DOI:10.16016/j.1000-5404.202009104

肠道病毒 D68 型感染前后转录组分析及差异表达基因的验证

唐 霞,司俊卓,卢 楠,何永林,徐 蕾,包嘉佳,唐佳玲,杨 春 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病原微生物学教研室

[摘要] **目的** 探讨肠道病毒 D68 型(enterovirus D68, EV-D68)感染前后宿主细胞转录组的表达变化,寻找与 EV-D68 感染的相关基因及信号通路,为初步探索 EV-D68 的感染机制奠定基础。**方法** 将病毒以感染复数(multiplicity of infection,MOI)0.01 接种于人横纹肌瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞,24 h 后提取感染组和对照组细胞总 RNA 进行转录组测序,筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),对其进行 GO 和 KEGG 富集分析,并用 RT-qPCR 验证 8 个主要差异表达的基因(*EGR*1、*c-fos*、*ZNF*625、*ARRDC*3、*c-jun*、*ASNS*、*CHAC*1、*ADM*2)。**结果** 从测序结果中共筛选出差异表达两倍以上的基因 140 个,其中上调基因 71 个,下调基因 69 个。GO 功能富集分析结果主要涉及离子的调控与应答;KEGG 富集分析结果主要与甲状旁腺激素的合成分泌和作用、GnRH 信号通路、Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路和 MAPK 信号通路等有关。RT-qPCR 验证结果表明选取的 8 个基因上调或下调的差异表达倍数趋势与测序结果基本一致,*c-fos* 和 *c-jun* 的表达量随病毒 MOI 及感染时长的增加而增加。**结论** 通过对差异表达基因的功能和信号通路富集分析及验证,EV-D68 加重哮喘的机制可能与 *c-fos* 上调有关;而 MAPK 信号通路可能在 EV-D68 感染期间发挥促炎作用和抗病毒作用。

[关键词] EV-D68;转录组测序;差异表达基因
[中图法分类号] R373.2; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Transcriptome analysis and verification of differentially expressed genes before and after enterovirus D68 infection

TANG Xia, SI Junzhuo, LU Nan, HE Yonglin, XU Lei, BAO Jiajia, TANG Jialing, YANG Chun Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To detect the alterations of the transcriptome in host cells infected by enterovirus D68 (EV-D68) and look for the genes involved in its infection so as to lay a foundation for the preliminary exploration of the infection mechanism. **Methods** The virus was inoculated into human rhabdomyosarcoma (RD) cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. After 24 h, RNA was extracted from the infected RD cells and control cells for transcriptome sequencing. Differentially expressed genes (DEGs) were screened and analyzed by using Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. Eight DEGs, *EGR*1, *c-fos*, *ZNF*625, *ARRDC*3, *c-jun*, *ASNS*, *CHAC*1 and *ADM*2 were validated by RT-qPCR. **Results** A total of 140 genes with at least 2-fold changes at expression level were identified from the sequencing results, of which 71 were up-regulated and 69 were down-regulated. The results of GO functional enrichment analysis mainly involved the regulation and response to ions while the results of KEGG enrichment analysis mainly related to parathyroid hormone synthesis, secretion and action, IL-17 and GnRH signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, and MAPK signaling pathway and so on. The RT-qPCR results showed that the trend of fold change of expression in the selected 8 genes was basically consistent with the sequencing results, and the expression

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2016jcyjA0212)
[通信作者] 杨 春,E-mail:yangchunim@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

levels of *c-fos* and *c-jun* were increased with the increase of virus MOI and infection duration. **Conclusion** By validating and using the functional and enrichment analysis, we infer that the mechanism of EV-D68 exacerbating asthma may be related to the up-regulation of *c-fos*, and MAPK signaling pathway may play a pro-inflammatory and antiviral role during EV-D68 infection.

[**Key words**] EV-D68; transcriptome sequencing; differentially expressed genes

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2016jcyjA0212). Corresponding author: YANG Chun, E-mail: yangchunim@163.com.

肠道病毒 D68 型(enterovirus D68, EV-D68)是一种小 RNA 病毒,原名为鼻病毒 87 型,后归于肠道病毒属 D 组,多感染儿童,最早于 1962 年在美国加利福尼亚地区的 4 名呼吸道感染患儿呼吸道标本中被分离出[1]。在被发现之后的几十年里 EV-D68 感染病例散发且鲜有报道,一直被认为是一种边缘性病原体而不受关注。2014 年美国出现了一次 EV-D68 的大流行,共有 1 153 人被感染并多伴有严重的呼吸道症状[2],后来的许多回顾性研究表明,在同一时期欧洲也存在很高的 EV-D68 感染率[3],此后 EV-D68 才逐渐被引起重视。

目前关于 EV-D68 的研究多集中在流行病学,其生物学特征及其致病机理尚不完全清楚,与其他肠道病毒不同,EV-D68 主要引起呼吸系统疾病,严重者可出现呼吸困难、血氧不足等情况[4]。有研究表明 EV-D68 的感染与哮喘发病率有密切联系[5]。此外 EV-D68 也会导致中枢神经系统疾病急性弛缓性麻痹、急性无力脊髓炎(acute flaccid myelitis,AFM)的发生,严重危害公众健康[6]。但目前还没有针对 EV-D68 的有效抗病毒药物和疫苗。本研究通过对感染 EV-D68 前后的宿主细胞进行转录组测序,分析验证转录组表达谱差异,寻找参与感染发生的相关基因及其信号通路的作用等,为进一步探讨其致病机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与病毒感染

