

猪丁型冠状病毒感染引致细胞自噬的研究进展

邹程琳¹, 赵智香^{*2}, 严亚贤^{*1}

1 上海市兽医生物技术重点实验室 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

2 河套学院, 内蒙古 巴彦淖尔 015000

邹程琳, 赵智香, 严亚贤. 猪丁型冠状病毒感染引致细胞自噬的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5367-5376

Zou Chenglin, Zhao Zhixiang, Yan Yaxian. Autophagy induced by porcine deltacoronavirus infection: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5367-5376

摘要: 细胞自噬是利用溶酶体对细胞内多余、受损、死亡的蛋白质和细胞器进行降解的一种过程。细胞受到病毒等刺激时, 为了维持内环境稳态, 细胞自噬常有发生, 虽然细胞自噬可以有效抵抗病毒入侵, 但这个过程也会对病毒感染产生负作用。猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)感染细胞时会引发细胞发生自噬现象。本文从自噬的种类和发生流程、自噬与 PDCoV 互作及相关检测方法等方面, 对细胞自噬在 PDCoV 感染中如何抵抗和促进病毒复制进行了阐述, 对进一步研究 PDCoV 致病机制和防控具有积极意义。

关键词: 猪丁型冠状病毒; 细胞自噬; 检测方法; 抗病毒

Autophagy induced by porcine deltacoronavirus infection: a review

ZOU Chenglin¹, ZHAO Zhixiang^{*2}, YAN Yaxian^{*1}

1 Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Hetao College, Bayannur 015000, Inner Mongolia, China

Abstract: Autophagy is a cellular process that removes unnecessary or dysfunctional components through a lysosome-dependent regulated mechanism. It occurs in the presence of stimuli such as virus to maintain homeostasis. Autophagy can help defend against viral invasion and may promote viral replication. Porcine deltacoronavirus (PDCoV) can induce autophagy. In this paper, we summarize the types and process of autophagy, interaction of autophagy with PDCoV, and related detection methods, to

基金项目: 上海市科技兴农科技创新项目(202102080012F00773)

Supported by: Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (202102080012F00773)

*Corresponding authors: E-mail: ZHAO Zhixiang: 493672842@qq.com; YAN Yaxian: yanyaxian@sjtu.edu.cn

Received: 2022-06-16; Accepted: 2022-08-11; Published online: 2022-09-05

elucidate how autophagy resists the infection and supports the replication of PDCoV. The findings are expected to serve as a reference for further research on the pathogenic mechanism of PDCoV and prevention and control of this virus.

Keywords: porcine deltacoronavirus; autophagy; detection methods; antiviral

在应激条件下,真核细胞利用溶酶体降解错误折叠的蛋白质及受损的细胞器,进而周转细胞内物质、维持细胞稳态的细胞分解代谢过程,即为细胞自噬(autophagy)^[1]。在哺乳动物细胞中,这个适应过程是高度保守且耗能的分解代谢途径^[2]。细胞自噬的发展历史悠久。1956年,Novikoff等^[3]利用显微镜观察到了与溶酶体高度相关的“致密体”结构,这种未被定义的现象为自噬体的发现奠定了早期基础;1963年,De Duve^[4]在国际溶酶体会议上首次提出“自噬”的概念,解答了人们对于细胞内出现特殊结构的疑问,为日后研究自噬提供了基础定义;1997年,Matsuura等^[5]克隆了第一个自噬基因 *apg1* (后命名为 *ATG1*),逐步在分子水平探索自噬的发生机制;2014年,Chen等^[6]发现冠状病毒木瓜蛋白酶通过诱导自噬抑制先天免疫,促进病毒复制。2021年,Qu等^[7]发现新型冠状病毒诱导并利用自噬途径增强自身复制。为深入了解自噬发生的过程、调控机制及其与病毒互作,各国学者开始对细胞自噬展开了深入研究^[8]。

冠状病毒(coronavirus, CoV)感染宿主的范围广泛,对自然界生物有极大的威胁性。CoV分为甲型、乙型、丙型、丁型4个属,当前肆虐全球的新冠病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)属于乙型冠状病毒属;而猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)属于丁型冠状病毒属,可造成仔猪腹泻、呕吐、脱水等病症,造成新生仔猪致死率较高。本文从细胞自噬与PDCoV的相互作用展开论述,为找到PDCoV治疗方法提供新思路,降低PDCoV感染给养猪业造成的经济损失。

1 自噬的种类和发生流程

1.1 自噬种类

因吞噬方式的不同将真核细胞中的自噬分为3种类型:(1)微自噬,溶酶体或液泡膜内陷或突起吞噬异物的过程^[9];(2)分子伴侣介导的自噬,通过特异性溶酶体靶向受体摄取异物的过程^[10];(3)巨自噬,由无核糖体附着的粗面内质网所形成的双层膜囊泡包裹异物,并呈递至溶酶体或液泡降解^[11]。而且3种类型最终都会促进溶酶体的蛋白降解^[12],产生代谢所需的小分子营养物质会回归到细胞质。目前,大多数研究主要围绕巨自噬(简称自噬)展开^[13]。

