

# 基于转录组学分析 Vero 悬浮细胞并用表皮生长因子改善细胞自噬水平

李木子<sup>1,2,4</sup>, 孙娜<sup>1,2,3</sup>, 彭润生<sup>1,2,3</sup>, 马芳芳<sup>1,2</sup>, 王家敏<sup>1,2,3</sup>, 乔自林<sup>1,2,3</sup>, 陈建国<sup>1</sup>, 阿依木古丽·阿不都热依木<sup>1,2,4\*</sup>

- 1 西北民族大学 细胞基质疫苗关键技术与产业化教育部工程研究中心, 甘肃 兰州 730030
- 2 西北民族大学 生物医学研究中心 甘肃省动物细胞技术创新中心, 甘肃 兰州 730030
- 3 西北民族大学 生物医学研究中心 生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730030
- 4 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030

李木子, 孙娜, 彭润生, 马芳芳, 王家敏, 乔自林, 陈建国, 阿依木古丽·阿不都热依木. 基于转录组学分析 Vero 悬浮细胞并用表皮生长因子改善细胞自噬水平[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1671-1689.

LI Muzi, SUN Na, PENG Runsheng, MA Fangfang, WANG Jiamin, QIAO Zilin, CHEN Jianguo, Ayimugl Abudureyimu. Transcriptomic analysis of suspended Vero cells and reduction of cellular autophagy by epidermal growth factor[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1671-1689.

**摘要:** 目前悬浮驯化的 Vero 细胞存在细胞活率低和倍增时间长等问题。为了探究 Vero 悬浮细胞生长缓慢且活率低的主要原因, 本研究对 Vero 悬浮细胞(命名为 Vero-XF)和 Vero 贴壁细胞(命名为 Vero-AD)进行转录组学分析, 筛选悬浮培养时影响细胞生长的差异基因, 并通过外源添加表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)改善 Vero-XF 生长。结果表明, 与 Vero-AD 组相比, Vero-XF 组有 7 376 个显著变化的差异基因。京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析发现细胞自噬和线粒体自噬最为显著。选择 11 个差异表达基因, 进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证, 在 Vero-XF 中 *ATG9B*、*WIP12*、*LAMP2*、*OPTN*、*Rab7a* 和 *DEPTOR* 显著上调, *ATG4D* 显著下调, 与转录组分析结果一致; 另外 *ATG101*、*ATG2A* 和 *STX17* 显著上调, *NBR1* 则差异不显著。Western blotting 检测 Vero-XF 与 Vero-AD 中自噬标志蛋白 LC3 和 P62 的表达, 其中 Vero-XF 的 LC3II/I 表达量显著上调, P62 表达量显著下调, 自噬水平较高。最后通过外源添加 EGF 改善 Vero-XF 自噬。结果表明, 10、20、30 μg/L 的 EGF 使得 Vero-XF 自噬水平分别降低了 22.35%、48.15%、71.29%; 比生长速率增加了 15.48%、33.33%、57.14%; 细胞凋亡率下降了 2.84%、15.46%、16.23%。本研究结果初步揭示了 Vero-XF 自噬机制的激活是导致其生长缓慢的原因之一, 为后续 Vero 细胞的悬浮培养提供了参考。

资助项目: 西北民族大学中央高校基本科研业务费(31920230164); 西北民族大学引进人才科研项目(xbmuyjrc2020022)  
This work was supported by the Basic Research Expenses for Central Universities of Northwest Minzu University (31920230164) and the Northwest Minzu University Introduced Talent Research Project (xbmuyjrc2020022).

\*Corresponding author. E-mail: ayimgul80@xbmu.edu.cn

Received: 2024-07-01; Accepted: 2024-11-04; Published online: 2024-11-05

关键词: Vero 细胞; 细胞悬浮培养; 转录组学; 表皮生长因子; 细胞自噬

## Transcriptomic analysis of suspended Vero cells and reduction of cellular autophagy by epidermal growth factor

LI Muzi<sup>1,2,4</sup>, SUN Na<sup>1,2,3</sup>, PENG Runsheng<sup>1,2,3</sup>, MA Fangfang<sup>1,2</sup>, WANG Jiamin<sup>1,2,3</sup>, QIAO Zilin<sup>1,2,3</sup>, CHEN Jianguo<sup>1</sup>, Ayimugl Abudureyimu<sup>1,2,4\*</sup>

1 Ministry of Education Engineering Research Centre for Key Technology and Industrialisation of Cell-Based Vaccines, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 Gansu Tech Innovation Center of Animal Cell, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

3 Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

4 College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

**Abstract:** The culture of suspended Vero cells is facing difficulties such as low cell viability and long doubling time. To investigate the main reasons for the slow growth and low viability of suspended Vero cells, this study conducted transcriptomic analysis of suspended Vero cells (Vero-XF) and adherent Vero cells (Vero-AD) to screen the differentially expressed genes (DEGs) affecting the growth of suspended cells. In addition, epidermal growth factor (EGF) was supplemented to the culture system to improve the growth of Vero-XF. The results showed that compared with the Vero-AD group, the Vero-XF group had 7 376 significant DEGs. Kyoto encyclopedia of genes and genomes enrichment analysis revealed that the DEGs were mainly enriched in the autophagy and mitophagy pathways. Eleven DEGs were selected and verified by quantitative real-time PCR, which showed up-regulated expression of *ATG9B*, *WIPI2*, *LAMP2*, *OPTN*, *Rab7a*, and *DEPTOR* and down-regulated expression of *ATG4D*, being consistent with the results of transcriptomic analysis. In addition, the Vero-XF group showed significantly up-regulated expression of *ATG101*, *ATG2A*, and *STX17* and insignificant change in the expression of *NBRI*, compared with the Vero-AD group. The protein levels of LC3 and P62 in Vero-XF and Vero-AD were determined by Western blotting, which showed up-regulated expression of LC3II/I and down-regulated expression of P62 in Vero-XF, indicating a higher level of autophagy. Finally, the exogenous supplementation of EGF at 10, 20, and 30  $\mu\text{g/L}$  in the culture system reduced the autophagy level of Vero-XF by 22.35%, 48.15%, and 71.29%, increased the specific growth rate by 15.48%, 33.33%, and 57.14%, and decreased the apoptosis rate by 2.84%, 15.46%, and 16.23%, respectively. The results of this study preliminarily reveal that the activation of autophagy is one of the reasons for the slow growth of Vero-XF, which provides reference for the subsequent culture of suspended Vero cells.

**Keywords:** Vero cells; suspended cell culture; transcriptomics; epidermal growth factor; autophagy

Vero 细胞系是世界卫生组织(World Health Organization, WHO)第一个批准的用于人类病

毒性疫苗生产的传代性细胞系<sup>[1]</sup>。因其易感病毒范围<sup>[2]</sup>、血清依赖性低<sup>[3]</sup>、生物安全性高、

不易成瘤<sup>[4]</sup>等,促进了基于 Vero 细胞生产相应病毒疫苗的开发。为了保证大规模疫苗生产,急需探索 Vero 细胞全悬浮培养工艺,以实现高密度培养细胞。但目前悬浮驯化的 Vero 细胞仍面临诸多挑战,如细胞活率低、倍增时间长和细胞结团率高等。Shen 等<sup>[5]</sup>将贴壁的 Vero 细胞通过逐步降低血清的方法来适应 IHM03 培养基,但驯化后的细胞以  $1.00 \times 10^6$  cells/mL 接种于 125 mL 摇瓶内培养 96 h 后细胞密度才能翻倍。有研究表明,Opti-MEM 和 Ultraculture SFM 培养基仍需添加 1%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)才能维持悬浮驯化的 Vero 细胞增殖,且仍存在细胞结团<sup>[6]</sup>。目前,也有研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术敲低 Vero 细胞黏附蛋白 SDC4,建立易悬浮的基因工程细胞株,但驯化后的细胞以  $0.50 \times 10^6$  cells/mL 接种于 125 mL 摇瓶中培养 120 h 后细胞密度才达到  $1.40 \times 10^6$  cells/mL,细胞出现生长缓慢、活率低等问题<sup>[7]</sup>。因此,为了使 Vero 细胞更有效地适应悬浮培养状态,急需探究其从贴壁培养到悬浮培养过程中的生长变化。本研究采用 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq)技术从转录水平寻找 Vero 悬浮细胞与贴壁细胞的差异基因,并分析影响细胞生长缓慢的原因。

转录组学(transcriptome)主要研究生物体内基因转录及其调控,可全面且准确测定不同样本的转录本数量,绘制出特定条件下的基因表达谱,从转录水平揭示细胞的生长变化,为细胞系开发和疫苗生产提供新的可能。在 Vero 细胞的悬浮培养中,Logan 等<sup>[8]</sup>采用含 2.25 g/L 葡萄糖的低糖培养基 CDM2 培养细胞,并通过转录组学分析 Vero 悬浮细胞与贴壁细胞之间基因表达变化,发现悬浮细胞的氨基酸代谢、脂质代谢和 DNA 复制均出现异常,同时细胞自噬的相关基因表达也较为显著,但后续并没有进

行改善 Vero 悬浮细胞自噬的相关研究。本课题组前期采用含 6 g/L 葡萄糖的高糖培养基 Vero-S 驯化 Vero 细胞,通过转录组学分析也发现 Vero 悬浮细胞的自噬最为显著(尚未发表)。可以看出,在不同培养条件下所驯化的 Vero 悬浮细胞均会出现细胞自噬现象,且细胞活率较低,无法实现细胞高密度培养。也有研究表明,受环境影响的小鼠脾脏细胞会出现自噬异常及细胞凋亡现象,当抑制自噬后可降低小鼠脾脏细胞的凋亡<sup>[9]</sup>。因此,为改善 Vero 悬浮细胞培养,有必要降低其自噬水平促进细胞增殖。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)作为一种细胞保护因子,对调节细胞生长、增殖和分化起着重要作用,常用于悬浮细胞培养添加剂以改善细胞生长<sup>[10]</sup>。同时,在非疾病影响条件下发生细胞自噬,主要是由营养物质或生长因子剥夺、缺氧和病原体入侵所引起<sup>[11]</sup>。Vero 悬浮细胞以正常条件培养且无病原体的入侵,仍出现较高自噬水平,可能是缺乏营养物质。EGF 通过与其受体结合,促进细胞内糖酵解发生与蛋白质合成,来增加 DNA 复制和细胞增殖。Sobolewska 等<sup>[12]</sup>在牛乳腺退化的研究中,添加 EGF 激活 mTOR 途径,抑制自噬和细胞凋亡发生,促进乳腺上皮细胞增殖。另有研究表明,EGF 通过去磷酸化抑制自噬起始因子 Beclin1 以及下调 LC3 和 ATG5 的表达,改善卵丘细胞的自噬,从而促进卵泡发育和卵母细胞成熟<sup>[13]</sup>。因此,本研究尝试采用 EGF 从起始端控制自噬小体形成,改善其自噬水平以此提升细胞活率。

