



## 论文

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒侵入和释放依赖细胞膜胆固醇

孙颖<sup>①②</sup>, 肖少波<sup>①②</sup>, 王荡<sup>①②</sup>, 罗锐<sup>①②</sup>, 李彬<sup>①②</sup>, 陈焕春<sup>①②</sup>, 方六荣<sup>①②\*</sup>

① 华中农业大学生命科学技术学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

② 华中农业大学动物医学院动物病毒学实验室, 武汉 430070

\* 联系人, E-mail: fanglr@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2010-12-23; 接受日期: 2011-05-27

国家自然科学基金(批准号: 30770082)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB523200)资助项目

**摘要** 胆固醇是细胞膜脂质的重要组成成分. 目前的研究发现细胞膜胆固醇在病毒的感染中扮演十分重要的作用. 本研究对细胞膜胆固醇在猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染 MARC-145 细胞中的作用进行了探讨. 通过 TCID<sub>50</sub> 检测和 Real-Time RT-PCR 分析发现, 用胆固醇萃取剂甲基-β-环糊精预处理消除细胞膜胆固醇可显著抑制 PRRSV 的感染, 并呈剂量依赖性; 而补充外源性胆固醇后可部分恢复 PRRSV 的感染性, 提示 PRRSV 感染能力的下降确实是由于细胞膜胆固醇的去除而导致的. 进一步的研究证实, 细胞膜胆固醇的去除对 PRRSV 感染性的影响主要是通过影响 PRRSV 的侵入和释放过程. 上述结果表明, 细胞膜胆固醇是影响 PRRSV 感染的一个重要因子.

**关键词**猪繁殖与呼吸综合征病毒  
胆固醇  
病毒侵入  
释放

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是严重危害全球养猪业的病毒性传染病, 主要导致妊娠母猪的繁殖障碍和仔猪的呼吸系统疾病<sup>[1-3]</sup>. 该病是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的. PRRSV 是单股正链 RNA 病毒, 与鼠乳酸脱氢酶增高症病毒(lactate dehydrogenase-elevating virus, LDV), 马动脉炎病毒(equine arteritis virus, EAV)和猴出血热病毒(simian hemorrhagic fever virus, SHFV)同属动脉炎病毒科动脉炎病毒属<sup>[4]</sup>. 在体内 PRRSV 主要感染单核细胞和巨噬细胞, 在体外猪肺泡巨噬细胞和来源于非洲绿猴肾细胞的 MARC-145 是其敏感细胞<sup>[5-8]</sup>. 以前的研究表明, PRRSV 感染依赖于细胞膜中的特定组分<sup>[9,10]</sup>, 包括乙

酰肝素和唾液酸黏附素等细胞表面分子, 这些表面分子在 PRRSV 的吸附和内化中起重要作用<sup>[11-13]</sup>. 另外, 猴波形蛋白和 CD151 也被认为在 PRRSV 感染 MARC-145 细胞中具有重要作用<sup>[14,15]</sup>. 但是, 对 PRRSV 感染过程的分子细节目前研究的较少.

包膜病毒感染细胞通常依赖于宿主细胞膜中的脂质成分, 如甲病毒属的西门利克森林病毒的感染需要胆固醇和鞘脂的参与<sup>[16,17]</sup>. 另外, 某些反转录病毒和丝状病毒的侵入和组装依赖于细胞膜上富含胆固醇的微结构域<sup>[18,19]</sup>. 胆固醇是真核细胞膜上的一种重要组分, 具有一定的硬度和疏水性, 可在胞膜上形成有序的流动微环境<sup>[20]</sup>. 已有研究表明, 质膜胆固醇在多种包膜病毒的侵入和感染过程中起重要作用

用<sup>[21]</sup>, 如人免疫缺陷病毒<sup>[22]</sup>、脊髓灰质炎病毒<sup>[23]</sup>、鼠冠状病毒<sup>[24]</sup>、牛痘病毒<sup>[25]</sup>、单纯疱疹病毒<sup>[26]</sup>、手足口病毒<sup>[27]</sup>以及严重急性呼吸系统综合征冠状病毒<sup>[28]</sup>等。而且, 质膜胆固醇组分还影响流感病毒从感染细胞中释放<sup>[29]</sup>。但是, 动脉炎病毒属除 EAV 的侵入被证明与细胞膜胆固醇相关外<sup>[30]</sup>, 其他病毒包括 PRRSV 在内, 还没有关于这方面的研究报道。

