

鲁丹枫, 张振兴, 李占鸿, 等. 基于泛素-蛋白酶体系统的蓝舌病病毒对视黄酸诱导基因 I 信号传导的调控 [J]. 华南农业大学学报, 2025, 46(5): 637-648.
LU Danfeng, ZHANG Zhenxing, LI Zhanhong, et al. Regulation of retinoic acid inducible gene I signal transduction by bluetongue virus through the ubiquitin-proteasome system[J]. Journal of South China Agricultural University, 2025, 46(5): 637-648.

基于泛素-蛋白酶体系统的蓝舌病病毒对视黄酸诱导基因 I 信号传导的调控

鲁丹枫¹, 张振兴², 李占鸿², 朱沛², 李卓然²

(1 昆明学院 医学院, 云南 昆明 650214; 2 云南省畜牧兽医科学院 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室/农业农村部跨境动物疫病防控重点实验室(部省共建), 云南 昆明 650224)

摘要:【目的】视黄酸诱导基因 I (Retinoic acid inducible gene I, RIG-I) 泛素化修饰链上第 48 位赖氨酸 (Lysine, Lys) 残基连接的多泛素链能够调控 RIG-I 蛋白的稳定性, 以防止 RIG-I 信号和宿主抗病毒反应的过度激活。本研究旨在探讨蓝舌病病毒 (Bluetongue virus, BTV) 是否也通过影响 RIG-I 的泛素化修饰调控其信号传导而利于自身增殖。【方法】以 BTV 感染永生化绵羊肺动脉血管内皮 (Sheep pulmonary artery endothelium, SPAE) 细胞, 分别利用蛋白酶体抑制剂 MG-132 和去泛素化酶 (Deubiquitinase, DUB) 抑制剂 PR-619 处理细胞, 通过 RT-qPCR 分别检测环指蛋白 125 (Ring finger protein 125, RNF125)、泛素特异性蛋白酶 4 (Ubiquitin-specific protease 4, USP4)、RIG-I、干扰素调节因子 3 (Interferon regulatory factor 3, IRF3) 和干扰素 α (Interferon α , IFN- α) 的转录水平以及 BTV 基因组拷贝数; 利用免疫印迹 (Western blotting) 和 ELISA 检测以上蛋白的表达水平; 采用免疫荧光 (Immunofluorescence) 检测 IRF3 核转移水平。【结果】BTV 感染上调 RNF125、RIG-I、IRF3 和 IFN- α 的转录和表达水平, 转录水平上调 1.20~8.68 倍, 表达水平上调 0.06~3.94 倍; USP4 的转录水平轻微上调, 但表达水平下调。蛋白酶体抑制剂 MG-132 显著抑制 BTV 诱导的 RIG-I 降解, 并导致 IRF3 细胞核转移率在感染后 24 h (24 hour post-infection, 24 hpi) 和 48 hpi 较未处理对应组别分别上升 9.67 和 8.66 个百分点, IFN- α 表达水平在 48 hpi 上调至未处理对应组别的 2.18 倍, BTV 基因组拷贝数在 24 和 48 hpi 分别降低至未处理对应组别的 74% 和 85%。DUB 抑制剂 PR-619 处理明显促进 RIG-I 降解, IRF3 细胞核转移率在 24 和 48 hpi 较未处理对应组别分别下降 8.00 和 16.67 个百分点, IFN- α 表达水平在 24 hpi 下调至未处理对应组别的 56.50%, BTV 基因组拷贝数在 24 和 48 hpi 分别增加至未处理对应组别的 1.93 和 1.49 倍。【结论】BTV 利用泛素-蛋白酶体系统 (Ubiquitin-proteasome system) 调控宿主 RIG-I 信号传导而利于自身增殖。

关键词: 蓝舌病病毒; 视黄酸诱导基因 I; 泛素化修饰; 蛋白酶体; 降解

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2025)05-0637-12

Regulation of retinoic acid inducible gene I signal transduction by bluetongue virus through the ubiquitin-proteasome system

LU Danfeng¹, ZHANG Zhenxing², LI Zhanhong², ZHU Pei², LI Zhuoran²

(1 School of Medicine, Kunming University, Kunming 650214, China; 2 Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease

收稿日期: 2024-12-31 网络首发时间: 2025-06-12 10:29:47

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20250611.1748.002>

作者简介: 鲁丹枫, 主要从事动物虫媒病毒研究, E-mail: ldf3129554@163.com; 通信作者: 李卓然, 主要从事动物虫媒病毒研究, E-mail: lizhuoran85@126.com

基金项目: 云南省万人计划青年拔尖人才专项 (YNWR-QNBJ-2020-211); 国家自然科学基金 (32360883, 32460889); 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室开放课题 (2024RW002)

Laboratory/Key Laboratory of Transboundary Animal Diseases Prevention and Control (Co-construction by Ministry and Province), Yunnan Animal Science and Veterinary Institute, Kunming 650224, China)

Abstract: 【Objective】 The polyubiquitin chain linked to lysine (Lys) residues at 48th position of ubiquitination modification chain of retinoic acid inducible gene I (RIG-I) regulates RIG-I protein stability to prevent over-activation of RIG-I signaling and host antiviral responses. The aim of the study was to explore whether bluetongue virus (BTV) also regulated RIG-I signaling by affecting ubiquitination modification of RIG-I for its own reproductive benefit. 【Method】 The immortalized sheep pulmonary artery endothelium (SPAEC) cells were infected with BTV, and then were treated with the proteasome inhibitor MG-132 and the deubiquitinase (DUB) inhibitor PR-619, respectively. The transcriptional levels of ring finger protein 125 (RNF125), ubiquitin-specific protease 4 (USP4), RIG-I, interferon regulatory factor 3 (IRF3), and interferon α (IFN- α), along with the genomic copy numbers of BTV were detected using RT-qPCR. The expression levels of proteins mentioned above were detected with Western blotting and ELISA. Immunofluorescence were conducted to analyze the nuclear translocation ratio of IRF3. 【Result】 BTV infection upregulated the transcriptional levels of RNF125, RIG-I, IRF3, and IFN- α from 1.20 to 8.68-fold, and expression levels from 0.06 to 3.94-fold, respectively. The transcriptional level of *USP4* gene slightly increased, but the expression level of USP4 was downregulated. Treatment with the proteasome inhibitor MG-132 significantly suppressed RIG-I degradation induced by BTV infection; The nuclear translocation ratio of IRF3 in MG-132 treated SPAEC cells increased by 9.67 and 8.66 percentage points compared with their untreated counterparts at 24 hours post-infection (24 hpi) and 48 hpi; The expression level of IFN- α increased by 2.18-fold comparing with that of the corresponding untreated group at 48 hpi; The genomic copy numbers of BTV decreased to 74% and 85% of those of the untreated counterparts at 24 and 48 hpi, respectively. DUB inhibitor PR-619 obviously promoted RIG-I degradation; The nuclear translocation ratio of IRF3 in PR-619 treated SPAEC cells decreased by 8.00 and 16.67 percentage points compared with their untreated counterparts at 24 and 48 hpi, respectively; The expression level of IFN- α decreased to 56.50% comparing with that of the corresponding untreated group at 24 hpi; The copy numbers of BTV genome increased to 1.93- and 1.49-fold of the untreated counterparts at 24 and 48 hpi, respectively. 【Conclusion】 BTV utilized the ubiquitin-proteasome system (UPS) to regulate host RIG-I signaling to favor viral propagation.

