



猪流行性腹泻病毒劫持 DNA 损伤通路操纵细胞周期促进自身复制

龚晋祥^{1,2}, 张仟禧¹, 杨子银^{1,2}, 王文清¹, 冯康^{1,2}, 张志榜¹, 杨涛涛¹, 李凯¹, 孙子龙², 张晓燕^{1*}, 李鹏成^{1*}

1 宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000

2 山西农业大学 动物医学学院, 山西 晋中 030801

龚晋祥, 张仟禧, 杨子银, 王文清, 冯康, 张志榜, 杨涛涛, 李凯, 孙子龙, 张晓燕, 李鹏成. 猪流行性腹泻病毒劫持 DNA 损伤通路操纵细胞周期促进自身复制[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4850-4858.

GONG Jinxiang, ZHANG Qianxi, YANG Ziyin, WANG Wenqing, FENG Kang, ZHANG Zhibang, YANG Taotao, LI Kai, SUN Zilong, ZHANG Xiaoyan, LI Pengcheng. PEDV hijacks DNA damage pathways and manipulates the cell cycle to promote self-replication[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4850-4858.

摘要: 【目的】探究 DNA 损伤应答(DNA damage response, DDR)对猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)复制的作用。【方法】应用特异性抑制剂检测 DDR 通路是否参与 PEDV 的复制; 通过实时彗星试验观察 PEDV 感染 Vero 细胞造成 DNA 损伤的情况; 采用蛋白质免疫印迹和流式细胞术分别检测 PEDV 感染 Vero 细胞 DDR 通路中蛋白表达和细胞周期的变化。【结果】ATM 抑制剂 KU55933 可以极显著抑制 PEDV 的复制, 病毒滴度从 $(5.50 \pm 0.25) \log_{10}$ TCID₅₀/mL 下降到 $(3.15 \pm 0.15) \log_{10}$ TCID₅₀/mL; PEDV 感染 Vero 细胞 12–60 h 可极显著引起 DNA 损伤; PEDV 感染 Vero 细胞可激活 ATM、ATR、Chk1、Chk2 和 p53, 尤其是 p-Chk2 和 p-p53 在病毒复制过程中高表达; 此外, PEDV 感染使 Vero 细胞停滞在 S 期; 细胞周期蛋白 Cyclin B1 在病毒复制过程中, 蛋白表达先减少后极显著增加。【结论】PEDV 可能通过劫持 DNA 损伤通路中 ATM-Chk2 途径操控细胞周期促进病毒自身复制, 为进一步阐明 PEDV 感染复制机制及开发新的潜在抗病毒靶点提供了重要依据。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; DNA 损伤; 细胞周期; 病毒复制

资助项目: 国家自然科学基金(32260880, 31960697); 江西省“双千计划”(jxsq2019101056); 江西省自然科学基金(20202BABL205008)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260880, 31960697), the Double Thousand Plan of Jiangxi Province (jxsq2019101056), and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20202BABL205008).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Xiaoyan, zxy09161021@126.com; LI Pengcheng, lipengcheng305@163.com

Received: 2024-07-12; Accepted: 2024-09-02; Published online: 2024-09-03

PEDV hijacks DNA damage pathways and manipulates the cell cycle to promote self-replication

GONG Jinxiang^{1,2}, ZHANG Qianxi¹, YANG Ziyin^{1,2}, WANG Wenqing¹, FENG Kang^{1,2}, ZHANG Zhibang¹, YANG Taotao¹, LI Kai¹, SUN Zilong², ZHANG Xiaoyan^{1*}, LI Pengcheng^{1*}

1 College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun 336000, Jiangxi, China

2 College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

Abstract: [Objective] To study the effect of DNA damage response (DDR) on the replication of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). [Methods] Specific inhibitors were used to detect whether DDR pathway was involved in PEDV replication. The comet assay was employed to observe the DNA damage caused by PEDV infection in Vero cells. The changes in the expression levels of proteins in the DDR pathway and cell cycle of PEDV-infected Vero cells were determined by Western blotting and flow cytometry, respectively. [Results] The ATM inhibitor KU55933 significantly inhibited the replication of PEDV, with the virus titer decreasing from $(5.50 \pm 0.25) \log_{10}$ TCID₅₀/mL to $(3.15 \pm 0.15) \log_{10}$ TCID₅₀/mL. PEDV infection caused DNA damage in Vero cells during 12–60 h. ATM, ATR, Chk1, Chk2, and p53 were activated by PEDV infection of Vero cells. Especially, p-Chk2 and p-p53 showcased high expression during virus replication. In addition, PEDV infection led to the stagnation of Vero cells in the S phase. During virus replication, the expression of Cyclin B1 was first downregulated and then upregulated significantly. [Conclusion] PEDV perhaps utilized DNA damage pathway hijacks the ATM-Chk2 to manipulate the cell cycle and promote self-replication. The results provided a basis for elucidating the replication and infection mechanisms of PEDV and developing new potential antiviral targets.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; DNA damage; cell cycle; virus replication

