

刘小花,徐鹏,张昕薇,等. 猪圆环病毒2型感染人源细胞的转录组分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 17-24.
Liu XH, Xu P, Zhang XW, et al. Transcriptome analysis of human cells infected with porcine circovirus type 2 [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 17-24.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.003

猪圆环病毒2型感染人源细胞的转录组分析

刘小花,徐鹏,张昕薇,欧阳婷,吉卫龙,刘晓慧,任林柱*

(吉林大学动物科学学院,长春 130062)

【摘要】 目的 圆环病毒2型(porcine circovirus type 2,PCV2)能否感染人类细胞一直都是一个争论的话题。本研究通过转录组测序(RNA sequencing,RNA-seq)技术分析PCV2感染人源细胞后的差异表达基因及其相关的信号通路/生物学功能,以期为人源细胞对PCV2及其他病毒产生抗病毒效应的研究提供参考。**方法** 用PCV2感染HeLa细胞,然后进行RNA-seq技术分析,筛选与抗病毒反应相关的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),并通过实时定量PCR进一步验证。**结果** 在感染PCV2的HeLa细胞中共注释到15402个UniGenes,其中有387个DEGs(包括267个上调基因和120个下调基因)。对生物过程类DEGs进行GO富集和KEGG通路分析,发现富集基因要参与应激反应(97/291 DEGs)和免疫系统过程(80/291 DEGs),其中最显著两条途径的基因是NOD样受体信号途径(21/170 DEGs)和单纯疱疹病毒感染途径(22/170 DEGs)相关差异表达基因。**结论** PCV2感染HeLa细胞之后,改变了细胞的表达谱,获得的DEGs及其功能注释信息有助于理解其抗病毒机制,对于了解PCV2感染人源细胞所产生的免疫反应及抗病毒效力提供依据。

【关键词】 猪圆环病毒2型;转录组测序技术;抗病毒;实时定量;基因表达

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)06-0017-07

Transcriptome analysis of human cells infected with porcine circovirus type 2

LIU Xiaohua, XU Peng, ZHANG Xinwei, OUYANG Ting, JI Weilong, LIU Xiaohui, REN Linzhu*
(College of Animal Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China)

【Abstract】 Objective Whether porcine circovirus type 2 (PCV2) can infect human cells is controversial. To study the antiviral effects of human cells on PCV2 and other viruses, we analyzed differentially expressed genes (DEGs) and their related signaling pathways and biological functions in PCV2-infected human cells by transcriptome analysis (RNA sequencing, RNA-seq). **Methods** HeLa cells were infected with PCV2, and then analyzed by RNA-seq to screen DEGs related to antiviral reactions. The DEGs were further verified by Real-time quantitative PCR. **Results** A total of 15402 UniGenes and 387 DEGs, including 267 upregulated genes and 120 downregulated genes, were annotated in human HeLa cells infected with PCV2. The most abundant Gene Ontology (GO) terms were response to stress (97/291 DEGs) and immune system process (80/291 DEGs). The most significant pathways were the nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor signaling pathway (21/170 DEGs) and herpes simplex infection (22/170 DEGs). **Conclusions** The gene expression profile of HeLa cells significantly changed after PCV2 infection. The result obtained in

【基金项目】国家重点研发计划项目(2017YFD0500103);国家自然科学基金面上项目(31772747);吉林省教育厅十三五科学技术项目(JJKH20190172KJ)。

【作者简介】刘小花(1994—),女,硕士研究生,研究方向:病毒分子生物学、宿主与病毒相互作用。E-mail: lxh18@jlu.edu.cn

【通信作者】任林柱(1978—),男,教授,博士,研究方向:病毒分子生物学、宿主与病毒相互作用。E-mail: renlz@jlu.edu.cn

this study will help understand the antiviral mechanism of human cells and may provide a basis for understanding the immune response and antiviral efficacy of human cells infected with PCV2.

【Keywords】 porcine circovirus type 2; RNA-seq technology; antiviral; Real-time PCR; gene expression

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 是圆环病毒科圆环病毒属中的一员, 为紧密的球形无包膜单链环状 DNA 病毒。根据基因组特点, 可将 PCV 分为 PCV1 型 (porcine circovirus 1, PCV1)、2 型 (porcine circovirus 2, PCV2) 和 3 型 (porcine circovirus 3, PCV3)^[1]。对 PCV 的研究初期, 我们普遍以为这类病毒只能寄生在猪体或猪源细胞中。但随着科研人员的进一步研究发现, 在非洲绿猴肾细胞及其他细胞中也发现了 PCV 的寄生, 并且能够进行分离与传代^[2]。PCV2 与 PCV1 不同, 它能够引起猪圆环病毒病 (Porcine circovirus disease, PCVD) 或猪圆环相关病毒病 (Porcine circovirus associated disease, PCVAD)^[2-3]。突出表现在猪皮炎肾病综合征 (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)、断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪呼吸道疾病综合征 (Porcine respiratory diseases complex, PRDC) 和母猪繁殖障碍 (Reproductive failure) 等疾病中, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。

