



鲍熹,徐悦,庄腾寒,等. Cortactin 蛋白与猪瘟病毒 Core 蛋白互作对外泌体与病毒感染的影响[J]. 南京农业大学学报,2026,49(4):853-864.
Bao X,Xu Y,Zhuang T H,et al. Interaction between cortactin protein and classical swine fever virus core protein; impact on exosomes and viral infection[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(4):853-864.

Cortactin 蛋白与猪瘟病毒 Core 蛋白互作 对外泌体与病毒感染的影响

鲍熹¹,徐悦²,庄腾寒²,杨鹏¹,陈丽²,冯磊²,姚火春^{1*}

(1.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210014;2.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所,江苏 南京 210014)

摘要:[目的]本文旨在筛选并验证与猪瘟病毒(classical swine fever virus,CSFV)核心(Core)蛋白互作的宿主调控因子,系统解析外泌体依赖性 CSFV 感染的分子机制,为基于宿主细胞工程化改造优化疫苗生产工艺提供理论依据。[方法]基于体外蛋白互作沉淀(pull-down)-质谱联用技术筛选 Core 互作宿主蛋白;采用免疫共沉淀(Co-IP)和激光共聚焦显微术验证皮层肌动蛋白(cortactin,CTTN)与 Core 的亚细胞共定位;构建 CTTN 过表达(over-expression,OE)及敲低(knock-down,KD)细胞株;运用纳米颗粒追踪分析(NTA)定量外泌体分泌动力学,联合蛋白免疫印记(Western blot,WB)和间接免疫荧光(IFA)技术解析病毒蛋白时空分布特征及感染效价。[结果]蛋白质互作组学鉴定 CTTN 为 Core 蛋白互作蛋白,Co-IP 与共聚焦成像证实二者在细胞质各处均存在特异性互作;WB 分析显示 CTTN 敲低使外泌体的 Core 载量提升并加速其分泌,而 CTTN 过表达则延迟 Core 外泌体装载;NTA 定量表明 CTTN-KD 显著提高外泌体分泌效率,CTTN-OE 则抑制分泌活性;IFA 检测显示 CTTN 敲低通过外泌体途径提升胞外病毒滴度,而 CTTN 过表达导致总病毒滴度下降。[结论]本研究证实宿主 CTTN 蛋白与 CSFV Core 蛋白存在互作,并对外泌体介导的 CSFV 病毒组分释放及感染起重要调控作用,为基于宿主细胞改造的猪瘟病毒增殖效率优化及疫苗生产模式改进提供了全新靶标。

关键词:猪瘟病毒;核心蛋白(Core);皮层肌动蛋白(CTTN);外泌体;病毒-宿主互作

中图分类号:S855.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2026)04-0853-12

Effects of interaction between cortactin protein and classical swine fever virus core protein on exosomes and viral infection

BAO Xi¹,XU Yue²,ZHUANG Tengan²,YANG Peng¹,CHEN Li²,FENG Lei²,YAO Huochun^{1*}

(1.College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210014,China;2.Institute of Animal Immunology Engineering,Jiangsu Academy of Agricultural Sciences,Nanjing 210014,China)

Abstract:[Objectives] The paper aimed to screen and validate host regulatory factors interacting with classical swine fever virus (CSFV) Core protein, systematically elucidate the molecular mechanism of exosome-dependent CSFV infection, and provide a theoretical basis for optimizing vaccine production processes based on host cell engineering. [Methods] Core-interacting host proteins were screened using pull-down coupled with mass spectrometry (pull-down-MS). The subcellular colocalization of cortactin (CTTN) and Core was verified by co-immunoprecipitation (Co-IP) and confocal microscopy. Stable cell lines with CTTN over-expression (OE) or knock-down (KD) were constructed. Nanoparticle tracking analysis (NTA) was employed to quantify exosome secretion dynamics, while Western blot (WB) and indirect immunofluorescence assay (IFA) were used to analyze the spatiotemporal distribution of viral proteins and infection efficacy. [Results] Proteomic interaction analysis identified CTTN as a Core-interacting protein, and Co-IP and confocal imaging confirmed their specific interaction throughout the cytoplasm. WB analysis revealed that CTTN-KD increased Core loading into exosomes and accelerated its secretion, whereas CTTN-OE delayed Core exosomal packaging. NTA quantification demonstrated that CTTN-KD significantly enhanced exosome secretion efficiency, while CTTN-OE suppressed secretory activity. IFA detection showed that CTTN-KD elevated extracellular viral efficacy via the exosomal pathway, whereas CTTN-OE led to a reduction in total infection efficacy. [Conclusions] This study is the first to confirm the interaction between host CTTN protein and CSFV Core protein, highlighting its critical regulatory role in exosome-mediated CSFV component release and infection. These findings not only provide deeper insights into CSFV infection and virus-host interaction mechanisms but also offer a novel target for optimizing CSFV proliferation efficiency and improving vaccine production strategies through host cell engineering.

Keywords: classical swine fever virus (CSFV); core protein; cortactin (CTTN); exosomes; virus-host interaction

收稿日期:2025-02-21

基金项目:江苏省农业科技自主创新项目[CX(24)2004];江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2022787)

作者简介:鲍熹,博士研究生,助理研究员。*通信作者:姚火春,教授,主要研究方向为预防兽医学,E-mail:yaohch@njau.edu.cn。

猪瘟是由猪瘟病毒(*Hogcholeravirus*, classical swine fever virus, CSFV)引起的具有高度传染性和致死性的疾病。猪感染 CSFV 后可出现出血、弥散性血管内凝血、白细胞减少等临床现象^[1]。作为养猪大国,我国生猪养殖量占全球一半左右,而猪瘟严重危害生猪健康,对养猪行业威胁重大,一旦暴发将带来巨大经济损失。

我国猪瘟防控主要依赖传统减毒活疫苗进行预防免疫,其中猪瘟兔化弱毒株(C株)疫苗因其免疫原性高、安全性良好及保护率高等优势占疫苗防控主导地位,覆盖全国约90%的规模化猪场^[2],其单剂接种后3 d内即可诱导中和抗体,临床保护率接近100%^[3]。目前我国CSFV疫苗的工业化生产普遍采用ST细胞微载体悬浮培养体系,其核心策略为低感染复数(MOI为0.01~0.10)接毒结合多代次长周期培养(9~15 d)以逐步累积病毒滴度。然而,这一模式存在局限性:低MOI条件下病毒需经历多轮复制,导致宿主细胞代谢活性下降及凋亡加速,也限制病毒产量的提升。此外,长时间培养不仅增加污染风险与生产成本,还因中间代次MOI难以精准控制而影响批次间一致性,与疫苗生产“过程强化”原则形成矛盾^[4]。尽管提高MOI理论上可通过缩短复制周期优化生产效率,但高MOI引发的细胞快速死亡及病毒粒子释放障碍导致总滴度无法实现有效增加^[5],这一矛盾长期制约着CSFV疫苗生产的工艺提升,需通过CSFV感染机制及与宿主细胞互作的深入研究来解决。

近年来,越来越多研究显示病毒感染宿主细胞后会与宿主蛋白分泌系统产生互作,并借助其功能完成感染过程^[6-7],黄病毒科病毒感染与宿主细胞分泌系统间的联系已被广泛报道^[8-10]。笔者之前也报道了CSFV感染宿主细胞后分泌的外泌体含Core蛋白且能够介导病毒感染的研究结果^[11]。CTTN是一种广泛表达于多种细胞类型的肌动蛋白结合蛋白,在肌动蛋白细胞骨架动态及细胞迁移、黏附和胞内运输等过程中发挥关键作用。其主要功能包括促进肌动蛋白聚合和分支以调节肌动蛋白动态、参与囊泡的形成和运输以及调控信号通路等^[12-14]。近年研究表明,该蛋白通过介导病毒入侵、胞内运输及释放等关键环节,在多种病毒感染机制中具有重要调控功能^[15-16]。在前期研究^[11]的基础上,本研究综合运用互作沉淀(pull-down)技术、蛋白质谱分析(protein MS)、免疫共沉淀(Co-IP)及荧光共聚焦显微术等试验体系,验证皮层肌动蛋白(cortactin, CTTN)与CSFV Core蛋白存在特异性相互作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及毒株