1.2 自噬相关蛋白

目前已有40多种自噬相关蛋白被列为自噬重点组成成分,其中有18种被列为核心组成成分^[14]。其中核心组成包含五大成分:Unc-51样激酶复合物(unc-51 like kinase complex, ULK), III类磷脂酰肌醇-3-激酶[class III phosphatidylinositol-3-kinase, PI(3)K]复合物,磷酸肌醇相互作用的WD重复蛋白(WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein, WIPI)家族,以及两个进化保守的泛素样系统——自噬相关蛋白(autophagy, ATG12)偶联系统和微管相关蛋白(microtubule associated protein, LC3)偶联系统^[15]。

核心组成的五大成分相辅相成,共同促进细胞自噬的发生。首先,自噬上游是Unc-51样激酶复合物,其中包括自噬相关蛋白(ATG13、ATG101)和RB1诱导卷曲蛋白1(FAK family kinase-interacting protein, FIP200)等^[16],激活发

生磷酸化有助于促进相关复合物形成。其次, 诱导自噬的发生离不开 PI(3)K 激酶^[17], 它和磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 4 (vacuolar protein sorting, VPS15)、自噬相关蛋白 (autophagy, ATG14L) 一起组成了自噬相关蛋白 Beclin-1 复合物, 而后, PI(3)K 激酶磷酸化产生磷脂酰肌醇 3-磷酸 [PtdIns(3)P], 有利于 WIPI 家族与 ATG12 偶联系统结合, 促进自噬小体的形成及其从膜上分离^[18-19]。最后, 自噬的发生通过泛素样 LC3 偶联系统^[20]将 LC3 前体蛋白 (pre-LC3) 逐步转化为 LC3-I 蛋白和 LC3-II 蛋白, 此即检测细胞内发生自噬的重要蛋白指标。由此可见, 五大成分缺一不可, 而且主要集中在自噬发生流程的前半部分。

1.3 自噬发生流程

常态时, 细胞内环境处于相对稳定, 自噬发生水平相对较低^[15]。导致细胞内自噬增加的原因主要有病毒感染、缺少营养、生长因子变化、氧气不足、器官受损等, 当细胞处于上述状态时自噬也正逐步发生, 自噬泡 (phagophore)

从内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 上脱落, 为自噬成核的起始位点^[21]。哺乳动物体内的自噬过程主要分为四个阶段 (图 1): 成膜 (membrane formation)、成熟 (maturation)、融合 (fusion) 和溶解 (degradation)^[22]。

第一阶段, 内质网上形成双层膜结构。在哺乳动物中, Unc-51 样激酶复合物的活性受雷帕霉素 (mammalian target of rapamycin, mTORC1) 负调控, 并受 5' 磷酸腺苷活化蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK] 正调控, 可以磷酸化激活 Beclin1 复合物生成^[23-24], 该过程可由环境中的 B 细胞淋巴瘤因子 2 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 抑制。随后该复合物在内质网上作为自噬体形成的起始位点, 开始形成双层膜结构^[25]。

第二阶段, 自噬体成熟。双层膜的延展由不可逆的 ATG12 偶联系统^[26]和 LC3 偶联系统协同控制。首先, 在 E1 酶和 E2 酶作用下, 自噬相关蛋白复合物 (ATG16L、ATG5 和 ATG12) 彼此连接, 即 ATG12 偶联系统; 随后, 将 LC3 前

