

庄腾寒, 杨 鹏, 马心宇, 等. G1 期纤毛细胞器对宿主细胞 PEDV 敏感性的调控[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2302-2309.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.013

G1 期纤毛细胞器对宿主细胞 PEDV 敏感性的调控

庄腾寒¹, 杨 鹏², 马心宇², 徐 悦¹, 陈 丽¹, 鲍 熹¹, 杨丹晨², 冯 磊¹

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 本研究旨在分析宿主细胞周期对猪流行性腹泻病毒(PEDV)增殖能力的调控效果。使用 PEDV[感染复数(*MOI*)=1]分别感染猪睾丸(ST)细胞、猪小肠上皮(IPEC-J2)细胞,用流式细胞术(FACS)和免疫印迹(WB)技术鉴定细胞周期,用免疫荧光法观察纤毛组装效果,通过测定半数组织培养感染剂量(*TCID₅₀*)鉴定病毒的增殖能力。结果表明,PEDV 感染 ST 细胞、IPEC-J2 细胞 7 h 后,会导致宿主细胞阻滞于合成期(S 期),感染 31 h 后则会导致宿主细胞阻滞于合成前期(G1 期);FACS/WB 检测结果证实,通过双胸苷(Thy)释放协同诺考达唑(Noc)能够将细胞周期分别阻滞于 G1-S 转换期、S 期和细胞分裂期(M 期);PEDV(*MOI*=1)感染处于各细胞周期的 ST、IPEC-J2 细胞,同步化于 G1-S 转换期的细胞感染 PEDV 后的 *TCID₅₀* 最高,诱导纤毛去组装的细胞对 PEDV 的敏感性下降。由研究结果可知,PEDV 感染导致宿主细胞阻滞于 G1-S 转换期,G1 期细胞因具有纤毛细胞器而最有利于 PEDV 增殖。

关键词: 猪流行性腹泻病毒(PEDV); 细胞周期; 细胞同步化; ST 细胞; IPEC-J2 细胞; 纤毛

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)12-2302-08

Regulation of cilia in G1 phase on the susceptibility of host cells to PEDV

ZHUANG Tengan¹, YANG Peng², MA Xinyu², XU Yue¹, CHEN Li¹, BAO Xi¹, YANG Danchen², FENG Lei¹

(1.*Institute of Veterinary Immunology and Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*; 2.*College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

Abstract: This study aimed to research on the regulation of host cell cycle on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) proliferation. Swine testis (ST) and intestinal porcine epithelial cell line-J2 (IPEC-J2) cells were infected using PEDV with multiplicity of infection (*MOI*)=1, and the cell cycle was identified by fluorescence activated cell sorting (FACS) and Western blot (WB). Ciliary assembly was observed by immunofluorescence. Medium tissue culture infective dose (*TCID₅₀*) was measured to identify virus proliferation ability. PEDV infected ST cells and IPEC-J2 cells, and the host cells were arrested at the synthesis phase (S phase) and the pre-synthesis phase (G1 phase) after infection of 7 h and 31 h, respectively. FACS and WB tests confirmed that the use of double-thymidine release in coordination with nocodazole could block the cell cycle in the G1-S transition phase, S phase and cell division

phase (M phase), respectively. PEDV (*MOI*=1) infected synchronized ST cells and IPEC-J2 cells, and the *TCID₅₀* of cells synchronized in the G1-S transition phase was the highest after PEDV infection. Cells with ciliary disassembly were less sensitive to PEDV. PEDV infection arrested cell cycle to G1-S transition. Cells in G1 phase were most conducive to PEDV proliferation due to cilia.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); cell cycle; cell synchronization; ST cells; IPEC-J2 cells; cilia

收稿日期:2024-12-06

基金项目:江苏省自然科学基金-青年基金项目(BK20220748);国家自然科学基金-青年科学基金项目(32300577);江苏省重点研发计划-社会发展项目(BE2022787);江苏省农业科技自主创新基金全产业链关键技术协同创新项目[CX(24)2004]

作者简介:庄腾寒(1991-),男,上海人,博士,助理研究员,主要从事病毒-细胞互作机制和细胞工程改造及工艺放大等相关方面的研究。(E-mail) zhuangtenghan@foxmail.com

通讯作者:冯 磊, (E-mail) fenglei@jaas.ac.cn; 庄腾寒, (E-mail) zhuangtenghan@foxmail.com

猪流行性腹泻病毒(PEDV)是 α 冠状病毒属成员,可引起急性新生仔猪腹泻、呕吐、脱水和死亡。PEDV于20世纪70年代末首次在英国出现^[1],自2010年以来,中国^[2]、美国^[3]、日本^[4]、韩国^[5]和越南^[6]相继暴发了猪流行性腹泻,其他国家随后也报道了疫情,该病对全球养猪业造成了重大经济损失。

病毒必须依靠宿主细胞资源来完成自身的复制,常见机制是通过改变宿主细胞周期等生物过程,从而获得有利于自身复制的条件^[7]。冠状病毒根据自身复制的特点,进化出了多种调控宿主细胞周期的策略,如通过调节细胞周期相关蛋白质、p53信号通路和细胞凋亡相关通路调控细胞周期^[8-12]。细胞周期阻滞可能会抑制被感染细胞的早期死亡,使细胞逃避免疫防御,或者帮助促进病毒组装。目前,虽然冠状病毒介导的宿主细胞周期阻滞机制已经被广泛研究,但仍有许多问题尚不清楚,关于病毒在细胞周期被阻滞的细胞中的复制情况仍有待研究。

