

梅明珠, 杨先锋, 龙腾, 等. 狂犬病病毒 HEP-Flury *M* 基因重排后在小鼠神经母细胞瘤细胞中的表型分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 33-39.
MEI Mingzhu, YANG Xianfeng, LONG Teng, et al. Phenotypic consequences of *M* gene rearrangement of rabies virus HEP-Flury in mouse neuroblastoma cells[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 33-39.

狂犬病病毒 HEP-Flury *M* 基因重排后在小鼠神经母细胞瘤细胞中的表型分析

梅明珠^{1,2}, 杨先锋², 龙腾², 张琼², 赵静², 田钦², 彭娇娇²,
罗均², 姜贺², 林颖仪², 林志雄¹, 郭霄峰²

(1 广州海关技术中心, 广东 广州 510623; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探究狂犬病病毒 HEP-Flury *M* 基因重排对基因转录和蛋白表达的影响, 揭示病毒在小鼠神经母细胞瘤 (NA) 细胞中的表型变化与 *M* 基因重排的相关性。【方法】通过荧光定量 PCR、Western blot 以及病毒在 NA 细胞中的生长和扩散试验, 对亲本毒株 rHEP-Flury 和 *M* 基因重排毒株 M2、M4 在 NA 细胞中的基因转录、表达、生长和扩散进行比较。【结果】狂犬病病毒结构基因的转录和表达主要受病毒基因组 RNA 合成的影响, 但是在一个完整转录过程中单个结构基因的转录比例与其所在位置相关, *M* 基因重排病毒的 Leader RNA (LeRNA) 和 *L* mRNA 的转录比例显著高于亲本毒株 rHEP-Flury。*M* 基因重排病毒在 NA 细胞中的生长和扩散都劣于亲本毒株 rHEP-Flury。【结论】狂犬病病毒亲本毒株 rHEP-Flury 具有狂犬病病毒原始的基因组顺序, 在 NA 细胞中的生长和扩散都明显优于 *M* 基因重排病毒。结构基因在基因组中的位置主要决定其在一次转录过程中的转录比例, 进而影响病毒在 NA 细胞中的生长和扩散。

关键词: 狂犬病病毒; HEP-Flury; 基因重排; 基质蛋白; 表型; 神经母细胞瘤细胞
中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)02-0033-07

Phenotypic consequences of *M* gene rearrangement of rabies virus HEP-Flury in mouse neuroblastoma cells

MEI Mingzhu^{1,2}, YANG Xianfeng², LONG Teng², ZHANG Qiong², ZHAO Jing², TIAN Qin², PENG Jiaojiao²,
LUO Jun², JIANG He², LIN Yingyi², LIN Zhixiong¹, GUO Xiaofeng²
(1 Guangzhou Custom Technology Center, Guangzhou 510623, China; 2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To explore the effects of *M* gene rearrangement of rabies virus HEP-Flury on gene transcription and protein expression, reveal the correlation between phenotypic consequences of virus in mouse neuroblastoma (NA) cells and *M* gene rearrangement. 【Method】The gene transcription, expression, growth and spread of parent strain rHEP-Flury and *M* gene rearranged virus strains (M2 and M4) in infected NA cells were compared by fluorescence quantitative PCR, Western blot, growth and spread experiments of virus in NA cells. 【Result】The transcription and expression of rabies virus structural gene were mainly affected by RNA synthesis of virus genome. The gene position mainly affected the ratio of transcription in a complete transcription process. The transcription ratios of leader RNA (LeRNA) and *L* mRNA of *M* gene rearranged viruses were significantly

higher than those of rHEP-Flury. The growth and spread of *M* gene rearranged viruses in NA cells were inferiorer than rHEP-Flury. 【Conclusion】 rHEP-Flury has wild-type gene order of rabies virus. Its growth and spread in NA cells are superiorer to *M* gene rearranged viruses. The position of structural gene in genome determines its transcription ratio in a complete transcription process and affects the growth and spread of virus in NA cells.

Key words: rabies virus; HEP-Flury; gene rearrangement; matrix protein; phenotype; neuroblastoma cell

狂犬病是由狂犬病病毒 (Rabies virus, RABV) 引起的一种重要的高度嗜神经性人兽共患传染病, 人类和所有温血动物均易感, 感染后一旦出现临床症状, 致死率几乎为 100%^[1]。目前尚无有效的治疗方法, 主要依赖接种疫苗进行免疫预防。

