

分类号:

密级:



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

博士学位论文

Ph D DISSERTATION

猪流行性腹泻病毒和内质网应激标志蛋白 GRP78
相互作用的分子机制研究

MOLECULAR MECHANISM OF THE INTERACTION
BETWEEN PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS
AND ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS MARKER GRP78

研究生: 曾威

CANDIDATE: ZENG WEI

学 号: 2019302010051

STUDENT NO.:

专 业: 预防兽医学

MAJOR: PREVENTIVE VETERINARY
MEDICINE

导 师: 何启盖 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR HE QIGAI

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二三年六月

JUNE, 2023

华中农业大学博士学位论文

猪流行性腹泻病毒和内质网应激标志蛋白 GRP78

相互作用的分子机制研究

**Molecular Mechanism of the Interaction Between Porcine Epidemic
Diarrhea Virus and Endoplasmic Reticulum Stress Marker GRP78**

博士研究生：曾 威

学 号：2019302010051

指 导 教 师：何启盖 教授

指 导 小 组：何启盖 教授

李文涛 教授

江云波 副教授

专业：预防兽医学

研究方向：动物传染病学

获得学位名称：农学博士

获得学位时间：2023 年 6 月

华中农业大学动物医学院

二〇二三年六月

项目支撑

本研究由国家自然科学基金面上项目
“内质网应激在猪流行性腹泻病毒诱导细胞自噬中的作用及其生物学
效应（31972667）”资助

目 录

第 1 章 文献综述	1
1.1 引言	1
1.2 猪流行性腹泻概述	1
1.2.1 PEDV 病原学特点	1
1.2.2 PEDV 基因组特点	2
1.2.3 PEDV 的生命周期	2
1.2.4 PEDV nsp14 的功能	6
1.2.5 抗 PEDV 药物的开发	8
1.3 内质网应激概述	10
1.3.1 非折叠蛋白反应	10
1.3.2 冠状病毒与内质网应激	13
1.4 78 千道尔顿葡萄糖调节蛋白(GRP78)概述	15
1.4.1 GRP78 的结构和功能	15
1.4.2 GRP78 对病毒复制的影响	16
1.5 欧当归内酯 A 概述	17
第 2 章 研究目的与意义	19
第 3 章 材料与方法	20
3.1 试验材料	20
3.1.1 细胞、毒株和菌株	20
3.1.2 载体与质粒	20
3.1.3 抗体	21
3.1.4 药物	21
3.1.5 细胞、病毒、细菌培养相关试剂	22
3.1.6 蛋白免疫印迹相关试剂	22
3.1.7 质粒构建相关试剂	24
3.1.8 定量 PCR 相关试剂	24
3.1.9 细胞转染试剂	24
3.1.10 其它试剂	24
3.1.11 试验动物	25
3.2 试验仪器	25
3.3 分析软件	26
3.4 试验方法	26
3.4.1 细胞复苏、传代与冻存	26
3.4.2 病毒培养	27

3.4.3 测定药物的细胞毒性.....	28
3.4.4 病毒半数组织感染量测定.....	28
3.4.5 免疫荧光.....	28
3.4.6 RNA 提取	29
3.4.7 RNA 反转录	29
3.4.8 绝对定量 PCR	30
3.4.9 相对定量 PCR	31
3.4.10 蛋白免疫印迹.....	32
3.4.11 蛋白质真核表达载体构建.....	33
3.4.12 启动子重组载体构建.....	38
3.4.13 质粒转染.....	39
3.4.14 siRNA 转染.....	39
3.4.15 双萤光素酶报告基因检测.....	40
3.4.16 嘌呤霉素标记试验.....	40
3.4.17 序列同源性分析.....	41
3.4.18 PEDV 全基因组进化树绘制	41
3.4.19 蛋白质结构预测.....	41
3.4.20 免疫沉淀.....	41
3.4.21 蛋白质银染色.....	42
3.4.22 蛋白质 shotgun 质谱鉴定	43
3.4.23 蛋白质 GO 注释和信号通路聚类分析.....	44
3.4.24 流式细胞术.....	44
3.4.25 活性氧水平检测.....	45
3.4.26 内质网应激抑制 PEDV 增殖的动物感染试验	45
3.4.27 统计学分析.....	46
第 4 章 结果与分析	47
4.1 内质网应激抑制 PEDV 复制及其作用机制.....	47
4.1.1 衣霉素和毒胡萝卜素的细胞毒性.....	47
4.1.2 激活内质网应激抑制 PEDV 在细胞中的复制	48
4.1.3 抑制内质网应激促进 PEDV 在细胞中的复制	50
4.1.4 激活内质网应激抑制 PEDV 在仔猪肠道中的复制	51
4.1.5 不同 UPR 通路对 PEDV 复制的影响	52
4.1.6 内质网应激标志蛋白 GRP78 抑制 PEDV 复制	54
4.2 PEDV 抑制内质网应激标志蛋白 GRP78 表达及其作用机制.....	56
4.2.1 PEDV 感染促进 GRP78 转录	56
4.2.2 PEDV 感染抑制 GRP78 蛋白表达	57
4.2.3 PEDV 抑制内质网应激刺激剂诱导的 GRP78 表达	58
4.2.4 PEDV 抑制 GRP78 过表达	60

4.2.5 PEDV 抑制细胞翻译	61
4.2.6 PEDV 抑制 GRP78 表达不依赖蛋白质降解途径	61
4.3 PEDV nsp14 抑制 GRP78 表达及其作用机制.....	62
4.3.1 筛选抑制 GRP78 表达的 PEDV 蛋白	62
4.3.2 PEDV nsp14 抑制 GRP78 蛋白表达	63
4.3.3 PEDV nsp14 氨基酸序列保守性分析.....	65
4.3.4 PEDV nsp14 抑制 GRP78 蛋白表达依赖其 N7-MTase 功能 域	69
4.3.5 分析与 PEDV nsp14 相互作用的宿主因子	70
4.3.6 PEDV nsp14 抑制细胞翻译.....	77
4.3.7 PEDV nsp14 的细胞定位.....	78
4.3.8 PEDV nsp14 抑制 GRP78 启动子活性.....	78
4.4 开发靶向内质网应激的抗 PEDV 分子	80
4.4.1 筛选靶向内质网应激的抗 PEDV 分子	80
4.4.2 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 在细胞中的复制	81
4.4.3 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 吸附和入侵宿主细胞	84
4.4.4 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 依赖内质网应激	85
4.4.5 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 依赖氧化应激	86
第 5 章 讨论与结论	88
5.1 讨论.....	88
5.1.1 内质网应激抑制 PEDV 复制及其作用机制	88
5.1.2 PEDV 抑制内质网应激标志蛋白 GRP78 表达及其作用机制	90
5.1.3 PEDV nsp14 抑制 GRP78 表达及其作用机制.....	92
5.1.4 开发靶向内质网应激的抗 PEDV 分子	94
5.2 结论.....	97
参考文献.....	98

摘 要

猪流行性腹泻 (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) 是表现为腹泻、呕吐和脱水的猪肠道传染病, 其特征为急性、高度接触性传播。猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea virus, PEDV) 是导致 PED 的病原, 目前广泛流行的 GII 基因型 PEDV 毒株对新生仔猪的致死率接近 100%, 给我国养猪业造成了极大的经济损失。内质网应激是细胞处理非折叠蛋白的机制, 在维持内质网稳态和决定细胞命运方面起着重要作用, 研究表明内质网应激能抑制严重急性呼吸综合征冠状病毒 2、中东呼吸道综合征冠状病毒等人源冠状病毒的复制, 而这些人源冠状病毒反过来又能干扰内质网应激相关蛋白的表达, 但这种相互关系是否存在于 PEDV 和内质网应激之间还未被明确。本研究围绕 PEDV 和内质网应激之间的相互影响展开, 旨在明确内质网应激对不同基因型 PEDV 复制的影响、解析 PEDV 拮抗宿主内质网应激的机制和开发相关抗 PEDV 分子, 以期能为 PEDV 致病机制研究提供参考、为抗 PEDV 药物的开发提供新的靶点和新的抗病毒分子。具体研究内容如下:

1. 内质网应激抑制 PEDV 复制及其作用机制

为明确内质网应激对 PEDV 复制的影响, 使用经典的内质网应激诱导剂衣霉素 (tunicamycin, TM) 和毒胡萝卜素 (thapsigargin, Tg) 处理细胞。试验采取的药物处理方式是在病毒感染前使用 TM、Tg 预处理细胞 8 h, 以排除药物与 PEDV 病毒粒子或 PEDV 蛋白直接作用带来的影响。在 Vero 细胞上测试了内质网应激对 GI-b、GII-a 和 GII-b 基因亚型 PEDV 复制的影响, 结果显示 PEDV 的增殖水平随着 TM、Tg 浓度的增加而逐渐降低, 在 LLC-PK1 细胞上的测试结果也显示 TM、Tg 预处理呈剂量依赖性抑制 PEDV 复制, 另外还发现使用四苯基丁酸抑制内质网应激对 PEDV 复制有一定促进作用, 表明内质网应激能协助宿主细胞抵御不同基因型 PEDV 的感染。本研究也在仔猪水平测试了内质网应激对 PEDV 复制的影响, 给药方式为在攻毒前 8 h 给仔猪口服 TM。结果显示 TM 处理组猪只肠道鼓气、肠壁变薄的现象明显少于病毒对照组, 且 TM 处理组十二指肠、空肠、回肠和结肠的 PEDV 载量显著低于病毒对照组, 表明内质网应激也能在动物水平有效抑制 PEDV 复制。进一步探究了协助内质网应激抑制 PEDV 的主要非折叠蛋白反应, 结果显示只有激活蛋白激酶 R 样内质网激酶能抑制 PEDV 复制。另外还发现抑制肌醇需求酶 1 α 对 PEDV 增殖有抑制作用, 表明 PEDV 的复制可能依赖该途径。最后测定了内质网应激相关宿主蛋白对 PEDV 复制的影响, 发现只有过表达 78 千道尔顿葡萄糖调节蛋白 (78 kDa glucose-regulated protein, GRP78) 会显著抑制 PEDV 复制, 表明内质网应激标志蛋白 GRP78 是协助内质网应激抑制 PEDV 复制的主要宿主蛋白。

2. PEDV 抑制内质网应激标志蛋白 GRP78 表达及其作用机制

为探究 PEDV 能否拮抗内质网应激的抗病毒效应，本试验评估了 PEDV 对 *GRP78* 表达的影响。定量 PCR 结果显示 GI 基因型和 GII 基因型 PEDV 都能促进 *GRP78* 转录，但 Western Blot 结果显示 PEDV 感染后 *GRP78* 蛋白的表达量并未增加，反而在病毒感染后 36 h 明显下降，因此推测 PEDV 可能在蛋白质水平负调节 *GRP78*。在 PEDV 感染前后不同时间点使用 TM、Tg 处理细胞以进一步验证 PEDV 对 *GRP78* 蛋白表达的影响，结果显示在 PEDV 感染前 8 h 用 TM 预处理细胞或在 PEDV 感染的同时用 TM 处理细胞，PEDV/TM 组 *GRP78* 表达量都少于 TM 对照组，但降低幅度不大，推测和此两种条件下 PEDV 复制被显著抑制有关。进一步测试 PEDV 感染后 24 h 使用 TM、Tg 处理细胞对 *GRP78* 蛋白表达的影响，结果显示在此条件下 GI 基因型和 GII 基因型 PEDV 都能显著抑制 TM、Tg 诱导的 *GRP78* 表达，且该抑制作用在 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞中都能起效，表明 PEDV 能在蛋白质水平抑制 *GRP78* 表达。另外还发现 PEDV 能抑制质粒介导的 *GRP78* 过表达。鉴于 PEDV 促进 *GRP78* 转录，遂从 mRNA 翻译和蛋白质降解两方面探究 PEDV 抑制 *GRP78* 蛋白表达的机制，结果显示 PEDV 感染能降低细胞总的翻译水平，而干扰宿主蛋白质降解途径不能缓解 PEDV 对 *GRP78* 蛋白表达的抑制，表明 PEDV 主要通过抑制翻译实现对 *GRP78* 蛋白表达的负调控。

3. PEDV nsp14 抑制 *GRP78* 表达及其作用机制

为进一步探究 PEDV 抑制 *GRP78* 表达的机制，本研究鉴定了协助 PEDV 抑制 *GRP78* 表达的主要病毒蛋白。测试了除非结构蛋白（non-structural protein, nsp）2、nsp3、nsp11 以外所有 PEDV 蛋白对 *GRP78* 表达的影响，发现只有 nsp14 具有抑制 *GRP78* 表达的潜力。在 HEK293t、Vero 和 LLC-PK1 细胞上进一步明确了 PEDV nsp14 对 *GRP78* 蛋白表达的影响，结果显示 nsp14 能有效抑制 TM、Tg 诱导的 *GRP78* 表达，表明 PEDV nsp14 能在蛋白质水平负调节 *GRP78*。为证实通过 nsp14 抑制 *GRP78* 表达是所有 PEDV 毒株共有的特点，比较了 83 株 PEDV 的 nsp14 的氨基酸序列，发现 PEDV nsp14 存在 24 种氨基酸序列类型且这些序列类型的代表毒株涵盖了所有 PEDV 基因型。同源性分析结果显示这 24 种序列类型同源性平均值达 99.25%，序列比对分析显示这些序列类型都不存在氨基酸的插入和缺失，且各功能位点都未突变，表明 PEDV nsp14 的氨基酸序列和功能十分保守。分别构建了核酸外切酶功能域和 N7 甲基转移酶功能域沉默的 PEDV nsp14 的表达载体，将这些载体转染到 HEK293t 细胞中以评估各 nsp14 突变体抑制 *GRP78* 蛋白表达的能力。结果显示只有点突变 N7 甲基转移酶功能域内功能位点完全沉默了 PEDV nsp14 抑制 *GRP78* 蛋白表达的能力，说明 nsp14 主要依赖 N7 甲基化转移酶功能域抑制 *GRP78* 蛋白表达。通过免疫沉淀结合液相色谱-质谱联用的方法解析与 PEDV nsp14 相互作用的宿主因子，共鉴定到 153 个特异蛋白，GO 注释和信号通路聚类分析显示 PEDV

nsp14 主要和翻译相关的宿主蛋白相互作用，表明 PEDV nsp14 能影响细胞翻译。通过嘌呤霉素标记试验证实 PEDV nsp14 能抑制细胞翻译，推测 PEDV nsp14 通过抑制翻译实现对 GRP78 蛋白表达的负调节。分析了 PEDV nsp14 的细胞定位，发现 nsp14 能进入细胞核，鉴于 PEDV nsp14 能抑制 GRP78 转录，推测 nsp14 可能在核内干扰 GRP78 转录的起始。进一步测试了 PEDV nsp14 对 GRP78 启动子的影响，发现 PEDV nsp14 通过干扰 GRP78 启动子活性抑制其转录。

4. 开发靶向内质网应激的抗 PEDV 分子

鉴于内质网应激是一种有效的宿主抗 PEDV 机制，本研究以内质网应激为靶筛选抗 PEDV 分子，结果显示欧当归内酯 A (Levistolide A, LA) 具有抗 PEDV 活性。在 Vero 和 LLC-PK1 细胞上测试了 LA 对 PEDV 复制的影响，TCID₅₀、免疫荧光和定量 PCR 试验结果都显示 LA 呈剂量依赖性抑制 GI 基因型和 GII 基因型 PEDV 的复制，表明 LA 有被开发成抗 PEDV 药物的潜力。在 PEDV 感染后不同时间点用 LA 处理细胞，发现 LA 主要限制 PEDV 的吸附和入侵。进一步验证了 LA 抗 PEDV 和内质网应激的关系，发现 LA 能促进内质网应激相关基因 *ATF4*、*CHOP*、*GRP78* 的转录和 GRP78 蛋白的表达，而使用四苯基丁酸抑制内质网应激能拮抗 LA 对 PEDV 抑制作用，表明 LA 依赖内质网应激发挥抗 PEDV 作用。另外还发现通过 NAC 抑制内质网应激上游的氧化应激能拮抗 LA 对 PEDV 复制的抑制，表明 LA 的抗 PEDV 作用依赖氧化应激-内质网应激途径。

关键词：猪流行性腹泻病毒；内质网应激；78 千道尔顿葡萄糖调节蛋白；非结构蛋白 14；欧当归内酯 A

Abstract

Porcine Epidemic Diarrhea (PED) is an intestinal infectious disease of pigs manifested by diarrhea, vomiting, and dehydration, and characterized by acute and highly contagious transmission. The causative agent of PED is porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). At present, the widespread GII genotype PEDV strain has a lethality rate of nearly 100% in newborn piglets, which has caused great economic losses to the pig industry in our country. Endoplasmic reticulum (ER) stress is a mechanism for cells to process unfolded proteins and plays an important role in maintaining ER homeostasis and determining cell fate. Studies have shown that ER stress can inhibit the replication of human coronaviruses such as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and Middle East respiratory syndrome coronavirus, which in turn can interfere with the expression of ER stress-related proteins. However, whether this relationship exists between PEDV and ER stress has not yet been clarified.

In order to provide a reference for the study of the pathogenic mechanism of PEDV, and provide new targets and new antiviral molecules for the development of anti-PEDV drugs, this project focuses on the interaction between PEDV and ER stress, with the aim of clarifying the effect of endoplasmic reticulum stress on the replication of different genotypes of PEDV, analyzing the mechanism of PEDV antagonizing host endoplasmic reticulum stress, and developing related anti-PEDV molecules. The specific research content of the subject is as follows:

1. PEDV replication was inhibited by ER stress

To clarify the effect of ER stress on the replication of PEDV, cells were treated with classic ER stress inducers, tunicamycin (TM) and thapsigargin (Tg). The drug treatment method adopted in the experiment was to pretreat the cells with TM and Tg for 8 h before virus infection, to exclude the influence of the direct interaction between the drug and PEDV virion or PEDV proteins. The effect of ER stress on the replication of GI-b, GII-a, and GII-b sub-genotype PEDV was tested on Vero cells, and the results showed that the proliferation level of PEDV gradually decreased with the increase of TM and Tg concentrations. The test results on LLC-PK1 cells also showed that TM and Tg pretreatment inhibited PEDV replication in a dose-dependent manner. In addition, it was also found that inhibiting ER stress by 4-phenylbutyric acid can promote the replication of PEDV. These indicate that ER stress can assist host cells to resist the infection of different genotypes PEDV. This project also tested the effect of ER stress on the replication of PEDV on piglets. The administration method was to orally administer TM to piglets 8 hours before PEDV

challenge. The results showed that the pigs in the TM treatment group had significantly less intestinal gas and intestinal wall thinning than the PEDV control group pigs, and the load of PEDV in the duodenum, jejunum, ileum, and colon of pigs treated with TM were significantly lower than those of pigs in the PEDV control group, indicating that ER stress can also effectively inhibit PEDV replication at the pig level. We further explored the major unfolded protein response (UPR) that assists ER stress in repressing PEDV, the results showed that only activating protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase inhibited PEDV replication. In addition, inhibition of inositol-requiring enzyme 1 α was also found to inhibit PEDV proliferation, suggesting that PEDV replication may depend on this pathway. Finally, the effect of ER stress-related host proteins on PEDV replication was determined, and it was found that only overexpressing 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) could significantly inhibit PEDV replication, suggesting that GRP78 is the main host protein assisting ER stress to suppress PEDV replication.

2. The expression of GRP78 protein was inhibited by PEDV

In order to explore whether PEDV can antagonize the antiviral effect of ER stress, this experiment evaluated the effect of PEDV on the expression of *GRP78*. Quantitative PCR (qPCR) results showed that both GI and GII genotype PEDV could promote the transcription of *GRP78*. However, the results of Western Blot showed that the expression of GRP78 protein did not increase after PEDV infection, but decreased significantly at 36 hours after virus infection. Therefore, it is speculated that PEDV may negatively regulate *GRP78* at the protein level. The cells were treated with TM and Tg at different time points before and after PEDV infection to further verify the effect of PEDV on GRP78 protein expression. The results showed that when cells were pretreated with TM 8 h before PEDV infection or cells were treated with TM at the same time of PEDV infection, the expression of GRP78 in PEDV/TM group was less than that in TM control group. However, the decrease of GRP78 was not significant, which was presumed to be related to the significant inhibition of PEDV replication under these two conditions. Furthermore, the effect of TM and Tg treatment on the expression of GRP78 protein 24 h after PEDV infection was tested. The results showed that both GI genotype and GII genotype PEDV could significantly inhibit the expression of GRP78 induced by TM and Tg under this condition, and the inhibitory effect was effective in both Vero cells and LLC-PK1 cells, indicating that PEDV could inhibit the expression of *GRP78* at the protein level. In addition, PEDV was also found to inhibit plasmid-mediated overexpression of GRP78. Since PEDV promotes the transcription of *GRP78*, the mechanism of PEDV inhibiting the expression of GRP78 protein was explored from two aspects of mRNA translation and protein degradation. The

results showed that PEDV infection can reduce the overall translation level of cells, while interfering with the host protein degradation pathway could not alleviate the inhibition of GRP78 protein expression by PEDV, indicating that PEDV negatively regulates GRP78 protein expression mainly by inhibiting translation.

3. The expression of GRP78 was inhibited by PEDV nonstructural protein 14

In order to further explore the mechanism by which PEDV inhibits the expression of GRP78, this subject identified the main viral protein that assists PEDV to inhibit the expression of GRP78. We tested the effects of all PEDV proteins except for non-structural protein (nsp) 2, nsp3, and nsp11 on the expression of *GRP78*, and found that only nsp14 had the potential to inhibit the expression of *GRP78*. The effect of PEDV nsp14 on the expression of GRP78 was further measured on HEK293t, Vero, and LLC-PK1 cells. The results showed that PEDV nsp14 could effectively inhibit the expression of GRP78 induced by TM and Tg at the protein level, indicating that PEDV nsp14 could negatively regulate the expression of GRP78 protein. In order to confirm that the inhibition of GRP78 expression by nsp14 is a common feature of all PEDV strains, the amino acid sequences of nsp14 of 83 PEDV strains were compared. It was found that there are 24 amino acid sequence types in PEDV nsp14. Since the representative strains of these sequence types cover all PEDV genotypes, these 24 sequence types were considered to broadly represent the characteristics of the amino acid sequence of PEDV nsp14. The results of the homology analysis showed that the average homology between these sequence types reached 99.25%. Sequence comparison analysis showed that there were no insertions and deletions of amino acids in these 24 sequence types, and there were no mutations in each functional site. These indicate that the amino acid sequence and function of PEDV nsp14 are conserved. Expression vectors of PEDV nsp14 with silenced exonuclease domain or silenced N7 methyltransferase domain were constructed respectively, and these vectors were transfected into HEK293t cells to evaluate the effect of each nsp14 mutant on the expression of GRP78 protein. The results showed that only the point mutation of the functional site in the N7 methyltransferase domain completely silenced the ability of PEDV nsp14 to inhibit the expression of GRP78 protein, indicating that nsp14 mainly depends on the N7 methyltransferase domain to inhibit the expression of GRP78 protein. The host factors interacting with PEDV nsp14 were analyzed by immunoprecipitation combined with liquid chromatography-mass spectrometry, and a total of 153 specific proteins were identified. GO annotation and signaling pathway clustering analysis showed that PEDV nsp14 mainly interacted with translation-related host proteins, indicating that PEDV nsp14 can affect cellular translation. The puromycin labeling test confirmed that PEDV nsp14 can inhibit

cell translation, speculating that PEDV nsp14 negatively regulated the expression of GRP78 protein by inhibiting translation. The cell localization of PEDV nsp14 was analyzed, and it was found that nsp14 could enter the nucleus. Given that PEDV nsp14 can inhibit the transcription of GRP78, it was speculated that nsp14 may interfere with the initiation of GRP78 transcription in the nucleus. The effect of PEDV nsp14 on the GRP78 promoter was further identified, and it was found that PEDV nsp14 inhibited its transcription by interfering with the activity of the GRP78 promoter.

4. Screening of anti-PEDV molecules targeting endoplasmic reticulum stress

In view of the fact that ER stress is an effective host anti-PEDV mechanism, we further screened anti-PEDV molecules targeting endoplasmic reticulum stress and demonstrated for the first time that LA has anti-PEDV activity. The effect of LA on the replication of PEDV was tested on Vero and LLC-PK1 cells. The results of TCID₅₀, immunofluorescence, and qPCR tests all showed that LA inhibited the replication of GI and GII genotype PEDV in a dose-dependent manner, indicating that LA has the potential to be developed as an anti-PEDV drug. In order to explore the effect of LA on each replication process of PEDV, cells were treated with LA at different time points after PEDV infection. The results indicated that LA mainly limited the adsorption and invasion of PEDV. The relationship between the inhibitory activity of LA against PEDV and ER stress was further verified. It was found that LA can promote the transcription of endoplasmic reticulum stress-related genes, such as *ATF4*, *CHOP*, *GRP78*, and the expression of GRP78 protein while inhibiting ER stress with 4-phenylbutyric acid could antagonize the inhibition of PEDV replication by LA, suggesting that LA exerts an anti-PEDV effect dependent on ER stress. In addition, it was also found that inhibition of oxidative stress which is the upstream response of ER stress by NAC can antagonize the inhibition of PEDV replication by LA, indicating that the anti-PEDV effect of LA depends on the oxidative stress-ER stress pathway.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; endoplasmic reticulum stress; 78 kDa glucose-regulated protein; nonstructural protein 14; Levistolide A

缩略语表（Abbreviation）

英文缩写	英文全称	中文全称及注释
ACE2	angiotensin-converting enzyme	血管紧张素转化酶 2
ADP	adenosine diphosphate	腺嘌呤核苷二磷酸
aMPV	avian metapneumovirus	禽偏肺病毒
APN	aminopeptidase N	氨基肽酶 N
ATF	activating transcription factor	激活转录因子
ATP	adenosine triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
Bax	Bcl2-associated X	BCL2 相关蛋白 X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 基因
bCoV-HKU9	bat coronavirus HKU9	蝙蝠冠状病毒 HKU9
bp, kb	base pair, kilobase pair	碱基对, 千碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CCK-8	cholecystokinin-octapeptide	八肽胆囊收缩素
CCoV	canine coronavirus	犬冠状病毒
CHOP	C/EBP homologous protein	CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白
CTD	C-terminal	羧基末端结构域
DENV	dengue virus	登革热病毒
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco 改良 Eagle 培养基
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DMVs	double-membrane vesicles	双层膜囊泡结构
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyrinediamine triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DPP4	dipeptidyl peptidase 4	二肽基肽酶 4
DTMUV	duck tembusu virus	鸭坦布苏病毒
EBOV	Ebola virus	埃博拉病毒
EDEM	endoplasmic reticulum degradation enhancing α mannosidase like protein	增强内质网蛋白降解能力的甘露糖苷酶样蛋白
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
eIF2	eukaryotic translation initiator factor-2	真核翻译起始因子 2
EP 管	Eppendorf tube	艾本德管

ERdj	endoplasmic reticulum DNA J domain-containing protein	含内质网 DNA J 结构的蛋白, 内质网 Dnaj 同系物
ExoN	exoribonuclease	核酸外切酶
E 蛋白	envelope protein	包膜蛋白
FIPV	feline infectious peritonitis virus	猫传染性腹膜炎病毒
GADD34	growth arrest and DNA damage inducible 34	DNA 损伤诱导基因 34
GDP	guanosine diphosphate	鸟嘌呤核苷二磷酸
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	78 千道尔顿葡萄糖调节蛋白
GTP	guanosine triphosphate	鸟嘌呤核苷三磷酸
HBV	hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
hCMV	human cytomegalovirus	人巨细胞病毒
HCoV	human coronavirus	人源冠状病毒
HCV	hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
hpi	hours post infection	感染后小时数
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IBV	infectious bronchitis virus	传染性支气管炎病毒
IFA	indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
IFN	interferon	干扰素
IKKs	inhibitor of kappa B kinases	κ B 激酶抑制剂
IRE1 α	inositol-requiring enzyme 1 α	肌醇需求酶 1 α
JEV	Japanese encephalitis virus	日本乙型脑炎病毒
kDa	kilodalton	千道尔顿
LA	Levistolide A	欧当归内酯 A
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome coronavirus	中东呼吸道综合征冠状病毒
MHV	mouse hepatitis virus	小鼠肝炎病毒
MOI	multiplicity of infection	感染复数
mRNA	messenger RNA.	信使 RNA
M 蛋白	membrane protein	膜蛋白
N7-MTase	guanine-N7-methyltransferase	N7 甲基转移酶
NAC	N-acetylcysteine	乙酰半胱氨酸
NBD	nucleotide binding domain	核苷酸结合域
NF- κ B	nuclear factor kappa B	核因子 κ B
ng, μ g, mg, g	nanogram, microgram, milligram, gram	纳克, 微克, 毫克, 克

nsp	nonstructural protein	非结构蛋白
NTD	N-terminal	氨基末端结构域
N 蛋白	nucleocapsid protein	核衣壳蛋白
OD	optical density	光密度
ORF	open reading frame	开放读码框
p58IPK	protein kinase inhibitor p58	蛋白激酶抑制剂 p58
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDI-P5	protein disulfide isomerase P5	蛋白质二硫键异构酶 P5
PED	porcine epidemic diarrhea	猪流行性腹泻
PEDV	porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
PERK	protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase	蛋白激酶 R 样内质网激酶
pmol, nmol, μmol, mmol, mol	picomole, nanomole, micromole, millimole, mole	皮摩尔, 纳摩尔, 微摩尔, 毫摩尔, 摩尔
pAb	polyclonal antibody	多克隆抗体
poly (A)	polyadenylic acid	多聚腺苷酸
pp	polyprotein	多聚蛋白
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸综合征病毒
PRV	pseudorabies virus	伪狂犬病病毒
Puro	puromycin	嘌呤霉素
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
r/min	rotation per minute	每分钟转速
RAMP-4	ribosome associated membrane protein 4	核糖体相关膜蛋白 4
RBD	receptor binding domain	受体结合域
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖 RNA 聚合酶
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RNase	endoribonuclease	核糖核酸内切酶
rRNA	ribosomal RNA	核糖体 RNA
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus	严重急性呼吸综合征冠状病毒
SARS-CoV2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	严重急性呼吸综合征冠状病毒 2

SDS-PAGE	sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel	十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺
	electrophoresis	凝胶电泳
SBD	substrate binding domain	底物结合域
sec, min, h	second, minute, hour	秒, 分钟, 小时
sgRNAs	sub-genomic RNA	亚基因组 RNA
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA
S 蛋白	spike glycoprotein	刺突蛋白
TAE	Tris Acetate-EDTA buffer	Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液
TBS	Tris Buffered Saline	Tris 盐缓冲液
TBST	TBS with Tween-20	含吐温 20 的 TBS 溶液
TCID ₅₀	50 percent tissue culture infective dose	组织培养半数感染量
Tg	Thapsigargin	毒胡萝卜素
TGEV	transmissible gastroenteritis virus	猪传染性胃肠炎病毒
TM	Tunicamycin	衣霉素
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
tRNA	transfer RNA	转运 RNA
TRS	transcription regulating sequences	转录调控序列
TSA	Tryptic soy agar	胰蛋白大豆琼脂
TSB	Tryptic soy broth	胰蛋白大豆肉汤
UTR	untranslated Regions	非翻译区
μL, mL, L	microliter, milliliter, liter	微升, 毫升, 升
V/V	volume/volume	体积比
W/V	weight/volume	质量体积比
XBP1	X-box binding protein 1	X 盒结合蛋白

第1章 文献综述

1.1 引言

猪流行性腹泻（porcine epidemic diarrhea, PED）是表现为腹泻、呕吐和脱水的猪肠道传染病，其特征为急性、高度接触性传播。猪流行性腹泻病毒（porcine epidemic diarrhea virus, PEDV）是导致 PED 的病原。几乎所有年龄段的猪只均易感染 GII 基因型 PEDV，七日龄以内仔猪感染 GII 基因型 PEDV 的发病率和死亡率均接近 100%。GII 基因型 PEDV 在我国广泛流行，给我国养猪业造成了极大的经济损失。

1.2 猪流行性腹泻概述

1.2.1 PEDV 病原学特点

PEDV 是尼多病毒目冠状病毒科成员，属 α -冠状病毒。该科病毒的病毒粒子多呈球形，最外层被囊膜包裹，囊膜上有呈放射状排列的纤突结构，电子显微镜下病毒粒子表面纤突呈皇冠样，因此被称为冠状病毒。PEDV 病毒粒子直径约为 130 nm，纤突长度约为 10-13 nm。PEDV 只有一种血清型，但根据 PEDV 全基因组序列和 S 基因 S1 区域序列可将 PEDV 毒株分为 GI 基因型、GII 基因型和重组基因型，其中 GI 基因型和 GI 基因型又可分别被分为 a、b 亚型（GI-a、GI-b、GII-a、GII-b），另外也有研究将重组基因型定义为 GII-c 基因亚型（Wang et al 2016, Su et al 2020, Liu and Wang 2021）。PEDV 对多种哺乳动物红细胞无凝集活性，但有研究指出部分 PEDV 变异毒株在胰蛋白酶的催化作用下可凝集兔的红细胞（Park et al 2010）。PEDV 活性易受外界环境影响，多种理化方法可将其灭活，如 60 °C 处理 30 min、乙醚和氯仿等有机溶剂处理、碱性和酸性消毒剂处理等。

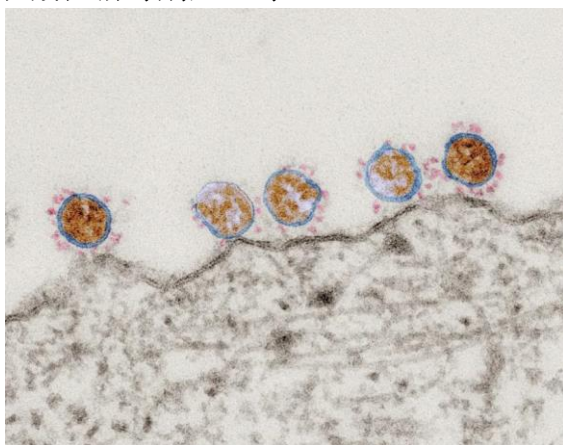


图 1-1 电子显微镜下的冠状病毒（Lamkiewicz et al 2023）

Fig.1-1 Electron microscope picture of coronavirus

1.2.2 PEDV 基因组特点

PEDV 的基因组为单股正义链 RNA，大小在 28 kb 左右，基因组 5'端有帽子结构，基因组 3'端有 poly(A)尾。PEDV 基因组从 5'到 3'按 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S 基因-ORF3-E 基因-M 基因-N 基因-3'UTR 顺序排列（Li et al 2020）。ORF1a 和 ORF1b 共占基因组大小 2/3，分别编码多聚蛋白（polyprotein, pp）1a 和 pp1b。S 基因、E 基因、M 基因、N 基因分别编码 PEDV 的四个结构蛋白，它们依次是刺突蛋白（S 蛋白）、包膜蛋白（E 蛋白）、膜蛋白（M 蛋白）和核衣壳蛋白（N 蛋白）。ORF3 编码一个多功能的辅助蛋白。

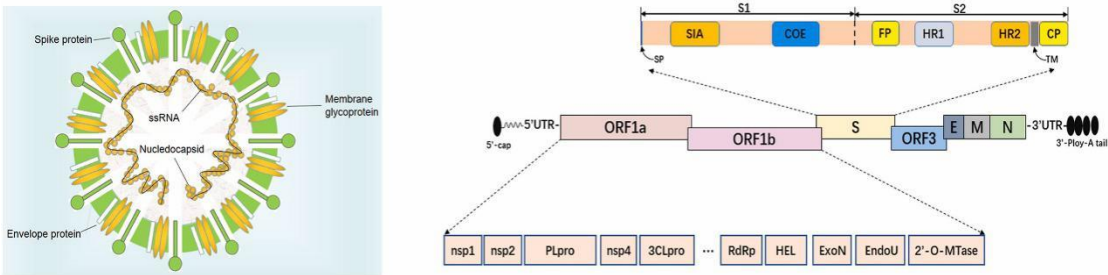


图 1-2 猪流行性腹泻病毒病毒粒子和基因组模式图（Li et al 2020）

Fig.1-2 Schematic diagram of PEDV virion and genome

1.2.3 PEDV 的生命周期

PEDV 的生命周期和大部分冠状病毒相同。冠状病毒吸附和入侵细胞后首先翻译病毒复制酶，接着依靠这些复制酶进行基因组的复制和转录，并进一步翻译病毒结构蛋白。最后冠状病毒的基因组和结构蛋白组装成完整的病毒粒子并通过细胞分泌途径释放到胞外。

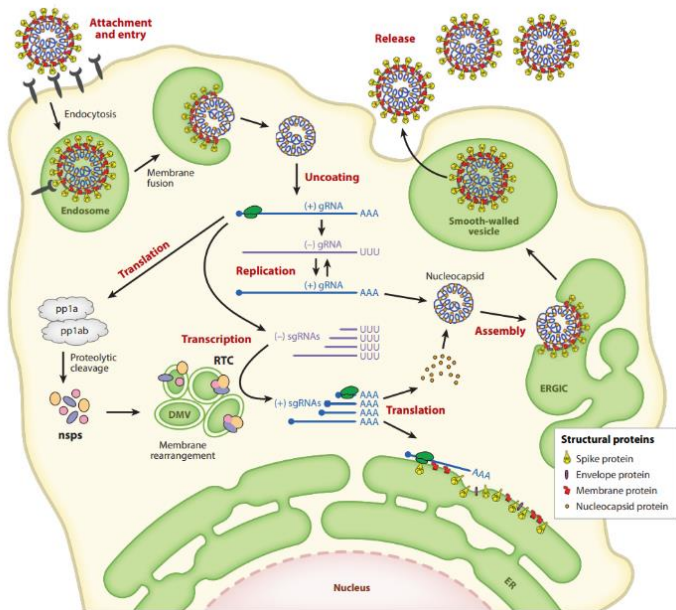


图 1-3 冠状病毒的生命周期（Lim et al 2016）

Fig 1-3 life cycle of coronavirus

1.2.3.1 吸附入侵

冠状病毒的复制始于由病毒 S 蛋白介导的对宿主细胞的吸附。冠状病毒的 S 蛋白有两个功能性亚基，分别是 S1 和 S2。S1 亚基主要负责和宿主细胞上的特异性受体结合，不同冠状病毒入侵细胞时所用的受体并不相同，常见的冠状病毒细胞受体如表 1-1 所示。PEDV 的细胞受体目前尚不清楚，有研究曾提出 PEDV 可能通过 APN 侵入细胞，但也有研究指出 APN 敲除的猪只仍然可感染 PEDV (Li et al 2007, Luo et al 2019)。

表 1-1 冠状病毒的细胞受体 (Lim et al 2016, 方谱县等 2016, Cui et al 2020)

Table 1-1 Cellular receptors for coronaviruses	
受体名称	对应冠状病毒
血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)	严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV2)、严重急性呼吸综 合 征 冠 状 病 毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、人冠状病毒 NL63 (human coronavirus NL63, HCoV- NL63)
二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4)	中东呼吸道综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)
氨基肽酶 (aminopeptidase N, APN)	猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、HCoV-229E、猫传染性腹膜炎病毒 (feline infectious peritonitis virus, FIPV)、犬冠状病毒 (canine coronavirus, CCoV)
唾液酸	HCoV-OC43、HCoV-HKU1、禽传染性支气管炎病毒 (avian infectious bronchitis virus, IBV)

S1 和细胞受体结合后，S2 的构像会因为宿主蛋白酶的切割而发生变化。宿主蛋白酶会对 S 蛋白进行两次切割，第一次是切割 S1/S2 位点，使 S1 和 S2 分开，值得一提的是 S1/S2 切割并不只发生于 S 蛋白结合受体之后，MERS-CoV 的 S 蛋白在合成时就会经历 S1/S2 切割 (Millet and Whittaker 2014)。S1/S2 切割后暴露了 S2 上的 S2'切割位点，宿主蛋白酶对 S2'位点进行切割后会暴露出 S2 上的融合肽，暴露的融合肽能嵌入细胞膜中并形成反平行式的六螺旋丛，该结构是病毒和细胞膜融合的关键 (Li and Wang 2020)。S 蛋白切割常用的宿主蛋白酶有弗林蛋白酶、组织蛋白酶和跨膜丝氨酸蛋白酶 (Zhang et al 2022)。冠状病毒囊膜和细胞膜融合后，病毒基因组被释放到细胞内 (Gui et al 2017)。

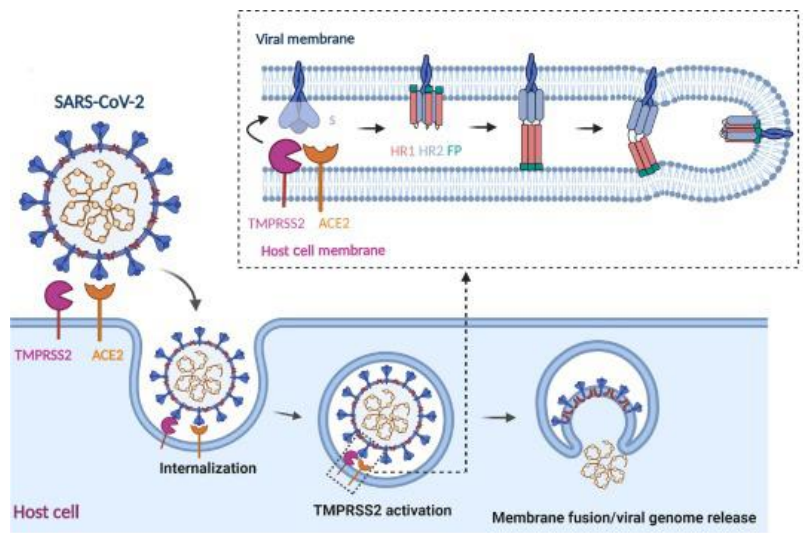


图 1-4 冠状病毒的吸附入侵过程（Renn et al 2020）

Fig 1-4 Adsorption and invasion process of coronavirus

1.2.3.2 复制酶翻译

冠状病毒基因组 5'端有帽子结构，病毒基因组侵入细胞后可通过宿主帽结构依赖的翻译机制翻译 ORF1a。当核糖体移动到 ORF1a 末端时，一个滑动序列和 RNA 假节会导致核糖体产生一个-1 位的移码，移码以后核糖体便能继续翻译 ORF1b（Forni et al 2016）。由 ORF1a、ORF1b 翻译而来的 pp1a 和 pp1b 能够被冠状病毒自身的蛋白酶切割，位于非结构蛋白 3（nonstructural protein 3, nsp3）内的木瓜样蛋白酶和位于 nsp5 上的 3C 蛋白酶切割 pp1a、pp1b 后会产生 15-16 个非结构蛋白，PEDV 的非结构蛋白数为 16 个（Yu et al 2020）。冠状病毒各非结构蛋白的功能见表 1-2。

1.2.3.3 基因组复制和转录

冠状病毒基因组的复制和转录由复制转录复合体介导，复制转录复合体主要包括 nsp7、nsp8 和 nsp12。

冠状病毒基因组复制时复制酶先以基因组 RNA 为模板合成出全长负链 RNA，然后反过来以全长负链 RNA 为模板合成正链基因组 RNA（Yesudhas et al 2021）。

冠状病毒的基因之间存在转录调节序列（transcription-regulated sequences, TRS），转录酶以冠状病毒正链 RNA 为模板合成负链 RNA 到 TRS 处时，部分转录会被终止，因此形成一系列 5'端相同但长短不一的病毒负链 RNA，这种转录方式被称为套式转录。以这些负链 RNA 为模板合成的正链 RNA 被称为亚基因组 RNA（sub-genomic RNA, sgRNAs），sgRNAs 是冠状病毒结构蛋白和辅助蛋白翻译的模板（Hartenian et al 2020）。

表 1-2 冠状病毒各非结构蛋白的功能 (Li et al 2020)

Table 1-2 The function of each coronavirus non-structural protein

蛋白名称	蛋白功能
nsp1	冠状病毒重要的毒力因子，决定冠状病毒的致病性。
nsp2	功能未知。
nsp3	病毒的木瓜样蛋白酶，参与 pp1a 的切割；通过去泛素化抑制宿主干扰素的产生；与 nsp4、nsp6 共同诱导双层膜囊泡结构 (double-membrane vesicles, DMVs) 的形成。
nsp4	参与诱导 DMV。
nsp5	病毒的 3C 样蛋白酶，参与 pp1a 和 pp1b 的切割；通过切割 NEMO 抑制 I 型干扰素表达。
nsp6	参与诱导 DMV；诱导细胞自噬。
nsp7、nsp8	nsp7-nsp8 复合体的作用是辅助冠状病毒 nsp12 合成病毒 RNA；部分冠状病毒 nsp7-nsp8 复合体具有非典型的 RNA 聚合酶功能。
nsp9	与冠状病毒 RNA 相互作用，稳定新合成的病毒 RNA。
nsp10	与 nsp14、nsp16 结合并促进它们功能的发挥；调节 nsp4-nsp11 区域的加工过程。
nsp11	nsp11 大小在 1.9 kDa 左右，一般不认为该蛋白具有功能。
nsp12	冠状病毒基因组复制所必需的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)。
nsp13	冠状病毒的 5'-3'解旋酶，同时还具有核酸水解酶活性。
nsp14	具有 3'-5'核酸外切酶活性和 N7 甲基转移酶活性，详细信息见 1.2.4。
nsp15	冠状病毒的核酸内切酶，能通过降解宿主 RNA 抑制干扰素的产生。
nsp16	冠状病毒的 2'氧甲基转移酶，帮助病毒 RNA 形成 1 型帽子结构。

1.2.3.4 结构蛋白翻译

冠状病毒的 sgRNAs 大部分都是 5'-3'单顺反子，依赖 RNA 的 5'帽子结构进行翻译 (Masters 2006)。S 蛋白、M 蛋白和 E 蛋白这些具有跨膜结构的结构蛋白的翻译场所为内质网。S 和 M 蛋白在内质网内合成后会分别被 N-连糖基化修饰和 O-连糖基化，糖基化修饰影响冠状病毒的吸附、复制和诱导中和抗体的能力 (de Haan et al 2003, Song et al 2004)。冠状病毒蛋白中丰度最高的 N 蛋白则是由细胞质内游离的核糖体翻译 (Baek et al 2020)。冠状病毒各结构蛋白的功能见表 1-3

表 1-3 冠状病毒各结构蛋白的功能（Li et al 2020）

Table 1-3 The function of each structural protein of coronavirus

蛋白名称和大小	主要功能
S 蛋白（150-220 kDa）	介导冠状病毒吸附入侵细胞；诱导中和抗体；影响冠状病毒毒力。
E 蛋白（7 kDa）	协助冠状病毒组装和出芽；抑制III型干扰素的表达。
M 蛋白（27-32 kDa）	协助冠状病毒囊膜的形成；协助冠状病毒病毒样颗粒的形成和释放；抑制III型干扰素的表达。
N 蛋白（48-50 kDa）	调节冠状病毒 RNA 的合成；在螺旋核衣壳中包装病毒 RNA；参与病毒粒子的组装；抑制 NF- κ B 通路的激活；诱导细胞自噬。

1.2.3.5 病毒粒子组装和释放

冠状病毒病毒粒子组装的场所是内质网和高尔基体之间的膜结构。冠状病毒病毒粒子组装由 M 蛋白主导，M 蛋白自身的相互作用为病毒粒子的形成提供了框架；S 蛋白通过与 M 蛋白相互作用进入病毒粒子的指定位点；包裹了基因组的 N 蛋白进入病毒组装场所后也由 M 蛋白引导进入病毒粒子核心；E 蛋白和 M 蛋白通过相互作用共同引导病毒囊膜对病毒粒子的包裹（Lim and Liu 2001, Fung and Liu 2019, 李向茸等 2021）。组装完成后病毒粒子从高尔基体上出芽并被光滑的囊泡结构包裹，囊泡被转运到细胞膜附近后冠状病毒通过细胞分泌途径出胞（Saud et al 2022）。

1.2.4 PEDV nsp14 的功能

PEDV nsp14 来自于前体多聚蛋白 pp1b，其大小为 67 kDa。PEDV nsp14 内有两个具有酶活性的功能域，分别是位于氨基端的核酸外切酶（3'-to-5' exoribonuclease, ExoN）功能域和位于羧基端的 N7 甲基转移酶（guanine-N7-methyltransferase, N7-MTase）功能域。

