

宿主 SLC25A6 蛋白与禽腺病毒血清 4 型感染的互作

王昕蕊^{1,2,3,4#}, 吴相龙^{1,2,3,4#}, 史慧君^{1,2,3,4}, 楚阿克·阿扎提^{1,2,3,4}, 吴彤^{1,2,3,4},
龙姝霏^{1,2,3,4}, 郑世军⁵, 阿热阿依·海依拉提^{1,2,3,4*}

- 1 新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐
- 2 农业农村部动物疫病乌鲁木齐野外科学观测研究站, 新疆 乌鲁木齐
- 3 新疆草食动物新药研究与创制重点实验室, 新疆 乌鲁木齐
- 4 新疆动物临床医学研究重点实验室, 新疆 乌鲁木齐
- 5 中国农业大学 动物医学院, 北京

王昕蕊, 吴相龙, 史慧君, 楚阿克·阿扎提, 吴彤, 龙姝霏, 郑世军, 阿热阿依·海依拉提. 宿主 SLC25A6 蛋白与禽腺病毒血清 4 型感染的互作[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3354-3365.

WANG Xinrui, WU Xianglong, SHI Huijun, Chuake·Azhati, WU Tong, LONG Shufei, ZHENG Shijun, Areayi·Haiyilati. Interaction between the host protein SLC25A6 and fowl adenovirus serotype 4 infection[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3354-3365.

摘要: 【目的】明确宿主蛋白溶质载体家族 25 成员 6 (solute carrier family 25 member 6, SLC25A6)在禽腺病毒血清 4 型(fowl adenovirus serotype-4, FAdV-4)感染中的作用及分子机制, 为深入阐明 FAdV-4 的致病机制和制定新型防控策略提供理论依据。【方法】首先确认 FAdV-4 在不同时间和感染复数(multiplicities of infection, MOI)下感染 LMH 细胞可产生明显的细胞病变。其次基于前期筛选获得的宿主蛋白 SLC25A6, 采用 Western blotting 方法检测 FAdV-4 对细胞内源性 SLC25A6 蛋白表达的影响; 通过转染实验调控 SLC25A6 的表达(过表达或干扰内源性表达), 结合实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 技术, 从 mRNA、蛋白及病毒滴度水平分析 SLC25A6 对 FAdV-4 复制的影响; 采用免疫共沉淀方法验证 SLC25A6 与 FAdV-4 核心衣壳蛋白 Hexon 的相互作用。【结果】FAdV-4 可显著抑制细胞内源性 SLC25A6 的表达。过表达 SLC25A6 能显著抑制 FAdV-4 的复制, 而干扰内源性 SLC25A6 则促进病毒复制。SLC25A6 可与 FAdV-4 Hexon 蛋白的直接相互作用。【结论】宿主蛋白 SLC25A6 通过与 FAdV-4 Hexon 蛋白相互作用抑制病毒复制, 为深入阐明 FAdV-4 的致病机制及制定新型防控策略提供了理论依据。

关键词: FAdV-4; SLC25A6; 病毒复制; 蛋白互作

资助项目: 新疆维吾尔自治区“天池英才”青年博士引进计划(2024); 新疆维吾尔自治区天山创新团队(2025)(2025D14006)
This work was supported by the 2024 “Tianchi Talent” Young Doctoral Recruitment Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region and the 2025 Tianshan Innovation Team Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2025D14006).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: aray2023@163.com

Received: 2025-12-24; Accepted: 2026-01-19; Published online: 2026-01-26

Interaction between the host protein SLC25A6 and fowl adenovirus serotype 4 infection

WANG Xinrui^{1,2,3,4#}, WU Xianglong^{1,2,3,4#}, SHI Huijun^{1,2,3,4}, Chuake·Azhati^{1,2,3,4}, WU Tong^{1,2,3,4}, LONG Shufei^{1,2,3,4}, ZHENG Shijun⁵, Areayi·Haiyilati^{1,2,3,4*}

1 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, China

2 Urumqi Field Scientific Observation and Research Station for Animal Diseases, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Urumqi, Xinjiang, China

3 Xinjiang Key Laboratory of New Drug Research and Development for Herbivorous Animals (XJ-LNDRDHA), Urumqi, Xinjiang, China

4 Xinjiang Regional Key Laboratory of Clinical Veterinary Medicine Research (XJRKLCVMR), Urumqi, Xinjiang, China

5 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, China

Abstract: [Objective] To clarify the role and molecular mechanism of the host protein solute carrier family 25 member 6 (SLC25A6) during fowl adenovirus serotype-4 (FAdV-4) infection, thus providing a theoretical basis for elucidating the pathogenic mechanism of FAdV-4 and developing novel prevention and control strategies. [Methods] First, we confirmed that infection of LMH cells with FAdV-4 at different time points and multiplicities of infection (MOI) resulted in obvious cytopathic effects (CPE). Second, on the basis of the host protein SLC25A6 identified in previous screening, Western blotting was employed to examine the effect of FAdV-4 on the expression of endogenous SLC25A6 in cells. Subsequently, transfection experiments were performed to regulate the expression of SLC25A6 (overexpression or interference with endogenous expression). RT-qPCR and Western blotting were employed to analyze the effect of SLC25A6 on FAdV-4 replication from the aspects of mRNA level, protein level, and viral titer. Finally, co-immunoprecipitation (Co-IP) was employed to verify the interaction between SLC25A6 and the core capsid protein Hexon of FAdV-4. [Results] FAdV-4 significantly inhibited the expression of endogenous SLC25A6 in cells. The overexpression of SLC25A6 markedly inhibited FAdV-4 replication, while interference with endogenous SLC25A6 promoted viral replication. SLC25A6 could directly interact with the Hexon protein of FAdV-4. [Conclusion] The host protein SLC25A6 inhibits FAdV-4 replication through its interaction with the viral Hexon protein. The results provide a theoretical basis for further elucidating the pathogenic mechanism of FAdV-4 and developing novel prevention and control strategies.

