

宿主线粒体通道蛋白促进干扰素应答抑制口蹄疫病毒复制的分子机制

蔡镇远^{1,2}, 陈文哲², 杨发誉², 魏衍全¹, 何继军², 郑海学², 包世俊^{1*}, 朱紫祥^{1,2*}

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州

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

蔡镇远, 陈文哲, 杨发誉, 魏衍全, 何继军, 郑海学, 包世俊, 朱紫祥. 宿主线粒体通道蛋白促进干扰素应答抑制口蹄疫病毒复制的分子机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 3935-3945.

CAI Zhenyuan, CHEN Wenzhe, YANG Fayu, WEI Yanquan, HE Jijun, ZHENG Haixue, BAO Shijun, ZHU Zixiang. Voltage dependent anion-selective channel 2 promotes interferon response to inhibit foot-and-mouth disease virus replication[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 3935-3945.

摘要: 口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染偶蹄动物引起的一种烈性动物传染病。FMDV 是一种单股正链无囊膜 RNA 病毒, 具有二十面体对称结构。FMDV 入侵宿主后会引发宿主的先天性免疫和适应性免疫反应, 而 FMDV 已经进化出多种途径来逃避免疫。FMDV 的感染致病机制复杂, 目前对于参与调控病毒感染复制的宿主因子的认知仍然非常有限。宿主线粒体通道蛋白(voltage dependent anion-selective channel 2, VDAC2)是一种线粒体通道蛋白, 目前关于 VDAC2 对 FMDV 复制调控的具体机制尚不清楚。【目的】确证 VDAC2 与 FMDV 之间的调控作用, 并揭示 VDAC2 抑制 FMDV 复制的分子机制。【方法】通过间接免疫荧光方法确定 VDAC2 在细胞内的定位; 利用 Western blotting 以及荧光定量 PCR 方法检测 FMDV 对 VDAC2 蛋白水平和转录水平的影响; 在 BHK-21 细胞上利用病毒滴度测定法检测过表达 VDAC2 对 FMDV 复制的影响; 利用 qPCR 方法检测上调或下调 VDAC2 后 FMDV 感染对细胞内 IL-1 β 、ISG15、OAS1、mtDNA 和 gDNA 水平的影响。【结果】结果显示 VDAC2 亚细胞定位于细胞质中; FMDV 感染可以降低 VDAC2 的表达; 过表达 VDAC2 显著抑制 FMDV 的复制, 并呈现剂量依赖关系; 干扰 VDAC2 能够促进 FMDV 的复制; 过表达 VDAC2 可

资助项目: 国家生猪创新中心先导科技项目(NCTIP-XD/C03); 国家生猪产业技术体系(CARS-35); “十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2022SDZG02)

This work was supported by the National Swine Innovation Center Pioneer Science and Technology Project (NCTIP-XD/C03), the Pig Industry System (CARS-35), and the “14th Five-year Plan” Guangdong Province Agricultural Science and Technology Innovation Ten Major Directions “Listed and Commanded” Project (2022SDZG02).

*Corresponding authors. E-mail: BAO Shijun, bsjdy@162.com; ZHU Zixiang, zhuzixiang@caas.cn

Received: 2025-02-07; Accepted: 2025-05-04; Published online: 2025-06-25

增强 FMDV 诱导的 IFN-I 反应；干扰 VDAC2 可抑制 FMDV 诱导的 IFN-I 反应；过表达 VDAC2 可以促进 mtDNA 的释放。【结论】本研究表明 FMDV 感染可以下调 VDAC2 的转录与蛋白表达，而 VDAC2 可通过调节 mtDNA 的释放促进 IL-1 β 、ISG15 和 OAS1 等抗病毒因子的表达，从而发挥抗病毒作用。当 FMDV 入侵宿主细胞时，宿主细胞可以通过 VDAC2 增强 IFN-I 反应，对病毒复制进行调控，发挥抗病毒作用。

关键词：口蹄疫病毒；VDAC2 蛋白；IFN 应答

Voltage dependent anion-selective channel 2 promotes interferon response to inhibit foot-and-mouth disease virus replication

CAI Zhenyuan^{1,2}, CHEN Wenzhe², YANG Fayu², WEI Yanquan¹, HE Jijun², ZHENG Haixue², BAO Shijun^{1*}, ZHU Zixiang^{1,2*}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine and Biosafety, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, China

Abstract: Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious disease caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV) in cloven-hoofed animals. FMDV is a single-stranded positive-sense non-enveloped RNA virus with icosahedral symmetry. FMDV can cause innate and adaptive immunity of the host, and it has evolved a variety of immune escape ways. The FMDV infection is a complicated process involving various host proteins. However, the related mechanisms remain largely unknown. Voltage dependent anion-selective channel 2 (VDAC2) is a mitochondrial channel protein, and the specific mechanism by which VDAC2 regulates FMDV replication remains unclear. **[Objective]** To confirm the regulatory effects between VDAC2 and FMDV and reveal the molecular mechanism by which VDAC2 inhibits FMDV replication. **[Methods]** The subcellular localization of VDAC2 was determined by the indirect immunofluorescence assay. The effects of FMDV on the translation and transcription levels of VDAC2 were determined by Western blotting and qPCR, respectively. The effect of VDAC2 overexpression on FMDV replication in BHK-21 cells was measured based on the virus titer. The effects of VDAC2 overexpression and knockdown on the levels of IL-1 β , ISG15, OAS1, mtDNA, and gDNA during FMDV infection were evaluated by qPCR. **[Results]** VDAC2 was localized in the cytoplasm. FMDV infection down-regulated the expression of VDAC2. The overexpression of VDAC2 inhibited FMDV replication in a dose-dependent manner, while the knockdown of VDAC2 promoted FMDV replication. The overexpression of VDAC2 enhanced FMDV-induced interferon-I (IFN-I) response, while the knockdown of VDAC2 inhibited FMDV-induced IFN-I response. In addition, the overexpression of VDAC2 increased the release of mtDNA. **[Conclusion]** FMDV infection can downregulate the transcription and translation of VDAC2, as VDAC2 can exert antiviral effects by