人横纹肌瘤(rhahdomyoma, RD)细胞购于北纳生物;EV-D68 选用原始 Fermon 毒株, 由本实验室保存。将 RD 细胞培养在含 10%胎牛血清(Hyclone)和 1%青-链霉素(碧云天)的 DMEM 细胞培养基(Hyclone)中。在 37 ℃和 5% CO_2 的条件下培养至细胞融合度达 80%~90%时,再将培养基更换为含 2%血清的培养基。然后将病毒接种到 RD 细胞中,感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.01,对照组不加病毒,每组 3 个生物重复,24 h 后收获细胞。

1.2 RNA 抽提

根据说明书,使用 TRIzol 试剂(Invitrogen)从每组细胞中提取总 RNA,去除基因组 DNA,在测序之前,使用 1%琼脂糖凝胶电泳、2100 Bioanalyser (Agilent)及 ND-2000 (NanoDrop Technologies)检测 RNA 的浓度和完整性。$D(260)/D(280)=1.8\sim2.2$,$D(260)/D(230)\geq2.0$,RIN≥7,28S:18S≥1.0,总量>2 μg 为合格样本。

1.3 文库构建及测序

按照说明书使用 TruSeqTM RNA(Illumina, San Diego, CA)试剂盒,加入 1 μg 总 RNA 进行文库构建。首先,通过带有 oligo(dT)的磁珠从总 RNA 中富集带有 poly-A 尾的 mRNA,然后通过片段化缓冲液进行片段化,再使用 SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit (Invitrogen, CA)试剂盒和随机引物(Illumina)合成双链 cDNA。随后根据 Illumina 的文库构建方案对合成的 cDNA 进行末端修复,并在 3′末端加上一个 A 碱基。使用 Phusion DNA 聚合酶(NEB)进行 PCR 扩增 15 个 PCR 循环后筛选出大小为 200~300 bp 的条带,用 TBS380 定量后,使用 Illumina HiSeq xten/NovaSeq 6000 测序仪(2×150 bp 读取长度)进行测序。

1.4 测序数据的处理与分析

1.4.1 原始数据质控及序列比对分析

使用软件 SeqPrep(https://github.com/jstjohn/SeqPrep)和 Sickle(https://github.com/najoshi/sickle)对原始测序数据进行质控(quality control, QC),QC 包括去除 reads 中的接头序列和没有插入片段的 reads;去除 3′端质量值<20 和剩余序列中质量值<10 的碱基;去除含模块碱基的 reads 以及舍弃去 adapter 及质量修剪后长度<30 bp 的序列。质控完成后再使用 HISAT2 软件,将质控后的原始数据与人类参考基因组 GRCh38 进行比对,获得用于后续转录本组装、表达量计算等的 mapped reads,比对完成后对该次转录组测序的比对结果进行质量评估。

1.4.2 表达量差异分析及 GO、KEGG 富集分析

使用表达定量软件 RSEM(http://deweylab.github.io/RSEM/)对基因的表达水平进行定量分析,并采用对基因长度和测序深度进行了均一化的 TPM(Transcripts Per Million reads)作为定量指标,使得不同样本中的总表达量一致,可更直观地比较基因间表达量。使用基于负二项分布的 DESeq2 软件对标准化后的数据进行分析,以 $P<0.05$ 且 $|\log2FC|\geq1$ 为标准筛选出差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。

筛选完成后再对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 途径富集分析。GO 分析主要涵盖生物过程(biological process, BP),分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)三个部分。KEGG 可将差异表达基因按照参与的通路或行使的功能分类并统计。以 $P<0.05$ 为标准进行功能富集分析。

1.5 RT-qPCR 验证

从测序结果中随机选取 8 个 TPM>5 的差异表达基因进行 RT-qPCR 验证。其中上调基因包括 *EGR*1、*c-fos*、*ZNF*625、*ARRDC*3、*c-jun*;下调基因包括 *ASNS*、*CHAC*1、*ADM*2。用 RNA 快速提取试剂盒(上海奕杉生物)分别提取对照组和 EV-D68 感染组细胞的总 RNA,再使用反转录试剂盒(TaKaRa)将 RNA 反转录成 cDNA。随后以此为模板根据 SYBR Green PCR Master Mix(Bimake)试剂盒说明书进行 RT-qPCR 实验,每组 3 个生物重复。使用 Oligo7 软件根据选定基因的序列设计特异性引物并用 NCBI Primer-BLAST 和融解曲线对引物特异性进行评价,挑选出合格的引物进行实验(表 1)。实验采用 β-actin 为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 RT-qPCR 结果进行分析,并与转录组测序结果相关基因表达量进行比较。

1.6 统计学分析

实验数据使用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 转录组测序数据统计

各样本测序获得总读数(raw reads)有 44 509 264~65 693 118 个,经过质控后剩余的读数(clean reads)有 4 316 446~64 996 826 个;clean reads 中 Q30 碱基百分比均≥91.15%,测序错误率控制在 0.03%以内;所有样本碱基的质量得分均为 37,且 GC 碱基所占比例均≥48.13%. 质控完成后将 clean reads 与人类参考基因组 GRCh38 进行序列比对(表 2),比对结果显示,各样本的 reads 与参考基因组的比对率在 91.99%~96.66%。