冠状病毒 nsp14 EoxN 功能域属于天门冬氨酸-谷氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸（Asp-Glu-Asp-Asp, DEDD）超家族成员，具有保守的 DEDD 核酸外切酶基序，可以借助双金属离子去除 RNA 3'末端错配的核苷酸，提高基因组复制的保真性（Chen et al 2007, Bouvet et al 2012, Ma et al 2015）。大部分 RNA 病毒的 RdRp 没有校对功能，导致基因组突变率较高（Sanjuán et al 2016）。基因组快速突变有助于病毒适应环境，但也增加了致死性突变的风险，为实现两者的平衡，RNA 病毒基因组一般小于 15 kb，而 nsp14 ExoN 功能域的校对功能帮助冠状病毒打破了这个限制（Domingo et al 2012, Aguilera et al 2017, Graepel et al 2019）。冠状病毒 nsp14 的 EoxN 功能域对病毒基因组的矫正是冠状病毒高效复制的关键。Eckerle 等发现沉默 SARS-

CoV 和小鼠肝炎病毒 (mouse hepatitis virus, MHV) nsp14 的 EoxN 功能域会导致病毒基因组突变率显著增加, 并进一步指出过高的突变负担对病毒复制有抑制作用 (Eckerle et al 2007, Eckerle et al 2010)。Ogando 等发现沉默 SARS-CoV2 和 MERS-CoV nsp14 的 EoxN 功能域完全阻断了病毒的复制 (Ogando et al 2020)。PEDV 复制同样依赖其 nsp14 的 EoxN 功能域, Niu 等发现将 PEDV nsp14 ExoN 功能域第 191 位谷氨酸 (E191) 替换为丙氨酸会导致病毒基因组稳定性急剧下降, 进而使 PEDV 的复制和致病能力减弱, 而点突变 nsp14 ExoN 功能域其它功能位点则会导致病毒完全无法复制 (Niu et al 2021)。

冠状病毒 nsp14 N7-MTase 功能域的主要作用是在病毒 RNA 5'端加帽过程中将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移到病毒 RNA 核心帽子结构 (GpppN-RNA) 帽子鸟嘌呤的 N7 位, 构成 0 型帽子结构 (Cap-0, ⁷MeGpppN-RNA) (图 1-5)。冠状病毒 RNA 的 5'端帽子结构可以起始翻译、保护 RNA 不被 5'核酸外切酶降解和帮助病毒逃逸细胞天然免疫 (Bankar et al 2021, Silva et al 2021)。冠状病毒 nsp14 N7-MTase 功能的缺失会阻断病毒 RNA 帽子的形成, 进而对冠状病毒的复制效率、致病和免疫逃逸能力造成负面影响。James 等发现将 MHV nsp14 N7-MTase 功能域第 332 位甘氨酸 (G332) 替换为丙氨酸会严重抑制 MHV 的复制效率和免疫逃逸能力 (Case et al 2016)。Pan 等指出 N7-MTase 功能域沉默会显著降低 MHV 和 SARS-CoV2 的致病能力 (Pan et al 2022)。PEDV 的复制效率和免疫逃逸能力同样受到其 nsp14 N7-MTase 功能域调控, 研究表明将 PEDV nsp14 第 350 位天冬氨酸 (D350) 突变为丙氨酸会部分抑制其 N7-MTase 活性, 携带该突变的 PEDV 毒株的复制效率和抑制 I 型、III 型干扰素的能力显著下降 (Lu et al 2020)。

除了协助病毒基因组复制, 冠状病毒 nsp14 还能调节宿主因子。HCoV-229E、MERS-CoV、SARS-CoV 以及 SARS-CoV2 的 nsp14 可以抑制细胞翻译, 进而负调节受干扰素刺激的宿主基因 (Hsu et al 2021)。SARS-CoV2 nsp14 可以激活宿主 NF-κB 信号通路和促进白细胞介素 8 表达 (Li et al 2021)。IBV nsp14 可以通过细胞自噬途径降解宿主 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1), 进而抑制 JAK-STAT 信号通路 (Ma et al 2022)。PEDV nsp14 同样能调节宿主因子, Li 等指出 PEDV nsp14 可以抑制 κB 激酶抑制剂 (inhibitor of kappa B kinases, IKKs) 的磷酸化和 p65 的核转运 (Li et al 2021)。

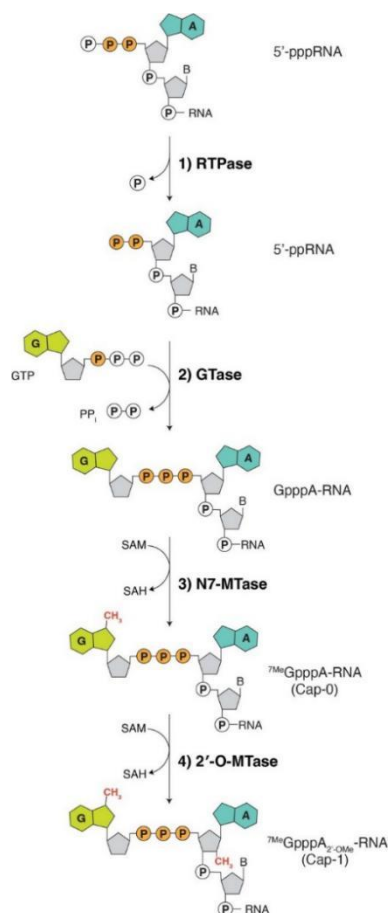


图 1-5 冠状病毒 RNA 加帽的过程 (Park et al 2022)

Fig.1-5 Coronavirus RNA capping process

1.2.5 抗 PEDV 药物的开发

在新型冠状病毒肺炎流行的背景下，抗冠状病毒药物的开发受到极大关注，这也极大的促进了抗 PEDV 药物的开发。目前报道的抗冠状病毒药物主要可以分为三类：针对冠状病毒非结构蛋白的药物、针对冠状病毒结构蛋白的药物、针对宿主靶点的药物。

冠状病毒基因组的复制和 sgRNAs 的转录依赖其非结构蛋白，针对冠状病毒非结构蛋白设计靶向药物能有效抑制冠状病毒的复制。目前针对 3C 样蛋白酶 (nsp5) 和 RdRp (nsp12) 的抗冠状病毒药物较多。Owen 针对 SARS-CoV2 nsp5 3C 样蛋白酶功能域筛选抗病毒药物，发现奈马特韦能抑制所有人源冠状病毒 3C 样蛋白酶活性，并进一步指出奈马特韦能有效抑制 SARS-CoV2 的复制和致病力，以奈马特韦为基础开发的新型冠状病毒肺炎特效药帕罗维德目前已经应用于临床 (Owen et al 2021)。针对 SARS-CoV2 RdRp 的瑞德西韦和莫纳匹拉韦对新型冠状病毒肺炎也有一定治疗效果，已经被美国食品药品监督管理局批准临床使用 (Ghosh et al 2022)。PEDV 抗病毒药物开发的热点蛋白是 nsp5。Li 等针对 PEDV nsp5 上鸟嘌呤-四联体 (G-quadruplexes, G4s) 结构筛选药物，发现 G4s 的特异性配体分子 TMPyP4 具有

抑制 nsp5 酶活性的能力且能阻断 PEDV 的增殖 (Li et al 2023)。Zhang 等报道 hypericin 通过与 PEDV nsp5 3C 样蛋白酶功能域结合干扰其酶活性, 进而抑制 PEDV 的增殖 (Zhang et al 2021)。Wang 等测试了食品药品监督管理局批准的 991 种天然化合物对 PEDV 复制的影响, 发现番茄碱能在病毒复制阶段抑制 PEDV, 进一步研究表明番茄碱可以和 PEDV 3C 样蛋白酶结合 (Wang et al 2020)。Li 等发现槲皮素能有效抑制 PEDV nsp5 3C 样蛋白酶活性且能阻断 PEDV 在细胞上的增殖 (Li et al 2020)。也有研究围绕 PEDV nsp13 筛选药物, Wang 等使用 ZINC 数据库筛选能抑制 PEDV 酶活性的分子, 发现 ZINC12899676 能有效抑制 PEDV nsp13 的 RNA 磷酸酶活性, 进而干扰 PEDV RNA 的加帽和抑制 PEDV 增殖 (Wang et al 2022)。此外, PEDV nsp14 也被指出是抗 PEDV 药物开发的潜在靶标 (Niu et al 2021)。

冠状病毒结构蛋白除了是病毒粒子的主要组分以外还在病毒的吸附入侵、病毒粒子的组装和出芽以及病毒的免疫逃逸方面发挥重要作用, 因此也被认为是药物开发的良好靶点 (韩露等 2020, 张丽娜和曹玲 2021)。目前靶向结构蛋白的抗冠状病毒药物以治疗性抗体居多 (Totura and Bavari 2019, Wu et al 2023)。新型冠状病毒肺炎流行期间全球研究人员开发了多种针对 SARS-CoV2 S 蛋白 RBD 的治疗性单克隆抗体, 其中包括 bamlanivimab、REGN10933 和 REGN10987 组合剂、CT-P59 以及我国科学家自主研发的安巴韦和罗米思韦, 这些药物都在临床上有所应用 (Yang et al 2020, Chen et al 2021, Kim et al 2021, Hoy 2022)。PEDV S 蛋白的治疗性抗体也有一定临床应用前景, 研究表明针对 PEDV S 蛋白的鸡卵黄抗体能有效降低 PEDV 对仔猪的肠道的损伤 (Kweon et al 2000, Lee et al 2015)。另外, 也有研究以 N 蛋白为靶标开发抗 PEDV 药物, 如 Deejai 等针对 PEDV N 蛋白筛选抗病毒分子, 发现三氯噻嗪、维生素 B7 和谷胱甘肽能结合 PEDV N 蛋白且对 PEDV 增殖有一定抑制作用 (Deejai et al 2017)。

冠状病毒和细胞的相互作用十分复杂, 细胞上存在协助冠状病毒入侵的受体, 细胞内有能调节冠状病毒复制的宿主因子, 这些宿主组分都可能是良好的治疗靶点。例如有研究围绕 SARS-CoV 的细胞受体 ACE2 开发治疗性药物, 发现氯喹可以干扰 ACE2 羧基末端糖基化, 进而抑制 SARS-CoV 入侵细胞 (Vincent et al 2005)。Yang 等发现唾液酸酶 Neu1 能帮助冠状病毒 N 蛋白唾液酸化, 进而促进病毒的增殖, 并进一步以 Neu1 为靶标开发能抑制冠状病毒复制和致病能力的药物 (Yang et al 2023)。Pan 等围绕细胞凋亡开发抗 TGEV 药物, 发现藜多糖可以缓解 TGEV 感染导致的细胞凋亡和活性氧累积, 对 TGEV 的复制有显著抑制作用 (Pan et al 2021)。PEDV 的细胞表面受体目前并未被明确, 无法从受体入手设计药物, 但有许多研究围绕细胞内组分设计抗 PEDV 药物 (Li et al 2017, Luo et al 2019)。如 Yang 等发现骨化三醇通过靶向细胞外调节蛋白激酶通路调节细胞周期, 进而在细胞水平抑制 PEDV 复制, 并且还指出骨化三醇能缓解 PEDV 引起的细胞凋亡和线粒体损伤, 是抗 PEDV 药物

开发的良好候选分子 (Yang et al 2021)。Yuan 等报道盐霉素的抗 PEDV 效力和其对细胞外调节蛋白激酶通路、c-Jun 氨基末端激酶和 p38 的抑制有关 (Yuan et al 2021)。Li 等发现氯化锂通过抑制细胞凋亡干扰 PEDV 的复制并指出其有被开发成为 PED 治疗药物的潜力 (Li et al 2018)。Gao 等评估了甘草酸的抗 PEDV 效力, 发现甘草酸通过抑制宿主高迁移率族蛋白 1 的功能发挥其抗 PEDV 活性 (Gao et al 2020)。抗 PEDV 药物的候选分子有很多, 但目前仍没有可用于治疗 PED 的商品化药物。PEDV 基因型复杂, 不同基因型毒株抗原差异性大, 开发能广泛性抑制 PEDV 不同基因型毒株的药物具有重要意义 (Lin et al 2016, He et al 2022, Zhang et al 2023)。

1.3 内质网应激概述

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是细胞内由膜结构形成的管道系统, 呈小管状、小囊状或扁平囊状且互相连通, 是细胞内重要的细胞器 (Schwarz and Blower 2016)。内质网分为粗面内质网和滑面内质网, 粗面内质网膜上有核糖体附着, 是细胞蛋白质合成的场所, 参与新生肽段的折叠、组装和运输 (Sano and Reed 2013, Wang et al 2019)。内质网稳态是新生肽段在粗面内质网正确折叠、组装的保证, 细胞外部微环境变化 (如缺氧、缺钙、营养物质缺乏、低 pH、氧化脂质等) 和一些胞内因素 (如细胞分化、代谢障碍等) 会使内质网稳态失衡, 进而导致内质网腔内肽段折叠不全, 最终因为大量非折叠蛋白滞留在内质网内诱发内质网应激 (Xin et al 2022, 张欣欣等 2022)。

1.3.1 非折叠蛋白反应

内质网应激条件下细胞通过非折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 纠正蛋白质折叠、减少转录和翻译、降解非折叠蛋白, 进而促进内质网稳态的恢复 (Jia et al 2018)。但 UPR 激活时间过长会导致细胞凋亡 (Rutkowski et al 2006)。

UPR 由蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 途径、肌醇需求酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α) 途径和激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 途径组成 (戴玉洁 2016)。正常情况下, 78 千道尔顿葡萄糖调节蛋白 (78 kilodalton glucose-regulated protein, GRP78) 分别与 IRE1 α 、PERK 和 ATF6 结合, 使它们保持静息状态 (李鹏程 2017)。GRP78 对未折叠蛋白的亲合力大于对 IRE1 α 、PERK 和 ATF6 的亲合力, 内质网腔内未折叠蛋白累积时 GRP78 从这三个 UPR 调节蛋白上解离, 这些 UPR 调节蛋白进而活化并激活下游级联信号 (Liu et al 2022)。

1.3.1.1 蛋白激酶 R 样内质网激酶途径

内质网应激时 UPR 优先抑制翻译和降解非折叠蛋白, 蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 途径是 UPR 调控细胞蛋白质合成的主要途径 (Hetz and Papa 2018)。

PERK 是典型的I型跨膜蛋白，氨基端在内质网腔内，静息状态下氨基端与 GRP78 结合；羧基端暴露于胞质，其激酶功能域在羧基端。内质网应激时，GRP78 从 PERK 氨基端上解离，失去 GRP78 抑制的 PERK 寡聚化和反式自磷酸化。第 980 位苏氨酸磷酸化是 PERK 活化的关键，PERK 活化后其羧基端与真核翻译起始因子（eukaryotic translation initiator factor）2 α 亚基之间的激活环和 α G 螺旋变得稳定，进而诱导 eIF2 α 第 51 位丝氨酸磷酸化（Cui et al 2011, 王立堃 2022）。eIF2 是组成翻译起始复合体的关键，正常情况下鸟苷酸交换因子 eIF2B 与 eIF2 的 γ 亚基结合，进而催化 eIF2-GDP 为 eIF2-GTP，使 eIF2 复合物能参与新一轮翻译。eIF2 的 α 亚基（eIF2 α ）被磷酸化后，eIF2B 更倾向于与 eIF2 α 结合，eIF2 复合物上 GDP 向 GTP 的转化被阻断，蛋白质的翻译因此被抑制（Stolboushkina and Garber 2011）。磷酸化的 eIF2 α 在抑制大部分 mRNA 翻译的同时会选择性地促进内质网应激相关基因 ATF4 的表达。ATF4 能从蛋白质折叠、非折叠蛋白降解以及抗氧化等方面协助内质网恢复稳态（Harding et al 2000, Harding et al 2003）。内质网应激被缓解时，ATF4 会促进生长停滞和 DNA 损伤诱导因子 34（growth arrest and DNA damage inducible 34, GADD34）的表达，进而去除 eIF2 α 的磷酸化，使得翻译功能正常运转，这是 PERK-eIF2 α 途径反馈调节的关键（Lee et al 2018）。若内质网应激不能及时解除，ATF4 会促进 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白（C/EBP homologous protein, CHOP）的表达。CHOP 是一种细胞凋亡诱导基因，它通过上调促凋亡蛋白 Bax 和抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 导致细胞凋亡（Zhang et al 2022）。

1.3.1.2 肌醇需求酶 1 α 途径

肌醇需求酶 1 α （IRE1 α ）途径是三条 UPR 通路中最保守的，从酵母到哺乳动物都保有该途径（Su et al 2017）。IRE1 α 也是内质网膜上的I型跨膜蛋白，其暴露于细胞质内的羧基末端具有两个催化功能域，分别是丝氨酸/苏氨酸激酶活性功能域和核糖核酸内切酶（endoribonuclease, RNase）功能域（Yang et al 2018）。GRP78 从 IRE1 α 上解离后，IRE1 α 寡聚化和反式自磷酸化，导致蛋白构象改变，其激酶功能域和 RNase 功能域随即被激活（Pinkaw et al 2017）。

IRE1 α RNase 功能域的主要作用是切除 X 盒结合蛋白 1（X-box binding protein 1, XBP1）mRNA 上一段含 26 个核苷酸的内含子，使得 XBP1 的编码蛋白从长且不稳定 XBP1_u 变为短但稳定的 XBP1_s。XBP1_s 可以和多种转录因子形成异质二聚体，进而诱导内质网 DnaJ 同系物 3（endoplasmic reticulum DNA J domain-containing protein 3, ERdj3）、ERdj4、蛋白激酶抑制剂 p58（protein kinase inhibitor p58, p58IPK）、增强内质网蛋白降解能力的甘露糖苷酶样蛋白（endoplasmic reticulum degradation enhancing α mannosidase like protein, EDEM）、核糖体相关膜蛋白 4（ribosome associated membrane protein 4, RAMP-4）和蛋白质二硫键异构酶 P5

(protein disulfide isomerase P5, PDI-P5) 等内质网伴侣蛋白的表达 (Shen et al 2002, Hetz 2012, Li et al 2017)。ERdj3 能协助维持内质网腔内外蛋白质平衡, XBP1s 诱导该基因能帮助协调内质网腔内肽段的折叠和转运 (Yu et al 2000); ERdj4 能协助 GRP78 结合 IRE1 α , 是一种 IRE1 α 的抑制因子, XBP1s 诱导该基因是 IRE1 α 途径反馈调节的关键, 有利于内质网功能的恢复 (Amin-Wetzel et al 2017); p58IPK 能和 PERK 的激酶功能域结合并抑制其活性, XBP1s 诱导该基因能帮助反馈调节 PERK 途径 (Yan et al 2002); EDEM 能促进内质网降解途径底物的降解, XBP1s 诱导该基因能缓解内质网腔内非折叠蛋白的累积 (Hosokawa et al 2001); RAMP-4 和膜蛋白的糖基化有关, XBP1s 诱导该基因能保证内质网应激时膜蛋白被正确糖基化 (Yamaguchi et al 1999); PDI-P5 和二硫键的形成有关, XBP1s 诱导该基因能促进内质网腔内肽段的折叠 (Kikuchi et al 2002)。此外, XBP1s 还参与调节脂质的合成 (Acosta-Alvear et al 2007)。IRE1 α RNase 功能域还能选择性降解 mRNA, 该功能被称为 RIDD (regulated IRE1-dependent decay)。RIDD 发生在 mRNA 开始翻译肽段之后, 特定的信号序列把 mRNA 引导到内质网膜的胞质面, IRE1 α RNase 功能域随即降解靠近的 mRNA (Hollien and Weissman 2006)。RIDD 能缓解内质网的翻译压力, 对内质网稳态的恢复有积极意义。

IRE1 α 丝氨酸/苏氨酸激酶功能域的主要作用是诱导细胞凋亡。IRE1 α 的丝氨酸/苏氨酸激酶功能域招募肿瘤坏死因子受体相关因子 2 后会促进促凋亡信号激酶 1 的表达 (李鹏程 2017)。促凋亡信号激酶 1 能诱导 c-Jun 氨基端激酶 1 磷酸化, 而磷酸化的 c-Jun 氨基端激酶 1 可通过破坏内质网膜结构、加大线粒体膜通透性、促进促凋亡基因表达、抑制抗凋亡基因表达等多种方式诱导细胞凋亡 (Lee et al 2021, 李鑫等 2021)。

1.3.1.3 激活转录因子 6 途径

激活转录因子 6 (ATF6) 与 PERK 和 IRE1 不同, 它是 II 型跨膜蛋白。ATF6 暴露于胞质内的氨基端具有亮氨酸拉链结构, 是典型的 DNA 结合蛋白, 具有转录因子活性 (Preusse et al 2022)。ATF6 失去 GRP78 的抑制后会进入高尔基体并被高尔基体常驻蛋白酶切割, 进而释放其氨基端功能域 (ATF6f), ATF6f 会进一步被转运到细胞核内作为转录因子发挥作用 (Shen et al 2019)。ATF6f 能诱导 GRP78、PDI、钙联接蛋白等多种内质网分子伴侣的转录, 进而提高内质网折叠蛋白质的能力、促进非折叠蛋白通过内质网降解途径降解 (Reddy and Chapman 2017)。此外 ATF6f 还可以诱导 XBP1 和 CHOP 的转录, 协同 IRE1 α -XBP1 轴和 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 轴调节内质网应激 (Al-Yacoub et al 2021)。

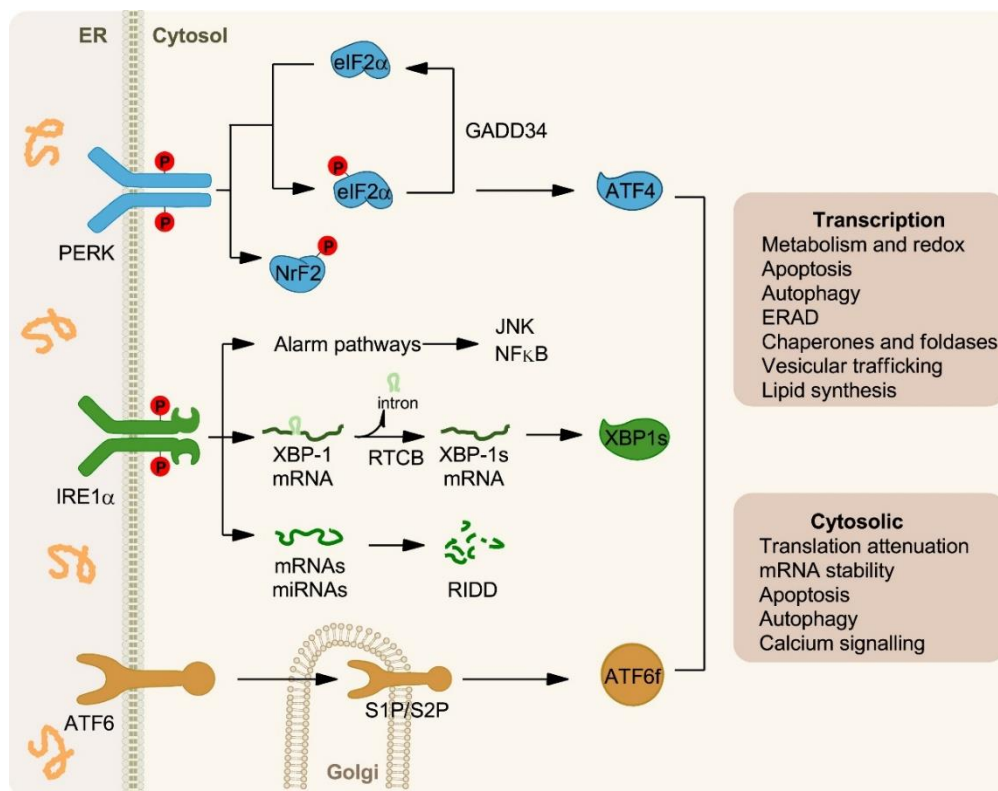


图 1-6 非折叠蛋白反应的三种途径 (Hetz et al 2018)

Fig.1-6 Three pathways of the unfolded protein response

1.3.2 冠状病毒与内质网应激

1.3.2.1 病毒诱发内质网应激的因素

病毒对细胞膜结构的损害会导致内质网应激。许多正链 RNA 病毒在复制过程中会直接利用宿主细胞的内质网膜 (Miller and Krijnse-Locker 2008)。Schlegel 等发现脊髓灰质炎病毒的膜结构中存在 PDI、P63 等内质网相关蛋白, 并指出细胞内质网是脊髓灰质炎病毒膜结构的主要供体 (Schlegel et al 1996)。El-Hage 等分析丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) RNA 和非结构蛋白的合成场所, 发现他们和内质网分子伴侣钙网结合蛋白存在共定位, 并进一步指出 HCV RNA 和非结构蛋白的合成场所由核周内质网膜形成并与核周内质网保持连接 (El-Hage and Luo 2003)。登革热病毒 (dengue virus, DENV) 感染会导致细胞核周内质网重新分布, 这可能有助于 DENV 的复制 (Lei et al 2013)。冠状病毒也会在复制过程中利用内质网膜结构。冠状病毒基因组复制发生在宿主细胞的胞质中, 若复制过程中产生的双链 RNA 暴露于胞质会引发宿主天然免疫反应, 为了规避这种风险, 冠状病毒 nsp3、nsp4、nsp6 会裹挟细胞内质网形成 DMVs。DMVs 将冠状病毒复制转录复合体包裹在内, 使细胞内天然免疫感应器无法接触病毒复制时产生的双链 RNA (Knoops et al 2008, Scutigliani and Kikkert 2017)。病毒导致的内质网重排会减弱内质网处理宿主蛋白的能力, 导致非折叠蛋白累积, 诱发内质网应激。

病毒糖蛋白的合成也会导致内质网应激。RNA 病毒的膜蛋白有很多是糖蛋白，如流感病毒的血凝素（Hemagglutinin, HA）就是一种糖蛋白，糖基化使得 HA 可以快速和钙联蛋白结合，促进其自身折叠（Tatu et al 1995）；决定 HCV 感染性的囊膜蛋白也是一种糖蛋白，它们糖基化后能与钙联蛋白保持长效的结合，进而提高自己的折叠和组装效率（Dubuisson and Rice 1996）；艾滋病病毒的囊膜蛋白亦是糖蛋白，囊膜蛋白的糖基化是其正常发挥功能和艾滋病病毒致病的关键（Valenzuela-Fernández et al 2022）。冠状病毒也有一个重要的糖蛋白——S 蛋白。S 蛋白是冠状病毒的受体结合蛋白，决定冠状病毒宿主嗜性并介导病毒的吸附入侵，而借助糖基化形成有效构像是 S 蛋白发挥功能的关键（Casalino et al 2020）。另外冠状病毒还会借助宿主的糖基化机制将病毒表面蛋白伪装成宿主蛋白，以此来逃逸宿主免疫系统的识别（Casalino et al 2020）。病毒蛋白糖基化依赖宿主的糖基化修饰系统，病毒糖蛋白和宿主糖蛋白竞争糖基化系统会导致宿主细胞蛋白的糖基化出现异常，使得宿主细胞糖蛋白折叠不全，进而诱发内质网应激。

此外，大量病毒蛋白转运到内质网、病毒打孔蛋白造成的内质网钙离子流失等也是内质网应激的潜在诱因（Jheng et al 2014, Zhang et al 2017）。

1.3.2.2 冠状病毒对内质网应激的调节

多种冠状病毒被报道能够激活内质网应激。研究表明 SARS-CoV2、HCoV-OC43 和 MERS-CoV 感染细胞时内质网应激 IRE1 α 途径被激活（Bartolini et al 2022, Nguyen et al 2022, Shin et al 2022）。SARS-CoV2 的 ORF3a、ORF7a 被指出参与激活内质网应激（Liu et al 2022, Zhang et al 2022）。SARS-CoV 也能激活内质网应激，其 ORF6、ORF8b 和 S 蛋白在其中起到促进作用（Versteeg et al 2007, Ye et al 2008, Kräling et al 2009, Shi et al 2019）。MHV 能激活内质网应激 IRE1 α 途径，Versteeg 等发现 MHV 的 S 蛋白是激活 IRE1 α 的关键（Versteeg et al 2007）。IBV 可以通过内质网应激 PERK 途径引发细胞凋亡，进而造成鸡肾损伤（Chen et al 2022）。猪源冠状病毒 TGEV 和猪 δ 冠状病毒能激活全部 UPR 通路（Xue et al 2018, Fang et al 2022）。PEDV 也被指出能激活内质网应激，Sun 等发现 PEDV 感染细胞中三条 UPR 通路全部激活，其中 PERK 和 IRE1 α 是 PEDV 诱导细胞自噬的上游通路（Sun et al 2021）。另外 PEDV 的 E 蛋白、M 蛋白、N 蛋白以及 ORF3 也被报道参与激活内质网应激（Xu et al 2013a, Xu et al 2013b, Xu et al 2015, Zou et al 2019）。也有研究指出冠状病毒会抑制内质网应激相关因子的表达，Shaban 分析了冠状病毒感染细胞中内质网应激相关因子在转录水平和蛋白质水平的变化，发现 HCoV-229E、MERS-CoV 和 SARS-CoV2 在转录水平上调内质网应激相关因子，但在蛋白质水平下调 GRP78、IRE1 α 等蛋白（Shaban et al 2021）。

1.3.2.3 内质网应激抑制冠状病毒复制

内质网应激对部分病毒的增殖有促进作用。Gladwyn-Ng 等指出寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 的复制依赖 IRE1 α 途径, 干扰 IRE1 α 的功能会显著抑制 ZIKV 的增殖 (Gladwyn-Ng et al 2018); Pasqual 等分析 UPR 对淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒的影响, 发现淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒通过激活 ATF6 促进自身增殖 (Pasqual et al 2011); Chen 发现猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 激活内质网应激 PERK 和 IRE1 α 途径, 并进一步指出这两个 UPR 途径对 PRRSV 的复制有促进作用 (Chen et al 2020)。

内质网应激也能抑制一些病毒的增殖, 如 Frabutt 等指出内质网应激介导的内质网降解途径能降解流感病毒的 HA 蛋白, 进而抑制流感病毒的复制 (Frabutt et al 2018); Ming 等指出内质网应激诱导的细胞自噬是泛素特异性蛋白酶 14 抑制剂降解猪伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) VP16 蛋白和抑制猪伪狂犬病病毒复制的关键通路 (Ming et al 2022)。

内质网应激对冠状病毒主要表现出抑制作用。Shaban 等指出 Tg 诱导的内质网应激对 HCoV-229E、MERS-CoV、SARS-CoV2 有显著抑制作用 (Shaban et al 2021)。Nguyen 等鉴定了大麻二酚对 SARS-CoV2 复制和致病性的影响, 发现大麻二酚通过激活内质网应激 IRE1 α 通路发挥抗 SARS-CoV2 活性 (Nguyen et al 2022)。Xue 等发现内质网应激在细胞水平抑制 TGEV 的复制, 该作用主要通过 PERK 途径实现 (Xue et al 2018)。Fang 等指出激活 PERK 和 ATF6 途径能抑制猪 δ 冠状病毒的复制 (Fang et al 2022)。内质网应激也具有抑制 PEDV 复制的潜力, Xu 等发现 GRAMD4 (Glucosyltransferase Rab-like GTPase activator and myotubularin domain containing 4) 对 PEDV 复制的抑制和内质网应激有关, GRAMD4 过表达会导致 GRP78 和 CHOP 表达上调、PERK 和 IRE1 α 磷酸化水平上升 (Xu et al 2023)。Wang 等发现内质网应激诱导剂 2-脱氧-D-葡萄糖通过干扰病毒蛋白质合成和病毒粒子组装抑制 PEDV 增殖 (Wang et al 2014)。

1.4 78 千道尔顿葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 概述

1.4.1 GRP78 的结构和功能

GRP78 又叫免疫球蛋白重链结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain-binding protein, Bip) 或 70 千道尔顿热休克蛋白 5 (heat-shock 70 kilodalton protein 5, HSPA5), 与 HSP70 家族有 60% 同源性。GRP78 是一个内质网伴侣分子, 是维持内质网稳态的重要调节蛋白, 参与蛋白的转运、折叠和组装。GRP78 蛋白主要包含两个功能域, 分别是氨基端的核苷酸结合域 (nucleotide binding domain, NBD) 和羧基端的底物结合域 (substrate binding domain, SBD)。GRP78 羧基端有少量疏水残

基，可以帮助 GRP78 识别内质网内的非折叠蛋白（Wolters-Eisfeld et al 2018, Gonzalez-Gronow et al 2021）。GRP78 是封闭内质网多肽易位孔的主要蛋白，当新生肽链长度超过 70 个氨基酸时 GRP78 解封易位孔并引导新生肽链进入内质网腔（Hamman et al 1998）。GRP78 能将非折叠多肽转运到具有折叠功能的内质网分子伴侣附近，GRP78 NBD 通过 ATP 和 ADP 交换决定 GRP78 SBD 对非折叠蛋白的结合和释放，该机制使得 GRP78 能不断识别蛋白的未折叠区域，直至蛋白被折叠完全（Gething 1999）。GRP78 还是内质网腔内主要的钙离子结合蛋白，对于维持内质网内外钙离子稳态十分重要（Ibrahim et al 2019）。另外，GRP78 还参与调节细胞生长（Luo et al 2006）。GRP78 上调是内质网应激的标志，内质网应激时，从 PERK、IRE1 α 、ATF6 上解离的 GRP78 与非折叠蛋白结合并将非折叠蛋白转运到相关分子伴侣附近以促进蛋白的正确折叠，若蛋白的折叠状态无法纠正，GRP78 会把错误折叠蛋白引向内质网降解途径（Kim et al 2001, Lodhi et al 2015, Quillard et al 2015）。

另外 GRP78 也可以转移到细胞表面。GRP78 虽然具有内质网滞留基序（KDEL），但当 GRP78 表达量因内质网应激等因素快速增加时，内质网无法完全滞留所有 GRP78，部分 GRP78 会离开内质网并转运到细胞表面。细胞表面的 GRP78 被称为 csGRP78（cell surface GRP78）。csGRP78 与细胞表面其它蛋白结合后可作为多功能受体发挥新的功能（Tseng et al 2019）。

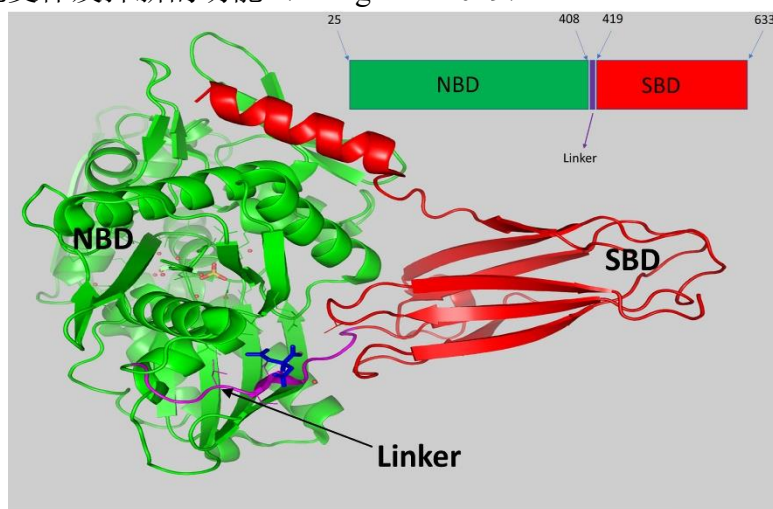


图 1-7 GRP78 的结构（Ibrahim et al 2019）

Fig.1-7 The structure of GRP78

1.4.2 GRP78 对病毒复制的影响

GRP78 可以帮助病毒吸附和入侵细胞。Wu 等发现干扰 GRP78 表达会抑制日本乙型脑炎病毒（Japanese encephalitis virus, JEV）的复制，Nain 等进一步指出 GRP78 可以协助 JEV 吸附和入侵细胞（Wu et al 2011, Nain et al 2017）。鸭坦布苏病毒（Duck tembusu virus, DTMUV）入侵细胞也依赖 GRP78，Zhao 等指出抑制

GRP78 表达会减少 DTMUV 对细胞的吸附 (Zhao et al 2018)。GRP78 也可能介导冠状病毒入侵细胞。Chu 等指出 GRP78 能和 MERS-CoV、蝙蝠冠状病毒 HKU9 (bat coronavirus HKU9, bCoV-HKU9) 的 S 蛋白结合, 可能在病毒的侵入过程中起到辅助作用 (Chu et al 2018)。

GRP78 还能促进病毒蛋白合成和成熟。Shin 等发现 DENV、JEV、人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, hCMV)、埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 和乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 会利用 GRP78 来折叠自身蛋白 (Shin et al 2022)。Wati 等指出抑制 GRP78 表达会减慢 DENV 抗原合成的速度 (Wati et al 2009)。SARS-CoV2 S 蛋白的合成也需要 GRP78, Rayner 等指出胞内的 GRP78 可以和 SARS-CoV2 S 蛋白结合, 干扰 GRP78 表达会降低 S 蛋白的合成速度 (Rayner et al 2020)。

GRP78 也可能抑制病毒复制, 如 Shu 等发现在 Huh7 细胞中过表达 GRP78 会抑制 HBV 的增殖 (Shu et al 2020)。部分病毒通过抑制 GRP78 表达促进自身复制。Khongwichit 等发现即使 GRP78 能促进 ZIKV 膜蛋白的成熟, ZIKV 还是会抑制 GRP78 表达, Turpin 等进一步指出 ZIKV 通过抑制 GRP78 表达使 UPR 的激活模式利于自身复制 (Turpin et al 2020, Khongwichit et al 2021)。HCoV-229E、MERS-CoV、SARS-CoV2 等冠状病毒被指出通过抑制细胞翻译拮抗 GRP78 的抗病毒效应 (Shaban et al 2021)。GRP78 也有抑制 PEDV 复制的潜力, Xu 等指出 GRAMD4 对 GRP78 表达的诱导可能帮助其抑制 PEDV (Xu et al 2023)。

1.5 欧当归内酯 A 概述

欧当归内酯 A (Levistilide A, LA) 是一种从传统中药材川芎中提取的天然化合物, 由两分子的 Z-藁本内酯 (Z-ligustilide) 聚合而成 (He et al 2015)。

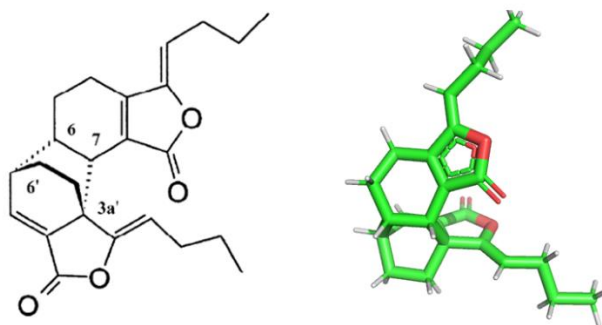


图 1-8 欧当归内酯 A 的结构 (Chen et al 2008)

Fig.1-8 The structure of Levistilide A

LA 具有多种生物活性。研究表明 LA 能直接抑制癌细胞, Yang 等发现 LA 可以通过氧化应激-内质网应激途径诱导结肠癌细胞凋亡 (Yang et al 2017); Zhang 等在筛选抗肿瘤分子时发现 LA 能结合生长因子受体 4 酪氨酸激酶功能域, 具有抑制肿

瘤细胞生长的潜力 (Zhang et al 2015)。LA 还能降低癌细胞的耐药性, Ding 等指出 LA 对癌细胞中耐药蛋白的表达有抑制作用, 能使阿霉素耐药的人慢性髓系白血病细胞对阿霉素敏感 (Ding et al 2019); Chen 等发现 LA 能抑制 P 糖蛋白介导的人乳腺癌细胞的多重耐药, 对阿霉素和长春新碱的抗癌效果有促进作用 (Chen et al 2008)。LA 也能促进神经细胞生长。Noda 等指出 LA 能促进嗅觉神经元再生和神经生长因子的表达 (Noda et al 2019)。LA 也可被用于治疗神经退行性疾病。研究表明 LA 能减少小鼠大脑中 β -淀粉样蛋白的沉积和 tau 蛋白的磷酸化, 进而缓解阿兹海默症模型小鼠的认知障碍 (Qu et al 2021)。在传染性疾病的治疗方面, 还未见关于 LA 的报道, 但有研究指出组成 LA 的藁本内酯具有一定抗病毒活性 (Beck and Stermitz 1995)。

第2章 研究目的与意义

PEDV是目前猪只病毒性腹泻最主要的病原，新生仔猪感染GII基因型PEDV毒株后死亡率高达100%。GII基因型PEDV的广泛流行给养猪业造成了巨大的经济损失。内质网应激是宿主清除内质网腔内非折叠蛋白的机制，在病毒感染过程中发挥重要作用。内质网应激能抑制多种人源冠状病毒的复制，但其对PEDV的具体作用还未被阐明。本研究旨在明确内质网应激的抗PEDV作用、解析PEDV拮抗宿主内质网应激的机制和开发相关抗PEDV分子，这有助于阐明PEDV的致病机理，同时也能为PED的防治提供理论支持。

PEDV基因型复杂，不同基因型毒株的差异较大。本研究以GI-b、GII-a、GII-b基因亚型PEDV毒株为材料测试内质网应激对PEDV复制的影响，旨在明确内质网应激能否有效抑制不同基因型PEDV的复制。本研究还深入挖掘了参与调节PEDV复制的UPR通路和内质网应激相关蛋白，发现PERK通路和内质网应激标志蛋白GRP78分别是内质网应激抑制PEDV复制依赖的主要UPR通路和宿主蛋白。这有助于阐明内质网应激抗PEDV的具体机制，也能为抗PEDV药物的开发提供宿主靶点。

病毒为维持自身复制会拮抗宿主的抗病毒效应。为明确PEDV能否拮抗内质网应激的抗病毒效应，本研究评估了PEDV对内质网应激的影响，发现PEDV能够抑制GRP78表达，并进一步挖掘了PEDV抑制GRP78表达的具体机制和抑制GRP78表达的主要PEDV蛋白。这将为PEDV逃逸宿主抗病毒反应的研究提供参考，同时也为抗PEDV药物的开发提供病毒靶点。

最后本研究以内质网应激为靶筛选对PEDV复制有抑制作用的分子，发现欧当归内酯A能抑制GI和GII基因型PEDV的复制，并指出欧当归内酯A的抗PEDV作用依赖氧化应激-内质网应激途径。该发现将为抗PEDV药物的开发和PED的防治提供理论支持。

第3章 材料与方法

3.1 试验材料

3.1.1 细胞、毒株和菌株

试验中使用的非洲绿猴肾细胞（Vero CCL81）、猪近端肾小管细胞（LLC-PK1）、人胚胎肾细胞（HEK293t）为本实验室保存的细胞。

试验中使用的 PEDV YN15 毒株（GenBank 登录号：KT021228.1）、PEDV JS 毒株（GenBank 登录号处于保密状态）为本实验室从临床腹泻样品中分离得到。PEDV DR13 毒株（GenBank 登录号：JQ023161）为本实验室保存的毒株。

大肠杆菌 DH10B 感受态细胞为本实验室自制并保存于-80 °C超低温冰箱。

3.1.2 载体与质粒

pCAGGS-Flag-MCS、psiCheckII、pCAGGS-mRFP 保存于本实验室。

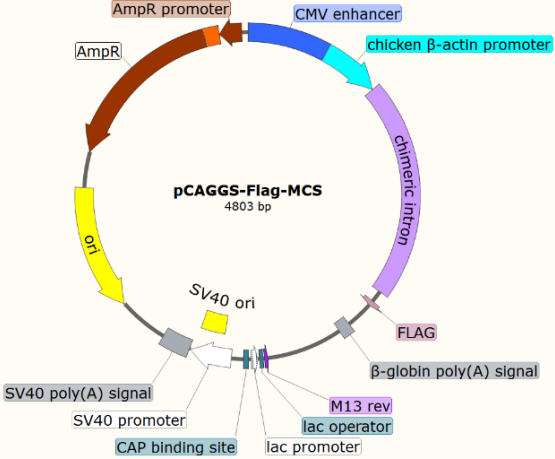


图 3-1 pCAGGS-Flag-MCS 图谱

Fig 3-1 The map of pCAGGS-Flag-MCS

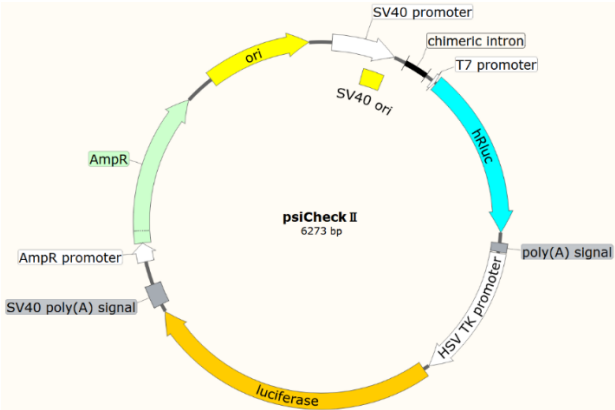


图 3-2 psiCheckII图谱

Fig 3-2 The map of psiCheckII

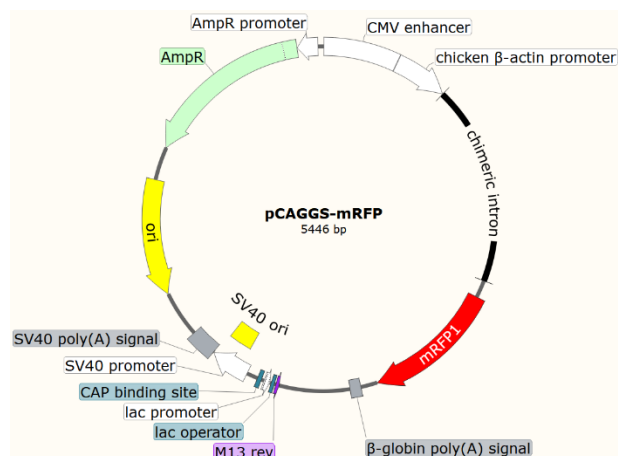


图 3-3 pCAGGS-mRFP 图谱

Fig 3-3 The map of pCAGGS-mRFP

3.1.3 抗体

鼠源 PEDV N 蛋白和 S 蛋白单克隆抗体为本实验室自制。

兔源 β -actin 单克隆抗体（产品号：AC026）、HRP 山羊抗兔 IgG（产品号：AS014）、HRP 山羊抗鼠 IgG（产品号：AS003）购自 Abclonal 公司。

兔源 GRP78 多克隆抗体（产品号：11587-1-AP）、兔源 Flag 标签多克隆抗体（产品号：20543-1-AP）购自 proteintech 公司。

驴抗鼠荧光二抗（Alexa Fluor 488 Donkey anti Mouse IgG，产品号：ANT023S）、驴抗兔荧光二抗（Alexa Fluor 594 Donkey anti Rabbit IgG，产品号：ANT030S）购自安特捷公司。

鼠源抗嘌呤霉素抗体（Anti-Puromycin Antibody，clone 12D10 ZooMAb® Mouse Monoclonal）购自 Sigma-Aldrich 公司。

3.1.4 药物

衣霉素（tunicamycin, TM）、毒胡萝卜素（thapsigargin, Tg）、AMG PERK 44、STF083010、褪黑素（Melatonin）、CCT020312、四苯基丁酸（4-Phenylbutyric acid, 4-PBA）、欧当归内酯 A（Levistilide A, LA）、 α -硫辛酸（ α -Lipoic acid）、虎杖苷（Polydatin）、棕榈酸（Palmitic acid）、3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine, 3-MA）、MG132 购自 MedChemExpress 公司。

NAC 购自碧云天公司。

嘌呤霉素盐酸盐溶液购自翌圣生物。

3.1.5 细胞、病毒、细菌培养相关试剂

DMEM 粉末、Opti-MEM 培养基、胰蛋白酶粉末购自 GIBCO 公司。胎牛血清购自 NEWZERUM 公司。100×青霉素-链霉素混合液购自 biosharp 公司。Tryptic soy broth (TSB) 培养基预混粉末、Tryptic soy agar (TSA) 培养基预混粉末购自 BD 公司。

DMEM 培养基：取 13.30 g DMEM 粉末溶于 800 mL 纯水中，接着加入 3.70 g 碳酸氢钠和 5.96 g 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)，混匀后将 pH 调至 6.8-7.0，使用纯水将溶液定容至 1 L，最后使用 0.22 μm 滤器过滤到无菌容器中。

含 0.25% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰蛋白酶消化液：取 0.197 g EDTA、8.020 g 氯化钠、1.530 g 磷酸氢二钠、0.163 g 磷酸二氢钾、0.201 g 氯化钾溶于 800 mL 纯水中，将 pH 调至 8.0 后加入 2.5 g 胰蛋白酶粉末，用纯水定容至 1 L，最后使用 0.22 μm 滤器过滤到无菌容器中。

