

许毓轩, 卢雪, 张恩权, 等. 病毒感染诱导赫氏颗石藻 (*Emiliana huxleyi*) 细胞自噬研究[J]. 海洋学报, 2023, 45(8): 143–154, doi:10.12284/hyxb2023084

Xu Yuxuan, Lu Xue, Zhang Enquan, et al. Virus-induced autophagy in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*[J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(8): 143–154, doi:10.12284/hyxb2023084

# 病毒感染诱导赫氏颗石藻 (*Emiliana huxleyi*) 细胞自噬研究

许毓轩<sup>1</sup>, 卢雪<sup>1</sup>, 张恩权<sup>1</sup>, 万霖月<sup>1</sup>, 张书苗<sup>1</sup>, 刘静雯<sup>1\*</sup>

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 以海洋环境中具有重要生态功能的赫氏颗石藻 (*Emiliana huxleyi*) BOF92 及其特异性裂解病毒 (*E. huxleyi* virus, EhV99B1) 为研究对象, 采用分子及细胞生物学方法探究海洋病毒感染诱导宿主细胞自噬特征及其调控机制。结果显示: 病毒感染能诱导宿主细胞自噬, 并出现明显的液泡酸化及液泡自噬现象; 感染过程中核心自噬相关基因如 *atg1*、*atg5*、*atg8* 及 *atg12* 的 mRNA 表达水平均显著上调 ( $p < 0.01$ ), 自噬启动成核相关蛋白 Vps34 显著上调 ( $p < 0.01$ ), 进而启动自噬并促使自噬体与液泡的融合; 自噬标志性蛋白 p62 显著下调 ( $p < 0.05$ ), 表明自噬流畅通以加速蛋白降解; 感染中后期对自噬起负调控作用的磷脂酰肌醇 (PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 和磷酸化雷帕霉素靶蛋白 (p-TOR) 等因子的表达水平均显著降低 ( $p < 0.01$ )。另外, 病毒感染过程中, 细胞活性氧 (ROS) 水平显著升高 ( $p < 0.01$ ), 线粒体膜电位 (MMP) 及 ATP 含量显著降低 ( $p < 0.01$ )。综上, 病毒感染诱发宿主藻细胞 ROS 的产生、线粒体膜受损, 并通过调节 PI3K/Akt/TOR 级联反应诱导细胞自噬。可见, 自噬作为一种独特的程序性细胞死亡形式, 对浮游植物遭受胁迫后的个体存活及种群延续具有重要意义。

**关键词:** 赫氏颗石藻; 病毒; 自噬; 自噬相关基因; 线粒体功能; PI3K/Akt/TOR 信号通路

中图分类号: Q291; Q949.2; P714<sup>+.5</sup>

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2023)08-0143-12

## 1 引言

海洋颗石藻 (Coccolithophores) 是一类全球广泛分布且具有重要生态功能的真核微型浮游植物, 其中赫氏颗石藻 (*Emiliana huxleyi*) 是最为重要, 也是迄今被研究最多的一种, 几乎每年都在大洋中形成大面积赤潮<sup>[1]</sup>。因其可以产生由碳酸钙 (CaCO<sub>3</sub>) 构成的“球石粒”及二甲巯基丙酸内盐 (DMSP), 在海洋碳、硫生物地球化学循环中具有重要作用<sup>[2-4]</sup>。自然海域中, 某些株系的颗石藻能够被其特异性裂解病毒 (*E.*

*huxleyi* virus, EhVs) 感染, 并诱导宿主程序性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD) 以此控制该藻赤潮消亡及宿主的种群动力学过程<sup>[5-6]</sup>。PCD 是真核生物应对环境胁迫进化出的一种高度保守的细胞自我保护机制, 在病原菌感染的免疫防御过程中起重要作用。单细胞浮游植物在营养胁迫或病原菌侵染条件下均能诱导 PCD 过程, 这一过程在决定海洋光合自养生物细胞命运中扮演重要角色, 并不断重塑浮游植物的演替和进化轨迹<sup>[7-9]</sup>。凋亡 (I 型 PCD) 和自噬是两种由不同效应分子介导的 PCD 行为, 但它们之间存在复

收稿日期: 2022-11-07; 修订日期: 2023-03-13。

基金项目: 国家自然科学基金 (42076086); 福建省自然科学基金 (2019J01696)。

作者简介: 许毓轩 (1998—), 女, 吉林省延边朝鲜族自治州敦化市人, 主要从事海洋微生物生化与分子生物学研究。E-mail: [xyx995999@163.com](mailto:xyx995999@163.com)