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的猪的一种急性高度接触性的肠道传染病, 以呕吐、腹泻、脱水为特征。PEDV 为冠状病毒科单股正链 RNA 病毒, 主要在小肠 (十二指肠、空肠和回肠) 的绒毛肠细胞中感染和复制, 且传播迅速。各种年龄和不同品种的猪群对 PEDV 都有易感性, 但不同年龄易感猪群的致死率不同, 其中以哺乳仔猪的致死率最高; 由 PED 引起的仔猪腹泻已经成为困扰

养猪业发展的重要传染病^[1-3]。

DNA 损伤应答 (DNA damage response, DDR) 是细胞内一种非常保守的信号转导通路, 对维持基因组完整性、稳定性和细胞存活至关重要^[4]。DDR 信号通路主要是通过 2 种关键的蛋白激酶启动, 分别是共济失调毛细血管扩张突变蛋白 (ataxia telangiectasia mutated, ATM)、共济失调毛细血管扩张突变和 Rad3 相关蛋白 (ataxia telangiectasia and rad3-related protein, ATR)^[5-7]。ATM 和 ATR 可共同磷酸化数百种蛋白, 以响应

DNA 损伤调节基因组稳定性^[8]。ATM 和 ATR 可分别通过激活下游检查点激酶 Chk2 和 Chk1 介导细胞周期调控。研究表明,多种病毒可引发宿主 DDR,病毒可能通过操纵相关的 DNA 损伤通路激酶和细胞周期的策略,以创造有利的细胞环境进行复制。以往研究均集中于 DNA 病毒,例如:猿猴病毒 40 型(simian vacuolating virus 40, SV40)、单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)、人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)和疱疹病毒 IV 型(Epstein-Barr virus, EBV)^[9-12],在感染期间均会激活 ATM 和下游信号传导,同时 ATM 和其他修复蛋白会募集到病毒 DNA 复制位点。然而,研究发现 RNA 病毒同样可以劫持 DDR 通路促进自身复制,包括丙型肝炎病毒(hepatitis c virus, HCV)^[13]、传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)^[14]、新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)^[15]和新型冠状病毒(corona virus disease 2019, COVID-19)^[16]。丙型肝炎病毒感染后激活 ATM 和 Chk2,可促进丙型肝炎病毒复制^[13]。ATR 信号激活介导 IBV 对宿主细胞 S 期捕获,从而促进 IBV 的复制^[14]。例如,COVID-19 会对细胞 DNA 造成损害,并靶向 DDR 通路的特定成分^[16]。

最新研究显示, PEDV 可激活 DDR 信号通路促进其自身复制^[17-18],但具体的作用机制尚不明了。本研究首先通过实时彗星试验观察 PEDV 感染 Vero 细胞造成 DNA 损伤的情况;然后应用特异性抑制剂确证 DDR 通路是否参与 PEDV 的复制;最后经蛋白质免疫印迹和流式细胞术分别检测 PEDV 感染 Vero 细胞 DDR 通路中蛋白表达和细胞周期的变化,旨在研究 DDR 通路在 PEDV 复制中的作用机制,为进一步阐明 PEDV 感染复制机制及开发新的潜在抗病毒靶点提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

非洲绿猴肾细胞 Vero 细胞、猪流行性腹泻病毒 CV777 和 PEDV-N 蛋白单克隆抗体均由本研究室制备并保存;DMEM 培养基、青链霉素、0.25%胰酶及胎牛血清均购自 Gibco 公司;RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)和 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L)均购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司;KU55933、AZD6738、VE821 抑制剂均购自 Selleck 公司;蛋白预染 Marker [M5 SuperRange Prestained Protein Ladder (10–310 kDa)]购自北京聚合美生物科技有限公司;彗星法 DNA 损伤分析试剂盒(3 孔载玻片)购自亚科因生物技术有限公司;p-ATR (NBP2-43564)、ATR (sc-515173)、ATM (NB100-104)、p-ATM (NB100-306)、 γ -H2AX (NB100-384)均购自 NOVUS 公司;Chk1-296 (2349T)、Chk1-317 (2344T)、p-Chk2 (2661T)、p53 (2527T)、p-p53 (82530S)一抗均购自 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH (PAB45851)一抗购自武汉贝茵莱生物有限公司;0.45 μ m PVDF 膜购自 Cytiva 公司。

