



lncRNA663调控CLDN10表达及猪流行性腹泻病毒复制的功能分析

吴作林, 梁海江, 吴哲豫, 杨松柏, 赵阿勇, 钦伟云*

(浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 杭州 311300)

摘要: 猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是一种引起仔猪急性腹泻、呕吐及脱水等临床症状的冠状病毒,对全球猪养殖业造成了严重的经济损失。越来越多的研究报道长链非编码RNA(lncRNA)在猪冠状病毒中发挥着重要的调控作用,然而,关于lncRNA663在PEDV感染中的调控作用和机制研究尚未有相关报道。基于前期高通量转录组数据分析,笔者发现lncRNA 663与紧密连接蛋白CLDN10具有共表达趋势,因此本研究以lncRNA 663和CLDN10为试验对象,探索其在PEDV感染中的调控作用。本研究qRT-PCR和Western blot结果显示,PEDV感染IPEC-J2细胞后上调了lncRNA 663和CLDN10的表达水平($P<0.05$),DSS处理则显著降低了lncRNA 663和CLDN10的表达水平($P<0.05$)。亚细胞定位预测发现lncRNA 663主要定位于细胞质,RPISeq预测发现lncRNA663和CLDN10高度互作(SVM: 0.98, RF: 0.8);功能试验结果显示,siRNAs敲低lncRNA 663后,CLDN10的mRNA和蛋白表达水平显著下降,PEDV复制水平亦同步降低($P<0.05$)。进一步通过AlphaFold3和ChimeraX进行结构预测,发现CLDN10可能与PEDV S蛋白形成7个氢键结合位点,提示其可能参与病毒侵染过程。综上所述,本研究初步揭示lncRNA 663通过调控CLDN10表达促进PEDV复制的可能机制,为深入解析病毒与宿主非编码RNA互作关系及干预靶点提供参考。

关键词: 猪流行性腹泻病毒;长链非编码RNA;CLDN10;肠道屏障

中图分类号: Q522;S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0945-10

Functional Analysis of lncRNA663 Regulating CLDN10 Expression and Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication

WU Zuolin, LIANG Haijiang, WU Zheyu, YANG Songbai, ZHAO Ayong, QIN Weiyun*

(College of Animal Science and Technology·College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is a coronavirus that causes acute diarrhea, vomiting, and dehydration in piglets, among other clinical signs, and has caused severe economic losses to the global swine farming industry. More and more studies have reported that long non-coding RNAs (lncRNAs) play important regulatory roles in porcine coronaviruses, however, the role and mechanism of lncRNA 663 in PEDV infection remain unclear. Based on prior transcriptome sequencing, we identified a co-expression pattern between lncRNA 663 and the tight junction protein CLDN10. This study aimed to explore their roles and regulatory relationship during PEDV infection. The qRT-PCR and Western blot results showed that the expression levels of lncRNA 663 and

收稿日期: 2025-05-27

基金项目: 浙江省自然科学基金青年科学基金项目(ZCLQN25C1702);浙江农林大学人才启动项目(2024LFR035)

作者简介: 吴作林,主要从事猪抗病育种研究, E-mail: 1494474436@qq.com

* 通信作者: 钦伟云,主要从事猪抗病育种研究, E-mail: qinwy@zafu.edu.cn

CLDN10 were up-regulated after PEDV infection of IPEC-J2 cells ($P<0.05$), DSS treatment significantly reduced the expression levels of lncRNA 663 and CLDN10 ($P<0.05$). Subcellular localization prediction revealed that lncRNA 663 was mainly localized in the cytoplasm, and RPISeq prediction revealed that lncRNA663 and CLDN10 were highly interoperable (SVM: 0.98, RF: 0.8). Functional experiments demonstrated that siRNA-mediated knockdown of lncRNA 663 led to a significant decrease in both CLDN10 expression and PEDV replication ($P<0.05$). Furthermore, structure prediction using AlphaFold3 and ChimeraX revealed potential hydrogen bond interactions between CLDN10 and the PEDV spike (S) protein, suggesting a role in viral entry or infection. Collectively, these results suggest that lncRNA 663 may promote PEDV replication by regulating CLDN10 expression. These findings expand our understanding of PEDV-host interactions and provide a theoretical basis for future antiviral strategies targeting host non-coding RNAs.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; long chain non-coding RNA; CLDN10; intestinal barrier

* **Corresponding author:** QIN Weiyun, E-mail: qinwy@zafu.edu.cn

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的一种急性、高度接触性传染的肠道疾病。PEDV主要感染猪小肠绒毛上皮细胞^[1],7日龄以下哺乳仔猪感染症状严重,出现呕吐、腹泻、脱水等症状,死亡率可达到100%^[2]。免疫接种是目前防控PED的主要策略,然而PEDV的快速变异导致疫苗难以对所有变异株提供有效保护^[3]。目前,PEDV的感染与致病机制尚未完全解析,这在很大程度上制约了有效防控措施的研发^[4]。因此,从宿主角度深入研究PEDV的感染与复制机制,对于阐明其致病过程并寻找新的防控靶点具有重要意义,已成为当前病毒研究的热点方向。