regulating mtDNA release and promoting the expression of antiviral factors such as IL-1 β , ISG15, and OAS1. This study indicates that upon FMDV infection, host cells can regulate the virus replication by enhancing IFN-I response *via* VDAC2 to exert antiviral effects.

Keywords: foot-and-mouth disease virus (FMDV); voltage dependent anion-selective channel 2 (VDAC2); interferon (IFN) response

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种高度传染性偶蹄动物疾病。FMDV 感染会引起口腔、鼻腔和足部的水疱病变,并伴随发烧、流涎和跛行等症状^[1-2]。口蹄疫的流行会对国家经济和贸易带来严重影响,尽管接种灭活疫苗对口蹄疫的流行起到了一定的控制作用,但疫病流行的风险仍然存在^[3]。FMDV 是一种单股正链 RNA 病毒,具有二十面体对称的无包膜结构^[4]。由于 RNA 复制的稳定性较差,基因组突变率较高,FMDV 有 7 种不同的血清型,分别为 A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3,血清型的多样性导致疫苗免疫缺乏交叉保护^[5]。FMDV 的基因组长度约为 8 kb,其中开放阅读框(open reading frame, ORF)包含 4 种结构蛋白(分别为 VP1、VP2、VP3 和 VP4)以及编码 11 种非结构蛋白的序列^[6]。

线粒体在细胞信号传导、细胞衰老、细胞增殖、疾病和细胞死亡中起着至关重要的作用。电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion-selective channel, VDAC)是线粒体外膜上的一类孔蛋白,在线粒体代谢中发挥着关键作用^[7]。据报道,VDACs 参与多种病理反应过程,这可能是由于 VDACs 功能紊乱导致细胞质和线粒体之间的物质代谢障碍以及细胞凋亡调节异常所致^[8]。VDACs 家族有 3 种亚型,分别是 VDAC1、VDAC2 和 VDAC3,其中 VDAC2 存在主要的结构差异,其 N 端区域比 VDAC1 和 VDAC3 延伸了 12 个氨基酸^[9]。VDACs 通道的关闭可导致代谢物交换停止。VDACs 可以与 Bcl-2 家族蛋白相互作用,调节细胞凋亡的发生,VDAC2 通过与 BAK 相互作用调控 BAK 依

赖的细胞凋亡,缺失 VDAC2 可增强 BAK 寡聚化,促进细胞凋亡;而过表达 VDAC2 能够抑制 BAK 激活,进而抑制线粒体凋亡的发生^[10]。

VDAC2 是一种对 FMDV 复制具有显著调控作用的线粒体通道蛋白。为探究宿主 VDAC2 蛋白对 FMDV 复制的影响及其在 FMDV 感染期间的功能,本研究利用过表达和 RNA 干扰等方法,探讨了 VDAC2 对 FMDV 诱导的 I 型干扰素反应的影响,以期为主宿主抗 FMDV 感染机制的阐明提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

PK-15 和 BHK-21 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学实验室提供。细胞在含有 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内静置培养。口蹄疫 O/BY/CHA/2010 毒株由中国农业科学院兰州兽医研究所统一保存提供。

1.2 主要试剂和仪器

小鼠抗 HA 单克隆抗体和鼠抗 β -actin 单克隆抗体, Sigma-Aldrich 公司;山羊抗小鼠 IgG 的辣根过氧化物酶偶联二抗和山羊抗兔 IgG 的辣根过氧化物酶偶联二抗,武汉博士德生物工程有限公司;VDAC2、STAT1、p-STAT1 和针对 cGAS (环状 GMP-AMP 合酶)的兔源多克隆抗体, ABclonal 公司;VDAC2 表达质粒,苏州金唯智生物科技有限公司构建;针对 FMDV 的 VP1 和 3D 抗体由本实验室制备;ECL 显色剂、Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody 和 AlexaFluor[™] 594, ThermoFisher Scientific 公司;EDTA 胰酶溶液、DMEM 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum,

FBS), Gibco 公司; PBS 溶液, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 蛋白 marker, TaKaRa 公司; 转染试剂 JetPRIME, Polyplus-transfection 公司; RNA 抽提试剂 TRIzol, Invitrogen 公司; qRT SuperMix 反转录试剂和 SYBR Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 荧光染料, Beyotime 公司。

