



牛病毒性腹泻病毒 Erns 蛋白激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体诱发细胞焦亡的研究

李园, 韩言言, 钟林翰, 宋京格, 周佳莹, 王美, 徐义刚*

浙江农林大学动物科技学院·动物医学院 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室,
浙江 杭州 311300

李园, 韩言言, 钟林翰, 宋京格, 周佳莹, 王美, 徐义刚. 牛病毒性腹泻病毒 Erns 蛋白激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体诱发细胞焦亡的研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4271-4282.

LI Yuan, HAN Yanyan, ZHONG Linhan, SONG Jingge, ZHOU Jiaying, WANG Mei, XU Yigang. Erns glycoprotein of bovine viral diarrhea virus activates NLRP3 inflammasome to induce pyroptosis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4271-4282.

摘要: 【目的】牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)是引起牛病毒性腹泻-黏膜病的关键病毒。BVDV 的结构蛋白 Erns 可在病毒感染的初期削弱宿主的免疫防御, 引发牛群炎症反应。核苷酸寡聚化结构域样受体(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)炎症小体是 NOD 样受体(NOD-like receptor, NLRs)家族重要成员, 调控炎症性疾病的发生发展, 同时激活的 NLRP3 炎症小体能够引起宿主细胞焦亡, 进而诱发级联放大的炎症反应。但 BVDV Erns 蛋白在 BVDV 感染诱发炎症反应的分子机制尚不清楚。【方法】为进一步探索 Erns 蛋白对 BVDV 感染激活 NLRP3 炎症小体诱发细胞焦亡的影响, 构建了 BVDV Erns 蛋白的真核表达质粒 pCMV-HA-Erns, 过表达 BVDV Erns 蛋白, 检测 BVDV 感染细胞中 NLRP3 炎症小体组分[半胱氨酸蛋白酶(caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)和 NLRP3]、IL-1 β 的 mRNA 转录水平和蛋白表达水平, 以及细胞死亡调节蛋白(gasdermin D, GSDMD)的基因表达和蛋白剪切情况, 并通过扫描电镜观察牛睾丸(bovine testis, BT)细胞膜成孔及 BT 细胞内容物释放情况, 以分析 Erns 蛋白诱导 BT 细胞产生细胞焦亡。【结果】Erns 蛋白能够显著引起 NLRP3 炎症小体活化进而激活 caspase-1, 活化的 caspase-1 一方面切割 GSDMD, 形成有活性的 GSDMD-N 端并在 BT 细胞膜形成孔洞, 释放内容物, 诱导 BT 细胞发生

资助项目: 浙江省自然科学基金(LZ23C180001); 国家自然科学基金(32273017); 浙江农林大学科研发展基金(2021FR034, 2023LFR007)

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LZ23C180001), the National Natural Science Foundation of China (32273017), and the Zhejiang A&F University Research Development Fund (2021FR034, 2023LFR007).

*Corresponding author. Tel: +86-571-61083275, E-mail: yigangxu@zafu.edu.cn

Received: 2023-03-23; Accepted: 2023-06-07; Published online: 2023-06-14

细胞焦亡；另一方面活化的 caspase-1 切割 pro-IL-1 β ，形成有活性的 IL-1 β ，并释放到 BT 细胞外，引起 BT 细胞上清中 IL-1 β 水平上升。【结论】系统解析了 BVDV Erns 蛋白激活 NLRP3 炎症小体介导细胞焦亡的产生，对疫苗及治疗药物的研制具有重要指导意义。

关键词：牛病毒性腹泻病毒；Erns 蛋白；NLRP3 炎症体；细胞焦亡

Erns glycoprotein of bovine viral diarrhea virus activates NLRP3 inflammasome to induce pyroptosis

LI Yuan, HAN Yanyan, ZHONG Linhan, SONG Jingge, ZHOU Jiaying, WANG Mei, XU Yigang*

Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is the key pathogen that causes bovine viral diarrhea-mucosal disease. The structural protein Erns of BVDV can weaken the host immune defense at the initial stage of virus infection and induce an inflammatory response in cattle. Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome is an important member of the NLR family, regulating the occurrence and development of inflammatory diseases. The activated NLRP3 inflammasome can cause pyroptosis of host cells, thereby inducing cascading inflammatory responses. However, the molecular mechanism of the Ern protein in inducing an inflammatory response in BVDV infection remains unclear. **[Methods]** To explore the effect of Erns protein on the NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis during BVDV infection, we constructed a eukaryotic expression plasmid pCMV-HA-Erns to overexpress the Ern protein of BVDV. The mRNA and protein levels of cysteine-dependent aspartate-specific protease 1 (caspase-1), apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), NLRP3, and interleukin-1 beta (IL-1 β) in BVDV-infected cells were determined. The gene expression and cleavage of gasdermin D (GSDMD) were examined. Furthermore, electron microscopy was employed to observe the bovine testis (BT) cells and examine the pyroptosis. **[Results]** The Erns protein significantly activated the NLRP3 inflammasome and caspase-1. The activated caspase-1 cleaved GSDMD to produce active GSDMD-N and create holes on the BT cell membrane for the contents releasing, thereby inducing pyroptosis. Furthermore, the activated caspase-1 cut pro-IL-1 β to produce activated IL-1 β in the BT cell supernatant. **[Conclusion]** We systematically analyze the role of BVDV Erns protein in activating NLRP3 inflammasome to mediate pyroptosis, which is vital for the development of vaccines and therapeutic drugs for the prevention of BVDV.

Keywords: bovine viral diarrhea virus; Erns protein; NLRP3 inflammasome; pyroptosis

牛病毒性腹泻是由牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 引起的一种临床症状复杂且多样的病毒性传染病, 临床主要表现为发热、腹泻、消化道黏膜发炎等炎症反应, 严重影响牛的生产性能, 给养牛产业造成了巨大的损失^[1-2]。因此, 深入探究 BVDV 的感染与致病机理, 有利于该病的预防与治疗。Erns 蛋白又称囊膜蛋白 E0, 属于病毒的结构蛋白^[3]。研究表明, Erns 能够调控感染细胞 RNA 的合成, 可在病毒感染初期削弱宿主的免疫防御^[4]。本实验室前期研究表明, Erns 能够激活 BVDV 感染细胞中的 NF- κ B 信号通路, 导致炎症反应的产生^[5]。NLRP3 炎症小体是 NLRs 家族重要成员, 可识别“危险”信号, 作出免疫应答, 释放成熟炎症因子, 调控炎症性相关疾病的发生发展^[6-7]。孙静宜的研究发现, 丙型肝炎 (hepatitis C virus, HCV) 能够激活 NLRP3, 进而引起细胞焦亡, 导致大量促炎因子释放, 诱发级联放大的炎症反应^[8]。那么 BVDV Erns 蛋白在 BVDV 感染过程中能否激活 NLRP3 炎症小体进而诱发细胞焦亡? 目前尚不清楚, 因此本研究以“Erns-NLRP3 炎症小体-细胞焦亡”为主要路线, 从 Erns 角度探究 BVDV 感染激活 NLRP3 炎症小体介导细胞焦亡的产生, 为进一步解析 BVDV 感染引起炎症反应的机制提供新视角。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备