\* 通信作者: 刘静雯, 女, 博士, 教授, 主要从事海洋微型生物分子生物学研究。E-mail: [ljwsbch@163.com](mailto:ljwsbch@163.com)

杂的交互调控,即“串话”(Crosstalk)关系,特别是在病原菌感染的细胞中,它们的协同作用影响子代病毒的复制、传播,进而影响细胞的生命活动<sup>[10-12]</sup>。有关浮游植物响应环境胁迫细胞凋亡的研究已有大量报道,如,氮胁迫诱导假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)细胞活性氧(ROS)水平急剧上升,与细胞凋亡过程密切相关的 caspase 蛋白酶活性水平明显升高<sup>[13]</sup>。颗石藻细胞在被病毒感染后,合成并积累了大量病毒性鞘糖脂(vGSLs),vGSLs 能够诱导宿主依赖于凋亡特征蛋白酶 metacaspase 的细胞凋亡过程<sup>[5,14-15]</sup>。玫瑰杆菌(*Phaeobacter inhibens*)与钙化颗石藻(*E. huxleyi*) CCMP3266 共培养能够促进二倍体阶段颗石藻细胞 ROS 的产生、类-caspase 酶活性升高并出现典型的类-caspase 细胞凋亡形态特征(Apoptosis-Like-PCD, AL-PCD)<sup>[16]</sup>。然而,细胞凋亡并非是决定浮游植物细胞死亡命运的唯一方式,近年也陆续发现浮游植物通过细胞自噬(II型 PCD)应答众多环境和生物胁迫。例如,强光照<sup>[17]</sup>或高浓度金属离子<sup>[18]</sup>胁迫下,莱茵衣藻(*Chlamydomonas Reinhardtii*)通过产生 ROS 和调节自噬通路关键蛋白的表达丰度诱导细胞自噬。氮饥饿诱导莱茵衣藻(*C. Reinhardtii*) CC-2686 细胞自噬,促进细胞三酰甘油(TAG)的积累,从而介导氮胁迫下的营养循环和再利用<sup>[19]</sup>。长时间低光胁迫或氮饥饿诱导纤维藻(*Ankistrodesmus densus*)细胞凋亡和植物所特有的液泡自噬(Autophagic/Vacuolar Cell Death, VCD)<sup>[20]</sup>。磷胁迫上调颗石藻(*E. huxleyi*) CCMP2090 细胞碱性磷酸酶(AP)活性以促进膜磷脂成分发生迅速可逆性重构,如形成胞内膜泡并与液泡融合、酸化,加速生物大分子的循环利用<sup>[21]</sup>。2014 年以色列学者首次报道裂解性病毒 EhV201 感染颗石藻(*E. huxleyi*) CCMP2090 诱导宿主细胞裂解并出现自噬体样囊泡,且子代病毒粒子包膜上含有宿主自噬相关蛋白 Atg8,暗示自噬可能在病毒粒子的组装和释放过程中起关键作用<sup>[22]</sup>。可见,凋亡和自噬在颗石藻病毒与宿主相互作用过程中发挥重要作用,并可能存在类似于哺乳动物病毒感染诱导的细胞凋亡和自噬之间的“串话”关系。自噬过程由一系列自噬相关基因(*atgs*)编码的自噬相关蛋白(Atgs)所介导,这些自噬相关基因在酵母、植物和哺乳动物中具有高度保守性。雷帕霉素靶点复合体(Target of Rapamycin Complex, TOR)位于自噬信号通路的最上游,它可以通过感受细胞内多种信号变化,对自噬进行负调控<sup>[23]</sup>。与哺乳动物细胞类似,浮游植物细胞中也存在由核心自噬相关蛋白组成的 3 个关键功能单位,即 Atg9 循环系统、

III 型磷脂酰肌醇三磷酸激酶(Phosphatidyli Nositol 3-Kinase, PI3K)复合体 I 以及类泛素化(Ubiquitin-like, Ubl)系统<sup>[24]</sup>。目前,浮游植物自噬研究多集中于自噬相关基因的发现和鉴定,对自噬的分子机制及自噬与凋亡之间的交互作用等尚缺乏足够的认识。随着对颗石藻病毒-宿主复杂的基因组结构、基因间水平转移现象以及丰富的遗传多样性等特点的逐渐认识,发现它们之间存在很强的协同进化关系<sup>[25]</sup>。颗石藻及其病毒已成为研究真核浮游植物宿主-病毒互作的最佳模式系统。本研究以颗石藻 *E. huxleyi* BOF92 和其特异性裂解病毒(EhV99B1)为对象,探究病毒感染诱导的细胞自噬及其调控机制。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验藻种培养、病毒感染及样本收集