激光共聚焦显微镜, Leica 公司。

1.3 细胞转染

细胞转染使用 JetPRIME 转染试剂, 在实验之前将消化混匀后的细胞加入所需的孔板内, 并在 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内静置培养。待细胞密度达到 70%–80% 时进行转染, 取 1.5 mL 无 RNase 离心管, 加入转染缓冲液, 按说明书比例先后加入各组分, 用移液枪吹吸混匀后静置 10 min。将细胞孔板从培养箱中取出, 在生物安全柜内使用真空泵吸去培养基, 加入新的培养基, 然后将质粒和转染试剂的混合物缓慢加入培养基中, 水平前后缓慢摇晃孔板, 使转染试剂均匀分布后, 再将其放回 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中继续培养。转染 12 h 后, 弃去旧培养基, 加入新的完全培养基, 继续培养 12 h 后收取细胞样品并进行相应处理。

1.4 siRNA 干扰实验

VDAC2 的特异性 siRNA 序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成(表 1)。将消化好的 PK-15 细胞均匀铺于 12 孔板内, 待细胞密度达到 70%–80% 时, 将 VDAC2 特异性 siRNA 转染到 PK-15 细胞中, 干扰 48 h 后按照病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.1 感染 FMDV, 12 h 后弃去上清, 收集细胞, 对 VDAC2 和 FMDV mRNA 的表达水平差异进行分析。

1.5 蛋白免疫印记试验(Western blotting)

收集细胞样品, 金属浴 100 °C 加热 12 min 进行蛋白变性, 随后 12 000 r/min 离心 5 min。将样品和蛋白 marker 分别加入蛋白胶梳孔中,

表1 靶向VDAC2的siRNA序列

Table 1 siRNAs targeting the VDAC2 gene

Name of siRNAs	Primer sequences (5'→3')
si-VDAC2-1	Sense: GGUUCAUCUAAUACAGACA Antisense: UGUCUGUAUUAGAUGAACC
si-VDAC2-2	Sense: GAUCUUGACACUUCAGUAA Antisense: UUACUGAAGUGUCAAGAUC

调节电压为 80 V, 运行 30 min。待 SDS loading buffer 形成整齐的线性且离开上层胶后, 将电压调整至 120 V, 继续运行以分离蛋白, 直至目的条带清晰分离为止。在 100 V 恒压下, 于冰水混合物中进行 1 h 的转膜操作。室温下封闭 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次。一抗(1:2 000 稀释)在 4 °C、50 r/min 孵育过夜, 随后用 TBST 洗涤 3 次。二抗(1:5 000 稀释)在室温下 50 r/min 孵育 1 h, 之后用 TBST 洗涤 3 次, 最后用 ECL 化学发光显色液进行显色。

1.6 间接免疫荧光(indirect fluorescence assay, IFA)

将 0.01% (100 μg/mL) 的多聚赖氨酸溶液加入共聚焦小皿中, 在 5% CO₂、37 °C 培养箱中包被 30 min。铺 PK-15 细胞, 待细胞生长至 60%–80% 时进行转染, 随后置于培养箱中继续培养 24 h 后处理样品。弃去培养基, 用 PBS 清洗; 使用提前冷却备用的 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 PBS 清洗; 在室温条件下用 0.2% Triton X-100 通透 15 min, 随后用 PBS 清洗; 用 5% BSA 在室温下封闭 1 h, 再用 PBS 清洗 1 次; 加入一抗(用 5% BSA 稀释), 在 4 °C 孵育过夜; 用 PBST 洗涤 3 次, 加入荧光二抗(用 5% BSA 稀释), 在避光条件下孵育 1 h, 随后用 PBST 洗涤 3 次; 用 DAPI 在避光条件下染色 10 min, 最后用 PBS 清洗。在避光条件下, 使用激光共聚焦显微镜进行观察并拍照。

1.7 实时荧光定量 PCR (qPCR)

采用 TRIzol 法提取 PK-15 细胞总 RNA。弃去细胞孔板内的培养液, 用 PBS 漂洗后在通风

橱内加入 500 μL TRIzol (12 孔板/孔), 室温裂解 5 min。反复吹打以促使细胞脱落, 将裂解液转移至 RNase-free 离心管, 室温静置 5 min。按体积比 5:1 加入氯仿(100 μL), 涡旋振荡至溶液呈均质粉红色, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 分离水相与有机相。吸取 200 μL 上层水相至新的离心管, 加入等体积异丙醇, 轻柔混匀后置于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 收集 RNA 沉淀, 弃上清, 加入 1 mL 预冷 75% 乙醇洗涤沉淀, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min。彻底吸弃乙醇, 室温干燥沉淀至半透明状。加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA, 冰上暂存, 测定浓度后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。使用 qRT SuperMix 反转录试剂对提取的细胞总 RNA 进行反转录为 cDNA。反应体系(10 μL): RNA 2 μL , RNase-free ddH₂O 6 μL , 5 \times PrimerScript RT Master Mix 2 μL 。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

使用 SYBR Green Master Mix 进行 qPCR。反应体系: 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , SYBR Premix 5 μL , cDNA 1 μL , DEPC 水 3 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 进行 40 个循环; 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。目的基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式进行计算。本研究所用引物如表 2 所示。

1.8 病毒滴度测定(TCID₅₀)

将 BHK-21 细胞铺于 96 孔板中, 用含 1% 血清的 DMEM 培养基对 FMDV 上清进行梯度稀释。感染 72 h 后, 在显微镜下观察每列细胞中产生细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)的细胞孔数量, 计算 TCID₅₀ 值。进行 3 次生物学重复观察测量, 最后取其平均值作为最终的病毒效价。

