

L 蛋白第 177 位氨基酸突变对 O 型口蹄疫病毒生物学特性的影响

李静雯^{1,2,3}, 曹伟军^{2,3}, 杨帆^{2,3}, 朱紫祥^{2,3}, 张伟^{2,3}, 郑海学^{2,3*}, 蒋大伟^{1*}

(1. 河南农业大学 国家动物免疫学国际联合研究中心, 河南 郑州 450002; 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; 3. 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州 730046)

摘要: 为探究前导蛋白 L^{pro} 氨基酸突变对口蹄疫病毒(FMDV)生物学特性的影响,利用 FMDV 反向遗传操作技术,构建含有 L-V177M 定点突变的 FMDV 全长 cDNA 克隆,转染 IBRS-2 细胞进行体内拯救,通过生长曲线、PCR Array 检测、146S 抗原产能分析等鉴定突变氨基酸对 FMDV 生物学特性的影响。结果表明:定点突变毒 rO-L/V177M 和亲本毒 rWT 相比,两者在 IBRS-2 细胞中的生长曲线复制动态相似,但前者的病毒滴度却显著降低且形成小的蚀斑,抗病毒基因 OAS2、NOS2、IFITM1 以及促炎基因 CCL4、PYCARD、CXCL11、CD80 的表达水平也显著上调,两者在悬浮 BHK-21 细胞上的抗原产量并无显著变化。该研究揭示了该氨基酸位点对 FMDV 复制和致病性中的关键作用,并且为理解 FMDV 与宿主免疫系统的相互作用提供了新的视角,为开发减毒活疫苗提供了潜在的候选毒株,不仅深化了对 FMDV L^{pro} 蛋白功能的理解,还为口蹄疫疫苗研发和开发靶向抗病毒策略提供了重要的理论支撑。

关键词: 口蹄疫病毒;L 蛋白;生物学特性

Impact of amino acid mutation at position 177 in the L protein on the biological characteristics of O-type foot-and-mouth disease virus

LI Jingwen^{1,2,3}, CAO Weijun^{2,3}, YANG Fan^{2,3}, ZHU Zixiang^{2,3}, ZHANG Wei^{2,3}, ZHENG Haixue^{2,3*}, JIANG Dawei^{1*}

(1. National International Joint Research Center for Animal Immunology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention/College of Veterinary Medicine of Lanzhou University/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, China)

Abstract: To investigate the impact of amino acid mutations in the leader protein (L^{pro}) on the biological characteristics of foot-and-mouth disease virus (FMDV), a full-length cDNA clone of FMDV containing the L-V177M point mutation was constructed by FMDV reverse genetics technology. The construct was transfected into IBRS-2 cells for *in vivo* rescue. The effects of the mutated amino acid on the biological properties of FMDV were assessed through growth curves, PCR Array analysis, and 146S antigen production assays. The results indicated that while the replication dynamics of the point-mutated

收稿日期:2025-01-18;修回日期:2025-03-07

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFD1800302);国家生猪产业技术体系项目(CARS-35, CARS-39-13);甘肃省自然科学基金项目(23JRRA547)

作者简介:李静雯(1998-),女,河南郑州人,硕士生,研究方向为动物病毒分子生物学,E-mail:lijingwen332@163.com。*通讯作者:蒋大伟(1986-),男,河南郑州人,副教授,博士,研究方向为动物新型生物制品研发,E-mail:jiangdawei1010@126.com;郑海学(1979-),男,研究员,博士,主要研究方向为动物传染病学与流行病学研究,E-mail:zhenghaixue@caas.cn。

virus r0-L/V177M were similar to those of the parental virus rWT in IBRS-2 cells, the former exhibited significantly reduced viral titers and formed smaller plaque. Additionally, the expression levels of antiviral genes OAS2, NOS2, IFITM1, and pro-inflammatory genes CCL4, PYCARD, CXCL11, and CD80 were significantly upregulated in the mutant. However, there was no significant difference in antigen production between the two viruses in suspended BHK-21 cells. This study elucidates the critical role of this amino acid site in FMDV replication and pathogenicity, provides new insights into the interaction between FMDV and the host immune system, and offers a potential candidate strain for the development of live attenuated vaccines. The findings not only deepen the understanding of the function of the FMDV L^{pro} protein but also provide important theoretical support for FMD vaccine development and the development of targeted antiviral strategies.

Key words: foot-and-mouth disease virus; leader protein; biological characteristics

***Corresponding authors:** JIANG Dawei, E-mail: jiangdawei1010@126.com; ZHENG Haixue, E-mail: zhenghaixue@caas.cn

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种急性、热性、高度接触性传染病, 主要感染猪、牛、羊等家畜及其他野生偶蹄动物, 感染动物临床上主要表现为发热、跛行、流涎, 并在口、鼻、蹄叉等部位出现水疱^[1]。FMDV 有 7 种血清型, 分别为 O 型、A 型、C 型、Asia 1 型、SAT 1 型、SAT 2 型和 SAT 3 型。2017—2022 年期间, 在我国流行的主要 FMDV 血清型为 O 型 (51 次) 和 A 型 (3 次), 其中 O 型包括 5 个主要流行毒株: O 型缅甸-98 毒株 (O/Mya-98)、O/Ind-2001、O/CATHAY、O/PanAsia 和 A/Sea-97。其中, O/Mya-98 属于东南亚 (SEA) 拓扑型, 是我国当前流行且持续变异的毒株, 尤其是在猪源分离毒中表现显著。

