



猪丁型冠状病毒拮抗细胞焦亡的研究进展

孔令贺, 刘茜倩, 马婧姣, 孙建和, 严亚贤*

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

孔令贺, 刘茜倩, 马婧姣, 孙建和, 严亚贤. 猪丁型冠状病毒拮抗细胞焦亡的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4011-4021.
KONG Linghe, LIU Xiqian, MA Jingjiao, SUN Jianhe, YAN Yaxian. Antagonism of pyroptosis by porcine deltacoronavirus: a review[J].
Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4011-4021.

摘要: 猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种新发现的猪肠道致病性病毒, 呈现全球流行趋势, 能够引起仔猪腹泻、呕吐、脱水, 给养猪业带来重大的经济损失。该病毒具有跨种传播特征, 能够感染人类和养殖动物, 对动物和人类的健康存在一定的威胁。细胞焦亡是由 Gasdermin 家族蛋白介导的细胞程序性死亡, 在病原感染过程中发挥防御和清除的作用。冠状病毒在长期的进化过程中形成了拮抗焦亡逃逸宿主天然免疫反应的策略。本文对 PDCoV 的主要生物学特征、细胞焦亡的过程以及 PDCoV 对 Gasdermin D 介导的细胞焦亡的拮抗作用进行综述, 为深入了解 PDCoV 拮抗宿主免疫反应的机制以及防控 PDCoV 的感染提供一定的理论支撑。

关键词: 猪丁型冠状病毒; 焦亡; Gasdermin D (GSDMD); 免疫逃避

Antagonism of pyroptosis by porcine deltacoronavirus: a review

KONG Linghe, LIU Xiqian, MA Jingjiao, SUN Jianhe, YAN Yaxian*

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

Abstract: Porcine deltacoronavirus (PDCoV), an emerging virus globally prevalent, causes watery diarrhea, vomiting, and dehydration of newborn piglets, posing severe economic losses in the swine

资助项目: 上海市农业科技创新项目(K2023011); 国家自然科学基金(32373021)

This work was supported by the Shanghai Agricultural Science and Technology Innovation Program (K2023011) and the National Natural Science Foundation of China (32373021).

*Corresponding author. E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

Received: 2024-04-10; Accepted: 2024-09-04; Published online: 2024-09-05

industry. Moreover, with the characteristic of cross-species transmission, PDCoV can infect human and farmed animals, posing a serious threat to human health. Pyroptosis is a form of programmed cell death mediated by members of the Gasdermin family, which plays a role in defending and eliminating viruses. Coronaviruses, however, have developed precise strategies to antagonize pyroptosis and evade immune responses. This review expounds the biological characteristics of PDCoV, the process of pyroptosis, and the antagonism of Gasdermin D-mediated pyroptosis by PDCoV, aiming to enrich the knowledge about the antagonism of immune responses by PDCoV and lay a theoretical foundation for the prevention and control of this virus.

Keywords: porcine deltacoronavirus; pyroptosis; Gasdermin D (GSDMD); immune escape

冠状病毒(coronavir, CoV)是一类有囊膜的单股正链 RNA 病毒,是目前已知的含有最长基因组序列的 RNA 病毒,已在全球范围内流行,对人类和动物的生命安全造成极大威胁^[1]。根据国际病毒分类命名委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)的分类,冠状病毒属于套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒亚科(Coronavirinae),冠状病毒亚科主要分为 Alphacoronavirus (α CoV)、Betacoronavirus (β CoV)、Gammacoronavirus (γ CoV)以及 Deltacoronavirus (δ CoV) 4 个属^[2]。猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)属于 δ 冠状病毒,是一类猪肠道致病性冠状病毒,可感染不同年龄段的猪,导致哺乳期仔猪死亡率较高^[3]。PDCoV 可以单独感染宿主,也存在与其他猪肠道病毒对宿主产生混合感染的情况^[4]。

细胞焦亡是一类由 Gasdermin (GSDM)家族蛋白介导的程序性细胞死亡,宿主细胞识别病原或者其他刺激信号时, Gasdermin 家族蛋白通过切割解除自抑制状态,在细胞膜上形成寡聚体孔道诱导细胞死亡,同时释放大量炎症因子,促进机体对病原的清除^[5-7]。病原体为促进自身的感染与增殖,进化出了抑制细胞焦亡的功能,逃逸宿主的天然免疫;冠状病毒基因组编码多种结构蛋白、非结构蛋白和辅助蛋白,某些非结构蛋白具有酶的活性,存在抑制宿主天然免疫的功

能^[8]。本文从 PDCoV 非结构蛋白对宿主细胞焦亡通路关键蛋白的相互作用展开论述,为今后深入了解 PDCoV 拮抗宿主免疫反应以及开发有效防控 PDCoV 的疫苗和药物提供理论支撑。

1 猪丁型冠状病毒感染特性

PDCoV 呈现全球性流行的趋势,极大地影响了养猪产业的发展。2012 年, Woo 等在中国香港首次在猪的肠道内检测到 PDCoV^[9]。2014 年,美国、韩国及加拿大相继报道检测出 PDCoV^[4,10-12]。目前中国已有多个省份相继检测到此病毒,本课题组纪立凯等成功分离到上海地区的流行毒株^[13]。2021 年,首次在患病儿童血浆样品中检测到 PDCoV^[14],表明该病毒具有跨物种传播的特征。PDCoV 是一类猪肠道致病性病毒,主要通过粪-口传播,引起小肠绒毛脱落、萎缩,造成仔猪腹泻、呕吐、脱水,对仔猪的生存有较大的威胁。成年猪感染 PDCoV 后,临床症状相对于仔猪较轻^[15-16]。PDCoV 是单股正链有囊膜的 RNA 病毒,其亚显微结构呈现球状或椭圆状,外膜有凸起,整体结构呈现为冠状病毒典型的“皇冠”状。PDCoV 的基因组约为 25.4 kb,其基因组包括 5'非编码区(untranslated region, UTR)、开放阅读框 1a/1b、病毒结构蛋白(nucleocapsid, envelope protein, membrane protein, spike protein)基因、辅助蛋白以及 3'非编码区^[17-18]。其中 1a 和