PCV2 感染会引起猪源细胞内一系列的信号改变, 这些信号包括 PCV2 增殖、细胞凋亡和自噬的启动以及抗病毒应答的诱导。已有研究发现许多与细胞信号通路相关的蛋白质可作为抗病毒效应的靶标^[3]。研究发现, PCV1 能够感染人源细胞, 且能够引起细胞超微结构的改变^[4-5], 但 PCV2 是否也能感染人源细胞的问题一直存在争议。Hattermann 等人^[6]在 2004 年用带有 PCV2 全长的质粒感染 293T、HeLa 等人源细胞后, 发现在所有转染细胞中都扩增出了 PCV2 的 DNA, 并且发现了病毒抗原的表达; 随后, 转染 3 d 后的细胞出现病变, 细胞形态变为圆形, 上清液中死亡细胞和细胞碎片数量增加, 但在两周之后, 病毒颗粒消失, 证明 PCV2 不能在人的细胞中稳定存在^[6]。往后其他研究人员的调查显示, 没有证据表明 PCV2 接触者的血清中存在 PCV2 特异性抗体, 表明 PCV2 在人类细胞是有限存在^[7-9]。直至 2019 年, 我们用 PCV2 感染 12 种人的细胞, 包括单核细胞、上皮以及成纤维细胞, 结果发现 PCV2 都能够稳定感染这些细胞, 且产生可感染性的病毒粒子^[10]。但关于人源细胞感染 PCV2 之后所引起的免疫反应及抗病毒效应知之甚少。

RNA-seq 技术是近些年发展较快的一种高通量测序技术, 具有测序量大且快速、应用范围广等优势^[11]。本文通过 PCV2 感染 HeLa 细胞后的转录组测序分析, 将筛选出来的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 做进一步分析, 预测其相关的信号通路以及生物学功能, 最后筛选出与抗病毒反应相关的基因, 并通过实时定量 PCR 方法进一步验证, 以期为人源细胞对 PCV2 及其他病毒产生抗病毒效应的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PCV2 株 CC1 (GenBank 登录号 JQ955679) 是从患有 PMWS 症状的猪组织标本中分离得到, 并由本实验室培养及储存^[12]。人源细胞系 MCF-7、HeLa 和 A549 购自上海通威生物科技有限公司^[10]。

1.2 主要试剂与仪器

TRNzol-A⁺ 试剂 (天根生化科技有限公司, 中国北京); Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); TruSeq 链 mRNA LT 样品制备试剂盒 (Illumina, San Diego, CA, USA); 磁性寡糖 (dT) 珠 (Anchored oligo (dT)₂₃ primers, Sigma); Illumina HiSeqTM 2500 平台 (Illumina, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 制备与 RNA 序列测定

简单来说, 接毒前 1 d 分板, 待 MCF-7、HeLa 和 A549 细胞长至 50%~60% 时, 用感染复数为 1 的 PCV2 株 CC1 毒液感染细胞, 1 h 后弃掉病毒液, 用新鲜培养液轻轻洗涤 1~2 遍, 然后加入正常培养液继续培养, 未感染组同期进行, 72 h 后用 TRNzol-A⁺ 试剂提取 RNA。总 RNA 溶于 50 μ L 去 RNase 的 ddH₂O 中, 并在 -20 $^{\circ}$ C 下保存。

为制备 cDNA 文库, 用去 RNase 的 DNase I 处理总 RNA, 然后用磁性寡糖 (dT) 珠纯化 mRNA, 并用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 完整性。RNA 完整性指数 (RINs) > 8 的可进行后续分析。纯化的 mRNA 用 TruSeq 链 mRNA LT 样品制备试剂盒构建文库。然后, 在 Illumina HiSeqTM 2500 平台上对这些文库进行测序。

1.3.2 差异基因的功能注释与富集分析

利用 Blast2 GO 软件将所有的 UniGenes 比对到各大平台的数据库中,最后在 Nr 数据库可注释到最大的比对率。再将测序获得的所有 DEGs 进行基因功能注释(Gene Ontology, GO)分析和分类,获得转录本的 GO 功能注释信息。DEGs 比对 GO 数据库后,获得 GO 条目(term)。通过超几何检验(Phyper),将校正 P 值(corrected P -value) <0.05 的 GO term 定义为 DEGs 中显著富集的 GO term。将 DEGs 应用京都基因与基因组百科全书(Kyoto The Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库预测其参与的代谢途径(corrected P -value ≤ 0.05 为筛选标准)。再利用分子相互作用分析软件(String)预测 DEGs 相互作用网络,用 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用网络。

1.3.3 定量 PCR 分析基因表达

获得 PCV2 感染 72 h 以及未感染细胞的总 RNA 后,并用 FastQuant RT-Kit(天根生化科技有限公司,中国北京)进行反转录。所得 cDNA 用 Bio-Rad IQ™ 多色实时 PCR 检测系统和 Luna® Universal qPCR Master Mix(新英格兰生物实验室,美国)进行 SYBR Green 定量实时 PCR。