本研究分析了细胞膜胆固醇在 PRRSV 感染 MARC-145 细胞过程中的作用, 发现去除细胞膜胆固醇显著抑制 PRRSV 的增殖, 并且主要发生在病毒的侵入和释放过程。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒、细胞与试剂

PRRSV CH-1a 株由中国农业科学院上海兽医研究所童光志博士惠赠。高致病性 PRRSV WUH3 株由本实验室 2007 年从患“高热病”的发病猪中分离<sup>[31]</sup>。MARC-145 细胞所用的培养基为含 10%胎牛血清的 DMEM, 置于 37℃ 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。甲基-β-环糊精(MβCD)和水溶性胆固醇均购自 Sigma 公司(USA)。

### 1.2 病毒的纯化和生物素标记

PRRSV 的纯化按 Nauwynck 等人<sup>[11]</sup>介绍的方法进行。纯化病毒的滴度约为 5×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL(半数组织感染剂量)。将纯化的病毒调整至蛋白浓度为 2 mg/mL, 用 GE Healthcare 公司(Uppsala Sweden)的蛋白生物素标记试剂盒标记生物素, 具体操作按试剂盒说明书进行。生物素化的病毒通过葡聚糖凝胶柱进一步纯化, 用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)稀释至 0.2 mg/mL, 储存于-80℃ 备用。病毒感染性和侵入细胞的能力在生物素化后没有显著降低。

### 1.3 MβCD 处理细胞

MβCD 对细胞的毒性实验: 将含有不同浓度 MβCD 或不含 MβCD 的无血清 DMEM 加入 MARC-145 细胞已长成单层的 96 孔细胞板, 37℃处理 1 h 后收集细胞, 用 MTT 法检测细胞活性。

细胞膜胆固醇含量测定: 先用冷 PBS 洗涤 24 孔细胞培养板中的 MARC-145 细胞单层 3 次, 然后加入无血清的 DMEM(对照组)或者含不同浓度 MβCD 的无血清 DMEM(实验组), 37℃作用 1 h, 再用 PBS 洗涤

3 次后收集细胞, 用 Amplex Red 胆固醇检测试剂盒(Molecular Probes, USA)测定细胞中胆固醇的含量。

细胞膜胆固醇去除实验: 将 MARC-145 细胞接种 24 孔细胞培养板, 待长成单层后用冷 PBS 洗涤 3 次, 然后加入无血清 DMEM(对照组)或者含 10 mmol/L MβCD 的无血清 DMEM(实验组), 37℃作用 1 h。

胆固醇补充实验: 根据 Popik 等人<sup>[32]</sup>建立的方法, 向 MARC-145 细胞已长成单层的 24 孔细胞板中加入无血清的 DMEM(对照组)或者含 10 mmol/L MβCD 的无血清 DMEM(实验组), 37℃处理 1 h 后, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后加入无血清 DMEM 或含有 400 μg/mL 水溶性胆固醇的无血清 DMEM, 37℃作用 1 h, 用 PBS 洗涤 3 次, 收集细胞用于胆固醇含量检测或进行 PRRSV 感染实验。

### 1.4 RNA 提取、实时荧光定量 RT-PCR

采用 RNAPrep Micro 试剂盒(Tiangen, China)提取细胞悬液或上清中的总 RNA, 经 ReverTra Ace-α-™(Toyobo, Japan)和 Oligo(dT)<sub>20</sub>将 RNA 反转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 的操作参照 Egli 等人<sup>[33]</sup>的方法。定量 PCR 所用的上下游引物分别为(5'-AAATGGG-GCTTCTCCGGGTTTT-3')和(5'-TCAGCTGTGCCAA-ATGCTGG-3'), 特异性荧光探针(5'-TCCC GG TCCC-TTGCTCTGGA-3')的 5'端标记 FAM(reporter), 3'端标记 TAMRA。定量 PCR 在 ABI Prism 7500 Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA)仪器上完成。每一轮 PCR 设 4 个无模板的空白对照和 5 个含 PRRSV *ORF7* 基因不同拷贝数(10<sup>12</sup>, 10<sup>11</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup>)的标准品对照, 且每个样品都设置 3 个重复。以 PRRSV *ORF7* 基因的拷贝数作为病毒基因组复制的指标。TaqMan<sup>®</sup>数据采用 SDS 软件分析(Version 1.7, Applied Biosystems)。

