

• 动物及兽医生物技术 •

猪丁型冠状病毒诱导的细胞线粒体凋亡

焦少勇¹, 林翠², 杜柳阳¹, 刘俊丽¹, 顾金燕¹, 周继勇²

1 南京农业大学 免疫研究所, 江苏 南京 210095

2 浙江大学 农业农村部动物病毒学重点实验室, 浙江 杭州 310058

焦少勇, 林翠, 杜柳阳, 等. 猪丁型冠状病毒诱导的细胞线粒体凋亡. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1050–1058.

Jiao SY, Lin C, Du LY, et al. Porcine deltacoronavirus induces mitochondrial apoptosis in ST cells. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 1050–1058.

摘要: 猪丁型冠状病毒 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 是一种新型的猪肠道致病性冠状病毒, 可引起猪群剧烈腹泻及呕吐, 但致病机制尚不清楚。本研究检测了 PDCoV 感染诱导的细胞凋亡。Caspase 酶活性检测显示, 在 PDCoV 感染的细胞中, caspase 3、caspase 8 和 caspase 9 的活性随病毒感染量的增多而显著提高, 类似的现象未能在紫外灭活病毒感染的细胞中观察到, 表明 PDCoV 感染可同时激活内源性与外源性细胞凋亡通路, 并暗示细胞凋亡的诱导依赖于病毒复制。为深入探究 PDCoV 诱导的内源性细胞凋亡, 分别检测胞浆和线粒体中细胞色素 C 与凋亡诱导因子。结果显示, 与正常细胞相比, PDCoV 感染细胞从线粒体释放到胞浆的细胞色素 C 显著增多, 且其释放量随着感染时间的延长而增多, 而凋亡诱导因子始终定位于线粒体, 提示 PDCoV 感染通过促使线粒体膜间隙的细胞色素 C 进入胞浆而启动 caspase 依赖的线粒体凋亡通路。本研究初步揭示了 PDCoV 诱导细胞凋亡的机制。

关键词: 猪丁型冠状病毒, 线粒体凋亡, 细胞色素 C

Porcine deltacoronavirus induces mitochondrial apoptosis in ST cells

Shaoyong Jiao¹, Cui Lin², Liuyang Du¹, Junli Liu¹, Jinyan Gu¹, and Jiyong Zhou²

1 Institute of Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: Porcine deltacoronavirus (PDCoV) is a newly emerging enteropathogenic swine coronavirus causing acute diarrhea and vomiting in pigs. The apoptosis of ST cells induced by PDCoV infection was studied in this research. In ST cells, caspase activity assay showed that the activity of caspase 3, caspase 8 and caspase 9 increased significantly with the infection of PDCoV, but not observed in UV irradiated PDCoV-infected cells, indicating that PDCoV infection activated both

Received: December 10, 2018; **Accepted:** April 15, 2019

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0500102), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Jinyan Gu. Tel: +86-25-84396068-8041; E-mail: gjy@njau.edu.cn

国家重点研发计划(No. 2016YFD0500102), 江苏高校优势学科建设项目资助。

网络出版时间: 2019-04-28

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190426.1620.001.html>

endogenous and exogenous apoptotic pathways in ST cells, and the induction of apoptosis depended on viral replication. To further investigate the endogenous apoptosis induced by PDCoV, cytochrome C and apoptosis-inducing factors in cytoplasm and mitochondria were detected. Compared with normal cells, the amount of cytochrome C released from mitochondria to cytoplasm increased significantly in PDCoV-infected cells, and the release increased with the prolongation of infection, while the apoptosis-inducing factor was always localized to mitochondria, suggesting that PDCoV induced apoptosis was initiated through caspase-dependent mitochondrial apoptosis pathway by promoting cytochrome C in the mitochondrial membrane gap into the cytosol. In conclusion, this study reveals the mechanism of PDCoV inducing apoptosis.

