

猪瘟病毒通过网格蛋白介导的内吞途径入侵 ST 细胞

梁武龙, 方佳, 林鸷, 郑敏萍, 鲍长磊, 王涛, 张彦明*

(西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 病毒入侵易感细胞是病毒建立感染的必要过程, 猪瘟病毒如何入侵易感细胞尚未明确。笔者对猪瘟病毒入侵细胞与网格蛋白介导的内吞途径的关系进行了初步研究。通过利用抑制剂氯丙嗪和 Dynasore 及 shRNA 技术, 对网格蛋白及动力蛋白功能进行抑制, 干扰网格蛋白介导的内吞途径, 发现猪瘟病毒的细胞入侵效率明显下降; 通过利用内体酸化抑制剂 NH_4Cl 及 shRNA 技术下调内体标志蛋白 Rab5 和 Rab7 的表达量, 发现内体酸化过程受到抑制后猪瘟病毒的感染效率受到了明显抑制。本研究初步证明猪瘟病毒能够利用网格蛋白介导的内吞途径完成对易感细胞的入侵, 感染的过程依赖于初级内体和次级内体, 为了解猪瘟病毒的感染过程积累了新的数据。

关键词: 猪瘟病毒; 入侵; 网格蛋白; 内体

中图分类号: S852.651

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)01-0140-10

Classical Swine Fever Virus Entry into ST Cells by Clathrin-mediated Endocytosis Pathway

LIANG Wu-long, FANG Jia, LIN Zhi, ZHENG Min-ping, BAO Chang-lei,

WANG Tao, ZHANG Yan-ming*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Cell entry of virus is an indispensable process in virus life cycle. However, the mechanism of classical swine fever virus (CSFV) cell entry is still undiscovered. Here, CSFV entry into ST cells by clathrin-mediated endocytosis was tested. Chemical inhibitor chlorpromazine and Dynasore and shRNA were used to disturb the clathrin-mediated endocytosis. The cell entry efficiency of CSFV was greatly decline when the function of clathrin and dynamin-2 were blocked. By using NH_4Cl and down-regulation of Rab5 and Rab7 gene, CSFV infection was inhibited. These results showed that the CSFV can entry into susceptible cells by using clathrin-mediated endocytosis pathway and the early endosome and late endosome were used for CSFV infection. This research provides new information to understand the CSFV infection.

Key words: classical swine fever virus; cell entry; clathrin; endosome

有囊膜的病毒往往通过内吞的方式进入细胞^[1]。网格蛋白介导的内吞途径是一种经典的内吞途径, 被诸多病毒利用而完成对细胞的入侵^[2-4]。网格蛋白由轻链和重链组成, 形成一种三角复合体结构; 当病毒和受体结合后, 网格蛋白三角复合体会应

答内吞信号被募集到细胞膜表面, 并拖拽细胞膜内陷形成网格蛋白内陷小窝^[5]。在动力蛋白(dynamin)的介导下^[6], 内陷小窝最终脱离细胞膜, 形成网格蛋白包被小泡, 并最终将内吞物质传递给内体(endosome)。内体成熟是不断酸化的过程, 由初

收稿日期: 2016-08-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472210)

作者简介: 梁武龙(1988-), 男, 山西忻州人, 博士, 主要从事分子病原学与免疫学研究, E-mail: fenghua880725@126.com

* 通信作者: 张彦明(1956-), E-mail: zhangym@nwsuaf.edu.cn

级内体形成次级内体。诸多囊膜病毒正是利用了内体中的酸性环境来诱发蛋白质结构改变,从而触发病毒囊膜和内体的膜融合^[7]。

猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)是一种有囊膜的单股正链 RNA 病毒。近年来猪瘟病毒的囊膜蛋白的功能及复制机制研究都取得了一定的进展,然而 CSFV 入侵易感细胞的机制尚未清楚^[8]。因此,本研究对 CSFV 与网格蛋白介导的内吞途径的关系进行了初步研究,并对初级内体和次级内体在 CSFV 感染细胞过程中的必要性进行了检测,以期对 CSFV 入侵细胞的机制有初步的了解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒和质粒 猪睾丸细胞(ST)由实验室培养保存;猪瘟病毒石门株购自于中国兽医药品监察所;干扰载体 pGFP-V-RS 由王晶钰教授馈赠;大肠杆菌工程菌(DH5 α)购自于 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;抗猪瘟病毒多克隆抗体由实验室保存;FITC 标记的兔抗猪 IgG 抗体(F1638)购自 Sigma 公司;抑制剂氯化铵(NH₄Cl)、氯丙嗪(CPZ)、Dynasore 购自 Sigma 公司;嘌呤霉素(PJ593)购自生工生物工程(上海)有限公司;反转录用 Prime Script RT 试剂盒、荧光定量用 2 \times STBR Green 购自 TaKaRa 公司;细胞转染试剂 jetPRIME transfection reagent 购自 Polyplus-transfection 公司;荧光倒置显微镜为 Nikon 公司产品;荧光定量 PCR 仪为 Bio-Red 公司产品。

1.2 干扰载体的构建

通过 BLOCK-iTTM RNAi Designer (Thermo Fisher)软件设计各基因的干扰序列(表 1),由华大基因公司合成;将合成片段与双酶切处理的干扰载体 pGFP-V-RS 连接后,转化大肠杆菌,并提取质粒。所得质粒经测序比对正确后冻存备用。

1.3 抑制剂安全浓度检测

将药物连续 10 倍梯度稀释后加入到 96 孔板中 ST 细胞单层上,每个药物浓度做 4 个重复。药物与细胞共孵育 24 h 后将药物去除,添加 50 μ L MTT (2 μ g \cdot mL⁻¹)与细胞孵育 4 h,添加 200 μ L DM-SO,在酶标仪上 490 nm 波长下读取吸光值。