猪睾丸(ST)细胞(ATCC® CRL-1764™)及人胚胎肾细胞293(HEK293)(ATCC® CRL-11268™)购自美国ATCC生物标准品资源中心,用含100 IU·mL⁻¹青霉素、链霉素及10%胎牛血清(FBS, Gibco Cat. 10270)的DMEM培养基在37℃下培养于含5% CO₂的细胞培养箱(CelMate, ESCO)中。猪瘟兔化弱毒株C株购自国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心(CVCC AV1412)。

1.2 间接免疫荧光(IFA)检测病毒滴度

收取完成CSFV增殖的ST细胞完整培养体系(细胞+培养上清液), -80℃及室温下反复冻融3次后经0.45 μm滤膜(Merck-Millipore, SLHV033RB)过滤得待检病毒液。10倍梯度稀释病毒液(100 μL)并接种生长在96孔板上的单层ST细胞;72 h后细胞用磷酸盐缓冲液(PBS, Thermo Fisher Scientific, 10010002)洗涤3次,4℃下用预冷的80%丙酮固定45 min;室温下以0.5% Triton X-100(Solarbio Life Sciences, T8200)渗透15 min。封闭液(Beyotime, P0260)室温封闭2 h后加入稀释至工作浓度的鼠抗E2抗体(CVCC, Z294)(1:200), 37℃下孵育1.5 h, 再与荧光标记偶联的山羊抗鼠IgG(Solarbio, SF131)在室温下孵育1 h。用双蒸水替换培养板中的液体后使用荧光显微镜(Zeiss, Axio Observer Z1)观察记录荧光孔数并进行统计分析。

1.3 外泌体提取及纯化

参照笔者之前研究^[11],采用梯度超速离心结合免疫磁珠法进行外泌体提取纯化:健康或接毒细胞培养适当时间后收取培养上清液,用台式离心机(ThermoFisher, Multifuge X3R)分别以500 g、2 000 g和10 000 g速度离心30 min以及0.22 μm滤膜(Sartorius, Minisart PES)处理,去除细胞碎片及大囊泡(large extracellular vesicles, LEVs),再用超速离心机(Beckman Coulter, Optima L-100XP)100 000 g离心2 h沉淀外泌体,弃上清液后用PBS重悬沉淀,得到超离沉淀(UC-pellets)。用protein A磁珠(Beyotime, P2102)包被E2单抗(CVCC, Z294),将超离沉淀与E2单抗包被的磁珠混合后置于旋转反应器,4℃反应过夜,反应

完后收集上清液。重复以上过程3次,收集上清液即得到纯化后外泌体。

1.4 CTTN 蛋白的免疫印记(Western blot, WB)

收集健康、转染及接毒后的ST细胞,加入适量RIPA裂解液(Beyotime, P10013B)在冰上裂解后与上样缓冲液(CWBIO, CW0028)混合并在金属浴中以95℃煮样10 min后得WB样品。免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)样品在IP反应完成后用1×TBS清洗磁珠,重复清洗3次后直接加入上样缓冲液并进行混合及煮样操作。SDS-PAGE电泳及转膜完成后,将硝酸纤维素(NC)膜置于脱脂奶中室温下封闭2 h,接着用一抗及二抗进行孵育。本研究中所用抗体:本课题组自制兔抗E0、E2及Core蛋白多克隆抗体(抗原特异性已验证^[11,17])、兔抗CANX多克隆抗体(A24433)、兔抗syntenin多克隆抗体(A5360)、兔抗TSG101抗体(A1692)、兔抗β-actin抗体(AC006)、鼠抗Flag抗体(AE005)、兔抗CTTN抗体(A9518)、兔抗His抗体(AE086)、HRP标记的山羊抗兔IgG(AS014)及山羊抗鼠IgG抗体(AS003)均为爱博泰克(Abclonal)公司产品。用增强型化学发光液(爱博泰克, RM00021)显色并用化学发光成像仪(天能, 5200)观察结果。

1.5 细胞转染及目的蛋白表达检测

将待转染细胞接种至培养装置中,控制细胞密度为70%~90%,24 h后计算细胞总量并取适量质粒加入相应体积OPTI-MEM(Gibco, 31985088)中,轻轻吹打混合均匀,再加适量转染试剂(Qiagen, 301005),吹打混合后室温静置。15 min后将混合液逐滴加入细胞培养基,轻轻晃动使其均匀分布。转染4~6 h后半量更换新鲜完全培养基。转染24~48 h后进行WB及荧光检测目的蛋白表达情况,或将细胞裂解后用于Co-IP。

1.6 体外蛋白互作沉淀(pull-down)及免疫共沉淀(Co-IP)

pull-down:以pcDNA 3.1为载体构建表达携带Flag标签Core蛋白的真核表达质粒p-Flag-Core,经酶切后核酸电泳检测及测序验证序列正确。用p-Flag-Core质粒转染ST细胞,并通过SDS-PAGE电泳检测Flag-Core外源蛋白表达情况。确认蛋白表达无误后,培养并收集转染细胞,按1.4节中所述方法进行细胞裂解作为样品。用1×TBS将偶联Flag标签抗体的磁珠(爱博泰克, AE037)重复清洗3次,以V(样品):V(磁珠)=25:1的比例将磁珠与样品混合,置于旋转反应器上,4℃反应过夜后以10 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清液,收集磁珠,再以1×TBS清洗3次后按1.4节步骤制备成WB样品。阴性对照为仅表达Flag标签载体细胞裂解液的pull-down产物。

Co-IP:使用商用CTTN兔单克隆抗体(爱博泰克, A9518)进行Co-IP检测。磁珠处理、磁珠-样品反应及样品的收取、制备步骤与pull-down试验相同。采用未偶联CTTN抗体的磁珠沉淀产物作为阴性对照。

1.7 蛋白质的质谱(protein mass spectrometry, Protein MS)检测及分析

pull-down复合物经SDS-PAGE分离后,依次采用脱色工作液及脱水液进行凝胶脱色及脱水处理,经真空冷冻干燥仪冻干后依次经吸胀液及脱水液梯度处理,最终加入胰蛋白酶酶解缓冲液于37℃进行过夜酶解,取酶解产物进行离心后收集上清液。肽段脱盐采用C18 StageTip固相萃取柱。具体流程如下:1)柱活化:依次用100 μL乙腈、100 μL 0.1%甲酸-50%乙腈及100 μL 0.1%甲酸平衡萃取柱;2)上样:将真空浓缩离心干燥的多肽样品复溶于0.1%甲酸-2%乙腈溶液,以1 μL·min⁻¹流速上C18 StageTip固相萃取柱;3)清洗:使用100 μL 0.1%甲酸进行3次脱盐处理;4)洗脱:依次用40 μL 0.1%甲酸/50%乙腈和40 μL 0.1%甲酸/80%乙腈分步洗脱,收集洗脱液经SpeedVac真空浓缩系统干燥后于-80℃保存。

质谱分析采用UltiMate 3000 RSLCnano纳升液相色谱系统(Thermo Fisher Scientific)与Q Exactive Plus四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(Thermo Fisher Scientific)联用平台。多肽样品经Acclaim PepMap 100 C₁₈毛细管色谱柱(75 μm×15 cm, 2 μm)梯度分离后以纳升电喷雾离子化方式导入质谱仪,采用数据依赖采集模式(DDA)进行全扫描(分辨率70 000)及离子扫描(分辨率17 500)。原始数据经Proteome Discoverer 2.5软件(Thermo Fisher Scientific)进行谱图解析,再用SEQUEST HT算法比对UniProtKB数据库完成蛋白质鉴定。

1.8 荧光共聚焦(fluorescence confocal)