颗石藻(*E. huxleyi*) BOF92 及其特异性裂解病毒(EhV99B1)均分离自挪威西海域(60.2°N, 5.2°E)<sup>[26]</sup>。颗石藻培养使用 f/2-Si 加富培养基,培养条件:温度为(18±1)°C,光照强度(以光子计)为 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光周期为 14 h : 10 h(光 : 暗)。

将指数生长期的藻液(细胞密度约为 1×10<sup>6</sup> cell/mL)分成两组,不加病毒的作为对照组(Control),将按宿主与病毒 50 : 1 体积比加入浓缩病毒裂解液的组作为感染组(Infected)(病毒感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)约为 1 : 1),每组设置 3 个生物学平行,分别于病毒感染后 6 h、24 h 和 48 h 收集藻细胞样品。分别收集 10 mL 藻细胞沉淀(4°C, 3 000 g 离心 5 min)用于细胞活性氧 ROS、线粒体膜电位(MMP)、细胞 ATP 含量的测定及荧光染色观察液泡酸化情况;收集 50 mL 藻细胞样品用于观察细胞超微结构变化;收集 500 mL 藻细胞沉淀(4°C, 6 000 g 离心 8 min)迅速冻于液氮中,用于提取细胞总 RNA 和总蛋白。

### 2.2 透射电镜观察细胞自噬

将上述藻细胞沉淀加入 1 mL 固定液(含 4% 多聚甲醛 PFA、1% 戊二醛和 pH 为 7.2 的磷酸缓冲液),于 4°C 固定 1 h 以上,然后转入锇酸固定。依次使用 30%、50%、70%、90% 和 100% 的乙醇进行分级脱水,最后用 100% 环氧丙烷处理 1 h。分别用环氧丙烷/树脂比例为 1 : 1 和 1 : 2 浸透样品 1 h,纯树脂浸透 2 h,于 70°C 聚合 12 h 进行包埋。超薄切片,柠檬酸铅染色 10 min,透射电镜(Hitachi HT7700 120kV,日本)观察并拍照。

### 2.3 荧光染色标记细胞中酸性区室

用 2 mL 无菌海水重悬细胞沉淀,加入 2 μL 浓度

为 1 mmol 的 lysosensor DND189 荧光染料, 光照培养箱中锡纸包裹避光培养 20 min, 培养条件同上。取 50  $\mu$ L 混合的培养液滴于载玻片上, 避光孵育 30 min。用少量海水洗去多余染料, 滴加 15  $\mu$ L 抗荧光淬灭封片剂封片。分别于绿色通道激发波长 (502~545 nm) 和红色通道激发波长 (655~755 nm) 下观察细胞中的酸性区室。用终浓度为 1  $\mu$ mol/L 雷帕霉素 (溶于 DMSO 中) 处理作为阳性对照组, 其他步骤同上。

#### 2.4 qRT-PCR 检测自噬相关基因 mRNA 表达水平

利用 Primer Premier 5.0 设计引物,  $\beta$ -tubulin 作为内参, 引物序列见表 1。使用天根 RNA simple 总 RNA 提取试剂盒提取藻细胞总 RNA, 采用诺唯赞 HiScript® II Q RT SuperMix 和 ChamQ Universal SYBR qPCR 试剂盒进行 RNA 反转录。qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 其中包括 2  $\mu$ L 模板 cDNA, 6  $\mu$ L DEPC 水, 10  $\mu$ L ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和各 1  $\mu$ L 浓度为 10  $\mu$ mol/L 的正、反向引物。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 50 个循环。每个样品设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算自噬相关基因的相对表达量。

#### 2.5 Western Blot 检测自噬相关蛋白的表达

用 0.2 mol PBS (pH 为 6.8) 洗涤细胞沉淀, 加入增强型细胞裂解液 (1 mL RIPA、0.5% PVP 及终浓度为 1 mmol 的 PMSF), 超声破碎细胞, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 30 min, 收集上清, 用 BOSTER BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。每个泳道上样 40~60  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 采用 0.45  $\mu$ m 的 NC 膜于 80 V 恒压湿转 1 h, 3% BSA 室温封闭 1 h, 加入相应的一抗 (表 2), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次 (5 min/次), 使用索莱宝 ECL 化学发光液进行显色, 凝胶成像仪曝光、拍照。采用 Image J 软件对 Western Blot 蛋白条带进行灰度分析。

