生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):328-338

猪δ冠状病毒核衣壳蛋白稳转细胞株的构建及其功能探究

杨泰然[1, 2, 3, 4] 郑鑫祺[1, 2, 3, 4] 胡超[2, 3, 4, 5] 安婷婷[2, 3, 4, 5] 文龙[2, 3, 4, 5]
李有利[2, 3, 4, 5] 陈峥宏[2, 3, 5] 崔古贞[2, 3, 5] 李博岩[1*] 田益明[2, 3, 4, 5*]

（1.贵州医科大学公共卫生与健康学院,贵阳 550000；2.贵州医科大学基础医学院病原生物学系,贵阳 550000；3.贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室,贵阳 550000；4.贵州医科大学-上海交通大学医学院病毒研究所,贵阳 550000；5.贵州省微生物组与感染性疾病防控全省重点实验室,贵阳 550000）

摘 要：【目的】构建稳定表达猪δ冠状病毒（porcine deltacoronavirus, PDCoV）核衣壳蛋白（N）的单克隆细胞株，为解析其在病毒生命周期中调控宿主细胞微环境促进病毒增殖的致病机制提供细胞工具。【方法】基于系统发育分析选取3个不同谱系PDCoV代表株，构建*N*基因慢病毒真核表达质粒；利用慢病毒系统及极限稀释法，获得稳定表达N蛋白的LLC-PK单克隆细胞株；通过干扰素-β（IFN-β）启动子荧光素酶报告系统、实时荧光定量PCR、流式细胞术及病毒增殖实验，分析N蛋白稳定表达对I型干扰素（IFN-I）通路、宿主细胞周期及病毒增殖能力的影响。【结果】成功构建了30株稳定表达PDCoV N蛋白的单克隆LLC-PK稳转细胞系，其中包括北美谱系人源毒株HT/h0256来源的12株、中国谱系人源毒株HT/h0329来源的9株，以及东南亚谱系毒株THA/S5011来源的9株。功能探究结果显示，PDCoV N蛋白的稳定表达可显著抑制仙台病毒（SeV）诱导的IFN-β启动子活性及下游干扰素刺激基因（*ISG*56、*ISG*15和*MX*1）的激活，并且该蛋白能显著诱导LLC-PK细胞发生S期阻滞。此外，N蛋白的稳定表达还可显著促进病毒在宿主细胞中的增殖。【结论】成功构建了表达3个谱系PDCoV代表株N蛋白的LLC-PK单克隆稳转细胞株，其中N蛋白的稳定表达可显著抑制IFN-I通路、诱导宿主细胞S期阻滞，并促进病毒增殖，为深入解析N蛋白调控宿主细胞微环境的致病机制提供了重要细胞模型。

关键词：猪δ冠状病毒；核衣壳蛋白；稳转细胞株；I型干扰素通路；S期阻滞；病毒复制

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1397

Construction and Functional Characterization of Stable Cell Lines Expressing Nucleocapsid Protein of Porcine Deltacoronavirus

YANG Tai-ran[1, 2, 3, 4] ZHENG Xin-qi[1, 2, 3, 4] HU Chao[2, 3, 4, 5] AN Ting-ting[2, 3, 4, 5] WEN Long[2, 3, 4, 5] LI You-li[2, 3, 4, 5]
CHEN Zheng-hong[2, 3, 5] CUI Gu-zhen[2, 3, 5] LI Bo-yan[1*] TIAN Yi-ming[2, 3, 4, 5*]

（1. *School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang* 550000; 2. *Department of Pathogen Biology, College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang* 550000; 3. *Guizhou Provincial Distinguished Key Laboratory of Pathogen Biology for Higher Education Institutions, Guiyang* 550000; 4. *Guizhou Medical University & Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Joint Institute of Virology, Guiyang* 550000; 5. *Guizhou Provincial Key Laboratory of Microbiome and Infectious Disease Prevention and Control, Guiyang* 550000）

Abstract: 【Objective】 This study aims to establish monoclonal cell lines stably expressing the nucleocapsid (N) protein of porcine deltacoronavirus (PDCoV), which will provide a cellular tool to elucidate its pathogenic mechanism in modulating the host cellular microenvironment to enhance viral proliferation in the viral life cycle. 【Method】 Three representative PDCoV strains from different lineages were selected based on phylogenetic analysis, and eukaryotic lentiviral expression plasmids carrying the *N* gene were constructed. The

收稿日期：2025-12-22
基金项目：国家自然科学基金项目（32260035，32460042），贵州省科技计划项目（黔科合基础-ZK［2023］一般333），贵州省中央引导地方科技发展资金项目（黔科合中引地［2025］024）
*通信作者：田益明 tianym@gmc.edu.cn，李博岩 boyan.li@gmc.edu.cn

lentiviral system combined with the limiting dilution method was then used to generate LLC-PK monoclonal cell lines stably expressing PDCoV N protein. Finally, the interferon-β (IFN-β) promoter luciferase reporter system, quantitative real-time PCR (RT-qPCR), flow cytometry, and viral proliferation assays were employed to analyze the effects of stable N protein expression on the type I interferon (IFN-I) pathway, host cell cycle, and viral proliferation ability. 【Result】 A total of 30 LLC-PK monoclonal cell lines stably expressing PDCoV N protein were successfully established, including 12 lines of the North American lineage (HT/h0256, a human-derived strain), 9 lines of the Chinese lineage (HT/h0329, a human-derived strain), and 9 lines of the Southeast Asian lineage (THA/S5011). Functional investigation revealed that the stable expression of PDCoV N protein significantly suppresses Sendai virus (SeV)-induced activation of the IFN-β promoter activity and the expression of downstream interferon-stimulated genes (*ISG56*, *ISG15* and *MX1*), induces pronounced S-phase arrest in LLC-PK cells, and markedly enhances viral proliferation within host cells. 【Conclusion】 Stable LLC-PK monoclonal cell lines expressing the N protein of representative strains across three PDCoV lineages were successfully established. The sustained expression of N protein in these cell lines effectively antagonizes the IFN-I signaling pathway, induces host cell S-phase arrest, and enhances viral proliferation, thereby providing a critical cellular model for further dissection of the pathogenic mechanisms underlying N protein-mediated modulation of the host cellular microenvironment.