细胞生长液：Vero 细胞、LLC-PK1 细胞、HEK293t 细胞的生长液为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

病毒培养液：针对 PEDV DR13 毒株的病毒培养液为无血清 DMEM 培养基，针对 PEDV YN15 毒株、JS 毒株的病毒培养液为含 8 $\mu\text{g/mL}$ 胰蛋白酶的无血清 DMEM 培养基。

TSB 培养基：取 30 g TSB 预混粉末溶于 800 mL 纯水，用纯水定容至 1 L，于高压蒸汽灭菌锅中 121 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 min。

TSA 培养皿：取 40 g TSA 预混粉末溶于 800 mL 纯水，用纯水定容至 1 L，于高压蒸汽灭菌锅中 121 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 min。待 TSA 溶液降温至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右时于超净工作台内将 TSA 溶液分装到干净的培养皿中，轻微晃匀使 TSA 溶液均匀的铺在培养皿中，TSA 溶液凝固后即可使用。若要在 TSA 培养基中添加抗生素，可在分装之前加入。

3.1.6 蛋白免疫印迹相关试剂

Omni-ECL™ 超灵敏化学发光检测试剂盒、三色预染蛋白 marker (10-250 kDa) 购自雅酶生物。RIPA 裂解液 (强)、N,N,N',N'-四甲基二乙胺 (TEMED) 购自碧云天公司。PVDF 膜购自 Millepore 公司。

1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)：取 121.1 g Tris 溶于 800 mL 纯水中，用盐酸 (HCl) 将 pH 调至 6.8，最后用纯水定容至 1 L。

1.0 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)：取 121.1 g Tris 溶于 800 mL 纯水中，用 HCl 将 pH 调至 8.0，最后用纯水定容至 1 L。

1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)：取 181.7 g Tris 溶于 800 mL 纯水中，用 HCl 将 pH 调至 8.8，最后用纯水定容至 1 L。

30% (W/V) 丙烯酰胺：取 290 g 丙烯酰胺和 10 g 甲叉丙烯酰胺溶于 800 mL 纯水中，溶解后将 pH 调至 8.8，最后用纯水定容至 1 L。

10% (W/V) 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液：取 10 g SDS 溶于 80 mL 纯水中，溶解后用纯水定容至 100 mL。

10% (W/V) 过硫酸铵：取 10 g 过硫酸铵溶于 80 mL 纯水中，溶解后用纯水定容至 100 mL。

SDS-PAGE 浓缩胶配方：纯水 1.40 mL、30% (W/V) 丙烯酰胺 0.33 mL、1.0 mol/L Tri-HCl 0.25 mL、10% (W/V) SDS 溶液 0.02 mL、10% (W/V) 过硫酸铵 0.02 mL、TEMED 0.002 mL。SDS-PAGE 分离胶配方见表 3-1。

表 3-1 SDS-PAGE 分离胶配方

Table 3-1 SDS-PAGE separating gel recipe

各组分名称及体积 (mL)	SDS-PAGE 分离胶丙烯酰胺浓度 (W/V)				
	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
纯水	5.3	4.6	4.0	3.3	2.3
30% (W/V) 丙烯酰胺	2.0	2.7	3.3	4.0	5.0
1.5 mol/L TriHCl (pH 8.8)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10% (W/V) SDS 溶液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10% (W/V) 过硫酸铵	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED	0.008	0.006	0.004	0.004	0.004

SDS-PAGE 电泳缓冲液：取 3.03 g Tris、18.8 g 甘氨酸、1.00 g SDS 置于 1 L 烧杯中，加入 0.8 L 纯水，搅拌至溶解，最后用纯水将溶液定容至 1 L。

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)：取 0.5 g 溴酚蓝、10 g SDS 溶于 15 mL 纯水中，接着加入 50 mL 甘油和 25 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 混匀后用纯水定容至 100 mL。

湿转法膜转移缓冲液：取 5.80 g Tris、2.90 g 甘氨酸、0.37 g SDS 置于 1 L 烧杯中，加入 0.6 L 纯水，搅拌至溶解。接着加入 0.2 L 甲醇，混匀。最后用纯水将溶液定容至 1 L。

PVDF 膜清洗液 (TBST Buffer)：取 8.8 g NaCl、20 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 置于 1 L 烧杯中，加入 0.8 L 纯水，搅拌至溶解。接着加入 0.5 mL 吐温 20，混匀。最后用纯水定容至 1 L。

PVDF 膜封闭缓冲液：取 5 g 脱脂牛奶粉或牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 置于烧杯中，加入 100 mL TBST Buffer，充分搅拌均匀。

抗体稀释液：1 μ L 抗体加入到 5 mL TBST Buffer 中混匀，即为抗体稀释液。

3.1.7 质粒构建相关试剂

高保真 DNA 聚合酶（Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase）购自诺唯赞公司。

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司。

无内毒素质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 公司。

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自康为世纪公司。

50×Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液（Tris Acetate-EDTA buffer, TAE）、琼脂糖粉末、核酸染色剂 NA-Red、无缝克隆试剂盒购自碧云天公司。

1%琼脂糖凝胶：将 1 g 琼脂糖粉末与 100 mL 1×TAE 缓冲液混匀，于微波炉内加热直至琼脂糖完全溶解。待溶液温度降至 60 °C 左右时加入 50 μL NA-Red，混匀后将溶液倒入凝胶模具中，待溶液变为结实的固态时即可用于电泳。

3.1.8 定量 PCR 相关试剂

探针法荧光定量 PCR 反应预混液（Hieff Unicon® qPCR TaqMan Probe Master Mix）、染料法荧光定量 PCR 反应预混液（Hieff UNICON qPCR SYBR Green Master Mix）购自翌圣生物。

反转录预混液（PrimeScript™ RT Master Mix，产品号：RR036A）购自 Takara 公司。

总 RNA 提取试剂盒购自 BioFlux 公司。

3.1.9 细胞转染试剂

Lipo8000™转染试剂购自碧云天公司。RFect 小核酸转染试剂购自百代生物。

3.1.10 其它试剂

Cell Counting Kit-8（CCK-8）试剂盒、活性氧检测试剂盒、DAPI 染色液、免疫沉淀试剂盒、快速银染试剂盒购自碧云天公司。

双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自翌圣生物。

PBS 缓冲液：取 8.00 g NaCl、0.20 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄ 溶于 800 mL 纯水中，使用浓盐酸将溶液 pH 调至 7.4，最后使用纯水定容至 1 L。

免疫荧光封闭液：取 10 g BSA 和 1 mL 吐温 20 溶解于 800 mL PBS 溶液中，接着使用 PBS 定容至 1 L。

SDS-PAGE 凝胶银染色固定液：取 50 mL 乙醇、10 mL 乙酸和 40 mL 纯水混匀。

UA 缓冲液：取 480 g 尿素、18.17 g Tris 溶于 800 mL 纯水中，将溶液 pH 调至 8.5，最后使用纯水定容至 1 L。

3.1.11 试验动物

未吃初乳的初生仔猪（PEDV 抗原和抗体皆为阴性）购自湖北某规模化种猪场，为大白猪和长白猪二元杂交品种。

3.2 试验仪器

试验所用仪器见表 3-2

表 3-2 仪器信息

Table 3-2 Instrument information

仪器名称	厂家与型号
细胞二氧化碳培养箱	三洋
倒置荧光显微镜	尼康 Ti-U
高速冷冻离心机	Eppendorf 5415R、5804R
SDS-PAGE 电泳槽和湿法转膜槽	Bio-Red
多功能酶标仪	PerkinElmer VICTOR Nivo™
荧光定量 PCR 仪	Applied Biosystems
全自动化学发光分析系统	天能 5200
流式细胞仪	BECKMAN COULTER
生化培养箱	上海智城
恒温培养振荡器	上海智城
涡旋振荡器	翌圣
高压蒸汽灭菌锅	上海申安
点扫描激光共聚焦显微镜	尼康 AX
质谱仪	赛默飞 Orbitrap Fusion Lumos
色谱仪	赛默飞 EASY-nLCTM 1200
超声波系统	Biosafe150-96
真空离心浓缩仪	Eppendorf Concentrater plus
可见紫外分光光度计	Eppendorf BioSpectrometer

3.3 分析软件

试验所用分析软件见表 3-3

表 3-3 分析软件

Table 3-3 Softwares for data analysis

软件名称	功能
Applied Biosystems ViiA7	定量 PCR 分析软件
GraphPad Prism8	作图及显著性分析
SnapGene	质粒设计
CytExpert	流式细胞术运行及分析软件
MEGA7	序列同源性分析和进化树构建
Promoter 2.0	启动子预测
SWISS-MODEL	蛋白质结构模拟
MaxQuant 2.0.1.0	质谱数据比对和分析
PyMOL	蛋白质结构分析
DAVID	GO 注释和信号通路聚类分析
Image-Pro Plus	图片荧光强度和灰度值分析

3.4 试验方法

3.4.1 细胞复苏、传代与冻存

3.4.1.1 细胞复苏

- (1) 将细胞培养液置于 37 °C 温箱中预热。
- (2) 从液氮罐中取出细胞，迅速放入 37 °C 温水中解冻。
- (3) 解冻完全后在超净工作台内将细胞转移至无菌的 1.5 mL EP 管中，1000 r/min 离心 10 min。
- (4) 在超净工作台内弃去上层清液，使用预热过的细胞培养液重悬细胞，随后将细胞转移到 T25 细胞培养瓶中，并将培养液体积补足到 5 mL。
- (5) 将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

3.4.1.2 细胞传代培养

观察细胞状态，细胞铺满单层时需进行传代培养。

- (1) 预热试剂：将细胞培养液、胰蛋白酶消化液、PBS 置于 37 °C 温箱中预热。
- (2) 清洗细胞：在超净工作台中弃掉细胞瓶内培养液，加入适量 PBS，匀速水平摇晃细胞瓶 20 次。
- (3) 湿消化：弃掉 PBS，加入适量胰蛋白酶消化液，水平摇晃细胞瓶。摇晃

力度和湿消化时间视细胞种类而定，Vero 和 LLC-PK1 细胞需摇晃约 1 min，HEK293t 细胞只能轻轻摇晃 5-10 次。

(4) 干消化：弃掉细胞瓶内 90% 的消化液，将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 条件下干消化。干消化时间视细胞种类而定，Vero 和 LLC-PK1 细胞可消化 4 min 左右，HEK293t 细胞只能消化 1-2 min。

(5) 分散细胞：消化完成后向细胞瓶内加入 5-10 mL 细胞生长液，使用无菌的 15 mL 吸管吹打细胞，直至细胞分散。

(6) 分装：将细胞悬液分装到 2-3 个细胞瓶中，补足每个细胞瓶中的细胞生长液。T25 细胞瓶补足至 5 mL，T75 细胞瓶补足至 15 mL。

(7) 培养：将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

3.4.1.3 细胞冻存

观察细胞状态，细胞铺满单层时即可进行冻存。

(1) 将胎牛血清置于 37 °C 温箱内预热。

(2) 按照细胞传代方法消化和分散细胞。

(2) 将细胞悬液收集到 15 或 50 mL 离心管中，1000 r/min 离心 10 min。

(3) 弃掉离心管中液体，使用适量体积的胎牛血清重悬细胞，接着加入 1/9 体积的 DMSO 混匀并将细胞悬液分装到细胞冻存管中。

(4) 将细胞冻存管放入细胞冻存盒内，于 -80 °C 超低温冰箱中冷冻 24 h。

(5) 将细胞冻存管转移到液氮罐中，取出一管细胞复苏以判断冻存效果。

3.4.2 病毒培养

将细胞接种到细胞瓶或细胞板中，待细胞长到 100% 融合度时即可接种病毒。

(1) 在超净工作台中使用无菌的 PBS 将细胞洗 3 遍。

(2) 弃掉 PBS，向细胞瓶或细胞板中加入 0.1 MOI 的 PEDV，用病毒培养液补足液体体积，置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2 h。

(3) 弃掉细胞瓶或细胞板中培养液，加入新鲜的病毒培养液，继续置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

(4) 观察细胞形态，PEDV 感染会造成细胞拉丝和形成合胞体。待 80-90% 的细胞产生这些变化时将细胞瓶或细胞板放置于 -80 °C 超低温冰箱中冷冻，冷冻完全后置于 4 °C 冰箱中化冻，冻融过程重复 2 次。

(5) 将化冻的病毒液分装至无菌的 1.5 mL EP 管中，置于 -80 °C 超低温冰箱中保存。

3.4.3 测定药物的细胞毒性

使用碧云天公司 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒测定细胞活性, 并依此评价药物的细胞毒性。

(1) 细胞接种与处理: 将细胞接种于 96 孔细胞培养板, 待细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下生长到 100% 融合度时使用待测药物处理细胞 48 h。

(2) 洗涤: 移除孔内液体, 然后每个孔加入 100 μL PBS, 轻微摇晃后弃掉 PBS, 此步骤重复三次。

(3) 孵育 CCK-8: 在避光条件下向每个孔中加入 110 μL 含 9.09% (V/V) CCK-8 溶液的细胞生长液, 置于 37°C、5% CO₂ 条件下避光培养 2 h。

(4) 结果判定: 使用多功能酶标仪测定每孔溶液的 OD450 数值。细胞活力计算公式: 细胞活力 = $(A_s - A_b) \div (A_c - A_b) \times 100\%$ 。A_s: 实验孔 OD450 值; A_b: 无细胞孔 OD450 值; A_c: 细胞对照孔 OD450 值。

3.4.4 病毒半数组织感染量测定

(1) 细胞接种: 将细胞接种于 96 孔细胞培养板, 待细胞在 37°C、5% CO₂ 条件下生长到 100% 融合度时用 PBS 洗 3 遍备用。

(2) 样品处理: 将待测样品反复冻融 3 次, 4 °C、12000 r/min 离心 5 min 后取上清液备用。

(3) 梯度稀释: 使用病毒培养液将待测上清液 10 倍梯度稀释, 共稀释成 8 个梯度。

(4) 样品孵育: 向细胞孔中加入 100 μL 稀释液, 每个稀释度设置 8 个重复孔, 接着将细胞继续置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 72 h。

(5) 结果判定: 使用 Reed-Muench 法计算病毒半数组织感染量 (median tissue culture infective dose, TCID₅₀) (Reed and Muench 1938)。

3.4.5 免疫荧光

(1) 固定: 细胞板中待检细胞用 PBS 洗 3 遍, 然后在室温条件下用 4% 多聚甲醛固定 20 min。

(2) 透化: 固定过的细胞用 PBS 洗 3 遍, 接着在室温条件下用含 0.1% Triton X 的 PBS 溶液透化 10 min。

(3) 封闭: 透化过的细胞用 PBS 清洗 3 遍, 加入免疫荧光封闭液, 室温条件下封闭 2 h。

(4) 孵育一抗: 将封闭液替换为含 0.1% (V/V) 一抗的封闭液, 于 37 °C 温箱内孵育 1 h。

(5) 孵育二抗: 用 PBS 将细胞洗 3 遍, 接着向细胞板中加入含 0.1% (V/V)

荧光二抗的封闭液，于 37 °C 温箱内孵育 0.5 h。

(6) 细胞核染色：吸除二抗稀释液，在避光条件下加入 DAPI 染色液，室温条件下避光孵育 5 min。染色完毕后在避光条件下用 PBS 将细胞洗 3 遍。

(7) 拍摄图片：使用倒置荧光显微镜或点扫描激光共聚焦显微镜观察结果并拍摄图片。

3.4.6 RNA 提取

使用 BioFlux 公司总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。

(1) 样品准备

提取病毒基因组 RNA：细胞板中细胞和培养液一同反复冻融 3 次后将溶液转移到 2 mL EP 管中。4 °C、12000 r/min 离心 5 min 后取 100 μ L 上清液与 100 μ L 裂解液 R1 混合，再使用涡旋振荡器振荡 30 s，随后室温静置 1 min。静置结束后加入 600 μ L 裂解液 R2，充分颠倒混匀，随后室温静置 5 min。

提取细胞总 RNA：移除细胞板内培养液，再向细胞板每个孔中加入 200 μ L 裂解液 R1 和 1200 μ L 裂解液 R2，充分吹打混匀，然后室温静置 5 min。

提取组织 RNA：将组织块置于液氮中研磨成粉末，取 30 mg 组织粉末加入 1.5 mL EP 管中，接着向 EP 管中加入 600 μ L 裂解液 R2，充分颠倒混匀，随后室温静置 5 min。

(2) 过柱纯化

经过裂解和静置后的样品转移到纯化柱中，12000 r/min 离心 30 s。

(3) 洗涤

弃去接液管中液体，向纯化柱中加入 600 μ L 洗涤液，12000 r/min 离心 30 s。接着弃去接液管中液体，再洗涤 1 次。最后弃去接液管中液体，12000 r/min 空柱离心 1 min。

(4) 收集 RNA

将纯化柱转移到新的 1.5 mL EP 管中。向纯化柱中部滴加 50 μ L DEPC 处理水，室温静置 5 min 后 12000 r/min 离心 2 min，EP 管中液体即为 RNA 溶液。

3.4.7 RNA 反转录

将 RNA 稀释到 62.5 ng/ μ L，使用 Takara 反转录预混液 (PrimeScript™ RT Master Mix) 合成 cDNA，反应体系 (10 μ L) 见表 3-4，反应条件见表 3-5，反应结束后向 PCR 管中加入 190 μ L DEPC 处理水，混匀后置于 -80 °C 保存。

表 3-4 RNA 反转录反应体系

Table 3-4 RNA reverse transcription reaction system

试剂	体系
5×PrimeScript RT Master Mix	2 μL
RNA	8 μL

表 3-5 RNA 反转录反应条件

Table 3-5 RNA reverse transcription reaction conditions

反应步骤	反应温度 (°C)	时间
反转录	37	15 min
灭活反转录酶	85	8 μL
降温保存	4	-

3.4.8 绝对定量 PCR

根据翌圣公司定量 PCR 预混液 Hieff Unicon® qPCR TaqMan Probe Master Mix 说明书进行操作, 反应体系 (20 μL) 见表 3-6。将反应体系加到定量 PCR 板中, 于定量 PCR 仪中反应, 反应条件为先 50 °C 预热 2 min, 然后 95 °C 预变性 10 min, 接着进入 40 次循环反应 (95 °C 变性 15 sec, 56 °C 退火 30 sec, 72 °C 延伸 31 sec), 在延伸时采集荧光信号。PEDV 绝对定量 PCR 所需引物和探针信息见表 3-7。标准质粒以 10 倍倍比稀释成 8 个梯度, 最高浓度为 1×10^{10} copies/μL。使用 Applied Biosystems ViiA7 系统进行定量 PCR 测试, 试验类型设置为 Standard Curve, 检测试剂设置为 TaqMan, 程序运行完毕后自动生成标准曲线和样品中特定 cDNA 的拷贝数。

表 3-6 绝对定量 PCR 反应体系

Table 3-6 The reaction system of absolute quantitative PCR

试剂	体系 (μL)
Hieff Unicon® qPCR TaqMan Probe Master Mix	10
上游引物 (10 μM)	0.4
下游引物 (10 μM)	0.4
探针 (10 μM)	0.2
50×Low Rox	0.4
cDNA	8.6

表 3-7 针对 PEDV M 基因的定量 PCR 引物和探针

Table 3-7 Quantitative PCR primers and a probe designed for PEDV M gene

名称	序列 (5'-3')
qPCR-PEDV-M-F	CGTACAGGTAAGTCAATTAC
qPCR-PEDV-M-R	GATGAAGCATTGACTGAA
probe-PEDV-M	FAM-TTCGTCACAGTCGCCAAGG-TAMRA

3.4.9 相对定量 PCR

根据翌圣公司定量 PCR 预混液 Hieff UNICON qPCR SYBR Green Master Mix 说明书进行操作, 反应体系 (20 μ L) 见表 3-8。将反应体系加到定量 PCR 板中, 于定量 PCR 仪中反应, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 接着进入 40 次循环反应 (95 $^{\circ}$ C 变性 10 sec, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 sec), 在延伸时采集荧光信号。最后按照仪器默认设置测定溶解曲线。使用 Applied Biosystems ViiA7 系统进行定量 PCR 测试, 试验类型设置为 Comparative Ct, 检测试剂设置为 SYBR Green。

检测 Vero 细胞中内质网应激相关基因 mRNA 水平时所用内参基因为 β 2-微球蛋白 (β 2-microglobulin, *B2M*) 基因; 检测 HEK293t 细胞和 LLC-PK1 细胞中 *GRP78* mRNA 水平时所用内参基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)。试验所用引物见表 3-9。

表 3-8 相对定量 PCR 反应体系

Table 3-8 The reaction system of relative quantitative PCR

试剂	体系 (μ L)
Hieff UNICON qPCR SYBR Green Master Mix	10
上游引物 (10 μ M)	0.4
下游引物 (10 μ M)	0.4
cDNA	9.2

表 3-9 相对定量 PCR 所用引物

Table 3-9 Primers for relative quantitative PCR

名称	序列 (5'-3')
Vero- <i>GRP78</i> -F	TGCTTGATGTGTGTCCCCTT
Vero- <i>GRP78</i> -R	TGTCAGGGGTCGTTACCTT
Vero- <i>ATF4</i> -F	CCAACAACGGCAAGGAGGATG
Vero- <i>ATF4</i> -R	GGGCATCAAAGTCGAACCTC
Vero- <i>CHOP</i> -F	GGAACCTGAGGAGAGAGTGTTC
Vero- <i>CHOP</i> -R	CTGCCATCTCTGCAGTTGGA

续表 3-9 相对定量 PCR 所用引物

Continued Table 3-9 Primers for relative quantitative PCR	
名称	序列 (5'-3')
Vero- <i>GADD34</i> -F	GTCAGGACCTGTGATCGCTT
Vero- <i>GADD34</i> -R	CCATGTGTCTGGGCGGTG
Vero- <i>B2M</i> -F	GCGGAATATAAGTGGAGGCGT
Vero- <i>B2M</i> -R	ATCTTTGGAGCACGCTGGATA
HEK293t- <i>GRP78</i> -F	GAACGTCTGATTGGCGATGC
HEK293t- <i>GRP78</i> -R	ACCACCTTGAACGGCAAGAA
HEK293t- <i>GAPDH</i> -F	CACCATCTTCCAGGAGCGA
HEK293t- <i>GAPDH</i> -R	ATGACGAACATGGGGGCATC
LLC-PK1- <i>GRP78</i> -F	TTGTGATCGGTTTGCTTGCG
LLC-PK1- <i>GRP78</i> -R	CGTTCTCCCCTTTCCACAA
LLC-PK1- <i>GAPDH</i> -F	GTGAACGGGTGAGTTAGGGG
LLC-PK1- <i>GAPDH</i> -R	CGATGCGGCCAAATCTTGAG

3.4.10 蛋白免疫印迹

蛋白免疫印迹即 Western Blot。

(1) 样品准备

用 PBS 将 6 孔细胞培养板中待测细胞洗 3 遍，每孔加入 200 μ L RIPA 强裂解液，置于冰上裂解 1 min。用细胞刮刀将细胞收集到 1.5 mL EP 管中，于冰上使用 1 mL 注射器将样品吹打 20 次。4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 5 min，取上清液到新的 1.5 mL EP 管中。测量上清液体积，向 EP 管中加入 1/4 上清液体积的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$)，混匀后 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min，接着置于 4 $^{\circ}$ C 冷却 5 min，最后放入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存。

(2) SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳时先保持恒定电压 80 V，待蛋白 marker 完全分开后将电压调至 120 V，目的分子量附近的蛋白 marker 充分展开后可停止电泳。

(3) 膜转印

通过湿转法将 SDS-PAGE 胶上的蛋白质转印到 PVDF 膜上，转印条件为恒定电流 300 mA，按 1 kDa/min 的速度设定转印时间。转印时将转印槽置于冰水浴中。

(4) 封闭

转印结束将膜置于膜封闭缓冲液中，室温条件下在摇床（转速 75 r/min）上封闭 2 h。

(5) 孵育一抗

用 TBST Buffer 将封闭好的膜清洗 3 次, 随后将膜置于一抗稀释液中, 室温条件下在摇床 (转速 75 r/min) 上孵育 2 h。

(6) 孵育二抗

用 TBST Buffer 将孵育过一抗的膜清洗 3 次, 接着将膜置于偶联 HRP 的二抗的稀释液中, 在摇床 (转速 75 r/min) 上室温孵育 2 h, 孵育结束后用 TBST Buffer 将膜清洗 3 次。

(7) 显色与图像采集

用 Omni-ECL™ 超灵敏化学发光检测试剂盒 (雅酶) 显影。将 FemtoLight ECL Substrate 和 Oxidant 等体积混匀即为显影工作液。将膜置于工作液中孵育 2 min, 随后使用全自动化学发光分析系统 (天能) 采集影像。

3.4.11 蛋白质真核表达载体构建

以 pCAGGS-Flag-MCS 为载体构建 GRP78、野生型 eIF2 α (Wt eIF2 α)、磷酸化位点突变 eIF2 α (S52A eIF2 α)、ATF4、CHOP、ATF6 氨基端功能域 (ATF6-NTD) 和 PEDV 蛋白的真核表达质粒。质粒构建步骤依次为引物设计、片段扩增、PCR 产物回收、酶切与连接、转化感受态细胞和无内毒素质粒提取。

3.4.11.1 引物设计

依据 NCBI 数据库中相关基因的核酸序列设计引物, 并在引物 5' 端添加保护性碱基和限制性核酸内切酶切割位点, 引物信息见表 3-10。

表 3-10 真核表达质粒构建引物

Table 3-10 Primers related to eukaryotic expression vector construction

引物名称	序列 (5'-3')	酶切位点
ATF6-NTD-F	TTCGAGCTCATGGGGAGTCGGGAG	<i>SacI</i>
ATF6-NTD-R	CGAGCTAGCCTGTTCCAGCATGCTCATAGG	<i>NheI</i>
CHOP-F	ACGGAATTCATGGAGCTCGTTCCAGC	<i>EcoRI</i>
CHOP-F	AGCAGATCTTGCTTGGTGCAGATTCACCATT	<i>BglII</i>
ATF4-F	ACGGAATTCATGACCGAAATGAGCT	<i>EcoRI</i>
ATF4-R	AGCAGATCTGGGGACCCTTTTCTTC	<i>BglII</i>
eIF2 α -F	GAGGAATTCATGCCGGGTCTAAGTTGT	<i>EcoRI</i>
eIF2 α -R	AGCAGATCTATCTTCAGCTTTGGCTTCCATT	<i>BglII</i>
GRP78-F	GATGGTACCATGAAGCTCTCCCTGGTGG	<i>KpnI</i>
GRP78-R	TGCCTCGAGCTTCAACTCATCTTTTCTGCTGTATCC	<i>XhoI</i>
nsp1-F	GCTGAATTCATGGCTAGCAACCAAGTCAC	<i>EcoRI</i>

续 表 3-10 真核表达质粒构建引物

Continued Table 3-10 Primers related to eukaryotic expression vector construction

引物名称	序列 (5'-3')	酶切位点
nsp1-R	TGCCTCGAGACCACCACGACGACCAAAAG	<i>Xho</i> 1
nsp4-F	GCTGAATTCGCAGGTCTTCCTAGTTTTTCA	<i>Eco</i> R1
nsp4-R	TGCCTCGAGCTGTAGAGTTGAATTGTAAC	<i>Xho</i> 1
nsp5-F	ATTGAATTCGCTGGCTTGCGTAAGATGGCA	<i>Eco</i> R1
nsp5-R	TGCCTCGAGCTGAAGATTAACGCCATACAT	<i>Xho</i> 1
nsp6-F	ATTGAATTCAGTGGTTATGTTTCACGCGCC	<i>Eco</i> R1
nsp6-R	TGCCTCGAGCTGAACGGAAGAAATCTTAAT	<i>Xho</i> 1
nsp7-F	GCTGAATTCTCTAAACTGACTGATATTAAG	<i>Eco</i> R1
nsp7-R	TGCCTCGAGCTGCAACATACTATTGTCA	<i>Xho</i> 1
nsp8-F	GCTGAATTCAGTGTTGCATCTACTTAT	<i>Eco</i> R1
nsp8-R	TGCCTCGAGCTGGAGCTTGACAATACGC	<i>Xho</i> 1
nsp9-F	GCTGAATTCAATAATGAAATTATTCCTGGTAAGC	<i>Eco</i> R1
nsp9-R	TGCCTCGAGCTGCAAGCGTACAGTGG	<i>Xho</i> 1
nsp10-F	GCTGAATTCGCTGGTAAACAAACAGAACAG	<i>Eco</i> R1
nsp10-R	TGCCTCGAGTTGCATAATGGATCTGTCACAA	<i>Xho</i> 1
nsp12-F	GCTGAATTCCGAGTACGGGGCTCTAG	<i>Eco</i> R1
nsp12-R	TGCCTCGAGTTGCAAACTGCAGATTTCT	<i>Xho</i> 1
nsp13-F	CGGAATTCCTGCAGGGCTTTGTGTTGTTTG	<i>Eco</i> R1
nsp13-R	CCGCTCGAGCTGGCTGTTATAAGGAGAAATAA	<i>Xho</i> 1
nsp14-F	GCTGAATTCAATTATGTTGCCAGCCGTATG	<i>Eco</i> R1
nsp14-R	TGCCTCGAGTTGCAAATTGTTACTAAATGTCTGC	<i>Xho</i> 1
nsp15-F	GCTGAATTCGGCCTTGAGAACATTGCTTT	<i>Eco</i> R1
nsp15-R	TGCCTCGAGCTGAAGTTGCGGATAAAAT	<i>Xho</i> 1
nsp16-F	ATTGAATTCGCCAGTGAATGGAAGTGTGGT	<i>Eco</i> R1
nsp16-R	TGCCTCGAGTCATTTGTTTACGTTGACCAA	<i>Xho</i> 1
S-F	GCTGAATTCATGAAGTCTTTAACCTACTTCT	<i>Eco</i> R1
S-R	TGCCTCGAGCTGCACGTGGACCTTTTCA	<i>Xho</i> 1
ORF3-F	GCGGAATTCATGTTTCTTGGAATTTTCA	<i>Eco</i> R1
ORF3-R	ATACTCGAGTCACAATGGATTTGCC	<i>Xho</i> 1
E-F	GCTGAATTCATGCTACAATTAGTGAATGAT	<i>Eco</i> R1
E-R	TGCCTCGAGTACGTCAATAACAGTACTGG	<i>Xho</i> 1

续 表 3-10 真核表达质粒构建引物

Continued Table 3-10 Primers related to eukaryotic expression vector construction		
引物名称	序列 (5'-3')	酶切位点
M-F	GCTGAATTCATGTCTAACGGTCTATTCCC	<i>EcoR</i> I
M-R	TGCCTCGAGTTAGACTAAATGAAGCACTTT	<i>Xho</i> I
N-F	GCTGAATTCATGGCTTCTGTCAGTTTTC	<i>EcoR</i> I
N-R	TGCCTCGAGATTTCTGTGTCGAAGATC	<i>Xho</i> I

3.4.11.2 片段扩增

使用诺唯赞高保真 PCR 试剂盒 (Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase) 扩增片段, 扩增体系 (50 μ L) 见表 3-11。将上述体系加到 PCR 管中, 于 PCR 仪内反应, 反应条件为: 先 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 接着进入 35 次循环反应 (95 $^{\circ}$ C 变性 15 sec, 根据引物退火温度退火 15 sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 (按每 33 kb/sec 的速度设置延伸时长)), 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min, 最后将温度降低至 4 $^{\circ}$ C。此外, 部分片段由北京擎科公司直接合成。

表 3-11 诺唯赞高保真 PCR 试剂盒的反应体系

Table 3-11 Reaction system of Vazyme high-fidelity PCR kit	
试剂	体系 (μ L)
纯水	17
2 $\times$ Phanta Max Buffer	25
dNTP Mix	1
上游引物 (10 μ mol/L)	2
下游引物 (10 μ mol/L)	2
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1
模板 DNA	2

3.4.11.3 PCR 产物回收

使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (康为世纪) 回收目的大小的片段

(1) 通过琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物中不同大小的 DNA 片段。

(2) 将目的大小的片段从琼脂糖凝胶中切割下来, 放入 2.0 mL EP 管中并称重。根据胶块重量加入 1 倍体积 Buffer PG (100 mg 凝胶加 100 μ L Buffer PG), 50 $^{\circ}$ C 孵育 10-15 min, 孵育期间每隔 2 min 温和上下颠倒离心管 1 次, 胶块完全融化即可停止孵育。

(3) 活化吸附柱, 向吸附柱中加入 200 μ L Buffer PS, 12000 r/min 离心 1 min, 离心结束弃掉收集管中液体。

- (4) 将混合有目的片段的溶液转移到吸附柱中，室温静置 2 min，接着 12000 r/min 离心 1 min，离心结束弃掉收集管中液体。
- (5) 向吸附柱中加入 450 μ L Buffer PW，室温静置 5 min，接着 12000 r/min 离心 1 min，离心结束弃掉收集管中液体，然后再重复洗涤 1 次。
- (6) 洗涤结束后 12000 r/min 空柱离心 1 min。
- (7) 将吸附柱转移到一个新的 1.5 mL EP 管中，向吸附柱中央滴加 50 μ L 纯水，室温静置 2 min，最后 12000 r/min 离心 1 min，此时 EP 管内为目的片段的水溶液，测定其 DNA 浓度后置于 -20°C 保存。

3.4.11.4 片段酶切与连接

使用限制性核酸内切酶（Takara）将回收到的目的片段和载体质粒切割成含有特定粘性末端的线性化 DNA。限制性核酸内切酶酶切反应的体系（50 μ L）见表 3-12，反应条件为 37°C 作用 2 h，反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳并回收目的片段。

表 3-12 限制性核酸内切酶酶切反应的体系

Table 3-12 The reaction system of restriction endonuclease digestion	
试剂	体系
10 $\times$ 酶切缓冲液	5 μ L
限制性核酸内切酶 1	1 μ L
限制性核酸内切酶 2	1 μ L
DNA	1 μ g
纯水	补齐至 50 μ L

使用 T4 DNA 连接酶（Takara）将具有对应粘性末端的目的片段和线性化载体连接在一起，连接体系见表 3-13，连接的反应条件为 16°C 作用 30 min。

表 3-13 T4 连接酶连接反应的体系

Table 3-13 The reaction system of T4 DNA ligase-based ligation	
试剂	体系（ μ L）
T4 连接酶	0.5
反应缓冲液	1
目的片段	6.5
载体片段	2

3.4.11.5 转化感受态细胞

- 连接结束后将质粒转化到大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中。
- (1) 解冻感受态细胞：首先将 -80°C 保存的感受态细胞（保存于 1.5 mL EP 管中）放置于 4°C 解冻。

(2) 冰浴：接着将连接产物和感受态细胞轻轻混合，置于冰水浴中孵育 30 min。

(3) 热激：冰水浴结束后置于 42 °C 水中热激 90 sec。

(4) 活化：热激结束立即将感受态细胞置于冰水浴中降温，3 min 后加入 500 μ L TSB 培养基，接着置于恒温培养振荡器（37 °C、180 r/min）内活化 45 min。

(5) 涂板：3000 r/min 离心 10 min，弃掉上清液，用 100 μ L TSB 培养基重悬感受态细胞，将感受态细胞悬液均匀地涂布到含有与载体抗性基因相应抗生素的 TSA 培养皿中，置于生化培养箱中 37 °C 培养 12-18 h。

(6) 挑取单菌落：挑取培养皿中的单菌落到 2 mL EP 管中，向 EP 管中加入 1 mL 含有与载体抗性基因相应抗生素的 TSB 培养基，置于恒温培养振荡器（37 °C、180 r/min）内培养 12-18 h。

(7) PCR 鉴定：以菌液为模板，通过片段扩增的引物进行 PCR 鉴定。

(8) 测序：PCR 鉴定为阳性的菌液送至北京擎科公司测序，通过一代测序鉴定大肠杆菌是否携带正确重组载体。

3.4.11.6 无内毒素质粒提取

使用 TIANGEN 无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒。

(1) 细菌扩大培养：将携带正确重组载体的大肠杆菌转移到细菌瓶（30 mL 规格）中，加入 20 mL 含有与载体抗性基因相应抗生素的 TSB 培养基，置于恒温培养振荡器（37 °C、180 r/min）内培养 18-24 h，待菌液 OD₆₀₀ 值达到 3.0 左右时将菌液转移到离心管中，3000 r/min 离心 10 min 收集细菌用于无内毒素质粒提取。

(2) 细菌裂解：离心结束后弃去上清液，向留有细菌沉淀的离心管中加入 8 mL 溶液 P1，使用涡旋振荡器彻底悬浮细菌。接着向离心管中加入 8 mL 溶液 P2，温和上下翻转离心管 6-8 次后室温静置 5 min。然后向离心管中加入 8 mL 溶液 P4 并立即温和上下翻转离心管 6-8 次，待出现白色分散絮状沉淀后于室温静置 10 min。

(3) 去除内毒素：8000 r/min 离心 10 min，用过滤器 CS1 过滤上层清液并用 50 mL 离心管收集滤液。向离心管中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

(4) 质粒纯化：向吸附柱 CP6 中加入 2.5 mL 的平衡液 BL，8000 r/min 离心 2 min 后弃去收集管中液体。将（3）中混合了异丙醇的滤液转移到吸附柱 CP6 中，8000 r/min 离心 2 min 后弃去收集管中液体。

(5) 洗涤纯化柱：向吸附柱 CP6 中加入 10 mL 漂洗液 PW，8000 r/min 离心 2 min 后弃去收集管中液体，然后再重复 1 次洗涤步骤。洗涤 2 次后向吸附柱 CP6 中加入 3 mL 无水乙醇，8000 r/min 离心 2 min 后弃去收集管中液体，接着空柱 8000 r/min 离心 5 min。

(6) 质粒洗脱：将吸附柱 CP6 转移到干净的 50 mL 离心管中，向吸附柱中央滴加 1 mL 纯水，室温静置 5 min，接着 8000 r/min 离心 2 min，此时离心管中液体即为无内毒素的质粒溶液。

3.4.12 启动子重组载体构建

分别使用人和猪 *GRP78* 的启动子替换 psiCheckII 载体萤火虫荧光素酶编码序列上游的 HSV TK 启动子和 pCAGGS-mRFP 载体 mRFP 编码序列上游的 chicken β -actin 启动子。质粒构建的步骤为：

(1) 在载体待替换启动子的下游和上游分别设计上游和下游引物，通过 PCR 扩增剔除了待替换启动子的线性化载体片段；

(2) 使用 Promoter 2.0 预测人和猪 *GRP78* 启动子并通过 PCR 扩增相应片段，启动子片段扩增所用上游引物和下游引物 5'端前 10 个碱基应分别与载体扩增所用下游引物和上游引物 5'端前 10 个碱基互补配对；

(3) PCR 产物回收；

(4) 使用碧云天无缝克隆试剂盒将启动子片段和线性化载体连接。无缝克隆反应体系为 (20 μ L)：待插入片段 100 ng、线性化载体 100 ng、2 $\times$ Seamless Cloning Mix 10 μ L，最后加入纯水将体系补足到 20 μ L。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 作用 1 h；

(5) 转化感受态细胞；

(6) 无内毒素质粒提取。

片段扩增、PCR 产物回收、转化感受态细胞、无内毒素质粒提取的详细操作见 3.4.11。步骤 (1)、(2) 所用引物信息见表 3-14。

表 3-14 *GRP78* 启动子重组载体构建所用引物

Table 3-14 Primers used in the construction of <i>GRP78</i> promoter recombinant vector	
引物名称	序列 (5'-3')
psiCheckII-F	AAGCTTGGCATTCCGGTACTG
psiCheckII-R	TAGATCCTCACACAAAAACCAACACACA
pCAGGS-mRFP-F	GGAGTCGTTGCGCGCTGC
pCAGGS-mRFP-R	CCATGGTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGT
psiCheckII 人源 <i>GRP78</i>	TGAGGATCTACCAGCCTGGGCGTGACAGAG
启动子插入-F	
psiCheckII 人源 <i>GRP78</i>	TGCCAAGCTTGACCTACCGTCGCCTACTC
启动子插入-R	
psiCheckII 猪源 <i>GRP78</i>	TGAGGATCTACCGTATGTGTTTTGGTACCA
启动子插入-F	

续表 3-14 *GRP78* 启动子重组载体构建所用引物

Continued Table 3-14 Primers used in the construction of <i>GRP78</i> promoter recombinant vector	
引物名称	序列 (5'-3')
psiCheckII猪源 <i>GRP78</i> 启动子插入-R	TGCCAAGCTTGCCGCTGATTGG
pCAGGS-mRFP 人源 <i>GRP78</i> 启动子插入-F	ATTACCATGGCCAGCCTGGGCGTGA
pCAGGS-mRFP 人源 <i>GRP78</i> 启动子插入-R	CAACGACTCCGACCTCACCGTCGCCTACT
pCAGGS-mRFP 猪源 <i>GRP78</i> 启动子插入-F	ATTACCATGGCCGTATGTGTTTTGGTACCA
pCAGGS-mRFP 猪源 <i>GRP78</i> 启动子插入-R	CAACGACTCCGCCGCTGATTGGCTAG

3.4.13 质粒转染

使用碧云天公司 Lipo8000 转染质粒。

(1) 细胞接种与处理：将细胞接种到 12 孔细胞培养板中，于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养至 80 % 融合度后将培养基换为新鲜的细胞生长液。

(2) 转染试剂的配制：取 50 μL Opti-MEM 培养基和含 1 μg 质粒的质粒溶液混匀于 1.5 mL EP 管中，再向 EP 管中加入 1.6 μL Lipo8000 转染试剂，轻轻混匀。

(3) 转染：将转染试剂缓慢滴入细胞培养板，每孔滴加 50 μL，轻轻晃动培养板混匀，接着继续将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养，转染后 36- 48 h 通过 Western Blot 检测蛋白质的表达。

3.4.14 siRNA 转染

使用百代生物 Rfect 转染试剂转染 siRNA。

(1) 细胞接种与处理：将细胞接种到 24 孔细胞培养板中，于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养至 50 % 融合度后将培养基替换为新鲜的细胞生长液。

(2) 转染试剂的配制：取 6 pmol siRNA 用 50 μL Opti-MEM 稀释。另取 2 μL Rfect 转染试剂用 50 μL Opti-MEM 稀释，轻轻混匀，于室温静置 5 min。将稀释好的 siRNA 和转染试剂轻轻混合，室温孵育 20 min。

(3) 转染：取 100 μL 转染试剂慢慢滴入细胞培养板的孔内，轻轻晃动培养板混匀。继续将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 条件培养，转染后 24- 36 h siRNA 会显著减少靶基因 mRNA 的量，此时可通过定量 PCR 和 Western Blot 评估 siRNA 干扰的效果。

针对非洲绿猴 *GRP78* 的 siRNA 由广州锐博公司设计与合成（表 3-15），此公司对照 siRNA 序列不对外公布。

表 3-15 针对非洲绿猴 *GRP78* siRNA 的序列

Table 3-15 Sequence of siRNA targeting african green monkey *GRP78*

名称	序列 (5'-3')
siRNA- <i>GRP78</i> -1	CCACCAAGATGCTGACATT
siRNA- <i>GRP78</i> -2	GCGCATTGATACTAGAAAT
siRNA- <i>GRP78</i> -3	GAAGAGCTCAACATGGATC

3.4.15 双萤光素酶报告基因检测

使用翌圣双萤光素酶报告基因检测试剂盒检测双萤光素酶报告基因。

（1）细胞处理：将细胞接种到 48 孔板细胞培养板中，待细胞长到 80% 融合度时转染以 psiCheck II 为骨架的质粒。

（2）样品收集：用 PBS 将待检细胞洗两遍，接着每孔加入 150 μ L 细胞裂解液并置于冰上孵育 5 min。

（3）工作液配制：使用相应缓冲液将荧光虫萤光素酶底物（50 $\times$ ）和海肾萤光素酶底物（50 $\times$ ）稀释成 1 $\times$ 工作液，并将工作液温度平衡至室温（20-25 $^{\circ}$ C）。

（4）萤光素酶检测：取 20 μ L 裂解后的溶液加至不透光的白色酶标板中，加入 100 μ L 荧光虫萤光素工作液，晃动酶标板以混匀板内溶液，通过多功能酶标仪检测萤火虫萤光素酶的活力。接着加入 100 μ L 海肾萤光素工作液，晃动酶标板以混匀板内溶液，通过多功能酶标仪检测海肾萤光素酶的活力。

（5）计算公式：表达倍数 = $\frac{(\text{实验组 A} - \text{背景 A}) \times (\text{对照组 B} - \text{背景 B})}{(\text{实验组 B} - \text{背景 B}) \times (\text{对照组 A} - \text{背景 A})}$ 。A：与目的基因或启动子关联的萤光素酶活性数值；B：内参萤光素酶活性数值；背景：未转染萤光素酶报告质粒的细胞对照组。

3.4.16 嘌呤霉素标记试验

通过嘌呤霉素标记法评估细胞总的翻译水平。

（1）细胞处理：将 nspl4 表达质粒转染到细胞中或者使用 PEDV 感染细胞，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养到指定时间点。

（2）嘌呤霉素标记：细胞处理结束后，将待检细胞的培养液替换为含有 10 μ g/mL 嘌呤霉素的细胞生长液，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下孵育 15 min。

（3）样品收集：孵育结束后将细胞用 PBS 洗 3 遍，向每个孔（6 孔板）内加入 200 μ L RIPA 强裂解液，置于 4 $^{\circ}$ C 条件下裂解 10 min，裂解结束后将样品转移到 1.5 mL EP 管中并于冰上吹打样品 20 次。接着 12000 r/min 离心 2 min，取上清液到新的

EP 管中, 根据上清液体积加入 1/4 体积的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)。将混合了 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液的样品置于 100 °C 加热 10 min, 然后再置于 4 °C 静置 2 min。

(4) 结果检测: 通过 Western Blot 检测嘌呤霉素标记蛋白的量。

3.4.17 序列同源性分析

从 Genbank 中下载了 83 株 PEDV 全基因组序列, 这些毒株覆盖了目前报道的所有 PEDV 基因型。使用 MEGA7 提取全基因组序列中的 nsP14 编码序列并将其转化为氨基酸序列, 通过 MEGA7 的 Align 选项中 Align by ClustalW 功能比对这 83 株 PEDV 毒株 nsP14 蛋白氨基酸序列的差异, 通过 Distance 选项中 Compute Pairwise Distance 功能计算不同毒株两两之间氨基酸序列的相似性。依据序列相似性将氨基酸序列分类, 相似性 100% 的归为一类, 并进一步通过 MEGA7 比对不同序列类型氨基酸的差异和相似性。

3.4.18 PEDV 全基因组进化树绘制

将 PEDV 全基因组序列导入到 MEGA7 中, 通过 Align 选项中 Align by ClustalW 功能比对核酸序列, 将比对结果输出为 meg 文件。使用 MEGA7 打开包含比对结果的 meg 文件, 使用 Phylogeny 选项中的 Construct/Test Maximum Likelihood Tree 构建进化树。

3.4.19 蛋白质结构预测

通过在线工具 SWISS-MODEL 对 PEDV nsP14 的结构进行预测。上传 PEDV nsP14 氨基酸序列信息到 SWISS-MODEL 中, 以 SARS-CoV nsP14 结构 (SWISS-MODEL 模板 ID: 5c8t.2.B) 为模板进行结构预测, 使用 PyMOL 对蛋白结构进行注释。

3.4.20 免疫沉淀

使用碧云天免疫沉淀试剂盒进行免疫沉淀。

(1) 细胞处理: 以 6 孔板为例, 待 HEK293t 细胞长到 80% 融合度时, 将 PEDV nsP14 表达质粒 (pCAGGS-nsP14-Flag) 转染到 HEK293t 细胞中。

(2) 样品收集: 转染后 36 h 后用 PBS 将细胞洗 1 遍, 然后吸净孔内液体, 加入 200 μ L 裂解液 (试剂盒自带), 冰上孵育 10 min。充分裂解后 4 °C、12000 r/min 离心 5 min, 取上清液用于后续免疫沉淀。

(3) 磁珠预清洗: 使用 TBS (试剂盒自带) 清洗 protein A+G 磁珠 2 次, 备用。

(4) 抗体稀释: 使用 TBS 将鼠源抗 Flag 标签单克隆抗体和试剂盒中 Normal Mouse IgG 稀释成 50 μ g/mL 的抗体工作液。

(5) 磁珠耦合抗体：将准备好的磁珠磁性分离 10 s，弃上清，加入 500 μ L 抗体工作液，重悬后在室温条件下于翻转混合仪上翻转孵育 1 h，然后磁性分离磁珠 10 sec，再用 TBS 重悬，分离和重悬重复 3 次以充分洗涤。