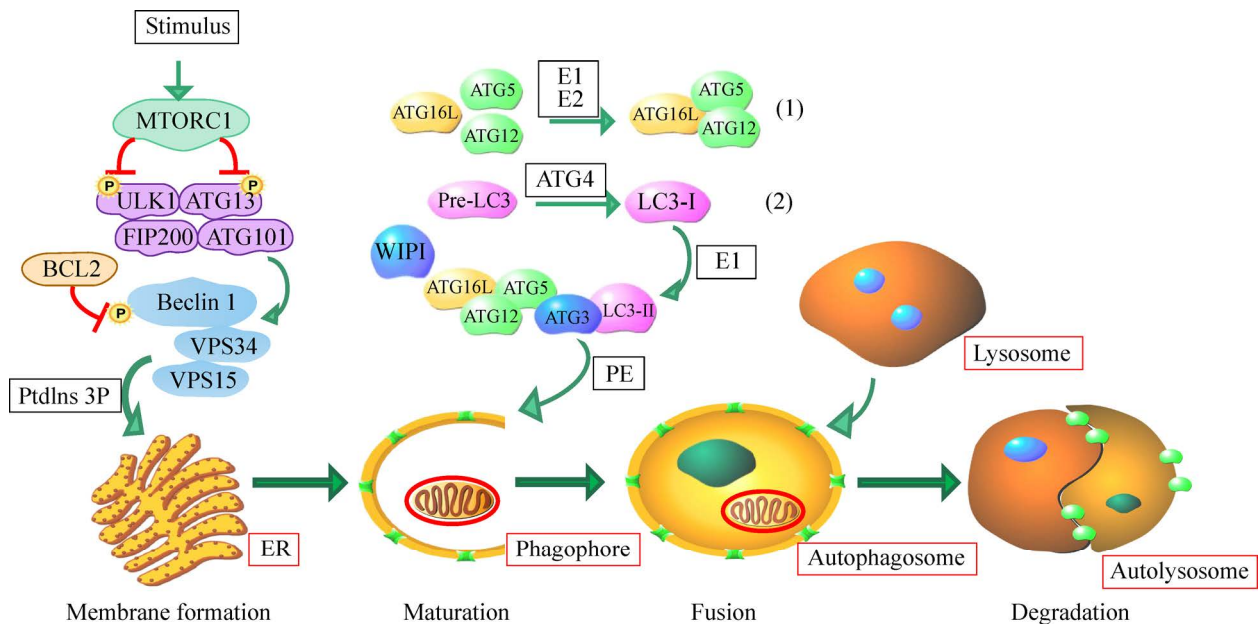


图 1 细胞自噬的 4 个阶段

Figure 1 Four stages of autophagy.

体蛋白在自噬相关蛋白(ATG4)作用下转化为 LC3-I 蛋白,紧接着在泛素活化酶 E1 样酶(ATG7)作用下转化为 LC3-II 蛋白,即 LC3 偶联系统;最后,两个偶联系统通过泛素缀合酶 E2 样酶(ATG3)相互结合,在膜脂分子磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)作用下^[27]与 WIPI 家族形成 LC3-PE 体系。在该体系作用下,双层膜两端向外延长并逐渐弯曲形成自噬泡,自噬泡弯曲封闭最终形成成熟的双层膜结构,即自噬体(autophagosome)。

第三阶段,自噬体和溶酶体(lysosome)融合。双层膜自噬体通过膜识别蛋白与溶酶体融合成单层膜自噬溶酶体(autolysosome)^[28],将自噬体内包裹的废物清除。同时,在与溶酶体融合之前,自噬体也可能会与晚期核内体形成两性体^[29],而后再与溶酶体融合。

第四阶段,自噬溶酶体溶解包裹物。自噬溶酶体利用溶酶体特性降解体内衰老损伤的废物,并将小分子分解产物通过膜转运蛋白释放到细胞质中,作为营养物质供给细胞,无法被细胞利用的物质被排放到胞浆中或细胞外。同时,负反馈自噬上游^[30-31]。

2 自噬与 PDCoV 感染的关系

宿主感染 PDCoV 后以天然免疫和适应性免疫 2 种方式产生抵抗机制。Jiang 等^[32]发现 PDCoV 感染小肠上皮细胞(intestinal porcine epithelial cell, IPEC-J2)时,宿主的 miRNA 能通过调节先天免疫反应抑制 PDCoV 复制。同时,Liu 等^[33]在原代猪肠样细胞和猪睾丸细胞(swine testis, ST)上,体外验证了 PDCoV 感染后期会上调猪白细胞抗原 I 类(swine leukocyte antigen-I, SLA-I)分子和 SLA-I 抗原呈递相关基因的表达,从而抑制病毒复制。上述研究发现,病毒感染后一般会受到宿主天然免疫抵制。然

而,Jeon 等^[34]发现 PDCoV 感染 IPEC-J2 后产生了破坏宿主天然免疫的机制,从而促使病毒在宿主中的传播。Ji 等^[35]发现 PDCoV 感染猪肾细胞(lilly laboratories cell-porcine kidney 1, LLC-PK1)时,其 N 蛋白通过泛素-蛋白酶体途径以物种特异性方式降解 poIRF7,然后促进其降解以抑制猪 I 型 IFN 的产生,从而减弱天然免疫的抗病毒功能。

上述 2 种不同的现象揭示了 PDCoV 感染宿主后,在宿主体内通过不同的信号通路产生了不同的应答机制。据此推测,在 PDCoV 感染初期,其增殖能力受到宿主自身免疫应答的抵抗机制;在感染中后期,PDCoV 很有可能胁迫某机制逃避免疫反应从而提高复制水平。针对这种机制所展开的研究不约而同地汇集到细胞自噬的相关通路上,因此,探索 PDCoV 感染与自噬的互作关系显得尤为迫切。

2.1 天然免疫调控细胞自噬以抗病毒

天然免疫是利用模式识别受体(PRRs)产生抗病毒因子和免疫调节因子以抵抗病毒感染,在调控细胞自噬中发挥着重要作用。干扰素(interferon, IFN)包括 3 种亚型,即 I 型、II 型和 III 型,通过结合并激活其受体相关信号通路来抑制病毒。一方面,干扰素通过激活 PI(3)K 磷酸化蛋白激酶,使叉头蛋白家族 O 类成员(forkhead box O3, FOXO3)上调 BCL-2,激活 mTOR 抑制 ULK,从而抑制自噬^[36];另一方面,干扰素激活信号转换器和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT),形成干扰素刺激因子复合物,其中包含 STAT1、STAT2 和干扰素调节因子(IRF9)。复合物进入细胞核后,结合干扰素刺激反应元件(interferon-stimulated genes, ISGs)以介导细胞死亡、免疫等基因转录^[36]。