狂犬病病毒属于单股负链 RNA 病毒目弹状病毒科狂犬病病毒属, 基因组顺序高度保守, 为 3'-N-P-M-G-L-5'。狂犬病病毒基因组只编码 5 种结构蛋白: 核蛋白 (Nucleoprotein, N 蛋白)、磷酸化蛋白 (Phosphoprotein, P 蛋白)、基质蛋白 (Matrix protein, M 蛋白)、糖蛋白 (Glycoprotein, G 蛋白) 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, L 蛋白), 其中 N、P、L 蛋白与狂犬病病毒 RNA 共同组成核糖核蛋白体, 核糖核蛋白体是狂犬病病毒转录和复制的核心成分^[2]。基因重排是改变基因组中的基因顺序, 从而改变病毒基因的表达和病毒表型。基因重排首先应用于水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 的研究, 该技术成功改变了 VSV 的表型^[3-5]。陈凯云等^[6]和文兆海等^[7]利用基因重排技术将狂犬病病毒 *SRV9 G* 基因重排至基因顺序第 2 位, 并对基因重排后病毒的遗传稳定性和免疫效果进行了评估。Mei 等^[8-9]对狂犬病病毒 Flury 高鸡胚传代株 (High egg passage-Flury, HEP-Flury) 的 *N* 和 *P* 基因进行了重排, 并对基因重排后病毒在小鼠神经母细胞瘤 (Neuroblastoma, NA) 细胞和小鼠上的生物学特性进行了评估, 探讨了基因重排与病毒表型的相关性。

狂犬病病毒基质蛋白 M, 是狂犬病病毒最小的结构蛋白, 主要参与病毒粒子的装配和出芽, 调节病毒的转录和复制平衡^[10-12]。M 蛋白被认为是决定狂犬病病毒致病性的一个重要因素^[12-13]。在前期研究中, Yang 等^[14]成功拯救了 *M* 基因位于第 2 位和第 4 位的病毒, 并发现这 2 个病毒在幼仓鼠肾细胞的传代细胞 (Clone of baby hamster kidney-21 cell, BSR) 上的生长劣于亲本毒株 rHEP-Flury。由于狂犬病病毒为嗜神经病毒^[15], 本研究拟进一步对狂犬病病毒亲本毒株 rHEP-Flury 和 *M* 基因重排病毒在 NA 细胞上的基因转录、表达、生长和扩散进行评估和比较, 进而探讨 *M* 基因重排对狂犬病病毒在 NA

细胞上的生物学特性的影响。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

狂犬病病毒亲本毒株 rHEP-Flury 基因结构顺序为 3'-N-P-M-G-L-5', 由华南农业大学兽医学院郭霄峰教授课题组拯救保存。*M* 基因位于第 2 位的基因重排病毒毒株 M2(3'-N-M-P-G-L-5') 和 *M* 基因位于第 4 位的基因重排病毒毒株 M4(3'-N-P-G-M-L-5') 由 Yang 等^[14] 前期通过反向遗传操作系统拯救获得。NA 细胞购自武汉生物制品所基因工程室。

1.2 基因重排病毒的 RT-PCR 鉴定

参照试剂盒说明书, 利用 Hipure universal RNA 试剂盒 (Magen) 提取病毒 RNA, 然后利用 HiScript® II 1st strand cDNA synthesis 试剂盒 (Vazyme) 反转录酶进行 cDNA 第 1 链的合成, 反转录引物为随机引物, 最后利用 3 对引物 D-F 和 P-R、D-F 和 N-R、D-F 和 M-R(表 1) 同时进行 PCR 扩增鉴定。根据 PCR 扩增产物大小区分亲本毒株 rHEP-Flury 和 *M* 基因重排病毒 M2 和 M4, 同时设置无菌双蒸水为阴性对照。回收 PCR 产物, 测序并进一步验证。

表 1 用于 *M* 基因重排病毒基因顺序鉴定的引物
Table 1 Primers used for gene order verification of *M* gene rearranged virus

引物名称	引物序列(5'→3')
Primer name	Primer sequence
D-F	CTTAACAACAAAACCAAAGAAGAAGCAG
P-R	CATCTCAAGATCGGCCAGACCG
N-R	TGAAGTTCGGTATAGTACTCC
M-R	GTCCTCATCCCTACAGTTTTTC

1.3 荧光定量 PCR 检测病毒 RNA 的表达

为了检测 *M* 基因重排对病毒结构基因转录的影响, 本研究将亲本毒株 rHEP-Flury 和基因重排病毒 M2、M4 分别感染 NA 细胞, 感染指数 (Multiplicity of infection, MOI) 设为 3.00, 以确保每个细胞都能感染病毒。34 °C 条件下孵育 12 h 后, 用 PBS 缓冲液将细胞漂洗 1 遍后收集细胞。利用 HiPure Universal RNA 试剂盒 (Magen) 提取细胞总 RNA,

参照 Mei^[8] 前期建立的荧光定量 PCR 对感染细胞中的病毒 Leader RNA(LeRNA) 和 *N*、*P*、*M*、*G*、*L* 基因 mRNA 的转录水平以及基因组 RNA(vRNA) 的复制水平进行半定量 PCR, 以 β -actin 作为内参基因。同时设置空白细胞对照组和病毒感染平行组, 利用 FITC 标记的抗狂犬病病毒的免疫球蛋白 (Fujirebio) 进行标记, 以确认每个细胞都感染了病毒。

