



非洲猪瘟病毒 D1133L 蛋白增加宿主波形蛋白磷酸化而促进病毒在猪巨噬细胞中的复制

陈玲玲^{1,2}, 张婷², 郝雨², 杨金柯², 史喜娟², 张大俊², 杨行², 赵登率², 闫文倩², 别鑫恬², 陈国辉², 郑海学², 乐涛^{1*}, 张克山^{2*}

1 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331

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 730000

陈玲玲, 张婷, 郝雨, 杨金柯, 史喜娟, 张大俊, 杨行, 赵登率, 闫文倩, 别鑫恬, 陈国辉, 郑海学, 乐涛, 张克山. 非洲猪瘟病毒 D1133L 蛋白增加宿主波形蛋白磷酸化而促进病毒在猪巨噬细胞中的复制[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 720-732.
CHEN Lingling, ZHANG Ting, HAO Yu, YANG Jinke, SHI Xijuan, ZHANG Dajun, YANG Xing, ZHAO Dengshuai, YAN Wenqian, BIE Xintian, CHEN Guohui, ZHENG Haixue, LE Tao, ZHANG Keshan. D1133L protein of African swine fever virus promotes virus replication in pig macrophages by increasing vimentin phosphorylation in the host[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 720-732.

摘要: 非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染引起家猪和野猪的一种高死亡率的传染性疾病。ASFV 具有庞大的基因组, 其中非结构蛋白 pD1133L 被预测为其编码的 6 个解旋酶之一。本实验室应用免疫沉淀-质谱联用(immunoprecipitation-mass spectrometry, IP-MASS)技术筛选与 pD1133L 互作的宿主细胞蛋白, 发现细胞波形蛋白(vimentin, VIM)为 pD1133L 互作的宿主蛋白之一, 但尚不清楚宿主蛋白 VIM 对 ASFV 复制的影响。【目的】探究 ASFV 与 VIM 的相互调控作用, 揭示 VIM 促进 ASFV 复制的机制。【方法】通过免疫共沉淀

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1801300); 甘肃省科技重大专项计划(21ZD3NA001-5, 20ZD7NA006); 甘肃省科技计划(21JR7R024); 动物用生物制品创制与应用(21ZD3NA001); 国家生猪产业体系(CARS-35); 国家生猪技术创新中心先导科技项目(NCTIP-XD/C03); “十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2022SDZG02); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2022-LVRI)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801300), the Gansu Provincial Science and Technology Major Special Program (21ZD3NA001-5, 20ZD7NA006), the Gansu Province Science and Technology Plan (21JR7R024), the Creation and Application of Biological Products for Animal Use (21ZD3NA001), the National Swine Industry System (CARS-35), the National Swine Technological Innovation Centre Pilot Science and Technology Program (NCTIP-XD/C03), the “14th Five-year Plan” Guangdong Province Agricultural Science and Technology Innovation Ten Major Directions “Listed and Commanded” Project (2022SDZG02), and the Chinese Academy of Agricultural Sciences Science and Technology Innovation Project (CAAS-ASTIP-2022-LVRI).

*Corresponding authors. E-mail: LE Tao, letao@cqnu.edu.cn; ZHANG Keshan, vtzks009@126.com

Received: 2023-07-20; Accepted: 2023-12-06; Published online: 2023-12-18

(co-immunoprecipitation, Co-IP)试验验证 pD1133L 与 VIM 存在互作关系; 外源过表达 VIM 蛋白以及设计并合成 VIM 的 siRNA 探究 VIM 对 ASFV 复制的影响; 利用 Western blotting 以及荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)方法检测 ASFV 对 VIM 蛋白水平以及转录水平的影响; 通过 Western blotting、间接免疫荧光试验(immunofluorescence assay, IFA)探究巨噬细胞感染 ASFV 后 VIM 磷酸化水平变化以及亚细胞定位变化情况; CCK-8 试剂盒检测 VIM 磷酸化抑制剂 KN-93 处理的最佳浓度, 并利用 Western blotting 以及 IFA 检测 KN-93 对 VIM 磷酸化、亚细胞定位以及对 ASFV 复制影响。【结果】VIM 过表达促进 ASFV 复制, 敲低 VIM 的表达则抑制 ASFV 复制; ASFV 感染抑制 VIM 蛋白水平以及转录水平表达, 且呈时间依赖性; ASFV 感染后 VIM 发生磷酸化修饰且发生亚细胞定位改变, 从而促进 ASFV 复制。【结论】证实了 ASFV 与宿主蛋白 VIM 之间的相互调控作用; 初步确定 ASFV 感染后 VIM 受到 ASFV pD1133L 调控, 亚细胞定位发生重排向核周聚集从而促进 ASFV 复制的机制。

关键词: 非洲猪瘟病毒; D1133L 蛋白; 波形蛋白; 蛋白互作; 磷酸化

D1133L protein of African swine fever virus promotes virus replication in pig macrophages by increasing vimentin phosphorylation in the host

CHEN Lingling^{1,2}, ZHANG Ting², HAO Yu², YANG Jinke², SHI Xijuan², ZHANG Dajun², YANG Xing², ZHAO Dengshuai², YAN Wenqian², BIE Xintian², CHEN Guohui², ZHENG Haixue², LE Tao^{1*}, ZHANG Keshan^{2*}

1 College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine and Biosafety, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: African swine fever (ASF) caused by African swine fever virus (ASFV) is a severe infectious disease affecting both domestic pigs and wild boar. ASFV has a large genome, and the non-structural protein pD1133L is predicted to be one of the six helicases the genome encodes. We used the IP-MASS technology to screen the host proteins interacting with pD1133L and found that vimentin (VIM) is one of the host proteins that interacted with pD1133L. However, it remains unclear how the VIM affects ASFV replication. **[Objective]** To investigate the mutual regulation between ASFV and VIM and disclose the mechanism by which VIM enhances ASFV replication. **[Methods]** We employed the Co-IP assay to examine the interaction between pD1133L and VIM. Furthermore, we examined the effects of VIM on ASFV replication by designing and synthesizing VIM siRNAs and overexpressing VIM. Western blotting and quantitative real-time PCR (qPCR) were employed to determine the impact of ASFV on the protein and mRNA levels of VIM. Western blotting and indirect

immunofluorescence assay (IFA) were used to explore the changes in the phosphorylation level and subcellular localization of VIM in macrophages infected with ASFV. The CCK-8 kit was used to determine the optimal concentration of KN-93, a VIM phosphorylation inhibitor, for treatment. The effects of KN-93 on the phosphorylation and subcellular localization of VIM and the replication of ASFV were examined by Western blotting and IFA. **[Results]** The overexpression of VIM promoted the replication of ASFV, while the knockdown of VIM inhibited ASFV replication. In addition, ASFV infection down-regulated both the protein and mRNA levels of VIM in a time-dependent manner. After ASFV infection, VIM was modified by phosphorylation and changed in subcellular localization, thereby promoting ASFV replication. **[Conclusion]** This study confirms the interaction between ASFV and the host protein VIM. After ASFV infection, pD1133L leads to the rearrangement of the subcellular localization of VIM towards paranuclear aggregation, which promotes ASFV replication.