Keywords: porcine deltacoronavirus, mitochondrial apoptosis, cytochrome C

猪丁型冠状病毒 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 是近年来发现的新型冠状病毒, 属于套氏病毒目冠状病毒科丁型冠状病毒属, 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约为 25.4 kb^[1]。PDCoV 于 2012 年首次在中国香港被报道^[2], 并于 2014 年初在美国的腹泻猪群中首次被检测到^[3], 现已在美国、加拿大及亚洲多个国家流行^[4-6]。PDCoV 可感染各年龄段猪群, 主要引起仔猪水样腹泻、呕吐及脱水^[7]。组织病理学研究发现, PDCoV 可感染猪小肠绒毛上皮细胞, 引起细胞空泡化、绒毛萎缩及细胞坏死脱落^[8]。在体外, PDCoV 可感染猪肾细胞 (LLC porcine kidney, LLC-PK) 和猪睾丸细胞 (Swine testicular, ST), 并使感染细胞产生明显病变^[9], 这些都提示 PDCoV 感染与细胞凋亡密切相关。

细胞凋亡是在生理或病理条件下, 细胞受内外信号刺激后发生的受基因调控的自杀行为, 又被称为“程序性细胞死亡”。在抵抗微生物感染、维持机体内环境稳态中也起着至关重要的作用^[10-11]。病毒感染过程与细胞凋亡发生密切相关, 一方面细胞通过凋亡过程可以清除病毒, 抵抗病毒感染; 另一方面病毒在与宿主细胞博弈过程中会进化出一些拮抗或劫持策略, 以利于病毒的复制与传播。目前已发现许多病毒在感染后期可诱导细胞凋亡, 猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 被证实其感染晚期可通过激活线粒体凋亡诱导因子 (Apoptosis-inducing factor, AIF) 诱导不依赖 caspase 的细胞凋亡^[12], 从而利于病

毒扩散。近期有研究表明, PDCoV 感染也能激活线粒体凋亡通路^[13], 但对于 PDCoV 诱导凋亡的具体机制仍需深入探究。本研究通过检测 PDCoV 感染细胞中各项内外源凋亡指标, 确定了病毒激活凋亡的具体途径, 为深入探究 PDCoV 调节细胞凋亡的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

ST 细胞和 PDCoV-CH-HA3-2017 (MK040455) 毒株由本实验室保存。ST 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 0.05% 胰酶消化后按 1:3 比例传代。PDCoV 病毒扩繁后使用 Optiprep 密度梯度离心法进行纯化。病毒灭活系采用紫外线 (Ultraviolet, UV) 照射 1 h, 用间接免疫荧光试验 (Immunofluorescence assay, IFA) 来检测 PDCoV 的灭活效果。本实验中病毒感染复数均为 MOI=1。

1.2 生物材料和主要试剂

DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; TPCK 胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司; Optiprep 密度梯度介质购自 Sigma-Aldrich 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 GenStar 公司; 细胞线粒体分离试剂盒和 RIPA 细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司; 线粒体荧光染料 JC-1 购自杭州联科生物技术有限公司; caspase 8 检测试剂盒购自 Clontech Laboratories 公司; caspase 3、caspase 9 及 AIF 的抗体均购自 Cell Signaling Technology 公

司;细胞色素 C、线粒体外膜转位酶 20 (Tomm 20) 的抗体购自 Abcam 公司;兔抗 β -actin 抗体购自杭州华安生物技术有限公司;HRP 标记羊抗兔 IgG 和 HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 KPL 公司;PDCoV N 蛋白的鼠多抗和 PDCoV S 蛋白的兔多抗由本实验室制备并保存。

1.3 病毒蛋白多抗的制备

PCR 扩增 PDCoV-CH-HA3-2017 毒株的 N 基因,构建 pET-28A-N 原核表达质粒,转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,挑斑活化重组表达菌,以 1:100 接种含卡那抗性的液体培养基,待培养至 OD 值约为 0.4–0.6 时,加入 1 mmol/L IPTG 诱导剂,16 °C、80 r/min 振荡培养 14 h,诱导表达 N 蛋白。收集菌体,经超声破碎后取上清液,使用 Ni-NTA 亲和纯化柱进行融合蛋白的纯化。取蛋白与佐剂等比例混合充分乳化后免疫小鼠 3 次,最后取小鼠血清即为 PDCoV N 蛋白鼠多抗,进行 ELISA、IFA、SDS-WB 方法检测抗体的反应性,并用于后续试验。

PDCoV S 蛋白兔多抗制备过程与 PDCoV N 蛋白鼠多抗制备过程类似。截取 PDCoV S1 中段第 766–1173 位碱基编码的亲水区域命名为 S1ep,将合成的 S1ep 基因序列插入 pET-28A 载体,构建 pET-28A-S1ep 重组质粒。将重组质粒转化 *E. coli* BL21 感受态细胞后,以 0.5 mmol/L IPTG 为诱导剂,16 °C、100 r/min 诱导过夜,Ni-NTA 纯化 S1ep 融合蛋白,与佐剂混合乳化后免疫新西兰大白兔 3 次,最后心脏取血并收集血清得到后续试验所用的 PDCoV S 蛋白兔多抗。