表 1 各基因干扰片段序列

Table 1 Parameters of the short hairpin RNA (shRNA)

shRNA	序列(5'-3') Sequence
CHC shRNA-1	GCAGATAAGTGAGAAACATGA
CHC shRNA-2	GCAGTTTGCTCAAATGTTAGT
CHC shRNA-3	GCAGAGAAAGCAACTGTTATG
dynammin-2 shRNA-1	GCTGGTGAAGATGGAGTTTGA
dynammin-2 shRNA-2	GCCAAGTTTGAAGTGTGTTGA
dynammin-2 shRNA-3	GGAGAACCAAGGACCAGATTC
Rab5 shRNA-1	GGGCCAATTTTCATGAATTTCA
Rab5 shRNA-2	GCCTAGCACCAATGTACTACA
Rab5 shRNA-3	GCACAGTCCTATGCAGATGAC
Rab7 shRNA-1	GGAAGACATCACTCATGAACC
Rab7 shRNA-2	GGAGAGATGAGTTTCTCATCC
Rab7 shRNA-3	GGAGCTGTACAACGAATTTCC
Scrambled shRNA	GATGAAATGGATAGAAGTACA

CHC. 网格蛋白重链

CHC. Clathrin heavy chain

1.4 病毒感染和药物处理

药物在病毒感染前 1 h 添加到细胞中,并且在 CSFV 与细胞孵育的 1 h 过程中维持药物浓度。在病毒与细胞孵育完成后,药物和病毒一起连同上清弃掉,用 PBS 对细胞清洗 3 次,并用胰酶消化 30 s,以去除吸附在细胞表面的病毒粒子。细胞添加维持液继续培养。

1.5 细胞转染和阳性细胞筛选

将 ST 细胞培养于 6 孔板中,待细胞汇合度达到 75% 时,将构建好的干扰载体按照 jetPRIME transfection reagent 操作说明进行转染。转染 24 h 后向细胞中添加嘌呤霉素对阳性细胞进行筛选,待阳性细胞率达到 90% 以上时,对干扰效率进行检测,筛选出干扰效率好的细胞用于后续试验。

1.6 RNA 提取及 Real-time PCR

细胞总 RNA 通过 Trizol 法进行提取,提出的总 RNA 经浓度测定后按照反转录试剂盒操作指导生成 cDNA。Real-time PCR 用引物由华大基因公司合成(表 2),反应程序按照如下进行:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火和延伸 30 s,反应 40 个循环。 β actin 基因作为内参基因。

表 2 用于定量 PCR 的引物序列

Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	序列(5'-3') Sequence
CSFV-F	GATCCTCATACTGCCCACTTAC
CSFV-R	GTATACCCCTTACCAGCTTG
β -actin-F	CAAGGACCTCTACGCCAACAC
β -actin-R	TGGAGGCGGATGATCTT
CHC-F	CAGATACCATCCGTCGGTTCC
CHC-R	TGAAGTACCGGCCTACACAGTTC
dynammin-2-F	CACAGAGCAGAGGAACGTCTACAA
dynammin-2-R	CTGGGCTCCATCCTCATTCTC
Rab5-F	CCAAAGAATGAACCACAGAATCC
Rab5-R	TACTACAACACTGACTCCTGGTTGG
Rab7-F	AAGGTGCTCCAGTGGTCTGACTC
Rab7-R	TGAAGGTAGTGGCGTTGGTAACA

1.7 间接免疫荧光检测 (IFA)

细胞单层用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 清洗 3 次, 用 1% Triton X-100 室温穿透 10 min; 5% 脱脂奶粉封闭 6 h, 然后将抗 CSFV 多抗按照 1:100 的比例稀释后孵育过夜; 用 PBS 清洗 3 次

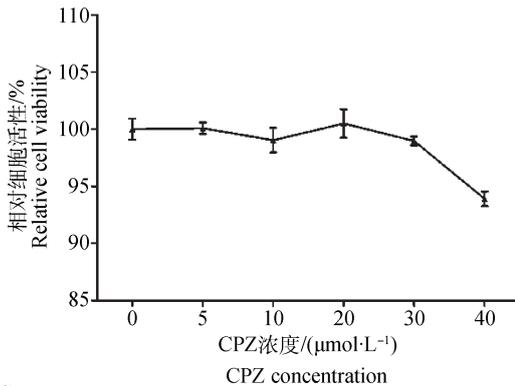
后添加 200 倍稀释的 FITC 标记的兔抗猪 IgG 二抗, 室温孵育 1 h; PBS 清洗后在荧光显微镜下观察。

2 结果

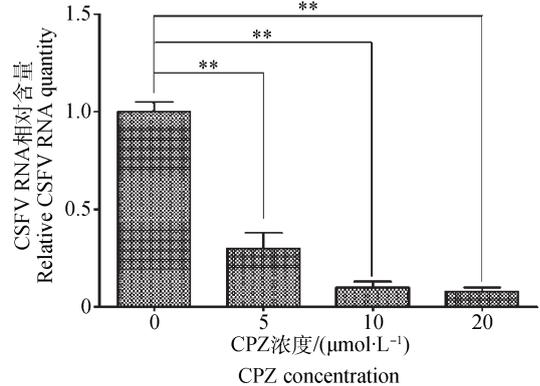
2.1 CPZ 抑制 CSFV 入侵细胞

CPZ 是网格蛋白组装抑制剂。在用于 CSFV 入侵抑制试验之前, 首先检测了 CPZ 的细胞安全浓度。结果发现, CPZ 浓度小于 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞活力没有显著差异, 因此用于后续试验的最大安全浓度设定为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1A)。CSFV 感染 3 h 后收取细胞, 通过 Real-time PCR 检测 CPZ 对 CSFV 入侵细胞的影响。与未用 CPZ 处理过的 ST 细胞相比, CPZ 处理后 CSFV 入侵细胞的效率明显下降。随着 CPZ 处理浓度的增大, 胞内 CSFV 含量下降程度逐步增加, 用 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CPZ 处理细胞后, 进入细胞的 CSFV 下降了约 92% (图 1B)。CSFV 感染后 24 h, 通过 IFA 观测 CPZ 处理对 CSFV 入侵效率的影响。结果显示, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CPZ 处理后 CSFV 感染的细胞数量显著减少 (图 1C)。