Key words: Bluetongue virus; Retinoic acid inducible gene I; Ubiquitin modification; Proteasome; Degradation

蓝舌病 (Bluetongue) 是一种由蓝舌病病毒 (Bluetongue virus, BTV) 感染引起的、依赖库蠅属 *Culicoides* spp. 昆虫传播的、主要侵害家养及野生反刍动物的烈性出血性疫病, 临床症状主要表现为广泛的血管损伤导致多组织出血、水肿、弥散性血管内凝血和组织坏死, 其中绵羊较其他反刍动物更易感, 并表现出较高的发病率和死亡率^[1-4]。蓝舌病在经济方面造成的破坏不仅体现在直接导致家畜死亡和生产性能下降, 而且还能够间接阻碍家畜及畜产品贸易^[2, 5-6], 给全球畜牧养殖业带来沉重负担。

BTV 是呼肠孤病毒科 Reoviridae 环状病毒属 *Orbivirus* 的代表性成员, 基因组由 10 条 (Segment-1~10, Seg-1~10) 长短不一的双链 RNA(Double-

stranded RNA) 构成, 并编码 7 个结构蛋白 (VP1~7) 和 5 个非结构蛋白 (NS1~4 和 NS3A)^[7]。视黄酸诱导基因 I(Retinoic acid inducible gene I, RIG-I) 作为一种模式识别受体 (Pattern recognition receptor, PRR), 主要识别双链和单链 RNA(Single-stranded RNA) 病毒之间共同的分子特征, 是机体抵御 RNA 病毒入侵的第一道防线^[8-9]。一旦 RIG-I 被具有特定分子特征的病毒 RNA 所激活, 活化的 RIG-I 信号就能够被传递给下游的跨膜配体线粒体抗病毒信号蛋白 (Mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS), 而 MAVS 则通过招募和激活肿瘤坏死因子- α 相关募集因子 (Tumor necrosis factor- α -associated recruitment factors, TRAFs)、TANK 结合

激酶 1(Tank-binding kinase 1, TBK1) 和抑制性 κ B 激酶复合物 (Inhibitory kappa B kinase complex, IKK) 等信号分子进一步介导和放大活化的 RIG-I 信号, 并将活化信号传递给干扰素调节因子 3 (Interferon regulatory factor 3, IRF3) 和活化 B 细胞的核因子 κ -轻链增强子 (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 等转录因子, 最终促进干扰素 (Interferon, IFN) 和其他炎症细胞因子的产生进而抑制病毒复制^[8-10]。

泛素化修饰 (Ubiquitin modification) 是一种蛋白质翻译后修饰, 在真核生物生物学过程中的方方面面均发挥作用, 泛素化修饰起始于由 76 个氨基酸构成的单泛素分子与底物赖氨酸 (Lysine) 残基的连接。单泛素分子一旦连接到底物上, 就会受到进一步修饰, 例如, 泛素蛋白中的 7 个赖氨酸残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63) 能够继续连接泛素链构成复杂的多泛素链修饰^[11]。而泛素-蛋白酶体系统 (Ubiquitin-proteasome system, UPS) 在 RIG-I 信号传导过程中发挥重要调控作用, 其中, 环指蛋白 125(Ring finger protein 125, RNF125) 作为一种 E3 泛素连接酶, 能够介导 RIG-I 蛋白酶体降解途径所需的 K48 连接的多泛素化, 从而限制 RIG-I 信号的过度激活并维持宿主抗病毒反应的平衡^[8-10]。另有研究报道, 水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 和肠病毒 71(Enterovirus 71, EV71) 均能够通过下调泛素特异性蛋白酶 4(Ubiquitin-specific protease 4, USP4) 的表达, 使 RIG-I 和 TRAF6 上 K48 连接的多泛素链无法被有效去除, 导致上述蛋白发生降解进而拮抗宿主的抗病毒反应^[12-13]。

Du 等^[14] 指出 9 个 UPS 相关的酶在 BTV 感染过程中均发生显著上调; 本研究前期针对 BTV-1 型毒株 (Y863) 感染绵羊胚胎睾丸细胞 (Sheep embryonic testicular cells, OA3.Ts) 的转录组测序结果提示, *RNF125* 的转录水平在感染后 24 h (24 hours post-infection, 24 hpi) 显著上调了 4.34 倍 ($P<0.01$), 而 *USP4* 的转录水平则下调至对照组的 64.41% ($P>0.05$)^[15]。BTV 是否也通过影响 RIG-I 的泛素化修饰而调控其信号的传导仍不得而知。因此, 本研究利用 BTV 感染绵羊肺动脉血管内皮 (Sheep pulmonary artery endothelium, SPAE) 细胞, 并通过 RT-qPCR、免疫印记 (Western blotting)、免疫荧光 (Immunofluorescence) 和 ELISA 等技术检测 RIG-I、RNF125、USP4、IRF3 和 IFN- α 等重要蛋白和基因的表达和转录情况以及病毒基因组拷贝数的变化

情况, 揭示 UPS 在 BTV 复制过程及 RIG-I 信号传导中发挥的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、抑制剂、抗体和试剂盒

永生化 SPAE 细胞委托上海赛百慷生物技术股份有限公司制备; 幼仓鼠肾细胞 (Baby hamster kidney cells, BHK-21) 由云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室保藏。BTV-1 型毒株 (Y863) 于 1979 年分离自云南省师宗县的发病绵羊^[16]。抑制剂 MG-132 和 PR-619 购自 MedChemExpress 公司。RIG-I 兔单克隆抗体 (4200) 购自 Cell Signaling Technology 公司; USP4 兔多克隆抗体 (ab245654) 购自 Abcam 公司; IRF3 兔多克隆抗体 (11312-1-AP)、RNF125 兔多克隆抗体 (13290-1-AP)、Multi-rAb CoraLite Plus 488-Goat Anti-Rabbit Recombinant Secondary Antibody (H+L) 和 Multi-rAb CoraLite Plus 594-Goat Anti-Mouse Recombinant Secondary Antibody (H+L) 购自 Proteintech Group 公司; NS3 小鼠单克隆抗体 (33H7) 购自 Ingenasa 公司; β -actin 小鼠单克隆抗体 (HC201) 购自 TransGen Biotech 公司; 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 购自 Beyotime Biotechnology 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Beyotime Biotechnology 公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TB Green Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) 和 Premix Ex TaqTM (Probe qPCR) 购自 Takara Bio 公司; ClarityTM Western ECL Substrate 购自 Bio-Rad Laboratories 公司; 绵羊 IFN- α 检测试剂盒购自上海将来实业股份有限公司; 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8) 购自大连美仑生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

血管内皮细胞专用培养体系购自上海基斯德啉生物科技有限公司; DMSO 购自 MedChemExpress 公司; RNAiso Plus 购自 Takara Bio 公司; Western 及 IP 细胞裂解液、BeyoColorTM 彩色预染蛋白分子量标准和蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Beyotime Biotechnology 公司; 40 g·L⁻¹ 多聚甲醛固定液、Triton X-100、无蛋白酶牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)、脱脂奶粉和 PBS 缓冲液购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司。NanoDrop ND-100 微量分光光度计购自 NanoDrop 公司; ABI QuantStudio3 实时荧光定量

PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司; 电泳仪购自 Bio-Rad Laboratories 公司; Synergy 多功能微孔板检测系统购自 BioTek 公司; ChemiScope 3300mini 化学发光成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司; DP72 倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司。

1.3 病毒扩增和滴度测定

将 BTV-1 型毒株 (Y863) 接种至单层 BHK-21 细胞, 待出现细胞病变 (Cytopathic effects, CPEs) 后于 4 ℃、8 000 r·min⁻¹ 离心, 收集细胞培养上清液, 0.45 μm 孔径滤膜过滤后分成小份冻存至 -80 ℃ 备用。通过 Spearman-Kärber 法测定扩增的 BTV-1 型毒株 (Y863) 的滴度^[17]。

1.4 细胞增殖及毒性检测

肺动脉血管内皮细胞是 BTV 起始复制的靶细胞之一, 与绵羊感染 BTV 后出现的出血、水肿、弥散性血管内凝血和组织坏死等临床症状密切相关^[3-4]。MG-132 和 PR-619 分别为蛋白酶体抑制剂和广谱去泛素化酶 (Deubiquitinase, DUB) 抑制剂^[18], 利用 CCK-8 试剂盒评价 2 种抑制剂对 SPAE 细胞活力的影响。接种 SPAE 细胞至 96 孔板, 待细胞贴壁后, 弃原培养基, 分别加入 100 μL 含 1% (φ) 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 以及 DMSO 溶解的 MG-132(终浓度分别为 5、10、15、20、25 和 30 μmol·L⁻¹) 或 DMSO 溶解的 PR-619(终浓度分别为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 和 15.0 μmol·L⁻¹) 或等体积 DMSO 的血管内皮细胞专用培养基于 37 ℃ 继续培养 12 h。弃培养上清液, 以 1×PBS 缓冲液清洗细胞 1 次, 再分别加入 100 μL 含 1% (φ)

