

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.04.009

猪流行性腹泻病毒感染猪肠上皮细胞引起 Na^+/H^+ 交换器 NHE3 活性下降

晏涛^{1,2}, 牛铮², 张依琳², 阚子斐², 张静怡²,
张淑娟², 徐莎莎², 邹红², 雷程红¹, 宋振辉²

1. 新疆农业大学 动物医学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为阐明猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)感染猪小肠上皮细胞(Porcine intestine epithelial cells J2, IPEC-J2)后对钠氢交换器 3(NHE3)表达活性的影响, 利用 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞并观察其细胞病变. 使用火焰原子吸收法检测 PEDV 感染后细胞内外 Na^+ 的质量浓度变化, 应用 Western-blot 检测 PEDV 感染后细胞总 NHE3 和细胞膜上 NHE3 蛋白的表达水平. 结果显示, IPEC-J2 细胞在 PEDV 感染 12 h 后出现皱缩、伸长、融合, 表现为典型的细胞病变, 表明 PEDV 感染模型建立成功; 过表达 NHE3 组、干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组细胞内的 Na^+ 逐渐降低, 而细胞外的 Na^+ 逐渐升高; 过表达 NHE3 组、干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组细胞总 NHE3 的蛋白表达量变化无统计学意义, 但与过表达 NHE3 组相比, 干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组膜蛋白 NHE3 表达量显著性降低, 干扰 NHE3 组与 PEDV 感染组相比, 干扰 NHE3 组膜蛋白 NHE3 的表达量显著性降低. 研究在细胞水平上验证了 PEDV 感染后 NHE3 活性和表达量下调, 为探究 PEDV 感染新生仔猪引发腹泻机制提供参考.

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 肠上皮细胞; 钠氢交换器 3

中图分类号: S851 文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2022)04-0070-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Infection of Porcine Intestinal Epithelial Cells with Porcine Epidemic Diarrhea Virus Resulted in a Decrease in NHE3 Activity of Na^+/H^+ Exchangers

YAN Tao^{1,2}, NIU Zheng², ZHANG Yilin², KAN Zifei²,
ZHANG Jingyi², ZHANG Shujuan², XU Shasha²,
ZOU Hong², LEI Chenghong¹, SONG Zhenhui²

1. College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. College of Animal Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: To study the infection of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) on expression activity of sodi-

收稿日期: 2021-01-19

基金项目: 科技部引智计划基金资助项目(G20190022030); 中央高校基本业务专项(XDJK2020RC001).

作者简介: 晏涛, 硕士研究生, 主要从事动物传染病及免疫学的研究.

通信作者: 雷程红, 教授.

um hydrogen exchanger 3 (NHE3) in Porcine intestine epithelial cells J2 (IPEC-J2), IPEC-J2 cells were infected with PEDV and cytopathic effect was observed. The concentration of intracellular and extracellular Na^+ after PEDV infection was detected by flame atomic absorption spectrometry. Western-blot was performed to detect the expression of total NHE3 protein and membrane NHE3 protein after PEDV infection. The results demonstrated that IPEC-J2 cells showed a typical cytopathic effect of shrink, elongation and fusion at 12 hours after PEDV infection, indicating that the model of PEDV infection was successfully established. The intracellular Na^+ in overexpressed NHE3 group, interfered NHE3 group and PEDV infected group gradually decreased, while the extracellular Na^+ gradually increased. There was no significant change in expression of total NHE3 protein in overexpressed NHE3 group, interfered NHE3 group and PEDV infected group, but the expression of membrane protein NHE3 in interfered NHE3 group and PEDV infected group was significantly lower than that in overexpressed NHE3 group. Meanwhile, compared with PEDV infected group and interfered NHE3 group, the expression of membrane protein NHE3 in interfered NHE3 group was significantly decreased. This study verified the decrease of NHE3 activity and expression after PEDV infection at the cellular level, which provides a reference for exploring the mechanism of diarrhea caused by PEDV infection in newborn piglets.

Key words: PEDV; IPEC-J2; NHE3

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhoea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起猪的一种急性高度接触性肠道传染病^[1-3]。临床症状以呕吐、严重水样腹泻和脱水为主要特征^[3-5]。2010年底,我国大面积暴发PED疫情,导致猪群高发病率及高死亡率,感染仔猪的致死率高达100%,造成巨大的经济损失^[6-7]。在2013年,美国PED疫情不断出现和广泛流行,给美国养猪业造成沉痛打击^[8-9]。此外,国际贸易日益频繁加剧了PEDV的全球暴发,也给全球养猪业造成了威胁。