本研究分别从感染 PEDV 后对宿主细胞周期的影响和将细胞同步化于特定细胞周期或去组装纤毛[合成前期(G1期)特定细胞器]后接毒检测半数组织培养感染剂量($TCID_{50}$)2个方面进行研究,对于揭示 PEDV 和细胞周期的相互关系及相互调控作用,以及以此为依据进行 PEDV 新疫苗的开发和生产具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞、抗体和试剂

PEDV(AH2012/12株)、猪睾丸(ST)细胞为本实验室留存。猪小肠上皮(IPEC-J2)细胞购自北纳生物-河南省工业微生物菌种工程技术研究中心。

细胞周期蛋白(Cyclin)A、Cyclin E、Cyclin B、乙酰化- α -微管蛋白(AcTub)、 α -微管蛋白、纤毛内转运(IFT)88蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)等多克隆抗体和羊抗兔免疫球蛋白(IgG)-辣根过氧化物酶(HRP)抗体均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。抗 PEDV 核衣壳(N)蛋白抗体购自北京溯本源和生物科技有限公司。

胸苷(Thy)、诺考达唑(Noc)购自Sigma公司。DMEM培养基、胎牛血清购自赛默飞世尔科技公司。碘化丙啶(PI)染色液购自BD公司。

1.2 细胞同步化

用2.5 mmol/L Thy处理ST或IPEC-J2细胞17

h,然后在新鲜培养基中释放10 h。细胞经第2轮16 h的2.5 mmol/L Thy处理后阻滞于合成前期-合成期(G1-S)转换期。随后,使用新鲜培养基释放细胞4~5 h至合成期(S期)。

用5 μ mol/L Noc处理细胞6 h,将细胞阻滞于细胞分裂期(M期)。用含有0.5%血清的培养基培养并诱导细胞进入静止期(G0期)。

1.3 流式细胞术(FACS)

将ST、IPEC-J2细胞固定于-20℃预冷的70%乙醇中过夜,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗后重悬细胞,使用PI于室温染色30 min,用Accuri™ C6流式细胞仪收集细胞周期分布数据,用FlowJo软件分析并作图。

1.4 免疫印迹(WB)鉴定

将ST、IPEC-J2细胞分别接种于6孔板中,培养24~48 h后加入细胞裂解液,离心后取上清液,对蛋白质样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,将蛋白质样品转至硝酸纤维素膜上后,在室温下用1%脱脂奶粉封闭1 h;用一抗(按1:1 000的体积比稀释于1%脱脂奶粉溶液中)于4℃孵育过夜,再用二抗(抗体与1%脱脂奶粉溶液体积比为1:5 000)于室温孵育1 h;通过化学发光法显影观察并记录Western blotting(WB)结果。

1.5 PEDV $TCID_{50}$ 的测定

将ST、IPEC-J2细胞接种于96孔板中,待细胞汇合度生长至95%时,接入待测PEDV。在无菌1.5 mL离心管中,用加入10 μ g/mL胰酶的DMEM培养基对病毒进行10倍体积连续稀释,取各稀释度的病毒液依次接种到96孔板中,每孔接种100 μ L,每个稀释度设置8个重复孔。同时,以正常ST、IPEC-J2细胞作为对照。将96孔板置于37℃、5% CO₂细胞恒温培养箱中培养48 h,观察细胞病变(CPE)情况并计数,按照Reed-Muench法测定病毒的 $TCID_{50}$ 。

1.6 免疫荧光染色

分别将ST、IPEC-J2细胞接种于17 mm载玻片上,用含有0.5%血清的培养基培养细胞,于36~72 h诱导纤毛组装,用含有4%多聚甲醛的溶液于室温固定细胞20 min,用含有0.2% Triton的溶液对细胞进行打孔,用乙酰化- α -微管蛋白(纤毛指示物)标记纤毛,用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)标记DNA。

1.7 RNA 干扰

将 ST 细胞分别接种于 17 mm 载玻片上,转染 IFT88 siRNA (正义链:5'-CGACUAAGUGCCAGACU-CAU-3';反义链:5'-AAUGAUCUGGGCACUUAGUCG-3'),收取细胞后进行免疫荧光标记染色。

