

原冬伟, 王 一, 栾广宇, 等. 整合素 $\alpha v\beta 1$ 在猪流行性腹泻病毒(PEDV) 感染 Vero 细胞过程中的作用[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 422-428.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.016

整合素 $\alpha v\beta 1$ 在猪流行性腹泻病毒(PEDV) 感染 Vero 细胞过程中的作用

原冬伟, 王 一, 栾广宇, 张 旭

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 为明确整合素 $\alpha v\beta 1$ 在猪流行性腹泻病毒(PEDV) 感染过程中的作用, 通过对整合素 $\alpha v\beta 1$ 在 Vero 细胞表面的过表达和抑制反应, 检测 PEDV 在感染过程中的病毒载量和蛋白质表达量的变化。结果显示, Vero 细胞表面整合素 $\alpha v\beta 1$ 的过表达使病毒载量和蛋白质表达量升高, Vero 细胞表面整合素 $\alpha v\beta 1$ 基因的沉默使病毒载量和蛋白质表达量显著降低。整合素 $\alpha v\beta 1$ 可促进 PEDV 感染 Vero 细胞。

关键词: 整合素 $\alpha v\beta 1$; PEDV; 感染; Vero 细胞

中图分类号: S858.282.65⁺9.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)02-0422-07

Role of integrin $\alpha v\beta 1$ for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Vero cells

YUAN Dong-wei, WANG Yi, LUAN Guang-yu, ZHANG Xu

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In this study, we detected the viral load and protein expression of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) after overexpression and inhibition of integrin $\alpha v\beta 1$ on the surface of Vero cells, and then cleared the role of integrin $\alpha v\beta 1$ in the PEDV infection process. The results showed that the viral load and protein expression were significantly increased in the Vero cells which overexpressed integrin $\alpha v\beta 1$, and the viral load and protein expression were significantly reduced in the Vero cells with silent integrin $\alpha v\beta 1$ gene. Integrin $\alpha v\beta 1$ promotes PEDV to infect Vero cells.

Key words: integrin $\alpha v\beta 1$; porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); infection; Vero cells

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是猪流行性腹泻病(Porcine epidemic diarrhea, PED)的病原,易感群体涉及不同年龄和不同品系猪,尤其以引起哺乳仔猪出现水样腹泻、呕

吐、脱水甚至死亡为主要特征^[1]。PED是有季节变化且有地方流行趋势的猪消化道传染性疾病,上世纪70年代初期在英格兰被发现,目前已传播至全球36个国家,遍布欧洲、亚洲、美洲,已经成为制约养猪业发展的重要肠道传染病,给养猪业造成巨大的经济损失^[2]。

PEDV为具有囊膜结构的RNA冠状病毒,是尼多病毒目(Nidovirales)下冠状病毒科(Coronaviridae)成员,基因组大小约为28 kb,由5'和3'非翻译区(UTR)以及7个开放阅读框组成,编码4个结构蛋白及3个非结构蛋白,排列顺序为5'UTR-ORF1a-ORF1b-纤突糖蛋白基因(S)-ORF3-小包膜蛋白基因

收稿日期:2021-09-16

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C2018049);黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动计划资助项目(XYB2014-11);黑龙江八一农垦大学三横三纵支持计划资助项目(ZRCPY201907)

作者简介: 原冬伟(1980-),男,吉林吉林人,博士,讲师,主要从事动物传染病机制及诊断方法研究。(E-mail)yuandongwei@163.com

(E)-膜糖蛋白基因(M)-核衣壳蛋白基因(N)-3'UTR^[3]。PEDV 感染宿主细胞的过程十分复杂,主要通过病毒表面纤突糖蛋白与宿主细胞表面膜蛋白及碳水化合物分子的结合,促进病毒感染^[4]。猪氨基肽酶 N(*pAPN*)曾被报道是 PEDV 的细胞受体参与病毒感染,开启了 PEDV 侵入机理的深入研究^[5-9]。然而,在后续试验中证实,在表达 *pAPN* 的猪睾丸细胞(ST)中并不能形成 PEDV 的感染,而对 PEDV 易感的非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)又不依赖于氨基肽酶 N 的表达^[10-13]。因此,*pAPN* 不是 PEDV 感染宿主细胞必须存在的蛋白质,作为病毒感染宿主细胞受体的理论尚未完全确证,正处在探索阶段,PEDV 的侵入机制仍不清楚。另外,大量研究结果显示,病毒感染宿主细胞并非依赖一种受体,大多病毒都可利用多种受体蛋白质,包括冠状病毒成员在内许多囊膜病毒,存在多个细胞感染受体或细胞感染相关蛋白质。在 PEDV 同科的病毒中,猪传染性胃肠炎病毒、SARS 冠状病毒、人冠状病毒 229E、鼠冠状病毒和禽传染性支气管炎病毒都存在多个细胞感染受体的情况^[14-17]。