PRRs 特异性识别外源微生物后,通过相应

的信号通路产生干扰素来抗病毒。其中包括 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)、RIG-I 样受体(RIG-I like receptors, RLRs)、DNA 模式识别受体和 NOD 样受体(NOD like receptors, NLRs) 这 4 种信号通路。细胞自噬与 4 种信号通路相互协调以促进或抑制病毒增殖(图 2)。TLRs 家族包括 TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 等成员, 特异性识别病毒核酸。细胞自噬通过 TLRs 信号通路产生 I 型干扰素抗病毒。在自噬发生过程中, TLR3 通过衔接蛋白(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF)诱导受体蛋白(tripartite motif family, TRIM)来识别病原体^[37]。TLR7、TLR8、TLR9 利用衔接蛋白(myeloid differentiation primary response 88, MyD88)接受细胞自噬的信号后激活 I 型干扰素以抗病毒^[38]。RLRs 家族包括视黄酸诱导基因(retinoic acid-inducible gene I, *RIG-I*)和黑色素瘤分化相关基因(melanoma differentiation-associated gene

5, *MDA5*)等, 特异性识别 RNA 病毒。在细胞自噬成熟阶段, 自噬相关蛋白(ATG5、ATG12)会抑制 RIG-I 和 MDA5 分别与线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral-signaling protein, MAVS)相互作用, 抑制干扰素调节因子(IRF3)磷酸化, 从而抑制 I 型干扰素^[39]。DNA 模式识别受体包括环 GMP-AMP 合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)等, 特异性识别病毒核酸。一方面, Liang 等^[40]证实 cGAS 在蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)作用下磷酸化解除 beclin-1 抑制剂, 促进 PI(3)K 激酶诱导自噬; 另一方面, cGAS 在三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和三磷酸鸟苷(guanosine-5'-triphosphate, GTP)作用下生成环磷酸一鸟苷-磷酸腺苷(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, cGAMP), 激活内质网上的干扰素基因刺激剂(stimulator of interferon gene, STING), 有利于刺激 TANK 结合激酶(TANK-

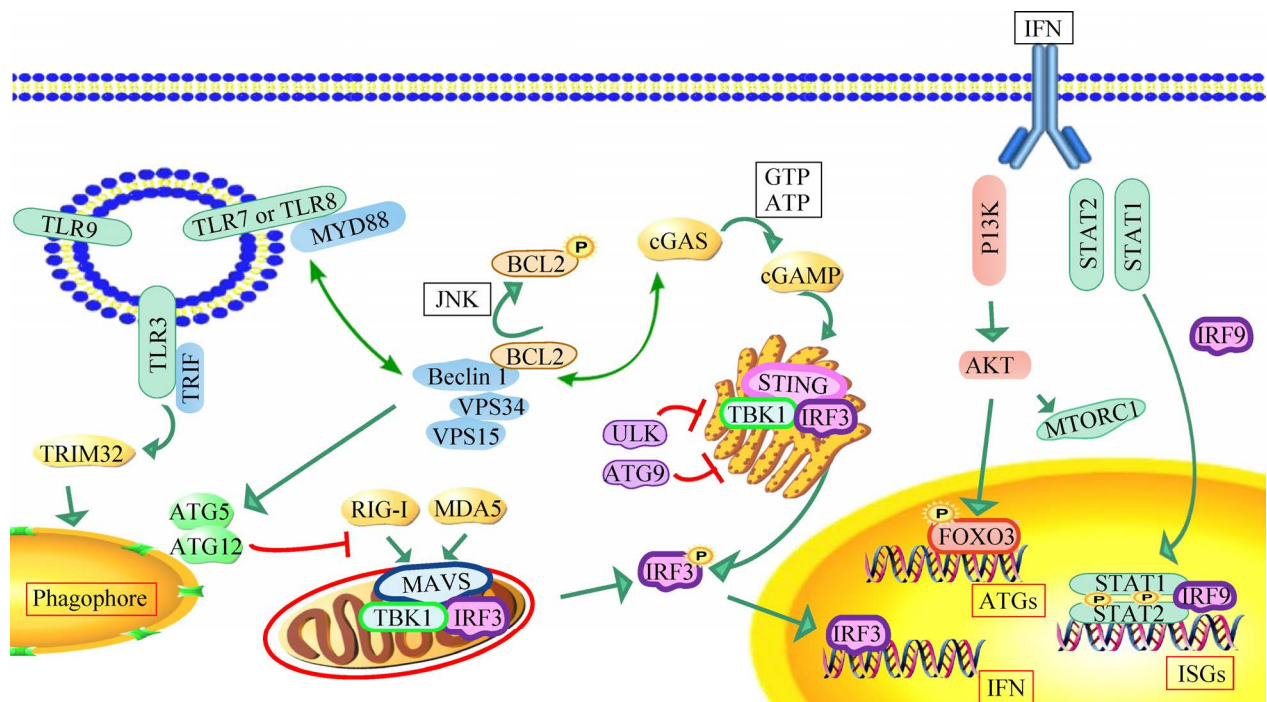


图 2 细胞自噬与天然免疫
Figure 2 Autophagy and innate immunity.

