

HSP27过表达抑制脑心肌炎病毒复制的作用初探

李倩^{1,2} 马瑞仙^{1,2} 许淑娟^{1,2} 陈延宏² 李向茸¹ 冯若飞^{1*}

(¹西北民族大学生物医学研究中心, 生物工程与技术国家民委重点实验室, 兰州 730030;

²西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030)

摘要 已有研究表明, HSP27在一些病毒的生命周期中发挥着重要作用, 但它对于脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)的调控作用尚不明晰。该研究通过构建人源HSP27的表达质粒pCMV-Myc-HSP27并于HEK293细胞中表达后, 接种EMCV检测病毒的复制及相关通路蛋白表达情况。结果显示, 过表达HSP27可以抑制EMCV在宿主细胞中的复制, 进一步分析表明, HSP27可能是通过正调控IFN- β 信号通路中接头分子MAVS、TBK1、IRF3的表达和阻止自噬体与溶酶体的融合实现对EMCV复制的负调控作用。总之, 该研究首次表明, HSP27抑制EMCV复制是通过IFN- β 信号通路及自噬途径来实现的, 这些发现为揭示EMCV感染中宿主因子的调控作用和潜在的抗病毒靶点提供新的见解。

关键词 热休克蛋白27; 脑心肌炎病毒; 细胞自噬; IFN- β 信号通路

The Preliminary Study on the Inhibitory Effect of Overexpression of HSP27 in Encephalomyocarditis Virus Replication

LI Qian^{1,2}, MA Ruixian^{1,2}, XU Shujuan^{1,2}, CHEN Yanhong², LI Xiangrong¹, FENG Ruofei^{1*}

(¹Key Laboratory of Biotechnology & Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center,

Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; ²College of Life Science and Engineering,

Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract HSP27 has been shown to play an important role in the life cycle of some viruses, but its regulatory role in EMCV infection is still unclear. In this study, the plasmid pCMV-Myc-HSP27 of human HSP27 was constructed and expressed in HEK293 cells, then inoculated with EMCV to detect the replication of the virus and the expression of related pathway proteins. The results showed that overexpression of HSP27 could inhibit the replication of EMCV in host cells. Further analysis indicated that HSP27 might negatively regulate the replication of EMCV by positively regulating the expression of adaptor proteins MAVS, TBK1, and IRF3 in the IFN- β signaling pathway and preventing the fusion of autophagosome and lysosome. In summary, this study is the first to show that HSP27 inhibits EMCV replication through the IFN- β signaling pathway and autophagy pathway. These findings provide new insights for revealing the regulatory role of host factors and potential antiviral targets in EMCV infection.

Keywords HSP27; EMCV; cell autophagy; IFN- β signaling pathway

收稿日期: 2020-02-07 接受日期: 2020-03-27

国家自然科学基金项目(批准号: 31460665)、西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助研究生项目(批准号: Yxm2019147)、国家民委中青年英才计划[批准号: (2018) 98]和教育部“创新团队发展计划”项目(批准号: IRT_17R88)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-2928315, E-mail: fengruofei@xbnu.edu.cn

Received: February 7, 2020 Accepted: March 27, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31460665), the Central special postgraduate research and innovation project (Grant No.Yxm2019147), the Program for Young Talent of SEAC (Grant No.(2018)98) and the Ministry of Education “Innovation Team Development Plan” project (Grant No.IRT_17R88)

*Corresponding author. Tel: +86-931-2928315, E-mail: fengruofei@xbnu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5244>

脑心肌炎是由脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)引起的多种脊椎动物共患的病毒性传染病^[1], 其病原体为无囊膜的单股正链RNA病毒^[2], 隶属于小RNA病毒科心病毒属, 病毒粒子直径约为27 nm, 正20面体对称, 外表光滑呈球形。EMCV基因组含有一个全长7.8 Kb的开放阅读框(open reading frame, ORF), 主要由三个前体蛋白构成, 分别是P1、P2和P3^[3], 其中前体蛋白P1区包含四种结构蛋白VP1~VP4。病毒衣壳正是由这些结构蛋白构成的, 病毒抗原表位形成也与这四种结构蛋白密切相关, 抗原性从强到弱依次为VP1、VP3、VP2、VP4, 其中VP1是最重要的抗原表位^[4]。RACANIELLO等^[5]的研究表明, EMCV病毒粒子表面的衣壳蛋白VP2存在一个较深的凹陷区, 此区域可能作为受体结合位点或天然免疫作用位点。EMCV可感染多种哺乳动物、鸟类、昆虫和人类, 对多种实验动物宿主也有高度的传染性^[6]。自然条件下, EMCV感染最广泛和最严重的动物是猪, 感染后可造成猪仔突然死亡或实质器官的病理损伤, 母猪感染还可造成繁殖障碍, 并且它还可与其他病毒混合感染, 不仅给养猪业带来严重的经济损失, 也对人类健康构成较大的威胁, 故近年来引起了国内外学者的广泛重视。虽然目前关于EMCV的流行病学调查、诊断和检测技术等方面的研究愈来愈多, 但其感染、复制以及致病的分子机制仍不明确。