整合素(Integrin)是一种异源二聚体跨膜蛋白质,广泛分布于大多数哺乳动物细胞表面,可以作为多种病毒(如:人类疱疹病毒、猪瘟病毒、腺病毒、口蹄疫病毒、轮状病毒、狂犬病毒等)感染受体或辅助受体,促进病毒感染宿主细胞^[18]。本实验室前期研究结果显示,整合素 $\alpha v\beta 3$ 能增强 PEDV 对非敏感细胞 CHO 的黏附,在 PEDV 感染后表达水平明显上调,整合素 $\alpha v\beta 3$ 增强了 PEDV 在 Vero 细胞和 IECs 中的复制^[19-20]。有研究者报道,细胞表面蛋白整合素 $\alpha v\beta 1$ 在多种病毒侵染细胞过程中具有促进作用^[21-23],而且其与整合素 $\alpha v\beta 3$ 为同家族成员,可识别 PEDV S 蛋白 RLD 配体识别序列。那么,整合素 $\alpha v\beta 1$ 是否也与 PEDV 感染相关呢?本研究通过对整合素 $\alpha v\beta 1$ 在 Vero 细胞表面的过表达和抑制反应,探索整合素 $\alpha v\beta 1$ 在 PEDV 侵染 Vero 细胞过程中的作用,为 PEDV 侵入宿主细胞机制的研究和预防策略的设计奠定基础并指出新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

PEDV 标准毒株 CV777(GenBank accession no. AF353511.1)、HA 标记的真核质粒(pCAGGS-HA)、

表达整合素 αv 的真核质粒(pCAGGS- αv)、表达整合素 $\beta 1$ 的真核质粒(pCAGGS- $\beta 1$)均为前期实验制备并保存,整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 、PEDV N 蛋白抗体也为本实验室制备和保存,非洲绿猴肾细胞(Vero)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所馈赠。

1.2 试剂

本试验所用到的主要试剂见表 1。

表 1 主要使用试剂

Table 1 Reagents mainly used in the experiment

试剂名称	公司
病毒 RNA 提取试剂盒	海基生物科技有限公司
Attractene Transfection Reagent 转染试剂盒	Qiagen 公司
BCA 蛋白质浓度检测试剂盒	上海碧云天生物技术研究所
RIPA 细胞裂解液	上海碧云天生物技术研究所
反转录试剂盒	大连 TaKaRa 公司
SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒	大连 TaKaRa 公司
ECL 发光试剂	上海爱必信生物科技有限公司
HRP 标记二抗(IgG)	Biosharp 公司

1.3 siRNA 设计与合成

参考 GenBank 中非洲绿猴整合素 αv 及整合素 $\beta 1$ 序列,由上海吉玛制药技术有限公司合成干扰序列 siRNA-mi αv 、siRNA-mi $\beta 1$ 、siRNA-NC。siRNA-mi αv 序列用 siRNA A、siRNA B、siRNA C 表示,siRNA-mi $\beta 1$ 序列用 siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 表示,siRNA-NC 为试验阴性对照。siRNA 序列见表 2。

表 2 siRNA 干扰分子序列

Table 2 Sequence of the siRNA interference

序列名称	序列(5'→3')
siRNA 1	GCUCAAGCCAGAGGAUUAUUTT
siRNA 2	CCAAGUGUCAUGAAGGAAATT
siRNA 3	GCAACGGACAGAUUCUGUAATT
siRNA A	CCCUCUGACAUUGAUUGUUTT
siRNA B	GCAACAGGCAAUAGAGAUUTT
siRNA C	GCGAUCAGAUAGGUGCAUATT
siRNA NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT

1.4 细胞培养和转染

常规方法复苏 Vero 细胞后用含胎牛血清的 DMEM 细胞培养基,于 37℃、5% CO₂ 恒温环境下培

养及传代。转染前 1 d, 将传代 Vero 细胞接种于 6 孔板, 次日细胞生长至 70%~80% 融合度时进行转染。按 Attractene Transfection Reagent (Qiagen) 转染说明书进行转染。分别加入待转染真核重组质粒或 siRNA 序列 (100 mg/L)。转染结束后在 37 ℃、5% CO₂ 恒温环境下继续培养, 间隔 6 h 后换含胎牛血清的 DMEM 细胞培养液继续培养 24~48 h 收取样品。每组试验都加设对照。

1.5 RNA 提取及 cDNA 合成

RNA 样品提取严格遵照病毒 RNA 提取试剂盒所述步骤执行, 获得样品 RNA 经测定浓度后用于反转录或 -40 ℃ 保存。样品 RNA 反转录制备 cDNA, 反应体系参照试剂盒说明书。制备的 cDNA 于 -40 ℃ 保存备用。