Keywords: porcine deltacoronavirus; nucleocapsid protein; stable cell line; type I interferon pathway; S-phase arrest; virus replication

近20年来，3种动物源性冠状病毒（SARS-CoV、MERS-CoV和SARS-CoV-2）的跨物种“外溢”已对人类生命健康、社会经济稳定与国家安全造成严重危害[1-3]。新发人兽共患冠状病毒的跨物种感染与流行已成为全球重大公共卫生问题[4]。猪δ冠状病毒（porcine deltacoronavirus, PDCoV）是2012年发现的一种新型δ属肠道冠状病毒，基因组结构为5′ UTR-ORF1ab-S-E-M-NS6-N-NS7(NS7a)-3′ UTR，全长约25.4 kb[5]。该病毒可感染各日龄猪群，目前已成为北美、东亚、东南亚等地猪场腹泻疫情的主要病原之一[6-7]。该病毒基因型可分为北美谱系、中国谱系、中国早期谱系和东南亚谱系，这4个谱系毒株在我国均有流行[8-10]。后续研究发现PDCoV具有跨物种感染潜力，可体外感染人、牛和鸡等多宿主细胞，人工感染犊牛和禽类亦可引起轻度腹泻症状[11-13]。2021年，Lednicky等[14]从海地儿童血样中分离到人源PDCoV，其与猪源毒株高度同源，首次证实该病毒具备感染人的能力。然而，PDCoV在人群中的致病性及流行风险尚不明确，其跨物种感染能力提示该病毒存在引发新发疫情的风险。因此，解析PDCoV的生物学特性及其与宿主相互作用的致病机制，对于该病毒感染人的前瞻性防控具有重要意义。

冠状病毒致病性由病毒毒力因子、宿主免疫状态及环境因素共同决定，其中病毒编码的毒力蛋白是决定致病性的核心因素[15]。核衣壳蛋白（nucleocapsid protein, N）是冠状病毒粒子中含量最丰富的结构蛋白，其包含2个保守结构域：N端结构域（NTD）和C端结构域（CTD），两者由富含丝氨酸/精氨酸（SR）的无序区域（IDR）连接。这3个结构域均具备RNA结合与二聚化能力，对病毒生命周期的多个环节至关重要[16]。例如，在感染后期，N蛋白与病毒RNA结合形成核衣壳，可维持病毒基因组的稳定性，进而保障其复制与传递的可靠性[17]。除上述结构性功能外，N蛋白在病毒致病过程中亦发挥关键作用。研究表明，N蛋白可通过多种机制干扰宿主抗病毒免疫，例如抑制I型干扰素（IFN-I）通路、影响应激颗粒形成、调控细胞周期进程及细胞凋亡等，从而削弱宿主的固有免疫防线，重塑宿主细胞生理状态，为病毒复制创造有利条件[18-19]。近期研究发现，N蛋白可作为连接病毒复制与免疫病理损伤的枢纽，通过促进炎症小体过度活化加剧细胞因子风暴[20]。因此，深入探究N蛋白的分子功能，对揭示冠状病毒致病机制及开发新型防控策略具有重要意义。

PDCoV是δ属冠状病毒中目前唯一成功分离的代表种，其*N*基因编码342个氨基酸[21]。作为新发病毒，其N蛋白致病机制研究尚不深入。现有研究多集中于N蛋白对IFN-I通路的拮抗作用。Ji等[22-23]发现PDCoV N蛋白可物种特异性地促进猪干扰素调节因子7（interferon regulatory factor 7, IRF7）降解，从而抑制IFN-I的表达；此外，该蛋白的NTD可与胞内模式识别受体RIG-I结合，阻碍其与dsRNA结合，

进而抑制IFN-β产生。Hu等[24]证实PDCoV N蛋白的CTD可直接作用于信号转导和转录激活因子1（STAT1），通过抑制其核易位来阻断IFN-I介导的JAK-STAT通路激活。此外，研究发现多种宿主蛋白（如FBXW8、PGAM5和LDHB）可识别N蛋白并介导其发生自噬降解，从而抑制病毒复制[25-27]。然而，以上研究大多基于病毒感染或N蛋白瞬时表达体系，存在病毒多蛋白干扰、表达水平波动及持续时间短等局限，难以精准剖析N蛋白单独、持续表达所引起的生物学效应。目前仍缺乏能够在稳定表达状态下系统研究PDCoV N蛋白对宿主细胞稳态全局性影响的细胞模型。

鉴于此，本研究旨在构建能够稳定表达PDCoV N蛋白的细胞株，并开展初步功能探究，为在接近生理的持续表达水平下，深入揭示N蛋白在感染过程中的多功能角色，尤其是其长期作用于宿主细胞所引发的病理生理改变机制，提供一个稳定可靠、条件可控的研究平台。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK-293FT细胞、LLC-PK细胞、质粒pMD2.G、psPAX2、IFN-β-Luc和pRL-TK为本实验室保存；PDCoV、SeV和VSV-GFP病毒为本实验室保存；嘌呤霉素、GAPDH鼠单抗、Alexa Fluor 488标记羊抗鼠IgG、RIPA裂解液、特超敏ECL化学发光试剂盒和Lipo293 Plus转染试剂均购自碧云天公司；DMEM高糖培养基、特级胎牛血清、PBS缓冲液、HRP标记的羊抗鼠IgG、BCA法微量蛋白质浓度测定试剂盒和SGExcel Fast-SYBR Master预混液均购自上海生工公司；PDCoV-N鼠单抗购自Medgene Labs公司；PDCoV-S鼠单抗购自千寻生物公司；DAPI染色液购自博士德生物公司；RNAiso Plus和PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser购自TaKaRa公司；CCK-8试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自翌圣生物公司；双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Zeta Life公司。

1.2 方法

1.2.1 3个谱系PDCoV毒株N蛋白序列差异分析及慢病毒质粒构建 参考NCBI GenBank数据库公布的194条PDCoV全基因组序列，使用SplitsTree 5软件和Kimura 2参数模型对PDCoV全基因组进行系统发育分析[28]。选取3个谱系代表性PDCoV毒株（MW685623、MW685624、KU051641），通过AlphaFold 3对3个谱系PDCoV N蛋白进行三维结构模拟，并进行氨基酸序列对比分析[29]。为探究PDCoV N蛋白生物学功能，将上述3个毒株*N*基因在上海生工公司进行全基因合成，并分别克隆至pLVX-Puro慢病毒载体上。

1.2.2 3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株构建及鉴定

（1）3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的构建。首先通过剂量梯度法测定LLC-PK细胞的嘌呤霉素最低致死浓度为4 μg/mL。将3个谱系PDCoV *N*基因慢病毒质粒与包装质粒psPAX2、pMD2.G按2∶2∶1的比例，使用Lipo293 Plus共转染至HEK-293FT细胞。48 h后收集病毒上清液，并进行超滤浓缩。采用上述浓缩病毒液（MOI=0.3）感染LLC-PK细胞，同时加入8 μg/mL的polybrene以增强感染效率。感染3–4 d后，更换为含4 μg/mL嘌呤霉素的完全培养液进行初步筛选，获得阳性多克隆细胞群。最后，通过有限稀释法筛选单克隆稳转细胞株：将细胞以每孔约1个的密度接种于96孔板，次日挑选并标记出单克隆的孔，扩大培养后用于后续实验。