热休克蛋白(heatshock proteins, HSPs)是机体在一些理化因素如热、饥饿或微生物感染的刺激下表达量急剧升高的一类蛋白质, 又名应激蛋白, 因首次发现于果蝇唾液腺的热应激反应而得名^[7]。它们主要作为细胞内很多蛋白的伴侣分子在蛋白质折叠、装配、蛋白酶体降解等多种生理过程中效力, 依据其等电点与分子量的不同可分为7个家族, 包括泛素、HSP27、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90以及HSP110等^[8]。HSP27作为该家族中的小分子蛋白, 在细胞内扮演着十分重要的角色, 它不仅能够减少胞内蛋白的错误折叠, 保全体内健康细胞, 并且具有应对饥饿及多种应激反应的生理功能, 此外它还可以与多种病毒蛋白互作调控病毒的增殖过程^[7-10]。有研究表明, 口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)的结构蛋白VP2、A型流感病毒(influenza A virus, IAV)的非结构蛋白NS1及猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV)的非结构蛋白NS5A均与

HSP27存在相互作用, 调控病毒诱导的自噬、I型干扰素及NF- κ B信号通路^[11-13]。鉴于HSP27参与多种病毒的感染机制, 那么它在脑心肌炎病毒感染过程中具体起到什么作用, 目前国内外尚无相关报道, 因此需要我们进一步探究, 以期对EMCV感染、复制以及致病分子机制的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、载体及菌毒株

人胚肾细胞(HEK293)、叙利亚地鼠肾细胞(BHK-21)、pCMV-Myc载体、*E.coli* BL21感受态细胞及EMCV GS01毒株(GenBank: KJ524643.1)均由西北民族大学生物医学研究中心提供。

1.2 主要试剂

RNAiso Plus、Premix Ex Taq Probe qPCR、限制性内切酶*EcoR* I及*Bgl* II均购自宝日医生物技术(北京)有限公司; Q5 High-Fidelity DNA聚合酶及T₄ DNA连接酶购自NEB(北京)公司; DNA ladder购自北京中科瑞泰生物科技有限公司; 低内毒素质粒提取试剂盒购自广州美基生物科技有限公司; RIPA裂解液、PMSF、Myc鼠单抗及增强型CCK-8试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 胶回收试剂盒、TransStart Top Green qPCR SuperMix购自北京全式金生物技术有限公司; HSP27兔单抗购自Cell Signaling Technology公司; VP1鼠单抗由南京农业大学白娟副教授惠赠; GAPDH鼠单抗购自Santa Cruz公司; MAVS鼠单抗、MDA5鼠单抗购自Proteintech公司; Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG(H+L)购自Jackson ImmunoResearch Laboratories公司。

1.3 引物

根据GenBank中的Homo sapiens *HSP27*基因序列(NM_001540.5), 利用Primer Premier 5.0设计1对扩增全长*HSP27*基因的引物(Homo-*HSPB1*-F/R)、3对荧光定量引物Homo-*GAPDH*-qF/R、Homo-*HSPB1*-qF/R、EMCV-*3D*-qF/R及探针, 由宝生物工程(大连)有限公司合成(表1)。

1.4 EMCV感染细胞不同时间HSP27蛋白表达的情况

选取生长状态良好且汇合度达到85%~90%的HEK293细胞接种0.000 1 MOI(multiplicity of infection) EMCV, 分别在接毒后不同时间(0、6、9、12

表1 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of the primers

引物名称 <i>Primer name</i>	引物序列 <i>Nucleotide sequence</i>
Homo- <i>HSPB1</i> -F	5'- <i>GAA TTC</i> ATA TGA CCG AGC GCC GCG TCC-3'
Homo- <i>HSPB1</i> -R	5'- <i>AGA TCT</i> CTT ACT TGG CGG CAG TCT CAT CGG A-3'
Homo- <i>GAPDH</i> -qF	5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3'
Homo- <i>GAPDH</i> -qR	5'-ACC ACC CTG TTG CTG TAGC CAA-3'
EMCV-3D-qF	5'-GTC ATA CTA TCG TCC AGG GAC TCT AT-3'
EMCV-3D-qR	5'-CAT CTG TAC TCC ACA CTC TCG AAT G-3'
EMCV-probe	5'-(FAM)CAC TTC GAT CAC TAT GCT TGC CGT T(Eclipse) -3'
Homo- <i>HSPB1</i> -qF	5'-CTG ACG GTC AAG ACC AAG GAT G-3'
Homo- <i>HSPB1</i> -qR	5'-GTG TAT TTC CGC GTG AAG CAC C-3'

斜体表示酶切位点,上游和下游引物分别加入*EcoR* I 和*Bgl* II 酶切位点。

The endonuclease sites were represented by italics, *EcoR* I and *Bgl* II digestion sites were added to the upstream and downstream primers respectively.