对比完成后,将比对到基因组上的 reads 分布情况进行统计(表 3),定位区域共有 5 个,分别为编码区(CDS)、内含子(intron)、基因间区(intergenic)和 5′和 3′非翻译区(UTR)。在人类参考基因组中,大部分的 reads 通常比对到 CDS 区,来源于 pre-mRNA 的残留或由可变剪切过程中发生的内含子保留事件导致的 reads 则会比对到 intron 区,而转录自新基因或新的非编码 RNA 的 reads 则会比对到 intergenic 区。

表 1 RT-qPCR 引物序列

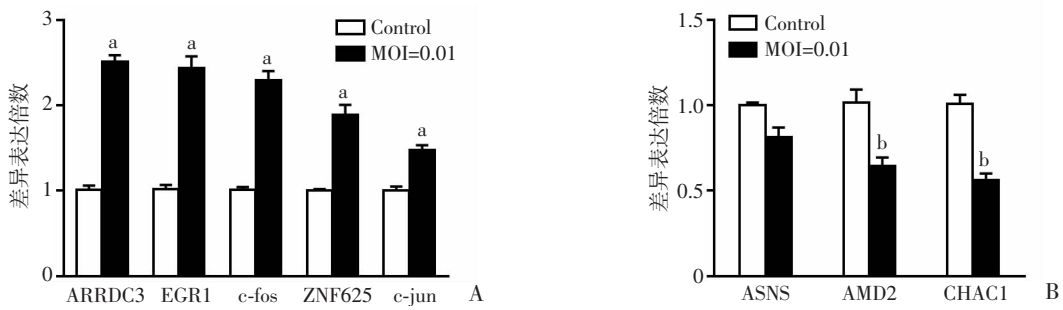
基因名称	引物序列(5′→3′)	扩增区域	产物大小/bp
*EGR*1	上游:AAGAAAAGCCAAGCAAACCAA	2430-3450	128
	下游:AACGGAACAACACTCTGACAC	2557-2537	
c-fos	上游:CCGGGGATAGCCTCTCTTACT	223-243	93
	下游:CCAGGTCCGTGCAGAAGTC	315-297	
*ZNF*625	上游:AGATTCCTAGAAGCCACCGAA	1304-1324	171
	下游:CCCCAGCTAAACTACTCCCAA	1474-1454	
*ARRDC*3	上游:AGCAGCATTTTGTTACTGACT	2266-2286	174
	下游:ACTTTTGTGTATGTCCCGTTT	2439-2419	
c-jun	上游:TCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG	1776-1796	78
	下游:CGAGTTCTGAGCTTTCAAGGT	1853-1833	
ASNS	上游:GGAAGACAGCCCCGATTTACT	1265-1285	154
	下游:AGCACGAACTGTTGTAATGTCA	1418-1397	
*CHAC*1	上游:CCCAGCCATCCATAGCCCTG	1030-1049	78
	下游:TCCTCATGCCCTACTATCCCT	1107-1087	
*ADM*2	上游:CTGAGCCCCATCTGAAGCC	818-836	112
	下游:CAGCACTGCGTGTAGACCAG	929-910	
β-actin	上游:CATTGCCGACAGGATGCAG	1008-1026	92
	下游:CGGAGTACTTGCGCTCAGGA	1099-1080	

表 2 测序样本与指定参考基因组的序列比对结果[序列数(%)]

样本名称(Sample)	总序列数(Raw reads)	质控后读数(Clean reads)	定位到基因组上的总序列数(Total mapped)	多个比对位置的序列数(Multiple mapped)	比对位置唯一的序列数(Uniquely mapped)
Infected1	44509264	43616446	40121712(91.99)	1285393(2.95)	38836319(89.04)
Infected2	57732532	57096208	53031046(92.88)	1770370(3.1)	51260676(89.78)
Infected3	56803892	56181770	52129282(92.79)	1724017(3.07)	50405265(89.72)
control1	55696854	55026242	52980860(96.28)	1811150(3.29)	51169710(92.99)
control2	62909056	62185334	59964147(96.43)	2088945(3.36)	57875202(93.07)
control3	65693118	64996826	62822701(96.66)	2127168(3.27)	60695533(93.38)