（2）3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的鉴定。间接免疫荧光法观察PDCoV N蛋白亚细胞定位：细胞经4% 多聚甲醛固定、0.25% Triton X-100透化及1% BSA封闭后，加入PDCoV N蛋白鼠单抗（1∶300），室温孵育3 h；PBS润洗后，加入Alexa Fluor 488标记的羊抗鼠IgG（1∶500）于室温避光孵育1 h；DAPI染细胞核后，于共聚焦显微镜下观察并采集图像。Western blot法检测N蛋白表达：细胞经PBS清洗后，使用RIPA裂解液于冰上裂解，离心取上清；BCA法测定蛋白浓度，取20 μg蛋白经变性后进行SDS-PAGE电泳，并转印至PVDF膜，室温封闭1 h；分别以抗PDCoV N蛋白鼠单克隆抗体（1∶2 000）与抗GAPDH鼠单克隆抗体（1∶2 000）为一抗，4 ℃孵育过夜；TBST洗涤5次后以HRP标记的羊抗鼠IgG（1∶4 000）为二抗室温孵育1 h，ECL显影后于成像系统观察。3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株mRNA水平鉴定：收集对照组LLC-PK细胞及3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞，使用Trizol法提取总

RNA并反转录为cDNA；以此为模板进行PCR扩增随后进行测序分析。

（3）CCK-8法检测PDCoV N蛋白稳转细胞株的增殖活性。将对照组LLC-PK细胞与3个谱系稳转细胞株以每孔1×10^4个细胞接种于96孔板中，分别于12、24和36 h进行检测。每孔加入10 μL CCK-8溶液，轻微振荡混匀，置于培养箱中37 ℃孵育1–4 h，使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的OD值。细胞相对活性计算公式如下：相对细胞活性（%）=（实验组OD值–空白孔OD值）/（对照组OD值–空白孔OD值）×100%，以对照组细胞的相对活性为100%进行归一化计算。

1.2.3　PDCoV N蛋白稳定表达对I型干扰素及下游刺激基因的影响

（1）双荧光素酶报告基因检测PDCoV N蛋白对IFN-β活化的影响。将3个谱系稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞分别接种于24孔板中。培养24 h后将IFN-β-Luc报告质粒和pRL-TK内参质粒按5∶1的比例进行共转染。转染24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种SeV病毒，感染12 h后进行荧光素酶活性检测。具体操作流程参照Zeta Life公司荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书。

（2）qPCR检测PDCoV N蛋白对*IFN-β*1及下游刺激基因表达的影响。将3个谱系稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞以每孔1×10^5个细胞的密度分别接种于12孔板中。培养24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种SeV病毒，分别于感染后0、12和24 h收集细胞。使用Trizol法提取细胞总RNA，并逆转录为cDNA；以*GAPDH*为内参基因，通过qPCR测定*IFN-β*1和干扰素刺激基因（interferon-stimulated genes, *ISGs*）家族成员*ISG*56、*ISG*15和*MX*1在转录水平的相对表达量（引物序列详见附表1），采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$公式计算基因的相对表达量[30]。

（3）PDCoV N蛋白稳定表达对VSV-GFP复制的影响。将生长状态良好的对照组LLC-PK细胞与3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株接种至6孔板中，待细胞生长至80%汇合度后，弃去培养液，用PBS洗涤1次，以相同感染复数（MOI=0.1）接种VSV-GFP，感染24 h后，用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.4　PDCoV N蛋白稳定表达对LLC-PK细胞周期的影响　将处于对数生长期的野生型LLC-PK细胞与3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株以每孔2.5×10^5个细胞接种于6孔板中。待细胞完全贴壁后，更换为含0.5% FBS的培养基进行同步化处理36 h，随后更换为含10% FBS的完全培养基，此时间点记为0 h。分别于换液后0、12和24 h收集细胞，使用流式细胞仪检测细胞周期。数据以均值±标准误表示，每个时间点设置3个生物学重复。具体操作流程参照翌圣生物公司细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书。

1.2.5　PDCoV N蛋白稳定表达对PDCoV增殖的影响

（1）qPCR绝对定量法检测PDCoV病毒增殖差异。将3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞分别接种于12孔板中。培养24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种PDCoV病毒，分别于感染后2、6、12和48 h收集细胞上清液。经Trizol法提取总RNA并逆转录为cDNA后，进行qPCR绝对定量分析，检测引物PDMq-F/R序列如附表1所示。以质粒pLVX-N为标准品建立标准曲线，通过比较各时间点病毒基因组拷贝数的差异，评估N蛋白对PDCoV增殖的影响。

（2）基于S蛋白的间接免疫荧光法检测不同稳转细胞株中PDCoV增殖差异。将3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞以每孔1.0×10^4个细胞的密度分别接种于96孔板中。培养24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种PDCoV病毒。感染48 h后以PDCoV S蛋白鼠单抗（1∶300）为一抗，Alexa Fluor 488标记的羊抗鼠IgG（1∶500）为二抗，检测不同细胞中PDCoV S蛋白的表达差异，方法参照1.2.2。

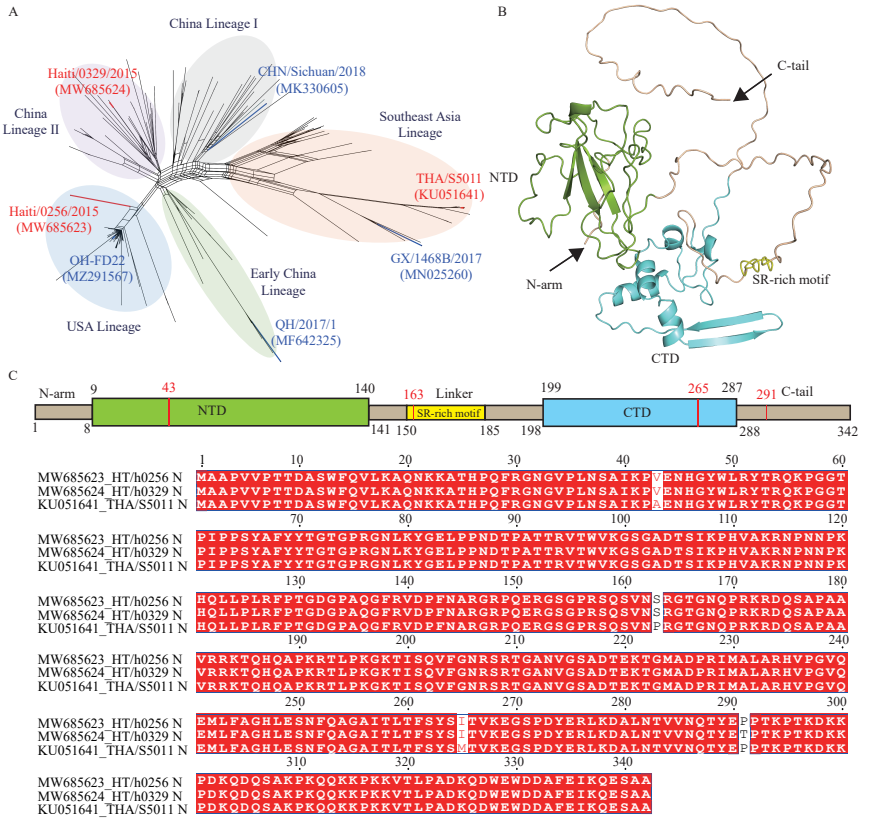
1.2.6　统计学分析与生物学重复　以上实验均设置3次独立生物学重复，实验数据以平均值±标准误表示。统计学分析采用GraphPad Prism 10.0软件完成，两组间比较采用双因素方差分析，统计学差异以星号标注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1；无星号表示组间差异无统计学意义。