1.4 Western blot 试验检测病毒蛋白的表达

将亲本毒株 rHEP-Flury 和 *M* 基因重排病毒 M2、M4 分别感染 NA 细胞, MOI=3.00, 同时设未接毒的细胞作为空白对照。感染 12 h 后取出细胞板, 每孔加入 1 mL 4 °C 预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次, 然后加入 100 μ L RIPA 蛋白裂解液 (1 mL RIPA 蛋白裂解液加 10 μ L PMSF), 混匀后置于冰上裂解 30 min。12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 冻存于-80 °C 冰箱。经 Pierce BCA protein assay 试剂盒进行蛋白定量后, 调节成相同浓度, 每份样品取 15 μ L 进行 100 g/L SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后将蛋白质转印到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 用 5%(w) 脱脂奶粉封闭 1 h, 然后用 0.1%(w) 的 PBST 缓冲液洗涤 2 次, 最后分别加入抗狂犬病病毒 N(按体积比 1:1 000 稀释, 浙江同点生物科技有限公司)、P(按体积比 1:500 稀释, 华南农业大学兽医学院郭霄峰课题组制备)、M(按体积比 1:100 稀释, 华南农业大学兽医学院郭霄峰课题组制备) 和 G(按体积比 1:500 稀释, 华南农业大学兽医学院郭霄峰课题组制备) 蛋白的单克隆抗体, 4 °C 孵育过夜。设置 β -actin(按体积比 1:1 000 稀释, 上海碧云天生物技术有限公司) 为参考蛋白。第 2 天取出 PVDF 膜用 0.1%(w) 的 PBST 缓冲液洗涤 4 次, 然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (体积比 1:50 000, Bioworld), 37 °C 条件下孵育 2 h。孵育后用 0.1%(w) 的 PBST 缓冲液洗涤 4 次, 再用 PBS 缓冲液漂洗 1 次, 然后进行曝光, 拍照, 最后利用软件 Image-Pro Plus 6.0 进行分析。

1.5 病毒在神经母细胞瘤细胞上的一步和多步生长曲线

为了解亲本毒株 rHEP-Flury 和 *M* 基因重排病毒 M2、M4 在神经细胞上的生长动力学差异, 本研究测定了它们在 NA 细胞上的一步 (MOI=3.00) 和多步 (MOI=0.01) 生长曲线。于第 1 天接种 NA 细胞至直径 3.5 cm 的细胞培养板中, 每板 8×10^5 个细胞。第 2 天先将细胞用无血清的 RPMI1640 培养基洗 1 遍, 然后分别以 MOI=0.01 和 MOI=3.00 接种病毒, 37 °C 条件下孵育 1 h 后, 弃上清, 用 RPMI1640 培养基洗 3 遍, 然后加入 5 mL 含 5% (φ) FBS 的

RPMI1640, 置于 34 °C、5% (φ) CO₂ 环境中培养。分别于 12、24、48、72 和 96 h 后收集 120 μ L 细胞培养上清液进行滴度测定^[16], 每个时间点的病毒滴度测 2 次取平均值, 共做 3 次重复。

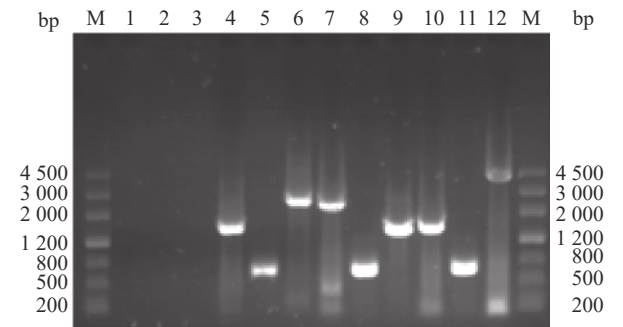
1.6 病毒在神经母细胞瘤细胞上的扩散

慢生长和快扩散有利于狂犬病病毒逃避宿主免疫系统, 增强病毒的致病性^[17-18], 因此本研究对病毒在 NA 细胞上的生长和扩散进行了评估。参照文献^[19], 于第 1 天在 12 孔板上接种细胞, 每孔接种 2.5×10^5 个 NA 细胞, 第 2 天以 MOI=0.005 分别接种 M2、M4 和 rHEP-Flury。接种完将细胞板置于入 34 °C、5% (φ) CO₂ 环境中培养, 分别于 12、24、36、48、60 和 72 h 后取出, 弃上清, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 遍。经 80% (φ) 预冷丙酮溶液固定后, 用 FITC 标记的抗狂犬病病毒的免疫球蛋白进行免疫荧光染色, 在荧光显微镜下观察和拍照, 每孔分别选 3 个视野进行拍照。

2 结果与分析

2.1 基因顺序的确定

利用 3 对引物对亲本毒株 rHEP-Flury 和重排病毒 M2、M4 的基因顺序进行确认, 结果显示: 利用引物 D-F 和 P-R 对 rHEP-Flury、M2 和 M4 进行扩增的产物大小分别为 1 570、2 380 和 1 570 bp (图 1, 泳道 4、7、10); 利用引物 D-F 和 N-R 对 3 种病毒进行扩增的产物大小均为 677 bp(图 1, 泳道 5、8、11); 利用引物 D-F 和 M-R 对 3 种病毒进行扩增的产物大小分别为 2 537、1 541 和 4 205 bp (图 1, 泳道 6、9、12)。这些条带与预期大小一致, 进一步测序比对确定为目的条带, 说明病毒的基因顺序没有改变。