Keywords: African swine fever virus (ASFV); D1133L protein; vimentin; protein-protein interaction; phosphorylation

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种具有高度传染性和高致死率的疾病^[1], 该病 2018 年传入我国以来, 对养猪行业造成了极大的经济损失, 目前在越南已推广使用 ASFV 弱毒活疫苗^[2]。ASFV 是非洲猪瘟相关病毒科(Asfarviridae)的成员, 是一种核胞质大型 DNA 病毒, 也是目前唯一已知的 DNA 虫媒病毒; 该病毒分离株可分为高、中和低毒力, 受感染家猪的临床表现因感染病毒株的毒力、途径、感染剂量以及宿主的遗传背景和饲养状态而异^[3]。

ASFV 病毒粒子呈正二十面体对称结构, 由内到外分为类核、核心壳、内膜、衣壳和外囊膜 5 层结构^[4]。ASFV 是一种有囊膜的双链 DNA 病毒, 其基因组为 170–193 kb, 包含 151–167 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码 150–170 个蛋白^[5]。ASFV 编码 6 种解旋酶蛋白, 分别命名为 pD1133L、pB962L、pQP509L、pQ706L、pA859L 以及 pC962R, 均属于解旋酶超家族 II 成员^[6–7]。其中, pD1133L 是一种中晚期表达蛋白, 同时分布于细胞质和细胞核, 可能参与病毒转录过程^[8]。前期研究表明, pD1133L

对 ASFV 复制至关重要, 条件性敲除 *D1133L* 基因的 ASFV 重组病毒相对于亲本毒株的复制能力明显减弱^[9]。本实验室前期通过免疫沉淀-质谱联用(immunoprecipitation-mass spectrometry, IP-MASS)技术筛选、鉴定, 构建了可能与 pD1133L 互作的宿主蛋白质网络^[10], 其中波形蛋白(vimentin, VIM)为 pD1133L 互作的候选宿主蛋白之一, 但其具体机制尚未明确, 仍待进一步探究。

VIM 是中间丝(intermediate filament, IF)蛋白家族中表达广泛和高度保守的蛋白之一, 在病毒感染中发挥至关重要的作用^[11]。虽然 VIM 主要存在于细胞质中, 但同样以分泌形式出现在多种细胞表面, 例如上皮细胞、巨噬细胞和成纤维细胞等^[12]。细胞表面 VIM 可作为辅助性受体促进病毒结合和进入过程, 据报道, 细胞表面 VIM 可作为 SARS-CoV-2 刺突蛋白 ACE2 结合的辅助受体, 从而促进病毒对上皮细胞的侵袭^[13–14]。病毒侵入细胞后, 细胞内 VIM 通过磷酸化等翻译后修饰调节其溶解度与聚合形式的转变, 劫持细胞骨架以促进其在细胞中的进一步运输^[15]。有研究表明, VIM 在猪瘟病毒

(classical swine fever virus, CSFV)感染期间与非结构蛋白 NS5A 相互作用, 发生磷酸化重排形成笼状结构, 将 NS5A 招募到内质网(endoplasmic reticulum, ER)促进病毒复制复合物(viral replication complex, VRC)形成^[16]。钙调蛋白依赖性激酶 II 型 γ (calcium calmodulin-dependent protein kinase II gamma, CaMKII γ)介导的 VIM 磷酸化由于改变了 VIM 在细胞质中的分布而促进猪圆环 2 型病毒(porcine circovirus type 2, PCV2)在宿主体内的复制^[17]。此外, 寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)在感染过程中, VIM 在病毒蛋白合成阶段发生剧烈重组, 形成包围并聚集于 VRC 周围的核周笼形结构以促进病毒复制^[18]。然而, 关于 VIM 在 ASFV 感染过程中的调控作用, 目前尚未有明确的研究结果。

为探究宿主蛋白 VIM 在 ASFV 感染期间的综合变化情况以及 VIM 对 ASFV 复制的影响, 本研究利用过表达以及敲低 VIM 分析了 VIM 对 ASFV 复制的影响; 使用 Western blotting 和荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)验证了 ASFV 感染期间 VIM 蛋白水平以及转录水平的变化情况; 通过间接免疫荧光试验 (immunofluorescence assay, IFA) 以及 Western blotting 确定了 ASFV 复制后可发生 VIM 磷酸化并引起亚细胞定位发生改变, 该动力学现象的发生由 ASFV 编码的 pD1133L 调控。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophages, PAMs)、骨髓巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs)、恒河猴肾细胞(MA-104)、人胚肾细胞(HEK-293T)均由中国农业科学院兰州兽医研究所非洲猪瘟区域实验室保存提供, 所有细胞均在 5% CO₂、37 °C

的环境中培养。

ASFV 毒株(CN/GS/2018 株)由中国农业科学院兰州兽医研究所 ASFV 区域实验室提供。本研究与 ASFV 相关的试验均在中国农业科学院兰州兽医研究所动物生物安全三级实验室(animal biosafety level 3 laboratory, ABSL-3)中进行。

1.2 抗体、质粒和试剂

兔抗 VIM (10366-1-AP)、抗 β -actin 单克隆抗体 (81115-1-RR) 购自 Proteintech 公司; Anti-Phospho-(Ser/Thr) Phe 抗体(ab17464)购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (A21020)和山羊抗鼠 IgG (H+L)抗体(A21010)购自 Abbkine 公司; 针对 ASFV pD1133L 和 p72 的鼠单克隆抗体由本实验室制备。

将 ASFV *D1133L* 基因(GenBank 登录号: 41901314)插入到 pcDNA3.1(+)表达载体, 构建真核表达质粒 pcDNAFlag-*D1133L*; 将猪源 VIM 基因(GenBank 登录号: 100522394)插入到 pcDNA3.1(+)表达载体, 构建真核表达质粒 pcDNAMyc-*VIM*。真核表达质粒由武汉金开瑞生物工程有限公司构建。

高糖 DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Lipofectamine 2000、Lipofectamine RNAiMAX、0.25% EDTA 胰酶均购自 Gibco 公司; PBS、10 \times 多聚赖氨酸、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)、三抗混合溶液购自 Solarbio 公司; 化学发光底物 (enhanced chemiluminescence, ECL)显色液购自 Advansta 公司; RNA 抽提试剂 TRIzol Reagent 购自 ThermoFisher Scientific 公司; TB GreenTM Premix *Ex Taq*TM II、PrimeScriptTM RT Master Mix、2 \times Pro *Taq* HS Probe Premix 购自 TaKaRa 公司; 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; 4',6-二

脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)荧光染料购自 Beyotime 公司。

1.3 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)试验

用含蛋白酶抑制剂的 NP40 缓冲液将细胞样品刮取下来,在 4 °C 条件下翻转裂解 1 h,然后对样品进行超声处理 1.5 min,间隔 5 s(频率为 20 kHz,输出强度为 30%)。12 000 r/min 离心 5 min 去除细胞碎片,保留上清细胞裂解液。将细胞裂解液与相应的标签抗体、IgG 抗体以及 Protein G 琼脂糖凝珠在 4 °C 孵育过夜。第 2 天,用 NP-40 缓冲液洗涤 Protein G 琼脂糖凝珠 3 次,每次 10 min。12 000 r/min 离心 10 min 破碎 Protein G 琼脂糖凝珠,加入蛋白上样缓冲液,进行后续 Western blotting 试验。