1.2 细胞培养

Vero 细胞于含有 10%的胎牛血清和 1%双抗(青霉素、链霉素浓度均为 100 U/mL)的 DMEM 细胞培养液中培养(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)。Vero 细胞接种于 6 孔、24 孔或 96 孔培养板,隔天更换培养基,细胞长成单层后使用。

1.3 病毒滴度的测定

病毒样品做 10 倍比稀释,然后将每个稀释度的病毒接种 96 孔细胞板,每个梯度做 6 个重复孔。随后放入 CO₂ 培养箱中孵育 1 h,弃去原

液后补加 200 μL 的维持液(2%胎牛血清的 DMEM 培养基), 待细胞出现典型细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)后根据 Reed and Mench 法判定病毒滴度。

1.4 抑制剂细胞毒性试验

用维持液将 ATM 抑制剂 KU55933、ATR 抑制剂 AZD6738 和 ATR 抑制剂 VE821 按不同浓度稀释。将细胞铺于 96 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养。待 96 孔板内细胞 75%融合, 弃去 96 孔板内培养液, 按相应浓度梯度加入抑制剂 200 μL /孔, 每种抑制剂作 3 个重复孔, 另设 3 个空白对照(只加 200 μL 维持液)以及加入 DMSO 浓度为 Mock 组, 每种梯度作 3 个重复。放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱再培养 36 h。弃去 96 孔板内培养液, 换维持液 100 μL /孔, 并向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下孵育 2 h, 酶标仪读取 OD_{450} 值。

1.5 抑制剂对病毒复制影响

将细胞铺至 24 孔细胞培养板, 待 24 孔板内细胞 75%融合, 弃去 24 孔板内培养液, 加入相应浓度的抑制剂, 同时设 Mock 组, 单独 PEDV 组, 每组 3 个重复, 另设 6 个空白对照。预作用 2 h 后向抑制剂组、Mock 组、PEDV alone 组每孔加入等量病毒液(MOI=0.5), 空白组加入维持液, 60 h 后冻融 3 次, 收获病毒液。按照 1.3 方法测病毒滴度。

1.6 彗星试验检测 PEDV 对细胞 DNA 损伤程度

PEDV 感染 Vero 细胞后分别于 4、8、12、24、36、48、60、72 h 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 收集各组细胞, 并单独设置不接毒空白组和 4 μL 博来霉素阳性对照组, 每组收集 1.0×10^4 个细胞悬液。将溶解的低熔点琼脂液加到 CometSlide 载玻片上完全覆盖, 以创建基层, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 15 min。取细胞样品与琼脂糖以 1:10 的比例混合, 再取 75 μL 混合液转移到 CometSlide 基层层的上面完

全覆盖, 自然冷却后 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解过夜, 用预冷的碱性解旋溶液解旋 30 min, 将其水平放入水平电泳槽中。使用预冷碱性电泳缓冲液电泳 20 V、20 min, 使 DNA 解链。电泳后, 将 CometSlide 水平转移到装有预冷的 0.4 mmol 的 Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液(约 25 mL/CometSlide)中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 中和 3 次, 每次 10 min。弃去 Tris-HCl 缓冲液, 加入 50 μL 1 \times PI 染料, 室温避光染色 10 min 后使用荧光显微镜观察 CometSlide 并拍取照片, 之后使用彗星分析软件分析。

1.7 Western blotting 检测蛋白表达水平

Vero 细胞在 6 孔细胞板培养至融合, 用 PEDV 感染 Vero 细胞 0、1、6、12、24、36、48、60 h, 之后细胞用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 150 μL 蛋白裂解液(提前加入 PMSF), 冰上作用 30 min 充分裂解细胞。将细胞样品刮下并收集到 1.5 mL 离心管中, 12 000 $\times g$ 离心 10 min 后吸取上清液, 使用 BCA 法测定蛋白浓度, 调整上样量。使用 SDS 聚丙烯酰胺进行电泳, 用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入不同稀释浓度抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后, 加入对应二抗孵育 1 h, 再次洗膜, 用化学发光液进行显影, 拍照保存。

1.8 流式细胞术检测 PEDV 感染 Vero 细胞周期的变化

PEDV 感染 Vero 细胞(MOI=0.5) 48 h 后, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 用胰酶消化细胞, 小心收集细胞悬液, 1 000 $\times g$ 离心 3 min 沉淀细胞; 小心吸除上清, 加入约 1 mL 冰浴预冷的 PBS 重悬细胞, 并转移到 1.5 mL 离心管内; 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50 μL 的 PBS, 以避免吸走细胞; 轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团; 然后将细胞悬液缓慢加入装有 1 mL 冰浴预冷 70%乙醇的 EP 管中, 轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min, BD FACScanto