Keywords: FAdV-4; SLC25A6; viral replication; protein-protein interaction

肝炎-心包积液综合征 (hepatitis-hydropericardium syndrome, HHS), 又称“安卡拉病”, 是由禽腺病毒血清 4 型 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 引起的一种急性、高度接触性和免疫抑制性病毒病^[1]。该病于 1987 年首次

在巴基斯坦安卡拉地区暴发并被报道, 目前已在全球范围内广泛流行, 对养禽业造成重大经济损失^[2]。FAdV-4 属于腺病毒科 (Adenoviridae) 禽腺病毒属 (Aviadenovirus), 病毒粒子呈无囊膜二十面体对称结构, 直径约 70–90 nm, 对热和

化学灭活具有较强的抵抗力^[3]。该病毒主要感染鸡,也可波及鸭、鹅等禽类,能够通过水平与垂直方式传播^[4]。此外,FAdVs能与传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus,IBDV)、禽白血病病毒(avian leukosis virus,ALV)和鸡传染性贫血病毒(chicken infectious anemia virus,CIAV)等其他病原共感染,加剧病情的复杂性^[5-6]。FAdV-4多侵害3周龄左右的雏鸡,病死率可达30%–80%;患病鸡常表现为食欲减退、精神沉郁、排黄色稀便等,剖检可见肝脏与肾脏肿胀坏死以及心包内积聚淡黄色至深黄色液体^[7]。近年来,该病在我国多地鸡群和鸭群中频繁暴发,目前仍存在区域性流行的情况^[8-9],因此深入阐明FAdV-4的感染机制并制定有效的干预策略已成为当前研究的重点。

溶质载体家族25成员6(solute carrier family 25 member 6,SLC25A6),又称ADP/ATP载体蛋白3,是定位于线粒体内膜的关键转运蛋白,在细胞能量代谢与稳态维持中发挥核心作用^[10-11]。该蛋白功能异常通常与抗炎、抗肿瘤和抗病毒等过程密切相关。例如,香芹酚通过抑制VDAC1调控SLC25A6表达以改善HMEC-1细胞线粒体功能及减轻LPS诱导的炎症损伤^[12];MRPL13通过加速SLC25A6的降解抑制线粒体通透性转换孔的异常开放,进而增强卵巢癌细胞的线粒体功能,并促进卵巢癌的恶性进展^[13];在流感病毒的研究中发现SLC25A6可与病毒PB1-F2蛋白相互作用,参与病毒诱导的细胞凋亡通路^[14]。

本研究通过实时荧光定量PCR、Western blotting、TCID₅₀及免疫共沉淀等方法,探究宿主因子SLC25A6与FAdV-4的相互作用机制,旨在揭示FAdV-4的致病机制,并为抗病毒策略的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株及质粒

LMH细胞购自上海酶研生物科技有限公司。

FAdV-4 HuBWH株由中国农业大学免疫生物学实验室于2015年分离保存并惠赠。pCMV-C-flag质粒购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

2×RT OR-Easy™ Mix试剂盒、2×PCR Hero™ Mix (dye)-v2.0试剂盒、Trans2K DNA Marker,成都福际生物技术有限公司;TRIzol® Reagent、Lipofectamine™ 3000,赛默飞世尔科技公司;同源重组试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;大肠杆菌DH5α感受态细胞,北京全式金生物技术有限公司;GAPDH单克隆抗体、Tubulin单克隆抗体、SLC25A6多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的高纯度山羊抗兔免疫球蛋白G及辣根过氧化物酶标记的高纯度山羊抗小鼠免疫球蛋白G,武汉三鹰生物技术有限公司。

–80℃超低温冰箱,海尔集团公司;医用净化工作台,苏州净化设备有限公司;CO₂培养箱,益世科(上海)企业发展有限公司;倒置荧光显微镜,尼康精机(上海)有限公司;Mini-Protean Tetra电泳槽和凝胶成像仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;4℃高速离心机,赛默飞世尔科技公司;台式高速冷冻离心机,艾本德中国有限公司。

1.3 引物及siRNA序列设计

根据GenBank公布的鸡(*Gallus gallus*) SLC25A6 mRNA序列的CDS(coding sequence)区,设计真核表达载体pCMV-C-flag的同源重组引物(表1)。同源重组引物由杭州有康生物科技有限公司合成,siRNA引物(表2)由苏州吉玛基因股份有限公司合成。

1.4 真核表达重组质粒的构建

总RNA采用TRIzol法从LMH细胞中提取,经氯仿分层、异丙醇沉淀及乙醇洗涤后,用无酶水溶解并测定浓度。随后,取1 μg总RNA,使用2×RT OR-Easy™ Mix试剂在20 μL体系中进行反转录,合成cDNA。以此cDNA为模板,采用DNA聚合酶扩增SLC25A6基因。

表1 同源重组引物

Table 1 Homologous recombination primers

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Product length (bp)
SLC25A6-F	<u>ATCGTCGACAGATCTCTCGAGATGGCGGACCAGGCCATC</u>	897
SLC25A6-R	<u>CTTGTAATCTCTAGACTCGAGTTAAATGACTTTCTTGAATTCATCGTAC</u>	

The underlined sequences represent the homology arms.

表2 siRNA引物

Table 2 siRNA primers

Primer names	Primer sequences (5'→3')
SLC25A6 siRNA#1	AUAUCAGCUCCUUUGCGUCTT
SLC25A6 siRNA#2	AGUCACUGUCUGUGCAAUCTT
SLC25A6 siRNA#3	AAUACCUCCAGAACUGAGUTT

利用引物 SLC25A6-F 和引物 SLC25A6-R (表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 2 $\times$ PCR EasyTM Mix 12.5 μ L、上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L、模板(cDNA) 2 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物经纯化后用于后续克隆实验。利用同源重组试剂盒, 将 SLC25A6 基因克隆至载体 pCMV-C-flag 中, 构建重组质粒 pCMV-C-flag-SLC25A6。将上述质粒转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞中, 经单酶切及测序验证。

1.5 Western blotting 检测蛋白表达量

将细胞用预冷 PBS 洗涤 3 次后, 加入 300 μ L 含蛋白酶抑制剂的裂解液, 冰上裂解 10 min。裂解产物于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清并测定蛋白浓度。将蛋白样品与 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合, 100 $^{\circ}$ C 加热变性 10 min。取 30 μ g 蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后, 采用半干转法将蛋白转印至 PVDF 膜。膜经 5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h, 随后加入对应一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 再次洗涤后使用 ECL 化学发光试剂进行显影。采用 ImageJ 软件分析目标条带的灰度值, 结果以目的蛋白/内参蛋白条带的灰度比值表示。

1.6 FAdV-4 对 SLC25A6 表达的影响

以 5×10^5 个细胞/孔的密度将 LMH 细胞接种于 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。随后分别以感染复数(multiplicities of infection, MOI)=0.1、1、10 的 FAdV-4 感染 LMH 细胞, 或以相同 MOI 感染后于不同时间点(24、36、48 h)收取蛋白, 按照 1.5 节所述方法进行 Western blotting 检测, 分析 SLC25A6 蛋白的表达变化。

