

非洲猪瘟病毒 E423R 蛋白诱导细胞自噬的功能

黄静怡^{1,2,3,4}, 康喜龙^{1,2,3,4*}, 黄霞^{1,2,3,4}, 周懿^{1,2,3,4}, 刘弘知^{1,2,3,4}, 焦新安^{1,2,3,4}, 潘志明^{1,2,3,4*}

- 1 扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州
- 2 扬州大学, 江苏省高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州
- 3 扬州大学, 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州
- 4 扬州大学, 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 江苏 扬州

黄静怡, 康喜龙, 黄霞, 周懿, 刘弘知, 焦新安, 潘志明. 非洲猪瘟病毒 E423R 蛋白诱导细胞自噬的功能[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3195-3207.

HUANG Jingyi, KANG Xilong, HUANG Xia, ZHOU Yi, LIU Hongzhi, JIAO Xin'an, PAN Zhiming. African swine fever virus protein E423R induces autophagy[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 3195-3207.

摘要: 【目的】探究非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)蛋白 E423R 诱导细胞自噬的功能。【方法】通过高内涵分析系统量化分析 pCMV-Myc-E423R 转染自噬报告细胞 HeLa-DifluoTM hLC3 后的 RFP-LC3 荧光斑点数, 评估自噬通量; 利用 Western blotting 分析 HeLa 细胞中自噬关键蛋白 LC3-II、SQSTM1/p62 的表达水平; 采用激光共聚焦技术观察自噬体与溶酶体的共定位情况; 通过 Western blotting 检测 E423R 蛋白与 LC3-II 表达的剂量依赖效应以及对 AKT/mTOR/ULK1 信号通路的调控作用。【结果】高内涵细胞分析实验显示, 表达 E423R 蛋白的报告细胞中 RFP-LC3 荧光斑点明显增多, 表明 E423R 蛋白可以诱导自噬发生活化; Western blotting 分析证实, E423R 蛋白表达促使 LC3-II/ β -actin 显著升高, p62 的表达水平显著下调; 共聚焦结果显示 E423R 蛋白可增强 GFP-LC3 的表达, 促使 GFP-LC3 与 Lyso-Tracker Red 荧光共定位明显增多, 诱导自噬体与溶酶体融合; 同时, E423R 蛋白表达水平与 HeLa 细胞中的 LC3-II 表达水平呈正相关, E423R 蛋白能下调 mTOR 信号通路中 p-AKT、p-mTOR、p-ULK1 (Ser757) 的表达。【结论】本研究揭示了 ASFV E423R 蛋白通过 AKT/mTOR/ULK1 信号通路诱导完整的细胞自噬过程, E423R 与 LC3-II 的表达呈一定程度的剂量依赖效应, 为深入研究自噬在 ASFV 感染与致病机制中的功能奠定了基础。

关键词: 非洲猪瘟病毒; E423R; 自噬; AKT/mTOR/ULK1 信号通路

资助项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2021331); 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX24_3823); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

This work was supported by the Key Research and Development Program (Modern Agriculture) Project of Jiangsu Province (BE2021331), the Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX24_3823), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

*Corresponding authors. E-mail: KANG Xilong, xlkang@yzu.edu.cn; PAN Zhiming, zmpan@yzu.edu.cn

Received: 2025-01-15; Accepted: 2025-03-04; Published online: 2025-05-12

African swine fever virus protein E423R induces autophagy

HUANG Jingyi^{1,2,3,4}, KANG Xilong^{1,2,3,4*}, HUANG Xia^{1,2,3,4}, ZHOU Yi^{1,2,3,4}, LIU Hongzhi^{1,2,3,4}, JIAO Xin'an^{1,2,3,4}, PAN Zhiming^{1,2,3,4*}

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

4 Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-product Safety of the Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To explore the autophagy induced by the African swine fever virus (ASFV) protein E423R. **[Methods]** The RFP-LC3 fluorescent spots following the transfection of HeLa-DifluoTM hLC3 cells with pCMV-Myc-E423R was quantified by the High-Content Analysis System, and the autophagic flux was assessed. The expression levels of key autophagy proteins, LC3-II and SQSTM1/p62, in HeLa cells were analyzed *via* Western blotting. Co-localization of autophagosomes and lysosomes was examined by laser confocal microscopy. Additionally, Western blotting was employed to investigate the dose-dependent effect of E423R on LC3-II expression and the regulatory effect of E423R on the AKT/mTOR/ULK1 signaling pathway. **[Results]** The High-Content Analysis System demonstrated a significant increase in RFP-LC3 fluorescence spots in the reporter cells expressing E423R, suggesting that E423R induced the activation of autophagy. Western blotting further confirmed that the expression of E423R significantly elevated the LC3-II/ β -actin ratio while decreasing the expression level of p62. Confocal microscopy results indicated that E423R enhanced the expression of GFP-LC3, promoted the co-localization of GFP-LC3 with Lyso-Tracker Red, and facilitated the fusion of autophagosomes and lysosomes. Additionally, the expression level of E423R exhibited a positive correlation with the expression level of LC3-II in HeLa cells. Furthermore, E423R down-regulated the expression of p-AKT, p-mTOR, and p-ULK1 (Ser757) in the mTOR signaling pathway. **[Conclusion]** This study demonstrates that the ASFV E423R protein induces complete autophagy *via* the AKT/mTOR/ULK1 signaling pathway, exhibiting a dose-dependent effect on LC3-II expression to a certain degree. These findings provide a foundation for further investigation into the infection and pathogenic mechanisms of ASFV.

Keywords: African swine fever virus (ASFV); E423R; autophagy; AKT/mTOR/ULK1 signaling pathway

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染引起的一种急性、出血性传染病。患病家猪和野猪表现出高热、皮肤及内脏器官出血性病变等

症状。由于尚无有效的疫苗和特效治疗药物,非洲猪瘟疫情难以控制,严重影响着我国乃至全球养猪业的运营与发展^[1-2]。ASFV是一种包膜、胞质的双链DNA病毒,基因组为170–193 kb,

编码 68 种结构蛋白和 100 多种非结构蛋白^[3], 参与调节病毒复制、装配、蛋白质修饰以及与宿主细胞的交互作用等多个过程^[4-5]。例如: p150、p37、p14、p34、p35 和 p15 是病毒粒子核衣壳的主要成分, 参与病毒装配^[6]; CD2v 使红细胞吸附到被感染的细胞表面, 促进病毒进一步感染^[7]; p30 是一种早期膜蛋白, 能够诱导机体发生快速且强烈的免疫应答, 被视为 ASFV 感染早期的检测标志^[8]。然而, ASFV 编码的大多数蛋白的功能仍然未知。