BVDV ZD-2018 毒株、牛睾丸细胞 (bovine testis, BT cell) 和 293T 细胞由本实验室保存。质粒大提试剂盒和转染试剂 Lipofectamine LTX with PLUS、蛋白质 marker (货号 26616) 购自 Invitrogen 公司; 聚肌胞苷酸 poly I:C、HA (货号 H3663)、Myc 鼠源单克隆抗体 (货号 SAB4200742)、GSDMD 兔多克隆抗体 (货号 G7422)、NLRP3 鼠单克隆抗体 (AMAB90569) 购

自 Sigma 公司; caspase-1 兔多克隆抗体 (货号 E2Z1C)、IL-1 β 兔多克隆抗体 (货号 D3U3E)、HRP/FITC 标记兔抗鼠 IgG 多克隆抗体 (SA00001-19 和 SA00014-3) 以及 HRP/TRITC 标记羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (货号 SA00001-2 和 SA00003-2) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。Erns 蛋白鼠多克隆抗体由实验室自制, *Sfi* I 和 *Xho* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; KOD Plus Neo 高保真酶购自东洋纺公司。

荧光定量仪器 (ABI 7500 real-time PCR), Applied Biosystems 公司; PCR 仪 (Labcyler 系列), Eppendorf 公司; 超微量分光光度计 (Nanodrop one 型号) 购自赛默飞世尔 (中国) 公司; 酶标仪 (RT600), Biometra 公司; 蛋白电泳仪 (DYY-6D), 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像仪 (ZF-288), 上海仪涛生物仪器有限公司。

1.2 引物设计

根据 BVDV ZD-2018 毒株的全基因序列, 设计 *Erns* 基因特异性引物, 在引物的上、下游引物引入 *Sfi* I 和 *Xho* I 酶切位点 (表 1 下划线标示), 根据 NCBI 中已经公布的牛源 *NLRP3*、*ASC*、*caspase-1*、*IL-1 β* 和 *GSDMD-N* 设计 qRT-PCR 引物, 引物序列如表 1 所示。

1.3 基因扩增

提取 BVDV ZD-2018 毒株的 RNA, 转录成 cDNA, 按照 1.2 中设计的引物, 进行 *Erns* 基因的扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 *Erns* 基因的大小, 回收纯化 *Erns* 基因产物。将纯化的 *Erns* PCR 产物与 pMD19-T simple 连接, 连接产物转化入感受态细胞 DH5 α , 挑单菌落接种于 LB 液体培养基, 测序鉴定 *Erns* 基因序列。

1.4 真核表达质粒构建与转染

提取 1.3 中阳性菌的重组质粒, 与真核表达质粒 pCMV 分别进行 *Sfi* I 和 *Xho* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测酶切是否成功, 胶回收双酶切

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| Genes | Sequences (5'→3') | Accession No. |
|-------------------------------|---|----------------|
| <i>Erns</i> | F: TCGGGCCATGGAGGCCGAGAACATAACACAAT R: CGCCTCGAGTTATGCATATGCCCCAAACCATGTCTTACTCT | KC695814.1 |
| <i>NLRP3</i> | F: AAGAAGCTCTGGTTGGTCAGTTGC R: GGAATGGTTGGTGCTCAGGACAG | NM_001102219.1 |
| <i>ASC</i> | F: AGAGGAGCAGTACCAGGCAGTG R: CCAGGTCGTCCACCAGGTAGG | NM_174730.2 |
| <i>caspase-1</i> | F: GCTTGCATCTTCAGGACCAGGAG R: CAACATCAGCTCCGTCTCTTCTGG | XM_002692921.5 |
| <i>IL-1β</i> | F: ATGAAGAGCTGCATCCAACACCTG R: ACCGACACCACCTGCCTGAAG | NM_174093.1 |
| <i>GSDMD-N</i> | F: ACCATCCTGTACGCCTCTGAGAC R: ACCAGTGCTCGTGCTCCAG | XM_019973629.1 |
| β -Actin | F: GCCAACCGTGAGAAGATGAC R: AGGCATACAGGGACAGCAC | BT030480.1 |

The underscore represents the restriction enzyme cutting site.

Erns 基因产物和 pCMV 载体产物, 16 °C 过夜连接, 将连接产物转化至感受态细胞 DH5 α , 挑取单菌落, 进行 PCR 鉴定。制备无内毒素 pCMV-HA-*Erns*。pCMV-Myc-NLRP3 和 pCMV-Myc-ASC 真核表达质粒由实验室前期构建保存。利用 Lip3000 转染试剂将 1.0 μ g pCMV-HA-*Erns* 转染 BT 细胞, 进行 *Erns* 的过表达。同时将 0.5、1.0 和 1.5 μ g 的 pCMV-HA-*Erns* 转染 BT 细胞进行剂量依赖性分析, 进一步鉴定 *Erns* 的过表达对 NLRP3 炎症小体及细胞焦亡的影响。将 1.0 μ g pCMV-HA-*Erns* (本研究构建) 和 1.0 μ g pCMV-Myc-NLRP3 真核表达质粒(实验室前期构建)转染 293T 细胞, 1.0 μ g pCMV-HA-*Erns* (本研究构建) 和 1 μ g pCMV-Myc-ASC 真核表达质粒(实验室前期构建)转染 293T 细胞, 分析 *Erns* 蛋白与 NLRP3 和 ASC 的共定位。

1.5 间接免疫荧光检测蛋白定位

pCMV-HA-*Erns* 转染 BT 细胞, 采用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence technique, IFA)鉴定 *Erns* 表达或分析 *Erns* 在细胞内的定位情况, 具体操作过程如下: 转染 48 h 后, 弃去培养液, 用无菌 PBS 清洗单层细胞; 每孔加入

