

汪婷, 汪威, 徐欢, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白及其结构域 I、II、III 对 DEF 细胞周期与凋亡的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 205-211.
WANG Ting, WANG Wei, XU Huan, et al. Effects of duck Tembutsu virus E protein and its domains of I, II, III on DEF cell cycle and apoptosis[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 205-211.

鸭坦布苏病毒 E 蛋白及其结构域 I、II、III 对 DEF 细胞周期与凋亡的影响

汪 婷¹✉, 汪 威¹, 徐 欢¹, 殷世彬¹, 孙敏华², 江心月¹, 徐 静¹, 汪招雄¹✉
(1 长江大学 动物科学学院, 湖北 荆州 434025; 2 广东省农业科学院 动物卫生研究所, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】探究鸭坦布苏病毒 (Duck Tambusu virus, DTMUV) E 蛋白全长及其结构域 I、II 和 III (DI、DII 和 DIII) 对鸭胚成纤维细胞 (Duck embryo fibroblast, DEF) 的细胞周期与凋亡的影响。【方法】本研究设计、合成 DTMUV E 蛋白全长及其 DI、DII 和 DIII 真核表达质粒, 并转染至 DEF, 用流式细胞仪检测不同蛋白引起的 DEF 细胞凋亡和细胞周期的变化。【结果】细胞凋亡结果显示: 质粒转染细胞 24 h 后, E 蛋白全长及 DI、DII、DIII 诱导的 DEF 早期凋亡率分别是 16.4%、15.1%、14.0% 和 17.2%; 质粒转染细胞 36 h 后, E 蛋白全长及 DI、DII、DIII 诱导的 DEF 早期凋亡率分别是 23.4%、18.5%、26.7% 和 29.4%。细胞周期检测结果显示: E 蛋白全长及 DI、DII、DIII 的质粒转染细胞 24、36 h 后, DNA 合成期 (S 期) 细胞比例都明显高于 pEGFP-N1 空载体转染组。质粒转染 24 h 后, E 蛋白及 DI、DII、DIII 的 S 期细胞比例分别为 5.43%、22.58%、12.75% 和 12.80%; 质粒转染细胞 36 h 后, E 蛋白及 DI、DII、DIII 的 S 期细胞比例分别为 9.98%、11.44%、10.44% 和 11.00%。【结论】DTMUV E 蛋白全长及其 3 个结构域均能诱导早期细胞凋亡, 引起细胞 S 期的停滞, 但是各蛋白片段诱导细胞凋亡和引起细胞周期变化的能力存在一定差异。

关键词: 鸭坦布苏病毒; E 蛋白; 结构域; 细胞周期; 细胞凋亡
中图分类号: S852 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2023)02-0205-07

Effects of duck Tembutsu virus E protein and its domains of I, II, III on DEF cell cycle and apoptosis

WANG Ting¹✉, WANG Wei¹, XU Huan¹, YIN Shibin¹, SUN Minhua², JIANG Xinyue¹, XU Jing¹, WANG Zhaoxiong¹✉
(1 School of Animal Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2 Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of the whole length of Duck Tambusu virus (DTMUV) E protein and its domains of I, II and III (DI, DII and DIII) on the cell cycle and apoptosis of duck embryo fibroblast (DEF) cells. 【Method】The full-length of DTMUV E protein, DI, DII and DIII eukaryotic expression plasmids were designed and synthesized, and transfected into DEF. The changes of DEF apoptosis and cell cycle caused by different proteins were detected by flow cytometry. 【Result】The results of apoptosis showed that after 24 h of plasmid transfection, the apoptosis rates of DEF induced by the full length, DI, DII and

收稿日期:2022-04-11 网络首发时间:2022-12-26 18:04:28
首发网址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20221226.0829.001.html>
作者简介:汪 婷, 硕士研究生, 主要从事动物传染病防治和病原感染宿主致病机制研究, E-mail: 1367421445@qq.com;
通信作者: 汪招雄, 副教授, 博士, 主要从事病原感染与致病机制研究, E-mail: luke751751@163.com
基金项目: 广东省农业科学院动物卫生研究所畜禽疫病防治研究重点实验室开放课题 (YDWS1905); 华中农业大学农业微生物国家重点实验室开放课题 (AMLKF201910)

DIII were 16.4%, 15.1%, 14.0% and 17.2% respectively; after 36 h of plasmid transfection, the apoptosis rates of DEF induced by E protein full length, DI, DII and DIII were 23.4%, 18.5%, 26.7% and 29.4%. The results of cell cycle detection showed that the percentage of DNA synthesis phase (S-phase) cells transfected with E protein full length, DI, DII and DIII plasmid was obviously higher than those of cells transfected with pEGFP-N1 empty vector 24 h and 36 h later. After 24 h of plasmid transfection, the percentage of S-phase cells in E protein, DI, DII and DIII groups were 5.43%, 22.58%, 12.75% and 12.80%, respectively; After 36 h of plasmid transfection, the percentage of S-phase cells in E protein, DI, DII and DIII groups were 9.98%, 11.44%, 10.44% and 11.00%, respectively. 【Conclusion】 The full length of DTMUV E protein and its three domains can induce early cell apoptosis and arrest the S-phase cells, but the ability of each protein fragment to induce cell apoptosis and change the cell cycle is different.