1.4 Optiprep 不连续密度梯度离心纯化病毒

将收集的病毒液于 4 °C、4 800 r/min 离心 25 min,上清经 0.4 μ m 滤器过滤后转移至高速离心管中,平衡后于 4 °C、15 700 r/min 离心 2 h,弃上清。取 0.5 mL DMEM 吹悬病毒沉淀并于 4 °C 溶解过夜。分别取 900 μ L 40%、30%、20%和 10%

(W/V) 碘克沙醇 (Iodixanol) 梯度介质依次缓慢注入超速离心管中配制密度梯度,将已溶解的病毒液缓慢加于密度梯度溶液上层,平衡后于 4 °C、20 300 r/min 离心 3 h,分别取病毒可能所在条带并转移至高速离心管中,平衡后于 4 °C、15 700 r/min 离心 2 h,所得沉淀即为纯化后的病毒粒子。用适量 DMEM 溶解沉淀,分装冻存于–80 °C。取一部分纯化的病毒样品通过 SDS-PAGE、免疫印迹、电镜观察以及毒价测定确定病毒纯化成功。

1.5 蛋白样品制备及免疫印迹

收集细胞样品,加入细胞裂解液,使用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。取等量的蛋白样品进行 SDS-PAGE,半干转印法将蛋白转移到 NC 膜上,膜经封闭、一抗和二抗等处理后,使用 ECL 显色液显色。本研究中使用的一抗分别为:抗细胞色素 C 鼠单抗 (1:1 000)、Tomm 20 兔单抗 (1:1 000)、AIF 兔单抗 (1:1 000)、caspase 3 兔单抗 (1:4 000)、caspase 9 鼠单抗 (1:200)、 β -actin 兔单抗 (1:1 000)、PDCoV S 兔多抗 (1:500) 和 PDCoV N 鼠多抗 (1:500),对应的二抗为 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1:8 000) 和 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:8 000)。

1.6 Caspase 8 活性检测

2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞样品,加入 50 μ L 预冷的细胞裂解缓冲液重悬细胞沉淀,冰上孵育 10 min 后,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清加入 50 μ L 2 \times 反应缓冲液/DDT 混合液,冰上孵育 30 min;随后加入 5 μ L 1 mmol/L 的 caspase 8 底物 (IETD-pNA),37 °C 水浴 1 h;最后,使用酶标仪测定 405 nm 波长下的吸光值。再根据标准曲线计算 pNA 量。

1.7 胞浆和线粒体组分分离

1 500 r/min 室温离心 5 min 收集细胞,用预冷 PBS 重悬细胞。4 °C、2 500 r/min 离心 5 min,向沉淀中加入 1 mL 线粒体分离试剂,重悬细胞

后于冰浴放置 15 min。随后，将细胞悬液匀浆后于 4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min。上清于 4 ℃、10 800 r/min 离心 10 min。此时，收集所得沉淀加入 150 μL 线粒体裂解液得到样品即为线粒体组分，而上清液再经 11 300 r/min 离心 10 min 得上清即为胞浆组分。

1.8 线粒体膜电位检测

待 96 孔板细胞密度达到 70% 时接种 PDCoV，分别在接毒后 16 h、24 h 和 32 h 检测。将 JC-1 试剂与 DMEM 按 1：10 稀释混匀，避光放置培养箱中温浴至 37 ℃ 后，向样品孔中分别加入 10 μL JC-1 混合液，混匀后避光置于 37 ℃ 培养箱中孵育 20 min。样品经 DMEM 培养基洗涤两次后置于 OLYMPUS DP72 倒置荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 PDCoV 激活凋亡依赖于病毒复制

本研究使用 Optiprep 不连续密度梯度离心对扩繁所得 PDCoV 病毒进行纯化。纯化后的病毒粒子存在于 Optiprep 介质的 20% 与 30% 梯度之间，透射电镜观察可见直径 100 nm 左右、形态规则、外有囊膜、表层有日冕状纤突的病毒粒子 (图 1A)。经紫外线灭活的纯化 PDCoV (UV-PDCoV)

与未灭活 PDCoV 分别感染 ST 细胞，检测凋亡指示蛋白 caspase 3 的剪切体水平，十字孢碱 (Staurosporine, STS) 处理作为凋亡阳性对照。结果如图 1B 和 1C 所示，UV-PDCoV 感染的细胞几乎检测不到病毒 S 蛋白和 caspase 剪切体 (Cleaved-caspase, Cl-caspase)，而活病毒感染后可检测到大量的 S 蛋白和 Cl-caspase 3，说明只有活 PDCoV 可以使 caspase 3 发生剪切，表明 ST 细胞凋亡的激活依赖于 PDCoV 的复制。

