

王敏, 温渊, 曹钰莹, 等. 牛结节性皮肤病病毒 ORF140 依赖 JUP 激活 Wnt 信号通路影响病毒复制的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 103-110.

WANG M, WEN Y, CAO Y Y, et al. Lumpy skin disease virus ORF140 regulates viral replication through JUP-dependent activation of the Wnt signaling pathway [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 103-110.

牛结节性皮肤病病毒 ORF140 依赖 JUP 激活 Wnt 信号通路影响病毒复制的研究

王敏¹, 温渊¹, 曹钰莹¹, 刘聪¹, 李超^{1,2}, 汤芳¹, 戴建君^{1,3}, 薛峰^{1*}

(1. 南京农业大学动物健康与食品安全国际合作联合实验室, 江苏 南京 210095;

2. 中国动物卫生与流行病学中心/农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(南方)/
青岛市动物生物安全重点实验室, 山东 青岛 266032;

3. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 211199)

摘要: 旨在探索牛结节性皮肤病病毒(lumpy skin disease virus, LSDV) ORF140 在病毒感染宿主细胞中的作用。利用前期构建的 LSDV ORF140 缺失株, 荧光定量分析缺失 ORF140 基因在 LSDV 感染宿主细胞后细胞因子转录水平的变化, 同时选取 LSDV 保守基因 ORF077 建立检测 LSDV ORF077 的标准曲线, 检测 LSDV ORF140 缺失株与野毒株在不同时间点的拷贝数变化, 然后通过蛋白质谱技术和免疫共沉淀技术分析 140 蛋白与宿主细胞内存在相互作用的蛋白, 最后敲低此蛋白的基因转录水平检测宿主细胞内细胞因子转录水平的变化。结果: LSDV ORF140 缺失株会引起宿主细胞 β -catenin 基因转录水平显著下调 ($P < 0.0001$) 且缺失株拷贝数始终比野毒株高, 推测 LSDV ORF140 基因的存在能激活宿主细胞的 Wnt/ β -catenin (Wnt/ β -连环蛋白信号通路) 信号通路, 并且该通路的激活会影响 LSDV 的复制, 宿主细胞中的连接斑珠蛋白(JUP)与 LSDV 140 蛋白存在相互作用, 敲低宿主细胞 JUP 基因转录水平, 发现 β -catenin 基因转录水平下调 ($P < 0.05$), 感染 LSDV 后, β -catenin 基因转录水平仍处于下调状态, 并且检测到此时病毒拷贝数比野毒株高 ($P < 0.05$), 以此推测 LSDV ORF140 是通过与 JUP 结合激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 从而影响 LSDV 的复制。综上, 本研究证实 LSDV 140 蛋白能够与宿主细胞中的 JUP 蛋白结合, 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 从而抑制 LSDV 的复制, 为揭示 LSDV 与宿主之间的相互作用及 LSDV 的致病机制提供参考。

关键词: 牛结节性皮肤病病毒; 连接斑珠蛋白; Wnt/ β -catenin 信号通路; 病毒复制

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)03-0103-08

Lumpy skin disease virus ORF140 regulates viral replication through JUP-dependent activation of the Wnt signaling pathway

WANG Min¹, WEN Yuan¹, CAO Yuying¹, LIU Cong¹, LI Chao^{1,2}, TANG Fang¹, DAI Jianjun^{1,3}, XUE Feng^{1*}

(1. Joint International Cooperation Laboratory of Animal Health and Food Safety, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center/Key Laboratory of Animal Biosafety Risk Prevention and Control (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Animal Biosafety, Qingdao 266032, China;

3. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211199, China)

Abstract: The aim of this study was to explore the role of the Lumpy skin disease virus (LSDV) ORF140 in infected host cells. Using a previously constructed LSDV ORF140 deletion mutant in the laboratory, fluorescence quantitative analysis was performed to assess the changes in cytokine transcription levels after the deletion of ORF140 in LSDV-infected host cells. Simultaneously, a standard curve for detecting LSDV ORF077 was established, and the copy number changes of LSDV ORF140 deletion mutant and wild-type strain at different time points were measured. Then, protein mass spectrometry and immunoprecipitation techniques were employed to analyze proteins that interact with the

收稿日期: 2024-03-31; 修回日期: 2025-02-02

基金项目: 国家重点研发项目(2021YFD1800500)

第一作者: 王敏, 女, 硕士

*通信作者: 薛峰, 博士, 教授, 研究方向: 兽医公共卫生, E-mail: xuefeng@njau.edu.cn.

140 protein in host cells. Finally, the transcription levels of genes were knocked down to examine changes in cytokine transcription levels within the host cells. The results showed that the LSDV ORF140 deletion mutant significantly downregulated the transcription levels of the host cell β -catenin gene ($P < 0.0001$) and maintained a higher copy number than the wild-type strain, suggesting that the presence of the LSDV ORF140 gene activated the host cell's Wnt/ β -catenin signaling pathway, and the activation of this pathway affected LSDV replication. Junction Plakoglobin (JUP) in the host cells interacted with the LSDV 140 protein. Knocking down the transcription levels of the host cell JUP gene resulted in downregulation of the β -catenin gene transcription level ($P < 0.05$). After LSDV infection, the β -catenin gene transcription level remained downregulated, and a higher virus copy number than the wild-type strain was detected ($P < 0.05$). It is inferred that LSDV ORF140 activated the Wnt/ β -catenin signaling pathway by binding to JUP, thereby affecting LSDV replication. This study confirmed for the first time that LSDV 140 protein can bind to JUP in host cells, activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway to inhibit LSDV replication. This finding provided reference for the study of the interaction between LSDV and its host and the pathogenic mechanism of LSDV.