1.7 SLC25A6 对 FAdV-4 复制的影响

1.7.1 过表达 SLC25A6 对 FAdV-4 复制的影响

以 5×10^5 个细胞/孔的密度将 LMH 细胞接种于 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。将细胞分为 2 组, 分别转染 1 μ g pCMV-C-flag-SLC25A6 重组质粒(试验组)和 1 μ g pCMV-C-flag 空载质粒(对照组)。转染时将质粒稀释于 Opti-MEMTM I 中并加入 P3000TM 试剂; 同时将 LipofectamineTM 3000 与 Opti-MEMTM I 轻柔混匀, 室温静置 5 min。随后将上述 2 种溶液轻轻混合, 室温孵育 15 min 形成复合物, 并均匀滴加至细胞培养液中。转染 24 h 后, 以 MOI=1 的 FAdV-4 感染细胞, 继续培养 24 h。收集细胞蛋白样品, 通过 Western blotting 检测 SLC25A6 及病毒蛋白的表达水平。病毒上清用于 TCID₅₀ 测定: 将 LMH 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 将病毒上清进行 10 倍梯度稀释, 按稀释度从高到低加入细胞中, 每个稀释度设 8 个复孔, 并设立阴性对照; 病毒感染 2 h 后, 将培养液更换为含 2% Waymouth 的维持液, 继续培养 5-7 d, 显微镜下观察细胞病变效应, 并采用 Reed-Muench 法计算病毒

滴度。

1.7.2 干扰 SLC25A6 表达对 FAdV-4 复制的影响

按照 Lipofectamine™ 3000 RNAi Max 转染试剂说明书, 将 25 pmol 针对 SLC25A6 基因的 siRNA 及对照 siRNA 分别转染至 LMH 细胞中。转染 48 h 后收集细胞, 通过 Western blotting 检测 SLC25A6 蛋白表达水平, 以评估 siRNA 的干扰效率。为分析 SLC25A6 敲低对病毒感染的影响, 在干扰 48 h 后, 以 MOI=1 的 FAdV-4 感染细胞, 继续培养 24 h 后分别收集细胞和病毒上清, 检测方法同 1.7.1 节。

1.8 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 验证病毒蛋白 Hexon 与 SLC25A6 的相互作用

为验证 flag-Hexon 和内源性 SLC25A6 的相互作用, 将状态良好的 LMH 细胞传代至 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 将 pRK5-flag 或 pRK5-flag-Hexon 转染至 LMH 细胞中。转染 24 h 后, 用 500 μ L 裂解液收获细胞蛋白, 12 000 r/min 离心 15 min。取 50 μ L 上清作为 Input, 剩余裂解

液中每管加入 10 μ L flag 标记或 Hexon 标记的磁珠, 在室温下与样品孵育 4–6 h, 随后利用 PBST 洗涤 3 次, 去除非特异性结合蛋白, 离心弃上清, 用 2 $\times$ SDS-PAGE 重悬沉淀, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 使蛋白变性后, 进行 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测 flag-Hexon 或 FAdV-4 Hexon 与内源性 SLC25A6 的相互作用。

1.9 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 6.02 软件, 通过独立样本 *t* 检验对数据进行组间差异显著性分析并作图。试验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 FAdV-4 感染 LMH 细胞诱导的形态学变化

倒置显微镜观察结果显示, FAdV-4 感染可诱导 LMH 细胞产生显著的细胞病变。与未感染的对照组相比, FAdV-4 感染后 12 h, LMH 细胞开始出现病变; 且随着感染时间的延长, 细胞病变程度不断加剧(图 1A)。此外, 细胞病变程

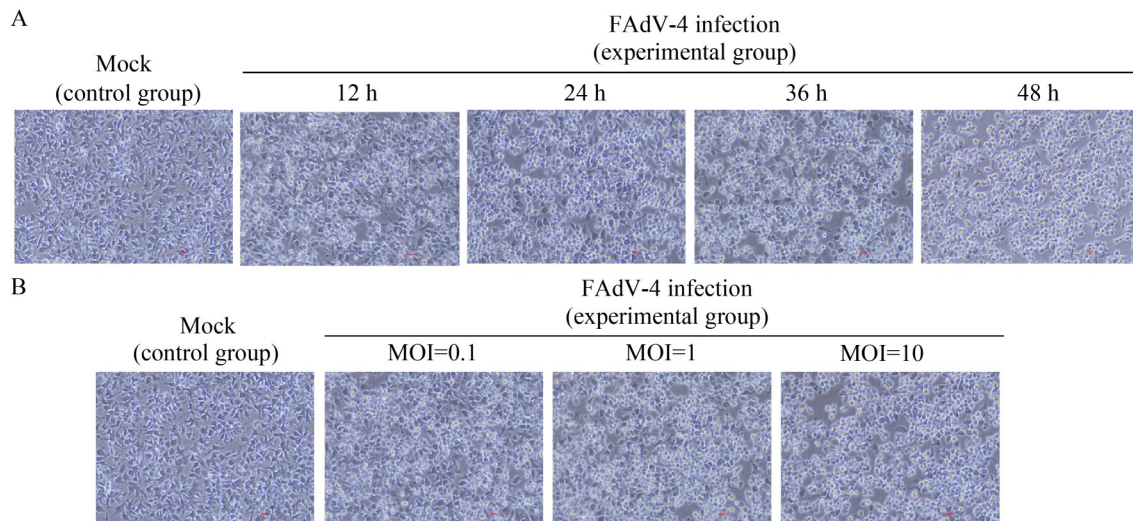


图1 FAdV-4感染LMH细胞形态观察(20 $\times$)

Figure 1 Morphological observation of LMH cells infected with FAdV-4 (20 $\times$). A: Cytopathic effects observed in LMH cells at different time points after infection with FAdV-4 at an MOI of 1; B: Cytopathic effects observed in LMH cells 24 h after infection with FAdV-4 at different MOIs.

度与病毒剂量呈正相关：随着感染剂量的增加，细胞病变程度显著加剧(图 1B)。细胞病变特征表现为细胞形态变圆、皱缩、贴壁能力下降并最终脱落，同时伴有细胞核体积增大等现象。

2.2 构建 pCMV-C-flag-SLC25A6 质粒

以 LMH 细胞提取的总 RNA 经反转录获得的 cDNA 为模板，PCR 扩增 SLC25A6 全长基因。如图 2 所示，目的条带大小约为 900 bp，与 SLC25A6 基因长度吻合。将扩增产物回收后，与经 *Xho* I 单酶切的载体质粒 pCMV-C-flag 进行同源重组连接，对连接产物进行转化和菌落 PCR 鉴定，阳性克隆送测序验证。测序结果表明，重组质粒 pCMV-C-flag-SLC25A6 构建成功。

2.3 FAdV-4 抑制内源性 SLC25A6 的表达

分别以 MOI=0.1、1、10 的 FAdV-4 感染 LMH 细胞，或以 MOI=1 的 FAdV-4 感染后于不同时间点(24、36、48 h)收取细胞蛋白，通过 Western blotting 检测 FAdV-4 感染对宿主细胞内 SLC25A6 蛋白表达的影响。结果显示，不同剂