II流式细胞仪[碧迪医疗器械(上海)有限公司]检测分析。

1.9 统计分析

OpenComet 软件分析彗星试验, 比较 DNA 尾距百分比 (tail DNA %)。试验数据应用 GraphPad Prism 9.0 进行生物学统计分析。

2 结果与分析

2.1 PEDV 病毒复制依赖于 ATM 途径

为了证实 DDR 通路是否参与 PEDV 复制, 本研究选择 3 种 DDR 通路顶端激酶抑制剂研究其对 PEDV 复制的影响。研究发现, ATM 抑制剂 KU55933 可极显著抑制 PEDV 的复制 ($P < 0.001$), PEDV 病毒滴度从 $(5.50 \pm 0.25) \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 下降到 $(3.15 \pm 0.15) \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 下降约 2 个滴度, 而 ATR 抑制剂 AZD6738 和 VE821 对 PEDV 的复制则无显著影响 (图 1)。

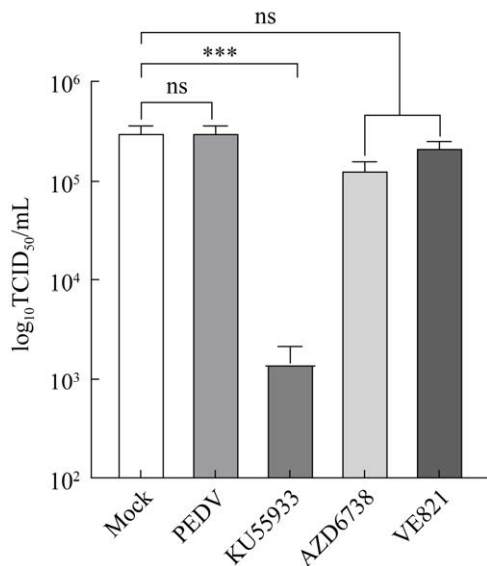


图 1 DDR 抑制剂对 PEDV 复制的影响

Figure 1 Effects of DDR inhibitors on PEDV replication. Mock: DMSO 100 $\mu\text{mol/L}$; KU55933: ATM kinase inhibitor 20 $\mu\text{mol/L}$; AZD6738: ATR kinase inhibitor 100 $\mu\text{mol/L}$; VE821: ATR kinase inhibitor 16 $\mu\text{mol/L}$. ns: No significance; ***: $P < 0.001$.

2.2 PEDV 感染显著引起 Vero 细胞 DNA 损伤

本研究应用彗星试验证实了 PEDV 感染可以显著引起 Vero 细胞 DNA 损伤。正常细胞的细胞核, 未观察到彗星拖尾 (图 2A); PEDV 感染 48 h 后 Vero 细胞核的形态为典型的 DNA 损伤细胞产生的彗星拖尾 (图 2B)。阳性对照博来霉素极显著造成细胞 DNA 损伤, DNA 尾距占比增加 83.90% (图 2C)。PEDV 实时感染 Vero 细胞发现 (图 2C), PEDV 感染 12 h 后 DNA 尾距占比增加 16.05% ($P < 0.0001$), 并且随着感染时间的增加而增加, 感染 60 h Tail DNA 占比增加达到了 34.08% ($P < 0.0001$), 72 h 可能由于细胞破裂造成 Tail DNA 下降。

2.3 PEDV 感染对 DDR 通路中蛋白分子表达的影响

如图 3 所示, 感染 PEDV 后 DNA 损伤标志物 $\gamma\text{-H2AX}$ 表达量在 36 h 之前并未表现出明显差异, 36 h 之后表达量开始增加, 且维持在较高水平。ATM 感染 PEDV 后表达量随时间逐渐降低; p-ATM 感染 PEDV 36 h 开始有表达, 48 h 表达量最高, 60 h 表达量降低; Chk2 感染 PEDV 后 1 h 表达量下降, 然后一直保持不变, 到 60 h

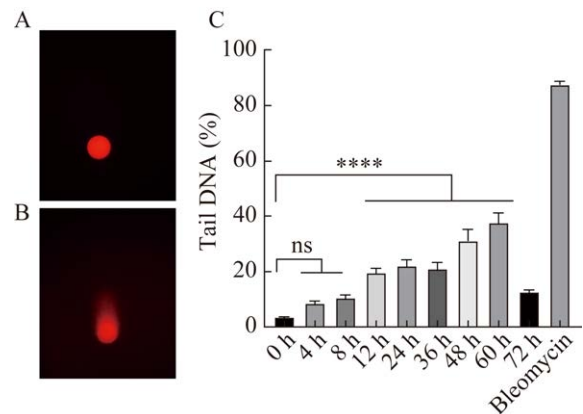


图 2 PEDV 感染 Vero 细胞彗星试验

Figure 2 PEDV infected Vero cells comet assay. A: Comet with no DNA damage. B: DNA damage comet. C: DNA damage tail distance percentage. ns: No significance; ****: $P < 0.0001$.