Keywords: lumpy skin disease virus; JUP; Wnt/ β -catenin signaling pathway; viral replication

牛结节性皮肤病 (lumpy skin disease, LSD) 又称牛结节、牛结节疹、牛结节性皮炎或牛疙瘩皮肤病, 是由牛结节性皮肤病病毒 (lumpy skin disease virus, LSDV) 引起牛的一种急性、亚急性传染病, 是世界动物卫生组织 (WOAH) 要求通报的疫病^[1-2]。LSDV 基因组包含 156 个预测的开放阅读框 (open reading frame, ORF)^[3], 编码 53~2 025 个氨基酸的蛋白质^[4]。中间保守基因编码的蛋白质参与 DNA 复制、转录、mRNA 合成、核苷酸代谢、结构形成和稳定性、毒力和宿主范围, 基因组两端则是基因家族和与毒力和宿主范围功能密切相关的基因^[5]。2019 年 8 月, 我国在新疆维吾尔自治区伊犁州首次确诊 LSD^[6], 2020 年在我国多地发生疫情^[7], 该病对我国养牛业构成了严重的威胁。目前, LSDV 只有一个血清型, 代表毒株为 Neethling 株^[8]。LSDV 感染宿主细胞后, 能够诱导宿主细胞产生炎症反应, 细胞凋亡等多种损伤性变化^[9]。因此, 深入研究宿主和 LSDV 的互作机制对认识病毒和开展有效防控措施具有重要意义。

LSDV ORF140 是假定的具有含指环结构的 N1R/p28 样蛋白的 E3 泛素连接酶类似物^[4]。E3 泛素连接酶是病毒的重要的毒力基因, 鼠痘病毒 (ectromelia virus, ECTV) 中能够编码一种 28 kDa 含指环结构域的蛋白, 被称为“p28”, 是重要的毒力和抗凋亡因子^[10]。p28 蛋白包含 RING 锌指结构域和 K1A-N DNA 结构域^[11], RING finger 结构域在不同的痘病毒属中相对保守。K1A-N 结构域一般与 E3 酶类似物定位于胞浆病毒工厂有关, 环状结构域则与泛素连接酶发挥作用有关^[12]。当 RING 结构发生改变时, 会导致 E3 酶失活^[13]。连接斑珠蛋白 (junction plakoglobin, JUP), 又叫 γ -catenin, 存在于细胞与细胞间的桥粒和黏着连接处, 介导细胞间的连接^[14-15], 新近研究表明, JUP 可以与泛素连接酶 FBW7 结合导致 JUP 蛋白的泛素化, 从而促进细胞增殖; 同时 JUP 蛋白又作为 β -连环蛋白 (β -catenin) 同源蛋白^[16],

参与 Wnt 通路^[17-21]。经典的 Wnt 通路又被称为 Wnt/ β -catenin 信号通路, Wnt/ β -catenin 一般被认为在细胞生长和迁移、肿瘤形成等方面发挥着重要作用^[22]。有报道显示, Wnt/ β -catenin 信号通路在病毒的复制和天然免疫中发挥重要作用^[23-25]; 该通路被激活后能够影响裂谷热病毒和人巨细胞病毒的复制^[26-27]。然而 Wnt/ β -catenin 信号通路参与调控 LSDV 的作用机制尚且不清楚。本研究首先基于 LSDV 保守基因 ORF077 构建了检测 LSDV 的荧光定量检测方法, 利用其检测 LSDV ORF140 缺失株 (LSDV Δ ORF140) 发现其复制能力有所上升, 之后探究 LSDV ORF140 与 JUP 相互作用对牛乳腺上皮 (MAC-T) 细胞内 Wnt/ β -catenin 通路相关信号分子水平, 最后通过一系列试验方法检测 Wnt/ β -catenin 通路的激活对 LSDV 复制的影响, 以期能为抗 LSDV 治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

非洲绿猴肾细胞 (Vero)、牛乳腺上皮细胞 (MAC-T)、真核表达载体 pcDNA3.1-N-flag (+) 均由本实验室保存, LSDV Δ ORF140 缺失株由本实验室构建并保存, LSDV HONGKONG 株 (GenBank 登录号: MW732649.1) 在中国动物卫生与流行病学中心保存, 总 RNA 抽提试剂盒 FastPure Cell/tissue Total RNA isolation Kit V2、荧光定量试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、ACEQ U⁺ Probe Master Mix、同源重组试剂盒 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司, pClone007 Versatile Simple Vector Kit 购自北京擎科生物科技股份有限公司, Protein A/G 免疫沉淀磁珠购自 selleck 公司, 胎牛血清购自 VivaCell 公司, DMEM 培养基、Opti-MEM 减血清培养基和转染试剂、Lipofectamine 3000 购自 Thermo Fisher 公司, NP-40 裂解液、蛋白酶抑制剂均购自碧云天生物技术公司, HA 兔源多抗购自 Proteintech, Flag 鼠源单抗 (3B9)、

HRP 标记的羊抗鼠 IgG 均购自 Abmart。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中 LSDV ORF140 (GenBank 登录号: NP_150574.1)、LSDV ORF077 (GenBank 登录号: NC_003027.1) 和 JUP (GenBank 登录号: NM_001004024.3) 的基因序列, 采用 SnapGene 分别于上下游设计引物扩增全长。所用的 LSDV ORF140、JUP

PCR 扩增引物、pclone007 反向 PCR 扩增引物 (表 1) 及 β -actin、LSDV ORF077、 β -catenin、Gsk3 β 、DKK1、JUP 荧光定量 PCR (qPCR) 检测引物、LSDV ORF077 探针 (表 2) 及敲低 JUP 的 siRNA-JUP 和用于对照的 siRNA-NC (表 3) 均由北京擎科生物科技股份有限公司提供。