200 μ L 预冷的 4%多聚甲醛, 室温作用 30 min, 弃上清, 用无菌 PBS 清洗单层细胞; 每孔加入 200 μ L 浓度为 0.2% Triton X-100, 室温作用 10 min; 每孔加入 200 μ L Triton X-100 (0.2%), 室温作用 10 min; 孵育 *Erns* 鼠多克隆抗体(1:150) 和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的兔抗鼠 IgG 多克隆抗体(1:200), 通过激光共聚焦显微镜观察 *Erns* 的表达。

基于 293T 细胞天然缺失 NLRP3 和 ASC 的特性, 选择 293T 细胞进行试验。pCMV-HA-*Erns* 和 pCMV-NLRP 共转染 293T 细胞, pCMV-HA-*Erns* 和 pCMV-Myc-ASC 转染 293T 细胞, 48 h 后收集细胞样本进行固定。采用 IFA 检测 *Erns* 蛋白与 NLRP3, 和 *Erns* 蛋白与 ASC 的共定位, 分别基于转染载体上的标签, 其中 pCMV-Myc-NLRP3 和 pCMV-Myc-ASC 真核表达质粒的标签是 Myc, pCMV-Myc-NLRP3 真核表达质粒的标签是 HA, 分别加入 Myc 和 HA 的鼠单克隆抗体(1:100), TRITC、FITC 标记的 IgG 兔抗鼠多克隆抗体(1:200), 进行 Myc 和 HA 的荧光标记。通过激光共聚焦显微镜观察 BVDV C 蛋白与炎症小体组分 NLRP3 和 ASC 的共定位。

1.6 qRT-PCR 检测 mRNA 转录水平

BT 细胞转染 pCMV-HA-Erns, 以未转染细胞、转染空质粒细胞为阴性对照, 提取细胞总 RNA, 并反转录后为 cDNA。以 β -Actin 为内参, 采用 qRT-PCR 检测炎症小体相关分子的 mRNA 转录水平。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.7 Western blotting 检测蛋白表达水平

BT 细胞转染 pCMV-HA-Erns 后, 提取细胞总蛋白, 配制分离胶和浓缩胶, 加入待蛋白样本, 进行电泳; 电泳结束后, 转膜; 用 0.5% 的脱脂乳溶液封闭膜; 加入稀释的一抗, 37 °C 作用 1 h, 1×磷酸盐吐温缓冲液(phosphate tween buffer, PBST)洗膜; 加入 5% 脱脂乳稀释的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗鼠/兔 IgG 二体, 室温条件下反应 1 h, 1×PBST 洗膜; 进行增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显色, 采集图像。

1.8 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测细胞上清中 IL-1 β 的含量

收集转染 pCMV-HA-Erns、空质粒的 BT 细胞上清和空细胞的 BT 细胞上清。通过 ELISA 试剂盒检测细胞上清中 IL-1 β 的分泌水平, 每孔加入 50 μ L 标准品或样品, 37 °C 反应 30 min; 弃去反应液, 洗涤平板; 每孔加入 50 μ L 酶溶液, 37 °C 反应 30 min; 洗涤平板; 每孔先后加入 50 μ L 显色剂 A 和 50 μ L 显色剂 B, 轻轻晃动混匀, 室温避光作用 20 min; 每孔加入终止液 50 μ L; 测定各孔 OD_{450} 吸光度值。

1.9 扫描电镜观察细胞焦亡

BT 细胞汇合至 80% 时, 感染复数(multiplicity of infection, MOI)=1 感染剂量的 BVDV 感染细胞, 感染后 12 h 和 24 h, 收集细胞样本, 1.0 μ g pCMV-HA-Erns 转染 BT 细胞, 收集转染 12 h 和 24 h 的细胞样本, 无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗单

层细胞, 加入 2.5%、pH 值 7.2 的戊二醛, 4 °C 固定单层细胞; 使用 pH 值 7.2 的 PBS 冲洗单层细胞, 分别采用 50%、70% 和 90% 浓度的乙醇脱水 1 次, 用无水乙醇脱水 3 次; 加入无水乙醇: 叔丁醇=1:1 的混合液置换 15 min, 然后加入纯叔丁醇置换 15 min; 将样品放入 -20 °C 冰箱冷冻 30 min, 放入 ES 2030 型冷冻干燥仪(HITACHI)干燥样品 4 h; 细胞面朝上放置, 使用导电胶将其固定在样品台上, 使用 E 010 型离子溅射镀膜仪(HITACHI)在样品表面镀上一层金属膜; 通过扫描电镜进行细胞膜表面的观察。

1.10 细胞活力检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK8)法检测细胞活性

设正常细胞对照组(不转染质粒)、转染空质粒细胞组(转染 pCMV 质粒)和转染 pCMV-HA-Erns 的 BT 细胞试验组, 每个样本设 6 个重复孔, 转染 6 h 后更换细胞完全培养液; 避光条件下, 每孔加入含 10% CCK-8 的完全培养基, 置培养箱中孵育 1 h; 测定每孔 OD_{450} 。

1.11 数据统计及分析

采用 Graphpad Prism 5.0 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)方法对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异显著(*), $P < 0.01$ 表示差异极显著(**), $P < 0.001$ 表示差异显著(***) , 无显著性差异用 NS 表示(not significant)。

2 结果与分析

2.1 pCMV-HA-Erns 的构建与鉴定

以 BVDV 总 RNA 的反转录产物 cDNA 为模板, 利用设计的引物 PCR 扩增 BVDV Erns 基因, 将 Erns 基因克隆至真核表达载体 pCMV-HA, 转化大肠杆菌感受态细胞, 采用 PCR 方法鉴定重组菌, Erns 基因大小与预期一致, 约为 750 bp (图 1A)。采用瞬时转染方法将 BVDV Erns 真核表达质粒分别转染 BT 细胞和

293T 细胞, 采用 IFA 和 Western blotting 方法检测 Erns 在细胞中的表达情况。IFA 检测结果显示, 转染 pCMV-HA-Erns 的 BT 细胞(图 1B)和 293T 细胞(图 1D)呈现出特异性绿色荧光, 正常细胞对照组未见绿色荧光, 表明目的蛋白获得表达。Western blotting 检测结果显示(图 1B、1D), Erns 蛋白在 BT 细胞和 293T 细胞均成功表达, 免疫印迹条带大小约为 25 ku, 与预期相符。

2.2 Erns 激活 NF- κ B 信号通路的鉴定

为鉴定 Erns 蛋白对 NLRP3 炎症小体的激活, 首先对 Erns 蛋白能否激活 NF- κ B 信号通路进行了分析。将 pCMV-HA-Erns、pRL-TK 内参质粒和 pNF- κ B-Luc 荧光素酶基因质粒共转染 BT 细胞, 以 polyI:C 为阳性对照, 转染等剂量