FMDV 基因组为单股正链 RNA, 其基因组结构包括 3' 非翻译区 (3'UTR)、5' 非翻译区 (5'UTR) 和 1 个开放阅读框 (ORF)。该 ORF 编码的多聚蛋白在病毒蛋白酶前导蛋白 (leader protein, L^{pro})、2A 和 3C 的作用下, 被剪切为具有生物学功能的结构蛋白和非结构蛋白。L^{pro} 作为前导蛋白, 在不同病毒株之间表现出显著的序列变异性和遗传多样性, 使其成为区分不同亚型的重要分子标记^[2]。研究表明, L^{pro} 不仅是决定 FMDV 毒力的关键因子之一, 其缺失可显著降低病毒的致病性^[3]。特别是在 O/Mya-98 毒株中, L^{pro} 第 10 位插入亮氨酸 (Leu) 可显著降低该毒株对猪和牛的致病性^[4]。从功能机制来看, L^{pro} 作为一种多功能蛋白酶, 在 FMDV 致病过程中发挥关键作用, 它通过特异性切割宿主细胞蛋白, 有效抑制宿主的抗病毒免疫反应, 从而促进病毒的复制和传播^[5-6]; 大量研究证实, L^{pro} 是 FMDV 拮抗宿主天然免疫反应的核心蛋白之一^[7-8]。通过构建 L 蛋白缺失

体, 能够减少对宿主细胞的破坏, 从而延长病毒颗粒的稳定性, 使抗原的稳定性和产量显著提高^[9]。对 L^{pro} 的研究有助于理解病毒的免疫逃逸和变异机制。

国家口蹄疫参考实验室在田间监测样品中分离到 1 株猪源 O/Mya-98/SD 毒株, 通过全基因组测序并与 NCBI 上公布的 Mya-98 毒株序列进行比对, 发现该毒株 L^{pro} 第 177 位氨基酸由缬氨酸 (Val) 突变为甲硫氨酸 (Met)。为了研究该位点突变对 FMDV 生物学特性的影响, 本研究利用 FMDV 反向遗传技术, 构建并拯救出该位点突变的重组 FMDV, 进一步研究该氨基酸突变对 FMDV 的病毒滴度、蚀斑表型及对抗原产量的影响, 并初步分析表型差异的原因。这一研究为理解 FMDV 的分子致病机制、FMD 疫苗的设计、抗病毒药物的开发以及 FMD 的防控提供了重要的理论依据, 具有重要的科学意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 毒株、质粒及细胞

FMDV O/Mya-98/SD 株由国家口蹄疫参考实验室分离保存, FMDV O/Mya-98 全长感染性克隆质粒 pcDNA-HBCX 由兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学创新团队构建并保存, IBRS-2 细胞系由该团队负责传代保存。实验所用毒株、质粒及细胞均存放于中国农业科学院兰州兽医研究所生物安全三级实验室。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 (*Kpn*、*Mfe*、*Sbf* 和 *Pac*) 及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司; 高保真 DNA 聚合酶 *Taq*、一步法 (One-step) RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 细胞培养基、胎牛血清均购自 Gibco

公司;质粒提取试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、病毒 RNA 提取试剂盒均购自 Omega 公司;WC-GENE mRNA cDNA 合成试剂盒(批号:wc-Mrpe2410181-P)购于上海沃吉基因科技有限公司;通用型 DNA 转染试剂 jetPRIME 购自 Polyplus-transfection 公司;FITC-山羊抗家兔 IgG 抗体购自 Invitrogen 公司;FMDV 3D 家兔多克隆抗体由本研究团队制备并保存。

1.3 突变全长 cDNA 感染性克隆的构建

以 FMDV 全长 cDNA 克隆 pcDNA-HBCX 质粒为模板,将含有该质粒 L 基因的克隆用下述引物对 L-177M-F:5'-TCAGACATGATGGTCTTTGTCC-3' 和 L-177M-R:5'-CATCATGCTGACGGATCAGG-C-3' 进行氨基酸位点突变,再用 *Kpn*、*Mfe* 酶切含有该突变位点的基因片段替换至 pcDNA-HBCX 全长 cDNA 质粒中(图 1),测序鉴定正确后将含有该突变位点的全长 cDNA 克隆命名为 pcDNA-L/V177M。