及24 h)收集细胞,置于冰上裂解30 min,裂解液按照PMSF:RIPA=1:100配制,每隔5 min用手指轻弹管壁几次以充分裂解细胞。裂解后于4 °C、12 000 r/min离心25 min收取上清,向上清液中加入5× Loading Buffer,95 °C煮沸5 min,将处理的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,15 V恒压30 min,半干转印到PVDF膜上。加入2.5%脱脂牛奶室温封闭1 h,然后分别加入HSP27抗体、GAPDH抗体或EMCV VP1抗体于4 °C孵育过夜,次日经PBST充分洗涤后,再分别加入Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse或Goat Anti-Rabbit IgG于室温摇床孵育1 h,充分洗涤后进行ECL显色。

1.5 HSP27表达质粒的构建、转染及检测

从HEK293细胞中提取总RNA,并将其反转录为cDNA,然后以此cDNA为模板利用Homo-*HSPB1*-F/R进行PCR扩增,所得产物经1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。回收HSP27的扩增片段,随后将其连接到载体pCMV-Myc中,分别进行酶切和测序鉴定,将测序鉴定正确的质粒命名为pCMV-Myc-HSP27。转染前1天,将HEK293细胞接种至6孔培养板中,置37 °C、5% CO₂培养箱中培养。次日待视野中细胞汇合度达到85%~90%时,用脂质体介导法转染细胞。分为3组,分别为pCMV-Myc 2 μg组、pCMV-Myc 1 μg+pCMV-Myc-HSP27 1 μg组及pCMV-Myc-HSP27 2 μg组。转染6 h后弃去转染液,每孔分别加入2 mL含8%新生牛血清的DMEM培养基,继续培养细胞分别进行以下处理。

1.5.1 细胞活力检测 细胞活力检测参考上海碧云天生物技术有限公司的增强型CCK-8试剂盒使用

说明进行。

1.5.2 细胞中HSP27基因转录表达检测 分别收集各组细胞,用RNAiso Plus提取细胞总RNA,进行RNA浓度及 $D_{260/280}$ 测定。然后以1 μg的RNA总量进行反转录,将反转录得到的cDNA作为模板进行荧光定量PCR检测,并选取*GAPDH*作为内参基因。

1.5.3 蛋白表达检测 分别收集3组细胞,经RIPA充分裂解后,免疫印迹检测HSP27蛋白的表达情况,操作同1.4。

1.6 过表达HSP27对EMCV复制的影响

重组质粒(分为3组,同1.5)转染HEK293细胞36 h后,接种0.01 MOI EMCV,待细胞刚开始出现CPE时1组收集细胞,裂解后免疫印迹检测EMCV VP1蛋白的表达情况;另1组收集上清和细胞,反复冻融3次后12 000 r/min离心10 min,弃去细胞碎片,病毒滴度测定利用TCID₅₀法;而病毒拷贝数的检测参考本实验室前期建立的EMCV TaqMan探针法荧光定量PCR检测方法^[14]。

1.7 过表达HSP27对自噬标志因子及IFN-β信号通路的影响

重组质粒(分为3组,同1.5)转染HEK293细胞36 h后,接种0.01 MOI EMCV,待细胞刚开始出现CPE时收集细胞,裂解后免疫印迹检测IFN-β信号通路中主要接头分子MAVS、TBK1、IRF3及自噬通路主要标志因子SQSTM1、LC3B的表达情况。

1.8 数据统计分析

所有数据均采用GraphPad Prism 5.0软件中单因素ANOVAs或*t*检验方法进行分析。在图中,

$P < 0.05$ 表示两组间数据的差异具有统计学意义 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

2 结果

2.1 EMCV感染对HSP27蛋白表达的影响

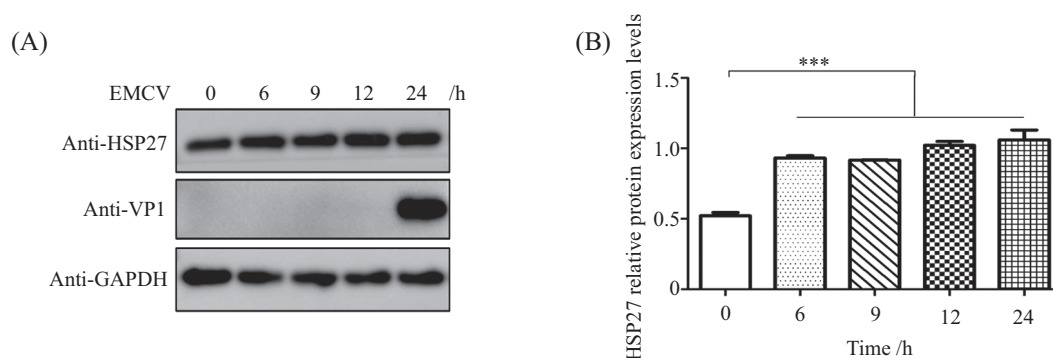
结果显示, EMCV感染HEK293细胞6 h至24 h后, HSP27蛋白表达均显著上调(图1A和图1B), 表明HSP27蛋白可能参与了EMCV的感染过程。

2.2 外源HSP27在HEK293细胞中的表达

2.2.1 HSP27重组表达质粒的构建及鉴定 以HEK293细胞的cDNA作为模板, 利用Homo-HSPB1-F/R引物扩增得到近似618 bp的片段, 分子量大小与预期吻合(图2A)。重组质粒pCMV-Myc-HSP27

经EcoR I+Bgl II双酶切后得到3 791 bp的pCMV-Myc载体片段和618 bp的插入片段, 均与预期分子量大小相符(图2B)。经测序分析与NCBI数据库中人源HSP27(NM_001540.5)的核苷酸序列同源性为100%, 说明重组表达质粒pCMV-Myc-HSP27构建成功。

2.2.2 HSP27在HEK293细胞中的过表达检测 不同剂量的HSP27对HEK293细胞活力均无影响(图3A); RT-qPCR检测结果表明, 转染不同剂量的HSP27后HEK293细胞中HSP27基因的转录表达显著高于空载组, 且呈剂量依赖性(图3B), 说明HSP27基因在HEK293细胞中转录表达奏效; 免疫印迹分析表明, HSP27蛋白在HEK293细胞中成功获得表达,