1b 编码的多聚蛋白 pp1a 和 pp1b 可以被加工成 15 个非结构蛋白(nonstructural proteins, Nsps)^[19-20]。基因组编码的蛋白在病毒的复制和拮抗宿主免疫反应中发挥重要的功能。

病毒受体的相关研究对于病毒感染及跨种传播非常重要。研究表明氨基肽酶 N (aminopeptidase N, APN)能够与冠状病毒 S 蛋白结合,介导病毒感染细胞^[21]。然而 APN 在 PDCoV 感染宿主过程中的作用仍处于研究阶段^[22-23]。Zhu 等研究发现,使用 APN 特异性抗体处理回肠细胞系 IPI-2I 后能够抑制 PDCoV 的感染;使用 APN 抑制剂处理细胞后,发现 APN 的酶活性不影响 PDCoV 的感染,其表位构象与 PDCoV 的感染有关;通过构建猪 APN 敲除的回肠细胞系 IPI-2I 发现,APN 敲除后不能完全阻断 PDCoV 的感染,但能够影响病毒的复制^[24]。因此 APN 并非 PDCoV 感染的唯一受体,关于 PDCoV 受体的工作仍需要进一步开展。

纪立凯^[25]发现,PDCoV 具有体外感染猪源、鸡源和人源细胞系的能力。瞿欢等^[26]发现,PDCoV 在感染猪源细胞 LLC-PK1、PK15、ST、PAM 和猴源细胞 Vero 后能出现明显的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),在 LLC-PK1、PK15 和 ST 细胞中能够持续传代,此外,还能够感染猪源 ZYM-SIEC02、禽源 DEF、猴源 Marc-145 和人源 HEK-293 细胞,但是不能持续传代。Fang 等^[27]研究证明,PDCoV 能够感染人源 A549、猪源 IPAM、牛源 MDBK 和猴源 Vero 细胞。这些结果表明 PDCoV 可以在体外感染不同物种的细胞,存在跨种传播的危险。

2 细胞焦亡的基本特征

细胞焦亡是由 Gasdermin 家族蛋白介导的程序性细胞死亡。GSDM 家族目前已经报道了 GSDMA、GSDMB、GSDMC、GSDMD、GSDME

(DFNA5)、DFNB59 (pejvakin)等 6 种分子,它们在机体内分布于多个组织^[28-29]。除了 DFNB59 外,均包含 GSDM N 端成孔区域(GSDM N terminal pore forming fragment, GSDM-NF)和 GSDM C 端的抑制区域(GSDM C terminal repressor fragment, GSDM-CF),在生理状态下处于自抑制状态^[30]。Gasdermin D (GSDMD)是首个被发现的焦亡执行蛋白。

焦亡起初是在鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)感染的巨噬细胞中发现的^[31],依赖于 caspase-1 同时伴随 IL-1 β 和 IL-18 炎症因子的释放^[32]。进一步的研究发现,焦亡由病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)和损伤相关的分子模式(danger-associated molecular patterns, DAMPs)引发,PAMPs 和 DAMPs 由模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别后,形成由活化后的 caspase-1 组成的炎症小体复合物^[33]。除了 PRR 引起的 caspase-1 炎症小体的组装之外,人源的 caspase-4/5 以及鼠源的 caspase-11 能够直接作为 PRR 和效应蛋白结合胞内的脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)进而被活化^[5-6]。当焦亡启动时,活化后的 caspase 能够切割 GSDMD,去掉 GSDMD C 端的抑制区域,使其由自抑制状态变为活化状态。活化后的 GSDMD N 端成孔区域(GSDMD N terminal pore forming fragment, GSDMD-NF)暴露出碱性氨基酸位点,该位点与磷酸肌醇磷酸盐(phosphoinositide phosphates)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)、磷脂酸(phosphatidic acid)和心磷脂(cardiolipin)等酸性磷脂结合,促进 GSDMD-NF 募集到含有这些磷脂的细胞膜,形成寡聚体孔道^[34-36]。孔道的直径为 18-22 nm,由 31-34 个 GSDMD-NF 组成,最终导致细胞膜快速出现损伤,释放出胞内的 DAMPs 以及炎症因子^[5-7,37-39](图 1)。