(6) 消除非特异性结合：将细胞裂解后的上清液加入到结合了 Normal Mouse IgG 的 protein A+G 磁珠中（每 500 μ L 上清液需要初始体积为 20 μ L 的磁珠悬液），重悬后在 4 $^{\circ}$ C 条件下于翻转混合仪上翻转孵育 1 h，然后磁性分离 10 s。

(7) 蛋白垂钓：取 (6) 中上清液加入到结合了 Flag 抗体的 protein A+G 磁珠中（每 500 μ L 上清液需要初始体积为 20 μ L 的磁珠悬液），重悬后在室温条件下于翻转混合仪上翻转孵育 2 h。孵育结束后磁性分离磁珠 10 sec，弃掉上清液，保留磁珠

(8) 蛋白洗脱：加入 100 μ L SDT 缓冲液重悬磁珠并置于 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min 以洗脱磁珠上结合的蛋白。

(9) 结果鉴定：通过 Western Blot 检测洗脱液中的 nsp14，通过 SDS-PAGE 蛋白电泳和蛋白质银染色检测洗脱液中总蛋白，通过蛋白质 shotgun 质谱鉴定洗脱液中的蛋白。

3.4.21 蛋白质银染色

使用碧云天快速银染试剂盒对电泳后的 SDS-PAGE 凝胶进行染色。

(1) 固定：电泳结束后将 SDS-PAGE 凝胶置于固定液中，于摇床上（转速 70 r/min）室温孵育 40 min。

(2) 乙醇洗涤：将固定好的凝胶置于 30% 乙醇中，于摇床上（转速 70 r/min）室温洗涤 10 min。

(3) 水洗涤：将乙醇处理过的凝胶置于纯水中，于摇床上（转速 70 r/min）室温洗涤 10 min。

(4) 增敏：水洗涤过的凝胶置于 100 mL 银染增敏液（1 $\times$ ）中，于摇床上（转速 70 r/min）室温孵育 2 min。

(5) 水洗涤：增敏结束后将凝胶置于纯水中，于摇床上（转速 70 r/min）室温洗涤 1min，该过程重复 2 次。

(6) 银染色：将凝胶置于 100 mL 银溶液（1 $\times$ ）中，于摇床上（转速 70 r/min）室温染色 10 min。

(7) 水洗涤：将银染色后的凝胶置于 100 mL 纯水中，于摇床上（转速 70 r/min）室温洗涤 2 min。

(8) 显色：将洗涤的凝胶置于 100 mL 银染显色液中，于摇床上（转速 70 r/min）室温显色 5-10 min。

(9) 显色终止: 待凝胶上出现预期蛋白条带时弃掉显色液, 加入 100 mL 银染终止液, 于摇床上 (转速 70 r/min) 室温孵育 10 min。

(10) 水洗涤: 显色终止后将凝胶置于纯水中, 于摇床上 (转速 70 r/min) 室温洗涤 1min, 该过程重复 2 次。

(11) 拍照: 通过天能化学发光仪拍摄凝胶照片。

3.4.22 蛋白质 shotgun 质谱鉴定

将 3.4.19 中洗脱下来的蛋白送到上海维基生物公司进行质谱鉴定。

(1) 蛋白酶解

向蛋白洗脱液中加入适量 1 mol/L 二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol, DTT) 溶液使样品中 DTT 终浓度为 100 mol/L, 振荡混匀后于 100 °C 加热 5 min, 将溶液转移到 0.22 μ m 超滤管中。向超滤管中加入 200 μ L UA 缓冲液, 室温 12000 r/min 离心 30 min, 离心后弃掉滤出液, 该步骤重复 3 次。向超滤管中加入 100 μ L 含吡啶乙酸 (终浓度 50 mmol/L) 的 UA 缓冲液, 600 r/min 振荡混匀 1 min, 接着在室温条件下 300 r/min 振荡孵育 30 min, 孵育结束后 12000 r/min 离心 30 min。向超滤管中加入 100 μ L UA 缓冲液, 于室温 12000 r/min 离心 30 min, 该步骤重复三次。接着向超滤管中加入 100 μ L 碳酸氢铵 (25 mmol /L) 缓冲液, 室温条件下 12000 r/min 离心 30 min, 该步骤重复三次。换新的收集管, 向超滤管内加入 44 μ L 含胰蛋白酶 (终浓度 0.05 μ g/ μ L) 的碳酸氢铵 (25 mmol /L) 缓冲液, 在 37 °C 条件下于恒温振荡器内振荡 18 h (300 r/min), 接着于室温条件下 12000 r/min 离心 30 min, 收集滤液, 再向离心管中加入 40 μ L 碳酸氢铵 (25 mmol /L) 缓冲液, 室温 12000 r/min 离心 30 min, 收集滤液。

(2) 液相色谱

通过液相色谱对酶解产物进行脱盐和分离。液相 A 液为 0.1% 甲酸水溶液, 液相 B 液为 0.1% 甲酸乙腈溶液。使用 95% 的液相 A 液平衡色谱分析柱。液相分离条件为: 前 40 分钟, B 液量由 5% 线性增加至 28%, 接着 B 液量在 2 min 内线性增加至 90% 并维持该比例 18 min。

(3) 质谱分析

经液相脱盐和分离后的产物进行质谱分析。一级扫描条件: 检测模式为正离子; 母离子质荷比扫描范围为 375-1800 m/z; 一级扫描分辨率在 200 m/z 处为 120000; 扫描模式为 Top-Speed; 动态增益控制为 4e5; 一级扫描最大飞行时间为 50 msec; 扫描范围为 1; 动态排除时间为 40 sec; Data Dependent Mode 为 Cycle time; 扫描间隔为 3 sec。每次一级扫描的同时进行二级扫描, 二级扫描条件为: 扫描循环周期 3 sec; 二级扫描激活类型为 HCD; 二级扫描分辨率在 200 m/z 处为 50000; 二级扫描最大飞行时间为 105 msec; 动态增益控制为 1e5; Microscans 为 1。

（4）质谱原始数据处理

使用 MaxQuant 2.0.1.0 软件对质谱原始数据进行查库鉴定及分析。本次使用数据库为 uniprot_human_20220624_204995.fasta，查库参数见表 3-16。

表 3-16 质谱原始数据查库参数

Table 3-16 Mass Spectrometry Raw Data Database Search Parameters	
项目	参数
Variable modifications	Oxidation(M)、Acetyl(N-term)、GlyGly(K)
Fixed modification	carbamidomethylation(C)
Digestion mode	Trypsin
Max. missed cleavages	2
Label-free quantification	LFQ、iBAQ
Database	uniprot_human_20220624_204995.fasta
Decoy mode	Revert
PSM FDR	0.01
Protein FDR	0.01
Min. peptide length	2
Peptides for quantification	Unique+Razor
FTMS MS/MS tolerance	20 ppm
FTMS top peaks per 100 Da	12

3.4.23 蛋白质 GO 注释和信号通路聚类分析

对质谱鉴定出的蛋白进行 GO 注释和信号通路聚类分析

- （1）筛选出 pCAGGS-nsp14-Flag 转染组中特有的蛋白。
- （2）使用在线工具 DAVID Gene ID Conversion Tool 将特有蛋白的基因名转化为可被 DAVID 识别的 ID 号。
- （3）蛋白质 GO 注释：使用 DAVID Functional Annotation Tools 中的 GO 注释工具对蛋白进行 GO 注释。
- （4）蛋白质信号通路聚类分析：使用 DAVID Functional Annotation Tools 关联的 Reactome Pathway 数据库对蛋白进行信号通路聚类分析。

3.4.24 流式细胞术

通过流式细胞术分析细胞的 mRFP 阳性率和平均荧光强度

- （1）细胞处理
- 待 HEK293t 细胞长到 80%融合度时将以 pCAGGS-mRFP 为骨架的 GRP78 启动子重组质粒分别和 pCAGGS-PEDV-nsp14-Flag、pCAGGS-Flag（阴性对照质粒）共

转到细胞中，以 12 孔板为例，转染时共转染的两种质粒各需 0.5 μg ，转染的具体步骤见 3.4.13。

(2) 样品准备

转染后 48 h 使用无 EDTA 胰蛋白酶消化液消化待测细胞，使用 DMEM 培养基轻轻将细胞吹打下来，使细胞分散成单个，取 5-10 万个细胞到 1.5 mL EP 管中，1000 r/min 离心 10 min，弃掉上清保留细胞沉淀，用 200 μL PBS 轻轻重悬细胞，随后置于冰浴中。

(3) 上机检测

用发射波长为 585 nm 的通道检测 mRFP 信号，检测细胞数设置为 15000 个。

(4) 结果分析

使用 CytExpert 软件分析阳性细胞率和平均荧光强度。

3.4.25 活性氧水平检测

通过碧云天活性氧检测试剂盒检测细胞内活性氧水平。

(1) 细胞处理：将细胞接种到黑色不透明 96 孔细胞培养板中，待细胞生长到 100% 融合度时将培养基替换为含 80 μM LA 的无血清 DMEM，置于细胞培养箱内（37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 ）作用 24 h。

(2) 孵育探针：用 PBS 清洗细胞 3 遍，接着加入含有 DCFH-DA 探针的无血清 DMEM（DCFH-DA 探针终浓度为 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ ），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下避光孵育 20 min，孵育结束后用无血清 DMEM 将细胞清洗 3 遍以清除未进入细胞的探针。

(3) 活性氧信号检测：通过多功能酶标仪检测细胞内 DCF 的荧光信号（激发波长 488 nm、发射波长 525 nm）。

3.4.26 内质网应激抑制 PEDV 增殖的动物感染试验

使用断奶后未吃初乳的初生仔猪进行试验，设置 PEDV 对照组、空白对照组和 TM 处理组，每组 3 头猪。

(1) 仔猪转移到试验动物房后每 3-4 h 喂 1 次奶，通过注射器灌服，每头猪灌服 10-20 mL。为减少猪只应激，每天灌服 1 次复合维生素。

(2) 待猪只生长至 3 日龄，给 TM 组猪只灌服含 TM 的奶，给药计量为每千克体重灌服 0.1 mg TM。

(3) TM 灌服后 8 h 给 PEDV 对照组和 TM 处理组猪只攻毒，攻毒方式为口服，攻毒计量为每头猪 2 mL PEDV 病毒液（ $10^6 \text{TCID}_{50}/0.1 \text{mL}$ ）。

(4) 攻毒后 3 天进行剖检，并收集猪只肠道样品。

(5) 提取组织 RNA 并进行反转录，参见 3.4.6 和 3.4.7。

(6) 通过绝对定量 PCR 测定十二指肠、空肠、回肠和结肠 PEDV 载量（3.4.8）。

3.4.27 统计学分析

通过 GraphPad Prism8 软件的 T 检验（Student's T test）功能检测试验组和对照组间差异的显著性。使用“*”表示显著程度的高低，“*”表示 P 值小于 0.05 且大于等于 0.01；“**”表示 P 值小于 0.01 且大于等于 0.001；“***”表示 P 值小于 0.001 且大于等于 0.0001；“****”表示 P 值小于 0.0001；“ns”表示没有显著性。

第4章 结果与分析

4.1 内质网应激抑制 PEDV 复制及其作用机制

4.1.1 衣霉素和毒胡萝卜素的细胞毒性

本试验使用经典内质网应激刺激剂衣霉素 (TM)、毒胡萝卜素 (Tg) 激活内质网应激 (Liu et al 2014)。通过 CCK-8 法测定 TM、Tg 的细胞毒性。如图 4-1A、4-1B 所示, TM 终浓度不高于 800 nmol/L 时, Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞的活性均大于 80%; Tg 终浓度不高于 800 nmol/L 时, Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞的活性分别大于 80% 和 100%。而对于 HEK293t 细胞, 800 nmol/L 的 TM 或 Tg 均不能明显影响其细胞活性 (图 4-1C)。细胞活性 80% 被认为是药物细胞毒性判定的阈值, 为排除药物细胞毒性对试验结果的影响, 后续试验中所用 TM 和 Tg 浓度均不超过 800 nmol/L (Rodriguez-Cotto et al 2014, Ha et al 2015)。

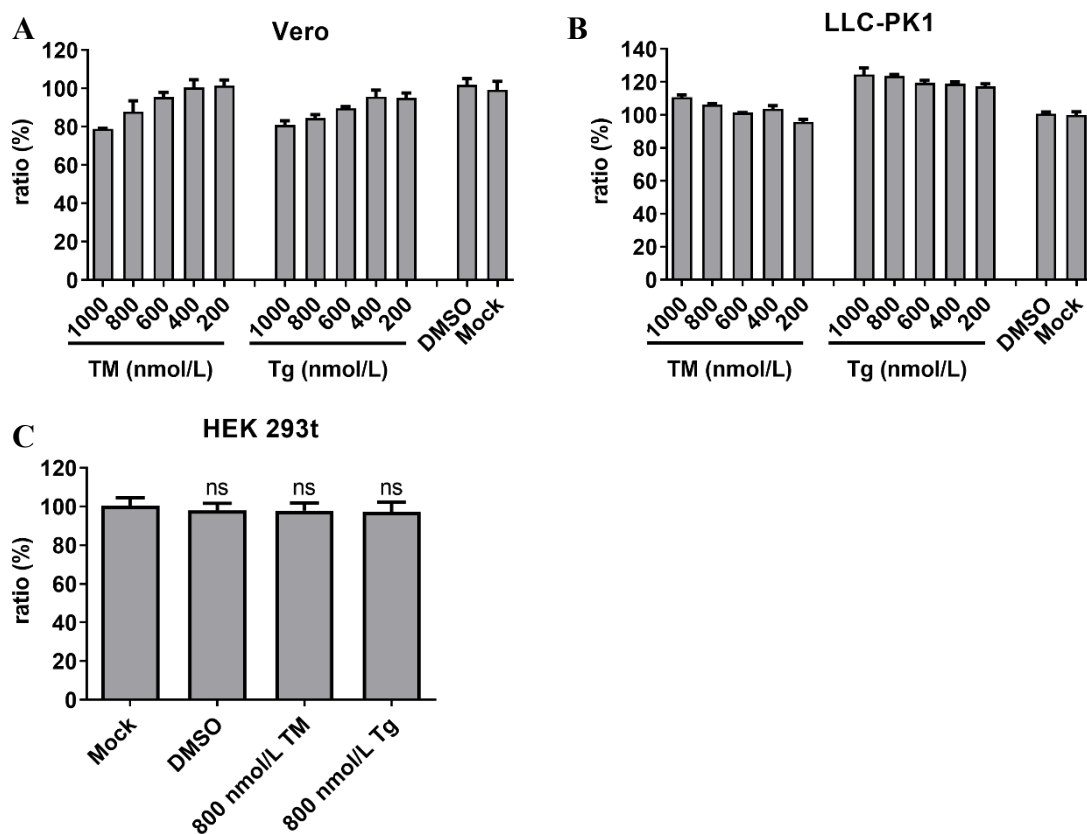


图 4-1 TM 和 Tg 的细胞毒性

Fig.4-1 Cytotoxicity of TM and Tg

(A) TM 和 Tg 对 Vero 细胞的毒性; (B) TM 和 Tg 对 LLC-PK1 细胞的毒性;

(C) TM 和 Tg 对 HEK293t 细胞的毒性

4.1.2 激活内质网应激抑制 PEDV 在细胞中的复制

为排除 TM、Tg 与 PEDV 病毒粒子或 PEDV 蛋白直接作用的可能性，本试验采取药物预处理的方式诱导细胞内质网应激。通过分析内质网应激标志蛋白 GRP78 表达量的变化评估 TM 或 Tg 预处理 8 h 能否有效激活内质网应激。试验结果显示与 TM 或 Tg 孵育 8 h 后 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞中 GRP78 表达量明显增加（图 4-2），表明该处理方法能有效在 Vero 和 LLC-PK1 细胞中激活内质网应激。

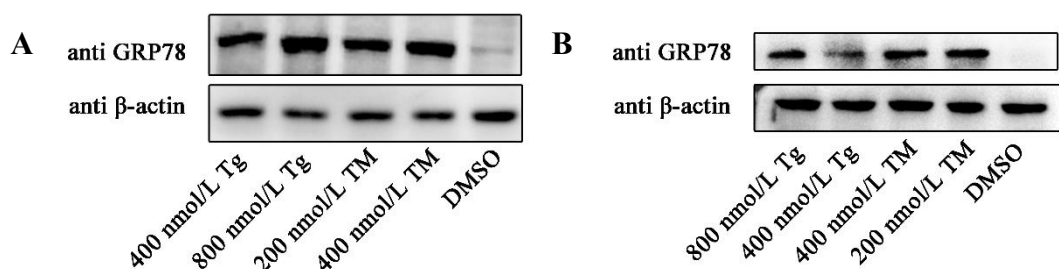


图 4-2 药物预处理对 GRP78 表达的影响

Fig.4-2 The effect of drug pretreatment on the expression of GRP78

药物预处理 Vero 细胞（A）和 LLC-PK1 细胞（B）后 GRP78 表达增加

接着测定内质网应激对 PEDV 复制的影响。细胞与 TM 或 Tg 孵育 8 h 后用 PBS 洗 3 遍，然后使用 0.1 MOI PEDV 感染细胞，于 36 hpi 收集样品并通过 TCID₅₀ 测定、免疫荧光和 Western Blot 等方法比较样品中的病毒含量。

首先评估了内质网应激对 GI 基因型 PEDV 复制的影响。TCID₅₀ 检测结果表明在 Vero 细胞上通过 TM 或 Tg 诱导内质网应激能有效抑制 GI-b 基因亚型 PEDV 毒株（DR13）的复制。如图 4-3A、4-3B 所示，随着 Tg 浓度从 0 逐渐增加到 800 nmol/L，PEDV TCID₅₀ 绝对值从 $10^{5.42}$ 下降至 $10^{3.30}$ ；随着 TM 浓度从 0 逐渐增加到 400 nmol/L，PEDV TCID₅₀ 绝对值从 $10^{5.45}$ 下降至 $10^{1.4}$ 。免疫荧光试验结果也证明激活内质网应激能抑制 PEDV DR13 毒株在 Vero 细胞上的复制。如图 4-3C 所示，TM 预处理组和 Tg 预处理组 PEDV 阳性信号均明显少于病毒对照组和 DMSO 对照组。

同时也通过 TCID₅₀ 测定和 Western Blot 在 Vero 细胞上评估了内质网应激对 GII 基因型 PEDV 复制的影响。针对 GII-b 基因亚型 PEDV 毒株（YN15）的试验结果显示，TM 预处理组和 Tg 预处理组 PEDV TCID₅₀ 绝对值显著低于 DMSO 对照组和病毒对照组（图 4-4A）；针对 GII-a 基因亚型 PEDV 毒株（JS）的试验结果显示，TM 预处理和 Tg 预处理降低了 PEDV 感染细胞中 PEDN 蛋白的表达量（图 4-4B）。表明 TM、Tg 诱导的内质网应激能有效抑制 GII-a 基因亚型 PEDV 和 GII-b 基因亚型 PEDV 的复制。

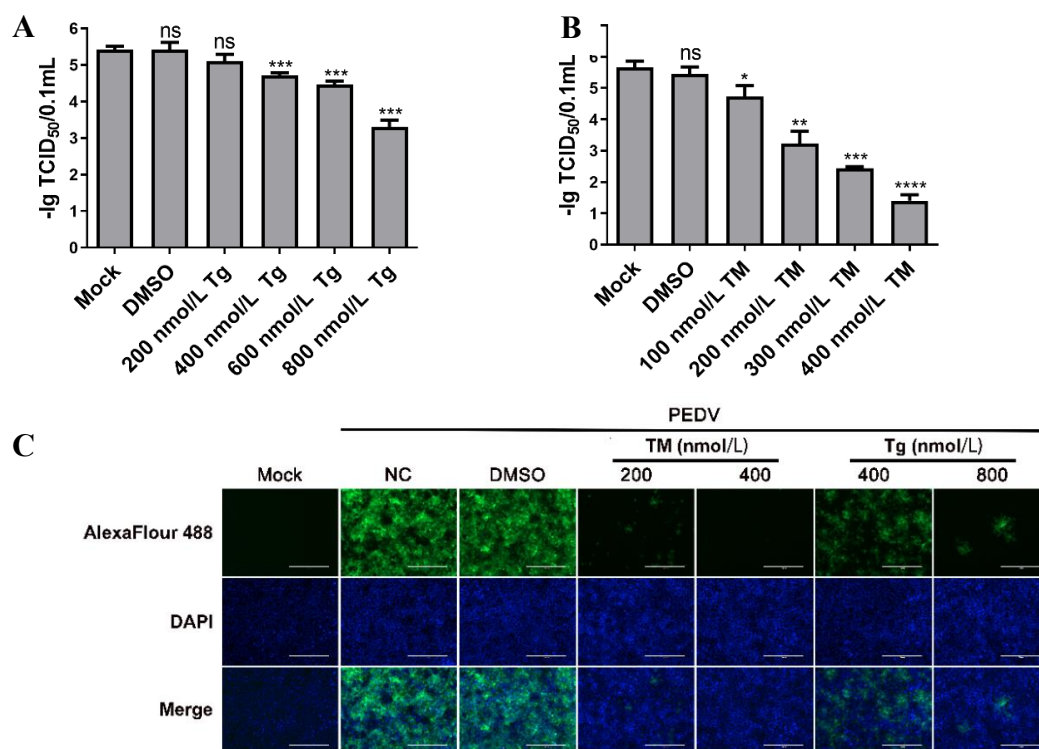


图 4-3 内质网应激对 GI 基因型 PEDV 复制的影响

Fig.4-3 Determining the effect of ER stress on GI genotype PEDV

(A、B) 通过测定 TCID₅₀ 评估诱导内质网应激对 GI 基因型的 PEDV DR13 毒株的影响；

(C) 通过免疫荧光试验评估内质网应激对 PEDV DR13 毒株的影响

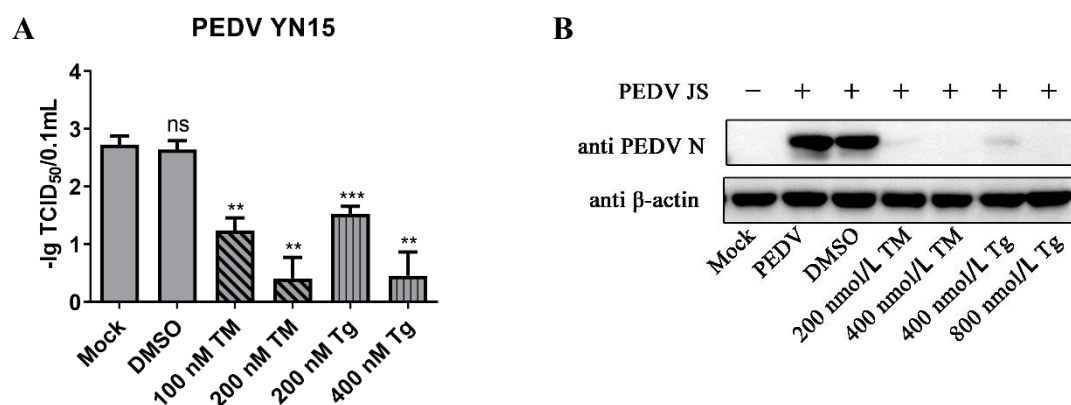


图 4-4 内质网应激抑制 GII 基因型 PEDV 复制

Fig.4-4 ER stress inhibits GII genotype PEDV replication

(A) 通过 TCID₅₀ 评估诱导内质网应激对 GII-b 基因亚型的 PEDV YN15 毒株复制的影响；

(B) 通过 Western Blot 评估诱导内质网应激对 GII-a 基因亚型的 PEDV JS 毒株复制的影响

另外还在 LLC-PK1 细胞上评估了内质网应激对 PEDV 复制的影响以排除细胞特异性的干扰。如图 4-5 所示，在针对 PEDV YN15 毒株的试验中和针对 PEDV JS 毒株的试验中 TM 或 Tg 预处理都减少了细胞中 PEDV N 蛋白的产生，表明在 LLC-PK1 细胞上内质网应激对 PEDV 复制也有明显抑制作用。

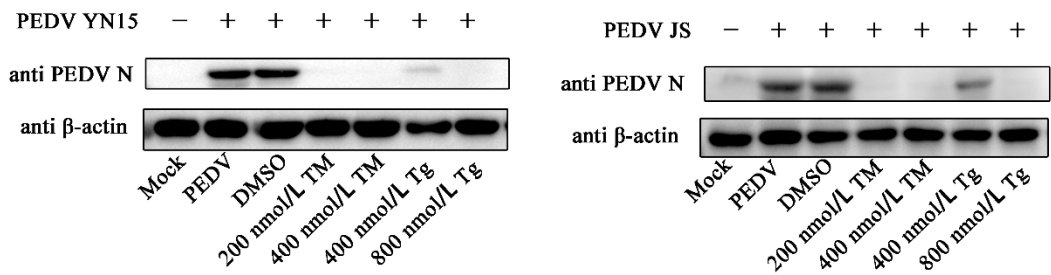


图 4-5 内质网应激抑制 PEDV 在 LLC-PK1 细胞上的复制

Fig.4-5 ER stress inhibits PEDV replication in LLC-PK1 cells

最后测定了内质网应激对 PEDV 生长趋势的影响，使用 400 mmol/L TM 预处理 Vero 细胞 8 h，在 PEDV 感染后 12、24 和 36 hpi 收集样品并通过定量 PCR 测定病毒 RNA 拷贝数，通过 GraphPad Prism8 的非线性拟合功能计算病毒增殖曲线的斜率（slope）。如图 4-6 所示，在针对 PEDV DR13 毒株和 YN15 毒株的试验中，每个时间点 DMSO 对照组的病毒拷贝数均显著高于 TM 预处理组，DMSO 对照组病毒增殖曲线的起点和斜率也均高于 TM 预处理组，表明内质网应激对 PEDV 的抑制在时间上具有持续性。

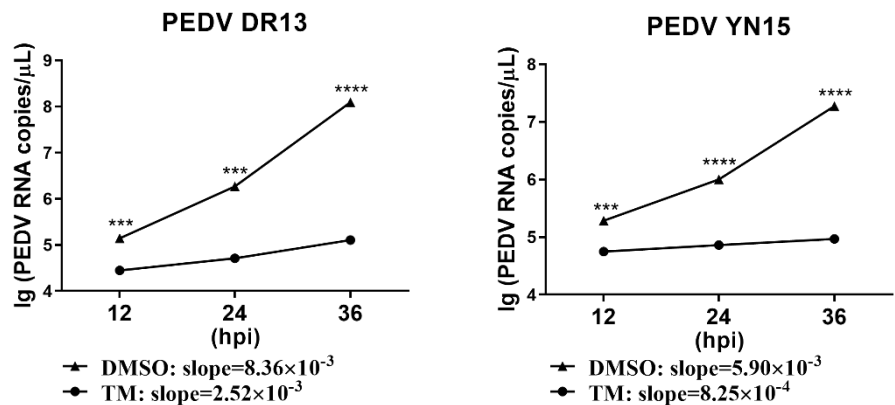


图 4-6 内质网应激对 PEDV 生长趋势的影响

Fig.4-6 ER stress affected the growth tendency of PEDV

4.1.3 抑制内质网应激促进 PEDV 在细胞中的复制

使用内质网应激抑制剂 4-PBA 处理细胞以确定抑制内质网应激对 PEDV 复制的影响。图 4-7 表明 500 μg/mL 浓度以下的 4-PBA 对 Vero 细胞无明显毒性。在 PEDV（0.1 MOI）感染后 2 h 加入指定浓度的 4-PBA，于 36 hpi 收集样品，通过定量 PCR 测定 PEDV RNA 拷贝数。如图 4-8 所示，4-PBA 处理组 PEDV RNA 拷贝数高于 DMSO 对照组，表明抑制内质网应激对 PEDV 复制有一定促进作用。

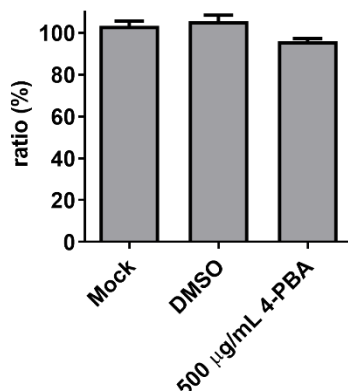


图 4-7 4-PBA 对 Vero 细胞的毒性

Fig.4-7 Toxicity of 4-PBA on Vero cells

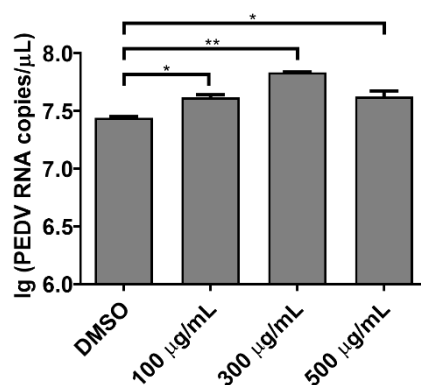


图 4-8 4-PBA 对 PEDV 复制的影响

Fig.4-8 Effect of 4-PBA on the replication of PEDV

4.1.4 激活内质网应激抑制 PEDV 在仔猪肠道中的复制

通过动物感染试验评估内质网应激对仔猪肠道中 PEDV 复制的影响。攻毒前 8 h 给未吃初乳的初生仔猪口服 TM，给药计量为每千克体重口服 0.1 mg TM，攻毒计量为每头猪 2 mL PEDV 病毒液 (10^6 TCID₅₀/0.1 mL)。攻毒后病毒对照组猪只逐渐表现出呕吐、腹泻等症状，而 TM 处理组和空白对照组猪只未见明显症状。攻毒后 3 天剖检并测定肠道病毒载量。如图 4-9 所示，PEDV 阳性对照组猪只小肠壁明显变薄，肠道内充满气体和黄色液体，而 TM 处理组和空白对照组猪只肠道未见明显眼观病理变化。组织病毒载量测定结果显示在十二指肠、空肠、回肠和结肠中，TM 处理组十二指肠、空肠、回肠和结肠的 PEDV 载量均显著低于 PEDV 阳性对照组（图 4-10）。表明激活内质网应激能显著抑制仔猪肠道中 PEDV 的增殖。

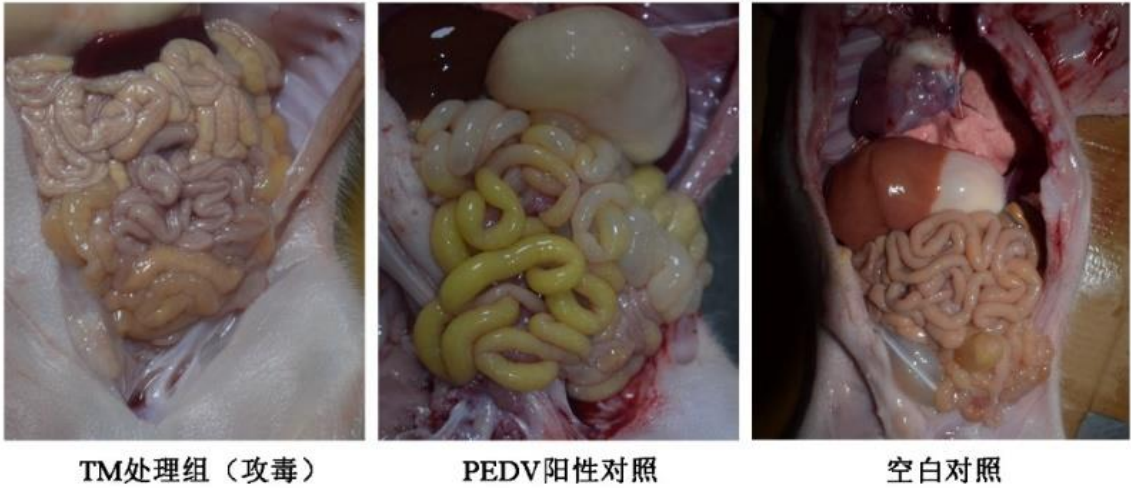


图 4-9 仔猪肠道病理变化

Fig.4-9 Pathological changes of piglet intestinal tract

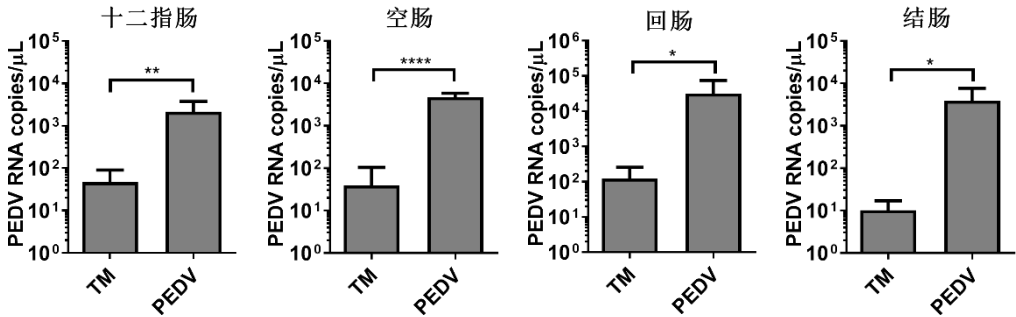


图 4-10 仔猪肠道 PEDV 载量

Fig.4-10 Intestinal PEDV load of piglets

4.1.5 不同 UPR 通路对 PEDV 复制的影响

首先评估了 PEDV 感染时各 UPR 通路的变化，将 0.1 MOI 的 PEDV 接种到 Vero 细胞中，于感染后 12、24、36 h 收集样品。通过 Western Blot 评估 UPR 通路相关蛋白表达和磷酸化的变化。结果显示 PEDV 感染组 eIF2α 磷酸化水平和 ATF4 表达量在 12、24 hpi 时均高于对照组，但在 36 hpi 时与对照组无明显差异，表明 PEDV 感染后 PERK-eIF2α 通路被激活，但随着感染时间的延长 PERK-eIF2α 通路又恢复静息；24 hpi 时 PEDV 感染组 IRE1α 的磷酸化水平高于对照组，表明此时 PEDV 感染激活了 IRE1α 通路；12、24、36 hpi 时 PEDV 感染组全长 ATF6 的量均显著低于对照组，且 PEDV 感染组切割态 ATF6 的量随着感染时间延长逐渐增加，表明 PEDV 感染过程中 ATF6 通路被逐渐激活（图 4-11）。总的来说 PEDV 感染后三条 UPR 通路都被激活，但它们激活的时间并不同步。

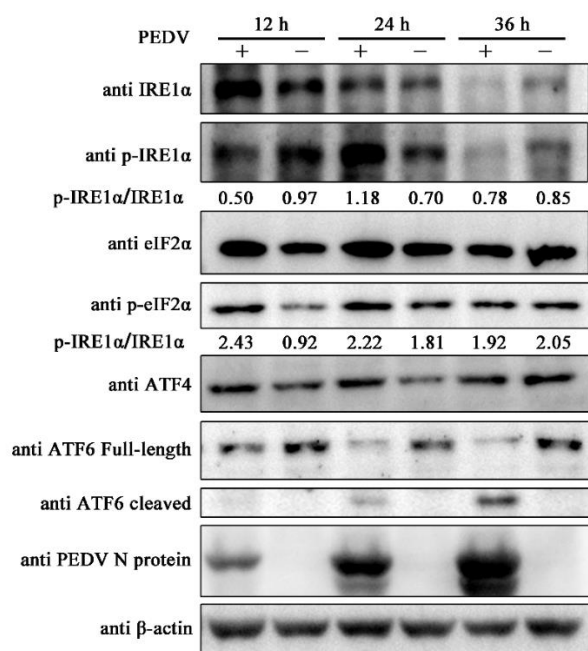


图 4-11 PEDV 感染对 UPR 通路相关蛋白的影响

Fig 4-11 The influence of PEDV infection on UPR pathway-related proteins

为鉴定在内质网应激抑制 PEDV 中起主要作用的 UPR 通路, 使用 PERK 抑制剂 AMG PERK44、IRE1α 核酸内切酶活性抑制剂 STF083010、ATF6 抑制剂褪黑素 (Melatonin) 和 PERK 激动剂 CCT020312 处理细胞以选择性干扰或激活相应 UPR 通路。通过 CCK-8 法测定这些药物在 Vero 细胞上的毒性, 如图 4-12 所示, 1 μmol/L AMG PERK44 处理组、100 μmol/L STF083010 处理组和 10 μmol/L CCT020312 处理组的细胞活性均超过 96.00%, 1 mmol/L 褪黑素处理组的细胞活性均值为 94.86%, 表明以上浓度的药物对于 Vero 细胞无明显毒性。

在 Vero 细胞上评估抑制不同 UPR 通路对 PEDV 复制的影响, UPR 通路抑制剂在 PEDV (0.1 MOI) 感染后 2 h 加入, 于 36 hpi 通过免疫荧光和定量 PCR 测定病毒含量。如图 4-13 所示, STF083010 处理组 PEDV 阳性信号和 RNA 拷贝数都显著少于 PEDV 阳性对照组, 而 AMG PERK44 处理组和褪黑素处理组 PEDV 阳性信号和 RNA 拷贝数与阳性对照组无显著差异, 表明抑制 IRE1α 通路会干扰 PEDV 复制。另外还测定了激活 PERK 通路对 PEDV 复制的影响, 于 -8 至 0 hpi 用 CCT020312 预处理 Vero 细胞, 0 hpi 时完全移除含药物的培养基并接种 PEDV (0.1 MOI), 2 hpi 时将培养孔内培养基替换为病毒培养液, 于 36 hpi 通过免疫荧光和定量 PCR 测定病毒含量。如图 4-13 所示, CCT020312 处理组 PEDV 阳性信号和 RNA 拷贝数都显著少于 PEDV 阳性对照组, 表明激活 PERK 通路能抑制 PEDV 复制。

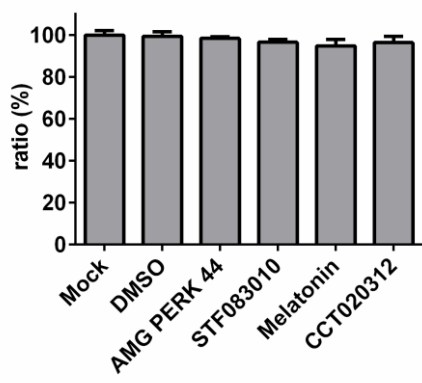


图 4-12 UPR 不同通路调节剂的细胞毒性

Fig.4-12 Cytotoxicity of different UPR pathway regulators

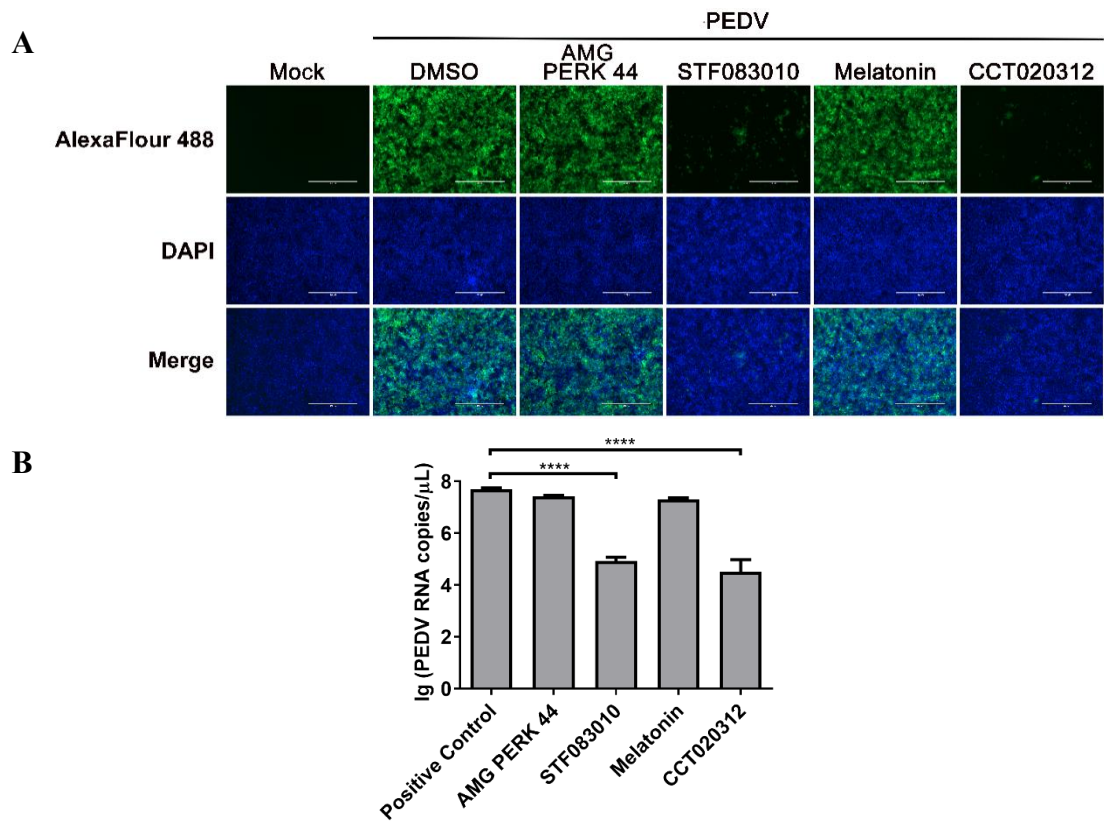


图 4-13 UPR 不同通路调节剂的对 PEDV 复制的影响

Fig.4-13 Determining the influence of different UPR pathway regulators on PEDV replication

通过免疫荧光试验（A）和定量 PCR 试验（B）测定各调节剂对 PEDV 复制的影响

4.1.6 内质网应激标志蛋白 GRP78 抑制 PEDV 复制

在 Vero 细胞中过表达内质网应激相关蛋白以筛选协助内质网应激抑制 PEDV 的宿主因子。细胞转染质粒后 36 h 感染 PEDV（0.1 MOI），于 36 hpi 通过免疫荧光检测病毒含量。如图 4-14 所示，只有 GRP78 转染组 PEDV 阳性信号明显少于 PEDV 阳性对照组（PC），表明 GRP78 过表达组中 PEDV 的复制被抑制。

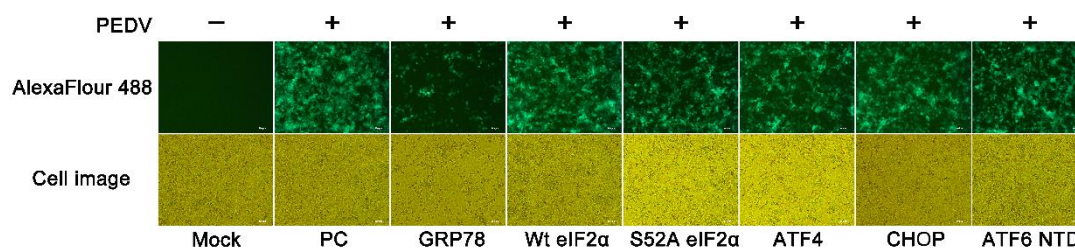


图 4-14 内质网应激相关蛋白对 PEDV 复制的影响

Fig.4-14 The influence of ER stress-related proteins on PEDV replication

进一步通过 Western Blot 和定量 PCR 明确过表达 GRP78 对 PEDV 复制的影响。如图 4-15 所示，GRP78 过表达组 PEDV N 蛋白表达量和 PEDV RNA 拷贝数 (copies) 显著低于载体对照组和 PEDV 阳性对照组，表明过表达 GRP78 能够有效抑制 PEDV 复制。

另外还测定了抑制 GRP78 对 PEDV 复制的影响。通过 siRNA 干扰 GRP78，如图 4-16 所示，针对 GRP78 基因的特异性 siRNA-3 能有效抑制 GRP78 的表达。细胞转染 siRNA 后 36 h 感染 PEDV (0.1 MOI)，于 36 hpi 通过定量 PCR 检测病毒含量。结果表明干扰 GRP78 对 PEDV 复制的影响并不明显 (图 4-17)。

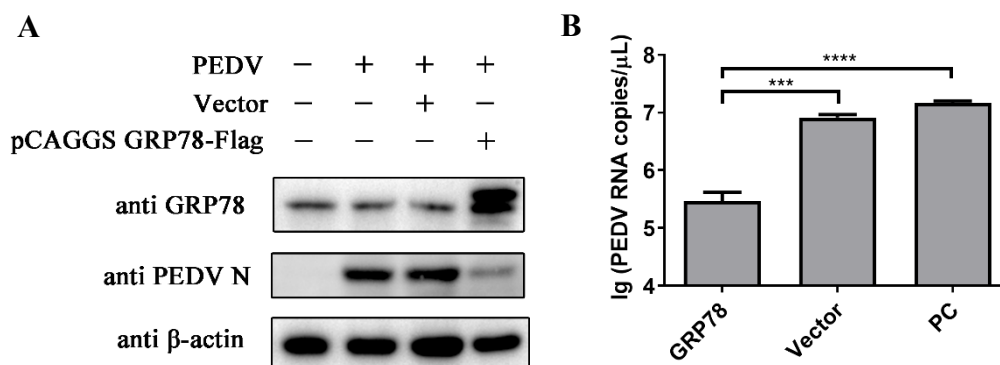


图 4-15 GRP78 抑制 PEDV 复制

Fig.4-15 GRP78 inhibits PEDV replication

通过 Western Blot (A) 和定量 PCR 试验 (B) 测定过表达 GRP78 对 PEDV 复制的影响

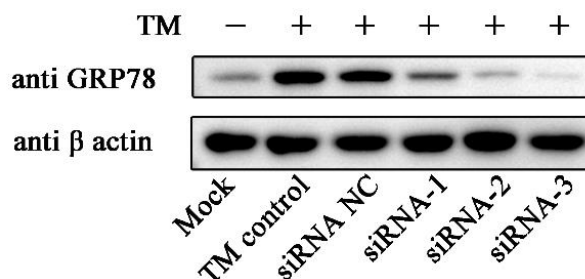


图 4-16 GRP78 特异性 siRNA 的抑制效率

Fig.4-16 The inhibition efficiency of GRP78-specific siRNA

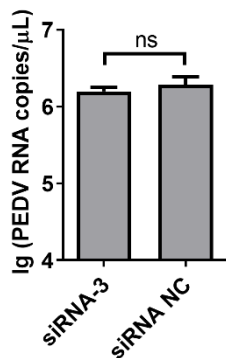


图 4-17 干扰 *GRP78* 对 PEDV 复制的影响

Fig.4-17 The influence of interference with *GRP78* on PEDV replication

4.2 PEDV 抑制内质网应激标志蛋白 *GRP78* 表达及其作用机制

4.2.1 PEDV 感染促进 *GRP78* 转录

为探究 PEDV 感染对 *GRP78* 转录的影响，使用 0.1 MOI GI 基因型 PEDV（DR13 毒株）感染 Vero 细胞，于 6、12、18、24、30 hpi 收集样品。分别通过相对定量 PCR 和绝对定量 PCR 检测 *GRP78* 转录和 PEDV RNA 拷贝数的变化。试验结果显示 PEDV 组和对照组 *GRP78* 转录水平的差异随着病毒的增殖而不断加大，18 hpi 以后 PEDV 组 *GRP78* 转录的水平均显著高于对照组，表明 GI 基因型 PEDV 对 *GRP78* 的转录有促进作用（图 4-18）。同时本试验也检测了 GII 基因型 PEDV 对 *GRP78* 转录的影响。使用 0.1 MOI GII 基因型 PEDV（YN15 毒株）感染 Vero 细胞，于 30 hpi 收集样品。绝对定量 PCR 结果显示 PEDV 组病毒 RNA 拷贝数在 1.93×10^6 copies/μL 左右，相对定量 PCR 结果显示 PEDV 组 *GRP78* 的转录量显著高于对照组（图 4-19），表明 GII 基因型 PEDV 也能促进 *GRP78* 的转录。

