



专论与综述

肠小体在猪肠道冠状病毒感染中的研究进展

尹灵丹 李亮 刘平黄*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 黑龙江 哈尔滨 150069

摘要: 猪肠道冠状病毒是引起仔猪腹泻的重要致病因素, 主要感染小肠绒毛上皮细胞, 给养猪业造成了巨大的经济损失。由于缺乏能模拟胃肠道高度复杂生理特性的体外研究模型, 猪肠道冠状病毒感染与宿主肠上皮之间相互作用的研究也受到了极大的限制。随着干细胞技术的快速发展, 一种能模拟肠道复杂的细胞类型及空间结构的体外模型——肠小体引起了人们的广泛关注。与传统的细胞系相比, 肠小体不仅能模拟肠的结构和功能, 同时还保留宿主的遗传特性, 有望成为研究宿主-肠道病原相互作用的一种理想模型。本文就猪肠道冠状病毒以及肠小体在肠道病原研究中的应用进行综述, 以期能为猪肠道冠状病毒的基础研究提供新的思路与见解。

关键词: 猪肠道冠状病毒, 肠上皮细胞, 肠小体, 肠道病原

Research progress in enteroids in porcine enteric coronavirus infection

YIN Ling-Dan LI Liang LIU Ping-Huang*

Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069, China

Abstract: Porcine enteric coronavirus, an important agent of diarrhea in piglets, primarily infects the villous epithelia of the small intestine, causing substantial economic losses to the pork industry. The lack of an *in vitro* model that can recapitulate the highly complex physiological properties of the gastrointestinal tract significantly limits the study of the interactions between porcine enteric coronavirus infection and host intestinal epithelium. With the rapid development of stem cell technology, an *in vitro* model that can mimic diverse cellular nature and complex structure of the intestine-enteroids, has attracted widespread attention. Compared with conventional cell lines, enteroids not only simulate the structure and function of the intestine, but also retain the genetic characteristics of the host. Enteroids would be expected to be an ideal model for studying the interactions of host-enteric pathogens. This article reviews the recent research progress of porcine enteric coronavirus and the applications of enteroids in enteric pathogens research, in order to provide new insights for the future fundamental research of porcine enteric coronavirus.

Keywords: Porcine enteric coronavirus, Intestinal epithelia, Enteroids, Enteric pathogens

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31772718)

***Corresponding author:** E-mail: pingh_liu@163.com

Received: 17-04-2019; **Accepted:** 09-08-2019; **Published online:** 12-09-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31772718)

*通信作者: E-mail: pingh_liu@163.com

收稿日期: 2019-04-17; 接受日期: 2019-08-09; 网络首发日期: 2019-09-12

猪肠道冠状病毒是引起仔猪腹泻的主要病原,临床感染以严重腹泻、呕吐、脱水和高死亡率为特征^[1-4],严重制约着养猪业的发展。猪肠道冠状病毒主要感染猪小肠绒毛上皮细胞,引起绒毛显著萎缩、脱落,导致病猪发生严重腹泻^[5-7]。然而,由于经典的体外细胞培养系统缺乏多样化的细胞类型和空间结构,不能体现胃肠道高度复杂的微环境,限制了猪肠道冠状病毒感染与宿主肠上皮之间相互作用的研究。近年来,随着干细胞生物学领域的发展,诞生了一种新型的体外培养模型——肠小体(enteroids),该模型类似肠的微型结构,即隐窝-绒毛复合体^[8],这为深入探究肠道病毒的分子生物学特性提供了一个更可靠的体外研究模型。

1 猪肠道冠状病毒介绍

猪腹泻是规模化养猪场中常见的一种疾病,其引起的脱水是导致病猪死亡的主要原因,给我国乃至全球养猪业造成了严重的经济损失。猪肠道冠状病毒是引起猪病毒性腹泻的主要病原,包括猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV),以及最近新发现的猪急性腹泻综合征冠状病毒(swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)。其中 TGEV、PEDV 和 SADS-CoV 都属于尼多病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae family) α -冠状病毒属(Alphacoronavirus genera), PDCoV 属于 δ -冠状病毒属成员^[9-11]。

TGEV 和 PEDV 是最早发现的两种猪肠道冠状病毒^[12-13],具有高度的肠致病性,且对两周龄以下仔猪的致死率高达 100%^[14-15]。TGEV 于 1945 年在美国被首次分离^[1],之后在美洲、欧洲及亚洲等国家相继报道,呈地方性流行或发生于局部地区^[14]。PEDV 于 1971 年在英国被首次报道^[2],随后在欧洲以及中国、日本等亚洲国家相继报道^[15-16]。