M: DNA marker; 泳道 1、2、3: 无菌双蒸水; 泳道 4、5、6: 亲本毒株 rHEP-Flury; 泳道 7、8、9: *M* 基因重排病毒 M2; 泳道 10、11、12: *M* 基因重排病毒 M4

M: DNA marker; Lane 1, 2, 3: Sterile double distilled water; Lane 4, 5, 6: Parent strain rHEP-Flury; Lane 7, 8, 9: *M* gene rearranged virus M2; Lane 10, 11, 12: *M* gene rearranged virus M4

图 1 病毒基因顺序的鉴定

Fig. 1 Determination of gene order in virus genome

2.2 神经母细胞瘤细胞中病毒基因的转录和表达

将 rHEP-Flury 和 M2、M4 感染 NA 细胞后,对细胞内病毒基因合成转录和蛋白表达水平进行测定,以 β -actin 作为内参基因,利用软件 GraphPad Prism 6.0 进行作图和生物学统计分析。检测结果显示:病毒感染细胞 12 h 后,亲本毒株 rHEP-Flury 的病毒 vRNA 的合成水平和 *N*、*P*、*M*、*G* mRNA 的转

录水平显著高于 M2 和 M4。病毒 *N*、*P*、*M*、*G* 和 *L* mRNA 的转录水平与 vRNA 的合成水平变化趋势一致,均为 rHEP-Flury > M4 > M2 (图 2A)。进一步的相关性分析表明 *N*、*P*、*M*、*G* 和 *L* mRNA 的转录水平与病毒 vRNA 或 LeRNA 具有显著相关性 ($r>0.9$, $P<0.01$),说明病毒结构基因的转录与病毒基因组 vRNA 的合成呈正相关。

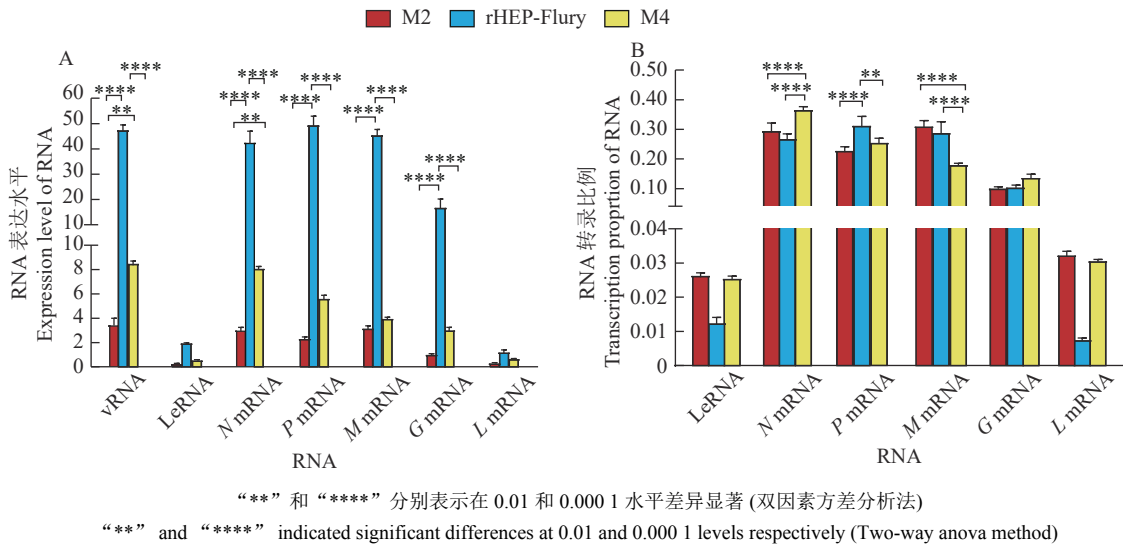


图 2 不同病毒感染的神经母细胞瘤细胞中病毒基因的转录和表达

Fig. 2 Transcription and expression of virus gene in neuroblastoma cells infected by different viruses

为了进一步确定结构基因位置对结构基因 mRNA 转录的影响,本研究对各结构基因 mRNA 在一次完整的转录过程中的转录比例进行了分析。mRNA 转录比例=该基因 mRNA 转录子数/(所有结构基因 mRNA 转录子总数+LeRNA 数量)。结果显示,*M* 基因位置距离基因组 3'端越远,*M* mRNA 的转录比例越低,即 M2>rHEP-Flury>M4。M4 的 *G* 基因被动向前移动一位,转录比例提高;M2 的 *P* 基因被动向后移一位,转录比例降低。此外,这 3 个病毒的 *N* 基因和 *L* 基因,虽然基因位置相同,但是转录比例不完全一致,*M* 基因重排病毒的 *L* mRNA 和 LeRNA 的转录比例均高于 rHEP-Flury(图 2B)。因此推测基因位置影响病毒结构基因的转录比例,但是还存在其他影响病毒结构基因转录的因素。