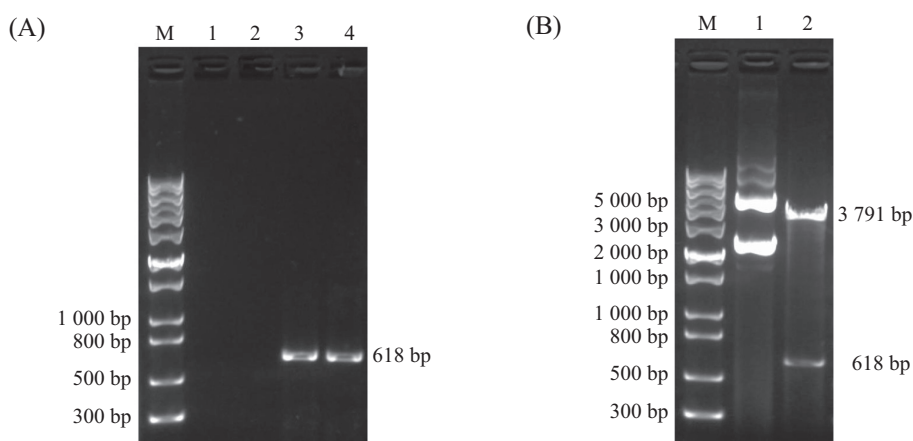


A: 免疫印迹检测VP1和HSP27蛋白的表达; B: 灰度分析HSP27蛋白的相对表达水平。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *** $P < 0.001$ 。

A: immunoblotting detection the expression of VP1 and HSP27 protein; B: gray analysis of HSP27 protein relative expression levels. Data is expressed as $\bar{x} \pm s$, *** $P < 0.001$.

图1 EMCV感染细胞中HSP27蛋白表达的检测

Fig.1 Detection of HSP27 protein expression in EMCV infected cells



A: HSP27基因的扩增产物; M: 1 Kb plus DNA ladder; 1、2: 阴性对照; 3、4: HSP27基因PCR产物; B: 重组质粒pCMV-Myc-HSP27的酶切鉴定; 1: 重组质粒pCMV-Myc-HSP27; 2: 重组质粒pCMV-Myc-HSP27的双酶切片段。

A: PCR product of HSP27 gene; M: 1 Kb plus DNA ladder; 1,2: negative control; 3,4: HSP27 gene PCR product; B: restriction enzyme identification of the recombinant plasmid pCMV-Myc-HSP27; 1: recombinant plasmid pCMV-Myc-HSP27; 2: product from pCMV-Myc-HSP27 plasmid digested with EcoR I and Bgl II.

图2 重组质粒pCMV-Myc-HSP27的双酶切鉴定

Fig.2 Double restriction enzyme identification of the recombinant plasmid pCMV-Myc-HSP27