2　结果

2.1　3个谱系PDCoV毒株N蛋白功能域及氨基酸水平差异分析

为解析PDCoV N蛋白的遗传变异特征与生物学

功能，基于全基因组系统发育分析，选取3个谱系PDCoV代表株：北美谱系人源毒株MW685623_HT/h0256、中国谱系人源毒株MW685624_HT/h0329和东南亚谱系猪源毒株KU051641_THA/S5011（图1-A）。通过三维结构模拟与多序列比对分析发现，相较于2个人源PDCoV毒株，东南亚谱系S5011毒株的N蛋白在NTD（V43A）、SR-rich motif（S163P）和CTD（I265M）处存在3个谱系特异性变异位点；此外，MW685624_HT/h0329毒株N蛋白在C-tail（P291T）处存在独特变异（图1-B, C）。为探究PDCoV N蛋白的生物学功能，本研究成功构建了包含上述3个谱系PDCoV *N*基因的重组慢病毒质粒。



A：基于194条PDCoV全基因组序列的系统发育谱系分型（红色标记为所选取的3个谱系PDCoV代表株）；B：PDCoV N蛋白结构域示意图（绿色：N端结构域；青色：C端结构域；黄色：SR富集区）；C：3个谱系PDCoV N蛋白氨基酸序列差异比对

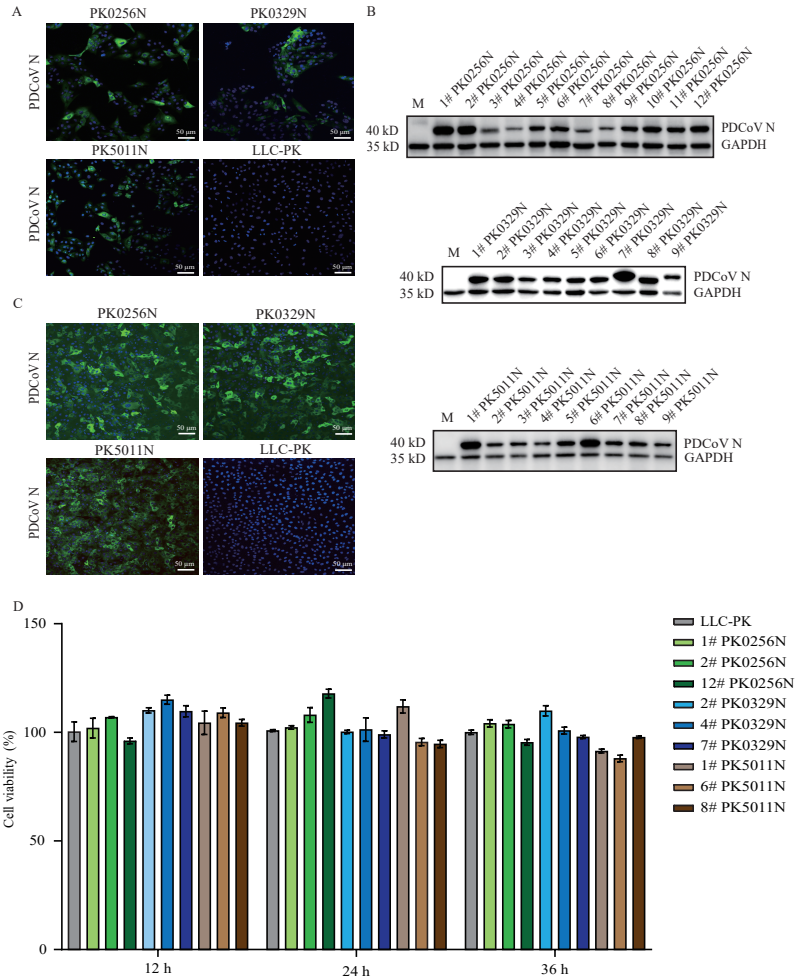
A: Phylogenetic genotyping based on 194 complete-genome sequences of PDCoV (red indicates representative strains of PDCoV from three lineages). B: Schematic diagram of PDCoV N protein domain (Green: NTD. Cyan: CTD. Yellow: SR-rich motif). C: Amino acid sequence alignment of N proteins from three PDCoV lineages

图1 3个谱系PDCoV毒株N蛋白功能域及氨基酸水平差异分析

Fig. 1 Functional domain and amino acid levels analysis of N protein from three PDCoV lineages

2.2 3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的构建与鉴定

为构建稳定表达3个谱系PDCoV N蛋白的单克隆细胞株，首先利用慢病毒包装系统分别构建了3个谱系PDCoV N蛋白的多克隆细胞株。间接免疫荧光法检测结果显示，3个谱系N蛋白均成功表达，并定位于细胞质与细胞核中（图2-A）。随后，采用有限稀释法对多克隆细胞进行单克隆化筛选，并通过Western blot验证蛋白表达水平。结果（图2-B）显示，共获得30株稳定表达PDCoV N蛋白的单克隆细胞株，其中PK0256N细胞12株、PK0329N细胞9株及PK5011N细胞9株。经连续传代培养后，基于N蛋白鼠单抗的间接免疫荧光法检测结果显示，3个谱系N蛋白单克隆细胞在检测视野下的每个细胞中均



A：间接免疫荧光法检测3个谱系PDCoV N蛋白在多克隆细胞株中的表达与定位（比例尺：50 μm）；B：Western blot法检测3个谱系单克隆稳转细胞株中N蛋白的表达水平（M：LLC-PK对照细胞）；C：间接免疫荧光检测3个谱系单克隆稳转细胞株中N蛋白的表达（比例尺：50 μm）；D：CCK-8法检测3个谱系稳转细胞株的细胞增殖活性，纵坐标为细胞活力，横坐标为检测时间点；*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.000 1；无星号表示组间差异无统计学意义。下同