Na^+/H^+ 交换器3(Na^+/H^+ exchanger 3, NHE3)属于SLC9A家族,存在于肠和肾上皮中,主要负责 Na^+ 的电中性吸收^[10]。在正常生理情况下,NHE3介导肠腔内 Na^+ 与肠上皮细胞内 H^+ 的交换,促进肠道对 Na^+ 的吸收,进而形成渗透梯度,增加肠道对水的被动吸收^[11-13],并在盐与液体的吸收和pH稳态中起关键作用^[14-15]。研究表明,NHE3^{-/-}小鼠的肠道和肾脏存在吸收缺陷,并出现酸碱失衡和 Na^+ 溶液量紊乱^[15-17],当致泻物质如病毒、细菌和一些肠毒素作用于肠上皮细胞时,肠上皮细胞上相关离子通道及转运载体的表达和活性就会发生异常改变,导致水和电解质(Na^+)的吸收和分泌受到干扰,从而引发腹泻^[18]。

在本研究中,我们利用PEDV感染IPEC-J2细胞后,检测NHE3的活性及其蛋白表达情况,探究NHE3与PEDV感染之间的联系,以期为PEDV感染诱发腹泻机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

非洲绿猴肾细胞(VERO),武汉大学中国典型培养物保藏中心;IPEC-J2细胞,上海素尔生物技术有限公司;PEDV CV777株由西南大学传染病实验室前期保存;DMEM培养基,青链霉素,Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640培养基,美国Gibco公司;澳洲胎牛血清,上海素尔科技有限公司;NHE3的siRNA干扰片段,广东瑞博生物科技有限公司;转染试剂,北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒,上海赛默飞世尔科技有限公司;pEGFP-N3,pEGFP-N3-NHE3是由该实验室前期保存;RIPA细胞裂解液和BCA检测蛋白浓度,上海碧云天生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂,Sulfo-NHS-SS-Biotin,APExBIO公司;鼠抗NHE3多克隆抗体,武汉金开瑞生物工程有限公司;兔抗 β -tubulin多克隆抗体,羊抗鼠HRP偶联IgG,羊抗兔HRP偶联IgG,武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞

将 IPEC-J2 细胞以每孔 1×10^5 细胞密度接种于 12 孔板中,直至细胞融合度达到约 90%。弃掉培养液,用 PBS 洗涤细胞 2 次,每孔加入 PEDV 病毒液(感染复数 0.1) 300 μL 。每组设 3 个重复,培养 2 h 后弃去病毒液,然后每孔加入 500 μL 新鲜的完全培养液,分别培养 2 h,10 h,22 h,显微镜下观察感染期间细胞的病理变化。

1.2.2 细胞内外 Na^+ 测定

应用火焰原子吸收法测定 IPEC-J2 细胞中 PEDV 感染后细胞内外液中 Na^+ 质量浓度的变化情况^[19]。将 IPEC-J2 细胞以每孔 2.5×10^5 细胞密度接种于 24 孔板中,分别设立 0 h,24 h,48 h 和 72 h 过表达 NHE3 组、干扰 NHE3 组、PEDV 感染组。每组设置 3 个重复,同时设立 3 组平行时间对照组。当细胞生长至融合度约 90%时,接种 PEDV 病毒液(感染复数 0.1),分别采集不同时间点的细胞内外液,于 -20°C 保存;按仪器和电脑软件的操作说明,依次打开乙炔气阀、仪器和电脑软件,选择 Na 元素灯,并在电脑软件上设置参数:测量 Na 的工作波长选择为 589 nm,工作负压为 297 V,2 mA 灯电流和 1 200 mL/min 的燃气流量,然后寻峰;待选择峰值出现后,进行能量平衡;待能量值到达 100%时,进行零校;然后点火成功后先用 ddH₂O 清洗,再用 5% KNO₃ 介质溶液进行润洗;最后进行各个样品测量(包括质量浓度分别为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$,0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准 Na 溶液稀释液),待样品测量数值平稳后,记录该数值(该数值为仪器自动 3 次检测数值的平均值)并处理数据;用 GraphPad Prism 软件绘制标准曲线和 PEDV 感染各个时间点下细胞内外液中 Na^+ 的质量浓度变化。

1.2.3 生物酰化标记测定膜蛋白

利用生物素酰化法检测 NHE3 在 IPEC-J2 细胞膜上的表达量^[20-21]。细胞用预冷 PBS(150 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L Na₂HPO₄, pH 值为 7.4)洗涤后,用 1 mg/mL Sulfo-NHS-SS-Biotin 室温孵育 30 min。然后用含有 15 mmol/L 甘氨酸的淬灭缓冲液洗涤以清除游离生物素。甘氨酸重悬后,2 184 r/min 离心 10 min,将细胞沉淀物在 RIPA(含有 100 mmol/L 蛋白酶抑制剂)细胞裂解液中冰上裂解 1 h,用 Pierce BCA 测定上清液中的蛋白质浓度,并用部分上清液分析总蛋白含量。根据蛋白浓度(1 mL 链霉亲和素琼脂糖可与 6 mg 蛋白结合)计算链霉亲和素琼脂糖的量,在 4°C 反应 90 min,然后用含 100 mmol/L 蛋白酶抑制剂的 RIPA 洗涤 3 次,2 991 r/min 离心 30 s,除去游离蛋白。然后,加入 $6 \times$ protein loading buffer,在 100°C 变性 10 min。Western blot 分析 IPEC-J2 细胞膜上 NHE3 蛋白表达量的百分比。利用维尔伯融合 FX5 成像系统(VILBER)获得印迹图像,并分析各波段的灰度值。