2.2 PDCoV 感染激活细胞内源性与外源性凋亡通路

为了进一步验证 PDCoV 激活细胞凋亡的途径，我们收集了感染 PDCoV 不同时间点的细胞样品，并检测凋亡相关 Cl-caspase 及 caspase 酶活性。与未感染组比较，感染细胞内 Cl-caspase 3 和 Cl-caspase 9 条带均显著增多，并与感染病毒量呈正相关 (图 2A、2B 和 2C)。病毒感染后 24 h，Cl-caspase 9 水平最高 (图 2A 和 2C)；感染后 32 h，Cl-caspase 3 水平最高 (图 2A 和 2B)。Caspase 8 活性检测结果显示，病毒感染后 24 h，caspase 8 酶活性显著增强；感染后 32 h，酶活性逐渐回落至正常水平 (图 2D)，表明 PDCoV 激活了感染细胞中内外源性凋亡信号通路。

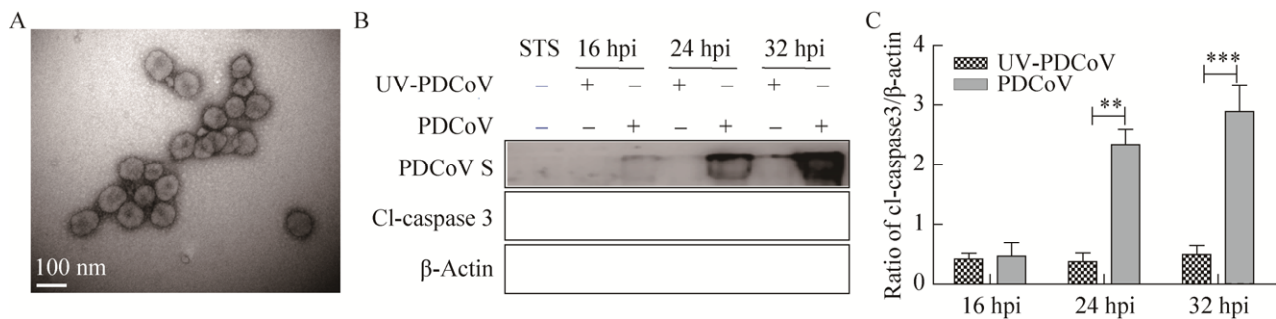


图 1 PDCoV 活化感染细胞的 caspase 3
Fig. 1 PDCoV activates caspase 3 in infected cells. (A) Transmission electron microscopy images of purified PDCoV. (B) Caspase activity of caspase 3 in UV-inactivated and non-inactivated PDCoV-infected cells was detected by Western blotting. (C) Grayscale analysis and statistical analysis of (B) data by Graphpad software. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; hpi: hours post-infection.