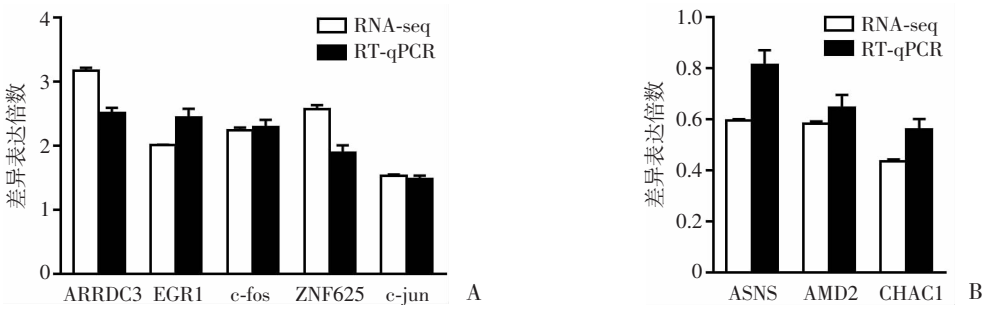
表 3　不同区域 Reads 的分布情况［序列数(%)］

样本名称	内含子区	3′非编码区	编码区	5′非编码区	基因间区
Infected1	3280097(5.54)	9170563(15.5)	43201662(73.02)	3106239(5.25)	405048(0.68)
Infected2	4304885(5.47)	11830199(15.04)	57858611(73.58)	4102487(5.22)	537301(0.68)
Infected3	4347575(5.63)	11643390(15.08)	56715571(73.46)	3956795(5.12)	547953(0.71)
control1	4510531(5.78)	11891302(15.23)	57023558(73.01)	4116075(5.27)	557367(0.71)
control2	5117151(5.77)	13141050(14.81)	65146309(73.4)	4709327(5.31)	641421(0.72)
control3	4893303(5.23)	13626435(14.55)	69606105(74.34)	4889271(5.22)	614510(0.66)



a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 control 比较 A:上调基因验证结果;B:下调基因验证结果

图 1　RT-qPCR 验证转录组结果　($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



A: 上调基因比较结果;B:下调基因比较结果

图 2　RT-qPCR 验证结果与转录组测序结果比较

2.2　RT-qPCR 验证

为了确定转录组测序结果的可靠性,本研究选取了 8 个基因进行 RT-qPCR 验证(*EGR*1、*c-fos*、*ZNF*625、*ARRDC*3、*c-jun*、*ASNS*、*CHAC*1、*ADM*2),并与转录组测序结果进行比较。RT-qPCR 实验结果表明(图 1、2),选取的 8 个基因中上调或下调的差异表达倍数趋势与测序结果基本一致,说明测序结果是可信的。

2.3　差异表达基因统计及 GO、KEGG 富集分析

数据经过定量且标准化处理后筛选出|log2FC| ≥1 的 DEGs 共 140 个,其中上调基因 71 个,下调基因 69 个(图 3)。为进一步研究这些 DEGs 的生物学功能,对其分别进行 GO 与 KEGG 富集分析。在 GO 富集分析中,显著富集到 420 个 GO terms,其中 311 个涉及 BP,28 个涉及 CC,89 个涉及 MF。显著富集的前 20 位中,18 项属于 BP 类,其中 9 个与离子的调控和应答有关,其次主要富集在血管生成负调控、细胞对 ATP 的应答、骨骼肌分化、内动力蛋白臂组装等方面。其余 2 项属于 MF 类,分别是 R-SMAD 结合及氨酰基-tRNA 编辑活性(图 4)。

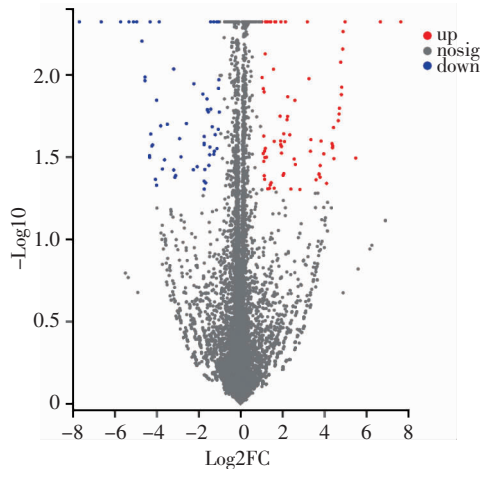


图 3　差异表达基因火山图

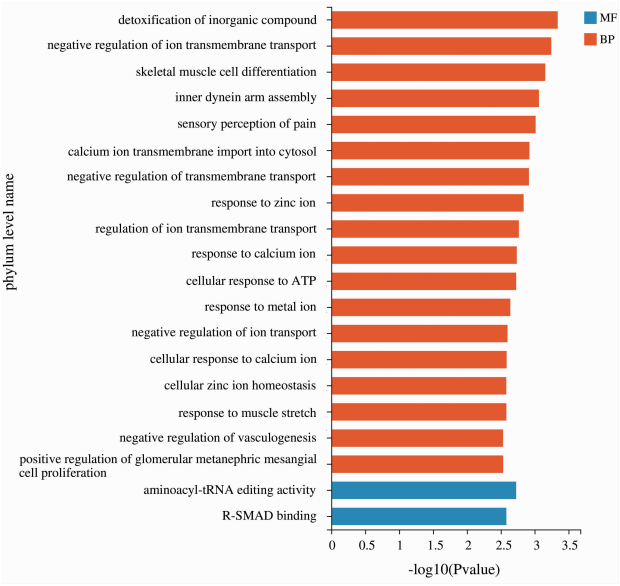


图 4　差异基因的 GO 富集分析

KEGG 富集分析结果共富集到 115 条,包括代谢(metabolize, M)、遗传信息处理(genetic Information processing, GIP)、环境信息处理(environmental information processing, EIP)、细胞过程(cellular processes, CP),生物体系统(biological system, OS)、人类疾病(human diseases, HD)等 6 大类。其中 26 条显著富集,包括甲状旁腺激素的合成分泌和作用、黑色素生成、松弛素信号通路、催乳素信号通路、矿物质吸收、GnRH 信号通路、Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路、内分泌抵抗、MAPK 信号通路等(图 5、6)。