自噬对维持细胞稳态至关重要。细胞能够通过自噬清除入侵的病原体, 从而抵抗病毒感染^[9-11]。研究显示, ASFV 可以参与调节宿主细胞自噬^[12]。其中, ASFV E199L 蛋白可通过与 PYCR2 相互作用, 降低 PYCR2 的表达, 诱导细胞自噬^[13]; ASFV K205R 蛋白通过诱导内质网应激激活自噬通路^[14]; ASFV p17 蛋白与宿主胞内蛋白 TOMM70 结合, 促进线粒体自噬受体 SQSTM1 与 TOMM70 的结合, 从而诱导线粒体自噬^[15]。然而, ASFV 致病机制复杂, 编码蛋白众多, 其与自噬的关系仍未被完全阐明。

ASFV E423R 蛋白是一种未表征蛋白, 由 Cackett 等^[16]通过高通量测序手段发现, 其在 ASFV 复制周期后期表达。Rodríguez 等^[17]通过氨基酸序列比对发现, E423R 蛋白可能与双组分信号传导蛋白组氨酸激酶相关, 参与调控 DpiA 等转录调控蛋白的磷酸化。目前有关 ASFV E423R 蛋白的相关研究报道非常少。为了探究 E423R 与细胞自噬的关系, 本研究通过高内涵细胞分析技术, 分析 ASFV E423R 蛋白对自噬体形成的影响; 使用 Western blotting 检测自噬关键蛋白 LC3-II、p62 的表达; 利用激光共聚焦技术观察 E423R 表达下自噬小体与溶酶体的共定位; 通过 Western blotting 探索 E423R 蛋白与 LC3-II 是否存在剂量依赖效应, 以及 E423R 参与细胞自噬的具体通路, 以期深入

研究 ASFV 病毒蛋白调节细胞自噬的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

HeLa 细胞、HeLa-Difluo™ hLC3 自噬报告细胞系均由本实验室保存, 使用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基进行培养。其中, HeLa-Difluo™ hLC3 自噬报告细胞系在含有 100 µg/mL Zeocin™ 的生长培养基中进行培养和细胞传代。pCMV-Myc 载体由本实验室保存。

1.2 主要试剂

无内毒素质粒小提中量试剂盒, Tiangen 公司; 细胞培养基 DMEM、胎牛血清、胰酶、Opti-MEM (转染用培养基), Gibco 公司; Lip2000 Transfection Reagent, Biosharp 公司; 180 kDa Prestained Protein Marker、180 kDa Plus Prestained Protein Marker, Vazyme 公司; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、Myc 抗体(小鼠单抗)、β-Actin Mouse Monoclonal Antibody、mTOR Rabbit Monoclonal Antibody、山羊抗兔 Alexa Fluor 488、山羊抗小鼠 DyLight 405 抗体, 上海碧云天生物技术股份有限公司; LC3 Polyclonal Antibody, 武汉三鹰生物技术有限公司; SQSTM1/p62 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、AKT1/2/3 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、Phospho-AKT (S473) Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、Anti-ULK1 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、Phospho-mTOR (S2448) Mouse Monoclonal Antibody, 杭州华安生物技术有限公司; Goat Anti Rabbit IgG HRP、Goat Anti Mouse IgG HRP, ABclone 公司; ULK1 (Phospho Ser757) Rabbit Polyclonal Antibody, 苏州博特龙免疫技术有限公司。

1.3 ASFV E423R、ASFV E199L、ASFV DP238L 真核表达质粒的构建及表达

ASFV E423R 基因 (GenBank 登录号为 AAA65355.1)、ASFV E199L 基因 (GenBank 登录号为 AAA65358.1)、ASFV DP238L 基因 (GenBank 登录号为 AAA65373.1) 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 并插入到 pCMV-Myc 表达载体的 *EcoR* I 和 *Eag* I 酶切位点之间。将 pCMV-Myc、pCMV-Myc-*E423R*、pCMV-Myc-*E199L*、pCMV-Myc-*DP238L* 分别转染至 HeLa 细胞, 24 h 后使用 Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞, 收集总蛋白。使用 Myc 抗体(小鼠单抗)作为一抗, 通过 Western blotting 检测 E423R、E199L、DP238L 蛋白的表达情况。

1.4 E423R 蛋白对自噬体形成的影响

将自噬报告细胞 HeLa-Difluo™ hLC3 接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养过夜。待细胞生长至 70% 后, 转染 200 ng pCMV-Myc-*E423R*, 24 h 后使用 1:1 混匀的甲醇:丙酮进行固定, PBS 清洗 3 遍, 加入 DAPI 荧光染料 37 °C 避光标记 8 min。设置如下对照: Mock 组(空白对照, 不进行质粒转染、Rapamycin 处理), EV 组(阴性对照, 200 ng pCMV-Myc 转染), Rapamycin 组(阳性对照, 使用 25 μmol/L Rapamycin 处理细胞, 2 h 后再进行固定等后续操作), E199L 组(阳性对照, 使用 pCMV-Myc-*E199L* 质粒进行转染), DP238L 组(无关对照, 使用 pCMV-Myc-*DP238L* 质粒进行转染)。使用 Operetta CLS 高内涵细胞成像仪 HCA 进行自噬体与荧光共定位观察。

1.5 E423R 蛋白对自噬关键蛋白 LC3、SQSTM1/p62 表达的影响

为了评价 E423R 蛋白对自噬关键蛋白 LC3、SQSTM1/p62 的影响, 将 HeLa 细胞接种于 24 孔培养板, 进行如下处理: 分别使用 800 ng

pCMV-Myc、pCMV-Myc-*E423R*、pCMV-Myc-*E199L* 转染 HeLa 细胞。收样前 2 h 更换含 25 μmol/L 雷帕霉素或 100 nmol/L 巴佛洛霉素 A1 的 DMEM, 继续培养至 24 h, 收取总蛋白。通过 Western blotting 检测 LC3、SQSTM1/p62 的表达水平。

1.6 E423R 蛋白对自噬流的影响

为了进一步探究 E423R 蛋白对自噬过程的影响, 将 HeLa 细胞接种于放有细胞爬片的 24 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养过夜。使用 800 ng pCMV-Myc-*E423R* 进行转染, 24 h 后加入 PBS 清洗细胞。使用 37 °C 预热的 4% 多聚甲醛, 室温固定 15–20 min, PBS 清洗, 加入 0.5% Triton X-100 400 μL 常温破膜 20 min。将细胞在含 5% BSA 的 PBS 中 37 °C 封闭 2 h, 依次孵育 LC3 Polyclonal Antibody、Myc 抗体(小鼠单抗), 置于 4 °C、40 r/min 的水平摇床上过夜。PBS 清洗 4 次, 每次 5 min, 加入山羊抗兔 Alexa Fluor 488、山羊抗小鼠 DyLight 405 37 °C 孵育 2 h, PBS 清洗 4 次, 每次 5 min, 加入甘油、指甲油封片。设置如下对照: Mock 组(空白对照, 不进行质粒转染、Rapamycin 处理), EV 组(阴性对照, 使用 800 ng pCMV-Myc 转染), EV+Rapamycin 组(阳性对照, 使用 800 ng pCMV-Myc 进行转染), 22 h 后使用 25 μmol/L 雷帕霉素处理 2 h 再进行固定等后续操作。

