RNA 的复制和转录^[9-11]。

α -CoV 的 nsp1 编码约 110 个氨基酸, 为 PPla 蛋白 N 端的剪切产物, 是宿主细胞细胞质中的第一个成熟的病毒蛋白。在冠状病毒的 4 个种属中, α -CoV 和 β -CoV 编码有 nsp1, 而 γ -CoV 和 δ -CoV 仅编码除 nsp1 外的 15 个非结构蛋白 (nsp2-nsp16)^[12], 并且 α -CoV 和 β -CoV 两个种属的 nsp1 也没有非常相似的序列同源性^[13], 所以 nsp1 可以被认为是种属特异性基因^[12]。有文献报道, 鼠肝炎病毒的 nsp1 截短后, 在细胞上的增殖与野生株类似, 但是在小鼠体内的增殖明显受到了抑制^[14]。另外, 将猪传染性胃肠炎病毒的 nsp1 与 nsp2 切割位置的碱基突变阻止了 nsp1 的释放后, 病毒的生存能力显著降低^[15]。这些结果均提示 nsp1 可能是病毒的毒力因子之一。近几年, nsp1 对宿主基因表达和在病毒逃避宿主天然免疫应答当中的调控作用备受关注。有研究显示, 与 PEDV nsp1 有较高氨基酸序列同源性的冠状病毒 NL63 和 229E 的 nsp1, 能显著抑制 IFN- β 、干扰素刺激基因 15 (ISG15) 和携带有干扰素刺激反应元件 (ISRE) 的报告基因的表达^[14,16]。另外, SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 的 nsp1 能够抑制多种宿主基因 mRNA 的表达, 包括参与天然免疫中的 I 型干扰素的表达^[17]。

为了研究 PEDV nsp1 对宿主天然免疫应答的调控功能, 本研究克隆和表达了 PEDV nsp1 基因, 利用 Western blotting、间接免疫荧光试验、双荧光素酶报告基因法及猪水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 复制抑制试验研究 nsp1 对 I 型 IFN 应答的影响。

1 材料与方 法

1.1 病毒、质粒、菌株、细胞和主要试剂

PEDV 流行株 CH/ZMDZY/11(GenBank 登

录号: KC196276)、带有绿色荧光标记的猪水泡性口炎病毒 (VSV-GFP)、pET-28a(+) 原核表达载体、带有 HA 标签的真核表达载体 pCAGGS、含有荧光素酶基因的 IFN- β 启动子报告质粒 (IFN- β -luc), 以及含有海肾荧光素酶的 pRL-TK 内参报告质粒、HEK-293T、A549 和 Vero 细胞, 均由本实验室制备和保存。DH5 α 和 BL21(DE3) 菌株感受态细胞购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。人 IFN- β ELISA 检测试剂盒购自上海瓦兰生物科技有限公司。

限制性内切酶 *Nco* I、*Eco*R I 和 *Xho* I 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。HRP-羊抗鼠 IgG、HRP-羊抗兔 IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司。FITC-羊抗兔 IgG 和 DAPI 购自武汉博士德生物工程有限公司。poly(I:C) 购自 Sigma 公司。Dual-Luciferase reporter assay system 购自 Promega 公司。

1.2 基因克隆与载体构建

以本实验室分离和保存的 PEDV 河南流行株 CH/ZMDZY/11 序列 (GenBank 登录号: KC196276) 为基础, 设计两对 nsp1 序列特异性引物。以 PEDV CH/ZMDZY/11 毒株基因组 cDNA 为模板, PCR 扩增 nsp1 基因, 引物对 1 的上、下游引物分别引入 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点, 序列如下, 上游引物: 5'-CATGCCATGGGCGCTAGCAACCAAGTCACATTGG-3'; 下游引物: 5'-ATACTCGAGACCACCACGACGACCAAAAAG-3', 扩增出的片段经 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切后克隆入经相同酶切的 pET-28a(+) 载体中。引物对 2 的上、下游引物分别引入 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点, 序列如下, 上游引物: 5'-AATGAATTCGCTAGCAACCAAGTCACATTGGC-3'; 下游引物: 5'-ATACTCGA