1.4 细胞瞬时转染

1.4.1 VIM 过表达试验

使用 Lipofectamine 2000 细胞转染试剂完成细胞瞬时转染。将 MA-104 细胞铺于 12 孔板中,待细胞密度至 70%–80% 时,使用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行转染,6 h 后更换细胞培养液,然后以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=1 剂量感染 ASFV 细胞,病毒感染 24 h 后收集细胞样品,通过 qPCR 分析 VIM 过表达对 ASFV 复制的影响。

1.4.2 siRNA 转染试验

针对 VIM 特异性 siRNA 序列由上海吉玛制药技术有限公司合成(表 1)。使用 Lipofectamine RNAiMAX 进行转染,将 VIM 特异性 siRNA 序列转染到 PAMs 细胞中,转染 6 h 后换液,转染 24 h 后收集细胞样品,分析 VIM siRNA 干扰效率;VIM siRNA 转染 6 h 后更换培养液,然后进行以 MOI=1 剂量感染 ASFV,病毒感染 24 h 后收集细胞样品,分析 VIM 对 ASFV 复制的影响。

1.5 荧光定量 PCR

1.5.1 相对定量

收集细胞样品,用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并通过反转录获得 cDNA,以 GAPDH mRNA 水平为内参值进行检测。PCR 反应体系(10 μL): cDNA(浓度为 200 ng/μL) 1 μL, DEPC 水 3 μL, TB Green™ Premix Ex Taq™ II 5 μL, 上下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s; 60 °C 34 s,共 40 个循环。相对定量引物序列见表 2,引物序列由奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.5.2 绝对定量

收集细胞样品,反复冻融 3 次使细胞破碎,12 000 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片。PCR 反应体系(25 μL): 上、下游引物(10 μmol/L)及探

表 1 靶向 VIM 的 siRNA 序列

Table 1 siRNAs against the VIM gene

Name of siRNAs	Primers (5'→3')
siRNA-1475-VIM	Sense: CCAUCAACACCGAGUUCAATT Antisense: UUGAACUCGGUGUUGAUGGTT
siRNA-2415-VIM	Sense: GGAGAAGAGAGCAGGAUUUTT Antisense: AAAUCCUGCUCUCUUCUCCTT
siRNA-2545-VIM	Sense: CCAGAGAUGGACAGGUUAUTT Antisense: AUAACCUGUCCAUCUCUGGTT

表 2 本研究所用引物及序列

Table 2 The primers and sequences used in this study

Genes	Primers (5'→3')
<i>p30</i>	Forward: GATCGGTGTGCCTGCCTTC Reverse: CGTTGCTGCGACCCTTGT
<i>p72</i>	Forward: ATGAAATGATGCCATCCCATTG Reverse: CATTCAAGTGCTGTCTGACATG
<i>D1133L</i>	Forward: GATTCGCGATGAGCACACAC Reverse: CACAATCACCTTGGACCCGA
<i>VIM</i>	Forward: CATCAACACCGAGTTCAAGAAC Reverse: CTCGGCTAGCAGAATCTTGTTTC
<i>GAPDH</i>	Forward: ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA Reverse: GATCGAGTTGGGGCTGTGACT

针引物各 1 μL , 病毒上清 3 μL , DEPC 水 6.5 μL , 2 \times Pro Taq HS Probe Premix 12.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 7 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 共 4 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 6 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 11 s, 共 40 个循环。所用针对 ASFV *p72* 的绝对定量引物序列以及探针引物序列见表 3。

1.6 Western blotting 检测

收集细胞样品, 加入蛋白上样缓冲液置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中煮沸 10 min 使蛋白充分变性, 12 000 r/min 离心 5 min。使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(80 V、30 min; 120 V、60 min)分离蛋白。在 100 V、90 min 冰浴条件下转膜, 5% BSA 常温条件下封闭, 用 TBST (含有 0.1% Tween-20) 洗涤 3 次, 每次 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育抗体过夜, 用 TBST 洗 3 次, 每次 5 min。然后加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h 后, 使用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后, 用 ECL 化学发光显色液进行显色。

1.7 红细胞吸附试验(50% Hemadsorbing dose, HAD₅₀)

将 PAMs 进行 UT、DMSO、KN-93 不同处理(UT 组: 未进行 DMSO 或 KN-93 处理, 感染 ASFV; DMSO 组: DMSO 处理, 感染 ASFV; KN-93 组: KN-93 处理, 感染 ASFV)后感染 ASFV, 在不同时间点收取样品并进行冻融两次。采取健康猪的抗凝全血, 用含 1%两性霉素、庆大霉素的 PBS 进行清洗, 3 000 r/min 离心 5 min; 清洗至离心后上清液近似为无色透明即可得到猪红细胞。将 PAMs 铺入 96 孔板, 每孔加入

20 μL 的猪红细胞(400 倍稀释)。将不同处理组样品进行梯度稀释, 从 10^{-1} – 10^{-7} , 接入含 PAMs 和红细胞的 96 孔板中, 每个稀释度样品设置 8 个重复孔。连续读板 7 d, 观察红细胞吸附现象。按照 Reed-Muench 法计算 HAD₅₀。

1.8 间接免疫荧光试验

使用 1 \times 多聚赖氨酸(PBS 稀释)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被共聚焦小皿 1 h, 干燥后将 MA-104 细胞铺于共聚焦小皿内, 培养至 60%–70% 汇合度, 将 pcDNA-Flag-*D1133L* 真核表达质粒转染至细胞, 放置培养箱培养 24 h 后处理样品。样品中加入 1 mL 4%多聚甲醛室温固定 1 h; 用 PBS 清洗后, 每个皿加入 500 μL 的 0.3% Triton X-100 室温通透 1 h; 用 PBS 清洗后, 使用 5% BSA 常温封闭 1.5 h; 然后加入用 5% BSA (用 PBS 稀释)稀释的 Flag 抗体以及 VIM 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育; 第二天回收抗体, 用 PBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 加入荧光素标记的抗体(Alexa Fluor 488 抗兔抗体以及 Alexa Fluor 594 抗鼠抗体), 室温孵育 2 h; 用 PBST 清洗后, 加 DAPI 荧光染料染色细胞核 10 min。使用激光共聚焦仪器观察荧光, 并保存图片。

使用 1 \times 多聚赖氨酸在 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被共聚焦小皿 1 h, 干燥后将 BMDMs 铺至共聚焦小皿内, 6 h 后 ASFV (MOI=1)感染细胞, 不同时间点后处理样品, 步骤同上。

1.9 数据的统计学分析

所有涉及统计学分析的数据至少重复 3 次。以“平均数 \pm 标准差”表示, 用 *t* 检验分析数据平均值间的统计学差异, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 pD1133L 和 VIM 相互作用

本实验室前期筛选的与 ASFV pD1133L 互作

表 3 ASFV *p72* 绝对定量引物

Gene	Primers (5'→3')
<i>p72</i>	Forward: GATACCACAAGATCAGCCGT Reverse: CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA
TaqMan probe	CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG

的候选宿主蛋白数据表明, VIM 与其存在互作关系^[10]。为进一步验证 VIM 与 ASFV pD1133L 的相互作用关系, 在 HEK-293T 细胞中分别将空载体 pcDNA3.1(+) 与 pFlag-*D1133L* 以及 pFlag-*D1133L* 与 pMyc-*VIM* 共转染, 转染 6 h 后更换为正常培养基, 24 h 后收取样品, 分别使用两种标签抗体孵育的 Protein G 进行 Co-IP 试验。结果表明, VIM 与 ASFV pD1133L 存在相互作用(图 1)。

2.2 VIM 促进 ASFV 的体外复制

为确定宿主 VIM 对 ASFV 复制的影响, 转染 pcDNA-Flag-*D1133L* 至 MA-104 细胞, 转染 24 h 后, 更换培养基, 用 ASFV CN/GS/2018 株 (MOI=1) 感染 MA-104 细胞, 感染后 24 h 收取细胞样品检测其对 ASFV 复制的影响, qPCR 结果表明随着 VIM 表达量的增加, ASFV *p30*、*p72* 转录水平显著高于对照组(图 2A、2B), 过表达 VIM 后, 病毒基因组拷贝数也显著高于对照组(图 2C)。综上所述, 在 MA-104 细胞上过表达 VIM 促进 ASFV 复制。

为进一步确定 VIM 促进 ASFV 复制的调控作用, 针对 VIM 设计合成 3 对特异性的 siRNA (表 1) 分别转染至 PAMs 中。在感染后 24 h 收取样品, 用 qPCR 检测 VIM 表达水平, 筛选出干扰

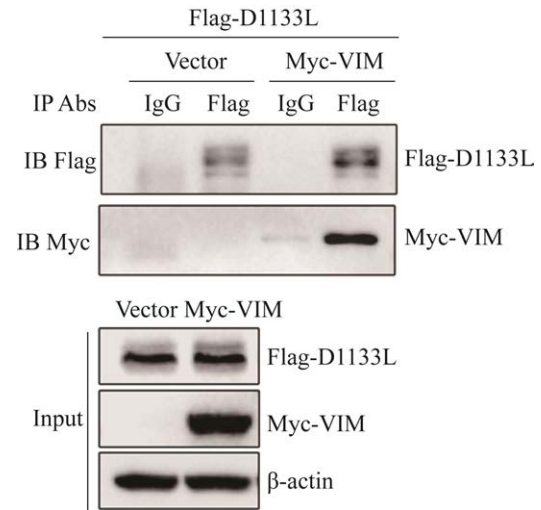


图 1 VIM 与 ASFV pD1133L 存在相互作用
Figure 1 The interaction between VIM and ASFV pD1133L was confirmed through Co-IP experiments.

效果最明显的序列。结果显示, siRNA-2415-*VIM* 的干扰效果最好(图 3A)。在 PAMs 转染 siRNA-2415-*VIM* 后以 MOI=1 剂量感染 ASFV, 进一步探究 VIM 对 ASFV 复制影响。qPCR 结果表明, 敲低 VIM 基因后, ASFV *p30*、ASFV *p72* 转录水平显著低于 NC (阴性对照组)(图 3B、3C), *p72* 蛋白表达显著低于 NC 组(图 3D)。综上所述, 敲低 PAMs 中 VIM 表达水平会显著抑制 ASFV 复制。

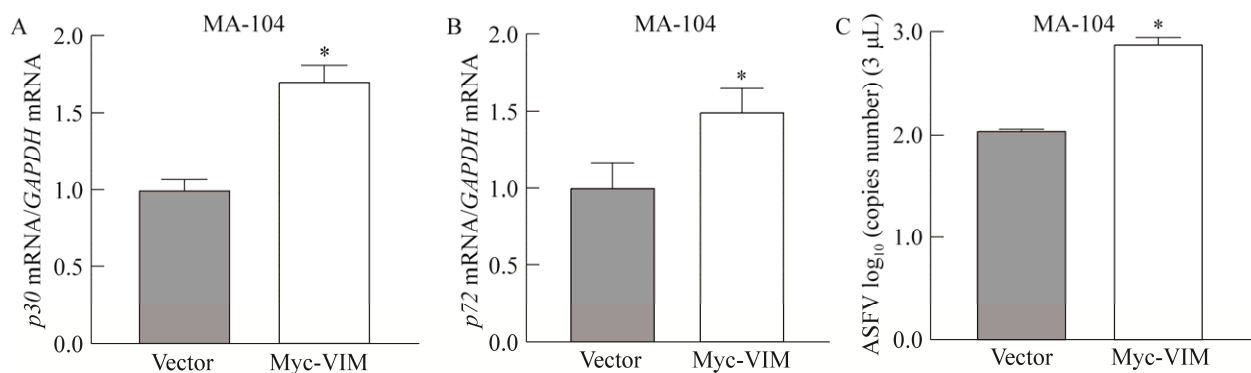


图 2 VIM 促进 ASFV 体外复制

Figure 2 VIM promotes ASFV replication *in vitro*. A and B: qPCR to detect the effect of Myc-VIM on ASFV *p30* and *p72* transcriptional levels. C: Effect of Myc-VIM on ASFV viral genome copies. *: $P < 0.05$.

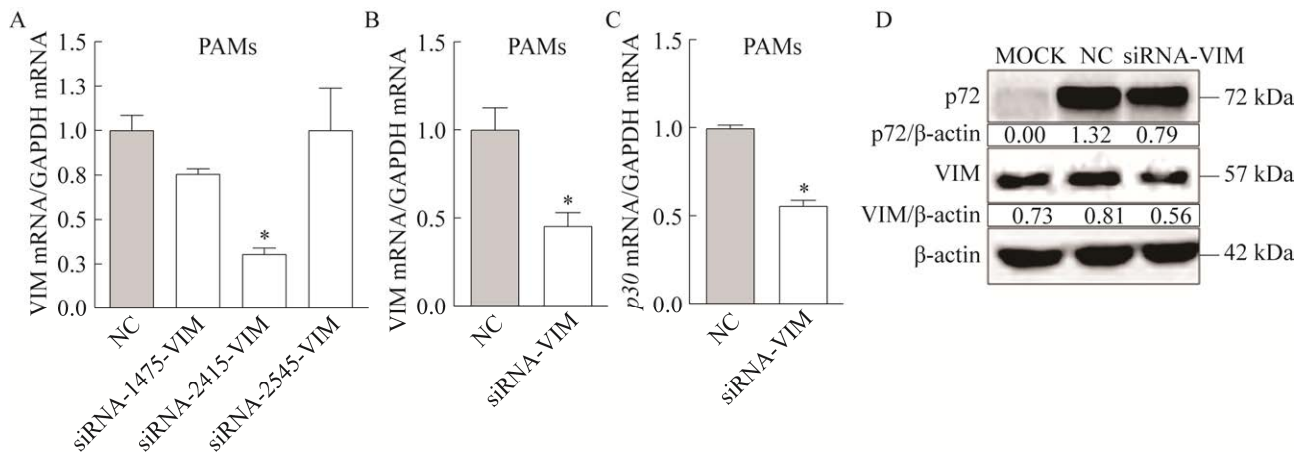


图3 敲低 VIM 抑制 ASFV 体外复制

Figure 3 Knock down of VIM inhibits ASFV replication *in vitro*. A: Down-regulation of intracellular VIM expression at the transcriptional level analyzed by siRNA assay. B: Knockdown of VIM affects its transcriptional levels. C: Effect of knock down VIM on ASFV *p30* transcriptional levels. D: Effect of knock down VIM on ASFV replication. *: Difference ($P < 0.05$).