2010 年我国再次暴发严重的猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)疫情,2013 年美国首次出现 PED 的大暴发,导致约超过 800 万的新生仔猪死亡,并随后蔓延至加拿大及墨西哥^[17-18]。迄今为止, PEDV 仍在世界范围内广泛流行。

PDCoV 基因组大小约为 25.4 kb,是所有冠状病毒中基因组最小的。PDCoV 于 2012 年在中国香港被首次报道^[19],2014 年 2 月在美国首次检测到 PDCoV,并迅速蔓延到美国多个州,感染猪的临床症状类似于 PEDV 感染,但仔猪的死亡率低于 PEDV^[20]。随后, PDCoV 在韩国和中国猪群中被发现^[21-22]。

SADS-CoV 是最近新发现的一种与 HKU-2 相关的蝙蝠源冠状病毒,基因组大小约为 27 kb^[23]。SADS-CoV 于 2017 年在中国广东省首次被发现,并迅速蔓延到附近的猪场,在短时间内导致近 2.5 万头仔猪死亡。SADS-CoV 感染猪的临床症状类似于 PDCoV 和 PEDV 感染,表现为严重且急性呕吐和腹泻,新生仔猪体重迅速减轻导致急性死亡,5 日龄及以下的仔猪死亡率高达 90%^[24]。

2 猪肠道冠状病毒体外研究模型介绍

病毒的体外分离与培养对研究病毒的生物学特性、致病机制及药物或疫苗的研发起着至关重要的作用。目前,研究 TGEV 致病性的体外模型主要有猪睾丸细胞(swine testicular, ST)、猪肾细胞(porcine kidney-15 cells, PK-15)和猪上皮细胞(空肠)(porcine small intestinal epithelial cell line-jejenum, IPEC-J2)^[25-27]。PEDV 的细胞适应性非常差,对其致病性的体外研究主要在 Vero 细胞上进行^[28]。此外, ST、PK-15、IPEC-J2 细胞以及另一种来源于非洲绿猴肾细胞的 MARC-145 也可以支持 PEDV 的体外增殖^[27,29]。TGEV 和 PEDV 主要感染猪小肠绒毛上皮细胞^[30-31],然而 ST、PK-15、Vero 以及 MARC-145 细胞来源并非猪肠上皮,与猪肠上皮细胞的很多特性都不相同,往往不能模拟

体内肠上皮细胞与 TGEV 或 PEDV 之间的相互作用。IPEC-J2 细胞是从刚出生的未吃初乳的仔猪空肠中段分离而来的非永生化细胞系^[32], 虽具有典型的肠上皮细胞特性, 但缺乏肠上皮细胞多样化类型和空间结构的复杂性, 因此不能很好地模拟自然感染过程。

PDCoV 是 2012 年新发现的一种猪肠道冠状病毒, 研究报告 ST 细胞和猪肾细胞(LLC porcine kidney, LLC-PK)能够支持 PDCoV 的体外分离与增殖^[33]。然而, PDCoV 主要感染猪小肠绒毛上皮细胞, 因此, 利用 ST 细胞和 LLC-PK 细胞进行 PDCoV 的相关研究不一定能真实反映体内病毒与宿主相互作用的情况。

SADS-CoV 是 2017 年发现的一种新型冠状病毒, 目前关于 SADS-CoV 的报道较少, 研究发现只有 Vero 细胞支持 SADS-CoV 的体外分离与增殖^[24]。然而, Vero 细胞并非猪源细胞, 并不能客观准确地反映 SADS-CoV 体内感染的情况。

综上, 当前用于猪肠道冠状病毒的体外研究模型都存在一定的局限性, 为更好地探究猪肠道冠状病毒的致病机制及其与宿主相互作用的生物学特征, 亟需开发一种能够密切概括猪肠道的体外模型, 以期能为疾病防控提供更加合理有效的策略。