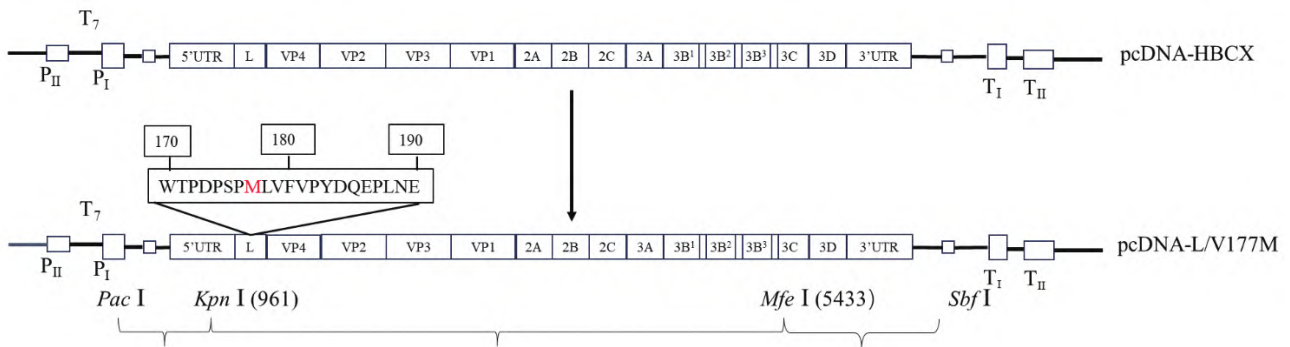


图 1 FMDV L 基因氨基酸位点突变全长 cDNA 克隆和突变重组构建示意图

Figure 1 Schematic of full-length cDNA cloning and recombination constructs for amino acid site mutation in the L gene of FMDV

1.4 重组病毒的拯救

当 IBRS-2 细胞在 T25 细胞瓶中的融合度达到 70%~80% 时,采用 jetPRIME 转染试剂介导 pcDNA-L/V177M 质粒进行转染。同时设置包括:pcDNA-HBCX(Wt) 作为阳性对照,仅加转染试剂的阴性对照,以及正常空白细胞对照。转染完成后,将细胞置于 37 °C 50 mL/L CO₂ 的细胞培养箱继续培养。持续观察直至细胞出现 90% 以上细胞病变效应(Cytopathogenic effect, CPE),随后收集细胞培养液并保存于 -80 °C。反复冻融 3 次后重新在 IBRS-2 细胞上进行连续传代,以备后续实验使用。将最终成功拯救的 FMDV 重组病毒命名为 rO-L/V177M。

1.5 重组病毒的间接免疫荧光鉴定

将 IBRS-2 细胞接种于激光共聚焦细胞培养皿中进行培养,待细胞融合度达到 80%~90% 时,分别以 MOI=1 接种 rO-L/V177M 和 rWT。病毒感染 4 h 后,使用 FMDV-3D 家兔多克隆抗体进行孵育,随后加入 FITC-山羊抗家兔 IgG 二抗,通过共聚焦显微镜观察,检测重组病毒 rO-L/V177M 是否表达 FMDV-3D 特异蛋白。

1.6 重组病毒的生长特性

1.6.1 重组病毒的遗传稳定性分析 将收集的 rO-L/V177M 和 rWT 上清液经过 3 次反复冻融后分别接种至 IBRS-2 细胞中,待细胞出现 90% 以上

典型 CPE 时,收集感染细胞并再次进行 3 次反复冻融处理,随后进行连续传代培养。待 CPE 出现时间趋于稳定后,对 F7 代病毒上清液经过 3 次反复冻融处理后,使用特异性引物 L-F(5'-TTCAGGTACCCGAGGTAACA-3') 和 L-R(5'-GAGTTCTGGTAYTYGTGCATRTARTA-3') 进行 RT-PCR 扩增。将扩增后的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析,确定重组病毒靶标位点的突变。

1.6.2 重组病毒蚀斑表型及生长曲线分析 将 IBRS-2 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,待细胞融合度达到 90% 以上后,用无菌 PBS 轻柔清洗细胞 2 次。将收集的病毒经过 3 次反复冻融后,进行 10× 倍比稀释,每孔接种 200 μL 病毒悬液。将细胞培养板置于 37 °C 50 mL/L CO₂ 的细胞培养箱中孵育 1 h,每 10 min 轻晃细胞培养板 1 次。1 h 后,每孔加入 2 mL overlay 培养液,继续在 37 °C CO₂ 体积分数为 5% 的细胞培养箱中培养 48 h,随后,将 overlay 培养液抽去,用 2 mL 无菌 PBS 清洗细胞 3 次,加入 2 mL 预冷的固定液,在 -20 °C 固定 30 min。吸去固定液后,加入结晶紫染色液,室温染色 12 h。染色完成后,用清水冲洗细胞,待干燥后观察病毒蚀斑形态,并使用 ImageJ 1.54h 软件对蚀斑进行计数分析。

另将 IBRS-2 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,

待细胞融合度达到 80%~90% 时,分别以 $MOI=0.1$ 接种 2 种病毒液上清。于感染后第 4、8、12、16、20 和 24 小时分别收集上清,经过 3 次反复冻融后,在 IBRS-2 细胞上测定病毒 $TCID_{50}$,根据测定结果绘制病毒生长曲线,以评估病毒复制动力学特性。

1.6.3 突变对 FMDV146S 病毒粒子产能的影响 为探究突变位点对 FMDV 有效病毒粒子包装效率的影响,将 rO-L/V177M 和 rWT 在悬浮 BHK-21 细胞中适应培养后,以 1:60 的接种剂量感染悬浮的 BHK-21 细胞。培养条件设置为:温度 37 °C、摇床转速 110 r/min、pH 7.6、50 mL/L CO_2 。待悬浮细胞存活率下降至约 5% 时,收集病毒上清液并经过冻融处理。随后,向上清液中加入终浓度为 2 mmol/L 的二乙烯亚胺(BEI),于 30 °C 条件下灭活 28 h。灭活后的病毒上清液通过蔗糖密度梯度离心进行纯化,并利用高效液相色谱(HPLC)检测 rO-L/V177M 和 rWT 病毒中有效 146S 病毒粒子的含量,以评估突变位点对病毒包装效率的影响^[10]。

