



杨黎,刘萍,韦美华,等.持续感染口蹄疫病毒 VP1 蛋白对细胞转录组的影响[J].江西农业大学学报,2022,44(2):411-421.
YANG L,LIU P,WEI M H,et al.Effects of VP1 protein in persistently infection with foot-and-mouth disease virus on cell transcriptome[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2022,44(2):411-421.

持续感染口蹄疫病毒 VP1 蛋白 对细胞转录组的影响

杨黎^{1,2,3},刘萍^{1,2,3},韦美华^{1,2,3},柯雄锋^{1,2,3},刘丽清^{1,2,3},宋静静^{1,2,3},
方莹^{1,2,3},唐欢^{1,2,3},孔令保^{1,2,3},辛秀^{1,2,3*}

(1.江西农业大学 病原微生物研究所,江西 南昌 330045;2.江西农业大学 生物科学与工程学院,江西 南昌 330045;3.南昌市动物病毒与基因工程重点实验室,江西 南昌 330045)

摘要:【目的】通过转录组测序(RNA-Seq)方法分析持续感染口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 诱导的 PK-15 细胞基因表达谱的变化,探索 VP1 蛋白对宿主细胞信号通路的影响。为后续开展 VP1 影响 FMDV 持续感染相关机制研究提供基础数据和理论支持。【方法】PK-15 细胞分别转染 pCAGGS-HA(对照载体)、pCAGGS-HA-Pi-VP1 质粒,转染 36 h 后,Western blot 检测 VP1 蛋白表达,同时提取两组细胞总 RNA 进行转录组测序(每组 3 个重复,2 组 6 个样本)。将测序所得的序列进行过滤比对,获得差异表达基因后,对差异表达基因进行了生物信息学分析。采用 qRT-PCR 验证关键差异表达基因的表达。【结果】RNA-Seq 共鉴定出 3 376 个差异表达基因(DEGs)|log₂(Fold Change)|>0 和 padj<0.05,其中上调基因 1 744 个,下调基因 1 632 个。许多参与免疫反应和炎症的效应基因差异表达。GO 和 KEGG 富集分析显示,差异基因 GO 条目绝大部分与核糖体有关,而 KEGG 富集中涉及了与天然免疫相关的信号通路,如 TNF 信号通路、Toll 受体信号通路。【结论】pCAGGS-HA-Pi-VP1 转染 PK-15 细胞之后,改变了细胞的表达谱,获得的 DEGs 及其功能注释信息有助于理解其对宿主细胞的影响,为后续开展 VP1 影响 FMDV 持续感染相关机制研究提供基础数据和理论支持。

关键词:转录组;基因表达谱;FMDV;持续感染;VP1;差异表达基因

中图分类号:S852.65 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2022)02-0411-11

Effects of VP1 Protein in Persistently Infection with Foot-and-mouth Disease Virus on Cell Transcriptome

YANG Li^{1,2,3}, LIU Ping^{1,2,3}, WEI Meihua^{1,2,3}, KE Xiongfeng^{1,2,3},
LIU Liqing^{1,2,3}, SONG Jingjing^{1,2,3}, FANG Ying^{1,2,3},
TANG Huan^{1,2,3}, KONG Lingbao^{1,2,3}, XIN Xiu^{1,2,3*}

(1.Institute of Pathogenic Microbiology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3.Nanchang Key Laboratory of Animal Virus and Genetic Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

收稿日期:2021-08-20 修回日期:2021-10-20

基金项目:江西省自然科学基金青年项目(20192BAB214001)

Project supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province(20192BAB214001)

作者简介:杨黎,orcid.org/0000-0002-8364-5511,swjsswxyli@163.com;*通信作者:辛秀,讲师,博士,主要从事病毒研究,orcid.org/0000-0002-9195-7099,xiuxin@jxau.edu.cn。

Abstract: [Objective] Through transcriptome analysis, this study aims to analyze the gene expression profile of PK-15 cells transfected with VP1 gene of persistently infected with FMDV, and its possible signal pathways, thus providing data and theoretical foundation for future studies on the mechanisms of VP1 affecting FMDV persistent infection. [Method] PK-15 cells were transfected with pCAGGS-HA (control vector) and pCAGGS-HA-Pi-VP1 plasmids respectively. After 36 hours of transfection, Western blot was used to detect the expression of VP1 protein, and the total RNA of two groups of cells was extracted for transcriptome sequencing (3 replicates in each group, 6 samples in 2 groups). The obtained sequences were filtered and compared to obtain differentially-expressed genes, then the differentially-expressed genes were analyzed by qRT-PCR to verify the expression levels of key differentially expressed genes. [Results] RNA-Seq identified a total of 3 376 differentially expressed genes (DEGs) $|\log_2(\text{Fold Change})| > 0$ and $\text{padj} < 0.05$, including 1 744 up-regulated genes and 1 632 down-regulated genes. A large quantity of effector genes involved in immune response and inflammation are differentially expressed. The enrichment analysis of GO and KEGG showed that most of the differential gene GO entries were related to ribosomes, while the KEGG enrichment involved signal pathways related to natural immunity, such as TNF signal pathway and Toll receptor signal pathway. [Conclusion] After pCAGGS-HA-Pi-VP1 was transfected into PK-15 cells, the expression profile of the cells was changed. The analysis of DEGs and their function annotation information was helpful to understand the impact of Pi-VP1 protein on host cells, which provides basic data and theoretical support for the further studies of FMDV persistent infection.