1.8 数据统计分析

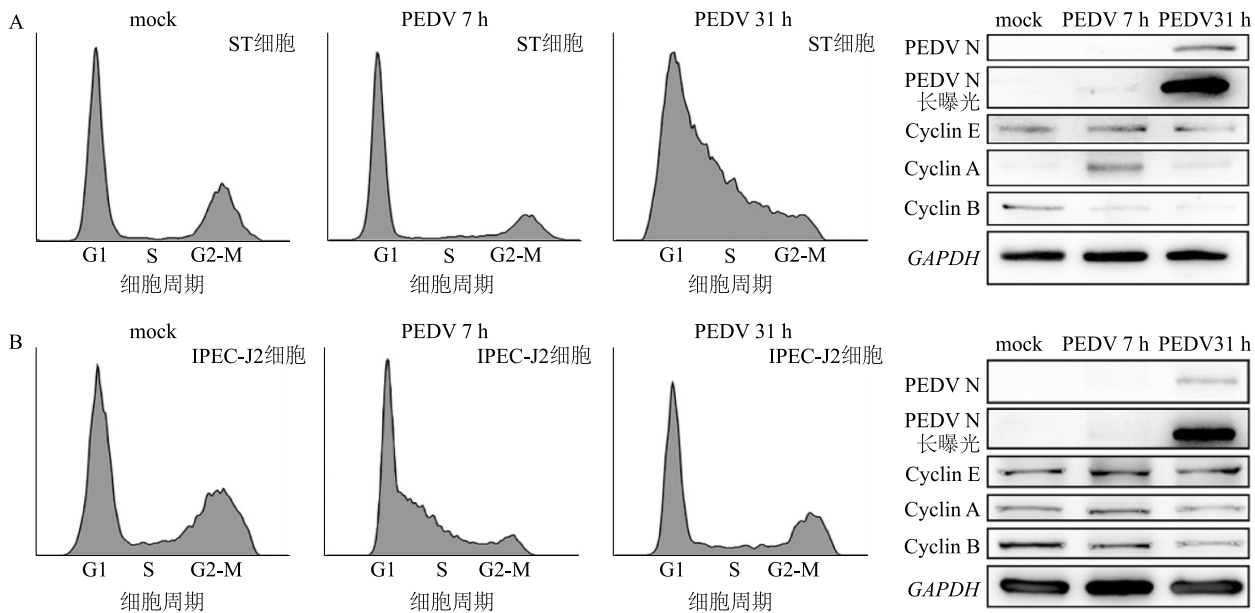
所有试验均重复 3 次及以上,用 GraphPad Prism 软件进行作图和统计分析,用 Student's *t* 检验进行统计学分析,数据用平均值±标准差表示;ns 表示无显著差异($P \geq 0.05$);* 表示在 0.05 水平差异显著($P < 0.05$),** 表示在 0.01 水平差异显著($P < 0.01$),*** 表示在 0.001 水平差异显著($P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 PEDV 感染导致宿主细胞 G1-S 阻滞的结果

为了研究 PEDV 对宿主细胞周期的影响,用

PEDV 分别感染 ST、IPEC-J2 细胞。流式结果显示,与对照细胞相比,PEDV 感染 7 h 后,处于 S 期的 ST、IPEC-J2 细胞占比升高,处于合成后期(G2)-M 期的 ST、IPEC-J2 细胞占比下降;PEDV 感染 31 h 后,处于 G1、S 期的 ST、IPEC-J2 细胞占比升高,处于 G2-M 期的 ST、IPEC-J2 细胞占比下降(图 1)。Western blotting 结果显示,PEDV 感染 7 h 后,ST、IPEC-J2 细胞中的 Cyclin A 得到高表达,提示细胞被阻滞于 S 期,此时可以检出 PEDV N 蛋白,但是需要长曝光才能检出;PEDV 感染 31 h 后,N 蛋白的检出量增加。此外,被 PEDV 感染后,Cyclin B 的检出量降低,提示处于 G2-M 转换期的细胞减少(图 1)。综合流式细胞术、WB 结果得出,PEDV 感染会使 ST、IPEC-J2 细胞发生 G1-S 转换阻滞。



A: PEDV 感染猪睾丸(ST)细胞 7 h、31 h; B: PEDV 感染猪小肠上皮(IPEC-J2)细胞 7 h、31 h。使用流式细胞术测定细胞周期,使用免疫印迹(WB)方法检测 PEDV N 蛋白,Cyclin E、A 和 B 蛋白。mock:空白对照;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶,内参蛋白;PEDV 核衣壳(N):PEDV 指示物;细胞周期蛋白(Cyclin)E:G1 期指示物;Cyclin A:S 期指示物;Cyclin B:M 期指示物。G1 期:合成前期;S 期:合成期;G2 期:合成后期;M 期:细胞分裂期。左侧 3 列图为液式细胞图,右侧 1 列图为 WB 图。

图 1 猪流行性腹泻病毒(PEDV)感染诱导的 G1-S 阻滞

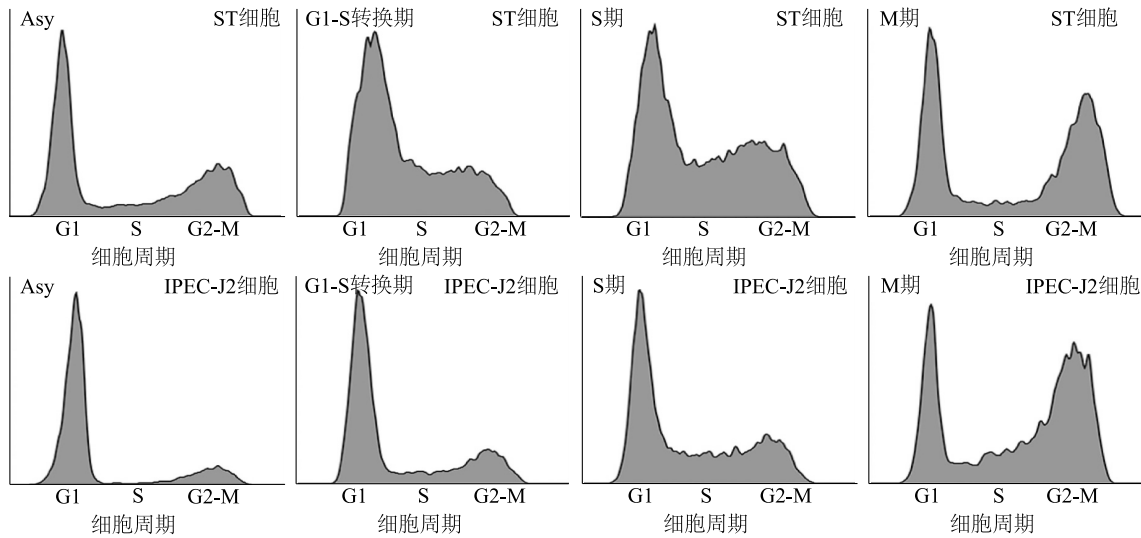
Fig.1 G1-S transition block induced by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection

2.2 ST、IPEC-J2 细胞同步化至细胞周期各时期的结果

分别使用双 Thy 释放结合 Noc 抑制的方式^[13],将 ST、IPEC-J2 细胞同步化于 G1-S 转换期、S 期和 M 期。流式细胞术验证结果显示,ST、IPEC-J2 细胞

被成功富集于相应细胞周期中(图 2)。

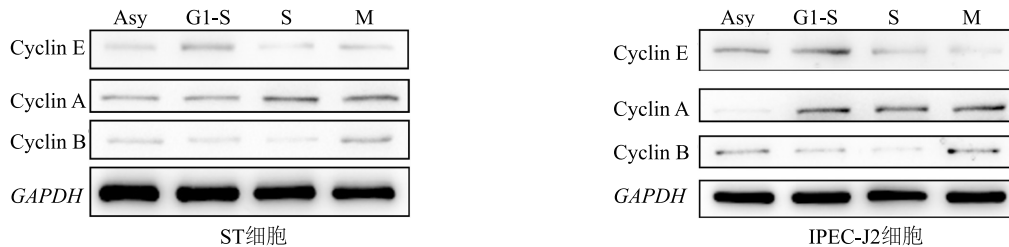
进一步用 WB 检测 G1-S 转换时期的标志物 Cyclin E、S 期的标志物 Cyclin A 和 M 期的标志物 Cyclin B^[13],证实 ST、IPEC-J2 被成功同步化于相应的细胞周期中(图 3)。



以非同步化细胞 (Asy) 为对照,使用双胸苷 (Thy) 释放结合诺考达唑 (Noc) 阻滞法将猪睾丸 (ST)、猪小肠上皮 (IPEC-J2) 细胞同步化至 G1-S 转换期、S 期和 M 期。G1 期:合成前期;S 期:合成期;G2 期:合成后期;M 期:细胞分裂期。

图 2 ST 和 IPEC-J2 细胞周期同步化流式细胞术鉴定结果

Fig.2 Identification of swine testis (ST) and intestinal porcine epithelial cell line-J2 (IPEC-J2) cell cycle via fluorescence activated cell sorting (FACS)



Asy:非同步化细胞(对照)。使用双胸苷 (Thy) 释放结合诺考达唑 (Noc) 阻滞法将猪睾丸 (ST)、猪小肠上皮 (IPEC-J2) 细胞同步化至 G1-S 转换期 (G1-S)、S 期和 M 期。Cyclin:细胞周期蛋白;以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参蛋白,用免疫印迹法检测细胞周期指示物 Cyclin E、Cyclin A 和 Cyclin B。G1 期:合成前期;S 期:合成期;M 期:细胞分裂期。

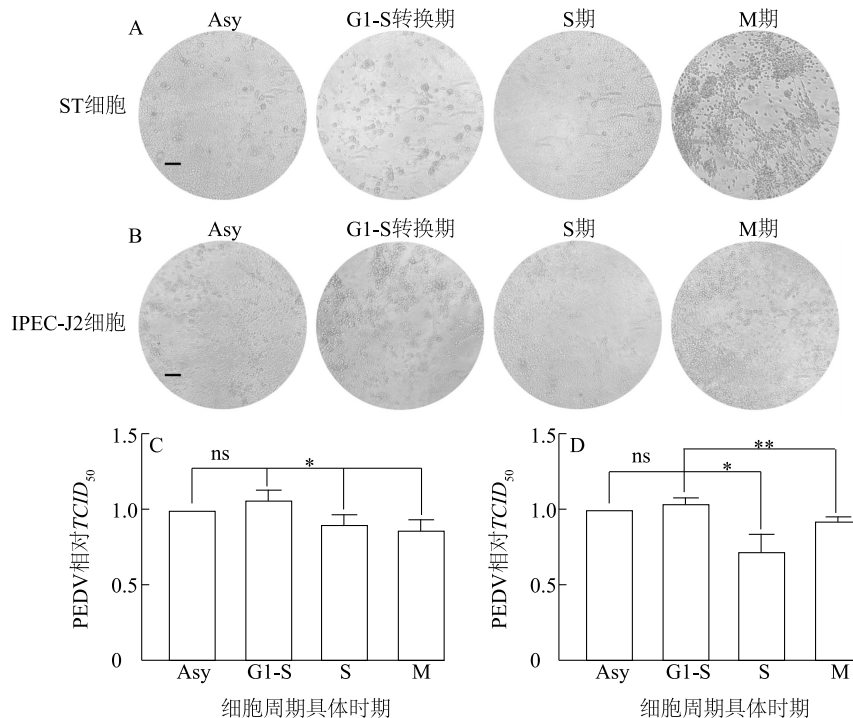
图 3 ST、IPEC-J2 细胞周期同步化免疫印迹鉴定结果

Fig.3 Identification of swine testis (ST) and intestinal porcine epithelial cell line-J2 (IPEC-J2) cell cycle via Western blot (WB)