3 肠小体概述

肠上皮是一个复杂的系统, 是许多胃肠道病原的主要感染部位以及与肠道微生物相互作用的界面, 由绒毛区(villus)和隐窝区(crypt)两个区域构成^[34]。肠上皮是哺乳动物自我更新最快的组织, 位于其底部隐窝结构中的肠干细胞是它快速更新不可或缺的驱动力。肠干细胞进行增殖后, 逐步分化成多种肠道上皮细胞(图 1), 包括执行吸收功能的肠细胞(enterocyte), 执行分泌功能的潘氏细胞(paneth cell)、杯状细胞(goblet cell)、肠内分泌细胞(enteroendocrine cell)和簇绒细胞(tuft cell), 以及 Peyer 集合淋巴结中的 M 细胞(microfold cell)^[35]。

近年来, 随着肠道干细胞分离技术的进步, 实现小肠上皮细胞体外长期培养成为可能。2009 年 Sato 等^[8]首次在体外建立了一种小肠类器官模型的培养方法, 该技术在无间质微环境的支持下利用单个 Lgr5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor, Lgr5)标记的干细胞建立一个隐窝-绒毛样结构的微型类器官, 这种类器官具有中间“囊样”结构的绒毛样区域和周围“芽状”结构的隐窝样区域的结构, 并且包含分化成熟的各种小肠上皮细胞类型, 称为肠小体(enteroids)。肠小体培养时需加入小肠生长所必需的生长因子(EGF、R-spondin-1、noggin、wnt3a 等)来模拟小肠干细胞的培养微环境, 同时用基质胶(matrigel)代替小肠间质的支架结构, 为肠小体的体外培养提供三维基质支持, 从而形成 3-D 肠组织类器官模型^[36]。为建立猪肠小体培养模型, 参考 Sato 等报道的培养方法, 我们实验室成功从猪的十二指肠(duodenum)、空肠(jejunum)、回肠(ileum)分离并培养了 Lgr5 干细胞来源的肠小体, 在培养第 7 天能分化形成具有隐窝-绒毛样结构的肠类器官(图 2)。

与目前传统的细胞模型相比, 肠小体具有显著优势。首先, 肠小体可通过周期性细胞解离和传代在体外长期、稳定地培养, 并且具有稳定的表型和遗传学特征^[38]。其次, 肠小体几乎包含所有终末分化的肠上皮细胞类型, 并含有隐窝-绒毛样结构, 不仅与活体内完整肠道独特的组织结构相似, 还具有吸收、分泌等生理功能^[39]。此外, 类似于经典的细胞系, 常规的基础实验技术, 如 PCR、qPCR、免疫组化、免疫荧光、慢病毒感染、CRISPR/Cas9 基因编辑等均适用于肠小体的研究^[40-42]。总的来说, 肠小体培养模型的成功构建, 为在体外探索病原体与宿主相互作用的研究提供了一个全新的平台, 进一步推动了生物体生理过程和疾病发病机制的探索, 同时也促进了药物筛选、毒理学研究和再生医学等多个领域的发展。

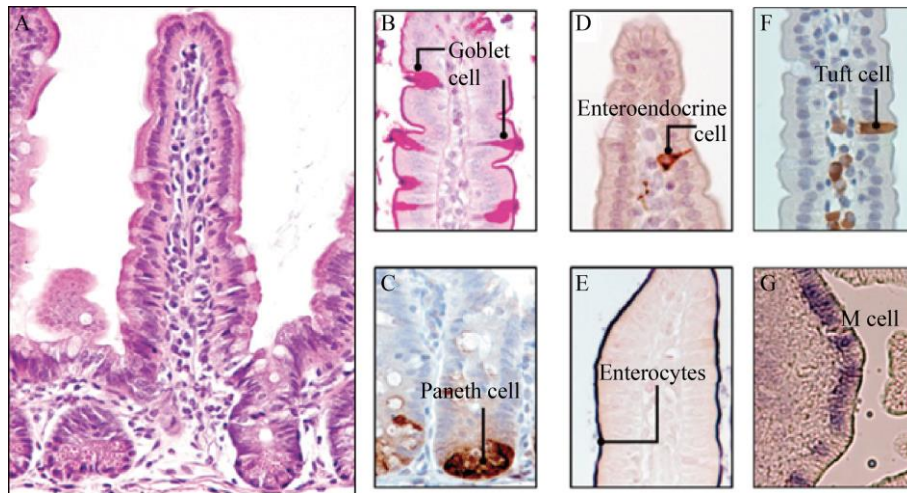


图1 肠上皮细胞类型示意图^[36]

Figure 1 Schematic of epithelial cell types of the small intestine^[36]

注: A: 肠上皮细胞; B: 杯状细胞; C: 潘氏细胞; D: 肠内分泌细胞; E: 肠细胞; F: 簇绒细胞; G: M细胞。

Note: A: Intestinal epithelium; B: Goblet cell; C: Paneth cell; D: Enteroendocrine cell; E: Enterocyte; F: Tuft cell; G: Microfold cell.

