



# 非洲猪瘟病毒 C717R 蛋白诱导小鼠炎症应答

尚小粉<sup>1,2</sup>, 马旭升<sup>2</sup>, 李茜<sup>2</sup>, 马永华<sup>1\*</sup>, 郑海学<sup>2\*</sup>

1 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046

尚小粉, 马旭升, 李茜, 马永华, 郑海学. 非洲猪瘟病毒 C717R 蛋白诱导小鼠炎症应答[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4185-4196.  
SHANG Xiaofen, MA Xusheng, LI Qian, MA Yonghua, ZHENG Haixue. Inflammatory response induced by African swine fever virus C717R protein in mice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4185-4196.

**摘要:**【目的】通过炎症应答系统筛选, 发现非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV) C717R 蛋白可诱导炎症反应, 本研究旨在首次鉴定 C717R 蛋白功能, 通过构建 C717R 重组慢病毒并感染 BALB/c 小鼠, 探究其对炎症应答产生的影响。【方法】通过炎症小体表达系统筛选出诱导炎症应答的 C717R 蛋白, 并构建 C717R 重组慢病毒。利用 C717R 重组慢病毒感染小鼠, 使 C717R 在小鼠组织中表达。经实时荧光定量、蛋白质免疫印迹等方法检测 C717R 慢病毒包装、蛋白表达以及促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\beta$  的变化。【结果】C717R 蛋白在小鼠组织中正常表达。酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测发现, 表达 C717R 蛋白的小鼠, 血清中促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\beta$  及 IFN- $\gamma$  分泌水平显著升高。实时荧光

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800300); 甘肃省科技发展重大专项(21ZD3NA001, 19ZDNA001); 中国农业科技创新项目(CAASZDRW202006, CAAS-ASTIP-2022-LVRI, Y2021XK11); 甘肃省优秀研究生“创新之星”项目(2022CXZXS-010); 兰州市科技计划(2022-2-112, 2017-4-103); 甘肃农业大学基金(GAU-ZDKC-202216, GAU-XKJS-2018-073, GAU-KYQD-2017RCZX-11, GAU-QDFC-2020-11); 甘肃省科技厅国际合作项目(144WCGA169); 甘肃省自然科学基金(18JR3RA167); 国家重点研发计划(2018YFD0500103, 2017YFD0501100, 2016YFD0500900); 国家生猪产业技术体系(CARS-35)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300), the Gansu Provincial Major Project for Science and Technology Development (21ZD3NA001, 19ZDNA001), the Chinese Academy of Agricultural Science and Technology Innovation Project (CAASZDRW202006, CAAS-ASTIP-2022-LVRI, Y2021XK11), the “Innovation Star” Project of Gansu Province Outstanding Graduate Students (2022CXZXS-010), the Lanzhou Science and Technology Planning Project (2022-2-112, 2017-4-103), the Foundation of Gansu Agricultural University (GAU-ZDKC-202216, GAU-XKJS-2018-073, GAU-KYQD-2017RCZX-11, GAU-QDFC-2020-11), the International Cooperation Project of Science and Technology Department of Gansu Province (144WCGA169), the Natural Science Foundation of Gansu Province (18JR3RA167), the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500103, 2017YFD0501100, 2016YFD0500900), and the National Technical System Of Hog Industry (CARS-35).

\*Corresponding authors. MA Yonghua, Tel/Fax: +86-931-7631229, E-mail: mayh517@163.com;

ZHENG Haixue, E-mail: haixuezheng@163.com

Received: 2023-03-17; Accepted: 2023-06-02; Published online: 2023-07-06

定量检测表达 C717R 蛋白的小鼠组织证实, C717R、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的 mRNA 转录水平显著上调; 蛋白质免疫印迹证实, C717R 可诱导小鼠不同组织 caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的成熟。组织病理切片结果显示, 表达 C717R 蛋白的 BALB/c 小鼠和对照组相比, 肝脏、心脏、肺脏等器官炎症细胞浸润程度较对照组更严重。【结论】ASFV 的 C717R 蛋白表达诱导 BALB/c 小鼠产生炎症应答, 为鉴定和阐明 C717R 蛋白介导的促炎新机制提供了重要依据。

关键词: 非洲猪瘟病毒; 炎症; C717R

## Inflammatory response induced by African swine fever virus C717R protein in mice

SHANG Xiaofen<sup>1,2</sup>, MA Xusheng<sup>2</sup>, LI Qian<sup>2</sup>, MA Yonghua<sup>1\*</sup>, ZHENG Haixue<sup>2\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine of Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

**Abstract: [Objective]** By screening the inflammatory response system, we discovered that the African swine fever virus (ASFV) protein C717R induced an inflammatory response. This study aims to reveal the function of C717R protein by constructing recombinant C717R-lentivirus and observing the recombinant-induced inflammatory response in BALB/c mice. **[Methods]** C717R was screened out by the inflammasome expression system and used to construct the recombinant C717R-lentivirus. Mice were infected with the recombinant C717R-lentivirus to enable the expression of C717R in mouse tissue. Quantitative real-time PCR, western blotting, and enzyme-linked immunosorbent assay were employed to examine the package of C717R-lentivirus, protein expression, and the serum levels of pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, and interferon-beta (IFN- $\beta$ ), respectively. **[Results]** C717R protein was normally expressed in mouse tissue. The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and IFN- $\beta$  were elevated in the expression of C717R protein in mice. The mRNA levels of C717R, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 were significantly up-regulated in the expression of C717R protein in mice. Western blotting demonstrated that expression of C717R protein induced the caspase-1 and IL-1 $\beta$  in different tissues. The lesions in the liver, heart, lungs, and other organs of BALB/c mice expressing C717R protein were severer than those in the control mice. **[Conclusion]** The expression of C717R protein induced an inflammatory response in BALB/c mice. The findings provide a basis for deciphering the mechanism of C717R protein-mediated inflammation.