2.3 最有利于 PEDV 复制的细胞周期具体时期分析

为了进一步研究宿主细胞所处细胞周期对 PEDV 病毒增殖的影响,分别将 ST、IPEC-J2 细胞同步化至 G1-S 转换期、S 期和 M 期,按照感染复数 ($MOI=1$) 的标准接入 PEDV。22 h 后镜下观察可见同步化于 G1-S 转换期的 ST 细胞 (图 4A) 和 IPEC-J2 细胞 (图 4B) 中出现以大量合胞体为代表的细胞病变效应;同步化于 S 期、M 期的 ST、IPEC-J2 细胞病变效应则较少,其中同步化于 M 期的细胞由于自身细胞周期特性,大量细胞呈圆形 (图 4A、图

4B)。TCID₅₀ 结果显示,与非同步化的对照细胞相比,同步化于 G1-S 转换期的 ST 细胞 (图 4C) 和 IPEC-J2 细胞 (图 4D) 的 TCID₅₀,无显著差异;与同步化于 G1-S 转换期的细胞相比,同步化于 S 期的 ST、IPEC-J2 细胞的 TCID₅₀ 显著下调 (图 4C、图 4D);与同步化于 G1-S 转换期的细胞相比,同步化于 M 期的 ST 细胞的 TCID₅₀ 显著下调,同步化于 M 期的 IPEC-J2 细胞的 TCID₅₀ 高于同步化至 S 期的细胞,与同步化于 G1-S 转换期的细胞相比则表现出极显著下调。由此可见,位于 G1 期、G1-S 转化期的细胞最有利于 PEDV 的感染和增殖。



A: PEDV 感染细胞 22 h 后镜下观察同步化猪睾丸(ST)细胞的结果, 标尺对应 50 μm ; B: PEDV 感染细胞 22 h 后镜下观察同步化猪小肠上皮(IPEC-J2)细胞的细胞病变效应(CPE), 标尺对应 50 μm ; C: 用统计学方法分析同步化至不同细胞周期的 ST 细胞的相对半数组织培养感染剂量($TCID_{50}$); D: 用统计学方法分析同步化至不同细胞周期的 IPEC-J2 细胞的相对 $TCID_{50}$ 。Asy: 非同步化细胞(对照)。用双胸苷(Thy)释放结合诺考达唑阻滞法将 ST、IPEC-J2 细胞同步化至 G1-S 转换期、S 期和 M 期。ns 表示差异不显著($P \geq 0.05$), * 表示在 0.05 水平差异显著($P < 0.05$); ** 表示在 0.01 水平差异显著($P < 0.01$)。G1 期: 合成前期; S 期: 合成期; M 期: 细胞分裂期。

图 4 最适于猪流行性腹泻病毒(PEDV)增殖细胞周期具体时期分析结果

Fig.4 Analysis of the most cell cycle phase for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) proliferation

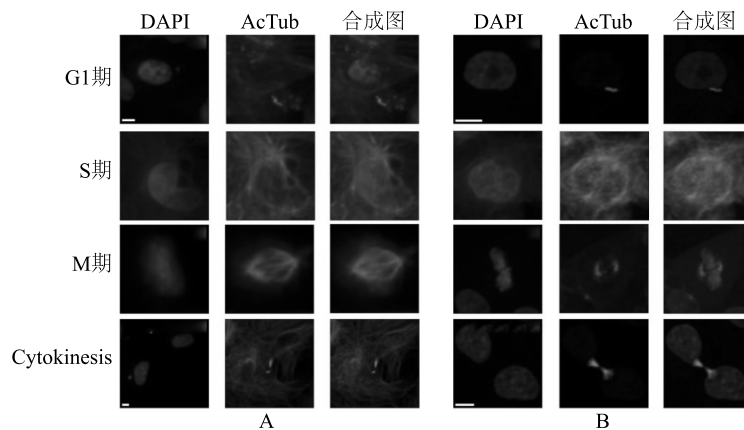
2.4 G1 期 ST、IPEC-J2 细胞纤毛细胞器的观察结果

G1 期细胞的一大特性为有大量纤毛细胞器, 且与 PEDV 同为冠状病毒的新型冠状病毒已被报道经由纤毛进入细胞, 为了研究 G1 期细胞适合 PEDV 增殖的机制, 本研究使用纤毛指示物乙酰化- α -微管蛋白(AcTub)标记 ST、IPEC-J2 细胞的纤毛(图 5)。随后, 为了研究纤毛细胞器是否参与 PEDV 增殖的调控, 通过血清饥饿法诱导 ST、IPEC-J2 细胞进入静止期(G0 期, 特殊的 G1 期, 其间组装大量纤毛), 有 40%~50% 的 ST、IPEC-J2 细胞组装纤毛(图 6A)。分别敲低 ST 细胞纤毛组装关键基因 *IFT88* 的相对表达量或使用纤毛组装小分子抑制剂 Ciliobrevin D 处理 ST 细胞, 处理后纤毛的组装比例均下降, 其中用 Ciliobrevin D 处理细胞后, 纤毛的比例下降至 10% 左右, 效果好于敲低纤毛组装关键基因 *IFT88* 相对表达量的处理(图 6B)。