1.7 E423R 蛋白诱导自噬剂量依赖效应探究

为了检测 E423R 与 LC3-II 蛋白之间是否存在剂量依赖效应, 使用 24 孔板接种 HeLa 细胞, 分别将 600 ng pCMV-Myc 转染 HeLa 细胞作为对照组, 将 200、400、600、800、1 000 ng pCMV-Myc-*E423R* 转染到 HeLa 细胞, 24 h 后收取总蛋白。使用 Myc 抗体(小鼠单抗)、LC3 Polyclonal Antibody 作为一抗, 通过 Western blotting 检测 E423R、LC3 的表达水平。

1.8 E423R 蛋白对 AKT/mTOR/ULK1 信号通路的调控作用

为了探究 E423R 蛋白诱导细胞自噬所涉及的信号通路, 使用 24 孔板接种 HeLa 细胞, 将 pCMV-Myc-E423R 分别以 200、400、600、800、1 000 ng 的剂量转染到 HeLa 细胞; 同时设立对照组, 将 pCMV-Myc 以 600 ng 的剂量转染到 HeLa 细胞。24 h 后, 进行裂解、收样。使用 AKT1/2/3 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、Phospho-AKT (S473) Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、mTOR Rabbit Monoclonal Antibody、Phospho-mTOR (S2448) Mouse Monoclonal Antibody、Anti-ULK1 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、ULK1 (Phospho Ser757) Rabbit Polyclonal Antibody 作为一抗, 通过 Western blotting 检测 AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、ULK1 等蛋白的表达水平。

1.9 统计学分析

将试验所得数据通过 GraphPad Prism 8 软件进行 *t* 检验分析, 统计学差异用 *P* 值表示, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。所有涉及统计学分析的数据至少重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 E423R、E199L、DP238L 蛋白表达的鉴定

为检测 pCMV-Myc-E423R、pCMV-Myc-E199L、pCMV-Myc-DP238L 质粒是否表达, 分别将 pCMV-Myc-E423R、pCMV-Myc-E199L、pCMV-Myc-DP238L 质粒转染 HeLa 细胞, 24 h 后收取总蛋白, 以 Myc 抗体(小鼠单抗)作为一抗进行 Western blotting。结果如图 1 所示, pCMV-Myc-E423R 转染组在 48 kDa 左右有明显可见的条带(图 1A), pCMV-Myc-E199L 转染组在 22 kDa 左右有明显可见的条带(图 1B),

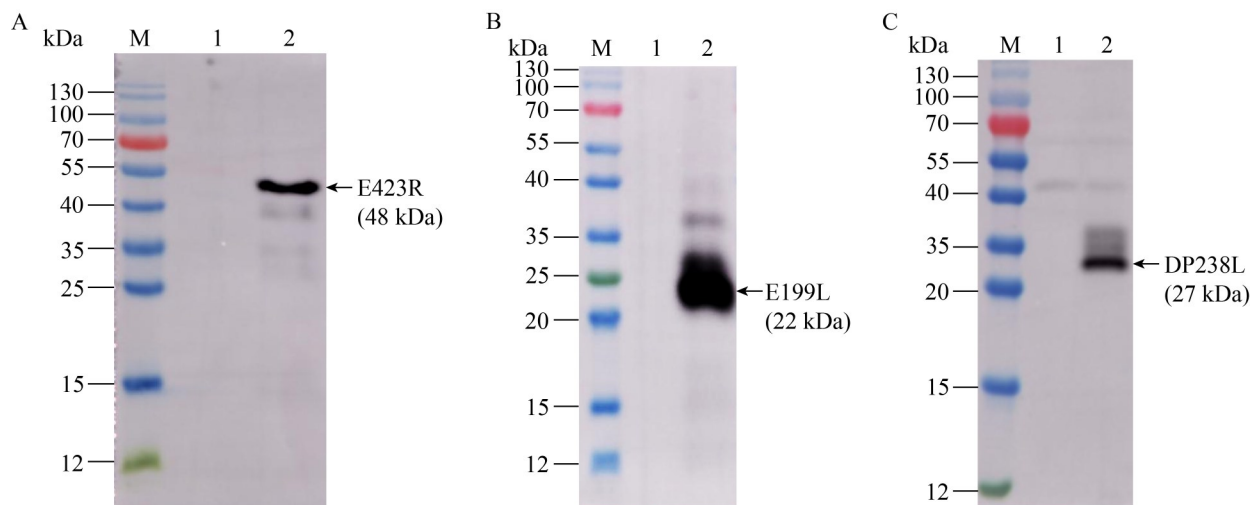


图1 E423R、E199L、DP238L蛋白表达的鉴定

Figure 1 Identification of expression of E423R, E199L and DP238L proteins. A: Western blotting was used to detect the expression of E423R protein (Lane M: 180 kDa Prestained Protein Marker; Lane 1: pCMV-Myc; Lane 2: pCMV-Myc-E423R); B: Western blotting was used to detect the expression of E199L protein (Lane M: 180 kDa Plus Prestained Protein Marker; Lane 1: pCMV-Myc; Lane 2: pCMV-Myc-E199L); C: Western blotting was used to detect the expression of DP238L protein (Lane M: 180 kDa Prestained Protein Marker; Lane 1: pCMV-Myc; Lane 2: pCMV-Myc-DP238L).

pCMV-Myc-DP238L 转染组在 27 kDa 左右有明显可见的条带(图 1C), 与预期结果一致, 而空载体转染组未见条带, 表明 E423R、E199L、DP238L 蛋白在真核细胞中成功表达。

2.2 E423R 蛋白诱导自噬体形成

通过高内涵实验探究 E423R 蛋白对细胞自噬的影响。HeLa-DifluoTM hLC3 细胞是来源于 HeLa 细胞系的自噬报告细胞, 能够表达融合蛋白 RFP::GFP::LC3, 通过检测双荧光或单荧光红色 LC3 斑点实时监测自噬通量。在自噬早期, RFP 和 GFP 信号都被检测到。随着自噬体与溶酶体的融合, GFP 荧光减弱, 只留下可见的 RFP 荧光。一般通过 RFP-GFP 阳性细胞的荧光斑点百分比或 RFP 阳性细胞的荧光斑点百分比评估自噬通量。如图 2A 所示, 未处理组(Mock)、空载体组(EV)与 pCMV-Myc-DP238L 转染组(DP238L)中的自噬活性处于较低水平, GFP-LC3、RFP-LC3 融合蛋白在胞质中主要呈弥散分布; 而在雷帕霉素刺激组(Rapamycin)、pCMV-Myc-E199L 转染组(E199L)和 pCMV-Myc-E423R 转染组(E423R)中, GFP-LC3、RFP-LC3 融合蛋白积聚在自噬体膜上, 形成明亮的红、绿荧光斑点。通过高内涵分析系统对 HeLa-DifluoTM hLC3 的 RFP-LC3 荧光斑点数进行量化分析(图 2B), 与 EV 组相比, E423R 组中 RFP-LC3 荧光斑点明显增多($P<0.05$)。上述结果表明, E423R 蛋白能够诱导自噬过程起始, 促进早期自噬体的形成。