### 1.5 共聚焦显微镜检测病毒侵入

将 10 μg 生物素标记的 PRRSV 接种 MARC-145 细胞(24 孔细胞培养板), 4℃孵育 1 h 后吸弃接种物, 用冷 PBS 洗涤细胞 3 次, 然后将细胞分为 3 组: 对照组、MβCD 处理组及 MβCD 处理后胆固醇补充组。按 1.3 所述方法处理完成后, 吸弃上清, 在各孔加入含 2% FBS 的 DMEM 培养液, 继续培养 1 h, 用预冷的 PBSA 洗涤 3 次, 再与 50 倍稀释的链霉素化异硫氰酸荧光素在冰上孵育 1 h, PBS 洗涤 1 次后重悬于含 4%多聚甲醛的冷

PBS 中, 室温固定 10 min 后弃去多聚甲醛, 用含 2% FBS 的 PBS 洗涤 2 次, 然后用共聚焦激光扫描显微镜观察(LSM 510 Meta; Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

## 1.6 统计学分析

所有实验数据采用 *t* 检验进行统计学分析, 以  $P < 0.05$  作为具有统计学差异的标准.

## 2 结果

### 2.1 M $\beta$ CD 处理降低 MARC-145 细胞胆固醇含量

将 MARC-145 细胞与 M $\beta$ CD 共孵育, 收集细胞检测 M $\beta$ CD 去除细胞胆固醇的能力. 结果如图 1(A)所示, M $\beta$ CD 能显著降低细胞胆固醇含量, 并呈剂量依赖性. 当 M $\beta$ CD 浓度达到 10 mmol/L 时, 细胞胆固醇水平仅为对照组的 25%. 但当 M $\beta$ CD 浓度继续升高(>10 mmol/L)时, 细胞胆固醇水平不再下降, 表明剩余的 25% 难以通过提高 M $\beta$ CD 的浓度来消除.

在确定 M $\beta$ CD 处理能有效去除 MARC-145 细胞胆固醇后, 进一步采用 MTT 法检测了不同浓度的 M $\beta$ CD 对细胞的毒性. 结果显示, 当 M $\beta$ CD 浓度不高于 10 mmol/L 时, 对 MARC-145 细胞活性的影响很小(图 1(B)). 因此, 在后续的实验中, M $\beta$ CD 的浓度均采用 10 mmol/L.

### 2.2 去除细胞膜胆固醇抑制 PRRSV 的感染

以前的研究表明, 细胞膜的脂质组分在多种包膜病毒的感染中发挥重要作用<sup>[24-28]</sup>. 为探讨细胞膜胆固醇在 PRRSV 感染中的作用, 先用 M $\beta$ CD 处理以去除 MARC-145 细胞的胆固醇, 然后将 PRRSV CH-1a 株以每孔(24 孔细胞培养板) $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> 的量感染

细胞, 36 h 后收集细胞悬液并测定病毒的 TCID<sub>50</sub>. 结果如图 2(A)所示, M $\beta$ CD 处理显著抑制 PRRSV CH-1a 株的增殖, 并呈剂量依赖性, 表明细胞膜胆固醇对 PRRSV 在 MARC-145 细胞中的复制是必要的. 而且, 10 mmol/L M $\beta$ CD 可将病毒的滴度由  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL 降至  $10^{2.75}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

为了进一步阐明细胞膜胆固醇在 PRRSV 复制周期中的作用, 用  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> 每孔(24 孔细胞培养板)的 PRRSV CH-1a 株接种 M $\beta$ CD 处理后的细胞, 在感染后的不同时间收集细胞悬液, 检测病毒的滴度. 结果显示, M $\beta$ CD 处理能显著抑制病毒增殖, 实验组病毒滴度在病毒复制周期的各阶段都显著低于对照组病毒滴度, 尤其在感染后 36 h, M $\beta$ CD 处理组病毒滴度较对照组降低  $7.9 \times 10^3$  倍(图 2(B)). 此外, 以 PRRSV WUH3 株为代表分析了细胞膜胆固醇对近几年在中国新出现的高致病性蓝耳病病毒在细胞中增殖的影响, 结果也观察到相似的抑制效果(图 2(C)), 表明去除细胞膜胆固醇对 PRRSV 增殖的抑制作用并没有毒株特异性.