扩增 20 μ L 体系,上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 2 \times Luna 通用 qPCR 混合物 10 μ L, ddH₂O 7 μ L, 采用以下循环条件:95°C 预变性 60 s, 95°C 变性 15 s, 并在 60°C 下退火而后延伸 30 s, 40 个循环。实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 PCV2 感染人源细胞的转录组分析

本研究利用 Illumina HiSeq 平台共测了 2 组样品(每组样品有三个重复),每组样品平均有 6.40 Gb 的数据。共检测到表达的基因数为 15402 个,其中已知基因 14817 个,预测新基因有 585 个。

对感染 72 h 及未感染 PCV2 的 HeLa 细胞进行的转录组 RNA 序列分析,结果如表 1 所示。在感染 PCV2 的 HeLa 细胞中共鉴定出 387 个 DEGs,包括 267 个上调基因和 120 个下调基因(表 1, 图 1A)。

在 387 个 DEGs 中,291 个基因与生物过程有关。因此,选取生物过程(biological process)的差异基因做进一步 GO 分类分析。结果显示共有 212 个基因上调,79 个基因下调。此外,调控基因可分为 15 个功能组别(图 1B、1C),表明 PCV2 感染可上调或下调多种人类基因。在上调基因中,占比前四的组别分别是生物调控(biological regulation)、刺激应答(response to stimulus)、细胞过程(cellular process)以及代谢过程(metabolic process),分别占上调基因总数的 15%、11%、10.8% 和 10.7%(图 1B)。在下调基因中,同样是生物调控、刺激应答、细胞过程和代谢过程这几个功能组别占比较高,分别为 16.9%、8.7%、17.2% 和 10.6%(图 1C)。

2.2 PCV2 感染细胞中 DEGs 的 GO 和 KEGG 途径富集分析

为了了解 DEGs 在 PCV2 感染细胞中的主要途径,我们进行了 GO 富集和 KEGG 通路分析,并预测了 DEGs 可能参与的生物学相互作用。GO 富集结果表明,最常见的 GO term 是应激反应(97 DEGs)和免疫系统过程(80 DEGs)(图 2A)。

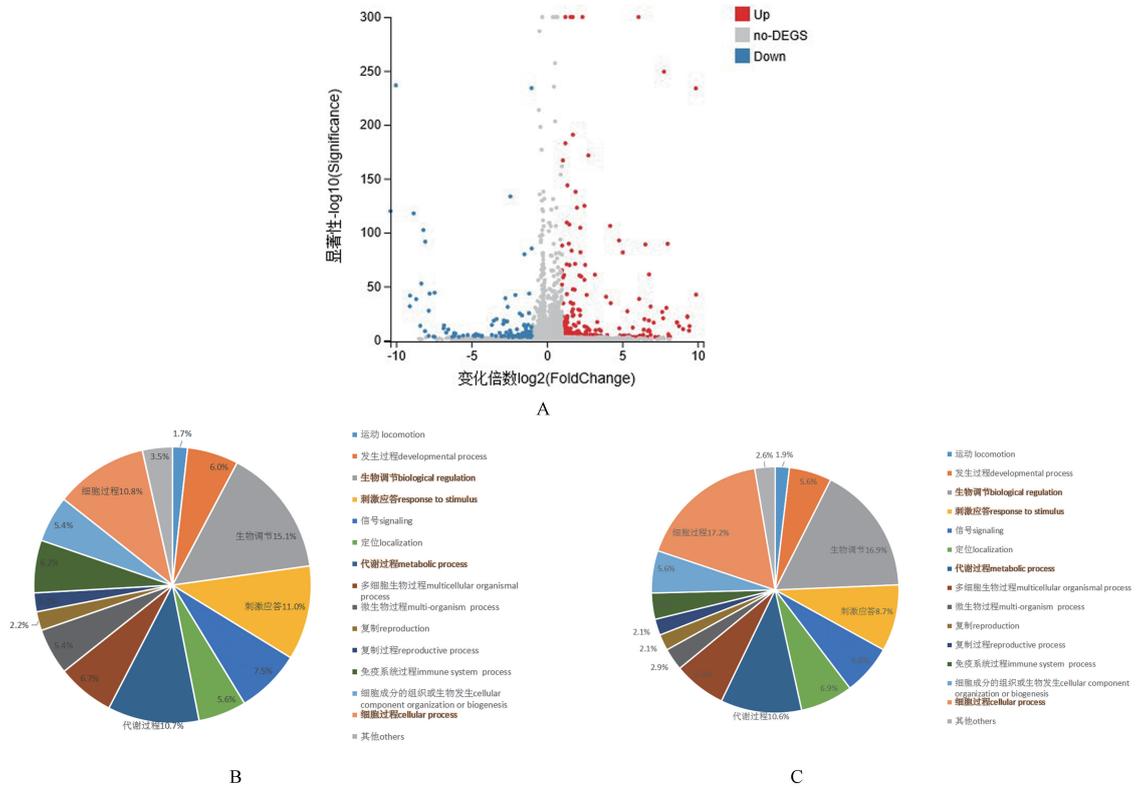
此外,将 DEGs 进行 KEGG 通路分析以进一步评估它们各自的功能。图 2B 展示了 PCV2 感染的人类细胞中的前 20 个(按 Q value 从小到大排序)富集途径。在 HeLa 细胞对 PCV2 感染的应答中, NOD 样受体信号途径(NOD-like receptor signaling pathway)有 21 个 DEGs,单纯疱疹病毒感染(Herpes simplex infection)相关的途径中有 22 个 DEGs 被高度富集(图 2B)。