的 pCMV 质粒为阴性对照, 检测荧光素酶活性。结果如图 1C 所示, 转染 24 h 后, Erns 蛋白能够显著激活 NF- κ B 信号通路。

2.3 NLRP3 炎症小体相关分子的表达检测

通过 qRT-PCR 检测 NLRP3 炎症小体组分 (*NLRP3*、*ASC* 和 *pro-caspase-1*) 及 *pro-IL-1 β* mRNA 转录水平, 如图 2A 所示, 分别将剂量为 0.5、1.0 和 1.5 μ g pCMV-HA-Erns pCMV-HA-Erns 转染 BT 细胞, 采用 qRT-PCR 方法检测 NLRP3 炎症小体组分和 *pro-IL-1 β* mRNA 转录水平的变化。结果显示 NLRP3 炎症小体组分和 *pro-IL-1 β* 的 mRNA 转录水平与 pCMV-HA-Erns 的转染剂量呈正相关。如图 2A 所示, 最终选择 pCMV-HA-Erns 转染剂量为 1.0 μ g, Erns 蛋白可显著激活 NLRP3 炎症小体组分和 *pro-IL-1 β* 的 mRNA 转录。

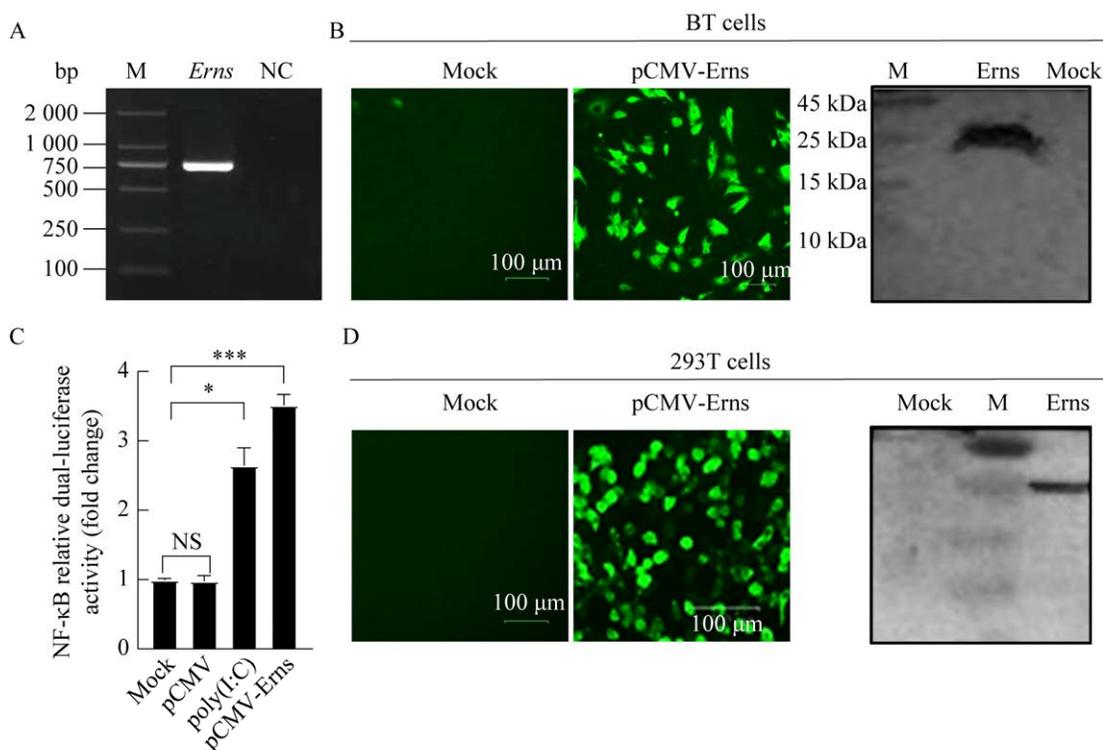


图 1 pCMV-HA-Erns 的鉴定及 NF- κ B 信号通路的激活分析

Figure 1 Identification of pCMV-HA-Erns and activation of NF- κ B signaling pathway. A: Agarose gel electrophoresis of *Erns* gene. B, D: IFA and Western blotting identification of pCMV-HA-Erns eukaryotic expression vector transfected BT cells and 293T cells. D: Activation identification of NF- κ B signaling pathway. NS: No difference; **: Significant difference ($P < 0.01$); ***: Significant difference ($P < 0.001$).