**Keywords:** African swine fever virus; inflammation; C717R

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染家猪引起的高度传染性疫病,被认为是危害严重的传染病之一,强毒株感染家猪可导致其死亡率高达 100%。ASF 首次于肯尼亚被发现,目前正在欧洲、非洲和亚洲大肆流行,因没有经商业批准的疫苗和特效药,对世界养猪业造成了巨大的威胁<sup>[4]</sup>。自我国 2018 年首次于辽宁发现 ASF 以来,已有超亿头生猪因疫情被扑杀,经济损失高达上千亿元。ASFV 强毒株感染家猪后,其主要病理表现有肺水肿、斑点皮肤、紫绀、血小板减少、淋巴细胞减少和出血性病变<sup>[1-2]</sup>。

ASFV 是直径约 220 nm 的双链 DNA 病毒,其结构包含类核、核壳、内脂膜、衣壳和外脂膜<sup>[2,5]</sup>。ASFV 基因组可编码 150–200 种蛋白,且大部分功能仍未知。ASFV 感染家猪诱发强烈的炎症应答和细胞因子“风暴”,但其机制仍不清楚。深入了解 ASFV 调控宿主炎症应答机制至关重要<sup>[6]</sup>。

核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)和核苷酸寡聚化结构域样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体是产生细胞因子的 2 种关键复合体<sup>[7-8]</sup>。目前,研究较多的是 ASFV 通过这 2 个复合体抑制炎症应答机制解析,如 ASFV 的 pF317L 蛋白通过破坏 NF- $\kappa$ B 活性而抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活<sup>[3]</sup>。pH240R 通过自噬介导的 NEMO 溶酶体降解抑制 NF- $\kappa$ B 活化,导致 pro-IL-1 $\beta$  转录减少。此外, pH240R 与 NLRP3 相互作用抑制其寡聚化,导致 IL-1 $\beta$  表达降低<sup>[9]</sup>。尽管 ASFV 调控炎症应答机制的研究不断深入,但 ASFV 参与诱导炎症应答的机制鲜有报道。

为了探究 ASFV 感染宿主诱导炎症应答的

分子机制,本研究通过对 ASFV 基因组编码的 186 个蛋白进行系统筛选,发现 C717R 具有诱导炎症发生的功能。C717R 蛋白功能至今未被阐述,为证实 C717R 具有诱导炎症应答的功能,本研究通过构建和包装 LV-C717R 慢病毒,使用该慢病毒感染 HEK-293T 细胞和 BALB/c 小鼠,进而探究其生物学功能。本研究为探索 C717R 蛋白诱发炎症应答新功能提供理论基础,以期为进一步揭示 ASFV 感染机体引发宿主炎症应答的分子机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验动物、细胞和病毒

非洲猪瘟基因 II 型野生毒株 ASFV CN/GS/2018 由兰州兽医研究所 P3 实验室分离并保存。BALB/c 小鼠由兰州兽医研究所动物实验中心提供,所有动物试验流程均经中国农业科学院兰州兽医研究所动物关爱与使用委员会审查通过(审批编号:LVRIAEC-2022-053)。HEK-293T 细胞、BMDM 细胞、慢病毒空载体以及包装质粒保存于兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学团队。

#### 1.1.2 试剂

细胞培养基 DMEM、胎牛血清、胰酶均购自 Gibco 公司。聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、抗体稀释液、放射免疫沉淀法缓冲液(radioimmunoprecipitation assay buffer, 也可称为 RIPA 裂解液)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、蛋白预染 Marker、化学发光底物(electrochemiluminescence, ECL)显色剂均购自上海碧云天生物技术有限公司。质粒大提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Promega 生物科技有限公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 购于中杉金桥公司。小鼠

IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  以及 IFN- $\gamma$  细胞因子酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自北京华博德亿生物技术有限公司。IL-1 $\beta$ 、caspase-1 单抗均购自上海优宁维科技股份有限公司。Flag、 $\beta$ -actin 等单抗均购自西格马奥德里奇(上海)贸易有限公司。反转录试剂盒、TB Green 均购自上海百赛科技股份有限公司。2 $\times$ Taq Master Mix 酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、*Xho* I 和 *EcoR* I 酶、DH5 $\alpha$  均购自北京索莱宝科技有限公司。

## 1.2 构建 C717R 慢病毒过表达质粒

### 1.2.1 C717R 蛋白生物学分析

将测序正确的 C717R 蛋白核苷酸序列通过软件翻译为氨基酸序列进行生物学信息分析, 利用 npsa-prabi ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl)) 预测蛋白二级结构; 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行蛋白质三级结构预测。

### 1.2.2 引物合成

参考 GenBank 中 C717R 基因序列(登录号: MN172368.1)设计扩增引物, 上下游分别添加 *Xho* I 和 *EcoR* I 酶切位点, 并由生工生物工程(上海)有限公司合成引物, 见表 1。

### 1.2.3 基因扩增

ASFV CN/GS/2018 感染 BMDM 细胞 24 h 后, 收集已接毒的细胞提取其病毒 DNA。以 ASFV 的 DNA 为模板, 利用 C717R 的上下游引物扩增 C717R 基因。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: 双蒸水 8  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq Master Mix 酶 10  $\mu$ L。扩增 PCR

反应程序: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 70 s, 35 次循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增产物经 1%核酸凝胶电泳分析并纯化回收 C717R 基因的编码序列(coding sequence, CDS)扩增片段。

### 1.2.4 慢病毒过表达质粒构建

应用 *Xho* I 和 *EcoR* I 分别双酶切过表达慢病毒空载体及 C717R 基因的 CDS, 1%核酸凝胶电泳检测并回收酶切产物, T<sub>4</sub> DNA 连接酶 16  $^{\circ}$ C 过夜连接 C717R 基因和慢病毒空载体 pHBLV-CMV-MCS-3Flag-EF1-T2A-ZsGreen-Puro。将连接产物通过 DH5 $\alpha$  转化, 挑取单克隆菌落, 利用含有氨苄抗性的 LB 液体培养基培养, 采用 Promega 质粒提取试剂盒提取重组质粒, 经酶切鉴定, 并送样西安擎科泽西生物科技有限责任公司测序鉴定。将慢病毒空载体质粒命名为 LV-EV, 重组 C717R 慢病毒质粒命名为 LV-C717R。酶切体系为 20  $\mu$ L: 空载体或 C717R 基因 3  $\mu$ L, *Xho* I 2  $\mu$ L, *EcoR* I 2  $\mu$ L, buffer 2  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 11  $\mu$ L。连接体系为 10  $\mu$ L: 载体 2  $\mu$ L, C717R 基因 1  $\mu$ L, T<sub>4</sub> 连接酶 1  $\mu$ L, 10 $\times$ H buffer 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L, 于 16  $^{\circ}$ C 过夜连接。