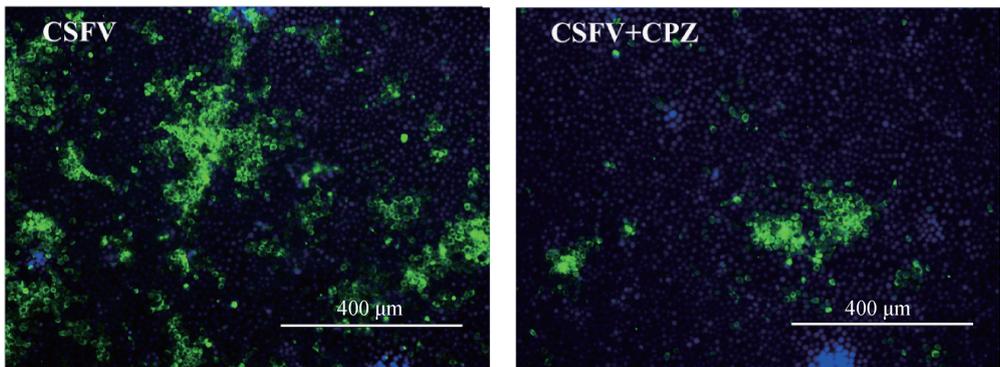
A



B



C



A. 抑制剂 CPZ 在 ST 细胞上的安全浓度检测; B. Real-time PCR 检测不同浓度 CPZ 处理后胞内 CSFV 含量; C. IFA 观测 CPZ 处理后 CSFV 感染细胞的变化; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

A. The safe concentration of CPZ; B. Cellular CSFV RNA in ST cells with or without CPZ treatment; C. CSFV-infected ST cells with or without CPZ treatment was observed by IFA; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

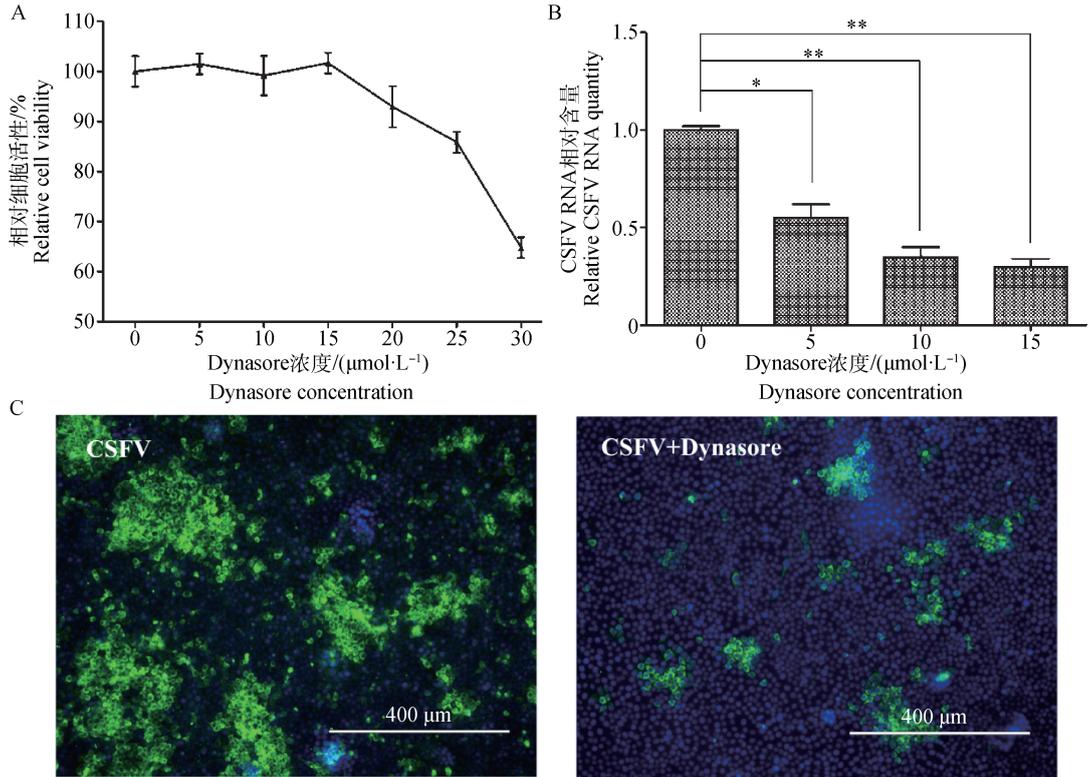
图 1 网格蛋白组装抑制剂 CPZ 对 CSFV 入侵细胞的影响

Fig. 1 Effect of CPZ on CSFV cell entry

2.2 CSFV 细胞入侵过程对 Dynasore 敏感

Dynasore 是动力蛋白的抑制剂。Dynasore 在 ST 细胞上的最大安全浓度为 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2A)。CSFV 在经过 Dynasore 处理后入侵 ST 细胞的效率有所下降,并且随着 Dynasore 添加浓度的增

加下降程度增加。当 Dynasore 使用浓度达到 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞内 CSFV 含量下降到了对照组的 30% (图 2B)。IFA 观测结果显示,Dynasore 的处理对 CSFV 的细胞入侵过程有明显抑制作用(图 2C)。