A: Indirect immunofluorescence assay for detecting the expression and localization of PDCoV N protein from three lineages in polyclonal cell lines (scale bar: 50 μm). B: Western blot analysis of N protein expression levels in monoclonal stable cell lines of three PDCoV lineages (M: LLC-PK control cells). C: Indirect immunofluorescence assay for detecting the expression of N protein in monoclonal stable cell lines of three PDCoV lineages (scale bar: 50 μm). D: CCK-8 assay for evaluating the proliferative activity of stable cell lines of three PDCoV lineages; the ordinate represents cell viability, and the abscissa represents detection time points. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.000 1. No asterisk indicates no statistically significant difference between groups. The same below

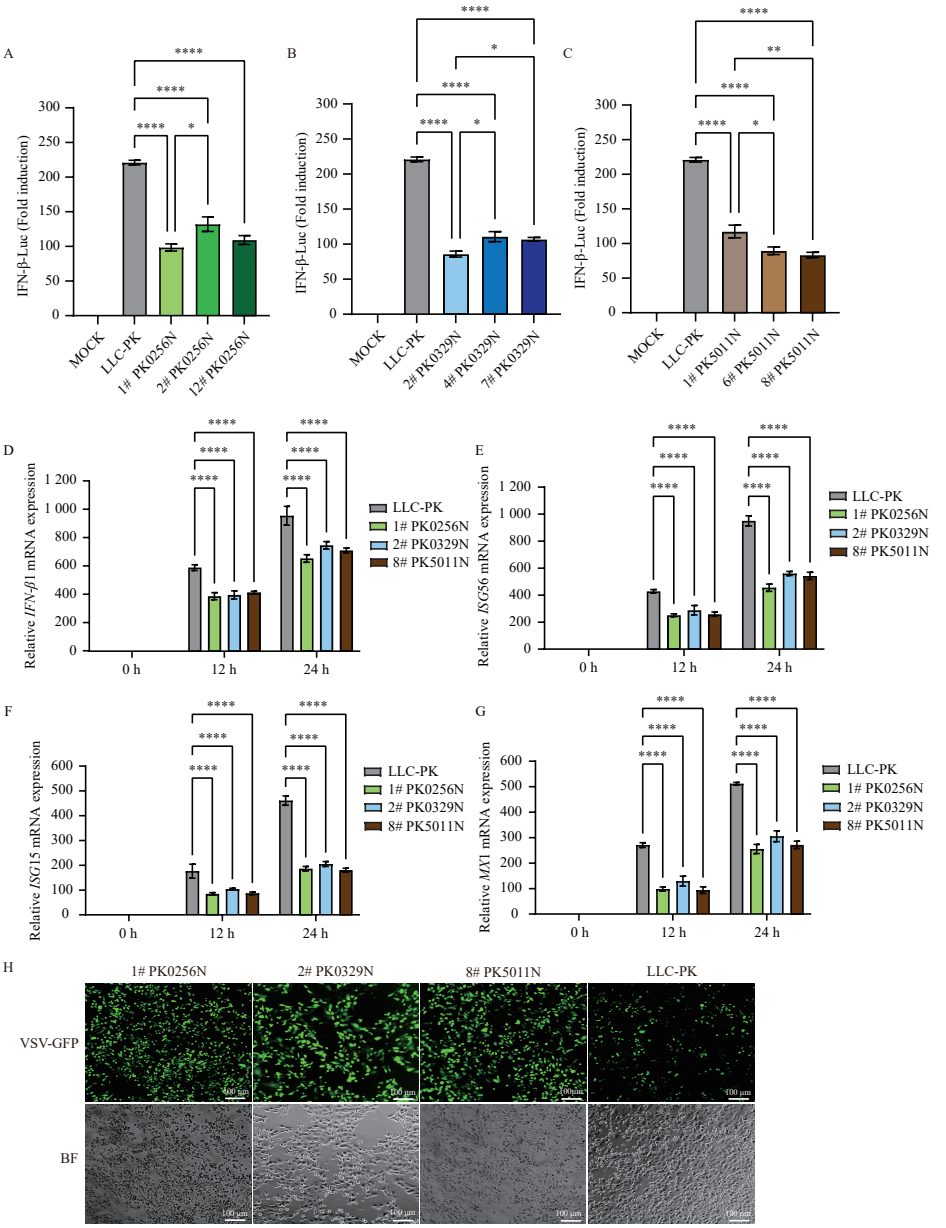
图2　3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的构建与鉴定

Fig. 2　Construction and identification of stable cell lines expressing the N protein from three PDCoV lineages

可见绿色荧光信号，初步表明3个谱系PDCoV N蛋白细胞株是由单个克隆增殖而来（图2-C）。此外，CCK-8细胞增殖活性检测结果显示，与野生型LLC-PK细胞相比，3个谱系N蛋白单克隆稳转细胞株的增殖活性均无显著差异（图2-D，P>0.05）。以上结果表明，3个谱系PDCoV N蛋白单克隆稳转细胞株已构建成功。

2.3　PDCoV N蛋白稳定表达抑制I型干扰素及下游刺激基因表达

为解析PDCoV N蛋白对宿主I型干扰素的影响，本研究通过双荧光素酶报告系统检测IFN-β启动子活性。结果（图3-A–C）显示，3个谱系PDCoV N蛋白的稳定表达均能显著抑制SeV诱导的IFN-β启动子活化；根据抑制效率，筛选出效果最显著的



A–C：双荧光素酶报告系统检测3个谱系PDCoV N蛋白对SeV诱导的IFN-β启动子活化的影响（MOCK：空白对照）；D–G：RT-qPCR检测3个谱系稳转细胞株中SeV诱导的*IFN-β*1（D）、*ISG*56（E）、*ISG*15（F）及*MX*1（G）基因mRNA的相对表达水平；H：荧光显微镜观察PDCoV N蛋白对VSV-GFP复制的影响（绿色荧光强度代表VSV复制水平；比例尺：100 μm）

A–C: Analysis of the effect of N proteins from three PDCoV lineages on SeV-induced IFN-β promoter activity using a dual-luciferase reporter assay system (MOCK: Mock control). D–G: Detection of the relative mRNA expression levels of SeV-induced *IFN-β*1 (D), *ISG*56 (E), *ISG*15 (F) and *MX*1 (G) genes in stable cell lines of different PDCoV lineages by RT-qPCR. H: Fluorescence microscopy observation of the effect of PDCoV N protein on VSV-GFP replication (green fluorescence intensity indicates VSV replication level. scale bar: 100 μm)

图3 PDCoV N蛋白抑制IFN-β活化及下游刺激基因激活

Fig. 3 PDCoV N protein suppresses IFN-β activation and downstream stimulated gene expression

1# PK0256N、2# PK0329N和8# PK5011N稳转细胞株，用于后续研究。在SeV感染模型中，RT-qPCR检测结果显示，与野生型LLC-PK细胞相比，3个谱系稳转细胞株中*IFN-β*1的转录水平分别下调约