将直径12 mm圆形玻片置于6孔板中,经70%乙醇清洗并紫外灭菌后于超净台内干燥。每孔接种ST细胞(每孔细胞数约3×10⁵),37℃、5% CO₂培养箱中孵育过夜,待细胞融合度达50%~70%时,使用之前试验中构建的GFP标记Core蛋白表达载体转染ST细胞,继续培养24~48 h诱导靶蛋白表达。转染完成

后使用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,0.1% Triton X-100 透膜处理 10 min,用含 30 g·L⁻¹ BSA 的 PBS 溶液封闭非特异性结合位点。

将细胞爬片与 CTTN 兔单克隆抗体 4 ℃ 孵育过夜,PBS 漂洗后加入激发波长 593 nm 的荧光染料标记山羊抗兔二抗(Abcclonal,AS053),室温避光孵育 1 h。经充分洗涤后使用抗荧光淬灭封片剂封片,再以透明指甲油(MINISO,01)密封玻片边缘。最后,使用 SOPTOP XD 荧光成像系统在相应激发波长下观察,采集 Core 蛋白与 CTTN 的亚细胞定位图像并进行图像处理。

1.9 CTTN 稳定过表达及敲低 ST 细胞系构建

使用 pLV3 慢病毒载体实现 CTTN 转录水平的稳定改变。使用 BLOCK-iTTM RNAi Designer (ThermoFisher)设计 3 条 CTTN shRNA 序列,经试验验证,最终选择其中敲低效果最显著的用于构建敲低载体(表 1)。过表达载体基于 NCBI 记载的 CTTN CDS 序列构建(XM_021082649.1)。载体构建完成并经酶切及测序验证序列无误后将慢病毒载体与辅助质粒共转染 HEK293 细胞,分别于转染后 48 和 72 h 收集上清液,用慢病毒浓缩液(Clontech,631231)浓缩后测定病毒滴度,确定 MOI 并感染 ST 细胞。感染后 6~8 h,弃培养上清液,用 PBS 清洗 3 次后换含 100 mL·L⁻¹ FBS 的 DMEM 培养基于 5% CO₂ 培养箱中 37 ℃ 培养;48 h 后消化细胞并在培养基中加入 5 μg·mL⁻¹ 嘌呤霉素,培养箱中培养 6~8 h 后弃上清液,用 PBS 清洗 3 次后加不含嘌呤霉素培养基培养。该过程重复至嘌呤霉素浓度达到 20 μg·mL⁻¹,换普通培养基进行传代培养后收集细胞,WB 检测蛋白过表达及敲低效果。

表 1 CTTN shRNA 引物序列设计
Table 1 Design of shRNA primers targeting CTTN

序列代号 Sequence ID	引物序列 Primer sequence(5'→3')
CTTN-shRNA 1 top strand	ATCCGGCAAGTACGGGATTGACAATTCAGAGATTGTCAATCCCGTAACTTGCTTTTTTG
CTTN-shRNA 1 bottom strand	AATTCAAAAAATCTCTTGAAGCAAGTTACGGGATTGACAATCTCTTGAAGTTGTCAATCCCGTAACTTGCG
CTTN-shRNA 2 top strand	CATCCGGAGTACCACTCGAAGCTTTTTCAAGAGAAAAGCTTCGACTGGTACTCTTTTTTG
CTTN-shRNA 2 bottom strand	AATTCAAAAAATCTCTTGAAGAGTACCACTCGAAGCTTTTCTCTTGAAGAAAAGCTTCGACTGGTACTCG
CTTN-shRNA 3 top strand	GATCCGGAGAGAGAACGTGTTTCAATTCAAGAGATTGAAACACGTTCTCTCTTTTTTG
CTTN-shRNA 3 bottom strand	AATTCAAAAAATCTCTTGAAGAGAGAGAACGTGTTTCAATCTCTTGAAGTTGAAACACGTTCTCTCTCG

1.10 纳米粒子示踪分析(NTA)

使用 NanoSight NS300 分析仪(Malvern Panalytical,英国)完成 NTA:取-80 ℃ 冻存的超离浓缩样品,室温下完全解冻,用移液器轻柔反复吹吸分散。检测前仪器预热 15 min,注入超纯水调节背景散射强度至小于 100 counts·s⁻¹,加载 0.5 mL 样品后静置 60 s。参数设置:检测温度(25±0.5)℃,采集时间 60 s,快门速度 1 000,增益水平 15~20。每个样品平行测定 3 次并更换检测区域。数据通过 NTA 3.4 软件基于 Stokes-Einstein 方程计算流体力学直径,记录各样本的粒径分布,并提取特定粒径范围(50~220 nm)的颗粒浓度,用于外泌体数量的组间比较。背景浓度采用空白对照校正。

1.11 数据统计分析

所有试验均重复 3 次以上,数据用平均值±标准差表示。使用 GraphPad Prism 软件进行绘图和统计分析,采用 Student's *t* test 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 pull-down 试验可靠性验证及复合物质谱(MS)检测

WB 检测结果显示,Flag 标签与 Core 蛋白均显示清晰单一条带,表明所用抗体特异性良好,2 种蛋白在分子质量和表达量上的一致性提示其以融合蛋白复合体形式表达(图 1-A)。磁珠 pull-down 效果验证结果显示,转染 Flag-Core 表达质粒的细胞裂解物(Input)经 Flag 抗体包被的免疫磁珠 pull-down 后,可特异性检测到高丰度 Flag-Core 蛋白,而阴性对照组未出现相应条带(图 1-B)。该结果说明基于 Flag 抗体的免疫沉淀体系对目标蛋白的高效富集能力及其严格的特异性,表明 pull-down 试验条件合

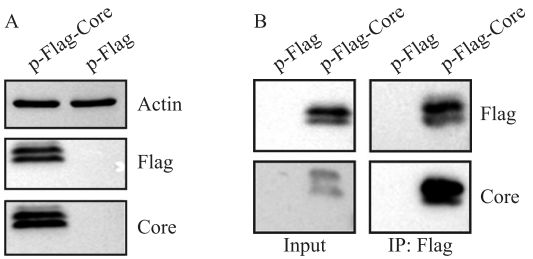


图 1 Core 外源蛋白表达验证(A)及 Flag 磁珠捕获效果验证(B)
Fig. 1 Validation of exogenous Core protein expression(A)and validation of Flag-tagged beads capture efficiency(B)

理,数据可靠性满足后续互作分析要求。

对 pull-down 试验得到的 Core 蛋白复合物进行 SDS-PAGE 分离,经胶内酶解后开展质谱分析。通过试验组与阴性对照组对比筛选潜在互作蛋白,GO 富集分析显示这些蛋白主要参与 RNA 结合、核仁组织及核质组成等生物学过程,与 Core 蛋白基因组结合及核定位功能特性高度吻合(图 2)。基于独特肽段数(unique peptides)及肽段覆盖率(coverage)筛选出互作概率较高的候选宿主蛋白(表 2)。其中 MYO1B 蛋白已证实能与 Core 蛋白产生特异性结合^[17],本研究针对同样具有较高肽段覆盖率的 CTTN 蛋白开展与 Core 蛋白的互作验证。

