·论著·

纳尔逊海湾病毒感染小鼠巨噬细胞RAW264.7的转录物组分析

马竹萍[1],陈淼娟[2],孙绿茵[1],付纹瑞[1],田晶[1],李永刚[1],陶晓莉[1,3]
(1.锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室,辽宁 锦州 121001;2.通用技术辽油宝石花医院心内科,辽宁 盘锦 124000;3.锦州医科大学人畜共患病防控协同创新中心,辽宁 锦州 121001)

摘要 目的 通过分析纳尔逊海湾病毒(NBV)感染小鼠巨噬细胞RAW264.7转录物组测序结果,筛选差异表达基因,探讨固有免疫应答在呼肠孤病毒感染中的作用机制。**方法** 用感染复数为30的NBV-Miyazaki病毒株感染小鼠巨噬细胞RAW264.7,运用高通量转录物组测序技术,以$q<0.05$且$|\log_2FC|\geq1$为条件,筛选感染组和对照组的差异表达基因,利用基因本体论(GO)和京都基因和基因组数据库(KEGG)对差异表达基因进行富集分析。**结果** 与对照组相比,感染组差异表达的基因共442个,其中显著上调的基因381个,显著下调的基因61个。差异表达基因在GO富集中主要与固有免疫反应、对病毒的防御反应、细胞因子的产生以及细胞对细胞因子刺激的反应等功能相关,在KEGG中主要富集到Toll样受体信号通路、维甲酸诱导基因Ⅰ样受体信号通路、PI3K/Akt等信号通路。**结论** RAW264.7细胞被NBV-Miyazaki病毒感染后,可以通过激活模式识别受体,促进细胞因子、趋化因子和其他免疫相关因子释放,增强抗体依赖细胞介导的细胞毒作用,以发挥免疫效应,为探究固有免疫在NBV-Miyazaki病毒感染过程中的作用机制提供了理论依据。

关键词 纳尔逊海湾病毒;巨噬细胞;转录物组
中图分类号 R373.1 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)04-0340-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250409.1641.004
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.04.010

Transcriptome analysis of murine RAW264.7 macrophages infected with Nelson Bay virus

MA Zhuping[1],CHEN Miaojuan[2],SUN Lüyin[1],FU Wenrui[1],TIAN Jing[1],LI Yonggang[1],TAO Xiaoli[1,3]
(1.Department of Pathogen Biology,School of Basic Medicine,Jinzhou Medical University,Jinzhou 121001,China;2.Department of Cardiology,General Technology Panjin Liaoyou Petroflower Hospital,Panjin 124000,China;3.Collaborative Innovation Center for Prevention and Control of Zoonoses,Jinzhou Medical University,Jinzhou 121001,China)

Abstract Objective To analyze the transcriptome sequencing results of Nelson Bay virus (NBV)-infected murine RAW264.7 macrophages,and to screen for differentially expressed genes (DEGs) to provide a theoretical basis for exploring the mechanism of innate immune response in reovirus infection. **Methods** RAW264.7 cells were infected with the NBV-Miyazaki virus strain at a multiplicity of infection (MOI) of 30. We used transcriptome sequencing technologies,with $q<0.05$ and $|\log_2FC|\geq1$,for screening the DEGs in the infection and control groups. The Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databases were used for enrichment analysis of DEGs. **Results** A total of 442 genes were differentially expressed in the infection group,of which 381 genes were significantly upregulated and 61 genes were significantly downregulated. In the GO analysis,the enrichment of DEGs was primarily related to the innate immune response,defense response to viruses,cytokine production,and cell response to cytokine stimulation. In the KEGG analysis,the enrichment of DEGs were primarily related to the Toll-like receptor,retinoid acid inducible gene Ⅰ-like receptor,PI3K/Akt,and other signaling pathways. **Conclusion** RAW264.7 macrophages infected with the NBV-Miyazaki virus can activate pattern recognition receptors; promote the release of cytokines,chemokines,and other immune-related factors; and enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to exert an immune effect. This study provides a theoretical basis for exploring the mechanisms of innate immunity during NBV-Miyazaki virus infection.