31.6%、21.8%和25.7%；其下游干扰素刺激基因（*ISGs*）中，*ISG*56表达量分别下调约52.1%、41.1%和42.9%，*ISG*15表达量分别下调约59.6%、55.5%和60.9%，*MX*1表达量分别下调约50.1%、40.2%和46.9%（图3-D-G，P<0.000 1）。上述数据表明，N蛋白的稳定表达可显著抑制I型干扰素及其下游刺激基因的转录激活。为在功能层面进一步验证PDCoV N蛋白抑制干扰素通路的下游生物学效应，本研究选用水疱性口炎病毒（VSV-GFP）作为报告病毒进行感染实验。结果（图3-H）显示，稳定表达N蛋白的细胞中绿色荧光信号强度显著高于对照组，提示N蛋白可通过抑制IFN-I通路的激活促进VSV复制。以上结果表明，PDCoV N蛋白能够通过抑制I型干扰素通路的活化从而削弱宿主固有抗病毒免疫应答。

2.4　3个谱系PDCoV毒株N蛋白诱导LLC-PK细胞S期阻滞

为探究PDCoV N蛋白对宿主细胞周期的调控作用，本研究采用流式细胞术检测LLC-PK细胞与3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的细胞周期分布特征。结果（图4）显示，经血清饥饿同步化处理并恢复培养12 h后，LLC-PK细胞的S期细胞比例约为（25.20±0.45）%。相比之下，3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的S期细胞比例均显著上调，分别约为（34.47±0.32）%、（30.70±0.38）%和（32.83±0.35）%。以上结果表明，N蛋白的稳定表达可诱导LLC-PK细胞发生S期阻滞。

2.5　3个谱系PDCoV毒株N蛋白稳定表达促进PDCoV病毒的复制与增殖

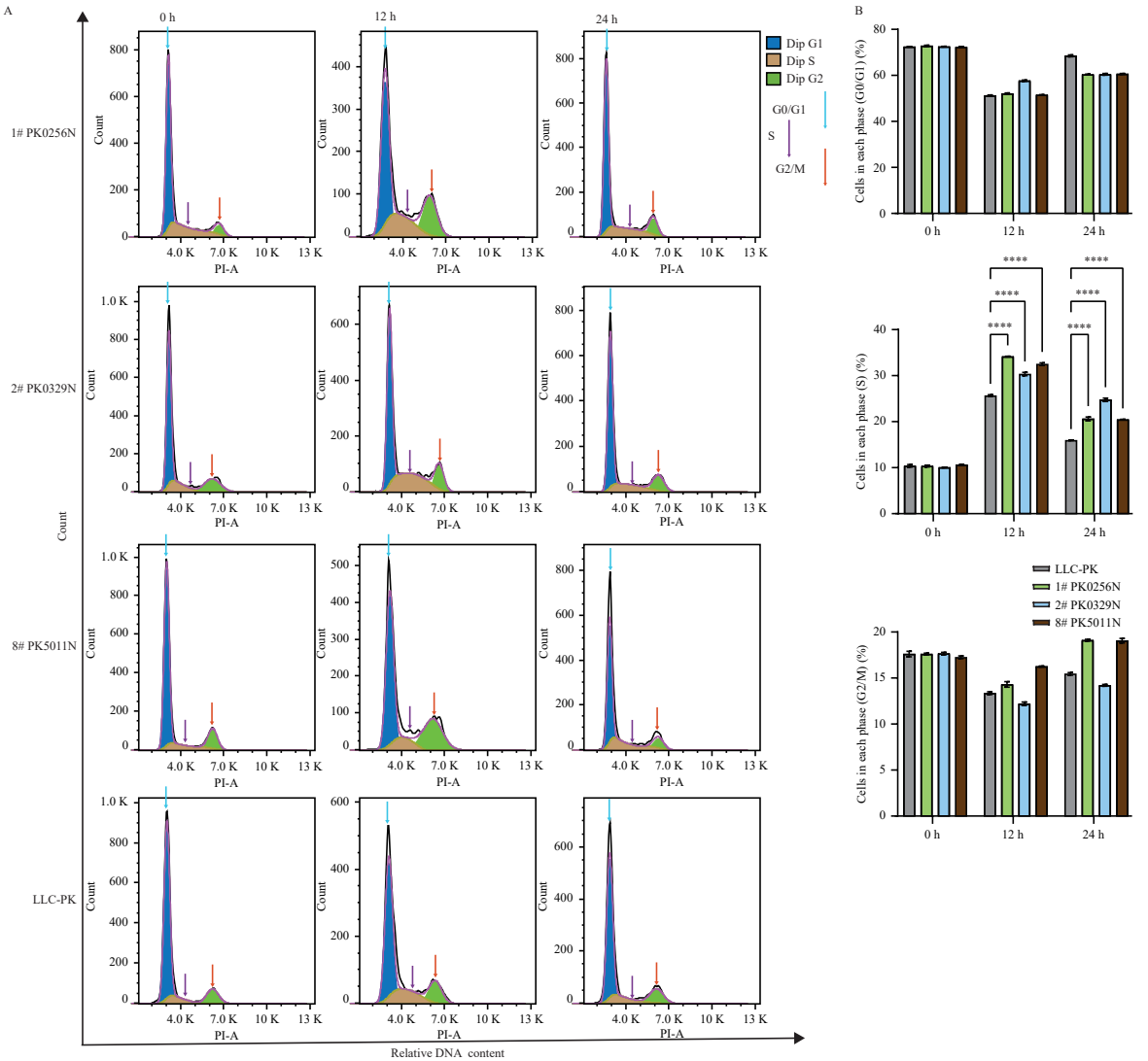
为探究N蛋白稳定表达对PDCoV增殖的影响，用PDCoV感染野生型LLC-PK细胞及3个谱系的N蛋白稳转细胞株，分别于感染后2、6、12和48 h收集细胞上清，并通过RT-qPCR检测病毒拷贝数。结果（图5-A）显示，感染48 h后，3个谱系稳转细胞株上清中的病毒拷贝数分别达到3.08×10^{12}、1.62×10^{12}、3.27×10^{12} copies/mL，均显著高于野生型LLC-PK细胞上清中病毒拷贝数的3.25×10^{11} copies/mL（P<0.000 1）。此外，基于S蛋白鼠单抗的间接免疫荧光法检测结果显示（图5-B），3个谱系稳转细胞株中S蛋白的绿色荧光信号均较野生型细胞显著增强，提示稳转细胞株中病毒的复制增殖能力显著提升。以上结果表明，PDCoV N蛋白的稳定表达可显著促进PDCoV病毒的复制与增殖。