1.9 IP-cGAS 检测 mtDNA

将 PK-15 细胞铺于 6 孔板中, 空白对照组

表2 本研究所用引物

Table 2 The primers used in this study

Gene	Primer sequences (5'→3')
FMDV	Forward: TTCGGCCTTTGATGCTAACCACTG Reverse: GCATCCCGCCCTAACAACAAT
VDAC2	Forward: TCAAGTCTTCTTACAAGAGGGGA Reverse: TCAAAGGTCATCTGGTACCCAG
IL-1 β	Forward: AGCGACATGGAGAAGCGATTT Reverse: TTCTGCTTGAGAGGTGCTGATG
ISG15	Forward: GATCGGTGTGCCTGCCTTC Reverse: CGTTGCTGCGACCCTTGT
OAS1	Forward: AAGCATCAGAAGCTTTGCATCTT Reverse: CAGGCCTGGGTTTCTTGAGTT
GAPDH	Forward: ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA Reverse: GATCGAGTTGGGGCTGTGACT

和实验组分别以 MOI=0.1 接毒 8-10 h 后, 用 PBS 洗 1 次。每孔加入 300 μL 含蛋白酶抑制剂的裂解液, 冰上裂解 15 min, 随后以 12 000 r/min 离心 15 min。在 1.5 mL 离心管中加入 10 μL protein G, 用 lysis buffer 洗涤 2 次, 8 000 r/min 离心 30 s。将上清液加入离心管中, 每管加入 0.4 μL cGAS 抗体。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转混匀仪上孵育 4-6 h, 用 lysis buffer 洗涤 2 次, 加入 50 μL DEPC 水, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10-30 min。每管加入 50-100 ng EGFP 质粒, 用枪尖研磨底部 beads, 提取上清液保存或进行 qPCR 实验。检测 mtDNA、gDNA (GAPDH) 和 EGFP 引物。其中, EGFP 作为内参, gDNA (GAPDH) 表示总 DNA 含量, mtDNA 表示释放的线粒体 DNA 量。在 gDNA 含量一致的情况下, 比较 mtDNA 的变化。

1.10 统计学分析

统计分析结果均以 mean \pm SD 表示, 每组实验至少进行 3 次生物学重复。使用 GraphPad Prism 8.0 进行 *t* 检验分析, 对数据均值之间的统计差异进行分析, 其中: *表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$; ***表示 $P<0.001$; ****表示 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 VDAC2 的定位

为了验证 VDAC2 的亚细胞定位, 将 pcDNA-HA-VDAC2 真核表达质粒转染至生长密度为 70%–80% 的 BHK-21 细胞中, 转染 24 h 后进行观察。结果如图 1 所示, 红色为 HA-VDAC2, 蓝色为细胞核, VDAC2 主要定位于细胞质中。

2.2 FMDV 感染调控 VDAC2 的表达

为了研究 FMDV 感染对 VDAC2 表达的影响, 设计了 0、2、4、8、12 h 的时间点。当待 PK-15 细胞生长至单层时, 以 MOI=0.1 进行感染, 分别在 5 个细胞孔中进行 Western blotting

和 12 h 时间点的 qPCR 实验。结果显示, FMDV 感染会导致 VDAC2 的蛋白表达水平和转录水平呈下降趋势(图 2A、2B)。这表明 FMDV 感染可以降低 VDAC2 的表达水平。

2.3 过表达 VDAC2 抑制 FMDV 的复制

为了验证过表达 VDAC2 对 FMDV 复制的影响, 将 PK-15 细胞转染不同剂量的 VDAC2 表达质粒(0、250、500 ng), 转染 24 h 后以 MOI=0.1 感染 FMDV, 12 h 后分别收集细胞和上清进行实验。结果表明, 随着 VDAC2 表达量的增加, FMDV 的蛋白水平和 mRNA 水平显著降低(图 3A、3B)。对收集的上清进行滴度测定, TCID₅₀ 结果显示过表达 VDAC2 能抑制 FMDV 的复制, 并呈现剂量依赖关系(图 3C)。

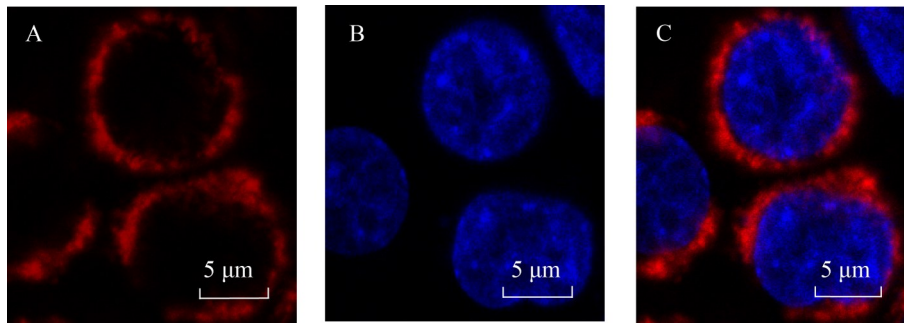


图1 pcDNA-HA-VDAC2质粒的细胞定位

Figure 1 The subcellular localization of VDAC2. A: Subcellular localization of HA-VDAC2; B: DAPI staining of the nucleus; C: Merge staining of the nucleus and cytoplasm.