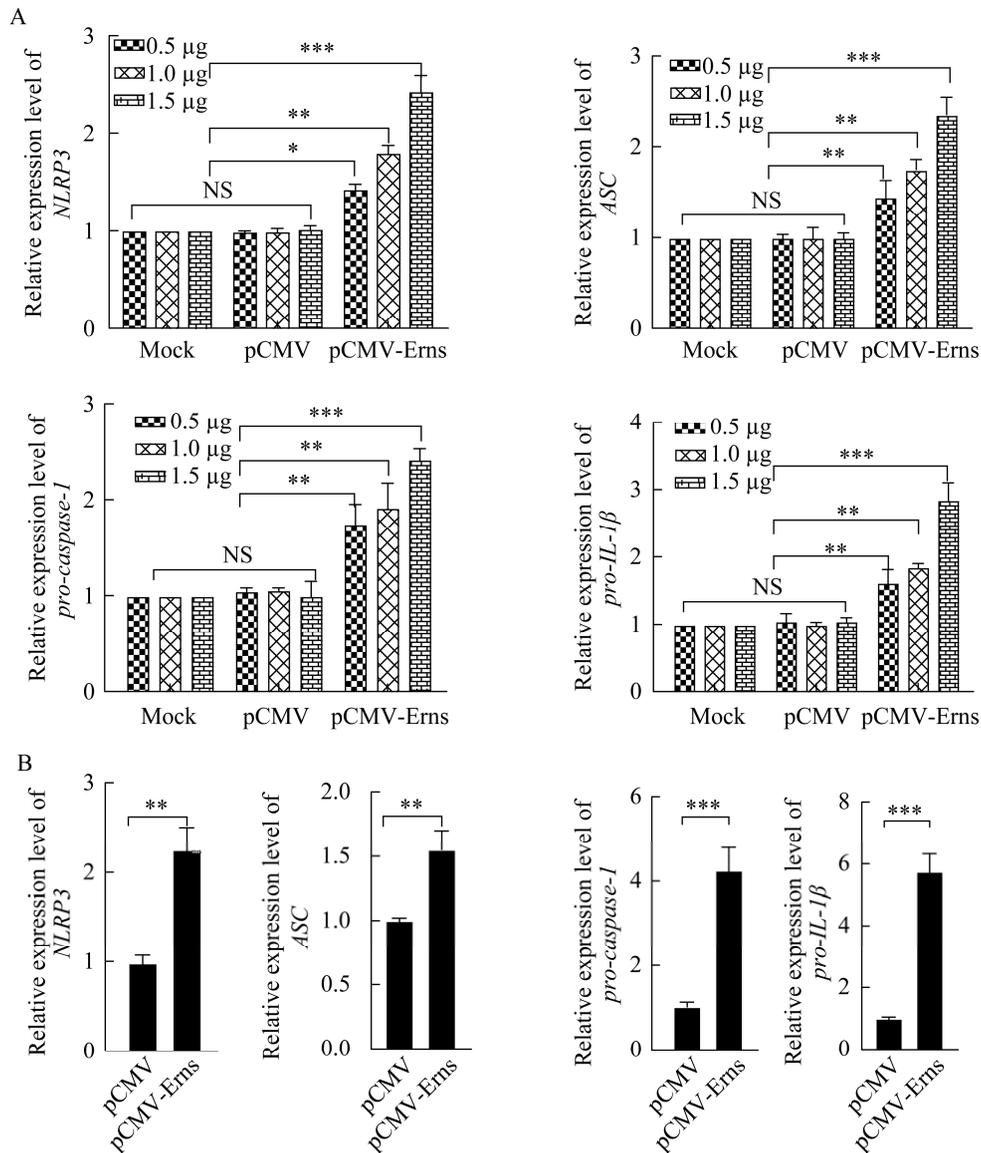


图 2 NLRP3 炎症小体相关分子的 mRNA 转录水平分析

Figure 2 Detection of transcription of NLRP3 inflammasome-associated molecules. A: BT cells transfected with pCMV-HA-Erns recombinant plasmid at doses of 0.5, 1.0, and 1.5 μg , *NLRP3*, *ASC*, *pro-caspase-1*, and *pro-IL-1β* mRNA transcript levels, respectively. B: Analysis of *NLRP3*, *ASC*, *pro-caspase-1*, and *pro-IL-1β* mRNA transcript levels at doses of 1.0 μg . NS: No difference; **: Difference ($P < 0.05$); **: Significant difference ($P < 0.01$); ***: Significant difference ($P < 0.001$).

Western blotting 检测 NLRP3 炎症小体组分、*pro-IL-1β* 和 *IL-1β* 蛋白的表达水平, 如图 3A 所示, Erns 能够激活 NLRP3 炎症小体, 引起 NLRP3 炎症小体组分的蛋白水平的上升。此外, *pro-caspase-1* 发生切割, 会以 P20 活性形

式存在(图 3B), *pro-IL-1β* 也被切割形成有活性的 *IL-1β* (图 3C)。

2.4 Erns 与 NLRP3 炎症小体组分在细胞中的共定位分析

293T 细胞天然缺失 NLRP3 和 *ASC*, 所以

本研究选择实验室前期构建的NLRP3和ASC的真核表达质粒,转染293T细胞,采用Western blotting方法检测NLRP3和ASC在293T细胞中的表达。如图4A所示,NLRP3和ASC均在293T细胞中有效表达。为分析Erns蛋白和炎症小体组分之间是否存在相互作用关系,分别将pCMV-HA-Erns与pCMV-Myc-NLRP3/pCMV-Myc-ASC共转染293T细胞,通过激光共聚焦显微镜观察Erns与NLRP3/ASC在的共定位情况。结果显示,Erns蛋白与NLRP3和ASC存在共定位(图4B、4C)。

2.5 GSDMD的表达、活化与切割检测

GSDMD活化并被切割形成GSDMD-N端是细胞发生焦亡的重要标志。将pCMV-HA-Erns转染BT细胞,分别采用qRT-PCR和Western blotting方法检测GSDMD的转录、蛋白表达、

活化及切割情况。如图5A、5B所示,转染pCMV-HA-Erns后,GSDMD的mRNA转录水平和GSDMD的蛋白表达水平显著上升。同时,Western blotting检测结果显示,GSDMD发生剪切,生成了GSDMD-N端和GSDMD-C端(图5C)。

2.6 细胞焦亡的扫描电镜观察及上清中IL-1 β 的检测

BVDV感染后的BT细胞的电镜观察结果显示,BT细胞感染BVDV 12 h和24 h后,细胞膜表面形成渗透孔,可观察到明显的细胞膜损伤和细胞焦亡的发生(图6A上)。为观察过表达Erns蛋白引起的BT细胞焦亡,通过扫描电镜观察了过表达Erns蛋白12 h和24 h后,BT细胞的细胞膜的损伤及细胞焦亡的发生。结果显示,过表达Erns蛋白后,BT细胞膜会形成渗透孔进