且HSP27蛋白与Myc标签蛋白实现了融合表达(图3C和图3D)。以上结果均揭示, 构建的pCMV-Myc-HSP27质粒在HEK293细胞中成功表达。

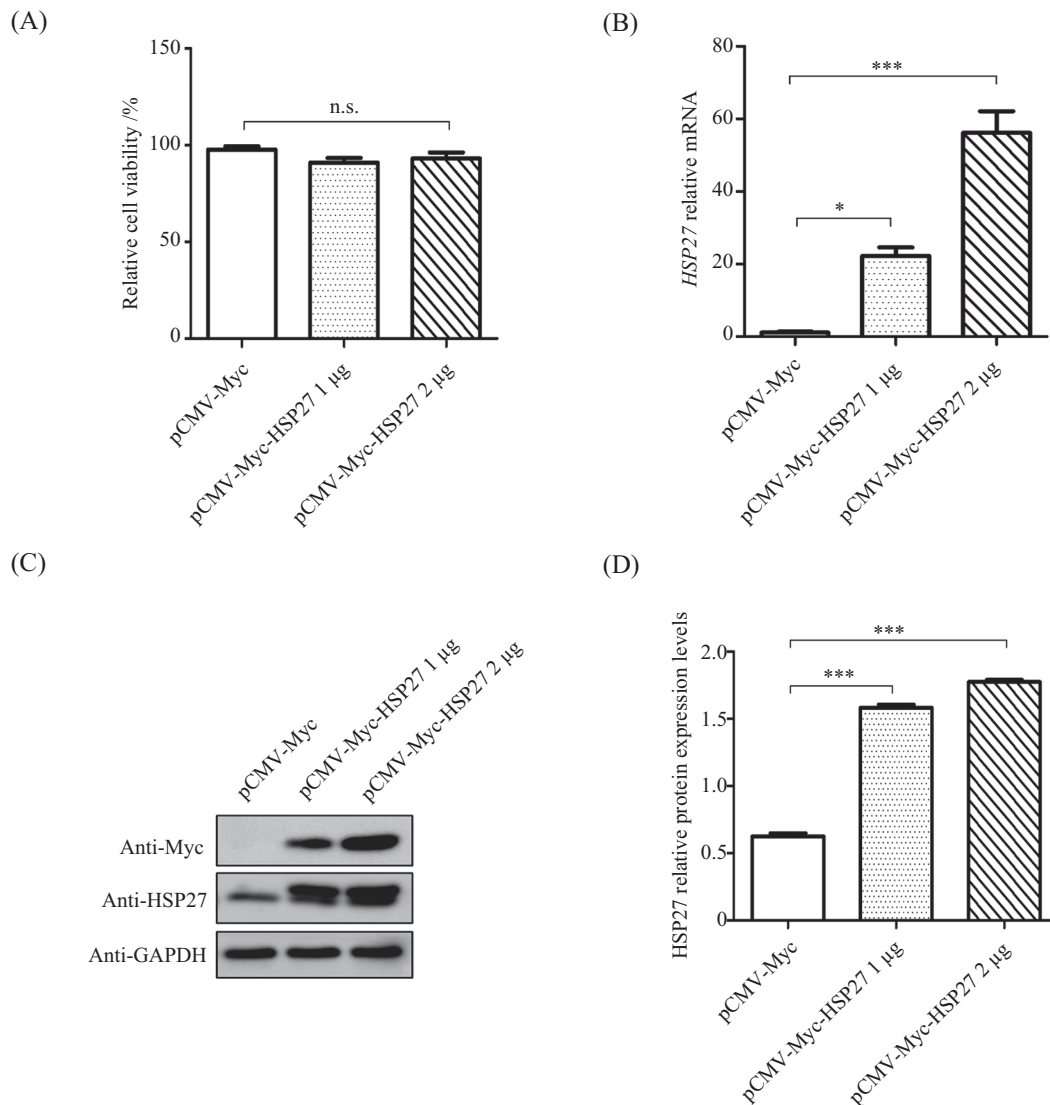
2.3 过表达HSP27对EMCV复制的影响

为了进一步探究HSP27在EMCV感染中的作用, 本试验选择于转染不同剂量HSP27的HEK293细胞中接种0.01 MOI EMCV。RT-qPCR结果显示, pCMV-Myc-HSP27 1 μ g组及2 μ g组的EMCV拷贝数均显著低于pCMV-Myc组(图4A, $P < 0.001$)。病毒滴度检测的结果亦是如此(图4B, $P < 0.05$)。pCMV-Myc-HSP27 1 μ g组及2 μ g组中VP1蛋白的含量也均

明显低于pCMV-Myc组, 且HSP27蛋白对VP1蛋白的抑制效果呈剂量依赖性(图4C、图4D和图4E)。以上结果均表明, 过表达HSP27抑制EMCV在宿主细胞中的复制, 提示HSP27在EMCV复制过程中发挥着负调控作用。

2.4 过表达HSP27对自噬标志因子及IFN- β 信号通路的影响

为了进一步阐明HSP27抑制EMCV复制的作用机制, 本试验初步探索了HSP27对EMCV感染激活的IFN- β 信号通路及自噬途径主要标志因子的影响。结果发现, 过表达HSP27能够显著增加IFN- β 信号通