长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一种长度大于200个核苷酸的非编码RNA分子,在基因表达调控、细胞分化、肌肉发育及疾病发生等多个生物过程中发挥重要作用。近年来,lncRNAs在病毒感染过程中所发挥的调控作用逐渐受到关注^[5-6],已有研究涉及其在PEDV感染宿主细胞中的作用机制^[7-11]。研究表明,PEDV感染猪回肠组织后lncRNA表达谱的变化,并发现部分lncRNA可能与PEDV致病机制相关^[8]。除此之外,燕苗苗等^[9]研究报道了lncRNA9606在PEDV感染猪肠上皮细胞后可以显著上调表达并抑制PEDV的复制。黄东璋等^[10]研究系统验证了lncRNA LOC102157897和PEDV感染的关系,表明其表达水平下调利于提高宿主细胞对PEDV感染的抵抗力。余昕雅^[11]研究发现lncRNA18850是调控PEDV复制的重要因子,参与核因子 κ B(nuclear

factor kappa-B, NF- κ B)信号通路促进病毒复制。此外,PEDV感染可上调Vero-E6细胞内lncRNA 18850的表达,lncRNA 18850可能通过靶向调控多个基因而促进病毒的复制^[12]。

CLDN10(claudin 10)蛋白是细胞膜骨架蛋白之一,是细胞间紧密连接(tight junction, TJ)的重要组成部分^[13]。TJ是维持细胞结构以及细胞间连接和细胞间作用的重要通道。CLDN10的功能不仅仅是作为细胞间紧密连接的结构成分,还参与调节离子和水分的跨细胞运输,是细胞间屏障的关键组成部分^[14]。目前关于CLDN10的研究较少,多集中在癌症领域,研究表明,CLDN10的表达异常或功能失调与人体肿瘤的发生和进展有密切关系^[15]。CLDN10在猪中的研究仍较为匮乏,有待于进一步探究。

尽管目前已有研究初步揭示lncRNA在PEDV感染宿主过程中的调控作用,但lncRNA与其靶向宿主蛋白之间的具体互作机制尚缺乏系统研究。基于前期高通量测序数据,笔者发现lncRNA 663与紧密连接蛋白CLDN10在PEDV感染过程中呈共表达趋势,提示二者可能存在功能关联。为了进一步研究lncRNA663是否通过调控CLDN10的表达进而影响PEDV的复制,本研究在猪小肠上皮细胞(intestinal porcine epithelial cell line-J2, IPEC-J2)细胞中构建lncRNA 663干扰模型,对其功能机制进行了初步的探讨,本研究有助于阐明宿主lncRNA调控PEDV感染的功能机制,为新型抗病毒策略及遗传抗性育种提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒

IPEC-J2 细胞系为本实验室保存,采用含有 10%FBS、1%青链霉素的 DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium) 培养基培养。PEDV CV777 毒株由本实验室分离保存,接种细胞后用含 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰酶的 DMEM 培养扩毒。

1.2 PEDV 感染

将猪小肠上皮细胞(IPEC-J2)放入含有 10%FBS、1%青链霉素的 DMEM 培养基,并置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 的恒温培养箱培养。经传代 2 次后,接种至 24 孔培养板,等到细胞含量达到约 80% 时,使用 $\text{MOI}=0.1$ 的 PEDV CV777 毒株感染细胞 2 h,更换培养基继续培养至不同时间点提取 RNA。

1.3 2%DSS 处理 IPEC-J2 细胞

首先配制终浓度为 2% 的硫酸葡聚糖钠(dextran sulfate sodium, DSS),取 0.1 g 的 DSS 预先溶解于 50 mL 的 DMEM 培养基中,并通过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜进行无菌过滤备用。等到 IPEC-J2 细胞生长至融合状态后,使用 DSS 处理细胞以破坏肠道屏障,设置不同分组,处理时间分别为 0、12、24 和 48 h。在每个

时间点收集细胞用于 RNA 提取,所有样本在提取前均经氯化锂纯化。

1.4 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 Trizol 法提取 RNA,使用反转录试剂盒进行反转录,在 PCR 管中加入适量 RNA 溶液,在梯度 PCR 仪 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行 5 min 失活变性反应,结束后立即放入冰盒中冷却。将冷却后的变性 RNA 按反应液比例配制,放入 PCR 仪中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行 15 min 逆转录反应,接着在 $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应条件下进行 5 min 的酶失活反应。所得的 cDNA 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存。

1.5 荧光定量 PCR 检测

根据 NCBI 数据库提供的 lncRNA663 (XR_001302663.2)、PEDV *M*、*CLDN10* 和 *GAPDH* 基因序列,通过 Primer Premier 5.0 设计引物,引物序列参考表 1。利用 PEDV 感染猪小肠上皮细胞后,分别在 0、4、8、12、24 h 时利用 Trizol 法提取细胞 RNA,利用反转录合成 cDNA,以 *GAPDH* 为内参基因,进行荧光定量 PCR 反应,PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环;熔解曲线: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s。每个样本设置 3 个重复,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算不同时间段目的基因相对转录量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Real-time fluorescent quantitative PCR primer sequence