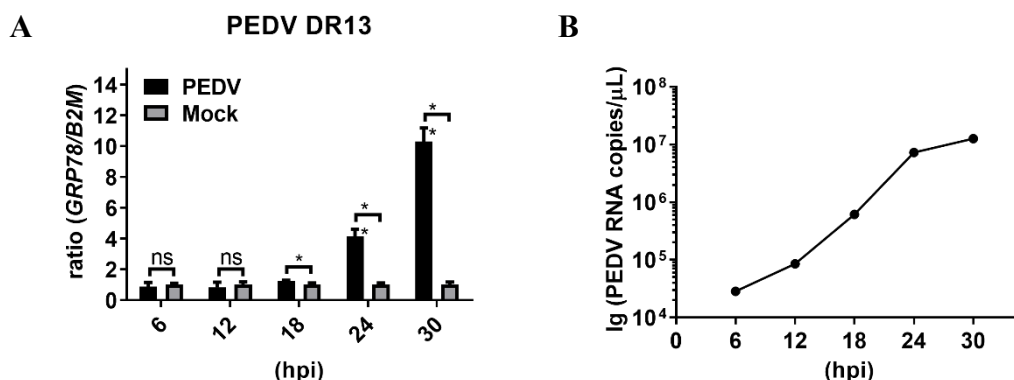
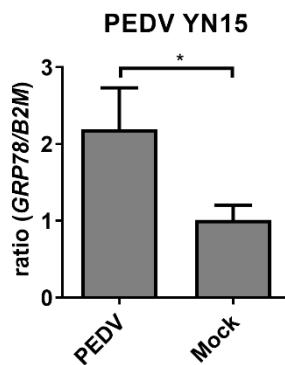


图 4-18 GI 基因型 PEDV 促进 *GRP78* 转录

Fig 4-18 The GI genotype PEDV promotes *GRP78* transcription

(A) *GRP78* 转录水平的变化；(B) PEDV RNA 拷贝数的变化

图 4-19 GII 基因型 PEDV 促进 *GRP78* 转录Fig 4-19 The GII genotype PEDV promotes *GRP78* transcription

4.2.2 PEDV 感染抑制 GRP78 蛋白表达

将 0.1 MOI 的 PEDV 接种到 Vero 细胞中, 于感染后 12、24、36 h 收集样品。通过 Western Blot 评估 GRP78 表达的变化。如图 4-20A 所示, 12、24 hpi 时 PEDV DR13 毒株感染组 GRP78 蛋白的量与对照组无明显差异, 而到 36 hpi 时 PEDV DR13 毒株感染组 GRP78 蛋白表达量低于对照组, 表明在 36 hpi 时 GRP78 蛋白的表达受到抑制。PEDV YN15 毒株也能抑制 GRP78 蛋白的表达。如图 4-20B 所示, 36 hpi 时 PEDV YN15 毒株感染组 GRP78 蛋白的量明显低于对照组。以上结果表明 GI 基因型和 GII 基因型 PEDV 都可能具有抑制 GRP78 蛋白表达的能力。同时也在 LLC-PK1 细胞中评估了 36 hpi 时 PEDV (0.1 MOI) 感染对 GRP78 表达的影响, 结果表明在 LLC-PK1 细胞中 PEDV 感染不能促进 GRP78 表达 (图 4-20C)。

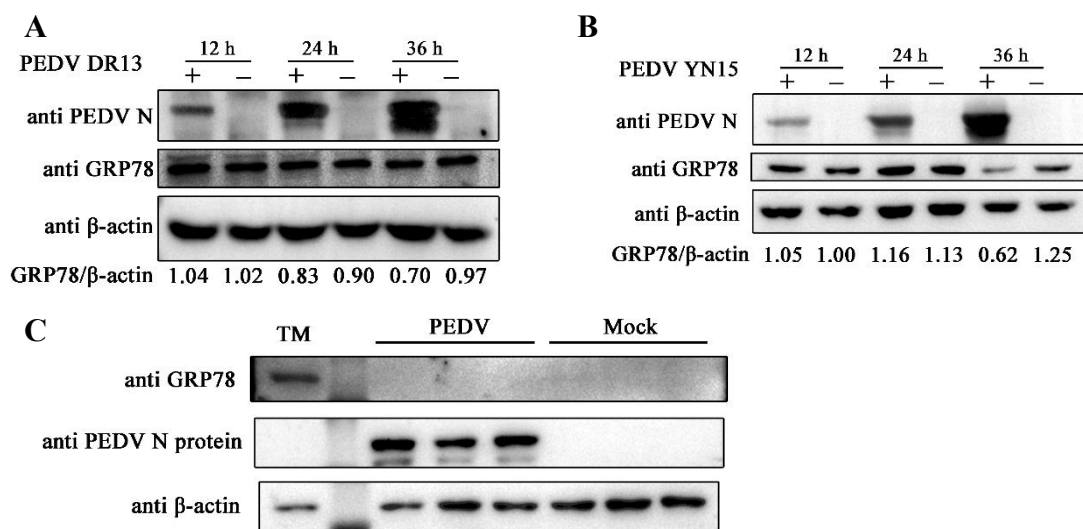


图 4-20 PEDV 感染对 GRP78 表达的影响

Fig 4-20 The influence of PEDV infection on the expression of GRP78

(A、B) PEDV 感染 Vero 细胞后 GRP78 蛋白表达的变化;

(C) PEDV YN15 毒株感染 LLC-PK1 细胞后 GRP78 蛋白表达的变化

4.2.3 PEDV 抑制内质网应激刺激剂诱导的 GRP78 表达

在 PEDV 感染细胞前后不同时间用内质网应激刺激剂 TM 或 Tg 处理细胞以进一步评估 PEDV 对 GRP78 蛋白表达的影响。

首先测试了 TM 处理后接种 PEDV 对 GRP78 表达的影响。使用 400 nmol/L TM 预处理 Vero 细胞 8 h，用 PBS 将细胞洗 3 遍后将 PEDV（0.1 MOI）接种到细胞中，于 32 hpi 通过 Western Blot 检测 GRP78。试验结果显示 TM 处理明显促进了 GRP78 表达，但 TM 预处理后被 PEDV 感染的细胞中 GRP78 表达量要少于 TM 对照组细胞，表明 PEDV 抑制了 TM 预处理诱导的 GRP78 表达（图 4-21）。

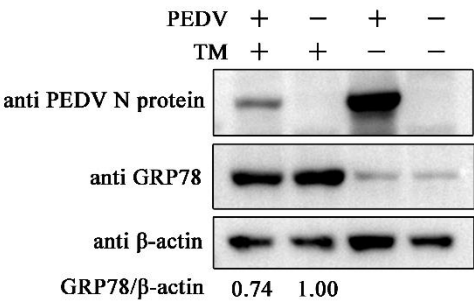


图 4-21 Vero 细胞经 TM 处理后感染 PEDV

Fig 4-21 Vero cells infected with PEDV after TM treatment

接着测试了 TM 孵育的同时接种 PEDV（0.1 MOI）对 GRP78 表达的影响。在 32 hpi 收集样品，通过 Western Blot 检测 GRP78。试验结果显示 TM 和 PEDV 共孵育组 GRP78 的量少于 TM 对照组，表明 TM 和 PEDV 共同作用于细胞时 PEDV 会抑制 TM 诱导的 GRP78 表达（图 4-22）。

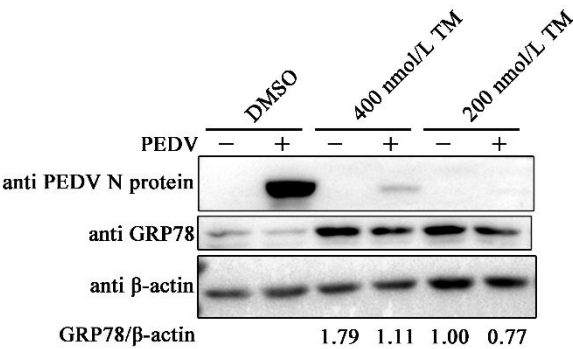


图 4-22 Vero 细胞用 TM 处理的同时感染 PEDV

Fig 4-22 Vero cells were infected with PEDV while being treated with TM

最后测试了 PEDV 建立感染后对 TM 和 Tg 诱导 GRP78 表达的影响。将 PEDV（0.1 或 0.01 MOI）接种到 Vero 细胞上，24 hpi 时向细胞培养液中加入 TM（400 nmol/L）或 Tg（800 nmol/L），在 32 hpi 收集样品。为了排除毒株特异性的影响，分别使用 GI 和 GII 基因型 PEDV 开展试验。针对 GI 基因型 PEDV（DR13 毒株）试验的结果显示被 PEDV 感染后又经刺激剂（TM 或 Tg）处理的细胞中 GRP78 蛋白

表达量明显少于刺激剂对照组细胞, 表明 GI 基因型 PEDV 建立感染后能有效抑制 TM 和 Tg 对 GRP78 表达的诱导 (图 4-23A)。GII 基因型 PEDV 也表现出抑制 TM 和 Tg 诱导 GRP78 表达的能力。图 4-23B、4-23C 显示被 PEDV YN15 毒株 (GII-b 基因亚型) 感染后又经刺激剂 (TM 或 Tg) 处理的细胞中 GRP78 蛋白表达量随着 PEDV N 蛋白的增加逐渐减少, 表明 PEDV YN15 毒株抑制了 TM 和 Tg 诱导的 GRP78 表达, 且该抑制效果呈剂量依赖性增强; 图 4-23D、4-23E 显示, 被 0.1 MOI PEDV JS 毒株 (GII-a 基因亚型) 感染后又经刺激剂 (TM 或 Tg) 处理的细胞中 GRP78 蛋白表达量均明显少于刺激剂对照组细胞, 表明 PEDV JS 毒株也能有效抑制 TM、Tg 诱导的 GRP78 表达。以上结果表明 GI 和 GII 基因型 PEDV 均能抑制 TM、Tg 诱导的 GRP78 表达。

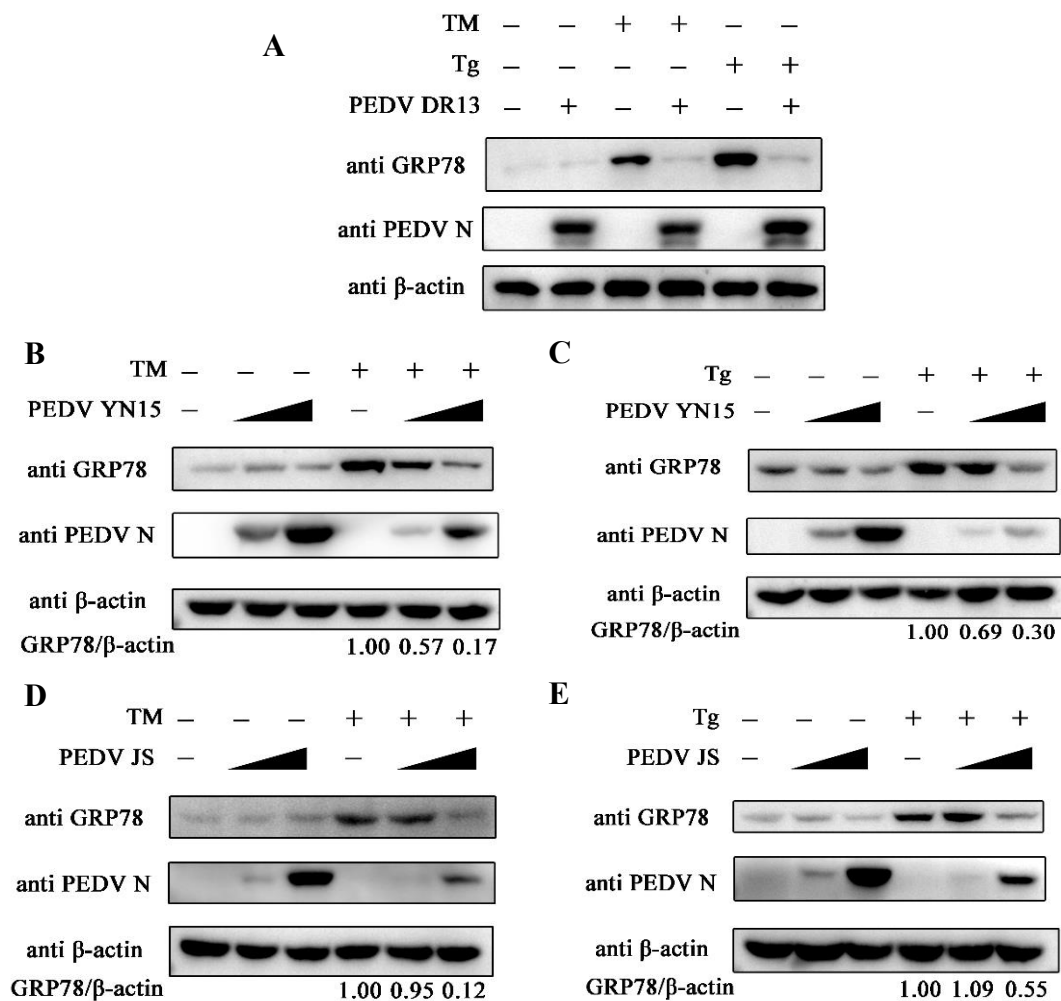


图 4-23 Vero 细胞感染 PEDV 后用 TM 或 Tg 处理细胞

Fig 4-23 Vero cells were treated with TM or Tg after infection with PEDV

(A) PEDV DR13 毒株感染后分别用 TM 和 Tg 处理细胞; (B) PEDV YN15 毒株感染后用 TM 处理细胞; (C) PEDV YN15 毒株感染后用 Tg 处理细胞; (D) PEDV JS 毒株感染后用 TM 处理细胞; (E) PEDV JS 毒株感染后用 Tg 处理细胞

为排除细胞特异性的干扰，也在 LLC-PK1 上评估了 PEDV（0.1 和 0.01MOI）建立感染后对内质网应激刺激剂诱导 GRP78 表达的影响。试验结果显示被 0.1 MOI PEDV 感染后又经刺激剂（TM 或 Tg）处理的细胞中 GRP78 蛋白表达量均明显少于刺激剂对照组细胞（图 4-24），表明在 LLC-PK1 上 PEDV 也能有效抑制 TM、Tg 诱导的 GRP78 表达。

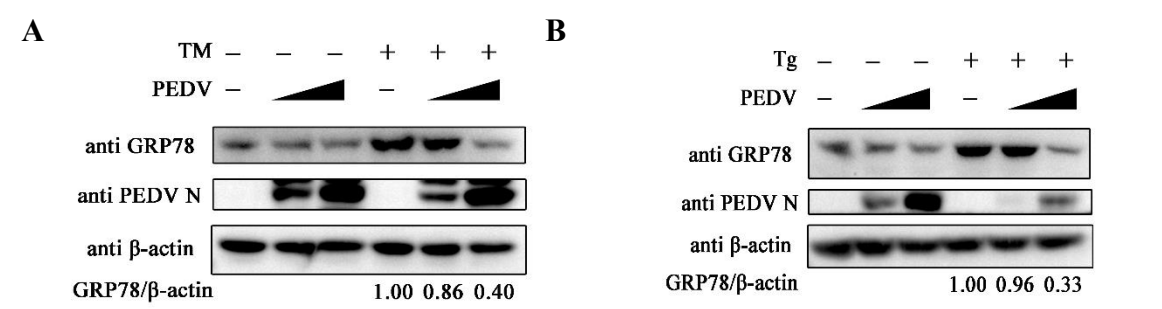


图 4-24 LLC-PK1 细胞感染 PEDV 后用 TM 或 Tg 处理细胞

Fig 4-24 LLC-PK1 cells were treated with TM or Tg after infection with PEDV

（A）PEDV 感染后用 TM 处理细胞；（B）PEDV 感染后用 Tg 处理细胞

4.2.4 PEDV 抑制 GRP78 过表达

通过真核表达载体 pCAGGS-GRP78-Flag 在 Vero 细胞中过表达 GRP78 蛋白。如图 4-25 所示，pCAGGS-GRP78-Flag 转染组内源性 GRP78 上出现了一个分子量略大的条带，表明该质粒转染 Vero 细胞后能表达携带 Flag 标签的 GRP78 蛋白。通过分析 GRP78-Flag 条带的灰度值比较 PEDV 组（Lane 1）和细胞对照组（Lane 4）中 GRP78 过表达水平的差异，图 4-25 显示 Lane 1 中 GRP78-Flag 的量明显低于 Lane 4，表明 PEDV 感染能有效抑制 GRP78 的过表达。

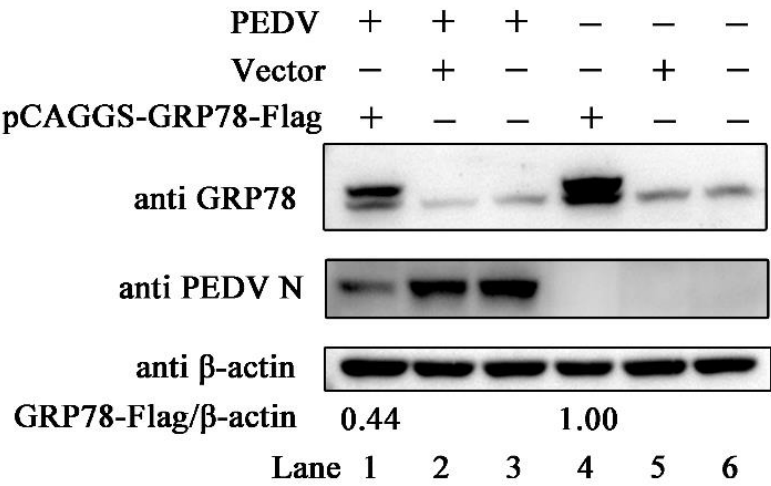


图 4-25 PEDV 感染对 GRP78 过表达的影响

Fig 4-25 The influence of PEDV infection on GRP78 overexpression

4.2.5 PEDV 抑制细胞翻译

为明确 PEDV 能否通过调控宿主翻译抑制 GRP78 表达, 通过嘌呤霉素标记试验检测 PEDV 感染细胞中总的蛋白质翻译水平。将 0.1 MOI PEDV 接种到 Vero 细胞中, 于 36 hpi 进行嘌呤霉素标记试验。试验结果如图 4-26 所示, PEDV 感染组嘌呤霉素标记蛋白 (Lane 5、6) 明显少于嘌呤霉素对照组 (Lane 4), 说明 PEDV 具有抑制宿主细胞蛋白质翻译的能力。

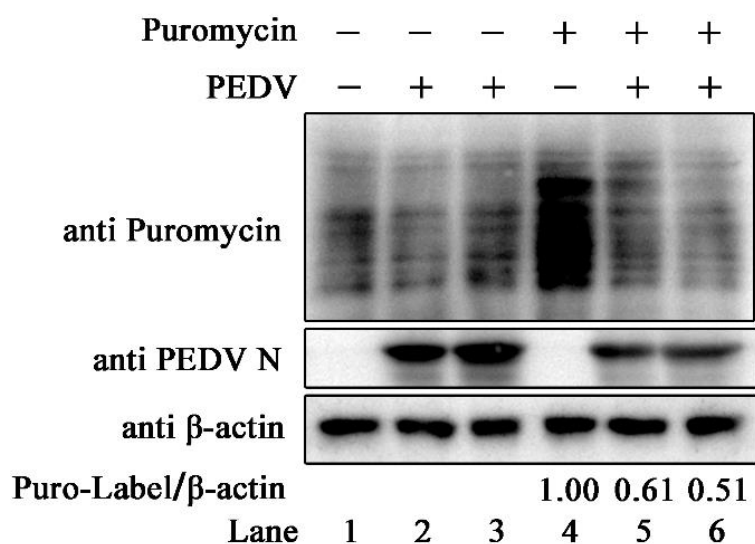


图 4-26 PEDV 抑制细胞翻译

Fig 4-26 PEDV inhibited host translation

4.2.6 PEDV 抑制 GRP78 表达不依赖蛋白质降解途径

为明确 PEDV 是否通过蛋白质降解途径抑制 GRP78 表达, 使用特异性抑制剂干扰细胞内主要的蛋白质降解途径——泛素-蛋白酶体途径和自噬-溶酶体途径 (Liu et al 2015)。MG132 和 3-MA 分别能特异性抑制泛素-蛋白酶体途径和自噬-溶酶体途径, 有研究指出这两个抑制剂在 Vero 细胞上的工作浓度分别为 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 mmol/L (Huang et al 2022), 本试验通过 CCK-8 试验测定了这两个抑制剂的细胞毒性, 结果表明 10 $\mu\text{mol/L}$ MG132 和 5 mmol/L 3-MA 对 Vero 细胞没有明显毒性, 可被用于后续试验 (图 4-27A)。

使用 0.1 MOI PEDV 感染 Vero 细胞, 在 24 hpi 将 MG132 或 3-MA 与 TM (400 nmol/L) 一起加入细胞培养液, 于 32 hpi 收集样品。试验结果如图 4-27B 所示, TM/MG132 处理组 (Lane 5) 和 TM/3-MA 处理组 (Lane 6) 中 GRP78 蛋白表达量明显少于 TM 对照组 (Lane 2), 而且与 PEDV 对照组 (Lane 3)、PEDV/TM (Lane 4) 组无明显差异, 表明 PEDV 抑制 GRP78 表达并不依赖泛素-蛋白酶体途径和自噬-溶酶体途径。

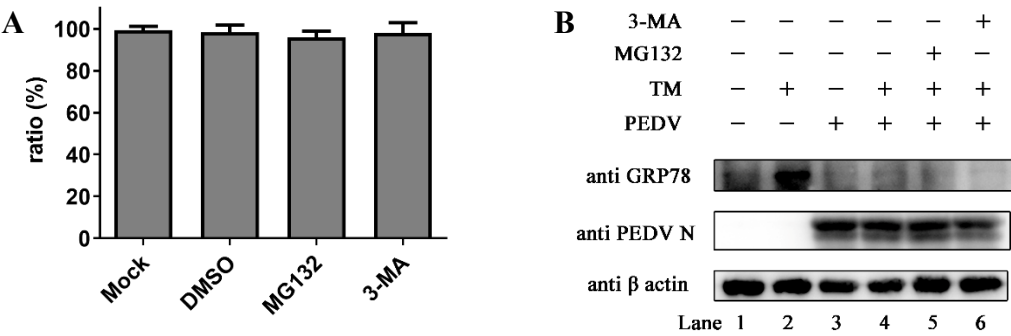


图 4-27 PEDV 抑制 GRP78 表达不依赖经典的蛋白质降解途径

Fig 4-27 PEDV inhibits GRP78 expression independently of the canonical proteolytic pathway

(A) 在 Vero 细胞上测定 MG132 和 3-MA 的细胞毒性；

(B) MG132 和 3-MA 对 PEDV 拮抗 GRP78 的影响

4.3 PEDV nsp14 抑制 GRP78 表达及其作用机制

4.3.1 筛选抑制 GRP78 表达的 PEDV 蛋白

为明确协助 PEDV 抑制 GRP78 表达的病毒蛋白，本研究以 pCAGGS-Flag-MCS 为骨架构建了 PEDV nsp1、nsp4 至 10、nsp12 至 16、ORF3、S、E、M 和 N 蛋白的真核表达载体。为验证各载体表达蛋白的效果，将它们转染到 HEK293t 细胞中，36 h 后通过免疫荧光检测蛋白表达情况。试验结果表明这些载体能有效表达相应的 PEDV 蛋白（图 4-28）。

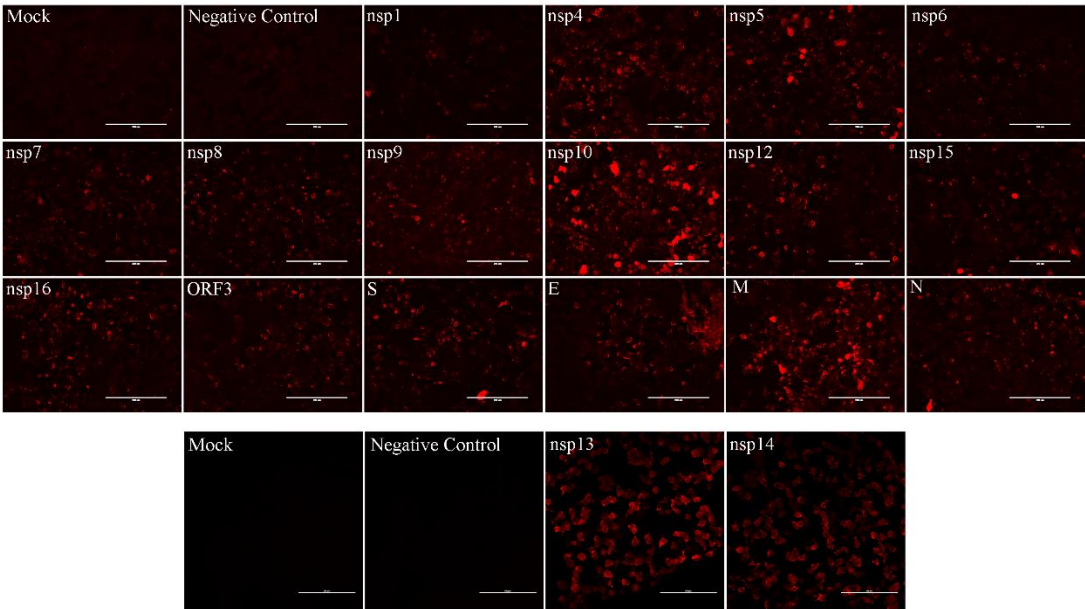


图 4-28 通过免疫荧光检测 PEDV 蛋白真核表达载体的表达效率

Fig 4-28 Detection of the expression PEDV protein mediated by corresponding eukaryotic expression vectors by IFA

将 PEDV 蛋白真核表达载体转染到 HEK293t 细胞中, 转染后 36 h 向培养基中加入 800 nmol/L TM, TM 与细胞作用 8 h 后收集样品。通过相对定量 PCR 和 Western Blot 分别检测各 PEDV 蛋白在转录水平和蛋白质水平对 *GRP78* 表达的影响。试验结果表明在被测试的各 PEDV 蛋白中只有 nsp14 有抑制 *GRP78* 表达的潜力 (图 4-29、4-30)。

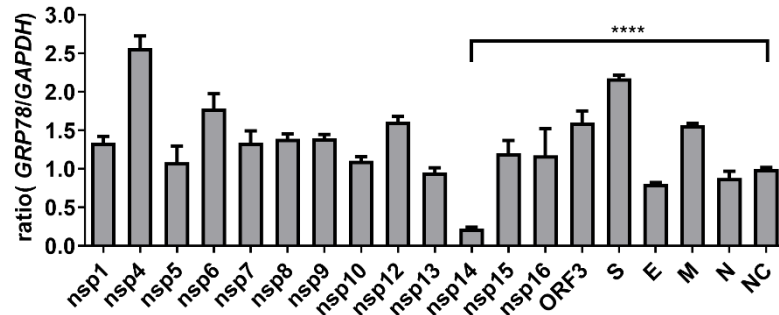


图 4-29 不同 PEDV 蛋白对 *GRP78* 转录的影响

Fig 4-29 The influence of different PEDV proteins on *GRP78* transcription

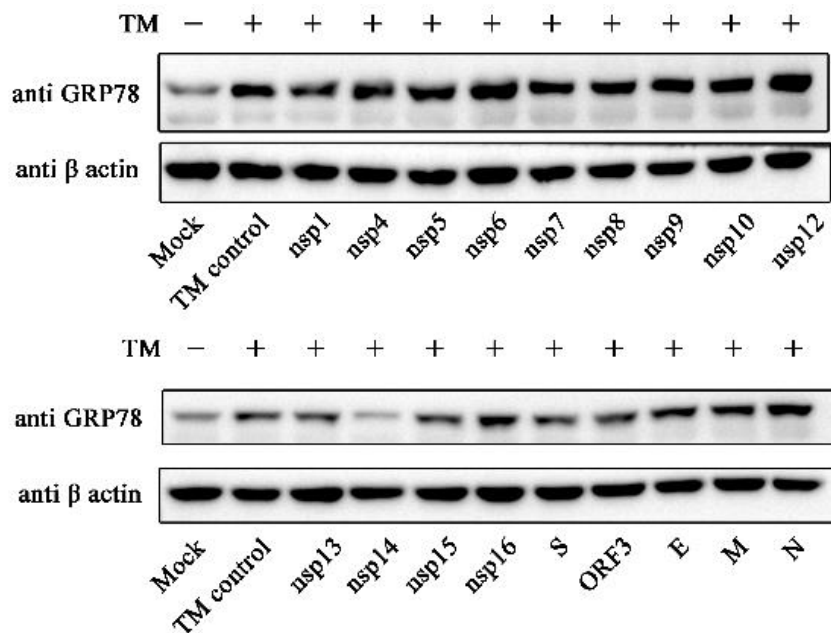


图 4-30 不同 PEDV 蛋白对 *GRP78* 蛋白表达的影响

Fig 4-30 The influence of different PEDV proteins on *GRP78* expression

4.3.2 PEDV nsp14 抑制 *GRP78* 蛋白表达

本试验进一步在不同细胞系上验证了 PEDV nsp14 对 *GRP78* 蛋白表达的影响。将不同剂量的 pCAGGS-nsp14-Flag (0.5 μ g、1.0 μ g、2.0 μ g) 转染到细胞中, 36 h 后向细胞培养液中加入 TM 或 Tg, 转染后 44 h 收集样品, 通过 Western Blot 检测 *GRP78* 蛋白表达的变化。在 HEK293t 细胞上的试验结果如图 4-31 所示, nsp14 过表达组 (Lane 3、Lane 4、Lane 5) *GRP78* 表达量随着 nsp14 表达量的增加而逐渐减少,

其中 nsp14 表达量较多的两组（Lane 4、Lane 5）的 GRP78 表达量要明显低于刺激剂对照组（Lane 2），表明 PEDV nsp14 能呈剂量依赖性抑制 HEK293t 细胞中 GRP78 蛋白的表达。Vero 细胞上试验结果与 HEK293t 细胞上试验结果相似，表明 PEDV nsp14 也能有效抑制 Vero 细胞中 GRP78 蛋白的表达（图 4-32）。另外也在 LLC-PK1 细胞上进行了测试，试验结果显示 PEDV nsp14 过表达组 nsp14 的条带并不明显，提示 nsp14 过表达的效率不高，但过表达 nsp14 后又经 TM 处理的细胞中（Lane 4）GRP78 蛋白的量还是低于 TM 对照组（Lane 3），表明在 LLC-PK1 细胞中 PEDV nsp14 也能有效抑制 GRP78 蛋白的表达（图 4-33）。

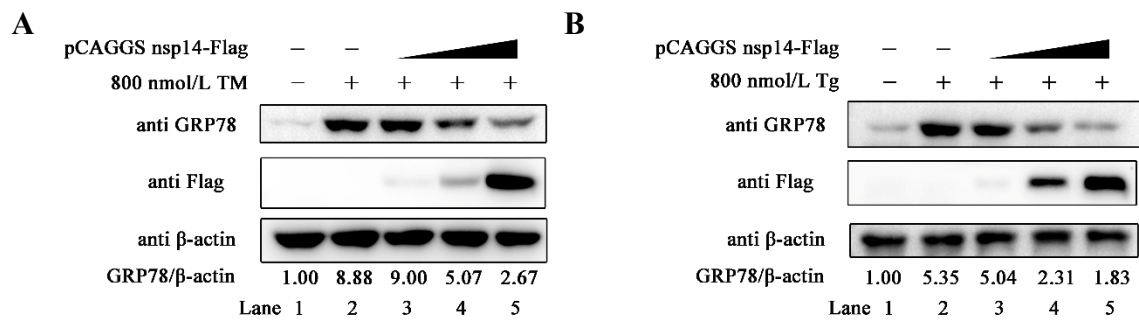


图 4-31 PEDV nsp14 抑制 HEK293t 细胞中 GRP78 的表达

Fig 4-31 PEDV nsp14 inhibits the expression of GRP78 in HEK293t cells

(A) nsp14 抑制 TM 诱导的 GRP78 表达；(B) nsp14 抑制 Tg 诱导的 GRP78 表达

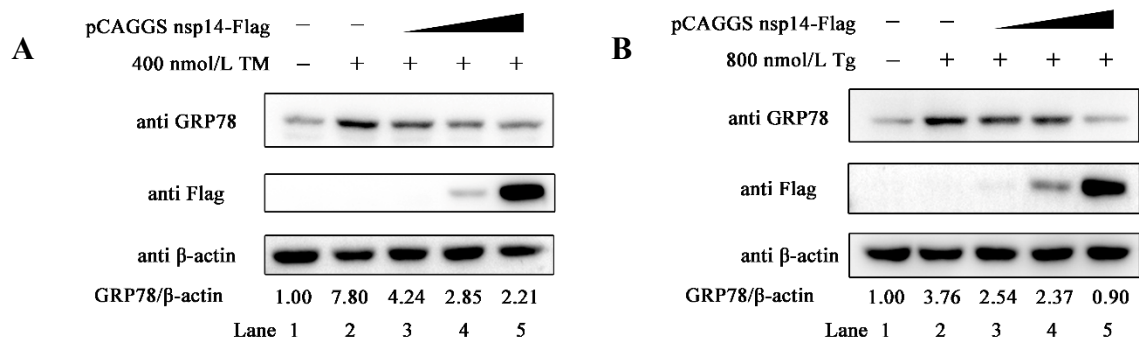


图 4-32 PEDV nsp14 抑制 Vero 细胞中 GRP78 的表达

Fig 4-32 PEDV nsp14 inhibits the expression of GRP78 in Vero cells

(A) nsp14 抑制 TM 诱导的 GRP78 表达；(B) nsp14 抑制 Tg 诱导的 GRP78 表达

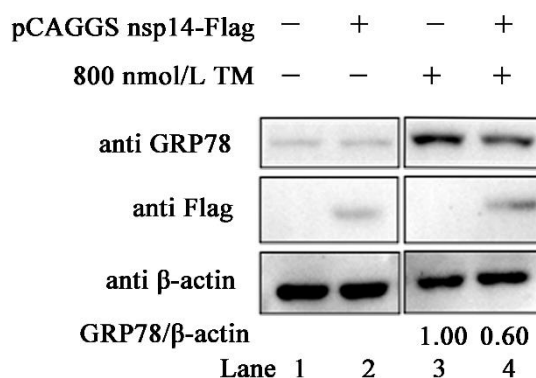
图 4-33 PEDV nsp14 抑制 LLC-PK1 细胞中 *GRP78* 的表达

Fig 4-33 PEDV nsp14 inhibits the expression of GRP78 in LLC-PK1 cells

4.3.3 PEDV nsp14 氨基酸序列保守性分析

为明确抑制 *GRP78* 表达是否是不同 PEDV 毒株 nsp14 共有的特性，对不同基因型 PEDV 毒株 nsp14 的氨基酸序列进行序列比对和同源性分析。从 GenBank 中收集了 83 株 PEDV 的全基因组序列，初步分析发现这些毒株 nsp14 的氨基酸序列共存在 24 种序列类型，每种类型挑选一个代表进行序列比对和同源性分析，这些代表序列对应的 PEDV 毒株涵盖了 GI-a、GI-b、GII-a、GII-b、GII-c (S-INDEL) 基因亚型（图 4-34），其中 PEDV YN1 毒株 nsp14 的核酸序列与本试验构建真核表达载体时所用的 PEDV YN15 毒株 nsp14 核酸序列完全相同。同源性分析结果显示这 24 种 PEDV nsp14 氨基酸序列类型两两之间的同源性均超过 98%，同源性平均值为 99.25%，不同氨基酸序列类型两两之间平均只有 1.5 个氨基酸不同（表 4-1）。序列比对结果显示这 24 种氨基酸序列类型都不存在氨基酸的插入和缺失，且第 90 位天门冬氨酸（D90）、第 92 位谷氨酸（E92）、第 242 位天门冬氨酸（D242）、第 267 位组氨酸（H267）、第 272 位天门冬氨酸（D272）、第 330 位天门冬氨酸（D330）、第 332 位甘氨酸（G332）、第 334 位脯氨酸（P334）、第 335 位赖氨酸（K335）、第 350 位天门冬氨酸（D350）等能影响 nsp14 酶活性的功能位点全部未出现突变（图 4-35）（Bouvet et al 2012, Lu et al 2020）。

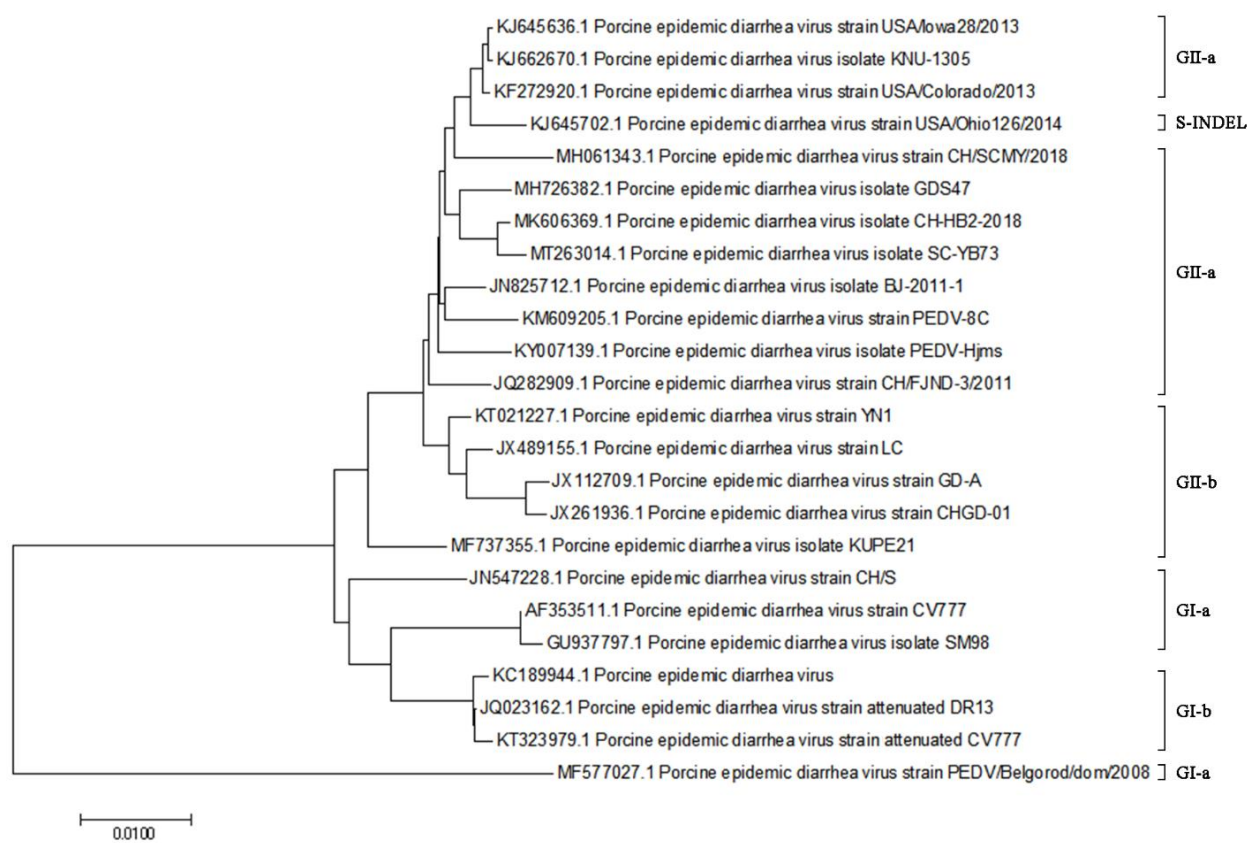


图 4-34 不同 nsP14 氨基酸序列类型代表 PEDV 毒株的全基因组进化树

Fig 4-34 Genome-wide phylogenetic tree of representative PEDV strains for different nsP14 amino acid sequence types

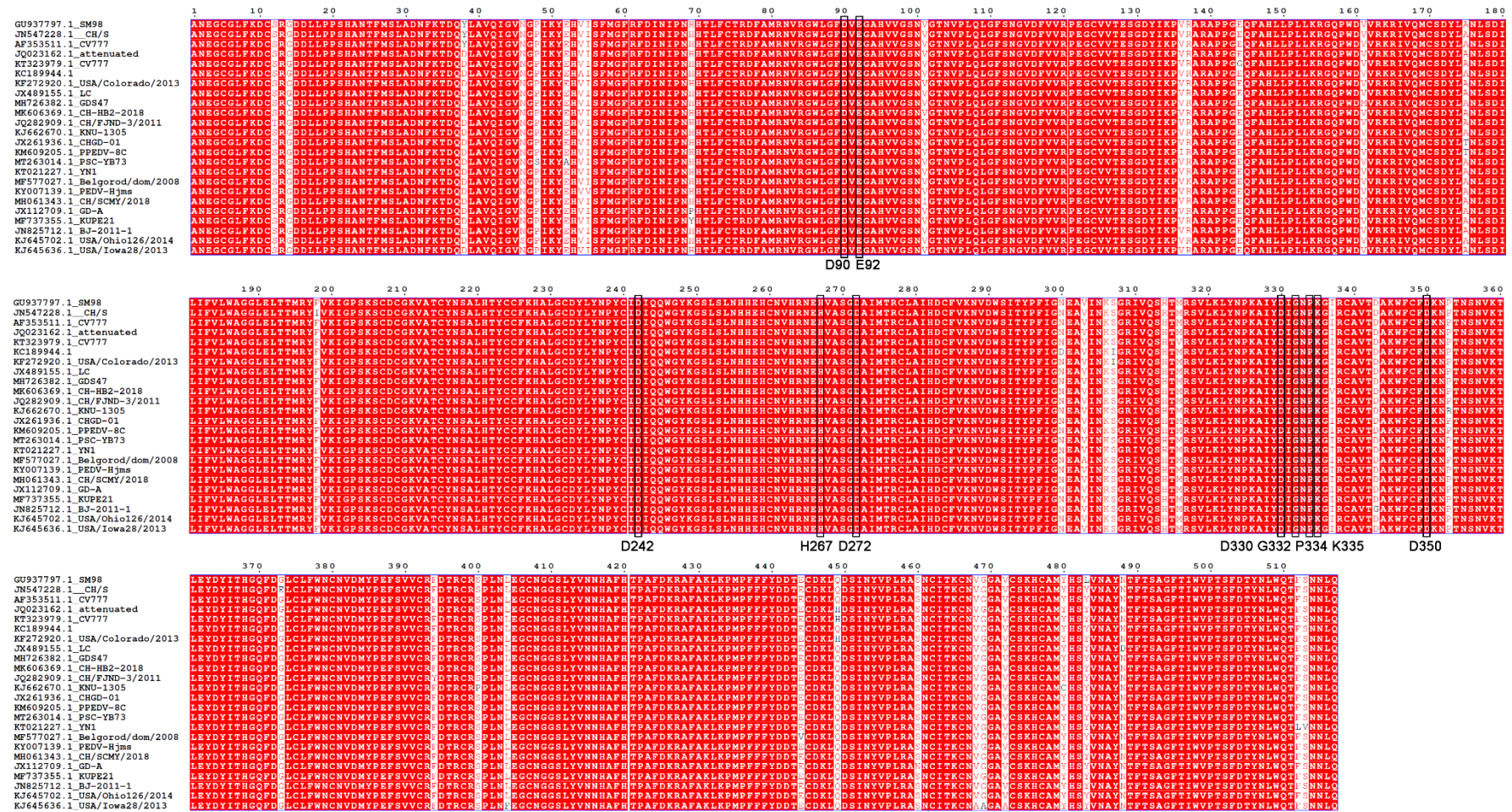


图 4-35 PEDV nsp14 24 种类型氨基酸序列的比对分析

Fig 4-35 Alignment analysis of 24 types of amino acid sequences for PEDV nsp14

表 4-1 PEDV ns14 24 种类型氨基酸序列的同源性分析

Table 4-1 Homology analysis of of 24 types of amino acid sequences for PEDV ns14

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1. AF353511.1_CV777		99.81%	99.42%	99.61%	99.61%	99.42%	99.22%	99.61%	99.61%	99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%	99.61%	99.61%	99.42%	99.61%	99.42%
2. GU937797.1_SM98	99.81%		99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.03%	99.42%	99.42%	99.03%	99.22%	98.83%	99.42%	99.03%	99.22%	99.22%	99.03%	99.42%	99.03%	99.42%	99.42%	99.22%	99.42%	99.22%
3. JN547228.1_CH/S	99.42%	99.22%		99.03%	99.03%	98.83%	98.64%	99.03%	99.03%	98.64%	98.83%	98.44%	99.03%	98.64%	98.83%	98.83%	98.64%	99.03%	98.64%	99.03%	99.03%	98.83%	99.03%	98.83%
4. JN825712.1_BJ-2011-1	99.61%	99.42%	99.03%		99.61%	99.42%	99.22%	99.61%	99.61%	99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%	99.61%	99.61%	99.42%	99.61%	99.42%
5. JQ023162.1_attenuated_DR13	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%		99.42%	99.22%	99.61%	99.61%	99.22%	99.81%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.61%	99.22%	99.61%	99.61%	99.42%	99.61%	99.42%	99.42%
6. JQ282909.1_CH/FJND-3/2011	99.42%	99.22%	98.83%	99.42%	99.42%		99.03%	99.42%	99.42%	99.03%	99.22%	98.83%	99.42%	99.03%	99.22%	99.22%	99.03%	99.42%	99.03%	99.42%	99.42%	99.22%	99.42%	99.22%
7. JX112709.1_GD-A	99.22%	99.03%	98.64%	99.22%	99.22%	99.03%		99.22%	99.22%	98.83%	99.03%	98.64%	99.22%	98.83%	99.03%	99.03%	98.83%	99.22%	98.83%	99.42%	99.22%	99.03%	99.22%	99.03%
8. JX261936.1_CHGD-01	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%	99.61%	99.42%	99.22%		99.61%	99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.81%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%	99.61%	99.61%	99.42%	99.61%	99.42%
9. JX489155.1_LC	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%	99.61%	99.42%	99.22%	99.61%		99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%	99.61%	99.61%	99.42%	99.61%	99.42%
10. KC189944.1	99.22%	99.03%	98.64%	99.22%	99.22%	99.03%	98.83%	99.22%	99.22%		99.42%	98.64%	99.22%	98.83%	99.03%	99.03%	98.83%	99.22%	98.83%	99.22%	99.22%	99.03%	99.22%	99.03%
11. KF272920.1_USA/Colorado/2013	99.42%	99.22%	98.83%	99.42%	99.81%	99.22%	99.03%	99.42%	99.42%	99.42%		98.83%	99.42%	99.03%	99.22%	99.22%	99.42%	99.42%	99.03%	99.42%	99.42%	99.22%	99.42%	99.22%
12. KJ645636.1_USA/Iowa28/2013	99.03%	98.83%	98.44%	99.03%	99.03%	98.83%	98.64%	99.03%	99.03%	98.64%	98.83%		99.03%	98.64%	98.83%	98.83%	98.64%	99.03%	98.64%	99.03%	99.03%	98.83%	99.03%	98.83%
13. KJ645702.1_USA/Ohio126/2014	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%	99.61%	99.42%	99.22%	99.61%	99.61%	99.22%	99.42%	99.03%		99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%	99.61%	99.61%	99.42%	99.61%	99.42%
14. KJ662670.1_KNU-1305	99.22%	99.03%	98.64%	99.22%	99.22%	99.03%	98.83%	99.22%	99.22%	98.83%	99.03%	98.64%	99.22%		99.03%	99.03%	98.83%	99.22%	98.83%	99.22%	99.22%	99.03%	99.22%	99.03%
15. KM609205.1_PPEDV-8C	99.42%	99.22%	98.83%	99.42%	99.42%	99.22%	99.03%	99.81%	99.42%	99.03%	99.22%	98.83%	99.42%	99.03%		99.22%	99.03%	99.42%	99.03%	99.42%	99.42%	99.22%	99.42%	99.22%
16. KT021227.1_YN1	99.42%	99.22%	98.83%	99.42%	99.42%	99.22%	99.03%	99.42%	99.42%	99.03%	99.22%	98.83%	99.42%	99.03%	99.22%		99.03%	99.42%	99.03%	99.42%	99.42%	99.22%	99.42%	99.22%
17. KT323979.1_CV777	99.22%	99.03%	98.64%	99.22%	99.61%	99.03%	98.83%	99.22%	99.22%	98.83%	99.42%	98.64%	99.22%	98.83%	99.03%	99.03%		99.22%	98.83%	99.22%	99.22%	99.03%	99.22%	99.03%
18. KY007139.1_PEDV-Hjms	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%	99.61%	99.42%	99.22%	99.61%	99.61%	99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.22%		99.22%	99.61%	99.61%	99.42%	99.61%	99.42%
19. MF577027.1_Belgorod/dom/2008	99.22%	99.03%	98.64%	99.22%	99.22%	99.03%	98.83%	99.22%	99.22%	98.83%	99.03%	98.64%	99.22%	98.83%	99.03%	99.03%	98.83%	99.22%		99.22%	99.22%	99.03%	99.22%	99.03%
20. MF737355.1_KUPE21	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%	99.61%	99.42%	99.42%	99.61%	99.61%	99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%		99.61%	99.42%	99.61%	99.42%
21. MH061343.1_CH/SCMY/2018	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%	99.61%	99.42%	99.22%	99.61%	99.61%	99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%	99.61%		99.42%	99.61%	99.42%
22. MH726382.1_GDS47	99.42%	99.22%	98.83%	99.42%	99.42%	99.22%	99.03%	99.42%	99.42%	99.03%	99.22%	98.83%	99.42%	99.03%	99.22%	99.22%	99.03%	99.42%	99.03%	99.42%	99.42%		99.42%	99.22%
23. MK606369.1_CH-HB2-2018	99.61%	99.42%	99.03%	99.61%	99.61%	99.42%	99.22%	99.61%	99.61%	99.22%	99.42%	99.03%	99.61%	99.22%	99.42%	99.42%	99.22%	99.61%	99.22%	99.61%	99.61%	99.42%		99.42%
24. MT263014.1_PSC-YB73	99.42%	99.22%	98.83%	99.42%	99.42%	99.22%	99.03%	99.42%	99.42%	99.03%	99.22%	98.83%	99.42%	99.03%	99.22%	99.22%	99.03%	99.42%	99.03%	99.42%	99.42%	99.22%	99.42%	