2.3 E423R 蛋白诱导完整的细胞自噬过程

为检测 E423R 蛋白对细胞自噬的促进作用, 采用 Western blotting 分析检测 pCMV-Myc-E423R 转染后 HeLa 细胞中 LC3-II、p62 的表达水平。如图 3A 所示, 与空白对照组(Mock)和空载体组(EV)相比, pCMV-Myc-E423R 转染及阳性对照 pCMV-Myc-E199L 转染的细胞中 LC3-II 水平均升高; 使用 ImageJ 对 LC3 表达量进行灰

度分析, 与空载体组相比, pCMV-Myc-E423R 转染后 LC3-II/ β -actin 显著升高($P<0.05$) (图 3B)。自噬体的累积可能是由于自噬诱导或自噬流的阻断。为测定 E423R 蛋白诱导的自噬过程是否完整, 进一步检测 p62 的表达水平, 与空载体组相比, 在转染 24 h 后 p62 表达水平降低(图 3A); 使用 ImageJ 对 p62 表达量进行灰度分析, 与空载体组相比, pCMV-Myc-E423R 转染后 p62/ β -actin 显著降低($P<0.05$) (图 3C)。为进一步确定 E423R 蛋白是否影响自噬通量, 使用巴佛洛霉素 A1 处理 pCMV-Myc-E423R 转染的细胞。结果显示, 与未刺激组相比, 添加巴佛洛霉素 A1 的刺激组诱导的 LC3-II 积累更多, 并且未引起 p62 降解(图 3D)。同时灰度分析表明, 与未刺激组相比, 添加巴佛洛霉素 A1 的刺激组的 LC3-II/ β -actin (图 3E)与 p62/ β -actin (图 3F)均上升。因此, E423R 蛋白能够促进完整的细胞自噬过程。

2.4 E423R 蛋白诱导自噬体与溶酶体在 HeLa 细胞中的共定位

为进一步证实 E423R 蛋白诱导自噬过程的完整性, 通过激光共聚焦显微镜观察 E423R 蛋白诱导细胞产生自噬体积累以及自噬小体与溶酶体的共定位情况。利用 pCMV-Myc-E423R 转染 HeLa 细胞, Lyso-Tracker Red 染料标记细胞的酸性溶酶体, 在激光共聚焦显微镜下观察自噬体和 Lyso-Tracker Red 在细胞中的共定位。结果如图 4A 所示, 在 pCMV-Myc-E423R 转染组(E423R)中能够观察到自噬小体与溶酶体在细胞质内共定位, 说明 E423R 蛋白能够诱导自噬小体与溶酶体融合。利用 ImageJ 软件进行统计分析, pCMV-Myc-E423R 转染组(E423R)中, LC3 荧光斑点(图 4B)、自噬体与 Lyso-Tracker Red 的共定位(图 4C)与空载体组 EV 相比均明显增加($P<0.01$ 、 $P<0.001$)。以上结果表明, E423R 蛋白能够诱导自噬体与酸性溶酶体融合, 进一步

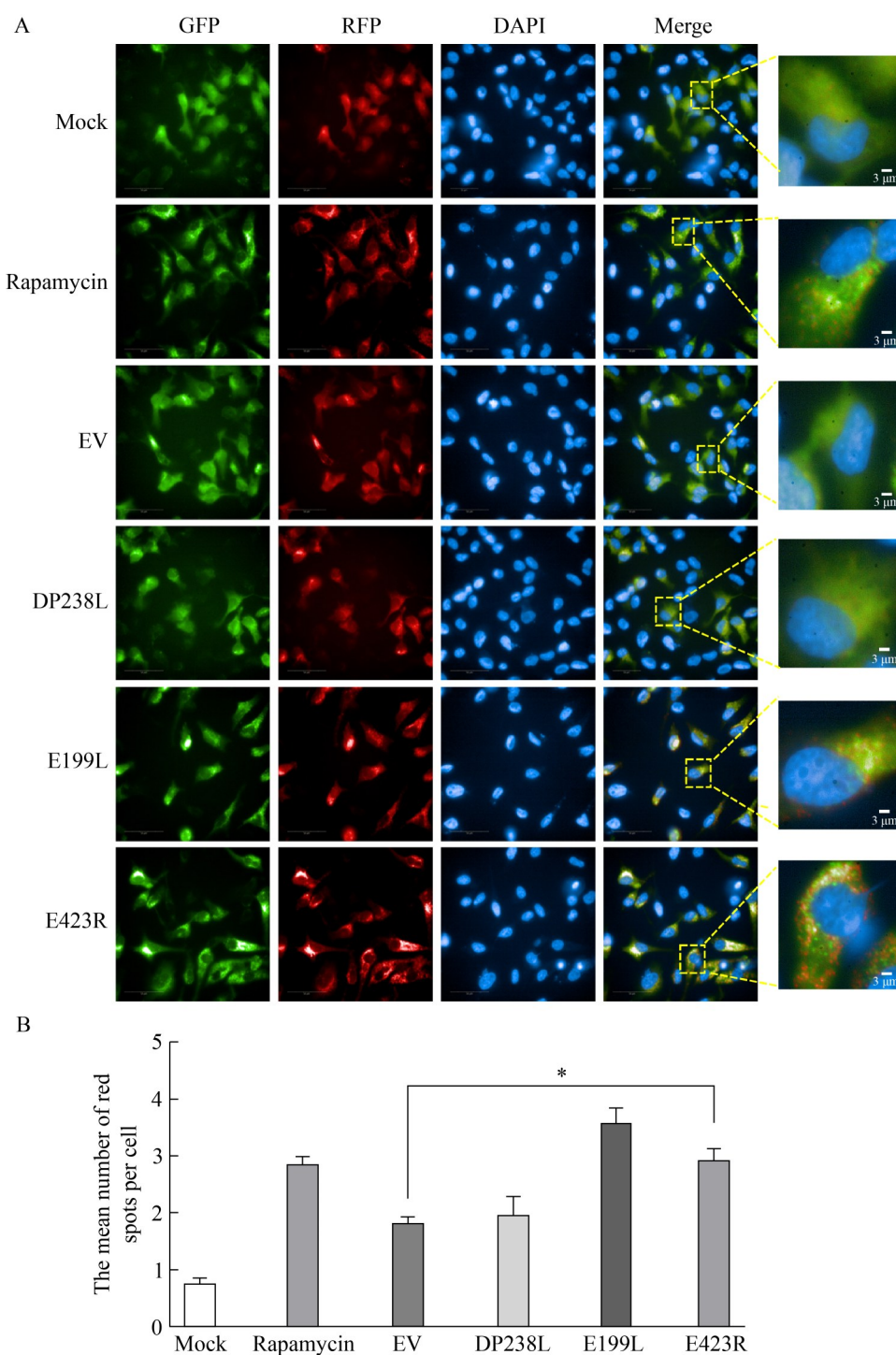


图2 E423R蛋白诱导自噬体形成

Figure 2 E423R protein promotes the formation of autophagosomes. A: The impact of E423R protein on autophagosome formation was assessed using High-Content Analysis System; B: Quantitative analysis of High-Content Analysis results. Mock: Blank control; Rapamycin: 25 $\mu\text{mol/L}$ rapamycin stimulation; EV: pCMV-Myc; DP238L: pCMV-Myc-DP238L; E199L: pCMV-Myc-E199L; E423R: pCMV-Myc-E423R. *: $P < 0.05$.