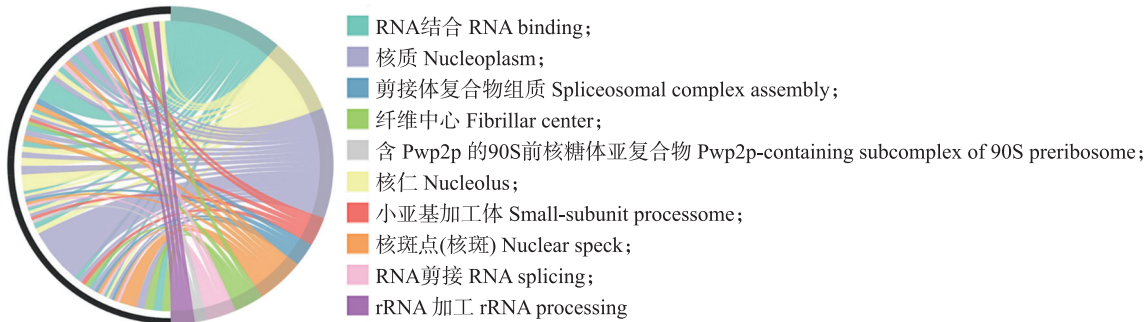


图 2 蛋白质质谱检测数据 GO 富集分析

Fig. 2 GO enrichment analysis of proteomic mass spectrometry data

表 2 pull-down 复合物中宿主蛋白质谱检测

Table 2 Mass spectrometry identification of host proteins in pull-down complex

宿主蛋白 Host protein	肽段覆盖率/% Coverage	肽段匹配量 Peptide-spectrum matches	特异肽段数 Unique peptides	宿主蛋白 Host protein	肽段覆盖率/% Coverage	肽段匹配量 Peptide-spectrum matches	特异肽段数 Unique peptides
MYO1B	12	9	8	RAB8A	7	14	6
CTTN	10	8	5	UBE2N	8	0	5
ANXA2	5	5	4	IQGAP1	9	11	8
TMEM19	4	7	6				

注: MYO1B: 肌球蛋白 1B Myosin IB; CTTN: 皮层肌动蛋白 Cortactin; ANXA2: 膜联蛋白 A2 Annexin A2; TMEM19: 跨膜蛋白 19 Transmembrane protein 19; RAB8A: Ras 相关蛋白 Rab8A Ras-related protein Rab8A; UBE2N: 泛素结合酶 E2N Ubiquitin-conjugating enzyme E2N; IQGAP1: 含 IQ 基序 GTP 酶激活蛋白 1 IQ motif containing GTPase activating protein 1.

2.2 Core 蛋白与宿主 CTTN 蛋白互作验证

WB 检测 CSFV 感染后不同时间点胞内 CTTN 蛋白表达水平,结果(图 3)显示,CSFV 感染后胞内 CTTN 浓度呈现时间依赖性上调趋势。值得注意的是,尽管感染早期(24 h)CTTN 上调幅度较小,但其累积效应随感染进程(72 h)显著增强。该结果表明 CSFV 感染会显著影响胞内 CTTN 蛋白表达水平,间接表明 CTTN 蛋白在 CSFV 感染中发挥重要作用。

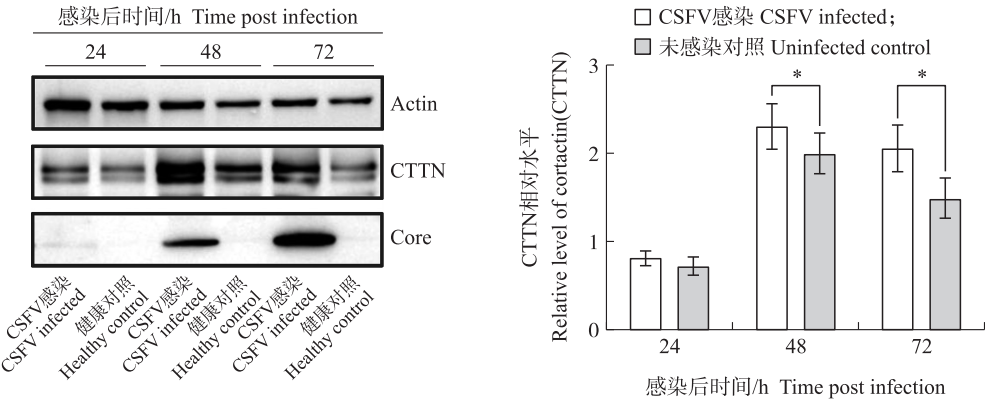


图 3 CSFV 感染对宿主胞内 CTTN 表达水平的影响

Fig. 3 Effect of CSFV infection on the expression level of CTTN in host cells

* $P<0.05$. The same as follows.

Co-IP 样品的 WB 检测结果(图 4)显示,在正向 Co-IP 试验中,抗 CTTN 抗体沉淀复合物的 Core 蛋白信号强度较 IgG 对照组显著增强,同时 Flag 标签蛋白亦呈现特异性富集。该结果证实 CTTN 与 Flag-Core 融合蛋白存在特异性相互作用,提示 CTTN 可与病毒 Core 蛋白形成复合物。对照组中 Flag 蛋白含量显著低于 CTTN Co-IP 产物,表明其可能来自非特异性吸附。

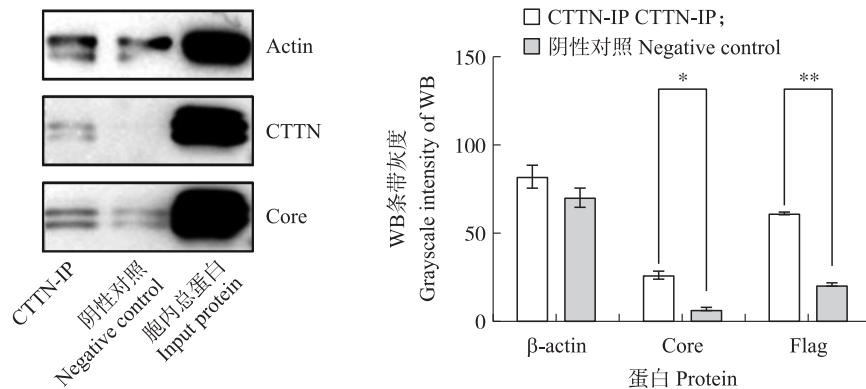


图 4 免疫共沉淀 (Co-IP) 检测 CTTN 与 Core 蛋白互作

Fig. 4 Co-immunoprecipitation (Co-IP) detection of interaction between CTTN and Core protein

阴性对照组为兔 IgG 抗体。Negative control group was rabbit IgG antibody. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The same as follows.

双荧光标记系统结合激光共聚焦显微成像分析结果显示:外源表达的 Core 蛋白在胞质与核区均呈现显著分布特征,其核定位可能由 Core 蛋白 C 端保守的核定位序列 (NLS) 介导;而内源性 CTTN 主要定位于胞质,与已知的细胞骨架调控功能一致。荧光共定位分析(图 5)表明,二者在胞质区域(尤其是细胞皮层及内吞囊泡富集区)存在显著共定位现象,提示 Core 蛋白与 CTTN 可能通过动态的亚细胞结构(如网格蛋白包被小窝或内吞体)实现空间互作。

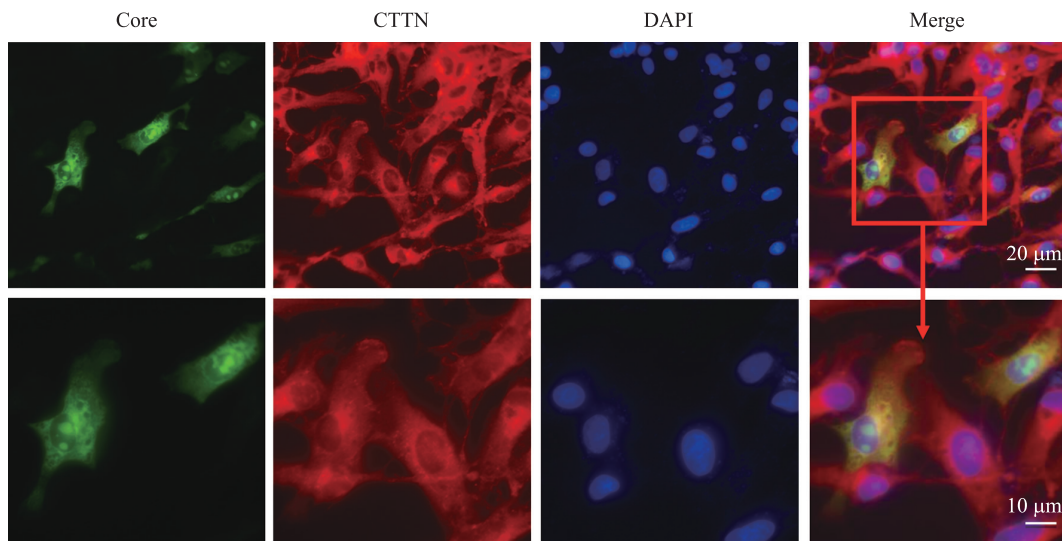


图 5 CTTN 与 Core 蛋白在 ST 细胞内的荧光共定位

Fig. 5 Fluorescence co-localization of CTTN and Core protein in ST cells

上排为 40 倍放大,下排为 60 倍放大。

The top panel display a 40× magnification, and the bottom panel display a 60× magnification.