利用 Western blot 对病毒感染的 NA 细胞中的 *N*、*P*、*M* 和 *G* 蛋白表达的检测结果显示:病毒感染细胞 12 h 后,M2 感染的 NA 细胞中的 *N*、*P*、*M* 和 *G* 蛋白表达水平明显低于亲本毒株,M4 感染的 NA 细胞中的 *M* 蛋白的表达水平明显低于亲本毒株(图 3)。以 β -actin 作为参考蛋白对细胞中的 *N*、*P*、*M* 和 *G* 蛋白进行半定量,结果显示:*N*、*P*、*M* 和 *G* 这 4 种结构蛋白的表达水平与 mRNA 的表达水

平基本一致(图 4),说明病毒结构蛋白的表达受到结构基因 mRNA 的转录水平调节。

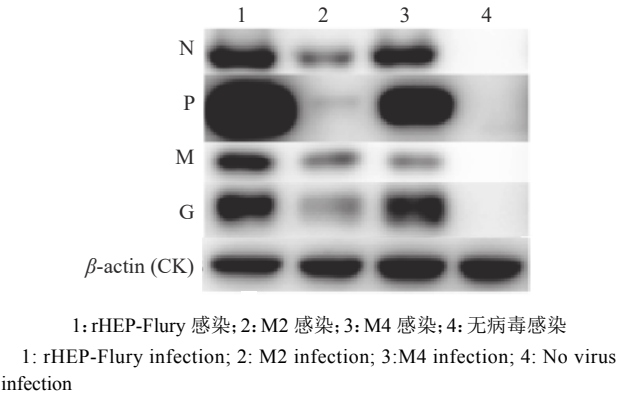


图 3 不同病毒感染的神经母细胞瘤细胞细胞中的蛋白表达
Fig. 3 Protein expression in neuroblastoma cells infected by different viruses

2.3 病毒在神经母细胞瘤细胞中的生长与扩散
当 MOI=0.01 时,病毒在 NA 细胞中的多步生长曲线显示:rHEP-Flury、M2 和 M4 在 NA 细胞上的生长没有显著差别,rHEP-Flury 的生长和最大滴度优于 M2 和 M4;感染 48 h 前,M4 在 NA 细胞中的生长速度快于 M2,48 h 后,M2 的生长速度快

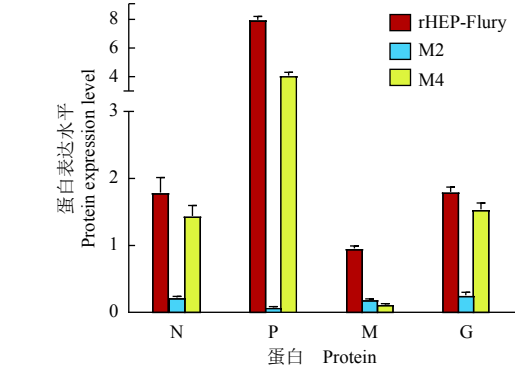
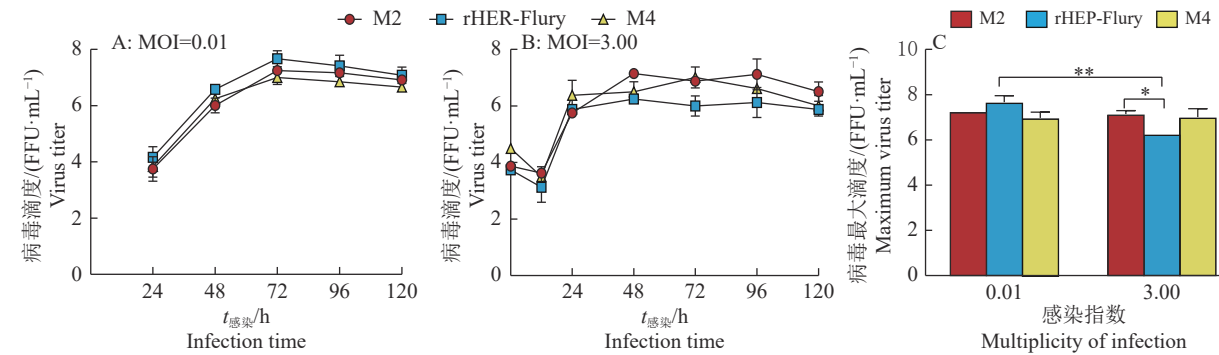


图 4 不同病毒感染的神经母细胞瘤细胞中的蛋白表达

Fig. 4 Protein expression in neuroblastoma cells infected by different viruses

于 M4, 且 M2 最大滴度高于 M4(图 5A)。当 MOI=3.00 时, 病毒在 NA 细胞中的一步生长曲线显示: rHEP-Flury、M2 和 M4 在 NA 细胞上的一步生长曲线没有明显规律, 都是在感染 48 h 左右达到最高峰 (图 5B)。进一步对 MOI=0.01 和 MOI=3.00 时病毒的最大滴度进行比较, 结果显示: 当 MOI=0.01 时, M2、rHEP-Flury 和 M4 在 NA 细胞上的生长都优于 MOI=3.00, 其中亲本毒株 rHEP-Flury 差异最显著。当 MOI=0.01 时, M2、M4 在 NA 细胞中的最大滴度与 rHEP-Flury 无显著性差异; 当 MOI=3.00 时, M2 在 NA 细胞中的最大滴度显著高于 rHEP-Flury(图 5C)。



