



康磊,刘珂,王建忠,等. PRRSV *Nsp4* 基因突变株对  $\beta$ 2M 表达的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):507-514.

KANG Lei, LIU Ke, WANG Jianzhong, et al. Effect of PRRSV *Nsp4* gene mutant strains on the expression of  $\beta$ 2M[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(3): 507-514.

## PRRSV *Nsp4* 基因突变株对 $\beta$ 2M 表达的影响

康磊<sup>1,2</sup>, 刘珂<sup>2</sup>, 王建忠<sup>3</sup>, 尹才<sup>4</sup>, 邱亚峰<sup>2</sup>, 魏建超<sup>2</sup>,  
李蓓蓓<sup>2</sup>, 邵东华<sup>2</sup>, 李宗杰<sup>2</sup>, 栗硕<sup>1\*</sup>, 马志永<sup>2\*</sup>

(1.南京农业大学动物医学院免疫学研究所/教育部动物卫生与食品安全国际联合研究实验室/  
江苏省动物免疫学工程实验室,江苏 南京 210095;2.中国农业科学院上海兽医研究所,上海 200241;  
3.苏州市相城区农业技术综合服务中心,江苏 苏州 215131;4.宁夏回族自治区动物疾病预防控制中心,宁夏 银川 750011)

**摘要:** [目的] 本试验旨在探究猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) *Nsp4* 基因是否在抑制细胞  $\beta$ 2M 表达方面发挥关键性作用,以进一步研究 PRRSV 对抗原递呈的免疫抑制机制。[方法] 建立 PRRSV 的反向遗传平台并成功拯救出 PRRSV 野生毒株 SH2020。根据之前对 *Nsp4* 基因不同结构域的研究以及氨基酸位点功能预测,在其 Domain II 和 Domain III 分别筛选出 3 个和 5 个不同的氨基酸位点,并在病毒感染性克隆质粒上对这些位点进行不同的氨基酸替换突变,再将构建好的感染性克隆质粒转染 Marc-145 细胞以拯救各个 *Nsp4* 突变 PRRSV 病毒,将拯救的 PRRSV 病毒以 MOI=0.02 感染 PAM 细胞,并通过 RT-qPCR 和 Western blot 验证 PRRSV *Nsp4* 基因是否能够在 PAM 细胞  $\beta$ 2M 表达方面发挥作用。[结果] 成功拯救出 PRRSV D2-5(*Nsp4-A80L*) 突变毒株,并且在 Marc-145 细胞上的生长动力学特性与野生毒株 SH2020 相似;而 *Nsp4* 基因其余位点突变则会导致 PRRSV 生长受到显著抑制从而无法进行试验。Western blot 和 RT-qPCR 试验结果证实 PRRSV D2-5 毒株能够显著促进  $\beta$ 2M 在 Marc-145 和 PAM 细胞的表达,而野生毒株 SH2020 则表现出了对  $\beta$ 2M 表达的抑制作用。[结论] *Nsp4* 基因在 PRRSV 抑制细胞  $\beta$ 2M 表达方面发挥重要作用,并且 *Nsp4-A80L* 突变能够显著促进  $\beta$ 2M 的表达。

**关键词:** PRRSV; *Nsp4*;  $\beta$ 2M; 反向遗传平台; 突变毒株

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)03-0507-08

## Effect of PRRSV *Nsp4* gene mutant strains on the expression of $\beta$ 2M

KANG Lei<sup>1,2</sup>, LIU Ke<sup>2</sup>, WANG Jianzhong<sup>3</sup>, YIN Cai<sup>4</sup>, QIU Yafeng<sup>2</sup>, WEI Jianchao<sup>2</sup>,  
LI Beibei<sup>2</sup>, SHAO Donghua<sup>2</sup>, LI Zongjie<sup>2</sup>, SU Shuo<sup>1\*</sup>, MA Zhiyong<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Immunology of College of Veterinary Medicine/International Joint Collaborative Research Laboratory for Animal Health & Food Safety, Ministry of Education/Jiangsu Engineering Laboratory of Animal Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 200241, China; 3. Suzhou Xiangcheng Agricultural Technology Integrated Service Center, Suzhou 215131, China; 4. Ningxia Animal Disease Prevention and Control Center, Yinchuan 750011, China)

**Abstract:** [Objectives] This study was conducted to investigate whether porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *Nsp4* gene played a key role in the inhibition of  $\beta$ 2M expression, which laid a foundation for further study of the immunosuppressive mechanism of PRRSV on antigen presentation. [Methods] In this experiment, the reverse genetic platform of PRRSV was established, and the wild PRRSV strain SH2020 was successfully saved. Based on the previous research on different domains of *Nsp4* gene and the prediction of amino acid site function, three and five different amino acid sites in the Domain II and Domain III of *Nsp4* gene were screened, and different amino acid substitution mutations were performed on viral infectious cloning plasmids. The constructed infectious clone plasmids were then transfected into Marc-145 cells to rescue *Nsp4* mutant PRRSV viruses. The rescued PRRSV virus was used to infect PAM cells at a MOI of 0.02, and RT-qPCR and Western blot were used to verify whether PRRSV *Nsp4* gene could play a role in the expression of  $\beta$ 2M in PAM cells. [Results] The mutant strain D2-5 (*Nsp4-A80L*) was rescued successfully, the character of growth kinetics of which was similar to that of wild strain SH2020; but other mutant sites of *Nsp4* gene led the restriction to the replication of the PRRSV which was not accessible to the experiment assay. It was verified that D2-5 strain could enhance the expression of the  $\beta$ 2M on the Marc-145 and PAM through the Western blot and RT-qPCR while the wild strain SH2020 presented the inhibition to the  $\beta$ 2M. [Conclusions] *Nsp4* gene plays an important role in inhibiting the expression of  $\beta$ 2M molecule in PRRSV cells, and *Nsp4-A80L*

收稿日期: 2023-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972693, 32273024); 上海市科技重大专项 (ZD2021CY001); 农业科技创新计划项目 (CAAS-ZDRW202203)

\* 通信作者: 栗硕, 教授, 主要从事公共卫生、病毒学、病毒流行病学、生物信息学研究, E-mail: shuosu@njau.edu.cn; 马志永, 研究员, 主要从事乙型脑炎等人畜共患病和猪呼吸道传染病研究, E-mail: zhiyongma@shvri.ac.cn。

mutation can significantly promote the expression of  $\beta$ 2M.