2.3 CTTN 敲低及过表达 ST 细胞系构建及 CSFV 感染后外泌体与病毒滴度变化

不同细胞内蛋白 WB 检测结果(图 6)显示,CTTN 蛋白表达呈现显著差异。在未归一化条件下,CTTN 敲低组在 24、48、72 h 蛋白水平分别为对照组的 24.1%、14.5%和 31.7%,而 CTTN 过表达组分别达到对照组的 563.2%、281.3%和 407.9%,表明敲低及过表达效果持续存在,CTTN 敲低及过表达细胞系构建成功,分别命名为 ST-CTTN-OE(过表达)及 ST-CTTN-KD(敲低)。值得注意的是,内参蛋白浓度也受 CTTN 表达水平影响,提示 CTTN 变化对细胞存活率产生影响,后续胞内蛋白浓度结果需经归一化处理后再比对。

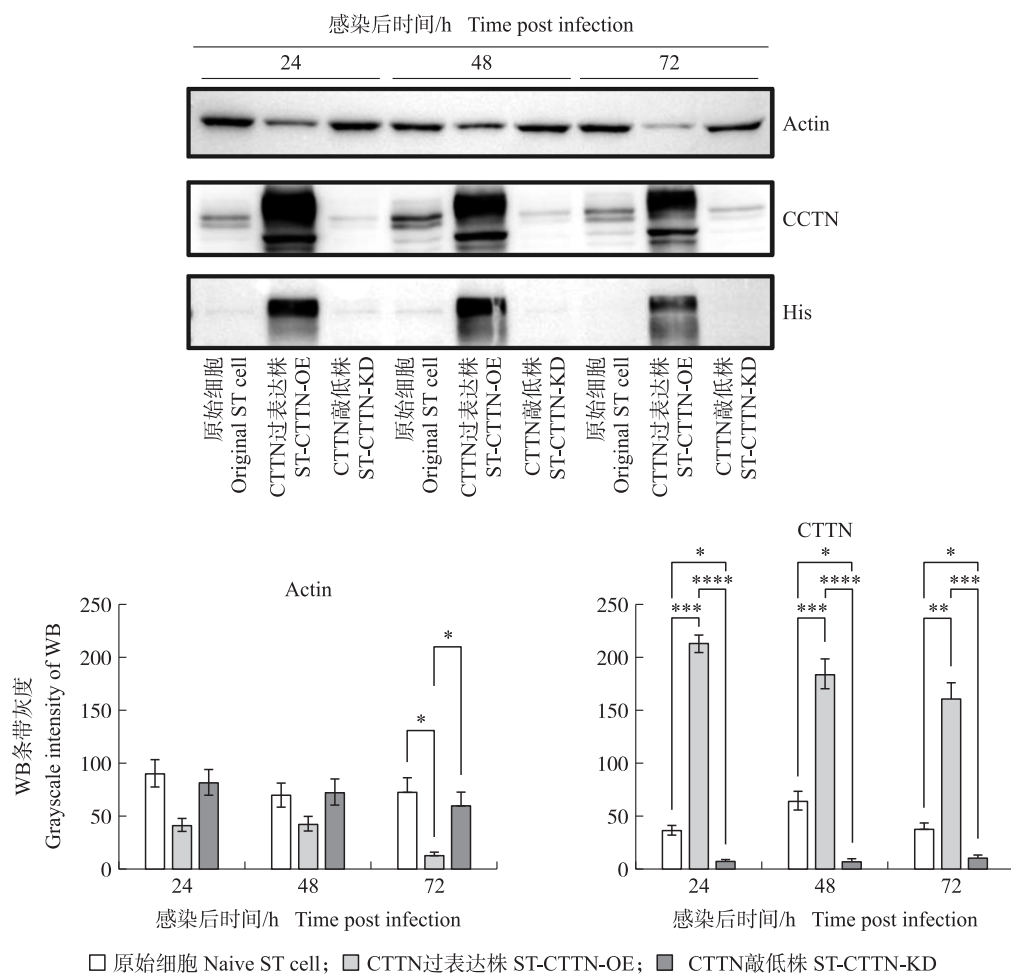


图6 感染后不同时间 CTTN 过表达及敲低株胞内 CTTN 浓度变化
Fig. 6 Time course detection of intracellular CTTN concentration in distinct cell lines

*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

基于内参归一化的 CSFV 感染后胞内病毒蛋白定量分析结果显示:CTTN 表达水平显著影响 CSFV 感染细胞后 E2 及 Core 蛋白在胞内的积累水平。感染后 24、48、72 h CTTN 敲低组 E2 蛋白相对浓度分别为对照组的 82.3%、106.8% 和 76.2%,而过表达组分别达到对照组的 163.2%、185.8% 和 165.9%。结果表明:CTTN 敲低在感染早期(24 h)可能通过增强外泌体介导的 E2 蛋白胞外分泌减少其胞内积累,但中后期(48~72 h)E2 蛋白复制效率提升,促进其积累;而 CTTN 过表达则持续增强 E2 蛋白水平,可能与高浓度 CTTN 导致的 E2 蛋白外泌体分泌途径受阻或病毒复制效率提升相关。Core 蛋白的变化更明显:感染后 24、48、72 h 敲低组分别较对照组上调 105.2%、279.7% 和 311.2%,过表达组则呈现早期抑制(24 h 下降 57.6%)与后期促进(72 h 时上调 276.6%)的双相调控模式(图 7)。该结果表明,相较于 E2 蛋白,Core 蛋白的胞内累积对 CTTN 表达量变化具有更高的调控敏感性($P < 0.01$),其含量变化与外泌体分泌途径存在更显著的关联性。

外泌体中病毒结构蛋白的富集模式与胞内分布呈现显著异质性:所有试验组外泌体中均未检出 E2 糖蛋白信号,可能与其跨膜结构域阻碍外泌体腔室分选相关。ST-CTTN-KD 在感染后 24 h 即出现外泌体 Core 蛋白浓度峰值,显著高于原始细胞及过表达组;至 48 h 时敲低组 Core 浓度快速回落,至 72 h 维持基线水平以上。过表达组则呈现时序性分选补偿效应:24 h Core 浓度最低,48 h 激增,72 h 又有所回落;而 WT 组全程维持稳态分选(图 8)。

以标志蛋白 Syntenin 作为内参对外泌体分泌总量进行定量,结果显示,敲低组总分泌量较 WT 组增加 2.3 倍($P < 0.001$),而过表达组降低 30%($P = 0.078$)。值得注意的是,Core 蛋白的绝对载量与 Syntenin 标准化相对丰度呈现解耦特征:敲低组 24 h 绝对载量极高,但其相对丰度因分泌通量激增而被稀释,表明 CTTN 通过双途径调控病毒传播——增强多泡体(MVBs)分泌通量,又通过肌动蛋白网络重塑影响分选效

率。该结果表明 CTTN 转录水平能够调控外泌体介导的 CSFV Core 蛋白转运及分泌。Syntenin 在外泌体中含量受亚群异质性影响较大,其作为内参蛋白进行外泌体中蛋白相对表达量计算时,准确度不如 Actin 等内参蛋白,因此结果可能存在一定误差,但仍能够反映外泌体内容物蛋白相对变化趋势。