1.6.4 重组病毒对特定基因表达水平的 PCR Array 检测 将 rO-L/V177M 和 rW 以 $MOI=0.1$ 接种于融合度达到 90% 的 IBRS-2 单层细胞中,感染 12 h 后收集样品,使用总 RNA 快速提取试剂盒提取细胞总 RNA,并测定其浓度。随后,利用 Fast King cDNA 第一链合成试剂盒合成 10 μ L cDNA,将反转录产物稀释并混匀后放置于冰上备用。将 cDNA 与预混液(mix)按比例混合,加入 96 孔 PCR Array 板中,每孔加入等体积的混合液。用透明封板膜密封反应板,以 2 000 r/min 离心 1 min,确保液体均匀分布于孔底。将反应板置于实时荧光定量 PCR 仪中进行上机检测,以 β -actin 作为内参基因,分析目标基因的表达水平。

1.7 数据处理和差异性分析

利用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行处理分析,采用单因素方差分析,再进行 t 检验,结果以均值 \pm 标准差表示。 $P<0.05$ 为有统计学意义, $P<0.01$ 为差异性显著, $P<0.001$ 为差异性极显著。

2 结果

2.1 FMDV 重组全长质粒的构建

对构建的含 FMDV 突变位点的全长 cDNA 质粒 pcDNA-L/V177M 及其亲本质粒 pcDNA-HBCX,使用 *Sbf* 和 *Pac* 内切酶进行双酶切鉴定。通过琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物,结果显示切出的目的条带大小与预期相符(图 2)。随后,将从酶切鉴定正确的质粒中回收的含突变位点的片段送至生工生物

工程(上海)股份有限公司进行测序验证,以确保突变位点的准确性和质粒构建的正确性。

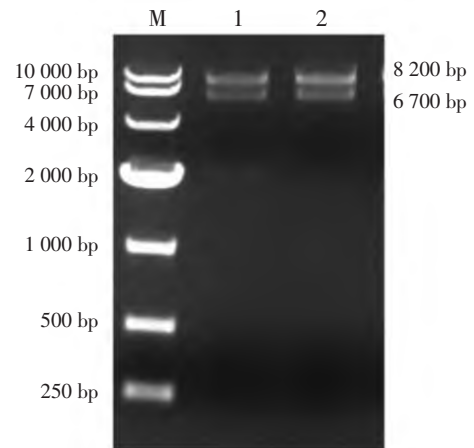


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid with *Sbf* and *Pac* restriction enzyme digestion

M:DL10000 DNA 分子质量标准;1:pcDNA-L/V177M 的 *Sbf*、*Pac* 酶切产物;2:pcDNA-HBCX 的 *Sbf*、*Pac* 酶切产物

M:DL10000 DNA Marker;1:Products from the plasmid pcDNA-L/V177M digested with *Sbf* and *Pac*;2:Products from the plasmid pcDNA-HBCX digested with *Sbf* and *Pac*.

2.2 突变病毒的拯救

将经酶切鉴定和测序验证正确的 pcDNA-L/V177M 质粒及其亲本质粒 pcDNA-HBCX 转染至 IBRS-2 细胞,24 h 后观察到细胞出现体积增大、形态变圆等典型的 FMDV 细胞病变效应(图 3)。空白对照组和仅添加转染试剂的阴性对照组细胞状态良好,未出现任何异常变化。随着培养时间的延长,转染 72 h 后,CPE 现象显著增强,感染细胞比例达到 90% 以上。收集细胞上清液,经过 3 次反复冻融处理后,继续在 IBRS-2 细胞中进行传代培养,以进一步验证病毒的感染性和稳定性。

2.3 重组病毒的间接免疫荧光鉴定

将 rO-L/V177M 和 rWT 接种于 IBRS-2 细胞后,使用 FMDV 3D 多克隆抗体进行孵育。免疫荧光检测结果显示,rO-L/V177M 和 rWT 均能与 FMDV 3D 多克隆抗体特异性结合,在激光共聚焦显微镜下观察到明显的绿色荧光信号(图 4)。相比之下,未接种病毒的对照细胞未检测到任何荧光信号。这一结果表明,rO-L/V177M 与 rWT 均能成功表达 FMDV 3D 蛋白,成功拯救重组 FMDV。

2.4 重组病毒的细胞生物学特性

2.4.1 重组病毒的遗传稳定性分析 将 rO-L/V177M 和 rWT 在 IBRS-2 细胞上进行连续传代培养,随着传代次数的增加,细胞出现典型 CPE 的时间逐渐缩