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequences	产物长度/bp Length
lncRNA663	F: GGACCTCCGGAGCTGTTTTA R: CTTGTGCGTCGCAAACCAA	123
PEDV <i>M</i>	F: AGGTCTGCATTCCAGTGCTT R: GGACATAGAAAGCCCAACCA	216
<i>CLDN10</i>	F: ACGGCGTCGGAGATCATTG R: ATGCCTGGATATAACCGTCCAG	226
<i>GAPDH</i>	F: ACATCATCCCTGCTTCTACTGG R: CTCGGACGCCTGCTTCAC	188

1.6 蛋白免疫印迹 (Western blot)

使用 RIPA 裂解液 (radioimmunoprecipitation assay lysis buffer) 裂解细胞后,采用 BCA 蛋白定量法 (bicinchoninic acid protein assay) 对蛋白质进行定量分析。取 $20\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转膜至 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的 PVDF 膜上。膜在 5% 脱脂乳中封闭后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下与一抗 (CLDN10 和 PEDV N) 孵育过夜。洗膜后,再与相应二抗孵育,

并使用 ECL 发光检测试剂盒显色检测蛋白条带, HSP90 作为内参蛋白。

1.7 lncRNA 亚细胞定位预测与 RNA-蛋白质相互作用预测

在 NCBI 数据库中,查找 lncRNA663 基因序列并下载,利用 lncLocator 软件,对 lncRNA663 亚细胞定位进行预测分析。除此之外,为了探究 lncRNA663 与 CLDN10 之间生物学联系,利用在线

软件 RNA-Protein Interaction Prediction (RPISeq, <http://priddb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/index.html>) 预测 lncRNA663 和 CLDN10 互作可能性。

1.8 lncRNA 干扰试验

根据 lncRNA663 基因序列,利用 Invitrogen RNAi Designer 软件设计 3 对 siRNA 和阴性对照序列(表 2)。将 IPEC-J2 细胞接种至 12 孔板中,待细胞聚集达到约 50% 时,利用 jetPRIME 试剂将 siRNAs 转染至 IPEC-J2 细胞中。48 h 后收集细胞,按照 Trizol 法提取细胞总 RNA 并反转录成 cDNA,利用实时荧光定量 PCR 计算 lncRNA663 干扰效率。为进一步探究 lncRNA663 对 PEDV 复制影响,以 PEDV 感染 lncRNA663 干扰组和对照组细胞,利用实时荧光定量 PCR 检测 PEDV *M*、*CLDN10* 的相对表达水平。

表 2 siRNAs 序列信息
Table 2 Sequence information of siRNAs

siRNAs	序列(5'→3') Sequences
siRNA-1	F: GGAUCGAGCUGCUCAUCAUTT R: AUGAUGAGCAGCUCGAUCCTT
siRNA-2	F: CCUUCUCACCUCUGUUUAUTT R: AUAACAGAGGUGAGAAGGTT
siRNA-3	F: GCGACACUCGUGAAACUAATT R: UUAGUUUCACGAGUGUCGCTT
NC	F: UUCUCCGAAACGUGUCACGUTT R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.9 蛋白质结合氢键预测

从 NCBI Protein 数据库中获取 CLDN10 和 PEDV S 的蛋白质序列,利用 Alphafold3(<https://alphafoldserver.com/welcome>)软件,输入 CLDN10 和 PEDV S 的蛋白质序列,预测结束后下载预测数据结果。打开预测数据结果,找出 PDB 文件导入 ChimeraX 1.9 软件中,在 H-Bonds 界面设置距离和角度,选择显示蛋白质间的氢键,找出氢键结合位点并标注。

1.10 数据统计与分析

利用 SPSS 25.0 软件对样本数据独立分析,对于两组间的差异比较,使用独立样本 *t* 检验;对于三组及以上的比较,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并通过 GraphPad Prim 9.0 软件绘图。试验结果用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结 果