#### 2.6 酶联免疫吸附检测 p62 蛋白表达量

p62 是反映自噬活性的重要标志蛋白之一, 其与自噬体膜蛋白 Atg8/LC3 以及泛素化的蛋白质结合, 将包含 p62 的蛋白聚合物转运到自噬体, 一同在自噬溶酶体内降解, 其蛋白含量间接反映自噬小体清除水平<sup>[27]</sup>。本研究采用 Enzo life science p62 Elisa 试剂盒测定 p62 蛋白的浓度。用 1 $\times$ PBS 稀释蛋白样品至浓度为 0.625 ng/ $\mu$ L 后加入 10  $\mu$ L 到包被了 p62 单克隆抗体的 Elisa 96 孔板中, Assau Buffer 作为空白对照, 每个样品设置 3 个平行, 密封孔板于室温震荡 (500 r/min) 孵育 1 h; 加入 300  $\mu$ L 的 1 $\times$ Wash buffer 清洗 3 次, 然后加入 100  $\mu$ L p62 多克隆抗体 (1 : 800) 孵育 1 h, 加

表 1 本研究自噬相关基因 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of autophagy-related gene for qRT-PCR used in this study

基因名称	扩增片段长度/bp	引物名称	序列(5'→3')
<i>atg1</i>	106	F	AGGGCAGCTTTGCGATTGT
		R	TTGGCCTGTAGCTTCTGTTG
<i>atg2</i>	96	F	CATGGGCGTGTGTCGAG
		R	AAGGCGTAGAGGGAGGAGAAG
<i>atg4_1</i>	118	F	GCGTGCCTTTGGTTCACGTA
		R	GTGCTTGC GCGAGTATCATCT
<i>atg3</i>	146	F	TCCTGGAGAAGGGTGTGTTGAC
		R	CGTGACGAGGTACTGCTTGTTTC
<i>atg5</i>	117	F	GAGCACTCCTGCCTTTTGC
		R	CGTCAGCAGGTCAAAGAGCA
<i>atg7</i>	154	F	GCAAACACACTCGAGGACTTCAA
		R	TCTTGAGGTCTGCGAAGGTGA
<i>atg8_1</i>	163	F	GCCGCTGATTGACAAGAAGAA
		R	CGTCCTTGTGGCTGTCGTAGA
<i>atg9</i>	215	F	GTGCCCCGTTTCGTCACTT
		R	CGAGCCATCACAGCAGGTT
<i>atg10</i>	181	F	GGTGCTGGAGGAGCCAATCT
		R	AGCGGCAGATGTGTATGCG
<i>atg12</i>	149	F	CGAACCGCTGCTCCTCTACT
		R	GAAAGCACTGCGCCACATC
<i>atg13</i>	249	F	GCGAAACTGCGTCCAGAAGA
		R	CGCTCGAGAAGCACGAGATG
<i>LST8</i>	212	F	TGGCAAACAACCTTCTCGTGC
		R	TCAAACCTGGCCATCGTGTA
<i>TOR_1</i>	110	F	CAGCACAAATCTCCTTCTGCAC
		R	TGCCGATTGCGGGTAC
<i>TOR_3</i>	79	F	GACCGGCACCTCAACAACA
		R	CCTCGAAGCAGTCGCCATA
<i>Vps15</i>	122	F	CATCAAGGGCGAGAATGTGC
		R	CGTCAAAGTAGAAGGAGAAGTCCG
<i>Vps34_2</i>	203	F	AGCTCGTCTGGAAGTCCGGTA
		R	CCTCGGCTGTATCTCGCATAACAT
$\beta$ -tubulin	160	F	TCATGTGCTCCTACTCGGTCTTC
		R	TTCAGCGTGC GGAAACAGA

入 300  $\mu$ L 的 1 $\times$ Wash buffer 清洗 3 次。每孔加入 100  $\mu$ L p62 缀合物 (辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗), 密封

表 2 本研究中使用的抗体  
Table 2 Antibodies used in this study

抗体名称	生产商	产品货号	稀释倍数
CDK1	Beyotime, 中国	AF1516	1 : 800
ATG8	Abcam, 英国	ab4753	1 : 1 000
Vps34	Abcam, 英国	ab233437	1 : 200
CDK1	Beyotime, 中国	AF0111	1 : 1 000
PI3K	Beyotime, 中国	AF7749	1 : 1 000
p-AKT (Thr308)	Beyotime, 中国	AF5734	1 : 1 000
p-TOR (Ser2448)	Bioworld, 中国	BS4706	1 : 1 000
IgG	Thermo, 美国	31460	1 : 10 000