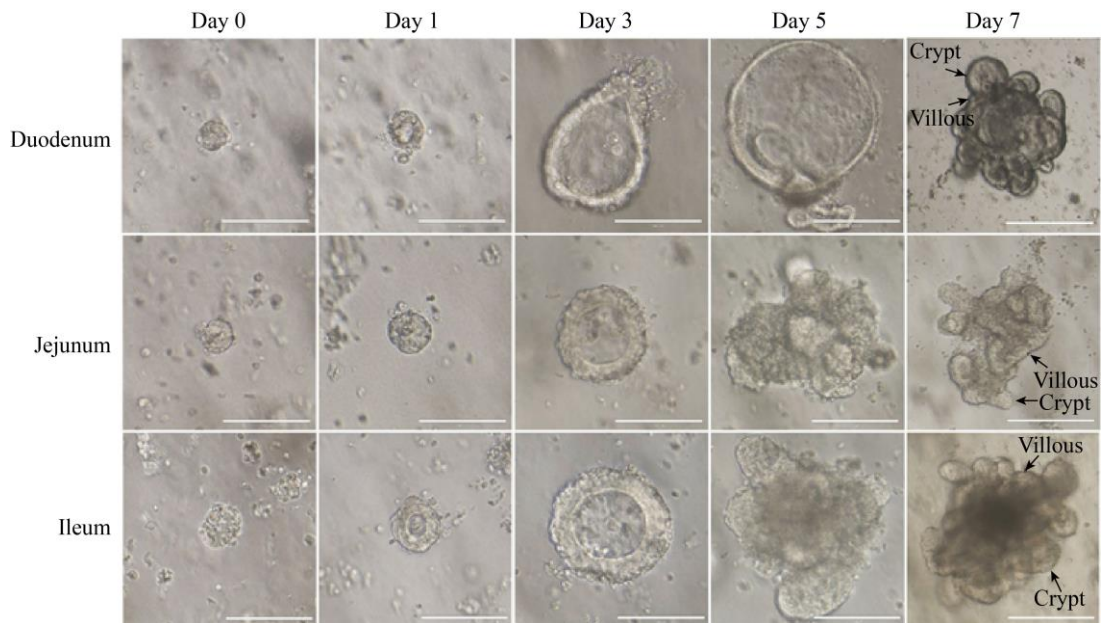


图2 猪肠小体的培养分化过程^[37]

Figure 2 The culture and differentiation process of porcine enteroids^[37]

Note: Bar: Day 0, Day 1, Day 3, Day 5: 100 μm ; Day 7: 200 μm .

4 肠小体在肠道病原研究中的应用

各种肠道病原感染引起的腹泻是临床常见的一种疾病,严重危害人类或动物的健康^[43]。在腹泻疾病的发生发展过程中,肠上皮是病原感染的主要靶点,由于传统的体外细胞模型不能概括胃肠道

高度复杂的生理特性,而肠小体模型的构建成功弥补了这一不足,成为一种在体外研究肠道病原感染期间肠上皮病理生理改变及其致病机制等方面的良好模型。随着肠小体培养技术的日趋成熟,近年来,肠小体模型已经广泛应用于人类及小鼠的小肠

生理与疾病基础的相关研究。

4.1 肠小体在人轮状病毒感染中的应用

人轮状病毒(human rotavirus, HRV)是一种分节段的双链 RNA 病毒^[44], 是全球严重腹泻病的主要病原, 每年导致约 45.3 万的 5 岁以下儿童死亡^[45]。由于 HRV 在大多数转化细胞系和动物模型中生长受限^[46-48], 以致于不能深入理解 HRV 的生物学特性以及与宿主之间的相互作用。随着人类肠小体模型的成功构建, 为进一步探究 HRV 的发生发展以及致病机制等提供了一个重要的体外研究模型。