2.3 参与 PCV2 感染的 DEGs 相关网络分析

利用 Cytoscape 软件(<http://www.cytoscape.org/>, Version 3.6.1)的生物网络基因功能注释插件(Biological Networks Gene Ontology, BinGo)对基因的 GO 注释进行了超几何检验, $P<0.001$ 。如图 3A 所示,DEGs 在炎症反应(inflammatory response)、细胞因子刺激反应(response to cytokine stimulus)、白细胞趋化性(leukocyte chemotaxis)、免疫应答(immune response)和病毒应答(response to virus)等生物过程中高度富集,表明这些生物过程与 PCV2 感染人类

表 1 RNA-Seq 数据汇总
Table 1 Summary of RNA-Seq data

组别 Groups	净读数(M) Clean reads	净碱基数(Gb) Clean bases	Q20 值(%) Q20 value	Q30 值(%) Q30 value	比对率(%) Mapped ratio	唯一比对效率(%) Unique mapped ratio
实验组 HeLa-PCV2	43.23	6.48	98.6	95.59	89.04	69.72
对照组 HeLa	42.12	6.32	98.65	95.68	89.81	70.36

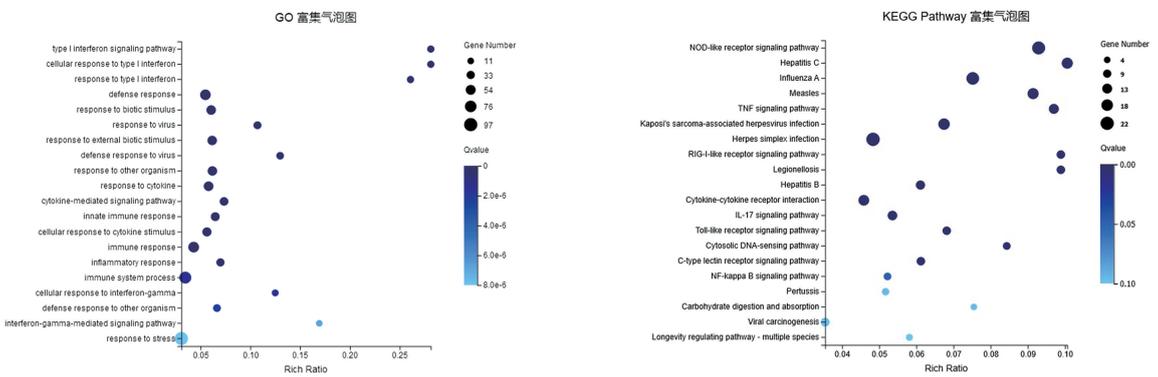


注: A: DEGs 的火山图, DEGs 以蓝点和红点突出显示; B-C: 上调基因 (B) 和下调基因 (C) 的功能组别分类。

图 1 PCV2 感染与未感染细胞基因差异表达分析

Note. A, Volcano plot of DEGs. Significantly DEGs were highlighted in blue and red dot. B-C, Categories of the up-regulated genes (B) and the down-regulated genes (C).

Figure 1 Differential expression analyses of human genes between mock and PCV2-infected cells



注: A: GO 富集分析; B: KEGG 富集分析。圆圈表示富集的基因数量, 颜色代表着 Q 值大小。

图 2 PCV2 感染与未感染的 HeLa 细胞中 GO 富集的前 20 个生物过程

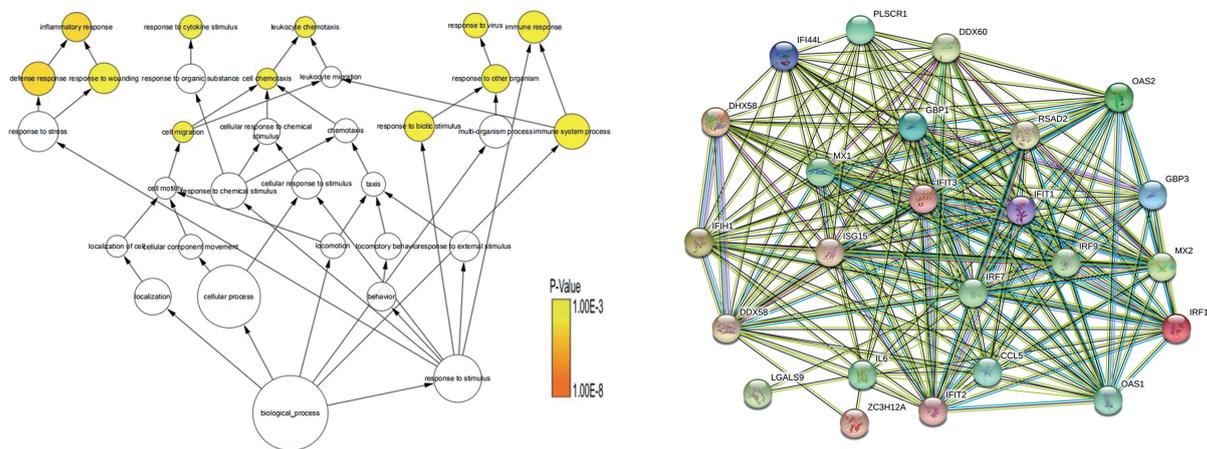
Note. A, GO enrichment analysis. B, KEGG enrichment analysis. Circles indicate numbers of enriched genes and colors mean the Q value.