表 1 PCR 扩增目的基因引物序列

引物名称	序列 (5'→3')
LSDV ORF140-F	gccggtaccgagctcgatccATGGATTCTGATATTCCGAAC
LSDV ORF140-R	ggtttaaacgggcccctctagaTTATGGAAAAATCTACTTTTTATAACAATAAG
LSDV ORF077-F	actcaggatcactcgtcttacATGAGAGGATTATTTATAA
LSDV ORF077-R	ttcaggtggactcaagTTATATAGTGTCTCTATTTACTACTATATAATC
JUP-F	gtggctagcctttaaacttacgggtATGGAGGTGATGAACCTG
JUP-R	cactgtgctgatatctgcagaattCTAGGCCAGCATGTG
pclone007-F	CTTGAGTCCACCTGAAGG
pclone007-R	GTAACACGAGTGATCCTGAGT

注: 小写部分表示同源臂, 大写部分表示目的基因扩增引物。

表 2 qPCR 检测引物序列及探针序列

引物名称	寡聚核苷酸序列 (5'→3')
β -actin-F	GATGAGATTGGCATGGCTTTA
β -actin-R	AACCGACTGCTGTCACCTTC
GSK3 β -F	ACAGCAGCCTCAGATGCTAA
GSK3 β -R	TGTTCTGTGTAGCTGGCTG
β -catenin-F	ACTGCTGGGACCTTGACAAA
β -catenin-R	ACTGCTGAACCGAGCATCTTCA
JUP-F	CCTGACGAGCAATAGCCCC
JUP-R	TGCATGTCAGTTGGACAGA
LSDV ORF077-F	CTACATCTATAAAAACAAACGGCTGAAA
LSDV ORF077-R	TAACAGTTGTTGCGATATATGCACTT
LSDV 077 Probe	TGTTGGTCATAGTCCTTC

表 3 siRNA 序列

名称	序列 (5'→3')
JUP siRNA-F	CGGUCUUGUUCUAUGCCAUTT
JUP siRNA-R	AUGGCAUAGAACAAGACCGTT
NC siRNA-F	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
NC siRNA-R	ACGUGACACGUCCGAGAATT

1.3 TaqMan qPCR 检测方法的建立及 LSDV Δ ORF140 毒株复制能力检测

用病毒 DNA 提取试剂盒提取 LSDV 的基因组

DNA, PCR 扩增目的片段 LSDV ORF077, 长度为 991 bp, 反向 PCR 线性化 pclone007 载体, PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 切胶回收, 将 LSDV ORF077 与 pclone007 连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 和酶切鉴定无误后, 送上海生工生物工程公司测序, 后对鉴定正确的阳性重组质粒进行扩大培养, 即得到阳性标准品 pclone007-077。使用分光光度计测定阳性标准质粒的浓度, 计算其拷贝数后分装于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。对引物浓度、探针浓度、退火温度进行优化后, 将标准质粒进行 10 倍梯度稀释, 取 10^{11} 至 10^4 拷贝数/ μ L, 8 个稀释度作为标准品模版, 用优化后的 TaqMan qPCR (实时荧光定量聚合酶链式反应) 体系及反应程序进行检测, 同时设置空白对照, 每个标准品及空白对照均做 3 个平行重复。最后以起始模板拷贝数对数为 X 轴, Ct 值为 Y 轴做回归曲线建立检测 LSDV ORF077 的标准曲线。

将 LSDV Δ ORF140 与 LSDV 野毒株分别接种 80% Vero 细胞的 12 孔细胞培养板, 37 $^{\circ}$ C 5%CO $_2$ 孵育 2 h, 加入 2% 细胞维持液, 于细胞培养箱继续培养。分别在接种病毒后培养 24、48、72、96 和 120 h 时回收病毒液, 检测各个时间段收集得到的病毒液的 TCID $_{50}$ (半数组织细胞感染剂量), 同时用所建立的 qPCR 方法检测病毒拷贝数。

1.4 LSDV Δ ORF140 感染 MAC-T 细胞对 Wnt 信号通路的影响

将 LSDV Δ ORF140 与 LSDV HONGKONG 株以 MOI (感染复数) = 0.1 的剂量感染 MAC-T 细胞, 分别在感染后的 16、20 和 24 h 提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, 利用表 2 中 qPCR 检测引物检测 Wnt 信号通路相关基因的转录水平。

1.5 LSDV ORF140 编码蛋白与宿主细胞互作蛋白的鉴定

PCR 扩增目的片段 LSDV ORF140, 与线性化载体 pcDNA3.1-HA 同源重组合成真核表达质粒 pcDNA3.1-HA-140, 将真核表达质粒 pcDNA3.1-HA-140 转染于 85% 的 293T 细胞, 设置转染 pcDNA3.1-HA 组作为对照, 48 h 后加入 NP-40 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 冰上裂解, 取 10 μ L 作为 Input (阳性对照) 组。将 Protein A/G 免疫沉淀磁珠提前用预冷的细胞裂解液清洗后, 按 1:100 用细胞裂解液稀释 HA 兔源多抗, 加入到磁珠沉淀中, 在旋转仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 8 h, 同时设置 IgG 抗体结合磁珠作为阴性对照。按照 200 μ L 样品加 50 μ L 磁珠悬液, 加入结合了抗体的 proteinA/G 磁珠, 置于旋转仪上 4 $^{\circ}$ C 过夜。磁性分离, 加入预冷的细胞裂解液, 轻轻吹打后磁性分离, 重复此操作 8 次, 加入用 NP-40 (含蛋白酶抑制剂) 细胞裂解液冰上裂解的 MAC-T 细胞置于旋转仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 8 h, 磁性分离, 用预冷的细胞裂解液反复吹洗 8 遍以上, 将磁珠重悬于 50 μ L 细胞裂解液中, 95 $^{\circ}$ C 10min, 送至北京诺禾致源公司进行质谱检测。