A. 抑制剂 Dynasore 在 ST 细胞上的安全浓度检测;B. Real-time PCR 检测不同浓度 Dynasore 处理后胞内 CSFV 含量;C. IFA 观测 Dynasore 处理后 CSFV 感染细胞的变化; * . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$

A. The safe concentration of Dynasore;B. Cellular CSFV RNA in ST cells with or without Dynasore treatment;C. CSFV-infected ST cells with or without Dynasore treatment was observed by IFA; * . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$

图 2 动力蛋白抑制剂 Dynasore 对 CSFV 入侵细胞的影响

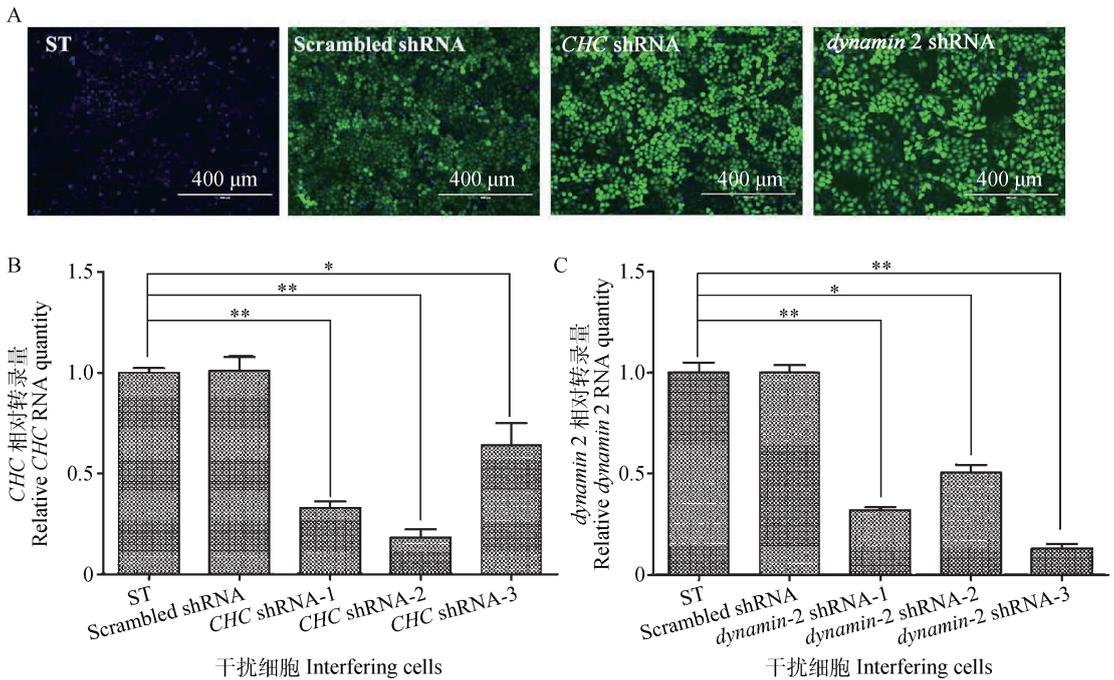
Fig. 2 Effect of Dynasore on CSFV cell entry

2.3 网格蛋白和动力蛋白的下调影响 CSFV 对细胞的入侵

为进一步验证网格蛋白和动力蛋白在 CSFV 入侵中的作用,在抑制剂研究的基础上,通过 shRNA 下调网格蛋白重链(clathrin heavy chain,CHC)和动力蛋白(dynamin-2),进一步检测网格蛋白介导的内吞途径受阻后 CSFV 入侵细胞的效率。首先,构建了针对 CHC 和 dynamin-2 的干扰载体并转染细胞,经嘌呤霉素筛选后进行干扰效率的检测。每个基因针对 3 个靶点设计了 shRNA 载体,随机序列(scrambled shRNA)充当对照组。经过嘌呤霉素筛选,转染干扰载体的阳性细胞达到了 90% 以上(图 3A)。利用 Real-time PCR 对于干扰细胞和空白

细胞中各基因转录情况进行检测,结果显示干扰载体能够有效的下调靶标基因。其中对 CHC 下调最为明显的为 shRNA-2(图 3B),与对照组相比 CHC 转录量下调了约 75%;对 dynamin-2 基因下调最为明显的是 shRNA-3,转录量下调了 80%(图 3C)。而随机序列对 CHC 和 dynamin-2 基因转录量没有显著影响。因此 CHC shRNA-2 和 dynamin-2 shRNA-3 被选择用于后续试验。

将 CSFV 接种于 CHC 和 dynamin-2 干扰细胞上,观测 CHC 和 dynamin-2 转录量下调对 CSFV 入侵细胞是否产生影响。Real-time PCR 检测结果显示,CSFV 对 CHC 干扰细胞的入侵效率与 ST 细胞相比,下降了约 70%,对 dynamin-2 干扰细胞的



A. *CHC* 和 *dynamin-2* shRNA 载体转染筛选后的细胞荧光照片; B. *CHC* 干扰效果检测; C. *dynamin-2* 干扰效果检测; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

A. *CHC* and *dynamin-2* interference cells images; B. Down-regulation effect of *CHC*; C. Down-regulation effect of *dynamin-2*; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

图3 *CHC* 和 *dynamin-2* 干扰细胞系的筛选和检测

Fig.3 Screening and testing of *CHC* and *dynamin-2* shRNA interfering cells

入侵效率下降了约 50%，而对随机序列干扰细胞的入侵效率没有显著差异(图 4A 和 4B)。IFA 试验结果显示,CSFV 感染 ST 细胞和随机干扰细胞的效率显著高于 *CHC* 和 *dynamin-2* 干扰细胞(图 4C)。