Keywords Nelson bay virus; macrophage; transcriptome

纳尔逊海湾病毒(Nelson Bay virus,NBV)属于呼肠孤病毒科,正呼肠孤病毒属,可以编码分节段的双链RNA。最初NBV是从澳大利亚果蝠中分离出来的,2007年有研究[1-2]从急性呼吸道疾病患者体内分离出NBV,并命名为Miyazaki-Bali/2007(MB)。致

基金项目: 辽宁省科学技术计划(2022-BS-320);辽宁省教育厅高校基本科研项目(24100200014)
作者简介: 马竹萍(1999-),女,硕士研究生.
通信作者: 陶晓莉,E-mail:420391072@qq.com
收稿日期: 2024-04-12
网络出版时间: 2025-04-10 10:49:46

病性NBV能引起严重的固有免疫应答，患者出现急性呼吸道和肠道炎症，包括发热、咳嗽、咽喉炎、腹痛、水样腹泻和呕吐等。目前，在我国云南省采集的吸血蝙蝠蝇和果蝠的样本中分离出了千余株NBV变异株[3]。虽然我国尚未发现人群感染病例，但NBV今后有可能变异，成为人类感染的另一种新兴传染病病毒。

固有免疫反应是抗病毒感染第一道防线的重要组成部分，感染早期快速的固有免疫应答能有效控制病毒对宿主细胞的感染及其复制[4]。而巨噬细胞作为固有免疫系统重要的专职吞噬细胞，是研究细胞吞噬和细胞免疫的重要对象，不仅可以通过模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）级联信号通路放大免疫反应，发挥抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用清除感染颗粒[5]，还可以调节细胞因子的分泌，使免疫介导的损伤与组织修复处于平衡状态。巨噬细胞的免疫调节在防御病毒感染方面发挥至关重要的作用。

本研究使用NBV-Miyazaki病毒株感染小鼠巨噬细胞RAW264.7，进行高通量转录物组测序分析，筛选差异表达基因，分析其参与的信号通路，了解该病毒感染宿主细胞后产生的免疫应答反应，为研究其感染机制和巨噬细胞抗病毒感染的免疫调控机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　细胞、毒株和主要试剂

小鼠巨噬细胞RAW264.7，购自中国科学院细胞资源中心；NBV-Miyazaki病毒株，由本课题组前期通过反向遗传学技术制备[6]；DMEM培养基、胎牛血清、牛血清白蛋白，购自美国Gibco公司；TRIzol Universal总RNA提取试剂，购自天根生化科技（北京）有限公司。

1.2　病毒感染实验

将对数生长期的RAW264.7细胞铺于6孔板中，当细胞汇合率达到80%~90%时，分别用感染复数（multiplicity of infection，MOI）为10、30、50的NBV-Miyazaki感染巨噬细胞（MOI 10组、MOI 30组、MOI 50组），对照组加入相同体积的纯培养基。37 ℃、5%CO_2孵育1 h后，弃去病毒液，加入含1%牛血清白蛋白、1%双抗、0.1%TPCK的维持液培养48 h。

1.3　高通量转录物组测序样本的制备

将不同MOI值NBV-Miyazaki感染的RAW264.7细胞用TRIzol法提取RNA，使用PrimeScript™ RT reagent试剂盒反转录成cDNA，以其为模板按照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书进行实时定量PCR，检测RAW264.7细胞产生免疫因子的水平。选取最适MOI值即MOI 30的NBV-Miyazaki感染RAW264.7细胞作为感染组，提取感染组和对照组RNA后用液氮保存，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行转录物组测序。

1.4　差异表达基因统计

采用R语言DESeq2包对差异表达基因进行分析，主要分为3个部分：首先，对reads计数进行标准化；然后，根据模型进行假设检验概率（*P*值）计算；最后，进行多重假设检验校正，得到*q*值（校正后的*P*值）。差异表达基因的判定标准为$q<0.05$，不同处理组间差异表达基因的变化情况以$\log_2$FC表示。若$\log_2\text{FC}>0$，认为该基因上调；若$\log_2\text{FC}<0$，认为该基因下调。显著差异表达基因的筛选标准为$|\log_2\text{FC}|\geq 1$且$q<0.05$。