Keywords: transcriptome; gene expression profile; FMDV; persistent infection; VP1; differentially expressed genes

【研究意义】口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引起的一种急性、热性、高度接触传染性和可快速远距离传播的动物疫病。被世界动物卫生组织(World organization for animal health, OIE)列为必报动物疫病之首,我国也将其定义发生时必须依法上报的重大动物传染病^[1]。世界各国对FMD一直保持着高度的关注,使FMDV感染、发病机制及流行性病学取得长足的进展。研究表明FMD的爆发虽是FMDV急性感染的结果,但急性感染可转换为持续感染,持续感染在一定条件下又引发大规模的急性感染,导致FMD的爆发^[2]。因此,揭示FMDV持续感染形成和维持的机制,既是消除持续感染隐患的必由之路,也是FMDV持续感染研究亟需解决的重要基础科学问题。【前人研究进展】FMDV属于单链正义RNA病毒,大小约为30 nm,无包膜,具有二十面体对称性。病毒基因组为8.5 kb,编码结构蛋白VP1、VP2、VP3、VP4和至少10个非结构蛋白,非结构蛋白包括L、2A、2B、2C、3A、3B1、3B2、3B3、3C和3D以及一些中间体前体^[3]。其中VP1蛋白是核衣壳的重要组成部分,在病毒复制中起着重要作用。VP1蛋白大部分暴露在衣壳的外面并至少有两个重要的抗原决定位点,分别是位于氨基酸141-160的G-H环和氨基酸200-213的C末端位点^[4]。G-H环包含一个非常重要的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arginine-glycine-aspartic acid, RGD)三联体结构,该结构能够介导病毒通过整合蛋白受体与宿主细胞结合。VP1编码区的核苷酸序列,由于它们对病毒吸附和进入,保护性免疫和血清特异性的重要作用,已被用于作为确定口蹄疫病毒毒株的基因特征^[5]。大量实验已经证明VP1中的许多单个氨基酸替换,特别是在RGD基序和围绕二十面体病毒粒子的五重对称轴附近,可能影响受体识别^[6]、酸诱导病毒脱壳^[7-9]、病毒复制和致病性^[10-11]。【本研究切入点】VP1蛋白除了介导和受体结合外,也可以影响宿主细胞体内的信号通路,从而有利于自己的复制。研究发现VP1蛋白可以通过抑制AKT通路的活化促进宿主细胞的凋亡^[12]。也能通过与sorcina蛋白和肿瘤进展位点2(Tumor progression locus 2, TPL2)蛋白结合抑制细胞体内IFN- α 的产生^[13-15]。此外,VP1蛋白还可以和肿瘤坏死因子受体相关因子3(TNFR-associated factor 3, TRAF3)竞争性结合线粒体抗病毒信号蛋白(Mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS),从而抑制先天性免疫应答,但是在培养过程出现的VP1(E83K)突变会丧失这种竞争性抑制能力^[16]。而对于VP1在

FMDV持续感染过程的机制尚不清楚。【拟解决的关键问题】利用前期实验室已经建立的O型FMDV持续感染模型^[17],以持续感染FMDV(FMDV-Op)为模板扩增(Persistent infection virus protein, Pi-VP1),对持续感染FMDV VP1转染的PK-15细胞进行转录组测序分析,探讨其可能作用的信号通路。为后续开展Pi-VP1影响持续感染FMDV相关机制研究提供基础数据和参考。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞

猪肾细胞(PK-15细胞),叙利亚仓鼠肾细胞(BHK-21细胞),持续感染FMDV^[18]均由中国典型培养物保藏中心提供,pCAGGS-HA^[19]质粒由华中农业大学兽医学院农业微生物学国家重点实验室赠送。

1.2 主要试剂

DMEM培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、含乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid, EDTA)的0.25%胰蛋白酶、RIPA细胞裂解液均购于北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, 四季青)购自浙江天杭生物科技有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex-Taq™试剂盒(TaKaRa, 北京)购自宝日医生物技术(北京)有限公司;TRIZOL试剂购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 质粒的构建与表达

用持续感染FMDV感染BHK-21细胞,待细胞发生明显病变后,提取总RNA反转录为cDNA,以cDNA为模板利用特异性引物[forward primer: 5'-CCGGAATTCATGACCACCTCCCCGGGCGAG (*EcoRI*)-3', reverse primer: 5'-CCGCTCGAGTTACTGTTTTGCGGGTGC (*XhoI*)-3'];扩增目的基因Pi-VP1,通过酶切酶连构建到pCAGGS-HA载体上,构建载体命名为:pCAGGS-HA-Pi-VP1。

将PK-15细胞培养于6孔细胞培养板中,当细胞密度至95%汇合度时,弃去培养液,用PBS清洗两遍,加入1 mL的DMEM培养基。按照jetPRIME®polyplus说明书,分别将2 µg的pCAGGS-HA空载质粒和pCAGGS-HA-Pi-VP1质粒加入到200 µL的jetPRIME® buffer中涡旋混匀,再加入4 µL的jetPRIME®涡旋混匀10 s,室温孵育10 min,将混合液加入到6孔细胞培养板中,培养36 h后加入RIPA细胞裂解液收取蛋白样品,用Western Blot检测蛋白表达情况。

1.4 RNA的提取

将pCAGGS-HA和pCAGGS-HA-Pi-VP1质粒转染于细胞36 h后,收集细胞并加入TRIZOL,样品由北京诺禾致源科技股份有限公司提取总RNA,用Agilent 2100生物分析仪对RNA的质量检测,确定合格后的样品可用于后期测序。

1.5 文库的构建与测序

建库起始RNA为total RNA,通过Oligo(dT)磁珠富集带有polyA尾的mRNA,随后在NEB Fragmentation Buffer中用二价阳离子将得到的mRNA随机打断,按照NEB普通建库方式或链特异性建库方式进行建库。库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求pooling后进行Illumina测序,并产生150 bp配对末端读数。

1.6 数据的质控

测序片段被高通量测序仪测得的图像数据经CASAVA碱基识别转化为序列数据(reads),为了保证数据分析质量及可靠性,对原始数据进行过滤。主要包括去除带接头的reads、去除含N的reads、去除低质量reads。同时,对有效碱基数(clean bases)进行Q20, Q30和GC含量计算。使用R语言对样品间相关系数(Pearson相关系数)进行检测,以保证样品间的重复性。

1.7 差异基因的筛选统计与聚类

对于有生物学重复的样本,使用DESeq2软件进行两个比较组合之间的差异表达分析。DESeq2提供了统计程序,用于使用基于负二项式分布的模型来确定数字基因表达数据中的差异表达,将 $|\log_2(\text{Fold-Change})| > 0$ 并且 $\text{padj} < 0.05$ 的基因定义为差异表达。再通过应用Cluster 3.0软件对筛选到的候选基因进