FBS 和 10% (φ) CCK-8 的培养基于 37 ℃ 孵育 1 h 进行显色, 于 450 nm 处测定吸光度 (Absorbance)。未接种 SPAE 细胞且未加抑制剂组为空白对照, 吸光度计为 A_b ; 接种 SPAE 细胞且加入同等体积 DMSO 组为阴性对照, 吸光度计为 A_c ; 接种 SPAE 细胞并加入抑制剂组为处理组, 吸光度计为 A_s 。细胞存活率= $[(A_s-A_b)/(A_c-A_b)]\times 100\%$ 。

1.5 利用 BTV 感染和处理细胞

利用感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 1 的 BTV-1 型毒株 (Y863) 感染 SPAE 细胞, 于 37 ℃ 孵育 1 h 后弃上清液, 重新加入含 1% (φ) FBS 的血管内皮细胞专用培养基继续培养 24 和 48 h。根据“1.4”的试验结果, 在感染的最后 12 h 分别加入终浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的 MG-132 或 5.0 μmol·L⁻¹ 的 PR-619 或等体积的 DMSO 处理细胞 12 h。

1.6 利用 RT-qPCR 检测宿主基因表达水平

以 RNAiso Plus 分别提取各组 SPAE 细胞总 RNA, 利用 NanoDrop ND-100 微量分光光度计测定提取的总 RNA 的浓度和纯度。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书分别反转录各组 SPAE 细胞的总 RNA。利用 TB Green Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 和特异性引物 (表 1) 通过 RT-qPCR 检测 *RIG-I*、*USP4*、*RNF125*、*IRF3* 和 *IFN-α* 的表达水平, 以 *18S* 为内参基因, 使用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量^[19]。以未感染 BTV 且未经抑制剂处理的 SPAE 细胞组 (Cr) 各基因的表达水平为标准对相应组别基因的表达水平进行均一化处理。

表 1 RT-qPCR 使用的引物
Table 1 The primers used for RT-qPCR

基因名称 Gene name	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence	参考文献或序列 Reference or sequence
<i>RIG-I</i>	GCCTTAAAGAACTGGATTGA	ATACCCATTGTCTGATTGTGT	[20]
<i>USP4</i>	CGACATAAATTCCTTGCCAC	CGTGCTTCTCATACGTCTCAG	XM_004018463
<i>RNF125</i>	TGCCGTTCTTGATCGCTA	CACCTTGCTGTTGTCTCTCCA	XM_027960741
<i>IRF3</i>	GAGGACCACAGCAAGGACTC	TGTCTGCCATTGTCTTGAGC	[21]
<i>IFN-α</i>	GCACTGGATCAGCAGCTCACTG	CTCAAGACTTCTGCTCTGACAACCT	[22]
<i>18S</i>	GATCCATTGGAGGGCAAGTCT	GCAGCAACTTTAATATACGCTATTGG	[23]

1.7 利用 RT-qPCR 检测病毒基因组拷贝数

按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书反转录各组 SPAE 细胞总 RNA, 利用 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 以及 NS3 基因特异性引物 (正向序列: TGGAYAAAGCGATGTCAAA, 反向序列: ACATCATCACGAAACGCTTC) 和探针

(FAM-ARGCTGCATTTCGCATCGTACGC-BHQ)^[24] 检测各组 SPAE 细胞 BTV 基因组拷贝数。

1.8 利用免疫印迹检测蛋白表达水平

收集各组 SPAE 细胞, 以含 1×蛋白酶抑制剂 Cocktail 的 Western 及 IP 细胞裂解液于 4 ℃ 裂解 30 min, 于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集上

清液, 利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白样品浓度, 每份样品取 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳。将 SDS-PAGE 凝胶中的蛋白转印至 PVDF 膜上, 使用含 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉的封闭液于室温封闭 1 h; 加入相应的特异性抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 或 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 于室温孵育 1 h; 经 Clarity™ Western ECL Substrate 显色后在 ChemiScope 3300mini 化学发光成像系统中曝光, 以 Image J 软件分析各蛋白的表达情况。蛋白表达的相对丰度分别以 RNF125/ β -actin、USP4/ β -actin、RIG-I/ β -actin 和 IRF3/ β -actin 进行展示, 并以未感染 BTV 且未经抑制剂处理的 SPAE 细胞组 (Cr) 各蛋白的表达水平为标准对相应组别蛋白的表达水平进行均一化处理。

1.9 利用免疫荧光检测 IRF3 核转移水平

以预冷的 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤各组 SPAE 细胞 3 次, 随后经 40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定液于室温固定 20 min, 以含 0.5% (φ) Triton X-100 的 1 $\times$ PBS 缓冲液于室温通透 10 min, 再加入含 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 的 1 $\times$ PBS 缓冲液于室温封闭 1 h。以 IRF3 和 NS3 为一抗于室温共同孵育 1 h, 采用预冷的 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤各组 SPAE 细胞 3 次, 以 Multi-rAb CoraLite Plus 488-Goat Anti-Rabbit Recombinant Secondary Antibody (H+L) 和 Multi-rAb CoraLite Plus 594-Goat Anti-Mouse Recombinant Secondary Antibody (H+L) 为二抗于室温共同孵育 1 h。于相差显微镜下观察并拍照, 随机选取 100 个染色细胞统计 IRF3 的核转移率。

1.10 利用 ELISA 检测 IFN- α 质量浓度

收集各组 SPAE 细胞培养上清液, 于 3 681 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 分别取 50 μL 标准品溶液和上清

液至预先包被捕获抗体的包被微孔中, 加入 100 μL HRP 标记的检测抗体于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 弃检测抗体并洗涤 5 次后, 加入 100 μL HRP 底物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min, 随后加入 50 μL 终止液, 于 450 nm 波长下测定吸光度, 根据标准曲线计算样品浓度。

1.11 数据分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差形式表示, 至少进行 3 次独立重复试验。以 GraphPad Prism 7.0 软件中的 t 检验进行统计分析。

2 结果与分析

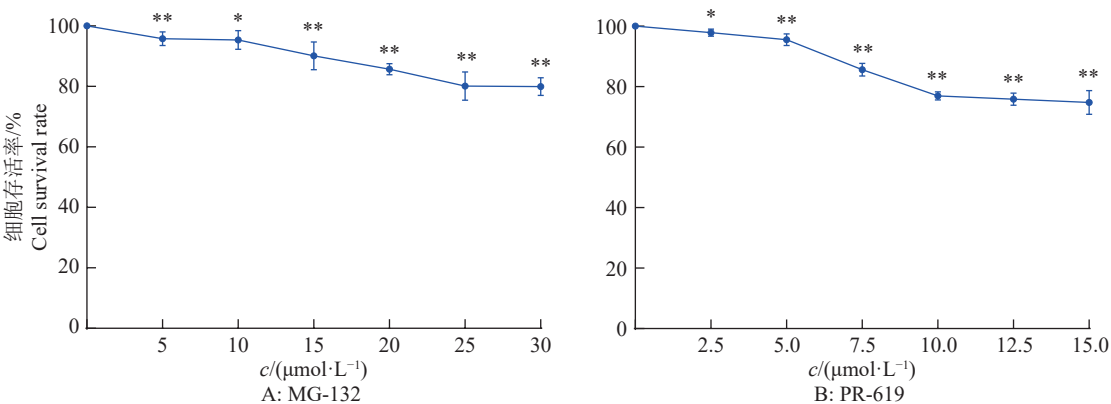
2.1 抑制剂 MG-132 和 PR-619 对 SPAE 细胞增殖及毒性的影响

与 DMSO 处理组相比, 利用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MG-132 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PR-619 处理 12 h 对 SPAE 细胞增殖及毒性的影响较小, 细胞存活率分别为 95.35% 和 95.50%, 其余较高处理浓度下细胞存活率均低于 95%(图 1), 因此分别选择 10 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 MG-132 和 PR-619 处理 SPAE 细胞的终浓度。

2.2 抑制剂对 BTV 感染 SPAE 细胞基因转录水平的影响

与未感染 BTV 且未经抑制剂处理的 Cr 组相比, 未经抑制剂处理的感染 BTV 组 *RNF125*、*USP4*、*RIG-I* 和 *IRF3* 4 个基因在 24 hpi 分别上调 1.20、0.25、5.95 和 2.13 倍以及在 48 hpi 分别上调 1.68、0.07、8.68 和 2.35 倍(图 2)。

与 MG-132 处理的未感染 BTV 组 (MG-132) 相比, MG-132 处理的感染 BTV 组 *RNF125* 和 *RIG-I* 的转录水平在 24 hpi 分别显著上调 1.46 和 38.18 倍以及在 48 hpi 分别显著上调 2.86 和 15.90 倍; 而 *USP4* 和 *IRF3* 的转录水平在 24 hpi 下



*和**分别表示细胞存活率在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平显著降低 (t 检验)。
* and ** indicate that the cell survival rates significantly decreased at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively (t test).