2.1 PEDV 感染上调 lncRNA 663 和 CLDN10 的表达水平

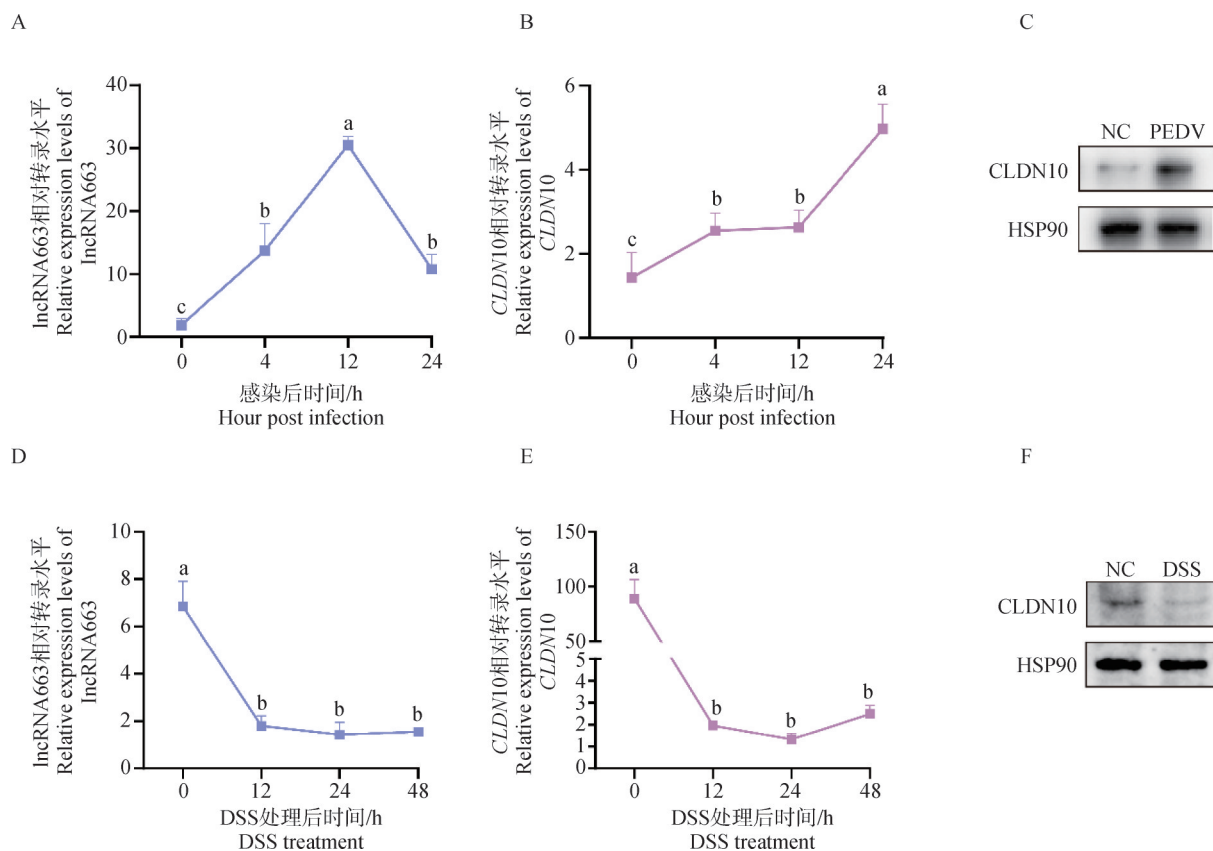
PEDV(MOI=0.1)感染 IPEC-J2 细胞后,在 0、4、12、24 h 分别检测 lncRNA 663 和 *CLDN10* 的转录水平。结果表明,随着 PEDV 感染的时间延长,lncRNA663 转录水平逐步增加,并在 12 h 达到峰值($P < 0.05$),此后 lncRNA663 转录水平下降(图 1A)。*CLDN10* 则在 PEDV 感染 24 h 之内一直呈现持续性增长,在 24 h 达到峰值($P < 0.05$)(图 1B),并且 Western blot 结果显示,PEDV 感染后 *CLDN10* 表达上升(图 1C)。为了进一步探究 lncRNA663 和 *CLDN10* 的关系,本研究利用 DSS 处理建立了 IPEC-J2 肠道屏障受损模型,结果显示,DSS 处理后,lncRNA663 和 *CLDN10* 的转录水平均显著性下降($P < 0.05$),且 *CLDN10* 蛋白表达也发生下调(图 1D~F)。综上所述,在 PEDV 感染和 DSS 处理条件下,lncRNA663 与 *CLDN10* 均表现出相似的表达变化趋势,提示二者可能具有一定的表达关联性,但其具体关系及调控机制仍有待进一步研究。

2.2 lncRNA663 亚细胞定位和互作蛋白预测分析

为深入探究 lncRNA663 在细胞内的定位情况,利用 lncLocator 软件对 lncRNA 663 定位情况进行预测。结果显示,lncRNA663 在细胞质、细胞核、核糖体及外泌体中都可能存在表达,但是定位于细胞质中的可能性最大(88.1%)(图 2A)。为探讨 lncRNA663 与 *CLDN10* 之间的潜在生物学关联,利用 RPISeq 软件对 lncRNA 663 和 *CLDN10* 两者间互作可能性的预测分析。预测结果显示,lncRNA663 和 *CLDN10* 高度互作(SVM: 0.98, RF: 0.8)(图 2B)。基于上述结果,推测 lncRNA663 可能通过与 *CLDN10* 的相互作用参与其表达调控。

2.3 lncRNA663 干扰细胞系的建立

为了进一步探究 lncRNA663 对 *CLDN10* 表达和 PEDV 感染的影响,本研究设计并合成了针对 lncRNA663 的三种干扰 siRNAs。干扰试验结果显示,与阴性对照组(NC 组)相比,三组 siRNA 均显著降低了 lncRNA663 的转录水平($P < 0.05$),其中,siRNA1 干扰效率为 39.92%,siRNA2 干扰效率为 62.31%,siRNA3 干扰效率为 84.76%(图 3),其中 siRNA3 具有最高的干扰效率,可用于后续的功能验证试验。