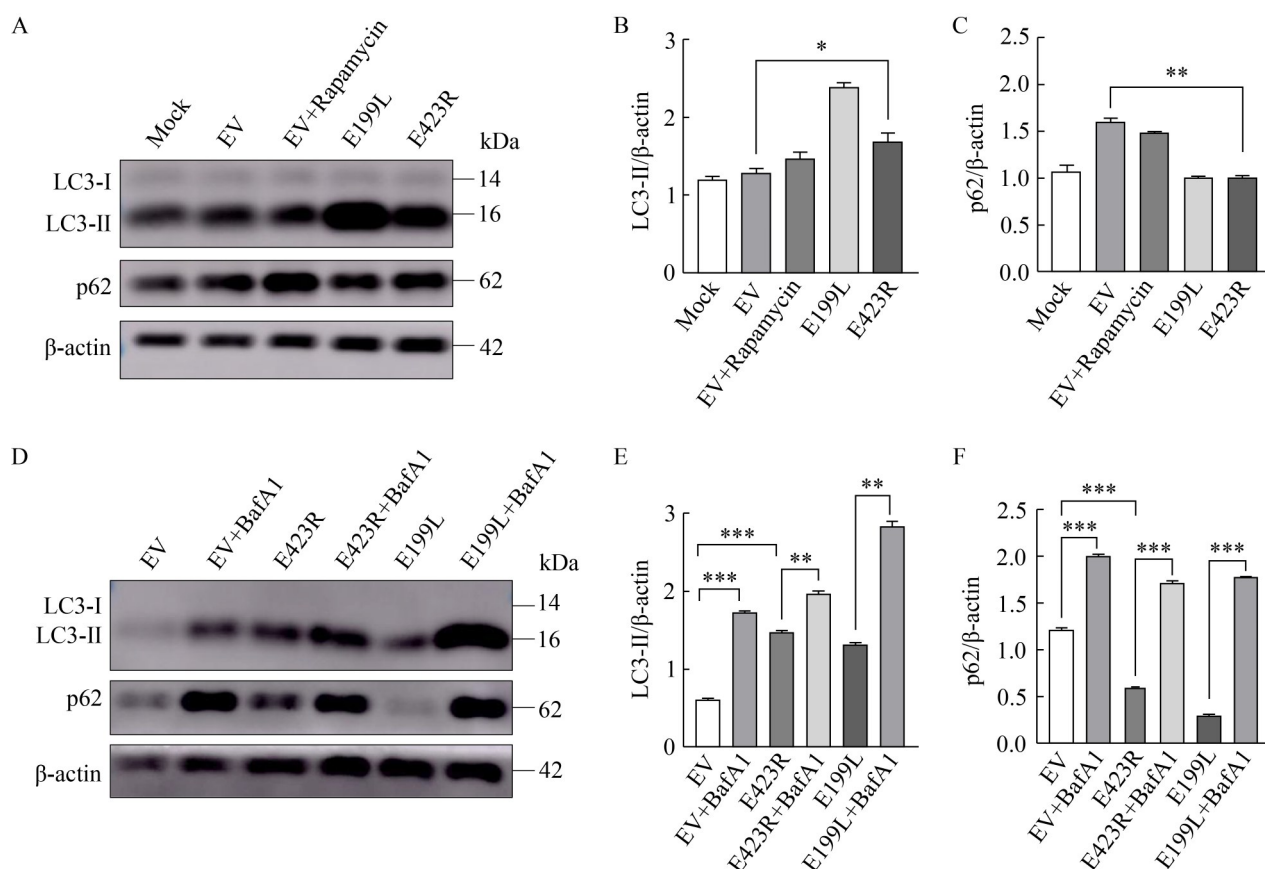


图3 ASFV E423R蛋白诱导完整的细胞自噬过程

Figure 3 Complete autophagy induced by ASFV E423R protein. A: Western blotting was used to detect the effect of E423R protein on the expression of autophagy-related proteins LC3 and p62; B: The gray values of the protein LC3-II; C: The gray values of the protein p62; D: Western blotting was employed to assess the autophagic function of E423R in response to stimulation by bafilomycin A1; E: The gray values of LC3-II stimulated by bafilomycin A1; F: The gray values of p62 stimulated by bafilomycin A1. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

验证了 E423R 蛋白诱导的自噬在 HeLa 细胞中是一个完整的过程。

2.5 E423R 蛋白诱导自噬关键蛋白 LC3-II 表达并呈剂量依赖

为检测 E423R 蛋白对细胞内自噬关键蛋白 LC3-II 的促进作用, 将 200–1 000 ng pCMV-Myc-E423R 或 pCMV-Myc (EV 组) 分别转染到 HeLa 细胞中, 24 h 后通过 Western blotting 测定 LC3-II 表达水平。如图 5A、5B 所示, 在检测范围内 E423R 表达量越高, LC3-II 表达量越多。结果表明, E423R 蛋白能够激活自噬过程, 并

且与 LC3-II 呈现剂量依赖性。

2.6 E423R 蛋白通过 AKT/mTOR/ULK1 信号通路激活自噬

在自噬通路中存在许多关键蛋白, 这些蛋白通过相互作用对自噬进行调控。根据 Western blotting 结果观察到, 使用 200–1 000 ng pCMV-Myc-E423R 转染时, 随着转染剂量升高, 磷酸化的 AKT 和 mTOR 逐渐降低(图 6), p-ULK1 (Ser757) 的磷酸化逐渐减少, 表明 E423R 蛋白激活了 ULK1, 上调自噬信号通路。这一结果表明 AKT/mTOR/ULK1 通路受到 E423R 蛋白的抑