图 1 抑制剂 MG-132 和 PR-619 对 SPAE 细胞存活率的影响
Fig. 1 Effects of inhibitors MG-132 and PR-619 on survival rates of SPAE cells

调 1% 和 15% 以及在 48 hpi 显著下调 35% 和 27%。未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [MG-132、(BTV+MG-132) 24 hpi 和 (BTV+MG-132) 48 hpi] 对应组别相比, MG-132 处理的感染组 *RNF125* 转录水平在 48 hpi 显著升高 1.02 倍; *RIG-I* 在 24 hpi 显著升高 4.76 倍; *IRF3* 在 24 和 48 hpi 分别显著下降 74% 和 79% (图 2A~2D)。

与 PR-619 处理的未感染 BTV 组 (PR-619) 相比, PR-619 处理的感染 BTV 组 *RNF125*、*RIG-I* 和

IRF3 的转录水平在 24 hpi 分别上调 1.07、5.10 和 0.11 倍以及在 48 hpi 分别上调 1.50、11.06 和 0.26 倍; *USP4* 在 24 hpi 显著上调 0.13 倍, 而在 48 hpi 下调 10%。未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [PR-619、(BTV+PR-619) 24 hpi 和 (BTV+PR-619) 48 hpi] 对应组别相比, PR-619 处理的未感染组 *USP4* 转录水平显著上升 0.27 倍; PR-619 处理的感染组 *RNF125* 转录水平在 24 和 48 hpi 分别显著上升 0.34 和 0.33 倍, *IRF3* 在 24 和 48 hpi 分别显著下调 56% 和 54% (图 2E~2H)。

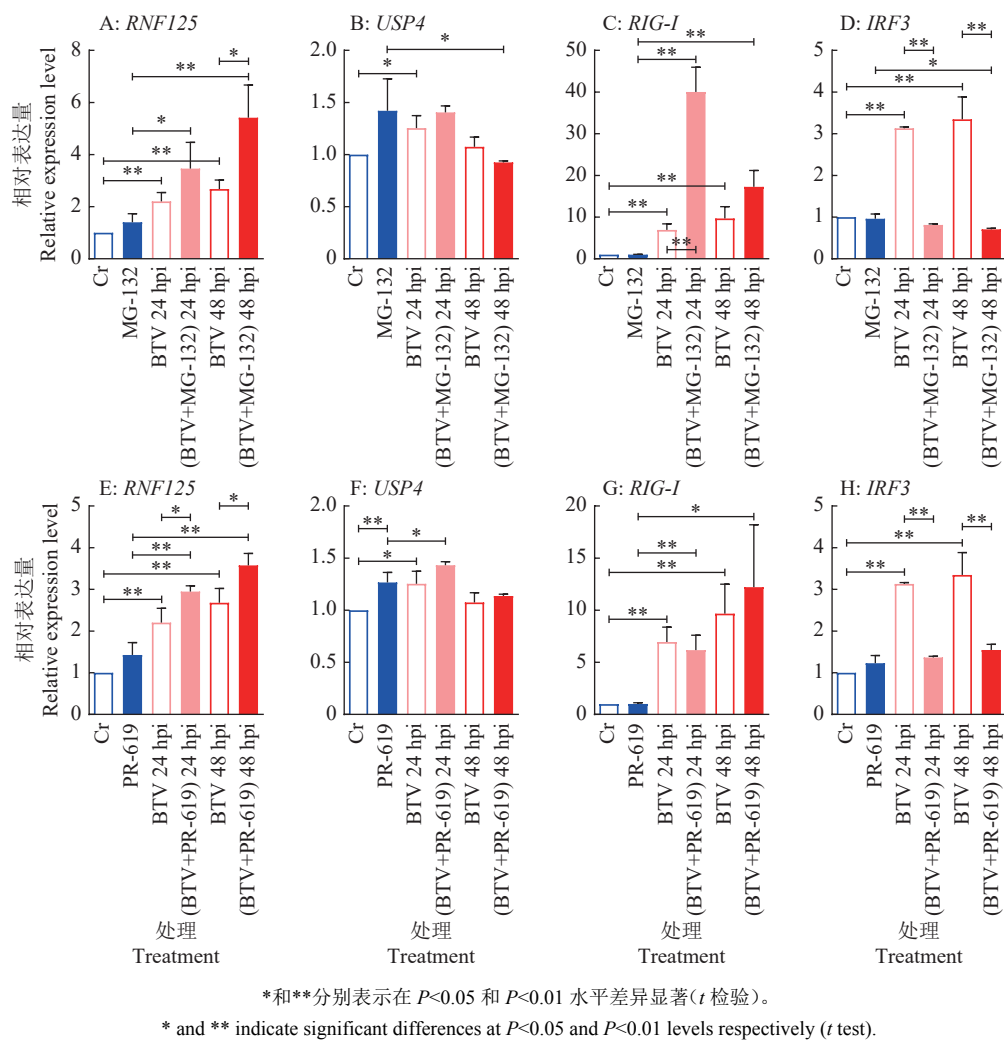


图 2 抑制剂 MG-132(A~D) 和 PR-619(E~H) 对 BTV 感染 SPAE 细胞基因转录水平的影响
Fig. 2 Effects of inhibitors MG-132 (A~D) and PR-619 (E~H) on gene transcriptional levels of BTV-infected SPAE cells

2.3 抑制剂对 BTV 感染 SPAE 细胞蛋白表达水平的影响

通过 Western blotting 分别检测各组 *RNF125*、*USP4*、*RIG-I* 和 *IRF3* 的表达, 结果如图 3 所示。

与 Cr 组相比, 未经 MG-132 处理的感染 BTV 组 *RNF125* 和 *IRF3* 表达水平在 24 hpi 分别上调 0.06 和 0.28 倍以及在 48 hpi 分别上调 0.16 和

1.01 倍; *RIG-I* 表达水平在 24 和 48 hpi 也显著上调; 而 *USP4* 表达水平在 24 和 48 hpi 均下调 1% (图 4A~4D)。与 MG-132 处理的未感染 BTV 组 (MG-132) 相比, MG-132 处理的感染组 *RNF125* 和 *IRF3* 表达水平在 24 hpi 分别上调 0.02 和 0.15 倍以及在 48 hpi 分别上调 0.19 和 1.22 倍; *RIG-I* 表达水平在 24 和 48 hpi 也显著上调; *USP4* 的表达水平在