Key words: Duck Tembusu virus; E protein; Domain; Cell cycle; Apoptosis

鸭坦布苏病毒 (Duck Tembusu virus, DTMUV) 是黄病毒科黄病毒属恩塔亚病毒群的一种新型黄病毒, 可引起雏鸭腹泻和神经症状, 蛋鸭卵巢出血坏死、产蛋量急剧下降, 严重者出现死亡^[1]。近年来有报道, 该病的感染宿主已扩大至麻雀、鹅、鸽子等多种禽类^[2]。该病毒的开放性阅读框 (Open reading frame, ORF) 编码产生 1 个 3 425 个氨基酸长度的多肽, 在宿主和病毒蛋白酶的作用下, 可水解为 C、prM、E 结构蛋白和 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5 非结构蛋白^[3]。

E 蛋白是 DTMUV 的外膜蛋白, 包含大约 501 个氨基酸残基, 由 1 503 个核苷酸残基构成, 相对分子质量为 54 200^[4]。其参与病毒的细胞膜融合和穿入, 能刺激机体产生保护性的中和抗体, 是主要的免疫原性蛋白^[5]。E 蛋白空间结构多数为 β -折叠, 并形成 3 个不同的空间结构域——Domain I、Domain II 和 Domain III, 分别简称 DI、DII 和 DIII^[6]。其中, DI 位于包膜蛋白的中部, 通过柔性铰链连接 DII^[7], DI 中的糖基化位点与病毒产生、pH 敏感性和神经侵袭性有关^[8]。DII 由 2 个从 DI 循环中投射出来的片段组成, 折叠成指状结构, 含有高度保守的疏水性顶端的融合环, 称为融合肽 (Fusion peptide, FP)。当融合形成构象时, 融合肽负责与靶膜的直接相互作用^[9]。具有免疫球蛋白 IgG 样结构的 E 蛋白 DIII 位于融合 E 蛋白羧基端, 只有 1 个二硫键影响 E 蛋白抗原结构正确性, 该区包含众多抗原表位, 在病毒结合细胞受体并入侵细胞机制中具有重要作用, 是临床诊断和亚单位疫苗制备的重要靶候选区域^[10]。近年来研究表明, E 蛋白是病毒的主要毒力抗原, 它参与病毒的许多复制过程; 此外, 其所含的大量抗原表位与病毒入侵宿

主细胞以及病毒致病性密切相关^[11]。而目前对 DTMUV E 蛋白 DI、DII 和 DIII 功能的研究较少。本研究旨在探讨 E 基因 DI、DII 和 DIII 真核表达产物对鸭胚成纤维细胞 (Duck embryo fibroblast, DEF) 细胞周期与细胞凋亡的影响, 为 E 蛋白 DI、DII 和 DIII 的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pEGFP-N1 真核表达质粒由长江大学动物科学学院禽病实验室保存; DMEM 培养基、Lipo2000 脂质体转染试剂、Opti-MEM 培养基均购于 Thermo Fisher Scientific 公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒和细胞周期检测试剂盒购于 Biosharp 公司。

1.2 重组质粒的构建

根据 DTMUV E 蛋白基因及其结构域 I、II 和 III 基因核苷酸序列, 设计 pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII、pEGFP-N1-DIII 4 种真核表达质粒, 并交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 基因片段及长度见图 1 和表 1。

1.3 质粒转染

参照 Lipo2000 脂质体转染试剂说明将 pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII、pEGFP-N1-DIII 和空载体 pEGFP-N1 转染 DEF 细胞。设置不转染质粒的细胞为阴性对照 (CK)。

1.4 倒置荧光显微镜下观察 GFP 荧光表达

将质粒转染 DEF 24 h 后, 将细胞置于倒置荧光显微镜下, 观察 GFP 在细胞中的表达并拍照。

1.5 细胞总蛋白的提取

在质粒转染 DEF 24 h 后, 弃去培养基, 用胰酶消化, 用 DMEM 完全培养基 (含体积分数为

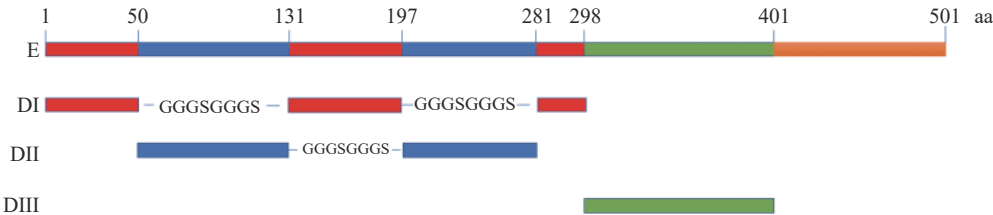


图 1 DTMUV E 蛋白及 DI、DII、DIII 分布
Fig. 1 Distribution of DTMUV E protein and DI, DII, DIII