2.5 诱导纤毛去组装对宿主细胞对 PEDV 敏感性的影响

分别用 5 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 纤毛组装小分子抑制剂 Ciliobrevin D 处理非同步化的 ST 细胞和经血清饥饿诱导于静止期的 ST 细胞, 用 PEDV($MOI=1$)感染 24 h 后, 在光学显微镜下观察 CPE。结果显示, 与非同步化组相比, 静止期细胞的 CPE 更广泛, 与对照细胞相比, 几乎所有细胞发生了病变。用 5 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ Ciliobrevin D 处理的 ST 细胞部分发生 CPE, 用 50 $\mu\text{mol/L}$ Ciliobrevin D 处理的 ST 细胞的 CPE 较少, 呈现随着 Ciliobrevin D 处理浓度的升高 CPE 水平下降的趋势(图 7)。

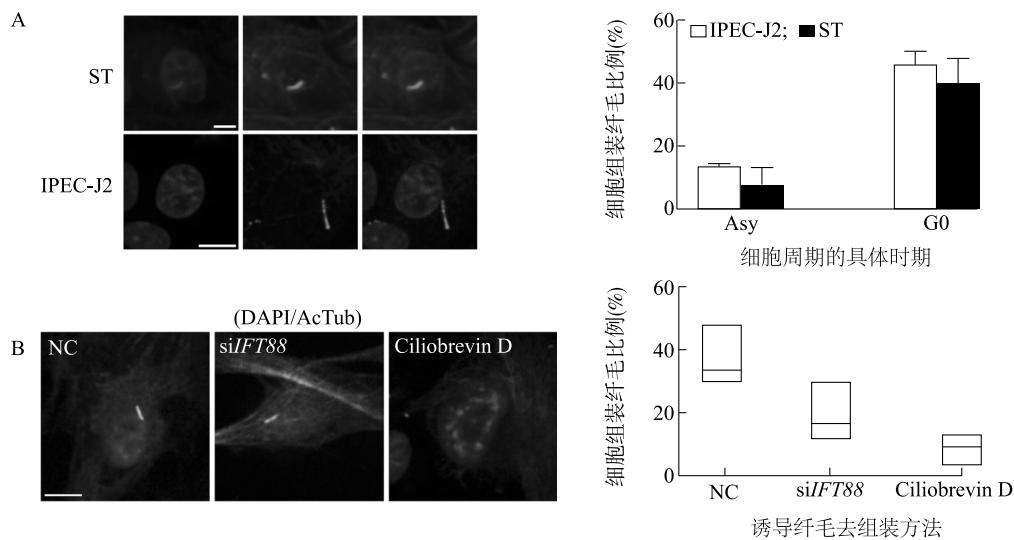
继续培养细胞, 使 PEDV 完全感染细胞, 当感染时间达到 72 h 时测定 $TCID_{50}$ 。结果显示, 静止期对照 ST 细胞的 $TCID_{50}$ 极显著高于非同步化细胞对照的 ST 细胞, 静止期 ST 细胞的 $TCID_{50}$ 普遍高于非同步化细胞组的 ST 细胞。静止期细胞与非同步化细胞均呈现出随着 Ciliobrevin D 处理浓度升高,



A: 未同步化的猪睾丸(ST)细胞; B: 未同步化的猪小肠上皮(IPEC-J2)细胞。细胞固定后,用乙酰化- α -微管蛋白(AcTub, 纤毛指示物)标记纤毛,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)标记DNA,标尺为10 μ m;Cytokinesis:胞质分裂期。G1期:合成前期;S期:合成期;M期:细胞分裂期。

图5 ST、IPEC-J2 细胞 G1 期生长纤毛

Fig.5 The cilia of swine testis (ST) and intestinal porcine epithelial cell line-J2 (IPEC-J2) cells in G1 phase



A: 血清饥饿法诱导猪睾丸(ST)、猪小肠上皮(IPEC-J2)细胞进入静止期(G0期,特殊G1期)后统计得到的组装有纤毛的细胞与比例;B: 分别用 siRNA 干扰纤毛组装关键基因 *IFT88* (si $IFT88$)、纤毛组装抑制剂 Ciliobrevin D 药物诱导 ST 细胞纤毛去组装后统计得到的组装有纤毛的细胞图像与比例。NC: 阴性对照;Asy: 非同步化细胞(对照)。用乙酰化- α -微管蛋白(AcTub)标记纤毛,用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)标记DNA,标尺表示10 μ m。