如果 M $\beta$ CD 处理抑制 PRRSV 的复制确实是由于消除细胞膜胆固醇所致, 那么补充外源性胆固醇就应该使病毒的增殖得到恢复. 为了验证这一假设, 向 M $\beta$ CD 处理过的细胞中加入外源胆固醇, 然后检测细胞胆固醇水平及病毒在细胞中的增殖情况. 结果如图 2(D)所示, 加入外源胆固醇后, 细胞胆固醇水平可以恢复到对照组的 85%. 病毒滴度检测也发现, 补充外源胆固醇后病毒滴度显著提高, 达到 M $\beta$ CD 处理但未补充外源胆固醇组的  $3.35 \times 10^3$  倍(图 2(E)). 上述结果进一步证实降低细胞胆固醇水平抑制了 PRRSV 的复制, 而且这种抑制作用可以通过补充外源胆固醇来得到补偿.

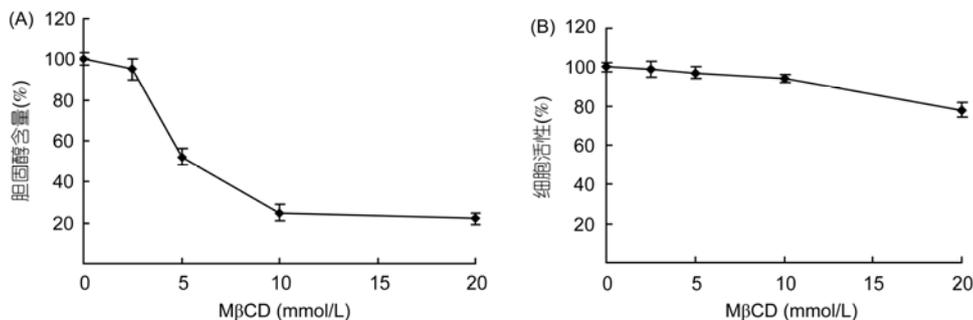


图 1 M $\beta$ CD 处理对 MARC-145 细胞胆固醇含量及细胞活性的影响

(A) MARC-145 细胞胆固醇含量的变化; (B) M $\beta$ CD 对 MARC-145 细胞的毒性. 所有数据均为 3 次独立实验的  $\bar{x} \pm SD$

### 2.3 去除细胞膜胆固醇抑制 PRRSV 的侵入

为进一步阐明去除细胞膜胆固醇对 PRRSV 感染的抑制主要作用于病毒复制周期的哪个阶段, 首先研究了细胞膜胆固醇在病毒侵入过程中的作用. 培养于 24 孔细胞板中的 MARC-145 细胞经过 M $\beta$ CD 处理及补充外源胆固醇后, 每孔接种滴度为  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> 的 PRRSV CH-1a 株. 孵育 1 h 后收集细胞悬

液, 提取 RNA 并用实时荧光定量 PCR 对病毒基因组进行定量分析. 结果如图 3(A)所示, M $\beta$ CD 处理组中病毒基因组拷贝数较未处理对照组降低了 80%, 而补充外源胆固醇后病毒基因组拷贝数较未处理对照组仅降低 17%, 表明 PRRSV 侵入细胞的过程依赖于细胞膜中的胆固醇含量.