表 1 DTMUV E 蛋白 DI、DII、DIII 序列
Table 1 Sequence of DI, DII, DIII of DTMUV E protein

基因名称 Gene name	序列设计 Sequence design	长度/bp Length
<i>pEGFP-N1-DI</i>	CTCGAGATG+50aa+GGGSGGGS+66aa+GGGSGGGS+17aa+CGGGATCC	447
<i>pEGFP-N1-DII</i>	CTCGAGATG+81aa+GGGSGGGS+84aa+CGGGATCC	519
<i>pEGFP-N1-DIII</i>	CTCGAGATG+103aa+CGGGATCC	312

10% 的 FBS) 吹打细胞, 收集于 15 mL EP 管中, 1 500 r/min 离心 5 min, 用预冷 PBS 洗涤细胞, 重复 2 次, 去上清液。6 孔板每孔加 200 μ L 裂解液; 裂解液用之前 1 min 加 PMSF(蛋白酶抑制剂), 混匀, 冰浴 30 min。将细胞收集至 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}$ C 条件下于 14 000 r/min 离心 10 min。小心吸取上清液, 转移至新的 15 mL 离心管中, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 Western blot 检测 DTMUV E 蛋白及其 DI、DII 和 DIII

将蛋白样品加 5 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液煮沸处理 5 min 后, 进行 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。纯化蛋白经 100 g/L SDS-PAGE 分离后, 采用湿法将蛋白质转印至硝酸纤维膜上, 采用 75 V 电压作用 1.5 h。将蛋白条放入封闭液(脱脂乳体积分数为 5% 的 TBST 溶液)中, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下作用 1.5 h。将蛋白条转移到一抗稀释液中, 4 $^{\circ}$ C 慢摇, 过夜。次日用 TBST 清洗 3 次后转移至二抗稀释液中, 37 $^{\circ}$ C 慢摇, 孵育 1 h。用 TBST 清洗 3 次后按照 Super ECL PLus 超敏发光液显色试剂盒说明书显色。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

在质粒转染细胞 24、36 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液。用预冷的 PBS 重悬细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液, 在用 PBS 重悬 1 次细胞、小心吸除上清液后, 加入 250 μ L Binding buffer 重悬细胞, 吸取 100 μ L 的细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加 5 μ L Annexin V-FITC, 避光孵育 10 min, 上机前 5 min 加入 10 μ L 碘化丙啶 (PI) 溶液, 轻轻混匀。上机前在反应管中补加 400 μ L PBS 重悬细胞, 避光保存, 随即进行流式细胞仪检测。

1.8 流式细胞术检测细胞周期

在质粒转染 24、36 h 后, 小心吸除细胞培养液, 用胰酶消化细胞, 加入 1 mL 完全培养基收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液。用 1 mL 预冷 PBS 重悬细胞, 去上清液。用 1 mL 预冷的 70%(φ) 乙醇溶液固定细胞, 过夜。然后 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液。加入预冷的 PBS 重悬细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液。配制碘化丙啶染色液: 对于 1 个样品, 在 0.5 mL 染色缓冲液中加入 25 μ L 碘化丙啶染色液 (20 $\times$) 和 10 μ L RNaseA (50 $\times$), 混匀待用。染色: 每管细胞样品中加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀重悬细胞沉淀, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 就可以进行流式检测, 流式检测最好在 5 h 内完成。流式检测和分析: 用流式细胞仪在微波长 488 nm 处检测红色荧光, 同时检测光散射情况。采用 Flow Jo 分析软件进行细胞 DNA 含量和光散射分析。

2 结果与分析

2.1 质粒转染 DEF 后 GFP 表达

利用倒置荧光显微镜对各组转染细胞进行观察, 见图 2。结果显示, 在转染 24 h 后, 可见 pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 重组质粒及 pEGFP-N1 空载体转染的 DEF 细胞出现明显的绿色荧光, GFP 在 DEF 中有明显的表达。随着时间的推移, 各组细胞荧光强度均有所增强。