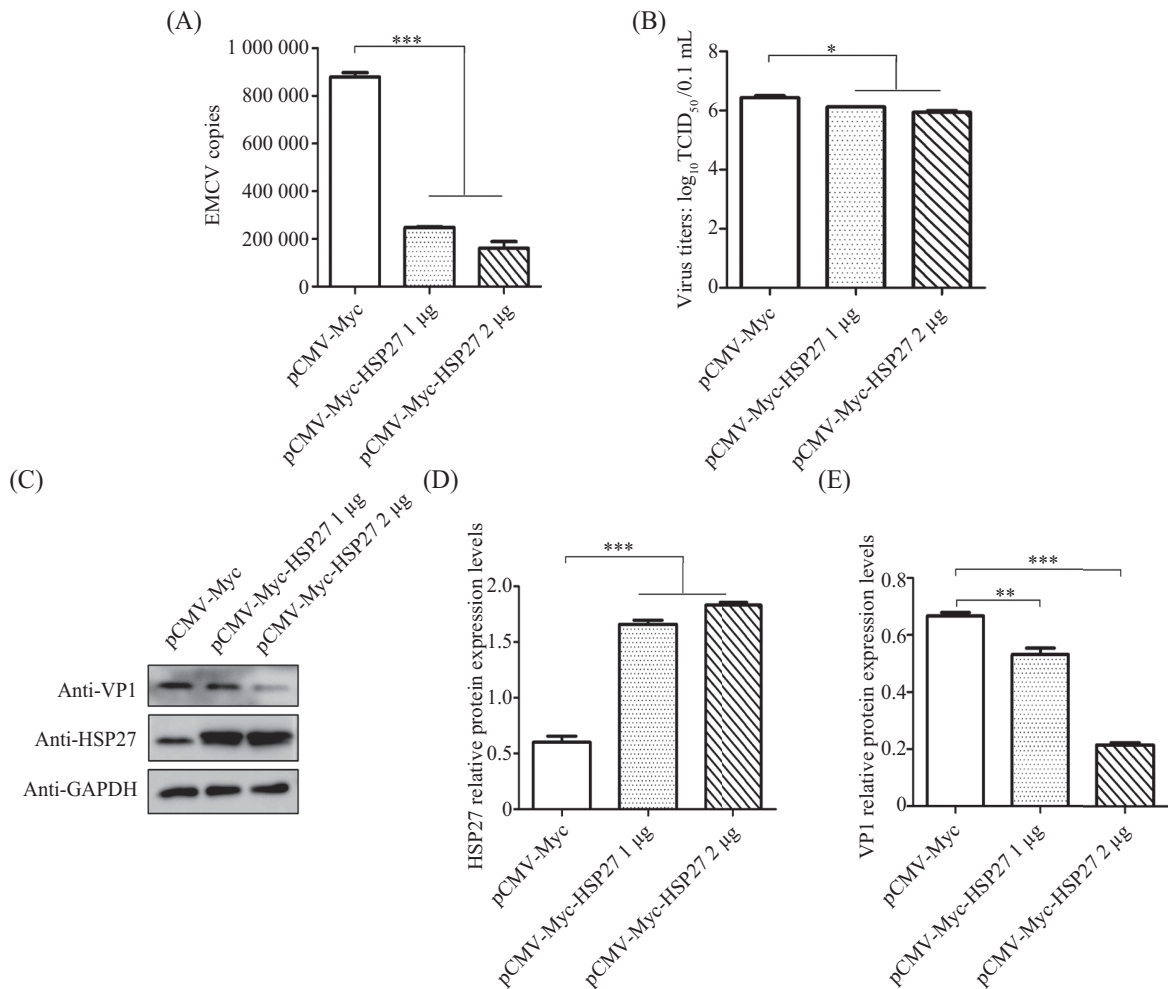


A: 细胞活力检测; B: RT-qPCR分析HSP27基因的转录表达情况; C、D: 免疫印迹检测及灰度分析HSP27蛋白在HEK293细胞中的表达。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, n.s.为 $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: enhanced CCK-8 assays; B: RT-qPCR analysis of the HSP27 mRNA expression; C,D: immunoblotting detection and gray analysis of HSP27 expression in HEK293 cells. Data is expressed as $\bar{x} \pm s$, n.s. indicates $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图3 HSP27基因及蛋白在HEK293细胞中的表达检测

Fig.3 Analysis of the HSP27 gene and protein expression in HEK293 cells



A、B: RT-qPCR及TCID₅₀检测HSP27过表达对EMCV滴度的影响; C-E: 免疫印迹检测及灰度分析HSP27过表达对VP1蛋白表达的影响。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A,B: the effect of HSP27 overexpression on EMCV titer through RT-qPCR and TCID₅₀ assay; C-E: the effect of HSP27 overexpression on VP1 protein expression through immunoblotting detection and gray analysis. Data is expressed as $\bar{x}\pm s$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 过表达HSP27对EMCV复制的影响

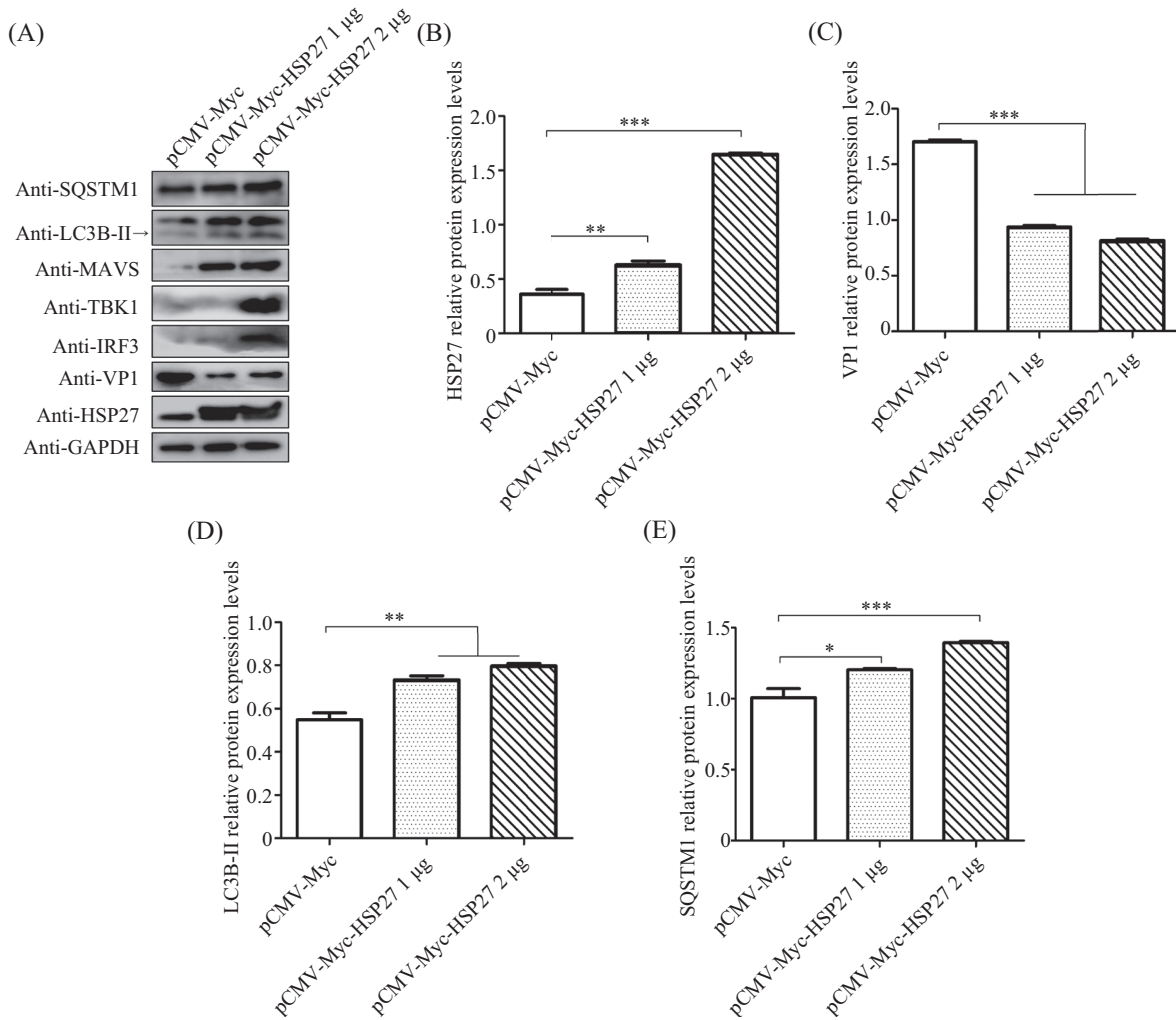
Fig.4 Effects of overexpression of HSP27 in EMCV replication