1.5　差异表达基因的基因本体论（Gene Ontology，GO）富集分析

GO是一个国际标准化的基因功能分类体系，共有3个本体，分别描述基因的分子功能、细胞组分以及参与的生物学过程。筛选出差异表达基因后，进行GO注释，以研究差异表达基因在注释功能中的分布状况，阐明样本差异在基因功能上的体现。根据GO注释统计每个条目的基因数，应用超几何检验，找出与整个基因组背景相比在差异表达基因中显著富集的GO条目。

1.6　差异表达基因的京都基因和基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析

对KEGG中每个通路，应用超几何检验进行富集分析，找出差异表达基因中显著富集的通路。以$q<0.05$为阈值，筛选满足此条件的通路，为在差异表达基因中显著富集的通路。

1.7　实时定量PCR验证

选取与免疫、抗病毒相关的5个差异表达基因，通过在线网站（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/）设计引物。引物序列：*INF-β*，正向5'- GCCTTTGCCATCCAA

GAGATGC-3’，反向5’- ACACTGTCTGCTGGTGGAG TTC -3’；*TLR3*，正向5’- GTCTTCTGCACGAACCTG ACAG -3’，反向5’- TGGAGGTTCTCCAGTTGGACCC-3’；*SYK*，正向5’- GAGAGCACTGTGTCCTTCAACC-3’，反向5’- CAGCATAAGGGCTCTCGTACAC -3’；*IL-17RA*，正向5’- CTGTATGACCTGGAGGCTTTCTG-3’，反向5’- CGAGTAGACGATCCAGACCTTC -3’；*EGFR*，正向5’- GGACTGTGTCTCCTGCCAGAAT-3’，反向5’- GGCAGACATTCTGGATGGCACT -3’；*GAPDH*，正向5’- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3’，反向5’- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3’。分别提取感染组和对照组的细胞总RNA，反转录成cDNA后进行实时定量PCR检测，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各mRNA的相对表达量。

1.8　统计学分析

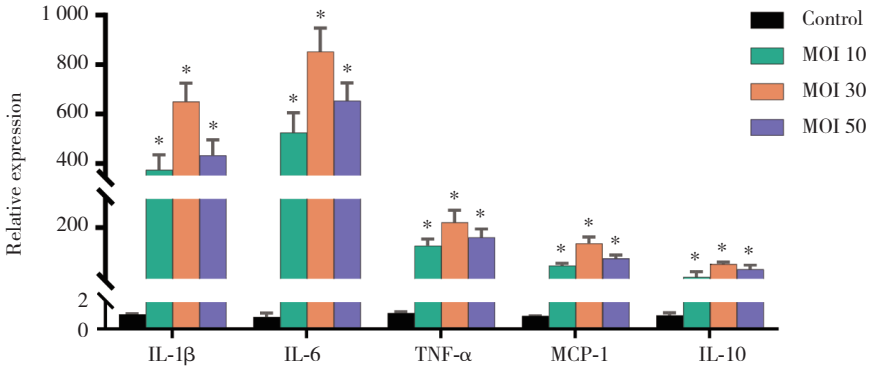
应用GraphPad Prism 10.1.2软件统计数据并绘图。计量资料用$\bar{x} \pm s$表示，2组比较采用独立样本t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　NBV-Miyazaki最适MOI值

与对照组相比，MOI 10组、MOI 30组、MOI 50组IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1和IL-10水平均显著升高（$P<0.001$），且MOI 30组促炎性细胞因子IL-1β、IL-6、TNF-α和MCP-1以及抗炎细胞因子IL-10分泌水平最高，巨噬细胞呈现的免疫效应最强。见图1。因此，后续实验采用MOI 30感染RAW264.7细胞。

2.2　细胞形态学变化



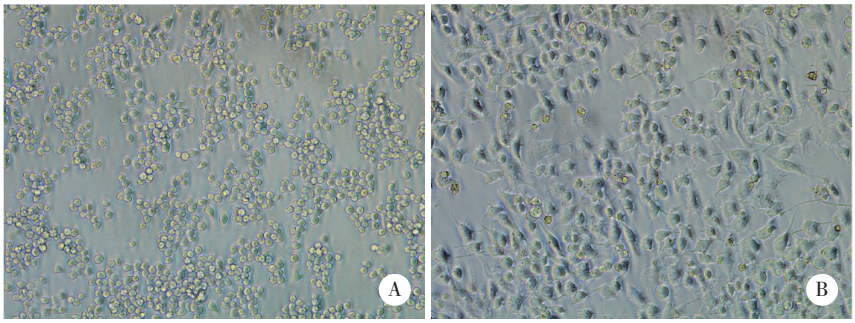
*$P<0.001$ vs. control group.