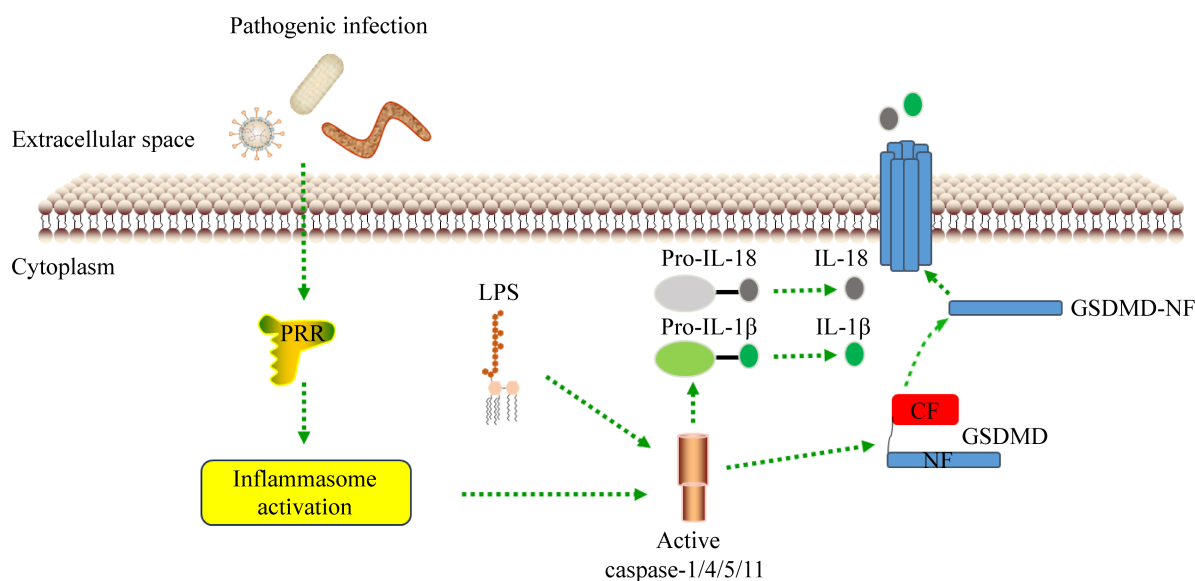


图1 GSDMD 介导的细胞焦亡

Figure 1 GSDMD-mediated pyroptosis. Active caspase-1/4/5/11: Active cysteinyl aspartate specific proteinase-1/4/5/11; GSDMD-NF: GSDMD-N-terminal pore-forming fragment; NF: N-terminal pore-forming fragment; CF: C-terminal repressor fragment; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-18: Interleukin-18; LPS: Lipopolysaccharide; Pro-IL-1 β : Pro-interleukin-1 β ; Pro-IL-18: Pro-interleukin-18; PRR: Pattern recognition receptor.

3 PDCoV 拮抗细胞焦亡

细胞焦亡是宿主天然免疫过程的重要组成部分，有助于清除病原感染的细胞，减少病原体在胞内的存活与增殖，抵御病原微生物对机体的伤害^[40]。GSDMD 在小肠中具有较高的表达水平^[41]。猪 GSDMD 介导的细胞焦亡研究目前处于起步阶段。Song 等研究发现猪的 GSDMD 是 caspase-1 的底物，介导细胞焦亡^[42]。随后，Song 等以及 Yang 等分别制备了猪 GSDMD 的抗体，探究了猪 GSDMD 在不同组织和细胞中的表达情况，为研究猪 GSDMD 介导的细胞焦亡提供了有效的工具和基础信息^[43-44]。猪的 GSDMD 在病毒感染过程中发挥着重要的作用。研究表明，猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染猪肺泡巨噬细胞后能够活化 NOD 样受体家族核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NOD-like receptor

thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体，引起 GSDMD 依赖的细胞焦亡和 IL-1 β 的分泌^[45]；猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)感染猪空肠细胞后能够显著诱导 NLRP3 依赖的 IL-1 β 的分泌以及 GSDMD 的活化^[46]；猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)感染单核细胞后能够诱导 caspase 1 介导的 IL-1 β 的表达和加工，并且诱导 GSDMD 的活化^[47]；伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)在感染猪肺泡巨噬细胞后能够引起 GSDMD 介导的焦亡，进而导致 IL-1 β 和 LDH 的释放^[48]。另外，猪 GSDMD 能够促进抗病毒 IFN- β 通过非经典途径释放，增强干扰素刺激基因的应答抑制冠状病毒的感染，发挥抗病毒的功能^[49]。

冠状病毒的宿主类型较为广泛，主要对呼吸系统和胃肠消化系统造成损伤，新型冠状病毒(SARS-CoV-2)主要引起呼吸系统疾病，造成

肺炎等多脏器损伤^[50];猪肠道冠状病毒 PDCoV、TGEV 以及猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)主要感染猪小肠上皮,对新生仔猪产生较高的发病率和死亡率,对养猪产业产生重大的影响^[51]。在感染与免疫的过程中,冠状病毒进化出了多种策略来逃避宿主的免疫反应,应对 GSDMD 介导的焦亡^[40]。根据目前的报道, PDCoV 可能通过抑制上游核因子 κ B (nuclearfactor- κ B, NF- κ B)转录因子的活性在转录水平影响炎症小体的激活,从而拮抗 GSDMD 介导的焦亡;此外, PDCoV 编码的病毒蛋白能够在蛋白水平对 GSDMD 产生直接作用,进而拮抗焦亡的发生。目前 PDCoV 与 GSDMD 的研究相对有限,需要进一步深入研究。

3.1 PDCoV 通过抑制 NF- κ B 信号拮抗焦亡

GSDMD 介导的细胞焦亡经典通路依赖于 NLRP3 炎症小体的激活。NF- κ B 是 NLRP3 炎症小体组分的重要转录因子^[52]。病毒通过抑制 NF- κ B 转录因子的活化对 NLRP3 炎症小体-GSDMD 介导的细胞焦亡也会产生一定程度的抑制作用。研究表明, PDCoV 感染后不激活 NF- κ B 启动子的活性,显著抑制仙台病毒(Sendai virus, SeV)诱导的 NF- κ B 启动子的活性,并在一定程度上抑制 poly(I:C)诱导的 NF- κ B 启动子的活性^[53]。PDCoV 非结构蛋白 5 (nonstructural protein 5, Nsp5)能够在谷氨酰胺 231 (Q231)位点切割 NF- κ B 信号的重要调节因子 NF- κ B 必需调节剂(NF- κ B essential modifier, NEMO),抑制 NF- κ B 信号(图 2)^[54]。此外,有研究报道 PDCoV Nsp15 能够通过不依赖核糖核酸内切酶活性的方式影响 NF- κ B 的活化(图 2)^[55]。这表明 PDCoV 的非结构蛋白能够在转录水平影响 NLRP3 炎症小体的激活,通过影响上游信号的激活来抑制 GSDMD 介导的焦亡。

3.2 PDCoV Nsp5 切割 GSDMD 抑制焦亡

Ma 等^[56]研究表明, SARS-CoV-2 病毒的 N 蛋白能够高效地结合 GSDMD-NF 和 GSDM-CF 的连接区域,阻碍 GSDMD 解除自抑制状态,抑制 GSDMD 介导的焦亡和细胞因子的释放。TGEV 的 3C 样蛋白酶(Nsp5)能够切割 GSDMD 并形成无功能的 N 端片段,抑制焦亡^[40]。此外, Shi 等^[57]的研究表明, SARS-CoV-2、MERS CoV 和 PEDV 的 Nsp5 能够在猪 GSDMD 的 Q193-G194 区域将 GSDMD 切割成 2 个片段,其中 N 端的片段不能诱导焦亡,同时 2 个片段均不影响 PEDV 的复制, PEDV 能够利用 Nsp5-GSDMD 途径抑制细胞焦亡。