2.4 CSFV 建立感染依赖于酸性环境诱导

NH_4Cl 可以用于延缓内含体酸化的过程。CSFV 感染的过程中添加 NH_4Cl 后发现,CSFV 对细胞的感染效率会显著下降。通过 Real-time PCR 检测发现,CSFV 建立感染的效率随着 NH_4Cl 使用浓度的增加而下降,当 NH_4Cl 使用浓度达到 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CSFV 感染效率下降到对照组的 5%(图 5A)。IFA 检测结果显示,与未处理的细胞相比, NH_4Cl 处理后 CSFV 感染的细胞数量显著减少(图 5B)。

2.5 CSFV 感染细胞依赖于 Rab5 和 Rab7 蛋白

Rab5 和 Rab7 蛋白分别是初级内体和次级内体的标志蛋白质。试验针对 *Rab5* 和 *Rab7* 基因分别设计了 3 个干扰载体,并通过转染和筛选建立了干扰细胞系(图 6A)。通过检测发现,针对于 *Rab5* 基因的 3 个干扰载体中,shRNA-1 下调效果最为明显,与对照组相比 *Rab5* 转录量下调约 65%;针对于

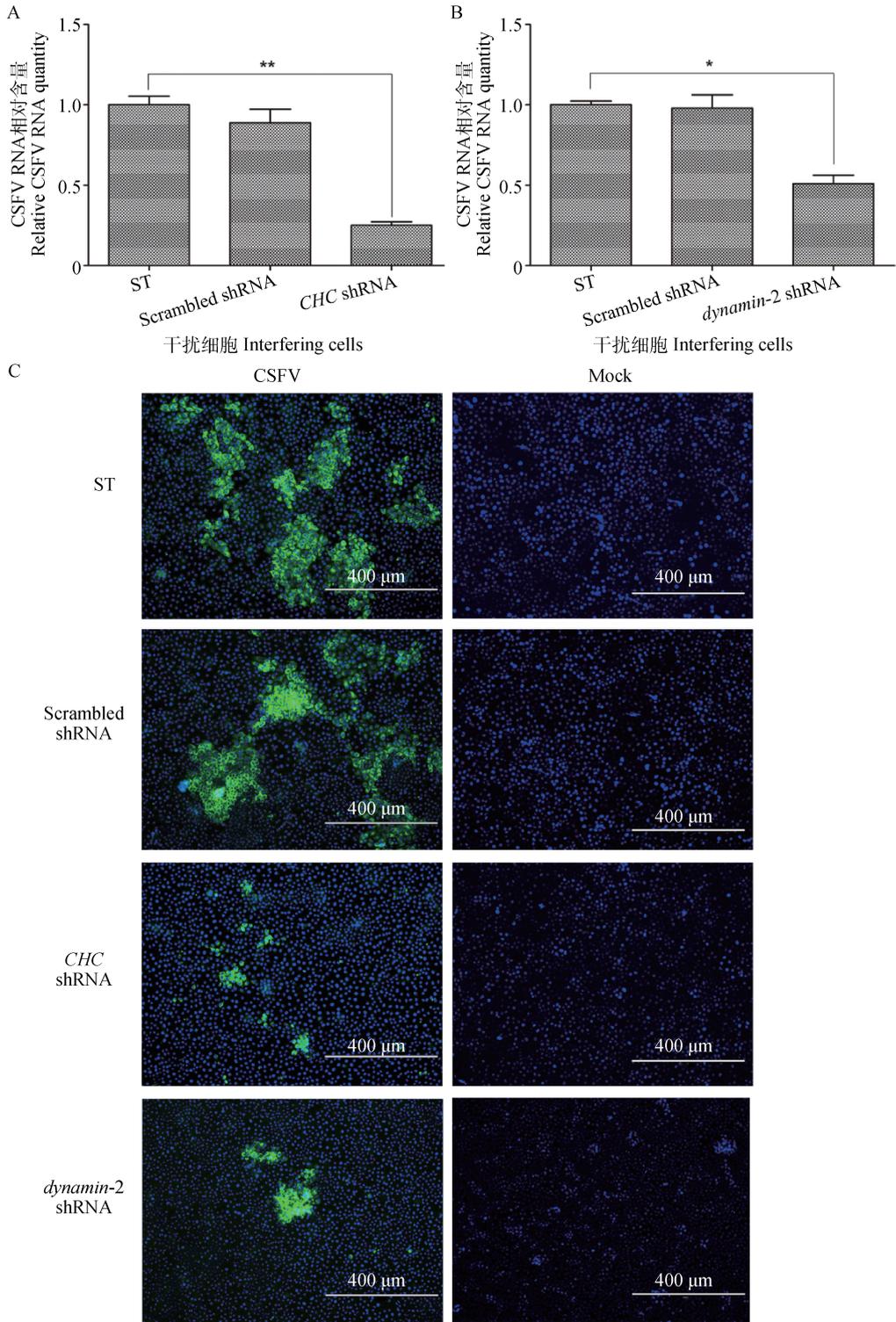
Rab7 基因 3 个干扰载体中,shRNA-3 下调其 70% 的转录量,效果最为显著(图 6B 和 6C)。因此选择 *Rab5* shRNA-1 和 *Rab7* shRNA-3 用于后续试验。

将 CSFV 接种于 *Rab5* 和 *Rab7* 干扰细胞,对比检测 CSFV 感染细胞的效率。Real-time PCR 检测发现,*Rab5* 和 *Rab7* 基因转录下调后,CSFV 对细胞的感染效率有所下降,在 *Rab5* 干扰细胞上 CSFV 细胞感染效率约为对照组的 45%,而在 *Rab7* 干扰细胞上 CSFV 细胞感染效率为对照组的 30%(图 7A 和 7B)。IFA 检测发现,CSFV 感染 *Rab5* 和 *Rab7* 干扰细胞的效率与对照组相比有显著下降(图 7C)。