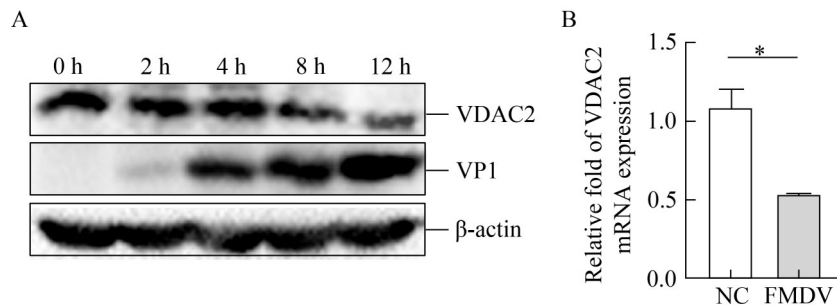


图2 FMDV感染调控内源蛋白VDAC2的表达

Figure 2 FMDV infection decreased the expression of endogenous VDAC2. A: VDAC2 protein levels were detected after FMDV infection; B: VDAC2 mRNA level was detected after FMDV infection. NC: Negative control. *: Significant difference ($P < 0.05$).

2.4 干扰 VDAC2 促进 FMDV 的复制

对合成的 2 对猪源 VDAC2 特异性 siRNA 进行 mRNA 水平的筛选, 选择干扰效率较高的 siRNA 进行后续实验。PK-15 细胞转染 VDAC2 的 siRNA 和空白对照 48 h 后, 以 MOI=0.1 感染 FMDV 12 h, 收集细胞样品进行检测。结果显示, si-VDAC2-2 的干扰效率较高(图 4A)。VDAC2 siRNA 的转染导致 FMDV VP1 蛋白水

平和 mRNA 水平升高(图 4B、4C), 同时 VDAC2 的表达量降低(图 4D), 表明干扰 VDAC2 能够促进 FMDV 的复制。

2.5 过表达 VDAC2 促进 FMDV 诱导的 IFN-I 反应

为探究过表达 VDAC2 抑制 FMDV 复制的分子机制, 将 VDAC2 质粒转染至 PK-15 细胞 24 h 后, 以 MOI=0.1 感染 12 h。通过 qPCR 实

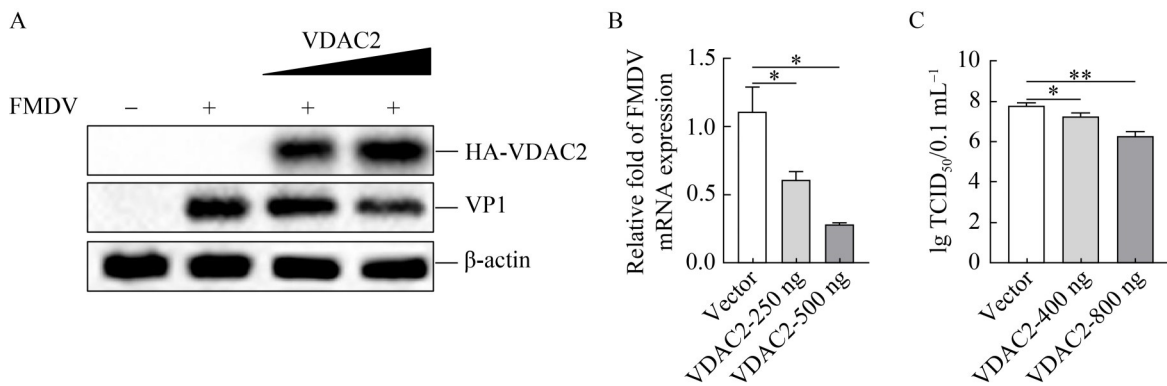


图3 过表达VDAC2抑制FMDV的复制

Figure 3 Overexpression of VDAC2 suppressed FMDV replication. A: FMDV protein levels were detected in VDAC2 overexpressing cells after FMDV infection; B: FMDV VP1 mRNA levels were detected in VDAC2 overexpressing cells; C: Determination of viral titers using BHK-21 cells. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

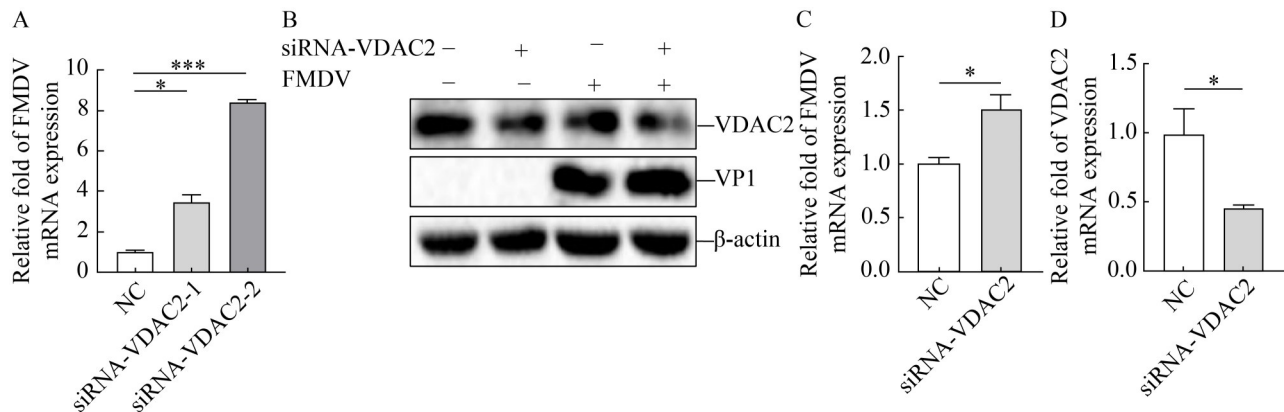


图4 下调VDAC2促进FMDV的复制

Figure 4 Downregulation of VDAC2 expression promotes FMDV replication. A: Detection of silence ratio of VDAC2 siRNA; B: FMDV protein levels were detected after downregulation of VDAC2 expression; C: FMDV VP1 mRNA levels were detected after downregulation of VDAC2 expression; D: VDAC2 mRNA levels were detected after downregulation of VDAC2 expression. NC: Negative control. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