“*” 和 “**” 分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著 (双因素方差分析法)
“*” and “**” indicated significant differences at 0.05 and 0.01 levels respectively (Two-way anova method)

图 5 狂犬病病毒在神经母细胞瘤细胞中的生长

Fig. 5 Growth of rabies virus in neuroblastoma cells

病毒在 NA 细胞中的扩散试验结果 (图 6) 显示: 病毒感染细胞 12 h 后, 利用 FITC 标记的抗狂犬病病毒的免疫球蛋白进行标记, 所有细胞均为阴性; 当病毒感染细胞 24 h 后, 所有处理均有阳性细胞呈现, 但数量上没有明显差别; 当病毒感染 36 h

后, 亲本毒株 rHEP-Flury 阳性细胞数量略多; 当病毒感染 48 h 后, rHEP-Flury 和 M4 几乎感染了全部细胞, M2 此时未能感染全部细胞, 这与病毒在 NA 细胞上的多步生长曲线显示的感染 48 h 前, M4 在 NA 细胞中的生长速度快于 M2 一致; 当病毒感

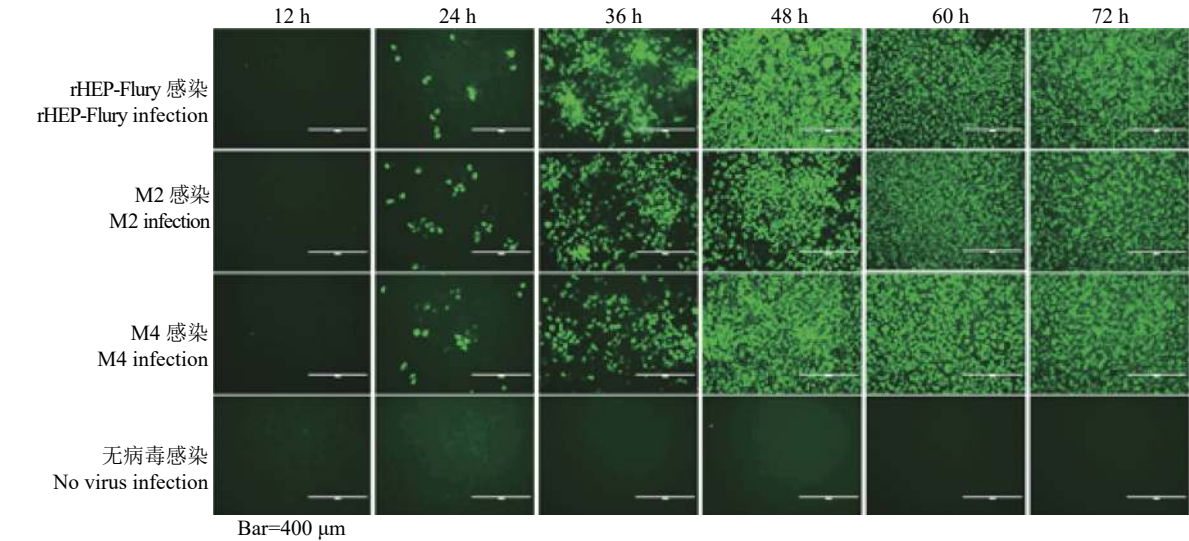


图 6 狂犬病病毒在神经母细胞瘤细胞中的扩散

Fig. 6 Spread of rabies virus in neuroblastoma cells

染 60 h 后, rHEP-Flury、M2 和 M4 接种的细胞均显示全部被感染。这表明狂犬病病毒 *M* 基因的重排只能降低病毒在细胞间的扩散速度, 并不能限制病毒在细胞间的扩散。

3 讨论与结论

前期研究表明单股负链 RNA 病毒缺少同源重组的能力, 基因顺序改变后不会发生回复突变^[20], 利用 RT-PCR 方法对本研究 *M* 基因重排病毒 M2 和 M4 的基因顺序进行验证, 结果表明狂犬病病毒 HEP-Flury 作为单股负链 RNA 病毒, 其基因重排后不会发生回复突变。