量的 FAdV-4 感染均能明显抑制 SLC25A6 蛋白的表达，且 SLC25A6 蛋白的表达量随 FAdV-4 感染剂量的增加而逐渐降低(图 3A、3B)。此外，这种抑制效应呈时间依赖性，即随着感染时间的延长，SLC25A6 蛋白的表达量进一步降低，至 48 h 时其表达量明显下降(图 3C、3D)。

2.4 过表达 SLC25A6 抑制 FAdV-4 的复制

如图 4A、4B 所示，过表达 SLC25A6 可显著降低病毒 Hexon 与 PX 基因的 mRNA 水平。与此一致，病毒 Hexon 和 PX 蛋白的表达也受到明显抑制(图 4C–4E)。进一步通过病毒滴度测定证实，过表达 SLC25A6 能有效降低病毒滴度(图 4F)。上述结果共同表明，过表达 SLC25A6 可抑制 FAdV-4 的复制。

2.5 siRNA 干扰 SLC25A6 蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示(图 5A)，siRNA#1 对鸡 SLC25A6 基因的干扰效率显著高于 siRNA#2 和 siRNA#3(图 5B)，因此后续实验选用 siRNA#1。

2.6 干扰 SLC25A6 促进 FAdV-4 的复制

利用筛选获得的高效 siRNA#1 敲低 LMH 细胞中 SLC25A6 的表达后感染 FAdV-4。qPCR 检测结果显示，敲低 SLC25A6 可显著升高病毒 Hexon 与 PX 基因的 mRNA 转录水平(图 6A、6B)。Western blotting 检测结果显示，敲低 SLC25A6 可明显促进 FAdV-4 蛋白 Hexon 与 PX 的表达(图 6C–6E)，同时病毒滴度也显著增加(图 6F)。上述结果表明，敲低 SLC25A6 可促进 FAdV-4 的复制，与过表达实验结论相互印证，共同表明 SLC25A6 是调控 FAdV-4 复制的关键宿主因子。

2.7 Co-IP 验证 SLC25A6 与 FAdV-4 Hexon 蛋白的相互作用

在 LMH 细胞中转染 pRK5-flag-Hexon，检测外源性 Hexon 与内源性 SLC25A6 的相互作用。结果表明，在全细胞裂解液中 SLC25A6、

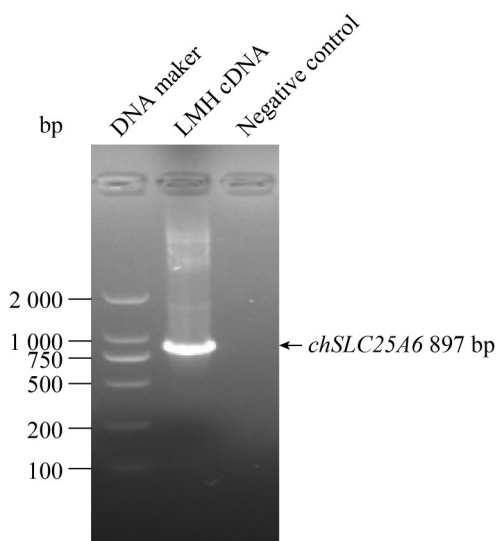


图2 SLC25A6基因PCR扩增产物

Figure 2 PCR amplification products of the SLC25A6 gene.

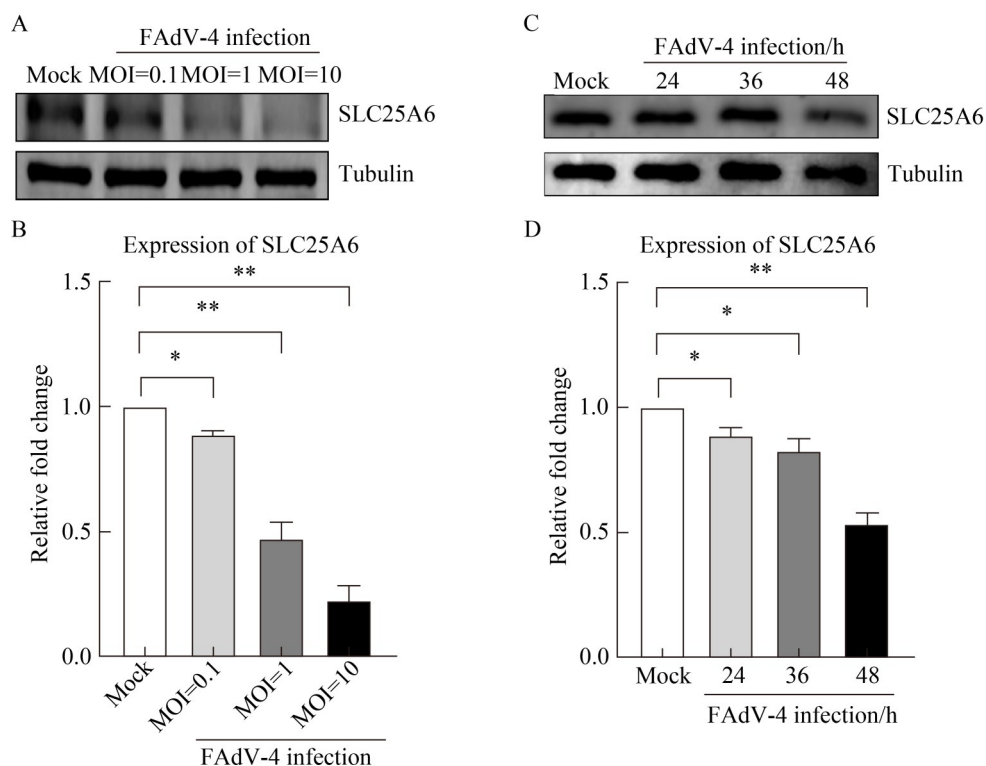


图3 Western blotting检测FAdV-4感染后SLC25A6蛋白表达量

Figure 3 Western blotting analysis of SLC25A6 protein expression following FAdV-4 infection. A: Western blotting analysis of SLC25A6 and Hexon protein expression in LMH cells infected with increasing MOI of FAdV-4 for 24 h; B: Quantitative analysis of SLC25A6 protein levels shown in figure A; C: Western blotting analysis of host SLC25A6 and viral Hexon protein expression in LMH cells infected with FAdV-4 (MOI=1) for the indicated durations; D: Quantitative analysis of SLC25A6 protein levels shown in figure C. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. The same below.