### 1.2.5 慢病毒包装及滴度测定

应用无内毒素大提质粒试剂盒提取质粒 LV-C717R、LV-EV 及慢病毒包装辅助质粒 pMD2G、PSPAX-2。将 LV-717R 质粒或 LV-EV 质粒分别与包装辅助质粒共同转染 HEK-293T 细胞。于 48 h 和 72 h 收集细胞培养液上清, 通过超速离心浓缩病毒, 细胞制样用于 Western blotting 验证。

表 1 PCR 扩增 C717R 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of C717R gene for PCR amplification

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Length (bp)
C717R-F	CCG <u>CTCGAG</u> ATGACAAAATTAGCCCAATGGATGTT	2 171
C717R-R	CGGA <u>ATTCT</u> TACAAATTTTCATTAGCAAGACTGCTC	

The underline is the restriction site sequence of *Xho* I and *EcoR* I.

滴度测定:将生长状态良好的 HEK-293T 细胞消化计数后稀释至  $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 加入 96 孔板,  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  ( $1 \times 10^4$  个细胞)。于  $37^\circ\text{C}$  温箱、 $5\% \text{CO}_2$  培养箱中培养过夜。第 1 天将 LV-C717R 和 LV-EV 慢病毒在 EP 管中做 10 倍梯度稀释, 连续 6 个稀释度。把稀释好的病毒和细胞孵育过夜。第 2 天吸出病毒悬液, 换新的培养基。第 4 天在荧光显微镜下观察结果, 对荧光比例合适 ( $10\% \sim 30\%$  之间) 的孔进行细胞计数, 并计算滴度。

滴度 ( $\text{TU}/\text{mL}$ ) = 细胞数  $\times$  荧光百分比  $\times 10^3$  / 病毒原液体积 ( $\mu\text{L}$ )。

### 1.3 慢病毒感染细胞

将细胞铺板于 24 孔板, 待细胞长至 70%, 弃掉原有培养基, 加入  $250 \mu\text{L}$  新鲜培养基并加入病毒悬液, 4 h 后补充  $250 \mu\text{L}$  培养液。感染后 24 h, 弃掉含病毒的培养基, 更换新鲜培养基于细胞培养箱培养。病毒感染 48 h 后, 收集细胞制样检测 C717R 表达及促炎细胞因子表达。

### 1.4 慢病毒感染 BALB/c 小鼠

将 32 只 BALB/c 小鼠随机分 4 组 (空白、PBS、LV-EV、LV-C717R), 每组 8 只, 将 PBS、LV-EV 和 LV-C717R 分别于小鼠尾静脉注射, 注射 2 次, 每次分别注射  $5 \times 10^7 \text{ TU}/\text{mL}$  LV-EV、LV-C717R 慢病毒悬液, 每次间隔 3 d, 第 7 天眼球采血并采集小鼠实质器官心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏。

### 1.5 ELISA 检测血清中细胞因子的分泌水平

将采集的小鼠血液于室温放置 2 h 后于  $4^\circ\text{C}$  过夜,  $2000 \text{ r}/\text{min}$  离心 15 min, 收集上清用于 ELISA 检测小鼠血清中促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\beta$  以及 IFN- $\gamma$ 。

### 1.6 qRT-PCR 检测各组织促炎细胞因子和 C717R 的 mRNA 转录水平

采集各组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏, 各取 1 g 应用匀浆机研磨组织, 用 TRIzol 总 RNA 提取试剂提取小鼠不同组织 mRNA 并将

其反转录为 cDNA, qRT-PCR 检测 C717R 及促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的 mRNA 转录水平。

### 1.7 Western blotting 检测组织内 C717R 以及促炎细胞因子表达水平

将各组织称取 1 g 置于 2 mL 离心管内, 加入  $800 \mu\text{L}$  RIPA 裂解液提取组织总蛋白, 利用蛋白质定量试剂盒 BCA 法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 检测组织蛋白浓度, 取  $100 \mu\text{g}$  蛋白制样并进行 SDS-PAGE, 转膜于 PVDF 膜,  $5\%$  脱脂奶粉封闭 2 h 后,  $4^\circ\text{C}$  过夜孵育抗体, 用等渗缓冲液 (TBS with Tween-20, TBST) 洗涤 3 次后孵育抗体, 洗涤 3 次后应用 ECL 发光底物试剂盒进行显影及曝光。

### 1.8 组织病理切片分析

各组织经福尔马林浸润后, 脱水浸蜡、包埋、切片、HE 染色制备病理切片, 观察各组织的病理变化。

### 1.9 统计学方法

将试验所得数据通过 GraphPad Prism 8 软件来进行统计学分析, 统计学差异用  $P$  值表示,  $*P < 0.05$  时表示差异显著;  $**P < 0.01$  和  $***P < 0.001$  时表示统计学差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 C717R 蛋白生物学信息分析

通过 NLRP3 炎性小体表达系统分别与 ASFV 基因组编码的不同蛋白进行共同表达, 用 ELISA 检测培养上清中 IL-1 $\beta$  的分泌, 对 ASFV 基因组编码的蛋白进行筛选, 发现 C717R 具有诱导炎症发生的功能 (图 1A)。C717R 蛋白结构分析如图 1B 所示, C717R 蛋白二级结构中  $\alpha$  螺旋占  $47.84\%$ , 扩展链占  $18.83\%$ ,  $\beta$  转角占  $5.72\%$ , 无规卷曲占  $27.62\%$ , 为后期蛋白纯化提供参考。将 C717R 蛋白氨基酸序列提交至 SWISS-