GACCACCACGACGACCAAAAAGTG-3'，扩增出的片段经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后克隆入经相同酶切的 pCAGGS-HA 载体中。最终获得重组质粒 pET-28a-nsp1 和 pCAGGS-nsp1，经酶切和序列测定验证载体序列的正确性。

1.3 Nsp1 多克隆抗体的制备及抗体效价的测定

将鉴定正确的重组质粒 pET-28a-nsp1 转入 BL21(DE3) 宿主菌中，经过异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达后，超声裂解表达菌体，收取上清，参照 His 标签蛋白镍柱亲和层析纯化说明书进行重组蛋白的纯化，洗脱样品进行 SDS-PAGE 分析。将纯化后的 nsp1 用 BCA 法进行蛋白含量的测定，每只兔子免疫剂量为 500 μ g，与弗氏佐剂体积比 1:1 混合乳化后进行背部多点注射免疫。间隔 2 周分别进行二免和三免，三免 10 d 后采血，分离血清。用纯化的 nsp1 原核蛋白包被板子，包被量为 0.5 μ g/孔，将分离得到的抗 nsp1 阳性及阴性血清分别按照 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000 等倍数进行稀释，以 HRP-羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释) 作为二抗，间接 ELISA 方法测定 nsp1 多克隆抗体效价。

1.4 nsp1 真核表达鉴定

在六孔细胞板中培养 HEK-293T 细胞，待细胞长至单层时转染 pCAGGS-nsp1 和 pCAGGS 质粒，转染剂量为 2 μ g/孔，转染 24 h 后，分别以兔抗 nsp1 多克隆抗体和鼠抗 GAPDH 为一抗，以 HRP-羊抗兔 IgG 和 HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗，通过 Western blotting 来验证 nsp1 和内参蛋白 GAPDH 的真核表达。

1.5 PEDV 感染细胞中 nsp1 表达鉴定

在六孔细胞板中培养 Vero 细胞，待细胞长至单层时感染 PEDV 流行株 CH/ZMDZY/11，接毒剂量为 0.5 MOI (Multiplicity of infection, MOI)，待 20 h 细胞病变完全后，通过常规方法进行间接免疫荧光试验鉴定病毒感染细胞中 nsp1 的表达：以兔抗 nsp1 多克隆抗体 (1:100 稀释) 为一抗，以 FITC-羊抗兔 IgG (1:100 稀释) 为二抗，在荧光显微镜下观察染色结果。

1.6 双荧光素酶法验证 nsp1 对 IFN- β 启动子活性影响

HEK-293T 接种 12 孔板，待细胞生长密度达到 70% 左右时转染 pCAGGS-nsp1 质粒以及干扰素报告质粒 IFN- β -luc 和内参基因质粒 pRL-TK，3 种质粒转染剂量比率为 10:10:1，转染总剂量为 1.05 μ g/孔，同时设立转染空质粒 pCAGGS 和报告质粒对照。24 h 后再次转染 poly(I:C) (1 μ g/孔)，使其作用 12 h。然后采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行酶活性测定，结果取萤火虫荧光素酶信号值与海肾荧光素酶活性值的比值，每个组设 3 个重复。

1.7 nsp1 不同表达剂量对 IFN- β 启动子活性影响

为探究 nsp1 表达量对 I 型干扰素启动子活性的影响，将 HEK-293T 接种 12 孔板，待细胞生长密度达到 70% 左右时，分别将 0.5 μ g/孔、1 μ g/孔和 2 μ g/孔 3 种剂量的 pCAGGS-nsp1 质粒与等剂量的 IFN- β -luc (0.5 μ g/孔) 和 pRL-TK (0.05 μ g/孔) 共转染，并且同时设立 pCAGGS (2 μ g/孔) 和报告质粒对照组，poly(I:C) 刺激 12 h 后测定萤火虫荧光素酶信号值与海肾荧光素酶活性值的比值，每个组设 3 个重复。