M 蛋白对狂犬病病毒的转录和复制调节主要是刺激复制抑制转录。本研究显示当病毒感染 NA 细胞 12 h 后, 病毒 *N*、*P*、*M*、*G* 和 *L* mRNA 的转录水平与 vRNA 的合成呈正相关, 这可能是因为狂犬病病毒只表达 *N*、*P*、*M*、*G*、*L* 这 5 种蛋白, 它们不仅是狂犬病病毒的功能蛋白还是组成狂犬病病毒粒子的结构蛋白, 因此表达受到病毒复制的二级影响^[21]。亲本毒株 rHEP-Flury 具有野生型的基因顺序, 最适合病毒的生长和基因表达, 因此最先达到病毒复制的需求, 细胞内 vRNA 水平显著高于 *M* 基因重排病毒^[22]。基因重排病毒 M2 的 *M* 基因从 3 位移至 2 位, 提高了 *M* 基因的转录比例, 但是在病毒感染细胞的早期, 其病毒基因组 RNA 的复制水平仍低于亲本毒株 rHEP-Flury 和 M4, 这可能是因为狂犬病病毒的 RNA、*N*、*P* 和 *L* 蛋白共同形成核糖核蛋白体, 核糖核蛋白体是狂犬病病毒转录和复制的核心成分^[2]。此外, Pattnaik 等^[23]发现最佳的 *N*、*P*、*L* 比例能产生最佳的病毒复制, 亲本毒株 rHEP-Flury 和基因重排病毒 M4 的 *N*、*P*、*L* 位置没有发生改变, 因此对 *N*、*P*、*L* 比例影响较小, 病毒复制速度较快, 而 M2 的 *M* 基因从第 3 位移至第 2 位, *P* 基因被动从第 2 位移至第 3 位, 对 *N*、*P*、*L* 比例影响较大, 因此病毒复制速度较慢。狂犬病病毒 LeRNA 能够与宿主的 La 蛋白结合, 抑制细胞 RNA 的合成^[24]。近期研究表明致病性狂犬病病毒的 LeRNA 能够干扰狂犬病病毒 *N* 蛋白与 vRNA 的结合, 从而抑制病毒狂犬病病毒的复制^[25]。本研究中 *M* 基因重排病毒的 LeRNA 的转录比例明显高于亲本毒株 rHEP-Flury, 重排后病毒增殖速度降低是否与此相关还有待进一步验证。

Yang 等^[14]前期研究显示: 在低感染指数 (MOI=0.1) 和高感染指数 (MOI=5.0) 时 *M* 基因重排病毒在 BSR 细胞上的生长都劣于亲本毒株 rHEP-

Flury, 但 M4 的生长优于病毒 M2, 这与本研究病毒感染细胞 12 h 后病毒在细胞中的增殖速度一致。但是病毒在 NA 细胞中生长的最大滴度结果显示: 当 MOI=3.00 时, 亲本毒株 rHEP-Flury 感染的 NA 细胞上清中病毒滴度显著低于 MOI=0.01 时, 同时也低于相同感染指数时的 *M* 基因重排病毒, 这可能是因为狂犬病病毒 HEP-Flury 虽然不能诱导 NA 细胞产生经典的细胞病变, 但是能够诱导 NA 细胞发生凋亡^[26-27], 且在高感染指数时, 诱导细胞凋亡的能力更强^[8, 28]。因此, 高感染指数时, 亲本毒株 rHEP-Flury 在 NA 细胞中的最大滴度显著下调, 而狂犬病病毒 HEP-Flury 不能诱导 BSR 细胞凋亡, 因此病毒的最大滴度与感染指数无关。

基因重排病毒 M2 在 NA 细胞中生长的最大滴度高于 M4, 可能与 M2 在 NA 细胞中的增殖速度减慢有关, 因为狂犬病病毒的缓慢增殖能够维持细胞结构的稳定性, 从而有利于病毒的复制。在病毒感染细胞 48 h 前, M4 生长速度快于 M2, 在细胞间的扩散更快, 细胞上清中的病毒滴度高于 M2; 感染细胞 48 h 后, 几乎所有的细胞被感染, 此时 M2 的慢生长更利于细胞结构的稳定, 因此后期细胞上清中的病毒滴度高于 M4。病毒 M2 的 *M* 基因移至第 2 位, 转录比例增加可能刺激病毒在单个细胞中的复制, 使病毒滴度升高。此外, *G* 蛋白是狂犬病病毒诱导 NA 细胞凋亡的主要蛋白^[29], 病毒 M4 在 *M* 基因后移一位时 *G* 基因被动前移一位, 增强了病毒诱导细胞凋亡的能力, 导致病毒在 NA 细胞上的最大滴度降低。

狂犬病病毒弱毒株的 *G* 蛋白能够诱导中枢神经系统凋亡, 从而限制病毒扩散^[30-31]。虽然 HEP-Flury 的 *G* 蛋白能够诱导神经细胞凋亡, 但在低感染指数时, 病毒诱导细胞凋亡的能力不足以限制病毒的扩散, 因此病毒的扩散速度与病毒增殖速度一致, M4 的扩散速度快于 M2。

本研究比较分析了狂犬病亲本毒株 rHEP-Flury 和 *M* 基因重排病毒 M2、M4 在 NA 细胞中的基因转录、蛋白表达、生长及扩散, 推测出狂犬病病毒 HEP-Flury 的基因顺序通过影响结构基因在一次基因转录中的比例, 改变病毒在 NA 细胞中的生长和扩散特性, 这为进一步了解病毒结构基因与体外生物学特性的相关性奠定了基础。

参考文献:

[1] MRAK R E, YOUNG L. Rabies encephalitis in humans: Pathology, pathogenesis and pathophysiology[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1994, 53(1): 1-10.