行层级聚类分析观察基因的表达模式。

1.8 差异基因富集分析

通过 clusterProfiler(3.4.4)软件,以 padj<0.05 作为显著性富集的阈值,对差异基因集进行 GO 富集分析。可将基因按照它们参与的生物过程(Biological Process),细胞组成(Cellular Component)和分子功能(Molecular Function)对相应的差异基因数目进行统计。与 GO 富集相同的原理对差异基因进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)富集分析,用于了解生物系统的高级功能和效用,如细胞、生物体和生态系统等。

1.9 测序数据的qRT-PCR验证

为进一步验证转录组分析结果,本试验在显著富集的信号通路中随机选取了 7 个上调表达和 12 个下调表达的差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。将质粒转染于 PK-15 细胞后 36 h,提取总 RNA,并将其反转录成 cDNA;然后根据 TaKaRa RT-PCR 试剂盒说明书进行扩增,qPCR 引物委托北京擎科生物科技有限公司合成。以 GAPDH 作为内参基因(见表 1),扩增结果根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各基因的相对表达量,采用 GraphPad Prism8 统计作图。

表 1 差异基因的 qPCR 引物
Tab.1 Primers of differentially expressed genes used for qPCR verification

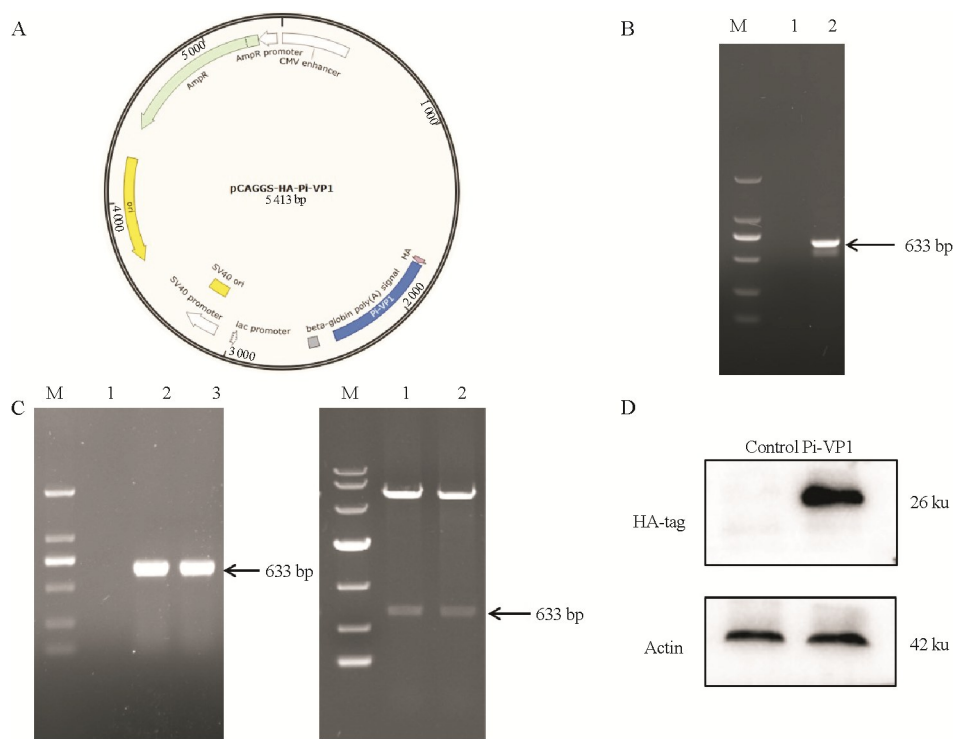
基因名称	引物	引物序列(5'→3')	基因名称	引物	引物序列(5'→3')
Gene name	Primer	Primer sequence(5'→3')	Gene name	Primer	Primer sequence(5'→3')
<i>RSAD2</i>	F	CCCAGTGCAGCATCGTGAG	<i>SAT1</i>	F	TTCGGAGAGCACCCCTTCTA
<i>RSAD2</i>	R	ATAATCCCTGCACCACGTCC	<i>SAT1</i>	R	GTTTGCCAATCCATGGGTCAT
<i>CCL5</i>	F	TCCCCATATGCCTCGGACAC	<i>EREG</i>	F	GGTGCAGATGCGAGCACTT
<i>CCL5</i>	R	CACACACCTGGCGGTTCCT	<i>EREG</i>	R	GACCCCTTGAGGACACTCTT
<i>CXCL8</i>	F	CTTCCAAACTGGCTGTTGCC	<i>DPP4</i>	F	ACCCAAAGACTGTGCGGATT
<i>CXCL8</i>	R	TGGAAAGGTGTGGAATGCGT	<i>DPP4</i>	R	ATTAACACAGACGCCGGAGG
<i>CCL4</i>	F	ATGAAGCTCTGCGTGACTGT	<i>PLAT</i>	F	ACAATGCCAAACCTGCACGAC
<i>CCL4</i>	R	TTCCGCACGGTGTATGTGAA	<i>PLAT</i>	R	GTCACGGTCTCGTGTGTCT
<i>CCL2</i>	F	GTGTCCTAAAGAAGCAGTGATCTTC	<i>SERPINE1</i>	F	ATATGACCAGACTCACCCGC
<i>CCL2</i>	R	TCTGAGGGTATTTAGGGCAAGT	<i>SERPINE1</i>	R	AGACTTGAGAAGTCCGCCTG
<i>CXCL10</i>	F	ATAAGGATGGGCCGGAGAGA	<i>SLC5A3</i>	F	CGCTACGAGCTGGCTTTGAT
<i>CXCL10</i>	R	GTGGGAGCAGCTAACTTGGT	<i>SLC5A3</i>	R	CGCTACGAGCTGGCTTTGAT
<i>FCRLB</i>	F	GGGTAACCTTGCGGTGTGAT	<i>AREG</i>	F	CGTGGTGCTGTCACTCTTGA
<i>FCRLB</i>	R	AGGGTACTTGCAGGATCAGC	<i>AREG</i>	R	CATTTCGCTAGCAGGGGGAG
<i>GAPDH</i>	F	AAGCATGTGGGGGACTTGGA	<i>PFDN4</i>	F	TTGCCGATGACGACTGCTTA
<i>GAPDH</i>	R	AGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA	<i>PFDN4</i>	R	CGCTGGATTGATGCCACTCT
<i>TBK1</i>	F	CCTTCGTCCAGTGATGTTCA	<i>DNHD1</i>	F	GCATTGTTGGTGCTGAGGTG
<i>TBK1</i>	R	CTCCACATGGACAAAATTCCA	<i>DNHD1</i>	R	AACGTCCGAGTCAAGCTGAG
<i>GBP1</i>	F	CTCACCCCAAGAAGCGAGAA	<i>COX2</i>	F	AAGACGCCACTTCACCCATC
<i>GBP1</i>	R	CTGGTTAATGGTCCCCATGCT	<i>COX2</i>	R	TCTTGGGCATCCATTGTGCT