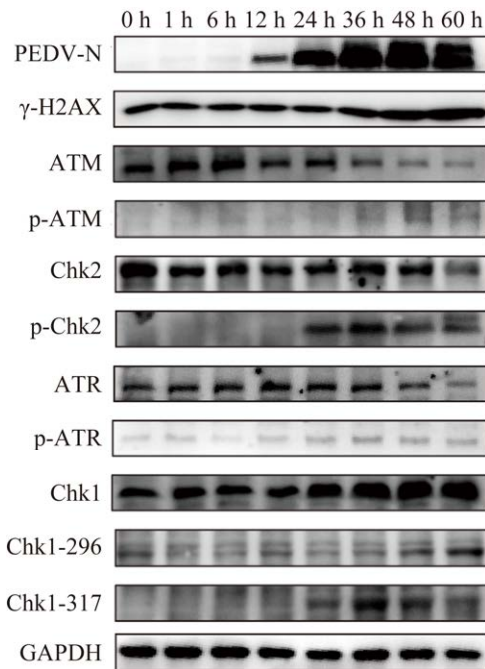


图 3 PEDV 感染 Vero 细胞 DNA 损伤相关蛋白表达
 Figure 3 Expression of DNA damage-related proteins in PEDV-infected Vero cells.

表达量继续降低; p-Chk2 感染 PEDV 24 h 后激活到 36 h 表达量最高, 然后降低。ATR 感染 PEDV 48 h 后表达量开始降低; p-ATR 感染 PEDV 1 h 后表达增加, 之后不断激活上升; Chk1 感染 PEDV 24 h 表达量开始增加直到 60 h; Chk1-296 感染 PEDV 1 h 和 6 h 表达降低, 12 h 之后又降低, 36 h 之后表达量逐渐增加; Chk1-317 感染 PEDV 24 h 后激活 36 h 表达量最高, 然后降低。

2.4 PEDV 影响细胞周期停滞在 S 期

如图 4 所示, 48 h 时 PEDV 感染引起 G1 期细胞百分比的极显著降低($P < 0.0001$), S 期细胞百分比极显著升高($P < 0.001$), G2 期细胞占比差异不显著, 表明 PEDV 感染导致细胞周期停滞在 S 期。细胞周期检查点调控蛋白表达变化发现 (图 5): p53 于 PEDV 感染 Vero 细胞 12 h 后表达开始逐渐减少, 磷酸化 p53 (Ser15) 的表达逐渐增

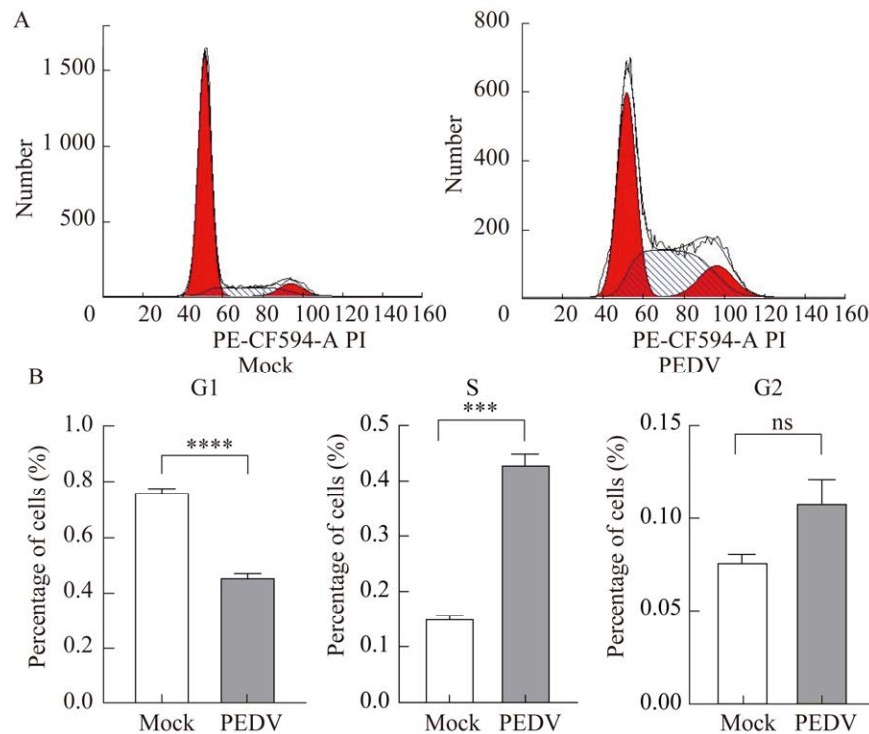


图 4 PEDV 感染 Vero 细胞流式细胞检测

Figure 4 Flow cytometry of PEDV infected Vero cells. A: Vero cells were infected with PEDV for 48 h, and cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. B: Statistics of cell cycle results in different periods. ns: No significance; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