本课题组前期采用逐步递减血清法将 Vero 贴壁细胞(Vero-AD)进行悬浮适应性培养,经连续传代培养 25 代后获得一株适应悬浮培养的 Vero 细胞,并命名为 Vero-XF;细胞按  $1.00 \times 10^6$  cell/mL 培养并添加 2%新生牛血清(newborn calf serum, NBS),最大增殖密度  $2.12 \times 10^6$  cell/mL,倍增时

间 76.93 h (尚未发表)。为了探究 Vero-XF 生长缓慢的原因,本研究对 Vero-XF 和 Vero-AD 进行 RNA-seq 分析,筛选关键差异基因,探究悬浮驯化后细胞生长缓慢的可能原因,并为构建 Vero 悬浮培养的基因工程细胞株提供理论依据。同时,本研究通过外源添加 EGF 来改善 Vero-XF 增殖,为 Vero 细胞的悬浮培养提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 细胞与培养基

贴壁培养型 Vero 细胞(adherent culture Vero, Vero-AD)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC);悬浮培养型 Vero 细胞(suspension culture Vero, Vero-XF)由本课题组前期通过血清递减法驯化得到。M199 培养基购自兰州百灵生物技术有限公司;新生牛血清(newborn bovine serum, NBS)和 0.25%胰蛋白酶购自兰州民海生物工程有限公司。

### 1.2 主要试剂和抗体

TRIzol、Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;BCA Protein Quantification Kit、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自北京索莱宝科技股份有限公司;兔源 LC3 抗体、兔源 P62 抗体、鼠源  $\beta$ -actin 抗体、鼠源 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自杭州华安生物技术有限公司。

### 1.3 细胞培养及生长曲线测定

生长状态良好且汇合度达到 80%–90%的贴壁培养型 Vero 细胞,经 0.25%胰蛋白酶消化后用含 5%NBS 的 M199 培养基制成细胞悬液,经台盼蓝染色后计活细胞数。用完全培养基将细胞悬液稀释成  $2.00 \times 10^4$  cells/mL,接种至 24 孔

板中,每孔加 1 mL。摇匀放置在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每隔 24 h 各消化 3 孔,计数。

同样,取生长状态良好的悬浮培养型 Vero 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用含 2% NBS 的 Vero-S 培养基重悬细胞,经台盼蓝染色后进行活细胞计数。将 Vero-XF 按  $1.00 \times 10^6$  cells/mL 的初始密度接种至 125 mL 摇瓶中,培养体积 20 mL。摇匀放置在 100 r/min、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 摇床中培养,每隔 24 h 取 100  $\mu$ L 细胞液,计数。

悬浮培养型 Vero 细胞按  $0.50 \times 10^6$  cells/mL 初始密度接种于 125 mL 摇瓶中,分为 4 组:空白组和外源添加 10  $\mu$ g/L、20  $\mu$ g/L、30  $\mu$ g/L EGF 的实验组,培养体积 20 mL。摇匀放置在 100 r/min、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 摇床中培养,每隔 24 h 取 100  $\mu$ L 细胞液,计数。基于 Countstar 细胞分析仪得出各培养阶段的活细胞密度,计算细胞倍增时间和比生长速率。细胞倍增时间:倍增时间= $T/\log_2(Y/X)$ , $T$  代表细胞培养时间, $X$  代表细胞接种密度, $Y$  代表细胞峰值前一天的细胞密度。比生长速率( $\mu$ ): $\mu=\ln(X_n/X_{n-1})/(T_n-T_{n-1})$ , $X$  代表细胞密度, $T$  代表细胞培养时间, $n$  和  $n-1$  代表 2 个取样计数时间点。

### 1.4 转录组 RNA-seq 测序

采用 TRIzol 提取悬浮培养型 Vero 细胞和贴壁培养型 Vero 细胞的总 RNA。悬浮培养型 Vero 细胞标记为 XF1、XF2 和 XF3;贴壁培养型 Vero 细胞标记为 AD1、AD2 和 AD3,将合格的总 RNA 样品送至华大基因完成测序工作。首先,用带有 oligo dT 的磁珠富集含有 polyA 尾巴的 mRNA,加入随机的 N6 引物进行反转录,将合成的 cDNA 进行末端修复和接头连接,最终的连接产物经 PCR 扩增建立 mRNA 文库,最后使用 DNBSEQ 平台测序。

首先,过滤测序所得到的原始数据(raw

reads), 将低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads 去除, 得到 clean reads。随后比对到参考基因组上, 进行新转录本预测、单核苷酸多态性分析(single nucleotide polymorphisms, SNP)和差异剪接基因检测, 得到新转录本。最后将具有蛋白编码潜力的新转录本加入到参考基因序列中构成一个完整的参考序列, 并计算基因表达水平。

### 1.5 差异基因表达水平分析及功能分析

基于华大转录组学计算统计的转录本表达量, 利用 R 语言对 Vero-XF 与 Vero-AD 的差异 mRNA 进行分析, 以  $P$ -value<0.05 且差异倍数 FC>2 作为标准, 筛选差异表达基因并绘制火山图。随后将筛选出的差异表达基因根据 KEGG 注释结果进行生物通路分类分析, 并利用 R 语言中 phyper 函数进行富集分析,  $P$ -value 采用错误发现率(false discovery rate, FDR)方法校正, 将  $Q$ -value<0.05 的结果视为显著性富集。

### 1.6 qRT-PCR 检测差异 mRNA 表达

首先, 由北京擎科生物科技股份有限公司设计并合成待检基因引物(表 1)。待细胞生长至对数期时, 取  $3.00 \times 10^6$  个细胞 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液用预冷的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗细胞 2 次, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 检测 RNA 浓度, 且确保  $OD_{260/280}$  比值在 1.8–2.0 之间。根据检测到 RNA 浓度, 取 1  $\mu$ g 总 RNA 去除基因组 DNA, 反应体系及条件为 2  $\mu$ L 的 gDNA Clean Reaction Mix, RNase free water 补至 10  $\mu$ L; 42  $^{\circ}$ C 反应 2 min。随后, 将第一步的反应液进行反转录, 反应体系及条件为 4  $\mu$ L 的 5 $\times$ Evo M-MLV RT Reaction Mix, 6  $\mu$ L 的 RNase free water; 37  $^{\circ}$ C, 15 min; 85  $^{\circ}$ C, 5 s。最后, 将获得的 cDNA 进行 PCR 扩增。反应体系为: 10  $\mu$ L 的 2 $\times$ SYBR Green Pro Taq HS Premix, 10  $\mu$ mol/L 的 Primer1

和 Primer2 各 1  $\mu$ L, 2  $\mu$ L 的 cDNA, 6  $\mu$ L 的 RNase free water。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 次循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s; 60  $^{\circ}$ C 60 s; 95  $^{\circ}$ C 15 s。以 *GAPDH* 为内参, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算各组细胞差异 mRNA 相对表达量。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Gene name	Primer sequence (5'→3')
<i>ATG9B</i>	F: TTCAGCGTGCGGAGGATGG R: CAGAGGTGCCCAAGAACTTAGAG
<i>ATG101</i>	F: GCTGGAGGTGTCGGTGGAG R: TTCTTGTAGTGGAACTTGCTGTG
<i>ATG2A</i>	F: TTCACTCTGTCCAGCAACATCATC R: AATCTCGCCGACAGTCCAG
<i>WIP12</i>	F: GAGACTTCAACCTGGAGTGGCTAC R: ATCATGTCCGACACCTGGCTTG
<i>LAMP2</i>	F: CAATGATACTTGTCTGCTGGCTACC R: CTGCCTGTGGAATGAGTTGTATTGG
<i>OPTN</i>	F: CTGTTGGGCATTGTGTCTGAACTG R: TTAAGTACCCTTCTGCTTCTCCTTC
<i>Rab7a</i>	F: GGACACAGCAGGACAGGAACG R: GGGCAGTCACATCAAATACCAGAAC
<i>DEPTOR</i>	F: ACTGATTGACTGGCTGATTGAACAC R: AAAGCGGTAGAAGAGTTTGACATCC
<i>STX17</i>	F: AGAAGAAGCATCAGCAGCAACAG R: CAACAGTCATGGATCTGGTCAAAGG
<i>ATG4D</i>	F: CGAGGGTGACATACAGCGTTTT R: CCAGCCACAGTCCGAGGTC
<i>NBR1</i>	F: GCCATATAGCCACGACACTAACC R: CAGCAGGAAGACGAGGAGTAGAG
<i>GAPDH</i>	F: TGCCAAATACGATGACATCAAGAAGG R: TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAG

### 1.7 Western blotting 检测自噬标志蛋白的表达

待细胞生长至对数期时, 取  $3.00 \times 10^6$  个细胞 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次, 加入 RIPA 裂解液, 经反复冻融提取细胞总蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 加入 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后将样品 100  $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。首先, 利用制胶盒配制 12% 的 SDS-PAGE 凝胶, 以恒

压 80 V 跑浓缩胶, 恒压 120 V 跑分离胶。随后, 以 75 V 恒压转膜 90 min, 采用含吐温-20 的盐酸三甲胺缓冲盐溶液(tris buffered saline with Tween-20, TBST)配制 5% 脱脂奶粉室温封闭 2.5 h 后分别与 LC3 和 P62 抗体(1:2 000 稀释)于 4 °C 摇床孵育过夜。次日, 与相应二抗(1:5 000 稀释)于室温孵育 70 min, 用 TBST 洗膜 6 次, 每次 5 min。最后, 利用电泳凝胶成像系统检测蛋白条带, 并用 ImageJ-win64 进行灰度值分析。

### 1.8 细胞凋亡和周期检测

对 Vero-XF 和 Vero-AD 进行凋亡检测。待细胞生长至对数期时, 取  $1.00 \times 10^6$  个细胞 1 000 r/min 离心 5 min, 加入 1.5 mL 的 Apoptosis Positive Control Solution 重悬细胞, 于冰上孵育 30 min, 经预冷的 PBS 清洗后加入 1.5 mL 的 1×Binding Buffer, 平均分配 3 管, 每管 500  $\mu$ L。1 管作为空白对照, 另外 2 管分别加入 5  $\mu$ L 的 Annexin V-APC 和 10  $\mu$ L 的 7-氨基放线菌素 D (7-aminoactinomycin D, 7-AAD), 室温孵育 5 min。最后, 采用流式细胞仪上机检测分析。