2 结果与分析

2.1 pCAGGS-HA-Pi-VP1 质粒的构建和表达

重组质粒 pCAGGS-HA-Pi-VP1 的质粒模型如图 1A,通过 PCR 扩增出大小为 633 bp 的条带(图 1B),利用酶切酶连后进行转化,挑取单菌落进行 PCR 验证和双酶切验证(图 1C),都出现了大小约为 633 bp 的目的条带,再提取质粒后经测序鉴定,pCAGGS-HA-Pi-VP1 质粒序列无误。

质粒转染 PK-15 细胞 36 h 后,用 Western Blot 检测蛋白的表达。结果发现,在 25 KDa-35 KDa 之间能检测到 pCAGGS-HA-Pi-VP1 表达的明显的单一特异性条带,而转染的空载体泳道没有检测到表达,说明 Pi-VP1 蛋白表达成功(图 1D)。



A:重组质粒模型;B:Pi-VP1 目的片段的扩增;C: 菌液 PCR(左)和双酶切(右)鉴定重组子;D: 重组子的真核表达。
A: Model of a recombinant plasmid; B: Amplification of target fragment Pi-VP1; C: Colony PCR and identification of recombinants; D: Eukaryotic expression of recombinants.

图1 重组质粒pCAGGS-HA-Pi-VP1 的构建和表达

Fig.1 Construction and expression of recombinant pCAGGS-HA-Pi-VP1

2.2 原始数据质控

利用 Illumina 高通量测序技术对 2 组 6 个样本(转染 pCAGGS-HA 质粒的对照组,转染 pCAGGS-HA-Pi-VP1 质粒的实验组)进行测序,各个样本经过质量控制后的有效碱基数(clean bases)均超过了 6 GB, Q30 碱基百分比均在 92.9% 以上,GC 含量百分比均在 53.05% 以上(表 2)。将质控数据比对到猪的参考基因组中,唯一比对率的 reads 均超过 90%,总比对率均大于 95%,见表 3。以上结果表明质控后得到了高质量的测序数据。

表 2 测序数据统计分析

Tab.2 Statistical analysis of sequencing data

样品 Sample	原始数据 Raw data	质控数据 Quality control data	有效碱基数 Effective base number	错误 Error rate	Phred 数值大于 20 的碱基占总碱 基的百分比/% Q20	Phred 数值大于 30 的碱基占总 碱基的百分比/% Q30	GC 含量/% GC content
Control-1	45 438 984	43 946 096	6.59G	0.03	97.81	94.23	53.32
Control-2	41 621 344	40 397 528	6.06G	0.02	97.94	94.47	53.05
Control-3	46 019 466	44 529 572	6.68G	0.03	97.72	93.98	53.22
Pi-VP1-1	42 118 514	40 918 446	6.14G	0.03	97.88	94.31	53.37
Pi-VP1-2	41 349 832	40 332 172	6.05G	0.02	97.95	94.5	53.61
Pi-VP1-3	45 268 496	44 150 794	6.62G	0.02	97.88	94.4	53.56

Q20.Phred 值>20 的碱基数百分比;Q30. Phred 值>30 的碱基数百分比;GC 含量 .G+C 的数量占总的碱基数量的百分比。
Q20.The percentage of the bases with Phred value >20; Q30.The percentage of the bases with Phred value >30; GC content.
The percentage of G/C bases.

表3 样本与参考基因组比对情况统计
Tab.3 Comparison and statistics on samples and reference genomes

样品 Sample	总比对率/% Total comparison rate	唯一比对率/% Unique comparison rate	比对到外显子占比/% Alignment to exon proportion	比对到内含子占比/% Alignment to intron proportion	比对到基因间区占比/% Alignment to intergenic area proportion
Control-1	95.31	91.15	89.49	5.11	5.41
Control-2	95.34	91.23	89.67	4.96	5.37
Control-3	95.13	90.90	89.55	4.97	5.48
Pi-VP1-1	95.10	91.11	90.15	4.86	5.00
Pi-VP1-2	95.15	91.08	90.14	4.87	4.99
Pi-VP1-3	95.12	91.03	90.33	4.71	4.96

对样品间基因表达水平进行相关性分析,结果显示,所有样品间皮尔逊相关系数 R^2 值均在0.99以上(图2),远高于实验要求的0.8,因此,本实验的样品间重复性很好,测序数据可靠。