4.3.4 PEDV nsp14 抑制 GRP78 蛋白表达依赖其 N7-MTase 功能域

为明确 PEDV nsp14 ExoN 功能域和 N7-MTase 对 GRP78 表达的影响, 根据已经被报道的功能位点构建 ExoN 功能域沉默的 nsp14 的真核表达载体 (突变体 D90A-E92A、突变体 H267L)、N7-MTase 功能域沉默的 nsp14 的真核表达载体 (突变体 G332A、突变体 D350A) 和两个功能域都沉默的 nsp14 的真核表达载体 (突变体 H267L-D350A) (图 4-36) (Bouvet et al 2012, Lu et al 2020)。将野生型 nsp14 的表达载体和各突变体的表达载体分别转染到 HEK293t 细胞中, 36 h 后向培养液中加入 TM (800 nmol/L) 或 Tg (800 nmol/L), 于转染后 44 h 收集样品。Western Blot 结果显示 ExoN 功能域沉默的突变体和野生型 nsp14 能抑制 TM 和 Tg 诱导的 GRP78 表达, 但 N7-MTase 功能域沉默的突变体不能抑制 TM 和 Tg 诱导的 GRP78 表达, 表明 PEDV nsp14 N7-MTase 功能域是抑制 GRP78 表达的主要功能域 (图 4-37)。

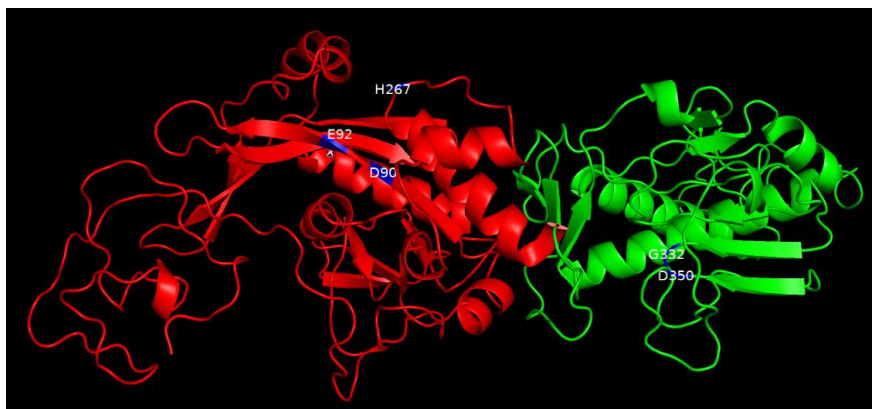


图 4-36 预测 PEDV nsp14 的结构

Fig 4-36 The predicted structure of PEDV nsp14

通过在线工具 SWISS-MODEL 预测 PEDV nsp14 的结构, 红色区域为 ExoN 功能域, 绿色区域为 N7-MTase 功能域, 蓝色标记为功能位点

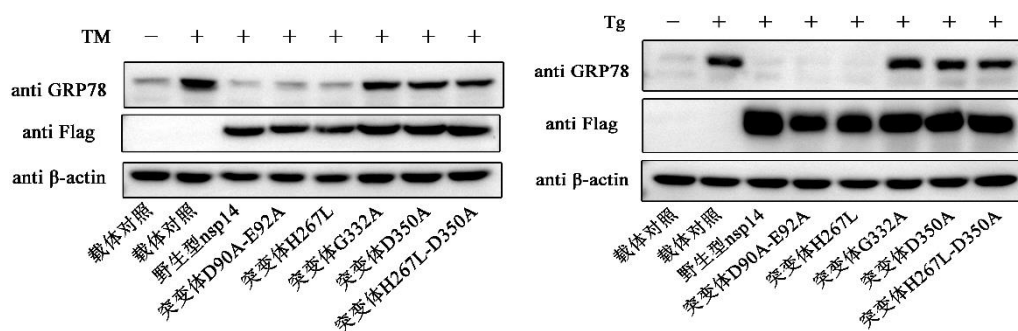


图 4-37 各 PEDV nsp14 突变体对 GRP78 表达的影响

Fig 4-37 The influence of PEDV nsp14 mutant on GRP78 expression

4.3.5 分析与 PEDV nsp14 相互作用的宿主因子

为进一步解释 PEDV nsp14 抑制 GRP78 表达的机制，通过免疫沉淀结合液相色谱-质谱联用的方法解析与 PEDV nsp14 相互作用的宿主因子。将 pCAGGS nsp14-Flag 转染到 HEK293t 细胞中，转染后 36 h 收集样品。使用针对 Flag 标签的单克隆抗体进行免疫沉淀，Western Blot 结果显示针对 Flag 标签的单克隆抗体特异性捕获了融合 Flag 标签的 nsp14 蛋白（图 4-38A）。SDS-PAGE 凝胶银染色结果显示 nsp14 过表达组总蛋白量大于对照组，表明 nsp14 过表达组垂钓到更多蛋白质（图 4-38B）。

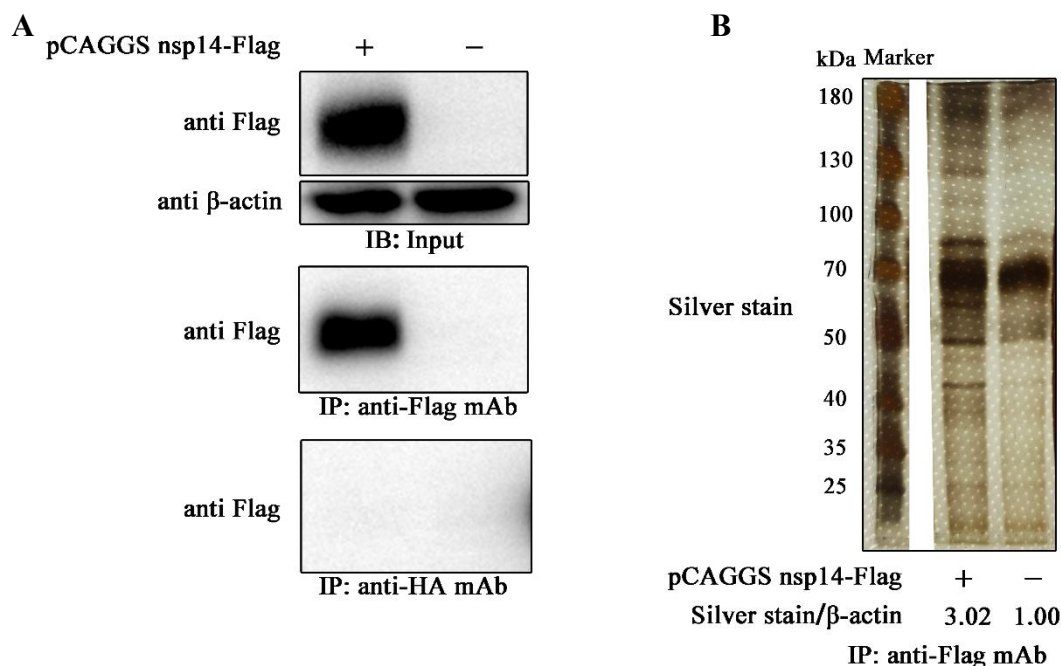


图 4-38 通过免疫沉淀垂钓结合 PEDV nsp14 的宿主蛋白

Fig 4-38 Fishing for host proteins that bind PEDN nsp14 by immunoprecipitation

（A）通过 Western Blot 验证免疫沉淀的效果；（B）通过银染色确定免疫沉淀后各组蛋白含量

对免疫沉淀后的样品进行质谱鉴定，nsp14 组共鉴定到 153 个特异蛋白（表 4-2）。对这些特异蛋白进行 GO 分析发现它们在胞内的分布范围较广，涉及到外泌体、胞质、细胞膜结构和核糖体等地方，这些特异蛋白大部分具有与蛋白质结合或与 RNA 结合的能力，主要参与 rRNA 合成、细胞翻译、RNA 剪切和 tRNA 氨基酰化等生物学过程（图 4-39）。采用 Reactome Pathway 数据库对这些特异蛋白涉及到的信号通路进行聚类分析，结果表明它们主要参与 RNA 剪切和代谢、rRNA 合成、细胞翻译等信号通路（图 4-40）。进一步分析发现细胞翻译方面与 PEDV nsp14 互作的蛋白主要为 RPL21、RPL14、RPS19、RPL5、RPL15、RPS24、RPS16 和 RPL31 等核糖体蛋白，表明 PEDV nsp14 可能影响核糖体亚基的形成。

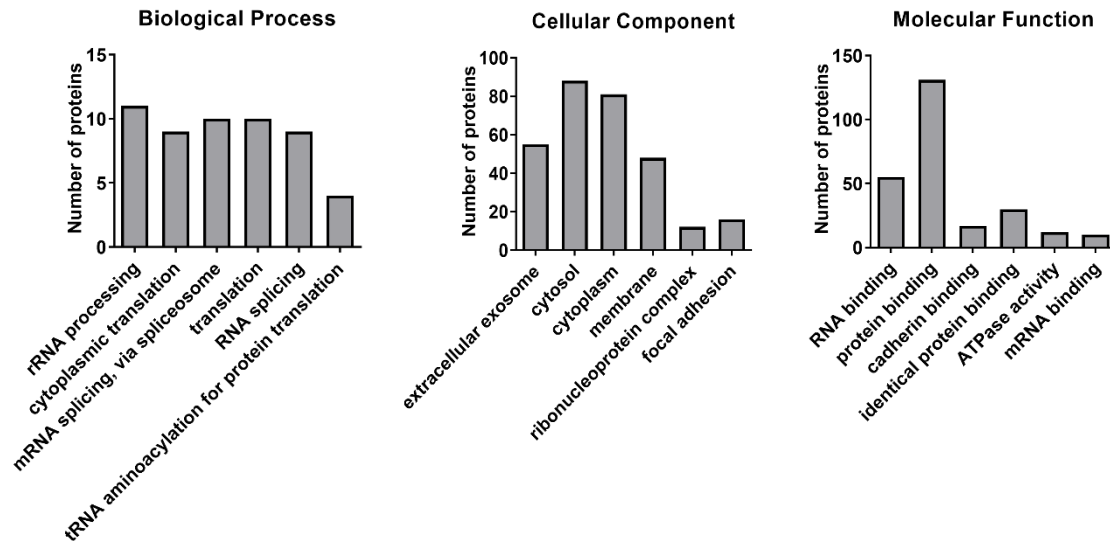


图 4-39 nsp14 组特异蛋白的 GO 注释结果

Fig 4-39 GO annotation results of nsp14 group-specific proteins

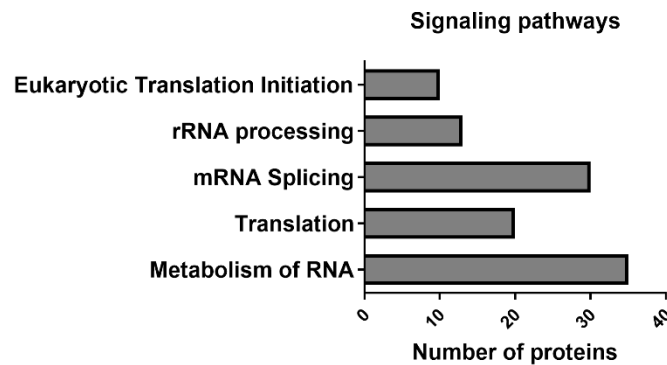


图 4-40 聚类分析 nsp14 组特异蛋白涉及的信号通路

Fig 4-40 Cluster analysis of signaling pathways involved in nsp14 group-specific proteins

表 4-2 与 PEDV nsp14 相互作用的特异性蛋白

Table 4-2 Specific protein interacting with PEDV nsp14

蛋白编号	蛋白名称	蛋白分子量 (kDa)
Q05DD5	Nuclear speckle splicing regulatory protein 1	42.62
A0A0S2Z5J7	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	10.69
A0A024QZY5	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	116.99
A0A7I2V5E6	Rho-related GTP-binding protein RhoC;Transforming protein RhoA	7.10
M0R3F1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	71.61
E7EX53	Ribosomal protein L15;60S ribosomal protein L15	15.72

续表 4-2 与 PEDV nsp14 相互作用的特异性蛋白

Continued Table 4-2 Specific protein interacting with PEDV nsp14

蛋白编号	蛋白名称	蛋白分子量 (kDa)
C9J4N6	Isocitrate dehydrogenase; Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic	17.72
B4E1L0	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	47.94
A0A024R7A8	Aldose reductase; Aldo-keto reductase family 1 member B15	35.85
M0QXG9	BRISC and BRCA1-A complex member 1	11.55
Q96CT7	Coiled-coil domain-containing protein 124	25.84
A4FS09	DNA replication licensing factor MCM4	9.43
R4GMY8	Transcription elongation factor B polypeptide 1	6.97
A0A7I2V4K4	V-type proton ATPase subunit G 1	8.29
A0A384P5S9	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	282.28
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III	46.87
E5RJY1	Protein NDRG1	10.98
A0A0C4DGS1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	48.80
G5E972	Thymopentin	46.31
Q6P1N4	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	107.54
A8K067	Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	73.42
B4DZZ8	Zinc transporter SLC39A7	39.60
B4E3J6	Arginine and glutamate-rich protein 1	26.60
A0A075B6E2	40S ribosomal protein S19	7.83
A0A1W2PRE1	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms Xlas	5.72
A0A087WX58	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	7.25
D6W5E6	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	38.77
A0A7I2V421	ATP-dependent RNA helicase DDX1	39.52
B7Z602	Hypoxia up-regulated protein 1	72.85
A0A087X2D0	Serine/arginine-rich splicing factor 3	10.32
U3KQC1	WD repeat-containing protein 18	43.24
Q6ICT4	Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1	13.34
H3BTW0	BolA-like protein 2	6.36

续表 4-2 与 PEDV nsp14 相互作用的特异性蛋白

Continued Table 4-2 Specific protein interacting with PEDV nsp14

蛋白编号	蛋白名称	蛋白分子量 (kDa)
Q9UP43	Translationally-controlled tumor protein	12.54
A0A0B5EEB2	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	3.86
H0Y6L4	WD repeat-containing protein 64	69.02
A0A0J9YYJ0	Protein canopy homolog 4	13.17
A0A0S2Z3A5	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	23.97
Q5H928	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	17.22
P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	79.69
Q5JRI1	Serine/arginine-rich splicing factor 12	20.91
U3KQT1	S-formylglutathione hydrolase	29.00
Q56VW8	threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B;Serine	51.65
A0A5F9ZHJ7	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	33.50
Q5CAQ4	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	57.23
B4E0N9	Glutamate dehydrogenase;Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial;Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	54.26
Q6IB71	Proteasome subunit alpha type-3	28.42
P68871	Hemoglobin subunit delta	16.00
A0A804HIY9	Kalirin	103.48
A0A1U9X8Y4	Chloride intracellular channel protein	26.79
A0A1W2PRZ7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	34.15
A0A1X7SBZ2	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	80.25
Q9BUV4	60S ribosomal protein L5	12.08
B4DRH6	Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	78.31
B7Z2S7	Radixin	52.65
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	532.40
E7ETK0	40S ribosomal protein S24	15.20
A0A2R8YFR1	Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	5.74
F8VRV7	Dynactin subunit 2	17.04
J3KT38	Growth factor receptor-bound protein 2	12.70

续表 4-2 与 PEDV nsp14 相互作用的特异性蛋白

Continued Table 4-2 Specific protein interacting with PEDV nsp14

蛋白编号	蛋白名称	蛋白分子量 (kDa)
B4DPN7	Erlin-2;Erlin-1	26.82
M0QYT0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	35.90
B4E3E6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	34.19
Q6FHJ9	Cytochrome c oxidase subunit 5B	13.70
B7Z9C4	CTP synthase;CTP synthase 1	35.25
A0A494C0J7	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	78.86
A0A494C189	Histone H2A.V	13.50
A0A5H1ZRQ3	Ig kappa chain C region	11.61
Q05DV5	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	49.25
A0A6Q8PFB2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	55.92
A0A6Q8PHJ6	Heat shock protein beta-1	16.45
A0A6Q8PFU2	Ankyrin repeat domain-containing protein 26	60.52
A0A7I2V3K6	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	27.90
E9PP11	Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein	22.30
A0A8I5KX20	Cytochrome b5 type B	7.14
D3DWL0	Plectin	234.12
E9PAP1	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1	12.42
D6RFH2	Protein CDV3 homolog	11.67
Q66K39	Deoxyribonuclease-2-beta	29.03
E7EPB3	60S ribosomal protein L14	14.56
H0YFY4	ADP-sugar pyrophosphatase	14.90
B3KTG4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	42.71
K7ENK9	Vesicle-associated membrane protein 3	7.78
A8K0P2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	31.58
D6RDI2	Luc7-like protein 3	20.68
B4DSN5	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type	41.26
H0YIC2	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	6.39
Q59GW6	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	42.14
B4DHS3	Nucleolysin TIAR	20.38
A8K5W7	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	105.94

续表 4-2 与 PEDV nsp14 相互作用的特异性蛋白

Continued Table 4-2 Specific protein interacting with PEDV nsp14

蛋白编号	蛋白名称	蛋白分子量 (kDa)
I3L3Q7	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	20.01
H3BV01	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	13.62
C9JKZ2	Nucleobindin-1	31.07
B7Z8S9	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	14.97
Q8IXJ3	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	95.37
B0AZQ4	Structural maintenance of chromosomes protein;Structural maintenance of chromosomes protein 3	141.53
B1ALA9	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	31.39
B1AQP2	Prefoldin subunit 2	16.65
Q76N53	60S ribosomal protein L31	5.60
B2R644	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	31.12
B3KSV9	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	29.44
B7Z9R6	Ezrin	22.47
B4DJL0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	31.36
Q8WWK9	Cytoskeleton-associated protein 2	76.99
B4DZC3	5-3 exoribonuclease 2	102.42
H0YK42	Sorting nexin-2;Sorting nexin-1	35.59
Q59F59	Importin-8;Importin-7	55.52
K7EJE8	Lon protease homolog, mitochondrial	93.30
Q59G73	Exosome component 10	49.22
B4DFE6	ATP synthase subunit gamma	15.73
B4DM33	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	26.58
B4DQG5	Cytosol aminopeptidase	39.35
Q96AF9	Zyxin	50.47
H3BTB3	ATP-dependent RNA helicase DDX19A	14.48
C9J6C5	MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	19.55
H7C0E5	Zinc finger protein ZPR1	42.54

续表 4-2 与 PEDV nsp14 相互作用的特异性蛋白

Continued Table 4-2 Specific protein interacting with PEDV nsp14

蛋白编号	蛋白名称	蛋白分子量 (kDa)
H3BT74	Cyclin-dependent kinase 10	26.47
H7C466	Zinc finger CCCH domain-containing protein 15	7.81
H0YI89	Charged multivesicular body protein 4a	6.91
C9JA28	Translocon-associated protein subunit gamma	20.16
E7ET15	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	118.25
E9PJF0	Mitogen-activated protein kinase;Mitogen-activated protein kinase 3	35.74
E9PPI9	Exosome complex component RRP41	16.58
E9PQI8	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	17.54
F5H702	39S ribosomal protein L48, mitochondrial	12.77
F8WF69	Clathrin light chain A	27.82
G3V1B3	60S ribosomal protein L21	9.89
H0Y512	Adipocyte plasma membrane-associated protein	45.29
H3BMZ1	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	16.16
H7BXY3	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	130.55
I4AY87	Macrophage migration inhibitory factor	12.48
M0QX76	40S ribosomal protein S16	5.56
V9HWP0	Serum amyloid P-component;Serum amyloid P- component(1-203)	25.39
P03973	Antileukoproteinase	14.33
P15924	Desmoplakin	331.77
Q6NZ59	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	12.63
Q2VIN3	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	41.46
P49006	MARCKS-related protein	19.53
P62306	Small nuclear ribonucleoprotein F	9.73
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	55.01
X5DNM4	Lactoylglutathione lyase	20.78
Q08AE9	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	33.78
Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	86.47
Q15046	Lysine--tRNA ligase	68.05

续表 4-2 与 PEDV nsp14 相互作用的特异性蛋白

Continued Table 4-2 Specific protein interacting with PEDV nsp14

蛋白编号	蛋白名称	蛋白分子量 (kDa)
Q3ZAQ7	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21	11.35
Q9Y6H1	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2	15.51
Q5TBR0	Sialic acid synthase	12.40
Q6UWP8	Suprabasin	60.54
Q6ZMS7	Protein ZNF783	61.01
Q9NRN7	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase- phosphopantetheinyl transferase	35.78
Q9NRX5	Serine incorporator 1	50.49
Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	38.44
Q05DD5	Nuclear speckle splicing regulatory protein 1	42.62

4.3.6 PEDV nsp14 抑制细胞翻译

4.3.5 中 GO 注释和信号通路聚类分析结果指出 PEDV nsp14 能与许多细胞翻译相关宿主因子相互作用, 本试验因此进一步评估了 PEDV nsp14 对细胞翻译的影响。将 pCAGGS nsp14-Flag 转染到 HEK293t 细胞中, 36 h 后通过嘌呤霉素标记试验检测细胞总的蛋白质翻译水平。试验结果显示 nsp14 转染组 (Lane 3) 中嘌呤霉素标记蛋白的量要明显少于嘌呤霉素对照组 (Lane 2), 表明 nsp14 过表达对宿主蛋白的翻译有抑制作用 (图 4-41)。

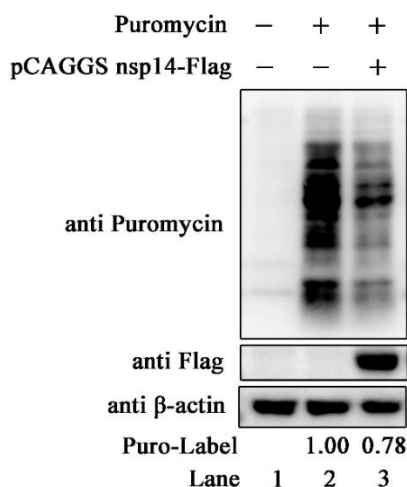


图 4-41 通过嘌呤霉素标记法评估 nsp14 对细胞翻译的影响

Fig 4-41 Assessing the effect of nsp14 on cellular translation by puromycin labeling

4.3.7 PEDV nsp14 的细胞定位

对 nsp14 的细胞定位进行了分析。将 pCAGGS-PEDV nsp14-Flag 转染到 HEK293t 细胞和 Vero 细胞中，转染后 36 h 通过免疫荧光试验检测 nsp14，使用激光共聚焦显微镜采集图片。试验结果显示在 Vero 细胞中 PEDV nsp14 分布于细胞质和细胞核（图 4-42A），在 HEK293t 细胞中 PEDV nsp14 主要分布于细胞核（图 4-42B）。

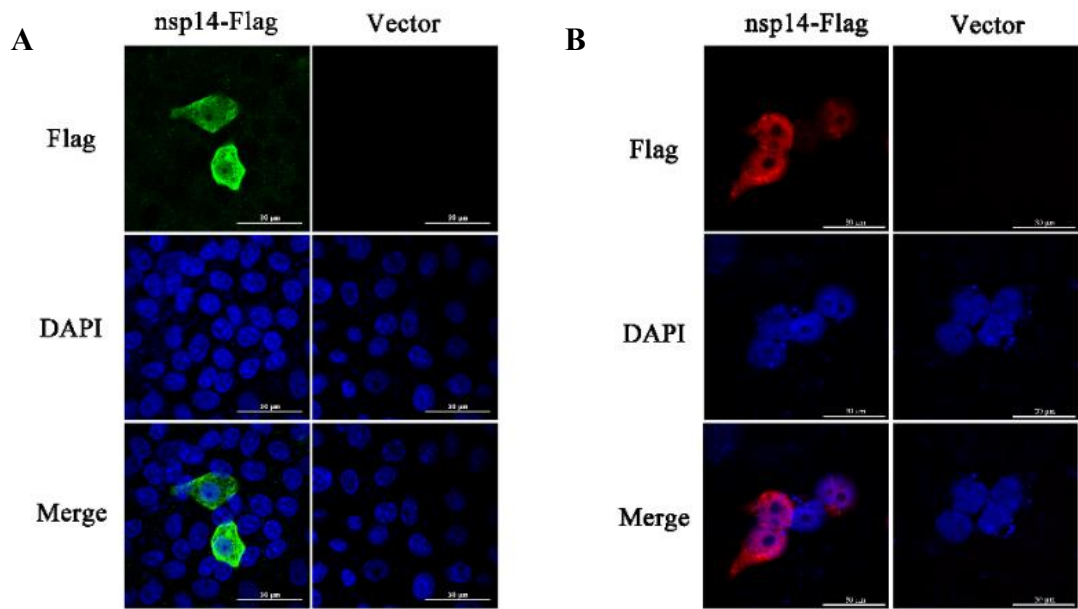


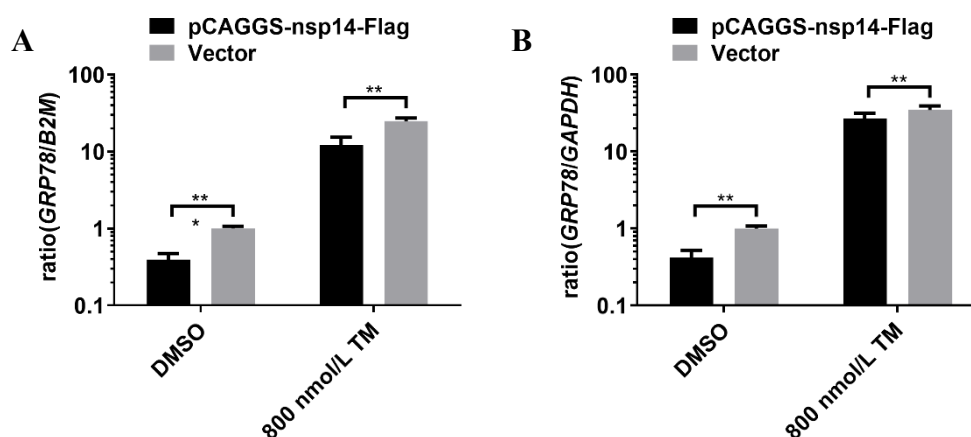
图 4-42 PEDV nsp14 的细胞定位

Fig 4-42 Cellular localization of PEDV nsp14

(A) 在 Vero 细胞中的定位；(B) 在 HEK293t 细胞中的定位

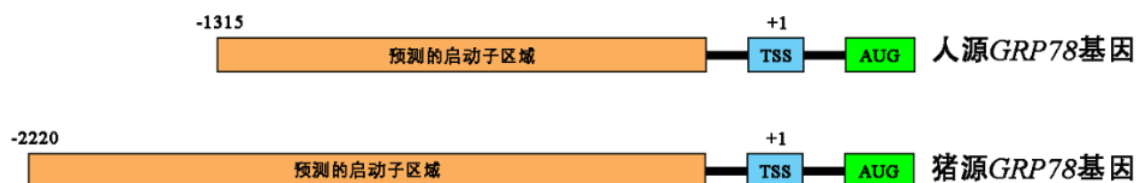
4.3.8 PEDV nsp14 抑制 *GRP78* 启动子活性

前文已经指出 PEDV nsp14 能抑制 HEK293t 细胞中 *GRP78* 的转录（见 4.3.1），本试验进一步在 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞中确认了 PEDV nsp14 对 *GRP78* 基因转录的影响。将 pCAGGS-nsp14-Flag 转染到细胞中，24 h 使用 TM 处理细胞，于转染后 32 h 收样，通过相对定量 PCR 检测 *GRP78* 的转录水平。试验结果显示无论在 Vero 细胞还是 LLC-PK1 细胞中，nsp14 转染组 *GRP78* 的转录水平均低于载体对照组，表明 PEDV nsp14 也能抑制 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞中 *GRP78* 基因的转录（图 4-43）。

图 4-43 PEDV nsp14 对 *GRP78* 转录的影响Fig 4-43 The influence of PEDV nsp14 on *GRP78* transcription

(A) Vero 细胞中试验; (B) LLC-PK1 细胞中试验

鉴于 PEDV nsp14 能进入细胞核 (见 4.3.7), 本试验进一步验证了 nsp14 是否通过干扰 *GRP78* 启动子活性抑制 *GRP78* 转录。使用 Promoter 2.0 预测人和猪 *GRP78* 启动子, 启动子预测结果见图 4-44。以双萤光素酶质粒 psiCheckII 为骨架构建启动子活性鉴定质粒, 将它们分别转染到 HEK293t 细胞中, 于转染后 36 h 检测萤光素酶报告基因。试验结果如图 4-45 所示, 人源 *GRP78* 启动子载体、猪源 *GRP78* 启动子载体转染组萤火虫萤光素酶的表达式高于阳性对照组 (转染原始 psiCheckII 质粒), 表明预测的人源和猪源 *GRP78* 启动子序列能起始基因的转录。后续试验中发现 PEDV nsp14 能抑制阳性对照载体 (原始 psiCheckII 质粒) 介导的萤火虫萤光素酶的表达, 这对结果判定造成影响。因此构建了以 pCAGGS-mRFP 质粒为骨架的 *GRP78* 启动子载体用于检测 PEDV nsp14 对 *GRP78* 启动子活性的影响。将 PEDV nsp14 表达质粒与基于 pCAGGS-mRFP 的 *GRP78* 启动子重组质粒共转染到 HEK293t 细胞中, 36 h 后通过流式细胞术评估 mRFP 阳性细胞率和细胞平均荧光强度。试验结果如图 4-46 所示, 与 PEDV nsp14 共转染会减少 *GRP78* 启动子介导了 mRFP 表达, 但原始质粒 (pCAGGS-mRFP) 介导的 mRFP 表达不受 nsp14 干扰, 表明 PEDV nsp14 能抑制人源和猪源 *GRP78* 启动子的活性。

图 4-44 *GRP78* 基因启动子预测结果Fig 4-44 Prediction results of *GRP78* gene promoter

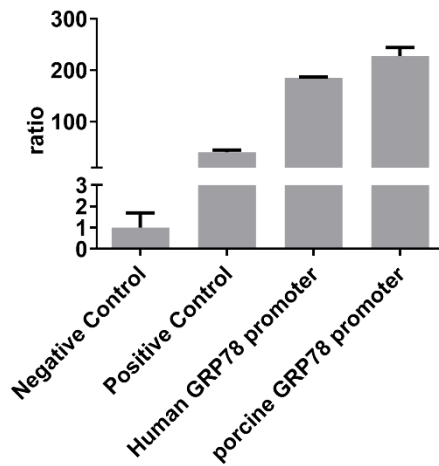


图 4-45 鉴定预测序列的启动子活性

Fig 4-45 Identify the promoter activity of the predicted sequence

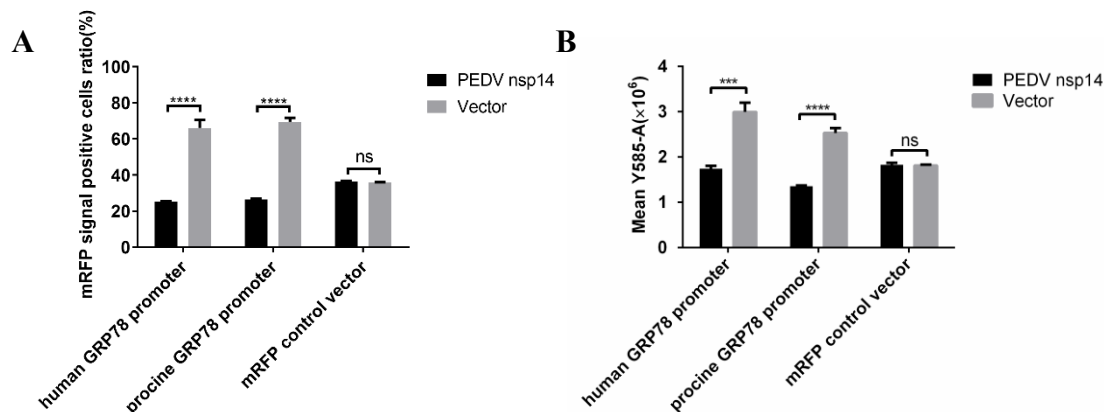


图 4-46 PEDV nsp14 抑制 GRP78 启动子活性

Fig 4-46 PEDV nsp14 represses GRP78 promoter activity

(A) mRFP 阳性细胞率；(B) 细胞平均荧光强度

4.4 开发靶向内质网应激的抗 PEDV 分子

4.4.1 筛选靶向内质网应激的抗 PEDV 分子

4.1 已经指出激活内质网应激能有效抑制多种基因型 PEDV 复制，提示内质网应激是开发抗 PEDV 药物的良好靶标，因此本试验进一步以内质网应激为靶筛选抗 PEDV 分子。通过查阅文献收集到四种能激活内质网应激的天然小分子（见表 4-3）并初步测试它们的抗 PEDV 活性。用 0.1 MOI PEDV 感染 Vero 细胞，在病毒感染的同时加入待测药物，于 36 hpi 通过免疫荧光检测病毒含量，试验结果显示 100 μ mol/L 欧当归内酯 A（Levistolide A, LA）组和 1 mmol/L α -硫辛酸组中 PEDV 阳性信号明显少于 DMSO 对照组和 PEDV 对照组（图 4-47），表明 LA 和 α -硫辛酸具有抑制 PEDV 复制的能力。

表 4-3 四种能激活内质网应激的天然小分子

Table 4-3 Four natural small molecules that can activate ER stress

小分子名称	文献描述
α -硫辛酸 (α -Lipoic acid)	经 500 $\mu\text{mol/L}$ α -硫辛酸处理后 FaO 细胞中 <i>GRP78</i> 、 <i>CHOP</i> 表达量增加且所有 UPR 通路被激活 (Pibiri et al 2020)。
虎杖苷 (Polydatin)	经 20 $\mu\text{mol/L}$ 虎杖苷处理后 UMSCC103 细胞中 <i>IRE1α</i> 、 <i>PERK</i> 通路被激活 (Mele et al 2018)。
欧当归内酯 A (Levistolide A)	HCT116 细胞经 LA 处理后细胞中 <i>GRP78</i> 和 <i>CHOP</i> 的表达量增加、 <i>eIF2α</i> 磷酸化水平上升 (Yang et al 2017)。
棕榈酸 (Palmitic acid)	Saos-2 细胞经棕榈酸处理后细胞中 <i>GRP78</i> 和 <i>CHOP</i> 的表达量增加 (Yang et al 2018)。

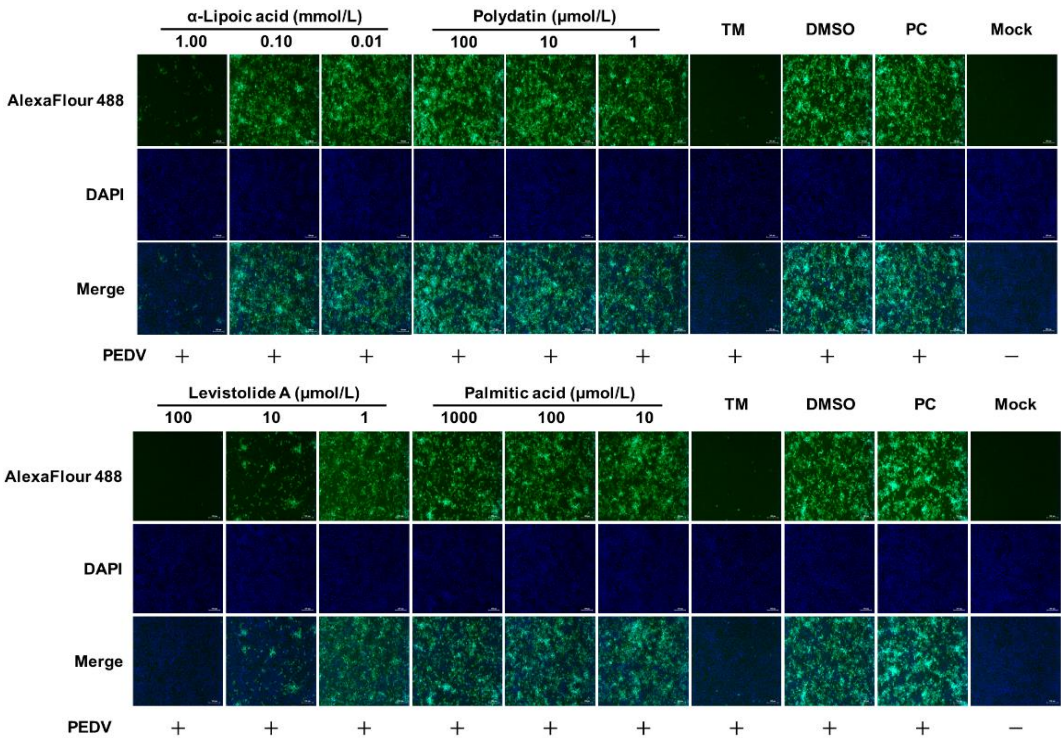


图 4-47 四种天然小分子对 PEDV 复制的影响

Fig 4-47 The influence of four natural small molecules on PEDV replication

4.4.2 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 在细胞中的复制

本试验进一步探究了 LA 的抗 PEDV 能力，首先通过 CCK-8 试验测定 LA 的细胞毒性。试验结果显示 20 至 100 $\mu\text{mol/L}$ LA 对 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞没有明显毒性（图 4-48）。

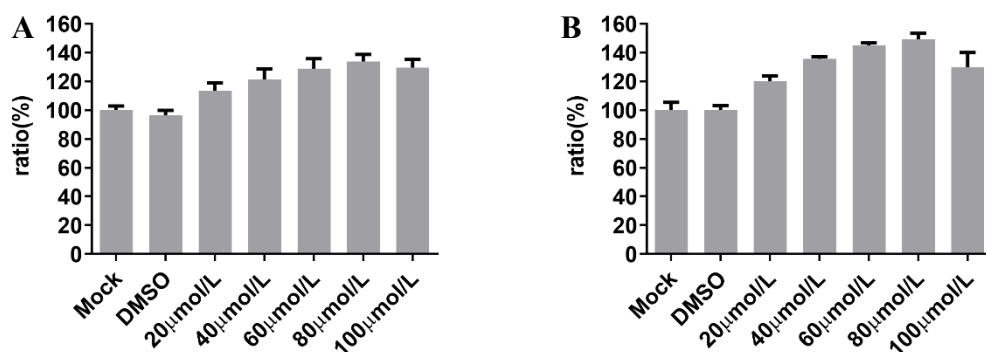


图 4-48 LA 的细胞毒性

Fig 4-48 Cytotoxicity of LA

LA 处理后 48 h 通过 CCK-8 法检测细胞活性。

(A) LA 对 Vero 细胞的毒性；(B) LA 对 LLC-PK1 细胞的毒性

为明确 LA 的抗 PEDV 能力，本试验测定了 LA 对 GI 基因型 PEDV (DR13) 和 GII 基因型 PEDV (YN15) 复制的影响。使用 0.1 MOI PEDV 感染 Vero 细胞，病毒接种的同时加入 LA (20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$)，在 36 hpi 收集样品。针对 PEDV DR13 毒株的测试结果如图 4-49 所示，免疫荧光结果显示 LA 处理组 PEDV 阳性信号均低于 DMSO 对照组和病毒对照组 (图 4-49A)，TCID₅₀ 和定量 PCR 结果显示 LA 处理组中 PEDV 滴度和 RNA 拷贝数显著低于对照组，且 PEDV 的滴度和 RNA 拷贝数随着 LA 浓度增加而逐渐下降 (图 4-49B、4-49C)，表明 LA 呈剂量依赖性抑制 GI 基因型 PEDV 复制。针对 PEDV YN15 毒株的测试结果显示 LA 也能显著抑制 GII 基因型 PEDV 的复制，且该抑制效果也呈剂量依赖性增强 (图 4-50)。

为排除细胞特异性的影响，本试验也在 LLC-PK1 细胞上测试了 LA 对 PEDV 复制的影响。试验结果显示 LA 处理组的病毒滴度显著低于 DMSO 对照组和病毒对照组，且病毒滴度随着 LA 浓度的增加而进一步减少 (图 4-51)，表明 LA 也能呈剂量依赖性抑制 LLC-PK1 中 PEDV 的复制。

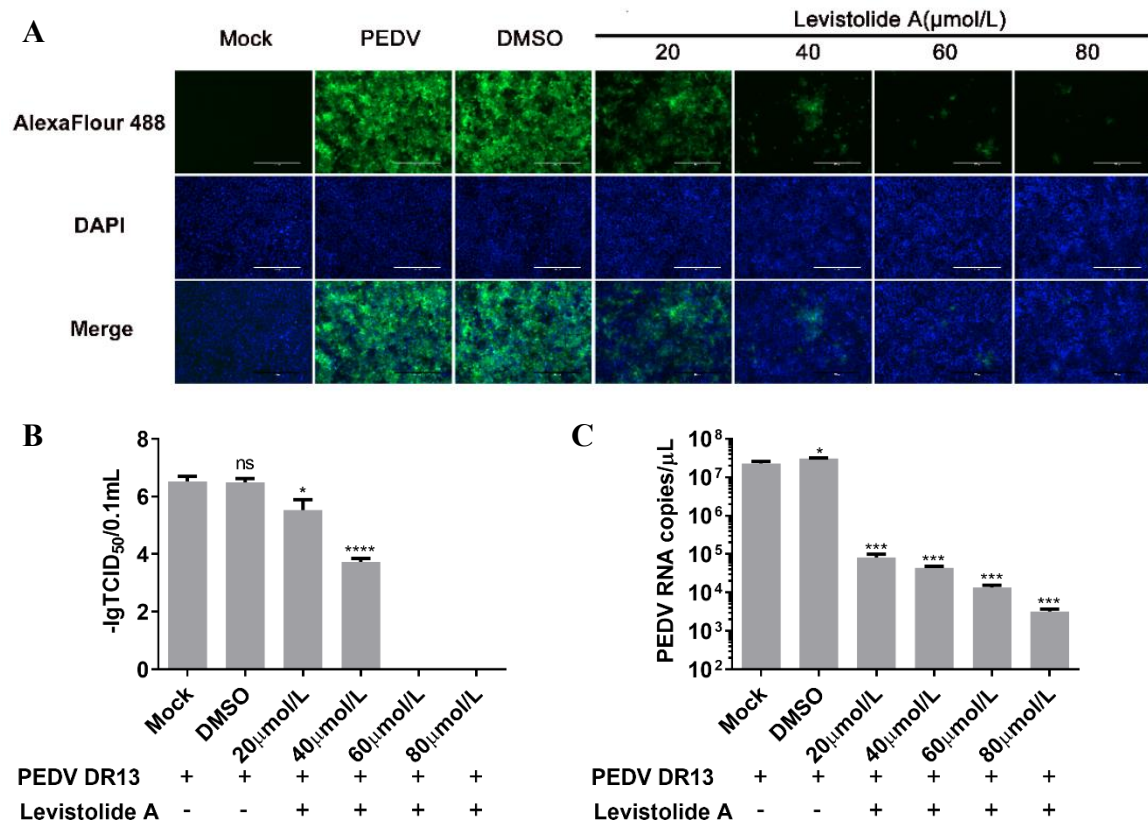


图 4-49 LA 抑制 Vero 细胞中 GI 基因型 PEDV 的复制

Fig 4-49 LA inhibits the replication of GI genotype PEDV in Vero cells

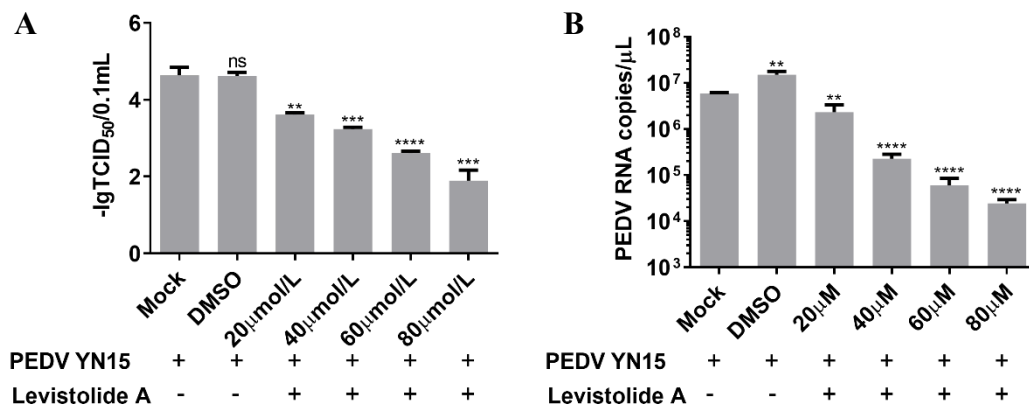
(A) 免疫荧光试验结果; (B) TCID₅₀ 试验结果; (C) 定量 PCR 结果

图 4-50 LA 抑制 Vero 细胞中 GII 基因型 PEDV 的复制

Fig 4-50 LA inhibits the replication of GII genotype PEDV in Vero cells

(A) TCID₅₀ 试验结果; (B) 定量 PCR 结果

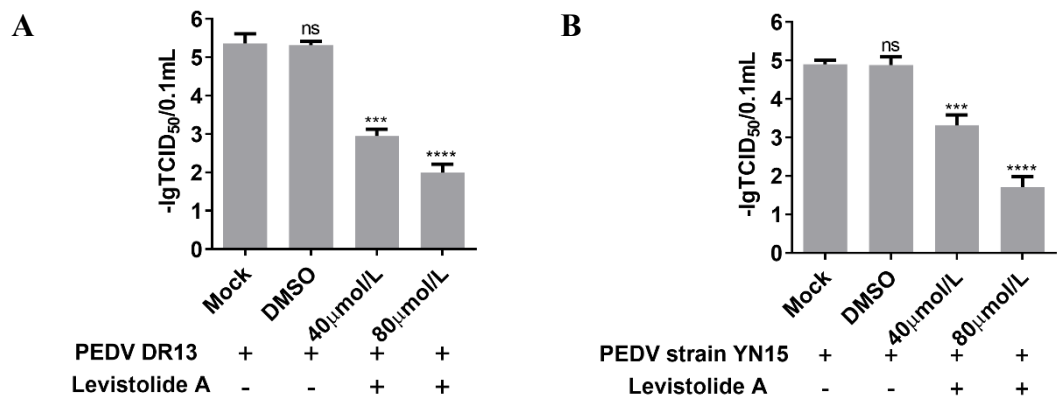


图 4-51 LA 抑制 LLC-PK1 细胞中 PEDV 的复制

Fig 4-51 LA inhibits the replication of PEDV in LLC-PK1 cells

(A、B) 分别是针对 PEDV DR13 毒株和 PEDV YN15 毒株的试验结果

4.4.3 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 吸附和入侵宿主细胞

为探究 LA 具体在病毒复制的哪个阶段起作用，使用 0.1 MOI PEDV 感染 Vero 细胞，在 PEDV 感染后不同时间段用 80 μmol/L LA 处理细胞，具体试验方案见图 4-52。试验结果显示在病毒感染后 0-2 hpi 用 LA 处理细胞会显著抑制 PEDV DR13 毒株和 YN15 毒株的复制（图 4-53）。0-2 hpi 是 PEDV 吸附和入侵细胞的时间段，说明 LA 可以干扰 PEDV 的吸附和入侵（Li et al 2020）。