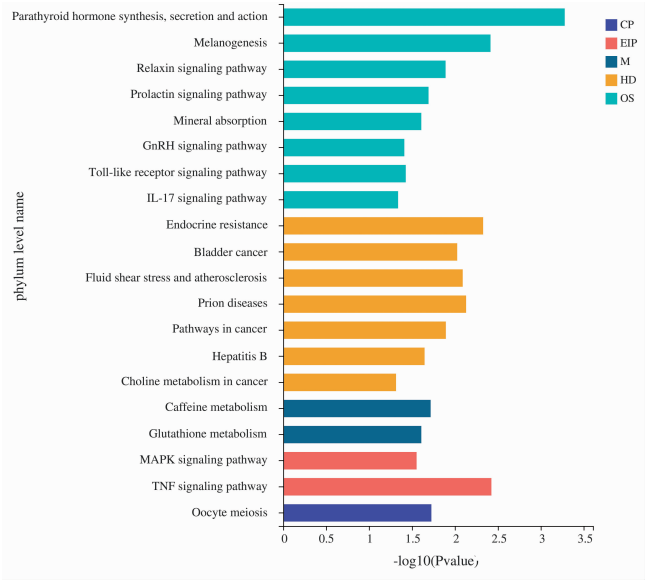
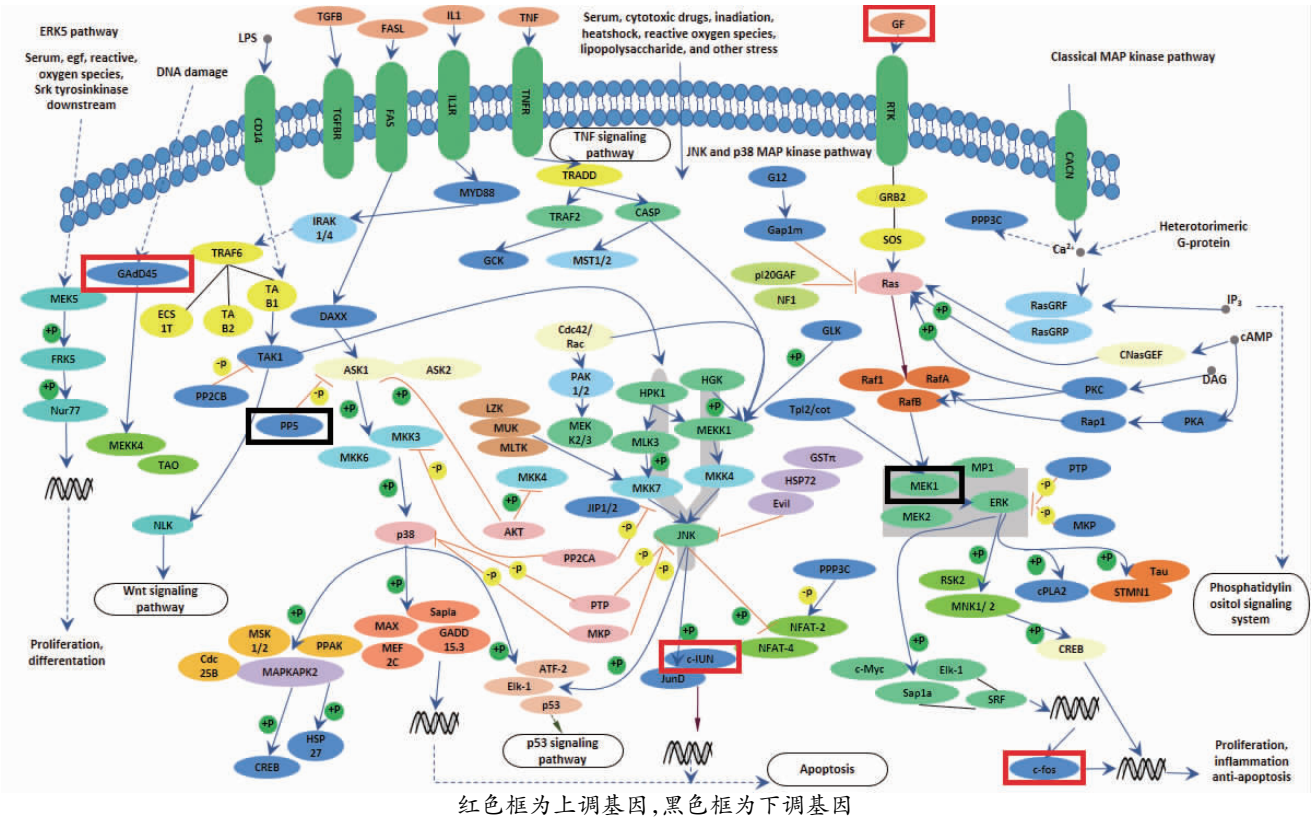