1.2.4 Western blot 检测 NHE3 总蛋白的表达

使用 RIPA 裂解缓冲液从细胞中提取总蛋白,并使用 BCA 蛋白试剂盒确定蛋白浓度。蛋白通过 10% SDS-PAGE 电泳,并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。利用 5% 脱脂奶粉进行封闭,随后用鼠抗 NHE3 多克隆抗体和兔抗 β -tubulin 多克隆抗体进行孵育,最后用羊抗鼠 HRP 偶联 IgG、羊抗兔 HRP 偶联 IgG 作为二级抗体的抗体。利用维尔伯融合 FX5 成像系统(VILBER)获得印迹图像,并分析各波段的灰度值。

1.3 统计分析

所有计算均使用 GraphPad Prism 7.0 进行。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示或带有来自 3 个独立实验的平均值的标准误差表示。采用单因素方差分析(ANOVA)和 t 检验确定多组间的统计学差异。 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 均表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PEDV 感染模型的建立

在显微镜下观察 PEDV 感染细胞的病理变化(图 1)。正常的 IPEC-J2 细胞呈完整的梭形,边界清晰,无重叠;PEDV 感染 4 h 后无明显变化;12 h 后细胞出现皱缩、伸长、融合,表现为典型的细胞病变;24 h 后,细胞形态严重受损,细胞皱缩成颗粒状,部分细胞坏死。

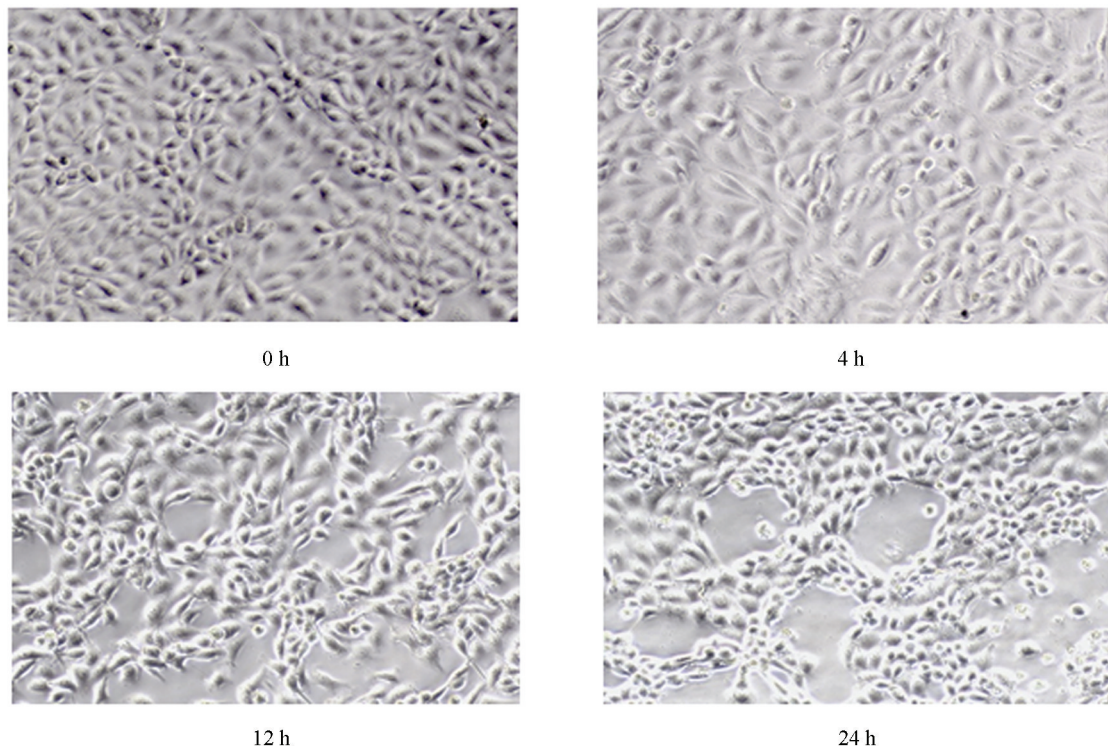


图 1 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞 4, 12, 24 h 的病变

2.2 NHE3 目标蛋白的最佳 siRNA 干扰片段的筛选

在 IPEC-J2 细胞中转染 3 个针对 NHE3 的特异性 siRNAs 干扰片段, 以筛选高效 siRNA 质粒干扰片段, 结果如图 2. 在 IPEC-J2 细胞中, 用微管蛋白(β -Tubulin)为内参, NHE3 的最佳干扰片段是 siRNA-1, 筛选出来的最佳干扰片段用于后续实验.