对质谱数据进行分析后, 选取靶标基因与真核表达载体 pcDNA3.1-flag 连接, 构建重组真核表达质粒, 待 293T 细胞长至 85% 密度, 将 pcDNA3.1-HA-140 分别与重组真核表达质粒共转染至 293T 细胞, 设置 pcDNA3.1-HA-140 与 pcDNA3.1-flag 共转染为阴性对照组, 48 h 后加入 NP-40 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 冰上裂解。将 Protein A/G 免疫沉淀磁珠提前用预冷的细胞裂解液清洗后, 用预冷的细胞裂解液按 1:100 比例稀释 HA 多抗, 加至磁珠沉淀中, 在旋转仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 8 h。按照 200 μ L 样品加 50 μ L 磁珠悬液, 加入结合有抗体的 proteinA/G 磁珠, 置于旋转仪上 4 $^{\circ}$ C 过夜。磁性分离, 加入预冷的细胞裂解液, 轻轻吹打后磁性分离, 重复此操作 8 次, 将磁珠重悬于 50 μ L 细胞裂解液中, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 进行免疫共沉淀 (Co-IP)。

将细胞裂解液经 SDS-PAGE 后, 蛋白转印至 NC 膜上, 加入 5% 脱脂奶, 于摇床 80 r/min 室温孵育 1.5 h, PBST 洗 3 次, 以 Flag 单抗 (3B9) 作为一

抗, 于摇床 60 r/min, 4 $^{\circ}$ C 孵育 8 h, PBST 洗 3 次, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗进行 Western blot 鉴定。

1.6 JUP 基因转录水平对 Wnt/ β -catenin 通路和 LSDV 复制的影响

待 12 孔板中 MAC-T 细胞汇合度达到 70% 左右, 采用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 pcDNA3.1-flag-JUP 转染至 MAC-T 细胞, 以 pcDNA3.1-flag 作为对照, 同时设置 MOCK (空白细胞) 组。此外, 采用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 JUP siRNA 转染 MAC-T 细胞, 同时以 siRNA-NC 作为对照, 设置空白细胞组, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后提取细胞总 RNA, 检测 JUP 基因转录水平以及 Wnt 信号通路相关基因的转录水平。同时, 在过表达或敲低 JUP 基因表达水平后, 以 MOI=0.1 的 LSDV 感染细胞, 检测 Wnt 信号通路相关基因的转录水平; 提取的总 DNA 利用所建立的 qPCR 方法检测病毒拷贝数。

1.7 数据统计与分析

荧光定量数据均采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量分析, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件作图, 并对所有试验数据进行 *t* 检验或单向方差分析, $P < 0.05$ 表示存在差异, $P < 0.01$ 表示差异显著, $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 表示差异极显著。

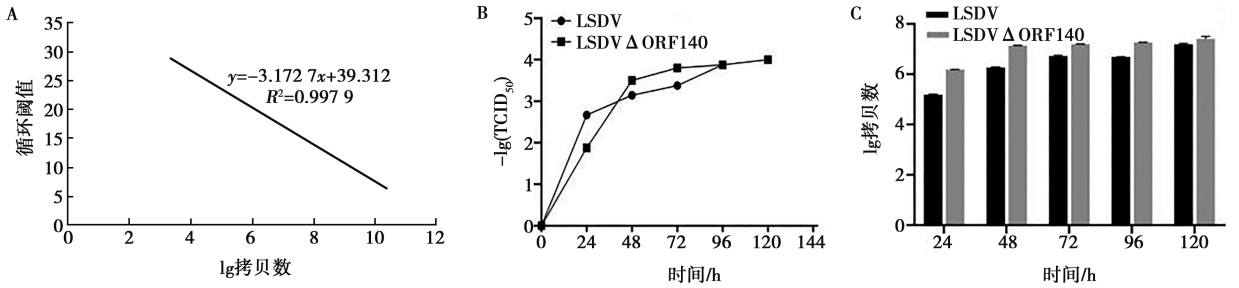
2 结果

2.1 qPCR 检测方法建立及 LSDV Δ ORF140 复制能力检测

重组质粒 pclone007-077 的拷贝数与 Ct 值存在良好的线性关系, 线性方程 $y = -3.1727x + 39.312$, $R^2 = 0.9979$, 扩增效率 (E) = 106% (图 1A)。将 LSDV Δ ORF140 和 LSDV 分别以 MOI = 0.1 感染 Vero 细胞, 缺失株在 24 h 毒价上升缓慢, 在 48 h 后增长速度超过了野生毒, 在 96 h 后增长减缓 (图 1B); 接种病毒后 24~72 h 缺失株的拷贝数是野生株的 8 倍左右 ($P < 0.001$), 接种病毒 96 h 后缺失株的拷贝数是野生株的 3 倍左右 ($P < 0.001$), 接种病毒 120 h 后缺失株的拷贝数是野生株的 1.5 倍左右 ($P > 0.05$) (图 1C)。

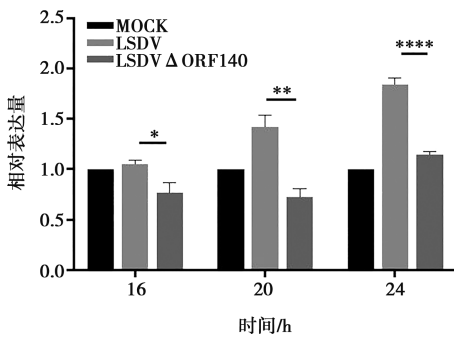
2.2 LSDV Δ ORF140 感染 MAC-T 细胞对 Wnt 信号通路的影响