1.6 实时荧光定量 PCR

针对 GenBank 中整合素 α_v 、整合素 β_1 、PEDV ORF3 序列及 β -actin 序列信息, 设计荧光定量 PCR 引物 (表 3), 引物由哈尔滨睿博兴科生物技术有限公司合成。按 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒提供的反应体系, 分别添加上、下游引物。配制好的反应液在避光、低温条件下混匀、分装、离心后, 放置于 ABI QuantStudio 3 RT-qPCR 检测仪中。反应程序为: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 55~60 ℃ (根据引物 T_m 值选择退火温度) 30 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环。检测完成后, 读取 C_t 值, 并对数据进行分析。

表 3 实时荧光定量 PCR 所使用引物

Table 3 Primers used in qRT-PCR

序列名称	序列 (5'→3')
β_1 -F	GCGAAGCCAGCAACGGACAG
β_1 -R	CAAGGCAGGTCTGACACATCTCAC
α_v -F	TTAGCAACTCGGACTGCACAA
α_v -R	TGCTGCTCTTGGAACCTCCTG
β -actin-F	AGGCTCTCTTCCAACCTTCCTT
β -actin-R	CGTACAGGTCTTTACGGATGTCCA
PEDV-F	GCACTTATTGGCAGGCTTTGT
PEDV-R	CCATTGAGAAAAGAAAGTGTCTGTAG

1.7 免疫印迹分析

首先将完成转染试验的各组 Vero 细胞按试验要求回收, 分别加入 RIPA 细胞裂解液, 在冰浴中裂解 30 min, 提取细胞中总蛋白质。用 BCA 法测定蛋白质浓度后加入上样缓冲液, 沸水中加热使蛋白质

变性, 然后取等量蛋白质样品进行 SDS 凝胶电泳。蛋白质凝胶电转仪上转印至 PVDF 膜上, PBS 清洗后用 5% 脱脂乳室温下封闭 2 h, 分别加入一抗 (整合素 α_v 、整合素 β_1 、PEDV N 蛋白抗体)、二抗 (HRP 标记的抗兔、抗鼠 IgG), 37 ℃ 孵育 2 h。最后加入 ECL 显色成像, 使用凝胶成像系统拍照。以 GAPDH 为内参, 利用 Image J 图像分析软件测定蛋白质条带灰度值, 计算并比较各试验组细胞样品中所含蛋白质相对表达水平。

1.8 数据分析

使用 SPSS 21.0 软件, 计量数值均以平均值 \pm 标准差表示, 两组数据间比较采用 t 检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 两两组间差异比较采用 SNK q 检验, 各试验独立重复 3 次, 以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

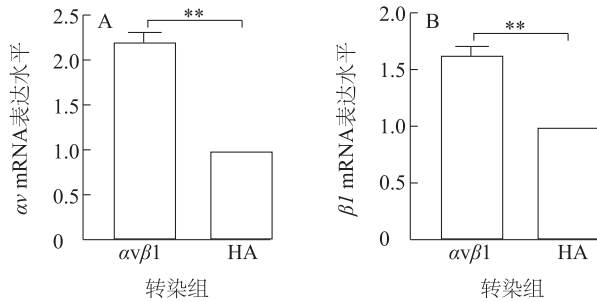
2 结果

2.1 整合素 $\alpha_v\beta_1$ 在 Vero 细胞中的过表达

为明确整合素 $\alpha_v\beta_1$ 对 PEDV 侵染 Vero 细胞的影响, 我们将质粒 pCAGGS- α_v 、pCAGGS- β_1 利用细胞转染的方法共转染在 Vero 细胞中, 同时转染空质粒 pCAGGS-HA 作为对照组。然后利用荧光定量 PCR 方法和 Western blot 技术对 Vero 细胞表面整合素 $\alpha_v\beta_1$ 的表达情况进行检测。结果显示, 整合素 $\alpha_v\beta_1$ 转染组与对照组相比较, 整合素 α_v 和整合素 β_1 mRNA 表达水平均极显著升高 (图 1); 整合素 $\alpha_v\beta_1$ 转染组蛋白质表达结果与整合素 α_v 和整合素 β_1 mRNA 表达水平一致, 在整合素 $\alpha_v\beta_1$ 转染组蛋白质表达增强, 灰度分析结果显示蛋白质表达水平与对照组差异显著或极显著 (图 2)。所得结果表明整合素 $\alpha_v\beta_1$ 在 Vero 细胞中过表达成功。