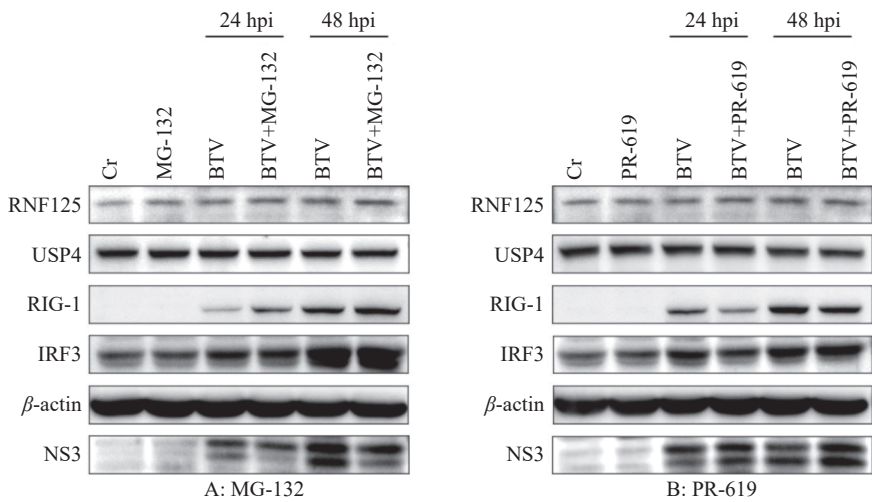
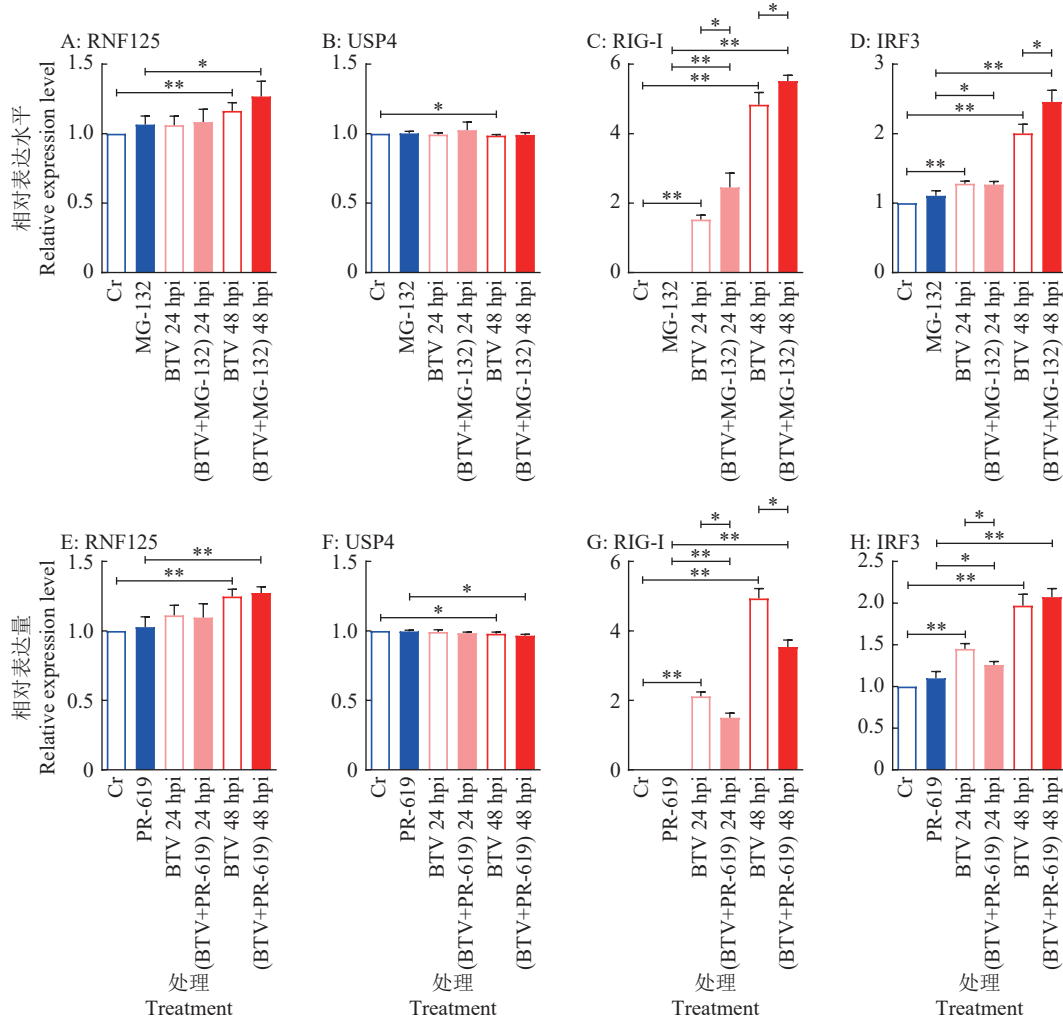


图 3 利用 Western blotting 检测抑制剂处理 BTV 感染 SPAE 细胞的蛋白表达水平

Fig. 3 Detection of protein expression levels in BTV-infected SPAE cells treated with inhibitors by Western blotting



*和**分别表示在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著 (t 检验)。
* and ** indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively (t test).

图 4 抑制剂 MG-132(A~D) 和 PR-619(E~H) 对 BTV 感染 SPAE 细胞蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effects of inhibitors MG-132 (A~D) and PR-619 (E~H) on protein expression levels of BTV-infected SPAE cells

24 hpi 上调 0.02 倍, 而在 48 hpi 下调 1% (图 4A~4D)。与经抑制剂处理组 [MG-132、(BTV+MG-132) 24 hpi 和 (BTV+MG-132) 48 hpi] 对应组别相比, MG-

132 处理组 RIG-I 表达水平在 24 和 48 hpi 显著上升 0.61 和 0.14 倍; IRF3 在 48 hpi 显著上调 0.22 倍 (图 4A~4D)。

与 Cr 组相比, 未经 PR-619 处理的感染 BTV 组 RNF125 和 IRF3 表达水平在 24 hpi 分别上调 0.11 和 0.45 倍以及在 48 hpi 分别上调 0.25 和 0.97 倍; RIG-I 表达水平在 24 和 48 hpi 也显著上调; 而 USP4 表达水平在 24 和 48 hpi 则均下调 1% 和 2% (图 4E~4H)。与 PR-619 处理未感染组 (PR-619) 相比, PR-619 处理的感染组 RNF125 和 IRF3 表达水平在 24 hpi 分别上调 0.07 和 0.15 倍以及在 48 hpi 分别上调 0.24 和 0.89 倍; RIG-I 表达水

平在 24 和 48 hpi 也显著上调; 而 USP4 在 24 和 48 hpi 分别下调 1% 和 3% (图 4E~4H)。未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [PR-619、(BTV+PR-619) 24 hpi 和 (BTV+PR-619) 48 hpi] 对应组别相比, PR-619 处理组 RIG-I 表达水平在 24 和 48 hpi 显著下调 29% 和 28%; IRF3 在 24 hpi 显著下调 13% (图 4E~4H)。

2.4 抑制剂对 BTV 感染 SPAE 细胞 IRF3 核转移水平的影响

通过免疫荧光分别检测各组 SPAE 细胞 IRF3 核转移情况, 结果如图 5 所示。

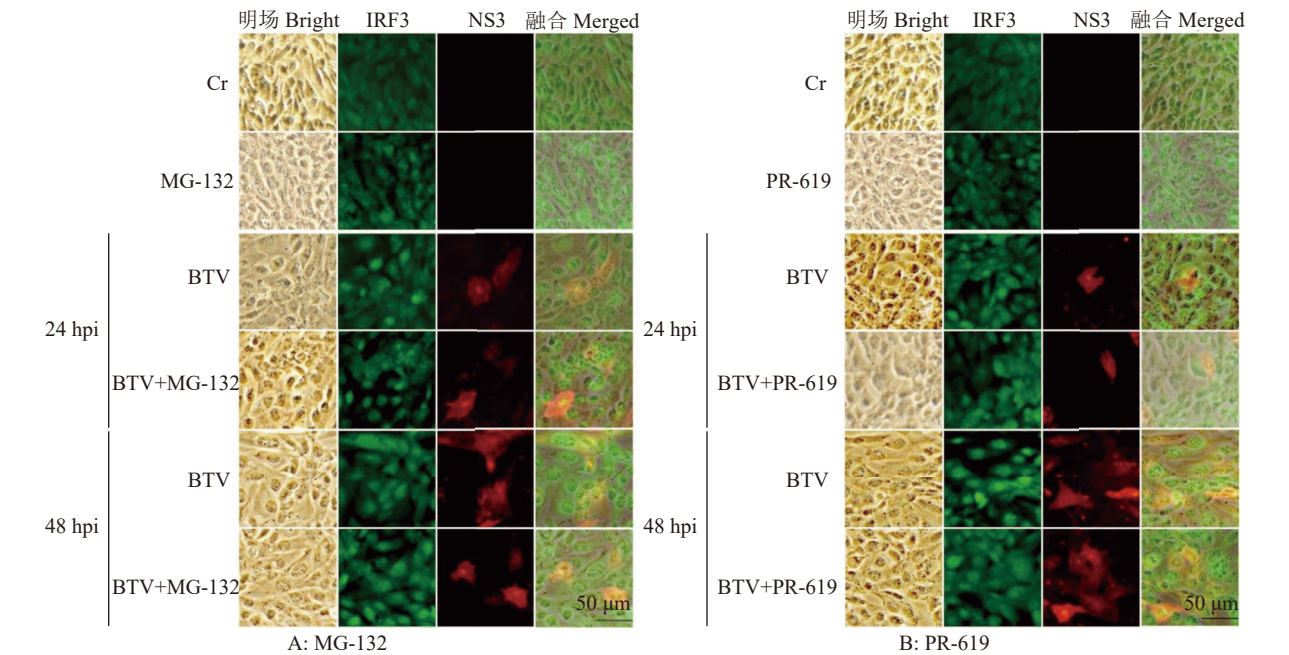


图 5 利用免疫荧光检测抑制剂处理 BTV 感染 SPAE 细胞的 IRF3 核转移水平
Fig. 5 Detection of IRF3 nuclear translocation level in BTV-infected SPAE cells treated with inhibitors by immunofluorescence