为评估肠小体是否可以作为 HRV 感染模型, Saxena 等^[49]将 HRV Ito 毒株(G3P[8])和 Wa 毒株(G1P[8])感染从不同患者的小肠不同区域(十二指肠、空肠、回肠)分离的肠小体, 通过 RT-qPCR、流式细胞术、电镜以及免疫组化进行分析, 结果表明肠小体支持 HRV 进行有效的复制, 且从小肠所有肠段分离的肠小体都对 HRV 易感。由于 HRV 存在宿主限制性, 而许多动物轮状病毒(animal rotavirus, ARV)具有更广泛的宿主适应性, 于是 Saxena 等进一步比较了 HRV Ito 毒株和 ARV RRV 毒株(G3P[3])在肠小体上是否存在感染的差异性, 利用流式细胞术分析, 发现 HRV 感染的细胞(51.6%±10.8%)显著多于 ARV 感染的细胞(13.5%±2.4%), 表明肠小体对同源的 HRV 更易感^[49]。肠小体含有多种终末分化的细胞类型, 通过免疫荧光分析, 发现 HRV 主要感染肠细胞以及肠内分泌细胞, 表明 HRV 存在细胞特异性的感染方式^[49]。

在 HRV 感染性腹泻的发生过程中, 常发生肠管腔肿胀和液体分泌等生理变化。为探究肠小体是否可以模拟这一过程, Saxena 等将肠小体暴露于 HRV 毒株 Ito, 并在不同时间点通过显微镜测定肠小体的腔半径^[49]。结果发现, 肠小体在感染 HRV 后 3-4 h 开始扩张, 并在感染后 6 h 扩张至最大腔半径; 此外, 当肠小体暴露于轮状病毒肠毒素 NSP4 时, 也发生显著的管腔扩张^[49]。这些结果表明, 肠小体能够模拟 HRV 感染的病理生理学相关的

特性。

4.2 肠小体在其它肠道病原感染中的应用

人类诺如病毒(human norovirus, HuNoV)是全球急性胃肠炎的主要致病因素^[50], 许多学者尝试在体外建立 HuNoV 的培养系统, 但目前关于成功建立 HuNoV 培养模型报道仍然较少^[51]。2016 年, Ettayebi 等^[52]首次将肠小体用于 HuNoV 的研究。Ettayebi 等^[52]将 HuNoV GII.4 基因型接种人空肠小体, 通过 RT-qPCR、免疫荧光、流式细胞术以及电镜分析, 证实人肠小体支持 HuNoV 进行有效的复制。其次, 研究发现 HuNoV 仅感染肠细胞, 提示肠细胞可能是 HuNoV 感染的主要靶细胞^[52]。此外, 进一步研究发现, 肠小体能够模拟流行病学中 HuNoV 的感染模式, 表明肠小体模型是一种生物学相关系统, 能模拟遗传决定的个体差异性^[52]。最后, Ettayebi 等研究发现, 肠道环境中的一种关键因子——胆汁在 HuNoV 感染中具有至关重要的作用^[52]。总的来说, 该研究首次利用肠小体建立了 HuNoV 体外感染模型, 有助于深入理解 HuNoV 的进化及致病机制。

2017 年, Drummond 等^[53]从人类胎儿小肠分离并培养了肠小体, 并将该模型应用于肠道病毒(enteroviruses)感染的研究。Drummond 等^[53]通过研究发现肠小体能够支持多种肠道病毒[柯萨奇病毒 B (coxsackievirus B, CVB)、埃可病毒 11 (echovirus 11, E11)、肠道病毒 71 (enterovirus 71, EV71)]的复制及子代病毒的释放。随后, Drummond 等通过 RNA-Seq 分析, 结果发现肠小体在 E11 感染时能显著诱导细胞因子、趋化因子以及干扰素刺激基因(interferon-stimulated genes, ISGs)的表达, 然而 CVB 和 EV71 感染并未诱导这些信号分子的表达, 表明肠小体在肠道病毒感染时能诱导宿主产生抗病毒免疫应答, 且存在病毒类型特异性差异^[53]。此外, 进一步研究发现, E11 主要感染肠细胞和肠内分泌细胞, 不感染杯状细胞, 表明肠道病毒感染特定的小肠上皮细胞类型^[53]。

2018 年, Holly 等也利用肠小体模型进行了人

腺病毒(human adenovirus, HAdV)致病机制的相关研究。Holly 等研究发现肠小体能够支持多种血清型的 HAdVs (HAdV-5p, HAdV-16p, HAdV-41p) 进行有效的复制^[54]; 他们进一步研究发现, 肠小体也能够支持 HAdV 临床毒株的复制; 另外, 他们研究还发现 I 型和 III 型 IFN 处理肠小体后能有效地抑制 HAdV 的复制, 但处理传统细胞系并不能明显抑制病毒的复制; 此外, 该研究还发现 HAdV-5p 优先感染杯状细胞, 且能被人肠道 α -防御素 HD5 中和^[54]。