病毒的侵入过程分为两个阶段, 第一阶段是病

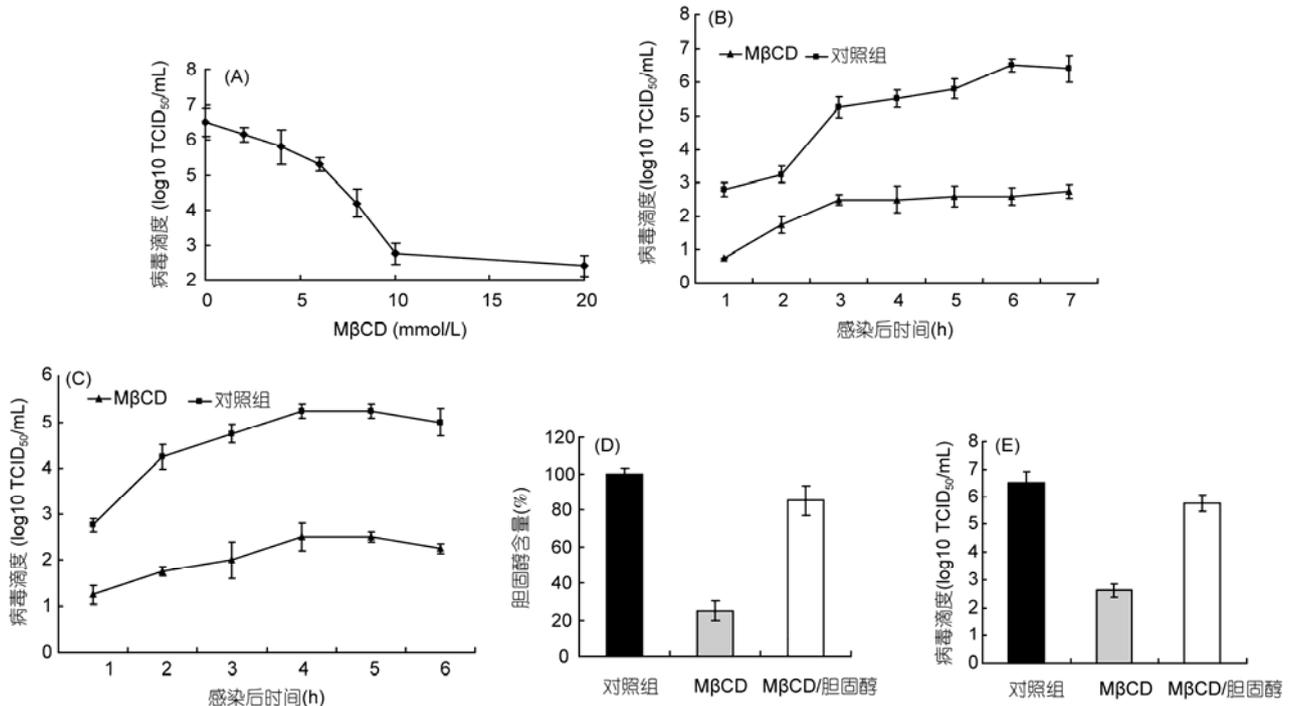


图 2 去除细胞膜胆固醇抑制 PRRSV 增殖

(A) 用 M $\beta$ CD 处理去除细胞膜胆固醇后, 接种 PRRSV CH-1a 株, 36 h 后测定病毒 TCID<sub>50</sub>; PRRSV CH-1a 株(B)或 WUH3 株(C)分别感染对照组(■)和 M $\beta$ CD 处理组(▲)后不同时间点的病毒滴度; (D) M $\beta$ CD 处理和 M $\beta$ CD 处理/补充外源胆固醇后细胞胆固醇水平的变化; (E) 病毒感染经 M $\beta$ CD 处理和 M $\beta$ CD 处理/补充外源胆固醇的细胞 36 h 后的病毒滴度. 所有数据均为 3 次独立实验的  $\bar{x} \pm SD$

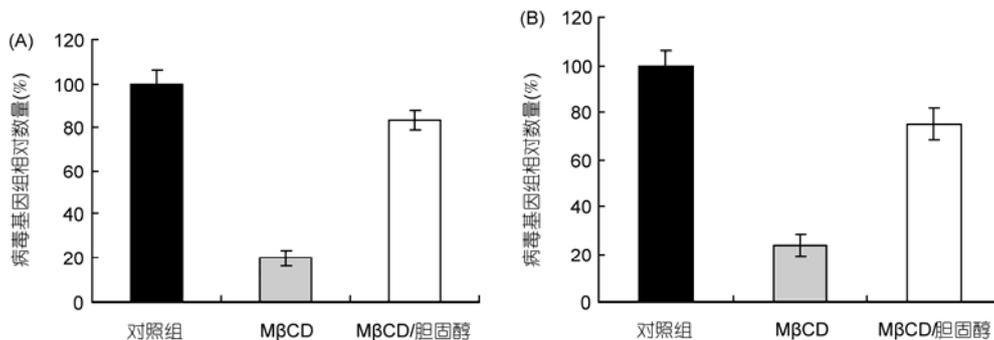


图 3 去除细胞膜胆固醇抑制 PRRSV 侵入

(A) 实时荧光定量 PCR 检测 PRRSV 的侵入; (B) 实时荧光定量 PCR 检测 PRRSV 的吸附. 所有数据均为 3 次独立实验的  $\bar{x} \pm SD$