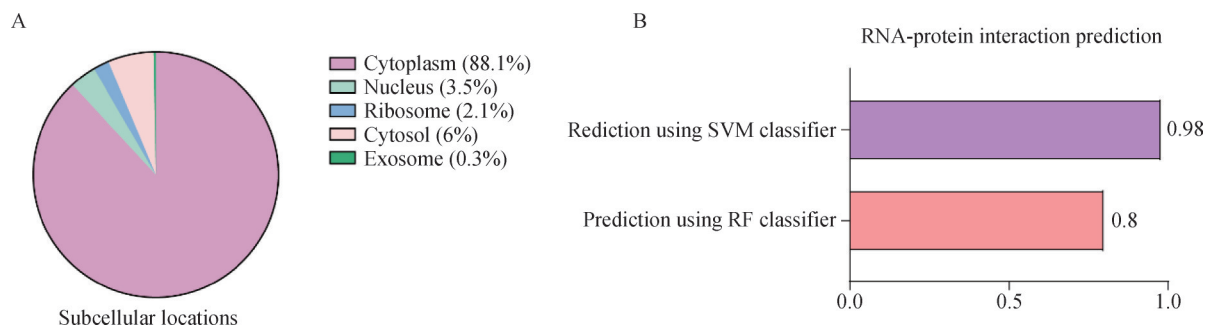


A. PEDV 处理不同时间点 lncRNA663 的转录水平; B. PEDV 处理不同时间点 *CLDN10* 的转录水平; C. Western blot 检测 PEDV 感染 24 h 后 *CLDN10* 的表达水平; D. DSS 处理不同时间点 lncRNA663 的转录水平; E. DSS 处理不同时间点 *CLDN10* 的转录水平; F. Western blot 检测 DSS 处理 24 h 后 *CLDN10* 的表达水平

A. Transcription level of lncRNA663 at different time points after PEDV treatment; B. Transcription level of *CLDN10* at different time points after PEDV treatment; C. Western blot analysis of *CLDN10* expression levels 24 h after PEDV infection; D. Transcription level of lncRNA663 at different time points after DSS treatment; E. Transcription level of *CLDN10* at different time points after DSS treatment; F. Western blot analysis of *CLDN10* expression levels 24 h after DSS treatment

图 1 PEDV 感染和 DSS 处理猪小肠上皮细胞中 lncRNA 663 和 *CLDN10* 的表达水平变化

Fig.1 Changes in the expression levels of lncRNA 663 and *CLDN10* in small intestinal epithelial cells of PEDV-infected pigs

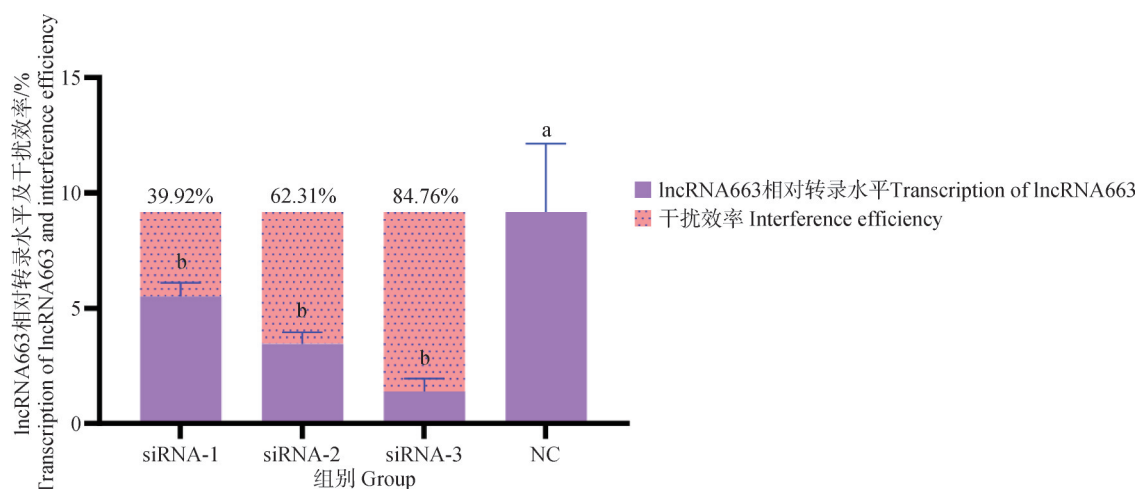


A. lncRNA 亚细胞定位预测; B. lncRNA663 和 *CLDN10* 互相作用预测

A. Prediction of subcellular localization of lncRNA663; B. Interaction prediction of lncRNA663 and *CLDN10*

图 2 lncRNA663 亚细胞定位预测和与 *CLDN10* 互作预测

Fig. 2 Prediction of subcellular localization of lncRNA 663 and interaction with *CLDN10*