3　讨论

近年来，SARS-CoV、MERS-CoV及SARS-CoV-2等β属冠状病毒的多次暴发流行，凸显了动物源性冠状病毒跨物种“外溢”的重要公共卫生风险[3]。PDCoV作为一种新发现的、可跨物种感染人的δ属冠状病毒，其“外溢”可对公共卫生构成新威胁[14]。冠状病毒N蛋白是兼具结构支撑与免疫调节功能的关键毒力因子，针对性开展N蛋白致病机制研究，对于冠状病毒前瞻性防控具有重要意义[31]。本研究基于系统发育分析与宿主来源特征，选取2个人源毒株（北美谱系、中国谱系）和1个猪源毒株（东南亚谱系）进行序列比对分析，构建了稳定表达3个毒株N蛋白的LLC-PK单克隆细胞株，初步评估了N蛋白持续表达对宿主固有免疫、细胞周期及病毒增殖的影响。

冠状病毒N蛋白通过拮抗宿主固有免疫（如IFN-I通路等）实现免疫逃逸，这是其致病机制的核心策略之一[32]。本研究发现，3个谱系PDCoV N蛋白均能显著抑制SeV诱导的IFN-β启动子活化，并显著抑制关键干扰素刺激基因（*ISG*56、*ISG*15和*MX*1）的表达。这一结果与既往基于瞬时表达或病毒感染的研究结论一致[22]。N蛋白的稳定表达排除了其他病毒蛋白及表达水平波动对宿主固有免疫拮抗作用的影响，证实N蛋白可独立和持续地发挥免疫抑制作用。此外，VSV-GFP感染实验也证实这种免疫抑制可为模式病毒的复制创造有利条件。基于既往研究推测，其机制可能与N蛋白和RIG-I、STAT1等IFN-I通路关键信号分子的相互作用有关[23-24]。本研究构建的稳转细胞株，可为后续精准定位N蛋白抑制IFN-I通路的关键靶点及动态过程提供研究工具。

本研究发现，PDCoV N蛋白可诱导宿主细胞周期发生S期阻滞。调控细胞周期是许多病毒篡夺宿主资源为自身复制服务的重要策略。例如SARS-CoV-2 N蛋白可诱导γ-H2AX高表达，间接干扰CDK/cyclin复合物功能，使细胞阻滞于S期[33]。本研究在3个不同谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株中均观察到S期阻滞，提示诱导S期阻滞是冠状病毒N蛋白的一种保守致病策略，这为理解PDCoV如何重塑宿主



A:流式细胞术检测血清饥饿同步化处理后,不同时间点(0、12和24 h)野生型LLC-PK与PDCoV N蛋白稳转细胞株的细胞周期代表性图谱(蓝色:G0/G1期;棕色:S期;绿色:G2/M期);B:不同时间点G0/G1期、S期及G2/M期细胞占比的统计结果

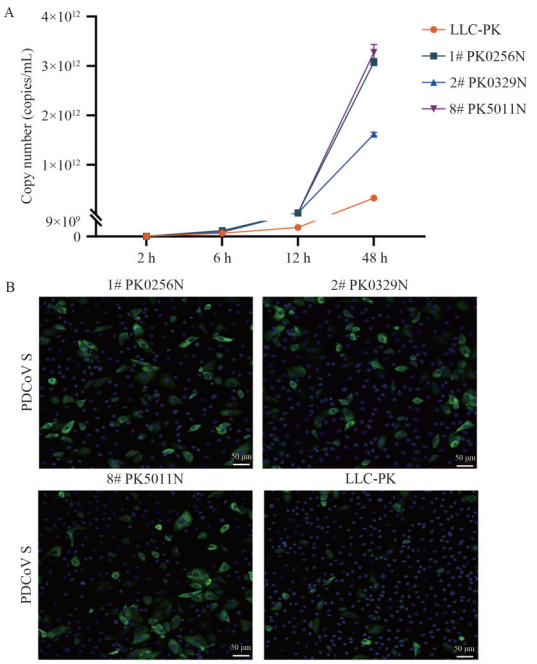
A: Representative cell cycle profiles of wild-type LLC-PK cells and PDCoV N protein stably transfected cell lines detected by flow cytometry at different time points (0, 12 and 24 h) after serum starvation synchronization (Blue: G0/G1 phase. Brown: S phase. Green: G2/M phase). B: Statistical results of the proportions of cells in G0/G1, S and G2/M phases at different time points

图4 PDCoV N蛋白诱导LLC-PK细胞S期阻滞

Fig. 4 PDCoV N protein induces S-phase arrest in LLC-PK cells

细胞微环境以利于自身增殖提供了新的视角。病毒感染介导的细胞周期阻滞涉及多种分子机制，包括细胞应激反应、DNA损伤应答以及细胞周期检查点调控等。Costa-Mattioli等[34]综述了整合应激反应（ISR）在病毒感染等多种应激条件下的激活机制；Luftig[35]总结了DNA和RNA病毒对DNA损伤应答（DDR）细胞通路的激活与拮抗策略；Bagga等[36]梳理了DNA与RNA病毒靶向细胞周期调节因子、干扰检查点控制等多种调控细胞周期的策略。PDCoV N蛋白是否也通过上述机制诱导S期阻滞，尚需在所构建的细胞株中进一步验证；其具体作用通路是未来的研究重点。

本研究还发现，3个谱系毒株N蛋白的稳定表达均可显著促进PDCoV的复制，这可能与上述免疫抑



A：qPCR绝对定量法检测3个谱系N蛋白稳转细胞株上清中PDCoV的一步生长曲线；B：基于S蛋白鼠单克隆抗体的间接免疫荧光法检测PDCoV的复制增殖情况（比例尺：50 μm）

A: Replication kinetics of PDCoV in supernatants of N protein stable cell lines from three lineages using absolute quantitative qPCR. B: Immunofluorescence detection of PDCoV proliferation in stable cell lines expressing the N protein using an anti-spike monoclonal antibody (scale bar: 50 μm)

图5　PDCoV N蛋白促进PDCoV的复制及增殖

Fig. 5　PDCoV N protein enhances PDCoV replication and proliferation

制和细胞周期重塑的共同作用有关。拮抗IFN-I通路削弱了细胞的抗病毒状态，S期阻滞则可能提供资源与时间窗口，二者协同为病毒增殖创造有利条件。此外，冠状病毒N蛋白还能够直接调控病毒基因组的不连续转录、模板转换及RNA分子伴侣活性等过程，进而促进病毒的复制增殖[37]；PDCoV N蛋白的稳定表达亦可能通过上述机制促进病毒复制，但其具体机制尚需探究。另外，本研究发现，尽管3个谱系毒株的N蛋白在关键功能域（NTD、SR-rich motif和CTD）中存在个别氨基酸突变，但其功能表型一致，提示这些功能可能由其保守结构域主导，这一保守性也凸显了N蛋白在同种属病毒生命周期中的核心作用。因此，N蛋白可作为开发广谱抗病毒策略（如靶向其保守功能域的小分子抑制剂）的潜在重要靶标。