Figure 2 Top 20 of GO terms between mock and PCV2-infected human cells

细胞的过程有关。

此外, 利用 STRING 网站分析了与病毒应答相关的 DEGs 潜在的相互作用网络。如图 3B 所示, 24 个 DEGs 在 PCV2 感染后下调, 包括 IRF9、IFI44L、

DDX58、GBP1、GBP3、IFIT2、IFIT1、IFIT3、IL6、IRF1、IRF7、LGALS9、MX1、MX2、OAS1、OAS2、PLSCR1、DDX60、CCL5、IFIH1 (MDA5)、DHX58 (LGP2)、ZC3H12 A (MCPIP)、RSAD2 和 ISG15 (图 3B)。



注: A:生物网络基因功能注释分析。 $P < 0.001$ 代表高度富集,每一个圈代表了一个 GO Term;颜色是根据富集度即“corrected P -value”进行着色的,颜色越深表示富集度越显著;箭头(→)表示细胞的生物过程。B:STRING 网络分析。

图 3 PCV2 感染人 HeLa 细胞诱导的 DEGs 的生物学网络分析

Note. A, Biological Networks analysis. Categories with normalized $P < 0.001$ were considered overrepresented. Each circle represents a GO term, and the color is colored according to the level of overrepresentation, i.e. "corrected P -value". The darker the color is, the more significant the concentration is. Arrow (→) indicates cellular biological processes. B, STRING network analysis.

Figure 3 Biological Networks analysis of DEGs in PCV2 infected human cells

2.4 实时 qPCR 对 DEGs 的确认

为了进一步验证上述 RNA-Seq 数据,选择了部分与病毒应答相关的属于刺激应答过程的 DEGs,使用实时 qPCR 进行验证。如图 4A 所示,与未感染细胞相比,细胞感染 PCV2 之后,所选择的所有 DEGs 显著下调,但与 RNA-Seq 数据结果相反。

根据免疫系统过程(imune system process)、信号(signaling)和刺激应答(response to stimulus)三个生物学过程的 GO 富集,选择了在 PCV2 感染 HeLa 后差异最显著的前 12 个 DEGs 进行 RT-qPCR 验证,并以 MCF-7 细胞做相同处理进行进一步验证。如图 4B 所示,在感染 PCV2 的 HeLa 细胞中,F8A2 的表达没有差异($FC < 1.5$);然而,CXCL3、CSF3、TNFAIP3 和 ITGB2 的表达水平明显升高,HIST1H2AK、CXCL1、FBXO17、HBA1、SAA1、PTX3 和 PI3 的表达水平明显降低(图 4B)。此外,感染 PCV2 的 MCF-7 细胞中 HIST1H2AK、FBXO17、PTX3 和 PI3 的表达水平同 HeLa 细胞一致,也明显降低,而其他基因 F8A2、CXCL1、HBA1、CXCL3、CSF3、SAA1、ITGB2 和 TNFAIP3 的表达水平明显高于未感染细胞(图 4C)。这些结果表明,不同人源细胞的抗病毒作用(特别是对病毒的应答)不尽相同。

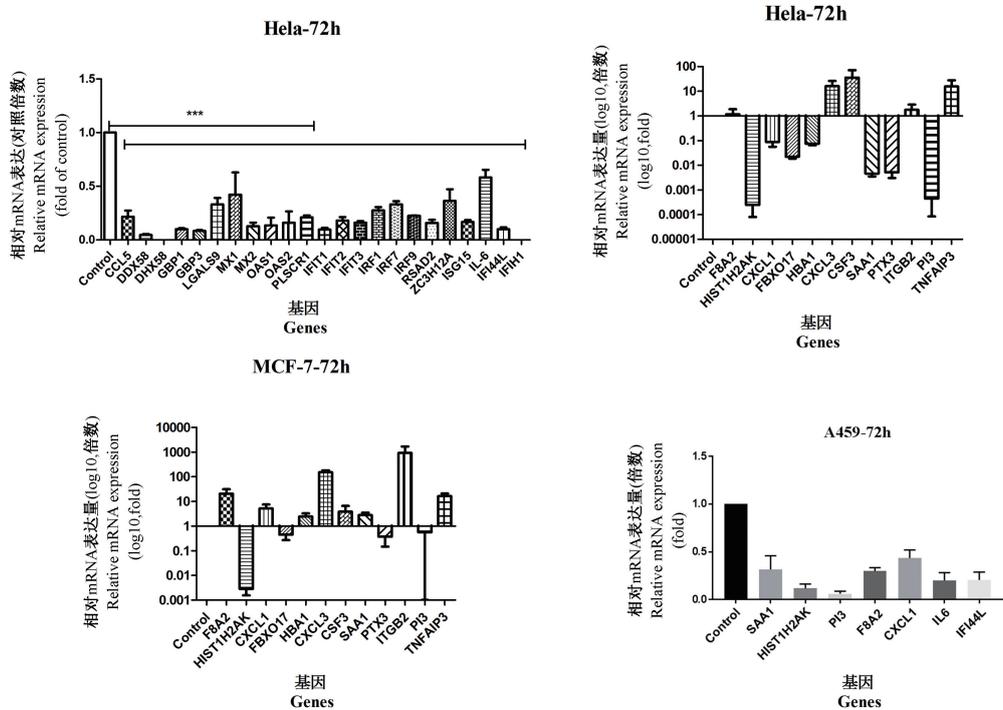
为了进一步证实这些结果,用 PCV2 感染 A549 细胞 72 h,随机选择前文中提到的 DEGs 做进一步实时 qPCR 验证。结果显示,病毒感染 A549 细胞