**Keywords:** PRRSV; *Nsp4*;  $\beta$ 2M; reverse genetic platform; mutation strains

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是危害养猪业的重要疾病之一, 临床症状主要是妊娠母猪流产、早产、产死胎和木乃伊胎以及各阶段育肥猪的呼吸系统疾病<sup>[1]</sup>, 造成的经济损失巨大<sup>[2]</sup>。其病原 PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 最显著的特征是容易发生基因重组<sup>[3-5]</sup>, 并且能够引起猪体的免疫抑制<sup>[6-7]</sup>, 从而导致该病毒能够长久存在猪体内, 并且造成其他病原的继发感染, 最终加剧了 PRRSV 对猪体的危害<sup>[8-10]</sup>。

目前对该病防控的一大挑战是临床上 PRRSV 感染康复猪会持续向外排毒而造成猪群不断感染。已有研究表明, HP-PRRSV 会对抗原递呈分子的表达进行抑制, 比如 SLA-I 或者  $\beta$ 2M 分子<sup>[11-13]</sup>; 细胞对 PRRSV 抗原递呈效率的降低, 最终使得对 CTL 细胞的活化受到抑制。细胞免疫抑制导致了胞内感染的 PRRSV 不能有效被清除, 从而导致 PRRSV 可以在细胞内持续存在。这种原因被推测是健康猪持续向外排毒的关键因素。但目前这些研究结果只是在质粒上被证实, 在病毒上的效果如何并未被试验证实。

SLA-I 又称猪主要组织相容性复合体 I 类 (MHC-I) 抗原, 由重链 SLA-I (SLA-I HC) 和轻链  $\beta$ 2-微球蛋白 ( $\beta$ 2M) 组成异源二聚体<sup>[14]</sup>。通常 SLA-I 异二聚体首先在内质网 (ER) 形成, 然后被蛋白酶体消化的抗原肽通过 TAP (与抗原加工相关的转运体) 转化至内质网, 与 SLA-I 异源二聚体结合, 形成异源三聚体 SLA-I 复合物并在细胞表面展示<sup>[15]</sup>。这种异三聚体 SLA-I 复合物可以激活 CTL 细胞。由于  $\beta$ 2M 在细胞免疫中发挥的关键作用, PRRSV 和其他一些病原亦进化出上述提到的相关免疫逃逸机制, 并造成机体的持续隐性带毒感染<sup>[16-17]</sup>。

本实验室已经在质粒水平上证实了 *Nsp4* 基因能够抑制  $\beta$ 2M 的表达<sup>[13]</sup>, 因此, 在病毒水平上进一步证实 *Nsp4* 基因是否在抑制  $\beta$ 2M 表达方面发挥关键作用显得尤为重要。本研究通过建立 PRRSV 反向遗传平台来获得 HP-PRRSV 亲本毒株 SH2020, 通过构建 *Nsp4* 各种突变毒株来验证对  $\beta$ 2M 的作用, 以筛选出在抑制  $\beta$ 2M 表达方面发挥关键作用的关键氨基酸位点, 为 PRRS 的防治提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 细胞和病毒** Marc-145 细胞 (非洲绿猴肾上皮细胞) 及高致病性 PRRSV 毒株 SH2020 均由本实验室提供。PAM (猪肺泡巨噬细胞) 由本实验室分离保存。相关突变毒株由本实验室构建并拯救。

**1.1.2 主要试剂与仪器** DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 购自 Biological Industries, Israel; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Biological Industries; PRRSV N 和 *Nsp4* 多抗由本实验室制备并保存; 细胞转染试剂为 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche); 猪  $\beta$ 2M 单抗和 Alexa Fluor 488-标记山羊抗鼠 IgG 购自赛默飞; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega; TRIzol 试剂购自 Invitrogen; RNA 反转录酶 HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 购自 Vazyme Biotech Co.; 荧光定量 PCR 酶购自诺唯赞; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒均购自天根生化科技有限公司; 限制性内切酶购自 New England Biolabs; 荧光定量仪购自 Bio-rad 公司; 恒温二氧化碳无菌细胞培养箱购自赛默飞。

### 1.2 方法

**1.2.1 PRRSV 感染性克隆质粒的构建** 1) pACYC-177 质粒的改造: 首先将 CMV 启动子通过同源重组方法插入 pACYC-177 质粒上, 再将人工合成的填充片段 (stuffer fragment, 包含 *Not I*、*Srf I*、*Pst I*、*Pme I*、*Acl I*、*Asc I*、*SgrA I*、*Bgl I* 内切酶位点) 通过同源重组的方法插入人巨细胞病毒启动子 (Cytomegalovirus, CMV) 序列之后; 构建了 pACYC-177 改造质粒, 命名为 p177。

2) PRRSV SH2020 感染性克隆质粒的构建。将 SH2020 全序列预先分成 4 段, 然后通过 PCR 分别对每个片段进行扩增。获得每个片段后, 分别使用 *Not I*/*Pst I*、*Pst I*/*Acl I*、*Acl I*/*Asc I*、*Asc I*/*SgrA I* 对 4 个 PCR 扩增片段进行酶切, 然后将 4 个酶切片段分别插入改造的 p177 质粒上, 再对插入的片段分别进行验证并测序。将构建正确的质粒命名为 pSH2020<sup>[18-19]</sup>。