图1　不同MOI对RAW264.7细胞免疫功能的影响

Fig.1　Effect of different MOIs on the immune function of RAW264.7 macrophages

倒置显微镜下观察，对照组RAW264.7细胞多呈圆形、类圆形，透亮状，感染组细胞为不规则形并伸出伪足，胞质内出现些许空泡和颗粒状物质。见图2。提示NBV-Miyazaki感染RAW264.7细胞后，细胞发生明显变化。

2.3　差异表达基因富集分析



A，control group；B，infection group.

图2　倒置显微镜下RAW264.7细胞的形态学变化 ×200

Fig.2　Morphological changes of RAW264.7 cells observed using an inverted microscope ×200

与对照组相比，感染组共鉴定出442个差异表达基因，其中381个基因显著上调，61个基因显著下调。

2.3.1　GO富集分析：在注释到GO数据库的差异表达基因中，生物学过程差异表达基因显著富集在免疫系统过程；细胞组分差异表达基因主要富集在细胞表面；分子功能差异表达基因主要富集在核苷结合功能。见图3。结果提示，RAW264.7细胞被NBV-Miyazaki感染后，主要通过发挥促进细胞因子释放等免疫效应和抗病毒反应来抵御病毒入侵。

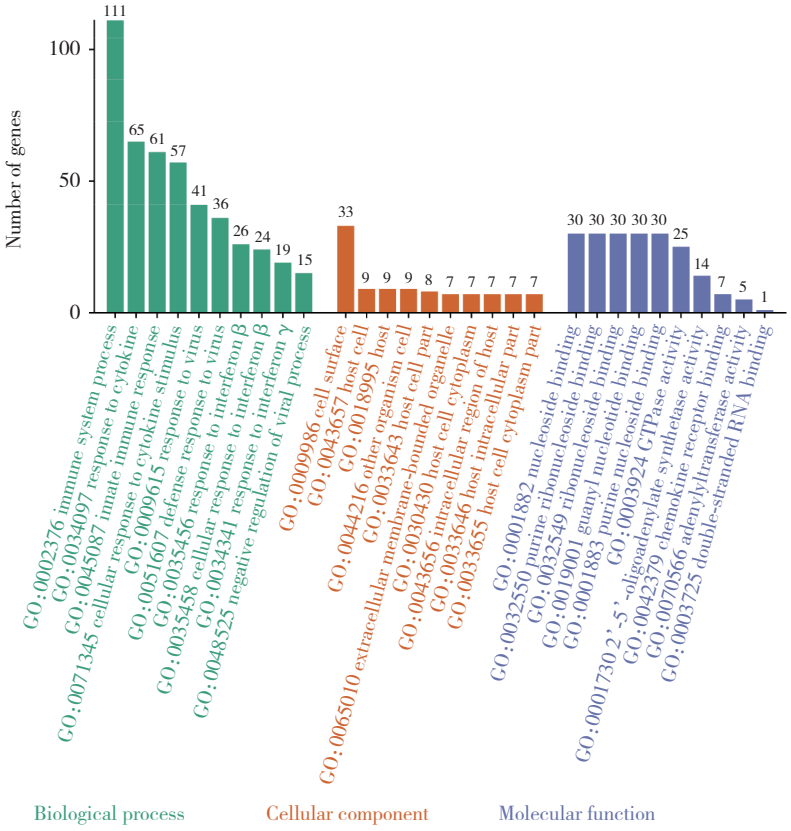


图3　GO富集分析

Fig.3　GO enrichment analysis

2.3.2　KEGG富集分析：KEGG信号通路富集分析显示，Toll样受体信号通路、维甲酸诱导基因Ⅰ样受体信号通路、细胞质DNA-感知通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路是富集到上调的差异表达基因最多的5个信号通路（图4A）；磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidyl inositol-3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路和补体与凝血级联信号通路是富集到下调的差异表达基因最多的2个信号通路（图4B）。这些结果为细胞抗NBV的天然免疫应答研究提供了理论基础。