待 Vero-XF 和 Vero-AD 生长至对数期时, 取  $1.00 \times 10^6$  个细胞 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液, 用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次进行周期检测。首先, 用 PBS 配制成 50  $\mu$ g/mL 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)的工作液; 随后, 加入 RNaseA 重悬细胞, 37 °C 避光孵育 30 min; 最后, 采用流式细胞仪进行检测。

## 2 结果与分析

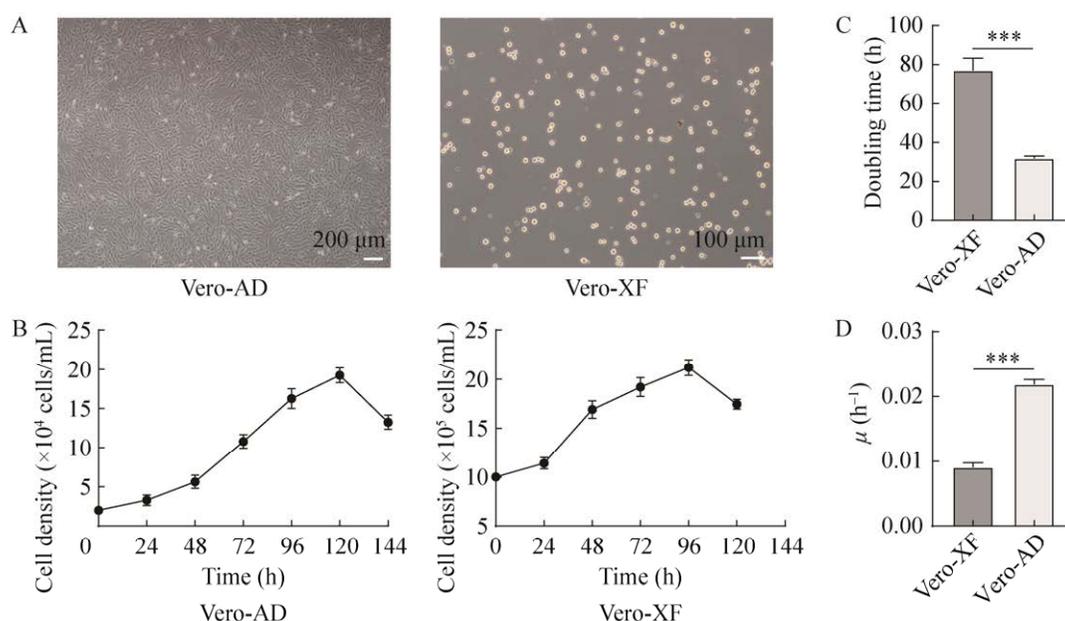
### 2.1 Vero 悬浮细胞与贴壁细胞生长特性研究

为了探究 Vero 细胞在悬浮和贴壁两种生长状态下细胞增殖的情况, 分别用含 5% NBS 的 M199 培养基培养贴壁细胞和含 2% NBS 的 Vero-S 培养基培养悬浮细胞, 每隔 24 h 观察细

胞生长状况。如图 1A 所示, Vero 贴壁细胞(命名为 Vero-AD)呈“网络状”生长; Vero 悬浮细胞(命名为 Vero-XF)呈单个圆形, 轮廓清晰, 大小相近, 偶尔观察到聚集体。将 Vero-AD 与 Vero-XF 各阶段的平均细胞密度绘制生长曲线, 如图 1B 所示, 2 种细胞的生长都经历了迟缓期、对数期和平台期, 呈“S”型生长, 且 Vero-XF 较 Vero-AD 增殖缓慢。为了更直观探究 Vero 细胞在悬浮驯化后细胞增殖的状况, 以 Vero-AD 的生长密度作为参照, 计算 2 组细胞的倍增时间和比生长速率。如图 1C、1D 所示, Vero-XF 与 Vero-AD 倍增时间分别为 76.93 h 和 31.78 h, 比生长速率分别为  $0.009 \text{ h}^{-1}$  和  $0.021 \text{ h}^{-1}$ 。以 Vero-AD 作为对照, 驯化后的 Vero-XF 倍增时间增加了 1.42 倍。综上, Vero 细胞在悬浮驯化后面临生长缓慢的问题。

### 2.2 Vero 悬浮细胞与贴壁细胞差异基因表达及 KEGG 富集分析

为了探究 Vero-XF 生长缓慢的原因, 利用 RNA-seq 技术对 Vero-XF 和 Vero-AD 的 mRNA 进行分析, 共检测到 14 329 个差异基因。如图 2A、2B 所示, 与 Vero-AD 组相比, Vero-XF 组有 7 376 个基因差异显著, 其中 3 601 个基因显著上调, 3 775 个基因显著下调。将差异基因进行 KEGG 通路分类分析, 其中细胞进程 (cellular processes) 通路中有 726 个差异基因调控细胞生长和死亡; 代谢途径 (metabolism pathway) 通路中差异基因主要参与脂质代谢、糖类合成、碳水化合物代谢以及能量代谢; 生物体系统 (organismal systems) 通路中有 180 个差异基因调控细胞衰老。随后将 Vero-XF 与 Vero-AD 的差异基因进行 KEGG 富集性分析,  $P$ -value 经 FDR 方法校正, 将  $Q$ -value < 0.05 的结果视为显著性富集。如图 2C 所示, Vero-XF 与 Vero-AD 的差异基因主要富集在细胞自噬和



**图 1 Vero 细胞在贴壁和悬浮培养条件下的生长特性** A: Vero-AD 与 Vero-XF 的细胞形态; B: Vero 悬浮与贴壁细胞的生长曲线; C: 倍增时间; D: 比生长速率( $n=3$ )。

Figure 1 Growth characteristics of Vero under adherent and suspension culture conditions. A: Cell morphology of Vero-AD vs. Vero-XF; B: Growth curves of Vero suspension versus adherent cells; C: Doubling time; D: Specific growth rate ( $n=3$ ). \*\*\*:  $P<0.001$ .

线粒体自噬途径,并参与调控 mTOR 信号通路、AMPK 信号通路和溶酶体途径等。基于转录组学结果推测,与 Vero-AD 相比,Vero-XF 产生了较高的自噬水平,可能是导致细胞生长缓慢的原因之一。最后,为了探究参与调控 Vero-XF 自噬和线粒体自噬的基因,以  $\log_2$  FC>1 作为筛选差异基因的标准,将富集于细胞自噬和线粒体自噬的 82 和 63 个基因绘制聚类热图。如图 2D 所示,自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)如 *ATG101*、*ATG2A*、*ATG4D* 和 *ATG9B* 差异显著,以及自噬溶酶体相关标志基因 *LAMP2* 和 mTOR 信号通路中 *DEPTOR* 等基因差异较为显著。