路中主要接头分子MAVS、TBK1、IRF3的表达(图5A~图5C),表明HSP27可以通过正调控IFN- β 信号通路抑制EMCV的复制。并且过表达HSP27可以促使SQSTM1及LC3B-II的表达增加(图5A~图5E),说明HSP27也可能是通过阻止自噬体与溶酶体的融合进而对EMCV体外增殖发挥负调控作用的。

3 分析与讨论

热休克蛋白是一类在原核生物和真核生物中广泛存在、高度保守且含量丰富的分子伴侣蛋白,它们不仅参与了信号传导、分化发育、应激保护等机体的生理过程,还与肿瘤形成、病毒感染及自身免疫病等相关^[7-10],并且能够调控多种病毒的复制增殖过程,如可以影响流感病毒、轮状病毒的入核

转运及组装,从而影响病毒的复制^[15]。HSP27从属于小分子热休克蛋白家族,有研究报道,敲低人前列腺癌细胞PC-3(human prostate cancer PC-3 cell line)中的HSP27表达后,能够激活内质网应激的3个信号感受器分子:类蛋白激酶内质网激酶(PKR-like ER kinase, PERK)、激活转录因子-6(activating transcription factor 6, ATF6)及肌醇酶-1 α (inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1 α , IRE-1 α),使得自噬标志分子LC3B-II及自噬通量表达均明显上调,利于癌细胞的存活^[16]。HSP27在体内主要以磷酸化及非磷酸化两种形式存在,非磷酸化的HSP27识别并结合被氧化应激损伤或被错误折叠的蛋白质,并与蛋白酶体途径相结合最终将这些蛋白降解,磷酸化的HSP27与宿主细胞的免疫反应、病毒复制增殖、细



A: 免疫印迹检测; B-E: 灰度分析HSP27、VP1、LC3B-II及SQSTM1蛋白的相对表达水平。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
A: immunoblotting detection; B-E: gray analysis of HSP27, VP1, LC3B-II and SQSTM1 relative expression levels. Data is expressed as $\bar{x}\pm s$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 过表达HSP27对IFN-β信号通路及自噬标志因子的影响

Fig.4 Effects of overexpression of HSP27 on IFN-β signal pathway and autophagy marker

胞周期、凋亡及自噬等过程密切相关^[17]。而本研究中的HSP27到底是以何种形式调控IFN-β信号通路和自噬途径进而抑制EMCV的复制有待进一步研究。

EMCV是一种传播性强、侵犯多系统的病毒性传染因子,常被用作研究病毒性心肌炎、固有免疫、糖尿病及Toll样受体的模式病毒^[18]。本研究结果表明,EMCV感染可以上调HSP27的表达,我们通过构建人源HSP27的表达质粒pCMV-Myc-HSP27,实现了HSP27蛋白在HEK293细胞中的表达,并且证明过表达HSP27抑制EMCV在宿主细胞中的复制。此外,还发现HSP27可能是通过正调控IFN-β信号通路和阻止自噬体与溶酶体的融合来对EMCV体外增殖发挥负调控作用的。以往的研

究表明,EMCV主要通过其前导蛋白L、非结构蛋白2C和3C干扰IFN-β信号转导来逃避宿主的天然免疫^[19-23]。本课题组近期研究发现,EMCV的结构蛋白VP2也能够拮抗IFN-β信号通路来应对宿主细胞的天然免疫应答(待发表)。有研究揭示,FMDV的VP2蛋白可与宿主细胞中的HSP27蛋白相互作用,激活细胞自噬通路^[11]。而EMCV与FMDV同属于小RNA病毒科病毒,基因组结构相似,并且本课题组前期研究发现,EMCV GS01株也可诱导不同的宿主细胞如BHK-21、小鼠成肌细胞(C2C12)和HEK293发生完全自噬^[24],故推测HSP27调控EMCV诱导的细胞自噬和IFN-β信号通路可能与EMCV的病毒蛋白相互作用有关。总之,本研究首次表明,HSP27抑制EMCV的复制是通过IFN-β

信号通路及自噬途径来实现的, 这些发现为揭示EMCV感染中宿主因子的调控作用和潜在的抗病毒靶点提供新的见解。

参考文献 (References)