肠道小肠上皮能产生丰富的 α -防御素, 有研究报道 α -防御素能选择性中和某些 AdV 血清型^[55-56]。为探究自然分泌的 α -防御素对鼠腺病毒 2 (mouse adenovirus 2, MAdV-2) 的影响, Wilson 等从野生型(WT)小鼠和缺乏功能性 α -防御素(*Mmp7*^{-/-})小鼠的肠组织分离肠小体, 然后将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的 MAdV-2 (MAdV-2.IXeGFP)显微注射到肠小体的管腔中, 并检测病毒的感染情况^[57]。结果表明, 在 WT 肠小体内产生的病毒显著高于在 *Mmp7*^{-/-}肠小体内产生的病毒, 且与体内感染结果一致^[57]。

5 肠小体在 PEDV 感染中的应用

虽然肠小体已经在人类以及小鼠肠道病原研究中成功应用, 但猪肠小体应用于猪肠道冠状病毒感染的相关研究报道却较少。2019 年, 我们实验室成功建立猪肠小体的培养, 并首次将该模型应用于 PEDV 感染的研究^[37]。为探究 PEDV 是否能够感染猪肠小体, 我们将临床分离株 PEDV-JMS 感染猪小肠不同区域(十二指肠、空肠、回肠)分离的肠小体, 通过免疫荧光等分析(图 3), 结果发现从小肠不同区域分离的肠小体都对 PEDV 易感^[37]。有研究报道 PEDV 体内主要感染小肠, 但在结肠中也存在限制性的感染^[58]。为探究肠小体是否能模拟 PEDV 在不同肠段感染的差异性, 我们将 PEDV-JMS 感染回肠小体和结肠小体, 通过 RT-qPCR、免疫荧光进行分析, 结果发现 PEDV 在

回肠小体上的复制显著优于结肠小体, 表明肠小体能够模拟 PEDV 体内感染的发生发展过程; 我们进一步研究发现, 与细胞适应株 PEDV-CV777 相比, 临床分离株 PEDV-JMS 在回肠小体上复制得更好^[37], 表明利用猪肠小体分离 PEDV 临床株有着巨大的应用前景; 同样地, 与 HRV 和 HuNoV 一样, 我们研究发现 PEDV 可以感染肠细胞以及杯状细胞, 且与体内感染结果一致^[37]。

最近有研究报道 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞能够抑制 I 型和 III 型 IFN 的产生^[59], 为探究 PEDV 感染肠小体是否能抑制 IFN 应答, 我们检测了 PEDV-JMS 感染回肠小体不同时间点的 I 型和 III 型 IFN 的 mRNA 水平, 结果发现 PEDV 在感染早期能够抑制 IFN 的产生; 此外, 我们进一步比较了 I 型和 III 型 IFN 在肠小体上的抗病毒活性, 结果发现与 I 型 IFN 相比, III 型 IFN 能够诱导更强的 ISGs 的表达, 并且表现出更强的抗 PEDV 活性^[37]。

总之, 我们实验室利用猪肠小体建立了 PEDV 感染模型, 且该模型能很好地模拟 PEDV 体内感染的过程, 为进一步深入探究 PEDV 的致病机制奠定了基础。

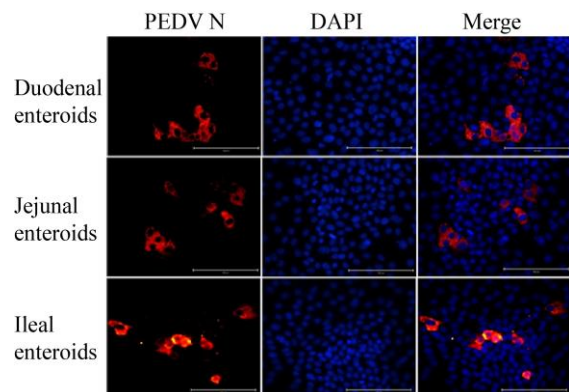


图 3 IFA 检测 PEDV 感染猪肠小体的情况^[37]

Figure 3 Detection of PEDV infection in porcine enteroids by IFA^[37]

Note: Bar: 100 μ m.