binding kinase 1, TBK1)磷酸化干扰素调节因子, 促进干扰素的表达, 其中 TBK1 在细胞自噬的成熟阶段发挥重要抵御病毒作用^[41]。NLRs 家族特异性识别细菌的核酸, 可通过调节炎症小体的活性间接影响自噬水平^[42]。

2.2 细胞自噬促进适应性免疫以抵抗病毒

适应性免疫系统依赖于对 PDCoV 病原体相关蛋白的识别, 以及其在主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子上的结合。其中 MHC I 类分子将抗原肽呈递给 CD8⁺ T 淋巴细胞的受体(T-cell receptor, TCR), MHC II 类分子将抗原肽呈递给 CD4⁺ T 淋巴细胞受体。如图 3 所示, 自噬为溶酶体降解提供被膜蛋白(pp65)、核抗原(epstein-barr nuclear antigen 1, EBNA1)、潜伏相关抗原(UL138)、重要免疫原(gB)、病毒结构蛋白(Gag)等物质, 促进 MHC II 类分子呈递内源性抗原的加工。一方面, LC3-PE 偶联机制可增强细胞内

抗原在 MHC II 类分子上的呈递。通过自噬处理内源性 MHC II 类抗原有助于诱导 T 细胞耐受并促进细胞内抗原呈递给 CD4⁺ T 细胞^[42]。另一方面, 除了 MHC II 类途径, 自噬在 MHC I 类分子呈递抗原中也起重要作用。研究发现, 自噬通过介导 IFN- γ 上调 MHC I 类, 将细胞内抗原递送到 MHC I 类并促进其呈递抗原进而抑制病毒复制^[42]。

2.3 PDCoV 引发自噬促进病毒复制

病毒感染引发的自噬反应对不同病毒复制有不同的作用。一方面, 病毒感染引发细胞自噬后, 通过自噬溶酶体的降解作用抑制病毒的复制。Ko 等^[43]发现在猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)感染 IPEC-J2 早期, 通过自噬诱导剂将病毒呈递到自噬溶酶体中降解, 从而显著抑制 PEDV 的增殖。另一方面, 病毒引发自噬后也会产生胁迫机制, 从而促进病毒复制。Zhu 等^[44]发现猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus,

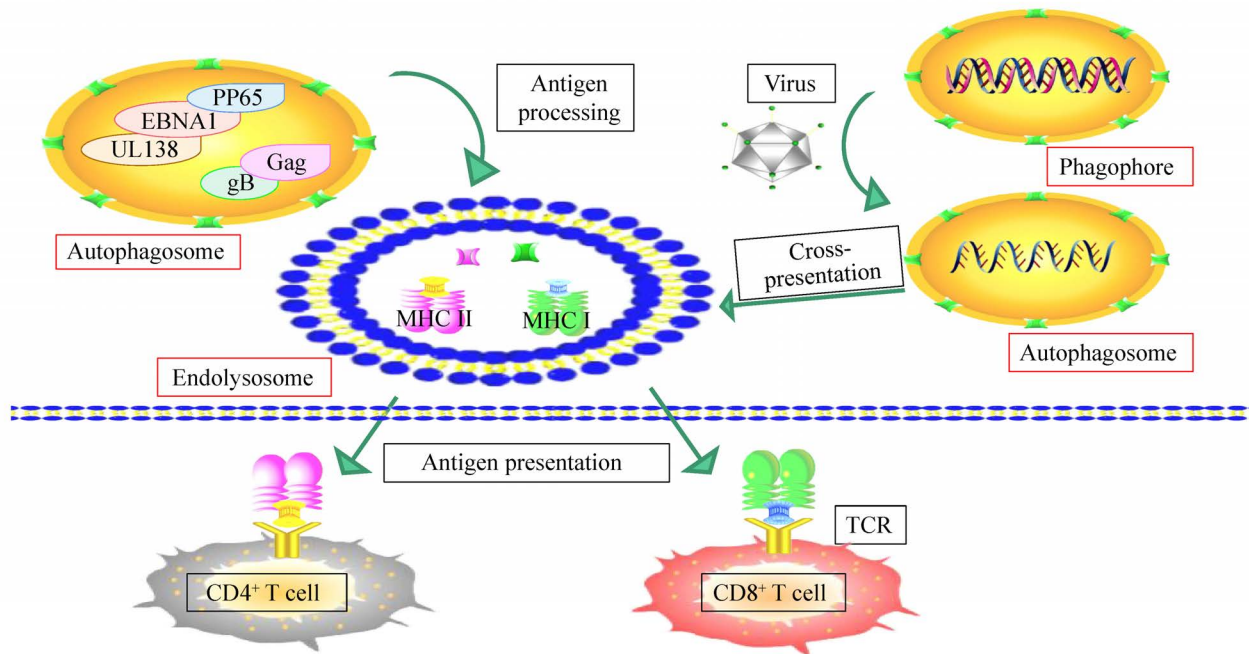


图 3 细胞自噬与适应性免疫

Figure 3 Autophagy and adaptive immunity.