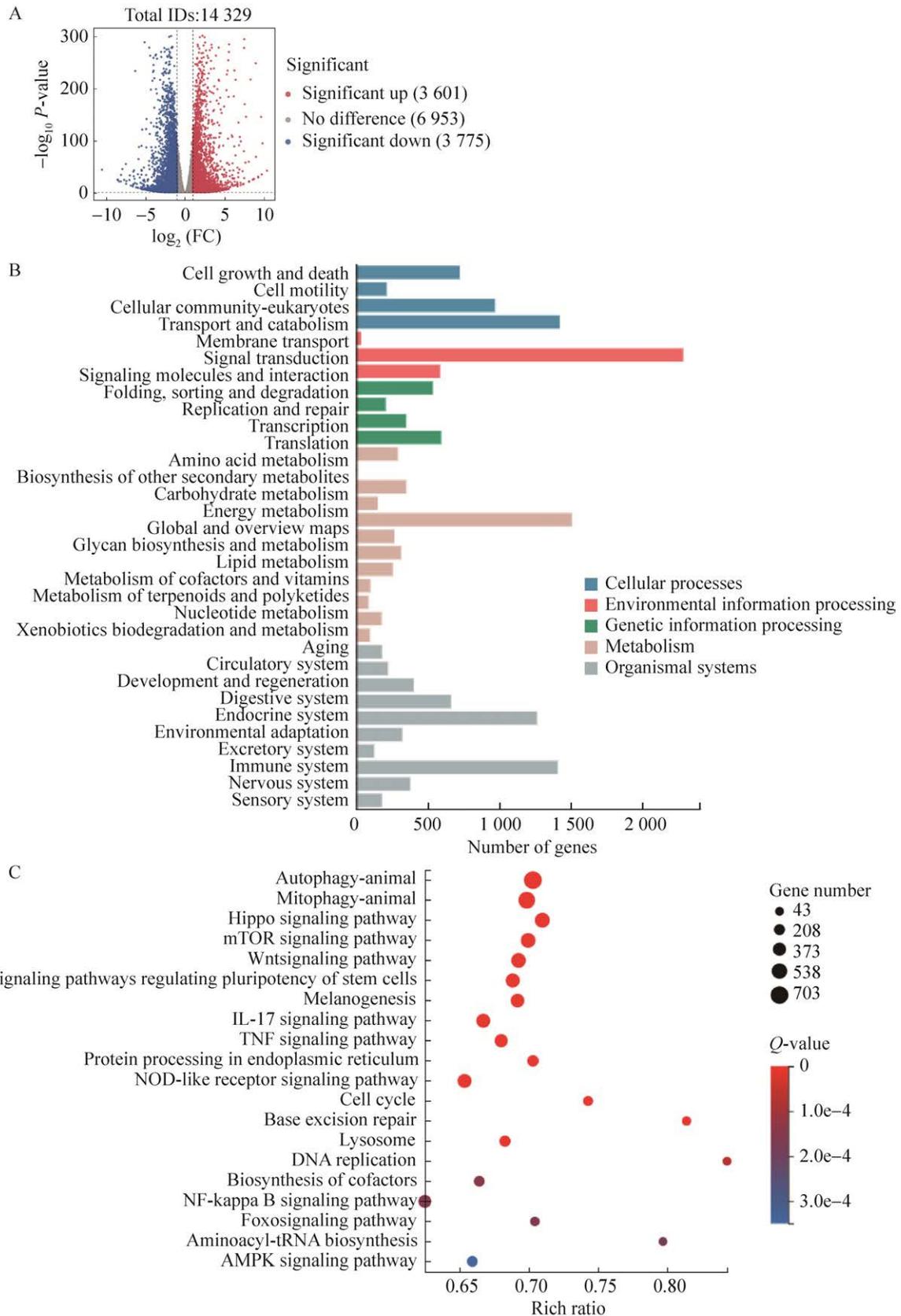
### 2.3 差异基因的 qRT-PCR 验证

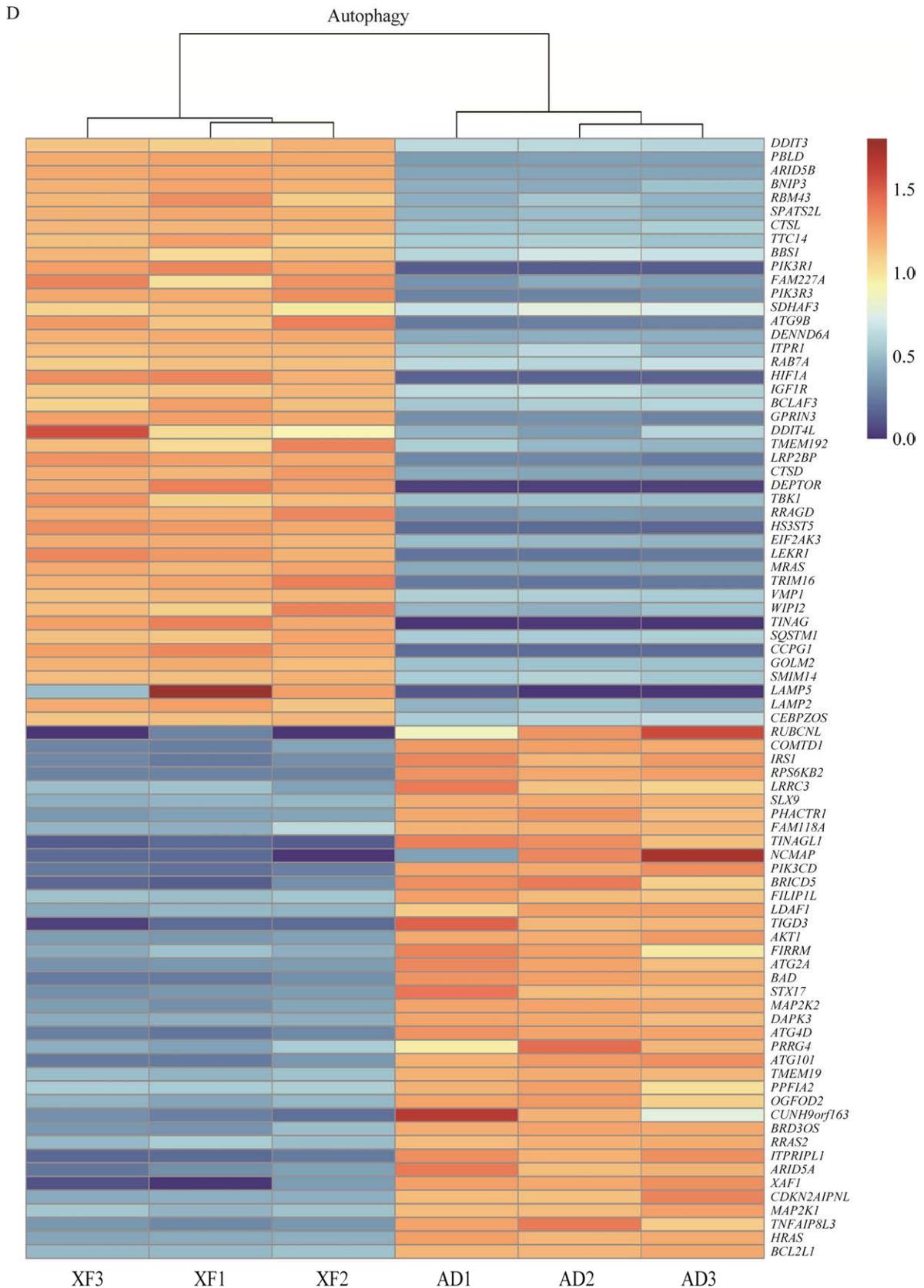
从转录组学鉴定出的候选基因中选取 11 个参与调控自噬途径的基因,如自噬起始相关基因 *ATG101*、*ATG9B* 和 *WIPI2*;自噬延伸的相关基

因 *ATG2A* 和 *ATG4D*;自噬关键因子 *NBR1* 和 *OPTN*;以及自噬溶酶体相关基因 *STX17*、*Rab7a* 和 *LAMP2*,并统计各个基因的相对丰度、 $\log_2$  FC 值及显著性,结果如表 2 所示。将筛选的 11 个差异基因进行 qRT-PCR 验证,如图 3 所示,与 Vero-AD 相比,Vero-XF 中 *ATG9B*、*WIPI2*、*LAMP2*、*OPTN*、*DEPTOR* 和 *Rab7a* 的表达量显著上调,*ATG4D* 的表达量显著下调,与组学结果一致;*ATG101*、*ATG2A* 和 *STX17* 的表达量显著上调,*NBR1* 的表达量差异不显著。

### 2.4 Vero 悬浮细胞自噬标志蛋白的验证

为了验证 Vero-XF 的确产生了较高的自噬水平,通过 Western blotting 检测 Vero-XF 与 Vero-AD 中自噬标志蛋白 LC3 和 P62 的表达。结果如图 4 所示,与 Vero-AD 相比,Vero-XF 的 LC3II/I 蛋白表达量显著上调,P62 蛋白表达量显著下调。结果表明 Vero-XF 有着较高的自噬水平。





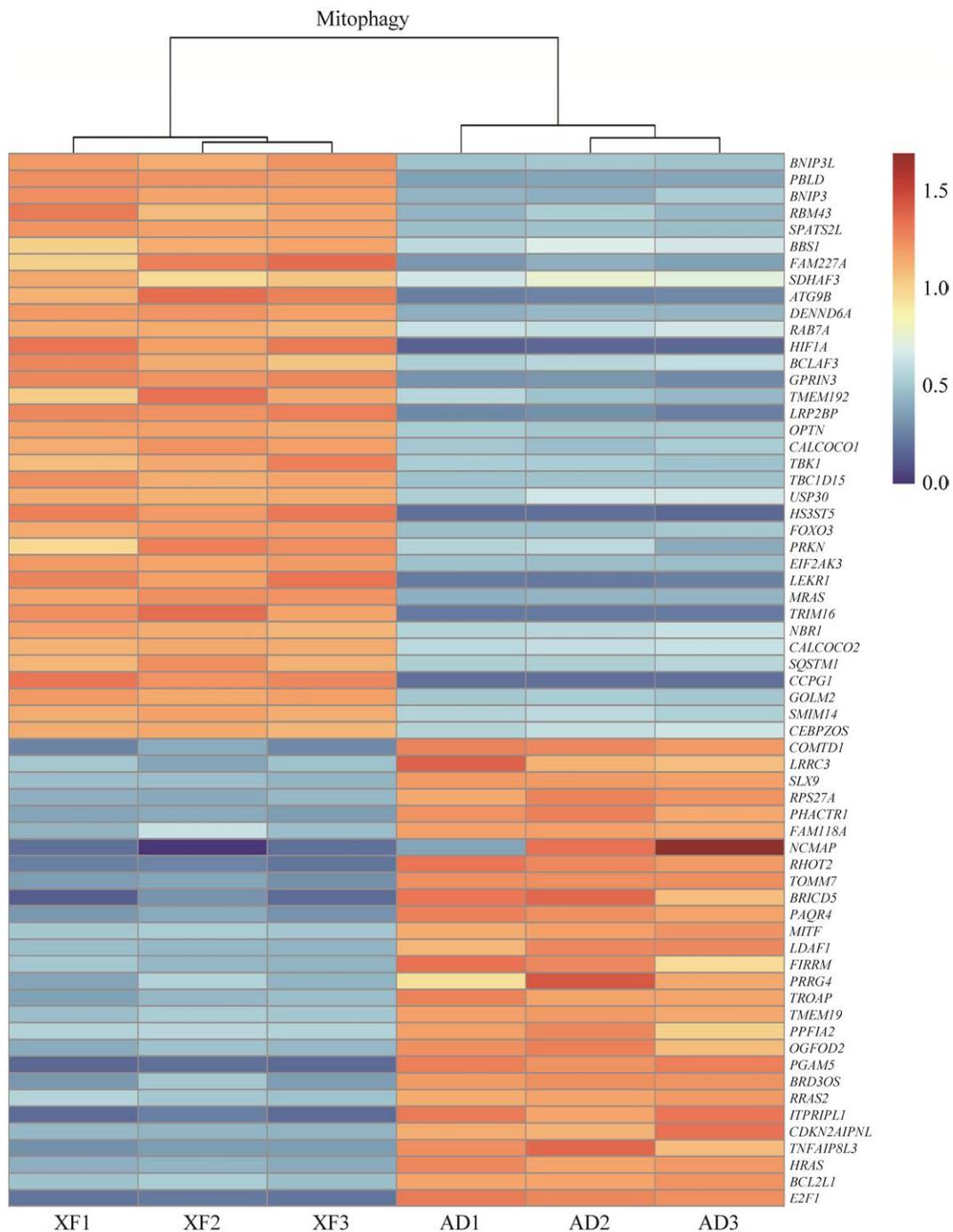


图 2 Vero-XF 和 Vero-AD 转录组学分析 A: Vero-XF 与 Vero-AD 差异基因的火山图; B: 差异基因 KEGG pathway 注释柱状图; C: 差异基因 KEGG 通路富集气泡图; D: 细胞自噬与线粒体自噬差异基因的聚类热图。

Figure 2 transcriptomic analysis of Vero-XF vs. Vero-AD. A: Volcano plot of Vero-XF vs. Vero-AD differential genes; B: Differential gene KEGG pathway annotated histogram; C: Differential gene KEGG pathway enriched bubble plot; D: Clustering heatmap of differential genes enriched in cellular autophagy and mitochondrial autophagy.