对各组 SPAE 细胞中 IRF3 的核转移水平进行统计分析, 与未经抑制剂处理且未感染 BTV 的 SPAE 细胞组 (Cr) 的 IRF3 核转移率 (3.33%) 相比, 未经抑制剂处理的 BTV 感染组 IRF3 核转移率在 24 和 48 hpi 分别显著上升至 23.00% 和 73.67% (图 6)。

与 MG-132 处理的未感染 BTV 组 (MG-132) IRF3 核转移率 (5.33%) 相比, MG-132 处理的感染组 IRF3 核转移率在 24 和 48 hpi 分别显著上升至 32.67% 和 82.33%(图 6A)。未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [MG-132、(BTV+MG-132) 24 hpi 和 (BTV+MG-132) 48 hpi] 对应组别相比, MG-132 处理组 IRF3 核转移水平在 24 和 48 hpi 显著高于未经抑制剂处

理组 (图 6A)。

与 PR-619 处理的未感染 BTV 组 (PR-619) IRF3 核转移率 (4.67%) 相比, PR-619 处理的感染 BTV 组 IRF3 核转移率在 24 和 48 hpi 分别显著上升至 15.00% 和 57.00%。未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [PR-619、(BTV+PR-619) 24 hpi 和 (BTV+PR-619) 48 hpi] 对应组别相比, PR-619 处理组 IRF3 核转移水平在 24 和 48 hpi 显著低于未经抑制剂处理组 (图 6B)。

2.5 抑制剂对 BTV 感染 SPAE 细胞 IFN-α 基因转录和 IFN-α 表达水平的影响

通过 RT-qPCR 和 ELISA 分别检测各组 SPAE 细胞 IFN-α 转录和 IFN-α 蛋白表达水平, 与 Cr 组相比, 未经抑制剂处理感染组 IFN-α 转录水平在

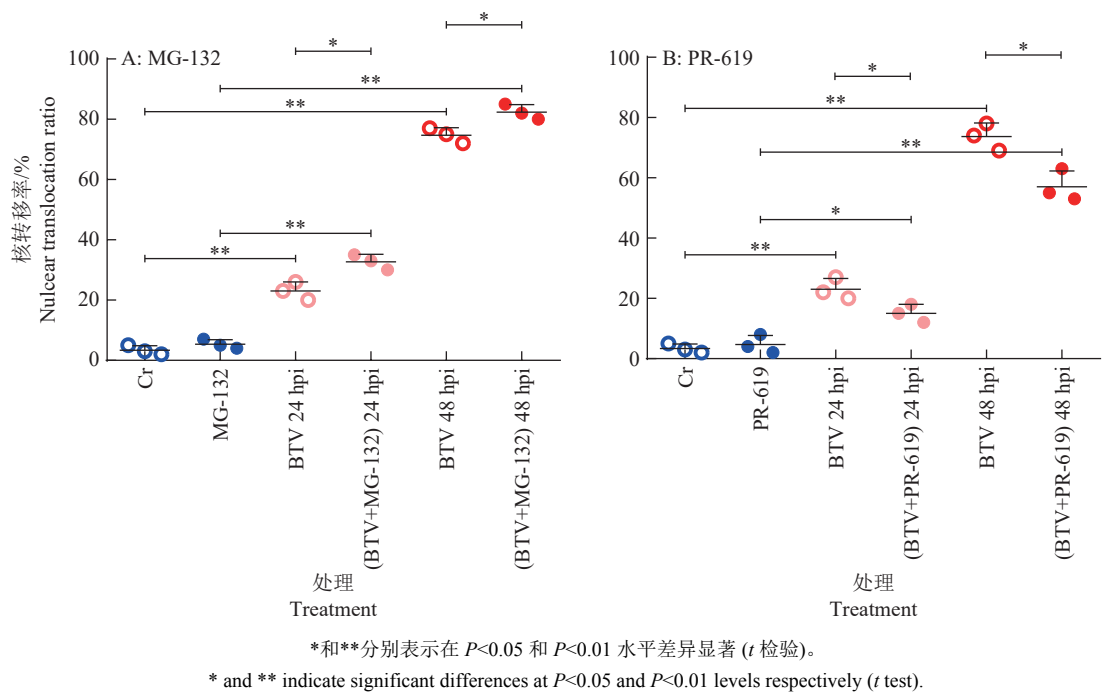


图 6 抑制剂处理 BTV 感染 SPAE 细胞 IRF3 核转移水平的变化
Fig. 6 Changes of IRF3 nuclear translocation ratio in BTV-infected SPAE cells treated with inhibitors

24 和 48 hpi 分别上调 5.07 和 1.28 倍 (图 7)。

与 MG-132 处理的未感染 BTV 组 (MG-132) 相比, MG-132 处理的感染 BTV 组 *IFN-α* 转录水平在 24 和 48 hpi 分别上调 2.10 和 9.60 倍; 未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [(MG-132、(BTV+MG-132) 24 hpi 和 (BTV+MG-132) 48 hpi] 对应组别相比, MG-132 处理组 *IFN-α* 转录水平在 48 hpi 显著上调 3.53 倍 (图 7A)。

与 PR-619 处理的未感染 BTV 组 (PR-619) 相比, PR-619 处理的感染组 *IFN-α* 转录水平在 24 和 48 hpi 分别上调 1.41 和 1.30 倍 (图 7C)。

与 Cr 组 *IFN-α* 质量浓度 ($61.00 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 相比, 未经抑制剂处理的 BTV 感染组 *IFN-α* 质量浓度在 24 和 48 hpi 分别显著上升至 184.17 和 $91.61 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 7)。

与 MG-132 组 *IFN-α* 质量浓度 ($61.94 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 相比, MG-132 处理的感染 BTV 组 *IFN-α* 质量浓度在 24 和 48 hpi 分别显著上升至 120.89 和 $200.06 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [MG-132、(BTV+MG-132) 24 hpi 和 (BTV+MG-132) 48 hpi] 对应组别相比, MG-132 处理组 *IFN-α* 质量浓度在 24 hpi 显著低于未经抑制剂处理组, 而在 48 hpi 则显著高于未经抑制剂处理组 (图 7B)。

与 PR-619 组 *IFN-α* 质量浓度 ($61.89 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 相比, PR-619 处理的感染组 *IFN-α* 质量浓度在 24

和 48 hpi 分别显著上升至 104.06 和 $91.28 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 未经抑制剂处理组 (Cr、BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经抑制剂处理组 [PR-619、(BTV+PR-619) 24 hpi 和 (BTV+PR-619) 48 hpi] 对应组别相比, PR-619 处理组 *IFN-α* 质量浓度在 24 hpi 显著低于未处理组 (图 7D)。

2.6 抑制剂对 BTV 感染 SPAE 细胞病毒基因组拷贝数的影响

利用 RT-qPCR 分别检测各组 SPAE 细胞内 BTV 基因组拷贝数, 未经抑制剂处理的感染组病毒基因组拷贝数在 24 和 48 hpi 分别为 7.68×10^6 和 $1.04 \times 10^7 \mu\text{L}^{-1}$ (图 8)。