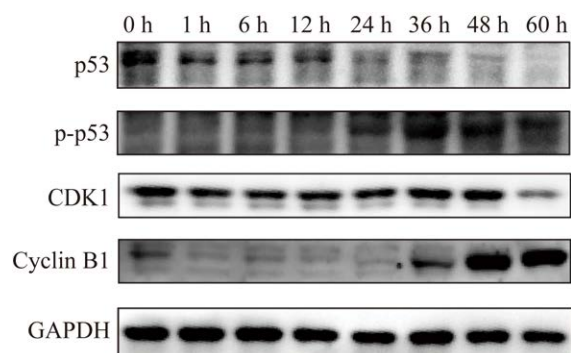


图 5 PEDV 感染 Vero 细胞周期相关蛋白表达变化
Figure 5 Expression of cell cycle-related proteins in PEDV-infected Vero cells.

加；CDK1 随时间表达量变化并不是很明显，仅 60 h 有所下降；而 Cyclin B1 在 PEDV 感染 1 h 后表达显著减少，直到 36 h 才有所升高，48 h 和 60 h 表达极显著增多。

3 讨论与结论

DNA 病毒基因组在复制过程中往往需要利用细胞 DNA 复制系统，因此与细胞内的 DNA 损伤反应(DDR)信号网络发生复杂广泛的相互作用，从而创造出有利于病毒复制的细胞内环境^[19-20]。然而，RNA 病毒除了少数逆转录病毒，大部分 RNA 病毒为胞质复制，很少与 DNA 损伤联系起来。越来越多的最新报道显示，RNA 病毒也具有诱导 DNA 损伤的特质，比如猪繁殖与呼吸综合征病毒^[21]、冠状病毒病^[16]和人肠道病毒 A71^[22]，说明 RNA 病毒也具有诱导 DNA 损伤的特质。

在真核生物中，组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 形成具有大约 150 bp DNA 的核小体。随着 DNA 损伤，H2AX (一种 H2A 变体)第 139 位的丝氨酸被磷酸化，H2AX 变成 p-H2AX-S139 (γ -H2AX)， γ -H2AX 通常作为关键的 DNA 损伤标志物，介导 DSB 位点信号转导蛋白的后续积累^[23-24]。

PEDV 在感染后期对 γ -H2AX 的表达上调，表明 PEDV 感染导致 DNA 损伤的激活。ATM、ATR 和 DNA-PK 是参与 γ -H2AX 激活的 3 种主要激酶，DNA-PK 和 ATM 主要参与 DNA 双链断裂，而 ATR 主要响应 DNA 单链断裂^[25]。本研究发现，ATM 和 ATR 作为 DNA 损伤的顶端激酶均在 PEDV 复制后期表达下降，而 p-ATM 和 p-ATR 在后期表达量上升，表明 PEDV 感染激活了 DDR 途径的两条通路。为了响应受损的 DNA 或停滞的复制，ATR 磷酸化 Ser317 和 Ser345 位点 Chk1，这种磷酸化被认为可以提高 Chk1 的催化活性^[26-27]，随后是 Ser296 的自磷酸化。Ser296 磷酸化诱导 Chk1 与 14-3-3 γ 结合，从而促进 Cdc25A 降解来控制细胞周期停滞^[28]。Chk1 被上游激酶 ATR 磷酸化而被激活，Chk1 随着时间增加表达量增高，而下游的 Chk1-Ser317 和 Chk1-Ser296 的激活又说明 DNA 修复和细胞周期检查点的启动。Chk2 会被 ATM 磷酸化和激活，诱导 DNA 损伤后的细胞凋亡^[29]。Chk2 在后期表达量下降，p-Chk2 后期的增加，预示着细胞凋亡的出现。聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)是 DNA 修复酶，它是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶的切割底物，在 DNA 损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用^[30]。我们发现，PARP 抑制剂 AZD2281 会降低 PEDV 的复制(结果未显示)，可能与 PARP 参与的细胞凋亡有关^[18]。本研究中 ATR 抑制剂不影响 PEDV 复制，那么 ATR 通路激活所发挥的具体作用，有待进一步研究。

病毒严格寄生于宿主细胞，已经进化出各种策略来破坏宿主细胞周期，以确保自身的正常复制^[31]。p53 作为公认的抑癌基因，可被 DNA 损伤、癌基因和细胞应激激活，可以调节多种细胞过程，包括 DNA 修复、细胞周期、凋亡、氧化还原稳态、代谢和线粒体功能^[32-33]。传染性支气