TGEV)感染 IPEC-J2 引起线粒体损伤并通过降低线粒体膜电位诱导线粒体自噬, 线粒体自噬通过消除受损的线粒体, 增加病毒滴度。石达^[45]分别通过自噬激活剂、抑制剂药物及下调自噬通路中核心蛋白 LC3 和 ATG5 的表达, 验证了猪急性腹泻综合征病毒 (swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV) 感染所诱导的细胞自噬能促进病毒复制。

作为 RNA 病毒的 PDCoV, 其 N 蛋白通过 N 端区域(1-246 aa)直接与猪 RIG-I 相互作用, 干扰其识别 dsRNA 和 pRiplet 诱导的 K63-连接的多聚泛素化修饰, 导致猪 RIG-I 激活受到抑制, 从而影响干扰素的产生^[46], 形成了逃避天然免疫的机制, 有效避免了通过天然免疫相关途径抵抗病毒。Qin 等^[47]研究发现, PDCoV 感染 LLC-PK1 产生自噬体且 LC3-II 蛋白含量上升, 确认产生自噬现象。袁为锋^[48]研究发现, 在 LLC-PK1 和 IPEC-J2 中, PDCoV 结构蛋白 N 和非结构蛋白 Nsp6 能够诱导自噬, 而且自噬诱导剂能够上调 PDCoV N 蛋白的表达, 所以由 PDCoV 诱导的自噬会有益于病毒自身的复制。进一步研究发现, Duan 等^[49]利用仔猪模型发现 PDCoV 感染 LLC-PK1 后激活 P38 信号通路诱导自噬, 而利用过氧化麦角甾醇药物会下调 P38 信号通路, 减弱 PDCoV 诱导的自噬, 从而抑制病毒自身的复制。

3 病毒感染引致细胞自噬的检测方法

目前, 细胞自噬相关检测方法种类多样, 通过分类归纳, 将 PDCoV 引发自噬常用的检测方式分为直接和间接 2 种。

3.1 直接检测自噬方法

自 20 世纪 50 年代以来, 利用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)可以直接观察到双层膜自噬体, 该方法被认为是

检测自噬的“金标准”, 因为其可以对自噬体和自噬溶酶体进行直接计数^[50]。然而, 使用 TEM 费时且无法保证细胞状态, 所以将其用于最后结果的验证。PDCoV 体外感染后, 在电子显微镜下可以观察其整个感染周期内的结构变化, 有时会发现双层膜囊泡的出现和线粒体的损伤等可能发生自噬的现象。进一步通过 TEM 直接观察, 若存在自噬体等相关结构, 则认为病毒引发自噬现象^[47]。

3.2 间接检测自噬方法

除了直接检测外, 通过间接检测自噬通量的变化也逐渐成为研究自噬的重要手段。研究发现检测自噬通量需要多种方法配合使用。

3.2.1 自噬通路相关蛋白的存在分析

利用蛋白质印迹技术(Western blotting, WB)、免疫荧光和流式细胞术检测自噬关键蛋白 LC3 含量。辅以 WB 检测 LC3-II/LC3-I 来评估自噬体的存在, 或者构建荧光载体蛋白, 利用荧光特性评估自噬活性^[51]。PDCoV 感染后, LC3 蛋白在自噬过程中会发生聚集转化, 利用 WB 检测到 LC3-II/LC3-I 的值上升时, 可以表观判定发生自噬。同时, 利用实时荧光定量 PCR 方法检测自噬相关因子, 通过比对标准曲线, 分析其是否激活来判定自噬^[52]。

3.2.2 自噬底物蛋白的检测

利用多光谱成像流式细胞仪检测自噬标志物的共定位, 或结合 WB 和免疫染色技术(免疫组织化学和免疫荧光)检测泛素结合蛋白(p62), 以测量自噬通量^[51]。PDCoV 感染后, p62 蛋白量会显著减少, 通过激光共聚焦显微镜观察自噬体标记物和溶酶体标记物, 若观察到共定位现象则有自噬通量^[52]。

3.2.3 长寿命蛋白质(long-lived proteins)的降解

胞内蛋白主要通过蛋白酶体途径和自噬途径 2 种途径降解, 其中长寿命蛋白主要通过自噬途径降解。利用荧光染料染色后通过流式细

胞仪测量长寿命蛋白的降解强度,对自噬动态定量分析^[51]。

3.2.4 其他新型潜在方式

Remaut 等^[53]研究发现,特定范围的纳米颗粒作为潜在的自噬激活剂能被自噬通量清除;Guo 等^[54]新开发的 Cyto-ID 荧光染料能够特异性标记自噬体且可测量自噬囊泡的大小;Hurley 等^[55]使用低温电磁技术能够得到自噬通量起始、发展和底物靶向过程的蛋白质复合物的详细图像数据。