图 5　差异基因的 KEGG 富集分析

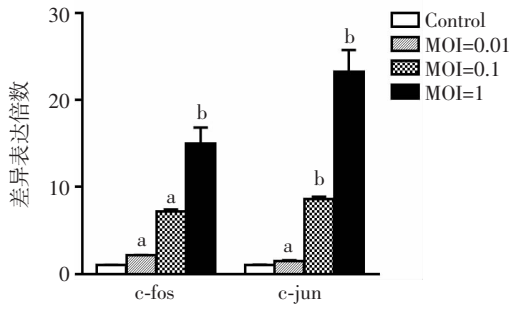


红色框为上调基因,黑色框为下调基因

图 6　MAPK 信号通路中差异表达的基因

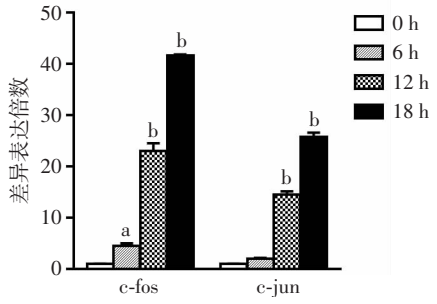
2.4 病毒感染对宿主细胞 *c-fos* 和 *c-jun* 表达的影响

为寻找参与病毒感染的基因与信号通路,我们分别以 MOI=0、MOI=0.01、MOI=0.1 和 MOI=1 等 4 个病毒量梯度感染细胞 24 h,再用 RT-qPCR 检测 MAPK 信号通路相关基因 *c-fos* 和 *c-jun* mRNA 水平表达变化,结果发现 *c-fos* 和 *c-jun* 的表达量随病毒量的增加而增加(图 7)。同时为了验证 *c-fos* 和 *c-jun* 基因与病毒感染时间的相关性,我们以 MOI=2 感染细胞,并在 0、6、12、18 h 收获细胞提取 RNA 进行 RT-qPCR 实验,结果表明 EV-D68 感染细胞后,*c-fos* 和 *c-jun* mRNA 的表达量随时间的延长而增加(图 8)。为进一步验证这种上调趋势是否只存在于 RD 细胞中,我们以 MOI=0、MOI=1、MOI=2 的感染量作用于另一种 EV-D68 的易感细胞 Hela 细胞,检测 *c-fos* 和 *c-jun* mRNA 表达水平,得到了相似的结果(图 9),说明 EV-D68 感染细胞后 *c-fos* 和 *c-jun* 的调节作用在 Hela 细胞中同样存在。



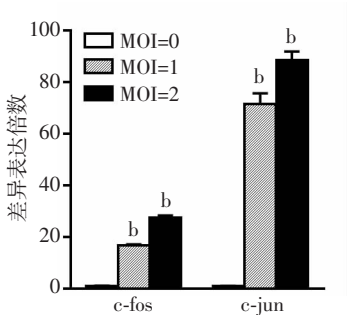
a: $P<0.01$, b: $P<0.001$, 与 control 比较

图 7 不同 MOI 处理 RD 细胞后 c-fos 和 c-jun mRNA 表达情况 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.01$, b: $P<0.001$, 与 control 比较

图 8 病毒感染不同时间 c-fos 和 c-jun mRNA 表达情况 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



b: $P<0.001$, 与 control 比较

图 9 不同 MOI 处理 Hela 细胞后 c-fos 和 c-jun mRNA 表达情况 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

虽然 EV-D68 在 1962 年就被发现,但直到 2014 年才被重视。有不少研究证明,EV-D68 的流行呈季节性且两年一爆发[7-11]。在我国 EV-D68 没有被纳入常规检测,临床上多数为对症治疗。有研究报道在我国北京、重庆、台湾等地,人群中均有较高滴度的中和抗体存在,且抗体阳性率随年龄的增长而升高[12-14]。EV-D68 易感人群为儿童,感染后轻者与感冒无异,但重者需要重症监护治疗。

哮喘是一种常见的多发性的气道慢性变态反应性炎症。越来越多的研究证明因 EV-D68 感染而需住院的患者中很大一部分有哮喘病史,且入院原因也是哮喘加重。WANG 等[15]通过统计分析发现,2018 年美国俄亥俄州哥伦布市国家儿童医院总共有 277 例因 EV-D68 感染住院的患者,其中有 146 名(53%)曾患有哮喘史;DREWS 等[16]和 MERTZ 等[17]研究报告中指出住院的 EV-D68 感染儿童中有 31%~70%有哮喘病史,而在我国台湾也有类似的报道[18];还有文献称在 74.3%的哮喘发作患者的鼻咽样本中检测到 EV-D68[19]。EV-D68 能加重哮喘或使有哮喘病史的患者复发,其机制尚不完全清楚。

目前还未见有 EV-D68 感染宿主细胞后转录组表达谱差异分析的报道。RD 细胞是 EV-D68、EV71 等新型肠道病毒感染的高效细胞[20-21],也是研究 EV-D68、EV71 等新型肠道病毒常用的经典细胞。在本研究中,通过对 EV-D68 感染前后的 RD 细胞进行转录组测序,筛选差异表达基因并对其进行 GO 和 KEGG 富集分析。在对测序结果的分析中,我们注意到一个特殊的基因 *c-fos*,它在 EV-D68 感染后是显著上调的,通过查阅文献我们发现它与哮喘有密切联系。*c-fos* 是