采用 qPCR 检测 LSDV Δ ORF140 感染 MAC-T 细胞不同时间点 β -catenin 转录水平, 结果显示, 与感染野毒相比, LSDV Δ ORF140 感染细胞后的 16、20 和 24 h, β -catenin 基因转录水平均下调 (图 2)。结果表明 LSDV ORF140 基因缺失后, 可抑制 Wnt/ β -catenin 通路。



A. LSDV qPCR 标准曲线；B. LSDV 与 LSDV ΔORF140 感染 Vero 细胞不同时间点 TCID₅₀ 检测；C. LSDV 与 LSDV ΔORF140 感染 Vero 细胞不同时间点病毒拷贝数检测。

图1 LSDV ΔORF140 复制能力检测



*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ****表示 $P < 0.0001$ 。下同。

图2 LSDV ΔORF140 感染 MAC-T 细胞不同时间点 β-catenin 基因转录水平检测

2.3 鉴定 LSDV ORF140 编码蛋白与宿主细胞互作的蛋白

将质谱分析的结果利用网站 <https://cn.string-db>。

org/和软件 Cytoscape 对结果进行分析,得到关于与 LSDV ORF140 编码蛋白互作的宿主细胞蛋白的蛋白网络(图3)。选取蛋白网络中分数较高的12个蛋白,构建真核表达质粒,利用 Co-IP 验证。以 Flag 标签鼠抗作为一抗,Western blot 检测到大小为 80 kDa 带 Flag 标签的 JUP 蛋白,与 pcDNA3.1-Flag-JUP 转染细胞裂解得到的条带大小一致,转染 pcDNA3.1-Flag 组未检测到相应大小蛋白,pcDNA3.1-Flag-JUP 与 pcDNA3.1-HA-140 共转染后收获的细胞裂解液内存在带有 Flag 标签的 70 kDa 左右大小的杂蛋白,经免疫共沉淀后可被洗脱,不与 140 蛋白结合(图4A)。以 HA 标签鼠抗作为一抗,Western blot 检测到大小为 30 kDa 带 HA 标签的 140 蛋白,转染 pcDNA3.1-HA-140 组未检测到相应大小的蛋白(图4B),表明只有 JUP 蛋白与 140 蛋白存在互作。

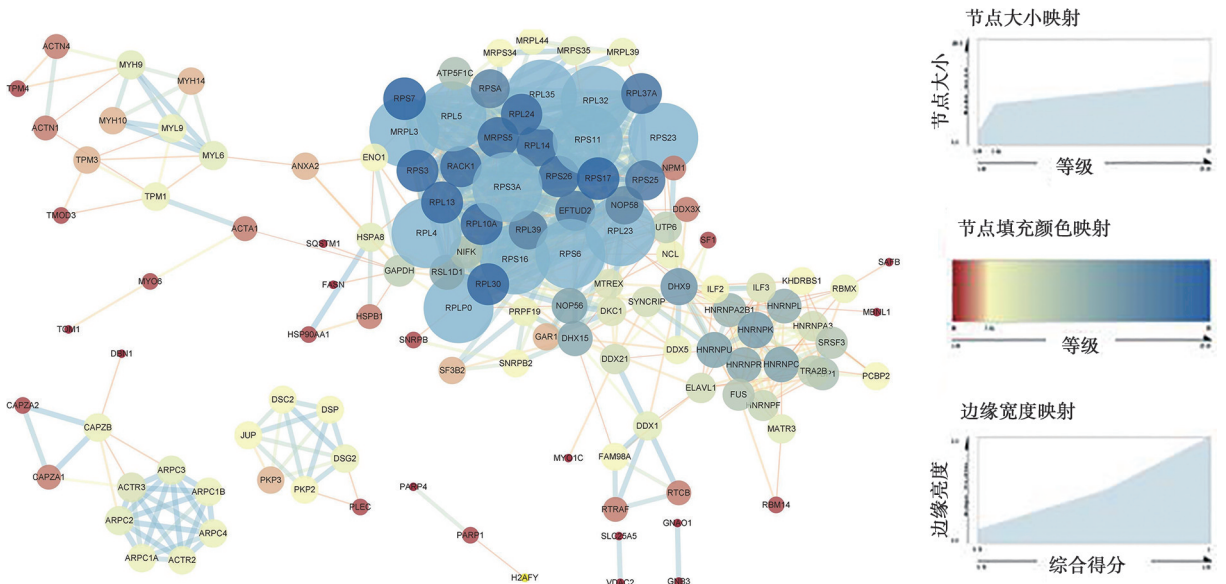
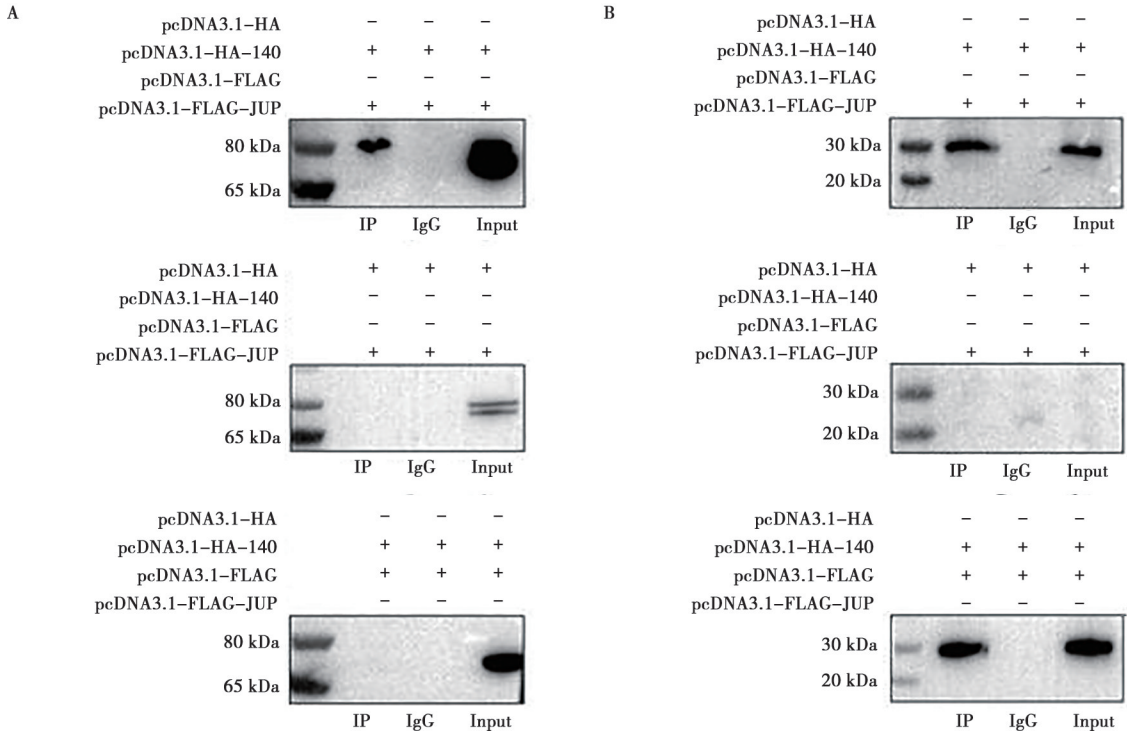