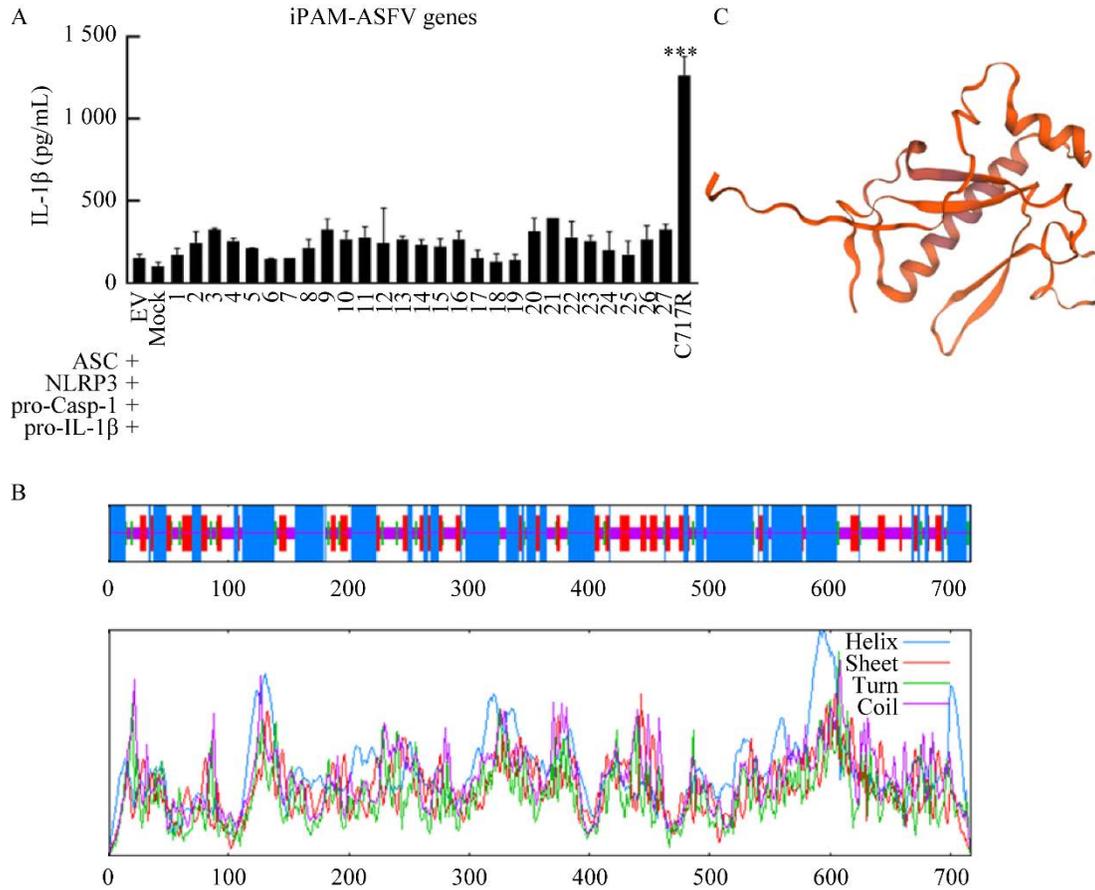


图 1 C717R 蛋白二、三级结构预测

Figure 1 Prediction of secondary and 3D structures of C717R protein. A: Inflammasome expression system screening proteins. B: C717R protein secondary structure prediction. C: C717R protein 3D structure prediction.

MODEL 进行三级结构预测, 结果表明, 预测的 C717R 三级结构与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构同源性的 17.35% (图 1C)。依据筛选结果, C717R 蛋白可能利用其激酶活性磷酸化宿主蛋白而发挥作用。

## 2.2 慢病毒过表达质粒构建

结果如图 2 泳道 1 所示, 通过 PCR 扩增获得含 C717R 基因的 CDS 片段, 其大小为 2 154 bp, 大小与预期一致。将 C717R 的 CDS 和慢病毒空载体 LV-EV 分别同时进行 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切, 然后连接酶切后的 PCR 产物和空载体, 转化后提取重组质粒经双酶切鉴定, 结果如图 2 第 3 泳道显示, C717R 基因成功插入慢病毒空载体

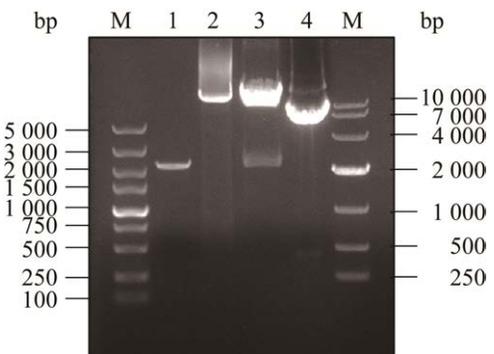


图 2 LV-C717R 质粒的构建

Figure 2 The plasmid LV-C717R was constructed. M: DNA marker; 1: PCR product of C717R gene; 2: Enzymes digested empty plasmid of LV-EV; 3: LV-C717R enzyme digestion; 4: The plasmid LV-C717R.

LV-EV, 即得到了 LV-C717R 重组慢病毒过表达载体质粒。阳性质粒送华大基因测序, 显示该质粒成功被构建。

### 2.3 C717R 慢病毒包装和鉴定

如图 3A 所示, 包装后的 LV-C717R 和 LV-EV 慢病毒感染 HEK-293T 细胞后都产生绿色荧光, 证实慢病毒成功包装。LV-EV 慢病毒和 LV-C717R 慢病毒滴度分别为  $9.24 \times 10^8$  TU/mL 和  $7.79 \times 10^8$  TU/mL。由于 LV-C717R 带有 Flag 标签, 利用慢病毒感染 HEK-293T 细胞, 其感染复数(multiplicity of infection, MOI)=2, 细胞总蛋白通过 Flag 抗体检

测发现, 在 79 kDa 的位置出现 C717R 蛋白特异性条带(图 3B), 结果说明 LV-C717R 慢病毒能够正常表达 C717R 蛋白。

### 2.4 慢病毒感染细胞

为进一步验证 C717R 蛋白调控炎症应答功能, LV-EV 慢病毒及 LV-C717R 慢病毒感染细胞。用 Western blotting 检测 C717R 蛋白及促炎细胞因子表达, 结果如图 4 所示, LV-C717R 慢病毒成功感染细胞, 相对于对照组(空白对照组、LV-EV 慢病毒), LV-C717R 慢病毒感染 HEK-293T 细胞后, 促炎性细胞因子 IL-1 $\beta$  和 caspase-1 表达水平均显著上调。