后,SAA1、HIST1H2AK、PI3、F8A2、CXCL1、IL-6 和 IFI44 L 水平较未感染细胞明显降低,与 HeLa 细胞相比,除 F8A2 结果不一致之外,其他基因变化趋势均相同。

3 讨论

PCV2 对猪源细胞的易感性,对全世界养猪业造成了严重的威胁,但该病毒是否存在公共卫生风险是目前首要关心的问题。随着以猪源器官为重点对象的异种移植技术的不断兴起与日趋成熟,PCV2 能否感染人源细胞成为饱受争议且需亟待解决的问题^[2]。我们之前的研究中初步证明 PCV2 能够感染人源细胞^[10],这对于接触此病毒的研究人员以及接受器官移植的患者来说都是一个非常大的安全隐患。除了对 PCV2 的防控措施做好之外,研究其抗病毒效应也显得极为重要。

在本次研究中,选用 HeLa 细胞作为转录组分析的对象。在感染 PCV2 之后,使用 Illumina HiSeq 平台一共测了 2 个样品,共注释到 15402 个 UniGenes。感染 PCV2 之后有 387 个差异表达基因,267 个上调基因和 120 个下调基因。Gene Ontology 分为分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)和生物过程(biological process)三大功能类。根据差异基因检测结果进行功能分类。本研究主要选取生物过程做进一步分



注:A:与病毒应答相关 DEGs 的实时定量检测结果;B-C:与免疫系统过程、信号传导和刺激应答相关 DEGs 的实时定量检测结果;D:随机选取感染 A549 细胞中相关 DEGs 的实时定量检测结果。以 GAPDH 作为内参,细胞 mRNA 标准化为 1.0,数据以($\bar{x} \pm s$)方式处理。*** $P < 0.001$ 或倍数变化(fold change, FC) ≥ 1.5 认为是有差异。

图 4 qRT-PCR 结果

Note. A, The results of Real-time PCR of related DEGs from response to virus. B-C, DEGs of the immune system process, signal and response to stimulus. D, Randomly selected some related DEGs from the infect A549 cells. Normalized with GAPDH, the cellular mRNA standardization was 1.0, *** $P < 0.001$ or $FC \geq 1.5$ was considered as the significance.

Figure 4 The results of qRT-PCR

析。上调基因集中于生物调控(biological regulation),而下调基因集中于细胞过程(cellular process)。对 291 个生物过程有关的差异基因做进一步 GO 富集和 KEGG 通路分析发现,应激反应(97/291 DEGs)和免疫系统过程(80/291 DEGs)占比最高,表明在感染病毒之后可能通过调控细胞调控免疫因子来产生抗病毒效应的。KEGG 通路分析发现最富集显著的两条途径是 NOD 样受体信号途径(21/170 DEGs)和单纯疱疹病毒感染(22/170 DEGs)。用 BinGo 插件对生物过程所有差异基因的 GO 注释进行超几何检验发现,其中对病毒应答(response to virus)的差异表达基因被高度富集,而这个过程的基因多数都与抗病毒研究相关。继而对其 24 个已知的 DEGs 进行实时定量 PCR 检测,结果显示这些病毒应答相关基因在感染之后全部下调。这与 RNA-seq 结果分析是相反的,实验重复了三次,结果较为可信,差异原因可能是由于 RNA-

seq 是大规模筛选的,反映的是样本整体的基因表达变化趋势,所以存在一些基因与 qPCR 的结果不一致,需要挑选大量的基因验证。所以又在不同的细胞中选取了另外一些与免疫系统过程(immune system process)、信号(signaling)和刺激应答(response to stimulus)三个生物学过程相关的基因做进一步验证。结果表明,PCV2 感染可调节人源细胞基因的表达,虽然不同细胞各基因变化有差异,但大致趋势相同,与 RNA-seq 结果有一些出入,这在其他一些研究中也出现过^[13-14],其原因可能是由于 Illumina HiSeq 平台测序虽然比较精准,但存在识别序列通常较短,有一定的错误率从而会出现较高假阳性的问题^[15]。