flag-Hexon 及 GAPDH 均能被有效检测到, 表明试验体系可靠。在实验组中, flag-Hexon 被成功富集, 同时检测到明显的 SLC25A6 蛋白条带, 表明 flag-Hexon 与 SLC25A6 存在相互作用(图 7A)。由于异位表达 Hexon 可能产生假阳性结果, 需在病毒自然感染状态下进一步验证 FAdV-4 Hexon 是否与内源性 SLC25A6 存在相互作用。结果显示, 在 FAdV-4 感染状态下, 与外源表达 Hexon 结果一致, Hexon 能够被成功富集, 同时检测到明显的 SLC25A6 蛋白条带, 表明在 FAdV-4 自然感染状态下 Hexon 仍与 SLC25A6 存在相互作用(图 7B)。

3 讨论

FAdV-4 是引起 HHS 的主要病原。FAdV-4 病毒粒子呈无囊膜的二十面体对称结构, 直径约为 70–90 nm, 主要由六邻体蛋白(Hexon)、五邻体基底蛋白(penton base)、纤突蛋白(fiber)、蛋白 VI (pVI)、蛋白 VII (pVII)等结构蛋白构成。其中, Hexon 是 FAdV-4 最为重要且含量最为丰富的结构蛋白之一, 大小约 109 kDa^[15]。多项研究已证实, Hexon 与高致病性 FAdV-4 (HPFAdV-4)的致病性密切相关。Zhang 等^[16-17]利用反向遗传操作系统将非致病性毒株 ON1 的 Hexon 基因替换至高致病性毒株 HLJFAd15 中, 成功构建了

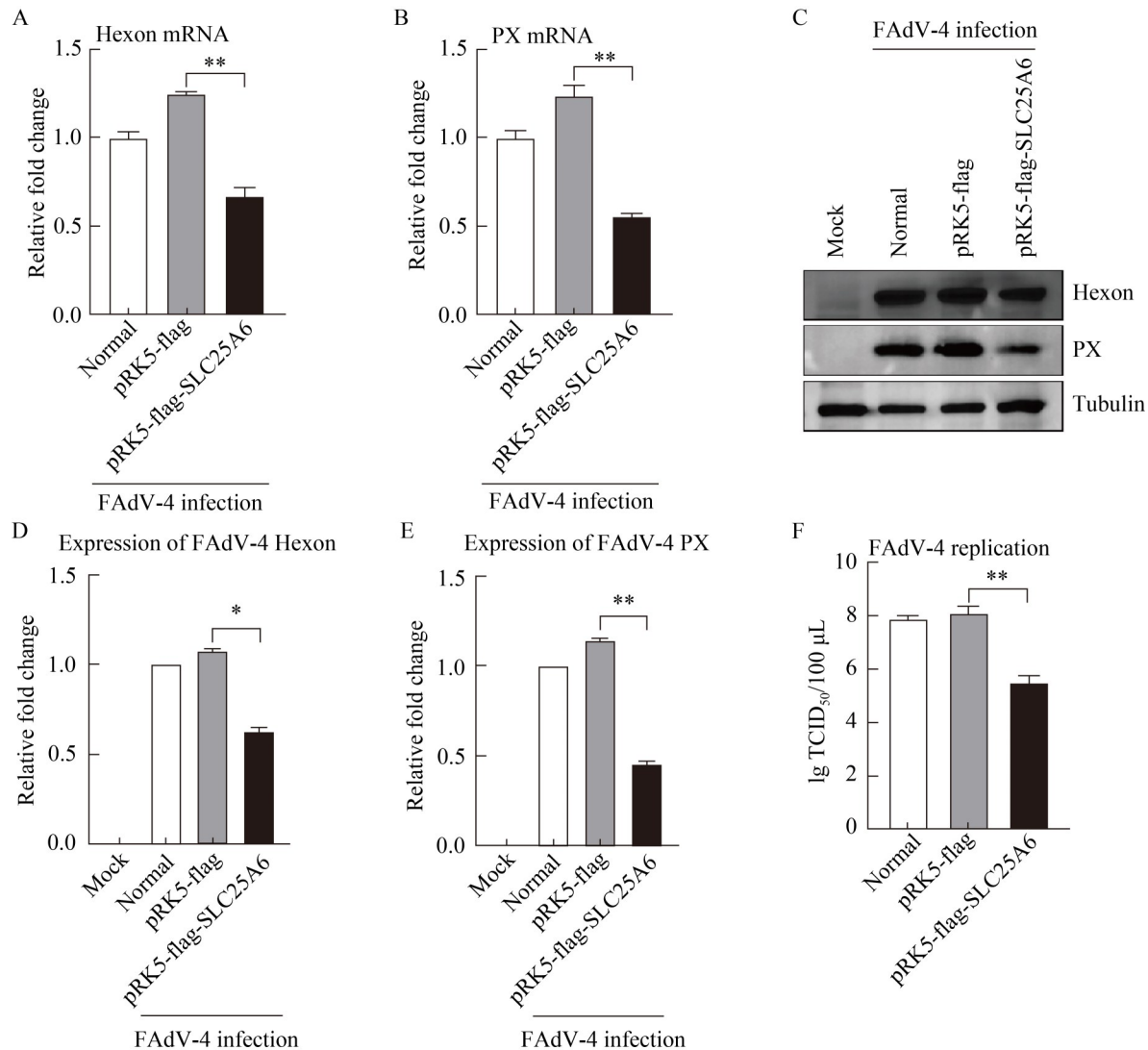


图4 过表达SLC25A6抑制FAdV-4的复制

Figure 4 Overexpression of SLC25A6 inhibits FAdV-4 replication. A, B: Overexpression of SLC25A6 inhibits the mRNA levels of viral Hexon and PX genes; C: Overexpression of SLC25A6 suppresses the expression of FAdV-4 Hexon and PX proteins; D, E: Quantitative results of figure C; F: Overexpression of pCMV-C-flag-SLC25A6 reduces the viral titer of FAdV-4 (After transfecting LMH cells with pCMV-C-flag-SLC25A6, the cells were infected with the virus for 24 h, and the viral titer was detected by the TCID₅₀ method).