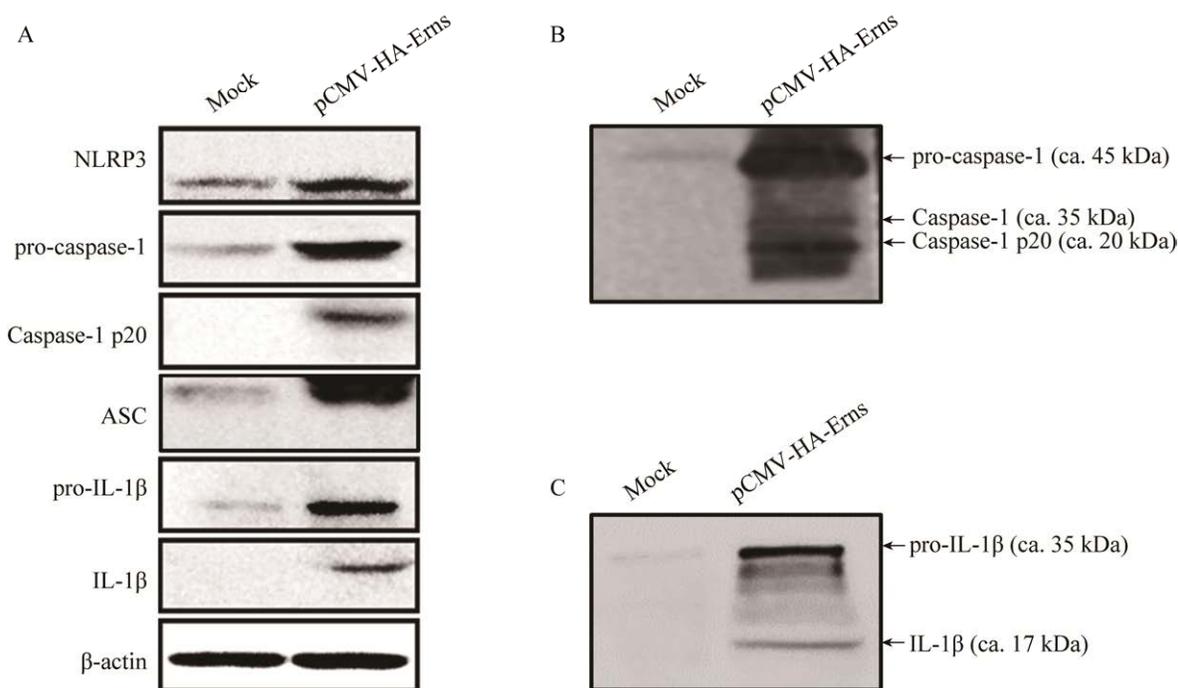


图3 NLRP3炎症小体组分的蛋白表达以及pro-IL-1 β 和pro-caspase-1的切割分析

Figure 3 Protein expression analysis of NLRP3 inflammasome components and cleavage analysis of pro-IL-1 β and pro-caspase-1. A: The protein levels of NLRP3 inflammasome components, pro-IL-1 β and IL-1 β . B: Cleavage of pro-caspase-1. C: Cleavage of pro-caspase-1.

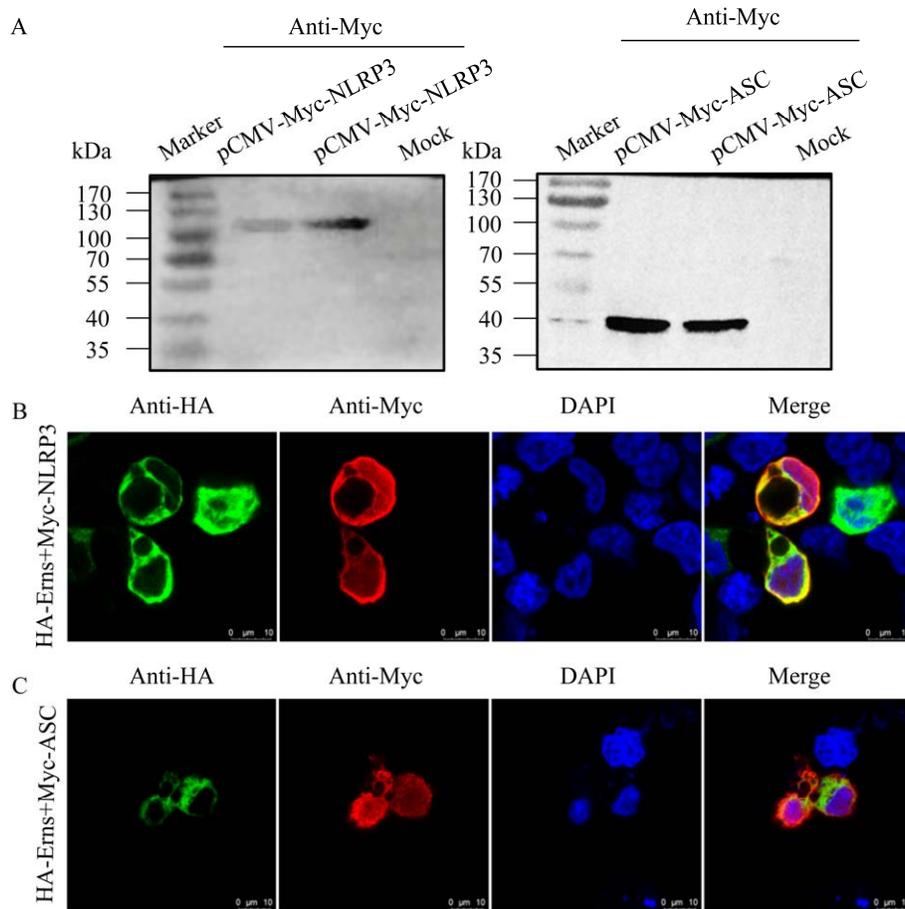


图 4 Erns 与 NLRP3 炎症小体组分在细胞中的共定位分析

Figure 4 Co-localization analysis of Erns and NLRP3 inflammasome components in cells. A: Expression of NLRP3 and ASC in 293T cells after transfection of pCMV-Myc-NLRP3 and pCMV-Myc-ASC. B: Co-localization of Erns protein and NLRP3. C: Co-localization of Erns protein and ASC.

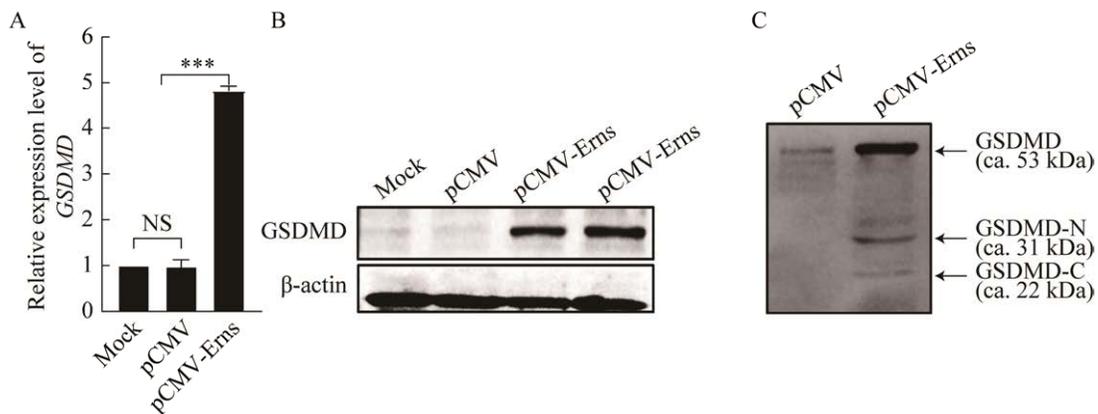


图 5 GSDMD 的表达、活化与切割

Figure 5 Expression, activation and cleavage detection of GSDMD. A: mRNA expression analysis of GSDMD. B: Protein expression analysis of GSDMD. C: Cleavage analysis of GSDMD. NS: No difference; ***: Significant difference ($P < 0.001$).