1.8 ELISA 检测 IFN- β 的表达水平

将目的质粒 pCAGGS-nsp1 和空质粒 pCAGGS 分别转染 HEK-293T 细胞 (各 1 μ g/孔), 24 h 后再转染 poly(I:C) (1 μ g/孔), 使其作用 12 h, 收取细胞上清, 用 IFN- β 定量 ELISA 试剂盒于 450 nm 处测定各孔 OD 值。根据标准曲线换算出样本中 IFN- β 含量 (pg/mL)。

1.9 VSV 病毒复制抑制试验

HEK-293T 接种 12 孔板, 等细胞生长密度达到 70% 左右, 转染目的质粒 pCAGGS-nsp1, 同时设立转染空质粒 pCAGGS 对照。转染质粒 24 h 后, 转染 poly(I:C) (1 μ g/孔), 12 h 后将细胞及培养液混合物反复冻融 3 次收取细胞上清, 然后将细胞上清以 2^0 、 2^{-1} 、 2^{-2} 、 2^{-3} 、 2^{-4} 、 2^{-5} 、 2^{-6} 稀释后接种于 96 孔板上培养的 A549 细胞, 每孔 100 μ L, 作用 24 h 后, 接种 VSV-GFP 病毒 (100 TCID₅₀/孔), 接毒后 16 h, 通过荧光显微镜观察荧光表达情况。

1.10 统计学分析

以上所有数据均采用双尾 T 检验进行统计分析, 数据由平均值 \pm 标准方差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极为显著。

2 结果与分析

2.1 nsp1 基因克隆与载体构建

选取 GenBank 数据库中 24 株国内外代表性 PEDV 毒株 (包括 22 株流行毒株和 2 株疫苗毒株), 通过生物信息学预测这些 PEDV nsp1 基因的开放阅读框。氨基酸序列分析结果显示, 不同地域的 PEDV 流行毒株与疫苗毒株的 nsp1 非常保守, 氨基酸序列同源性最低为 97.2%, 最高为 100% (结果未显示)。利用所设计的 PEDV

nsp1 基因引物, 通过 PCR 扩增出约 330 bp 的单一片段, 与预期大小相符。提取 pET-28a-nsp1 与 pCAGGS-nsp1 重组质粒, 对 pET-28a-nsp1 进行 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切, 对 pCAGGS-nsp1 进行 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, 均获得了约 330 bp 左右的目的条带 (图 1)。将酶切鉴定正确的表达载体进行序列测定, 测序结果说明 nsp1 基因在两个载体中的位置插入正确, 核酸序列与预期结果一致。

2.2 PEDV nsp1 蛋白原核表达、纯化及多克隆抗体效价的测定

将获得的重组阳性质粒 pET-28a-nsp1 转入 BL21(DE3) 感受态, IPTG 诱导表达后, 经 SDS-PAGE 验证表达, 并经镍柱纯化后得到带有 His 标签的 nsp1 融合蛋白, 相对分子质量大小约为 12 kDa (图 2)。用纯化的重组 nsp1 免疫小鼠, 三免 10 d 后采血, 采用间接 ELISA 测定抗体效价。结果显示, 三免后多克隆抗体效价达 1 : 64 000 (表 1)。

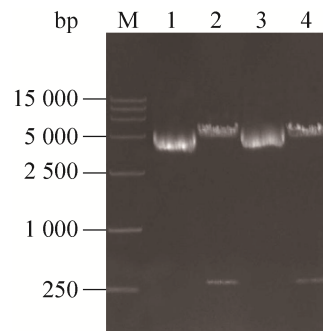


图 1 PEDV nsp1 的克隆与重组质粒的鉴定

Fig. 1 Cloning of PEDV nsp1 and identification of recombinant plasmids. M: 15 000 bp ladder DNA marker; 1: pCAGGS-nsp1; 2: pCAGGS-nsp1/*Eco*R I + *Xho* I; 3: pET-28a-nsp1; 4: pET-28a-nsp1/*Nco* I + *Xho* I.