表 2 部分差异基因筛选结果

Table 2 Results of partial differential genes screening

Gene symbol	Relative abundance						log <sub>2</sub> FC	P-values
	AD1	AD2	AD3	XF1	XF2	XF3		
	FPKM	FPKM	FPKM	FPKM	FPKM	FPKM		
<i>ATG101</i>	16.72	18.05	18.55	3.42	4.90	3.50	-2.072 92	0.000 051
<i>ATG2A</i>	10.02	9.32	8.61	2.68	2.79	2.47	-1.656 41	0.002 502
<i>ATG4D</i>	10.78	10.37	10.28	1.91	2.47	2.26	-2.032 41	0.000 003
<i>NBR1</i>	27.01	27.30	29.99	57.23	54.23	52.91	1.266 50	0.000 128
<i>ATG9B</i>	0.19	0.18	0.21	0.82	1.00	0.94	2.396 44	0.004 356
<i>DEPTOR</i>	0.38	0.38	0.43	14.16	13.10	12.67	5.221 85	0.001 157
<i>WIPI2</i>	5.54	5.19	6.03	12.39	15.51	13.25	1.474 84	0.009 194
<i>STX17</i>	18.72	15.28	15.48	4.73	4.96	4.15	-1.656 81	0.006 651
<i>LAMP2</i>	20.28	22.25	19.67	55.21	48.57	53.14	1.408 73	0.001 321
<i>OPTN</i>	5.85	5.73	5.72	13.63	13.63	13.10	1.405 93	0.000 282
<i>Rab7a</i>	79.27	76.74	84.89	144.36	145.01	140.41	1.053 52	0.000 109

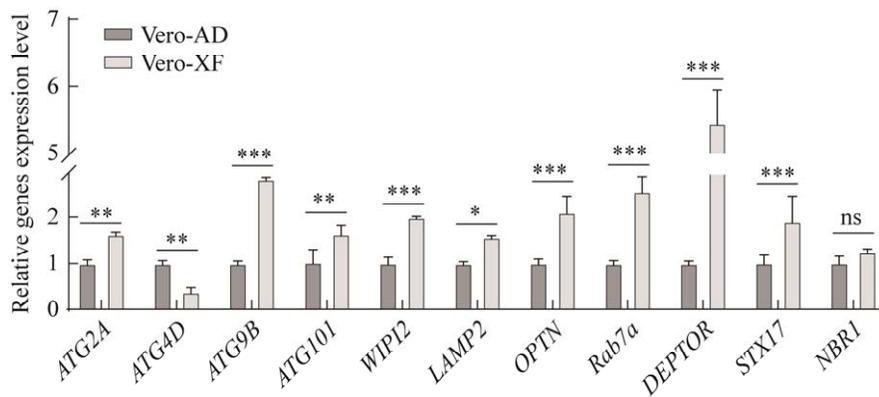


图 3 qRT-PCR 检测 Vero-XF 与 Vero-AD 中部分差异基因的表达

Figure 3 qRT-PCR to detect the expression of partial differential genes in Vero-XF and Vero-AD.  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; ns:  $P>0.05$ .

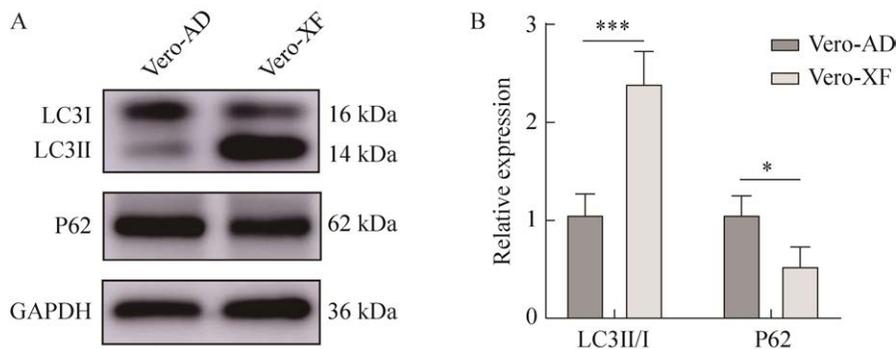


图 4 Western blotting 检测 LC3 和 P62 在 Vero-XF 与 Vero-AD 中表达(A)及量化(B)

Figure 4 Western blotting detection of LC3 and P62 expression (A) and quantification (B) in Vero-XF and Vero-AD.  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

## 2.5 表皮生长因子对 Vero 悬浮细胞自噬的影响

通过 Western blotting 验证 Vero-XF 中 LC3 和 P62 的表达, 结果表明 Vero-XF 产生了较高自噬水平。自噬是细胞内生理现象, 各种营养物质如氨基酸、生长因子、氧气和能量受到限制时, 可能会诱导自噬发生。因此, 推测 Vero-XF 在正常培养条件下仍产生较高自噬水平可能由营养缺乏导致。通过外源添加 EGF 观察是否能改善 Vero-XF 自噬水平。利用 Western blotting 对添加 10、20、30  $\mu\text{g/L}$  EGF 的 Vero-XF 进行自噬标记

蛋白检测。结果如图 5 所示, 与对照组相比, 外源添加 3 种浓度 EGF 后 LC3II/I 表达量均显著下调, P62 表达量也均显著上调。因此, EGF 的添加可有效改善 Vero-XF 的自噬水平。

## 2.6 表皮生长因子对 Vero 悬浮细胞增殖的影响

为了探究改善细胞自噬是否会影响细胞增殖, 通过对 Vero-XF 外源添加 10、20、30  $\mu\text{g/L}$  EGF, 并以空白组作为对照, 将 4 组细胞各阶段的平均细胞密度绘制生长曲线。如图 6A 所示, 外源添加 10、20 和 30  $\mu\text{g/L}$  EGF

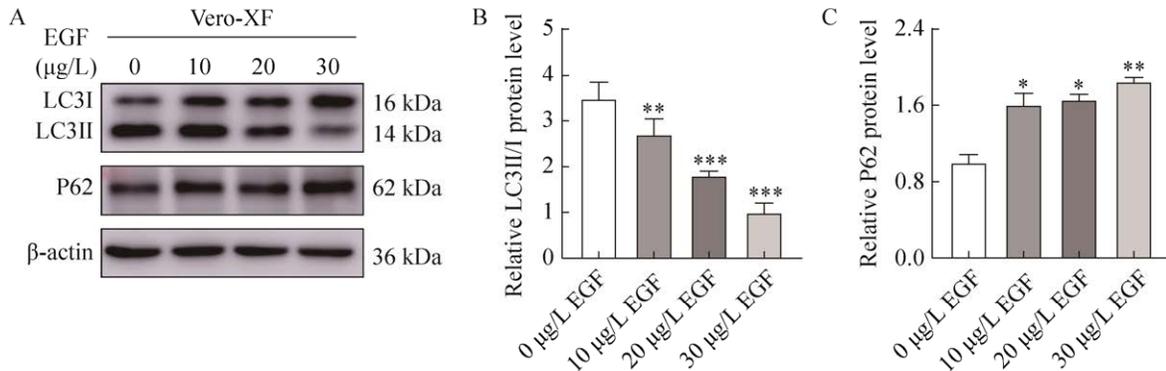


图 5 Western blotting 检测外源添加 EGF 后 Vero 悬浮细胞 LC3 和 P62 表达(A)及量化(B、C)

Figure 5 Western blotting detection of LC3 and P62 expression (A) and quantification (B, C) in Vero suspension cells after addition of EGF.  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

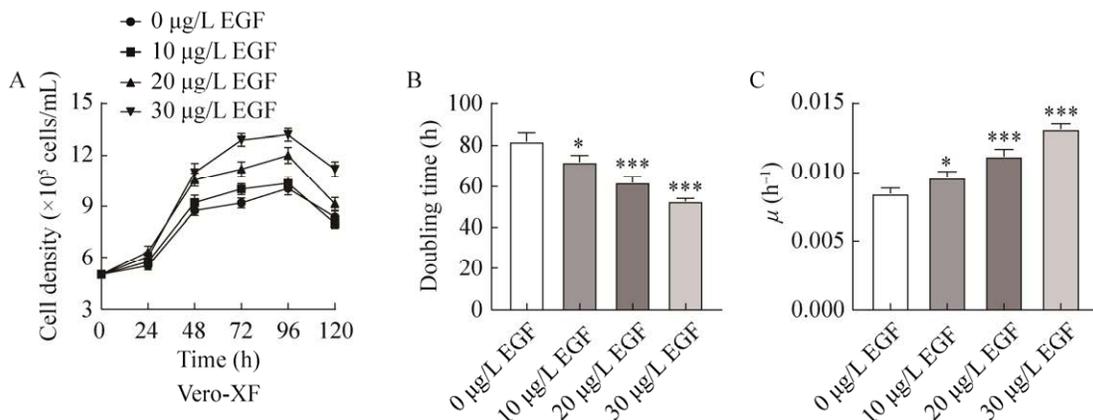


图 6 外源添加 EGF 后 Vero 悬浮细胞的生长特性 A: 外源添加 EGF 后 Vero 悬浮细胞的生长曲线; B: 倍增时间; C: 比生长速率( $n=3$ )。

Figure 6 Growth characteristics of Vero suspension cells after addition of EGF. A: Growth curve of Vero suspension cells after addition of EGF; B: Doubling time; C: Specific growth rate ( $n=3$ ). \*:  $P<0.05$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

使 Vero-XF 最大增殖密度分别增加了 3.08%、19.32%和 31.26%。通过计算 4 组细胞的倍增时间和比生长速率更清晰地观察 EGF 对 Vero-XF 增殖的影响。如图 6B、6C 所示, 对照组与外源添加 10、20、30  $\mu\text{g/L}$  EGF 组的细胞倍增时间分别为 82.02 h、71.93 h、62.01 h、52.70 h, 比生长速率分别为  $0.0084\text{ h}^{-1}$ 、 $0.0097\text{ h}^{-1}$ 、 $0.0112\text{ h}^{-1}$ 和  $0.0132\text{ h}^{-1}$ 。与对照组相比, 添加 10、20、30  $\mu\text{g/L}$  的 EGF 后 Vero-XF 的比生长速率分别增加了 15.48%、33.33%、57.14%。因此, 外源添加 EGF 改善细胞自噬水平可促进 Vero-XF 的增殖。

## 2.7 表皮生长因子对 Vero 悬浮细胞周期的影响

为了更进一步确认细胞增殖结果以及 EGF

的添加是否影响 Vero-XF 的周期, 利用流式细胞仪检测对照组与外源添加 EGF 组的 Vero-XF 周期情况。通常情况下, 细胞停滞于 G1 期是细胞周期受到抑制; S 期是完成细胞 DNA 的复制。因此, 细胞在 S 期的占比可作为细胞增殖的指标。如图 7A 所示, Vero-AD 的 G1 期占比为 63.44%, S 期占比为 29.85%。与 Vero-AD 相比, 驯化后的 Vero-XF 的 G1 期细胞数量增加, S 期细胞数量减少, 分别为 74.98%和 19.21%。如图 7B 所示, 对照组的 G1 期占比为 80.07%, S 期占比为 18.12%;外源添加 10  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ 、30  $\mu\text{g/L}$  EGF 组 G1 期占比分别为 77.44%、76.22%、73.10%, S 期占比分别为 20.94%、21.78%、24.50%。综上, 与对照组相比, 外源添加 EGF 组 G1 期细胞数量减少, S 期细胞数