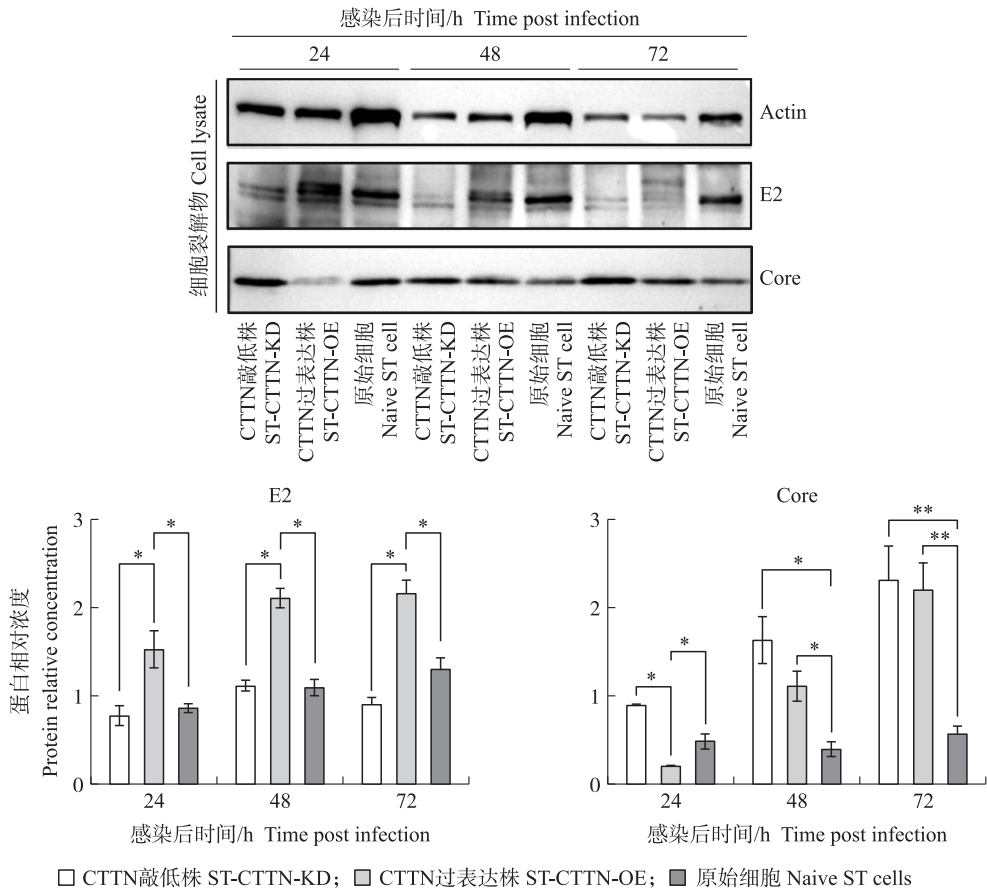


图 7 不同细胞株感染 CSFV 后胞内 E2 和 Core 蛋白浓度变化

Fig. 7 Dynamics of intracellular E2 and Core protein levels in different cell lines post CSFV infection

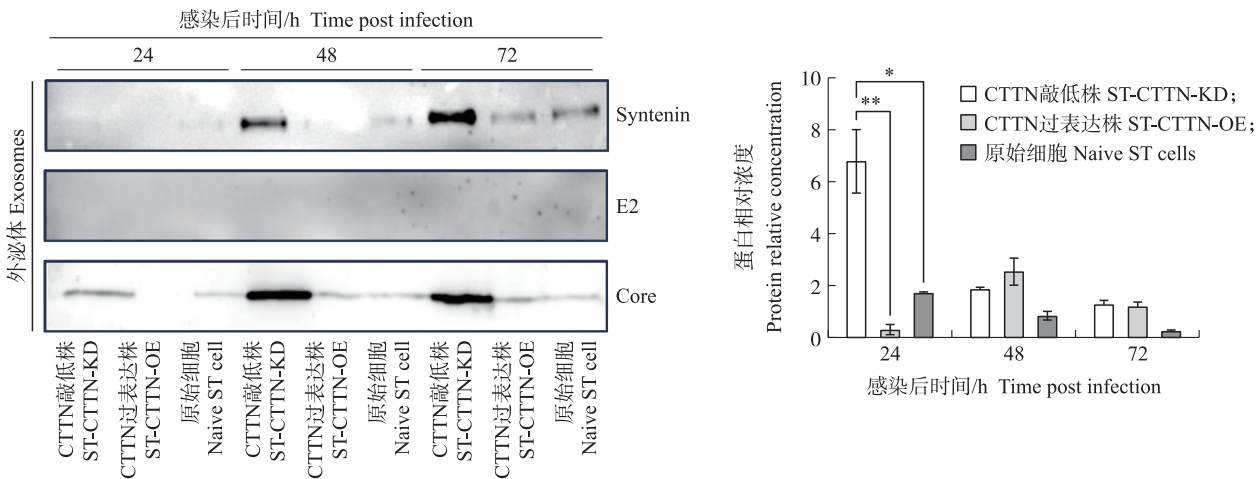


图 8 不同细胞株感染 CSFV 后外泌体中 Core 蛋白浓度变化

Fig. 8 Changes in Core protein concentration in exosomes derived from different cell lines post CSFV infection

外泌体经纯化不含病毒颗粒,导致 E2 蛋白无法检出。

Purified exosomes were confirmed to be free of viral particles, quantitative analysis of E2 protein bands was omitted as the E2 protein remained undetectable.

通过 NTA 检测系统解析 CSFV 感染条件下 CTTN 表达差异细胞系的外泌体分泌动力学。定量结果(图 9)显示:ST-CTTN-OE 在感染后 24 h 外泌体分泌量显著下降至对照组 85.7%,而 ST-CTTN-KD 则升高

至对照组的 105.5%。感染后 48 h,调控效应呈现时序依赖性增强,ST-CTTN-KD 外泌体分泌量达到对照组的 111.8%,而 ST-CTTN-OE 进一步下降至对照组的 83.4%。感染后 72 h,ST-CTTN-KD 外泌体仍维持高分泌量,而 ST-CTTN-OE 分泌量恢复至对照组的 98.2%,呈现分泌量的动态平衡。该外泌体分泌动力学特征与 Syntenin 蛋白表达谱检测结果形成互证:ST-CTTN-KD 组在感染早期(24 h)即呈现外泌体分泌通量与 Core 蛋白分泌效率的同步上调,而 ST-CTTN-OE 组则表现为外泌体分泌抑制延迟;至感染后期,尽管分泌量差异收窄至小于 10%,但病毒组分的分泌效率通过代偿机制达到各组平衡。

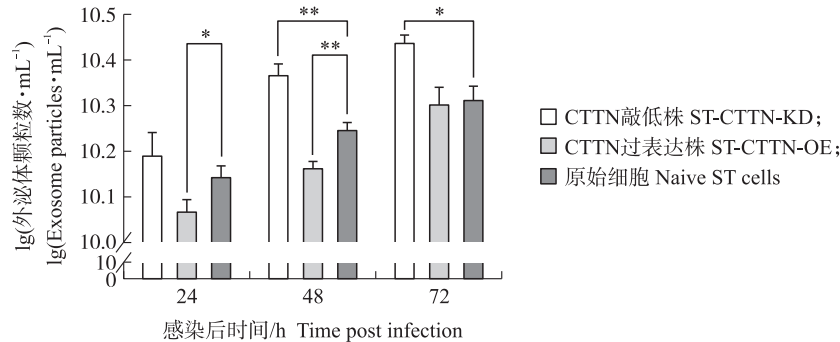


图9 不同细胞株感染 CSFV 后外泌体分泌数变化情况

Fig. 9 Changes in exosome secretion quantity in different cell lines post CSFV infection

IFA 检测结果(图 10)显示,CTTN 表达水平对病毒粒子及组分在胞内积累和外泌体释放均有显著调控作用。总滴度方面,敲低株在 48 和 72 h 呈现持续升高趋势,较对照组同期变化表现出更明显的上升幅度,但始终略低于对照组;而过表达株总滴度增长缓慢,与对照组相比明显降低。