2.3 ASFV 感染降低 VIM 表达

前文已经验证宿主蛋白 VIM 对 ASFV 复制具有正调控作用, 为进一步确定 ASFV 感染期间 VIM 表达情况, 在 PAMs 和 BMDMs 细胞中以 MOI=1 剂量感染 ASFV, 于不同时间点(0、12、18、24、36、48 hpi)收集样品分析 VIM 蛋白水平以及转录水平的变化。结果显示, 在 PAMs 中, 与未感染细胞(0 hpi)相比, ASFV 以时间依赖性方式抑制细胞内 VIM 蛋白水平以及转录水平的表达(图 4A、4B); 同样, 在 BMDMs 中, ASFV 分别在蛋白水平和转录水平以时间依赖性抑制细胞内 VIM 表达(图 4C、4D)。以上结果表明细胞内 VIM 表达受到 ASFV 感染的调控, 其具体机制仍待进一步探究。

2.4 ASFV 感染期间 VIM 磷酸化增强, 且亚细胞定位发生重排

在病毒入侵复制期间, VIM 可受到细胞激酶对其结构域磷酸化位点的调节从而诱导细胞骨架丝的解聚和重排。为探究 ASFV 感染期间是否涉及到 VIM 的动力学变化, 在 BMDMs 中, 通过 Western blotting 分析了 ASFV 感染后细胞

内 VIM 磷酸化情况, 结果表明, 与 0 hpi 组相比, ASFV 感染 24 h 后 VIM 磷酸化水平降低, 感染后 36 h 后 VIM 磷酸化水平增加(图 5A)。为进一步分析 ASFV 感染后细胞内 VIM 定位情况, 通过 IFA 观察到未感染 ASFV 时 VIM 在 BMDMs 中均匀地分布在细胞质中, 随着感染时间增加, VIM 在细胞内定位发生重排, 逐渐向细胞核周聚集(图 5B)。为探究 ASFV 感染期间 VIM 重排现象是否与 pD1133L 存在联系, 将空载体 pcDNA3.1(+)和 pcDNA-Flag-*D1133L* 转染至 MA-104 细胞中, 24 h 后通过 IFA 观察试验结果并对细胞内 VIM 定位进行分析, 相对于 Vector 组, 转染 Flag-*D1133L* 后 VIM 亚细胞定位发生改变向核旁聚集(图 5C、5D)。综上所述, ASFV 感染期间 VIM 总磷酸化水平增强, 且亚细胞定位发生重排, 该动力学现象的发生由 pD1133L 介导。

2.5 VIM 磷酸化促进 ASFV 复制

为进一步明确 VIM 磷酸化对 ASFV 复制的调控作用, 选用磷酸化抑制剂 KN-93^[19]进行后续试验。

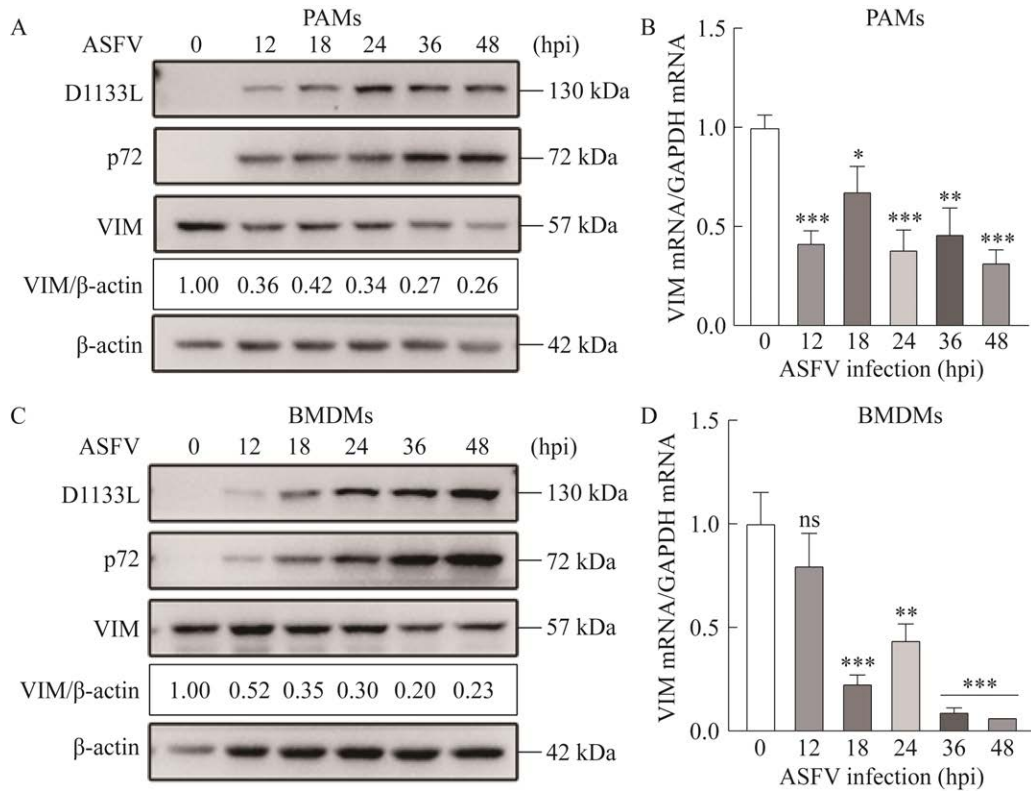


图 4 ASFV 感染抑制 VIM 表达

Figure 4 ASFV infection inhibits VIM expression. A and B: In PAMs, ASFV inhibited intracellular VIM expression in a time-dependent manner at the protein level and transcriptional level. C and D: In BMDMs, ASFV inhibited intracellular VIM expression in a time-dependent manner at the protein level and transcriptional level. ns: No difference; *: Difference ($P < 0.05$); **: Significant difference ($P < 0.01$); ***: Significant difference ($P < 0.001$).