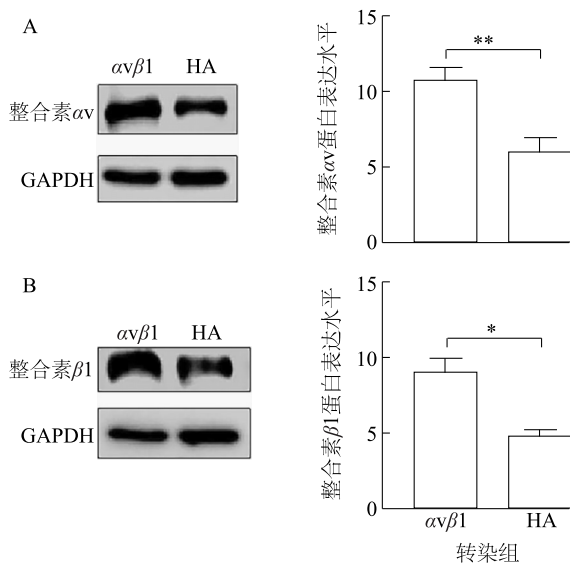
2.2 过表达整合素 $\alpha_v\beta_1$ 对 PEDV 侵染 vero 细胞的影响

将共转染整合素 $\alpha_v\beta_1$ 的 Vero 细胞接种 PEDV, 37 ℃ 孵育 6 h 后洗涤更换培养基, 37 ℃、5% CO₂ 下继续培养, 分别于接种后 24 h 和 48 h 收取样品, 荧光定量 PCR 检测 PEDV ORF3 mRNA 表达水平, Western blot 技术检测 PEDV N 蛋白质表达水平。试验过程中将 HA 标记的转染组设为试验对照。结果显示, 在病毒感染 24 h 和 48 h 后, 试验组 PEDV ORF3 mRNA 表达水平极显著升高 (图 3)。Western blot 技术检测结果显示, 在病毒感染 24 h 和 48 h 后, 试验组蛋白质



A: Vero 细胞中整合素 αv 在整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染组 ($\alpha v\beta 1$) 和空质粒转染组 (HA) 的 mRNA 表达水平; B: Vero 细胞中整合素 $\beta 1$ 在整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染组 ($\alpha v\beta 1$) 和空质粒转染组 (HA) 的 mRNA 表达水平。空质粒转染组 (HA) 为对照组。** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

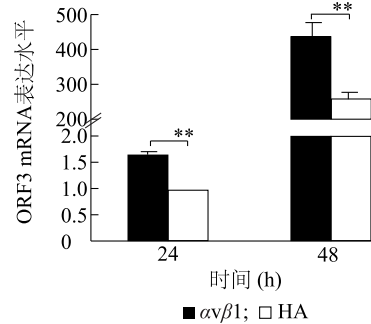
图 1 整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染 Vero 细胞后荧光定量 PCR 检测结果
Fig.1 The qRT-PCR results of integrin $\alpha v\beta 1$ in Vero cells after transfection



A: Vero 细胞中整合素 αv 在整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染组 ($\alpha v\beta 1$) 和空质粒转染组 (HA) 的蛋白质表达水平; B: Vero 细胞中整合素 $\beta 1$ 在整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染组 ($\alpha v\beta 1$) 和空质粒转染组 (HA) 的蛋白质表达水平。空质粒转染组 (HA) 为对照组。* 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 2 整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染 Vero 细胞后整合素蛋白质表达结果
Fig.2 The protein level of integrin $\alpha v\beta 1$ in Vero cells after transfection

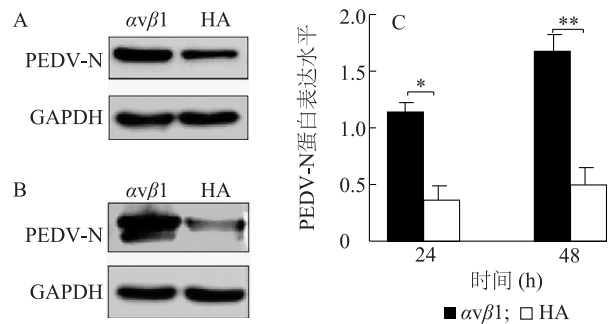
表达条带明显增强,灰度分析结果显示试验组 PEDV N 蛋白质表达水平随感染时间延长而升高且与对照组相比呈显著差异(图 4)。所得结果表明,整合素 $\alpha v\beta 1$ 的过表达能够促进 PEDV 侵染,使 PEDV 在 Vero 细胞内的含量明显增加。



HA 为空质粒转染对照组, $\alpha v\beta 1$ 为整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染组。** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 3 Vero 细胞接种 PEDV 24 h 和 48 h 后 PEDV ORF3 荧光定量 PCR 检测结果

Fig.3 The mRNA level of ORF3 gene of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Vero cells at 24 h and 48 h after infection