相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

The same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below

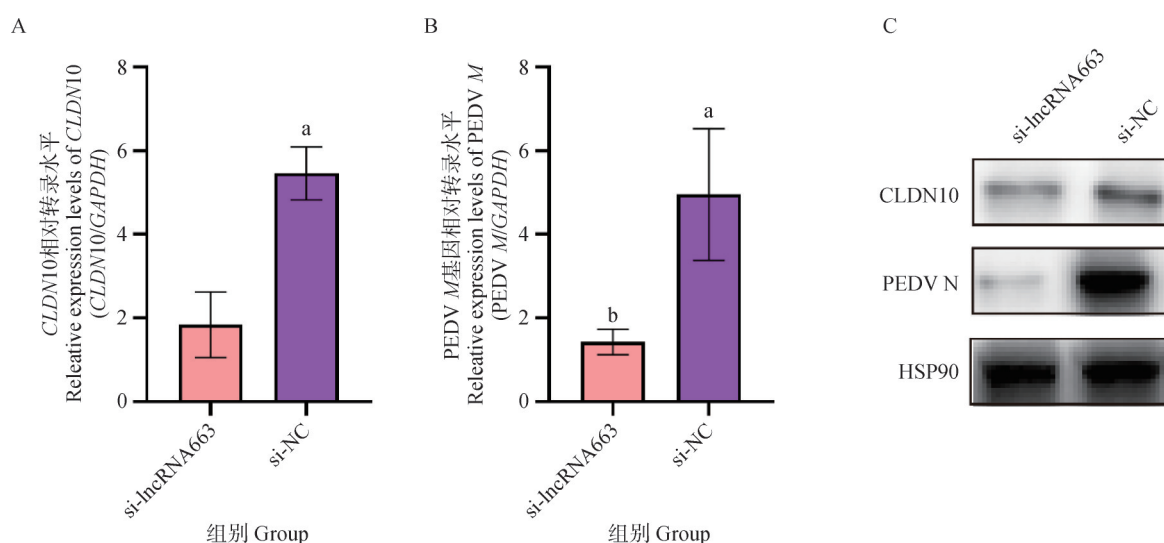
图3 实时荧光定量PCR检测 lncRNA 干扰效率

Fig. 3 Real-time PCR was used to detect lncRNA interference efficiency

2.4 lncRNA663 干扰下调 CLDN10 和 PEDV M 基因表达水平

利用实时荧光定量PCR分别检测在 lncRNA663 干扰后 CLDN10 和 PEDV M 基因转录水平。由结果可知, lncRNA663 干扰后, 与对照组 (NC 组) 相比, CLDN10 的相对转录水平 (图 4A) 和 PEDV M 基因的相对转录水平 (图 4B) 均显著下降 ($P <$

0.05)。Western blot 结果显示 lncRNA663 干扰后 CLDN10 和 PEDV N 蛋白的表达均明显下降, 提示 lncRNA663 可能在 CLDN10 的表达调控中发挥正向调节作用, 同时, PEDV M 基因表达和 N 蛋白表达的同时下降进一步表明, lncRNA663 可能通过调控 CLDN10 的表达间接影响病毒的复制过程。



A. 干扰后 CLDN10 相对转录水平; B. 干扰后 PEDV M 相对转录水平; C. 干扰后 CLDN10 和 PEDV N 蛋白的表达变化

A. Relative transcription levels of CLDN10 after interference; B. Relative transcription levels of PEDV M after interference;

C. Changes in the expression of CLDN10 and PEDV N protein after interference

图4 lncRNA663 干扰对 CLDN10 表达和 PEDV 感染的影响

Fig. 4 The effect of lncRNA663 interference on CLDN10 expression and PEDV infection

究发现 lncRNA 可以通过调控紧密连接相关蛋白抵抗 PEDV 的感染^[23],为了进一步验证其相关性,本研究引入 DSS 处理诱导 IPEC-J2 细胞肠道屏障功能受损模型。结果发现在 DSS 处理条件下, lncRNA663 和 CLDN10 的表达水平均显著下降,提示二者在维持肠道屏障完整性方面可能具有协同作用。该结果间接支持了 lncRNA663 与 CLDN10 在病毒感染过程中存在某种功能联系,并可能共同参与 PEDV 诱导的屏障破坏过程。