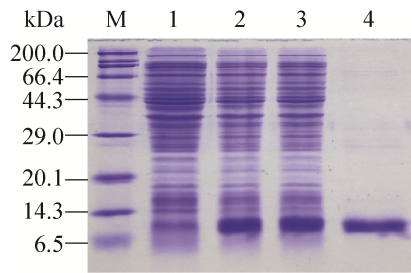


图2 重组 nsp1 的表达及纯化

Fig. 2 Expression and purification of recombinant nsp1. M: protein marker; 1: whole cell lysates of pET-28a-nsp1/BL21(DE3) uninduced; 2: whole cell lysates of pET-28a-nsp1/BL21(DE3) induced by IPTG; 3: solution supernatant from whole cell lysates of pET-28a-nsp1/BL21 (DE3) induced by IPTG; 4: purified nsp1.

表1 间接 ELISA 测定抗 nsp1 多克隆抗体效价

Table 1 ELISA titer of the polyclonal antiserum against nsp1

Serum (OD_{450})	Rabbit serum dilutions							
	1:500	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000
Positive serum	1.579	1.402	1.285	1.212	0.963	0.732	0.531	0.391
Negative serum	0.182	0.156	0.118	0.103	0.092	0.081	0.082	0.061

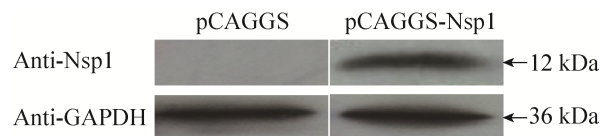


图3 nsp1 真核表达鉴定

Fig. 3 Identification of nsp1 eukaryotic expression.

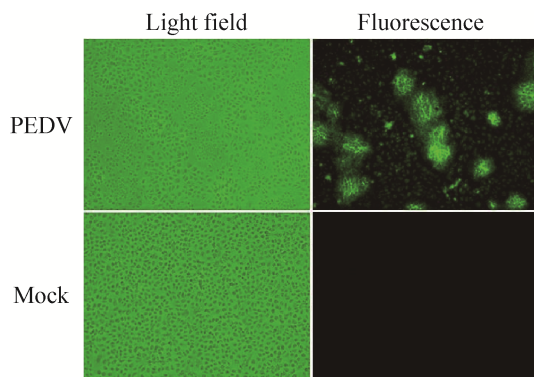


图4 病毒感染细胞中 nsp1 蛋白的表达 (100×)

Fig. 4 nsp1 expressed in PEDV-infected cells (100×). Mock stands for cells uninfected with PEDV.

2.3 PEDV nsp1 真核表达鉴定

将质粒 pCAGGS-nsp1 转染 HEK-293T 细胞, 转染 24 h 后通过 Western blotting 来验证 nsp1 的真核表达 (以 GAPDH 作为内参蛋白对照)。结果显示, pCAGGS-nsp1 转染 HEK-293T 细胞 24 h 后能成功检测到 nsp1 的表达 (图 3)。

2.4 PEDV 感染细胞中 nsp1 蛋白表达的鉴定

为证明病毒感染细胞中存在所预测的 nsp1, 将 PEDV 流行株 CH/ZMDZY/11 感染 Vero 细胞, 多聚甲醛固定细胞后, 分别用制备的 nsp1 多抗作为一抗, 以 FITC-羊抗兔 IgG 作为二抗。间接免疫荧光实验结果显示, 病毒在感染细胞过程中确实表达 nsp1 (图 4)。