A: PEDV 接种 24 h 后共转染整合素 $\alpha v\beta 1$ 的 Vero 细胞中 PEDV N 蛋白质表达; B: PEDV 接种 48 h 后共转染整合素 $\alpha v\beta 1$ 的 Vero 细胞中 PEDV N 蛋白质表达; C: PEDV 接种 24 h 和 48 h 后共转染整合素 $\alpha v\beta 1$ 的 Vero 细胞中 PEDV N 蛋白质表达灰度值分析。HA 为空质粒转染对照组, $\alpha v\beta 1$ 为整合素 $\alpha v\beta 1$ 转染组。* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

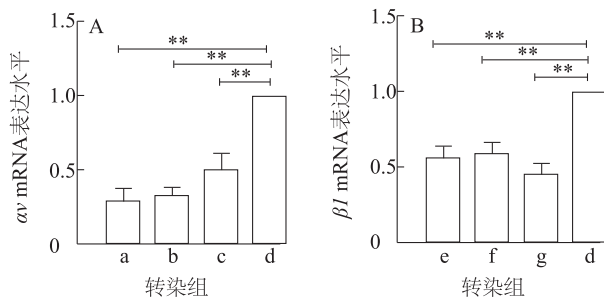
图 4 Vero 细胞接种 PEDV 24 h 和 48 h 后 PEDV N 蛋白检测结果

Fig.4 The western blot results of protein N of PEDV in Vero cells at 24 h and 48 h after infection

2.3 siRNA 转染对整合素 $\alpha v\beta 1$ 在 Vero 细胞中表达的影响

分别将整合素 αv 和整合素 $\beta 1$ 的特异性 siRNA 及阴性对照转染至 Vero 细胞,利用荧光定量 PCR 和 Western blot 技术检测 siRNA 干扰效果。整合素 αv 和整合素 $\beta 1$ mRNA 表达水平检测结果(图 5)显示,与 siRNA-NC 对照组相比,靶向 αv 的 siRNA A、siRNA B、siRNA C 组整合素 αv 的 mRNA 水平极显著下降,靶向 $\beta 1$ 的 siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 组整

合素 $\beta 1$ 的 mRNA 水平极显著下降。整合素 αv 和整合素 $\beta 1$ 蛋白质表达水平检测结果(图 6)显示,与 siRNA-NC 对照组相比,靶向 αv 的 siRNA A、siRNA B、siRNA C 组整合素 αv 蛋白质水平均显著降低,靶向整合素 $\beta 1$ 的 siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 组 $\beta 1$ 蛋白质水平均极显著降低。以上结果表明本研究所设计的 siRNA 对整合素 αv 和整合素 $\beta 1$ 在 Vero 细胞表面的干扰效果明显。



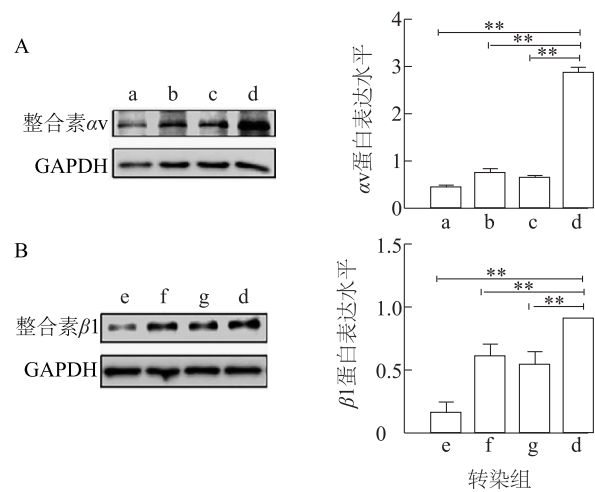
A: siRNA A、siRNA B、siRNA C 干扰后 Vero 细胞中整合素 αv 的 mRNA 表达水平; B: siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 干扰后 Vero 细胞中整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 表达水平。siRNA NC 为阴性对照。a: siRNA A; b: siRNA B; c: siRNA C; d: siRNA NC; e: siRNA 1; f: siRNA 2; g: siRNA 3。** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 5 siRNA 干扰后整合素 αv 和整合素 $\beta 1$ 荧光定量 PCR 检测结果

Fig.5 The qRT-PCR results of integrin αv and integrin $\beta 1$ after siRNA interference

2.4 整合素 $\alpha v\beta 1$ siRNA 干扰后对 PEDV 感染 vero 细胞的影响

为确定降低细胞表面整合素 $\alpha v\beta 1$ 的表达对 PEDV 感染 Vero 细胞的影响,利用干扰效果较好的 siRNA 分别下调 Vero 细胞表面的整合素 αv 和整合素 $\beta 1$ 的表达,然后感染 PEDV,通过荧光定量 PCR 检测 PEDV 感染的 Vero 细胞整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 以及 PEDV 感染后 PEDV ORF3 基因 mRNA 水平,Western blot 技术检测 siRNA 干扰后感染 PEDV 的 Vero 细胞中整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 以及 PEDV 感染后 PEDV N 蛋白质表达水平。荧光定量 PCR 检测结果(图 7)显示,与 siRNA NC 对照组相比,试验组整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 以及病毒感染后 PEDV ORF3 基因 mRNA 表达水平均降低且差异极显著。Western blot 技术检测结果(图 8)显示,siRNA 干扰试验组整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 以及病毒感染后 PEDV N 蛋白质表达水平与 siRNA NC 对照组相比较均明显