**1.2.2 PRRSV SH2020 株的拯救** 将构建好的感染性克隆质粒 pSH2020 与转染试剂按体积比 3:1 预先

混合,然后滴加至预先铺好的6孔板中,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养48h后收集病毒培养液;传至第3代后进行免疫荧光检测(IFA)验证。先将N多抗以体积比1:400进行稀释,然后37℃孵育PRRSV SH2020株感染的Marc-145细胞1.5h,再加Alexa Fluor 488标记的山羊抗鼠IgG二抗孵育1h,用倒置显微镜观察。

**1.2.3  $\beta$ 2M与N基因荧光定量检测** 用TRIzol收集细胞后提取总RNA,再依据HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)进行RNA反转录。以cDNA为模板,依据Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix说明书进行qPCR。反应体系:2×Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L,模板2  $\mu$ L,引物对(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)各0.4  $\mu$ L,RNase-free water 7.2  $\mu$ L。反应程序:95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40个循环;95℃ 1 min,58℃ 30 s,95℃ 30 s。同时设定阴性对照,获得C<sub>T</sub>值。采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup>法计算目的基因mRNA的表达水平。所有处理组均重复检测3次。引物详见表1。

**1.2.4  $\beta$ 2M与N蛋白表达量检测** 使用RIPA裂解液(含有蛋白酶抑制剂)提取细胞总蛋白,再采用BCA法对收取的蛋白进行浓度测定。根据BCA测定结果将各组蛋白浓度调整一致。加入5×上样缓冲液混匀后煮沸10 min,用150 g·L<sup>-1</sup>聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白样品,再转印到硝酸纤维素膜上。进行牛奶封闭、孵育PRRSV N蛋白多克隆抗体(1:400)或者 $\beta$ 2M单抗,再用孵育辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(1:5 000)等步骤检测目标蛋白。

**1.2.5 突变毒株与亲本毒株生长动力曲线比较** 参照之前报道的方法<sup>[20]</sup>,分别将拯救的PRRSV *Nsp4*-A80L突变毒株D2-5和SH2020野生毒株以MOI=0.01感染Marc-145细胞,以进行生长速率比较。在不同时间点收集细胞上清液后保存于-80℃,测TCID<sub>50</sub>。

表1 荧光定量PCR引物

Table 1 Primers for qPCR

基因 Gene	引物名称 Prime name	引物对序列 Primer sequences(5'→3')	片段长/bp Fragment length
$\beta$ 2M(pig)(F14868)	$\beta$ 2M-F/R	ccccaagggtcagggttactcaag/actgctccgcgttcattctc	140
GAPDH(pig)(NM_001206359)	GAPDH-F/R	cagggtctctttaaactctggca/ccgtgggtggaatcatactggaaca	105
$\beta$ 2M(monkey)(NC_022278)	$\beta$ 2M-F/R	ctcaagccatccaccagagaatg/caagctggaatgctccattttccc	133
GAPDH(monkey)(NW_023666063)	GAPDH-F/R	cttcaacagcgacaccctc/caccctgttctgttagccaaattc	118
N(SH2020)(OP852569)	N-F/R	caatcagctgtgcaaatgctgg/gacgtcatcttcagtcgctagagg	133

## 2 结果与分析

### 2.1 pACYC-177质粒的改造

为了使PRRSV的基因序列插入到pACYC-177质粒上,对其进行了改造(图1-A)。将CMV启动子引入质粒上,对插入的CMV片段进行PCR扩增验证并测序。片段长度为850 bp,测序结果亦符合预期(图1-B)将人工合成的填充片段(stuffer fragment)多克隆位点插入CMV启动子,电泳验证PCR扩增产物为220 bp左右,条带大小符合预期并且测序结果正确。上述结果证实成功得到了目标质粒p177。

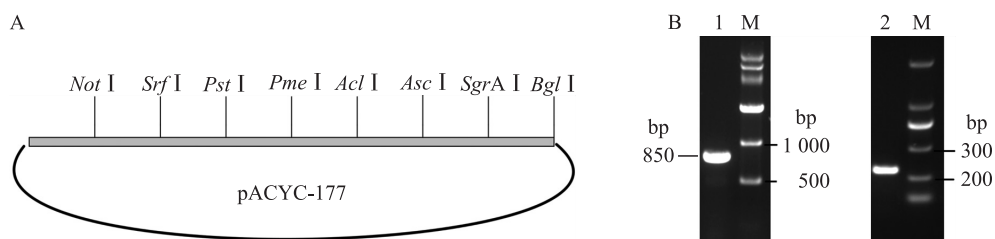


图1 pACYC-177质粒引入CMV和填充片段

Fig. 1 The CMV and stuffer fragment are inserted into pACYC-177 plasmid

A.pACYC177质粒改造模式图 Diagram of the pACYC177 plasmid modification pattern;B.CMV片段和填充片段的PCR扩增电泳验证 CMV fragment and stuffer fragment are verified by PCR amplification and electrophoresis.  
M. DNA marker;1. CMV片段 CMV fragment;2. 填充片段 Stuffer fragment.