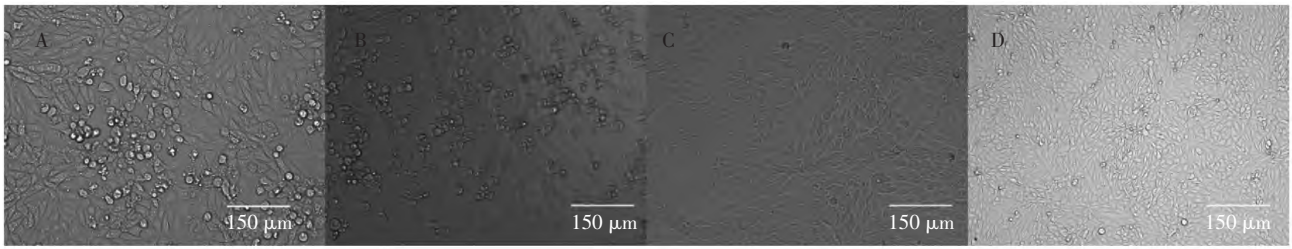


图 3 重组质粒转染 IBRS-2 后的 CPE 现象

Figure 3 CPE phenomenon after transfection of IBRS-2 with recombinant plasmids

A:rWT;B:rO-L/V177M;C:MOCK;D:阴性对照。

A:rWT;B:rO-L/V177M;C:MOCK;D:Negative control.

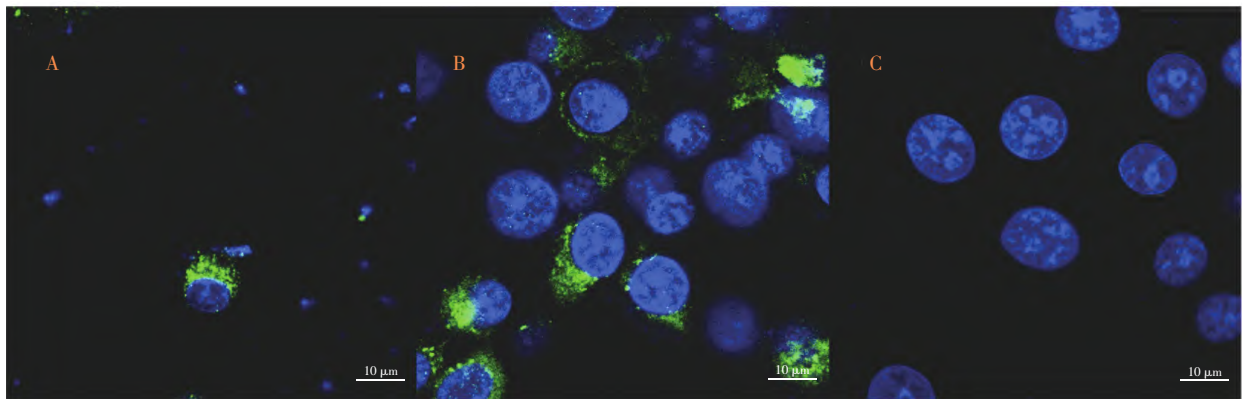


图 4 重组 FMDV 的间接免疫荧光

Figure 4 Recombinant FMDV were detected by indirect immunofluorescence assay

A:rWT;B:rO-L/V177M;C:MOCK.

短。传至 F6 代时,CPE 出现时间趋于稳定,细胞在接种后约 15 h 即可出现 90% 以上的 CPE。为进一步验证该重组病毒的遗传稳定性,对 F7 代细胞上清液进行 RT-PCR 扩增和测序分析。结果表明,传至 F7 代的 rO-L/V177M 未发生任何碱基或氨基酸水平的突变(图 5),证实该重组病毒在连续传代过程中能够稳定遗传其突变位点,具有良好的遗传稳定性。

2.4.2 重组病毒蚀斑表型及生长曲线分析 病毒蚀斑试验结果显示,rWT 和 rO-L/V177M 均能在 IBRS-2 细胞上形成蚀斑,但 rO-L/V177M 的蚀斑直

径显著小于 rWT(图 6A、B),表明 L-V177M 位点的突变显著影响了病毒的蚀斑表型,导致斑块直径减小。进一步通过生长动力学分析发现,以 MOI=0.1 感染 IBRS-2 细胞后,rWT 和 rO-L/V177M 病毒滴度均在感染后第 12 小时达到峰值(图 6C)。尽管 2 种病毒的生长动力学相似,但 rO-L/V177M 的病毒复制能力显著低于 rWT($P<0.0001$)。这些结果表明,L-V177M 位点的突变显著抑制了病毒的复制能力,导致病毒复制效率下降。

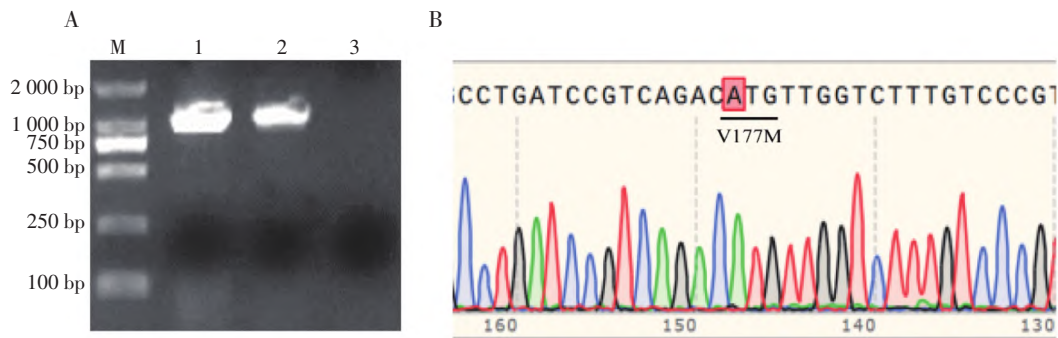


图 5 重组病毒突变位点的 RT-PCR 及测序鉴定

Figure 5 RT-PCR and sequencing identification of mutated amino acid sites in recombinant FMDV

M:DNA 分子质量标准;1:rWT-F7;2:rO-L/V177M-F7;3:阴性对照。

M:DL2000 DNA Marker;1:rWT-F7;2:rO-L/V177M-F7;3:Negative control.