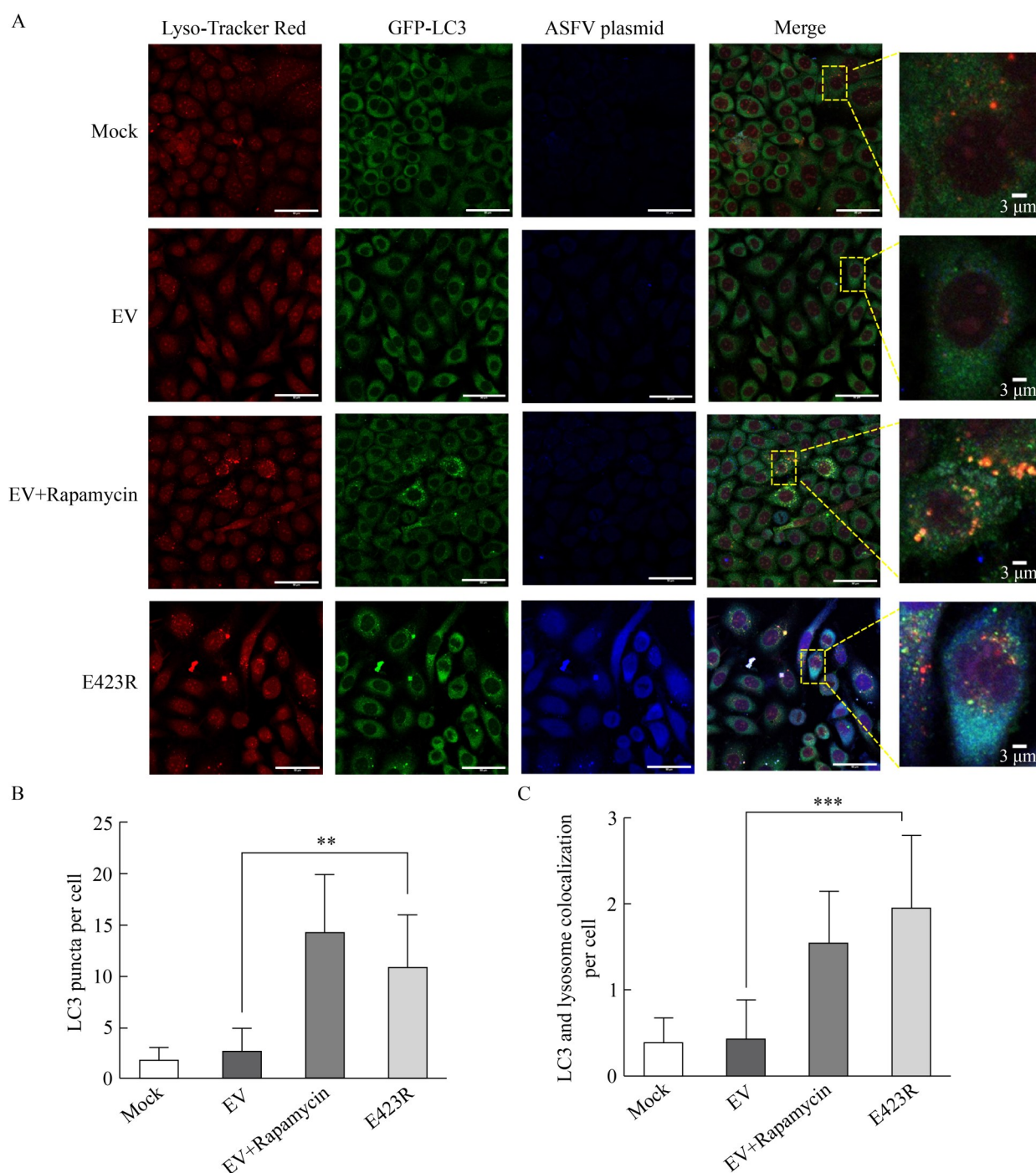


图4 E423R蛋白诱导自噬体与溶酶体在HeLa细胞中的共定位

Figure 4 E423R protein induces autophagosome-lysosomal colocalization in HeLa cells. A: The acid lysosomes were stained with Lyso-Tracker Red, and the HeLa cells were immunolabeled with LC3 (green fluorescence) and ASFV recombinant plasmid (blue fluorescence) after transfection for 24 h; B: LC3 spots were counted using ImageJ software; C: Autophagosomes and lysosomes colocalization were counted using ImageJ software. Scale: 50 μm . **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$.

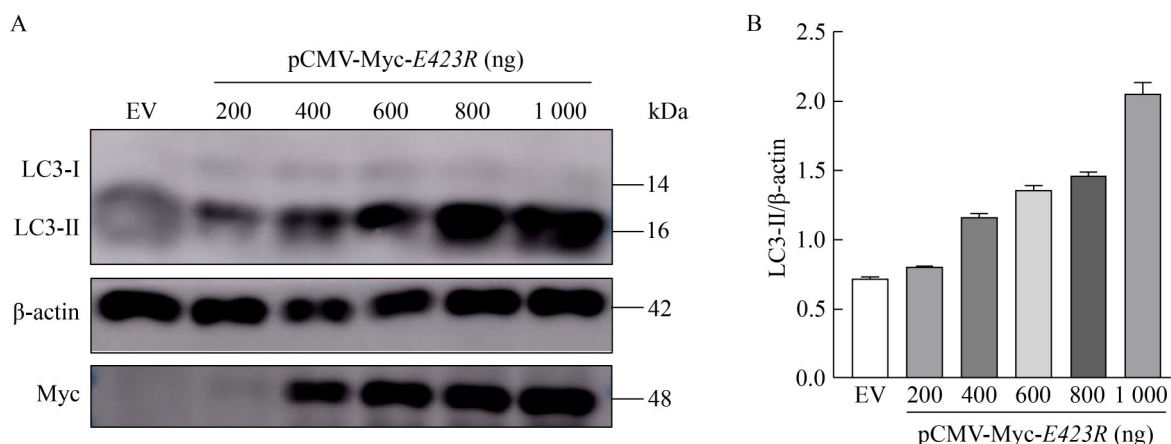


图5 E423R蛋白诱导自噬关键蛋白LC3-II表达并呈剂量依赖性

Figure 5 E423R protein can induce the expression of LC3-II in a dose-dependent manner. A: Western blotting was used to detect the effect of gradient overexpression of LC3-II on the expression of E423R in HeLa cells; B: Grayscale analysis of Western blotting results.

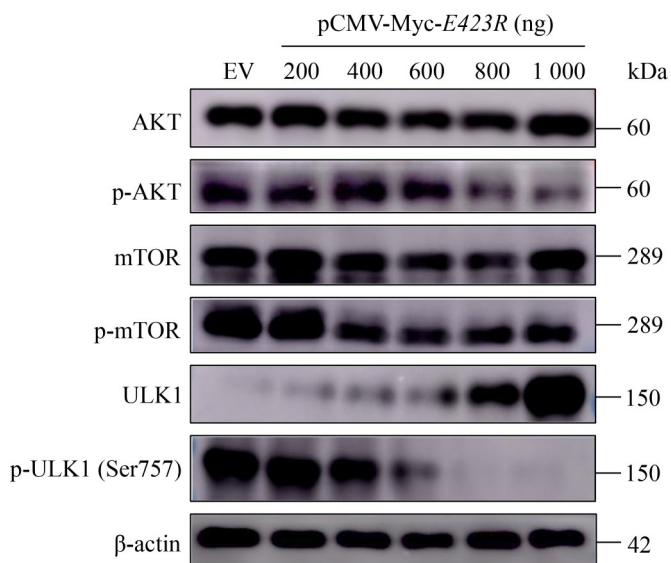


图6 E423R蛋白通过AKT/mTOR/ULK1信号通路激活自噬

Figure 6 E423R protein activates autophagy through the AKT/mTOR/ULK1 signaling pathway.