上述研究结果显示,新型技术正逐步应用于自噬检测研究中,研究人员们正迫切希望能尽早探索出一条更快、更精准地判定 PDCoV 发生自噬的道路。

4 基于调控细胞自噬控制 PDCoV 的展望

在 PDCoV 感染过程中,可以针对其利用细胞自噬促进病毒复制的特性,采取抑制细胞自噬的发生水平,从而抑制病毒感染。虽然 PDCoV 等多种病毒可以利用自噬机制促进病毒复制,然而其复制机制还需进一步探索。同时,减少自噬所产生的免疫应答的负调控影响可能恢复免疫应答的抗病毒效率。在 PDCoV 感染的关键节点,可以激活自噬来调节天然免疫和适应性免疫以恢复内环境稳态。自噬激活剂和自噬抑制剂已成为药物研究的热点,通过深入了解 PDCoV 各阶段免疫应答特点和自噬参与病毒复制、炎症反应等机制,在 PDCoV 感染的不同阶段,利用自噬的特殊功能对症下药,被认为是治疗疾病的有效方式之一。未来需要进一步提高对相关机制探索及临床试验,制备单一或联合自噬抑制剂或激活剂靶向自噬的药物,控制 PDCoV 复制传播,防控病毒感染所带来的养殖损失^[56]。

REFERENCES

- [1] Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(9): 528-542
- [2] Galati S, Boni C, Gerra MC, Lazzaretti M, Buschini A. Autophagy: a player in response to oxidative stress and DNA damage[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019: 1-12
- [3] Novikoff AB, Beaufay H, De Duve C. Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver[J]. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1956, 2(4 Suppl): 179-184
- [4] De Duve C. The lysosome[J]. *Scientific American*, 1963, 208: 64-72
- [5] Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1997, 192(2): 245-250
- [6] Chen XJ, Wang K, Xing YL, Tu J, Yang XX, Zhao Q, Li K, Chen ZB. Coronavirus membrane-associated papain-like proteases induce autophagy through interacting with Beclin1 to negatively regulate antiviral innate immunity[J]. *Protein & Cell*, 2014, 5(12): 912-927
- [7] Qu YF, Wang X, Zhu YK, Wang WL, Wang YY, Hu GW, Liu CR, Li JJ, Ren SH, Xiao MZX, et al. ORF3a-mediated incomplete autophagy facilitates severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 replication[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 716208
- [8] Cao WY, Li JH, Yang KP, Cao DL. An overview of autophagy: mechanism, regulation and research progress[J]. *Bulletin Du Cancer*, 2021, 108(3): 304-322
- [9] Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum[J]. *Autophagy*, 2011, 7(7): 673-682
- [10] Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(12): 2420-2434
- [11] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12(2): 1542-1552
- [12] Yang ZF, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(2): 124-131
- [13] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 20(3): 460-473

- [14] Suzuki H, Osawa T, Fujioka Y, Noda NN. Structural biology of the core autophagy machinery[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 43: 10-17
- [15] Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Münz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(10): 1014-1024
- [16] Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins[J]. *Autophagy*, 2010, 6(6): 764-776
- [17] Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, Yoshimori T. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI₃ kinase complex via Atg14L[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 190(4): 511-521
- [18] Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI₂ links LC3 conjugation with PI₃P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1[J]. *Molecular Cell*, 2014, 55(2): 238-252
- [19] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells[J]. *Journal of Cell Biology*, 2001, 152(4): 657-668
- [20] Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(7): 458-467
- [21] Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(12): 1433-1437
- [22] Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: a comprehensive review[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2018, 104: 485-495
- [23] Backer JM. The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34[J]. *The Biochemical Journal*, 2016, 473(15): 2251-2271
- [24] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes[J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1256-1269
- [25] Al-Bari MAA. A current view of molecular dissection in autophagy machinery[J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2020, 76(3): 357-372
- [26] Kraft LJ, Dowler J, Manral P, Kenworthy AK. Size, organization, and dynamics of soluble SQSTM1 and LC3-SQSTM1 complexes in living cells[J]. *Autophagy*, 2016, 12(9): 1660-1674
- [27] Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(5): 2092-2100
- [28] Sasaki T, Lian SS, Khan A, Llop JR, Samuelson AV, Chen WB, Klionsky DJ, Kishi S. Autolysosome biogenesis and developmental senescence are regulated by both Spns1 and v-ATPase[J]. *Autophagy*, 2017, 13(2): 386-403
- [29] Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion[J]. *Journal of Cell Science*, 2017, 130(7): 1209-1216
- [30] Chen Y, Yu L. Recent progress in autophagic lysosome reformation[J]. *Traffic: Copenhagen, Denmark*, 2017, 18(6): 358-361
- [31] Chen Y, Yu L. Development of Research into autophagic lysosome reformation[J]. *Molecules and Cells*, 2018, 41(1): 45-49
- [32] Jiang S, Chen JF, Li XL, Ren WK, Li FX, Wang T, Li C, Dong ZM, Tian XX, Zhang L, et al. Identification and integrated analysis of lncRNAs and miRNAs in IPEC-J2 cells provide novel insight into the regulation of the innate immune response by PDCoV infection[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 1-17
- [33] Liu X, Yin LD, Xue M, Chen JF, Li L, Fu F, Feng L, Liu PH. Coronavirus porcine deltacoronavirus upregulates MHC Class I expression through RIG-I/IRF1-mediated NLRC5 induction[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(7): e0015822
- [34] Jeon JH, Lee C. Stress-activated protein kinases are involved in the replication of porcine deltacoronavirus[J]. *Virology*, 2021, 559(2): 196-209
- [35] Ji L, Wang N, Ma J, Cheng Y, Wang H, Sun J, Yan Y. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein species-specifically suppressed IRF7-induced type I interferon production via ubiquitin-proteasomal degradation pathway[J]. *Vet Microbiol*, 2020, 250: 108853
- [36] Ekoff M, Kaufmann T, Engström M, Motoyama N, Villunger A, Jönsson JI, Strasser A, Nilsson G. The BH₃-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells[J]. *Blood*, 2007, 110(9): 3209-3217
- [37] Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC 3rd. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(11): 849-860