### 2.2 PRRSV SH2020株基因全序列的扩增

为了获得PRRSV SH2020株的全长序列,将其全长序列分成4段(图2-A),每个片段大小分别约为5.0、5.2、1.8和3.5 kb。对PCR扩增的片段进行电泳验证并测序,结果显示各个片段大小符合预期并且测序结果正确(图2-B)。

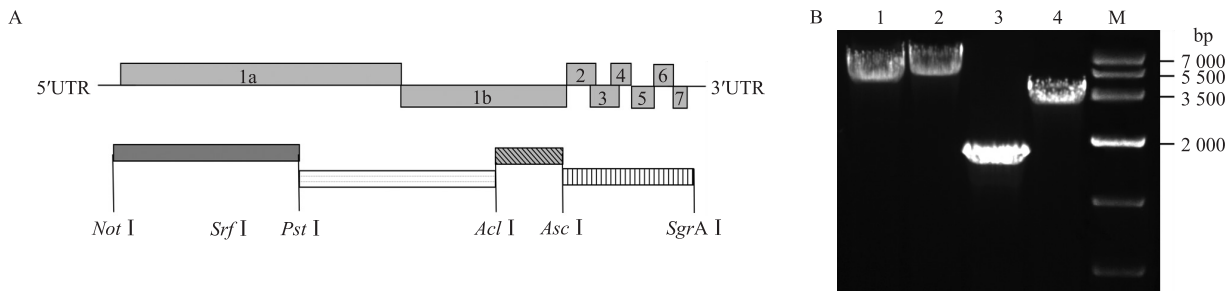


图 2 PRRSV SH2020 株基因全序列结构(A)和电泳验证(B)

Fig. 2 Schematic(A) and electrophoretogram verification(B) of the whole sequence of the PRRSV SH2020 strain

2.3 pSH2020 感染性克隆的获得

为了得到 PRRSV SH2020 毒株的感染性克隆质粒(图 3-A),将 PCR 扩增得到的 4 个片段分别采用酶切连接的方式逐一插入 p177 质粒。将全长序列用预期设计好的 *Not* I 和 *Sgr* A I 对感染性克隆质粒进行双酶切验证,对切下来的 PRRSV SH2020 全序列进行电泳验证,其结果为 15 kb 左右,大小符合预期。对构建好的感染性克隆进行测序验证,其序列与扩增片段序列一致(图 3-B)。此结果证明成功得到 pSH2020 感染性克隆质粒。

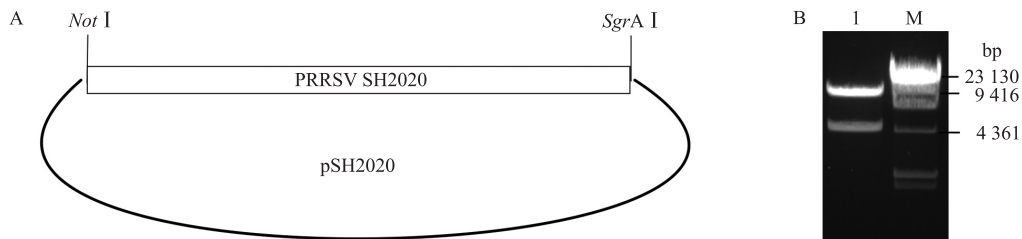


图 3 SH2020 全长序列插入 p177 质粒构成 pSH2020 感染性克隆质粒

Fig. 3 The pSH2020 infection clone plasmid is constructed by the insertion of SH2020 sequence into the p177 plasmid

A. pSH2020 感染性克隆质粒模式图 Schematic diagram of the pSH2020 infectious clone plasmid; B. *Not* I 和 *Sgr* A I 双酶切 pSH2020 质粒电泳验证 The fragment of *Not* I and *Sgr* A I double digestion of the pSH2020 plasmid is verified by electrophoresis.

2.4 PRSSV SH2020 毒株的拯救与鉴定

为了拯救出病毒,将无内毒素大提的感染性克隆质粒 pSH2020 与转染试剂 X-tremeGENE HP DNA 按 3:1 比例混合,加入至提前 24 h 培养铺好 Marc-145 细胞的 6 孔板中,72 h 后收集病毒培养液。传至第 3 代,48 h 后可出现明显的病变。使用本次试验制备的 N 蛋白多抗对拯救的 SH2020 病毒进行免疫荧光检测,可以看到阳性组有很明显的荧光,而阴性对照组没有绿色荧光(图 4-A)。对 SH2020 感染的细胞进行 Western blot 检测,依然能够在 SH2020 阳性对照组看到 N 蛋白条带(图 4-B)。此结果证实,利用构建的感染性克隆质粒 pSH2020 成功拯救出 SH2020 病毒。

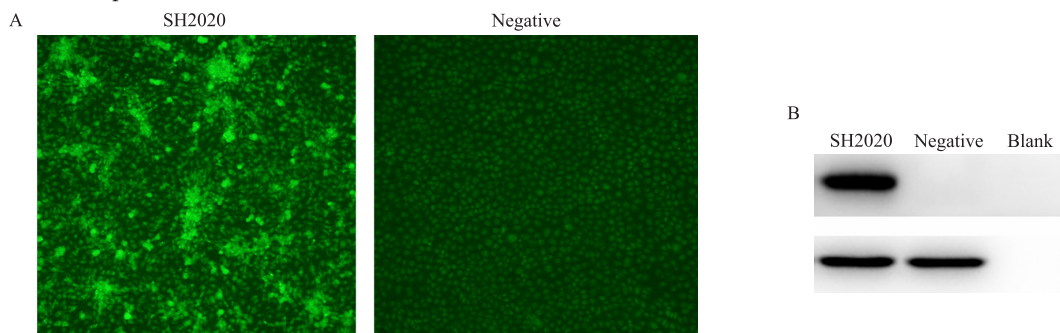


图 4 SH2020 感染性克隆质粒转染 Marc-145 细胞并进行免疫荧光检测和 Western blot(WB)验证

Fig. 4 SH2020 infection clone plasmid is transfected into Marc-145 cell and verified by indirect immunofluorescence assay(IFA) and Western blot(WB)

A. 拯救的 PRRSV SH2020 毒株进行 IFA 试验 The rescued PRRSV SH2020 strains tested for IFA; B. 对拯救的 PRRSV SH2020 株的 N 蛋白进行 WB 检测 The N protein of the rescued PRRSV SH2020 strain is tested by WB assay.