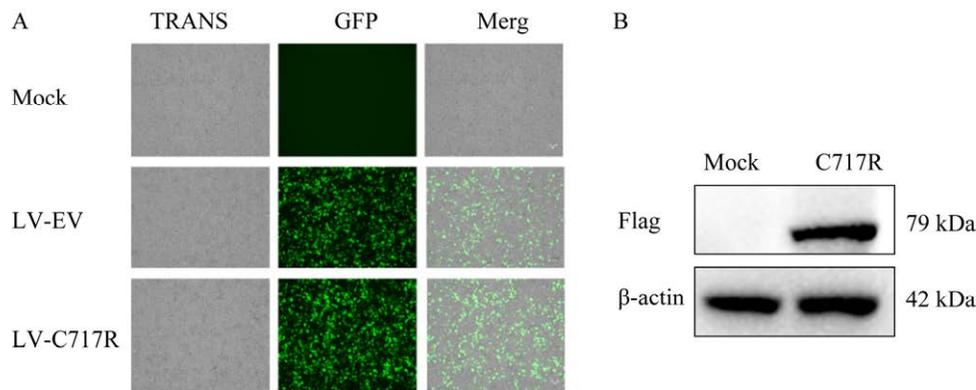


图 3 C717R 慢病毒包装和表达鉴定

Figure 3 Packaging and identification of recombination C717R lentivirus. A: The results of green fluorescent protein expression in HEK-293T cell 72 h after transfection with overexpression vector. TRANS: White light inferior visual field; GFP: Green fluorescent lower field of vision; Merge: White light and green fluorescence overlapping field; Mock: Blank controller; LV-EV: Empty vector recombinant lentivirus group; LV-C717R: C717R recombinant lentivirus group. B: The expression of C717R recombinant lentivirus was verified by Western blotting.

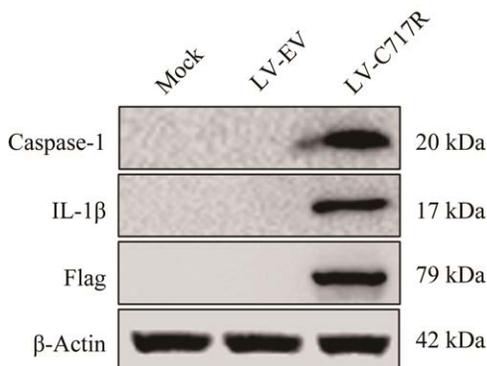


图 4 Western blotting 检测 C717R 及细胞因子表达水平

Figure 4 The expression levels of C717R and cytokines were detected by Western blotting.

### 2.5 ELISA 检测小鼠血清细胞因子的分泌水平

PBS、LV-EV 慢病毒及 LV-C717R 慢病毒分别感染小鼠后, ELISA 检测小鼠血清促炎细胞因子, 结果如图 5 所示, 空白对照组、PBS 对照组、LV-EV 慢病毒处理组的小鼠之间, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IFN- $\gamma$  的分泌水平没有显著变化。相对于对照组(空白对照组、PBS 对照组和 LV-EV 慢病毒), LV-C717R 慢病毒感染小鼠后, 小鼠血清中的促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6 和 IFN- $\gamma$  分泌均显著上调。以上结果显示, C717R 蛋白能够诱导促炎因子的表达分泌上调。

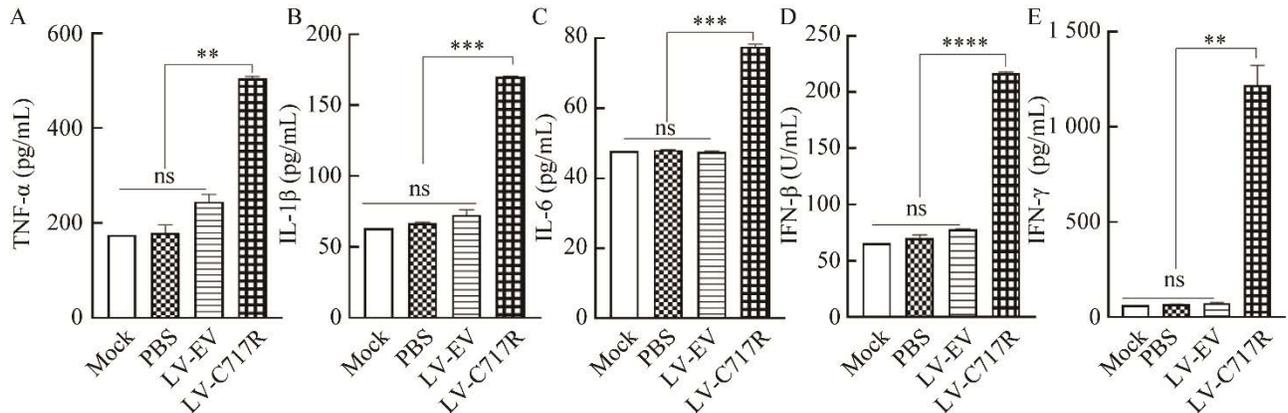


图5 ELISA 检测细胞因子分泌水平

Figure 5 Cytokine secretion levels were detected by ELISA. A: Serum TNF- $\alpha$  secretion was detected by ELISA. B: Serum IL-1 $\beta$  secretion was detected by ELISA. C: Serum IL-6 secretion was detected by ELISA. D: Serum IFN- $\beta$  secretion was detected by ELISA. E: Serum IFN- $\gamma$  secretion was detected by ELISA. ns: No significance,  $P>0.1$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

## 2.6 qRT-PCR 检测各组织 mRNA 转录水平

为确认 C717R 蛋白表达对动物机体炎症应答的影响,将空白组、PBS、LV-EV 慢病毒以及 LV-C717R 慢病毒处理的小鼠分别随机取 3 只,

采集小鼠心、肝、脾、肺和肾,提取小鼠各组织的 RNA,检测 C717R 以及促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6)的转录水平。结果如图 6A 所示,相较于对照组(空白组、PBS 和 LV-EV 慢病毒),