为进一步探究 lncRNA663 是否通过 CLDN10 调控 PEDV 感染,本研究首先利用 lncLocator 软件预测了其亚细胞定位情况。结果显示,定位在细胞质中的可能性最大(88.1%),lncRNA 的功能与其在细胞中的定位有着密切联系,根据 Wu 等^[24]研究推测具有一定转录后调控基因功能,作为 miRNA 前体物质,调节靶基因表达;也可能作为蛋白质支架调控基因表达^[25]。因此,本研究利用 RPISeq 对 lncRNA663 和 CLDN10 的互作关系进行了预测。RPISeq 能够仅使用序列衍生信息就可以可靠地预测 RNA-蛋白质相互作用^[26]。本研究利用该软件预测了 lncRNA663 和 CLDN10 存在高度互作(SVM: 0.98, RF: 0.8),并且在 lncRNA 干扰后 CLDN10 的表达和 PEDV 的复制显著下降, Boltana 等^[27]研究发现部分 lncRNA 可以通过调控蛋白,进而来调控病毒复制,由此推测 lncRNA 663 可能通过影响 CLDN10 的表达水平来影响 PEDV 表达。蛋白质结合位点的研究有助于理解蛋白质功能,从分子层面了解疾病的治病机制和药物治疗^[28]。本研究通过 AlphaFold3 初步预测了 PEDV S 和 CLDN10 的氢键结合位点,并通过 ChimeraX 将其可视化,发现共存在 7 个氢键结合位点。这些结合位点可能作为潜在功能位点参与 PEDV 感染过程,可作为后续基因调控机制研究切入点。本研究通过基因互作角度,初步探究了 lncRNA663 和 CLDN10 在 PEDV 感染、复制过程中的相关性,发现 PEDV 可以通过上调 lncRNA 663 促进 CLDN10 表达及自身复制,为今后 PEDV 的致病机理研究提供方向。然而,本研究仍存在一定的局限性。首先,虽然通过 qRT-PCR 和 Western blot 分析了 lncRNA663 和 CLDN10 在 PEDV 感染过程中的表达变化,但对它们的互作关系尚缺乏进一步的试验验证,如 RNA pull-down 或 Co-IP 等方法,这些将在未来的研究中进一步完善。其次, lncRNA663 的全长较长,扩增及表达过

程中存在技术挑战,因此未能在试验中进行完整的功能验证。此外,本研究中的细胞试验主要集中在 IPEC-J2 细胞上,未来应考虑在其他细胞系甚至动物模型中进行验证,以增加结果的广泛性和可靠性。今后将对这些方向进一步探索,以期为 PEDV 防治提供新的思路 and 方向。

4 结 论

本研究初步揭示了 PEDV 感染过程中宿主 lncRNA 663 与 CLDN10 的表达关联及其对病毒复制的调控作用。研究发现, PEDV 感染上调 lncRNA 663 和 CLDN10 的表达, lncRNA663 可能通过提高 CLDN10 的表达,进而促进病毒的感染水平,这是猪冠状病毒利用宿主进行免疫逃逸新的潜在靶点。本研究为阐明 PEDV 致病机制提供了新的分子依据,并为靶向 lncRNA 663 或 CLDN10 的抗病毒研究提供了理论参考和潜在策略。

参考文献(References):

- [1] 王瑞阳. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)膜蛋白互作宿主细胞蛋白的筛选[D]. 上海:上海海洋大学,2019.
WANG R Y. The screening of host cellular proteins interacting with porcine epidemic diarrheavirus M protein [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. (in Chinese)
- [2] ZHANG H, ZOU C, PENG O, et al. Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution, and transmission [J]. *Mol Biol Evol*, 2023, 40(3): msad052.
- [3] XU X, DU L, FAN B, et al. A flagellin-adjuvanted inactivated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine provides enhanced immune protection against PEDV challenge in piglets [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(6): 1299-1309.
- [4] 李程程, 赵永祥, 曹秋霞, 等. 紧密连接蛋白 CLDN4 促进猪流行性腹泻病毒感染[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(6): 2826-2835.
LI C C, ZHAO Y X, CAO Q X, et al. Tight junction protein CLDN4 promotes porcine epidemic diarrhea virus infection [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(6): 2826-2835. (in Chinese)
- [5] 赵学亮, 刘海金, 萧 飒, 等. 长链非编码 RNA——病毒与宿主相互作用中的新型调控因子[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(9): 2059-2067.
ZHAO X L, LIU H J, XIAO S, et al. Analysis of