3 讨论

网格蛋白介导的内吞是将外源物质从细胞膜递送到内体中的一类受体介导的吞噬反应,被诸多病毒所利用来完成细胞入侵过程,如流感病毒^[9]、丙型肝炎病毒(HCV)^[10]、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)^[11]等。CSFV 入侵细胞的过程还尚未知晓,本研究对 CSFV 利用网格蛋白介导的内吞途径入侵细胞进行了研究。

氯丙嗪能够有效抑制网格蛋白的组装,在网格

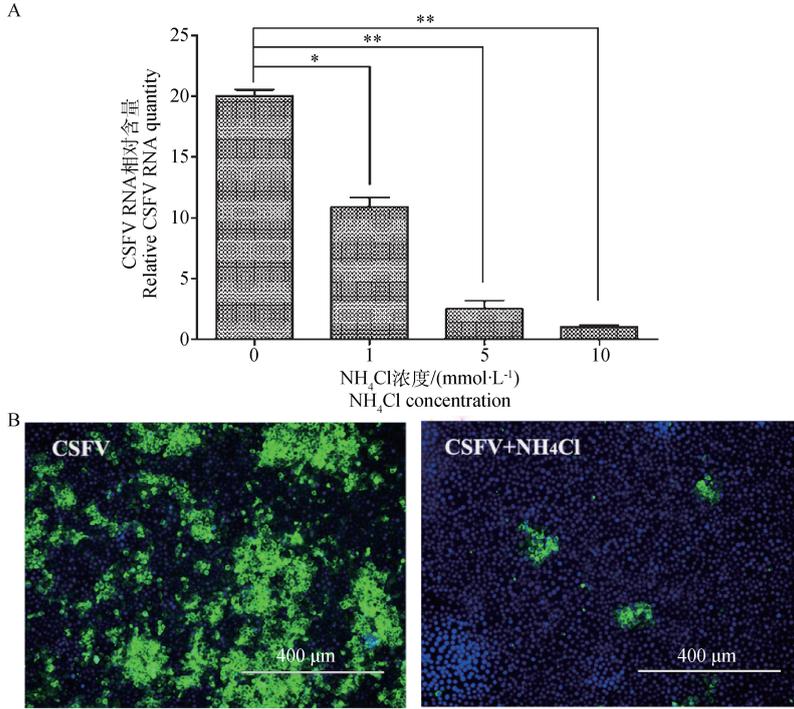


A. CSFV 对 *CHC* 干扰细胞入侵效率的检测; B. CSFV 对 *dynamin-2* 干扰细胞入侵效率的检测; C. IFA 检测 CSFV 对 ST 细胞、随机干扰细胞、*CHC* 和 *dynamin-2* 干扰细胞的感染效率; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

A. Cell entry efficiency of CSFV in *CHC* shRNA interfering cells; B. Cell entry efficiency of CSFV in *dynamin-2* shRNA interfering cells; C. IFA observation of CSFV-infected ST cells, scrambled shRNA transfected cells, and *CHC* or *dynamin-2* down-regulation cells; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

图 4 CSFV 对 *CHC* 和 *dynamin-2* 干扰细胞入侵效率的检测

Fig. 4 CSFV cell entry in *CHC* and *dynamin-2* shRNA interference cells

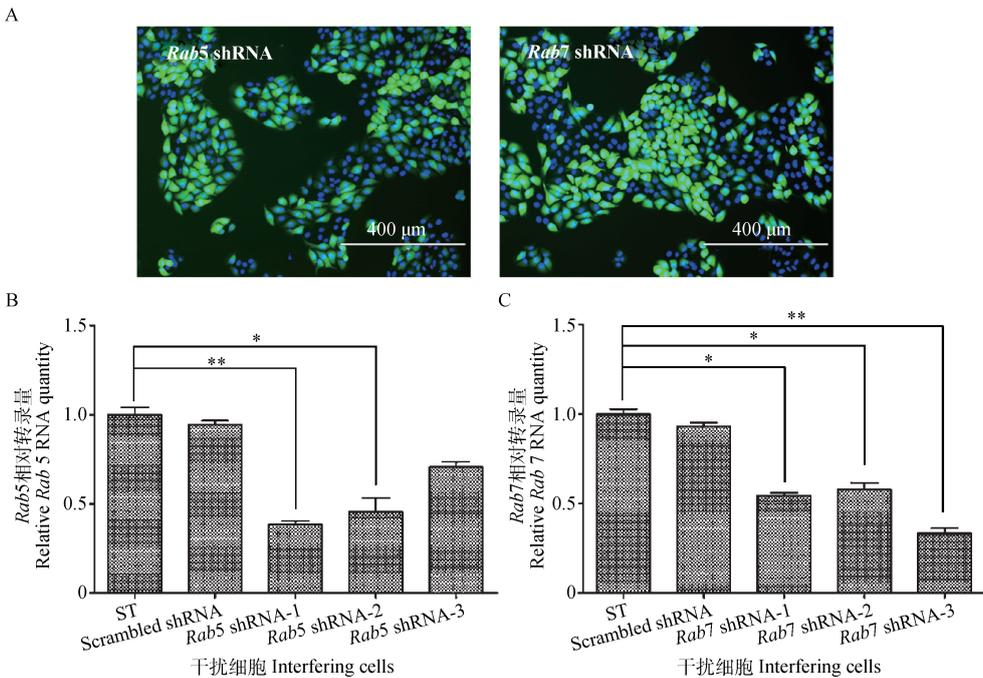


A. Real-time PCR 检测不同浓度 NH₄Cl 处理后胞内 CSFV RNA 含量; B. IFA 观测 NH₄Cl 处理后 CSFV 感染细胞的变化; *, P < 0.05, **, P < 0.01

A. Cellular CSFV RNA in ST cells with or without NH₄Cl treatment; B. CSFV-infected ST cells with or without NH₄Cl treatment (observed by IFA); *, P < 0.05, **, P < 0.01