一种原癌基因,与细胞的生长、增殖活化有关,在正常人类细胞中可检测到极低水平的表达。DEMOLY等[22]在1992年第一次指出*c-fos*在哮喘患者支气管活检气道上皮中表达升高,在随后的研究中又发现*c-fos*的阳性反应程度与上皮细胞脱落程度成正比;LIU[23]等研究发现在大鼠肺中,c-fos蛋白的光密度与支气管肺泡灌洗液中P物质的浓度呈正相关,与血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)的浓度呈负相关,说明c-fos蛋白表达和神经肽含量与哮喘发作有关。而c-fos在哮喘患者中表达升高不止体现在呼吸系统的组织中,也有研究表明,当哮喘模型动物被致敏,中枢系统的多个区域c-fos的表达增加[24-26]。而在我们的研究中,通过RT-qPCR证实*c-fos*在EV-D68感染后表达上调,且表达量随病毒MOI的增加和感染时间的延长而增加。结合测序结果和RT-qPCR验证结果我们猜想EV-D68加重哮喘的机制有可能和上调*c-fos*有关,在接下来的实验中,我们将进一步进行探索。

除此之外,在KEGG富集分析结果中,我们重点关注到MAPK信号通路,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,它在真核生物中广泛存在,MAPK信号通路是细胞增殖、应激、炎症、分化、功能同步化、转化、凋亡等信号转导通路的共同交汇通路之一,与病毒感染相关的MAPK信号通路主要有3种,包括ERK、p38和JNK。MAPK信号通路的激活在肠道病毒71型、单纯疱疹病毒、柯萨奇病毒B3等都有报道[27-29]。此外,许多MAPK调节的促炎或抗病毒细胞因子(如IL-2,IL-6,IFN-β和TNF-α)的转录取决于转录因子NF-κB,c-fos和c-jun[30-32]。而在我们的结果中,富集到的MAPK通路中有6个基因有显著差异,包括*c-fos*、*c-jun*、*GF*、*CADD*45、*MEK*1、*pp*5(图6)。除*c-fos*外,*c-jun*的表达量也随病毒MOI的增加和感染时间的延长而增加,所以我们推断,MAPK通路有可能在EV-D68感染期间发挥促炎作用和抗病毒作用,在后续实验中我们也将进一步对其进行验证。

虽然现在EV-D68逐渐引起重视,但关于其致病机制的研究却比较少,而且目前也没有预防和治疗EV-D68感染的特效药物和疫苗。本研究通过对EV-D68感染前后的宿主细胞进行转录组测序,一共发现了140个差异表达基因,并对其进行GO和KEGG富集分析,重点关注到可能参与哮喘发病机制的*c-fos*基因,及可能在EV-D68感染期间发挥促炎作用和抗病毒作用的MAPK信号通路,在后期实验中,我们将对以上重点关注基因的功能进行深入的探讨,为EV-D68的感染机制研究奠定实验基础。

参考文献:

[1] SCHIEBLE J H, FOX V L, LENNETTE E H. A probable new human picornavirus associated with respiratory disease [J]. Am J Epidemiol, 1967, 85(2): 297-310. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120693.

[2] MIDGLEY C M, WATSON J T, NIX W A, *et al*. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation[J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(11): 879-887. DOI: 10.1016/s2213-2600(15)00335-5.

[3] POELMAN R, SCHUFFENECKER I, VAN LEER-BUTER C, *et al*. European surveillance for enterovirus D68 during the emerging North-American outbreak in 2014[J]. J Clin Virol, 2015, 71: 1-9. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.07.296.

[4] OBERSTE M S, MAHER K, SCHNURR D, *et al*. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses [J]. J Gen Virol, 2004, 85(9): 2577-2584. DOI: 10.1099/vir.0.79925-0.

[5] RAJPUT C, HAN M Y, BENTLEY J K, *et al*. Enterovirus D68 infection induces IL-17-dependent neutrophilic airway inflammation and hyperresponsiveness[J]. JCI Insight, 2018, 3(16): 1-13. DOI: 10.1172/jci.insight.121882.

[6] BOWERS J R, VALENTINE M, HARRISON V, *et al*. Genomic analyses of acute flaccid myelitis cases among a cluster in Arizona provide further evidence of enterovirus D68 role [J]. mBio, 2019, 10(1). DOI: 10.1128/mbio.02262-18.

[7] MEIJER A, BENSCHOP K S, DONKER G A, *et al*. Continued seasonal circulation of enterovirus D68 in the Netherlands, 2011-2014[J]. Euro Surveill, 2014, 19(42). DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.42.20935.

[8] KRAMER R, SABATIER M, WIRTH T, *et al*. Molecular diversity and biennial circulation of enterovirus D68: a systematic screening study in Lyon, France, 2010 to 2016[J]. Euro Surveill, 2018, 23(37). DOI: 10.2807/1560-7917.es.2018.23.37.1700711.

[9] UPRETY P, CURTIS D, ELKAN M, *et al*. Association of enterovirus D68 with acute flaccid myelitis, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2009-2018 [J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(9): 1676-1682. DOI: 10.3201/eid2509.190468.

[10] American Centers for Disease Control and Prevention: AFM investigation[EB/OL]. [2020-09-13] https://www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/afm-surveillance.html.

[11] MEYERS L, BARD J D, GALVIN B, *et al*. Enterovirus D68 outbreak detection through a syndromic disease epidemiology network[J]. J Clin Virol, 2020, 124: 104262. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104262.