MG-132 处理的感染组病毒基因组拷贝数在 24 和 48 hpi 分别为 5.64×10^6 和 $8.89 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$; 未经抑制剂处理感染组 (BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经 MG-132 处理的感染组 [(BTV+MG-132) 24 hpi 和 (BTV+MG-132) 48 hpi] 对应组别相比, MG-132 处理分别导致 BTV 基因组拷贝数显著下降 26% 和 15% (图 8A)。

PR-619 处理的感染组病毒基因组拷贝数在 24 和 48 hpi 分别为 1.48×10^7 和 $1.55 \times 10^7 \mu\text{L}^{-1}$, 未经抑制剂处理的感染组 (BTV 24 hpi 和 BTV 48 hpi) 与经 PR-619 处理的感染组 [(BTV + PR-619) 24 hpi 和 (BTV + PR-619) 48 hpi] 对应组别相比, 无论是 24 hpi 还是 48 hpi, PR-619 处理分别导致 BTV 基因组拷贝数显著升高 0.93 和 0.49 倍 (图 8B)。

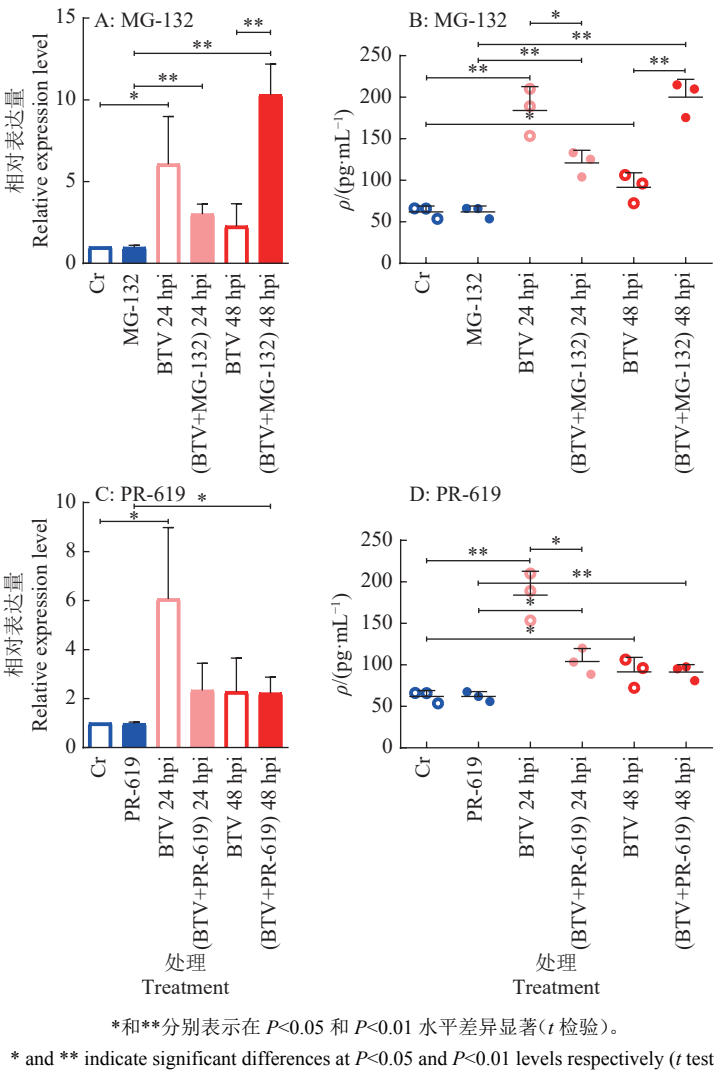


图 7 抑制剂处理 BTV 感染 SPAE 细胞 *IFN-α* 基因转录水平 (A、C) 和 *IFN-α* 蛋白表达水平 (B、D) 变化

Fig. 7 Changes in *IFN-α* gene transcriptional levels (A, C) and *IFN-α* protein expression levels (B, D) in BTV-infected SPAE cells treated with inhibitors

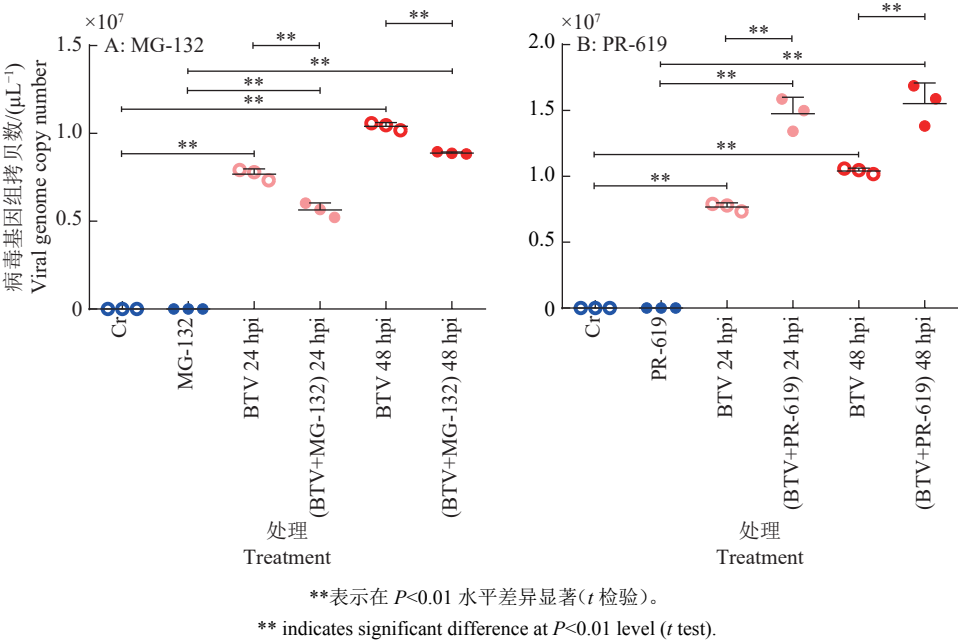


图 8 抑制剂处理 BTV 感染 SPAE 细胞 BTV 基因组拷贝数变化

Fig. 8 Changes in BTV genome copy numbers of BTV-infected SPAE cells treated with inhibitors

3 讨论与结论

通过“劫持”宿主 UPS 进行免疫逃逸而利于自身增殖已经成为多种病毒的“惯用手段”^[25-26], 然而关于 BTV 与宿主 UPS 间作用关系的研究却相对较少; 因此, 本研究利用蛋白酶体抑制剂 MG-132 和 DUB 抑制剂 PR-619 处理被 BTV 感染的 SPAE 细胞, 并通过 RT-qPCR、免疫印迹、免疫荧光和 ELISA 等方法证实 BTV 利用 UPS 调控宿主 RIG-I 信号传导从而利于自身增殖。

随着 BTV 感染进程的推进, *RNF125*、*RIG-I* 和 *IRF3* 转录水平在 24 和 48 hpi 呈现逐渐增长的趋势, 而 *USP4* 和 *IFN-α* 则呈现先上升后下降的趋势, 其中 *RNF125* 和 *RIG-I* 的转录水平变化与前期转录组测序结果^[15]吻合。*RNF125*、*RIG-I*、*IRF3* 和 *IFN-α* 表达水平变化趋势与其编码基因的转录水平变化趋势相似, 而 *USP4* 表达水平则持续下降, 推测 BTV 可能通过上调 *RNF125* 转录和表达水平以及下调 *USP4* 表达水平来调控 *RIG-I* 的稳定性并抑制宿主的抗病毒反应而有利于自身增殖。研究表明 VSV 和 EV71 均能够在感染 24 h 内显著下调 *USP4* 表达水平至对照组的 30% 左右^[12-13], 而 BTV 则仅能在 48 hpi 微弱地下调 *USP4* 的表达, 说明 BTV 可能不仅通过下调 *DUB* 的表达水平来抑制 *RIG-I* 信号的传导, 例如同属呼肠孤病毒科的轮状病毒 (Rotavirus) 的非结构蛋白 NSP1 可以发挥 E3 泛素连接酶的作用, 并介导宿主蛋白发生泛素-蛋白酶体途径降解^[27]。