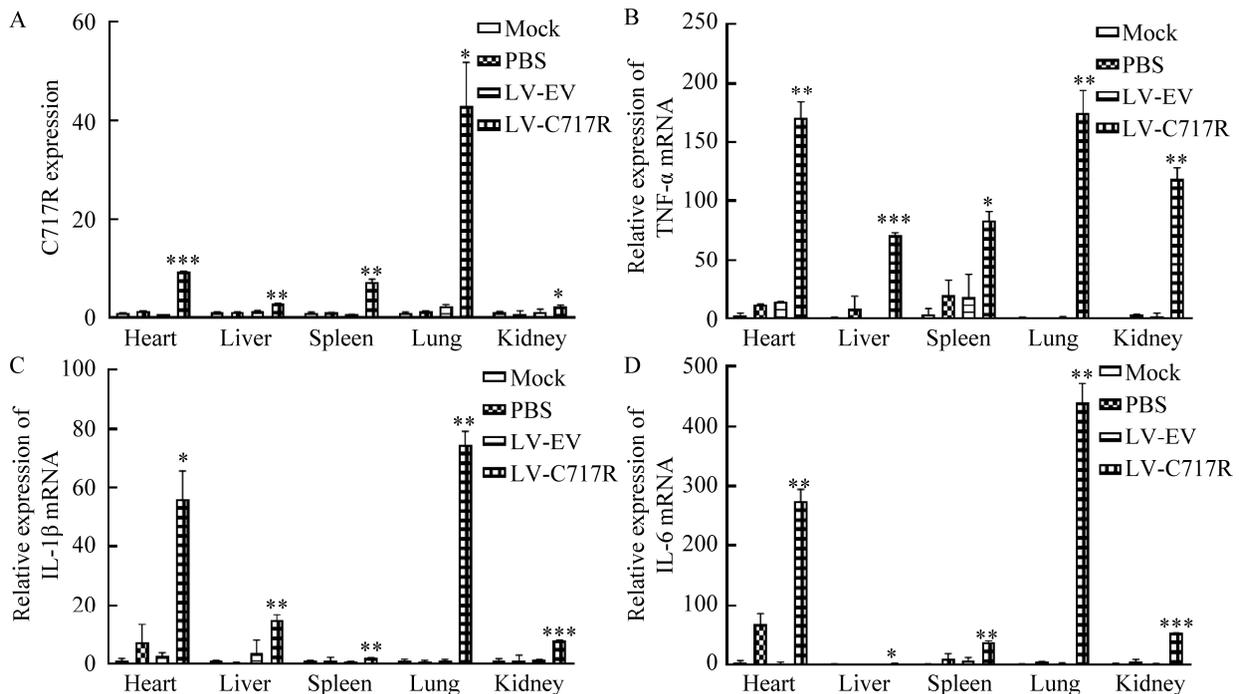


图6 qRT-PCR 检测 C717R 及细胞因子 mRNA 转录水平

Figure 6 mRNA transcription levels of C717R and cytokines were detected by qRT-PCR. A: The mRNA level of C717R transcription was detected by qRT-PCR. B: The mRNA level of TNF- $\alpha$  transcription was detected by qRT-PCR. C: The mRNA level of IL-1 $\beta$  transcription was detected by qRT-PCR. D: The mRNA level of IL-6 transcription was detected by qRT-PCR. ns: No significance,  $P>0.1$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

LV-C717R 慢病毒感染小鼠, C717R 在采集的各种脏器中均有表达, 在心脏和肺脏组织表达尤为明显。试验组小鼠心、肺组织中, 细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 转录水平显著升高(图 6B–6D)。上述结果说明 C717R 的表达能诱导小鼠促炎细胞因子的转录。

### 2.7 Western blotting 检测组织内各蛋白表达水平

为了进一步证实 C717R 诱导炎症应答的功能, 采集小鼠心、肝、脾、肺和肾组织进行蛋白

检测。结果如图 7 所示, 与对照组和空白组相比, LV-C717R 慢病毒感染小鼠, Flag-C717R 蛋白在心、肝、脾、肺和肾组织中明显表达, 且 C717R 表达可诱导小鼠各组织 IL-1 $\beta$  和 caspase-1 的蛋白成熟体表达显著上调。上述结果证实 C717R 的过表达能够诱导炎症细胞因子表达升高。

### 2.8 病理组织切片分析

为确认 C717R 诱导炎症应答对机体组织炎症性浸润的影响, 采集小鼠组织制备切片并 HE 染色观察各组织炎症浸润情况。结果如图 8 所示,

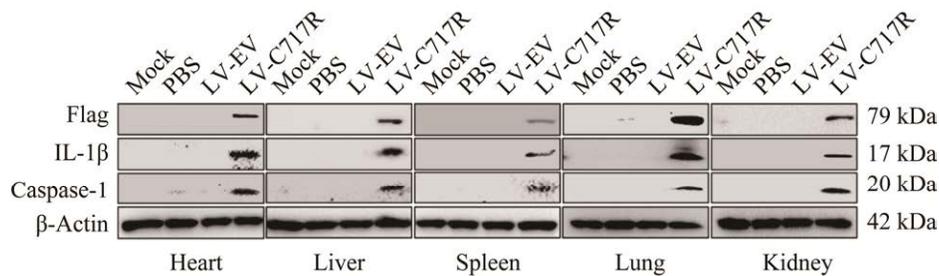


图 7 Western blotting 检测 C717R 及细胞因子表达水平

Figure 7 The expression levels of C717R and cytokines were detected by Western blotting.

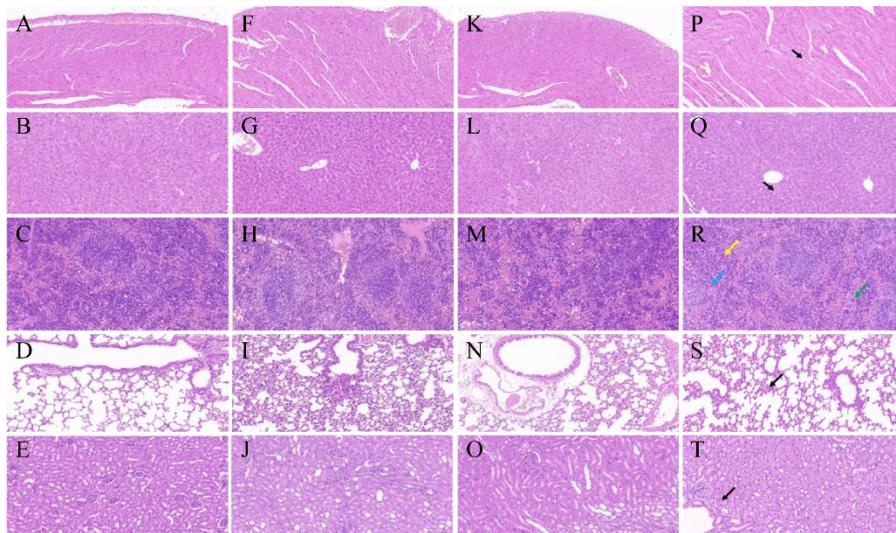


图 8 C717R 诱导小鼠病理组织炎症浸润( $\times 20$ )

Figure 8 C717R induced inflammatory injury in mouse pathological tissue ( $\times 20$ ). A–E: Heart, liver, spleen, lung and kidney of mice in the Mock group from top to bottom. F–J: Heart, liver, spleen, lung and kidney of mice in the PBS group from top to bottom. K–O: Heart, liver, spleen, lung and kidney of mice infected with LV-EV lentivirus from top to bottom. P–T: Heart, liver, spleen, lung and kidney of mice infected with C717R lentivirus from top to bottom.