6 展望

猪肠道冠状病毒仍然是引起仔猪腹泻的主要原因, 主要通过粪-口途径传播, 感染小肠绒毛上皮细胞, 引起仔猪的急性呕吐、腹泻及死亡。然而, 由于当前用于猪肠道冠状病毒的体外研究模型大部分来源都并非猪肠上皮, 如 Vero、ST、PK-15 细胞等, 而 IPEC-J2 细胞虽来源于猪肠上皮, 但其并不能模拟肠道复杂的生理特性, 限制了对病毒生物学功能以及与宿主相互作用的深入了解。肠小体具有模拟胃肠道高度复杂的空间结构及生理功能的特点, 克服了以前一些传统细胞模型的不足, 已广泛应用于人类及小鼠肠道病原的相关研究。该模型的应用已经在肠道研究领域取得了许多重大突破, 为肠道感染的防控与治疗提供了新的思路。猪肠小体培养模型的建立, 以及成功应用于 PEDV 感染的研究, 突破了一直限制猪肠道冠状病毒体外研究的瓶颈, 这为将来广泛应用于其它猪肠道冠状病毒感染的相关研究奠定了基础。

综上, 肠小体为猪肠道冠状病毒的基础研究提供了一个理想的体外模型, 使阐明其与宿主相互作用的致病机制以及病理生理成为可能, 从而为疾病的治疗和防控提供新的理论指导。

REFERENCES

- [1] Doyle LP, Hutchings LM. A transmissible gastroenteritis in pigs[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1946, 108: 257-259
- [2] Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Archives of Virology*, 1978, 58(3): 243-247
- [3] Wang L, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227-1230
- [4] Gong L, Li J, Zhou QF, et al. A new Bat-HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(9): 1607-1609
- [5] Wagner JE, Beamer PD, Ristic M. Electron microscopy of intestinal epithelial cells of piglets infected with a transmissible gastroenteritis virus[J]. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1973, 37(2): 177-188
- [6] Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis[J]. *The Veterinary Journal*, 2015, 204(2): 134-143
- [7] Jung K, Hu H, Eyerly B, et al. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4): 650-654
- [8] Sato T, Vries RG, Snippet HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build cryptvillus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265
- [9] Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus[J]. *Journal of Virology*, 1991, 65(6): 3369-3373
- [10] Lin CM, Saif LJ, Marthaler D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 20-39
- [11] Dong N, Fang LR, Zeng SL, et al. Porcine deltacoronavirus in mainland China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2254-2255
- [12] McClurkin AW. Studies on transmissible gastroenteritis of swine I. The isolation and identification of a cytopathogenic virus of transmissible gastroenteritis in primary swine kidney cell cultures[J]. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 1965, 29(2): 46-53
- [13] Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. *Veterinary Record*, 1977, 100(12): 243-244
- [14] Pritchard GC. Transmissible gastroenteritis in endemically infected breeding herds of pigs in East Anglia, 1981-85[J]. *Veterinary Record*, 1987, 120(10): 226-230
- [15] Hofmann M, Wyler R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera[J]. *Veterinary Microbiology*, 1990, 21(3): 263-273
- [16] Chen JF, Wang CB, Shi HY, et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(9): 1471-1476
- [17] Mole B. Deadly pig virus slips through US borders[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 388
- [18] Ojkic D, Hazlett M, Fairles J, et al. The first case of porcine epidemic diarrhea in Canada[J]. *The Canadian Veterinary Journal*, 2015, 56(2): 149-152
- [19] 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]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008
- [20] Li GW, Chen Q, Harmon KM, et al. Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(2): e00278-14
- [21] Lee S, Lee C. Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14-04/2014[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01191-14