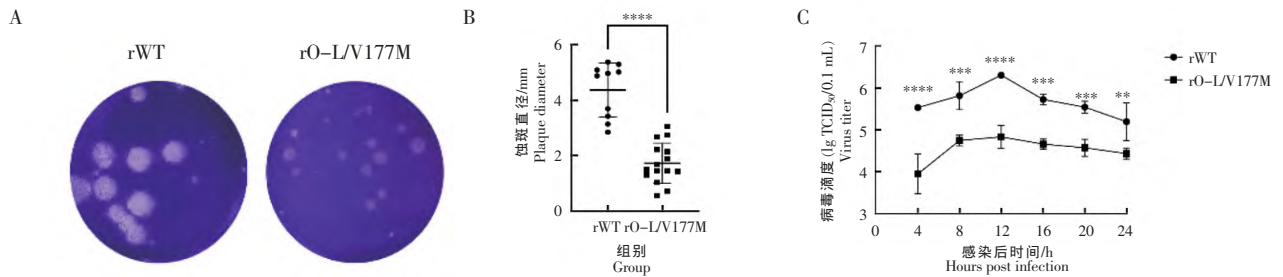


图 6 重组 FMDV 的蚀斑表型和生长曲线

Figure 6 The plaque phenotype and growth curves of recombinant FMDVs

A、B: 蚀斑表型; C: 生长曲线。数据以平均值和标准差表示, 统计学分析采用 *t* 检验; ****: $P < 0.0001$; ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$ 。下图同。

A: The plaque phenotype of FMDVs; B: Growth curves of FMDVs. Data are expressed as mean and standard deviation; *t* test was used for statistical analysis; ****: $P < 0.0001$; ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$. The same as follows.

2.4.3 重组病毒 146S 抗原质量浓度的测定 通过蔗糖密度梯度高速离心纯化后, 利用高效液相色谱 (HPLC) 对 rO-L/V177M 和 rWT 的 146S 病毒粒子含量进行定量分析。结果显示, rO-L/V177M 的 146S 病毒粒子质量浓度为 $12.2 \mu\text{g}/\text{mL}$, 而 rWT 的 146S 病毒粒子质量浓度为 $10.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。统计分析表明, rO-L/V177M 与 rWT 在 146S 病毒粒子的产能上无显著差异(图 7)。这一结果表明, 尽管 L-V177M 位点的突变显著降低了病毒的复制能力(如生长曲线和蚀斑试验结果所示), 但并未影响 FMDV 146S 病毒粒子的包装效率。因此, L-V177M 位点的改变主要影响病毒的复制动力学, 而对病毒粒子的组装和产能无明显影响。

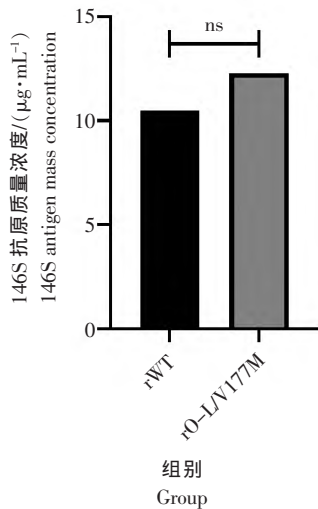


图 7 重组 FMDV 146S 抗原产量的体积排阻高效液相色谱法定量

Figure 7 Quantitation of recombinant FMDV 146S antigen yields by size-exclusion high-performance liquid chromatography(SE-HPLC) method

ns: 不显著。

ns: No significance.

2.4.4 突变重组病毒特定基因相对表达量的 PCR Array 检测 将 rO-L/V177M 和 rWT 以 $MOI=0.1$ 接种于 IBRS-2 细胞, 感染 12 h 后收集细胞上清并提取总 RNA, 利用 PCR Array 技术对抗病毒和促炎相关基因的表达水平进行筛选。为进一步验证结果, 使用特定基因引物对筛选出的差异表达基因进行复测。结果显示, 与 rWT 相比, 含 L-V177M 位点突变的 rO-L/V177M 显著上调了宿主抗病毒基因(如 OAS2、NOS2、IFITM1)以及促炎基因(如 CCL4、PYCARD、CD80、CXCL11)的表达水平(图 8)。这些结果表明, FMDV L^{pro} 第 177 位氨基酸由 Val 突变为 Met 后, 可能通过调控宿主细胞的抗病毒和促炎反应, 进而抑制病毒的复制能力, 导致病毒滴度下降。这一发现为深入解析 L^{pro} 在 FMDV 感染过程中的免疫调控机制提供了重要线索。