图3 LSDV 140 蛋白与宿主细胞互作的蛋白网络



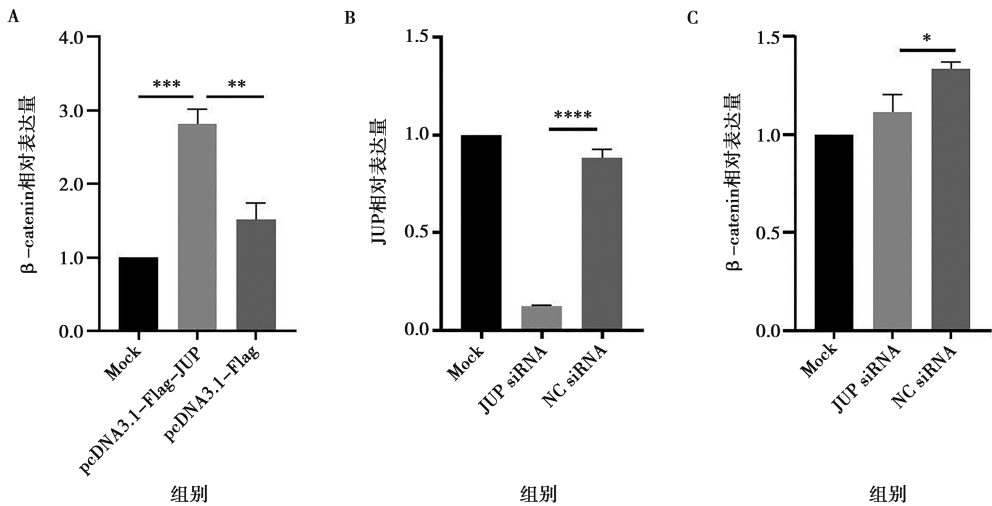
A. 以 Flag 标签鼠抗作为一抗的 Western blot 检测结果；B. 以 HA 标签鼠抗作为一抗的 Western blot 检测。

图 4 LSDV 140 蛋白与宿主细胞互作的蛋白的验证

2.4 宿主细胞 JUP 基因转录水平对 Wnt/ β -catenin 通路的影响

MAC-T 细胞转染 pcDNA3.1-Flag-JUP 后经 qPCR 检测各细胞因子转录水平，结果显示，与转染 pcDNA3.1-Flag 的细胞相比， β -catenin 基因转录水平上调（图 5A），表明过表达 JUP 后，Wnt/ β -

catenin 通路被激活。转染 JUP siRNA 后经 qPCR 检测敲低效率以及 β -catenin 基因转录水平，结果显示与转染 NC siRNA 的细胞相比，JUP 基因表达水平明显下调（图 5B）， β -catenin 基因转录水平下调（图 5C），表明敲低 JUP 后，Wnt/ β -catenin 通路被抑制。