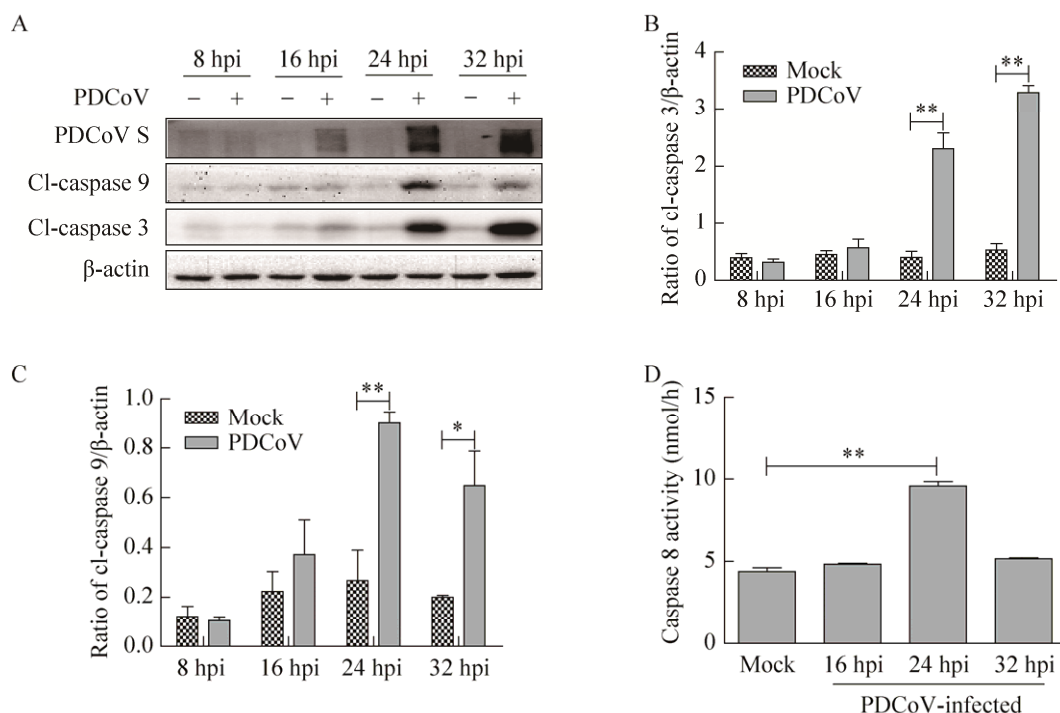


图 2 PDCoV 激活感染细胞内 caspase 9

Fig. 2 PDCoV activates caspase 9 in infected cells. (A) Caspase activity of caspase 3 and caspase 9 in PDCoV-infected cells were detected by Western blotting. (B, C) Grayscale analysis and statistical analysis of (A) data by Graphpad software. (D) Caspase 8 activity was detected by colorimetric assay kits in ST cells infected with PDCoV. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; hpi: hours post-infection.

2.3 PDCoV 感染诱导细胞色素 C 释放胞浆

依据上述实验结果, 我们使用细胞线粒体分离试剂盒分离 PDCoV 感染与未感染细胞的胞浆和线粒体组分, 免疫印迹分析细胞色素 C 和 AIF 变化。结果如图 3 所示, PDCoV 感染细胞后, 感染时间越长, 细胞浆中细胞色素 C 的水平越高; 而 AIF 则变化不显著, 依然定位在线粒体内, 表明 PDCoV 感染后可引起线粒体膜通透性增强, 导致线粒体膜间隙内可溶性蛋白细胞色素 C 释放胞浆, 从而激活下游 caspase 依赖的线粒体凋亡通路。此外, 我们还观察到, 线粒体和胞浆组分中均能检测到 PDCoV 的 N 蛋白, 而 S 蛋白则仅存在于线粒体组分中 (图 3A)。

2.4 PDCoV 感染不改变线粒体膜电位

线粒体膜通透性增强是内源性凋亡起始的关键^[14]。目前研究表明, 线粒体外膜通透性增强和线粒体内膜通透性增强均能激活线粒体凋亡通路, 引起细胞凋亡^[15-17]。通过 JC-1 染料检测线粒体膜电位, 在线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体基质中形成聚合物, 浓度较高, 产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低, 即线粒体内外膜通透性增强时, JC-1 染料逸出线粒体进入胞浆中, 浓度较低, 成单体形式存在, 产生绿色荧光。结果如图 4 所示, PDCoV 感染细胞与未感染细胞的红色荧光强度并无明显差异; 病毒感染时间对绿色荧光强度也无影响, 表明 PDCoV 感染后线粒体膜电位没有发生改变。

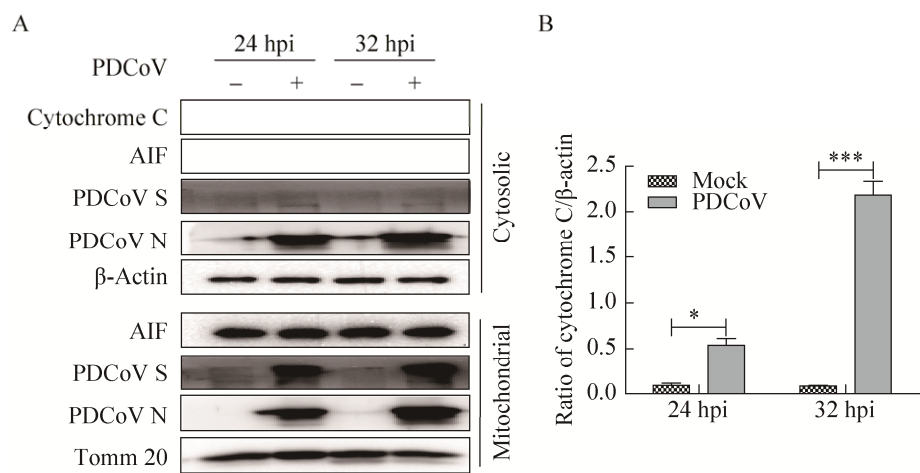


图 3 PDCoV 对感染细胞中细胞色素 C 及 AIF 分布的影响
Fig. 3 Effects of PDCoV on the distribution of cytochrome C and AIF in infected cells. (A) The release of cytochrome C and AIF were detected in the cytoplasm and mitochondria of cells infected with PDCoV. (B) Grayscale analysis and statistical analysis of (A) data by Graphpad software. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; hpi: hours post-infection.