毒与细胞的吸附, 第二阶段是病毒穿刺进入细胞. 为确定 M $\beta$ CD 处理是否影响 PRRSV 的吸附, 将 PRRSV 接种 M $\beta$ CD 处理或未处理、以及 M $\beta$ CD 处理再补充外源胆固醇的 MARC-145 细胞, 于 4 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后收集细胞并用实时荧光定量 PCR 对病毒基因组进行定量分析. 结果显示, M $\beta$ CD 处理组细胞中的病毒基因组拷贝数较对照组降低了 76.2%, 而补充外源胆固醇后可使病毒基因组拷贝数恢复至未处理对照组的 75%(图 3(B)), 说明该抑制作用是特异性地由胆固醇去除所致.

在确定了细胞膜胆固醇在病毒吸附过程中的作用后, 进一步探讨了其在病毒穿胞过程中的作用. 将生物素标记的 PRRSV 以每孔 10  $\mu$ g 的量接种于 24 孔细胞板中的 MARC-145 细胞, 4 $^{\circ}$ C 共孵育 1 h, 再用 M $\beta$ CD 处理细胞或处理后后补充外源胆固醇, 通过共聚焦显微镜观察病毒穿胞的情况. 结果发现各实验组间病毒穿胞过程没有显著差异(数据未显示), 表明 M $\beta$ CD 处理对病毒穿胞过程无明显影响. 综合上述病毒的吸附和穿胞过程的实验结果, 说明细胞膜胆固醇对 PRRSV 侵入 MARC-145 细胞是必需的, 消除细胞膜胆固醇主要影响病毒对细胞的吸附.

#### 2.4 去除细胞膜胆固醇促进病毒粒子释放但降低了释放病毒粒子的感染力

为了确定 M $\beta$ CD 处理是否影响 PRRSV 从被感染细胞中释放, 将 PRRSV CH-1a 株以  $10^{4.5}$  TCID $_{50}$  每孔的量感染 24 孔细胞培养板中的 MARC-145. 感染 24 h 后, 用 M $\beta$ CD 处理细胞或处理后再补加外源胆固醇, 处理后不同时间收集细胞上清并用实时荧光定

量 PCR 对病毒基因组进行定量分析. 结果显示, M $\beta$ CD 处理导致细胞上清中病毒基因组拷贝数显著高于对照组, 而这种提高可以通过补充外源胆固醇得到中和(图 4(A)), 表明病毒从细胞中释放的能力与胞膜胆固醇含量成反比, 即胆固醇含量的下降促进了病毒粒子的释放.

为了进一步阐明胆固醇对病毒释放的影响, 本研究检测了释放病毒粒子的感染力. 首先通过定量 PCR 对各实验组细胞所释放的病毒粒子进行定量, 然后用相同剂量的释放病毒感染 MARC-145 细胞, 36 h 后收集感染细胞及上清并用定量 PCR 对病毒基因组进行定量分析. 结果如图 4(B)所示, M $\beta$ CD 处理组释放的病毒粒子感染的细胞中病毒基因组拷贝数较对照组降低了 89.4%, 而补充外源胆固醇后能减弱这种变化趋势. 上述结果表明, M $\beta$ CD 处理促进了病毒粒子的释放, 但释放的病毒粒子的感染力有所下降.

### 3 讨论

细胞膜胆固醇在许多包膜病毒, 如单纯疱疹病毒<sup>[26]</sup>、痘苗病毒<sup>[25]</sup>、鼠冠状病毒<sup>[24]</sup>、SARS 冠状病毒<sup>[28]</sup>、带状疱疹病毒<sup>[34]</sup>、伪狂犬病毒<sup>[35]</sup>的复制过程中起重要作用. 本研究采用 M $\beta$ CD 去除细胞膜中胆固醇后, 发现 PRRSV 感染受到显著抑制, 而补充外源胆固醇后可部分消除这种抑制, 说明细胞膜胆固醇也在 PRRSV 感染中发挥重要作用.