将 BMDMs 铺于 96 孔板中, 以不同剂量的磷酸化抑制剂 KN-93 处理细胞, 处理 48 h 后使用 CCK-8 试剂盒检测 KN-93 对细胞的毒性。检测表明, KN-93 在 5 $\mu\text{mol/L}$ 及以下对细胞活力无显著影响(图 6A)。通过 Western blotting 分析了 VIM 磷酸化受到抑制后对 ASFV 复制的影响, 将 BMDMs 铺于 6 孔板中, 待细胞贴壁后使用 DMSO 以及 KN-93 预处理, 感染 ASFV 后于不同时间点收取样品进行检测。结果显示, ASFV 感染 24 h 后, 与 UT 组(未进行 DMSO 或 KN-93 处理, 感染 ASFV)以及 DMSO 组相比, KN-93 处理后 VIM 磷酸化水平降低, p72 以及 pD1133L 表达受到抑制(图 6B)。应用红细胞吸

附试验检测 UT 组、DMSO 组以及 KN-93 处理组样本中 ASFV 的病毒滴度情况。结果显示, 在感染 ASFV 24 h 和 36 h 后, 与 UT 组以及 DMSO 组相比, KN-93 处理组样品的病毒滴度均降低(图 6C), 与 Western blotting 结果一致。以上结果表明, KN-93 能够抑制 VIM 磷酸化水平, 且在不同感染时间下均可抑制 ASFV 复制。

为进一步分析 ASFV 感染后 VIM 磷酸化抑制剂 KN-93 对 VIM 亚细胞定位的影响, 使用 DMSO 以及 KN-93 对 BMDMs 进行预处理, 然后感染 ASFV, 通过 IFA 试验观察到 DMSO 处理组 VIM 亚细胞定位随 ASFV 感染时间增加发生重排并向细胞核周聚集, KN-93 处理组则抑

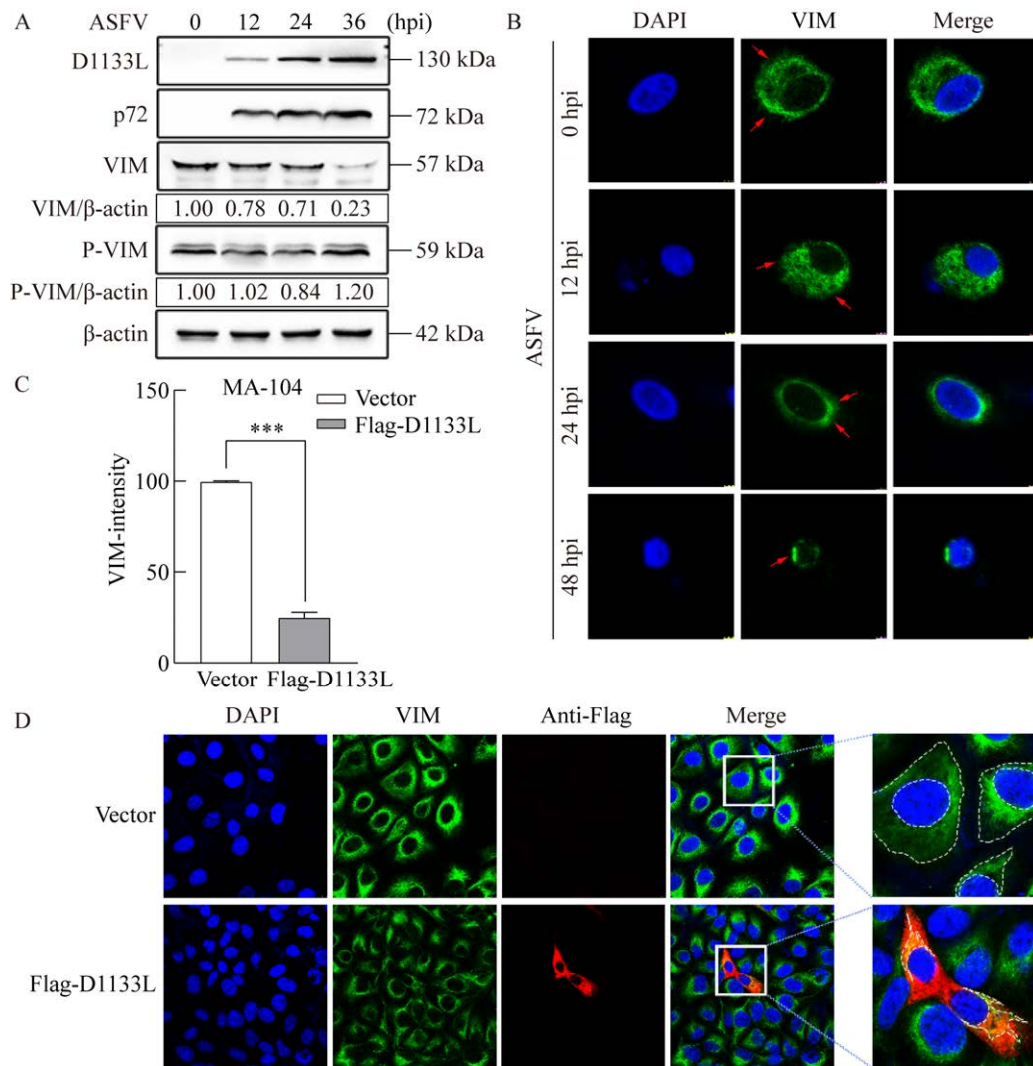


图 5 ASFV 感染期间 VIM 水平磷酸化增强且亚细胞定位发生重排

Figure 5 Enhanced phosphorylation of VIM and rearrangement of subcellular localization during ASFV infection. A: Western blotting assay verified that VIM was phosphorylated during ASFV infection. B: IFA assay verified that the subcellular localization of VIM was rearranged and aggregated to the perinuclear during ASFV infection. C and D: IFA verified that the rearranging of VIM was associated with pD1133L. ***: Significant difference ($P < 0.001$).

制了 ASFV 感染后 VIM 的重排(图 6D)。综上所述, VIM 磷酸化促进 ASFV 复制。

3 讨论

ASFV 作为一种编码超过 150 种病毒蛋白的大型双链 DNA 病毒, 尽管目前已有大量研究证实了 ASFV 蛋白的功能, 但是 ASFV 复杂的发病

机制以及宿主因素对 ASFV 复制的影响依旧值得深入探索^[4]。ASFV 入侵宿主后与宿主之间蛋白质网络互作在其生命周期中发挥复杂的调控作用, 因此, 解析病毒与宿主蛋白的相互作用能够为开发新的抗病毒药物提供可能的靶点线索, 并为深入研究 ASFV 的感染机制提供理论依据。