重组病毒 rHN20。动物实验表明，与野生型高致病性毒株相比，rHN20 感染鸡只后引起的病理损伤显著减轻，鸡群死亡率也明显下降。进一步的序列比对与验证实验证实，Hexon 蛋白第 188 位的精氨酸是维持 FAdV-4 强毒力的关键残基，直接决定了病毒的致病性强弱。除毒力调

控外，Hexon 还可通过与宿主蛋白相互作用参与病毒复制过程。Gao 等^[18]的研究显示，FAdV-4 的 Hexon 蛋白能够与宿主细胞内的 CCT7 蛋白相互作用，维持自身稳定表达，从而促进病毒复制；Li 等^[19]进一步发现，在 HPFAdV-4 感染细胞中 Hexon 与 BAG3 相互作用，BAG3 结合

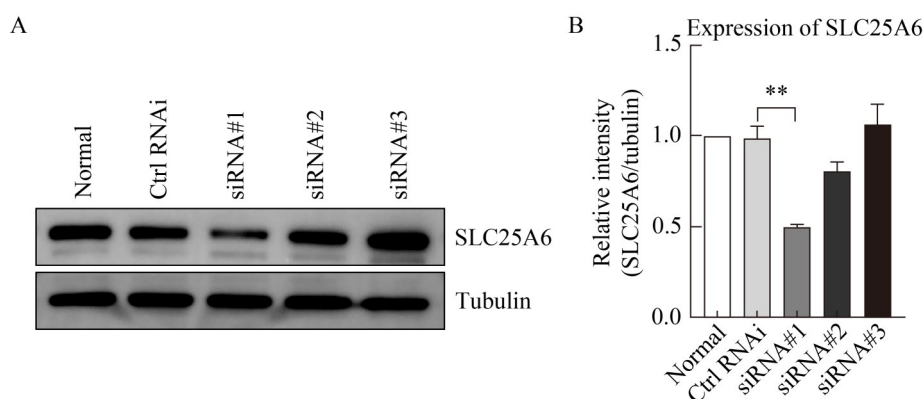


图5 敲低内源性SLC25A6蛋白表达

Figure 5 Knockdown of endogenous SLC25A6 protein expression. LMH cells were transfected with SLC25A6-specific siRNA. After 48 h, the protein expression level of SLC25A6 was detected by Western blotting, using tubulin as the internal loading control.

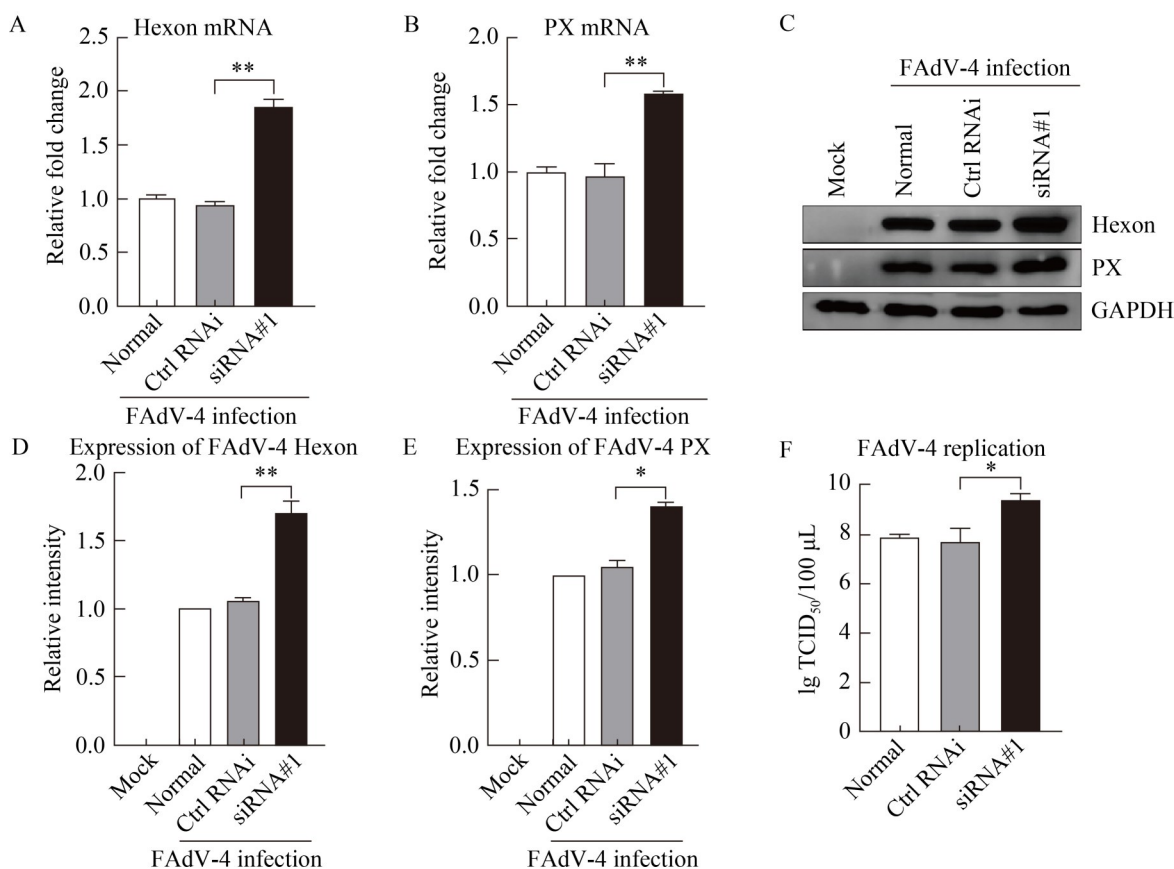


图6 干扰SLC25A6促进FAdV-4的复制

Figure 6 Knockdown of SLC25A6 promotes FAdV-4 replication. A, B: Silencing SLC25A6 promotes the mRNA levels of viral Hexon and PX genes; C: Silencing SLC25A6 enhances the expression of FAdV-4 Hexon and PX proteins; D, E: Quantitative results of the blot in figure C; F: Silencing SLC25A6 increases the viral titer of FAdV-4 (After siRNA transfection for 48 h, cells were infected with the virus for 24 h, and the viral titer was detected by the TCID₅₀ method).

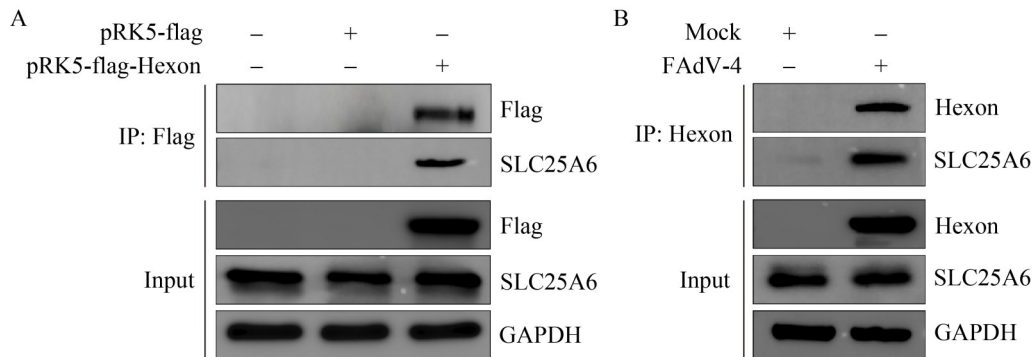


图7 Co-IP检测Hexon与SLC25A6的相互作用

Figure 7 Detection of the interaction between Hexon and SLC25A6 by Co-IP. A: LMH cells were transfected with pRK5-flag-Hexon or empty vector [At 24 h post-transfection, cellular proteins were harvested, and co-immunoprecipitation (Co-IP) was performed using an anti-flag antibody. The expression levels of flag, SLC25A6, or GAPDH were detected by Western blotting]; B: LMH cells were infected with FAdV-4 at a multiplicity of infection (MOI) of 1 (At 24 h post-infection, cellular proteins were harvested, and Co-IP was conducted using an anti-Hexon antibody. The expression levels of Hexon, SLC25A6, or GAPDH were detected by Western blotting).