2.4　实时定量PCR验证

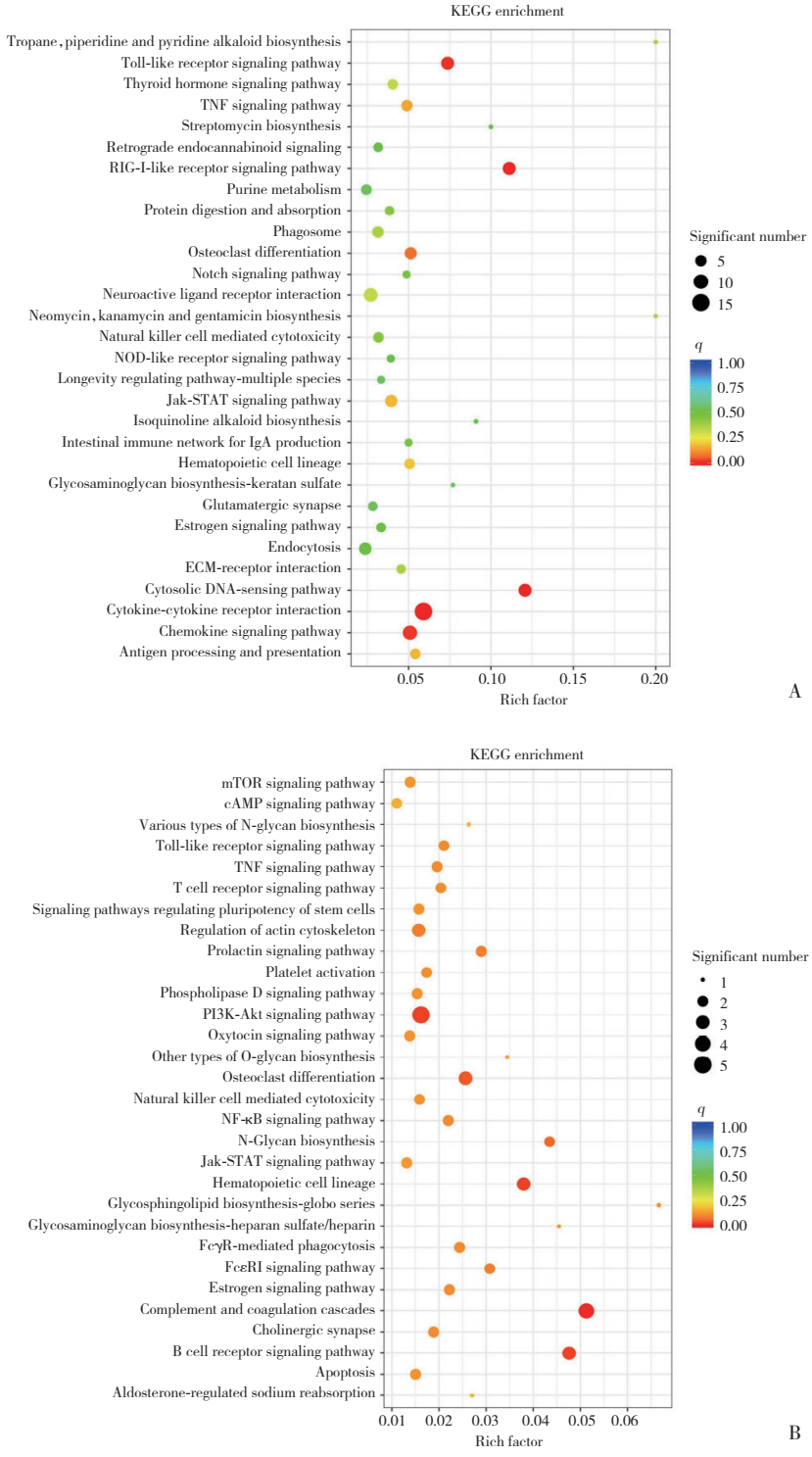
为了验证转录物组测序结果的可靠性，选取5个差异表达基因进行实时定量PCR验证，结果显示，*IFN-β*、*EGFR*、*TLR3*基因表达水平上调，*IL-17RA*、*SYK*基因表达水平下调，与测序结果的变化趋势基本一致。见图5。