2.5 nsp1 对 IFN- β 启动子活性的影响

为探究 nsp1 对 I 型干扰素应答的影响, 将 pCAGGS-nsp1、IFN- β -luc 和 pRL-TK 共转染 HEK-293T 细胞, 同时设立空质粒对照组, 24 h 后转染 poly(I:C)刺激细胞。然后裂解细胞, 测定双荧光素酶活性, 最终取萤火虫荧光素酶信号值与海肾荧光素酶活性值的比值。结果显示, 与转染 poly(I:C)组和空载体 pCAGGS 组相比, nsp1 能显著抑制 IFN- β 启动子的活性 ($P < 0.01$) (图 5)。

2.6 nsp1 不同表达剂量对 IFN- β 启动子活性影响

为探究不同 nsp1 表达水平对 I 型干扰素的应答是否存在差异, 将 3 种不同剂量的 pCAGGS-nsp1 与 IFN- β -luc 和 pRL-TK 共转染 HEK-293T 细胞,

比较双荧光素酶活性的差异。结果显示，与转染 poly(I:C)组和空载体 pCAGGS 组相比，不同转染剂量的 nsp1 真核表达质粒均能显著抑制 IFN- β 启动子的活性 ($P<0.01$)，并且存在剂量依赖性，随着 pCAGGS-nsp1 转染剂量的增加，对 I 型干扰素启动子活性的影响也逐渐增强 (图 6)。

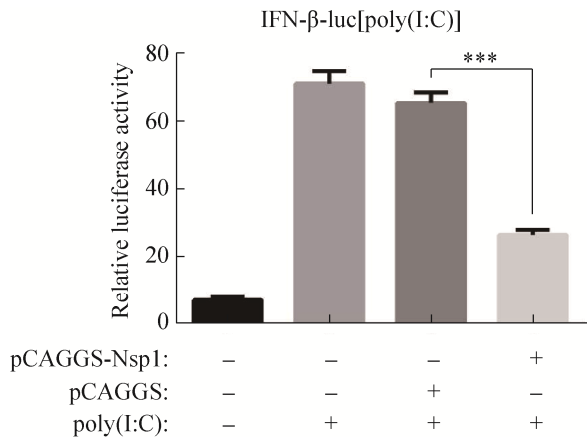


图 5 报告基因法评价 nsp1 对 IFN- β 启动子活性的影响

Fig. 5 Effect of nsp1 on the promoter activity of IFN- β confirmed by dual luciferase reporter assay.

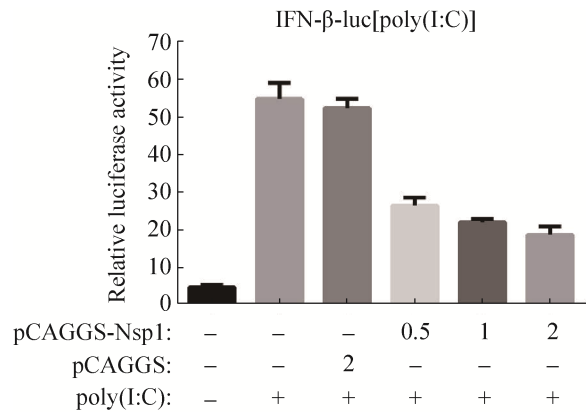


图 6 nsp1 表达水平对 IFN- β 启动子活性的影响

Fig. 6 Effect of nsp1 expression level on the promoter activity of IFN- β .

2.7 nsp1 对 IFN- β 蛋白表达水平的影响

将 pCAGGS-nsp1 和 pCAGGS 分别转染 293T 细胞，24 h 后再转染 poly(I:C)，12 h 后收取细胞上清，使用 ELISA 试剂盒检测 IFN- β 蛋白含量。结果显示，与转染 poly(I:C)组和空载体 pCAGGS 组相比，转染 pCAGGS-nsp1 组的 IFN- β 水平明显降低，即 nsp1 能显著抑制 poly(I:C) 诱导的 IFN- β 蛋白水平的表达 ($P<0.01$) (图 7)。