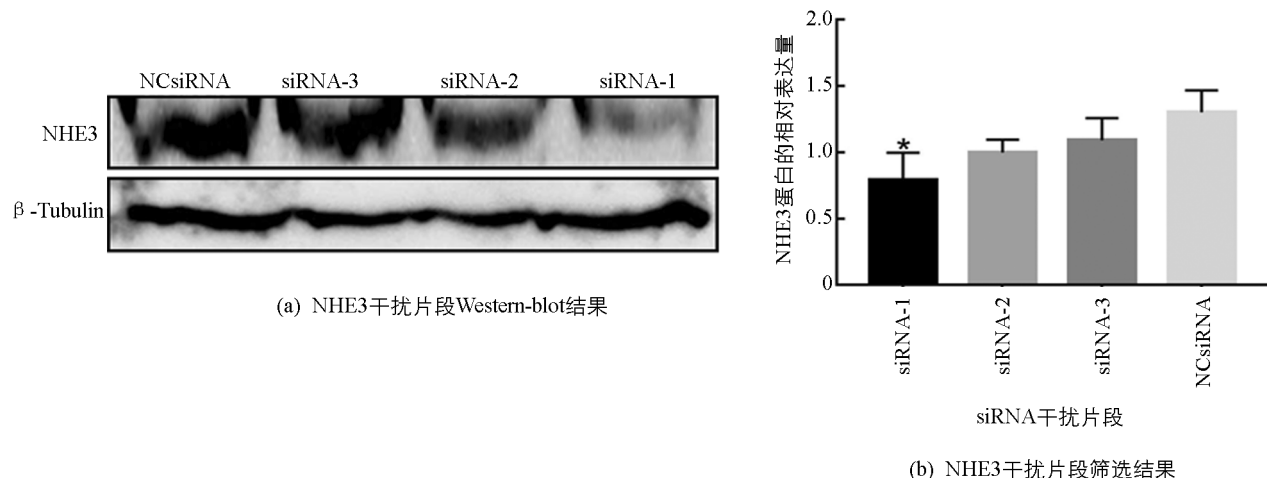


图 2 IPEC-J2 细胞中目的蛋白 NHE3 的最佳 siRNA 干扰片段筛选结果

2.3 PEDV 感染细胞后对 Na^+ 交换活性的影响

火焰原子吸收法结果显示, 过表达 NHE3 组 (pEGFP-NHE3 + PEDV)、干扰 NHE3 组 (siRNA1 + PEDV)、PEDV 感染组细胞内 Na^+ 质量浓度随着感染时间的延长逐渐减低 (图 3a). 在感染后的 0 h 和 24 h 时过表达 NHE3 组和干扰 NHE3 组相比, 干扰 NHE3 组细胞内 Na^+ 质量浓度下降比较显著 ($p < 0.01$, $p < 0.05$); 在 0 h 时干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组相比, 干扰 NHE3 组细胞内 Na^+ 质量浓度下降比较显著 ($p < 0.01$). 细胞外 Na^+ 质量浓度的变化随着时间延长逐渐升高 (图 3b). 在感染后 0 h 时过表达 NHE3

组和干扰 NHE3 组相比, 干扰 NHE3 组细胞外的 Na^+ 显著低于过表达 NHE3 组 ($p < 0.05$).

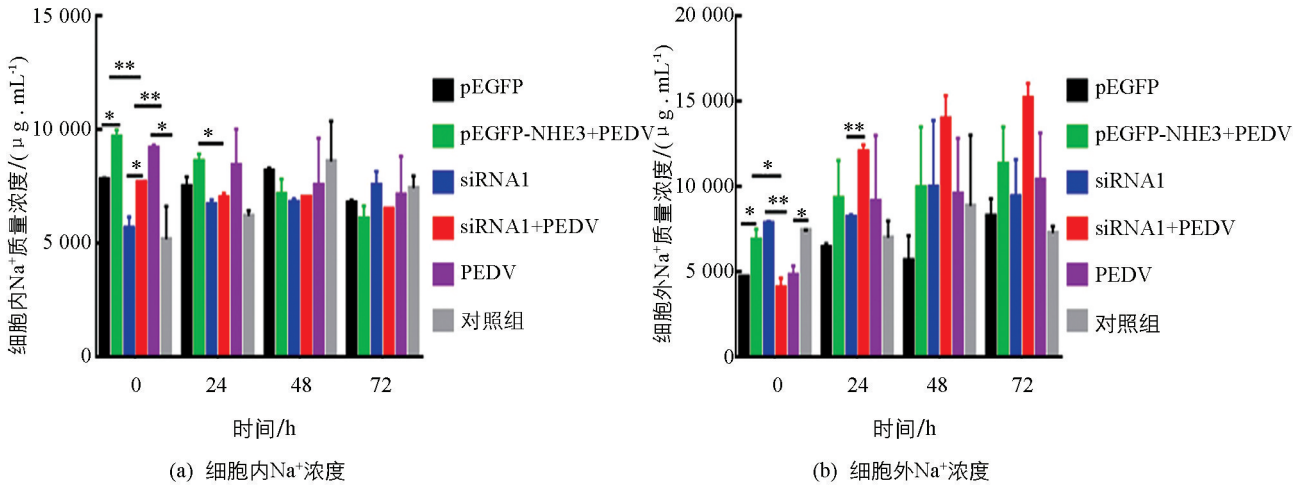


图 3 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后检测细胞内外 Na^+ 质量浓度

2.4 PEDV 感染细胞后对 NHE3 总蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, 过表达 NHE3 组、干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组细胞总 NHE3 蛋白表达量差异无统计学意义; 过表达 NHE3 组与干扰 NHE3 组、PEDV 感染组以及干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组相比, 随着感染时间的延长细胞总 NHE3 的蛋白表达变化无统计学意义(图 4), 说明总蛋白 NHE3 的表达量可能不受 PEDV 感染的影响.