- [1] KOENEN F. Encephalomyocarditis virus [M]. In: STRAW B E, ZIMMERMAN J J, ALLAIRE S D, eds. Disease of swine, 9th ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2006, 331-6.
- [2] FENG R F, ZHANG H X, WEI J, et al. Isolation, molecular and phylogenetic analysis of encephalomyocarditis virus strain GS01 in China [J]. Infect Genet Evol, 2015, 30: 19-26.
- [3] LUO Y K, LIANG L, TANG Q H, et al. Isolation and characterization of encephalomyocarditis virus from dogs in China [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 438.
- [4] 张元峰, 张昆丽, 薛娟, 等. 猪脑心肌炎病毒VP1蛋白与宿主RPS20蛋白相互作用研究[J]. 中国预防兽医学报(ZHANG Y F, ZHANG K L, XUE J, et al. Encephalomyocarditis virus VP1 interacts with ribosomal protein 20 [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine), 2018, 40(8): 715-19.
- [5] RACANIELLO V R. Picornaviridae: the viruses and their replication 4th ed [M]. Philadelphia Liippincott: Williams & Wilkins Publishers, 2001, 685-715.
- [6] ZHANG H X, WANG X L, LI X R, et al. Construction, expression, and characterization of a single-chain variable fragment (ScFv) antibody targeting to the encephalomyocarditis virus [J]. J Med Virol, 2018, 90(7): 1184-91.
- [7] RITOSSA F M. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* [J]. Cell Mol Life Sci, 1962, 18(12): 571-3.
- [8] TSOU Y L, LIN Y W, CHANG H W, et al. Heat shock protein 90: role in enterovirus 71 entry and assembly and potential target for therapy [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77133.
- [9] ZHU G D, XUE M, LUO Y, et al. Effects of short-term heat shock and physiological responses to heat stress in two *Bradysia* adults, *Bradysia odoriphaga* and *Bradysia difformis* [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1338.
- [10] 方娟, 伍小松, 杨青. 热休克蛋白27在病毒感染中的作用研究进展[J]. 动物医学进展(FANG J, WU X S, YANG Q. Progress on effects of heat shock protein 27 in viral infection [J]. Progress in Veterinary Medicine), 2019, 40(4): 120-3.
- [11] SUN P, ZHANG S M, QIN X D, et al. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP2 activates the cellular EIF2S1-ATF4 pathway and induces autophagy via HSPB1 [J]. Autophagy, 2018, 14(2): 336-46.
- [12] 李铮, 刘晓玲, 赵振东, 等. 热休克蛋白27增强A型流感病毒NS1对 β 干扰素的抑制作用[J]. 生物工程学报(LI Z, LIU X L, ZHAO Z D, et al. Heat shock protein 27 enhances the inhibitory effect of influenza A virus NS1 on the expression of interferon-beta [J]. Chinese Journal of Biotechnology), 2012, 28(10): 1205-15.
- [13] LING S F, LUO M Y, JIANG S N, et al. Cellular Hsp27 interacts with classical swine fever virus NS5A protein and negatively regulates viral replication by the NF- κ B signaling pathway [J]. Virology, 2018, 518: 202-9.
- [14] 张海霞. 脑心肌炎病毒LAMP及Real-time PCR检测方法的建立及初步应用[D]. 兰州: 西北民族大学, 2013.
- [15] GELLER R, TAGUWA S, FRYDMAN J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(3): 698-706.
- [16] KUMANO M, FURUKAWA J, SHIOTA M, et al. Cotargeting stress-activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(8): 1661-71.
- [17] ARRIGO A P. Analysis of HspB1 (Hsp27) oligomerization and phosphorylation patterns and its interaction with specific client polypeptides [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1709: 163-78.
- [18] CAROCCI M, BAKKALI K L. The Encephalomyocarditis virus [J]. Virulence, 2012, 3(4): 351-67.
- [19] LI X L, BLACKFORD J A, HASSEL B A. RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection [J]. J Virol, 1998, 72(4): 2752-9.
- [20] LI L, FAN H, SONG Z B, et al. Encephalomyocarditis virus 2C protein antagonizes interferon- β signaling pathway through interaction with MDA5 [J]. Antiviral Res, 2019, 161: 70-84.
- [21] 闭璟珊, 杜以军, 白娟, 等. 脑心肌炎病毒3C蛋白抑制IFN- β 信号通路的研究[J]. 南京农业大学学报(BI J S, DU Y J, BAI J, et al. Study of encephalomyocarditis virus 3C protein inhibit the signaling pathway of type I interferon [J]. Journal of Nanjing Agricultural University), 2014, 37 (3): 88-92.
- [22] HUANG L, LIU Q F, ZHANG L J, et al. Encephalomyocarditis virus 3C protease relieves traf family member-associated NF- κ B activator (TANK) inhibitory effect on TRAF6-mediated NF- κ B signaling through cleavage of TANK [J]. J Biol Chem, 2015, 290(46): 27618-32.
- [23] HUANG L, XIONG T, YU H B, et al. Encephalomyocarditis virus 3C protease attenuates type I interferon production through disrupting the TANK-TBK1-IKK ϵ -IRF3 complex [J]. Biochem J, 2017, 474(12): 2051-65.
- [24] LI X R, MA R X, LI Q, et al. Transmembrane protein 39A promotes the replication of encephalomyocarditis virus via autophagy pathway [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2680.