域位于 101–250 aa, HPFAdV-4 Hexon 蛋白通过与 BAG3 相互作用诱导自噬, 促进病毒复制。Pan 等^[20]发现, HPFAdV-4 的短纤维蛋白 Fiber 1 可与 LMH 细胞 CAR 受体的 D2 结构域相互作用, 介导 HPFAdV-4 的入侵, 最终导致机体感染发病。值得注意的是, 同为禽腺病毒的减蛋综合征病毒 (egg drop syndrome virus, EDSV) 的 Hexon 蛋白在体外实验中可诱导鸭胚成纤维细胞发生明显凋亡^[21]。因此, 深入鉴定与 FAdV-4 Hexon 相互作用的宿主蛋白, 并阐明其互作的具体分子机制对于系统揭示该蛋白的致病机理具有重要意义。

线粒体被称为细胞内的“能量工厂”, 细胞代谢需要大量 ATP, 而这些 ATP 需经线粒体氧化磷酸化途径合成, 再通过线粒体内膜上的 ADP/ATP 载体蛋白 SLC25A6 转运至细胞质中发挥作用^[22]。SLC25A6 又称 ADP/ATP 载体蛋白 3, 是定位于线粒体内膜的转运载体蛋白, 其在细胞内的正确组装直接影响细胞内 ATP 水平及线粒体内其他蛋白质的运输与组装, 其功能异常可导致癌症、败血症及细胞毒性等^[23-24]。

SLC25A6 作为腺嘌呤核苷酸转运体家族的核心成员, 其主要功能是维持线粒体能量代谢并调控细胞凋亡, 这两大功能为 FAdV-4 感染后宿主细胞的病理响应提供了关键分子基础^[25]。在能量代谢层面, SLC25A6 是线粒体内膜上介导 ADP/ATP 跨膜交换的关键载体, 可将细胞质中的 ADP 转运至线粒体基质以支持氧化磷酸化, 同时将生成的 ATP 转运至细胞质供能, 其功能异常会直接导致细胞能量稳态失衡^[26]。

本研究发现, FAdV-4 能够显著抑制宿主细胞内源性 SLC25A6 的表达。功能实验结果表明, 过表达 SLC25A6 可显著抑制病毒复制, 而干扰该基因表达则促进病毒复制, 提示 SLC25A6 具有抗 FAdV-4 感染的作用。在分子机制上, 免疫共沉淀实验证实了 FAdV-4 的 Hexon 蛋白与 SLC25A6 存在直接相互作用。据此推测, 该互作可能通过抑制 SLC25A6 的转运活性, 一方面“劫持”宿主能量代谢以利于自身复制, 另一方面导致线粒体能量输出障碍和肝细胞代谢紊乱, 这与 FAdV-4 感染后肝脏肿大、易碎的病理特征相符。在细胞凋亡调控层面,

SLC25A6 表达水平与线粒体膜通透性密切相关,病毒对其的早期抑制可能延缓肝细胞凋亡,为自身复制争取时间;而后期其功能的过度异常则可能触发大量细胞坏死,加剧肝脏损伤及心包积液等全身症状^[13]。此外,鉴于已有研究证实 SLC25A6 与 M1 型巨噬细胞活化呈负相关^[27],提示其还可能通过调控免疫细胞功能,间接影响 FAdV-4 的免疫逃逸过程,为后续探究病毒-宿主互作的多维度机制提供了方向。深入探究 SLC25A6 调控巨噬细胞活化的通路及其在 FAdV-4 免疫逃逸中的作用是一个颇具潜力的研究方向,解析该机制可能为开发通过调节宿主免疫代谢抗病毒的新策略提供理论依据。

4 结论

本研究通过前期筛选获得宿主蛋白 SLC25A6,首先明确了 FAdV-4 可显著抑制细胞内源性 SLC25A6 的表达;其次通过 mRNA、蛋白及病毒滴度水平证实过表达 SLC25A6 能显著抑制 FAdV-4 的复制,而干扰内源性 SLC25A6 表达则促进病毒复制;最后,为阐明 SLC25A6 调控 FAdV-4 复制的分子机制,采用免疫共沉淀实验验证了其 FAdV-4 Hexon 蛋白的直接相互作用。

作者贡献声明

王昕蕊:实验操作、论文撰写;吴相龙:协助实验操作;史慧君:研究构思和设计;楚阿克·阿扎提、吴彤:数据处理;龙姝霏:参与论文讨论;郑世军:提供技术支持贡献;阿热阿依·海依拉提:论文修改和项目支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 罗东还,曹登友,温贵兰,陈佳琪,龚新勇.禽安卡拉病毒生物制剂研发及药物防控的研究进展[J].黑龙江畜牧

兽医,2024(5):31-35,42.

Luo DH, Cao DY, Wen GL, Chen JQ, Gong XY. Advances in research and development of biological agents for avian Ankara disease and drug prevention and control[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2024(5): 31-35, 42 (in Chinese).