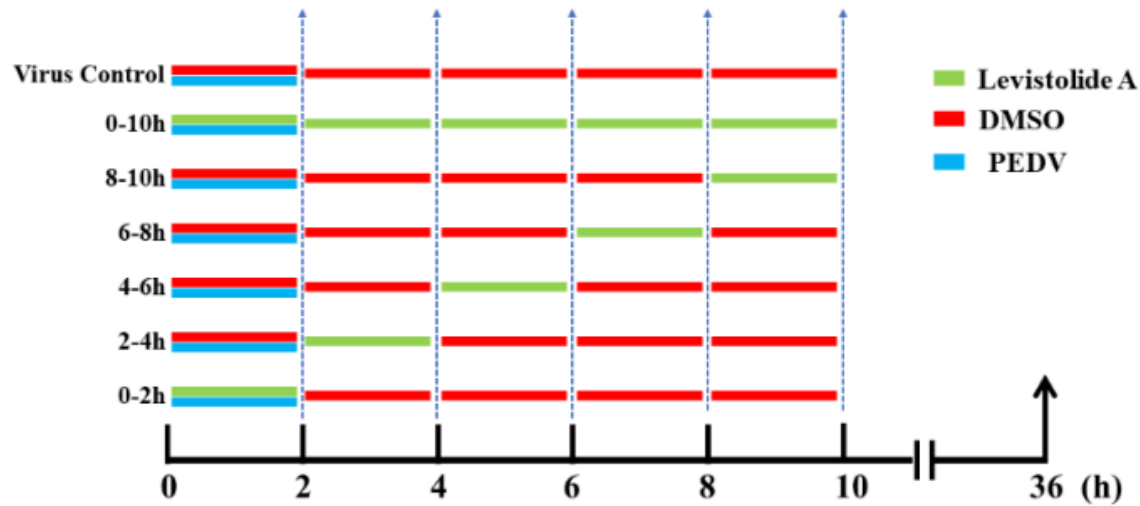


图 4-52 LA 处理细胞的方案

Fig 4-52 Protocol for treating cells with LA

蓝色箭头表示弃掉细胞板内液体；黑色箭头表示收集样品

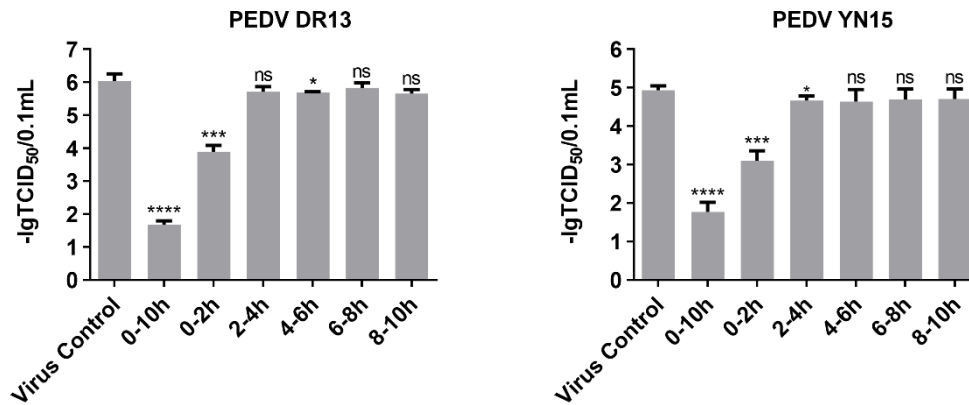


图 4-53 在 PEDV 感染后不同时间段用 LA 处理细胞对病毒复制的影响

Fig 4-53 The influence of treating cells with LA at different time periods
after virus challenge on PEDV replication

4.4.4 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 依赖内质网应激

为明确 LA 的抗 PEDV 作用和内质网应激的联系, 本试验首先在 Vero 细胞上测定了 LA 对内质网应激的影响。定量 PCR 检测结果显示经 LA (80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后 Vero 细胞中 *ATF4*、*CHOP*、*GRP78* 等内质网应激相关基因的转录显著增加 (图 4-54A), Western Blot 结果显示经 LA 处理 36 h 后 Vero 细胞中 *GRP78* 表达量显著增加 (图 4-54B), 这些结果表明 80 $\mu\text{mol/L}$ LA 能在 Vero 细胞上激活内质网应激。使用 4-PBA 干扰 LA 对 *GRP78* 的诱导, 以进一步评估 LA 是否通过激活内质网应激发挥抗 PEDV 作用。使用 0.1 MOI PEDV 感染 Vero 细胞, 病毒感染的同时加入 80 $\mu\text{mol/L}$ LA 和 300 $\mu\text{g/mL}$ 4-PBA, 于 36 hpi 收集样品并通过免疫荧光检测病毒含量。试验结果如图 4-55 所示, LA 单独处理组 PEDV 阳性信号显著低于 PEDV 阳性对照组, 而 LA 和 4-PBA 共处理组 PEDV 阳性信号高于 LA 单独处理组, 表明抑制内质网应激拮抗了 LA 的抗 PEDV 作用。

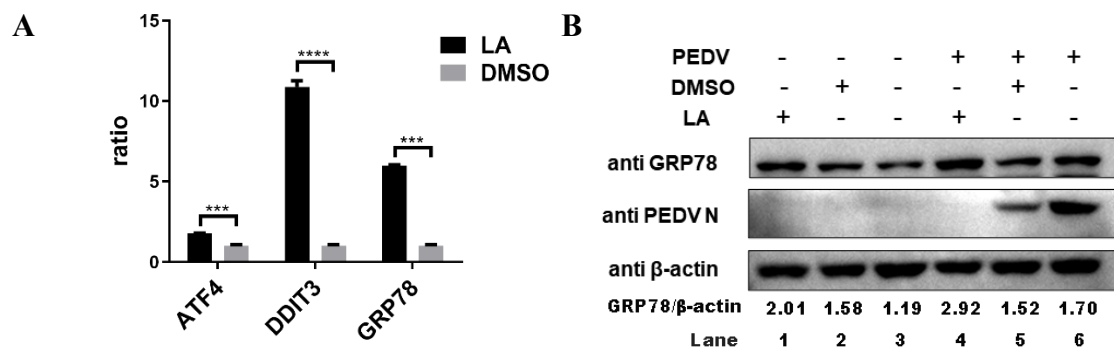


图 4-54 LA 能在 Vero 细胞上激活内质网应激

Fig 4-54 LA can activate ER stress on Vero cells

(A) 经 80 $\mu\text{mol/L}$ LA 处理后 Vero 细胞中内质网应激相关基因转录的变化;

(B) 经 80 $\mu\text{mol/L}$ LA 处理后 Vero 细胞中 *GRP78* 表达的变化, 此处 PEDV 感染量为 0.1 MOI

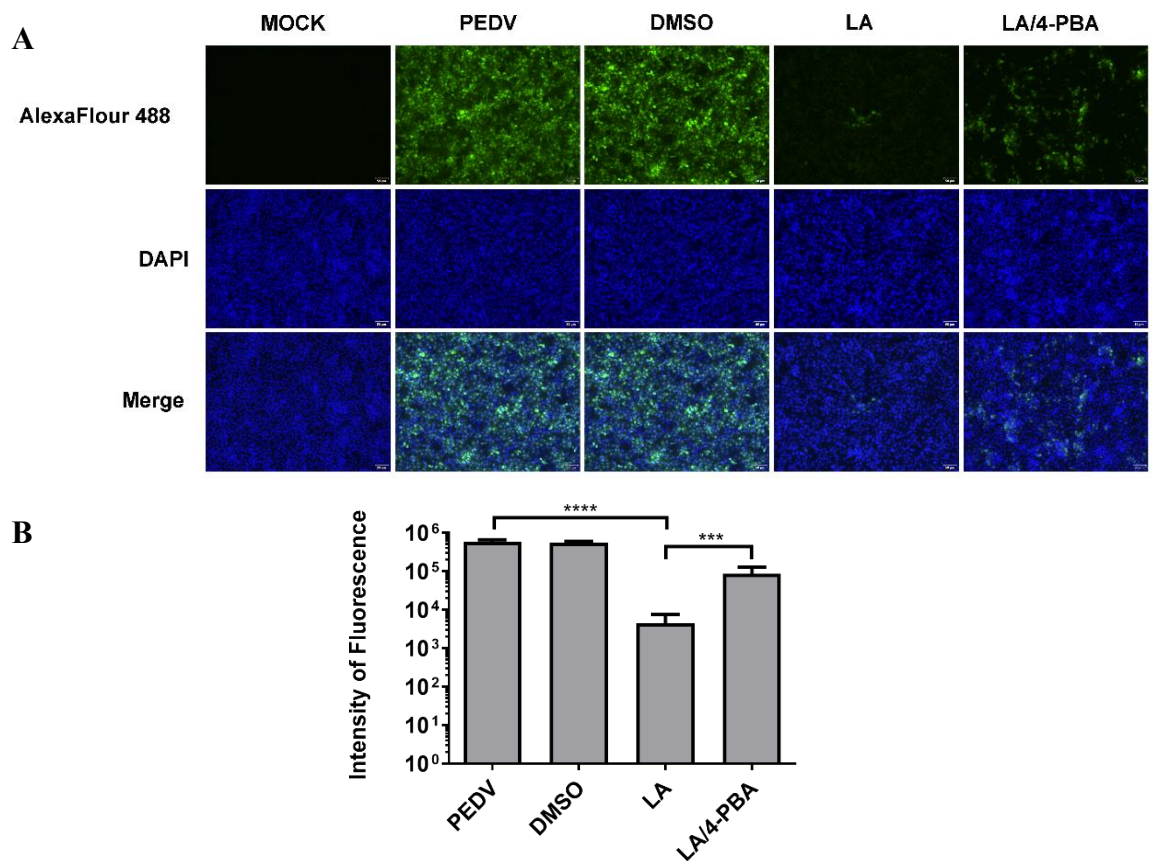


图 4-55 抑制内质网应激拮抗 LA 的抗 PEDV 作用

Fig 4-55 Inhibition of ER stress antagonizes the anti-PEDV effect of LA

(A) 免疫荧光结果；(B) 针对 A 的荧光强度分析

4.4.5 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 依赖氧化应激

有研究指出 LA 诱导细胞内质网应激依赖氧化应激途径，为明确 LA 抑制 PEDV 复制是否依赖氧化应激，本试验首先在 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞上测定了 LA 对细胞氧化应激的影响 (Yang et al 2017)。使用 80 $\mu\text{mol/L}$ LA 处理细胞，24 h 后通过试剂盒评估细胞内活性氧水平。结果显示无论是在 Vero 细胞中还是在 LLC-PK1 细胞中，LA 处理组活性氧水平均高于对照组，表明 LA 能有效在 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞中激活氧化应激 (图 4-56)。使用氧化应激抑制剂 NAC 处理细胞以明确氧化应激对 LA 的抗 PEDV 作用的影响。在 PEDV (0.1 MOI) 感染细胞的同时使用 LA (80 $\mu\text{mol/L}$) 和 NAC (5 mmol/L) 处理细胞，于 36 hpi 收集样品。免疫荧光试验结果和 TCID₅₀ 测定结果都显示 NAC 对照组病毒滴度与 DMSO 对照组无明显差异，但 LA、NAC 共处理组病毒含量显著高于 LA 单独处理组，表明抑制细胞氧化应激拮抗了 LA 的抗 PEDV 作用 (图 4-57)。

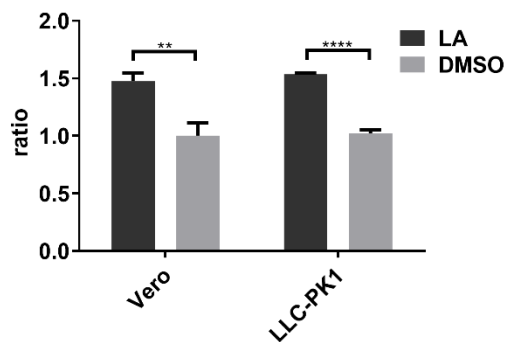


图 4-56 LA 诱导细胞氧化应激

Fig 4-56 LA induces cellular oxidative stress

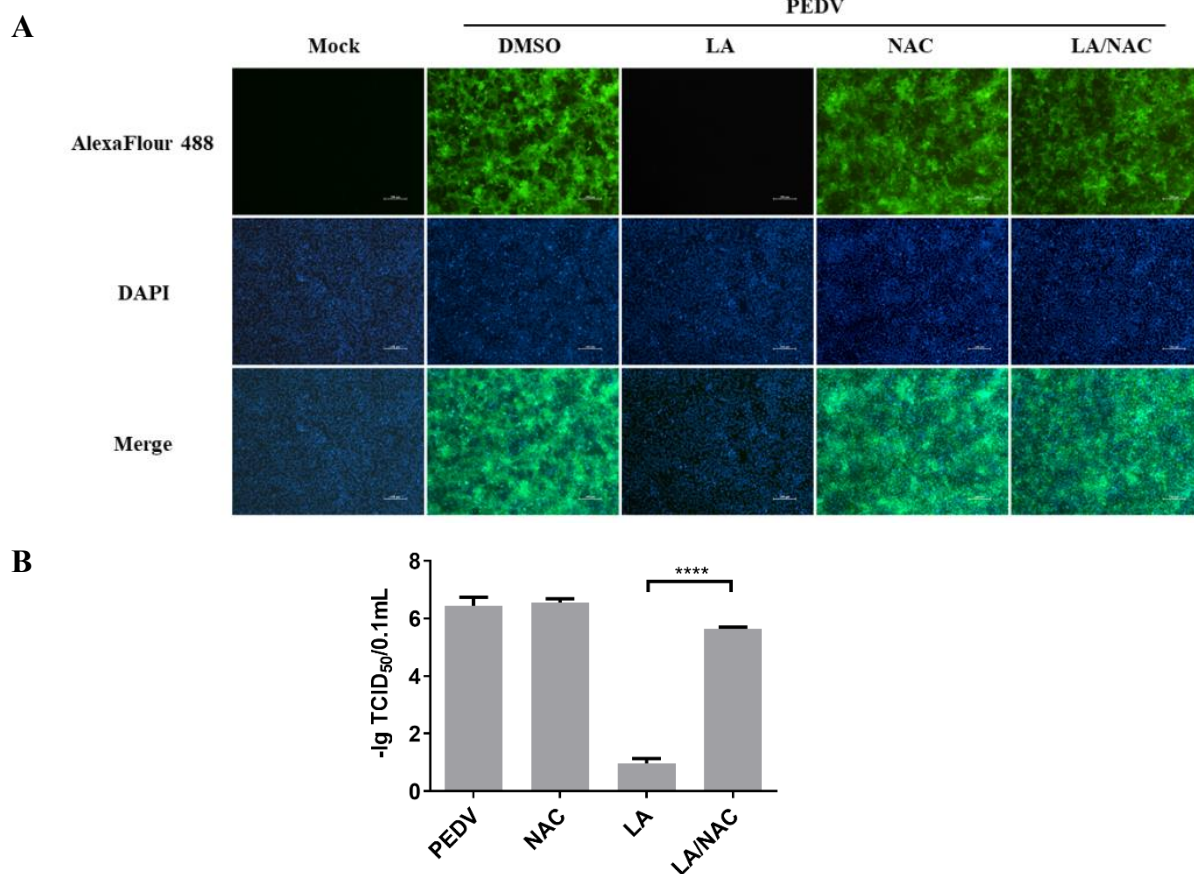


图 4-57 NAC 对 LA 抗 PEDV 作用的影响

Fig 4-57 The influence of NAC on the anti-PEDV effect of LA

(A) 免疫荧光试验结果; (B) TCID_{50} 测定结果

第5章 讨论与结论

5.1 讨论

5.1.1 内质网应激抑制 PEDV 复制及其作用机制

内质网应激是细胞处理非折叠蛋白的机制，在维持内质网稳态和决定细胞命运方面起着重要作用。研究表明内质网应激能够调节多种病毒的复制（Pasqual et al 2011, Frabutt et al 2018, Gladwyn-Ng et al 2018, Chen et al 2020, Ming et al 2022）。有研究曾指出 GRAMD4 和 2-脱氧-D-葡萄糖的抗 PEDV 作用和内质网应激有关，但内质网应激对 PEDV 复制的具体影响还未被明确（Wang et al 2014, Xu et al 2023）。本研究探究了内质网应激对不同基因型 PEDV 复制的影响并发掘了内质网应激调节 PEDV 复制依赖的 UPR 通路和宿主蛋白。

5.1.1.1 激活内质网应激抑制 PEDV 在细胞中的复制

本研究应用 TM 和 Tg 诱导细胞内质网应激，TM 和 Tg 作用于细胞的机制并不相同。TM 源自放线菌，是一种携带 N-乙酰氨基葡萄糖的同源核苷抗生素，它通过阻止 N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸从尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺向多萜醇单磷酸转移抑制 N-连接糖基化（Zhang et al 2020）；Tg 是内质网 Ca^{2+} ATP 酶的非竞争性抑制剂，会导致内质网腔内钙离子外流，使得钙连接蛋白和钙网蛋白等依赖 Ca^{2+} 的内质网分子伴侣无法滞留于内质网腔内（Taylor et al 2011）。导致内质网腔内非折叠蛋白累积和激活细胞内质网应激是 TM 和 Tg 生物学效应的共同点。TM 和 Tg 常被用于建立内质网应激模型，如 Abdullahi 等使用 TM 和 Tg 建立体内和细胞水平的急性内质网应激模型，并指出 TM 和 Tg 是快速有效的细胞内质网应激诱导剂（Abdullahi et al 2017）；Cóppola 等在研究黑质致密部 α -突触核蛋白对神经退行性疾病的影响时使用 TM 处理大鼠大脑黑质，并提出向黑质内注射 TM 能有效建立大鼠的内质网应激模型（Cóppola-Segovia et al 2017）。TM 和 Tg 也被应用于内质网应激抗病毒效应的研究，如 Shaban 等在研究内质网应激对新冠病毒复制的影响时使用 Tg 建立细胞内质网应激模型（Shaban et al 2021）；Xue 等为评估内质网应激对 TGEV 复制的影响，通过 TM 和 Tg 诱导内质网应激（Xue et al 2018）。

本研究在细胞试验中采取的药物处理方式是在 PEDV 感染前使用 TM 或 Tg 预处理细胞，这种方式减少了药物与病毒及病毒蛋白的直接接触，因而可以排除 TM、Tg 与 PEDV 病毒粒子或 PEDV 蛋白直接作用带来的影响。本研究以 GI-b 基因亚型、GII-a 基因亚型和 GII-b 基因亚型 PEDV 毒株为材料进行试验。GII-a 和 GII-b 基因亚型是目前临床上流行的主要基因亚型，GI-b 基因亚型是 2010 后 PED 暴发的主要元凶之一，这些基因亚型对临床流行的 PEDV 毒株有很好的代表性（Lee et al 2014, He et al 2022）。试验结果显示内质网应激能有效抑制以上基因亚型 PEDV 的复制，且

不受细胞特异性影响, 而抑制内质网应激对 PEDV 复制有一定促进作用, 表明内质网应激能协助宿主细胞抵御不同基因型 PEDV 的感染。除了 PEDV 以外, 内质网应激还对 α 型的 TGEV 和 HCoV-229E、 β 型的 MERS-CoV 和 SARS-CoV2 以及 δ 型的猪 δ 冠状病毒有抑制作用, 表明内质网应激可能是广谱性的抗冠状病毒机制 (Xue et al 2018, Shaban et al 2021, Fang et al 2022)。

5.1.1.2 激活内质网应激抑制 PEDV 在仔猪肠道中的复制

本研究也在动物水平对内质网应激的抗 PEDV 作用进行了评估。PEDV 感染对初生仔猪的影响最为严重, 遂选择未吃初乳的初生仔猪为试验对象 (Zhang et al 2020)。Abdullahi 等在大鼠体内建立内质网应激模型时发现相较于 Tg, TM 能更快速高效的激活内质网应激, 因此本研究也使用 TM 处理猪只 (Abdullahi et al 2017)。考虑到 PEDV 主要定植于肠道, 本研究采取口服方式给药以能针对性的激活肠道细胞的内质网应激。动物试验中 TM 的给药时间和细胞试验相同, 在攻毒前 8 h 给药以排除 TM 和 PEDV 直接作用造成的影响。试验测定了十二指肠、空肠、回肠、结肠、盲肠和直肠中 PEDV 的载量, 但只在十二指肠、空肠、回肠和结肠中检测到了 PEDV。试验结果表明 TM 预处理组猪只肠道的病变和组织病毒载量明显少于阳性对照组, 说明在仔猪肠道诱导内质网应激也能有效抑制 PEDV 复制。内质网在细胞水平和动物水平都能有效的抑制 PEDV 增殖, 且对临床流行的 PEDV 基因型都有效, 表明内质网应激是开发抗 PEDV 药物的良好靶标。

5.1.1.3 不同 UPR 通路对 PEDV 复制的影响

本研究进一步探究了 UPR 通路对 PEDV 复制的影响。PERK 通路能抑制细胞的翻译, 而病毒蛋白质的合成依赖宿主翻译机制。有研究曾报道 PERK 途径对细胞翻译的干扰会降低病毒蛋白质合成的效率, 进而抑制病毒的复制, 如 Shi 等指出 PERK-eIF2 α 轴负调控猪血凝性脑脊髓炎病毒的复制与 PERK-eIF2 α 通路导致的翻译停滞有关; Xue 等发现 PERK-eIF2 α 通路通过干扰细胞 mRNA 翻译实现对 TGEV 复制的抑制 (Xue et al 2018, Shi et al 2022)。本研究发现使用刺激剂激活 PERK 通路对 PEDV 的复制有抑制作用, 这可能也是由于 PERK 通路降低了 PEDV 蛋白合成的效率。在 IRE1 α 通路方面, 试验结果显示 PEDV 激活 IRE1 α , 而通过抑制剂 STF083010 干扰 IRE1 α 会抑制 PEDV 复制, 表明 PEDV 的复制可能依赖 IRE1 α 途径。IRE1 α 通路可以促进细胞存活, 该效应对部分病毒的复制有促进作用, 如 HCV 可以通过激活 IRE1 α 限制细胞凋亡, 进而帮助自身建立慢性感染 (Fink et al 2017)。IRE1 α 内含有一个丝氨酸/苏氨酸激酶活性功能域和一个 RNase 功能域, 其丝氨酸/苏氨酸激酶活性功能域的主要作用是诱导细胞凋亡, 因此 IRE1 α 的促生存作用可能主要依赖其 RNase 功能域 (Lee et al 2021)。本研究所用的 IRE1 α 抑制剂 STF083010

只抑制 IRE1 α 的 RNase 活性，因此推测 PEDV 复制可能依赖 IRE1 α RNase 活性介导的促细胞生存作用（Chien et al 2014）。另外，IRE1 α RNase 功能域还能诱导多种与蛋白质折叠和蛋白质修饰相关的内质网分子伴侣的表达，而 PEDV 的 S 蛋白、E 蛋白和 M 蛋白的合成依赖内质网，因此推测 IRE1 α RNase 活性被干扰后 PEDV 的复制被抑制也可能和 PEDV 结构蛋白合成受限有关（Shen et al 2002, Hetz 2012, Lim et al 2016, Li et al 2017）。在 ATF6 通路方面，试验结果显示 PEDV 感染后 ATF6 逐渐被激活。有研究报道 ATF6 通路能正调节病毒的复制，如 Hou 等发现抑制 ATF6 能抑制禽偏肺病毒（avian metapneumovirus, aMPV）的增殖，而 ATF6 通路介导的细胞自噬对 aMPV 的复制有促进作用（Hou et al 2017）。但 ATF6 似乎并不影响冠状病毒复制，Xue 等在探究 ATF6 对 TGEV 的影响时发现 TGEV 感染细胞中 ATF6 被激活，但抑制 ATF6 并不影响 TGEV 复制（Xue et al 2018）。本研究发现通过褪黑素抑制 ATF6 和过表达 ATF6 NTD 对 PEDV 增殖的影响并不明显（图 4-13、4-14），表明 ATF6 通路可能也不影响 PEDV 复制。本研究发现各 UPR 通路对 PEDV 复制的影响和内质网应激总体激活时对 PEDV 复制的影响并不完全一致，PEDV 感染后各 UPR 通路活化的时间也不同步。有研究曾指出病毒可以通过调节 UPR 通路活化的模式促进自身增殖，因此推测 PEDV 感染时抑制病毒增殖的 PERK 通路先激活、促进病毒增殖的 IRE1 α 通路后激活可能也是由于 PEDV 感染后逐渐诱使 UPR 的活化模式利于自身增殖（Khongwichit et al 2021）。

5.1.1.4 内质网应激标志蛋白 GRP78 抑制 PEDV 复制

研究表明内质网应激标志蛋白 GRP78 能抑制部分病毒的复制，如 Shu 等发现在 Huh7 细胞中过表达 GRP78 会抑制 HBV 的增殖；Khongwichit 等指出 ZIKV 通过降解 GRP78 使 UPR 的激活模式利于自身复制（Shu et al 2020, Khongwichit et al 2021）。Xu 等曾报道 GRAMD4 对 GRP78 表达的诱导可能帮助其抑制 PEDV，表明 GRP78 也有抑制 PEDV 复制的潜力（Xu et al 2023）。为进一步明确内质网应激激活时抑制 PEDV 的主要宿主蛋白，本研究评估了不同内质网应激相关蛋白对 PEDV 复制的影响，发现过表达 GRP78 能抑制 PEDV 复制，这和 Xu 等的发现相符合。考虑到 GRP78 在内质网应激激活时被大量表达，推测 GRP78 是协助内质网应激抑制 PEDV 的主要宿主蛋白（Zhang et al 2020）。但抑制 GRP78 对 PEDV 的影响并不明显。Vero 细胞内源性 GRP78 的表达量相对较低（图 4-16），因此 siRNA 干扰导致的 GRP78 绝对量变化的幅度会远低于蛋白过表达，这可能是抑制 GRP78 对 PEDV 复制无明显影响的原因。

5.1.2 PEDV 抑制内质网应激标志蛋白 GRP78 表达及其作用机制

鉴于内质网应激标志蛋白 GRP78 是内质网应激激活时抑制 PEDV 复制的主要

宿主蛋白, 为探究 PEDV 能否拮抗内质网应激的抗病毒效应, 本研究评估了 PEDV 感染对 GRP78 表达的影响。有研究曾指出 MHV 和 SARS-CoV 等冠状病毒能促进 GRP78 转录, 本研究发现 GI 基因型和 GII 基因型 PEDV 毒株也能显著促进 GRP78 转录 (Tang et al 2005, Versteeg et al 2007)。但 PEDV 感染后 GRP78 蛋白的表达量并未显著增加, PEDV 感染 Vero 细胞 36 h 后 GRP78 蛋白的量甚至出现了下降。有研究曾指出冠状病毒在转录水平上调内质网应激相关因子但在蛋白质水平下调内质网应激相关因子, 因此推测 PEDV 可能在蛋白质水平抑制 GRP78 表达 (Shaban et al 2021)。

5.1.2.1 PEDV 感染抑制 GRP78 蛋白表达

在病毒调节干扰素表达的研究中通常会在病毒感染后使用干扰素刺激因子处理细胞以放大病毒对干扰素表达的影响, 本研究借鉴该方法在 PEDV 感染前后不同时间点用 TM、Tg 诱导 GRP78 表达以放大 PEDV 对 GRP78 蛋白表达的影响 (Luo et al 2008, Liu et al 2020)。试验结果显示在 PEDV 感染前和 PEDV 感染的同时使用 TM 处理细胞, PEDV/TM 组 GRP78 蛋白表达量少于 TM 对照组, 但降低的幅度并不大。由于在此两种条件下并未观察到显著的 GRP78 表达量的变化, 因此并未进一步使用 Tg 和其它 PEDV 毒株进行验证。在 PEDV 感染前和 PEDV 感染的同时使用 TM 处理细胞会显著抑制 PEDV 复制 (图 4-21、4-22), 较低的病毒含量可能是 GRP78 变化幅度不大的原因, 因此本研究进一步探究了 PEDV 感染 24 h 后使用 TM、Tg 处理细胞对 GRP78 蛋白表达的影响。针对 GI 基因型和 GII 基因型 PEDV 毒株试验的结果均显示随着 PEDV 感染量的增加, GRP78 蛋白表达量逐渐减少, 表明随着 PEDV 病毒量的增加 GRP78 蛋白表达受到的抑制也加剧, 且该抑制效果不受毒株特异性影响。在 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞中观察到同样的现象, 表明该抑制效果也不受细胞特异性影响。另外, 本研究还证明 PEDV 能抑制真核表达载体介导的 GRP78 过表达。以上试验结果表明 PEDV 能在蛋白质水平抑制 GRP78 表达。除了 PEDV 以外, HCoV-229E、MERS-CoV、SARS-CoV2 也都被证明能抑制 GRP78 蛋白表达 (Shaban et al 2021)。鉴于内质网应激对这些冠状病毒的复制都有抑制作用, 推测抑制 GRP78 蛋白表达可能是这些冠状病毒拮抗内质网应激抗冠状病毒效应的方式。

5.1.2.2 PEDV 通过抑制细胞翻译负调节 GRP78 的表达

转录调节、mRNA 降解、翻译调节和蛋白质降解是调节蛋白质表达的主要途径 (Ren et al 2022)。鉴于 PEDV 感染细胞中 GRP78 mRNA 含量显著增加, 推测 PEDV 可能通过调节宿主翻译或宿主蛋白质降解途径抑制 GRP78 蛋白表达。研究表明部分病毒通过抑制细胞翻译拮抗宿主抗病毒反应, 如 Ahmed 等报道水泡性口炎病毒通过其基质蛋白抑制细胞翻译, 进而减少宿主干扰素的表达 (Ahmed et al 2003);

Thoms 等指出 SARS-CoV2 nsp1 对宿主 mRNA 翻译的阻断完全沉默了宿主天然免疫反应 (Thoms et al 2020)。本研究测试了 PEDV 对宿主翻译的影响, 嘌呤霉素标记试验结果显示 PEDV 感染能减少宿主细胞新生肽段的合成, 推测 PEDV 可能通过抑制细胞翻译减少 GRP78 表达以拮抗 GRP78 对自身复制的抑制。另外, 也有研究表明部分病毒通过蛋白质降解途径抑制宿主抗病毒反应, 如 Xia 等报道流感病毒 HA 蛋白通过泛素-蛋白酶体途径和溶酶体途径抑制宿主干扰素受体表达, 进而促进流感病毒复制 (Xia et al 2015); Avia 等报道蓝舌病病毒辅助蛋白 NS3 通过泛素-蛋白酶体途径降解 STAT2, 进而阻断干扰素通路的信号传递 (Avia et al 2019)。本研究评估了宿主蛋白质降解途径对 PEDV 抑制 GRP78 表达的影响, 发现通过特异性抑制剂干扰泛素-蛋白酶体途径和自噬-溶酶体途径不能缓解 PEDV 对 GRP78 表达的抑制, 表明 PEDV 抑制 GRP78 表达可能不依赖蛋白质降解途径, 这也解释了为何 PEDV 感染细胞后一定时间内胞内已有的 GRP78 蛋白不会明显减少。

5.1.3 PEDV nsp14 抑制 GRP78 表达及其作用机制

为明确协助 PEDV 抑制 GRP78 表达的病毒蛋白, 本研究测试了不同 PEDV 蛋白对 GRP78 表达的影响。其中 nsp2、nsp3 的表达载体构建不成功, 而 nsp11 因为分子量太小一般不被认为具有功能, 因此未测试以上 3 个 PEDV 蛋白。本研究发现在被测试的 18 个 PEDV 蛋白中只有 nsp14 能抑制 GRP78 表达。进一步研究表明 PEDV nsp14 能抑制 TM、Tg 诱导的 GRP78 表达, 且不受细胞特异性影响。冠状病毒 nsp14 在病毒复制过程负责校对病毒基因组和给病毒 RNA 加帽 (Ma et al 2015)。研究表明除了协助冠状病毒复制, 部分冠状病毒的 nsp14 还能抑制宿主抗病毒反应, 如 SARS-CoV2 nsp14 能阻止 IRF3 核转运, 抑制干扰素表达 (Yuen et al 2020, Hsu et al 2021); IBV nsp14 能通过靶向 JAK-STAT 信号通路抑制宿主抗病毒反应 (Ma et al 2022); MHV nsp14 也被报道能抑制宿主天然免疫反应 (Case et al 2018)。Lu 等曾指出 PEDV nsp14 能抑制干扰素的表达, 本研究发现 PEDV nsp14 能抑制内质网应激抗 PEDV 因子 GRP78 的表达, 表明 PEDV nsp14 也能帮助 PEDV 拮抗宿主的抗病毒反应 (Lu et al 2020)。在转录水平 PEDV 和 PEDV nsp14 调节 GRP78 的趋势并不一致, PEDV 促进 GRP78 转录而 PEDV nsp14 却抑制 GRP78 转录, 这可能是由于其它 PEDV 蛋白对 GRP78 转录的诱导导致 (Xu et al 2013, Xu et al 2015)。

5.1.3.1 PEDV nsp14 功能保守

本研究所用的 PEDV nsp14 序列来自 GII-b 基因亚型毒株 YN15, 为判断 PEDV nsp14 抑制 GRP78 表达是否是不同 PEDV 毒株共有的特性, 本研究分析了 PEDV nsp14 氨基酸序列的保守性。收集了 83 株 PEDV 毒株 nsp14 的氨基酸序列, 通过同源性分析发现这 83 条 nsp14 氨基酸序列中存在 24 种序列类型。这 24 种序列类型的

代表 PEDV 毒株涵盖所有 PEDV 基因型, 因此认为这 24 种序列能广泛性代表 PEDV nsp14 氨基酸序列的特点。序列同源性分析表明这 24 种序列同源性平均值为 99.25%, 两两之间平均只相差 1.5 个氨基酸, 说明这些序列的同源性极高。研究报道 PEDV nsp14 上 D90、E92、D242、H267、D272 发生突变会抑制 nsp14 ExoN 功能域活性, 而 D330、G332、P334、K335、D350 突变则可能抑制 nsp14 N7-MTase 功能域活性 (Bouvet et al 2012, Lu et al 2020)。序列比对结果显示这 24 种 PEDV nsp14 氨基酸序列在这些功能位点都没有突变, 也不存在氨基酸的插入和缺失, 表明不同基因型 PEDV nsp14 的功能十分保守。GI 基因型和 GII 基因型 PEDV 毒株都能抑制 GRP78 蛋白表达, 表明是这些毒株之间共有的保守功能在发挥作用, 而在众多 PEDV 蛋白中只有功能保守的 nsp14 表现出抑制 GRP78 表达的能力, 说明 PEDV nsp14 是协助 PEDV 抑制 GRP78 表达的主要病毒蛋白。

5.1.3.2 PEDV nsp14 抑制 GRP78 蛋白表达依赖其 N7-MTase 功能域

PEDV nsp14 内有两个主要功能域, 分别是 ExoN 功能域和 N7-MTase 功能域。ExoN 功能域的主要作用是纠正基因组复制时产生的氨基酸错配, 保证冠状病毒基因组的保真性; N7-MTase 功能域的主要功能则是给冠状病毒 RNA 加帽, 促进冠状病毒 RNA 的稳定性和翻译效率 (Ma et al 2015)。研究表明冠状病毒 nsp14 这两个功能域都参与调节宿主抗病毒反应。冠状病毒 nsp14 的 ExoN 功能域可能对宿主的抗病毒反应有促进作用, Becares 等发现沉默 TGEV nsp14 ExoN 功能域会导致 TGEV 感染细胞后诱导的天然免疫反应水平下降 (Becares et al 2016)。而冠状病毒 nsp14 的 N7-MTase 功能域则可能帮助病毒拮抗宿主抗病毒反应, 如 Case 等指出沉默 MHV 的 N7-MTase 功能域会导致 MHV 对 IFN- β 介导的天然免疫反应更敏感 (Case et al 2016)。本研究为明确不同功能域对 PEDV nsp14 抑制 GRP78 表达的影响, 根据已有文献报道构建了 ExoN 功能域沉默和 N7-MTase 功能域沉默的 nsp14 突变体, 试验结果显示 N7-MTase 功能域沉默会导致 PEDV nsp14 完全丧失抑制 GRP78 表达的能力。有研究曾指出 N7-MTase 功能域是 PEDV nsp14 抑制干扰素表达的关键, 结合本研究的发现推测 PEDV nsp14 N7-MTase 功能域除了能给病毒 RNA 加帽以外还可能通过抑制宿主基因表达帮助病毒拮抗宿主抗病毒反应 (Lu et al 2020)。

5.1.3.3 PEDV nsp14 通过抑制细胞翻译负调节 GRP78 的表达

本研究通过免疫沉淀结合液相色谱-质谱联用的方法解析了与 PEDV nsp14 相互作用的宿主因子, 共鉴定到 153 个特异性蛋白。但空白对照组也鉴定到一些蛋白, 这可能与非特异性结合以及洗涤不完全有关。GO 分析和信号通路聚类分析表明与 PEDV nsp14 互作的宿主蛋白涉及到 rRNA 合成、tRNA 氨基酰化和核糖体亚基的形成, 而这些生物学过程都与细胞蛋白质翻译相关, 表明 PEDV nsp14 可能参与宿主

翻译的调节 (Faridi et al 2019, Pan et al 2020)。冠状病毒的部分非结构蛋白具有抑制细胞翻译的能力。有研究曾指出 SARS-CoV2 的 nsp1 通过抑制细胞翻译减少干扰素的表达 (Thoms et al 2020)。而多种人源冠状病毒的 nsp14 也被指出通过抑制细胞翻译帮助病毒逃逸天然免疫反应 (Hsu et al 2021)。本研究通过嘌呤霉素标记试验证明 PEDV nsp14 能抑制细胞翻译。结合 PEDV 主要在翻译阶段抑制 GRP78 表达和 PEDV nsp14 是抑制 GRP78 表达的主要 PEDV 蛋白考虑, 推测 PEDV 是通过 nsp14 介导的翻译停滞抑制 GRP78 蛋白表达。

5.1.3.4 PEDV nsp14 通过抑制 GRP78 启动子活性负调节其转录

本研究分析了 PEDV nsp14 的细胞定位, 发现 PEDV nsp14 能够进入细胞核。细胞核是真核生物转录发生的场所, 通过具有入核能力的蛋白质调节基因启动子活性是细胞调节基因转录的重要方式 (Huang et al 2018)。如过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 蛋白磷酸化后可以进入细胞核并与 *UCPI* 启动子结合, 进而促进 *UCPI* 的转录 (Xue et al 2022); 内质网应激效应因子 sXBP1 被转移到细胞核后可以与基因启动子结合, 进而加强多个基因的转录 (Scortegagna et al 2014, Wang et al 2020)。部分病毒蛋白也能在细胞核内调节宿主基因启动子的活性。Guo 等报道 HBV 核心蛋白能和大量宿主基因的启动子序列结合并能干扰相关基因的表达 (Guo et al 2012)。Chen 等在分析 PRRSV 抑制树突状细胞中的抗原加工的机制时发现 PRRSV nsp1 能直接调节 *CD83* 启动子活性 (Chen et al 2018)。本研究发现 PEDV nsp14 能抑制 *GRP78* 转录, 结合 nsp14 的入核能力考虑, 推测 nsp14 可能影响 *GRP78* 启动子活性。通过软件预测和双萤光素酶报告试验成功鉴定到具有转录活性的 *GRP78* 启动子序列。进一步试验中发现 PEDV nsp14 会抑制双萤光素酶阳性对照载体 (原始 psiCheckII 质粒) 介导的萤火虫萤光素酶表达但不影响海肾萤光素酶表达, 这导致无法判断 PEDV nsp14 是作用于启动子还是作用于萤火虫萤光素酶表达的其它环节。因此本研究转而使用以 pCAGGS-RFP-MCS 为骨架构建的 *GRP78* 启动子重组载体验证 PEDV nsp14 对 *GRP78* 启动子的影响。PEDV nsp14 不能明显影响阳性对照质粒 (原始 pCAGGS-RFP-MCS) 介导的 RFP 表达, 但可以抑制 *GRP78* 启动子重组载体介导的 RFP 表达。重组载体和阳性对照载体只有启动子不同, 表明 PEDV nsp14 可以抑制 *GRP78* 启动子活性。但 PEDV nsp14 是直接作用于 *GRP78* 启动子还是依赖其它反式作用因子实现对 *GRP78* 启动子活性的抑制还有待研究。

5.1.4 开发靶向内质网应激的抗 PEDV 分子

PEDV 的防控目前依赖疫苗, 但以经典 GI 基因型 PEDV 毒株为毒种开发的 PEDV 疫苗不能抵御目前流行的 GII 基因型 PEDV 的感染, 另外 GII 基因型 PEDV 的序列和抗原性也还在持续变化, 现有商品化疫苗无法对猪只提供完全保护 (Lin et

al 2016, Chen et al 2021, Zhang et al 2023)。开发治疗性药物是 PED 防治的另一重要策略,但目前临床上并没有可用的商品化药物。有研究对广藿香多糖、槲皮素-7、咪唑衍生物和 2-脱氧-D-葡萄糖等分子的抗 PEDV 活性进行报道,但这些研究都只针对一种 PEDV 毒株验证化合物的抗病毒效应,而且部分研究使用的 PEDV 毒株是与目前流行毒株相差甚远的 PEDV CV777 毒株,因此开发能广泛抑制不同基因型 PEDV 的治疗性分子仍十分必要 (Song et al 2011, Wang et al 2014, Chen et al 2020, Chen et al 2021)。本文在 5.1 中已经指出内质网应激能广泛性的抑制不同基因型 PEDV 的复制,但经典内质网应激刺激剂 TM 和 Tg 具有毒性,不适合用于临床治疗 (Chesnokov et al 2014, Andersen et al 2017)。为开发能广泛抑制不同基因型 PEDV 的治疗性药物,本研究进一步以内质网应激为靶筛选有临床应用前景的抗 PEDV 分子。

5.1.4.1 筛选靶向内质网应激的抗 PEDV 分子

由于目前并没有用于筛选内质网应激刺激剂的高通量方法,本研究依据文献报道测试了四种能激活内质网应激的天然小分子对 PEDV 复制的影响,首次发现欧当归内酯 A (LA) 具有抑制 PEDV 复制的能力。LA 来源于传统中药材川芎,在治疗癌症和阿兹海默症方面有一定临床应用前景 (Ding et al 2019, Qu et al 2021)。本研究发现 LA 能抑制 GI 和 GII 基因型 PEDV 的复制,且在 Vero 细胞和 LLC-PK1 细胞上该抑制效果都生效,表明 LA 有被开发成抗 PEDV 药物的潜力。

5.1.4.2 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 吸附和入侵宿主细胞

许多抗病毒药物通过干扰病毒的吸附入侵实现对病毒增殖的抑制。如鼠尾草的甲醇提取物通过干扰 HBV 吸附细胞来抑制其复制 (Muruganantham 2015); 槲皮素能在多种病毒的吸附入侵阶段干扰病毒复制 (Wu et al 2016, Lopes et al 2020, Sun et al 2021); 格里非辛通过抑制介导艾滋病病毒入侵的病毒膜蛋白的活性实现对艾滋病病毒复制的抑制 (Sabrina and Carole 2016)。本研究发现 LA 也是通过干扰 PEDV 的吸附入侵实现对 PEDV 复制的抑制。吸附入侵是病毒复制第一步,在此阶段抑制病毒能最大限度减少病毒变异的机会 (Shen et al 2019, Yu et al 2019)。另外,在 PEDV 复制的早期阶段起效表明 LA 可能可以用于 PED 的预防性治疗或 PEDV 暴露后的紧急治疗。

5.1.4.3 欧当归内酯 A 抑制 PEDV 依赖氧化应激-内质网应激途径

有研究指出 LA 能促进 HCT116 细胞中活性氧的产生,进而激活细胞内质网应激 (Yang et al 2017)。本研究证实 LA 能在 PEDV 易感的 Vero 细胞中激活内质网应激,且通过 4-PBA 抑制内质网应激能拮抗 LA 的抗 PEDV 作用,表明 LA 抑制 PEDV 复制依赖内质网应激。另外本研究也发现 LA 能促进 PEDV 易感细胞中活性氧的产

生。氧化应激对部分病毒的复制有抑制作用。Nadhan 等报道白花丹醌的抗 HCV 和抗流感病毒作用和其对氧化应激的诱导有关，并指出促进活性氧产生能加速胞内病毒 RNA 的降解（Nadhan et al 2021）。Khan 等发现活性氧能有效抑制 DENV、JEV、SARS-CoV2 的复制（Khan et al 2021）。本研究发现活性氧抑制剂 NAC 能缓解 LA 对 PEDV 复制的抑制，表明 LA 抑制 PEDV 也依赖氧化应激。鉴于氧化应激通常是内质网应激的上游反应，推测 LA 可能通过氧化应激介导的内质网应激发挥抗 PEDV 作用（Wang et al 2017）。

5.2 结论

- (1) 证实内质网应激能抑制不同基因型 PEDV 的复制，是抗 PEDV 药物开发的良好靶标，并发现 PERK 途径和 GRP78 蛋白分别是内质网应激抑制 PEDV 复制所依赖的主要 UPR 通路和主要宿主蛋白。
- (2) 发现 PEDV 在转录水平正调节 GRP78 但在蛋白质水平负调节 GRP78，并揭示了 PEDV 通过干扰宿主翻译实现对 GRP78 蛋白表达的抑制。
- (3) 发现 PEDV nsp14 是协助 PEDV 抑制 GRP78 蛋白表达的主要病毒蛋白，并进一步揭示了 PEDV nsp14 既能通过抑制细胞翻译负调节 GRP78 蛋白的表达，又能通过抑制 GRP78 启动子活性负调节 GRP78 的转录。
- (4) 以内质网应激为靶筛选抗 PEDV 分子，发现欧当归内酯 A 能抑制 PEDV 复制且其抗 PEDV 作用对 GI 和 GII 基因型 PEDV 都有效，并进一步揭示了欧当归内酯 A 依赖氧化应激-内质网应激途径发挥抗 PEDV 作用。

参考文献

1. 戴玉洁. 自噬在类风湿关节炎滑膜成纤维样细胞中抗凋亡作用. [硕士学位论文]. 武汉: 华中科技大学图书馆, 2016.
2. 方谱县, 方六荣, 董楠, 肖少波. 猪 δ 冠状病毒的研究进展. 病毒学报, 2016, 32: 243-248.
3. 韩露, 王同兴, 肖智勇, 周文霞, 张永祥. 抗新型冠状病毒靶点及药物研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34: 881-898.
4. 李鹏程. ROS 及 ER-stress 信号通路在海水吸入性肺损伤中的作用及其机制的研究. [硕士学位论文]. 西安: 第四军医大学图书馆, 2017.
5. 李向茸, 李倩, 冯若飞. 冠状病毒的研究进展. 中国人兽共患病学报, 2021, 37: 22-38.
6. 李鑫, 李艳, 丁旭, 夏博园, 于维先. 内质网应激在牙周炎影响全身疾病过程中的作用. 国际口腔医学杂志, 2021, 48: 12-17.
7. 王立堃. 内质网应激下的内质网-线粒体互作. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 46-57.
8. 张丽娜, 曹玲. 冠状病毒感染概况研究进展. 中国实用儿科杂志, 2021, 36: 469-473.
9. 张欣欣, 辛鑫, 吴振华, 檀淼, 杨凤文, 张翠轻, 任美芳, 赵美姣, 陈素枝, 檀金川. 大黄泄浊方对 5/6 肾切除大鼠肾脏保护作用及对 PERK/ATF4/CHOP 通路的影响. 时珍国医国药, 2022, 33: 2908-2913.
10. Abdullahi A, Stanojcic M, Parousis A, Patsouris D, Jeschke M. Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro. *Shock*, 2017, 47: 506-513.
11. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents N, Arias C, Lennon C, Kluger Y, Dynlacht B. XBP1 controls diverse cell type and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*, 2007, 27: 53-66.
12. Aguilera E, Erickson A, Jesudhasan P, Robinson C, Pfeiffer J. Plaques Formed by Mutagenized Viral Populations Have Elevated Coinfection Frequencies. *mBio*, 2017, 8.
13. Ahmed M, McKenzie M, Puckett S, Hojnacki M, Poliquin L, Lyles D. Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J Virol*, 2003, 77: 4646-4657.