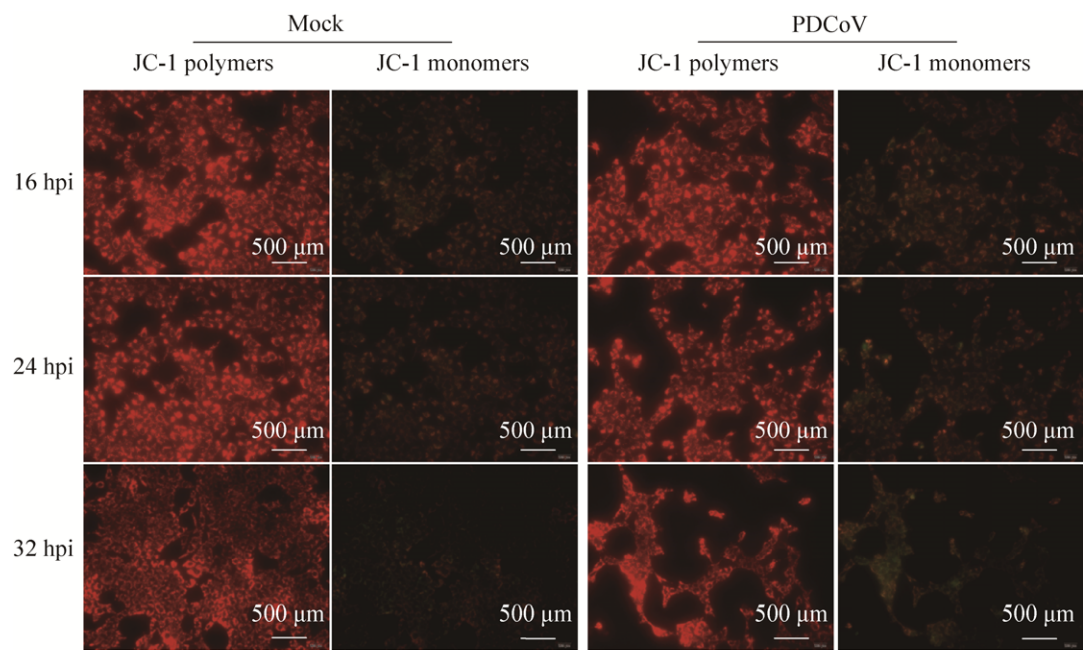


图 4 PDCoV 感染细胞的线粒体膜电位变化
Fig. 4 Changes of mitochondrial membrane potential in PDCoV-infected cells. There was no significant change in mitochondrial membrane potential at different time points after infection, and the membrane potential was always maintained. hpi: hours post-infection.

3 讨论

病毒感染细胞的过程是病毒与宿主之间的一场博弈过程。宿主细胞在该过程中可产生凋亡或自噬等一系列免疫调节机制以保护细胞免受侵

害，而病毒则会劫持利用细胞凋亡或自噬机制或进化出免疫逃避的策略以利于病毒自身复制^[18]。冠状病毒是一类对人和动物有严重危害的病原，近些年重症急性呼吸综合征 (Severe acute respiratory

syndrome, SARS) 和中东呼吸综合征的暴发引起了人们对于冠状病毒的广泛关注^[19-21]。同样, PEDV 和 PDCoV 等冠状病毒给畜禽养殖业也造成了严重的经济损失。近年来, 已有研究发现冠状病毒的致病机制与细胞凋亡密切相关。SARS 通过诱导凋亡引起扩散性肺组织细胞损伤, 从而使肺部组织中出现大量泡沫状巨噬细胞和多核合胞体^[22-24]; 猪传染性胃肠炎病毒感染引起细胞氧化应激反应, 可通过内质网功能性损伤诱导 caspase 依赖的细胞凋亡^[25]; PEDV 通过诱导 AIF 移位到胞核引起细胞凋亡^[12], 亦有研究报道, PEDV 木瓜蛋白酶可通过激活 caspase 3 诱导细胞凋亡^[26]。本研究发现, PDCoV 病毒感染不仅激活外源性凋亡 (图 2D), 还激活内源性凋亡通路 (图 2A-C), 并通过增强线粒体外膜通透性 (图 4), 促进线粒体膜间隙中的可溶性蛋白细胞色素 C 释放入胞浆 (图 3), 在胞浆中激活起始 caspase 9 (图 2A, 2C), 随后激活效应 caspase 3 (图 2A、2B), 最终引发凋亡。