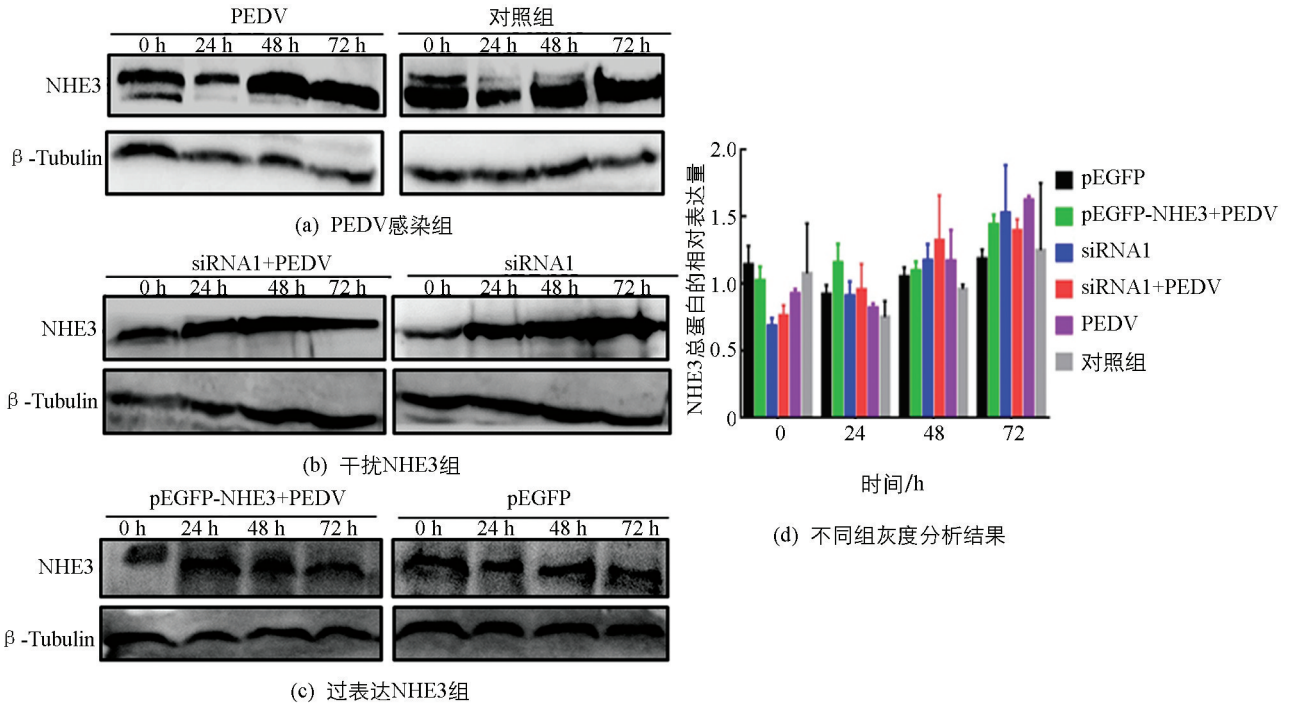


图 4 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后检测总蛋白 NHE3 的表达

2.5 PEDV 感染降低细胞膜上 NHE3 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示(图 5), 过表达 NHE3 组和干扰 NHE3 组相比, 干扰 NHE3 组的膜蛋白 NHE3 的表达水平显著低于过表达 NHE3 组 ($p < 0.01$); 过表达 NHE3 组和 PEDV 感染组相比, PEDV 感染组的膜蛋白 NHE3 的表达水平显著低于过表达 NHE3 组 ($p < 0.05$); 干扰 NHE3 组与 PEDV 感染组相比, 干扰 NHE3 组的膜蛋白 NHE3 的表达水平显著低于 PEDV 感染组 ($p < 0.05$); 干扰 NHE3 组和对照