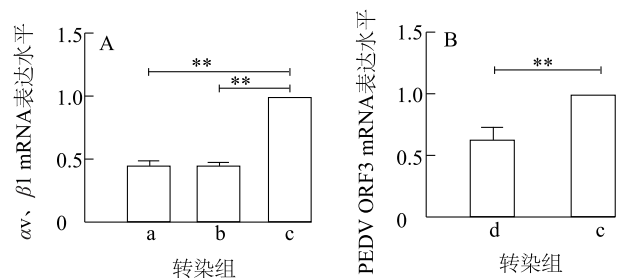


A: siRNA A、siRNA B、siRNA C 干扰后 Vero 细胞中整合素 αv 的蛋白质表达水平; B: siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 干扰后 Vero 细胞中整合素 $\beta 1$ 的蛋白质表达水平。siRNA NC 为阴性对照。a: siRNA A; b: siRNA B; c: siRNA C; d: siRNA NC; e: siRNA 1; f: siRNA 2; g: siRNA 3。** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 6 siRNA 干扰后整合素 αv 和整合素 $\beta 1$ 的 Western blot 检测结果

Fig.6 The western blot results of integrin αv and integrin $\beta 1$ after siRNA interference

降低且差异极显著。上述结果表明,整合素 $\alpha v\beta 1$ 被干扰表达后可降低 PEDV 对 Vero 细胞的侵染。



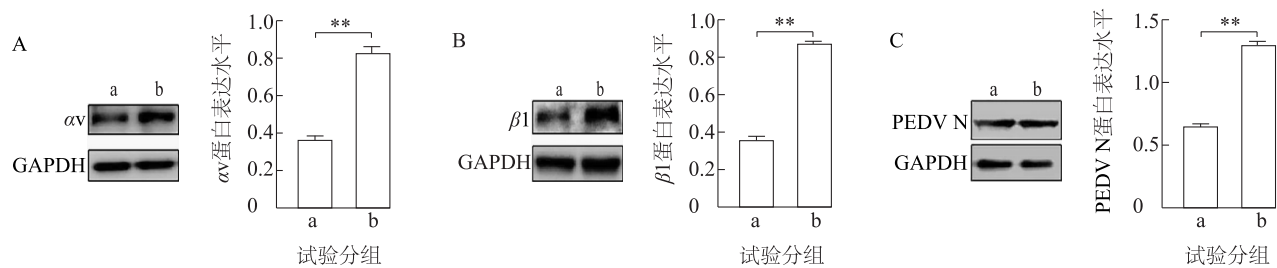
A: Vero 细胞中 siRNA 干扰后整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 的 mRNA 表达水平; B: PEDV 感染 siRNA 干扰后 Vero 细胞中 PEDV ORF3 的 mRNA 表达水平。siRNA NC 为阴性对照。a: siRNA-mi αv ; b: siRNA-mi $\beta 1$; c: siRNA-NC; d: siRNA-mi $\alpha v\beta 1$ 。** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 7 siRNA 干扰后整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 以及 PEDV ORF3 荧光定量 PCR 检测结果

Fig.7 The qRT-PCR results of integrin αv , integrin $\beta 1$ and PEDV ORF3 after siRNA interference

3 讨论

PED 是 PEDV 感染后引起的一种猪急性、流行



a: siRNA $\alpha v\beta 1$; b: siRNA NC. A: siRNA 干扰后 Vero 细胞中整合素 αv 的蛋白质表达水平; B: siRNA 干扰后 Vero 细胞中整合素 $\beta 1$ 的蛋白质表达水平; C: PEDV 感染 siRNA 干扰后 Vero 细胞中 PEDV N 蛋白质表达水平。siRNA NC 为阴性对照。** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 8 siRNA 干扰后整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 、PEDV N 蛋白 Western blot 检测结果

Fig.8 The western blot results of integrin αv , integrin $\beta 1$ and PEDV N protein after siRNA interference

性消化道传染病。PEDV 靶向感染小肠绒毛上皮细胞,造成小肠绒毛萎缩、上皮细胞变性坏死脱落,肠黏膜充血、肿胀,吸收不良和严重腹泻。自 2010 年 10 月 PED 在中国大面积暴发以来,2013 年以后美国、加拿大、墨西哥等北美国家,韩国、日本等亚洲国家及中国台湾地区也相继暴发 PED,目前已经席卷亚洲、欧洲、美洲的大部分地区,给世界主要生猪养殖地区和国家带来严重的经济损失^[1]。