图 5 NH₄Cl 对 CSFV 入侵的影响

Fig. 5 Effect of NH₄Cl on CSFV cell entry

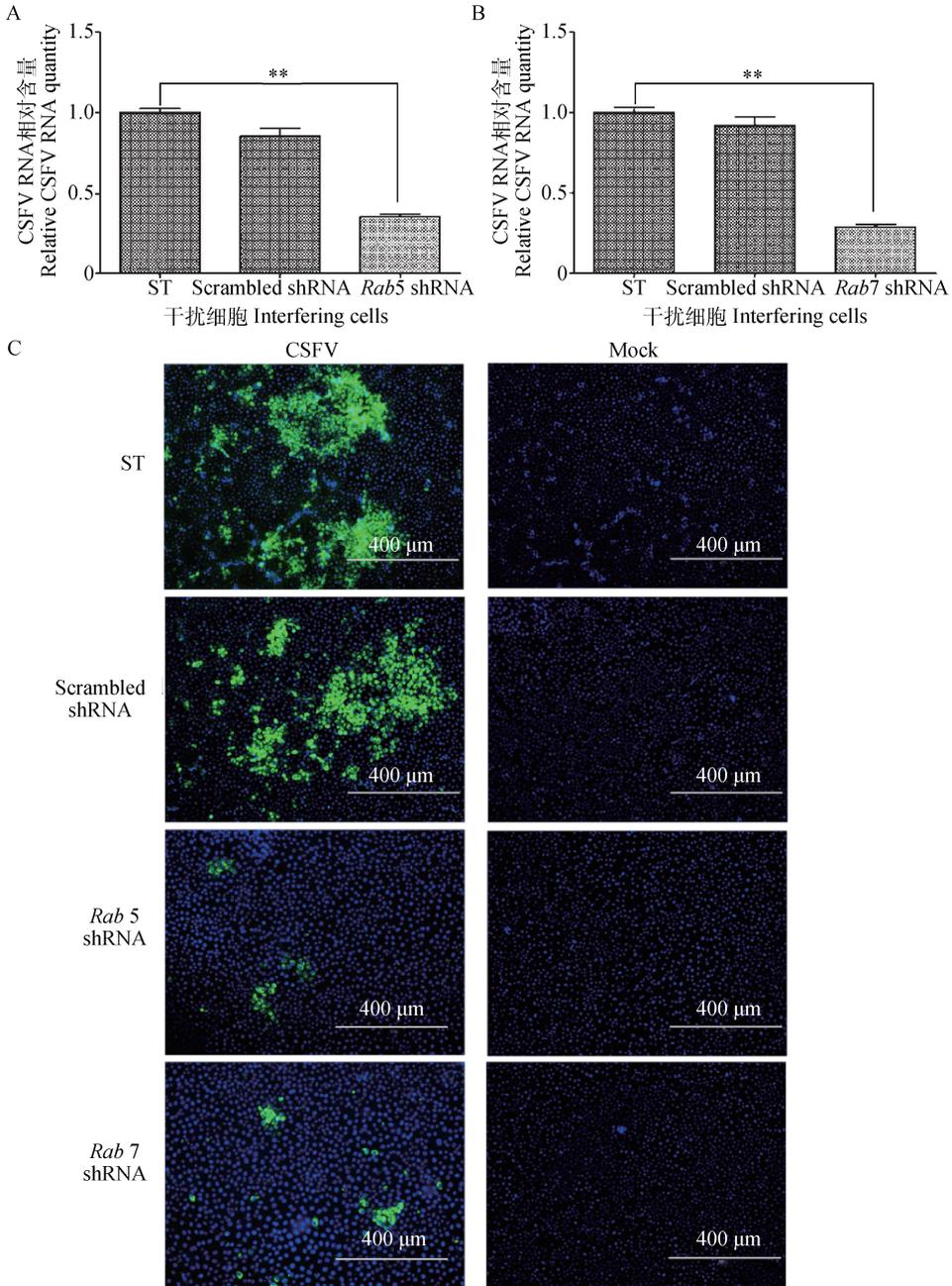


A. Rab5 和 Rab7 shRNA 载体转染筛选后的细胞荧光照片; B. Rab5 干扰效果检测; C. Rab7 干扰效果检测; *, P < 0.05, **, P < 0.01

A. Rab5 and Rab7 interference cells images; B. Down-regulation effect of Rab5; C. Down-regulation effect of Rab7; *, P < 0.05, **, P < 0.01

图 6 Rab5 和 Rab7 干扰细胞系的筛选和检测

Fig. 6 Screening and testing of Rab5 and Rab7 shRNA interfering cells



A. CSFV 对 *Rab5* 干扰细胞感染效率的检测; B. CSFV 对 *Rab7* 干扰细胞感染效率的检测; C. CSFV 对 ST 细胞、随机干扰细胞、*Rab5* 和 *Rab7* 干扰细胞感染效率的 IFA 观测; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

A. Cell infection efficiency of CSFV in *Rab5* shRNA interfering cells; B. Cell infection efficiency of CSFV in *Rab7* shRNA interfering cells; C. IFA observation of CSFV-infected ST cells, scrambled shRNA transfected cells, and *Rab5* or *Rab7* down-regulation cells; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

图 7 CSFV 对 *Rab5* 和 *Rab7* 干扰细胞感染效率的检测

Fig. 7 CSFV cell entry in *Rab5* and *Rab7* shRNA interference cells

蛋白介导的内吞研究中被广泛应用^[12]。本研究发现,当在 CSFV 入侵过程中添加氯丙嗪后,CSFV 入侵的效率会显著下降。Dynasore 是针对于动力蛋白的一种特异性抑制剂^[13]。通过使用 Dynasore 对 *dynamain-2* 抑制后,CSFV 对细胞的入侵效率也发