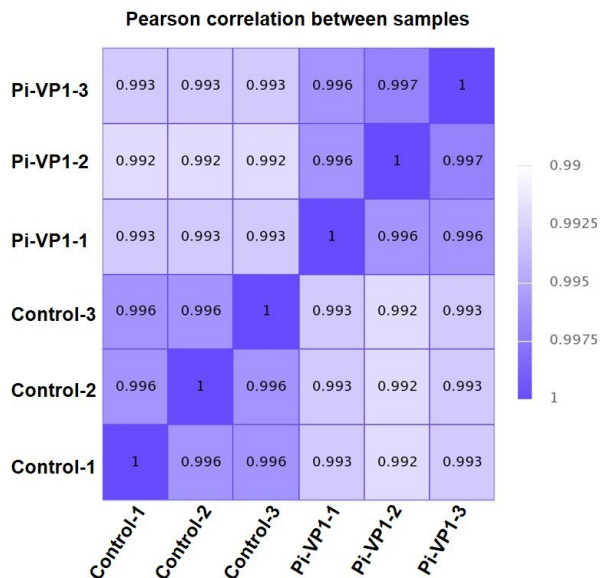


图2 样本间相关性热图

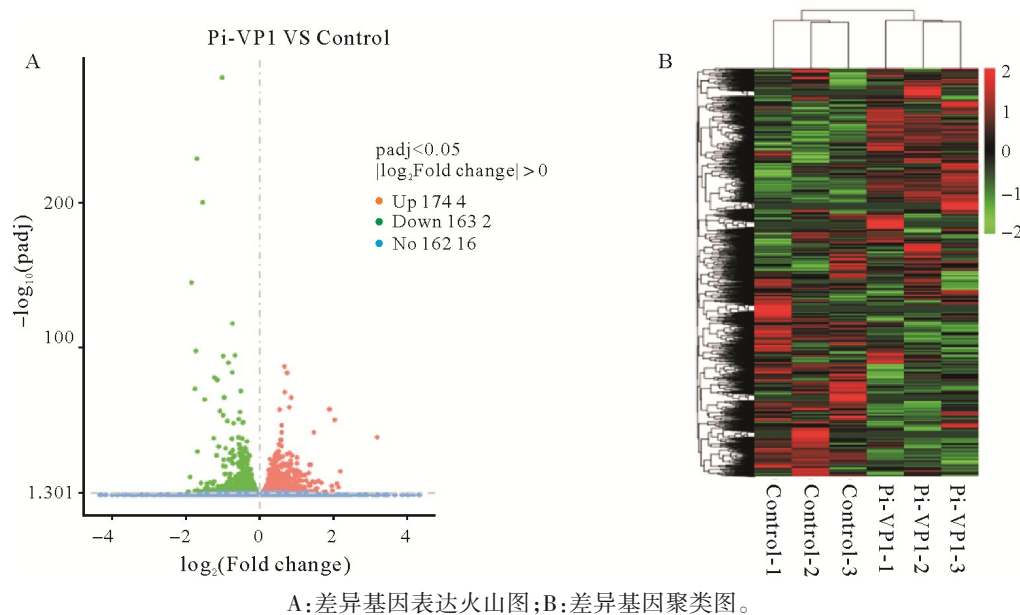
Fig.2 Sample correlation heat map

2.3 差异基因筛选与聚类

采用DESeq2软件对2组样本进行样本间基因的表达差异分析,将其以 $|\log_2(\text{FoldChange})|>0$ 和 $\text{padj}<0.05$ 为标准进行筛选,鉴定出样本间差异表达的基因,结果显示(图3A和3B),与转染pCAGGS-HA载体的对照组相比,转染pCAGGS-HA-Pi-VP1的实验组有3 376个差异表达基因,其中1 632个上调基因,1 744个下调基因,说明Pi-VP1蛋白表达能够显著影响细胞内的基因表达,而差异表达基因的发现为寻找Pi-VP1蛋白特异性的靶基因提供参考依据。

2.4 差异表达基因的GO功能注释分析

对上述筛选的差异表达基因进行GO功能注释分析,并按基因功能分为生物学过程(BP)、细胞组成(CC)以及分子功能(MF)3个方面。一共比对到了1 610个GO功能条目,其中显著富集的有15个,14个为细胞组成,1个为分子功能,8个显著富集GO功能条目与核糖体有关,如核糖体、胞质核糖体、核糖体亚基、细胞内核糖核蛋白复合物、核糖核蛋白复合物等,而且大部分基因下调(表4),表明Pi-VP1可能抑制核糖体的合成。图4为每类基因功能中显著性前10的功能亚组的功能名称和程度,与细胞组成有关的GO功能条目显著性最高,其中细胞组成中GO富集最显著的是胞内细胞器部分(intracellular organelle



A:差异基因表达火山图;B:差异基因聚类图。
A:Volcano map of differentially expressed genes;B:Differential gene cluster map.

图3 差异基因的筛选与聚类

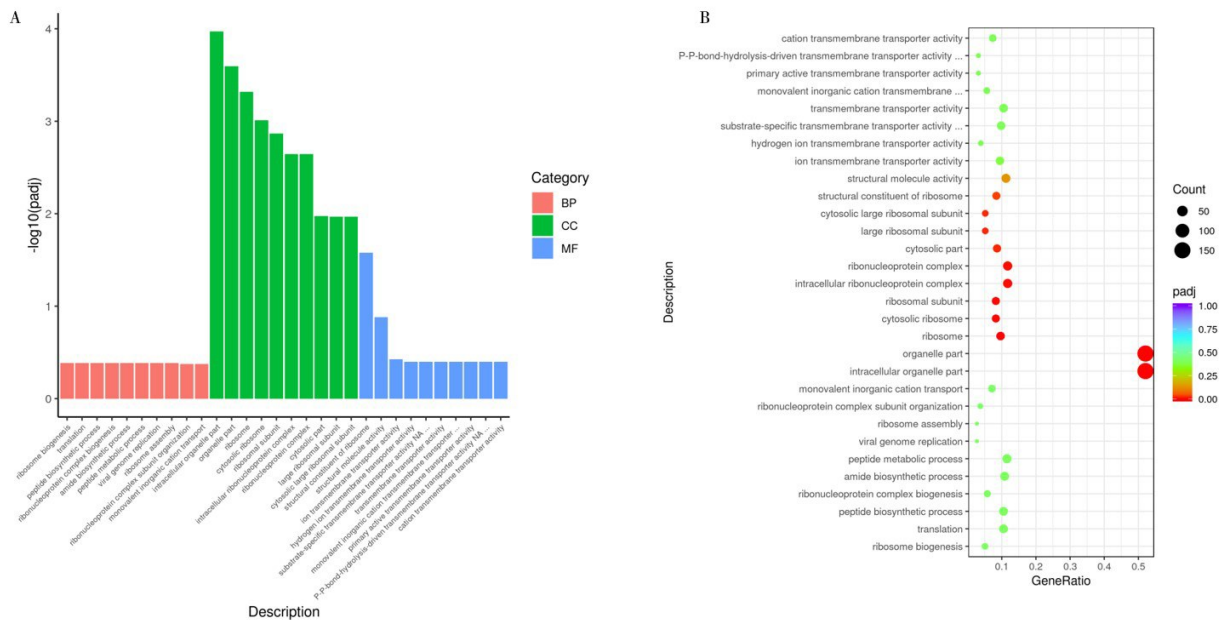
Fig.3 Screening and clustering of differential genes