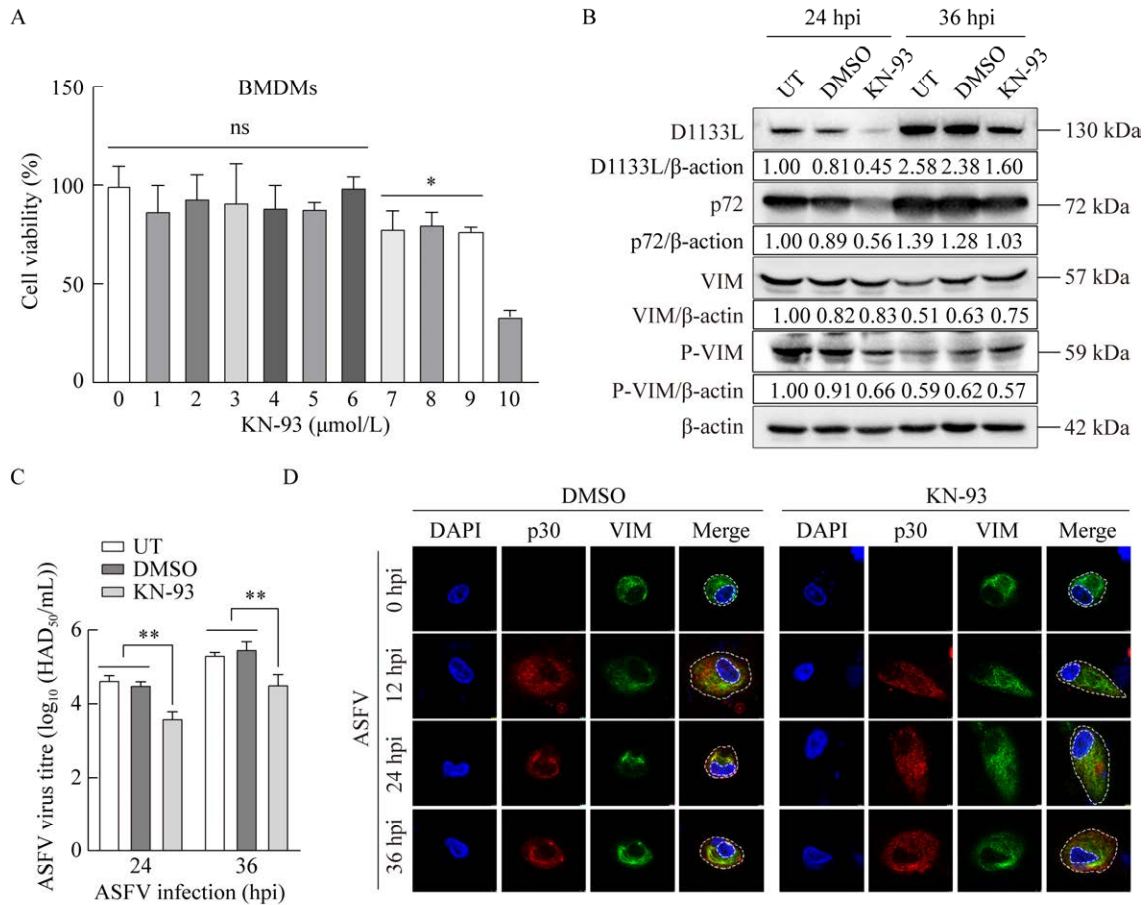


图 6 VIM 磷酸化抑制剂 KN-93 抑制 ASFV 复制

Figure 6 Inhibition of ASFV replication by VIM phosphorylation inhibitor KN-93. A: Effects on the viability of BMDMs after treatment with different doses of KN-93. B: Expression of VIM, p72, and pD1133L protein levels after treatment with 5 μmol/L KN-93. C: Effects of KN-93 on ASFV virus titer. D: Effects of KN-93 on the subcellular localization of VIM. ns: No difference; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

本实验室前期工作预测 ASFV 编码的 pD1133L 作为解旋酶之一对 ASFV 复制至关重要^[8-9], 目前尚不清楚 pD1133L 在病毒复制过程中发挥的作用。基于针对 ASFV pD1133L 互作宿主蛋白的鉴定筛选到细胞骨架蛋白 VIM 为 pD1133L 互作蛋白之一^[10]。VIM 是一种 III 型中间丝骨架蛋白, 包围在细胞核周围并向外延伸到细胞质膜形成巨大的细胞内网络结构, 可作为辅助性受体或与病毒复制复合物相互作用在多种病原体感染期间发挥重要调控功能^[20]。因此, 为进一步探究 ASFV pD1133L 与 VIM 的相互调控关

系, 本研究通过外源转染 Myc-VIM 真核表达质粒以及 VIM siRNA 试验表明, VIM 能促进 ASFV 复制。有研究报道在 DENV-2 感染过程中, VIM 的磷酸化和溶解度发生了动态变化, VIM 蛋白总水平发生显著下降^[21]。Caspase 9 介导的切割导致 VIM 的异常表达有助于癌细胞的侵袭^[22]; 此外, 在重热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)入侵过程中, VIM 还可与其非结构蛋白 NSs 相互作用, 通过 K48 连接的泛素-蛋白酶体途径降解 VIM 诱导的自噬以促进病毒复

制^[23]。以上研究表明 VIM 蛋白表达量在病毒复制和细胞自噬过程中发挥重要调控作用。本研究结果表明, VIM 蛋白水平以及转录水平表达受到抑制, 与 ASFV 感染呈时间依赖性, 推测 VIM 在 ASFV 复制期间可能受到降解调控, 其中具体调控机制尚未明确, 仍待进一步探索。

近年来, 有研究表明, VIM 在细菌及其他病原体复制中发挥重要作用, 病原体可通过调节细胞骨架的重排以促进其复制, 细胞内 VIM 的动力学变化依赖于翻译后修饰(posttranslational modifications, PTMs), 例如磷酸化。有报道称, 沙门氏菌效应器 SopB 可重组 VIM 网络结构形成包裹沙门氏菌复制液泡的笼状结构^[24]; 在登革热病毒(Dengue virus, DENV)感染期间发生依赖于 CaMKII γ 诱导的 VIM 重排和磷酸化, 这种向核周聚集重排的动力学现象对 DRNV VRC 的形成不可缺少从而促进病毒 RNA 的有效复制^[25]。本研究检测了 ASFV 感染对 VIM 磷酸化水平的影响, 发现随着 ASFV 感染时间增长 VIM 总磷酸化水平增加, 在细胞质中 VIM 网络随 ASFV 感染时间增长发生剧烈重组聚集在核旁, 该动力学变化由 ASFV pD1133L 介导; ASFV p30 与 VIM 共定位, 随 ASFV 感染时间增长由细胞外围向核周聚集。靶向 CaMKII γ 的抑制剂 KN-93 预处理后感染 ASFV 可抑制 VIM 磷酸化水平, VIM 亚细胞定位向核周聚集受到负调节, ASFV 复制受到抑制。因此, 基于 VIM 在 ASFV 感染过程中发挥的生物学功能, 本研究表明 CaMKII γ 介导的 VIM 磷酸化对 ASFV 复制至关重要, VIM 网络向核周聚集, 包裹、运输病毒粒子到达核周病毒工厂以促进 ASFV 复制。

4 结论

本研究证实了 VIM 是促进 ASFV 体外复制的关键宿主蛋白; 通过 Western blotting、IFA

试验表明在 ASFV 复制过程中 VIM 磷酸化水平增强, 亚细胞定位发生改变向核周聚集, 该现象由 ASFV 编码的 pD1133L 介导; ASFV 感染后可介导 VIM 发生磷酸化修饰形成 VIM 笼, 包裹运输病毒粒子到达核周病毒工厂, 以促进 ASFV 复制。本研究丰富了 ASFV 蛋白 pD1133L 与宿主蛋白 VIM 之间的互作调控网络, 为进一步研究 ASFV 致病机制提供新的参考。