MG-132 处理使 *RIG-I* 在 24 和 48 hpi 免于被蛋白酶体降解, 同时 *IRF3* 核转移水平以及表达水平的上调幅度在 48 hpi 均高于未处理组, 加之 *IFN-α* 表达水平在 48 hpi 也显著高于未处理组, 宿主 *RIG-I* 信号传导逐级加强, 最终使 BTV 基因组拷贝数显著降低。此外, 轮状病毒复制有赖于宿主 UPS 的充分激活, MG-132 处理也能大幅度降低轮状病毒的产量^[28], 说明 BTV 在复制过程中同样需要 UPS 系统的充分参与。

PR-619 处理不仅在 24 和 48 hpi 显著下调 *RIG-I* 表达水平, 而且导致 *IRF3* 表达水平在 24 hpi 显著低于未经抑制剂处理组, 同时 *IRF3* 核转移水平和 *IFN-α* 表达水平在 24 hpi 也显著低于未处理组, 宿主 *RIG-I* 信号传导被层层削弱; 而且 *IRF3* 乃至其上游的多个关键蛋白分子的稳定性同样受到 K48 泛素化修饰的调控, PR-619 作为一种广谱 DUB 抑制剂可能也会导致上述蛋白丧失稳定

性^[18, 25-26, 29], 最终使 BTV 基因组拷贝数显著增加。

MG-132 处理导致转录因子转录水平或表达水平发生改变, 例如 CCAAT/增强子结合蛋白 β (CCAAT/enhancer binding protein β, C/EBPβ) 和核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)^[30-31], 因此, 作为一种转录因子, *IRF3* 转录水平在 MG-132 处理后发生下调也并不令人意外。

Du 等^[14] 研究指出 HERC-6、UBE2N、ISG15、VPRBP、OTUB1、NUB1、RANBP2、PSMD5 和 PSME2 这 9 个 UPS 系统相关酶的表达在 24 hpi 显著上调, 而 *RNF125* 并不在其中, 说明 BTV 可能还通过“劫持”UPS 系统调控其他宿主蛋白的稳定性和抗病毒信号的传导。

综上所述, BTV 利用宿主 UPS 系统降低 *RIG-I* 的稳定性并抑制其信号的传导而利于自身增殖。本研究推测 BTV 同样通过 UPS 调控其他宿主蛋白的稳定性以保证其入侵宿主、复制和扩散等重要生命周期活动的完成, 但需要进一步试验加以佐证。

参考文献:

[1] ALKHAMIS M A, AGUILAR-VEGA C, FOUNTAIN-JONES N M, et al. Global emergence and evolutionary dynamics of bluetongue virus[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21677. doi: 10.1038/s41598-020-78673-9.

[2] GONG Q L, WANG Q, YANG X Y, et al. Seroprevalence and risk factors of the bluetongue virus in cattle in China from 1988 to 2019: A comprehensive literature review and meta-analysis[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 7: 550381. doi: 10.3389/fvets.2020.550381.

[3] MCLAUGHLIN B E, DEMAULA C D, WILSON W C, et al. Replication of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus in pulmonary artery endothelial cells obtained from cattle, sheep, and deer[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2003, 64(7): 860-865.

[4] DEMAULA C D, JUTILA M A, WILSON D W, et al. Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells[J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(Pt 4): 787-794.

[5] NIEDEBALSKI W. Bluetongue virus in Europe: The current epidemiological situation[J]. *Medycyna Weterynaryjna*, 2022, 78(3). doi: 10.21521/mw.6619.

[6] GOLENDER N, ELDAR A, EHRLICH M, et al. Genomic analysis illustrated a single introduction and evolution of Israeli bluetongue serotype 8 virus population 2008–2019[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1955. doi: 10.3390/microorganisms9091955.

[7] RATINIER M, CAPORALE M, GOLDBERGER M, et al. Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus[J]. *PLoS Pathogens*,

- 2011, 7(12): e1002477.
- [8] ARIMOTO K, TAKAHASHI H, HISHIKI T, et al. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(18): 7500-7505.
- [9] THORESEN D, WANG W, GALLS D, et al. The molecular mechanism of RIG-I activation and signaling[J]. *Immunological Reviews*, 2021, 304(1): 154-168.
- [10] ROJAS J M, AVIA M, MARTÍN V, et al. Inhibition of the IFN response by bluetongue virus: The story so far[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 692069. doi: 10.3389/fmicb.2021.692069.
- [11] SWATEK K N, KOMANDER D. Ubiquitin modifications[J]. *Cell Research*, 2016, 26(4): 399-422.
- [12] WANG L, ZHAO W, ZHANG M, et al. USP4 positively regulates RIG-I-mediated antiviral response through deubiquitination and stabilization of RIG-I[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(8): 4507-4515.
- [13] XU C, PENG Y, ZHANG Q, et al. USP4 positively regulates RLR-induced NF- κ B activation by targeting TRAF6 for K48-linked deubiquitination and inhibits enterovirus 71 replication[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13418. doi: 10.1038/s41598-018-31734-6.
- [14] DU J, XING S, TIAN Z, et al. Proteomic analysis of sheep primary testicular cells infected with bluetongue virus[J]. *PROTEOMICS*, 2016, 16(10): 1499-1514.
- [15] LU D F, LI Z Y, ZHU P, et al. Whole-transcriptome analyses of sheep embryonic testicular cells infected with the bluetongue virus[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1053059. doi: 10.3389/fimmu.2022.1053059.
- [16] ZHU J, YANG H, LI H, et al. Full-genome sequence of bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) strain Y863, the first BTV-1 isolate of eastern origin found in China[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(4): e00403-13.
- [17] RAMAKRISHNAN M A. Determination of 50% end-point titer using a simple formula[J]. *World Journal of Virology*, 2016, 5(2): 85-86.
- [18] LI W T, JIN X, SONG S J, et al. Blocking SLC7A11 attenuates the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Animal Cells and Systems*, 2024, 28(1): 237-250.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. 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.
- [20] SASSU E L, KANGETHE R T, SETTYPALLI T B K, et al. Development and evaluation of a real-time PCR panel for the detection of 20 immune markers in cattle and sheep[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2020, 227: 110092. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.
- [21] WANI S A, SAHU A R, SAXENA S, et al. Expression kinetics of *ISG15*, *IRF3*, *IFN γ* , *IL10*, *IL2* and *IL4* genes vis-a-vis virus shedding, tissue tropism and antibody dynamics in PPRV vaccinated, challenged, infected sheep and goats[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 117: 206-218.
- [22] LI H, CUNHA C W, DAVIES C J, et al. Ovine herpesvirus 2 replicates initially in the lung of experimentally infected sheep[J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(Pt 7): 1699-1708.
- [23] ZARATE M A, WESOŁOWSKI S R, NGUYEN L M, et al. *In utero* inflammatory challenge induces an early activation of the hepatic innate immune response in late gestation fetal sheep[J]. *Innate Immunity*, 2020, 26(7): 549-564.
- [24] 杨振兴, 朱建波, 李占鸿, 等. 蓝舌病病毒和流行性出血病病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(9): 1104-1111.
- [25] CHIANG C, LIU G, GACK M U. Viral evasion of RIG-I-like receptor-mediated immunity through dysregulation of ubiquitination and ISGylation[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 182. doi: 10.3390/v13020182.
- [26] HUANG S, CHENG A, WANG M, et al. Viruses utilize ubiquitination systems to escape TLR/RLR-mediated innate immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1065211. doi: 10.3389/fimmu.2022.1065211.
- [27] LUTZ L M, PACE C R, ARNOLD M M. Rotavirus NSP1 associates with components of the cullin RING ligase family of E3 ubiquitin ligases[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(13): 6036-6048.
- [28] LÓPEZ T, SILVA-AYALA D, LÓPEZ S, et al. Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(22): 11964-11971.
- [29] LIU X, CUI L, TAO Y, et al. The deubiquitinase BAP1 and E3 ligase UBE3C sequentially target IRF3 to activate and resolve the antiviral innate immune response[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(8): 114608. doi: 10.1016/j.celrep.2024.114608.
- [30] KUANG P P, GOLDSTEIN R H. Regulation of elastin gene transcription by proteasome dysfunction[J]. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2005, 289(3): C766-C773.
- [31] WANG Y, SUN W, DU B, et al. Therapeutic effect of MG-132 on diabetic cardiomyopathy is associated with its suppression of proteasomal activities: Roles of Nrf2 and NF- κ B[J]. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 2013, 304(4): H567-H578.

【责任编辑 李庆玲】