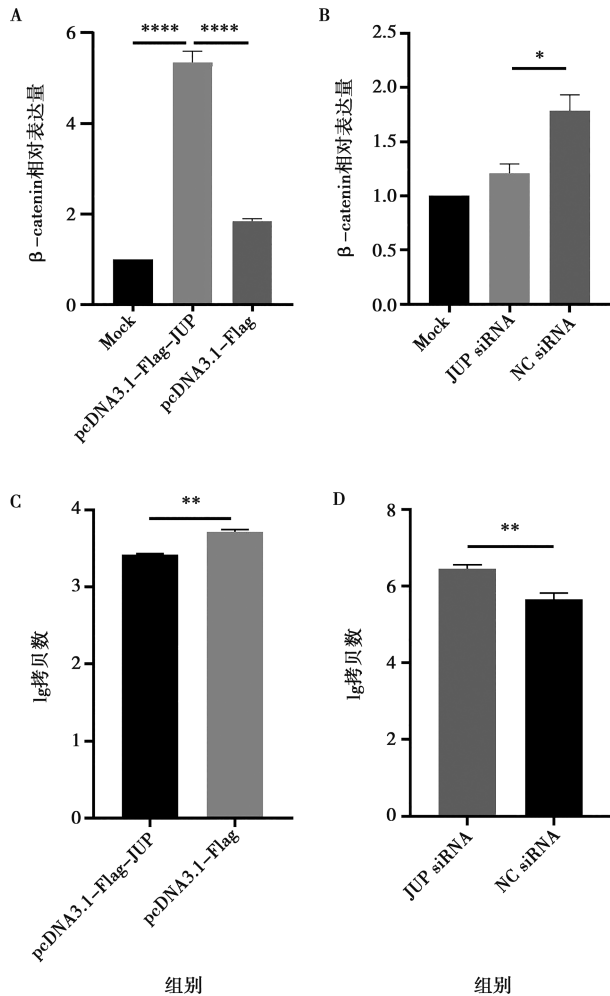
*** 表示 $P < 0.001$ 。

图 5 宿主细胞 JUP 基因转录水平对 Wnt/ β -catenin 通路的影响

2.5 过表达或敲低 JUP 基因的宿主细胞感染 LSDV 后 Wnt/ β -catenin 通路和 LSDV 复制能力的变化

过表达 JUP 24 h 后, 感染 LSDV 野毒 24 h 收集的细胞经 qPCR 检测, β -catenin 基因转录水平上调 (图 6A); 病毒拷贝数相比转染 pcDNA3.1-Flag 后接毒组降低 (图 6B)。

转染 JUP siRNA 24 h 后, 感染 LSDV 野毒 24 h 收集的细胞经 qPCR 检测, β -catenin 基因转录水平处于下调状态 (图 6C); 病毒拷贝数相比转染 NC siRNA 后接毒组升高 (图 6D)。



A: 过表达 JUP 后接 LSDV 上调 β -catenin mRNA 表达; B: 敲低 JUP 后接 LSDV 抑制 β -catenin mRNA; C: 过表达 JUP 抑制 LSDV 复制; D: 敲低 JUP 增强 LSDV 复制。

图 6 过表达、敲低 JUP 基因转录水平后感染 LSDV 对 Wnt/ β -catenin 通路活性和 LSDV 复制影响

3 讨论

病毒感染宿主细胞是一个复杂的过程, 涉及病毒与宿主细胞之间的相互作用。病毒依赖于宿主细胞完成自身的复制和传播, 同时也会引发宿主细胞的免疫

反应和应激反应。

Wnt/ β -catenin 信号通路主要通过关键信号分子 β -catenin 来调节细胞功能, 介导信号的传递^[28]。Wnt 途径是多种病毒的靶标^[29-31], 病毒感染可以对经典 Wnt 信号通路产生影响。研究表明, 丙型肝炎病毒的 NS5A 蛋白可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路^[32]。利用前期构建的 LSDV ORF140 缺失株进行试验, 荧光定量 PCR 的结果显示宿主细胞中的 β -catenin 基因表达水平明显下调。这一发现表明, 在 ORF140 基因缺失后, 宿主细胞的 Wnt/ β -catenin 信号通路受到了抑制。因此我们推测 LSDV 感染宿主细胞后, ORF140 基因可以激活宿主细胞的 Wnt/ β -catenin 信号通路。结合蛋白质谱技术分析和免疫共沉淀试验确认了 140 蛋白与宿主细胞的 JUP 蛋白之间存在互作, 这一互作可能是 ORF140 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路的途径之一。mRNA 水平上检测表明, 过表达 JUP 会引起 β -catenin 基因表达水平的上调, 而敲低 JUP 则会引起 β -catenin 基因表达水平下调。感染 LSDV 后, 由于敲低 JUP 引起的 β -catenin 基因表达水平下调状态没有显著变化, 因此推测 LSDV ORF140 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路依赖 JUP 蛋白。

在病毒感染期间, 宿主细胞会通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路进而影响病毒的复制。对于不同的病毒而言, Wnt/ β -catenin 信号通路对病毒复制的影响不尽相同。研究表明, 在甲型流感病毒感染期间, 使用 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂会促进病毒复制^[33]。而在人类免疫缺陷病毒的增殖复制过程中, Wnt/ β -catenin 信号通路的激活对病毒的复制起促进作用^[34]。最近研究表明, 使用 Wnt 抑制剂可以阻断人类巨细胞病毒的复制^[31]。本研究通过建立的 TaqMan qPCR 检测方法检测到缺失 ORF140 基因 24 h 后, LSDV 缺失株拷贝数是野毒株的 8 倍以上。进一步研究表明, 敲低 JUP 表达水平后感染 LSDV, 病毒复制能力比未敲低 JUP 表达水平感染 LSDV 组有所提高, 推测 Wnt/ β -catenin 信号通路能够抑制 LSDV 在 MAC-T 细胞的复制。

综上, 本研究揭示了 LSDV ORF140 蛋白可能通过与 JUP 互作来激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 从而影响病毒的复制和传播。这一发现为深入探究病毒与宿主细胞相互作用的分子机制提供了重要线索, 也为未来开发相关治疗策略提供了新思路。

参考文献:

[1] 史红, 唐万勇. 牛结节性皮肤病综述 [J]. 北方牧业, 2020

- (19): 23–25.
- [2] OCHWO S, VANDERWAAL K, MUNSEY A, et al. Seroprevalence and risk factors for lumpy skin disease virus seropositivity in cattle in Uganda [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15 (1): 236.
- [3] SPRYGIN A, VAN SCHALKWYK A, SHUMILOVA I, et al. Full-length genome characterization of a novel recombinant vaccine-like lumpy skin disease virus strain detected during the climatic winter in Russia, 2019 [J]. *Arch Virol*, 2020, 165 (11): 2675–2677.
- [4] TULMAN E R, AFONSO C L, LU Z, et al. Genome of lumpy skin disease virus [J]. *J Virol*, 2001, 75 (15): 7122–7130.
- [5] 翟頌, 黄敏霞, 吕殿红, 等. 牛结节性皮肤病病毒基因组学研究进展 [J]. *广东农业科学*, 2022, 49 (7): 97–104.
- [6] LU G, XIE J, LUO J, et al. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68 (2): 216–219.
- [7] TRAN H T T, TRUONG A D, DANG A K, et al. Lumpy skin disease outbreaks in vietnam, 2020 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68 (3): 977–980.
- [8] 李晓琳, 赵研, 刘志昌. 牛结节性皮肤病概述 [J]. *北方牧业*, 2022 (6): 30.
- [9] TAN J, LIU Y, LI W, et al. Lumpy skin disease virus infection activates autophagy and endoplasmic reticulum stress-related cell apoptosis in primary bovine embryonic fibroblast cells [J]. *Microorganisms*, 2023, 11 (8): 1883.
- [10] SENKEVICH T G, WOLFFE E J, BULLER R M. Ectromelia virus RING finger protein is localized in virus factories and is required for virus replication in macrophages [J]. *J Virol*, 1995, 69 (7): 4103–4111.
- [11] NERENBERG B T H, TAYLOR J, BARTEE E, et al. The poxviral RING protein p28 is a ubiquitin ligase that targets ubiquitin to viral replication factories [J]. *J Virol*, 2005, 79 (1): 597–601.
- [12] MOTTET K, BAREISS B, MILNE C D, et al. The poxvirus encoded ubiquitin ligase, p28, is regulated by proteasomal degradation and autoubiquitination [J]. *Virology*, 2014, 468/470: 363–378.
- [13] HUANG J, HUANG Q, ZHOU X, et al. The poxvirus p28 virulence factor is an E3 ubiquitin ligase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (52): 54110–54116.
- [14] NELSON W J. Regulation of cell–cell adhesion by the cadherin–catenin complex [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36 (Pt 2): 149–155.
- [15] ABERLE H, BIERKAMP C, TORCHARD D, et al. The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozygosity in breast and ovarian cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92 (14): 6384–6388.
- [16] WICKLINE E D, DU Y, STOLZ D B, et al. γ -Catenin at adherens junctions: mechanism and biologic implications in hepatocellular cancer after β -catenin knockdown [J]. *Neoplasia*, 2013, 15 (4): 421–434.
- [17] VISHAL S S, TILWANI S, DALAL S N. Plakoglobin localization to the cell border restores desmosome function in cells lacking 14–3–3 γ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495 (2): 1998–2003.
- [18] KOBAYASHI W, OZAWA M. The epithelial–mesenchymal transition induced by transcription factor LEF–1 is independent of β -catenin [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2018, 15: 13–18.
- [19] PIVEN O O, WINATA C L. The canonical way to make a heart: β -catenin and plakoglobin in heart development and remodeling [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242 (18): 1735–1745.
- [20] MORGAN R G, PEARN L, LIDDIARD K, et al. γ -Catenin is overexpressed in acute myeloid leukemia and promotes the stabilization and nuclear localization of β -catenin [J]. *Leukemia*, 2013, 27 (2): 336–343.
- [21] HÜTZ K, ZEILER J, SACHS L, et al. Loss of desmoglein 2 promotes tumorigenic behavior in pancreatic cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56 (8): 1884–1895.
- [22] YIM J H, BAEK J H, LEE C W, et al. Identification of HDAC4 as a target of γ -catenin that regulates the oncogenic K–Ras-mediated malignant phenotype of Rat2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436 (3): 436–442.
- [23] ZHU X, WEN L, SHENG S, et al. Porcine circovirus-like virus P1 inhibits Wnt signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 390.
- [24] DUCHARTRE Y, KIM Y M, KAHN M. The Wnt signaling pathway in cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 99: 141–149.
- [25] ZHAO H, MING T, TANG S, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21 (1): 144.
- [26] ANGELOVA M, ZWEZDARYK K, FERRIS M, et al. Human cytomegalovirus infection dysregulates the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8 (10): e1002959.
- [27] MARCATO V, LURON L, LAQUEUVRE L M, et al. β -Catenin upregulates the constitutive and virus-induced transcriptional capacity of the interferon beta promoter through T-Cell factor binding sites [J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36 (1): 13–29.
- [28] WANG Z, LI Z, JI H. Direct targeting of β -catenin in the Wnt signaling pathway: current progress and perspectives [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41 (4): 2109–2129.
- [29] CHA M Y, KIM C M, PARK Y M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/ β -catenin signaling in hepatoma cells [J]. *Hepatology*, 2004, 39 (6): 1683–1693.
- [30] HSIEH A, KIM H S, LIM S O, et al. Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Cancer Lett*, 2011, 300 (2): 162–172.
- [31] KAPOOR A, HE R, VENKATADRI R, et al. Wnt modulating agents inhibit human cytomegalovirus replication [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (6): 2761–2767.
- [32] DEBEBE A, MEDINA V, CHEN C Y, et al. Wnt/ β -catenin activation and macrophage induction during liver cancer development following steatosis [J]. *Oncogene*, 2017, 36 (43): 6020–6029.
- [33] HILLESHEIM A, NORDHOFF C, BOERGELING Y, et al. β -catenin promotes the type I IFN synthesis and the IFN-dependent signaling response but is suppressed by influenza A virus-induced RIG-I/NF- κ B signaling [J]. *Cell Commun Signal*, 2014, 12: 29.
- [34] AL-HARTHI L. Interplay between Wnt/ β -catenin signaling and HIV: virologic and biologic consequences in the CNS [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7 (4): 731–739.