### 2.5 *Nsp4* 基因中抑制 $\beta$ 2M 表达的氨基酸位点筛选

为了在 *Nsp4* 基因中筛选到抑制  $\beta$ 2M 表达的关键氨基酸位点,在 Domain II (结构域 II) 和 Domain III 分别选择 3 个(图 5-A)和 5 个(图 5-B)氨基酸位点,用不同的氨基酸进行替换突变。选择这 8 个位点进行突变的主要原因:第一,Domain II 中的 K138 和 Q139 位点为推测的 S1 pocket 氧负离子洞中 3 个氨基酸中的第 3 个残基,其主要功能为直接催化底物的氧化反应;第二,A80 位点为 PRRSV 不同毒株之间的差异位点,并且与 *Nsp4* 的酶活性中心形成的催化三聚体在空间上都位于 Domain II 和 Domain III 交界处,因此推测 A80 亦具有某些生物学功能<sup>[21]</sup>。第三,在 Domain III,选择 5 个相关位点进行氨基酸替换突变;这 5 个位点能够形成疏水结构,以推测某种生物学功能,并且本实验室之前的研究证实 Domain III 对  $\beta$ 2M 具有抑制作用,因此,对其进行氨基酸位点突变以验证是否能够在病毒水平上验证其功能。最终在病毒上对