part)和细胞器部分(organelle part)。在分子功能中,富集最显著的是核糖体结构组分(structural constituent of ribosome)以及结构分子活性(structural molecule activity)。生物学过程主要富集在核糖体生物发生(ribosome biogenesis)以及翻译(translation)等过程。综合以上分析结果,推测FMDV Pi-VP1可能通过抑制核糖体的合成,抑制宿主细胞的翻译。

表4 显著富集GO功能条目

Tab.4 Significantly enriched GO function items

类别 Category	GO 编号 GO ID	描述 Description	校正后的 p 值 Padj	上调基因数目 Number of up-regulated genes	下调基因数目 Number of down-regulated genes
CC	GO:0044446	intracellular organelle part	0.000 107	40	111
CC	GO:0044422	organelle part	0.000 255	40	111
CC	GO:0005840	ribosome	0.000 479	1	27
CC	GO:0022626	cytosolic ribosome	0.000 973	0	24
CC	GO:0044391	ribosomal subunit	0.001 363	0	24
CC	GO:0030529	intracellular ribonucleoprotein complex	0.002 273	6	28
CC	GO:1990904	ribonucleoprotein complex	0.002 273	6	28
CC	GO:0044445	cytosolic part	0.010 608	1	24
CC	GO:0015934	large ribosomal subunit	0.010 734	0	15
CC	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	0.010 734	0	15
CC	GO:0043228	non-membrane-bounded organelle	0.016 818	26	48
CC	GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	0.016 818	26	48
CC	GO:0005740	mitochondrial envelope	0.021 026	3	30
CC	GO:0031966	mitochondrial membrane	0.024 545	2	29
MF	GO:0003735	structural constituent of ribosome	0.026 515	0	24



A: 富集的 GO terms 柱状图; B: 富集的 GO terms 散点图。

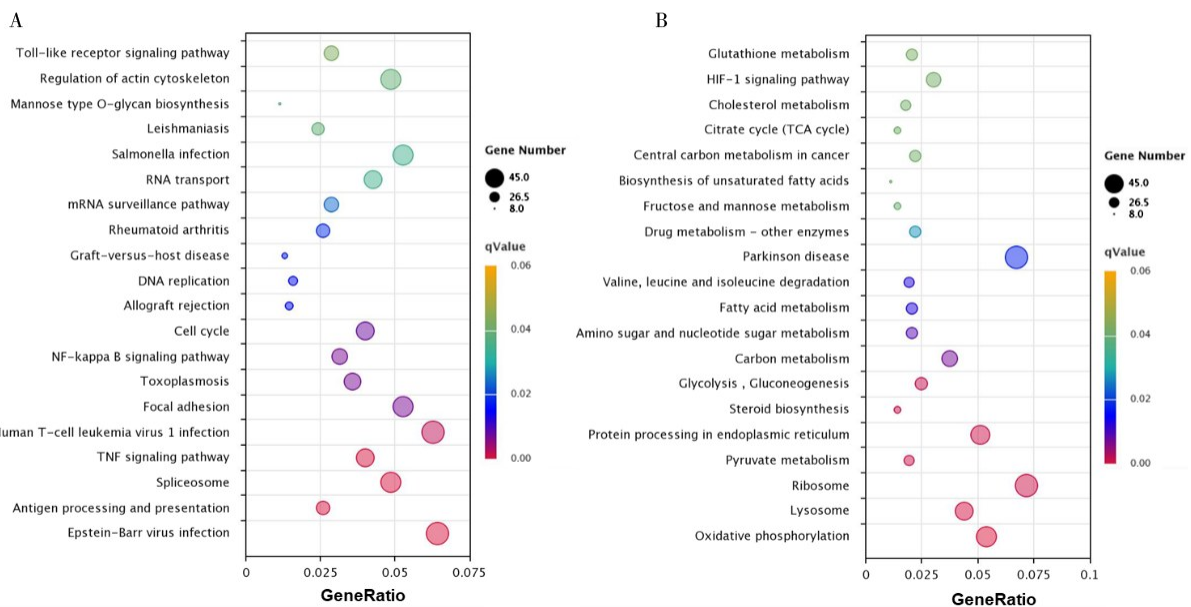
A: Enriched GO terms histograms; B: Enriched GO terms scatter plot.

图 4 GO 富集分析

Fig.4 GO classification of differentially expressed genes

2.5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

采用 KOBAS 对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析, 前 20 个富集的信号通路如图 5 所示。图 5A 是 KEGG 富集中显著上调的信号通路, 其中显著富集的前 4 的信号通路分别是 EB 病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)、抗原加工和呈递 (Antigen processing and presentation)、剪接体 (Spliceosome)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)。与对照组相比, EB 病毒感染中有 45 个基因上调, 抗原加工和呈递中有 18 个基因上调, 剪接体中有 34 个基因上调, TNF 信号通路中有 28 个基因上调。图 5B 是 KEGG 富集中显著下调的信号通路, 其中排名前 4 分别是氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation)、



A: 前 20 条富集的上调 KEGG 信号通路; B: 前 20 条富集的下调 KEGG 信号通路。

A: The first 20 enriched up-regulated KEGG signaling pathways; B: The first 20 enriched down-regulated KEGG signaling pathways.