值得注意的是，本研究构建的稳转细胞株仅在非感染条件下为解析N蛋白的独立功能提供了稳定研究工具。N蛋白的组成型表达与病毒持续性感染后期N蛋白的长期存在具有一定相似性，但并不能完全模拟天然感染的全过程。因此，后续研究可利用N蛋白的可诱导表达系统，并结合细胞或动物感染模型开展平行研究，以更深入地揭示N蛋白的生理功能。

4　结论

成功构建了稳定表达3个不同谱系PDCoV N蛋白的LLC-PK单克隆细胞株。N蛋白的持续表达能显著抑制IFN-I通路、诱导宿主细胞S期阻滞，并促进PDCoV的复制与增殖。所构建的稳转细胞株为解析N蛋白与宿主的相互作用网络、阐明其多重致病机制以及开发靶向N蛋白的新型抗病毒策略，提供了稳定可靠且条件可控的研究工具。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260509174224_NewsFile_38.pdf）。

参考文献

[1] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(3): 181-192.

[2] Ye ZW, Yuan SF, Yuen KS, et al. Zoonotic origins of human coronaviruses [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(10): 1686-1697.

[3] Ruiz-Aravena M, McKee C, Gamble A, et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats [J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(5): 299-314.

[4] Miranda C, Silva V, Igrejas G, et al. Genomic evolution of the human and animal coronavirus diseases [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(9): 6645-6653.

[5] Zhang JQ. Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution [J]. Virus Res, 2016, 226: 71-84.

[6] Wang QH, Vlasova AN, Kenney SP, et al. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs [J]. Curr Opin Virol, 2019, 34: 39-49.

[7] Shan XT, Li R, Ma X, et al. Epidemiology, pathogenesis, immune evasion mechanism and vaccine development of porcine Deltacoronavirus [J]. Funct Integr Genomics, 2024, 24(3): 79.

[8] He WT, Ji X, He W, et al. Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus [J]. Mol Biol Evol, 2020, 37(9): 2641-2654.

[9] Tang P, Cui EH, Song YH, et al. Porcine deltacoronavirus and its prevalence in China: a review of epidemiology, evolution, and vaccine development [J]. Arch Virol, 2021, 166(11): 2975-2988.

[10] Bahoussi AN, Wang PH, Shah PT, et al. Evolutionary plasticity of zoonotic porcine Deltacoronavirus (PDCoV): genetic characteristics and geographic distribution [J]. BMC Vet Res, 2022, 18: 444.

[11] Jung K, Hu H, Saif LJ. Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis [J]. Virus Res, 2016, 226: 50-59.

[12] Vlasova AN, Kenney SP, Jung K, et al. Deltacoronavirus evolution and transmission: current scenario and evolutionary perspectives [J]. Front Vet Sci, 2021, 7: 626785.

[13] Tian YY, Sun JQ, Hou XH, et al. Cross-species recognition of two porcine coronaviruses to their cellular receptor aminopeptidase N of dogs and seven other species [J]. PLoS Pathog, 2025, 21(1): e1012836.

[14] Lednicky JA, Tagliamonte MS, White SK, et al. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children [J]. Nature, 2021, 600(7887): 133-137.

[15] Su S, Wong G, Shi WF, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses [J]. Trends Microbiol, 2016, 24 (6): 490-502.

[16] Ye QZ, West AMV, Silletti S, et al. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein [J]. Protein Sci, 2020, 29 (9): 1890-1901.

[17] Chen H, Cui Y, Han XL, et al. Liquid-liquid phase separation by SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and RNA [J]. Cell Res, 2020, 30(12): 1143-1145.

[18] Cong YY, Ulasli M, Schepers H, et al. Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle [J]. J Virol, 2020, 94(4): e01925-e01919.

[19] Mu JF, Fang YH, Yang Q, et al. SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2 [J]. Cell Discov, 2020, 6: 65.

[20] Pan P, Shen MM, Yu ZY, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation [J]. Nat Commun, 2021, 12: 4664.

[21] Hu H, Jung K, Vlasova AN, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(5): 1537-1548.

[22] Ji LK, Li SS, Zhu WX, et al. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein suppressed IFN-β production by interfering porcine RIG-I dsRNA-binding and K63-linked polyubiquitination [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1024.

[23] Ji LK, Wang N, Ma JJ, et al. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein species-specifically suppressed IRF7-induced type I interferon production via ubiquitin-proteasomal degradation pathway [J]. Vet Microbiol, 2020, 250: 108853.

[24] Hu YT, Hao CL, Wang DH, et al. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein antagonizes JAK-STAT signaling pathway by targeting STAT1 through KPNA2 degradation [J]. J Virol, 2024, 98 (7): e00334-e00324.

[25] Ji LK, Zhou LY, Wang Y, et al. FBXW8 suppresses PDCoV proliferation via the NPD52-dependent autophagic degradation of a viral nucleocapsid protein [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1457255.

[26] Yang XY, Kong N, Qin WZ, et al. PGAM5 degrades PDCoV N protein and activates type I interferon to antagonize viral replication [J]. J Virol, 2023, 97(11): e01470-e01423.

[27] Wu XH, Lan SJ, Wang Y, et al. LDHB suppresses the PDCoV proliferation by targeting viral nucleocapsid protein for autophagic degradation [J]. Microbiol Spectr, 2025, 13(5): e02787-e02724.

[28] Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies [J]. Mol Biol Evol, 2006, 23(2): 254-267.

[29] Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 [J]. Nature, 2024, 630(8016): 493-500.

[30] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[31] El-Maradny YA, Badawy MA, Mohamed KI, et al. Unraveling the role of the nucleocapsid protein in SARS-CoV-2 pathogenesis: From viral life cycle to vaccine development [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 279: 135201.

[32] Zhao YH, Sui LY, Wu P, et al. A dual-role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in regulating innate immune response [J]. Sig Transduct Target Ther, 2021, 6: 331.

[33] Liu JM, Liu MY, Yu XY, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein delays cell cycle in S-phase [J]. Int J Med Microbiol, 2025, 320: 151671.

[34] Costa-Mattioli M, Walter P. The integrated stress response: From mechanism to disease [J]. Science, 2020, 368(6489): eaat5314.

[35] Luftig MA. Viruses and the DNA damage response: activation and antagonism [J]. Annu Rev Virol, 2014, 1: 605-625.

[36] Bagga S, Bouchard MJ. Cell cycle regulation during viral infection [M]// Noguchi E, Gadaleta MC. Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols. New York: Springer, 2014: 165-227.

[37] Bezerra PR, Almeida FCL. Structural basis for the participation of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in the template switch mechanism and genomic RNA reorganization [J]. J Biol Chem, 2024, 300(11): 107834.

（责任编辑　李楠）