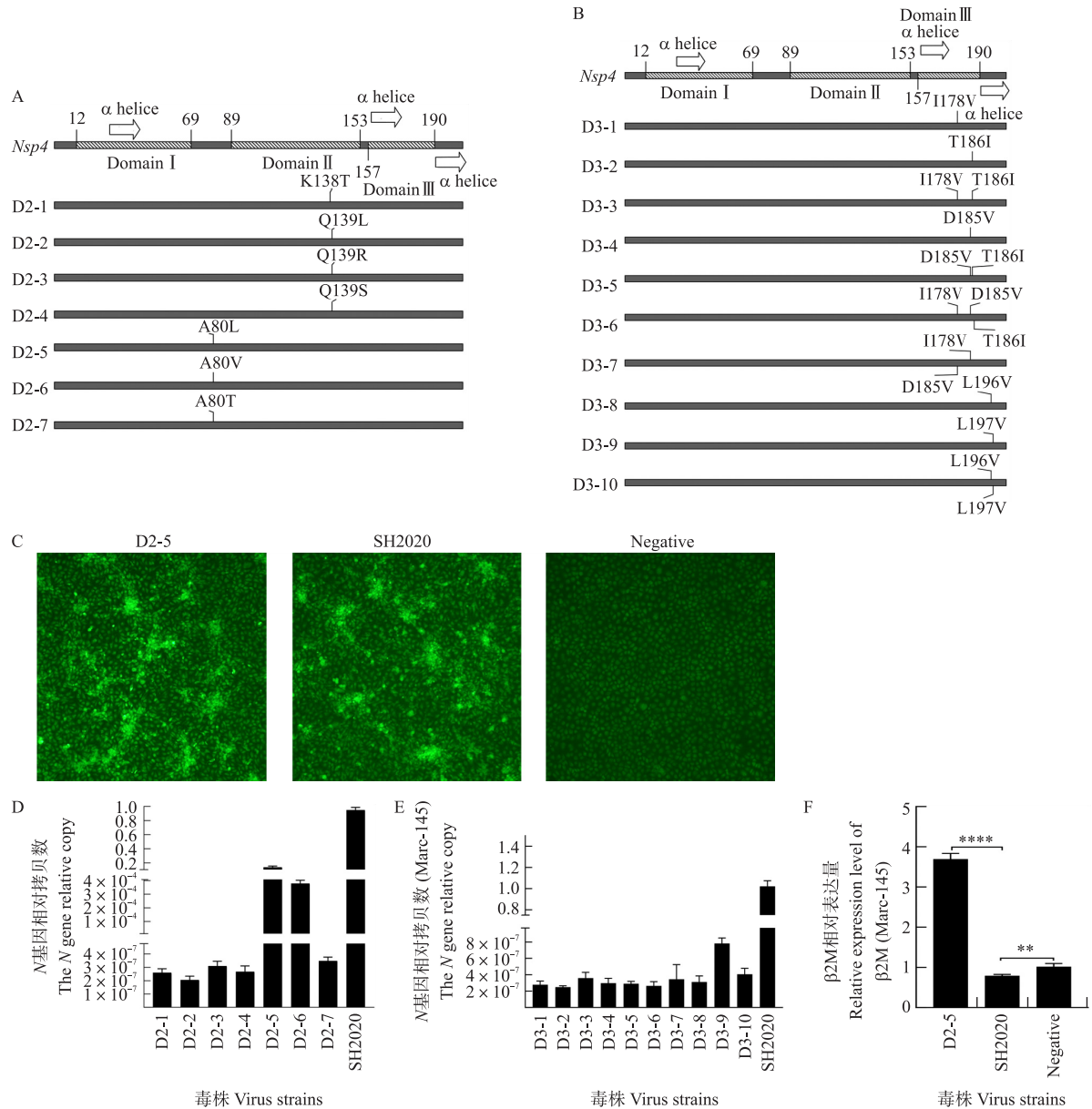


图 5 突变毒株的构建以及位点筛选

Fig. 5 Construction of the mutants and the sites screening

A. PRRSV *Nsp4* Domain II 相关突变位点模式图 Pattern of *Nsp4* Domain II-associated mutation sites; B. PRRSV *Nsp4* Domain III 相关突变位点模式图 Pattern of PRRSV *Nsp4* Domain III-associated mutation sites; C. D2-5 和 SH2020 在 Marc-145 细胞上的 IFA 试验 IFA assay for D2-5 and SH2020 on Marc-145 cells; D. PRRSV *Nsp4* Domain II 相关突变毒株的 *N* 基因相对拷贝数 Relative copy number of the *N* gene of *Nsp4* Domain II-associated mutant strains; E. PRRSV *Nsp4* Domain III 相关突变毒株的 *N* 基因相对拷贝数 Relative copy number of the *N* gene of *Nsp4* Domain III-associated mutant strains; F. PRRSV *Nsp4* Domain II 相关突变毒株在 Marc-145 细胞上对  $\beta$ 2M 表达的影响 Effect of PRRSV *Nsp4* Domain II-associated mutant strains on the expression of  $\beta$ 2M molecules in Marc-145 cells. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . The same as follows.

选择的这8个氨基酸位点进行突变验证,共构建17个不同重组病毒感染性克隆(Domain II包含7个重组病毒感染性克隆,Domain III包含10个重组病毒感染性克隆)。

将转染细胞的突变毒株感染性克隆传3代后,对这些突变毒株N基因进行RT-qPCR定量。结果显示,只有Domain II中的D2-5突变毒株(*Nsp4-A80L*)的N基因拷贝数较高,其余突变毒株的N基因拷贝数都明显较低,其 $C_T$ 值与阴性对照没有明显区别(图5-C,D)。另外,对拯救的病毒进行IFA检测,其他突变毒株的荧光强度亦不像野毒株SH2020和D2-5突变毒株那样典型。综合判断,只有D2-5突变毒株被成功拯救。

将D2-5突变株和SH2020株以MOI=2感染Marc-145细胞36h后对试验组进行 $\beta 2M$ 荧光定量检测。结果显示,SH2020株具有抑制Marc-145细胞 $\beta 2M$ 的作用,而*Nsp4*基因在突变后(即A80L突变)的D2-5突变株,能够使得SH2020株对Marc-145细胞 $\beta 2M$ 的抑制作用消失,并且能够使突变毒株在感染36h后促进 $\beta 2M$ 的表达。上述结果提示*Nsp4*A80位点在抑制 $\beta 2M$ 表达方面发挥重要作用。

## 2.6 *Nsp4-A80L* 基因突变毒株(D2-5)对PAM细胞表达 $\beta 2M$ 的影响

在初步筛选到*Nsp4*抑制 $\beta 2M$ 氨基酸位点并在Marc-145细胞上验证后,将突变毒株D2-5再次感染PAM细胞来验证其对PAM细胞 $\beta 2M$ 的作用。将D2-5和SH2020株以MOI=0.01感染Marc-145细胞,比较D2-5和SH2020株的生长动力曲线并对不同时间点的毒价(TCID<sub>50</sub>)进行测定。结果证实D2-5突变毒株和SH2020株具有相似的病毒复制能力(图6-A)。

将D2-5和SH2020株以MOI=0.02分别感染PAM细胞,培养18h后对各试验组 $\beta 2M$ 基因表达水平进行定量。在转录水平,对各组细胞进行RNA抽提并反转录,对 $\beta 2M$ 基因进行荧光定量,发现D2-5试验组的 $\beta 2M$ 基因表达水平是SH2020组的3.04倍,是阴性对照组的1.8倍(图6-B)。采用Western blot对这

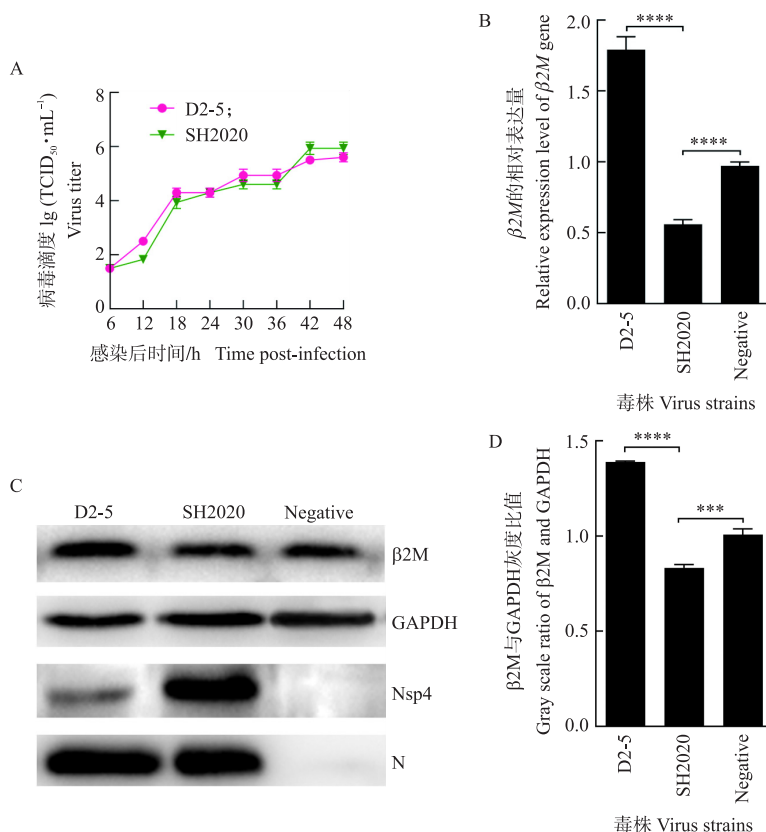


图6 D2-5突变毒株在PAM细胞上的验证

Fig. 6 Verification of the D2-5 mutant on PAM

A. D2-5和SH2020株的生长动力特性比较 Comparison of growth kinetic characteristics between D2-5 and SH2020 strains; B. D2-5和SH2020株在转录水平上对PAM细胞上 $\beta 2M$ 表达的影响 Effect of D2-5 and SH2020 strains on the expression of  $\beta 2M$  molecules on PAM cells at the transcriptional level; C. WB检测D2-5和SH2020毒株对PAM细胞上 $\beta 2M$ 蛋白表达的影响 The effect of D2-5 and SH2020 on the expression of  $\beta 2M$  protein in PAM cells by Western blot detection; D. D2-5和SH2020试验组中 $\beta 2M$ 与GAPDH灰度比值比较 Comparison of gray ratio between  $\beta 2M$  and GAPDH in D2-5 and SH2020 experimental groups. \*\*\*  $P < 0.001$ .