PDCoV 作为目前唯一一种感染非禽类且能在体外培养的 δ 冠状病毒,研究其与宿主的互动,了解其在感染宿主过程中对免疫反应的逃避策略对研发相应的保护性疫苗,高效防控 PDCoV 具有重要意义。研究表明, PDCoV 的 Nsp5 与 SARS-CoV-2、MERS CoV 2 和 PEDV 在序列上具有较高的相似性,催化结构域较为保守,表明功能上具有相似性^[57]。PDCoV Nsp5 能够将猪源的 GSDMD 切割形成无功能的片段,将猪 GSDMD 193 位的氨基酸 Q 突变为 A 后, Nsp5 无法切割 GSDMD,表明猪 GSDMD 的 Q193 是 PDCoV Nsp5 重要的识别位点^[57]。冠状病毒的 Nsp5 的组氨酸(His, H)和半胱氨酸(Cys, C)残基对其催化活性起到关键作用(PDCoV H41/C144、SARS-CoV-2 H41/C145、MERS CoV H41/C148、PEDV H41/C144)^[58-60]。分别将 PDCoV Nsp5 组氨酸和半胱氨酸突变后(H41A 和 C144A),其催化活性消失,不能够切割猪的 GSDMD^[57]。这表明 PDCoV 的非结构蛋白能够在蛋白水平对 GSDMD 产生直接切割作用,使其失活,拮抗细胞焦亡的发生(图 3)。本课题组研究发现 PDCoV 感染细胞后,会导致 GSDMD 在转录水

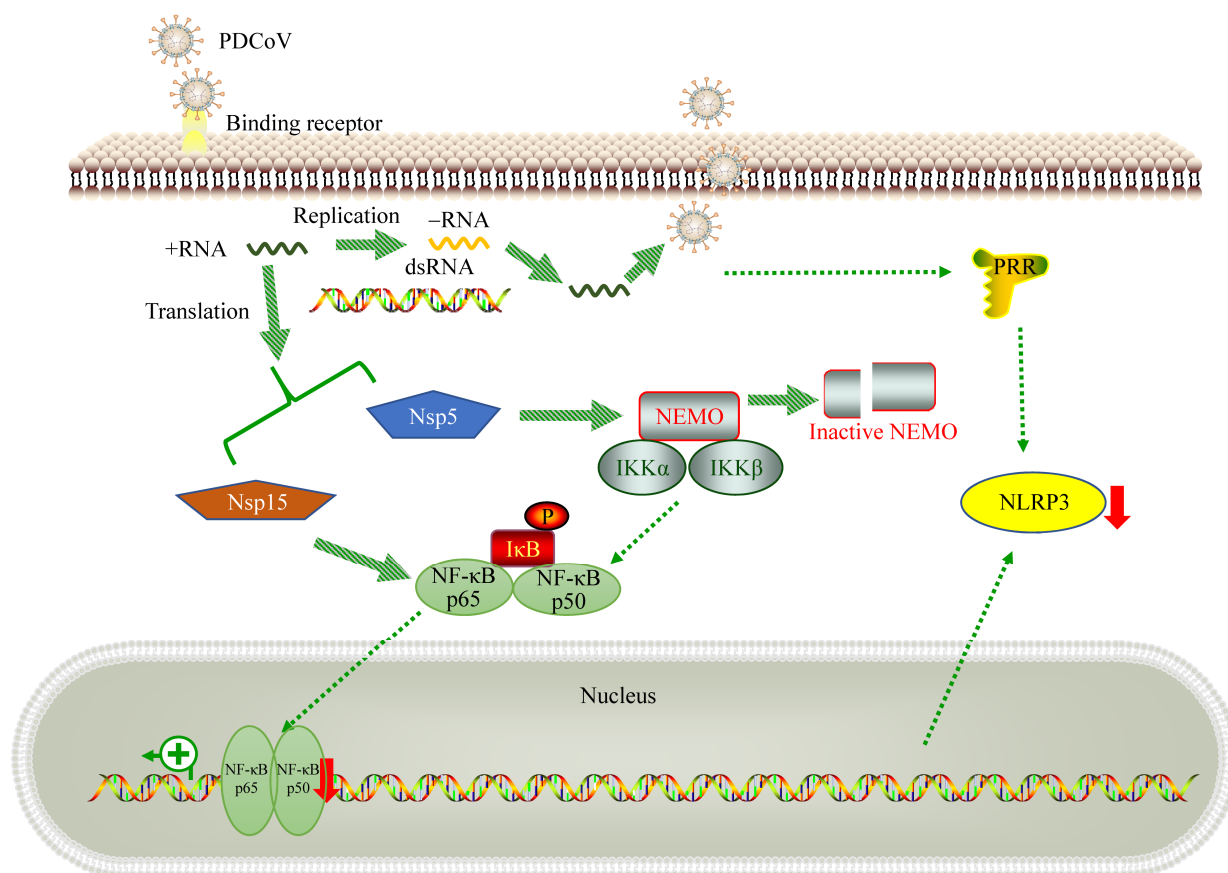


图2 PDCoV Nsp5 和 Nsp15 抑制 NF-κB 活化的作用机制

Figure 2 Mechanistic diagram of inhibiting the activation of NF-κB by PDCoV Nsp5 and Nsp15. dsRNA: Double-stranded RNA; +RNA: + sense RNA; -RNA: - sense RNA; Inactive NEMO: Inactive NF-κB essential modulator; NEMO: NF-κB essential modulator; IKKα: IκB kinase α; IKKβ: IκB kinase β; IκB: inhibitor of κB; NF-κB p65: Nuclear factor κB p65; NF-κB p50: Nuclear factor κB p50; NLRP3: NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; Nsp5: Nonstructural protein 5; Nsp15: Nonstructural protein 15; P: Phosphorylation; PDCoV: Porcine deltacoronavirus; PRR: Pattern recognition receptor.