2.8 nsp1 对 poly(I:C)介导的 I 型 IFN 的抗病毒作用的影响

由于 VSV 对 I 型 IFN 高度敏感，本研究利用表达 GFP 的重组 VSV 进行复制抑制试验来直观验证 nsp1 对细胞 I 型 IFN 应答的影响。结果显示，在未加 poly(I:C)对照组细胞裂解上清处理的 A549 细胞中，VSV-GFP 的复制不受抑制；单独添加 poly(I:C)刺激组和空载体 pCAGGS 转染 +poly(I:C)刺激组细胞裂解上清处理的 A549 细胞中，VSV-GFP 重组病毒的复制均受到不同程度的抑制，而在 pCAGGS-nsp1 转染组细胞裂解上清处理的 A549 细胞中，VSV-GFP 重组病毒的复制受抑制程度大大降低，证明 nsp1 能明显抑制 poly(I:C) 介导的 I 型 IFN 的产生和其抗病毒作用 (图 8)。

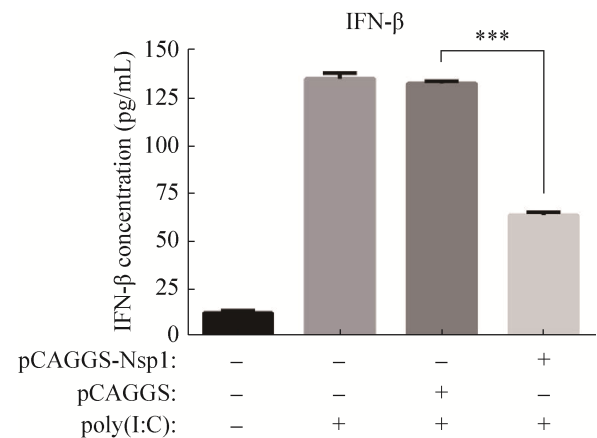


图 7 ELISA 检测 nsp1 对 IFN- β 表达的影响

Fig. 7 Effect of nsp1 on IFN- β expression detected by ELISA.

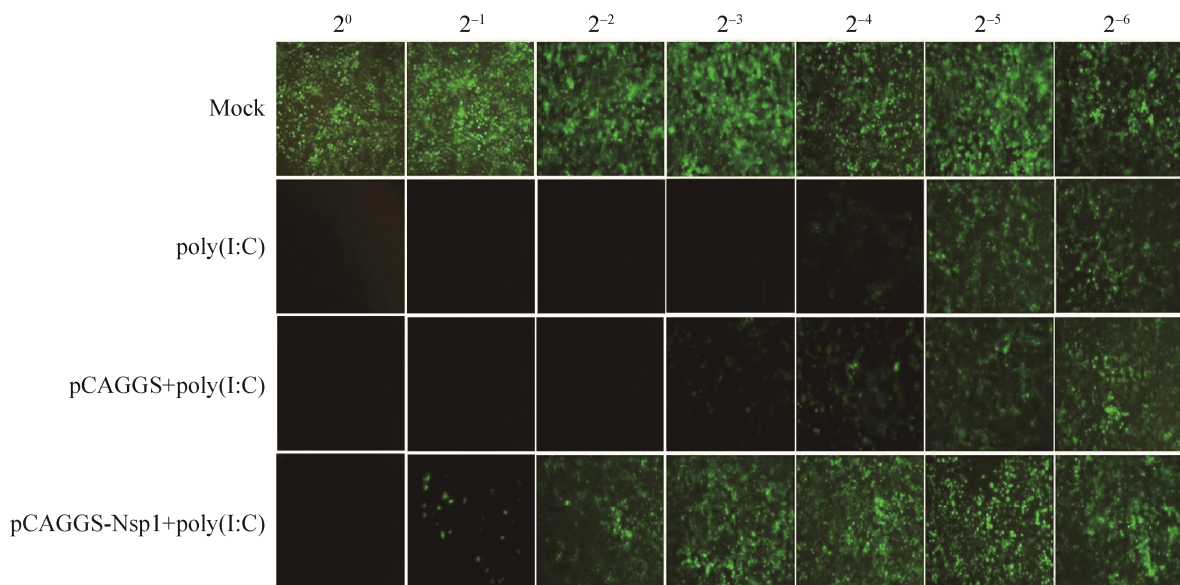


图 8 VSV 病毒复制抑制试验

Fig. 8 VSV replication-inhibition bioassay. Mock stands for the group without poly (I:C).