组相比, 对照组的膜蛋白 NHE3 的表达水平高于干扰 NHE3 组。

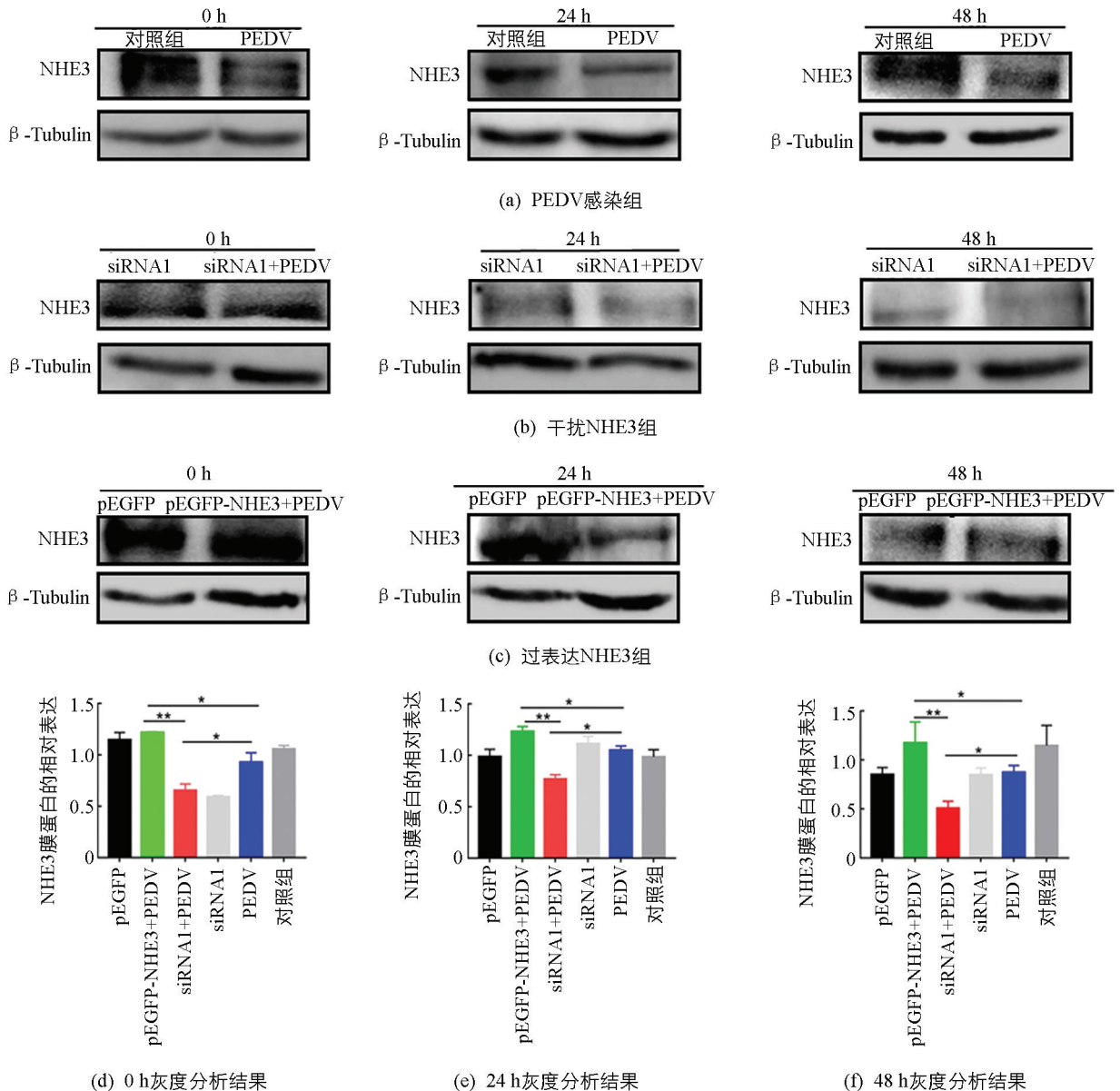


图 5 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后检测质膜上 NHE3 的表达

3 讨论与结论

目前对 PEDV 的感染途径、病理生理学等进行了广泛的研究^[3, 22], 但 PEDV 诱导仔猪腹泻的分子机制尚未明确. 本研究在细胞水平上发现了 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后引起 NHE3 活性降低和蛋白表达量下降, 为进一步探究 PEDV 感染后引发腹泻奠定了基础.

PEDV 主要通过消化道和鼻腔感染, 侵袭小肠并在小肠内进行大量复制^[3], 破坏小肠绒毛(空肠和回肠为主要感染部位)和大肠的绒毛上皮细胞^[1, 23-24], 扰乱了肠腔内营养物质吸收电解质的正常转运(尤其是 Na^+), 从而使肠腔内渗透压升高, 导致腹泻. 研究表明, NHE3 蛋白的活性状态及表达水平与腹泻的发生发展密切相关. 比如, NHE3 引起了小鼠肠道对 Na^+ 和水的吸收急剧下降, 导致严重腹泻^[15]. 编码 NHE3 的 *SCL9A3* 基因的错义突变与先天性钠腹泻(CSD)有关^[11]. 肠细胞中 NHE3 蛋白的表达减少和定位错误也被认为是微绒毛包涵体病患者腹泻的部分原因^[25]. 小鼠中 NHE3 基因的表达受到干扰时, 会导致轻度腹泻、血压较低、代谢性酸中毒^[16]. 在霍乱毒素引起的腹泻和严重肠炎条件下, NHE3 的蛋白表达和活性

受到明显抑制^[26-27]. 以上研究均表明 NHE3 的活性变化与腹泻的发生密切相关^[12, 28].