2.2 E 蛋白及其 DI、DII 和 DIII 在 DEF 中的表达

如图 3 所示, 纯化后 E 蛋白及 DI、DII 和 DIII 均有单一条带, 与目的片段大小相符, 相对分

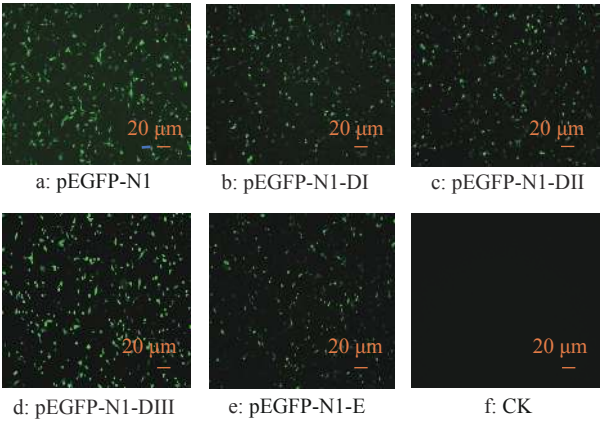


图 2 不同质粒转染 DEF 后 GFP 的表达

Fig. 2 GFP expression in DEF transfected by different plasmids

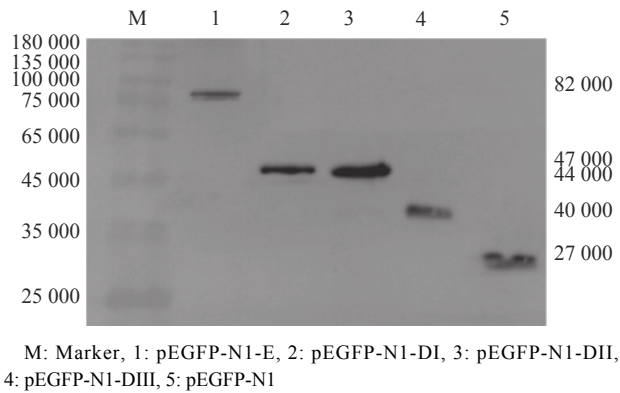


图 3 Western blot 检测 E 蛋白及其 DI、DII、DIII 在 DEF 中的表达

Fig. 3 Expression detection of E protein and its DI, DII, DIII in DEF by Western blot

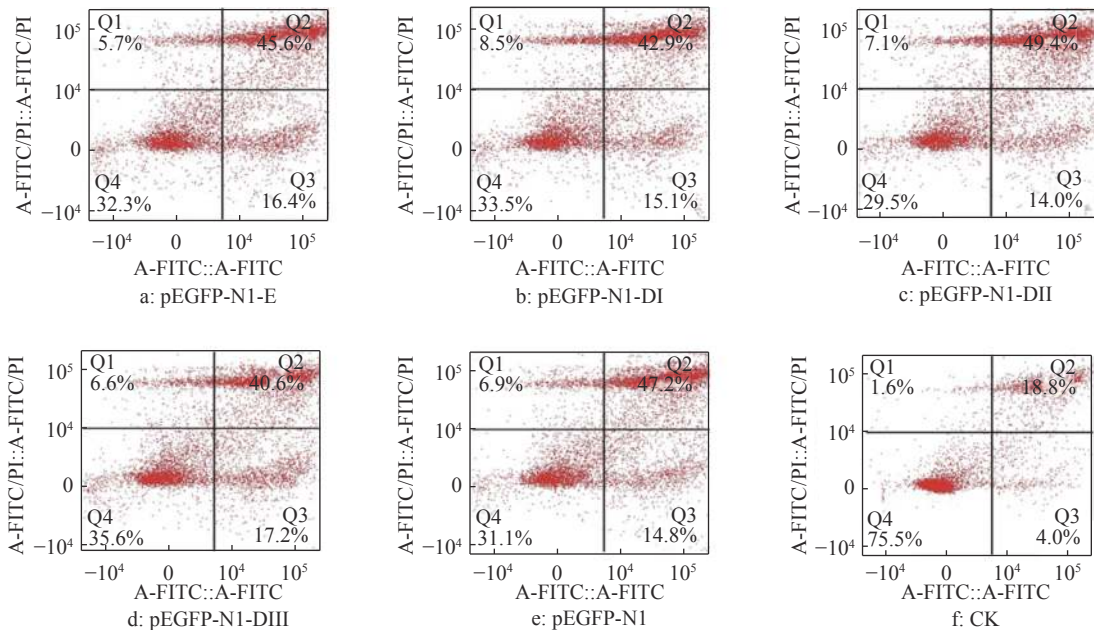


图 4 质粒转染细胞 24 h 后 DTMUV E 蛋白及其 DI、DII、DIII 真核表达产物对 DEF 凋亡率的影响

Fig. 4 Effect of E protein of DTMUV and its DI, DII, DIII eukaryotic expression products on DEF apoptosis rate after plasmid transfection for 24 h

子质量约为 82 000、44 000、47 000、40 000，pEGFP-N1 空载体与目的片段大小相符，相对分子质量约为 27 000，证明重组质粒 E 蛋白及其 DI、DII 和 DIII 蛋白具有良好的表达。