与对照组(空白组、PBS 和 LV-EV 慢病毒)相比, C717R 重组慢病毒感染小鼠的心脏组织可见多处心肌纤维轻度水样变性, 细胞肿胀, 胞质疏松淡染(黑色箭头, 图 8P); 肝组织中广泛可见中央静脉周围有肝细胞轻度水样变性, 细胞肿胀, 胞质疏松淡染(黑色箭头, 图 8Q); 脾脏组织可见白髓数量减少, 体积减小, 淋巴细胞减少, 红髓中可见多量中性粒细胞浸润(蓝色箭头), 可见少量多核巨细胞(绿色箭头), 大面积髓外造血灶(黄色箭头, 图 8R); 肺脏伴有炎性细胞浸润以及肺泡壁增厚(黑色箭头, 图 8S)。肾脏组织可见多量肾小管上皮细胞水样变性, 胞质疏松淡染(黑色箭头, 图 8T)。在 LV-EV 慢病毒感染的小鼠组织中, 发现其肺组织存在些许炎性细胞浸润(图 8N)。以上结果说明 C717R 能够引发小鼠组织发生炎性浸润。

### 3 讨论与结论

病毒感染机体引发机体天然免疫应答, 炎症应答是天然免疫的关键组成部分<sup>[10-11]</sup>。ASFV 强毒株感染家猪诱导细胞因子“风暴”和组织器官病理损伤, 表现为促炎细胞因子急剧增加、多器官衰竭坏死, 但其分子机制仍不清楚。由于 ASFV 基因组庞大, 且大部分蛋白功能未知, 其蛋白参与诱导炎症应答的研究势在必行<sup>[12]</sup>。前期的研究主要为 ASFV 抑制炎症应答功能的探讨, 尤其是 ASFV 对 NF- $\kappa$ B 通路和 NLRP3 炎症小体通路的抑制功能。ASFV 调控炎症应答的研究不断深入, 但目前 ASFV 诱导炎症的分子机制报道较少。

由于 ASFV 基因组庞大, 且大部分蛋白功能未知, 为了系统和深入地了解 ASFV 参与调控炎症应答的分子机制, 本研究首次发现 C717R 蛋白能够诱导炎症的发生。经共聚焦定位, 发现该蛋白是胞质蛋白。同时, 通过对 C717R 的二级

结构进行预测, 结果显示其结构大部分为  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲。由于蛋白质与蛋白质互作的界面主要以  $\alpha$  螺旋为主, 因此, 推测 C717R 可能参与较多的蛋白质相互作用。故推测 C717R 可能通过其激酶活性参与调控炎症应答。

促炎细胞因子的高表达能够诱导细胞或组织损伤, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等细胞因子在细胞因子“风暴”产生中起到重要的作用。LV-C717R 慢病毒感染 BALB/c 小鼠, ELISA 检测外周血清中不同促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IFN- $\beta$  发现其显著上调。组织 qRT-PCR 检测显示, C717R 在心脏和肺组织表达尤为显著。检测不同组织促炎细胞因子 mRNA 转录水平, 发现对应心脏和肺组织的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IFN- $\beta$  等促炎细胞因子显著性上升, 而这些促炎因子的转录均与 NF- $\kappa$ B 的活化相关, 这说明 C717R 的高表达可能诱导 NF- $\kappa$ B 的活化, 具体表型和机制需要进一步的证实。

IL-1 $\beta$  是重要的早期促炎介质, 主要在损伤或者免疫应答的部位产生, 以协调机体的多种活动, 包括募集细胞到感染或损伤部位、宿主睡眠、食欲和体温的调节。同时, IL-1 $\beta$  诱导其他细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-17 等表达, 激活抗原递呈细胞等天然免疫细胞, 它的产生在很大程度上有利于研究宿主的抗病毒机制<sup>[6]</sup>。ASFV 感染动物后, 导致动物嗜睡, 体温升高、IL-1 $\beta$  表达上调, 因此, 推测 IL-1 $\beta$  在 ASFV 诱导的炎症应答中起到重要的作用。

病毒感染机体后, 刺激 pro-IL-1 $\beta$  转录表达, ASFV 感染机体激活炎症小体并募集 pro-caspase-1 使其形成成熟 caspase-1, caspase-1 剪切 pro-IL-1 $\beta$  使其成为成熟的功能性 IL-1 $\beta$ 。在本研究中, Western blotting 检测 C717R 重组慢病毒感染小鼠组织, 发现 LV-C717R 慢病毒可促进成熟的 caspase-1 和 IL-1 $\beta$  表达。这说明 C717R

可能激活炎症小体, 如 NLRP3, 进而诱导 IL-1 $\beta$  的成熟和产生。Caspase-1 的活化与细胞炎性死亡相关, 因此推测 C717R 蛋白可能也参与了细胞焦亡等细胞炎性死亡的发生。上述问题仍需进一步研究证实。