本课题组前期已经证明轮状病毒(TGEV)感染小肠上皮细胞后,引起小肠细胞对胞外的 Na^+ 吸收水平降低, NHE3 膜蛋白表达量下降. 据此推测 TGEV 感染猪小肠上皮细胞后,可能通过改变 NHE3 膜蛋白的表达和活性,减少小肠上皮细胞对 Na^+ 的吸收^[21]. TGEV 和 PEDV 的临床症状极其相似^[29],又同属 α 冠状病毒,结合本实验室前期研究以及相关文献报道,发现轮状病毒对 NHE3 蛋白水平及其生物活性有影响^[30],而 PEDV 感染条件下对 NHE3 影响的研究还鲜有报道.

为进一步确定 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后对 NHE3 活性和表达量的影响,本研究利用火焰原子吸收法检测过表达 NHE3,干扰 NHE3 以及 PEDV 感染时细胞内外 Na^+ 的流动速率. 结果显示,过表达 NHE3 组、干扰 NHE3 组、PEDV 感染组细胞内 Na^+ 质量浓度随着感染时间的延长逐渐降低. 0 h 和 24 h 时,过表达 NHE3 组和干扰 NHE3 组相比,干扰 NHE3 组细胞内 Na^+ 质量浓度下降比较显著;0 h 时,干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组相比,干扰 NHE3 组细胞内 Na^+ 质量浓度下降比较显著;细胞外 Na^+ 质量浓度的变化随着时间延长逐渐升高. 利用生物素酰化实验进一步验证 PEDV 感染对 NHE3 的影响,Western blot 结果显示,过表达 NHE3 组和干扰 NHE3 组相比,干扰 NHE3 组的膜蛋白 NHE3 的表达水平显著低于过表达 NHE3 组;过表达 NHE3 组和 PEDV 感染组相比, PEDV 感染组的膜蛋白 NHE3 的表达水平显著低于过表达 NHE3 组;干扰 NHE3 组与 PEDV 感染组相比,干扰 NHE3 组的膜蛋白 NHE3 的表达水平显著低于 PEDV 感染组. 过表达 NHE3 组、干扰 NHE3 组和 PEDV 感染组总 NHE3 蛋白量感染前后无明显变化,但质膜上 NHE3 量却随感染时间显著性下降,因此推测可能是 PEDV 感染后期能抑制 NHE3 向质膜的易位,并刺激 NHE3 的直接降解,降低 NHE3 活性,从而影响肠上皮细胞正常的 Na^+/H^+ 交换,成为肠道电解质紊乱的重要因素之一.

本研究证明了 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后细胞膜上 NHE3 活性降低,阻碍了 Na^+ 转运,导致肠道内电解质紊乱,进而引发腹泻. 研究 NHE3 在 PEDV 感染中的作用,为揭示 PEDV 感染引发仔猪腹泻机理提供参考,也为抗病毒性腹泻治疗提供了新靶点.

参考文献:

- [1] JUNG K, SAIF L J. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection: Etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Immunoprophylaxis [J]. Veterinary Journal, 2015, 204(2): 134-143.
- [2] CHEN Q, LI G W, STASKO J, et al. Isolation and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Associated with the 2013 Disease Outbreak among Swine in the United States [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(1): 234-243.
- [3] LI Y C, WU Q, HUANG L L, et al. An Alternative Pathway of Enteric PEDV Dissemination from Nasal Cavity to Intestinal Mucosa in Swine [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3811.
- [4] SONG D, PARK B. Porcine Epidemic Diarrhoea Virus: a Comprehensive Review of Molecular Epidemiology, Diagnosis, and Vaccines [J]. Virus Genes, 2012, 44(2): 167-175.
- [5] ZHANG S, CAO Y N, YANG Q. Transferrin Receptor 1 Levels at the Cell Surface Influence the Susceptibility of New-born Piglets to PEDV Infection [J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(7): e1008682.
- [6] GAO X, LI D L, ZHAO J Y, et al. Complete Genome Sequence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus from an Outbreak in a Vaccinated Farm in Shandong, China [J]. Genome Announcements, 2016, 4(4): e00619.
- [7] WANG D, FANG L R, XIAO S B. Porcine Epidemic Diarrhea in China [J]. Virus Research, 2016, 226: 7-13.
- [8] SU M J, LI C Q, QI S S, et al. A Molecular Epidemiological Investigation of PEDV in China: Characterization of Co-Infection and Genetic Diversity of S1-Based Genes [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2020, 67(3): 1129-1140.
- [9] KONG F Z, XU Y R, RAN W, et al. Cold Exposure-Induced Up-Regulation of Hsp70 Positively Regulates PEDV mRNA Synthesis and Protein Expression in Vitro [J]. Pathogens, 2020, 9(4): 246.
- [10] DYNIA D W, STEINMETZ A G, KOCINSKY H S. NHE3 Function and Phosphorylation are Regulated by a Calyculin A-Sensitive Phosphatase [J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2010, 298(3): 745-753.
- [11] YIN J Y, SARKER R, YANG J B, et al. 110 Missense Mutations of SLC9A3 in Patients with Congenital Sodium Diar-