图6 ST 和 IPEC-J2 纤毛细胞器组装和诱导去组装

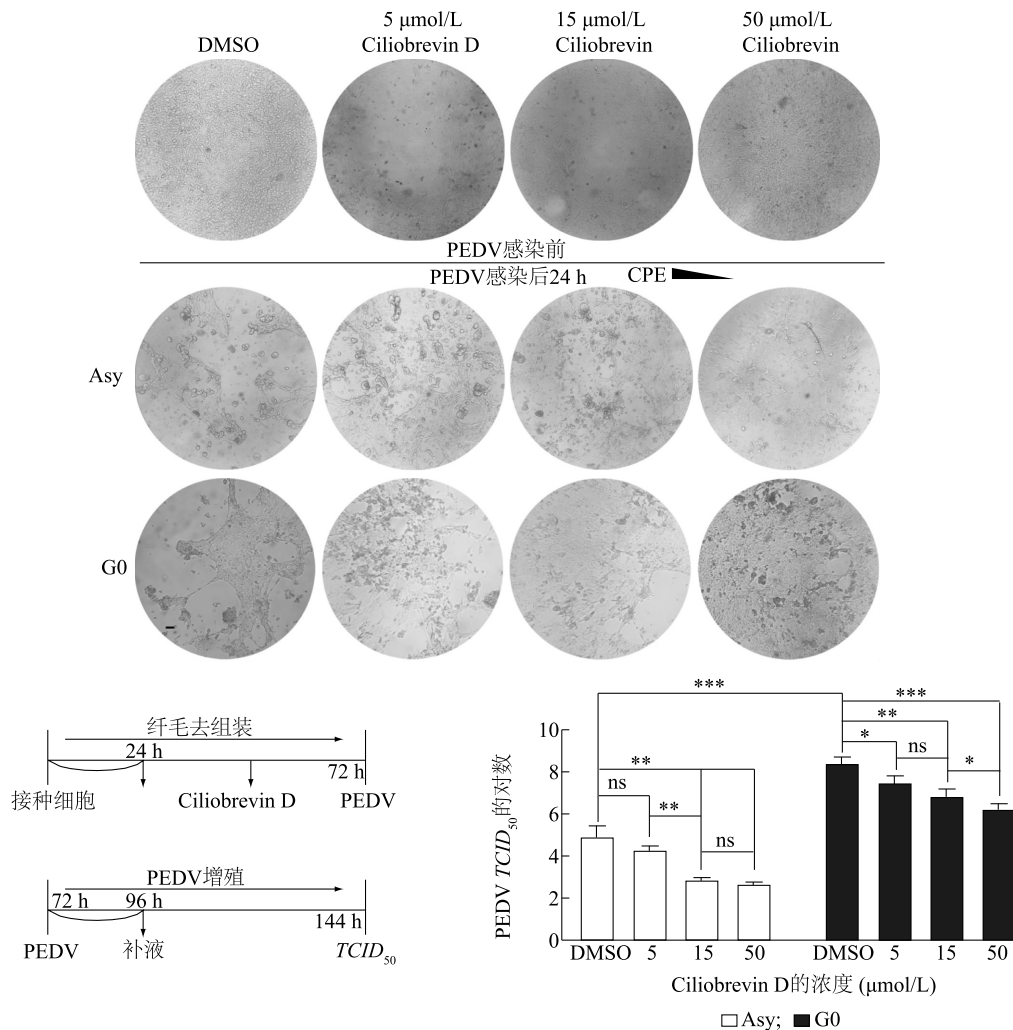
Fig.6 Assembly and induced disassembly of cilia in swine testis (ST) and intestinal porcine epithelial cell line-J2 (IPEC-J2) cells

$TCID_{50}$ 下降的趋势(图7)。由此可见,诱导纤毛去组装的 ST 细胞对 PEDV 的敏感性随着纤毛比例的下降而降低。

3 讨论

细胞周期由一系列受到高度调控的事件组成,包括细胞成分的严格复制和单细胞分离成2个子细胞。细胞周期控制的基本机制无论是在酵母还是人类中都

保守,主要分为G1期、S期、G2期和M期^[14]。在本研究中,非同步化细胞大部分处于G1期,因此与同步化于G1-S转换期的细胞感染PEDV后的 $TCID_{50}$ 差异不显著。动物机体内的绝大多数细胞都是非循环细胞并且含有非常低水平的核苷酸、复制因子,因此限制了病毒复制,调控细胞周期因而成为许多病毒为了创造适合生存的环境而采取的策略^[15]。尽管该调控对病毒生命周期有益,但是病毒介导的细胞周期的改变可能对细



分别使用 5 μmol/L、15 μmol/L 和 50 μmol/L Ciliobrevin D (一种细胞质动力蛋白抑制剂) 处理非同步化和处于静止期的猪睾丸 (ST) 细胞, 用 PEDV [感染复数 (MOI) = 1] 感染细胞 72 h, 在镜下观察细胞病变 (CPE) 情况并计数, 用 Reed-Muench 法测定病毒半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 并进行统计学分析。Asy: 非同步化细胞 (对照); G0: 静止期细胞; DMSO: 二甲基亚砜。ns 表示差异不显著 ($P \geq 0.05$), * 表示在 0.05 水平差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示在 0.01 水平差异显著 ($P < 0.01$), *** 表示在 0.001 水平差异显著 ($P < 0.001$), G0 表示静止期, 标尺代表 50 μm。

图 7 抑制纤毛细胞器组装对于宿主细胞抗猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 感染能力的分析

Fig.7 Analysis of ciliary disassembly effects on anti-porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ability of cells

胞生理产生有害影响, 并可能最终导致与病毒感染相关的病理现象, 包括细胞转化和癌症发生等^[7]。

纤毛组装、去组装过程与细胞周期紧密关联, 正常增殖的细胞中约有 10%~25% 可以观测到纤毛, 当通过血清饥饿诱导的细胞进入静止期时, 组装纤毛的细胞比例大幅提高, 成体内各种组织中的细胞即接近或类似于这一状态。纤毛长度由纤毛组装、去组装的平衡调控。PEDV 是单股正链 RNA 病毒。PEDV 基因组长度约为 28 kb, 包含 5' 帽子、3' 多腺苷酸化尾巴、5' 非翻译区域 (UTR) 和 3' UTR 及至少 7 个开放阅读框^[16]。ORF1a、ORF1b 编码病毒复制酶, 其余 ORF