[12] XIANG Z, GONZALEZ R, WANG Z, *et al*. Coxsackievirus

A21, enterovirus 68, and acute respiratory tract infection, China[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(5): 821-824. DOI: 10.3201/eid1805.111376.

[13] XIAO Q, REN L, ZHENG S, *et al*. Prevalence and molecular characterizations of enterovirus D68 among children with acute respiratory infection in China between 2012 and 2014 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16639. DOI: 10.1038/srep16639.

[14] LEE J T, SHIH W L, YEN T Y, *et al*. Enterovirus D68 seroepidemiology in Taiwan, a cross sectional study from 2017[J]. PLoS ONE, 2020, 15(3): e0230180. DOI: 10.1371/journal.pone.0230180.

[15] WANG H Y, DIAZ A, MOYER K, *et al*. Molecular and clinical comparison of enterovirus D68 outbreaks among hospitalized children, Ohio, USA, 2014 and 2018[J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(11): 2055-2063. DOI: 10.3201/eid2511.190973.

[16] DREWS S J, SIMMONDS K, USMAN H R, *et al*. Characterization of enterovirus activity, including that of enterovirus D68, in pediatric patients in Alberta, Canada, in 2014[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(3): 1042-1045. DOI: 10.1128/jcm.02982-14.

[17] MERTZ D, ALAWFI A, PERNICA J M, *et al*. Clinical severity of pediatric respiratory illness with enterovirus D68 compared with rhinovirus or other enterovirus genotypes[J]. CMAJ, 2015, 187(17): 1279-1284. DOI: 10.1503/cmaj.150619.

[18] HASEGAWA S, HIRANO R, OKAMOTO-NAKAGAWA R, *et al*. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: virus-induced asthma in Japanese children [J]. Allergy, 2011, 66(12): 1618-1620. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02725.x.

[19] PAN H H, TSAI C R, TING P J, *et al*. Respiratory presentation of patients infected with enterovirus D68 in Taiwan [J]. Pediatr Neonatol, 2020,61(2): 168-173. DOI: 10.1016/j.pedneo.2019.09.006

[20] WEI W, GUO H R, CHANG J L, *et al*. ICAM-5/telencephalin is a functional entry receptor for enterovirus D68 [J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(5): 631-641. DOI: 10.1016/j.chom.2016.09.013.

[21] LIU Y, SHENG J, BAGGEN J, *et al*. Sialic acid-dependent cell entry of human enterovirus D68[J]. Nat Commun, 2015, 6: 8865. DOI: 10.1038/ncomms9865.

[22] DEMOLY P , BASSET-SEGUIN N, CHANEZ N, *et al*. C-fos proto-oncogene expression in bronchial biopsies of asthmatics[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992, 7(2): 128-133. DOI: 10.1165/ajrcmb/7.2.128.

[23] LIU H, YANG X, HOU W. Correlation of c-fos protein expression with neuropeptide content in the lung of bronchial asthmatic rat[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(12): 8657-8665.

[24] GUO R B, SUN P L, ZHAO A P, *et al*. Chronic asthma results in cognitive dysfunction in immaturemice[J]. Exp Neurol, 2013, 247: 209-217. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.04.008.

[25] CHEN S D, WEN Z H, CHANG W K, *et al*. Acute effect of methylprednisolone on the brain in a rat model of allergic asthma[J]. Neurosci Lett, 2008, 440(2): 87-91. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.03.092.

[26] CHEN Z, LIU N N, XIAO J, *et al*. The amygdala via the paraventricular nucleus regulates asthma attack in rats[J]. CNS Neurosci Ther, 2020, 26(7): 730-740. DOI: 10.1111/cns.13293.

[27] ZHU L, LI W H, QI G J, *et al*. The immune mechanism of intestinal tract Toll-like receptor in mediating EV71 virus type severe hand-foot-and-mouth disease and the MAPK pathway[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 2263-2266. DOI: 10.3892/etm.2017.4245.

[28] ZHANG H, FENG H, LUO L, *et al*. Distinct effects of knocking down MEK1 and MEK2 on replication of Herpes simplex virus type 2[J]. Virus Res, 2010, 150(1/2): 22-27. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.02.007.

[29] SI X N, LUO H L, MORGAN A, *et al*. Stress-activated protein kinases are involved in coxsackievirus B3 viral progeny release[J]. J Virol, 2005, 79(22): 13875-13881. DOI: 10.1128/jvi.79.22.13875-13881.2005.

[30] TUNG W H, HSIEH H L, LEE I T, *et al*. Enterovirus 71 modulates a COX-2/PGE2/cAMP-dependent viral replication in human neuroblastoma cells: Role of the c-Src/EGFR/p42/p44 MAPK/CREB signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(2): 559-570. DOI: 10.1002/jcb.22946.

[31] CEBALLOS-OLVERA I, CHÁVEZ-SALINAS S, MEDINA F, *et al*. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol[J]. Virology (Lond), 2010, 396(1): 30-36. DOI: 10.1016/j.virol.2009.10.019.

[32] FEJER G, FREUDENBERG M, GREBER U F, *et al*. Adenovirus-triggered innate signalling pathways [J]. Eur J Microbiol Immunol, 2011, 1(4): 279-288. DOI: 10.1556/eujmi.1.2011.4.3.

(收稿:2020-09-13;修回:2020-11-25)

(编辑 邓强庭)