3　讨论

本研究分析了NBV-Miyazaki病毒株感染RAW264.7细胞48 h后感染组与对照组的差异表达基因，GO和KEGG富集分析发现，差异表达基因主要与受体活性、细胞迁移和凋亡、信号转导、免疫系统等功能相关，富集到KEGG通路的主要有Toll样受体信号通路、维甲酸诱导基因Ⅰ样受体信号通路、细胞质DNA-感知通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、PI3K/Akt信号通路和补体与凝血级联信号通路等。结果提示，NBV-Miyazaki感染RAW264.7细胞后，可以通过激活PRR，

促进细胞因子、趋化因子和其他免疫相关因子的释放，增强抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用（antibody-dependent cell cytotoxity，ADCC），进而提高RAW264.7细胞的固有免疫应答发挥抗病毒效应。

研究发现，在病原微生物感染过程中，其核酸或蛋白等成分会激活细胞内的PRR，如TLR3，TLR3信号通路的激活会进一步促进EGFR的表达[7]，使固有免疫反应在宿主防御中于感染的早期阶段发挥直接作用[8-9]。此外，PRR的活化可以触发信号级联反应，调控多种宿主防御分子的产生。



A，enriched KEGG pathway of upregulated DEGs；B，enriched KEGG pathway of downregulated DEGs.

图4　差异表达基因显著富集KEGG通路

Fig.4　KEGG pathways significantly enriched for differentially expressed genes

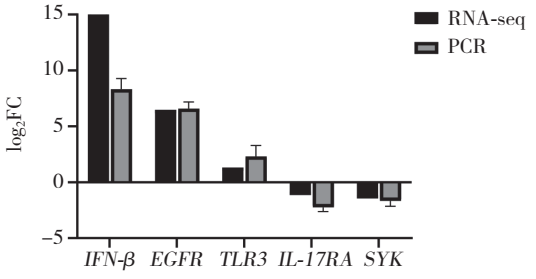


图5　实时定量PCR验证差异表达基因

Fig.5　Validation of differentially expressed genes using quantitative real-time PCR

IFN-β是一种重要的抗病毒细胞因子，病毒感染时（如轮状病毒[10]、牛病毒[11]等）会刺激细胞内的相关信号通路，导致*IFN-β*基因表达上调。随着免疫反应的推进，IL-10等具有抑制炎症作用的细胞因子被分泌，可能会产生负反馈调节机制。研究[12-13]表明，*IL-17RA*、*SYK*等基因的表达下调正是这种负反馈调节的结果。此外，NBV-Miyazaki作为抗原以及与PRR结合后促使RAW264.7细胞产生的细胞因子和趋化因子等，会进一步激活PI3K/Akt信号通路和补体与凝血级联信号通路，通过一系列复杂反应，引起溶菌作用、吞噬作用、趋化作用和天然免疫的杀菌作用等调节广泛的细胞过程，维持NBV-Miyazaki感染引起的免疫应答平衡，为其致病机制的研究提供一定理论依据。

研究[14]表明，呼肠孤病毒可以引起ADCC增强。自然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等表达的lgG Fc受体可以与已结合在病毒感染细胞和肿瘤细胞等靶细胞表面的IgG抗体的Fc段结合，促使其发挥ADCC效应，激活并杀伤靶细胞[15]。本研究中，NBV-Miyazaki感染RAW26.7细胞差异表达基因富集到FcγR介导的吞噬作用通路，提示细胞编码的*FcγRⅠ*和*FcγRⅢ*基因表达增加，可能导致其ADCC效应增强，进而激活RAW264.7细胞的免疫系统过程，促使其发挥迁移、生物黏附和细胞杀伤等效应，放大信号传导等生物过程。

综上所述，本研究采用转录物组测序技术分析了NBV-Miyazaki病毒株感染RAW264.7细胞后富集在免疫应答、抗病毒相关通路中的部分差异表达基因，这些差异表达基因可能与NBV-Miyazaki的致病机制或细胞的抗病毒反应有关。这将为研究NBV-Miyazaki感染引起的免疫应答机制提供一定的理论基础，为呼肠孤病毒的防治提供新的研究方向。

参考文献：

[1] YAMANAKA A，IWAKIRI A，YOSHIKAWA T，et al. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus [J]. PLoS One，2014，9 (3)：e92777. DOI：10.1371/journal.pone.0092777.