病毒感染细胞的整个过程都可能诱导凋亡发生。病毒黏附、入胞及其遗传物质释放过程都可调节细胞凋亡。然而, 这些也仅仅是其诱导凋亡的一小部分, 大部分凋亡的调节依赖于病毒复制后翻译出的病毒蛋白。例如, 猪圆环病毒 2 型 ORF4 蛋白通过结合线粒体 ANT3 蛋白促进线粒体膜通透性增强诱导线粒体凋亡^[27]; 人类免疫缺陷病毒 1 型的胞膜糖蛋白复合物 (gp140 和 gp41) 通过 P53 依赖反式作用于 puma 和 bax, 从而激活线粒体凋亡^[28-29]; 丙型肝炎病毒的 NS3 蛋白, 可结合 caspase 8 并增强 caspase 8 活性从而诱导细胞凋亡^[30-31]。之前有研究显示, PDCoV 激活 caspase 依赖的内源性凋亡由 bax 的线粒体募集引起^[13]。bax 是 Bcl-2 家族蛋白中最重要的凋亡效应蛋白, 在凋亡信号刺激下, bax 蛋白聚集在线粒体形成多聚体穿孔复合物, 在线粒体外膜打开孔

道, 释放膜间隙可溶性蛋白, 从而诱发凋亡^[32]。PDCoV 诱导凋亡机制已有初步研究报道^[8, 13], 本研究通过 caspase 试剂盒检测 caspase 8 活性, 发现 PDCoV 可以通过外源性凋亡通路诱导 ST 细胞凋亡, 这与报道通过使用 caspase 8 抑制剂获得的结论有所不同。caspase 信号通路中存在复杂的反馈调节机制, 外源性凋亡通路中的重要凋亡相关蛋白 caspase 8 涉及细胞增殖分化等多种生物学功能。我们目前先探索了内源性凋亡通路, 选择检测细胞色素 C 和 AIF 的胞浆线粒体分布以及通过 JC-1 染料检测线粒体膜电位等方法从不同层面探讨 PDCoV 诱导 ST 细胞凋亡的机制, 具体外源性凋亡通路有待进一步探讨。线粒体膜电位与线粒体内膜通透性相关, 线粒体膜通透性增强是内源性凋亡起始的关键。本研究使用 JC-1 染料检测线粒体膜电位, 详细分析了线粒体膜通透性在凋亡过程中的具体变化, 证实 PDCoV 感染通过引起线粒体外膜通透性增强, 使细胞色素 C 释放进入胞浆引起凋亡。有研究表明, 冠状病毒在入侵宿主细胞时, 通过 S 蛋白介导以膜融合方式将病毒基因释放入胞^[33]。宿主细胞的内质网合成新的 S 蛋白, 通过与其他病毒蛋白组装成为完整病毒粒子释放出胞, 完成病毒复制过程。关于 S 蛋白的亚细胞定位与具体功能, 目前研究还不是很透彻。在本研究中, 我们首次证实 PDCoV S 蛋白定位于线粒体 (图 3A), 这与我们对 S 蛋白的已有认知有所不同^[33-34], 推测 PDCoV 激活 ST 细胞线粒体凋亡与 S 蛋白合成相关, 这可能是 PDCoV 凋亡诱导研究的一个重要线索, 有待进一步证实。

REFERENCES

- [1] Fang PX, Fang LR, Ren J, et al. Porcine deltacoronavirus accessory protein NS6 antagonizes interferon beta production by interfering with the binding of RIG-I/MDA5 to double-stranded RNA. *J Virol*, 2018, 92(15): e00712-18.