胞内滴度测定结果显示,24 h 内敲低株胞内滴度与原始细胞接近,但 48 h 后增速放缓,72 h 敲低株显著低于对照组。过表达株在感染后期胞内滴度亦明显低于对照组,表明 CTTN 过表达可能抑制病毒复制或胞内运输减少病毒颗粒的积累。值得注意的是,敲低株与过表达株的胞内滴度变化方向相反,暗示 CTTN 对胞内病毒动力学存在双向调节机制。

外泌体介导的胞外病毒滴度呈现显著差异。敲低株在 48 和 72 h 的胞外病毒滴度均高于对照组,增幅达 57%,表明 CTTN 缺失促进胞外感染性粒子的显著增加。反之,过表达株的胞外病毒滴度在所有时间点均显著降低,仅为对照组的 82.9%。结果表明,CTTN 过表达可显著抑制感染性外泌体的生成。外泌体含量的大幅改变是造成病毒总滴度差异的核心原因。在转染后 72 h 的 CTTN 敲低组中,感染性外泌体来源的滴度占总滴度比例为 29.4%,显著高于对照组的 19.0%。

综合 WB 及 NTA 结果发现,CTTN 能够通过多重途径调控 CSFV 滴度:CTTN 敲低可显著增强病毒

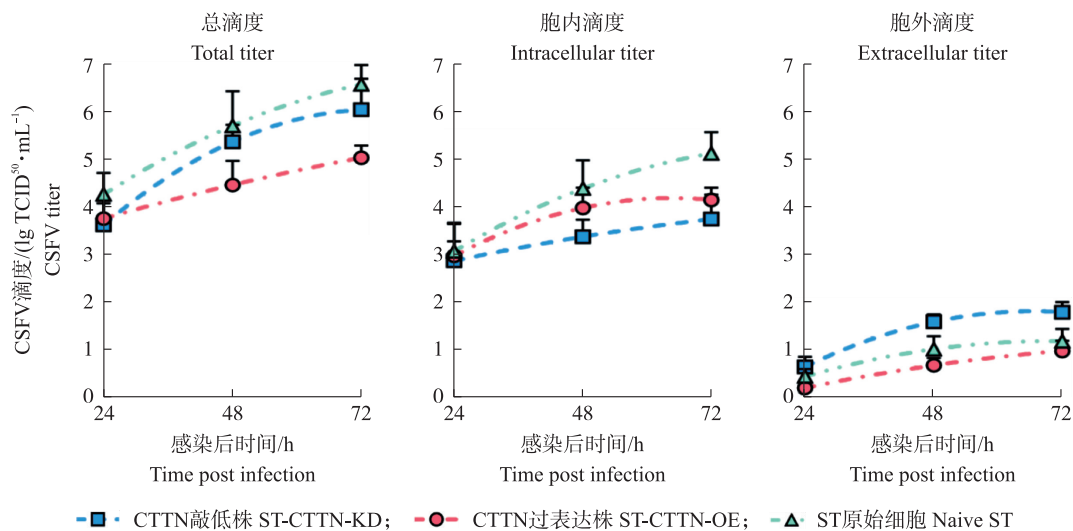


图10 不同细胞株感染 CSFV 后胞内、胞外及混合物中病毒滴度变化情况

Fig. 10 Changes in virus titer in intracellular, extracellular, and combined fractions of different cell lines post CSFV infection

Core 蛋白的胞内复制效率及外泌体介导的释放途径,导致胞外病毒滴度显著升高,但同时抑制胞内 E2 蛋白的生物合成,破坏完整病毒粒子的胞内组装过程并降低胞内病毒滴度。在低 MOI 条件下,病毒粒子胞内滞留现象显著,胞外滴度在总滴度中占比较低,因此尽管胞外病毒滴度升高,其增量仍被胞内病毒滴度的显著下降所抵消,最终 CTTN 敲低组总病毒滴度较对照组仍呈现轻微降低。而 CTTN 过表达虽能短暂提升 E2 蛋白表达水平,但其引发的 Core 蛋白转录及外泌体依赖性转运分泌通路的双重阻滞会显著抑制感染性外泌体的生成与释放,导致病毒滴度增速减缓及胞外病毒滴度显著降低,最终引发总滴度的急剧下降。综上所述,CTTN 通过双向调控病毒结构蛋白合成,以及外泌体介导的病毒核心蛋白、基因组转运分泌通路,显著干预 CSFV 感染进程;CTTN 蛋白表达量对胞内和以感染性外泌体为主的胞外病毒滴度均具有明显调控作用。

3 讨论

CSFV 作为黄病毒科(Flaviviridae)的重要成员,其感染机制与宿主因子互作网络始终是病毒学领域的研究热点。笔者在前期研究中发现,CSFV 感染的 ST 细胞可通过外泌体途径分泌携带病毒 Core 蛋白及基因组 RNA 的感染性颗粒,提示非经典释放途径在病毒传播中发挥重要作用^[11]。然而,Core 蛋白向外泌体的选择性转运的机制及其调控网络尚未明确。本研究聚焦于鉴定与 Core 蛋白互作的宿主因子,旨在解析外泌体介导的病毒传播机制,提高宿主细胞 CSFV 增殖效率,改进 CSFV 疫苗生产模式。

通过整合蛋白质质谱筛选、Co-IP 验证及荧光共定位分析,本研究首次证实皮层肌动蛋白 CTTN 与 CSFV Core 蛋白存在特异性互作。CTTN 作为多结构域支架蛋白,其功能模块呈特征性分布:N 端酸性结构域(NTA)通过激活 Arp2/3 复合体介导肌动蛋白成核;中央 4.1-ERM 结构域直接锚定 F-actin 微丝;C 端 SH3 结构域则特异性招募 Dynamin-2、WASP 等膜重塑调控因子^[12-13]。其多结构域协同作用机制揭示了该蛋白作为连接细胞骨架动态与外泌体生物发生关键分子枢纽的功能本质。基于上述分子特征与试验结果,本研究证实 CTTN 通过与 Core 蛋白互作直接参与其外泌体转运分选过程。

在病原体感染领域,CTTN 已被证明是多种病毒劫持宿主机制的重要靶点。例如,人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)的感染会诱导包括 CTTN 在内的一系列细胞骨架相关蛋白的转录水平上调和磷酸化,而通过拮抗剂阻断这一过程能够有效阻止 HIV-1 对巨噬细胞的感染,并减少病毒诱导的单核细胞与人脑微血管内皮细胞(HBMEC)的黏附^[14];在流感病毒(influenza A virus)感染中,CTTN 则呈现时间依赖性的募集模式——蛋白在感染初期被激活,随后发生下调^[15-16]。而呼吸道合胞病毒(RSV)的感染会导致气道上皮细胞中 F-肌动蛋白的解聚,并显著降低 CTTN 的表达水平,过表达 CTTN 可保护上皮屏障免受 RSV 的侵害^[18]。这些研究表明 CTTN 在病毒感染中具有“双刃剑”特性——既可作为病毒增效因子促进感染进程,亦可作为宿主防御元件限制病毒扩散。同时研究发现 CSFV 感染可引发 CTTN 胞内浓度上升。通过构建 CTTN 差异表达细胞株,发现 CTTN 浓度升高对病毒结构蛋白分泌及病毒滴度提升具有显著抑制作用,提示 CTTN 上调可能是宿主抗病毒应答的重要环节。然而,该防御效应的分子开关机制及其与病毒免疫逃逸策略的互作关系,仍有待通过时空分辨的蛋白互作组学及动态感染模型深入解析。

对 CTTN 差异表达细胞株感染 CSFV 后外泌体变化的研究结果显示,CTTN 对病毒组分转运调控呈显著浓度依赖性效应:过表达 CTTN 导致含 Core 蛋白外泌体的分泌峰值延迟至感染后 48 h(较对照组延迟 12 h),外泌体载量下降及病毒滴度降低,而敲低 CTTN 则使外泌体分泌提前载量增加,但总病毒滴度与野生型细胞差异无统计学意义。这种“负调控外泌体-维持病毒滴度”的表型与肿瘤细胞中 CTTN 促进外泌体分泌的报道^[19]形成鲜明对比,提示敲低 CTTN 可能通过提高 Core 蛋白外泌体分选转运至外泌体效率,促进感染性外泌体生成,实现病毒传播途径的代偿性切换。这种“此消彼长”的传播模式可能增强病毒在宿主群体中的扩散韧性^[20],但其对 CSFV 长期传代稳定性的影响仍需通过连续传代试验评估。