3 讨论

干扰素和干扰素诱导的细胞抗病毒应答是机体抵抗病原体侵袭的第一道防线^[18]。病毒感染期间,为了抵抗干扰素的抗病毒作用,包括冠状病毒在内的许多病毒都进化出了复杂的机制来逃避宿主的天然免疫,从而建立持续的感染。目前,已证实 SARS-CoV 编码至少 8 种蛋白可以作为干扰素的拮抗剂:nsp1、PLP、nsp7、nsp15、N、M、ORF3b 和 ORF6^[19-20]。研究表明,同属于冠状病毒科的 PEDV 感染宿主后也能抑制其天然免疫应答^[21]。研究发现 PEDV 可利用多个蛋白通过不同信号转导途径干扰宿主的 I 型 IFN 应答。目前已证明 PEDV 的 N 蛋白能够与 TBK1 发生互作,通过阻断 TBK1 与下游 IRF3 的结合拮抗细胞的 I 型 IFN 应答^[22]。另外,在 PEDV 编码的 16 个 nsps 中,部分 nsps 对 I 型 IFN

的拮抗功能及相关机制已得到解析^[23]。其中, PEDV nsp3 编码的木瓜样蛋白酶 (PLP2) 作为去泛素化酶将 RIG-I 和 STING 去泛素化后失活,从而阻断该信号通路^[24]。PEDV nsp5 编码的 3C 样蛋白酶 (3CLpro) 能够通过蛋白水解切割核转录因子 NF- κ B 必须调节蛋白 (NEMO),从而拮抗细胞的 I 型 IFN 应答^[25]。

本研究在前期克隆和表达了 PEDV 中国流行株 CH/ZMDZY/11 的 nsp1 并制备了高效价的兔抗 nsp1 多克隆抗体,为了深入研究 PEDV 的 nsp1 对 I 型干扰素的影响,我们构建了真核表达载体 pCAGGS-nsp1,并将该载体转染 293T 细胞。通过 Western blotting 验证了 nsp1 能够在 293T 细胞中高效表达。PEDV 流行株 CH/ZMDZY/11 感染 Vero 细胞的间接免疫荧光结果显示, PEDV 自然感染状态下能够表达 nsp1 蛋白。我们通过双荧光报告基因法、ELISA 试验以及 VSV 复制

抑制试验等,证明了 nsp1 能显著抑制由 poly(I:C) 介导的 IFN- β 的转录和蛋白表达,并抑制 I 型 IFN 介导的细胞抗病毒应答。

目前预防 PEDV 的主要手段是免疫母猪而使新生仔猪通过被动免疫获得保护。PEDV 现有的商品化疫苗主要是基于 CV777 毒株的弱毒活疫苗,虽然该疫苗能在一定程度上减缓该病的发生与发展,但其免疫保护效果仍然存在不足^[26]。另外,该疫苗对仔猪具有一定致病性。目前,国内外研究者正利用所分离的流行毒株进行传代致弱,以期研制相关疫苗。疫苗毒株的不稳定性使得对病毒致病性和动物机体抗病毒作用的机理的研究尤为重要。本研究证明,PEDV 编码的 nsp1 能通过与 IFN 通路中的相关接头分子互作来抑制 I 型 IFN 的表达及其抗病毒效应,从而来逃避天然免疫的识别和清除。本研究结果为 PED 高效疫苗及抗病毒药物的研发提供了具体的作用靶点,nsp1 可作为潜在的可修饰毒力因子,为发现新的抗病毒治疗药物靶标提供了重要理论基础。