- [2] Haiyilati A, Zhou LY, Li JX, Li W, Gao L, Cao H, Wang YQ, Li XQ, Zheng SJ. Gga-miR-30c-5p enhances apoptosis in fowl adenovirus serotype 4-infected leghorn male hepatocellular cells and facilitates viral replication through myeloid cell leukemia-1[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 990.
- [3] Rashid F, Xie ZX, Wei Y, Xie ZQ, Xie LJ, Li M, Luo SS. Biological features of fowl adenovirus serotype-4[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1370414.
- [4] Lai JY, He XC, Zhang RJ, Zhang LM, Chen LB, He FP, Li L, Yang LY, Ren t, Xiang B. Chicken interferon-alpha and-lambda exhibit antiviral effects against fowl adenovirus serotype 4 in leghorn male hepatocellular cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(3): 1681.
- [5] Yu GL, Lin Y, Dou YG, Tang Y, Diao YX. Prevalence of fowl adenovirus serotype 4 and co-infection by immunosuppressive viruses in fowl with hydropericardium hepatitis syndrome in Shandong Province, China[J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 517.
- [6] 许力文,尹德晶,杨佳佳,田红利,岳筠,杨鹏,陈静,方天,程振涛.海兰灰蛋鸡 ALV、FAdV-4 和 FAdV-8a 的混合感染分析[J].黑龙江畜牧兽医,2022(21):80-85,139.
- Xu LW, Yin DJ, Yang JJ, Tian HL, Yue J, Yang P, Chen J, Fang T, Cheng ZT. Analysis of mixed infection of ALV, FAdV-4 and FAdV-8a in Hyline Grey layers[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(21): 80-85, 139 (in Chinese).
- [7] 陈雨晴,曹洁,王玉峰,宋素泉,闫丽萍.1株禽4型腺病毒 JS 株的分离鉴定[J].畜牧与兽医,2020,52(5):92-96.
- Chen YQ, Cao J, Wang YF, Song SQ, Yan LP. Isolation and identification of a fowl adenovirus 4 JS strain[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 52(5): 92-96 (in Chinese).
- [8] Chen L, Yin LJ, Zhou QF, Peng P, Du YP, Liu LL, Zhang Y, Xue CY, Cao YC. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015-2018[J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 271.
- [9] 陈玥.抗禽腺病毒血清4型(FAdV-4)中草药的筛选及作用机制的初步探讨[D].秦皇岛:河北科技师范学院,2022.
- Chen Y. Screening and mechanism of Chinese herbal medicine against fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4)[D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology, 2022 (in Chinese).
- [10] Gong M, Zhu QM, Tan Q. Evolutionary analyses of mitochondrial carrier family of dictyostelids[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 1465.
- [11] Ruprecht JJ, Kunji ERS. The SLC25 mitochondrial carrier family: structure and mechanism[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2020, 45(3): 244-258.

- [12] Lu CF, Yang B, Liu Y, Liu WB, Yan J, Guo CG, Song TY, Wang XF. Carvacrol regulates the expression of SLC25A6 by inhibiting VDAC1 to improve mitochondrial function and reduce LPS-induced inflammatory injury in HMEC-1 cells[J]. ACS Omega, 2025, 10(8): 8512-8522.
- [13] Liu OX, Hu YX, Wang S, Nie X, Wang YX, Fan XC, Zeng K, Li X, Liu BY, Lin B. MRPL13 enhances mitochondrial function and promotes tumor progression in ovarian cancer by inhibiting mPTP opening *via* SLC25A6[J]. Cell Death & Disease, 2025, 16(1): 634.
- [14] Arnold U. Investigations into the cellular interactome of the PB2 protein expressed by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses[D]. Berlin: Humboldt University of Berlin, 2018.
- [15] Li XF, Xie ZX, Wei Y, Xie ZQ, Wu AQ, Luo SS, Xie LJ, Li M, Zhang YF. The knob domain of the fiber-1 protein affects the replication of fowl adenovirus serotype 4[J]. Microorganisms, 2024, 12(11): 2265.
- [16] Zhang Y, Pan Q, Guo RR, Liu AJ, Xu ZZ, Gao YL, Cui HY, Liu CJ, Qi XL, Zhang YP, Li K, Gao L, Wang XM. Immunogenicity of novel live vaccine based on an artificial rHN20 strain against emerging fowl adenovirus 4[J]. Viruses, 2021, 13(11): 2153.
- [17] Zhang Y, Liu AJ, Wang YN, Cui HY, Gao YL, Qi XL, Liu CJ, Zhang YP, Li K, Gao L, Pan Q, Wang XM. A single amino acid at residue 188 of the hexon protein is responsible for the pathogenicity of the emerging novel virus fowl adenovirus 4[J]. Journal of Virology, 2021, 95(17): e00603-21.
- [18] Gao JF, Zhao ML, Duan XY, Wang YQ, Cao H, Li XQ, Zheng SJ. Requirement of cellular protein CCT7 for the replication of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in leghorn male hepatocellular cells *via* interaction with the viral hexon protein[J]. Viruses, 2019, 11(2): 107.
- [19] Li W, You GJ, Haiyilati A, Wang HN, Jiao HX, Wang YQ, Gao L, Cao H, Li XQ, Zheng SJ. Critical role of viral protein hexon in hypervirulent fowl adenovirus serotype-4-induced autophagy by interaction with BAG3 and promotion of viral replication in LMH cells[J]. Journal of Virology, 2023, 97(6): e00284-23.
- [20] Pan Q, Wang J, Gao YL, Wang Q, Cui HY, Liu CJ, Qi XL, Zhang YP, Wang YQ, Li K, Gao L, Liu AJ, Wang XM. Identification of chicken CAR homology as a cellular receptor for the emerging highly pathogenic fowl adenovirus 4 *via* unique binding mechanism[J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 586-596.
- [21] Qi XF, Xu JM, Wang ZG, Wang XP, Wang JY. The role of hexon in egg drop syndrome virus (EDSV) inducing apoptosis in duck embryo fibroblast cells[J]. Research in Veterinary Science, 2017, 114: 395-400.
- [22] Chen YF, Wu LS, Liu J, Ma L, Zhang WL. Adenine nucleotide translocase: current knowledge in post-translational modifications, regulations and pathological implications for human diseases[J]. FASEB Journal, 2023, 37(6): e22953.
- [23] Zhang Q, Tang YB, Sun S, Xie QY, Yao J, Wang XD, Qian JJ, Li ZN. An extensive bioinformatics study on the role of mitochondrial solute carrier family 25 in PC and its mechanism behind affecting immune infiltration and tumor energy metabolism[J]. Journal of Translational Medicine, 2022, 20(1): 592.
- [24] Pohl EE, Vazdar M, Kreiter J. Exploring the proton transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier: FA-cycling hypothesis and beyond[J]. Protein Science, 2025, 34(3): e70047.
- [25] Cho SY, Kang NS. The solute carrier (SLC) transporter superfamily as therapeutic targets for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancers, 2024, 16(18): 3226.
- [26] Cimadamore-Werthein C, Jaquel Baron S, King MS, Springett R, Kunji ER. Human mitochondrial ADP/ATP carrier SLC25A4 operates with a ping-pong kinetic mechanism[J]. EMBO Reports, 2023, 24(8): e57127.
- [27] Liu AR, Liu YN, Shen SX, Yan LR, Lv Z, Ding HX, Wang A, Yuan Y, XU Q. Comprehensive analysis and validation of solute carrier family 25 (SLC25) and its correlation with immune infiltration in pan-cancer[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 4009354.