生了明显的下降。这些结果提示,网格蛋白和动力蛋白在 CSFV 入侵过程中可能发挥了重要的作用。为进一步验证此结果,本研究利用 shRNA 干扰的方法,下调了细胞内网格蛋白重链和动力蛋白的转录量,观察 CSFV 入侵的效率是否发生变化。结果

显示,CSFV对网格蛋白重链和动力蛋白转录量下调细胞的入侵效率显著低于对照组细胞,进一步证明CSFV能够利用网格蛋白介导的内吞途径完成对细胞的入侵。

网格蛋白介导的内吞途径会将吞噬物传递给内体^[14]。内体是膜包裹的囊泡结构,可以分为初级内体(early endosome)和次级内体(late endosome),初级内体向次级内体成熟的过程中伴随着内部环境的不断酸化。诸多病毒利用了内体不断酸化的特征,诱发病毒逃逸出囊泡,从而完成感染的过程^[7]。为验证CSFV建立感染是否也利用的这一酸化过程,笔者首先用NH₄Cl处理细胞来抑制CSFV感染过程中内体的酸化过程。通过检测细胞内CSFV的含量发现,经过NH₄Cl处理的细胞,CSFV感染效率会发生明显下降,初步说明CSFV建立感染的过程依赖于酸性环境。不同病毒对于内体的依赖性有所差异。HCV的病毒囊膜与初级内体融合,释放出核衣壳^[10]。而流感病毒则需要经历次级内体结构,进而完成感染过程^[15]。为进一步研究CSFV入侵需要依赖哪种内体结构,本试验对初级内体标志蛋白Rab5^[16]和次级内体标志蛋白Rab7^[17]在CSFV感染建立中的作用做了初步研究。通过shRNA干扰的方式得到了猪Rab5和Rab7基因转录下调的细胞株。通过对比检测CSFV在ST细胞和Rab5和Rab7干扰细胞上的感染效率发现,当Rab5和Rab7基因转录量下调后,CSFV的感染效率都显著下降,说明CSFV建立感染利用了初级内体和次级内体这两种细胞结构。

CSFV建立感染是一个细致而复杂的过程。诸多病毒会利用多种入侵方式感染易感细胞,或者针对于不同细胞有着不同的入侵策略。那么CSFV是否还利用了其他方式入侵细胞?对不同细胞CSFV是否采用了不同的入侵策略?在次级内体之后,CSFV在细胞内又经历了怎样的过程才能建立感染?这些问题的阐释对于进一步了解CSFV的感染过程有重要的意义,需要进一步研究探索。

4 结论

CSFV能够利用网格蛋白介导的内吞途径入侵细胞,感染建立过程依赖于酸性环境诱导。Rab5和Rab7对于CSFV感染建立至关重要。

参考文献(References):

[1] MÁ S V, MELERO J A. Entry of enveloped viruses

into host cells: membrane fusion[J]. *Subcell Biochem*, 2013, 68:467-487.

- [2] PERRET E, LAKKARAJU A, DEBORDE S, et al. Evolving endosomes: how many varieties and why? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(4):423-434.
- [3] SIECZKARSKI S B, WHITTAKER G R. Dissecting virus entry via endocytosis[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt7):1535-1545.
- [4] COSSART P, HELENIUS A. Endocytosis of viruses and bacteria[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(8). pii: a016972.
- [5] CHENG C Y, SHIH W L, HUANG W R, et al. Bovine ephemeral fever virus uses a clathrin-mediated and dynamin 2-dependent endocytosis pathway that requires Rab5 and Rab7 as well as microtubules [J]. *J Virol*, 2012, 86(24):13653-13661.
- [6] SUN Y, TIEN P. From endocytosis to membrane fusion: emerging roles of dynamin in virus entry[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2013, 39(2):166-179.
- [7] WHITE J M, WHITTAKER G R. Fusion of enveloped viruses in endosomes [J]. *Traffic*, 2016, 17(6):593-614.
- [8] JI W, GUO Z, DING N Z, et al. Studying classical swine fever virus: Making the best of a bad virus [J]. *Virus Res*, 2015, 197:35-47.
- [9] EDINGER T O, POHL M O, STERTZ S. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets [J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt2):263-277.
- [10] PLOSS A, EVANS MJ. Hepatitis C virus host cell entry [J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(1):14-19.
- [11] LECOT S, BELOUZARD S, DUBUISSON J, et al. Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis [J]. *J Virol*, 2005, 79(16):10826-10829.
- [12] HUANG W R, WANG Y C, CHI P I, et al. Cell entry of avian reovirus follows a caveolin-1-mediated and dynamin-2-dependent endocytic pathway that requires activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Src signaling pathways as well as microtubules and small GTPase Rab5 protein [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(35):30780-30794.
- [13] KIRCHHAUSEN T, MACIA E, PELISH H E. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis [J]. *Methods Enzymol*, 2008, 438:77-93.
- [14] SLO NSKA A, CYMERYS J, BA NBURA M W. Mechanisms of endocytosis utilized by viruses during

- infection [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016, 70:572-580.
- [15] SIECZKARSKI S B, WHITTAKER G R. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses [J]. *Traffic* 2003, 4(5):333-343.
- [16] GIMENEZ M C, RODRÍGUEI AGUIRRE J F, COLOMBO M I, et al. Infectious bursal disease virus uptake involves macropinocytosis and trafficking to early endosomes in a Rab5-dependent manner [J]. *Cell Microbiol*, 2015, 17(7):988-1007.
- [17] YIN X, AMBARDEKAR C, LU Y, et al. Distinct entry mechanisms for non-enveloped and quasi-enveloped hepatitis E viruses[J]. *J Virol*, 2016, 90(8):4232-4242.

(编辑 白永平)