制，并且在检测浓度范围内具有剂量依赖性。综上所述，E423R蛋白通过AKT/mTOR/ULK1信号通路激活了自噬。

3 讨论与结论

自噬是一种高度保守的分解代谢过程，通常被认为是细胞的一种保护机制。自噬体与溶

酶体融合形成自噬溶酶体，导致被吞噬的成分降解并产生营养物质^[18]。病毒与细胞自噬之间存在复杂的相关性。一方面，自噬可以用来降解病毒颗粒；另一方面，一些病毒阻断自噬降解，甚至通过促进细胞自噬进行复制^[19]。研究显示，ASFV可以调节宿主细胞自噬，但是关于ASFV与宿主细胞自噬的关系仍未完全阐明^[12]。

因此, 解析 ASFV 蛋白与宿主细胞自噬之间的关系能够为开发新的抗病毒药物提供可能的靶点线索, 为深入研究 ASFV 感染的机制提供理论依据。

ASFV 与自噬之间存在复杂的相互作用, 在 ASFV 感染过程中自噬很可能发挥抗病毒作用, 然而自噬与 ASFV 感染之间的研究仍然不足。ASFV E423R 蛋白是一种未表征蛋白, 在 ASFV 复制周期的后期表达^[16]。在本研究中, 着重关注 ASFV E423R 蛋白对细胞自噬的调控作用。鉴定完整的自噬发生过程通常包括 3 个指标: LC3 荧光斑点的形成、LC3-II 的积累和 p62 的降解^[20-21]。因此, 本研究通过高内涵分析系统对 HeLa-Difluo™ hLC3 细胞中 RFP-LC3 荧光斑点数进行量化分析。高内涵分析技术是一种结合了自动化细胞成像和复杂图像分析的高通量筛选技术, 它兼顾了直观与批量统计分析的优点, 能够通过自动化细胞成像的方法对多孔板每一个孔的细胞进行单细胞水平状态和总体趋势的分析, 常用于细胞的自噬水平评估, 通过 RFP-LC3、GFP-LC3 荧光斑点积聚判断细胞自噬水平^[22]。Zhou 等^[23]通过高内涵分析技术对肠炎沙门菌菌株 Z11 的转座子突变文库进行筛选, 发现 RfbD 基因对自噬有影响。Gao 等^[24]通过对 107 个 LSCC 组织和成对的癌旁正常黏膜 (adjacent normal mucosal, ANM) 组织进行高内涵筛选, 鉴定出抑制自噬的 circRNA circPARD3。同样地, 本研究通过高内涵细胞分析实验评估 HeLa-Difluo™ hLC3 细胞的自噬水平。当 E423R 蛋白表达时, HeLa-Difluo™ hLC3 细胞中出现了大量的 RFP、GFP 斑点, 并且与空载体组相比, RFP 斑点明显增多, 说明 E423R 蛋白的存在使得 LC3 融合蛋白在自噬体上发生积聚, 促进自噬的起始过程。通过 Western blotting 实验探究 E423R 蛋白诱导自噬过程的完整性, 结果显示 pCMV-Myc-E423R 真核表达质粒转染 24 h 后, LC3-II 的表达量显著升高, p62 降解, 并且随着 E423R 转染剂量增加, LC3-II 的表达

量增加, 呈正相关。同时, 通过共聚焦显微镜观察到 LC3 荧光斑点的形成以及酸性溶酶体共定位。这些观察结果证实, ASFV E423R 蛋白诱导自噬体形成, 并与自噬溶酶体融合。因此, E423R 能够诱导 HeLa 细胞内完整的自噬过程。

与本研究结果一致, ASFV E199L 也是病毒的一种晚期表达蛋白, 它可以通过与 PYCR2 相互作用, 诱导 HEK293T 细胞完整的自噬发生过程^[13,25]; ASFV K205R 蛋白激活内质网应激, 引发机体促炎反应, 进而激活自噬, 促进抗病毒免疫^[14]; ASFV p17 蛋白通过促进 p62 与 TOMM70 的相互作用促进线粒体自噬^[15]。然而 ASFV 也存在抑制自噬的蛋白, 如 ASFV A179L 通过与 Beclin1 BH3 结构域相互作用抑制自噬, 从而操纵细胞凋亡控制感染^[26-28]。

AKT/mTOR/ULK1 作为经典自噬通路, 参与调控多种病毒感染过程。正常状态下, AKT、mTOR 蛋白抑制自噬, 当自噬激活, AKT、mTOR 蛋白去磷酸化, 下游的 ULK1 通过改变磷酸化位点募集 ATG 家族蛋白, 促使自噬体形成^[29-30]。与 ASFV 同属于 DNA 病毒的人乳头瘤病毒 (human papilloma viruses, HPV) 通过表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和 PKB/AKT 相互作用, 导致 mTOR 发生磷酸化^[31]。有研究证实, ASFV 感染能够激活 mTOR, 抑制自噬相关基因 *Atg2A*、*Atg9A*、*Atg101*、*Atg4B*、*Atg7* 的表达^[32]。ASFV K205R 通过抑制 AKT、mTOR 磷酸化从而激活 ULK1, 激活自噬^[14]。本研究结果也同样表明, E423R 蛋白通过影响 AKT/mTOR/ULK1 信号通路调节细胞自噬。E423R 蛋白能够诱导 HeLa 细胞自噬, 并通过 AKT/mTOR/ULK1 信号通路增强细胞自噬的发生。

综上所述, 本研究通过高内涵分析、Western blotting、激光共聚焦技术, 证实了 ASFV E423R 蛋白具有诱导 HeLa 细胞自噬的功能。进一步地, Western blotting 分析显示, 随着 E423R 蛋白表达量上升, LC3-II 表达量也逐渐上

升, E423R 与 LC3-II 之间具有剂量依赖效应。然而, E423R 通过下调 AKT、mTOR 的磷酸化水平从而调控 ULK1, 诱导完整的自噬发生过程。本研究丰富了 ASFV E423R 蛋白的自噬功能, 为研究 ASFV 与自噬的关系提供了有意义的参考, 为开发新的抗病毒药物提供理论基础。