REFERENCES

- [1] Tian YF, Yu ZJ, Cheng KH, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of new variants of the porcine epidemic diarrhea virus in Gansu, China in 2012. *Viruses*, 2013, 5(8): 1991–2004.
- [2] Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*, 1978, 58(3): 243–247.
- [3] Ma SQ, Wang M, Feng L, et al. Development of bi-combined inactivated aluminum hydroxide adjuvanted vaccine against transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *Chin J Anim Poul Infect Dis*, 1995, (6): 23–27 (in Chinese).
- [4] Tong YE, Feng L, Li WJ, et al. Development of bi-combined attenuated vaccine against transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *Chin J Prev Vet Med*, 1999, 21(6): 406–410 (in Chinese).
佟有恩, 冯力, 李伟杰, 等. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联弱毒疫苗的研究. *中国预防兽医学报*, 1999, 21(6): 406–410.
- [5] Chen J, Wang C, Shi H, et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch Virol*, 2010, 155(9): 1471–1476.
- [6] Li WT, Li H, Liu YB, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(8): 1350–1353.
- [7] Wang LY, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(5): 917–919.
- [8] Cima G. Viral disease affects US pigs: porcine epidemic diarrhea found in at least 11 states. *J Am Vet Med Assoc*, 2013, 243(1): 30–31.
- [9] Bhardwaj K, Guarino L, Kao CC. The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *J Virol*, 2004, 78(22): 12218–12224.
- [10] Park SJ, Kim HK, Song DS, et al. Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J Virol*, 2012, 86(10): 5964.
- [11] Utiger A, Rosskopf M, Guscetti F, et al. Preliminary characterization of a monoclonal antibody specific for a viral 27 kD glycoprotein family synthesized in porcine epidemic diarrhoea virus infected cells. *Coronaviruses Springer US*, 1994, 197–202.
- [12] Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, et al. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol*, 2003, 331(5): 991–1004.
- [13] Connor RF, Roper RL. Unique SARS-CoV protein

- nsp1: bioinformatics, biochemistry and potential effects on virulence. *Trends Microbiol*, 2007, 15(2): 51–53.
- [14] Züst R, Cervantes-Barragán L, Kuri T, et al. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog*, 2007, 3(8): e109.
- [15] Galán C, Enjuanes L, Almazán F. A point mutation within the replicase gene differentially affects coronavirus genome versus minigenome replication. *J Virol*, 2005, 79(24): 15016–15026.
- [16] Wang YJ, Shi HL, Rigolet P, et al. Nsp1 proteins of group I and SARS coronaviruses share structural and functional similarities. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(7): 919–924.
- [17] Wathelet MG, Orr M, Frieman MB, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J Virol*, 2007, 81(21): 11620–11633.
- [18] Rathinam VA, Fitzgerald KA. Cytosolic surveillance and antiviral immunity. *Curr Opin Virol*, 2011, 1(6): 455–462.
- [19] Totura AL, Baric RS. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(3): 264–275.
- [20] Totura A. SARS coronavirus antagonizes innate immune signaling initiated by RIG-I but is recognized by TLR signaling via the adaptor molecule TRIF[D]. *Dissertations & Theses - Gradworks*, 2014.
- [21] Cao L, Ge X, Gao Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon- β production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway. *Virol J*, 2015, 12(1): 1–8.
- [22] Ding Z, Fang LR, Jing HY, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *J Virol*, 2014, 88(16): 8936–8945.
- [23] Zhang QZ, Shi KC, Yoo D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology*, 2016, 489: 252–268.
- [24] Xing YL, Chen JF, Tu J, et al. The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J Gen Virol*, 2013, 94(7): 1554–1567.
- [25] Wang D, Fang LR, Shi YL, et al. Porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving NEMO. *J Virol*, 2016, 90(4): 2090–2101.
- [26] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J*, 2015, 12: 193.

(本文责编 郝丽芳)