平表达下调,同时也出现蛋白水平表达下调(未发表),表明 PDCoV 编码的蛋白可能抑制 GSDMD 的表达或者降解 GSDMD。

3.3 PDCoV 抑制焦亡的其他方式

病原抑制细胞焦亡的方式主要有逃逸炎症小体的识别、抑制炎症小体组装活化、抑制 caspase 的活性、抑制 GSDM 的活化以及抑制 GSDM-NF 形成寡聚体孔道^[61]。翻译后的修饰对 GSDMD 的活化有重要的调控作用^[38],病毒有可能通过调控 GSDMD 翻译后的修饰影响细胞

焦亡。目前关于 PDCoV 抑制细胞焦亡的报道相对有限,其基因组编码的其他蛋白是否对 GSDMD 介导的焦亡通路产生影响仍然不清楚。PDCoV 对 GSDMD 介导的细胞焦亡的拮抗作用机制需要进一步地深入研究。

4 总结与展望

PDCoV 作为一种新发现的 δ 属冠状病毒,能感染人类和养殖动物等广泛的宿主,在体外能够感染较多物种的细胞系。当前对于其感染

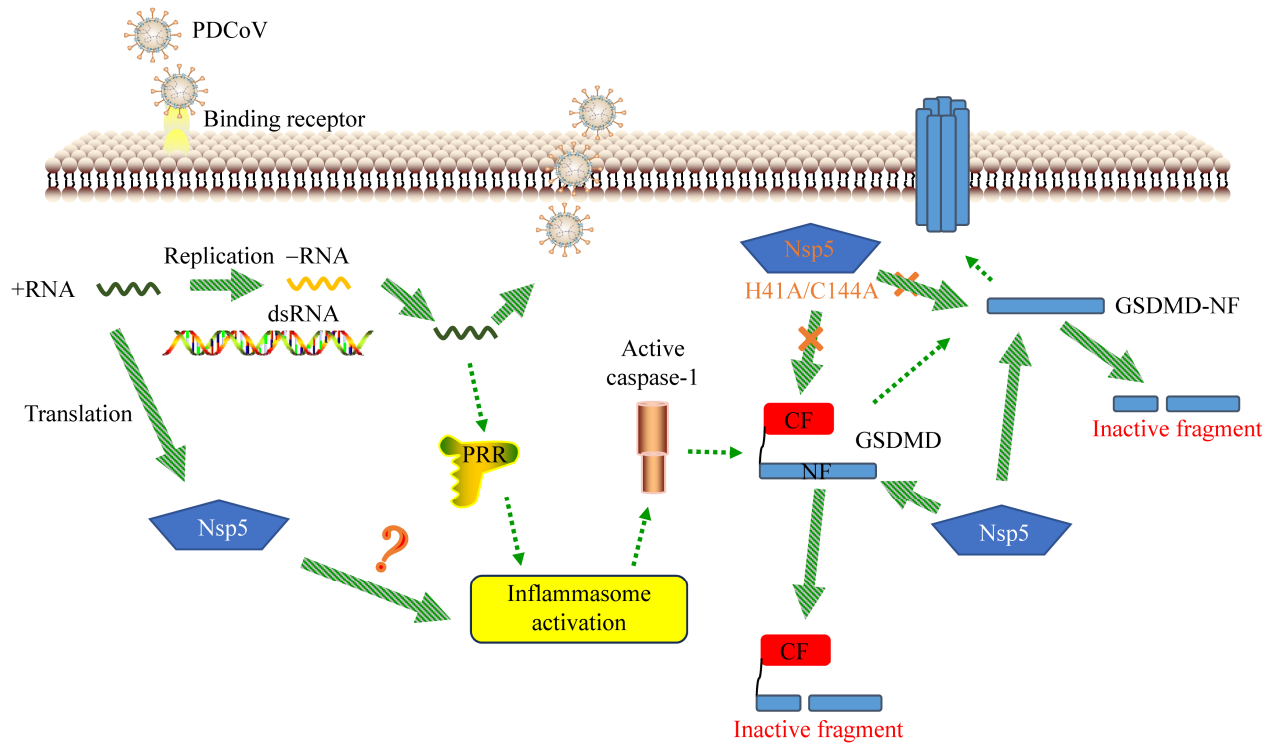


图3 PDCoV Nsp5 对 GSDMD 介导的细胞焦亡的拮抗作用

Figure 3 Mechanistic diagram illustrating antagonization of porcine GSDMD-mediated pyroptosis by PDCoV Nsp5. Active caspase-1: Active cysteinyl aspartate specific proteinase-1; dsRNA: Double-stranded RNA; +RNA: + sense RNA; -RNA: - sense RNA; GSDMD-NF: GSDMD-N-terminal pore-forming fragment; NF: N-terminal pore-forming fragment; CF: C-terminal repressor fragment; H41A/C144A: Protease-defective mutants; Nsp5: Nonstructural protein 5; PDCoV: Porcine deltacoronavirus; PRR: Pattern recognition receptor.