图 5 KEGG 富集分析

Fig.5 KEGG enrichment analysis

溶酶体(Lysosome)、核糖体(Ribosome)、丙酮酸代谢(Pyruvate metabolism)。与对照组相比,氧化磷酸化中有 39 个基因下调,溶酶体中有 32 个基因下调,核糖体中有 52 个基因下调,丙酮酸代谢中有 14 个基因下调。

2.6 差异基因的 qRT-PCR 验证

为了进一步验证转录组差异分析结果的准确性,本文从差异基因中随机选取了 19 个基因进行 qRT-PCR 验证,结果如图 5 所示, *RSAD2*、*CCL5*、*CXCL8*、*CCL2* 等基因表达上调, *TBK1*、*GBP1*、*SAT1*、*EREG*、*DPP4* 等基因表达下调,结果与转录组测序一致,证明了此次结果的可靠性。

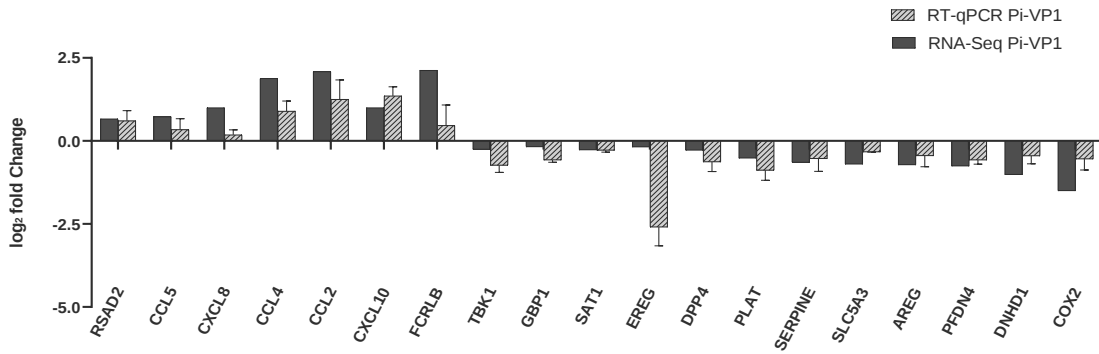


图 6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig.6 qRT-PCR verification of differentially expressed genes

3 讨 论

早在 20 世纪初期人们就发现了 FMDV 的持续性感染特征,但是一直没有足够的证据来证明。1959 年, van Bakkum 等^[20]首次从痊愈数月后的动物体内分离到 FMDV,但是并没有引起人们的重视。直到 1965 年, Suttmoller 等^[21]进一步用实验验证了 van Bakkum 的发现,人们才开始注意并进行 FMDV 持续性感染的研究。口蹄疫病毒持续性感染形成的主要原因有:遗传变异、病毒准种、RNA 重组、抗原变异及宿主免疫系统的损伤等^[22]。在持续性感染研究中,抗原变异为 FMDV 建立持续性感染提供条件, Holguin 等^[23]发现 RNA 病毒编码的 2 个抗原位点(C 和 D)基因的突变率低于抗原位点 A(VP1 的 G-H 环),而且只在位点 C 和 D 发生氨基酸替换,即在缺乏免疫选择情况下,VP1 的 G-H 环以外的抗原位点发生了变异。FMDV 的这种作用有可能使突变株逃脱抗体的中和调理作用,获得持续感染的机会。因此本研究以 VP1 突变体 Pi-VP1 转染到 PK-15 细胞作为转录组分析的研究对象。希望通过发现 Pi-VP1 对细胞基因群的影响找到 FMDV 持续感染的相关信号通路和靶向基因。

本研究从实验组得到 3 376 个差异表达基因,其中 1 632 个上调基因,1 744 个下调基因($P<0.05$),表明转染表达的 Pi-VP1 蛋白引起了剧烈的细胞反应。为了确定差异表达基因涉及的信号通路,笔者通过 GO 和 KEGG 数据库进行富集分析。对差异基因进行 GO 功能注释,转染后有 15 个显著富集的 GO 条目,其中富集差异最为显著的 7 个 GO 均涉及细胞组分,差异基因 GO 条目绝大部分与核糖体有关,如核糖体、胞质核糖体、核糖体亚基、细胞内核糖核蛋白复合物、核糖核蛋白复合物,且大部分相关基因下调,推测 FMDV Pi-VP1 可能通过抑制核糖体的合成,抑制宿主细胞的翻译。前期研究发现,在口蹄疫急性感染和持续性感染 BHK-21 细胞的转录本中,许多核糖体和翻译相关基因的表达存在差异,很多核糖体与翻译相关基因在持续性感染细胞系中下调^[24],与此次研究结果相符,所以推测在持续性感染 FMDV 影响宿主细胞的翻译系统中, Pi-VP1 起一定作用。KEGG 分析发现,转染后出现免疫相关的信号通路富集,如抗原加工和呈递、TNF 信号通路、Toll 受体信号通路。而天然免疫系统是机体的第一道防线,是宿主抵御病原体侵害的一个高度保守的细胞信号机制^[25]。宿主细胞通过一种可识别病原相关的分子模式(PAMP)的模式识别受体(PRR)来识别感染性病毒的存在,从而启动诱导促炎细胞因子和干扰素信号级联反应,最终发挥抗病毒作用^[26]。目前已鉴定出 3 类病毒感染的 PRR: RIG- I 样

受体(RLR), Toll样受体(TLR)和NOD样受体(NLR)^[27]。其中, TLR可导致I型IFN和促炎趋化因子(CCL4、CCL5、CXCL10)表达, 从而限制病毒复制和传播, 诱导组织发生炎症反应, 激发机体产生先天性和获得性免疫反应。本研究发现, TLR2信号通路的相关因子显著富集。从信号通路可推断, 转染后, 位于细胞膜表面的TLR2被激活, 随后上调TOLLIP的表达, 通过MyD88依赖途径激活下游的IRAK1, 继而引起CCL4、CCL5的表达。

综上, 通过转录组结果可推测, 转染pCAGGS-HA-Pi-VP1质粒后, 宿主细胞中与核糖体和翻译相关的许多基因的表达大多数是下调, 可能会抑制宿主细胞的翻译过程从而抑制病毒的增殖, 因此保护宿主细胞在病毒的感染过程中存活下来并形成持续性感染。在诱导的天然免疫中, 通过Toll受体信号通路继而引起CCL4、CCL5和CXCL10的表达; 但其机制仍需要进一步开展实验研究加以证明。