[2] VOON K，TAN YF，LEONG PP，et al. Pteropine orthoreovirus infection among out-patients with acute upper respiratory tract infection in Malaysia [J]. J Med Virol，2015，87 (12)：2149-2153. DOI：10.1002/jmv.24304.

[3] KUANG G，XU Z，WANG J，et al. Nelson bay reovirus isolated from bats and blood-sucking arthropods collected in Yunnan Province，China [J]. Microbiol Spectr，2023，11 (4)：e0512222. DOI：10.1128/spectrum.05122-22.

[4] GAUTHIER T，CHEN W. Modulation of macrophage immunometabolism：a new approach to fight infections [J]. Front Immunol，2022，13：780839. DOI：10.3389/fimmu.2022.780839.

[5] KOHRT HE，HOUOT R，MARABELLE A，et al. Combination strategies to enhance antitumor ADCC [J]. Immunotherapy，2012，4 (5)：511-527. DOI：10.2217/imt.12.38.

[6] TAO XL，ZHAO W，TONG W，et al. The effects of autophagy on the replication of Nelson Bay orthoreovirus [J]. Virol J，2019，16 (1)：90. DOI：10.1186/s12985-019-1196-7.

[7] ZHANG X，CHEN C，LING C，et al. EGFR tyrosine kinase activity and Rab GTPases coordinate EGFR trafficking to regulate macrophage activation in sepsis [J]. Cell Death Dis，2022，13 (11)：934. DOI：10.1038/s41419-022-05370-y.

[8] CARTY M，GUY C，BOWIE AG. Detection of viral infections by innate immunity [J]. Biochem Pharmacol，2021，183：114316. DOI：10.1016/j.bcp.2020.114316.

[9] JI J，RAO Y，WAN Q，et al. Teleost-specific TLR19 localizes to endosome，recognizes dsRNA，recruits TRIF，triggers both IFN and NF-κB pathways，and protects cells from grass carp reovirus infection [J]. J Immunol，2018，200 (2)：573-585. DOI：10.4049/jimmunol.1701149.

[10] HOLLOWAY G，COULSON BS. Innate cellular responses to rotavirus infection [J]. J Gen Virol，2013，94 (Pt 6)：1151-1160. DOI：10.1099/vir.0.051276-0.

[11] GENG Y，JIANG C，YANG H，et al. Construction of an IFNAR1 knockout MDBK cell line using CRISPR/Cas9 and its effect on bovine virus replication [J]. Front Immunol，2024，15：1404649. DOI：10.3389/fimmu.2024.1404649.

[12] KUTWIN M，MIGDALSKA-SĘK M，BRZEZIAŃSKA-LASOTA E，et al. An analysis of IL-10，IL-17A，IL-17RA，IL-23A and IL-23R expression and their correlation with clinical course in patients with psoriasis [J]. J Clin Med，2021，10 (24)：5834. DOI：10.3390/jcm10245834.

[13] YIN H，ZHOU H，KANG Y，et al. Syk negatively regulates TLR4-mediated IFNβ and IL-10 production and promotes inflammatory responses in dendritic cells [J]. Biochim Biophys Acta，2016，1860 (3)：588-598. DOI：10.1016/j.bbagen.2015.12.012.

[14] LONG S，GU Y，AN Y，et al. Reovirus enhances cytotoxicity of natural killer cells against colorectal cancer via TLR3 pathway [J]. J Transl Med，2021，19 (1)：185. DOI：10.1186/s12967-021-02853-y.

[15] BHATNAGAR N，AHMAD F，HONG HS，et al. FcγRⅢ (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and FcγRⅡ (CD32) [J]. Eur J Immunol，2014，44 (11)：3368-3379. DOI：10.1002/eji.201444515.

（编辑　陈　姜）