管炎病毒(IBV)感染通过以 p53 非依赖性方式调节各种细胞周期蛋白和低磷酸化 RB 的积累, 在 S 期和 G2/M 期停滞细胞周期^[34]。PEDV N 蛋白与 p53 相互作用以激活 p53-DREAM 通路, 并随后诱导 S 期停滞^[35]。ATM、ATR 和 DNA-PK 会诱导 p53 在 Ser15 和 Ser20 位点的磷酸化, 可导致细胞周期停滞和 DNA 修复或细胞凋亡^[36-37]。Chk1 和 Chk2 也可以磷酸化 p53, 影响细胞周期进程和细胞凋亡。本研究中 p53 (Ser15)在 PEDV 感染后期被激活, 说明细胞进入细胞周期阻滞和凋亡。周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK1)可以与 Cyclin A 或 B 结合来促进细胞周期 S/G2 或 G2/M 的转换, 在调控细胞周期进程中占重要地位^[38]。通常细胞周期阻滞就是对检查点激酶的破坏, 从而导致不能正常复制, Cyclin B1 作为调节 G2/M 期检查点激酶, PEDV 感染导致 CDK1 的下调和 Cyclin B1 的上调表明 S 期检查点的破坏, 导致细胞阻滞在 S 期。

综上所述, 本研究证实 PEDV 感染 Vero 细胞后显著引起 DNA 损伤, 并激活 ATM-Chk2 信号通路, 通过 p53 的活化和极显著增加 Cyclin B1 的表达来操纵细胞周期促进病毒复制。该结果为进一步阐明 PEDV 感染复制机制, 以及开发新的潜在抗病毒靶点提供了重要依据。

参考文献

- [1] JUNG K, ANNAMALAI T, LU ZY, SAIF LJ. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 178(1/2): 31-40.
- [2] LI WT, LI H, LIU YB, PAN YF, DENG F, SONG YH, TANG XB, HE QG. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(8): 1350-1353.
- [3] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 167-175.
- [4] STOKES MP, RUSH J, MACNEILL J, REN JM, SPROTT K, NARDONE J, YANG V, BEAUSOLEIL SA, GYGI SP, LIVINGSTONE M, ZHANG H, POLAKIEWICZ RD, COMB MJ. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(50): 19855-19860.
- [5] CIMPRICH KA, CORTEZ D. ATR: an essential regulator of genome integrity[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(8): 616-627.
- [6] DAVIS AJ, CHEN BPC, CHEN DJ. DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway[J]. *DNA Repair*, 2014, 17: 21-29.
- [7] LEE JH, PAULL TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex[J]. *Science*, 2005, 308(5721): 551-554.
- [8] JACKSON SP, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. *Nature*, 2009, 461(7267): 1071-1078.
- [9] BOICHUK S, HU L, HEIN J, GJOERUP OV. Multiple DNA damage signaling and repair pathways deregulated by Simian virus 40 large T antigen[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(16): 8007-8020.
- [10] XIAOFEI E, PICKERING MT, DEBATHIS M, CASTILLO J, LAGADINOS A, WANG SX, LU S, KOWALIK TF. An E2F1-mediated DNA damage response contributes to the replication of human cytomegalovirus[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(5): e1001342.
- [11] LILLEY CE, CARSON CT, MUOTRI AR, GAGE FH, WEITZMAN MD. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(16): 5844-5849.
- [12] LU CC, CHEN YC, WANG JT, YANG PW, CHEN MR. Xeroderma pigmentosum C is involved in Epstein Barr virus DNA replication[J]. *The Journal of General Virology*, 2007, 88(Pt 12): 3234-3243.
- [13] ARIUMI Y, KUROKI M, DANSAKO H, ABE KI, IKEDA M, WAKITA T, KATO N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(19): 9639-9646.
- [14] XU LH, HUANG M, FANG SG, LIU DX. Coronavirus infection induces DNA replication stress partly through interaction of its nonstructural protein 13 with the p125 subunit of DNA polymerase δ [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(45): 39546-39559.
- [15] REN SH, REHMAN ZU, GAO B, YANG ZQ, ZHOU JY, MENG CC, SONG CP, NAIR V, SUN YJ, DING C. ATM-mediated DNA double-strand break response facilitated oncolytic Newcastle disease virus replication and promoted syncytium formation in tumor cells[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(6): e1008514.