细胞因子“风暴”导致的临床病症包括发热、肝脏和脾脏肿大、败血症和高铁蛋白症<sup>[13-14]</sup>。同时, 细胞炎性死亡可能诱发机体组织病理损伤。研究表明, 细胞因子和死亡机制有着错综复杂的联系, 并形成正反馈循环, 即细胞因子释放会导致炎性细胞死亡, 从而促进通过膜孔和细胞裂解进一步释放致病细胞因子, 最终造成宿主组织和器官严重的、危及生命的损伤<sup>[10,15]</sup>。ASFV 感染的动物组织病变主要包括脾肿大、肺水肿和扩大的门脉淋巴结出血、肾脏和心外膜上的点状出血以及膀胱黏膜上的点状和瘀血性出血, 其机制仍不清楚<sup>[16]</sup>。本研究将重组 C717R 慢病毒感染的小鼠脏器制备各病理切片, 发现各组织中中性粒细胞均有不同程度的增多。说明 C717R 表达可能促进了机体组织免疫细胞浸润, 推测 C717R 可能参与了细胞炎性死亡介导的组织病理损伤, 后期将进行进一步证实。

由于 ASFV 的易感动物为家猪, 利用 C717R 基因敲除毒株感染家猪能更加直观地观察 C717R 的功能, 但本研究的局限性在于 C717R 基因的缺失, 可能导致 C717R 敲除毒株的致死, 因而试验中未能利用 C717R 缺失的 ASFV 毒株进行蛋白功能研究。同时, 慢病毒对大型动物的感染模型建立困难, 因此, 本课题组前期利用在生物医学研究中使用最广泛的模式动物小鼠作为研究对象, 通过 C717R 蛋白在小鼠体内过表达初步鉴定 C717R 蛋白的功能。然而小鼠和家猪在免疫学、遗传学、生理学以及代谢等研究领域存在不同, 故使用试验小鼠来进行研究具有一定程度的弊端。目前本课题组正在利用 IPTG 诱

导等方法攻克该难关, 后续将开展以易感动物为基础的进一步研究。

ASFV 感染机体诱导强烈的炎症反应, 导致感染猪炎症的病变和死亡, 探索 ASFV 基因功能鉴定以及 ASFV 诱导炎症应答的分子机制对于 ASF 的防控和疫苗创制具有重要意义。本研究首次证实 C717R 具有诱导炎症应答并促进 caspase-1 介导的 IL-1 $\beta$  的成熟的生物学功能, 该研究为进一步探究 C717R 蛋白的诱导免疫应答的分子机制以及 ASFV 感染引发炎症病理损伤机制提供了线索。

## 参考文献

- [1] WANG T, SUN Y, HUANG SJ, QIU HJ. Multifaceted immune responses to African swine fever virus: implications for vaccine development[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 249: 108832.
- [2] REVILLA Y, PEREZ-NUNEZ D, RICHT JA. African swine fever virus biology and vaccine approaches[J]. *Advances in Virus Research*, 2018, 100: 41-74.
- [3] YANG JP, LI SS, FENG T, ZHANG XL, YANG F, CAO WJ, CHEN HJ, LIU HS, ZHANG KS, ZHU ZX, ZHENG HX. African swine fever virus F317L protein inhibits NF- $\kappa$ B activation to evade host immune response and promote viral replication[J]. *Mosphere*, 2021, 6(5): e65821.
- [4] ZHUO YS, GUO ZH, BA TT, ZHANG C, HE LH, ZENG CP, DAI HC. African swine fever virus MGF360-12L inhibits type I interferon production by blocking the interaction of importin  $\alpha$  and NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(2): 176-186.
- [5] ZHAO GH, LI TT, LIU XM, ZHANG TQ, ZHANG ZX, KANG L, SONG J, ZHOU SJ, CHEN X, WANG X, LI JN, HUANG L, LI CY, BU ZG, ZHENG J, WENG CJ. African swine fever virus cysteine protease pS273R inhibits pyroptosis by noncanonically cleaving gasdermin D[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(1): 101480.
- [6] LI JN, SONG J, KANG L, HUANG L, ZHOU SJ, HU L, ZHENG J, LI CY, ZHANG XF, HE XJ, ZHAO DM, BU ZG, WENG CJ. pMGF505-7R determines pathogenicity of African swine fever virus infection by

- inhibiting IL-1 $\beta$  and type I IFN production[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(7): e1009733.
- [7] ZHANG HF, LIU L, LI L. *Lentivirus*-mediated knockdown of Fc $\gamma$ RI (CD64) attenuated lupus nephritis via inhibition of NF- $\kappa$ B regulating NLRP3 inflammasome activation in MRL/lpr mice[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2018, 137(4): 342-349.
- [8] SONG K, LI ST. The role of ubiquitination in NF- $\kappa$ B signaling during virus infection[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 145.
- [9] ZHOU PP, DAI JW, ZHANG KH, WANG T, LI LF, LUO YZ, SUN Y, QIU HJ, LI S. The H240R protein of African swine fever virus inhibits interleukin 1 $\beta$  production by inhibiting *NEMO* expression and NLRP3 oligomerization[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(22): e0095422.
- [10] MARTINON F, TSCHOPP J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2007, 14(1): 10-22.
- [11] RATHINAM VAK, VANAJA SK, FITZGERALD KA. Regulation of inflammasome signaling[J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(4): 333-342.
- [12] FAN WH, CAO Y, JIAO PT, YU P, ZHANG H, CHEN T, ZHOU XT, QI Y, SUN L, LIU D, ZHU HF, LIU WJ, HU RL, LI J. Synergistic effect of the responses of different tissues against African swine fever virus[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(4): e204-e215.
- [13] KARKI R, KANNEGANTI TD. The ‘cytokine storm’: molecular mechanisms and therapeutic prospects[J]. *Trends in Immunology*, 2021, 42(8): 681-705.
- [14] MARCUZZI A, MELLONI E, ZAULI G, ROMANI A, SECCHIERO P, MAXIMOVA N, RIMONDI E. Autoinflammatory diseases and cytokine storms—imbalances of innate and adaptive immunity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 11241.
- [15] KARKI R, SHARMA BR, TULADHAR S, WILLIAMS EP, ZALDUONDO L, SAMIR P, ZHENG M, SUNDARAM B, BANOTH B, MALIREDDI RKS, SCHREINER P, NEALE G, VOGEL P, WEBBY R, JONSSON CB, KANNEGANTI TD. Synergism of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes[J]. *Cell*, 2021, 184(1): 149-168.e17.
- [16] YOON H, HONG SK, LEE I, YOO DS, JUNG CS, LEE E, WEE SH. Clinical symptoms of African swine fever in domestic pig farms in the Republic of Korea, 2019[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020: tbed.13552.