作者贡献声明

黄静怡: 实验执行, 数据分析和论文撰写; 康喜龙: 实验设计, 数据分析和论文修改; 黄霞: 实验执行; 周懿: 协助实验操作, 数据分析; 刘弘知: 提供技术支持, 参与论文讨论; 焦新安: 指导论文思路, 论文修改; 潘志明: 研究构思和设计, 论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] DIXON LK, SUN H, ROBERTS H. African swine fever[J]. *Antiviral Research*, 2019, 165: 34-41.
- [2] LIU YJ, ZHANG XH, QI WB, YANG YZ, LIU ZX, AN TQ, WU XH, CHEN JX. Prevention and control strategies of African swine fever and progress on pig farm repopulation in China[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2552.
- [3] WANG GG, XIE MJ, WU W, CHEN ZZ. Structures and functional diversities of ASFV proteins[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2124.
- [4] WU QJ, LEI YY, ZUO Y, ZHANG J, GUO FL, XU WZ, XIE TH, WANG D, PENG GQ, WANG XR, CHEN HC, FU ZF, CAO G, DAI JX. Interactome between ASFV and host immune pathway proteins[J]. *mSystems*, 2023, 8(6): e0047123.
- [5] 孙茂文, 王涛, 孙元, 杨玉莹, 仇华吉. 非洲猪瘟病毒的免疫逃逸策略[J]. *微生物学报*, 2021, 61(2): 249-262.
SUN MW, WANG T, SUN Y, YANG YY, QIU HJ. Immuno-evasion strategies of African swine fever virus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(2): 249-262 (in Chinese).
- [6] WANG N, ZHAO DM, WANG JL, ZHANG YL, WANG M, GAO Y, LI F, WANG JF, BU ZG, RAO ZH, WANG XX. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. *Science*, 2019, 366(6465): 640-644.
- [7] LU WL, BAI YL, ZHANG S, ZHAO XY, JIN JX, ZHU XJ, WANG R, WU YN, ZHANG AK, ZHANG GP, ZHUANG GQ, SUN AJ. An intracellular epitope of ASFV CD2v protein elicits humoral and cellular immune responses[J]. *Animals*, 2023, 13(12): 1967.
- [8] CHEN XN, CHEN XJ, LIANG YF, XU SJ, WENG ZJ, GAO Q, HUANG Z, ZHANG GH, GONG L. Interaction network of African swine fever virus structural protein p30 with host proteins[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 971888.
- [9] SHIMMON GL, HUI JYK, WILEMAN TE, NETHERTON CL. Autophagy impairment by African swine fever virus[J]. *Journal of General Virology*, 2021, 102(8): 001637.
- [10] MILLER DR, THORBURN A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(7): 906-918.
- [11] RUBINSZTEIN DC, MARIÑO G, KROEMER G. Autophagy and aging[J]. *Cell*, 2011, 146(5): 682-695.
- [12] ALONSO C, GALINDO I, CUESTA-GEIJO MA, CABEZAS M, HERNAEZ B, MUÑOZ-MORENO R. African swine fever virus-cell interactions: from virus entry to cell survival[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 42-57.
- [13] CHEN S, ZHANG XH, NIE Y, LI HX, CHEN WG, LIN WC, CHEN F, XIE QM. African swine fever virus protein E199L promotes cell autophagy through the interaction of PYCR2[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(2): 196-206.
- [14] WANG Q, ZHOU LY, WANG J, SU D, LI DH, DU YK, YANG GY, ZHANG GP, CHU BB. African swine fever virus K205R induces ER stress and consequently activates autophagy and the NF- κ B signaling pathway[J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 394.
- [15] HU BL, ZHONG GF, DING SX, XU K, PENG XR, DONG WR, ZHOU JY. African swine fever virus protein p17 promotes mitophagy by facilitating the interaction of SQSTM1 with TOMM70[J]. *Virulence*, 2023, 14(1): 2232707.
- [16] CACKETT G, MATELSKA D, SÝKORA M, PORTUGAL R, MALECKI M, BÄHLER J, DIXON L, WERNER F. The African swine fever virus transcriptome[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(9): e00119-20.
- [17] RODRÍGUEZ JM, MORENO LT, ALEJO A, LACASTA A, RODRÍGUEZ F, SALAS ML. Genome sequence of African swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142889.
- [18] CAMPBELL GR, BRUCKMAN RS, HERNES SD, JOSHI S, DURDEN DL, SPECTOR SA. Induction of autophagy by PI3K/MTOR and PI3K/MTOR/BRD4 inhibitors suppresses HIV-1 replication[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(16): 5808-5820.
- [19] CHOI Y, BOWMAN JW, JUNG JU. Autophagy during viral infection—a double-edged sword[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(6): 341-354.
- [20] SINGH B, BHASKAR S. Methods for detection of autophagy in mammalian cells[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 2045: 245-258.
- [21] 刘晓宇, 陈芳艳, 韩黎. LC3 相关吞噬作用与病原微生物感染[J]. *微生物学报*, 2018, 58(8): 1340-1348.
LIU XY, CHEN FY, HAN L. LC3-associated phagocytosis

- and microbial infections[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(8): 1340-1348 (in Chinese).
- [22] FORVEILLE S, LEDUC M, SAUVAT A, CERRATO G, KROEMER G, KEPP O. High throughput screening for autophagy[J]. *Methods in Cell Biology*, 2021, 165: 89-101.
- [23] ZHOU Y, XIONG D, GUO YX, LIU Y, KANG XL, SONG HQ, JIAO XN, PAN ZM. *Salmonella* Enteritidis RfbD enhances bacterial colonization and virulence through inhibiting autophagy[J]. *Microbiological Research*, 2023, 270: 127338.
- [24] GAO W, GUO HN, NIU M, ZHENG XW, ZHANG YL, XUE XT, BO YF, GUAN XY, LI ZX, GUO YJ, HE L, ZHANG Y, LI L, CAO JM, WU YY. circPARD3 drives malignant progression and chemoresistance of laryngeal squamous cell carcinoma by inhibiting autophagy through the PRKCI-Akt-mTOR pathway[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 166.
- [25] MATAMOROS T, ALEJO A, RODRÍGUEZ JM, HERNÁEZ B, GUERRA M, FRAILE-RAMOS A, ANDRÉS G. African swine fever virus protein pE199L mediates virus entry by enabling membrane fusion and core penetration[J]. *mBio*, 2020, 11(4): e00789-20.
- [26] BANJARA S, SHIMMON GL, DIXON LK, NETHERTON CL, HINDS MG, KVANSKUL M. Crystal structure of African swine fever virus A179L with the autophagy regulator beclin[J]. *Viruses*, 2019, 11(9): 789.
- [27] BRUN A, RIVAS C, ESTEBAN M, ESCRIBANO JM, ALONSO C. African swine fever virus gene *A179L*, a viral homologue of BCL-2, protects cells from programmed cell death[J]. *Virology*, 1996, 225(1): 227-230.
- [28] REIS AL, RATHAKRISHNAN A, GOULDING LV, BARBER C, GOATLEY LC, DIXON LK. Deletion of the gene for the African swine fever virus BCL-2 family member *A179L* increases virus uptake and apoptosis but decreases virus spread in macrophages and reduces virulence in pigs[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(10): e0110623.
- [29] SUN H, WANG ZY, YAKISICH JS. Natural products targeting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway as anticancer agents[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(7): 1048-1056.
- [30] POPOVA NV, JÜCKER M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 1743.
- [31] MATTOSCO D, MEDDA A, CHIOCCA S. Human *Papilloma* virus and autophagy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1775.
- [32] ZHU JJ, RAMANATHAN P, BISHOP EA, O'DONNELL V, GLADUE DP, BORCA MV. Mechanisms of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages[J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0223955.