- [16] GIOIA U, TAVELLA S, MARTÍNEZ-ORELLANA P, CICIO G, COLLIVA A, CECCON M, CABRINI M, HENRIQUES AC, FUMAGALLI V, PALDINO A, PRESOT E, RAJASEKHARAN S, IACOMINO N, PISATI F, MATTI V, SEPE S, CONTE MI, BAROZZI S, LAVAGNINO Z, CARLETTI T, et al. SARS-CoV-2 infection induces DNA damage, through CHK1 degradation and impaired 53BP1 recruitment, and cellular senescence[J]. *Nature Cell Biology*, 2023, 25(4): 550-564.
- [17] LUO YR, ZHOU ST, YANG L, LIU YP, JIANG SY, DAWULI Y, HOU YX, ZHOU TX, YANG ZB. Porcine epidemic diarrhoea virus induces cell-cycle arrest through the DNA damage-signalling pathway[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2020, 64(1): 25-32.
- [18] MING X, CHEN H, YANG Y, ZHAO P, SUN LM, ZHANG CS, SHIN HJ, LEE JS, JUNG YS, QIAN YJ. Porcine enteric coronavirus PEDV induces the ROS-ATM and Caspase7-CAD- γ H2AX signaling pathways to foster its replication[J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1782.
- [19] WEITZMAN MD, FRADET-TURCOTTE A. Virus DNA replication and the host DNA damage response[J]. *Annual Review of Virology*, 2018, 5(1): 141-164.
- [20] KONO T, LAIMINS L. Genomic instability and DNA damage repair pathways induced by human papillomaviruses[J]. *Viruses*, 2021, 13(9): 1821.
- [21] LI PC, XU CC, ZHANG XY, CAO C, WANG XJ, CAI G. Single-stranded RNA viruses activate and hijack host apical DNA damage response kinases for efficient viral replication[J]. *Genome Instability & Disease*, 2022, 3(2): 83-87.
- [22] YU JH, ZHANG WY, HUO WB, MENG XL, ZHONG T, SU Y, LIU YM, LIU JM, WANG ZY, SONG FM, ZHANG SX, LI ZL, YU XY, YU XF, HUA SC. Regulation of host factor γ -H2AX level and location by enterovirus A71 for viral replication[J]. *Virulence*, 2022, 13(1): 241-257.
- [23] COOK PJ, JU BG, TELESE F, WANG XT, GLASS CK, ROSENFELD MG. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions[J]. *Nature*, 2009, 458(7238): 591-596.
- [24] STIFF T, O'DRISCOLL M, RIEF N, IWABUCHI K, LÖBRICH M, JEGGO PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(7): 2390-2396.
- [25] POLO SE, JACKSON SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications[J]. *Genes & Development*, 2011, 25(5): 409-433.
- [26] WALKER M, BLACK EJ, OEHLER V, GILLESPIE DA, SCOTT MT. Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity[J]. *Oncogene*, 2009, 28(24): 2314-2323.
- [27] ZHAO H, PIWNICA-WORMS H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(13): 4129-4139.
- [28] KASAHARA K, GOTO H, ENOMOTO M, TOMONO Y, KIYONO T, INAGAKI M. 14-3-3 γ mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29(16): 2802-2812.
- [29] GUERVILLY JH, RENAUD E, TAKATA M, ROSSELLI F. USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation[J]. *Human Molecular Genetics*, 2011, 20(11): 2171-2181.
- [30] SATOH MS, LINDAHL T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair[J]. *Nature*, 1992, 356(6367): 356-358.
- [31] NASCIMENTO R, COSTA H, PARKHOUSE RME. Virus manipulation of cell cycle[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(3): 519-528.
- [32] LIU J, ZHANG C, HU WW, FENG ZH. Tumor suppressor p53 and metabolism[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2019, 11(4): 284-292.
- [33] SIONOV RV, HAUPT Y. The cellular response to p53: the decision between life and death[J]. *Oncogene*, 1999, 18(45): 6145-6157.
- [34] LI FQ, TAM JP, LIU DX. Cell cycle arrest and apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus in the absence of p53[J]. *Virology*, 2007, 365(2): 435-445.
- [35] SU MJ, SHI D, XING XX, QI SS, YANG D, ZHANG JY, HAN YR, ZHU QH, SUN HB, WANG XR, WU HY, WANG MJ, WEI S, LI CQ, GUO DH, FENG L, SUN DB. Coronavirus porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein interacts with p53 to induce cell cycle arrest in S-phase and promotes viral replication[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(16): e0018721.
- [36] LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division[J]. *Cell*, 1997, 88(3): 323-331.
- [37] SHIEH SY, IKEDA M, TAYA Y, PRIVES C. DNA damage-induced Phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2[J]. *Cell*, 1997, 91(3): 325-334.
- [38] DIRIL MK, RATNACARAM CK, PADMAKUMAR VC, DU TH, WASSER M, COPPOLA V, TESSAROLLO L, KALDIS P. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(10): 3826-3831.