检测 IL-1 β 、ISG15 和 OAS1 的 mRNA 水平。结果显示，IL-1 β 、ISG15 和 OAS1 的 mRNA 水平显著提高(图 5)。这表明过表达 VDAC2 可以增强 FMDV 诱导的 IFN-I 反应。

2.6 干扰 VDAC2 抑制 FMDV 诱导的 IFN-I 反应

为探究干扰 VDAC2 促进 FMDV 复制的分子机制，设置实验组和对照组，在 PK-15 细胞中分别转染 siRNA 和空白对照 siRNA 24 h 后，以 MOI=0.1 感染 12 h，检测 mRNA 水平。通过 qPCR 实验检测 IL-1 β 、ISG15 和 OAS1 的 mRNA 水平。结果显示，IL-1 β 、ISG15 和 OAS1 的 mRNA 水平显著降低(图 6)。这表明干扰 VDAC2 可以抑制 FMDV 诱导的 IFN-I 反应。

2.7 过表达 VDAC2 对 mtDNA 和 gDNA 的影响

线粒体损伤或功能障碍会导致 mtDNA 释放到细胞质中，并被 cGAS 识别。本研究中通过 IP-cGAS 对过表达样品进行处理，以 EGFP 为内参，检测了过表达 VDAC2 后 FMDV 对 mtDNA 释放的影响。结果显示，FMDV 感染过表达 VDAC2 的细胞后，显著促进了 mtDNA 的释放，但不影响基因组 DNA (gDNA) 的释放(图 7A、7B)。这一结果与过表达 VDAC2 能够增强 FMDV 诱导的 IFN-I 反应相呼应。

2.8 过表达 VDAC2 后对 STAT1 磷酸化蛋白水平的检测

通过 Western blotting 技术检测了过表达 VDAC2 后 FMDV 感染细胞中 STAT1 及其磷酸

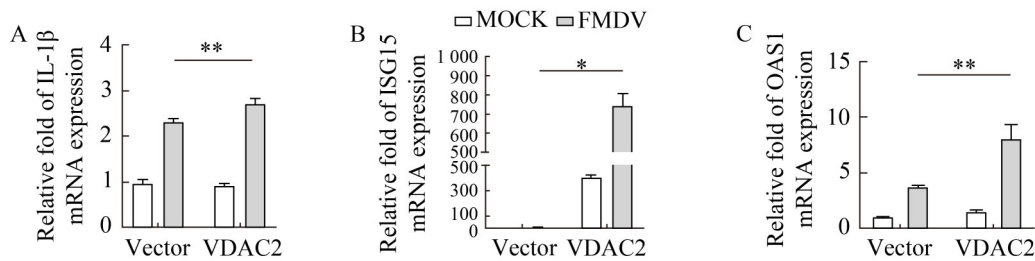


图5 过表达VDAC2促进FMDV诱导的IFN-I反应

Figure 5 Overexpression of VDAC2 promoted IFN-I response induced by FMDV. A: The mRNA level of IL-1 β was detected by qPCR; B: The mRNA level of ISG15 was detected by qPCR; C: The mRNA level of OAS1 was detected by qPCR. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$.

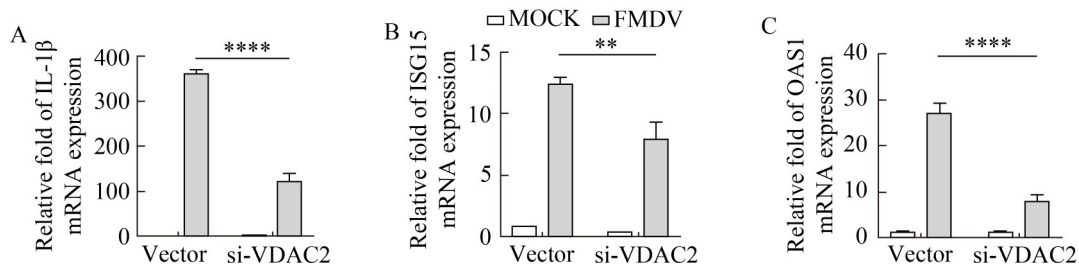


图6 下调VDAC2抑制FMDV诱导的IFN-I反应

Figure 6 Downregulation of VDAC2 inhibited IFN-I response induced by FMDV. A: The mRNA level of IL-1 β was detected by qPCR; B: The mRNA level of ISG15 was detected by qPCR; C: The mRNA level of OAS1 was detected by qPCR. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$.