- [2] ALBERTINI A A, RUIGROK R W, BLONDEL D. Rabies virus transcription and replication[J]. *Adv Virus Res*, 2011, 79: 1-22.
- [3] BALL L A, PRINGLE C R, FLANAGAN B, et al. Phenotypic consequences of rearranging the P, M, and G genes of vesicular stomatitis virus[J]. *J Virol*, 1999, 73(6): 4705-4712.
- [4] WERTZ G W, PEREPELITSA V P, BALL L A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 3501-3506.
- [5] FLANAGAN E B, BALL L A, WERTZ G W. Moving the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus to promoter-proximal positions accelerates and enhances the protective immune response[J]. *J Virol*, 2000, 74(17): 7895-7902.
- [6] 陈凯云, 文兆海, 翟少华, 等. 基因重排狂犬病病毒疫苗株免疫效果的初步研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(1): 279-286.
- [7] 文兆海, 毛丽萍, 陈凯云, 等. 基因重排减毒狂犬病病毒的拯救及遗传稳定性的研究[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(10): 1235-1241.
- [8] MEI M, LONG T, ZHANG Q, et al. Phenotypic Consequences *in vivo* and *in vitro* of rearranging the P gene of RABV HEP-Flury[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00120.
- [9] MEI M, LONG T, ZHANG Q, et al. Phenotypic consequence of rearranging the N gene of RABV HEP-Flury[J]. *Viruses*, 2019, 11(5). doi: 10.3390/v11050402.
- [10] WIRBLICH C, TAN G S, PAPANERI A, et al. PPEY motif within the rabies virus (RV) matrix protein is essential for efficient virion release and RV pathogenicity[J]. *J Virol*, 2008, 82(19): 9730-9738.
- [11] FINKE S, MUELLER-WALDECK R, CONZELMANN K K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(6): 1613-1621.
- [12] PULMANAUSAHAKUL R, LI J, SCHNELL M J, et al. The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread[J]. *J Virol*, 2008, 82(5): 2330-2338.
- [13] 王朝, 周明, 傅振芳, 等. 狂犬病病毒逃逸宿主天然免疫反应的研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(3): 237-244.
- [14] YANG X F, PENG J J, LIANG H R, et al. Gene order rearrangement of the M gene in the rabies virus leads to slower replication[J]. *Virusdisease*, 2014, 25(3): 365-371.
- [15] UGOLINI G. Rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections[J]. *Adv Virus Res*, 2011, 79: 165-202.
- [16] ZHAO L, TORIUMI H, KUANG Y, et al. The roles of chemokines in rabies virus infection: Overexpression may not always be beneficial[J]. *J Virol*, 2009, 83(22): 11808-11818.
- [17] FABER M, FABER M L, PAPANERI A, et al. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity[J]. *J Virol*, 2005, 79(22): 14141-14148.
- [18] DAVIS B M, RALL G F, SCHNELL M J. Everything you always wanted to know about rabies virus (but were afraid to ask)[J]. *Annu Rev Virol*, 2015, 2(1): 451-471.
- [19] WIRBLICH C, SCHNELL M J. Rabies virus (RV) glycoprotein expression levels are not critical for pathogenicity of RV[J]. *J Virol*, 2011, 85(2): 697-704.
- [20] PRINGLE C R. The genetics of vesiculoviruses[J]. *Arch Virol*, 1982, 72(1/2): 1-34.
- [21] OKUMURA A, HARTY R N. Rabies virus assembly and budding[J]. *Adv Virus Res*, 2011, 79: 23-32.
- [22] FINKE S, CONZELMANN K K. Replication strategies of rabies virus[J]. *Virus Res*, 2005, 111(2): 120-131.
- [23] PATTNAIK A K, WERTZ G W. Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs[J]. *J Virol*, 1990, 64(6): 2948-2957.
- [24] KURILLA M G, CABRADILLA C D, HOLLOWAY B P, et al. Nucleotide sequence and host La protein interactions of rabies virus leader RNA[J]. *J Virol*, 1984, 50(3): 773-778.
- [25] ZHANG R, LIU C, CAO Y, et al. Rabies viruses leader RNA interacts with host Hsc70 and inhibits virus replication[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 43822-43837.
- [26] PREHAUD C, LAY S, DIETZSCHOLD B, et al. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis[J]. *J Virol*, 2003, 77(19): 10537-10547.
- [27] THOULOUBE M I, LAFAGE M, YUSTE V J, et al. High level of Bcl-2 counteracts apoptosis mediated by a live rabies virus vaccine strain and induces long-term infection[J]. *Virology*, 2003, 314(2): 549-561.
- [28] PENG J, ZHU S, HU L, et al. Wild-type rabies virus induces autophagy in human and mouse neuroblastoma cell lines[J]. *Autophagy*, 2016, 12(10): 1704-1720.
- [29] LIU X, YANG Y, SUN Z, et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87105.
- [30] LAY S, PREHAUD C, DIETZSCHOLD B, et al. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a major inducer of apoptosis in human jurkat T cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 577-581.
- [31] SARMENTO L, TSEGAI T, DHINGRA V, et al. Rabies virus-induced apoptosis involves caspase-dependent and caspase-independent pathways[J]. *Virus Res*, 2006, 121(2): 144-151.