在预测的病毒应答相关基因中,变化差别较大的基因有:人粘液病毒抗性 2(human myxovirus resistance 2, MX2/MXB)、鸟苷酸结合蛋白 1/3(guanylate binding protein 1/3, GBP1/3)、四磷酸肽

重复序列 1 (tetratricopeptide repeats 1, IFIT1)、维甲酸诱导基因-1 (retinoic acid-inducible gene-1, RIG-I/DDX58) 以及干扰素诱导的 44 样蛋白 (interferon-induced protein 44-like, IFI44L)。大量文献报道, 上述基因均是与细胞抗病毒反应、细胞免疫反应或细胞增殖密切相关的。例如, Mx2 在感染细胞中与 HIV-1 相互作用, 并在逆转录和组装成完整病毒基因组过程的早期阶段阻断感染^[16-18]。GBP1 是多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 中表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的新靶基因, 在体内可促进 GBM 肿瘤的生长和侵袭, 但在体外对 GBM 细胞增殖无明显影响^[19-20]。另外, GBP3 通过抑制病毒转录和复制参与抗流感活性^[21]。在表达 IFIT1 的细胞中观察到较高水平的 I 型干扰素 (type I interferon, I-IFN), IFIT1 能感应到 RNA 的甲基化状态, 并通过与缺乏 2'-O 甲基化的 5' 帽结构结合而抑制病毒^[22], 也能通过抑制翻译起始的步骤发挥其抗病毒功能^[23-24]。RIG-I 和黑色素瘤分化相关基因 5 (Melanoma-differentiation-associated gene 5, MDA5) 是作为 RNA 病毒限制因子的胞浆 RNA 解旋酶, 有研究证明了 RIG-I 样受体 (The RIG-I-like receptors, RLRs) 限制了卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 的裂解再活化^[25]; Dvorak 等人^[26]用 PCV2 感染猪源间充质样细胞系后发现, 细胞主要通过 RIG-I/MDA5 通路产生大量的 I-IFN 来达到抗病毒应答的效果。IFI44L 是 I 型干扰素刺激基因 (type I interferon-stimulated gene, ISG), 属于 IFI44 家族^[27], 经 IL-28A 和 IFN- α 处理抑制细胞丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 复制后, IFI44L 表达显著增加^[28]。但是, 由于 PCV2 在感染猪源细胞的过程中具有免疫抑制作用^[29-30], 而病毒应答过程中的一些基因大多参与了免疫应答过程 (如 ISG15、IL6、IRF1 等), 因此, 推测 PCV2 感染人源细胞也可能具有免疫抑制作用或抑制相关抗病毒因子表达的作用, 最终导致上述基因的 mRNA 水平在感染 72 h 后降低, 但这些推测还有待进一步的研究证实。

总之, 用 PCV2 感染宫颈癌细胞 HeLa 之后引起细胞内大量基因表达情况改变, 利用 RAN-seq 技术系统性分析了胞内 mRNA 的差异变化, 多数 DEGs 参与了免疫系统过程、应激反应以及免疫应答过程。本文着重检测了与病毒应答以及免疫系统过

程等相关的 DEGs 的 mRNA 水平变化, 这些 DEGs 可能与细胞抗病毒反应或致病机制有关。目前, 正在以这些基因编码的蛋白质为研究对象, 分析其在感染 PCV2 之后的活性及功能变化以及这些蛋白对 PCV2 和其他病毒感染的影响。

参考文献:

- [1] Ouyang T, Niu G, Liu X, et al. Recent progress on porcine circovirus type 3 [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 73: 227-233.
- [2] 刘晓慧. PCV2 对人源细胞系感染的研究及转录组分析 [D]. 吉林: 吉林大学, 2019.
- [3] Ren L, Chen X, Ouyang H. Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts [J]. *Virus genes*, 2016, 52(4): 437-444.
- [4] Arteaga-Troncoso G, Guerra-Infante F, Rosales-Montaña LM, et al. Ultrastructural alterations in human blood leukocytes induced by porcine circovirus type 1 infection [J]. *Xenotransplantation*, 2005, 12(6): 465-472.
- [5] Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12(1): 3-14.
- [6] Hattermann K, Roedner C, Schmitt C, et al. Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2 [J]. *Xenotransplantation*, 2014, 11(3): 284-294.
- [7] Hattermann K, Maerz A, Slanina H, et al. Assessing the risk potential of porcine circoviruses for xenotransplantation: consensus primer-PCR-based search for a human circovirus [J]. *Xenotransplantation*, 2004, 11(6): 547-550.
- [8] Allan GM, McNeilly F, Foster JC, et al. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus [J]. *Vet Microbiol*, 1994, 41(3): 267-279.
- [9] Allan GM, McNeilly F, McNair I, et al. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep [J]. *Arch Virol*, 2000, 145(4): 853-857.
- [10] Liu X, Ouyang T, Ouyang H, et al. Human cells are permissive for the productive infection of porcine circovirus type 2 in vitro [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5638.
- [11] 张海燕, 金洁, 刘超, 等. 基于高通量测序技术测定普通棉耳猕猴粪便微生物多样性 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 366-373.
- [12] Yang X, Chen F, Cao Y, et al. Complete genome sequence of porcine circovirus 2b strain CC1 [J]. *J Virol*, 2012, 86(17): 9536.
- [13] 谢德金, 叶友杰, 杨德明, 等. 基于巴戟天转录组数据的 R2R3-MYB 转录因子的鉴定和分析 [J]. *药学报*, 2020, 55(1): 160-167.
- [14] 张秋平, 文李, 张振乾, 等. 抗感菌核病甘蓝型油菜近等基因系盛花期叶片转录组比较分析 [J/OL]. *华北农学报*: 1-10 [2020-05-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/13.1101.S.20200331.1537.002.html>