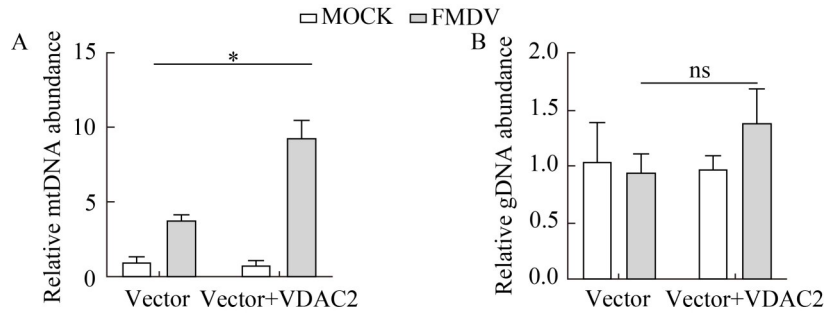


图7 过表达VDAC2促进mtDNA的释放

Figure 7 Overexpression of VDAC2 promotes mtDNA release. A: Detection of mtDNA levels; B: Detection of gDNA levels. ns: No significant difference ($P>0.05$); *: Significant difference ($P<0.05$).

化形式(p-STAT1)的表达水平。实验结果表明, VDAC2 的过表达显著增强了 STAT1 的磷酸化水平(p-STAT1), 提示其可能通过激活 JAK-STAT 信号通路的关键节点促进宿主的抗病毒反应, 功能实验证实 VDAC2 介导的 STAT1 磷酸化增强能够有效抑制 FMDV 在细胞内的复制(图 8)。

3 讨论

口蹄疫是一种极具传染性的动物传染病, 其流行对养殖业造成了严重的危害, 并导致了巨大的经济损失。口蹄疫病毒具有高度变异性, 这使得疫情反复发生, 给动物养殖、贸易出口以及疫病防控带来了极为严峻的挑战。FMDV 能够快速突破宿主的天然免疫系统, 并借助宿主细胞内的机制进行快速复制, 其发病机制极

为复杂。病毒与宿主免疫系统之间复杂的作用关系决定了病毒能否被宿主细胞清除。宿主主要通过先天性免疫和适应性免疫来对抗病毒感染, 其中 I 型干扰素的作用以及中和抗体的产生发挥着极为重要的作用^[11-12]。如果宿主无法及时清除病毒, 病毒就可能在机体内形成持续性感染。在一定条件下, 病毒可能再次排毒, 从而引发新的疫情。为了对抗宿主的抗病毒应答, FMDV 可以通过多种途径进行免疫逃避。因此深入了解宿主与病毒之间的相互作用机制对于口蹄疫的防控具有重要的指导意义。

VDAC2 作为线粒体的通道蛋白, 广泛分布于真核生物线粒体外膜。当细胞处于应激状态时, 线粒体外膜的通透性会发生改变, 最终导致细胞凋亡的发生, 在细胞命运的决定中起着关键作用。当病毒入侵时, 已有研究发现 VDAC2 可以通过多种途径增强病毒感染。这些途径包括介导病毒进入宿主细胞、为病毒提供能量供应、增强病毒复制、通过结合或激活其他类型的蛋白质减少细胞凋亡, 以及有助于抑制抗病毒免疫信号的有丝分裂诱导^[13-14]。已有报道 VDAC2 在细胞自噬中发挥重要作用, 当 VDAC2 基因缺失时细胞自噬更容易发生。然而, VDAC2 在病毒与宿主相互作用中的具体机制尚未完全明确。在 VDACs 家族中, 关于 VDAC2 的研究报道相对较少。已有研究报道过表达 VDAC2 抑制牛流行热病毒 (bovine

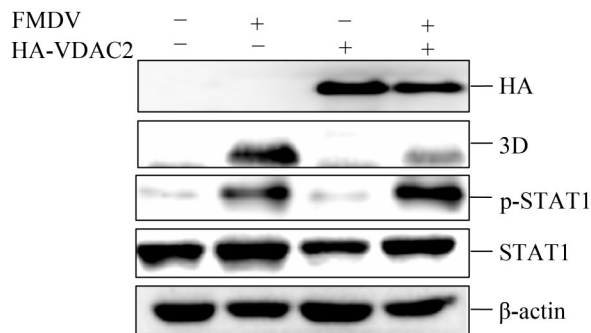


图8 过表达VDAC2促进p-STAT1的表达

Figure 8 Overexpression of VDAC2 promotes the expression of p-STAT1.

ephemeral fever virus, BEFV)诱导的 I 型干扰素的表达, 而干扰 VDAC2 则促进 BEFV 诱导的 I 型干扰素的表达, 表明 VDAC2 抑制 BEFV 诱导的 I 型干扰素反应。在传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 的感染过程中, 受体激活的蛋白 C 激酶 1 (receptor of activated protein C kinase 1, RACK1) 与 VDAC2 和 IBDV 的非结构蛋白 VP5 相互作用形成复合物, 抑制细胞凋亡, 促进 IBDV 病毒的复制。在 VDAC 的 3 种亚型中, 宿主蛋白 VDAC1 与 FMDV 的 3D^{pol} 蛋白发生互作, 进而抑制 3D^{pol} 蛋白的表达, 对口蹄疫病毒的复制具有抑制作用。目前关于 VDAC2 与 FMDV 之间关系的研究尚未见报道。然而, 已有研究表明 VDAC2 在病毒的免疫逃避中可能起到一定作用。