2.3 质粒表达的蛋白对细胞凋亡的影响

pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 重组质粒及 pEGFP-N1 空载体分别转染 DEF 24、36 h 后，收集各组细胞，用流式细胞仪检测。早期凋亡以 Annexin V-FITC (A-FITC) 染色为主，在流式细胞分析图 (图 4、5) 中为右下区 (Q3、Q7) 细胞簇。晚期凋亡为 Annexin V-FITC/PI (A-FITC/PI) 双染色，在流式细胞分析图 (图 4、5) 中为右上区 (Q2、Q6) 细胞簇。

检测结果表明，在质粒转染 24 h 后，与 pEGFP-N1 空载体转染组 14.8% 的早期凋亡率相比，pEGFP-N1-DII 转染组细胞凋亡率略低，为 14.0%；pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI 和 pEGFP-N1-DIII 真核表达产物诱导 DEF 的早期凋亡率分别是 16.4%、15.1% 和 17.2%，略高于空载体转染组。不同蛋白引起 DEF 晚期凋亡率的数据正好相反，相对于 pEGFP-N1 空载体转染组 47.2% 的晚期凋亡率，pEGFP-N1-DII 转染组凋亡率略高，为 49.4%，pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI 和 pEGFP-N1-DIII 真核表达产物诱导 DEF 的细胞凋亡率分别是 45.6%、42.9% 和 40.6%，略低于空载体转染组。质粒转染 36 h 后，pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 真核表达产物诱导 DEF 的

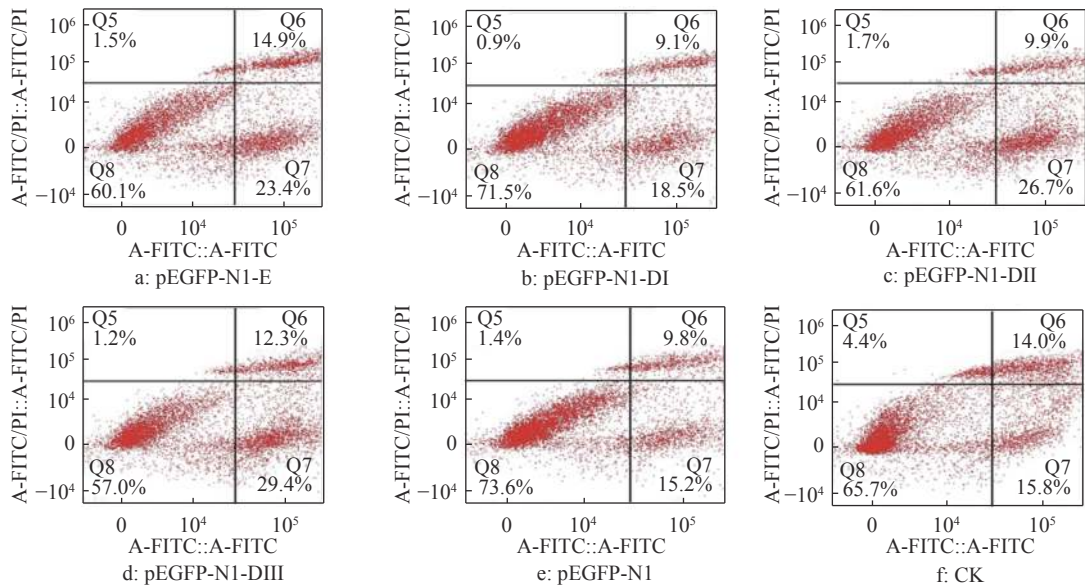


图 5 质粒转染细胞 36 h 后 DTUV E 蛋白及其 DI、DII、DIII 真核表达产物对 DEF 凋亡率的影响

Fig. 5 Effect of E protein of DTUV and its DI, DII, DIII eukaryotic expression products on DEF apoptosis rate after plasmid transfection for 36 h

早期凋亡率分别是 23.4%、18.5%、26.7% 和 29.4%，均明显高于 pEGFP-N1 空载体转染组 15.2% 的凋亡率。

通过分析各组细胞凋亡数据，结合细胞本身的凋亡背景，可以看出，pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 重组质粒在转染 DEF 24 h 后，各组细胞早期凋亡率差异不明显；质粒转染细胞 36 h 后，相对于空载体组，pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 重组质粒均能明显诱导细胞早期凋亡，但是各组诱导细胞凋亡能力存在一定差异。