- [15] 孙洪计, 魏慧君. RNA-Seq 技术在转录组研究中的应用 [J]. 中外医学研究, 2018, 16(20): 184-187.
- [16] Fricke T, White TE, Schulte B, et al. MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1 [J]. Retrovirology, 2014, 11: 68.
- [17] Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, et al. Transfer of the amino-terminal nuclear envelope targeting domain of human MX2 converts MX1 into an HIV-1 resistance factor [J]. J Virol, 2014, 88(16): 9017-9026.
- [18] Kane M, Yadav SS, Bitzegeio J, et al. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection [J]. Nature, 2013, 502(7472): 563-566.
- [19] Li M, Mukasa A, Inda MM, et al. Guanylate binding protein 1 is a novel effector of EGFR-driven invasion in glioblastoma [J]. J Exp Med, 2011, 208(13): 2657-2673.
- [20] Lan Q, Wang A, Cheng Y. Guanylate binding protein-1 mediates EGFRvIII and promotes glioblastoma growth *in vivo* but not *in vitro* [J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9680-9691.
- [21] Nordmann A, Wixler L, Boergeling Y, et al. A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication [J]. FASEB J, 2012, 26(3): 1290-1300.
- [22] Xie DY, Wang SM, Yang JM, et al. IFIT1 polymorphisms predict interferon- α treatment efficiency for hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(44): 9813-9821.
- [23] Guo J, Peters KL, Sen GC. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection [J]. Virology, 2000, 267(2): 209-219.
- [24] Hinnebusch AG. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes [J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(10): 553-562.
- [25] Zhao Y, Ye X, Dunker W, et al. RIG-I like receptor sensing of host RNAs facilitates the cell-intrinsic immune response to KSHV infection [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4841.
- [26] Dvorak CMT, Puvanendiran S, Murtaugh MP. Porcine circovirus 2 infection induces IFN β expression through increased expression of genes involved in RIG-I and IRF7 signaling pathways [J]. Virus Res, 2018, 253: 38-47.
- [27] McDowell IC, Modak TH, Lane CE, et al. Multi-species protein similarity clustering reveals novel expanded immune gene families in the eastern oyster *Crassostrea virginica* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 53: 13-23.
- [28] Meng X, Yang D, Yu R, et al. EPST11 is involved in IL-28A-mediated inhibition of HCV infection [J]. Mediat Inflamm, 2015, 2015: 716315.
- [29] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, et al. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection [J]. Viral Immunol, 2002, 15(4): 567-582.
- [30] 张蕾, 代松宝, 张丽琳, 等. PCV2 逃逸宿主天然免疫的分子机制研究 [J]. 华北农学报, 2018, 33(2): 149-156.

[收稿日期]2020-03-16

(上接第 16 页)

- [18] Han ZW, Chang YC, Zhou Y, et al. GPER agonist G1 suppresses neuronal apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(7): 1221-1229.
- [19] Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, et al. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57(5): 598-603.
- [20] Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Piskin MM, et al. Combination antioxidant effect of alpha-tocopherol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model [J]. Int Urol Nephrol, 2010, 42(3): 647-655.
- [21] Menke J, Sollinger D, Schamberger B, et al. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2014, 19(4): 395-400.
- [22] Xie H, Sun M, Liao XB, et al. Estrogen receptor alpha36 mediates a bone-sparing effect of 17beta-estrodil in postmenopausal women [J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(1): 156-168.
- [23] Debortoli AR, Rouver WDN, Delgado NTB, et al. GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats [J]. J Mol Endocrinol, 2017, 59(2): 171-180.
- [24] Wang H, Sun X, Lin MS, et al. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) deficiency induces cardiac remodeling through oxidative stress [J]. Transl Res, 2018, 199: 39-51.
- [25] Ma D, Feng L, Deng F, et al. Overview of experimental and clinical findings regarding the neuroprotective effects of cerebral ischemic postconditioning [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 6891645.
- [26] Zhu R, Wang W, Yang S. Cryptotanshinone inhibits hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis in renal tubular epithelial cells [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13354-13360.
- [27] Vanhaesebroeck B, Guillemet-Guibert J, Graupera M, et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(5): 329-341.

[收稿日期]2019-11-28