和引起免疫反应的机制研究相对有限,有部分研究介绍了其起源和遗传演化过程、基础的生物学特征以及对宿主天然免疫的影响^[1,3,17-18,62]。然而,其致病机理以及拮抗宿主免疫反应的机制仍然需要进一步深入地研究。细胞焦亡作为 GSDM 家族蛋白介导的程序性细胞死亡,在宿主防御病原感染的过程发挥着重要的作用^[40]。病原感染被模式识别受体识别后,引起 NLRP3 炎症小体的组装,进而活化 GSDMD,形成 GSDMD-NF 导致细胞发生焦亡并释放大量的炎症因子,从而清除病原体^[45]。病原在与宿主免疫系统的斗争中进化出了抑制细胞焦亡从而促进自身增殖感染的策略^[61]。PDCoV Nsp5 能够对

自身基因组编码的前体多聚蛋白进行加工,形成非结构蛋白,对病毒的复制至关重要^[54]。Nsp5 能直接切割焦亡执行蛋白 GSDMD 导致其产生不具备诱导焦亡功能的片段抑制细胞焦亡,促进自身的复制^[57]。NF- κ B 对于 NLRP3 的转录具有调控作用,影响 NLRP3 炎症小体的组装。PDCoV 的 Nsp5 能够对 NF- κ B 的调控因子 NEMO 进行切割,从而抑制 NF- κ B 信号^[54]的激活。另外, PDCoV 的 Nsp15 对 NF- κ B 的活化也有一定的抑制作用^[55]。NF- κ B 信号受到抑制会对 NLRP3 的活化产生影响,进而影响 NLRP3 炎症小体的组装和 GSDMD 介导的焦亡。

尽管目前已发现 PDCoV 的 Nsp5 对细胞的

焦亡具有一定的拮抗作用, 但 PDCoV 在逃逸宿主细胞焦亡过程中的机制还有很多未解。PDCoV 在拮抗细胞焦亡过程中哪些蛋白发挥关键作用? PDCoV 对 NLRP3 炎症小体的识别组装、GSDMD 蛋白的活化以及 GSDMD-NF 的寡聚化和定位是否有影响? 未来关于 PDCoV 拮抗宿主焦亡的研究可以围绕这些方面深入开展。探究 PDCoV 拮抗细胞焦亡的作用机制, 将为 PDCoV 的病原学研究和临床治疗与防控提供重要的理论支撑。

参考文献

- [1] MA YM, ZHANG Y, LIANG XY, LOU FF, OGLESBEE M, KRAKOWKA S, LI JR. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00064.
- [2] ADAMS MJ, CARSTENS EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012)[J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(7): 1411-1422.
- [3] HOMWONG N, JARVIS MC, LAM HC, DIAZ A, ROVIRA A, NELSON M, MARTHALER D. Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 123: 168-174.
- [4] 郑丽, 李秀丽, 鄢明华, 任卫科, 张蕾, 路超, 田向学, 韩伟. 猪德尔塔冠状病毒 TJ1 株的分离鉴定及生物学特性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(1): 219-224.
ZHENG L, LI XL, YAN MH, REN WK, ZHANG L, LU C, TIAN XX, HAN W. Isolation, identification and biological characteristics analysis of porcine deltacoronavirus TJ1[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(1): 219-224 (in Chinese).
- [5] SHI JJ, ZHAO Y, WANG K, SHI XY, WANG Y, HUANG HW, ZHUANG YH, CAI T, WANG FC, SHAO F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [6] KAYAGAKI N, STOWE IB, LEE BL, O'ROURKE K, ANDERSON K, WARMING S, CUELLAR T, HALEY B, ROOSE-GIRMA M, PHUNG QT, LIU PS, LILL JR, LI H, WU JS, KUMMERFELD S, ZHANG J, LEE WP, SNIPAS SJ, SALVESEN GS, MORRIS LX, et al. Caspase-11 cleaves Gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 666-671.
- [7] HE WT, WAN HQ, HU LC, CHEN PD, WANG X, HUANG Z, YANG ZH, ZHONG CQ, HAN JH. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion[J]. *Cell Research*, 2015, 25(12): 1285-1298.
- [8] HARTENIAN E, NANDAKUMAR D, LARI A, LY M, TUCKER JM, GLAUNSINGER BA. The molecular virology of coronaviruses[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(37): 12910-12934.
- [9] WOO PCY, LAU SKP, LAM CSF, LAU CCY, TSANG AKL, LAU JHN, BAI R, TENG JLL, TSANG CCC, WANG M, ZHENG BJ, CHAN KH, YUEN KY. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008.
- [10] MARTHALER D, RAYMOND L, JIANG Y, COLLINS J, ROSSOW K, ROVIRA A. Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(8): 1347-1350.
- [11] WANG LY, HAYES J, SARVER C, BYRUM B, ZHANG Y. Porcine deltacoronavirus: histological lesions and genetic characterization[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(1): 171-175.
- [12] DONG N, FANG LR, ZENG SL, SUN QQ, CHEN HC, XIAO SB. Porcine deltacoronavirus in mainland China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2254-2255.
- [13] 纪立凯, 李莎莎, 严亚贤. 猪 δ 冠状病毒感染及其对宿主先天免疫功能的影响[J]. *微生物学报*, 2020, 60(3): 431-440.
JI LK, LI SS, YAN YX. Porcine deltacoronavirus infection and its effects on host innate immunity[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(3): 431-440 (in Chinese).
- [14] LEDNICKY JA, TAGLIAMONTE MS, WHITE SK, ELBADRY MA, ALAM MM, STEPHENSON CJ, BONNY TS, LOEB JC, TELISMA T, CHAVANNES S, OSTROV DA, MAVIAN C, BEAU de ROCHARS VM,