作为一种重要的细胞膜组成成分, 胆固醇可以通过不同机制抑制病毒侵入细胞. 首先, 胆固醇可

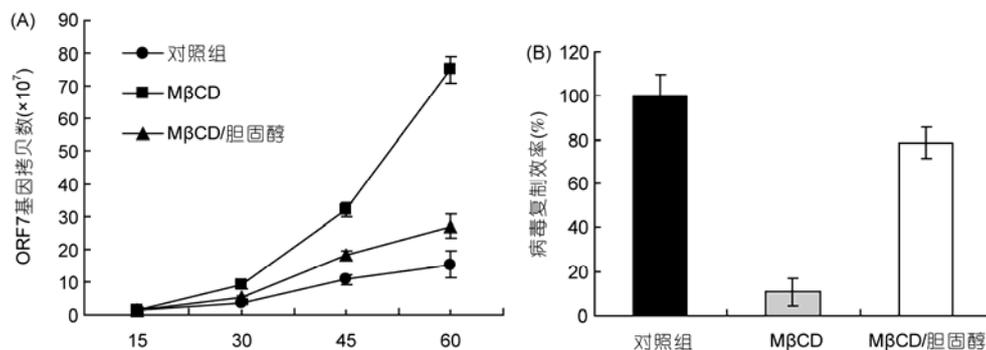


图 4 去除细胞膜胆固醇促进病毒粒子释放但降低其感染力

(A) 实时荧光定量 PCR 检测感染后不同时间点各实验组细胞上清中 PRRSV 基因组拷贝数; (B) 各实验组释放病毒粒子的感染力检测. 所有数据均为 3 次独立实验的  $\bar{x} \pm SD$

以改变病毒粒子与宿主细胞膜的相互作用来影响病毒侵入。胆固醇水平对维持生物膜的流动性十分重要<sup>[36]</sup>, 胆固醇去除会降低膜的径向扩散能力, 而这种膜扩散能力的降低可能影响 PRRSV 侵入细胞膜的能力。其次, 一般认为细胞膜上包括胆固醇在内的脂质环境对离子通道具有重要影响<sup>[37]</sup>, 而病毒基因组通过离子通道进入细胞的过程需要胆固醇的存在。胆固醇和鞘脂是脂筏的组成成分, 而病毒特定蛋白对脂质的识别在病毒侵入细胞的过程中是十分重要的<sup>[38]</sup>。另外, 也有报道指出胆固醇去除会导致细胞信号通路的抑制<sup>[39]</sup>。

有研究表明, 与 PRRSV 同属于动脉炎病毒属的马动脉炎病毒侵入细胞的过程与胆固醇含量相关<sup>[30]</sup>。本研究结果显示在病毒侵入细胞的过程中, 胆固醇去除主要影响 PRRSV 对细胞的吸附。以前的研究发现, PRRSV 侵入猪肺泡巨噬细胞依赖于受体介导的内吞小泡和低 pH 介导的内吞通路<sup>[11]</sup>, 因此, 细胞膜胆固醇在 PRRSV 侵入 MARC-145 细胞的过程中也可

能通过影响内吞过程而抑制病毒的侵入。

本研究的一个重要发现是去除细胞膜胆固醇可促使病毒从感染细胞中释放, 但释放的病毒粒子的感染性有所降低, 这一结果与 Barman 等人<sup>[29]</sup>关于流感病毒的研究结果一致。另有报道显示胆固醇去除导致新城疫病毒粒子感染力降低, 其原因可能是从胆固醇消除的细胞中释放的病毒粒子密度不均且结构异常所致<sup>[40]</sup>。Teissier 和 Pecheur<sup>[38]</sup>的研究结果显示, 脂筏的分子结构可以影响细胞膜的曲率并进一步影响其流动性而导致膜变形, 因此, 胆固醇去除导致病毒粒子的结构异常以及胆固醇在质膜中的物理作用也可能是引起 PRRSV 释放变化的原因。

总之, 本研究发现 PRRSV 感染 MARC-145 细胞的侵入和释放过程都需要细胞膜胆固醇的参与, 去除细胞膜胆固醇促进病毒粒子释放但降低了释放病毒粒子的感染力。这些结果为进一步研制有效的预防控制 PRRSV 的新方法奠定了良好的理论基础。