2.4 质粒表达蛋白对细胞周期的影响

pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 重组质粒及 pEGFP-N1 空载体分别转染 DEF 24、36 h 后，收集各组细胞，用流式细胞仪检测各质粒表达的蛋白对细胞周期的影响。质粒转染 24 h 后，pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 试验组的 DNA 合成期 (S 期) 细胞比例分别为 5.43%、22.58%、12.75% 和 12.80%，都明显高于 pEGFP-N1 空载体转染组的 4.38%；DNA 合成后期与细胞分裂期 (G2/M 期) 除了 pEGFP-N1-E 低于 pEGFP-N1 空载体转染组的 14.08% 外，pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII 组都高于 pEGFP-N1 空载体转染组，分别为 17.64%、14.35% 和 14.95%。质粒转染 36 h 后，pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII S 期细胞比例相较于 pEGFP-N1 空载体转染组

的 9.69% 明显上升；G2/M 期 pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DIII 明显高于 pEGFP-N1 空载体转染组，而相较于 24 h 的 pEGFP-N1-E、pEGFP-N1-DI、pEGFP-N1-DII 和 pEGFP-N1-DIII G2/M 期，细胞比例明显下降，分别下降了 1.64%、11.42%、7.26% 和 4.67%。具体见表 2、图 6 和图 7。

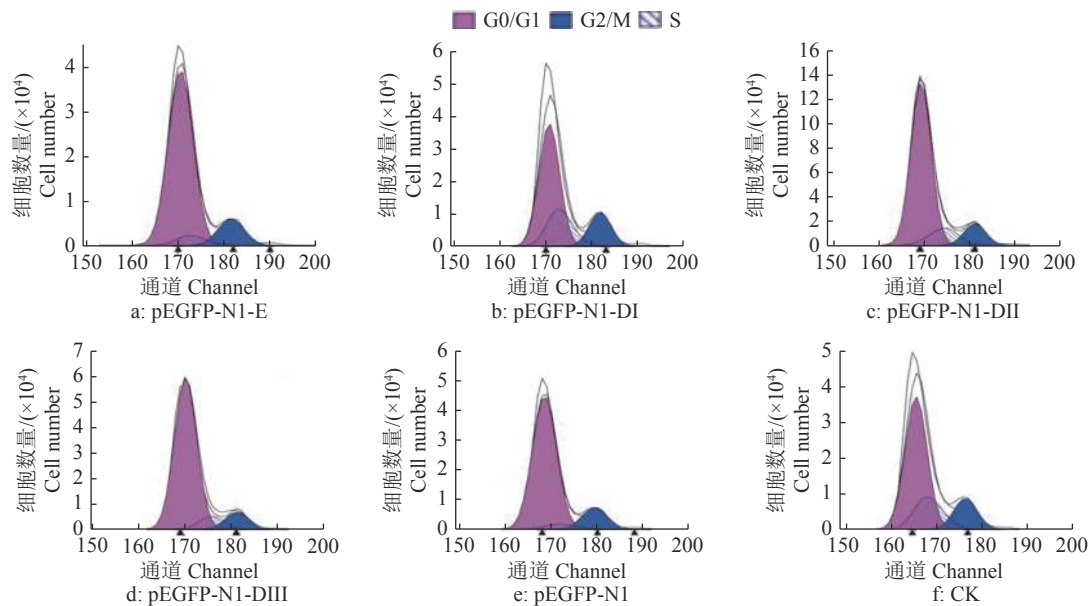
表 2 DTUV E 蛋白及其 DI、DII 和 DIII 真核表达产物对 DEF 细胞周期的影响

Table 2 Effect of DTUV E protein and its DI, DII, DIII eukaryotic expression products on DEF cell cycle

t/h	处理 Treatment	细胞比例 ¹⁾ Cell percentage		
		G0/G1	G2/M	S
24	pEGFP-N1-E	81.43	13.14	5.43
	pEGFP-N1-DI	57.90	17.64	22.58
	pEGFP-N1-DII	72.90	14.35	12.75
	pEGFP-N1-DIII	72.25	14.95	12.80
	pEGFP-N1	81.54	14.08	4.38
	CK	63.83	15.89	20.28
36	pEGFP-N1-E	78.52	11.50	9.98
	pEGFP-N1-DI	82.33	6.22	11.44
	pEGFP-N1-DII	82.47	7.09	10.44
	pEGFP-N1-DIII	78.72	10.28	11.00
	pEGFP-N1	82.51	7.80	9.69
	CK	45.18	11.97	42.84