- rhea are Associated with Reduced Na^+/H^+ Exchanger 3 (NHE3) Activity: Identification of the Cause of the Phenotype [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(4): S-29.
- [12] GURNEY M A, LAUBITZ D, GHISHAN F K, et al. Pathophysiology of Intestinal Na^+/H^+ Exchange [J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2017, 3(1): 27-40.
- [13] CRAJOINAS R O, POLIDORO J Z, GIRARDI A C C. The Potential Role of Myosin Motor Proteins in Mediating the Subcellular Distribution of NHE3 in the Renal Proximal Tubule [J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2019, 316(5): 986-992.
- [14] RIEG T, DOMINGUEZ RIEG J A. Reply to“Reduced NHE3 Activity Results in Congenital Diarrhea and can Predispose to Inflammatory Bowel Disease” [J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2017, 312(3): 312.
- [15] XUE J X, THOMAS L, TAHMASBI M, et al. An Inducible Intestinal Epithelial Cell-Specific NHE3 Knockout Mouse Model Mimicking Congenital Sodium Diarrhea [J]. *Clinical Science (London, England)*, 2020, 134(8): 941-953.
- [16] SCHULTHEIS P J, CLARKE L L, MENETON P, et al. Renal and Intestinal Absorptive Defects in Mice Lacking the NHE3 Na^+/H^+ Exchanger [J]. *Nature Genetics*, 1998, 19(3): 282-285.
- [17] LI X C, ZHU D, CHEN X, et al. Proximal Tubule-Specific Deletion of the NHE3 (Na^+/H^+ Exchanger 3) in the Kidney Attenuates Ang II (Angiotensin II)-Induced Hypertension in Mice [J]. *Hypertension*, 2019, 74(3): 526-535.
- [18] 陈洪浪, 宋丽军, 赵淑敏, 等. NHEs 在腹泻中的研究进展 [J]. *广东医学*, 2017, 38(6): 963-966.
- [19] YANG Z, RAN L, YUAN P, et al. EGFR as a Negative Regulatory Protein Adjusts the Activity and Mobility of NHE3 in the Cell Membrane of IPEC-J2 Cells with TGEV Infection [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018(9): 2734.
- [20] MURTAZINA R, KOVBASNJUK O, DONOWITZ M, et al. Na^+/H^+ Exchanger NHE3 Activity and Trafficking are Lipid Raft-Dependent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(26): 17845-17855.
- [21] YANG Y, YU Q H, SONG H, et al. Decreased NHE3 Activity and Trafficking in TGEV-Infected IPEC-J2 Cells via the SGLT1-Mediated P38 MAPK/Akt2 Pathway [J]. *Virus Research*, 2020, 280: 197901.
- [22] JUNG K, SAIF L J, WANG Q H. Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV): an Update on Etiology, Transmission, Pathogenesis, and Prevention and Control [J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198045.
- [23] STEVENSON G W, HOANG H, SCHWARTZ K J, et al. Emergence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in the United States: Clinical Signs, Lesions, and Viral Genomic Sequences [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(5): 649-654.
- [24] JUNG K, WANG Q, SCHEUER K A, et al. Pathology of US Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain PC21A in Gnotobiotic Pigs [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(4): 662-665.
- [25] YERUVA S, FARKAS K, HUBRICHT J, et al. Preserved Na^+/H^+ Exchanger Isoform 3 Expression and Localization, but Decreased NHE3 Function Indicate Regulatory Sodium Transport Defect in Ulcerative Colitis [J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010, 16(7): 1149-1161.
- [26] COON S, KEKUDA R, SAHA P, et al. Reciprocal Regulation of the Primary Sodium Absorptive Pathways in Rat Intestinal Epithelial Cells [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2011, 300(3): 496-505.
- [27] YANG J, ZHAO X F, PATEL A, et al. Rapamycin Inhibition of mTOR Reduces Levels of the Na^+/H^+ Exchanger 3 in Intestines of Mice and Humans, Leading to Diarrhea [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(1): 151-162.
- [28] MELIOPOULOS V A, MARVIN S A, FREIDEN P, et al. Oral Administration of Astrovirus Capsid Protein is Sufficient to Induce Acute Diarrhea in Vivo [J]. *mBio*, 2016, 7(6): e01494.
- [29] 王昕, 范媛媛, 王鹏, 等. 轮状病毒对 NHE3 蛋白水平及其生物活性的影响 [J]. *广东医学*, 2018, 39(7): 971-973.
- [30] 王丽, 代先进, 胡洋, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 M 基因酵母双杂交诱饵载体的构建及鉴定 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(9): 13-19.