## 参考文献

- 1 Rossow K D. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol*, 1998, 35: 1–20
- 2 Meulenbergh J J. PRRSV, the virus. *Vet Res*, 2000, 31: 11–21
- 3 Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J*, 2008, 177: 345–351
- 4 Plagemann P G, Moennig V. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv Virus Res*, 1992, 41: 99–192
- 5 Benfield D A, Nelson E, Collins J E, et al. Characterisation of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4: 127–133
- 6 Duan X, Nauwynck H J, Pensaert M B. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol*, 1997, 142: 2483–2497
- 7 Kim H S, Kwang J, Yoon I J, et al. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol*, 1993, 133: 477–483
- 8 Wensvoort G, de Kluiver E P, Pol J M, et al. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet Microbiol*, 1992, 33: 185–193
- 9 Kreutz L C. Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism. *Virus Res*, 1998, 53: 121–128
- 10 Van Gorp H, Van Breedam W, Delpitte P L, et al. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Arch Virol*, 2009, 154: 1939–1943
- 11 Nauwynck H J, Duan X, Favoreel H W, et al. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J Gen Virol*, 1999, 80: 297–305
- 12 Delpitte P L, Costers S, Nauwynck H J. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J Gen Virol*, 2005, 86: 1441–1445
- 13 Van Breedam W, Delpitte P L, Van Gorp H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol*, 2010, 91: 1659–1667
- 14 Kim J K, Fahad A M, Shanmukhappa K, et al. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J Virol*, 2006, 80: 689–696

- 15 Shanmukhappa K, Kim J K, Kapil S. Role of CD151, a tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol*, 2007, 4: 62
- 16 Kielian M C, Helenius A. Role of cholesterol in fusion of Semliki forest virus with membranes. *J Virol*, 1984, 52: 281–283
- 17 Nieva J L, Bron R, Corver J, et al. Membrane fusion of Semliki Forest virus requires sphingolipids in the target membrane. *EMBO J*, 1994, 13: 2797–2804
- 18 Bavari S, Bosio C M, Wiegand E, et al. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med*, 2002, 195: 593–602
- 19 Del Real G, Jimenez-Baranda S, Lacalle R A, et al. Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. *J Exp Med*, 2002, 196: 293–301
- 20 Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387: 569–572
- 21 Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 226–237
- 22 Viard M, Parolini I, Sargiacomo M, et al. Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol*, 2002, 76: 11584–11595
- 23 Danthi P, Chow M. Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *J Virol*, 2004, 78: 33–41
- 24 Thorp E B, Gallagher T M. Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry. *J Virol*, 2004, 78: 2682–2692
- 25 Chung C S, Huang C Y, Chang W. Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *J Virol*, 2005, 79: 1623–1634
- 26 Bender F C, Whitbeck J C, Ponce de Leon M, et al. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol*, 2003, 77: 9542–9552
- 27 Martin-Acebes M A, Gonzalez-Magaldi M, Sandvig K, et al. Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology*, 2007, 369: 105–118
- 28 Li G M, Li Y G, Yamate M, et al. Lipid rafts play an important role in the early stage of severe acute respiratory syndrome-coronavirus life cycle. *Microbes Infect*, 2007, 9: 96–102
- 29 Barman S, Nayak D P. Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells. *J Virol*, 2007, 81: 12169–12178
- 30 Nitschke M, Korte T, Tiesch C, et al. Equine arteritis virus is delivered to an acidic compartment of host cells via clathrin-dependent endocytosis. *Virology*, 2008, 377: 248–254
- 31 Li B, Xiao S, Wang Y, et al. Immunogenicity of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein encoded by a synthetic *ORF5* gene. *Vaccine*, 2009, 27: 1957–1963
- 32 Popik W, Alce T M, Au W C. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol*, 2002, 76: 4709–4722
- 33 Egli C, Thur B, Liu L, et al. Quantitative taqman RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods*, 2001, 98: 63–75
- 34 Hambleton S, Steinberg S P, Gershon M D, et al. Cholesterol dependence of varicella-zoster virion entry into target cells. *J Virol*, 2007, 81: 7548–7558
- 35 Desplanques A S, Nauwynck H J, Vercauteren D, et al. Plasma membrane cholesterol is required for efficient pseudorabies virus entry. *Virology*, 2008, 376: 339–345
- 36 Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 1577–1592
- 37 Chang H M, Reitstetter R, Mason R P, et al. Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J Membr Biol*, 1995, 143: 51–63
- 38 Teissier E, Pecheur E I. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur Biophys J*, 2007, 36: 887–899
- 39 Stulnig T M, Berger M, Sigmund T, et al. Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J Biol Chem*, 1997, 272: 19242–19247
- 40 Laliberte J P, McGinnes L W, Peebles M E, et al. Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J Virol*, 2006, 80: 10652–10662