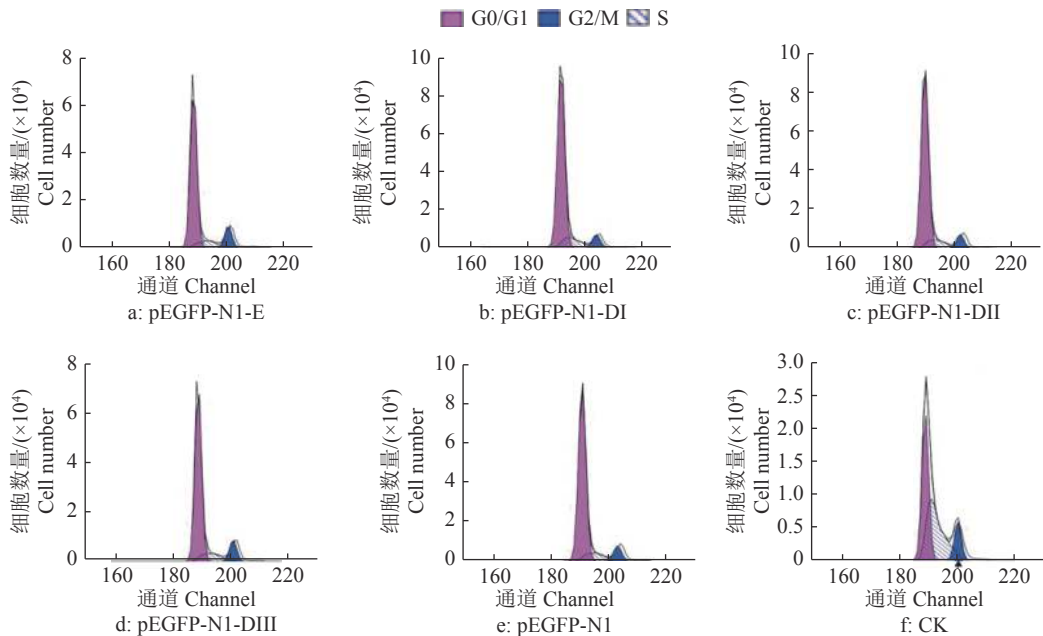
1) G0/G1: 细胞停止分裂期与DNA合成前期; G2/M: DNA合成后期与细胞分裂期; S: DNA合成期

1) G0/G1: Cell nondivision phase and DNA presynthetic phase; G2/M: DNA postsynthetic phase and cell division phase; S: DNA synthesis phase



G0/G1: 细胞停止分裂期与 DNA 合成前期; G2/M: DNA 合成后期与细胞分裂期; S: DNA 合成期
G0/G1: Cell nondivision phase and DNA presynthetic phase; G2/M: DNA postsynthetic phase and cell division phase; S: DNA synthesis phase

图 6 质粒转染细胞 24 h 后 DTUV E 蛋白及其 DI、DII、DIII 真核表达产物对 DEF 细胞周期的影响
Fig. 6 Effect of E protein of DTUV and its DI, DII, DIII eukaryotic expression products on DEF cell cycle after plasmid transfection for 24 h



G0/G1: 细胞停止分裂期与 DNA 合成前期; G2/M: DNA 合成后期与细胞分裂期; S: DNA 合成期
G0/G1: Cell nondivision phase and DNA presynthetic phase; G2/M: DNA postsynthetic phase and cell division phase; S: DNA synthesis phase

图 7 质粒转染细胞 36 h 后 DTUV E 蛋白及其 DI、DII、DIII 真核表达产物对 DEF 细胞周期的影响
Fig. 7 Effect of E protein of DTUV and its DI, DII, DIII eukaryotic expression products on DEF cell cycle after plasmid transfection for 36 h

3 讨论与结论

DTMUV E 蛋白是诱导机体产生免疫保护性抗体的主要抗原, 含有 3 个抗原表位区, 分为 DI、DII 和 DIII, DI 主要包含 3 个区段——第 1—51 个 aa、第 137—196 个 aa、第 293—311 个 aa, 是

糖基化位点和生物活性富集区; DII 包含 2 个区段——第 52—136 个 aa、第 197—292 个 aa, 为血凝活性及中和活性的富集区; DIII 只含 1 个区段——第 312—411 个 aa, 主要参与受体结合过程^[12]。为探讨 DTMUV E 基因 DI、DII 和 DIII 真核表达产物对 DEF 细胞周期与细胞凋亡的影响, 本研究设计、

合成了 E 蛋白及其 3 个结构域的真核表达质粒, 并转染到 DEF, 用流式细胞仪检测了细胞凋亡与细胞周期。

近年来, 有许多学者对 DTMUV 诱导的细胞凋亡进行了广泛的研究。李秀丽等^[13]研究表明 DTMUV 能够显著引起细胞凋亡, 导致脾脏淋巴细胞减少, 严重影响脾脏的免疫功能。提金凤等^[14]研究发现感染坦布苏病毒 (Tambursu virus, TMUV) 24 h 昆明鼠的脾细胞中, 细胞凋亡比例为 27.9%, 对照组为 16.1%, 感染 TMUV 48 h 昆明鼠的脾细胞中, 细胞凋亡比例为 32.22%, 对照组为 25.26%, 试验组和对照组相比差异显著; 证明 TMUV 可诱导昆明鼠发生显著的脾细胞凋亡, 感染病毒时间越长, 脾细胞凋亡越明显。Pan 等^[15]研究发现 DTMUV 感染后 DEF 中细胞凋亡比例与这些细胞获得的病毒滴度呈正相关, DTMUV 可能通过诱导细胞凋亡来促进病毒体的复制和传播。在本研究中, DTMUV E 蛋白及其 DI、DII 和 DIII 重组质粒均能诱导细胞早期凋亡, 且凋亡比例随时间延长逐渐增加, 36 h 的凋亡率 (18.5%~29.4%) 明显高于 24 h 的 (14.0%~17.2%), 这与前人研究结果一致。但不同的结构域在病毒复制的过程中如何诱导细胞凋亡, 凋亡过程与病毒的复制、毒力之间的关系值得进一步探讨。