2个试验组  $\beta 2M$  蛋白表达水平进行比较(图6-C),结果证实 D2-5 试验组的  $\beta 2M$  表达水平是 SH2020 组的 1.64 倍,是阴性对照组的 1.34 倍,而野毒株 SH2020 在转录水平和翻译水平都对 PAM 细胞的  $\beta 2M$  蛋白具有明显的抑制作用(图6-D);而 *Nsp4* 表达量在 D2-5 试验组明显降低(图6-C)。综上所述,PRRSV SH2020 株 *Nsp4* 基因在抑制  $\beta 2M$  蛋白表达方面发挥关键性作用;对其进行 A80L 突变,突变毒株 D2-5 能够促进 PAM 细胞  $\beta 2M$  蛋白的表达。

### 3 讨论

免疫逃逸现象在很多病毒中都存在,其中研究较多的病毒包括 HIV、Mouse Norovirus、Cowpox Virus 以及 SARS-CoV-2 等。一般都是通过不同的方式来逃逸免疫系统的识别和攻击,从而在宿主体内进行高效复制;其中最重要的一种方式是通过不同的感染机制来抑制 MHC-I 的表达,导致抗原递呈受阻,降低了 CTL 的识别抗原和活化效率,最终导致细胞免疫活性受到抑制<sup>[16,22-23]</sup>。同理,PRRSV 中亦存在细胞免疫逃逸机制。已有研究证实 PRRSV 中的一些基因在抑制抗原递呈方面发挥作用<sup>[17,24]</sup>,导致免疫识别效率降低,但具体机制并不十分清楚<sup>[25-26]</sup>。

另外,PRRSV 中存在一些基因能够抑制 SLA-I 的表达,比如 *Nsp1 $\alpha$* 、*Nsp2TF* 和 *GP3* 基因<sup>[11]</sup>,但这些研究结果都是基于质粒表达蛋白后对细胞的作用进行分析的,在病毒上并未研究这些基因到底如何发挥作用。而对 HP-PRRSV 的研究中,已证实 *Nsp1 $\alpha$*  基因在病毒水平上能够通过泛素化-蛋白酶体途径下调 SLA-I 的表达,最终破坏 SLA-I 在细胞膜上的表达<sup>[17]</sup>。*Nsp4* 基因目前只是在质粒水平上证明了其具有进入细胞核的定位信号序列<sup>[27]</sup>并能够与  $\beta 2M$  结合抑制  $\beta 2M$  的转录<sup>[13]</sup>,但目前并未在病毒水平上证实 *Nsp4* 基因功能。本次试验通过反向遗传技术对 PRSV *Nsp4* 基因筛选的氨基酸位点进行突变,对得到的突变毒株进行验证,最终证明 *Nsp4* 基因在抑制  $\beta 2M$  表达方面发挥关键性作用,并且 D2-5 突变株在 PAM 细胞中产生的 *Nsp4* 蛋白明显少于 SH2020 野生株;基于此,我们推测主要原因是由于 D2-5 突变株在感染细胞 *Nsp4* 蛋白量表达减少,导致其对细胞  $\beta 2M$  基因启动子结合量减少,最终对  $\beta 2M$  基因抑制的效率降低。此研究结果为进一步揭示 PRRSV 的细胞免疫抑制机制打下基础。

在构建的 17 个重组毒株中,只有来自 Domain II 的 D2-5 重组病毒可以成功拯救,而其余的 16 个重组病毒无法成功拯救,*N* 基因拷贝数较低,基本传至第 3 代后 IFA 就无法检测出其荧光;说明 *Nsp4* 蛋白中的大多数氨基酸位点对 *Nsp4* 基因功能的发挥以及 PRRSV 的生命活动都起着关键性作用。对于具体的 PRRSV 毒株而言,其氨基酸位点是不可替代的,也揭示了 PRRSV 毒力可能是多个基因联合决定的。PRSV D2-5 突变病毒与野生亲本毒株 SH2020 对比试验揭示了 *Nsp4* 基因在抑制细胞  $\beta 2M$  表达方面发挥重要作用,这是国内外该研究领域首次发现的关于 PRRSV 的一种重要致病机制。另外,在 *Nsp4* 基因 Domain II 中筛选的 A80L 氨基酸位点对 PRRSV 在抑制抗原递呈方面的进一步研究提供了新的理论,本次试验结果也对疫苗的开发提供了一种新的思路。有研究表明,*N* 蛋白亦拥有较好的抗体中和表位<sup>[24]</sup>,但目前的疫苗形态在诱导 *N* 蛋白中和抗体方面效果不佳,这是阻止 PRRSV 免疫逃逸的一个很重要障碍;因此,mRNA 疫苗、病毒载体等新形态疫苗亦是未来需要重点关注的方向<sup>[29]</sup>。