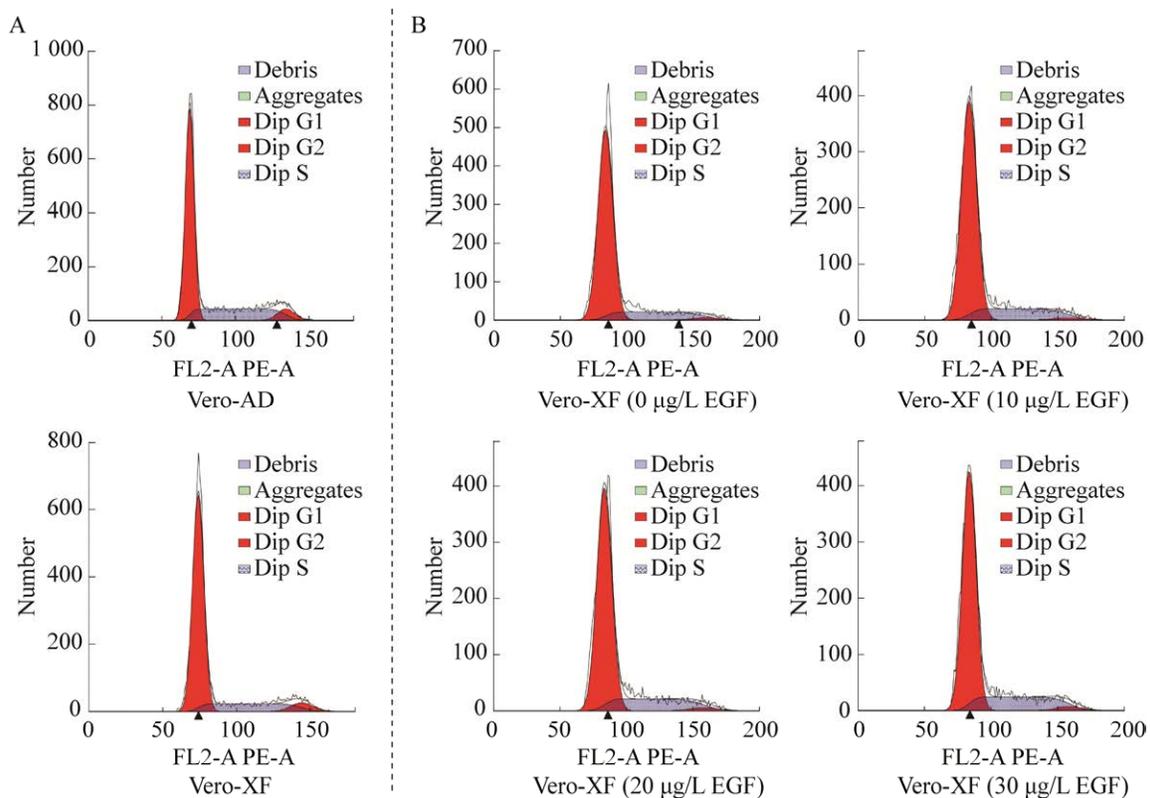


图 7 流式细胞仪检测细胞周期 A: Vero-AD 和 Vero-XF 的周期; B: 外源添加 EGF 后 Vero-XF 的周期。

Figure 7 Cell cycle detection by flow cytometry. A: Cycle of Vero-AD and Vero-XF; B: Cycle of Vero-XF after addition of EGF.

量增加,促进了细胞周期的进展。

## 2.8 表皮生长因子对 Vero 悬浮细胞凋亡的影响

为了探究 Vero-XF 凋亡情况以及评估外源添加 EGF 对 Vero-XF 凋亡的影响,利用流式细胞仪对 Vero-AD、Vero-XF 和外源添加 EGF 的 Vero-XF 进行凋亡检测。如图 8 所示, Q2 和 Q3 象限分别作为晚期细胞凋亡数和早期细胞凋亡数。在 Vero-AD 与 Vero-XF 凋亡检测中,如图 8A

所示, Vero-AD 的凋亡率为 3.29%, Vero-XF 的凋亡率为 13.27%。Vero-XF 凋亡率高于 Vero-AD,这进一步证明了 Vero-XF 存活率相对较低。在 Vero-XF 培养过程中外源添加 EGF 后进行凋亡检测,如图 8B 所示,对照组细胞的凋亡率为 27.50%,外源添加 10、20、30  $\mu\text{g/L}$  EGF 后的 Vero-XF 凋亡率分别为 24.66%、12.04%、11.27%。以上结果表明,外源添加 EGF 可有效改善 Vero-XF 的凋亡。

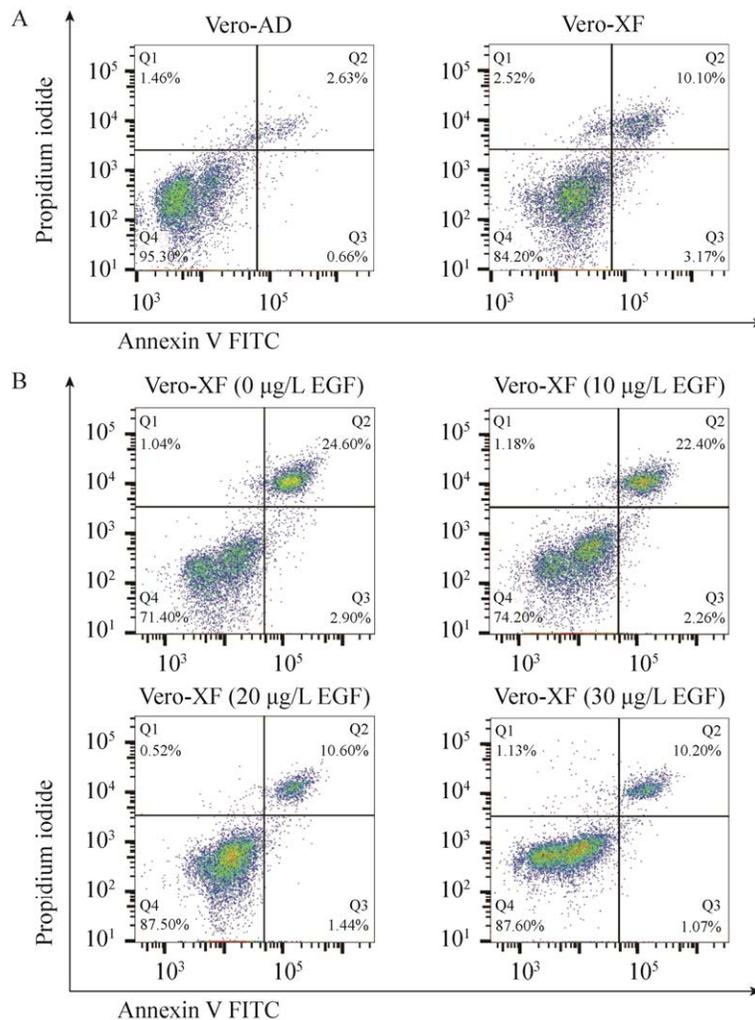


图 8 流式细胞仪检测细胞凋亡率 A: Vero-XF 与 Vero-AD 的凋亡率; B: 外源添加 EGF 后 Vero-XF 的凋亡率。

Figure 8 Apoptosis rate detected by flow cytometry. A: Apoptosis rate of Vero-XF vs. Vero-AD; B: Apoptosis rate of Vero-XF after addition of EGF.

## 2.9 qRT-PCR 验证表皮生长因子对差异基因的影响

为了探究外源添加 EGF 后对 11 个差异表达基因的影响, 选用 30  $\mu\text{g/L}$  EGF 处理的细胞进行 qRT-PCR 验证, 如图 9 所示, 与对照组相比, EGF 处理组中 *ATG101*、*LAMP2*、*Rab7a* 和 *STX17* 的表达量显著下调; *ATG4D* 的表达量显著上调; *ATG2A*、*ATG9B*、*WIPI2*、*OPTN*、*DEPTOR* 和 *NBR1* 的表达量差异不显著。因此, 结果表明, EGF 可调控 *ATG4D*、*ATG101*、*LAMP2*、*Rab7a* 和 *STX17* 等自噬相关基因的表达, 改善 Vero-XF 的自噬水平。

## 3 讨论与结论

Vero 细胞由于缺乏分泌干扰素的能力, 导致其对多种病毒的易感性较高, 且生物安全性高、不易变异, 是人类病毒性疫苗生产应用最为广泛的传代性细胞系之一<sup>[2]</sup>。近年来, 为了保证疫苗的大规模生产, 研究者不断地探索开发 Vero 细胞的悬浮培养工艺, 以实现高密度培养细胞。然而, 在 Vero 细胞悬浮驯化中始终存在细胞增殖缓慢、存活率低和结团率高等问题。为了更有效地使 Vero 细胞适应悬浮培养的状态, 并保持较高的细胞存活率和增殖速率, 本研究通过 RNA-seq 技术分析 Vero-XF 与 Vero-AD 的

差异基因, 获得在悬浮培养中影响细胞生长的关键基因, 为构建基因工程细胞株提供了参考。

目前基于 Vero-XF 与 Vero-AD 转录组学分析, 以及 Western blotting 验证 Vero-XF 自噬标志蛋白 LC3 和 P62 的表达, 结果表明 Vero-XF 的自噬水平较高。随后通过 qRT-PCR 验证了部分差异基因, 其中 *ATG101*、*ATG9B*、*WIPI2*、*ATG2A*、*OPTN*、*Rab7a*、*STX17* 和 *LAMP2* 的表达量在 Vero-XF 中显著上调, 以及 *ATG4D* 的表达量在 Vero-XF 中显著下调。*ATG101* 是 ULK1 激酶复合物的的重要组成部分, 可稳定 *ATG13* 并招募下游自噬相关蛋白。Suzuki 等<sup>[14]</sup>通过 siRNA 敲低 *ATG101* 后, 细胞 LC3II/I 表达量下调, 自噬受到抑制。*WIPI2*、*ATG2A* 和 *ATG9B* 等蛋白参与调控自噬的起始和吞噬泡的形成。Ren 等<sup>[15]</sup>揭示了 *WIPI2* 特异性识别 *ATG2A*, 形成复合物定位到吞噬泡和内质网的交界处, 并招募 *ATG9B* 将细胞膜组分运输至吞噬泡, 促进自噬体的延伸与闭合。*OPTN* 作为自噬受体蛋白, 通过泛素化信号途径参与自噬底物识别、自噬小体形成以及自噬溶酶体的降解。也有研究表明, 敲低 *OPTN* 可改变细胞黏附信号, 增强细胞周期蛋白 D1 表达, 促进细胞增殖<sup>[16]</sup>。*Rab7a* 和 *STX17* 都参与了自噬体与溶酶体的融合, 同时也介导了早期自噬体的成熟。Feng 等<sup>[17]</sup>研究

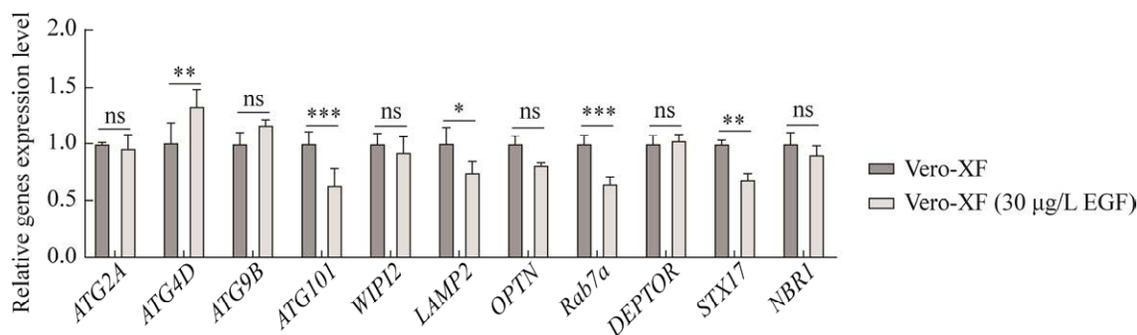


图 9 qRT-PCR 检测 EGF 对部分差异基因的表达

Figure 9 qRT-PCR to detect the expression of some differential genes by EGF.  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; ns:  $P>0.05$ .