3 讨论

FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, 具有在易感动物中迅速复制传播, 且病毒和宿主适应后极易发生突变, 而形成变异毒株的特性^[11]。2009 年, Mya-98 谱系在东南亚地区首次被分离并鉴定, 并且 2010—2011 年在我国迅速传播, 对我国畜牧业健康养殖构成巨大危害^[12]。

目前研究表明, FMDV L^{pro} 在病毒毒力改变和致病性中发挥重要作用^[13]。已有文献证实, FMDV 所有血清型 L^{pro} 第 143 位氨基酸(Leu 或 Met)是维持其切割活性的关键位点, 对底物识别具有决定性作用^[14]。此外, L^{pro} 第 138 位氨基酸残基的突变可显著降低 FMDV 在体内外的毒力^[15]。本研究发现, L^{pro} 第 177 位氨基酸残基的突变可明显降低 FMDV 的病毒滴度并且影响其复制能力(图 6)。这些发现提示 L^{pro} 在不同分离株中的变异可能与病毒的致病性和

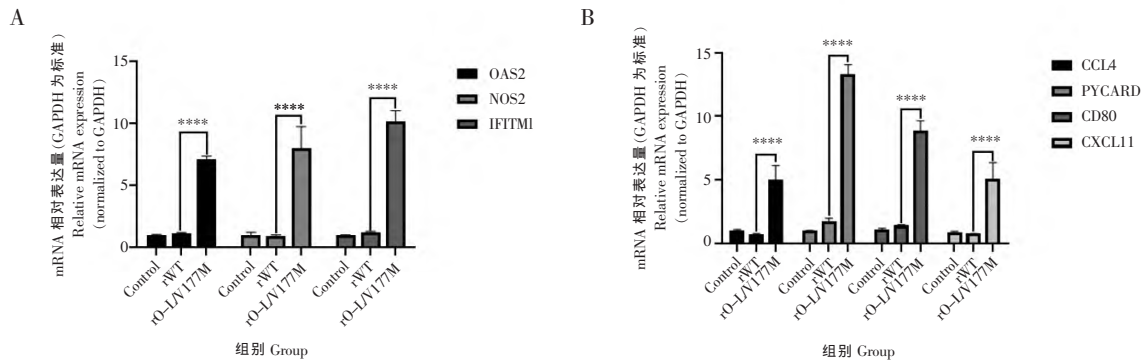


图 8 FMDV 抗病毒和炎症因子表达水平的 PCR Array 检测

Figure 8 Detection of antiviral and inflammatory factor expression levels of FMDV by PCR array

A: 抗病毒因子表达水平; B: 促炎因子表达水平。

A: Antiviral factor expression levels; B: Pro-inflammatory factor expression levels.

毒株特性密切相关。例如,猪源毒株 O/CHN/Mya98/2010S1 与 2 株牛源毒株在蚀斑试验中均表现为小斑表型,而猪源毒株 O/CHN/Mya98/2010S2 则呈现为大小斑混合表型^[16]。本研究借助 FMDV 反向遗传技术,将 L^{pro} 蛋白第 177 位氨基酸由 Val 突变为 Met 后,发现 rO-L/V177M 的蚀斑形态显著小于 rWT,这一结果进一步证实第 177 位氨基酸残基在调控口蹄疫病毒蚀斑大小中的重要作用。这些发现为深入理解 FMDV L^{pro} 的功能及其在病毒致病机制中的作用提供了新的见解。

146S 抗原是 FMDV 的一种含有完整中和表位的病毒粒子,是口蹄疫疫苗组分中最重要的免疫抗原,其完整性和稳定性能够直接影响疫苗的免疫效果^[17];本研究结果显示位点 L-V177M 的改变与野生型相比没有显著影响 FMDV 包装 146S 病毒粒子的能力,推断该位点可能不直接参与 146S 抗原的组装或稳定性,排除该位点对 146S 抗原产生的重要性,可为后续 FMD 疫苗的设计与优化提供更精准的靶点选择。

CC 家族的趋化因子 CCL4 和 CXCL11、炎症小体适配体蛋白 PYCARD 以及 CD80 均具有促炎作用^[18-20],能够通过促炎作用帮助清除病毒。干扰素诱导的抗病毒蛋白 OAS2、NOS2 和 IFITM1 能够通过不同的途径增强宿主的抗病毒能力;NOS2 通过在巨噬细胞中的高表达,从而赋予细胞有强大的抗菌和抗病毒能力^[21];OAS2 能够激活 RNase L 以抑制病毒的复制,也能够通过激活 I 型干扰素信号通路来抑制寨卡病毒的复制^[22-23];IFITM1 通过改变病毒的感染机制以增强病毒的感染能力^[24]。在本研究中接种 rO-L/V177M 后宿主细胞所分泌的促炎因子和抗病毒蛋白相较 rWT 均显著上调,说明其可能通过调控促炎和抗病毒基因的表达,从而影响 FMDV 的