于观留^[16]研究发现 TMUV 感染 12、24 h 后, BCL2A1 (B 淋巴细胞瘤 2A1 抗凋亡蛋白) 干扰组 (siRNA-BCL2A1) 的 S 期细胞比例与其对照组 (siRNA-NC) 相比显著增加 ($P<0.01$), 即 siRNA-BCL2A1 可以诱导病毒感染后 DEF 在 S 期停滞, 证明 BCL2A1 在调节病毒感染后的 DEF 细胞周期中发挥着重要作用。林昀^[17]发现在感染后 12、24 h, TMUV 感染组中处于 S 期和 G2/M 期的细胞比例显著升高, 说明 TMUV 的感染可以诱导 DEF 在 S 期和 G2/M 期停滞。在本研究中, 质粒转染 24、36 h 后, DTMUV E 全长及其 DI、DII 和 DIII 均可以诱导 S 期的停滞, 这与前人研究结果基本一致。DTMUV E 蛋白全长及其 DI、DII 和 DIII 通过什么途径造成 DEF 凋亡, 尚需进一步研究。

E 蛋白是 DTMUV 的主要结构蛋白, 在膜融合和介导病毒与细胞受体结合过程中起至关重要的作用, 可直接影响病毒的宿主范围、组织嗜性和毒力^[18]。在本研究中, E 蛋白及其 3 个结构域 DI、DII 和 DIII 不仅均可以诱导 DEF 早期凋亡, 也可以引起 DEF 在 S 期的停滞, 这可能为研究 DTMUV E 蛋白的功能以及致病机制提供了新的切入点。

参考文献:

[1] 张帆帆, 曾艳兵, 方绍培, 等. 鸭坦布苏病毒病的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(6): 1489-1497.

[2] 陈仕龙, 陈少莺, 王劭, 等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2011, 26(2): 170-174.

[3] 章丽娇. 坦布苏病毒细胞适应毒免疫原性及致弱分子基础研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.

[4] 姜胜男. 鸭 DDX3X 基因的克隆表达及其抗鸭坦布苏病毒活性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.

[5] 董嘉文, 李林林, 孙敏华, 等. 鸭坦布苏病毒 JM 株 E 蛋白的截断表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(1): 12-18.

[6] LIU M, LIU C, LI G, et al. Complete genomic sequence of duck flavivirus from China[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(6): 3398-3399.

[7] YU K, SHENG Z Z, HUANG B, et al. Structural, antigenic, and evolutionary characterizations of the envelope protein of newly emerging Duck Tembusu Virus[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71319.

[8] ZHANG X, JIA R, SHEN H, et al. Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections[J]. *Viruses*, 2017, 9(11): 338. doi: 10.3390/v9110338.

[9] ZHAO D, HUANG X, LIU Y, et al. Domain I and II from newly emerging goose tembusu virus envelope protein functions as a dominant-negative inhibitor of virus infectivity[J]. *Research in Veterinary Science*, 2015, 98: 121-126.

[10] 王若洁. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白 Domain III 的原核表达及其免疫原性的初步研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.

[11] 张琳. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白抗原表位的鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.

[12] KOLASKAR A S, KULKARNI-KALE U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus[J]. *Virology*, 1999, 261(1): 31-42.

[13] 李秀丽, 提金凤, 路云建, 等. 鸭坦布苏病毒对雏鸭免疫系统的影响[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(2): 211-217.

[14] 提金凤, 李志杰, 刁有祥, 等. 坦布苏病毒诱导昆明鼠脾细胞凋亡[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(4): 640-645.

[15] PAN Y, CHENG A, ZHANG X, et al. Transcriptome analysis of duck embryo fibroblasts for the dynamic response to duck tembusu virus infection and dual regulation of apoptosis genes[J]. *Aging*, 2020, 12(17): 17503-17527.

[16] 于观留. 坦布苏病毒感染对鸭胚成纤维细胞生物学功能的影响及其机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.

[17] 林昀. 坦布苏病毒感染的鸭胚成纤维中长链非编码 RNA 的表达谱变化及其功能初步研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.

[18] 林委卫, 陈雪明, 李晨曦, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白具有独特交叉反应性中和表位的鉴定[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(1): 26-32.