发现,当抑制 STX17 表达,使得自噬体与溶酶体的融合受到限制,阻止了相关蛋白的降解,可促进在营养缺乏的情况下细胞增殖。LAMP2 是溶酶体膜的重要组成部分,介导自噬体与溶酶体融合,促进细胞质内蛋白降解。当抑制 LAMP2 的表达,溶酶体功能和自噬体会受到抑制<sup>[18]</sup>。ATG4D 是半胱氨酸蛋白酶,为自噬相关蛋白,Liao 等<sup>[19]</sup>研究发现上调 ATG4D 表达显著提高三叉神经节自噬水平。但也有研究表明,ATG4D 的表达与自噬水平呈负相关。ATG4D 可介导 ATG8 蛋白水解,在 ATG4D 缺失的细胞中 ATG8 得到积累,促使细胞自噬小体的数量增加<sup>[20]</sup>。qRT-PCR 验证结果也进一步证实了与 Vero-AD 相比 Vero-XF 发生了较高的自噬水平。此外,通过 KEGG 富集分析所筛选出 *OPTN* 和 *STX17* 等基因,既有调控细胞黏附的功能,也能改善细胞自噬并促进其增殖,为后续悬浮型基因工程 Vero 细胞的构建提供了新靶点。

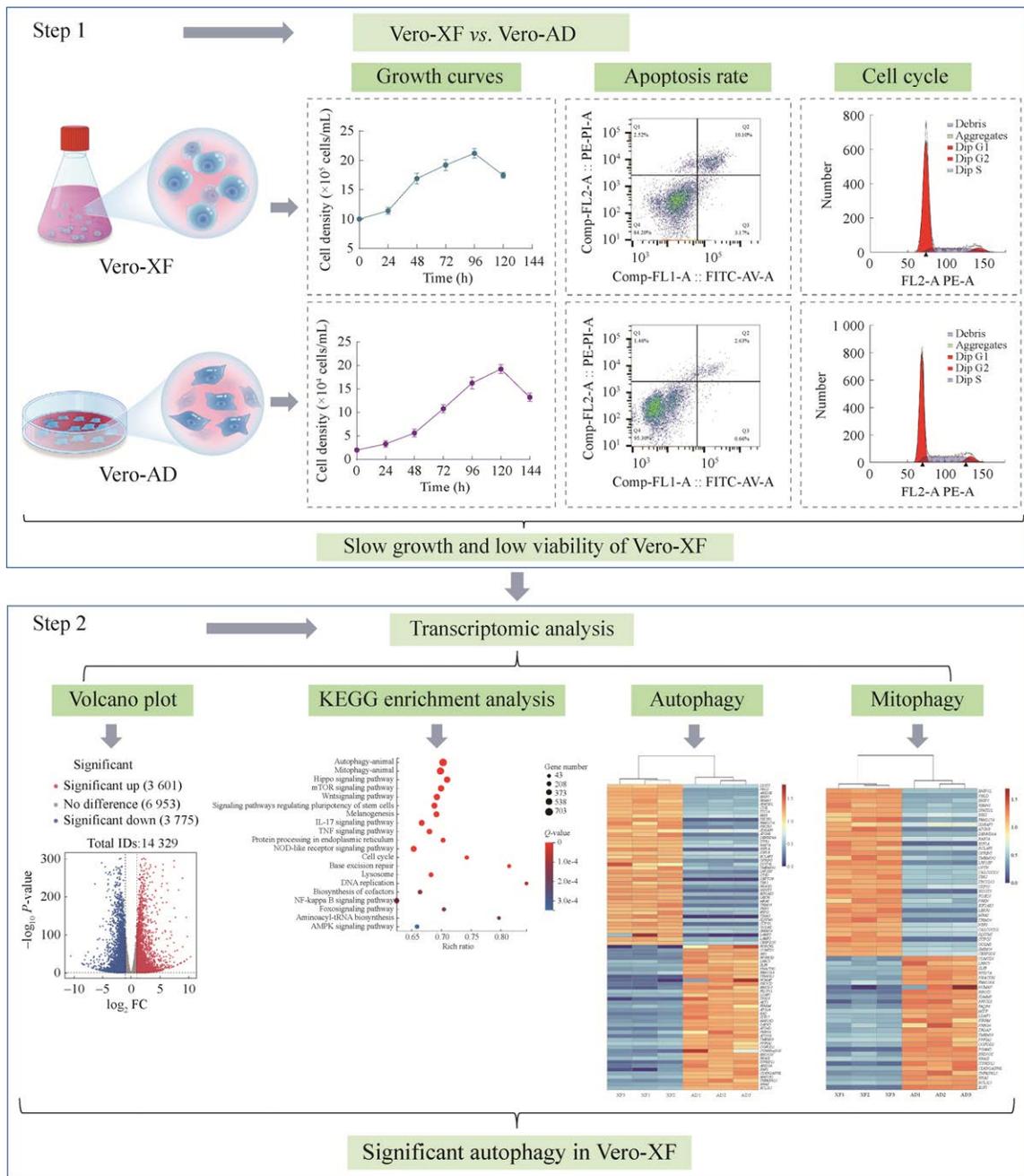
在 Vero 细胞悬浮驯化的过程中,Logan 等<sup>[8]</sup>通过组学分析影响细胞生长缓慢的原因,从而发现 Vero 悬浮细胞中自噬相关基因的表达水平显著升高。因此,在 Vero 细胞的悬浮驯化中,解决细胞的自噬问题至关重要。对 Vero-XF 与 Vero-AD 的差异基因进行 KEGG 富集性分析,结果表明除细胞自噬和线粒体自噬途径差异显著外,AMPK 信号通路和 mTOR 信号通路差异也较为显著。AMPK 是一种主要的能量调节因子。有研究发现,当 AMP/ATP 和 ADP/ATP 比值升高,或缺乏葡萄糖时,AMPK 的磷酸化水平升高,激活磷酸化 ATG1 来诱导细胞自噬<sup>[21]</sup>。WIPI2 的  $\beta$ -螺旋桨平台在自噬过程中为 AMPK 通路中的蛋白互作和激酶信号转导起着支架作用<sup>[22]</sup>。Lu 等<sup>[23]</sup>研究表明,WIPI 家族蛋白通过调节 STK11-AMPK-TSC2 信号通路,从而控制自噬小体的形成。mTOR 作为营养传感器,通

过感受氨基酸和生长因子的浓度来调节细胞自身的稳态。研究表明,当氨基酸缺乏时通过抑制 mTORC1 活性,降低 mTOR 通路的磷酸化水平,诱导下游 ULK1 引发细胞自噬<sup>[24]</sup>。DEPTOR 在 mTOR 通路中是 mTORC1 的天然抑制剂。Wang 等<sup>[25]</sup>发现 DEPTOR 的表达水平与自噬活性呈正相关,当 DEPTOR 水平下调时会减弱与 mTORC1 的互作,进而抑制细胞自噬的发生。因此,基于 KEGG 富集分析结果显示,AMPK 和 mTOR 信号通路在 2 组细胞中存在显著差异,表明这两条通路可能在 Vero-XF 的自噬调控中发挥重要作用。

为了进一步探究改善 Vero-XF 的自噬水平是否能提升细胞活率,并促进细胞生长。在营养饥饿小肠上皮细胞诱导的自噬模型中,Maynard 等<sup>[26]</sup>发现,外源添加 EGF 可抑制细胞自噬并减缓小肠上皮细胞的受损。EGF 与受体酪氨酸激酶结合后激活受体,进而促进 PI3K 的活化,并将激酶 AKT 招募至细胞膜,激活 mTORC1 和 mTORC2 复合物,从而引发其下游信号通路的级联反应,最终抑制细胞自噬发生<sup>[12]</sup>。同时,EGF 与其受体结合可直接去磷酸化抑制自噬启动因子 Beclin-1,从而控制自噬小体的形成<sup>[27]</sup>。本研究通过外源添加 EGF 来改善 Vero-XF 的自噬水平,并利用 Western blotting 检测 LC3 和 P62 的表达。结果表明,外源添加 EGF 后 Vero-XF 的 LC3II/I 表达量显著下调,P62 表达量显著上调,表明外源添加 EGF 可有效改善细胞自噬水平。与此同时,外源添加 EGF 后测定 Vero-XF 的倍增时间和比生长速率的变化,并利用流式细胞术检测外源添加 EGF 后对细胞凋亡的影响。结果表明,EGF 的添加提升了细胞比生长速率,并降低了细胞倍增时间和凋亡率。因此,外源添加 EGF 可促进 Vero-XF 的增殖,并提升细胞活率。

综上,如图 10 所示,本研究通过 RNA-seq 分析初步揭示了 Vero-XF 自噬机制的过度激活是导致其生长缓慢的原因之一,经聚类分析筛选部分差异基因,为后续悬浮型基因工程 Vero 细胞的构建提供了新靶点;同时,外源添加 EGF 改善了 Vero-XF 的生长状态,并促进了细胞增

殖。但本研究只关注细胞驯化的起始和最终的悬浮这 2 个阶段的生长变化,未探究细胞在驯化过程中的生长变化。后续将基因修饰后的 Vero 细胞进行悬浮驯化时,会收集驯化中不同阶段的样本,来探究细胞在驯化过程中生长和代谢的变化,为 Vero 细胞的悬浮培养提供全面的参考。