由于本研究聚焦 CTTN 在 Core 蛋白转运及分选中的功能,对其与外泌体分泌的直接关联未做深入探究,但 NTA 检测结果表明 CTTN 敲低/过表达可分别上调/下调外泌体分泌量。结合微丝网络重构调控多泡体(MVB)-质膜融合效率的经典理论^[21],推测 CTTN 可能通过动态调控细胞骨架张力影响外泌体生物发生过程。WB 检测结果显示 CTTN 过表达导致病毒 E2 蛋白胞内异常聚集,提示其可能通过抑制 Dynamin-2 依赖性经典分泌途径干扰病毒组分释放^[22]。同时,有研究表明 CTTN 的过表达可能激活 PERK-eIF2 α 通路引发未折叠蛋白反应(UPR),导致 CSFV 病毒蛋白加工效率降低^[23],但这些机制假说均

需后续通过动态成像及囊泡示踪技术进行验证。

此外,通过显微成像检测发现,与对照组相比,健康状态下 CTTN 过表达的细胞已出现肌动蛋白分支网络结构的区域性崩解及伪足结构显著缩短;CTTN 敲低细胞则呈现相反的形态学改变,表现为细胞体积极轻微缩减、胞体密度增加及细胞边界清晰度提升。上述形态学特征提示,单纯改变 CTTN 的转录水平即可引发细胞骨架动态重构与细胞形态重塑,此类改变可能通过干扰病毒囊膜蛋白的微管依赖性运输途径,从而间接抑制病毒粒子的组装效率^[24-25]。然而,此类由 CTTN 表达量波动引发的细胞骨架与形态学变化是否参与调控 CTTN 转录异常细胞系中 CSFV 的增殖模式转变,其分子机制是否与病毒复制周期中的特定步骤(如核衣壳装配或出芽释放)存在直接关联,仍需通过功能获得/缺失试验结合实时动态成像技术深入解析。

综上,基于前期对感染性外泌体生物组分及其功能调控网络的系统性解析,本研究通过系统性筛选试验证实宿主蛋白 CTTN 与 CSFV Core 蛋白存在特异性互作;利用构建的 CTTN 敲低及过表达细胞模型,首次揭示其转录水平变化可显著调控 Core 蛋白通过外泌体途径的转运分选效率及感染性外泌体的生物合成与分泌过程,从而改变 CSFV 的感染动力学特征。此结果为 CTTN 作为 CSFV 增殖周期关键宿主调控因子的功能提供了直接证据。需特别指出的是,CTTN 表达量异常不仅通过上述直接作用影响病毒增殖,还可通过诱导宿主细胞形态重构及代谢稳态失衡产生间接调控效应,但相关分子通路细节及其对 CSFV 感染的潜在级联调控网络,仍需通过整合转录组学、蛋白质组学与代谢组学的跨维度分析进行系统解析。

本研究首次系统解析了 CTTN 在 CSFV 病毒组分运输、外泌体依赖病毒感染中的关键调控作用。为阐明黄病毒科成员与宿主的互作机制提供了新的研究思路,也为改进 CSFV 增殖效率、优化 CSFV 细胞苗生产模式奠定试验基础。

参考文献 References:

- [1] van Oirschot J T. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field[J]. *Veterinary Microbiology*, 2003, 96(4): 367-384.
- [2] Qiu H J, Shen R X, Tong G Z. The lapinized Chinese strain vaccine against classical swine fever virus: a retrospective review spanning half a century[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5(1): 1-14.
- [3] Luo Y Z, Li S, Sun Y, et al. Classical swine fever in China: a minireview[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(1/2): 1-6.
- [4] Kallel H, Kamen A A. Large-scale adenovirus and poxvirus-vectored vaccine manufacturing to enable clinical trials[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(5): 741-747.
- [5] Roldão A, Mellado M C M, Castilho L R, et al. Virus-like particles in vaccine development[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [6] Gladue D P, Baker-Bransetter R, Holinka L G, et al. Interaction of CSFV E2 protein with swine host factors as detected by yeast two-hybrid system[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85324.
- [7] He F, Ling L J, Liao Y J, et al. Beta-actin interacts with the E2 protein and is involved in the early replication of classical swine fever virus[J]. *Virus Research*, 2014, 179: 161-168.
- [8] Maas S L N, Breakefield X O, Weaver A M. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles[J]. *Trends in Cell Biology*, 2017, 27(3): 172-188.
- [9] Nour A M, Li Y, Wolenski J, et al. Viral membrane fusion and nucleocapsid delivery into the cytoplasm are distinct events in some flaviviruses[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(9): e1003585.
- [10] Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(32): 13109-13113.
- [11] Bao X, Zhuang T H, Xu Y, et al. Exosomes secreted by CSFV-infected cells evade neutralizing antibody to activate innate immune responses and establish productive infection in recipient cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2024, 292: 110062.
- [12] Buday L, Downward J. Roles of cortactin in tumor pathogenesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1775(2): 263-273.
- [13] Ammer A G, Weed S A. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics[J]. *Cell Motility*, 2008, 65(9): 687-707.
- [14] Woollard S M, Li H, Singh S, et al. HIV-1 induces cytoskeletal alterations and Rac1 activation during monocyte-blood-brain barrier interactions: modulatory role of CCR5[J]. *Retrovirology*, 2014, 11: 20.
- [15] Chen D Y, Husain M. Caspase-mediated cleavage of human cortactin during influenza A virus infection occurs in its actin-binding domains and is associated with released virus titres[J]. *Viruses*, 2020, 12(1): 87.
- [16] Husain M. Identifying caspases and their motifs that cleave proteins during influenza A virus infection[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2022(185): e64189.
- [17] Bao X, Zhuang T, Xu Y, et al. Essential role of the interaction between classical swine fever virus core protein and cellular MYO1B in viral components transport to exosomes and titer maintenance[J]. *Veterinary Microbiology*, 2024, 299: 110315.

- [18] Gao N N, Raduka A, Rezaee F. Respiratory syncytial virus disrupts the airway epithelial barrier by decreasing cortactin and destabilizing F-actin[J]. *Journal of Cell Science*, 2022, 135(16): jcs259871.
- [19] Sinha S, Hoshino D, Hong N H, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics[J]. *Journal of Cell Biology*, 2016, 214(2): 197–213.
- [20] 余会芳, 徐倩倩, 刘龔, 等. 金刚烷胺和硒代蛋氨酸联合处理对猪卵母细胞与早期胚胎中猪圆环病毒 2 型复制的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2026, 57(1): 92–99.
- Yu H F, Xu Q Q, Liu Y, et al. Effects of combined treatment with amantadine and selenomethionine on porcine circovirus type 2 replication in porcine oocytes and early embryos[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2026, 57(1): 92–99 (in Chinese with English abstract).
- [21] Traikov S, Stange C, Wassmer T, et al. Septin6 and Septin7 GTP binding proteins regulate AP-3- and ESCRT-dependent multivesicular body biogenesis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e109372.
- [22] Tamai K, Shiina M, Tanaka N, et al. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway[J]. *Virology*, 2012, 422(2): 377–385.
- [23] Lewy T G, Offerdahl D K, Grabowski J M, et al. PERK-mediated unfolded protein response signaling restricts replication of the tick-borne flavivirus Langat virus[J]. *Viruses*, 2020, 12(3): 328.
- [24] Weed S A, Karginov A V, Schafer D A, et al. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex[J]. *Journal of Cell Biology*, 2000, 151(1): 29–40.
- [25] Foo K Y, Chee H Y. Interaction between flavivirus and cytoskeleton during virus replication[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015(1): 427814.

责任编辑: 周广礼