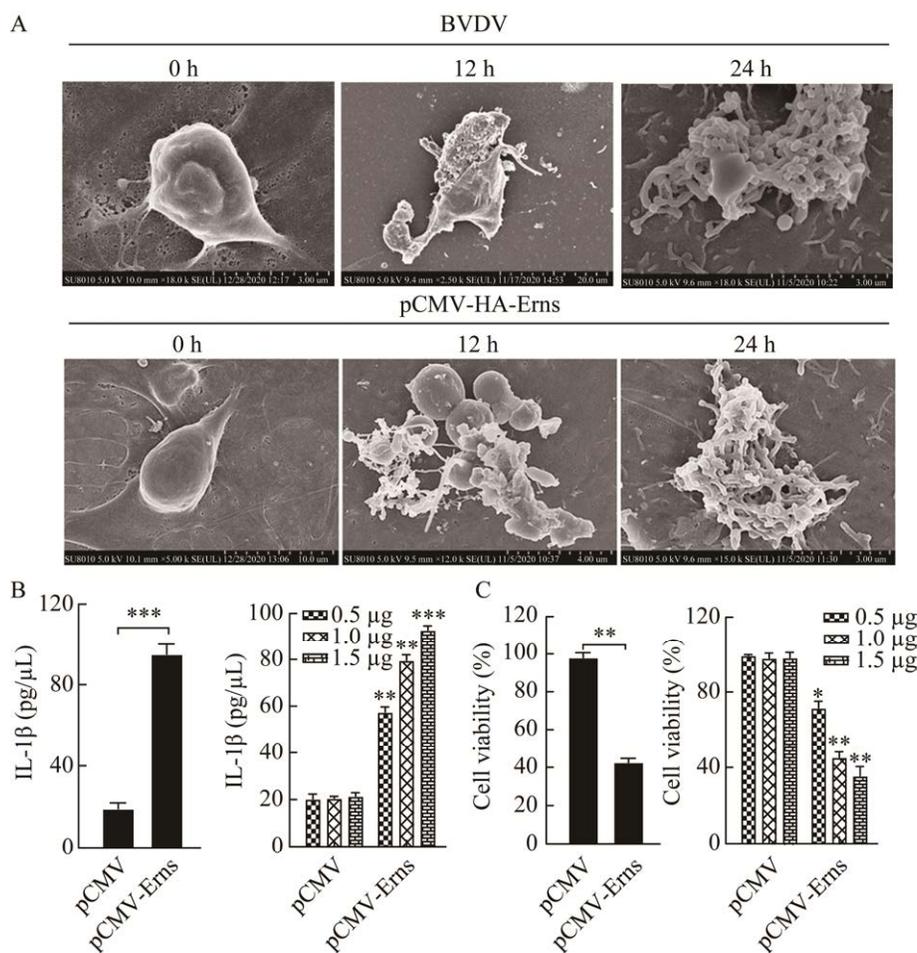


图 6 细胞活性及 IL-1 β 含量分析

Figure 6 Analysis of cell viability and IL-1 β . A: Dynamic observation of pyroptosis induced by Erns protein and BVDV at 0, 12 and 24 h. B: Analysis of the expression level of IL-1 β . C: Detection of cell viability. **: Difference ($P < 0.05$); **: Significant difference ($P < 0.01$); ***: Significant difference ($P < 0.001$).

而引起细胞内容物释放, 并发生细胞焦亡, 相比 BVDV 感染的 BT 细胞, 过表达 Erns 蛋白的 BT 细胞在 12 h 和 24 h 发生的细胞膜损伤更显著(图 6A 下)。通过 ELISA 试剂盒检测了过表达 Erns 蛋白后 BT 细胞上清中 IL-1 β 含量的变化。将剂量为 0.5、1.0 和 1.5 μ g 的 pCMV-HA-Erns 转染 BT 细胞, 发现 BT 细胞清中 IL-1 β 含量与质粒转染剂量呈正相关。最终选择 pCMV-HA-Erns 转染剂量为 1.0 μ g, 结果显示 Erns 蛋白能显著促进 BT 细胞中 IL-1 β 的释放(图 6B)。

2.7 细胞活性检测

采用 CCK-8 方法检测了转染 pCMV-HA-Erns 后 BT 细胞的活性。结果显示, 分别将剂量为 0.5、1.0 和 1.5 μ g 的 pCMV-HA-Erns 转染 BT 细胞, 发现 BT 细胞活性与质粒转染剂量呈负相关。最终选择 pCMV-HA-Erns 转染剂量为 1.0 μ g, Erns 蛋白可显著降低 BT 细胞的活性(图 6C)。

3 讨论与结论

牛病毒性腹泻是由 BVDV 引起的牛的一种

传染性疾病, 该病临床症状复杂多样, 主要表现为发热、腹泻、消化道黏膜发炎、糜烂和坏死、肺炎等炎症反应^[9]。当病毒感染时, 机体通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRRs)、识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)或损伤相关的分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs), 一方面激活干扰素信号通路, 介导干扰素抗病毒免疫反应; 另一方面激活 NF- κ B 信号通路, 诱导促炎因子 IL-1 β 等产生而引起炎症^[10]。炎症反应是机体抵抗外来病原的一种自发性免疫反应, NLRP3 炎症小体属于 NLR 家族, 由 NLRP3 小体、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis associated speck like protein containing a CARD, ASC)蛋白和 caspase-1 组成。NLRP3 炎症体活化受 2 个信号调控: 第一信号为通过激活 NF- κ B 信号通路, 以调节 NLRP3 炎症体的表达; 第二信号为 PAMPs 或 DAMPs 诱导炎症体复合物的组装与活化。目前已发现, 与 BVDV 同属的寨卡病毒和丙肝病毒可引起 NLRP3 的活化, 促进 IL-1 β 的分泌^[11]。本研究发现, BVDV Erns 蛋白均能显著激活 NF- κ B 通路, 同时可以激活 NLRP3 炎症小体组分及 pro-IL-1 β 基因的转录, 促进 NLRP3 炎症小体发生 pro-caspase-1 切割, 生成了具有活性的 caspase-1 蛋白。说明 Erns 蛋白对 BVDV 激活 NLRP3 炎症小体起了主要作用。已有研究显示, 当 NLRP3 炎症小体未激活时, NLRP3 定位于细胞核中。在 THP-1 细胞中稳定表达麻疹病毒(measles virus, MV)的 V 蛋白, V 蛋白与 NLRP3 定位于细胞质中, MV 的 V 蛋白能够活化 NLRP3^[12]。为进一步检测 Erns 蛋白与 NLRP3 炎症小体组分 ASC 和 NLRP3 的互作关系, 将表达 Erns 蛋白的真核表达质粒转染 293T 细胞, 经特异性荧光抗体标记后, 激光共聚焦结果显示, Erns 蛋白与 ASC 蛋白、NLRP3