参考文献

- [1] GAUDREAU NN, MADDEN DW, WILSON WC, TRUJILLO JD, RICHT JA. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 215.
- [2] BORCA MV, RAMIREZ-MEDINA E, SILVA E, VUONO E, RAI A, PRUITT S, HOLINKA LG, VELAZQUEZ-SALINAS L, ZHU J, GLADUE DP. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(7): e02017-e02019.
- [3] LI ZY, CHEN WX, QIU ZL, LI YW, FAN JD, WU KK, LI XW, ZHAO MQ, DING HX, FAN SQ, CHEN JD. African swine fever virus: a review[J]. *Life (Basel, Switzerland)*, 2022, 12(8): 1255.
- [4] YANG SC, MIAO C, LIU W, ZHANG GL, SHAO JJ, CHANG HY. Structure and function of African swine fever virus proteins: current understanding[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1043129.
- [5] WANG GG, XIE MJ, WU W, CHEN ZZ. Structures and functional diversities of ASFV proteins[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2124.
- [6] YÁÑEZ RJ, RODRÍGUEZ JM, BOURSNEILL M, RODRIGUEZ J, VIÑUELA E. Two putative African swine fever virus helicases similar to yeast 'DEAH' pre-mRNA processing proteins and vaccinia virus ATPases D11L and D6R[J]. *Gene*, 1993, 134(2): 161-174.
- [7] SHAO ZW, SU SC, YANG J, ZHANG WZ, GAO YQ, ZHAO X, ZHANG YX, SHAO QY, CAO CL, LI HL, LIU HH, ZHANG JR, LIN JZ, MA JB, GAN JH. Structures and implications of the C962R protein of African swine fever virus[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(17): 9475-9490.
- [8] 侯景, 申超超, 张大俊, 杨博, 史喜娟, 张婷, 崔卉梅, 袁兴国, 赵登率, 陈学辉, 张克山, 郑海学, 刘湘涛. 非洲猪瘟病毒解旋酶 D1133L 基因序列分析、

- 蛋白结构预测及亚细胞定位[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(7): 1953-1962.
- HOU J, SHEN CC, ZHANG DJ, YANG B, SHI XJ, ZHANG T, CUI HM, YUAN XG, ZHAO DS, CHEN XH, ZHANG KS, ZHENG HX, LIU XT. Gene sequence analysis, protein structure prediction and subcellular localization of African swine fever virus helicase D1133L[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2021, 52(7): 1953-1962 (in Chinese).
- [9] 张婷, 冯涛, 杨金柯, 郝雨, 杨行, 张大俊, 史喜娟, 闫文倩, 陈玲玲, 刘湘涛, 郑海学, 张克山. 条件性敲除 D1133L 基因的重组非洲猪瘟病毒的构建及增殖特性[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(2): 706-714.
- ZHANG T, FENG T, YANG JK, HAO Y, YANG X, ZHANG DJ, SHI XJ, YAN WQ, CHEN LL, LIU XT, ZHENG HX, ZHANG KS. Construction and growth characteristics of recombinant African swine fever virus with conditional deletion of D1133L gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(2): 706-714 (in Chinese).
- [10] HAO Y, YANG JK, YANG B, ZHANG T, SHI XJ, YANG X, ZHANG DJ, ZHAO DS, YAN WQ, CHEN LL, LIU XT, ZHENG HX, ZHANG KS. Identification and analysis of the interaction network of African swine fever virus D1133L with host proteins[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1037346.
- [11] ZHANG Y, WEN ZY, SHI XM, LIU YJ, ERIKSSON JE, JIU YM. The diverse roles and dynamic rearrangement of vimentin during viral infection[J]. *Journal of Cell Science*, 2020, 134(5): jcs250597.
- [12] MIAO CL, ZHAO SS, ETIENNE-MANNEVILLE S, JIU YM. The diverse actions of cytoskeletal vimentin in bacterial infection and host defense[J]. *Journal of Cell Science*, 2023, 136(1): jcs260509.
- [13] ARRINDELL J, ABOU ATMEH P, JAYET L, SEREME Y, MEGE JL, DESNUES B. Vimentin is an important ACE2 co-receptor for SARS-CoV-2 in epithelial cells[J]. *iScience*, 2022, 25(11): 105463.
- [14] SUPREWICZ Ł, SWOGER M, GUPTA S, PIKTEL E, BYFIELD FJ, IWAMOTO DV, GERMANN D, RESZEĆ J, MARCIŃCZYK N, CARROLL RJ, JANMEY PA, SCHWARZ JM, BUCKI R, PATTESON AE. Extracellular vimentin as a target against SARS-CoV-2 host cell invasion[J]. *Small*, 2022, 18(6): e2105640.
- [15] HELENIUS A. Virus entry: looking back and moving forward[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(13): 1853-1862.
- [16] CHENG Y, LOU JX, LIU YY, LIU CC, CHEN J, YANG MC, YE YB, GO YY, ZHOU B. Intracellular vimentin regulates the formation of classical swine fever virus replication complex through interaction with NS5A protein[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(5): e0177022.
- [17] GAO YN, LI JS, WANG ZJ, JIANG P, BAI J, LI YF, WANG XW. Vimentin promotes porcine circovirus type 2 (PCV₂) replication in pig alveolar macrophage[J]. *Virus Research*, 2022, 318: 198842.
- [18] ZHANG Y, ZHAO SS, LI YA, FENG FP, LI M, XUE YH, CUI J, XU T, JIN X, JIU YM. Host cytoskeletal vimentin serves as a structural organizer and an RNA-binding protein regulator to facilitate zika viral replication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(8): e2113909119.
- [19] WONG MH, SAMAL AB, LEE MK, VLACH J, NOVIKOV N, NIEDZIELA-MAJKA A, FENG JY, KOLTUN DO, BRENDZA KM, KWON HJ, SCHULTZ BE, SAKOWICZ R, SAAD JS, PAPALIA GA. The KN-93 molecule inhibits calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity by binding to Ca²⁺/CaM[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(7): 1440-1459.
- [20] RAMOS I, STAMATAKIS K, OESTE CL, PÉREZ-SALA D. Vimentin as a multifaceted player and potential therapeutic target in viral infections[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(13): 4675.
- [21] YU JH, LI XJ, ZHOU DR, LIU XL, HE XE, HUANG SH, WU QH, ZHU L, YU LZ, YAO JX, ZHANG B, ZHAO W. Vimentin inhibits dengue virus type 2 invasion of the blood-brain barrier[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 868407.
- [22] HAKIM F, KAZEMIRAAD C, AKBARI-BIRGANI S, ABDOLLAHPOUR D, MOHAMMADI S. Caspase-9-mediated cleavage of vimentin attenuates the aggressiveness of leukemic NB4 cells[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2023, 478(11): 2435-2444.
- [23] LIU SH, SU YZ, LU ZZ, ZOU XH, XU LL, TENG Y, WANG ZY, WANG T. The SFTSV nonstructural proteins induce autophagy to promote viral replication *via* interaction with vimentin[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(4): e0030223.
- [24] ZHAO SS, XU QP, CUI YQ, YAO S, JIN SH, ZHANG Q, WEN ZY, RUAN HH, LIANG X, CHAO YJ, GONG ST, SANSONETTI P, WEI K, TANG H, JIU YM. *Salmonella* effector SopB reorganizes cytoskeletal vimentin to maintain replication vacuoles for efficient infection[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 478.
- [25] TEO CSH, CHU JH. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(4): 1897-1913.