- SALEMI M, JR MORRIS JG. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children[J]. *Nature*, 2021, 600(7887): 133-137.
- [15] CHEN Q, GAUGER P, STAFNE M, THOMAS J, ARRUDA P, BURROUGH E, MADSON D, BRODIE J, MAGSTADT D, DERSCHIED R, WELCH M, ZHANG JQ. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets[J]. *Virology*, 2015, 482: 51-59.
- [16] 江珊, 李秀丽, 张莉, 王利丽, 李富强, 路超, 郑丽, 鄢明华. 猪 δ 冠状病毒致病机制研究进展[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(3): 92-96.
- JIANG S, LI XL, ZHANG L, WANG LL, LI FQ, LU C, ZHENG L, YAN MH. Progress on pathogenetic mechanism of porcine deltacoronavirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(3): 92-96 (in Chinese).
- [17] JI LK, LI SS, ZHU WX, MA JJ, SUN JH, WANG HA, YAN YX. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein suppressed IFN- β production by interfering porcine RIG-I dsRNA-binding and K63-linked polyubiquitination[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1024.
- [18] JI LK, WANG N, MA JJ, CHENG YQ, WANG HA, SUN JH, YAN YX. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein species-specifically suppressed IRF7-induced type I interferon production *via* ubiquitin-proteasomal degradation pathway[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 250: 108853.
- [19] 张蕙畅, 方谱县, 方六荣, 肖少波. 猪 δ 冠状病毒辅助蛋白研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2023, 31(1): 213-221.
- ZHANG HC, FANG PX, FANG LR, XIAO SB. Research progress on accessory proteins of porcine deltacoronavirus[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2023, 31(1): 213-221 (in Chinese).
- [20] ZHANG MJ, LI W, ZHOU P, LIU DJ, LUO R, JONGKAEWWATTANA A, HE QG. Genetic manipulation of porcine deltacoronavirus reveals insights into NS6 and NS7 functions: a novel strategy for vaccine design[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 9(1): 20-31.
- [21] LIU C, TANG J, MA YM, LIANG XY, YANG Y, PENG GQ, QI QQ, JIANG SB, LI JR, DU LY, LI F. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(11): 6121-6125.
- [22] LI WT, HULSWIT RJG, KENNEY SP, WIDJAJA I, JUNG K, ALHAMO MA, van DIEREN B, van KUPPEVELD FJM, SAIF LJ, BOSCH BJ. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): e5135-e5143.
- [23] WANG B, LIU Y, JI CM, YANG YL, LIANG QZ, ZHAO PW, XU LD, LEI XM, LUO WT, QIN P, ZHOU JY, HUANG YW. Porcine deltacoronavirus engages the transmissible gastroenteritis virus functional receptor porcine aminopeptidase N for infectious cellular entry[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(12): e00318-18.
- [24] ZHU XY, LIU SD, WANG XL, LUO ZC, SHI YJ, WANG D, PENG GQ, CHEN HC, FANG LR, XIAO SB. Contribution of porcine aminopeptidase N to porcine deltacoronavirus infection[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 65.
- [25] 纪立凯. 猪丁型冠状病毒 N 蛋白抑制猪 RLR 信号通路的分子机制研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2020.
- JI LK. The molecular mechanism of porcine deltacoronavirus N protein in suppressing porcine RLR signaling pathway[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2020 (in Chinese).
- [26] 瞿欢, 胡靖飞, 李施倩, 肖黛, 张路文, 付嘉钰, 赵玉佳, 陈汭, 文翼平, 伍锐. 不同动物源性细胞系对猪丁型冠状病毒的易感性[J]. *微生物学报*, 2022, 62(2): 672-685.
- QU H, HU JF, LI SQ, XIAO D, ZHANG LW, FU JY, ZHAO YJ, CHEN N, WEN YP, WU R. Susceptibility of cell lines from different animal species to porcine deltacoronavirus[J]. *Acta Microbiological Sinica*, 2022, 62(2): 672-685 (in Chinese).
- [27] FANG PX, ZHANG HC, SUN H, WANG G, XIA SJ, REN J, ZHANG JS, TIAN LY, FANG LR, XIAO SB. Construction, characterization and application of recombinant porcine deltacoronavirus expressing nanoluciferase[J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 1991.
- [28] NEWTON K, STRASSER A, KAYAGAKI N, DIXIT VM. Cell death[J]. *Cell*, 2024, 187(2): 235-256.
- [29] AI YW, MENG YT, YAN B, ZHOU QY, WANG XD. The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death[J]. *Molecular Cell*, 2024, 84(1): 170-179.
- [30] SHAO F. Gasdermins: making pores for pyroptosis[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2021, 21(10): 620-621.
- [31] COOKSON BT, BRENNAN MA. Pro-inflammatory