已有文献报道, FMDV 感染可以在细胞内引发 mtDNA 的释放。释放的 mtDNA 能够与 cGAS 结合, 并激活 cGAS 介导的抗病毒免疫应答^[5]。本研究通过在 PK-15 细胞中过表达 VDAC2 后进行病毒感染实验, 发现 VDAC2 可以通过诱导大量 mtDNA 的释放, 从而启动免疫系统对抗病毒感染。STAT1 的磷酸化是 JAK-STAT 信号通路的核心调控因子, 其通过级联反应将胞外信号(如干扰素、细胞因子)传递至细胞核内, 激活抗病毒及免疫调控基因的表达。本研究通过检测过表达 VDAC2 后 FMDV 感染细胞的 STAT1 磷酸化水平, 发现 VDAC2 介导的 STAT1 磷酸化增强能够有效抑制 FMDV 在细胞内的复制。这些发现揭示了 VDAC2 在 FMDV 感染过程中可能的调控机制。

4 结论

本研究结果显示, 在 PK-15 细胞中 FMDV 感染可以显著调控内源 VDAC2 的表达。这一结果表明 VDAC2 与 FMDV 之间存在必然的联系, 并且 VDAC2 在 FMDV 感染后发挥着重要的抗病毒作用。本研究的发现为进一步理解 VDAC2 在 FMDV 感染中的作用机制提供了新的视角。

通过深入研究 VDAC2 与 FMDV 之间的相互作用, 有望为开发新的口蹄疫防控策略提供理论依据。未来的研究可以进一步探索如何通过调节 VDAC2 的功能来增强宿主的抗病毒能力。此外, 还可以研究 VDAC2 与其他免疫相关分子之间的协同作用, 为口蹄疫的防控提供更全面的解决方案。总之, 本研究为揭示 VDAC2 在 FMDV 感染中的作用奠定了基础。

作者贡献声明

蔡镇远: 数据收集与监管, 数据分析, 完成呈现, 撰写文章; 陈文哲: 监督管理, 数据分析; 杨发誉: 审阅文章; 魏衍全: 监督管理; 何继军: 监督管理; 郑海学: 项目管理; 包世俊: 监督管理; 朱紫祥: 提出概念, 提供资源, 审阅文章。

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] LI KL, WANG CC, YANG F, CAO WJ, ZHU ZX, ZHENG HX. Virus-host interactions in foot-and-mouth disease virus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 571509.
- [2] ASLAM M, ALKHERAIJE KA. The prevalence of foot-and-mouth disease in Asia[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1201578.
- [3] LU ZM, YU S, WANG WJ, CHEN WX, WANG XY, WU KK, LI XW, FAN SQ, DING HX, YI L, CHEN JD. Development of foot-and-mouth disease vaccines in recent years[J]. *Vaccines*, 2022, 10(11): 1817.
- [4] PENG JL, YI JM, YANG WP, REN JJ, WEN Y, ZHENG HX, LI D. Advances in foot-and-mouth disease virus proteins regulating host innate immunity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2046.
- [5] KNOWLES NJ, SAMUEL AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 65-80.
- [6] 张克山, 刘永杰, 卢国栋, 刘湘涛. 口蹄疫病毒基因组结构及功能最新研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(9): 836-838. ZHANG KS, LIU YJ, LU GD, LIU XT. Latest research progress on the structure and function of the foot-and-mouth disease virus genome[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27 (9): 836-838 (in Chinese).

- [7] ZINGHIRINO F, PAPPALARDO XG, MESSINA A, NICOSIA G, de PINTO V, GUARINO F. VDAC genes expression and regulation in mammals[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 708695.
- [8] SHOSHAN-BARMATZ V, BEN-HAIL D. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target[J]. *Mitochondrion*, 2012, 12(1): 24-34.
- [9] YAMAMOTO T, YAMADA A, WATANABE M, YOSHIMURA Y, YAMAZAKI N, YOSHIMURA Y, YAMAUCHI T, KATAOKA M, NAGATA T, TERADA H, SHINOHARA Y. VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(12): 3336-3344.
- [10] CHENG EHY, SHEIKO TV, FISHER JK, CRAIGEN WJ, KORSMEYER SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis[J]. *Science*, 2003, 301(5632): 513-517.
- [11] KABIR A, ULLAH K, ALI KAMBOH A, ABUBAKAR M, SHAFIQ M, WANG L. The pathogenesis of foot-and-mouth disease virus infection: how the virus escapes from immune recognition and elimination[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2024, 72(1): 102478.
- [12] SARRY M, VITOUR D, ZIENTARA S, BAKKALI KASSIMI L, BLAISE-BOISSEAU S. Foot-and-mouth disease virus: molecular interplays with IFN response and the importance of the model[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2129.
- [13] 马柯, 薛巧, 刘鹏飞, 朱紫祥, 李宏斌, 刘会胜, 郑海学. 宿主蛋白VDAC1抑制口蹄疫病毒复制的机制研究[J]. *中国兽医科学*, 2024, 54(12): 1563-1568.
- MA K, XUE Q, LIU PF, ZHU ZX, LI HB, LIU HS, ZHENG HX. Study on mechanism of host protein VDAC1 inhibiting replication of foot-and-mouth disease virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2024, 54(12): 1563-1568 (in Chinese).
- [14] YUAN Z, DEWSON G, CZABOTAR PE, BIRKINSHAW RW. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49(6): 2787-2795.
- [15] WHITE MJ, McARTHUR K, METCALF D, LANE RM, CAMBIER JC, HEROLD MJ, van DELFT MF, BEDOUI S, LESSENE G, RITCHIE ME, HUANG DCS, KILE BT. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production[J]. *Cell*, 2014, 159(7): 1549-1562.