滴度。这为研究 FMDV 的免疫逃避机制提供了新的研究线索,也揭示了 FMDV 感染后验证反应的调控机制,为进一步探索病毒与宿主的相互作用奠定了基础。

本研究利用 FMDV 反向遗传技术,对 FMDV L^{pro} 第 177 位残基进行氨基酸位点突变,结果表明位点 L-177 的改变能够显著影响病毒的蚀斑形态、病毒滴度以及复制能力,但不影响病毒粒子的产量。本研究为深入分析 L 基因在 FMDV 致病性差异中的功能提供了研究数据。

参考文献 (References)

- [1] DIAZ-SAN SEGUNDO F, MEDINA G N, STENFELDT C, *et al.* Foot-and-mouth disease vaccines[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 206: 102-112.
- [2] NAGENDRAKUMAR S, MADHANMOHAN M, RANGARAJAN P, *et al.* Genetic analysis of foot-and-mouth disease virus serotype A of Indian origin and detection of positive selection and recombination in leader protease- and capsid-coding regions[J]. *JBiosci*, 2009, 34(1): 85-101.
- [3] RAI D K, DIAZ-SAN SEGUNDO F, CAMPAGNOLA G, *et al.* Attenuation of foot-and-mouth disease virus by engineered viral polymerase fidelity[J]. *J Virol*, 2017, 91(15): e00081-17.
- [4] YANG F, ZHU Z, CAO W, *et al.* Genetic determinants of altered virulence of type O foot-and-mouth disease virus[J]. *J Virol*, 2020, 94(7): e01657-19.
- [5] CLARKE B, SANGAR D, BURROUGHS J, *et al.* Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein *in vivo*[J]. *J Gen Virol*, 1985, 66(12): 2615-2626.
- [6] LIU Y, ZHU Z, ZHANG M, *et al.* Multifunctional roles of leader protein of foot-and-mouth disease viruses in suppressing host antiviral responses[J]. *Vet Res*,

- 2015,46:1-13.
- [7] GOLDE W T,NFON C K,TOKA F N.Immune evasion during foot-and-mouth disease virus infection of swine [J]. *Immunol Rev*,2008,225(1):85-95.
- [8] RODRIGUEZ PULIDO M,SÁIZ M.Molecular mechanisms of foot-and-mouth disease virus targeting the host antiviral response[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017,7:252.
- [9] 薛美,王海伟,于力.亚洲 1 型口蹄疫病毒 L 蛋白缺失株的构建及其生物学定性[J]. *中国预防兽医学报*,2010,32(4):259-262.
- [10] 朱元源,徐嫵,邹兴启,等.高效液相体积排阻色谱法测定口蹄疫灭活疫苗 146S 抗原含量及疫苗质量评估 [J]. *中国农业科学*,2019,52(20):3695-3704.
- [11] GRUBMAN M J,BAXT B.Foot-and-mouth disease [J]. *Clin Microbiol Rev*,2004,17(2):465-493.
- [12] VALDÁZ-GONZÁLEZ B,TIMINA A,SCHERBAKOV A, et al. Multiple introductions of serotype O foot-and-mouth disease viruses into East Asia in 2010-2011 [J]. *Vet Res*,2013,44:1-12.
- [13] MASON P W,GRUBMAN M J,BAXT B.Molecular basis of pathogenesis of FMDV [J]. *Virus Res*,2003,91(1):9-32.
- [14] MAYER C,NEUBAUER D,NCHINDA A T, et al. Residue L143 of the foot-and-mouth disease virus leader proteinase is a determinant of cleavage specificity [J]. *J Virol*,2008,82(9):4656-4659.
- [15] AZZINARO P A,MEDINA G N,RAI D, et al. Mutation of FMDV L^{pro} H138 residue drives viral attenuation in cell culture and *in vivo* in swine [J]. *Front Vet Sci*, 2022,9:1028077.
- [16] 周强,包慧芳,白兴文,等.口蹄疫病毒 Mya98 谱系猪源及牛源 2010 年分离株的分子特征及蚀斑显型比较分析 [J]. *中国兽医科学*,2012,42(4):331-338.
- [17] 刘国民,高日明,尚策,等.口蹄疫灭活疫苗保存及稳定性研究 [J]. *兽医导刊*,2021(21):132-133.
- [18] ZLOTNIK A,YOSHIE O.Chemokines:A new classification system and their role in immunity [J]. *Immunity*,2000,12(2):121-127.
- [19] ONO S J,NAKAMURA T,MIYAZAKI D, et al. Chemokines: Roles in leukocyte development,trafficking,and effector function [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003,111(6):1185-1899.
- [20] STROWIG T,HENAO-MEJIA J,ELINAV E, et al. Inflammasomes in health and disease [J]. *Nature*,2012,481(7381):278-286.
- [21] MACMICKING J,XIE Q W,NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function [J]. *Ann Rev Immunol*,1997,15(1):323-350.
- [22] LI Y,BANERJEE S,WANG Y, et al. Activation of RNase L is dependent on OAS3 expression during infection with diverse human viruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2016,113(8):2241-2246.
- [23] LIAO X,XIE H,LI S, et al. 2',5'-Oligoadenylate synthetase 2(OAS2) inhibits Zika virus replication through activation of type I IFN signaling pathway [J]. *Viruses*,2020,12(4):418.
- [24] SUN F,XIA Z,HAN Y, et al. Topology,antiviral functional residues and mechanism of IFITM1 [J]. *Viruses*, 2020,12(3):295.

(责任编辑 胡志敏)