14. Al-Yacoub N, Colak D, Mahmoud S, Hammonds M, Muhammed K, Al-Harazi O, Assiri A, Al-Buraiki J, Al-Habeeb W, Poizat C. Mutation in FBXO32 causes dilated cardiomyopathy through up-regulation of ER-stress mediated apoptosis. *Commun Biol*, 2021, 4: 884.
15. Amin-Wetzel N, Saunders R, Kamphuis M, Rato C, Preissler S, Harding H, Ron D. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell*, 2017, 171: 1625-1637.
16. Andersen T, Martinez-Swatson K, Rasmussen S, Boughton B, Jørgensen K, Andersen-Ranberg J, Nyberg N, Christensen S, Simonsen H. Localization and in-Vivo Characterization of Thapsia garganica CYP76AE2 Indicates a Role in Thapsigargin Biosynthesis. *Plant Physiol*, 2017, 174: 56-72.
17. Avia M, Rojas J, Miorin L, Pascual E, Van Rijn P, Martín V, García-Sastre A, Sevilla N. Virus-induced autophagic degradation of STAT2 as a mechanism for interferon signaling blockade. *EMBO Rep*, 2019, 20: e48766.
18. Baek Y, Um J, Antigua K, Park J, Kim Y, Oh S, Kim Y, Choi W, Kim S, Jeong J, Chin B, Nicolas H, Ahn J, Shin K, Choi Y, Park J, Song M. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 998-1007.
19. Bankar R, Suvarna K, Ghantasala S, Banerjee A, Biswas D, Choudhury M, Palanivel V, Salkar A, Verma A, Singh A, Mukherjee A, Pai M, Roy J, Srivastava A, Badaya A, Agrawal S, Shrivastav O, Shastri J, Srivastava S. Proteomic investigation reveals dominant alterations of neutrophil degranulation and mRNA translation pathways in patients with COVID-19. *iScience*, 2021, 24: 102135.
20. Bartolini D, Stabile A, Vacca C, Pistilli A, Rende M, Gioiello A, Cruciani G, Galli F. Endoplasmic reticulum stress and NF- κ B activation in SARS-CoV-2 infected cells and their response to antiviral therapy. *IUBMB Life*, 2022, 74: 93-100.
21. Becares M, Pascual-Iglesias A, Nogales A, Sola I, Enjuanes L, Zuñiga S. Mutagenesis of Coronavirus nsp14 Reveals Its Potential Role in Modulation of the Innate Immune Response. *J Virol*, 2016, 90: 5399-5414.
22. Beck J, Stermitz F. Addition of methyl thioglycolate and benzylamine to (Z)-ligustilide, a bioactive unsaturated lactone constituent of several herbal medicines. An improved synthesis of (Z)-ligustilide. *J Nat Prod*, 1995, 58: 1047-1055.

23. Bouvet M, Imbert I, Subissi L, Gluais L, Canard B, Decroly E. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109: 9372-9377.
24. Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith J, Hjorth C, Dommer A, Harbison A, Fogarty C, Barros E, Taylor B, McLellan J, Fadda E, Amaro R. Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS central science*, 2020, 6: 1722-1734.
25. Case J, Ashbrook A, Dermody T, Denison M. Mutagenesis of S-Adenosyl-l-Methionine-Binding Residues in Coronavirus nsp14 N7-Methyltransferase Demonstrates Differing Requirements for Genome Translation and Resistance to Innate Immunity. *J Virol*, 2016, 90: 7248-7256.
26. Case J, Li Y, Elliott R, Lu X, Graepel K, Sexton N, Smith E, Weiss S, Denison M. Murine Hepatitis Virus nsp14 Exoribonuclease Activity Is Required for Resistance to Innate Immunity. *J Virol*, 2018, 92.
27. Chen F, Wang T, Wang J, Wang Z, Qian M. Levistolide A overcomes P-glycoprotein-mediated drug resistance in human breast carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29: 458-464.
28. Chen P, Jiang M, Hu T, Liu Q, Chen XS, Guo D. Biochemical characterization of exoribonuclease encoded by SARS coronavirus. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40: 649-655.
29. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb R, Boschia J, Morris J, Huhn G, Cardona J, Mocherla B, Stosor V, Shawa I, Adams AC, Van Naarden J, Custer K, Shen L, Durante M, Oakley G, Schade A, Sabo J, Patel D. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*, 2021, 384: 229-237.
30. Chen P, Zhao X, Zhou S, Zhou T, Tan X, Wu X, Tong W, Gao F, Yu L, Jiang Y, Yu H, Yang Z, Tong G, Zhou Y. A Virulent PEDV Strain FJzz1 with Genomic Mutations and Deletions at the High Passage Level Was Attenuated in Piglets via Serial Passage In Vitro. *Virol Sin*, 2021, 36: 1052-1065.
31. Chen Q, Men Y, Wang D, Xu D, Liu S, Xiao S, Fang L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection induces endoplasmic reticulum stress, facilitates virus replication, and contributes to autophagy and apoptosis. *Sci Rep*, 2020, 10: 13131.
32. Chen W, Huang C, Shi Y, Li N, Wang E, Hu R, Li G, Yang F, Zhuang Y, Liu P, Hu G, Gao X, Guo X. Investigation of the Crosstalk between GRP78/PERK/ATF-4 Signaling Pathway and Renal Apoptosis Induced by Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus Infection. *J Virol*, 2022, 96: e0142921.

33. Chen X, Bai J, Liu X, Song Z, Zhang Q, Wang X, Jiang P. Nsp1 α of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain BB0907 Impairs the Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells via the Release of Soluble CD83. *J Virol*, 2018, 92 .
34. Chen Y, Luo Q, Li S, Li C, Yang Y. Antiviral activity against porcine epidemic diarrhea virus of Pogostemon cablin polysaccharide. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 259: 113009.
35. Chen Z, Chen J, Wei X, Hua H, Hu R, Ding N, Zhang J, Song D, Ye Y, Tang Y, Ding Z, Ke S. Antiviral Activities of Carbazole Derivatives against Porcine Epidemic Diarrhea Virus In Vitro. *Viruses*, 2021, 13: 2527.
36. Chesnokov V, Gong B, Sun C, Itakura K. Anti-cancer activity of glucosamine through inhibition of N-linked glycosylation. *Cancer Cell Int*, 2014, 14: 45.
37. Chien W, Ding L, Sun Q, Torres-Fernandez L, Tan S, Xiao J, Lim S, Garg M, Lee K, Kitajima S, Takao S, Leong W, Sun H, Tokatly I, Poellinger L, Gery S, Koeffler P. Selective inhibition of unfolded protein response induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 2014, 5: 4881-4894.
38. Chu H, Chan C, Zhang X, Wang Y, Yuan S, Zhou J, Au-Yeung R, Sze K, Yang D, Shuai H, Hou Y, Li C, Zhao X, Poon V, Leung S, Yeung M, Yan J, Lu G, Jin D, Gao G. Middle East respiratory syndrome coronavirus and bat coronavirus HKU9 both can utilize GRP78 for attachment onto host cells. *J Biol Chem*, 2018, 293: 11709-11726.
39. C  ppola-Segovia V, Cavarsan C, Maia F, Ferraz A, Nakao L, Lima M, Zanata S. ER Stress Induced by Tunicamycin Triggers α -Synuclein Oligomerization, Dopaminergic Neurons Death and Locomotor Impairment: a New Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*, 2017, 54: 5798-5806.
40. Cui T, Theuns S, Xie J, Van den Broeck W, Nauwynck H. Role of Porcine Aminopeptidase N and Sialic Acids in Porcine Coronavirus Infections in Primary Porcine Enterocytes. *Viruses*, 2020, 12 .
41. Cui W, Li J, Ron D, Sha B. The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011, 67: 423-428
42. de Haan C, de Wit M, Kuo L, Montalto-Morrison C, Haagmans B, Weiss S, Masters P, Rottier P. The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. *Virology*, 2003, 312: 395-406.
43. Deejai N, Roshorn Y, Kubera A. Antiviral Compounds Against Nucleocapsid Protein of Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Anim Biotechnol*, 2017, 28: 120-130.

44. Ding Y, Niu W, Zhang T, Wang J, Cao J, Chen H, Wang R, An H. Levistolide A synergistically enhances doxorubicin-induced apoptosis of k562/dox cells by decreasing MDR1 expression through the ubiquitin pathway. *Oncol Rep*, 2019, 41: 1198-1208.
45. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76: 159-216.
46. Dubuisson J, Rice C. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J Virol*, 1996, 70: 778-786.
47. Eckerle L, Becker M, Halpin R, Li K, Venter E, Lu X, Scherbakova S, Graham R, Baric R, Stockwell T, Spiro D, Denison M. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000896.
48. Eckerle L, Lu X, Sperry S, Choi L, Denison M. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J Virol*, 2007, 81: 12135-12144.
49. El-Hage N, Luo G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol*, 2003, 84: 2761-2769.
50. Fang P, Tian L, Zhang H, Xia S, Ding T, Zhu X, Zhang J, Ren J, Fang L, Xiao S. Induction and modulation of the unfolded protein response during porcine deltacoronavirus infection. *Vet Microbiol*, 2022, 271: 109494.
51. Faridi A, Sun Y, Mortimer M, Aranha R, Nandakumar A, Li Y, Javed I, Kakinen A, Fan Q, Purcell A, Davis T, Ding F, Faridi P, Ke P. Graphene quantum dots rescue protein dysregulation of pancreatic β -cells exposed to human islet amyloid polypeptide. *Nano Res*, 2019, 12: 2827-2834.
52. Fink S, Jayewickreme T, Molony R, Iwawaki T, Landis C, Lindenbach B, Iwasaki A. IRE1 α promotes viral infection by conferring resistance to apoptosis. *Sci Signal*, 2017, 10.
53. Forni D, Cagliani R, Mozzi A, Pozzoli U, Al-Daghri N, Clerici M, Sironi M. Extensive Positive Selection Drives the Evolution of Nonstructural Proteins in Lineage C Betacoronaviruses. *J Virol*, 2016, 90: 3627-3639.
54. Frabutt D, Wang B, Riaz S, Schwartz R, Zheng Y. Innate Sensing of Influenza A Virus Hemagglutinin Glycoproteins by the Host Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathway Triggers a Potent Antiviral Response via ER-Associated Protein Degradation. *J Virol*, 2018, 92.

55. Fung T, Liu D. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu Rev Microbiol*, 2019, 73: 529-557.
56. Gao R, Zhang Y, Kang Y, Xu W, Jiang L, Guo T, Huan C. Glycyrrhizin Inhibits PEDV Infection and Proinflammatory Cytokine Secretion via the HMGB1/TLR4-MAPK p38 Pathway. *Int J Mol Sci*, 2020, 21.
57. Gething M. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10: 465-472.
58. Ghosh A, Mishevich J, Mesecar A, Mitsuya H. Recent Drug Development and Medicinal Chemistry Approaches for the Treatment of SARS-CoV-2 Infection and COVID-19. *ChemMedChem*, 2022, 17: e202200440.
59. Gladwyn-Ng I, Cordón-Barris L, Alfano C, Creppe C, Couderc T, Morelli G, Thelen N, America M, Bessi res B, Encha-Razavi F, Bonni re M, Suzuki I, Flamand M, Vanderhaeghen P, Thiry M, Lecuit M, Nguyen L. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nature neuroscience*, 2018, 21: 63-71.
60. Gonzalez-Gronow M, Gopal U, Austin R, Pizzo S. Glucose-regulated protein (GRP78) is an important cell surface receptor for viral invasion, cancers, and neurological disorders. *IUBMB Life*, 2021, 73: 843-854.
61. Graepel K, Agostini M, Lu X, Sexton N, Denison M. Fitness Barriers Limit Reversion of a Proofreading-Deficient Coronavirus. *J Virol*, 2019, 93.
62. Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, Wang X. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res*, 2017, 27: 119-129.
63. Guo Y, Kang W, Lei X, Li Y, Xiang A, Liu Y, Zhao J, Zhang J, Yan Z. Hepatitis B viral core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions. *BMC Genomics*, 2012, 13: 563.
64. Ha S, Jang H, Nam K, Beck G. Nano-hydroxyapatite modulates osteoblast lineage commitment by stimulation of DNA methylation and regulation of gene expression. *Biomaterials*, 2015, 65: 32-42.
65. Hamman B, Hendershot L, Johnson A. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, 1998, 92: 747-758.
66. Harding H, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 2000, 5: 897-904.

67. Harding H, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu P, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl D, Bell J, Hettmann T, Leiden J, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 2003, 11: 619-633.
68. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker J, Glaunsinger B. The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem*, 2020, 295: 12910-12934.
69. He W, Lv W, Zhang Y, Qu Z, Wei R, Zhang L, Liu C, Zhou X, Li W, Huang X, Wang Q. Study on Pharmacokinetics of Three Preparations from Levistolide A by LC-MS-MS. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53: 1265-1273.
70. He W, Bollen N, Xu Y, Zhao J, Dellicour S, Yan Z, Gong W, Zhang C, Zhang L, Lu M, Lai A, Suchard M, Ji X, Tu C, Lemey P, Baele G, Su S. Phylogeography Reveals Association between Swine Trade and the Spread of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in China and across the World. *Mol Biol Evol*, 2022, 39.
71. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 89-102.
72. Hetz C, Papa F. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*, 2018, 69: 169-181.
73. Hollien J, Weissman J. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, 2006, 313: 104-107.
74. Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yoriyuzi T, Tremblay L, Herscovics A, Nagata K. A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep*, 2001, 2: 415-422.
75. Hou L, Wei L, Zhu S, Wang J, Quan R, Li Z, Liu J. Avian metapneumovirus subgroup C induces autophagy through the ATF6 UPR pathway. *Autophagy*, 2017, 13: 1709-1721.
76. Hoy SM. Amubarvimab/Romlusevimab: First Approval. *Drugs*, 2022, 82: 1327-1331.
77. Hsu J, Laurent-Rolle M, Pawlak J, Wilen C, Cresswell P. Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118.
78. Huang Y, Chang Z, Li X, Liang S, Yi Y, Wu L. Integrated multifactor analysis explores core dysfunctional modules in autism spectrum disorder. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 811-818.
79. Ibrahim I, Abdelmalek D, Elfiky A. GRP78: A cell's response to stress. *Life sciences*, 2019, 226: 156-163.

80. Jheng J, Ho J, Horng J. ER stress, autophagy, and RNA viruses. *Front Microbiol*, 2014, 5: 388.
81. Jia Y, Li Z, Feng Y, Cui R, Dong Y, Zhang X, Xiang X, Qu K, Liu C, Zhang J. Methane-Rich Saline Ameliorates Sepsis-Induced Acute Kidney Injury through Anti-Inflammation, Antioxidative, and Antiapoptosis Effects by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 4756846.
82. Khan N, Kar M, Panwar A, Wangchuk J, Kumar S, Das A, Pandey A, Lodha R, Medigeshi G. Oxidative stress specifically inhibits replication of dengue virus. *J Gen Virol*, 2021, 102.
83. Khongwichit S, Sornjai W, Jitobaom K, Greenwood M, Greenwood M, Hitakarun A, Wikan N, Murphy D, Smith D. A functional interaction between GRP78 and Zika virus E protein. *Sci Rep*, 2021, 11: 393.
84. Kikuchi M, Doi E, Tsujimoto I, Horibe T, Tsujimoto Y. Functional analysis of human P5, a protein disulfide isomerase homologue. *J Biochem*, 2002, 132: 451-455.
85. Kim C, Ryu D, Lee J, Kim Y, Seo J, Kim Y, Jeong J, Kim M, Kim J, Kim P, Bae J, Shim E, Lee M, Kim M, Noh H, Park G, Park J, Son D, An Y, Lee J. A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Commun*, 2021, 12: 288.
86. Kim D, Eu Y, Yoo C, Kim Y, Pih K, Jin J, Kim S, Stenmark H, Hwang I. Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *The Plant cell*, 2001, 13: 287-301.
87. Knoops K, Kikkert M, Worm S, Zevenhoven-Dobbe J, van der Meer Y, Koster A, Mommaas A, Snijder E. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS biology*, 2008, 6: e226.
88. Krähling V, Stein D, Spiegel M, Weber F, Mühlberger E. Severe acute respiratory syndrome coronavirus triggers apoptosis via protein kinase R but is resistant to its antiviral activity. *J Virol*, 2009, 83: 2298-2309.
89. Kweon C, Kwon B, Woo S, Kim J, Woo G, Son D, Hur W, Lee Y. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (Ig Y) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J Vet Med Sci*, 2000, 62: 961-964.
90. Lamkiewicz K, Esquivel Gomez L, Kühnert D, Marz M. Genome Structure, Life Cycle, and Taxonomy of Coronaviruses and the Evolution of SARS-CoV-2. *Current topics in microbiology and immunology*, 2023, 439: 305-339.

91. Lee D, Jeon Y, Park C, Kim S, Lee D, Lee C. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Arch Virol*, 2015, 160: 2197-2207.
92. Lee I, Ho X, George S, Goh C, Sundaram J, Pang K, Luo W, Yusoff P, Sze N, Shenolikar S. Oxidative stress promotes SIRT1 recruitment to the GADD34/PP1 α complex to activate its deacetylase function. *Cell death and differentiation*, 2018, 25: 255-267.
93. Lee S, Lee E, Kang D, Lee J, Hong S, Jeong W, Kang S. Glutathione peroxidase-1 regulates ASK1-dependent apoptosis via interaction with TRAF2 in RIPK3-negative cancer cells. *Exp Mol Med*, 2021, 53: 1080-1091.
94. Lee S, Park G, Shin J, Lee C. Full-genome sequence analysis of a variant strain of porcine epidemic diarrhea virus in South Korea. *Genome Announc*, 2014, 2.
95. Lei S, Tian Y, Xiao W, Li S, Rao X, Zhang J, Yang J, Hu X, Chen W. ROCK is involved in vimentin phosphorylation and rearrangement induced by dengue virus. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67: 1333-1342.
96. Li B, Ge J, Li Y. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 2007, 365: 166-172.
97. Li C, Wang X. Three kinds of treatment with Homoharringtonine, Hydroxychloroquine or shRNA and their combination against coronavirus PEDV in vitro. *Virol J*, 2020, 17: 71.
98. Li H, Gao D, Li Y, Wang Y, Liu H, Zhao J. Antiviral effect of lithium chloride on porcine epidemic diarrhea virus in vitro. *Res Vet Sci*, 2018, 118: 288-294.
99. Li S, Yang F, Ma C, Cao W, Yang J, Zhao Z, Tian H, Zhu Z, Zheng H. Porcine epidemic diarrhea virus nsp14 inhibits NF- κ B pathway activation by targeting the IKK complex and p65. *Anim Dis*, 2021, 1: 24.
100. Li T, Kenney A, Liu H, Fiches G, Zhou D, Biswas A, Que J, Santoso N, Yount J, Zhu J. SARS-CoV-2 Nsp14 activates NF- κ B signaling and induces IL-8 upregulation. *bioRxiv*, 2021.
101. Li W, Luo R, He Q, van Kuppeveld FJM, Rottier PJM, Bosch BJ. Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry. *Virus Res*, 2017, 235: 6-13.
102. Li Y, Zhu Y, Wang Y, Feng Y, Li D, Li S, Qin P, Yang X, Chen L, Zhao J, Zhang C, Li Y. Characterization of RNA G-quadruplexes in porcine epidemic diarrhea virus genome and the antiviral activity of G-quadruplex ligands. *Int J Biol Macromol*, 2023, 231: 123282.

103. Li Z, Cao H, Cheng Y, Zhang X, Zeng W, Sun Y, Chen S, He Q, Han H. Inhibition of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication and Viral 3C-Like Protease by Quercetin. *Int J Mol Sci*, 2020, 21.
104. Li Z, Ma Z, Li Y, Gao S, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines. *Microbial pathogenesis*, 2020, 149: 104553.
105. Li Z, Vuong J, Zhang M, Stork C, Zheng S. Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by ER stress. *Rna*, 2017, 23: 378-394.
106. Lim K, Liu D. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J Biol Chem*, 2001, 276: 17515-17523.
107. Lim Y, Ng Y, Tam J, Liu D. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*, 2016, 4.
108. Lin C, Saif L, Marthaler D, Wang Q. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res*, 2016, 226: 20-39.
109. Liu G, Tao J, Lu J, Jia G, Zhao H, Chen X, Tian G, Cai J, Zhang R, Wang J. Dietary Tryptophan Supplementation Improves Antioxidant Status and Alleviates Inflammation, Endoplasmic Reticulum Stress, Apoptosis, and Pyroptosis in the Intestine of Piglets after Lipopolysaccharide Challenge. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11.
110. Liu Q, Wang HY. Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis. *Vet Res Commun*, 2021, 45: 75-86.
111. Liu S, Fang P, Ke W, Wang J, Wang X, Xiao S, Fang L. Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection antagonizes interferon- λ 1 production. *Vet Microbiol*, 2020, 247: 108785.
112. Liu Z, Fu Y, Huang Y, Zeng F, Rao J, Xiao X, Sun X, Jin H, Li J, Yang J, Du W, Liu L. Ubiquitination of SARS-CoV-2 ORF7a Prevents Cell Death Induced by Recruiting BclXL To Activate ER Stress. *Microbiol Spectr*, 2022, 10: e0150922.
113. Liu Z, Xia Y, Li B, Xu H, Wang C, Liu Y, Li Y, Li C, Gao N, Li L. Induction of ER stress-mediated apoptosis by ceramide via disruption of ER Ca(2+) homeostasis in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Biosci*, 2014, 4: 71.
114. Lodhi I, Wei X, Yin L, Feng C, Adak S, Abou-Ezzi G, Hsu F, Link D, Semenkovich C. Peroxisomal lipid synthesis regulates inflammation by sustaining neutrophil membrane phospholipid composition and viability. *Cell metabolism*, 2015, 21: 51-64.

115. Lopes B, da Costa M, Genova Ribeiro A, da Silva T, Lima C, Caruso I, de Araujo G, Kubo L, Iacovelli F, Falconi M, Desideri A, de Oliveira J, Regasini L, de Souza F, Toledo K. Quercetin pentaacetate inhibits in vitro human respiratory syncytial virus adhesion. *Virus Res*, 2020, 276: 197805.
116. Lu Y, Cai H, Lu M, Ma Y, Li A, Gao Y, Zhou J, Gu H, Li J, Gu J. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Deficient in RNA Cap Guanine-N-7 Methylation Is Attenuated and Induces Higher Type I and III Interferon Responses. *J Virol*, 2020, 94.
117. Luo L, Wang S, Zhu L, Fan B, Liu T, Wang L, Zhao P, Dang Y, Sun P, Chen J, Zhang Y, Chang X, Yu Z, Wang H, Guo R, Li B, Zhang K. Aminopeptidase N-null neonatal piglets are protected from transmissible gastroenteritis virus but not porcine epidemic diarrhea virus. *Sci Rep*, 2019, 9: 13186.
118. Luo R, Xiao S, Jiang Y, Jin H, Wang D, Liu M, Chen H, Fang L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway. *Mol Immunol*, 2008, 45: 2839-2846.
119. Luo S, Mao C, Lee B, Lee A. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 5688-5697.
120. Ma P, Gu K, Li H, Zhao Y, Li C, Wen R, Zhou C, Lei C, Yang X, Wang H. Infectious Bronchitis Virus Nsp14 Degrades JAK1 to Inhibit the JAK-STAT Signaling Pathway in HD11 Cells. *Viruses*, 2022, 14.
121. Ma Y, Wu L, Shaw N, Gao Y, Wang J, Sun Y, Lou Z, Yan L, Zhang R, Rao Z. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 9436-9441.
122. Masters P. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 2006, 66: 193-292.
123. Mele L, Paino F, Papaccio F, Regad T, Boocock D, Stiuso P, Lombardi A, Liccardo D, Aquino G, Barbieri A, Arra C, Coveney C, La Noce M, Papaccio G, Caraglia M, Tirino V, Desiderio V. A new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase blocks pentose phosphate pathway and suppresses malignant proliferation and metastasis in vivo. *Cell death & disease*, 2018, 9: 572.
124. Miller S, Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 363-374.
125. Millet J, Whittaker G. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 15214-15219.

126. Ming S, Zhang S, Wang Q, Zeng L, Zhou L, Wang M, Ma Y, Han L, Zhong K, Zhu H, Bai Y, Yang G, Wang J, Chu B. Inhibition of USP14 influences alphaherpesvirus proliferation by degrading viral VP16 protein via ER stress-triggered selective autophagy. *Autophagy*, 2022, 18: 1801-1821.
127. Muruganantham S. In vitro screening of anti-HBV properties of selected Indian medicinal plants from kolli hills, namakkal district of tamilnadu, India. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 2015, 4: 909-915.
128. Nadhan R, Patra D, Krishnan N, Rajan A, Gopala S, Ravi D, Srinivas P. Perspectives on mechanistic implications of ROS inducers for targeting viral infections. *Eur J Pharmacol*, 2021, 890: 173621.
129. Nain M, Mukherjee S, Karmakar S, Paton A, Paton J, Abdin M, Basu A, Kalia M, Vratil S. GRP78 Is an Important Host Factor for Japanese Encephalitis Virus Entry and Replication in Mammalian Cells. *J Virol*, 2017, 91.
130. Nguyen L, Renner D, Silva D, Yang D, Parenti N, Medina K, Nicolaescu V, Gula H, Drayman N, Valdespino A, Mohamed A, Dann C, Wannemo K, Robinson-Mailman L, Gonzalez A, Stock L, Cao M, Qiao Z, Moellering R, Tay S. SARS-CoV-2 diverges from other betacoronaviruses in only partially activating the IRE1 α /XBP1 ER stress pathway in human lung-derived cells. *bioRxiv*, 2022.
131. Nguyen L, Yang D, Nicolaescu V, Best T, Gula H, Saxena D, Gabbard J, Chen S, Ohtsuki T, Friesen J, Drayman N, Mohamed A, Dann C, Silva D, Robinson-Mailman L, Valdespino A, Stock L, Suárez E, Jones KA, Azizi SA *et al.* Cannabidiol inhibits SARS-CoV-2 replication through induction of the host ER stress and innate immune responses. *Science advances*, 2022, 8: eabi6110.
132. Niu X, Kong F, Hou YJ, Wang Q. Crucial mutation in the exoribonuclease domain of nsp14 of PEDV leads to high genetic instability during viral replication. *Cell & bioscience*, 2021, 11: 106.
133. Noda T, Shiga H, Yamada K, Harita M, Nakamura Y, Ishikura T, Kumai M, Kawakami Z, Kaneko A, Hatta T, Sakata-Haga H, Shimada H, Miwa T. Effects of Tokishakuyakusan on Regeneration of Murine Olfactory Neurons In Vivo and In Vitro. *Chem Senses*, 2019, 44: 327-338.
134. Ogando N, Zevenhoven-Dobbe J, Meer Y, Bredenbeek P, Snijder E. The enzymatic activity of the nsp14 exoribonuclease is critical for replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 2020, 94.

135. Owen D, Allerton C, Anderson A, Aschenbrenner L, Avery M, Bertritt S, Boras B, Cardin R, Carlo A, Coffman K, Dantonio A, Di L, Eng H, Ferre R, Gajiwala K, Gibson S, Greasley S, Hurst B, Kadar E, Kalgutkar A. An oral SARS-CoV-2 M(pro) inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*, 2021, 374: 1586-1593.
136. Pan N, Bhatti M, Zhang H, Ni B, Fan X, Chen J. The Encystment-Related MicroRNAs and Its Regulation Molecular Mechanism in *Pseudourostyla cristata* Revealed by High Throughput Small RNA Sequencing. *Int J Mol Sci*, 2020, 21.
137. Pan R, Kindler E, Cao L, Zhou Y, Zhang Z, Liu Q, Ebert N, Züst R, Sun Y, Gorbalenya AE, Perlman S, Thiel V, Chen Y, Guo D. N7-Methylation of the Coronavirus RNA Cap Is Required for Maximal Virulence by Preventing Innate Immune Recognition. *mBio*, 2022, 13: e0366221.
138. Pan X, Zhou Y, Duan X, Cui J, Liu J, Song X, Ma W, Zhang W, Liu Y, Fan Y. The inhibitory effect Polygonum Cillinerve polysaccharide on transmissible gastroenteritis virus of swine. *Res Vet Sci*, 2021, 140: 47-55.
139. Park G, Osinski A, Hernandez G, Eitson J, Majumdar A, Tonelli M, Henzler-Wildman K, Pawłowski K, Chen Z, Li Y, Schoggins J, Tagliabracci V. The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2. *Nature*, 2022, 609: 793-800.
140. Park J, Cruz D, Shin H. Trypsin-induced hemagglutination activity of porcine epidemic diarrhea virus. *Arch Virol*, 2010, 155: 595-599.
141. Pasqual G, Burri D, Pasquato A, de la Torre J, Kunz S. Role of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection. *J Virol*, 2011, 85: 1662-1670.
142. Pibiri M, Sulas P, Camboni T, Leoni V, Simbula G. α -Lipoic acid induces Endoplasmic Reticulum stress-mediated apoptosis in hepatoma cells. *Sci Rep*, 2020, 10: 7139.
143. Pinkaew D, Chattopadhyay A, King M, Chunhacha P, Liu Z, Stevenson H, Chen Y, Sinthujaroen P, McDougal O, Fujise K. Fortilin binds IRE1 α and prevents ER stress from signaling apoptotic cell death. *Nat Commun*, 2017, 8: 18.
144. Preusse C, Marteau T, Fischer N, Hentschel A, Sickmann A, Lang S, Schneider U, Schara-Schmidt U, Meyer N, Ruck T, Dengler NF, Prudlo J, Dudesek A, Görl N, Allenbach Y, Benveniste O, Goebel HH, Dittmayer C, Stenzel W, Roos A. Endoplasmic reticulum-stress and unfolded protein response-activation in immune-mediated necrotizing myopathy. *Brain Pathol*, 2022, 32: e13084.
145. Qu X, Guan P, Han L, Wang Z, Huang X. Levistolide A Attenuates Alzheimer's Pathology Through Activation of the PPAR γ Pathway. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2021, 18: 326-339.

146. Quillard T, Araújo H, Franck G, Shvartz E, Sukhova G, Libby P. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *European heart journal*, 2015, 36: 1394-1404.
147. Rayner J, Roberts R, Kim J, Poklepovic A, Roberts J, Booth L, Dent P. AR12 (OSU-03012) suppresses GRP78 expression and inhibits SARS-CoV-2 replication. *Biochem Pharmacol*, 2020, 182: 114227.
148. Reddy B, Chapman A. A Patient with a Novel Gene Mutation Leading to Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12: 1695-1698.
149. Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 1938.
150. Ren X, Zhang L, Ma X, Li J, Lu Z. Integrated bioinformatics and experiments reveal the roles and driving forces for HSF1 in colorectal cancer. *Bioengineered*, 2022, 13: 2536-2552.
151. Renn A, Fu Y, Hu X, Hall M, Simeonov A. Fruitful Neutralizing Antibody Pipeline Brings Hope To Defeat SARS-Cov-2. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41: 815-829.
152. Rodriguez-Cotto R, Ortiz-Martínez M, Rivera-Ramírez E, Mateus V, Amaral B, Jiménez-Vélez B, Gioda A. Particle pollution in Rio de Janeiro, Brazil: increase and decrease of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 in human lung cells. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 2014, 194: 112-120.
153. Rutkowski D, Arnold S, Miller C, Wu J, Li J, Gunnison K, Mori K, Sadighi Akha A, Raden D, Kaufman R. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS biology*, 2006, 4: e374.
154. Sabrina L, Carole B. Griffithsin: An Antiviral Lectin with Outstanding Therapeutic Potential. *Viruses*, 2016, 8: 296.
155. Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 4433-4448.
156. Sano R, Reed J. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, 1833: 3460-3470.
157. Saud Z, Tyrrell V, Zaragkoulias A, Protty M, Statkute E, Rubina A, Bentley K, White D, Rodrigues P, Murphy R, Köfeler H, Griffiths W, Alvarez-Jarreta J, Brown R, Newcombe R, Heyman J, Pritchard M, McLeod R, Arya A, Lynch C. The SARS-CoV2 envelope differs from host cells, exposes procoagulant lipids, and is disrupted in vivo by oral rinses. *J Lipid Res*, 2022, 63: 100208.

158. Schlegel A, Giddings T, Jr., Ladinsky M, Kirkegaard K. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol*, 1996, 70: 6576-6588.
159. Schwarz D, Blower M. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 79-94.
160. Scortegagna M, Kim H, Li J, Yao H, Brill L, Han J, Lau E, Bowtell D, Haddad G, Kaufman R, Ronai Z. Fine tuning of the UPR by the ubiquitin ligases Siah1/2. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004348.
161. Scutigliani E, Kikkert M. Interaction of the innate immune system with positive-strand RNA virus replication organelles. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 37: 17-27.
162. Shaban M, Müller C, Mayr-Buro C, Weiser H, Meier-Soelch J, Albert B, Weber A, Linne U, Hain T, Babayev I, Karl N, Hofmann N, Becker S, Herold S, Schmitz M, Ziebuhr J, Kracht M. Multi-level inhibition of coronavirus replication by chemical ER stress. *Nat Commun*, 2021, 12: 5536.
163. Shen L, Feng C, Zhang K, Chen Y, Gao Y, Ke J, Chen X, Lin J, Li C, Iqbal J, Zhao Y, Wang W. Proteomics Study of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) in Autistic Children. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 105.
164. Shen L, Niu J, Wang C, Huang B, Wang W, Zhu N, Deng Y, Wang H, Ye F, Cen S, Tan W. High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses. *J Virol*, 2019, 93.
165. Shen Y, Meunier L, Hendershot L. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem*, 2002, 277: 15947-15956.
166. Shi C, Nabar N, Huang N, Kehrl J. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discov*, 2019, 5: 101.
167. Shi J, Li Z, Xu R, Zhang J, Zhou Q, Gao R, Lu H, Lan Y, Zhao K, He H, Gao F, He W. The PERK/PKR-eIF2 α Pathway Negatively Regulates Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Replication by Attenuating Global Protein Translation and Facilitating Stress Granule Formation. *J Virol*, 2022, 96: e0169521.
168. Shin J, Toyoda S, Fukuhara A, Shimomura I. GRP78, a Novel Host Factor for SARS-CoV-2: The Emerging Roles in COVID-19 Related to Metabolic Risk Factors. *Biomedicines*, 2022, 10.

169. Shin W, Ha D, Machida K, Lee A. The stress-inducible ER chaperone GRP78/BiP is upregulated during SARS-CoV-2 infection and acts as a pro-viral protein. *Nat Commun*, 2022, 13: 6551.
170. Shu W, Guo Z, Li L, Xiong Z, Wang Z, Yang Y, Li Y, He M, Gong R, Gao B. Regulation of Molecular Chaperone GRP78 by Hepatitis B Virus: Control of Viral Replication and Cell Survival. *Mol Cell Biol*, 2020, 40.
171. Silva J, Urban J, Araújo E, Lameira J, Moliner V, Alves C. Exploring the Catalytic Mechanism of the RNA Cap Modification by nsp16-nsp10 Complex of SARS-CoV-2 through a QM/MM Approach. *Int J Mol Sci*, 2021, 23.
172. Song H, Seo M, Stadler K, Yoo B, Choo Q, Coates S, Uematsu Y, Harada T, Greer C, Polo J, Pileri P, Eickmann M, Rappuoli R, Abrignani S, Houghton M, Han J. Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *J Virol*, 2004, 78: 10328-10335.
173. Song J, Shim J, Choi H. Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species. *Virology Journal*, 2011, 8: 1-6.
174. Stolboushkina E, Garber M. Eukaryotic type translation initiation factor 2: structure-functional aspects. *Biochemistry (Mosc)*, 2011, 76: 283-294.
175. Su A, Wang H, Li Y, Wang X, Chen D, Wu Z. Opposite Roles of RNase and Kinase Activities of Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) on HSV-1 Replication. *Viruses*, 2017, 9.
176. Su M, Li C, Qi S, Yang D, Jiang N, Yin B, Guo D, Kong F, Yuan D, Feng L, Sun D. A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: Characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67: 1129-1140.
177. Sun P, Jin J, Wang L, Wang J, Zhou H, Zhang Q, Xu X. Porcine epidemic diarrhea virus infections induce autophagy in Vero cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress through PERK and IRE1 pathways. *Vet Microbiol*, 2021, 253: 108959.
178. Sun Y, Li C, Li Z, Shangguan A, Jiang J, Zeng W, Zhang S, He Q. Quercetin as an antiviral agent inhibits the Pseudorabies virus in vitro and in vivo. *Virus Research*, 2021, 305: 198556.
179. Tang B, Chan K, Cheng V, Woo P, Lau S, Lam C, Chan T, Wu A, Hung I, Leung S, Yuen K. Comparative host gene transcription by microarray analysis early after infection of the Huh7 cell line by severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E. *J Virol*, 2005, 79: 6180-6193.

180. Tatu U, Hammond C, Helenius A. Folding and oligomerization of influenza hemagglutinin in the ER and the intermediate compartment. *Embo j*, 1995, 14: 1340-1348.
181. Taylor G, Raghuwanshi S, Rowe D, Wadowsky R, Rosendorff A. Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication. *Blood*, 2011, 118: 5528-5539.
182. Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, Kratzat H, Hayn M, Mackens-Kiani T, Cheng J, Straub J, Stürzel C, Fröhlich T, Berninghausen O, Becker T, Kirchhoff F, Sparrer K, Beckmann R. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science*, 2020, 369: 1249-1255.
183. Totura A, Bavari S. Broad-spectrum coronavirus antiviral drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2019, 14: 397-412.
184. Tseng C, Zhang P, Lee A. The COOH-Terminal Proline-Rich Region of GRP78 Is a Key Regulator of Its Cell Surface Expression and Viability of Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, 2019, 21: 837-848.
185. Turpin J, Frumence E, Harrabi W, Haddad J, El Kalamouni C, Desprès P, Krejbich-Trotot P, Viranaïcken W. Zika virus subversion of chaperone GRP78/BiP expression in A549 cells during UPR activation. *Biochimie*, 2020, 175: 99-105.
186. Valenzuela-Fernández A, Cabrera-Rodríguez R, Casado C, Pérez-Yanes S, Pernas M, García-Luis J, Marfil S, Olivares I, Estévez-Herrera J, Trujillo-González R, Blanco J, Lopez-Galindez C. Contribution of the HIV-1 Envelope Glycoprotein to AIDS Pathogenesis and Clinical Progression. *Biomedicines*, 2022, 10.
187. Versteeg G, van deNes P, Bredenbeek P, Spaan W. The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations. *J Virol*, 2007, 81: 10981-10990.
188. Vincent M, Bergeron E, Benjannet S, Erickson B, Rollin P, Ksiazek T, Seidah N, Nichol S. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virol J*, 2005, 2: 69.
189. Wang D, Fang L, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea in China. *Virus Res*, 2016, 226: 7-13.
190. Wang J, Hu B, Zhao Z, Zhang H, Zhang H, Zhao Z, Ma X, Shen B, Sun B, Huang X, Hou J, Xia Q. Intracellular XBP1-IL-24 axis dismantles cytotoxic unfolded protein response in the liver. *Cell death & disease*, 2020, 11: 17.
191. Wang P, Bai J, Liu X, Wang M, Wang X, Jiang P. Tomatidine inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication by targeting 3CL protease. *Vet Res*, 2020, 51: 136.

192. Wang P, Wang X, Liu X, Sun M, Liang X, Bai J, Jiang P. Natural Compound ZINC12899676 Reduces Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication by Inhibiting the Viral NTPase Activity. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 879733.
193. Wang X, Peng P, Pan Z, Fang Z, Lu W, Liu X. Psoralen inhibits malignant proliferation and induces apoptosis through triggering endoplasmic reticulum stress in human SMMC7721 hepatoma cells. *Biol Res*, 2019, 52: 34.
194. Wang Y, Gu Y, Liu M, Bai Y, Liang L, Wang H. TBHQ Alleviated Endoplasmic Reticulum Stress-Apoptosis and Oxidative Stress by PERK-Nrf2 Crosstalk in Methamphetamine-Induced Chronic Pulmonary Toxicity. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 4310475.
195. Wang Y, Li J, Sun M, Ni B, Huan C, Huang L, Li C, Fan H, Ren X, Mao X. Triggering unfolded protein response by 2-Deoxy-D-glucose inhibits porcine epidemic diarrhea virus propagation. *Antiviral Research*, 2014, 106: 33-41.
196. Wati S, Soo M, Zilm P, Li P, Paton A, Burrell C, Beard M, Carr J. Dengue virus infection induces upregulation of GRP78, which acts to chaperone viral antigen production. *J Virol*, 2009, 83: 12871-12880.
197. Wolters-Eisfeld G, Mercanoglu B, Hofmann B, Wolpers T, Schnabel C, Harder S, Steffen P, Bachmann K, Steglich B, Schrader J, Gagliani N, Schlüter H, Güngör C, Izbicik J, Wagener C, Bockhorn M. Loss of complex O-glycosylation impairs exocrine pancreatic function and induces MODY8-like diabetes in mice. *Exp Mol Med*, 2018, 50: 1-13.
198. Wu W, Cheng Y, Zhou H, Sun C, Zhang S. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virol J*, 2023, 20: 6.
199. Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, Yang J. Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*, 2016, 8: 6.
200. Wu Y, Chang C, Hung C, Tsai M, Schuyler S, Wang R. Japanese encephalitis virus co-opts the ER-stress response protein GRP78 for viral infectivity. *Virol J*, 2011, 8: 128.
201. Xia C, Vijayan M, Pritzl C, Fuchs S, McDermott A, Hahm B. Hemagglutinin of Influenza A Virus Antagonizes Type I Interferon (IFN) Responses by Inducing Degradation of Type I IFN Receptor 1. *J Virol*, 2015, 90: 2403-2417.
202. Xin J, Shan W, Li J, Yu H, Zuo Z. Activation of the Lateral Habenula-Ventral Tegmental Area Neural Circuit Contributes to Postoperative Cognitive Dysfunction in Mice. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9: e2202228.

203. Xu X, Liu Y, Gao J, Shi X, Yan Y, Yang N, Wang Q, Zhang Q. GRAMD4 regulates PEDV-induced cell apoptosis inhibiting virus replication via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Vet Microbiol*, 2023, 279: 109666.
204. Xu X, Zhang H, Zhang Q, Dong J, Liang Y, Huang Y, Liu H, Tong D. Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression. *Virology journal*, 2013a, 10: 26.
205. Xu X, Zhang H, Zhang Q, Huang Y, Dong J, Liang Y, Liu H, Tong D. Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression. *Vet Microbiol*, 2013b, 164: 212-221.
206. Xu X, Zhang H, Zhang Q, Dong J, Huang Y, Tong D. Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells. *Acta Virol*, 2015, 59: 265-275.
207. Xue C, Li X, Ba L, Shen Y, Sun Z, Gu J, Yang Y, Han Q, Zhao R. Irisin mediates beiging of adipose-derived mesenchymal stem cells through binding to TRPC3. *BMC Biol*, 2022, 20: 95.
208. Xue M, Fu F, Ma Y, Zhang X, Li L, Feng L, Liu P. The PERK Arm of the Unfolded Protein Response Negatively Regulates Transmissible Gastroenteritis Virus Replication by Suppressing Protein Translation and Promoting Type I Interferon Production. *J Virol*, 2018, 92.
209. Yamaguchi A, Hori O, Stern D, Hartmann E, Ogawa S, Tohyama M. Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol*, 1999, 147: 1195-1204.
210. Yan W, Frank C, Korth M, Sopher B, Novoa I, Ron D, Katze M. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 15920-15925.
211. Yang D, Wu Y, Turan I, Keil J, Li K, Chen M, Liu R, Wang L, Sun XL, Chen G. Targeting intracellular Neu1 for Coronavirus Infection Treatment. *iScience*, 2023, 106037.
212. Yang J, Tian G, Chen D, Mao X, He J, Zheng P, Yu J, Luo Y, Luo J, Huang Z, Wu A, Yan H, Yu B. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication by regulating cell cycle resumption in IPEC-J2 porcine epithelial cells. *Microb Pathog*, 2021, 158: 105017.

213. Yang L, Guan G, Lei L, Lv Q, Liu S, Zhan X, Jiang Z, Gu X. Palmitic acid induces human osteoblast-like Saos-2 cell apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Stress Chaperones*, 2018, 23: 1283-1294.
214. Yang L, Liu W, Yu X, Wu M, Reichert JM, Ho M. COVID-19 antibody therapeutics tracker: a global online database of antibody therapeutics for the prevention and treatment of COVID-19. *Antib Ther*, 2020, 3: 205-212.
215. Yang Y, Zhang Y, Wang L, Lee S. Levistolide A Induces Apoptosis via ROS-Mediated ER Stress Pathway in Colon Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42: 929-938.
216. Yang Z, Zhang J, Jiang D, Khatri P, Solow-Cordero D, Toesca D, Koumenis C, Denko N, Giaccia A, Le Q, Koong A. A Human Genome-Wide RNAi Screen Reveals Diverse Modulators that Mediate IRE1 α -XBP1 Activation. *Mol Cancer Res*, 2018, 16: 745-753.
217. Ye Z, Wong C, Li P, Xie Y. A SARS-CoV protein, ORF-6, induces caspase-3 mediated, ER stress and JNK-dependent apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 2008, 1780: 1383-1387.
218. Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha M. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*, 2021, 49: 199-213.
219. Yu J, Liu R, Zhou B, Chou TW, Ghedin E, Sheng Z, Gao R, Zhai SL, Wang D, Li F. Development and Characterization of a Reverse-Genetics System for Influenza D Virus. *J Virol*, 2019, 93.
220. Yu M, Haslam R, Haslam D. HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J Biol Chem*, 2000, 275: 24984-24992.
221. Yu R, Chen L, Lan R, Shen R, Li P. Computational screening of antagonists against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 56: 106012.
222. Yuan C, Huang X, Zhai R, Ma Y, Xu A, Zhang P, Yang Q. In Vitro Antiviral Activities of Salinomycin on Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Viruses*, 2021, 13.
223. Yuen C, Lam J, Wong W, Mak L, Wang X, Chu H, Cai J, Jin D, To K, Chan JF, Yuen KY, Kok KH. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 1418-1428.
224. Zhang H, Zou C, Peng O, Ashraf U, Xu Q, Gong L, Fan B, Zhang Y, Xu Z, Xue C, Wei X, Zhou Q, Tian X, Shen H, Li B, Zhang X, Cao Y. Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution and transmission. *Mol Biol Evol*, 2023.

225. Zhang P, Su C, Jiang Z, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 UL41 Protein Suppresses the IRE1/XBP1 Signal Pathway of the Unfolded Protein Response via Its RNase Activity. *J Virol*, 2017, 91.
226. Zhang Q, Li Y, Wang X, Yin C, Zhou Q, Guo J, Zhao J, Xian X, Hou Z, Wang Q. Sevoflurane exposure causes neuronal apoptosis and cognitive dysfunction by inducing ER stress via activation of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 990679.
227. Zhang R, Hao J, Wu Q, Guo K, Wang C, Zhang W, Liu W, Wang Q, Yang X. Dehydrocostus lactone inhibits cell proliferation and induces apoptosis by PI3K/Akt/Bad and ERS signalling pathway in human laryngeal carcinoma. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 6028-6042.
228. Zhang S, Cao Y, Yang Q. Transferrin receptor 1 levels at the cell surface influence the susceptibility of newborn piglets to PEDV infection. *PLoS Pathog*, 2020, 16: e1008682.
229. Zhang S, Gui C, Shao M, Kumar P, Huang H, Ju J. Antimicrobial tunicamycin derivatives from the deep sea-derived *Streptomyces xinghaiensis* SCSIO S15077. *Nat Prod Res*, 2020, 34: 1499-1504.
230. Zhang T, Ding Y, An H, Feng L, Wang S. Screening anti-tumor compounds from *Ligusticum wallichii* using cell membrane chromatography combined with high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2015, 38: 3247-3253.
231. Zhang X, Yang Z, Pan T, Long X, Sun Q, Wang P, Li X, Kuang E. SARS-CoV-2 ORF3a induces RETREG1/FAM134B-dependent reticulophagy and triggers sequential ER stress and inflammatory responses during SARS-CoV-2 infection. *Autophagy*, 2022, 18: 2576-2592.
232. Zhang Y, Chen H, Zou M, Oerlemans R, Shao C, Ren Y, Zhang R, Huang X, Li G, Cong Y. Hypericin Inhibit Alpha-Coronavirus Replication by Targeting 3CL Protease. *Viruses*, 2021, 13.
233. Zhang Y, Zhang L, Wu J, Yu Y, Liu S, Li T, Li Q, Ding R, Wang H, Nie J, Cui Z, Wang Y, Huang W, Wang Y. A second functional furin site in the SARS-CoV-2 spike protein. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11: 182-194.
234. Zhao D, Liu Q, Han K, Wang H, Yang J, Bi K, Liu Y, Liu N, Tian Y, Li Y. Identification of Glucose-Regulated Protein 78 (GRP78) as a Receptor in BHK-21 Cells for Duck Tembusu Virus Infection. *Front Microbiol*, 2018, 9: 694.

235. Zou D, Xu J, Duan X, Xu X, Li P, Cheng L, Zheng L, Li X, Zhang Y, Wang X, Wu X, Shen Y, Yao X, Wei J, Yao L, Li L, Song B, Ma J, Liu X, Wu Z *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein causes endoplasmic reticulum stress to facilitate autophagy. *Vet Microbiol*, 2019, 235: 209-219.