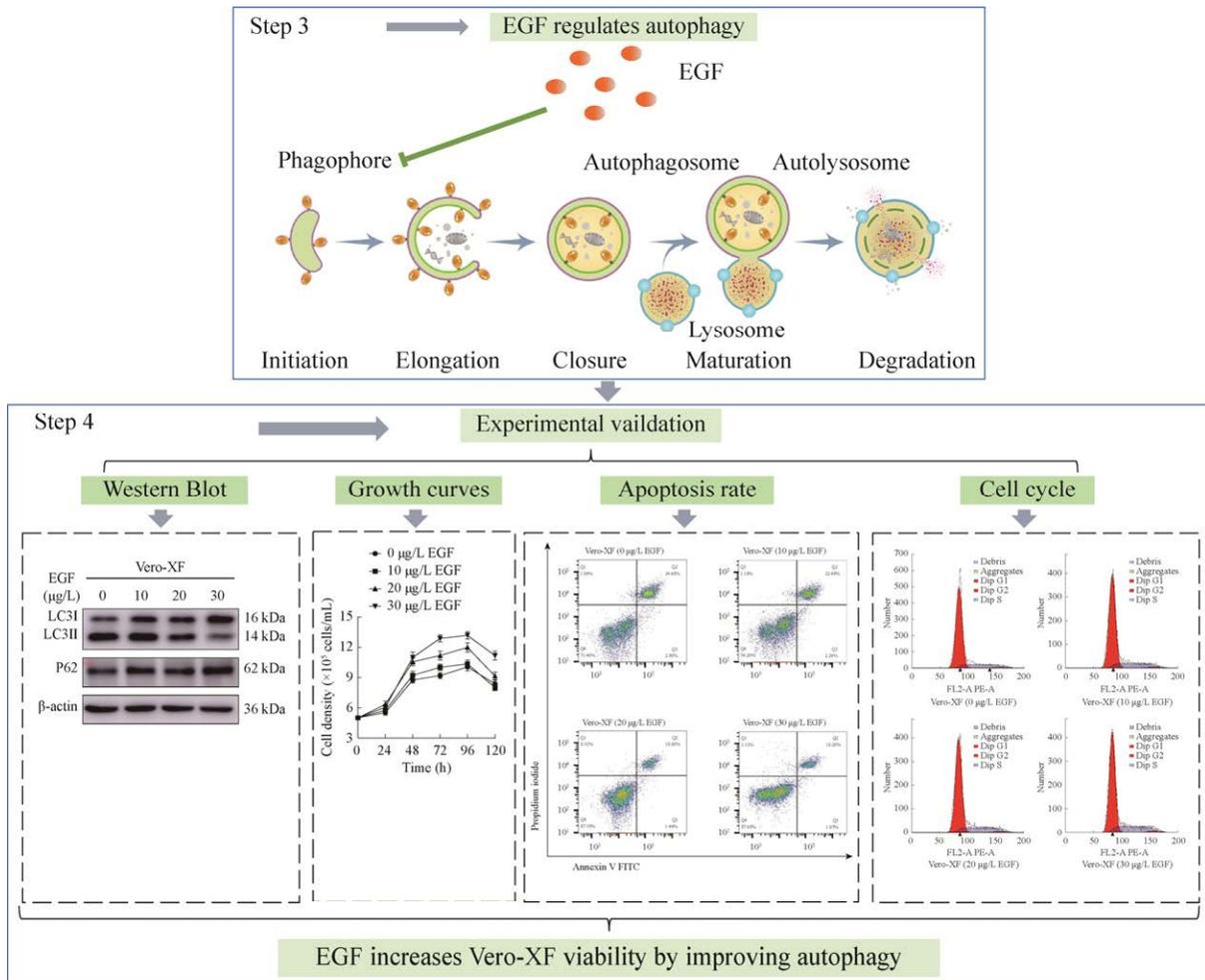


图 10 转录组学分析 Vero-XF 并用 EGF 改善其自噬水平

Figure 10 Summary plot of transcriptomic analysis of Vero-XF and improvement of its autophagy with EGF.

## 作者贡献声明

李木子：方案设计、实验操作、初稿写作；  
孙娜：数据管理、方案设计、稿件润色修改；  
彭润生、马芳芳：实验操作；王家敏：数据管理、提供材料；乔自林：提供材料、监督指导、稿件润色修改；陈建国：监督指导、稿件润色修改；阿依木古丽·阿不都热依木：稿件润色修改。

## 作者利益冲突公开声明

本人声明没有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。

## REFERENCES

- [1] BARRETT PN, MUNDT W, KISTNER O, HOWARD MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2009, 8(5): 607-618.
- [2] EMENY JM, MORGAN MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production[J]. *The Journal of General Virology*, 1979, 43(1): 247-252.
- [3] MERTEN OW, WU R, COUVÉ E, CRAINIC R. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors[J]. *Cytotechnology*, 1997, 25: 35-44.
- [4] OSADA N, KOHARA A, YAMAJI T, HIRAYAMA N, KASAI F, SEKIZUKA T, KURODA M, HANADA K. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line[J]. *DNA Research*, 2014, 21(6): 673-683.
- [5] SHEN CF, GUILBAULT C, LI XL, ELAHI SM, ANSORGE S, KAMEN A, GILBERT R. Development

- of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines[J]. *Vaccine*, 2019, 37(47): 6996-7002.
- [6] LEE DK, PARK J, SEO DW. Suspension culture of Vero cells for the production of adenovirus type 5[J]. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2020, 9(1): 48-55.
- [7] 张潇文. 基于转录组学和蛋白质组学筛选与 Vero 细胞黏附相关分子及其功能初步研究[D]. 兰州: 西北民族大学, 2023.
- ZHANG XW. Screening molecules related to Vero cell adhesion based on transcriptomics and protein omics and preliminary study on their functions[D]. Lanzhou: Northwest Minzu University, 2023 (in Chinese).
- [8] LOGAN M, RINAS K, McCONKEY B, AUCOIN MG. Vero cells gain renal tubule markers in low-calcium and magnesium chemically defined media[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 6180.
- [9] GU J, WANG YW, LIU YM, SHI ML, YIN LD, HOU YZ, ZHOU Y, CHU WONG CK, CHEN DF, GUO ZG, SHI HF. Inhibition of autophagy alleviates cadmium-induced mouse spleen and human B cells apoptosis[J]. *Toxicological Sciences*, 2019, 170(1): 109-122.
- [10] ZHOU GJ, LV XJ, ZHONG XR, YING W, LI WB, FENG YC, XIA QH, LI JS, JIAN SH, LENG ZW. Suspension culture strategies to enrich colon cancer stem cells[J]. *Oncology Letters*, 2023, 25(3): 116.
- [11] FILOMENI G, de ZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22(3): 377-388.
- [12] SOBOLEWSKA A, GAJEWSKA M, ZARZYŃSKA J, GAJKOWSKA B, MOTYL T. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells *via* the mTOR pathway[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2009, 88(2): 117-130.
- [13] 马睿. EGF 与 IGF-1 对牦牛卵丘细胞自噬及胞吞相关蛋白表达的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.
- MA R. Effects of EGF and IGF-1 on autophagy and endocytosis-related protein expression in yak cumulus cells[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [14] SUZUKI H, KAIZUKA T, MIZUSHIMA N, NODA NN. Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(7): 572-580.
- [15] REN JQ, LIANG RB, WANG WJ, ZHANG DC, YU L, FENG W. Multi-site-mediated entwining of the linear WIR-motif around WIPI  $\beta$ -propellers for autophagy[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2702.
- [16] PETRACCHINI S, HAMAOUI D, DOYE A, ASNACIOS A, FAGE F, VITIELLO E, BALLAND M, JANEL S, LAFONT F, GUPTA M, LADOUX B, GILLERON J, MAIA TM, IMPENS F, GAGNOUX-PALACIOS L, DAUGAARD M, SORENSEN PH, LEMICHEZ E, METTOUCHI A. Optineurin links Hsc1-dependent Rac ubiquitylation to integrin-mediated mechanotransduction to control bacterial invasion and cell division[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6059.
- [17] FENG H, LIU X, ZHOU CQ, GU QC, LI Y, CHEN JG, TENG JL, ZHENG PL. CCDC115 inhibits autophagy-mediated degradation of YAP to promote cell proliferation[J]. *FEBS Letters*, 2023, 597(5): 618-630.
- [18] GUO W, ZHONG W, HAO LY, DONG HB, SUN XG, YUE RC, LI TJ, ZHOU ZX. Fatty acids inhibit LAMP2-mediated autophagy flux *via* activating ER stress pathway in alcohol-related liver disease[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2021, 12(5): 1599-1615.
- [19] LIAO DL, WEI SJ, HU JZ. Inhibition of miR-542-3p augments autophagy to promote diabetic corneal wound healing[J]. *Eye and Vision*, 2024, 11(1): 3.
- [20] TAMARGO-GÓMEZ I, MARTÍNEZ-GARCÍA GG, SUÁREZ MF, REY V, FUEYO A, CODINA-MARTÍNEZ H, BRETONES G, CARAVIA XM, MOREL E, DUPONT N, CABO R, TOMÁS-ZAPICO C, SOUQUERE S, PIERRON G, CODOGNO P, LÓPEZ-OTÍN C, FERNÁNDEZ ÁF, MARIÑO G. ATG4D is the main ATG8 delipidating enzyme in mammalian cells and protects against cerebellar neurodegeneration[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2021, 28(9): 2651-2672.
- [21] PARK JM, LEE DH, KIM DH. Redefining the role of AMPK in autophagy and the energy stress response[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2994.
- [22] BAKULA D, MUELLER AJ, PROIKAS-CEZANNE T. WIPI  $\beta$ -propellers function as scaffolds for STK11/LKB1-AMPK and AMPK-related kinase signaling in autophagy[J]. *Autophagy*, 2018, 14(6): 1082-1083.
- [23] LU G, YI J, GUBAS A, WANG YT, WU YH, REN Y, WU M, SHI Y, OUYANG CX, TAN HWS, WANG TR, WANG LM, YANG ND, DENG S, XIA DJ, CHEN RH, TOOZE SA, SHEN HM. Suppression of autophagy during mitosis *via* CUL4-RING ubiquitin ligase-mediated WIPI2 polyubiquitination and proteasomal degradation[J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1917-1934.
- [24] KAMADA Y, FUNAKOSHI T, SHINTANI T, NAGANO K, OHSUMI M, OHSUMI Y. Tor-mediated induction of autophagy *via* an Apg1 protein kinase complex[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2000, 150(6): 1507-1513.
- [25] WANG JZ, CHEN JM, QIU DB, ZENG ZY. Regulatory role of DEPTOR-mediated cellular autophagy and mitochondrial reactive oxygen species in angiogenesis in multiple myeloma[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 47(2): 643-658.
- [26] MAYNARD AA, DVORAK K, KHAILOVA L, DOBRENEN H, ARGANBRIGHT KM, HALPERN MD, KURUNDKAR AR, MAHESHWARI A, DVORAK B. Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 299(3): G614-G622.
- [27] TAN XJ, THAPA N, SUN Y, ANDERSON RA. A kinase-independent role for EGF receptor in autophagy initiation[J]. *Cell*, 2015, 160(1): 145-160.