综上所述,本研究证实了 *Nsp4* 在 PRRSV 抑制细胞  $\beta 2M$  表达方面发挥主要作用;并且验证了 A80L 突变毒株能够促进 PAM 细胞  $\beta 2M$  的表达,为进一步研究 PRRSV 的免疫抑制机制奠定理论基础。

#### 参考文献 References:

- [1] Han D P, Hu Y X, Li L M, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection results in acute lung injury of the infected pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 169(3/4): 135-146.
- [2] Zimmerman J J, Yoon K J, Wills R W, et al. General overview of PRRSV: a perspective from the United States[J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55(1/2/3/4): 187-196.
- [3] van Gucht S, Labarque G, van Reeth K. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 102(3): 165-178.
- [4] Nieuwenhuis N, Duinhof T F, van Nes A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds[J]. *The Veterinary Record*, 2012, 170(9): 225.
- [5] Renken C, Nathues C, Swam H, et al. Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany[J]. *Porcine Health Management*, 2021, 7(1): 3.

- [6] Pejsak Z, Stadejek T, Markowska-Daniel I. Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm[J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55(1/2/3/4): 317–322.
- [7] Vu H L X, Kwon B, Yoon K J, et al. Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(11): 5555–5564.
- [8] Cao J, Grauwet K, Vermeulen B, et al. Suppression of NK cell-mediated cytotoxicity against PRRSV-infected porcine alveolar macrophages *in vitro*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 164(3/4): 261–269.
- [9] Wang P, Zhang J Y, Ha Z, et al. Synergistic pathogenicity by coinfection and sequential infection with JXA1-like HP-PRRSV and PCV2d in PCV2 antibody-positive post-weaned pigs[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 173: 105810.
- [10] Yan X G, Zeng J, Li X Y, et al. High incidence and characteristic of PRRSV and resistant bacterial co-infection in pig farms[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104536.
- [11] Cao Q M, Subramaniam S, Ni Y Y, et al. The non-structural protein Nsp2TF of porcine reproductive and respiratory syndrome virus down-regulates the expression of Swine Leukocyte Antigen class I[J]. *Virology*, 2016, 491: 115–124.
- [12] Du J G, Ge X N, Liu Y, et al. Targeting swine leukocyte antigen class I molecules for proteasomal degradation by the nsp1 $\alpha$  replicase protein of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain JXwn06[J]. *Journal of Virology*, 2015, 90(2): 682–693.
- [13] Qi P F, Liu K, Wei J C, et al. Nonstructural protein 4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates cell surface swine leukocyte antigen class I expression by downregulating  $\beta$ 2-microglobulin transcription[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(5): 1755–1770.
- [14] Raghavan M, del Cid N, Rizvi S M, et al. MHC class I assembly: out and about[J]. *Trends in Immunology*, 2008, 29(9): 436–443.
- [15] del Balzo D, Capmany A, Cebrian I, et al. *Chlamydia trachomatis* infection impairs MHC-I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 662096.
- [16] Ali A, Furler R L, Pedroza-Martins L, et al. A novel HIV-1 nef mutation in a primary pediatric isolate impairs MHC-class I downregulation and cytopathicity[J]. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2020, 36(2): 122–130.
- [17] Liu Y Y, Gao P, Zhou L, et al. Mapping the key residues within the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp1 $\alpha$  replicase protein required for degradation of swine leukocyte antigen class I molecules[J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 690.
- [18] Wang Y X, He W, Li Q Q, et al. Generation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressing a marker gene inserted between ORF4 and ORF5a[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(8): 1803–1813.
- [19] Huang Y W, Fang Y, Meng X J. Identification and characterization of a porcine monocytic cell line supporting porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication and progeny virion production by using an improved DNA-launched PRRSV reverse genetics system[J]. *Virus Research*, 2009, 145(1): 1–8.
- [20] Moser L A, Boylan B T, Moreira F R, et al. Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(11): e0006880.
- [21] Tian X S, Lu G W, Gao F, et al. Structure and cleavage specificity of the chymotrypsin-like serine protease (3CLSP/nsp4) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 392(4): 977–993.
- [22] Fritzlar S, Jegaskanda S, Aktepe T E, et al. Mouse norovirus infection reduces the surface expression of major histocompatibility complex class I proteins and inhibits CD8<sup>+</sup>T cell recognition and activation[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(18): 286–303.
- [23] Rubio-Casillas A, Redwan E M, Uversky V N. SARS-CoV-2: a master of immune evasion[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1339.
- [24] 胡晓静, 张路捷, 张杰, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(5): 103–109.
- Hu X J, Zhang L J, Zhang J, et al. Monoclonal antibodies preparation and antigenic epitope identification of N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(5): 103–109 (in Chinese with English abstract).
- [25] Costers S, Lefebvre D J, Goddeeris B, et al. Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> high cells[J]. *Veterinary Research*, 2009, 40(5): 46.
- [26] Huang C, Zhang Q, Guo X K, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 antagonizes beta interferon expression by targeting the NF- $\kappa$ B essential modulator[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(18): 10934–10945.
- [27] Tao R, Fang L R, Bai D C, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 cleaves porcine DCP1a to attenuate its antiviral activity[J]. *Journal of Immunology*, 2018, 201(8): 2345–2353.
- [28] 刘惠莉, 方莹. 猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 NSP4 细胞核定位研究[J]. *南京农业大学学报*, 2011, 34(4): 89–94. DOI: 10.7685/j.issn.1000-2030.2011.04.016.
- Liu H L, Fang Y. Nuclear localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(4): 89–94 (in Chinese with English abstract).
- [29] 汪梦竹, 蒲飞洋, 赵泽阳, 等. 新型疫苗的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54(9): 141–147.
- Wang M Z, Pu F Y, Zhao Z Y, et al. Advances in development of novel types of vaccines[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(9): 141–147 (in Chinese with English abstract).