编码结构蛋白, 包括刺突蛋白 (S)、包膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N)。PEDV E 蛋白^[17]、M 蛋白^[18]、N 蛋白^[19-20] 均被报道能够引起宿主细胞的周期阻滞。目前, 猪流行性腹泻已成为制约中国养猪行业发展的重要传染病之一。

本研究选取 PEDV 天然宿主细胞 IPEC-J2 和可用于疫苗生产的 ST 细胞作为试验对象, 2 种细胞均为猪来源细胞, 且能增殖 PEDV。通过 Thy 释放、Noc 阻滞等方法分别将 ST、IPEC-J2 细胞同步化至 G1-S 转换期、S 期和 M 期, 并通过细胞周期标志蛋白进行鉴定, 确认同步化效果。随后进一步深入探究同步化

后的 ST、IPEC-J2 细胞对 PEDV 感染的反应,结果显示,同步化于 G1-S 转换期的细胞的 $TCID_{50}$ 最高。目前已有对 PEDV N 蛋白造成的细胞周期阻滞和由 Thy 诱导的非洲绿猴肾 (Vero) 细胞周期阻滞差异的研究^[20],但 Vero 细胞具有干扰素分泌缺陷的特点。本研究对 ST、IPEC-J2 的细胞周期进行同步化,明确 PEDV 感染和宿主细胞周期之间的相互调控关系,并发现纤毛细胞器的去组装有助于宿主细胞抗 PEDV 反应和能力的提升,对于进一步研制 PEDV 新型疫苗和改进相关病毒生产工艺具有重要意义。

4 结 论

PEDV 感染会导致 ST、IPEC-J2 细胞阻滞于 G1-S 转换时期。本研究使用双 Thy 释放结合 Noc 抑制方法,分别成功将 ST、IPEC-J2 细胞阻滞于 G1-S 转换期、S 期和 M 期,并通过比较同步化于不同时期的 ST、IPEC-J2 细胞感染 PEDV 后的 $TCID_{50}$,证实 G1-S 转换期的细胞最适于 PEDV 的增殖,并证明细胞去组装纤毛后增殖 PEDV 的能力下降。

参考文献:

- [1] WOOD E. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. Veterinary Record, 1977, 100(12): 243-244.
- [2] WEISS S, WITKOWSKI P T, AUSTE B, et al. Hantavirus in bat, *Silvery armadillo*[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 159-161.
- [3] STEVENSON G W, HOANG H, SCHWARTZ K J, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2013, 25(5): 649-654.
- [4] MASUDA T, MURAKAMI S, TAKAHASHI O, et al. New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs[J]. Archives of Virology, 2015, 160(10): 2565-2568.
- [5] KIM S H, LEE J M, JUNG J, et al. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Korea from 1998 to 2013[J]. Archives of Virology, 2015, 160(4): 1055-1064.
- [6] DIEP N V, SUEYOSHI M, IZZATI U, et al. Appearance of US-like porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) strains before US outbreaks and genetic heterogeneity of PEDVs collected in Northern Vietnam during 2012-2015[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(1): e83-e93.
- [7] BAGGA S, BOUCHARD M J. Cell cycle regulation during viral infection[J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1170: 165-227.
- [8] DING L, HUANG Y, DAI M L, et al. Transmissible gastroenteritis virus infection induces cell cycle arrest at S and G2/M phases via p53-dependent pathway[J]. Virus Research, 2013, 178(2): 241-251.
- [9] DING L, HUANG Y, DU Q, et al. TGEV nucleocapsid protein induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 signaling[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 445(2): 497-503.
- [10] LUO Y R, ZHOU S T, YANG L, et al. Porcine epidemic diarrhoea virus induces cell-cycle arrest through the DNA damage-signalling pathway[J]. Journal of Veterinary Research, 2020, 64(1): 25-32.
- [11] SHEN X H, YIN L, PAN X C, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infection blocks cell cycle and induces apoptosis in pig intestinal epithelial cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 147: 104378.
- [12] DONG W Y, XIE W T, LIU Y B, et al. Receptor tyrosine kinase inhibitors block proliferation of TGEV mainly through p38 mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Antiviral Research, 2020, 173: 104651.
- [13] ZHUANG T H, ZHANG B Y, SONG Y H, et al. Sufu negatively regulates both initiations of centrosome duplication and DNA replication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(28): e2026421118.
- [14] DIEHL F F, SAPP K M, VANDER HEIDEN M G. The bidirectional relationship between metabolism and cell cycle control[J]. Trends in Cell Biology, 2024, 34(2): 136-149.
- [15] BOGDANOW B, PHAN Q V, WIEBUSCH L. Emerging mechanisms of G₁/S cell cycle control by human and mouse cytomegaloviruses[J]. mBio, 2021, 12(6): e0293421.
- [16] ZHAO Y, TANG T, ZHAO W C, et al. Inhibition of PEDV viral entry upon blocking N-glycan elaboration[J]. Virology, 2024, 594: 110039.
- [17] XU X G, ZHANG H L, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhoea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression[J]. Virology Journal, 2013, 10(1): 26.
- [18] XU X G, ZHANG H L, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhoea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells[J]. Acta Virologica, 2015, 59(3): 265-275.
- [19] XU X G, ZHANG H L, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhoea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 164(3/4): 212-221.
- [20] ZHU Q, SU M, WEI S, et al. Up-regulated 60S ribosomal protein L18 in PEDV N protein-induced S-phase arrested host cells promotes viral replication[J]. Virus Research, 2022, 321: 198916. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198916>.

(责任编辑:徐 艳)