小体在 293T 细胞中存在共定位关系, 说明 Erns 蛋白可以通过与 ASC/NLRP3 直接作用, 实现对炎症小体的激活。

研究表明, 炎症小体被活化后, 切割 pro-caspase-1 使之成为具有活性的 caspase-1 形式, 活化的 caspase-1 可以切割 GSDMD 蛋白, GSDMD-N 端与细胞膜结合, 在细胞膜上形成孔洞, 导致细胞焦亡发生^[13-14]。登革热病毒的 NS1 蛋白可以激活 NLRP3 炎症小体, 促进 IL-1 β 的释放, 导致细胞焦亡的发生^[15]。本研究发现, Erns 蛋白能够促进 GSDMD 的 mRNA 的转录及蛋白的表达, 以及细胞上清中 IL-1 β 的表达, 同时, Western blotting 方法检测发现 Erns 蛋白促进了 GSDMD 蛋白的剪切, 生成了具有活性的 GSDMD-N 蛋白, 以及 pro-IL-1 β 发生剪切且生成了具有活性的 IL-1 β 。扫描电镜观察发现, 相对于 BVDV 感染的 BT 细胞, 过表达 Erns 蛋白后的 BT 细胞膜上出现了更多渗透孔, 细胞焦亡现象更明显。用 CCK-8 法检测细胞活性, 发现 Erns 蛋白过表达会显著引起 BT 细胞的活性下降。综上所述, 本研究证实 BVDV Erns 蛋白可激活 NLRP3 炎症小体进而诱导细胞焦亡, 为解析 BVDV 感染引起机体炎症反应的致病机理提供了重要依据。

参考文献

- [1] AL-KUBATI AAG, HUSSEN J, KANDEEL M, AL-MUBARAK AIA, HEMIDA MG. Recent advances on the bovine viral diarrhea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 665128.
- [2] 李宇, 郑培育, 胡文昊, 朱洪涛. 牛病毒性腹泻病的危害及防制分析[J]. *吉林畜牧兽医*, 2023, 44(1): 78-79. LI Y, ZHENG PY, HU WH, ZHU HT. Analysis on the harm and prevention of bovine viral diarrhea[J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023, 44(1): 78-79 (in Chinese).

- [3] 郗珊珊, 张玲艳, 贾伟娟, 何云江, 马德慧, 王学理. 牛病毒性腹泻病毒结构蛋白功能研究进展[J]. 病毒学报, 2022, 38(5): 1244-1252.
CHI SS, ZHANG LY, JIA WJ, HE YJ, MA DH, WANG XL. Research progress on the function of the structural proteins of the bovine viral diarrhoea virus[J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 38(5): 1244-1252 (in Chinese).
- [4] LAZAR C, ZITZMANN N, DWEK RA, BRANZA-NICHITA N. The pestivirus Erns glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions[J]. Virology, 2003, 314(2): 696-705.
- [5] FAN WL, WANG YX, JIANG S, LI Y, YAO X, WANG M, ZHAO JH, SUN XB, JIANG XX, ZHONG LH, HAN YY, SONG HH, XU YG. Identification of key proteins of cytopathic biotype bovine viral diarrhoea virus involved in activating NF- κ B pathway in BVDV-induced inflammatory response[J]. Virulence, 2022, 13(1): 1884-1899.
- [6] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN YH, HE Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(13): 3328.
- [7] 刘霜, 张成剑. NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 对 H1N1 病毒感染模型小鼠肺脏的保护作用研究[J]. 病毒学报, 2022, 38(4): 814-820.
LIU S, ZHANG CJ. Protective effect of an inhibitor of the NLRP3 inflammasome, MCC950, on the lungs of H1N1 Virus Infected mice[J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 38(4): 814-820 (in Chinese).
- [8] 孙静宜, 蒋伟. NLRP3 炎症小体在乙型肝炎病毒相关性肾炎足细胞焦亡中的作用[J]. 临床医学进展, 2022, 12(8): 7012-7025.
SUN JY, JIANG W. Role of NLRP3 inflammasome in podocyte pyroptosis in hepatitis B virus-associated nephritis[J]. Advances in Clinical Medicine, 2022, 12(8): 7012-7025 (in Chinese).
- [9] 吕双燕. 牛病毒性腹泻诊断与防控[J]. 畜牧兽医学(电子版), 2021(18): 74-75.
LV SY. Diagnosis and control of bovine viral diarrhoea[J]. Graziery Veterinary Sciences (Electronic Version), 2021(18): 74-75 (in Chinese).
- [10] NEGASH AA, OLSON RM, GRIFFIN S, GALE M. Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(2): e1007593.
- [11] 李媛媛, 马旭升, Mohiuddin, 郑海学, 刘湘涛, 马永华. A 型塞内卡病毒激活炎症因子表达及诱导细胞焦亡[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(5): 586-594.
LI YY, MA XS, MOHIUDDIN, ZHENG HX, LIU XT, MA YH. Seneca virus A activates the expression of inflammatory factors and induces pyroptosis[J]. Chinese Veterinary Science, 2022, 52(5): 586-594 (in Chinese).
- [12] KOMUNE N, ICHINOHE T, ITO M, YANAGI Y. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion[J]. Journal of Virology, 2011, 85(24): 13019-13026.
- [13] 王舒舒, 吴一凡, 阙加群, 何飞, 郑祥. 巨细胞病毒感染诱发高血压血管病变的细胞焦亡机制[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(18): 2778-2782.
WANG SS, WU YF, QUE JQ, HE F, ZHENG X. Mechanism of pyroptosis in hypertensive vascular disease induced by cytomegalovirus infection[J]. Chinese Journal of Hospital Infection, 2021, 31(18): 2778-2782 (in Chinese).
- [14] 邵青青, 陈琢, 段倩旎, 刘桐, 黄聪. 炎症小体介导的焦亡在宿主细胞抵御病毒感染中的作用及机制[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2019, 48(4): 488-491, 496.
SHAO QQ, CHEN Z, DUAN QN, LIU T, HUANG C. The role and mechanism of inflammasome-mediated pyroptosis in host cell defense against virus infection[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Edition), 2019, 48(4): 488-491, 496 (in Chinese).
- [15] SUWANMANEE S, LUPLERTLOP N. Immunopathogenesis of dengue virus-induced redundant cell death: apoptosis and pyroptosis[J]. Viral Immunology, 2017, 30(1): 13-19.