- programmed cell death[J]. *Trends in Microbiology*, 2001, 9(3): 113-114.
- [32] HILBI H, CHEN Y, THIRUMALAI K, ZYCHLINSKY A. The interleukin 1 β -converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages[J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65(12): 5165-5170.
- [33] MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β [J]. *Molecular Cell*, 2002, 10(2): 417-426.
- [34] LIU X, ZHANG ZB, RUAN JB, PAN YD, MAGUPALLI VG, WU H, LIEBERMAN J. Inflammasome-activated Gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-158.
- [35] LIU ZH, WANG CP, YANG J, ZHOU BW, YANG R, RAMACHANDRAN R, ABBOTT DW, XIAO TS. Crystal structures of the full-length murine and human Gasdermin D reveal mechanisms of autoinhibition, lipid binding, and oligomerization[J]. *Immunity*, 2019, 51(1): 43-49.e4.
- [36] DING JJ, WANG K, LIU W, SHE Y, SUN Q, SHI JJ, SUN HZ, WANG DC, SHAO F. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the Gasdermin family[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111-116.
- [37] XIA SY, ZHANG ZB, MAGUPALLI VG, PABLO JL, DONG Y, VORA SM, WANG LF, FU TM, JACOBSON MP, GREKA A, LIEBERMAN J, RUAN JB, WU H. Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1[J]. *Nature*, 2021, 593(7860): 607-611.
- [38] DEVANT P, KAGAN JC. Molecular mechanisms of Gasdermin D pore-forming activity[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(7): 1064-1075.
- [39] WANG K, SUN Q, ZHONG X, ZENG MX, ZENG H, SHI XY, LI ZL, WANG YP, ZHAO Q, SHAO F, DING JJ. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis[J]. *Cell*, 2020, 180(5): 941-955.e20.
- [40] LIU X, DING SH, LIU PH. The roles of Gasdermin D in coronavirus infection and evasion[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 784009.
- [41] HE KX, WAN TT, WANG DC, HU J, ZHOU TY, TAO WY, WEI Z, LU Q, ZHOU RB, TIAN ZG, FLAVELL RA, ZHU S. Gasdermin D licenses MHCII induction to maintain food tolerance in small intestine[J]. *Cell*, 2023, 186(14): 3033-3048.e20.
- [42] SONG YY, SONG JM, WANG M, WANG JW, MA B, ZHANG WL. Porcine Gasdermin D is a substrate of caspase-1 and an executioner of pyroptosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 828911.
- [43] SONG JM, WANG KX, MA B, WANG JW, ZHANG WL. Preparation of rabbit polyclonal antibody against porcine Gasdermin D protein and determination of the expression of Gasdermin D in cultured cells and porcine tissues[J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 187: 105945.
- [44] YANG MH, GE XN, ZHOU L, GUO X, HAN J, ZHANG YN, YANG HC. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against porcine Gasdermin D protein[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 173.
- [45] HE S, LI L, CHEN HF, HU XL, WANG WD, ZHANG H, WEI RP, ZHANG XX, CHEN YS, LIU XH. PRRSV infection induces Gasdermin D-driven pyroptosis of porcine alveolar macrophages through NLRP3 inflammasome activation[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(14): e0212721.
- [46] WEI GH, LUO SJ, WU WY, HU JY, ZHOU RQ. Activation of interleukin-1 β release and pyroptosis by transmissible gastroenteritis virus is dependent on the NOD-like receptor protein 3 inflammasome in porcine intestinal epithelial cell line[J]. *Viral Immunology*, 2021, 34(6): 401-409.
- [47] FAN SQ, YUAN J, DENG SF, CHEN YM, XIE BM, WU KK, ZHU MJ, XU HL, HUANG YZ, YANG JF, ZHANG YY, CHEN JD, ZHAO MQ. Activation of interleukin-1 β release by the classical swine fever virus is dependent on the NLRP3 inflammasome, which affects virus growth in monocytes[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 225.
- [48] ZHANG XH, CHEN GY, YIN JQ, LI LH, HUANG K, DU Q, TONG DW, HUANG Y. Pseudorabies virus infection activates the NLRP3 and IFI16 inflammasomes to trigger pyroptosis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 284: 109826.
- [49] ZHAO LY, LI L, XUE M, LIU X, JIANG CF, WANG WZ, TANG LJ, FENG L, LIU PH. Gasdermin D inhibits coronavirus infection by promoting the noncanonical secretion of beta interferon[J]. *mBio*, 2021, 13(1): e0360021.
- [50] CUI J, LI F, SHI ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 181-192.
- [51] XIAO WW, WANG XL, WANG J, FANG PX, XIAO

- SB, FANG LR. Replicative capacity of four porcine enteric coronaviruses in LLC-PK1 cells[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(3): 935-941.
- [52] BAUERNFEIND FG, HORVATH G, STUTZ A, ALNEMRI ES, MACDONALD K, SPEERT D, FERNANDES-ALNEMRI T, WU JH, MONKS BG, FITZGERALD KA, HORNUNG V, LATZ E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression[J]. *Journal of Immunology*, 2009, 183(2): 787-791.
- [53] LUO JY, FANG LR, DONG N, FANG PX, DING Z, WANG D, CHEN HC, XIAO SB. Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection suppresses RIG-I-mediated interferon- β production[J]. *Virology*, 2016, 495: 10-17.
- [54] ZHU XY, FANG LR, WANG D, YANG YT, CHEN JY, YE X, FODA MF, XIAO SB. Porcine deltacoronavirus nsp5 inhibits interferon- β production through the cleavage of NEMO[J]. *Virology*, 2017, 502: 33-38.
- [55] LIU XR, FANG PX, FANG LR, HONG YY, ZHU XY, WANG D, PENG GQ, XIAO SB. Porcine deltacoronavirus nsp15 antagonizes interferon- β production independently of its endoribonuclease activity[J]. *Molecular Immunology*, 2019, 114: 100-107.
- [56] MA J, ZHU FR, ZHAO M, SHAO F, YU D, MA JW, ZHANG XS, LI WT, QIAN Y, ZHANG Y, JIANG D, WANG S, XIA PY. SARS-CoV-2 nucleocapsid suppresses host pyroptosis by blocking Gasdermin D cleavage[J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40(18): e108249.
- [57] SHI FS, LV Q, WANG TJ, XU JD, XU W, SHI YH, FU XY, YANG TM, YANG Y, ZHUANG LN, FANG WH, GU JY, LI XL. Coronaviruses Nsp5 antagonizes porcine Gasdermin D-mediated pyroptosis by cleaving pore-forming p30 fragment[J]. *mBio*, 2022, 13(1): e0273921.
- [58] ANAND K, ZIEBUHR J, WADHWANI P, MESTERS JR, HILGENFELD R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs[J]. *Science*, 2003, 300(5626): 1763-1767.
- [59] HSU MF, KUO CJ, CHANG KT, CHANG HC, CHOU CC, KO TP, SHR HL, CHANG GG, WANG AHJ, LIANG PH. Mechanism of the maturation process of SARS-CoV 3CL protease[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(35): 31257-31266.
- [60] YE G, DENG F, SHEN Z, LUO R, ZHAO L, XIAO SB, FU ZF, PENG GQ. Structural basis for the dimerization and substrate recognition specificity of porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease[J]. *Virology*, 2016, 494: 225-235.
- [61] 杨茂艺, 崔潇月, 郑诗棋, 马诗瑶, 郑增长, 邓万燕. 病原体逃逸宿主固有免疫的新策略: 抑制细胞焦亡[J]. *遗传*, 2023, 45(11): 986-997.
- YANG MY, CUI XY, ZHENG SQ, MA SY, ZHENG ZC, DENG WY. Inhibiting pyroptosis: novel immune evasion strategies for pathogens[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2023, 45(11): 986-997 (in Chinese).
- [62] HU H, JUNG K, VLASOVA AN, CHEPNGENO J, LU ZY, WANG QH, SAIF LJ. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1537-1548.