- [2] Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol*, 2012, 86(7): 3995–4008.
- [3] Marthaler D, Jiang Y, Collins J, et al. Complete genome sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine deltacoronavirus from the United States. *Genome Announc*, 2014, 2(2): e00218–14.
- [4] Le VP, Song S, An BH, et al. A novel strain of porcine deltacoronavirus in Vietnam. *Arch Virol*, 2018, 163(1): 203–207.
- [5] Dong N, Fang LR, Zeng SL, et al. Porcine deltacoronavirus in mainland China. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(12): 2254–2255.
- [6] Lee S, Lee C. Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14–04/2014. *Genome Announc*, 2014, 2(6): e01191–14.
- [7] Ma YM, Zhang Y, Liang XY, et al. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States. *mBio*, 2015, 6(2): e00064–15.
- [8] Jung K, Hu H, Saif LJ. Porcine deltacoronavirus induces apoptosis in swine testicular and LLC porcine kidney cell lines *in vitro* but not in infected intestinal enterocytes *in vivo*. *Vet Microbiol*, 2016, 182: 57–63.
- [9] Hu H, Jung K, Vlasova AN, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(5): 1537–1548.
- [10] Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41: 367–401.
- [11] Golstein P. Cell death in us and others. *Science*, 1998, 281(5381): 1283.
- [12] Kim Y, Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology*, 2014, 460–461: 180–193.
- [13] Lee YJ, Lee C. Porcine deltacoronavirus induces caspase-dependent apoptosis through activation of the cytochrome C-mediated intrinsic mitochondrial pathway. *Virus Res*, 2018, 253: 112–123.
- [14] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 99–163.
- [15] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, et al. Mechanisms of cytochrome C release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 2006, 13(9): 1423–1433.
- [16] Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, et al. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog*, 2008, 4(5): e1000018.
- [17] Yamamoto T, Yamada A, Yoshimura Y, et al. The mechanisms of the release of cytochrome C from mitochondria revealed by proteomics analysis. *Yakugaku Zasshi*, 2012, 132(10): 1099–1104.
- [18] Danthi P. Viruses and the diversity of cell death. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1): 533–553.
- [19] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, 300(5624): 1394–1399.
- [20] Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*, 2003, 362(9393): 1353–1358.
- [21] Scobey T, Yount BL, Sims AC, et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(40): 16157–16162.
- [22] Yan R, Shen C, Lei L, et al. SARS-CoV infection induces apoptosis of Vero E6. *Virol Sin*, 2003, 18(6): 541–543 (in Chinese).
- 鄢然, 沈超, 雷磊, 等. SARS-CoV 感染 Vero E6 细

- 胞诱导细胞凋亡. 中国病毒学, 2003, 18(6): 541–543.
- [23] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1967–1976.
- [24] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1953–1966.
- [25] Eleouet JF, Chilmonczyk S, Besnardeau L, et al. Transmissible gastroenteritis coronavirus induces programmed cell death in infected cells through a caspase-dependent pathway. *J Virol*, 1998, 72(6): 4918–4924.
- [26] Zhao Q, Chen XJ, Xing YL, et al. PEDV coronavirus induces apoptosis through activation of caspase-3 by papain-like protease. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2015, 31(11): 1171–1178 (in Chinese).
赵倩, 陈晓娟, 邢雅玲, 等. 猪流行性腹泻病毒通过病毒蛋白酶激活 caspase 3 诱导细胞凋亡. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(11): 1171–1178.
- [27] Lin C, Gu JY, Wang HJ, et al. Caspase-dependent apoptosis induction via viral protein ORF4 of porcine circovirus 2 binding to mitochondrial adenine nucleotide translocase 3. *J Virol*, 2018, 92(10): e00238–18.
- [28] Castedo M, Ferri KF, Blanco J, et al. Human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein complex-induced apoptosis involves mammalian target of rapamycin/FKBP12-rapamycin-associated protein-mediated p53 phosphorylation. *J Exp Med*, 2001, 194(8): 1097–1110.
- [29] Perfettini JL, Roumier T, Castedo M, et al. NF- κ B and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *J Exp Med*, 2004, 199(5): 629–640.
- [30] Prikhod'ko EA, Prikhod'ko GG, Siegel RM, et al. The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities. *Virology*, 2004, 329(1): 53–67.
- [31] Prikhod'ko GG, Prikhod'ko EA, Pletnev AG, et al. Langat flavivirus protease NS3 binds caspase-8 and induces apoptosis. *J Virol*, 2002, 76(11): 5701–5710.
- [32] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 887–896.
- [33] Li WT, Hulswit RJG, Kenney SP, et al. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(22): E5135–E5143.
- [34] Shang J, Zheng Y, Yang Y, et al. Cryo-electron microscopy structure of porcine deltacoronavirus Spike protein in the prefusion state. *J Virol*, 2018, 92(4): e01556–17.

(本文责编 郝丽芳)