- [38] Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses[J]. *Biological Research*, 2007, 40(2): 97-112
- [39] Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin KQ, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Suzuki K, et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses[J]. *PNAS*, 2007, 104(35): 14050-14055
- [40] Liang QM, Seo GJ, Choi YJ, Kwak MJ, Ge JN, Rodgers MA, Shi MD, Leslie BJ, Hopfner KP, Ha T, Oh BH, Jung JU. Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses[J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(2): 228-238
- [41] Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell MA, Dupont N, Ornatowski W, Jiang SY, Bradfute SB, Bruun JA, Hansen TE, Johansen T, Deretic V. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation[J]. *Immunity*, 2012, 37(2): 223-234
- [42] Paul P, Münz C. Autophagy and mammalian viruses: roles in immune response, viral replication, and beyond[J]. *Advances in Virus Research*, 2016, 95: 149-195
- [43] Ko S, Gu MJ, Kim CG, Kye YC, Lim Y, Lee JE, Park BC, Chu H, Han SH, Yun CH. Rapamycin-induced autophagy restricts porcine epidemic diarrhea virus infectivity in porcine intestinal epithelial cells[J]. *Antiviral Research*, 2017, 146: 86-95
- [44] Zhu LQ, Mou CX, Yang X, Lin J, Yang Q. Mitophagy in TGEV infection counteracts oxidative stress and apoptosis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 27122-27141
- [45] 石达. 猪急性腹泻综合征冠状病毒诱导细胞自噬的机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2020
Shi D. Mechanisms of autophagy induced by swine acute diarrhea syndrome coronavirus[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese)
- [46] Ji LK, Li SS, Zhu WX, Ma JJ, Sun JH, Wang HG, Yan YX. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein suppressed IFN- β production by interfering porcine RIG-I dsRNA-binding and K63-linked polyubiquitination[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1024
- [47] Qin P, Du EZ, Luo WT, Yang YL, Zhang YQ, Wang B, Huang YW. Characteristics of the life cycle of porcine deltacoronavirus (PDCoV) in vitro: replication kinetics, cellular ultrastructure and virion morphology, and evidence of inducing autophagy[J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 455
- [48] 袁为锋. 基于转录组学、天然免疫分子及自噬水平的猪 δ 冠状病毒感染机制研究[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2020
Yuan WF. PDCoV pathogenesis study based on transcriptome, innate immune molecule, and autophagy[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [49] Duan C, Liu Y, Hao ZH, Wang JF. Ergosterol peroxide suppresses porcine deltacoronavirus (PDCoV)-induced autophagy to inhibit virus replication via p38 signaling pathway[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 257: 109068
- [50] Lü S, Xu Q, Sun E, Yang T, Li J, Feng Y, Zhang Q, Wang H, Zhang J, Wu D. Autophagy activated by bluetongue virus infection plays a positive role in its replication[J]. *Viruses*, 2015, 7(8): 4657-4675
- [51] Zhang XW, Lv XX, Zhou JC, Jin CC, Qiao LY, Hu ZW. Autophagic flux detection: significance and methods involved[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-2830-6_9. PMID: 34260026
- [52] 焦少勇. 猪丁型冠状病毒感染对 ST 细胞凋亡和自噬的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2019
Jiao SY. Effects of cellular apoptosis and autophagy during porcine deltacoronavirus infection[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [53] Remaut K, Oorschot V, Braeckmans K, Klumperman J, De Smedt SC. Lysosomal capturing of cytoplasmic injected nanoparticles by autophagy: an additional barrier to non viral gene delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 195: 29-36
- [54] Guo SJ, Liang YP, Murphy SF, Huang A, Shen HH, Kelly DF, Sobrado P, Sheng Z. A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications[J]. *Autophagy*, 2015, 11(3): 560-572
- [55] Hurlley JH, Nogales E. Next-generation electron microscopy in autophagy research[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 41: 211-216
- [56] García-Pérez BE, González-Rojas JA, Salazar MI, Torres-Torres C, Castrejón-Jiménez NS. Taming the autophagy as a strategy for treating COVID-19[J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2679