- differential expression profile of lncRNA in PK15 cells infected with Japanese encephalitis virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(9): 2059-2067. (in Chinese)
- [6] 朱静静,戴政列,汪 涵,等. 乙型脑炎病毒感染 PK15 细胞的 lncRNA 差异表达谱分析[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(1): 272-281.
- ZHU J J, DAI Z L, WANG H, et al. Analysis of differential expression profile of lncRNA in PK15 cells infected with Japanese encephalitis virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(1): 272-281. (in Chinese)
- [7] 杨 荔,杜小妹,刘梦媛,等. 影响猪流行性腹泻病毒复制的关键 lncRNA 筛选及其功能验证[J]. 中国畜牧兽医, 2025, 52(2): 792-800.
- YANG L, DU X M, LIU M Y, et al. Screening and functional verification of key lncRNA affecting porcine epidemic diarrhea virus replication [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2025, 52(2): 792-800. (in Chinese)
- [8] 钦伟云. lncRNA446 介导 Alix 泛素化调控肠道紧密连接蛋白参与 PEDV 感染的分子机制研究[D]. 扬州:扬州大学, 2021.
- QIN W Y. Molecular mechanism of lncRNA446-mediated Alix ubiquitination regulating intestinal tight junction proteins involved in PEDV infection [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021. (in Chinese)
- [9] 燕苗苗,陈佳宁,刘光亮. lncRNA9606 对猪流行性腹泻病毒复制的影响[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(5): 537-544.
- YAN M M, CHEN J N, LIU G L. lncRNA9606 regulates porcine epidemic diarrhea virus replication in LLC-PK1 cells [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2020, 50(5): 537-544. (in Chinese)
- [10] 黄东璋,包文斌,吴正常. 猪 lncRNA LOC102157897 表达、定位及其对 PEDV 复制的调控作用[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2024, 45(05): 82-89.
- HUANG D Z, BAO W B, WU Z C. Expression, localization and its effect of porcine lncRNA LOC102157897 on PEDV replication [J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2024, 45(05): 82-89. (in Chinese)
- [11] 余昕雅. lncRNA 3977.1 和 lncRNA 18850 调控猪流行性腹泻病毒复制的机制研究[D]. 杭州:浙江农林大学, 2024.
- YU X Y. Mechanism of regulated porcine epidemic diarrhea virus replication by lncRNA 3977.1 and lncRNA 18850 [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2024. (in Chinese)
- [12] 余昕雅,何海健,王 磊,等. lncRNA 18850 对猪流行性腹泻病毒复制的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(3): 1366-1375.
- YU X Y, HE H J, WANG L, et al. Effect of lncRNA 18850 on porcine epidemic diarrhea virus replication [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(3): 1366-1375. (in Chinese)
- [13] TSUKITA S, FURUSE M, ITOH M. Multifunctional strands in tight junctions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(4): 285-293.
- [14] BOSSUS M C, MADSEN S S, TIPSMARK C K. Functional dynamics of claudin expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Response to environmental salinity [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2015, 187: 74-85.
- [15] HUANG G W, DING X, CHEN S L, et al. Expression of claudin 10 protein in hepatocellular carcinoma: impact on survival [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(8): 1213-1218.
- [16] 王海珍,李步高,高鹏飞. 哺乳动物肠上皮屏障中非编码 RNAs 的调控作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(12): 1333-1340.
- WANG H Z, LI B G, GAO P F. Regulation of non-coding rnas in the intestinal epithelial barrier in mammal [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 35(12): 1333-1340. (in Chinese)
- [17] 丛 馨,张 艳,俞光岩,等. 上皮细胞间紧密连接功能的研究进展[J]. 生理学报, 2016, 68(4): 492-504.
- CONG X, ZHANG Y, YU G Y, et al. Research progress on the function of epithelial tight junction [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2016, 68(4): 492-504. (in Chinese)
- [18] 杨靖源,蒙 俊,杨 堃. 肠紧密连接蛋白与肠道屏障功能 [J]. 医学综述, 2022, 28(2): 235-239.
- YANG J Y, MENG J, YANG K. Intestinal tight junction protein and intestinal barrier function [J]. *Medical Recapitulate*, 2022, 28(2): 235-239. (in Chinese)
- [19] 王 琦. PEDV 通过 miRNA-328-3p 调控细胞紧密连接的研究[D], 长春:吉林农业大学, 2023.
- WANG Q. A study of PEDV regulating cellular Tight junction through miRNA-328-3p [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [20] DING G, LIU J, SHAO Q, et al. Porcine reproductive

- and respiratory syndrome virus structural protein GP3 regulates claudin 4 to facilitate the early stages of infection[J]. *J Virol*, 2020, 94(20):e00124-20.
- [21] TORRES-FLORES J M, ARIAS C F. Tight junctions go viral! [J]. *Viruses*, 2015, 7(9): 5145-5154.
- [22] KANDA Y, YAMASAKI Y, SHIMURA S, et al. MA026, an anti-hepatitis C virus compound, opens tight junctions of the epithelial cell membrane [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017, 70(5):691-694.
- [23] QIN W, QI X, XIE Y, et al. LncRNA446 regulates tight junctions by inhibiting the ubiquitinated degradation of alix after porcine epidemic diarrhea virus infection [J]. *J Virol*, 2023, 97(3):e0188422.
- [24] WU Z, FAN H, JIN J, et al. Insight into mechanisms of pig lncRNA FUT3-AS1 regulating *E. coli* F18-bacterial diarrhea [J]. *PLoS Pathog*, 2022, 18(6): e1010584.
- [25] DYKES I M, EMANUELI C. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017, 15(3):177-186.
- [26] MUPPIRALA U K, HONAVAR V G, DOBBS D. Predicting RNA-protein interactions using only sequence information[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12:489.
- [27] BOLTAÑA S, VALENZUELA-MIRANDA D, AGUILAR A, et al. Long noncoding RNAs (lncRNAs) dynamics evidence immunomodulation during ISAV-Infected Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22698.
- [28] 张富豪. 基于序列的蛋白质结合位点预测方法研究[D]. 长沙:中南大学, 2023.
- ZHANG F H. Sequence-based predictors for protein binding sites[D]. Changsha: Central South University, 2023. (in Chinese)

(编辑 白永平)