致谢: 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ180240)同时对本研究给予了资助, 谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] BO L L, LWIN K S, UNGVANIJBAN S, et al. Foot-and-mouth disease outbreaks due to an exotic serotype Asia 1 virus in Myanmar in 2017 [J]. Transboundary and emerging disease, 2019, 66(2): 1067-1072.
- [2] BAO H F, LI D, SUN P, et al. The infectivity and pathogenicity of a foot-and-mouth disease virus persistent infection strain from oesophageal-pharyngeal fluid of a Chinese cattle in 2010 [J]. Virology journal, 2011, 8(1): 536.
- [3] JAMAL S M, BELSHAM G J. Foot-and-mouth disease: past, present and future [J]. Veterinary research, 2013, 44(1): 116.
- [4] MAHDY S E, LIU S, SU L, et al. Expression of the VP1 protein of FMDV integrated chromosomally with mutant *Listeria monocytogenes* strain induced both humoral and cellular immune responses [J]. Apply microbiology and biotechnology, 2019, 103(4): 1919-1929.
- [5] KNOWLES N J, WADSWORTH J, BACHANEK-BANKOWSKA K, et al. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology [J]. Revue scientifique et technique (international office of epizootics), 2016, 35(3): 741-755.
- [6] BAI X, BAO H, LI P, et al. Effects of two amino acid substitutions in the capsid proteins on the interaction of two cell-adapted PanAsia-1 strains of foot-and-mouth disease virus serotype O with heparan sulfate receptor [J]. Virology journal, 2014, 11(1): 132.
- [7] VAZQUEZ-CALVO A, CARIDI F, SOBRINO F, et al. An increase in acid resistance of foot-and-mouth disease virus capsid is mediated by a tyrosine replacement of the VP2 histidine previously associated with VP0 cleavage [J]. Journal of virology, 2014, 88(5): 3039-3042.
- [8] MARTIN-ACEBES M A, VÁZQUEZ-CALVO A, RINCON V, et al. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid resistance [J]. Journal of virology, 2011, 85(6): 2733-2740.
- [9] CARIDI F, VAZQUEZ-CALVO A, SOBRINO F, et al. The pH stability of foot-and-mouth disease virus particles is modulated by residues located at the pentameric interface and in the N terminus of VP1 [J]. Journal of virology, 2015, 89(10): 5633-5642.
- [10] BAI X W, BAO H F, LI P H, et al. Engineering responses to amino acid substitutions in the VP0- and VP3-coding regions of PanAsia-1 strains of foot-and-mouth disease virus serotype O [J]. Journal of virology, 2019, 93(7): e02278-18.
- [11] LIAN K, YANG F, ZHU Z, et al. The VP1 S154D mutation of type Asia1 foot-and-mouth disease virus enhances viral replication and pathogenicity [J]. Infection, genetics and evolution, 2016, 39: 113-119.
- [12] PENG J M, LIANG S M, LIANG C M. VP1 of foot-and-mouth disease virus induces apoptosis via the Akt signaling pathway [J]. Journal of biological chemistry, 2004, 279(50): 52168-52174.
- [13] LI X, WANG J, LIU J, et al. Engagement of soluble resistance-related calcium binding protein (sorcini) with foot-and-mouth disease virus (FMDV) VP1 inhibits type I interferon response in cells [J]. Veterinary microbiology, 2013, 166(1/2): 35-46.
- [14] HAO J, SHEN C, WEI N, et al. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP1 antagonizes TPL2-mediated activation of

- the IRF3/IFN- β signaling pathway to facilitate the virus replication[J].Frontiers immunology, 2021(11):580334.
- [15] ZHANG K, YAN M, HAO J, et al. Foot-and-mouth disease virus structural protein VP1 destroys the stability of the TPL2 trimer by degradation of TPL2 to evade host antiviral immunity[J]. Journal of virology, 2021, 95(7):e02149-20.
- [16] EKANAYAKA P, LEE S Y, HERATH T U B, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 target the MAVS to inhibit type-I interferon signaling and VP1 E83K mutation results in virus attenuation[J]. PLoS pathogens, 2020, 16(11):e1009057.
- [17] HUANG X, YONG L, HUI F, et al. Establishment of persistent infection with foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells[J]. Virology journal, 2011, 8(1):169.
- [18] XIN X, WANG H, HAN L, et al. Single-cell analysis of the impact of host cell heterogeneity on infection with foot-and-mouth disease virus[J]. Journal of virology, 2018, 92(9):e00179-18.
- [19] WANG T, FANG L, ZHAO F, et al. Exosomes mediate intercellular transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Journal of virology, 2018, 92(4):e01734-17.
- [20] VAN BEKKUM J, FRENKEL H S, FREDERIKS H, et al. Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus[J]. Tijdschrift voor diergeneeskunde, 1959, 84:1159-1164.
- [21] SUTMOLLER P, MCVICAR J W. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers[J]. Archiv für die gesamte Virusforschung, 1972, 37(1):78-84.
- [22] MARTINEZ M A, VERDAGUER N, MATEU M G, et al. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus[J]. Proceedings of national academy of the United State of America, 1997, 94(13):6798-6802.
- [23] HOLGUÍN A, HERNÁNDEZ J, MARTÍNEZ M, et al. Differential restrictions on antigenic variation among antigenic sites of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibody selection[J]. Journal of general virology, 1997, 78(3):601-609.
- [24] LI J, HAN L, HAO Y, et al. Comparative Transcriptome Analysis Reveals Different Host Cell Responses to Acute and Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus Infection[J]. Virologica Sinica, 2020, 35(1):52-63.
- [25] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. Cell, 2006, 124(4):783-801.
- [26] RANDALL R E, GOODBOURN S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures[J]. Journal of general virology, 2008, 89(1):1-47.
- [27] MOGENSEN T H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses[J]. Clinical microbiology reviews, 2009, 22(2):240-73.