阐明 PEDV 感染宿主细胞的机制是预防 PED 发生的重要基础性研究。PEDV 感染宿主细胞的过程十分复杂,主要通过病毒表面纤突糖蛋白与宿主细胞表面膜蛋白及碳水化合物分子的结合,促进病毒感染^[4]。pAPN 曾被报道是 PEDV 感染宿主细胞的受体并开展了大量病毒侵入机制的研究,但随后 pAPN 又被证实只是一种与病毒感染相关的宿主蛋白质^[9]。目前认为病毒感染并非依赖一种受体蛋白质,而是利用位于细胞表面的多个受体蛋白质,才能完成病毒感染过程。整合素是一种广泛分布于哺乳动物细胞表面的黏附分子,在多种病毒感染宿主细胞的过程中都起到促进或辅助作用,如:整合素 $\alpha 2\beta 1$ 与艾柯病毒 1 (EV1) 的感染有关^[24],整合素 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 都可在 FMDV 感染过程中起到促进作用^[25],整合素 $\alpha v\beta 3$ 可促进日本脑炎病毒 (JEV) 的感染^[26]。整合素 $\beta 1$ 可以与 α 亚基结合,广泛分布于许多哺乳动物细胞中,介导病毒感染细胞^[18, 27]。本实验室前期研究发现, PEDV 感染 Vero 细胞差异表达蛋白质筛选结果显示整合素 $\alpha v\beta 1$ 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 与病毒感染有关,且与整合素 $\alpha v\beta 1$ 同源的整合素 $\alpha v\beta 3$ 已被证明可促进 PEDV 感染细胞^[19-20]。整合素 $\alpha v\beta 1$ 在 PEDV 主要感染的仔猪小

肠绒毛上皮细胞中存在^[23],同时在 PEDV 高度敏感的 Vero 细胞中也存在。本研究在 Vero 细胞上通过表达和抑制整合素 $\alpha v\beta 1$ 的表达来阐明 PEDV 在感染 Vero 细胞过程中所受整合素 $\alpha v\beta 1$ 的影响。试验结果显示,在 Vero 细胞中过表达 $\alpha v\beta 1$ 后, PEDV 的 mRNA 和蛋白质表达水平均出现显著上调,证明整合素 $\alpha v\beta 1$ 能够促进 PEDV 感染细胞,使 PEDV 在 Vero 细胞内的含量明显增加。RNA 干扰技术 (RNAi) 是一种基因沉默技术,是通过导入与内源性 mRNA 同源的双链 RNA,来诱发同源靶 mRNA 高效、特异性地降解,从而导致靶基因沉默且表达下降的现象^[28-29]。本研究通过 siRNA 干扰试验反向验证整合素 $\alpha v\beta 1$ 与 PEDV 感染细胞的关系。由于 RNAi 技术存在不同位点效应,相应的序列抑制 mRNA 降解效率会有差异,甚至有些序列根本起不到抑制的作用。因此本研究分别设计 3 个整合素 αv 与整合素 $\beta 1$ 基因的 siRNA 序列,通过检测转染后 Vero 细胞各基因蛋白质及核酸水平的变化,筛选出最佳 siRNA 序列。利用最佳 siRNA 沉默 Vero 细胞表面整合素 $\alpha v\beta 1$,结果显示在被干扰的 Vero 细胞感染 PEDV 48 h 后, PEDV 的 mRNA 和蛋白质表达水平均出现显著下调,说明整合素 $\alpha v\beta 1$ 的干扰可降低 PEDV 对 Vero 细胞的感染。综上所述,整合素 $\alpha v\beta 1$ 能够促进 PEDV 感染 Vero 细胞,由于整合素 $\alpha v\beta 1$ 是位于细胞表面的蛋白质,因此整合素 $\alpha v\beta 1$ 是否可能作为一种受体蛋白与 PEDV 的 S 蛋白相结合,在病毒的黏附、内化过程中起到促进作用有待继续研究。本研究所获结果为 PEDV 侵入机制的解析和抗病毒策略设计提供了新的研究方向和理论基础。

参考文献:

- [1] 李公美,李茂辉,钱爱东,等.猪流行性腹泻病毒新型检测方法的研究进展[J].中国兽医学报,2020,40(3):650-653,664.
- [2] WOOD E N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea [J]. The Veterinary Record, 1977, 100(12): 243-244.
- [3] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus [J]. Virol J, 2015, 12: 193.
- [4] SANDRINE B, MILLET J K, LICITRA B N, et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein [J]. Viruses, 2012, 4(6): 1011-1033.
- [5] OH J S, SONG D S, PARK B K. Identification of a putative cellular receptor 150 kDa polypeptide for porcine epidemic diarrhea virus in porcine enterocytes [J]. J Vet Sci, 2003, 4(3): 269-275.
- [6] LI B X, GE J W, LI Y J. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus [J]. Virology, 2007, 365(1): 166-172.
- [7] CONG Y, LI X, BAI Y, et al. Porcine aminopeptidase N mediated polarized infection by porcine epidemic diarrhea virus in target cells [J]. Virology, 2015, 478: 1-8.
- [8] PARK J E, PARK E S, YU J E, et al. Development of transgenic mouse model expressing porcine aminopeptidase N and its susceptibility to porcine epidemic diarrhea virus [J]. Virus Res, 2015, 197: 108-115.
- [9] 李公美,么乃全,李茂辉,等.猪氨基肽酶对 PEDV 感染作用的研究进展[J].中国兽医科学,2020,50(11):1421-1427.
- [10] SHIRATO K, MAEJIMA M, ISLAM M T, et al. Porcine aminopeptidase N is not a cellular receptor of porcine epidemic diarrhea virus, but promotes its infectivity via aminopeptidase activity [J]. J Gen Virol, 2016, 97(10): 2528-2539.
- [11] WHITWORTH K M, ROWLAND R R R, PETROVAN V, et al. Resistance to coronavirus infection in amino peptidase N-deficient pigs [J]. Transgenic Res, 2019, 28(1): 21-32.
- [12] LI W, LUO R, HE Q, et al. Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry [J]. Virus Res, 2017, 5(2): 6-13.
- [13] LUO L, WANG S, ZHU L, et al. Aminopeptidase N-null neonatal piglets are protected from transmissible gastroenteritis virus but not porcine epidemic diarrhea virus [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13186.
- [14] CHRISTEL S, HERRLER G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses[J]. Glycoconjugate Journal, 2006, 23(1/2): 51-58.
- [15] KUBA K, IMAI Y, OHTO N T, et al. Trilogy of ACE2: A peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2010, 128(1): 119-128.
- [16] JEFFERS S A, HEMMILA E M, HOLMES K V. Human coronavirus 229E can use CD209L (L-SIGN) to enter cells [J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 2006, 581: 265-269.
- [17] MADU I G, CHU V C, LEE H, et al. Heparan sulfate is a selective attachment factor for the avian coronavirus infectious bronchitis virus Beaudette[J]. Avian Diseases, 2007, 51(1): 45-51.
- [18] 张俊磊.整合素在病毒感染宿主细胞过程中的作用[J].第三军医大学学报,2004,26(2):176-178.
- [19] 高晶.猪整合素 $\alpha v \beta 3$ 真核表达载体构建及介导 PEDV 感染作用的初步验证[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2016.
- [20] LI C, SU M, YIN B, et al. Integrin $\alpha v \beta 3$ enhances replication of porcine epidemic diarrhea virus on Vero E6 and porcine intestinal epithelial cells [J]. Vet Microbiol, 2019, 237: 108400.
- [21] YUN B L, GUAN X L, LIU Y Z, et al. Integrin $\alpha v \beta 1$ modulation affects subtype B avian metapneumovirus fusion protein-mediated cell-cell fusion and virus infection [J]. J Biol Chem, 2016, 291(28): 14815-14825.
- [22] SHUAI L, WANG J, ZHAO D, et al. Integrin $\beta 1$ promotes peripheral entry by rabies virus [J]. J Virol, 2020, 94(2): e01819.
- [23] DORNER M, ZUCOL F, ALESSI D, et al. $\beta 1$ integrin expression increases susceptibility of memory B cells to Epstein-Barr virus infection [J]. J Virol, 2010, 84(13): 6667-6677.
- [24] XING L, HUHTALA M, PIETIÄINEN V, et al. Structural and functional analysis of integrin $\alpha 2 \text{II}$ domain interaction with echovirus 1 [J]. J Biol Chem, 2004, 279(12): 11632-11638.
- [25] NEFF S, SA-CARVALHO D, RIEDER E, et al. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin $\alpha(v)\beta 3$ as its receptor [J]. J Virol, 1998, 72(5): 3587-3594.
- [26] FAN W, QIAN P, WANG D, et al. Integrin $\alpha v \beta 3$ promotes infection by Japanese encephalitis virus [J]. Res Vet Sci, 2017, 111: 67-74.
- [27] ASKARI J A, BUCKLEY P A, MOULD A P, et al. Linking integrin conformation to function [J]. J Cell Sci, 2009, 122(2): 165-170.
- [28] 李方华,侯玲玲,苏晓华,等. RNA 干扰的研究进展及应用[J].生物技术通讯,2010,21(5):740-745.
- [29] 王龙涛,葛晨霞,王丹,等.靶向 TGEV S 基因的外源性 microRNA 对 TGEV 增殖效果的抑制[J].中国兽医学报,2016,36(2):196-199.

(责任编辑:张震林)