- [22] Song D, Zhou X, Peng Q, et al. Newly emerged porcine *Deltacoronavirus* associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 575-580
- [23] Pan YF, Tian XY, Qin P, et al. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 15-21
- [24] Zhou P, Fan H, Lan T, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin[J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 255-258
- [25] Sirinarumit T, Kluge JP, Paul PS. Transmissible gastroenteritis virus induced apoptosis in swine testes cell cultures[J]. *Archives of Virology*, 1998, 143(12): 2471-2485
- [26] Huang Y, Ding L, Li ZC, et al. Transmissible gastroenteritis virus infection induces cell apoptosis via activation of p53 signalling[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(8): 1807-1817
- [27] Zhao SS, Gao JK, Zhu LQ, et al. Transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus infection induces dramatic changes in the tight junctions and microfilaments of polarized IPEC-J2 cells[J]. *Virus Research*, 2014, 192: 34-45
- [28] Hofmann M, Wyler R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhoea in cell culture[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(11): 2235-2239
- [29] Liu C, Tang J, Ma YM, et al. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhoea coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(11): 6121-6125
- [30] Woods RD, Cheville NF, Gallagher JE. Lesions in the small intestine of newborn pigs inoculated with porcine, feline, and canine coronaviruses[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1981, 42(7): 1163-1169
- [31] Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, et al. Emergence of *Porcine epidemic diarrhoea virus* in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(5): 649-654
- [32] Brosnahan AJ, Brown DR. Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156(3/4): 229-237
- [33] Hu H, Jung K, Vlasova AN, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhoea in the United States[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1537-1548
- [34] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(1): 20-32
- [35] Buczacki SJA, Zecchini HI, Nicholson AM, et al. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5[J]. *Nature*, 2013, 495(7439): 65-69
- [36] Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 274-284
- [37] Li L, Fu F, Guo SS, et al. Porcine intestinal enteroids: a new model for studying enteric coronavirus PEDV infection and the host innate response[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(5): e01682-18
- [38] Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications[J]. *Science*, 2013, 340(6137): 1190-1194
- [39] Zachos NC, Kovbasnjuk O, Foulke-Abel J, et al. Human enteroids/colonoids and intestinal organoids functionally recapitulate normal intestinal physiology and pathophysiology[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(8): 3759-3766
- [40] Miyoshi H, Stappenbeck TS. *In vitro* expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(12): 2471-2482
- [41] Yin YB, Bijvelds M, Dang W, et al. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids[J]. *Antiviral Research*, 2015, 123: 120-131
- [42] Driehuis E, Clevers H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2017, 312(3): G257-G265
- [43] Donowitz M, Alpers DH, Binder HJ, et al. Translational approaches for pharmacotherapy development for acute diarrhoea[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(3): e1-e9
- [44] Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(6): 1939-1951
- [45] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000-2013[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2016, 62(S2): S96-S105
- [46] Cuadras MA, Feigelstock DA, An S, et al. Gene expression pattern in Caco-2 cells following rotavirus infection[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(9): 4467-4482
- [47] Hoshino Y, Saif LJ, Kang SY, et al. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model[J]. *Virology*, 1995, 209(1): 274-280
- [48] Kitamoto N, Ramig RF, Matson DO, et al. Comparative growth of different rotavirus strains in differentiated cells (MA104, HepG2, and CaCo-2)[J]. *Virology*, 1991, 184(2): 729-737
- [49] Saxena K, Blutt SE, Ettayebi K, et al. Human intestinal enteroids: a new model to study human rotavirus infection, host restriction, and pathophysiology[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(1): 43-56
- [50] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(8): 725-730
- [51] Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, et al. Laboratory efforts to cultivate noroviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85(1): 79-87
- [52] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids[J]. *Science*, 2016, 353(6306): 1387-1393

- [53] Drummond CG, Bolock AM, Ma CR, et al. Enteroviruses infect human enteroids and induce antiviral signaling in a cell lineage-specific manner[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(7): 1672-1677
- [54] Holly MK, Smith JG. Adenovirus infection of human enteroids reveals interferon sensitivity and preferential infection of goblet cells[J]. Journal of Virology, 2018, 92(9): e00250-18
- [55] Wilson SS, Wiens ME, Holly MK, et al. Defensins at the mucosal surface: latest insights into defensin-virus interactions[J]. Journal of Virology, 2016, 90(11): 5216-5218
- [56] Smith JG, Silvestry M, Lindert S, et al. Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(6): e1000959
- [57] Wilson SS, Bromme BA, Holly MK, et al. Alpha-defensin-dependent enhancement of enteric viral infection[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(6): e1006446
- [58] Jung K, Eyerly B, Annamalai T, et al. Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 177(3/4): 373-378
- [59] Zhang QZ, Ke HZ, Blikslager A, et al. Type III interferon restriction by porcine epidemic diarrhea virus and the role of viral protein nsp1 in IRF1 signaling[J]. Journal of Virology, 2018, 92(4): e01677-17

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊,中文核心期刊,中国科技核心期刊,CSCD 核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今,本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选 300 种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(1) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得;(2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以避免长句,以求简单清晰;(3) 建议使用过去时态,要求语法正确,句子通顺;(4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致,但可比中文摘要更详尽,写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿;(5) 摘要中不要使用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP 等;(6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词:应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不用,如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.338)