孔板室温震荡孵育 30 min, 加入 300  $\mu$ L 的 1 $\times$ Wash buffer 重复洗涤 3 次, 加入 100  $\mu$ L TMB, 室温震荡孵育 30 min, 最后加入 100  $\mu$ L 终止液。用 BioTEK 酶标仪读取 450 nm 处的光密度值并绘制标准曲线, 根据标准曲线计算 p62 的浓度。

### 2.7 流式细胞仪检测细胞中活性氧水平

用 1 mL 无菌海水重悬细胞沉淀, 加入 1 mL 终浓度为 10  $\mu$ mol/L 的 DCFH-DA 荧光探针工作液(用无菌海水按照 1 : 1 000 的比例稀释), 于 16 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min(每 5 min 颠倒混匀一次), 提前 20 min 加入 1  $\mu$ L Rosup 刺激剂(终浓度为 50 mg/mL)作为阳性对照组。孵育结束后, 用 0.01 mol 的 PBS 溶液洗涤细胞 3 次(4 $^{\circ}$ C, 3 000 g 离心 5 min), 然后用 500  $\mu$ L 0.01 mol 的 PBS 溶液重悬细胞沉淀, 采用 Millipore 流式细胞仪的绿色荧光通道检测细胞绿色荧光强度。

### 2.8 JC-1 法检测细胞线粒体膜电位

用 1 mL 无菌海水重悬细胞沉淀, 加入双标荧光探针 1 $\times$ JC-1 染色缓冲液(超纯水和 5 $\times$ JC-1 染色缓冲液 4 : 1 稀释), 16 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min(每 5 min 颠倒混匀一次), 提前 20 min 加入 1  $\mu$ L CCCP 刺激剂(终浓度为 10 mmol/L)作为阳性对照组。孵育结束后, 用 1 $\times$ JC-1 染色缓冲液洗涤细胞 3 次(4 $^{\circ}$ C, 3 000 g 离心 5 min), 然后用 500  $\mu$ L 1 $\times$ JC-1 染色缓冲液重悬细胞沉淀, 采用 Millipore 流式细胞仪的绿色荧光通路检测细胞绿色荧光强度。

### 2.9 ATP 含量测定

采用碧云天 ATP 检测试剂盒测定细胞中 ATP 含量。根据说明书操作, 于 10 mL 藻细胞沉淀中加入 1 mL 细胞裂解液, 冰上超声破碎 1 min(35 kHz, Ampl 40%), 离心 5 min(4 $^{\circ}$ C, 6 000 g), 在 96 孔板中加入 100  $\mu$ L 稀释 10 倍的 ATP 检测工作液, 室温静置 3~5 min 后

加入 20  $\mu$ L 上述细胞裂解样品, 用 BioTEK 酶标仪检测 254 nm 波长下的荧光强度。

### 2.10 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 显著性差异采用 *t* 检验,  $p < 0.05$  表示差异显著,  $p < 0.001$  表示差异极显著。

## 3 实验结果

### 3.1 病毒感染诱导颗石藻细胞自噬体的形成

特异性裂解病毒 EhV99B1 感染颗石藻 *E. huxleyi* BOF92 过程中, 随着感染时间的延长, 宿主细胞被病毒裂解, 藻液逐渐变澄清(图 1a 至图 1c)。透射电镜观察结果显示, 病毒感染中期(24 h)即可观察到细胞质及液泡内出现的自噬体样双层膜囊泡结构, 即液泡自噬现象(图 1e 至图 1g), 感染后期(48 h)细胞核出现皱缩、叶绿体和线粒体结构膨大松散, 细胞膜破裂并释放出子代病毒颗粒(图 1h, 图 1i)。

Lysosensor DND189 荧光探针用于标记和追踪活细胞中的酸性区室(如溶酶体、液泡), 随着细胞器的酸化程度其荧光强度呈 pH 依赖型增强。早期自噬体的 pH 与细胞质相同, 在成熟过程中与含有液泡膜蛋白和质子泵的囊泡融合后开始酸化。荧光标记结果显示, 感染后期, 细胞内出现了类似于雷帕霉素处理后的液泡酸化绿色荧光(图 2), 雷帕霉素是一种有效的自噬诱导剂, 与该阳性组结果对比, 表明病毒感染诱导了宿主细胞液泡参与的自噬过程。

### 3.2 病毒感染对核心自噬相关基因 mRNA 表达的影响

基于颗石藻 (*E. huxleyi*) CCMP1516 全基因组注释信息 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 筛选部分自噬关键核心基因, 对其表达水平进行 qRT-PCR 定量分析。与对照组相比, 病毒感染过程中自噬相关基因的表达均发生了明显变化(图 3a)。感染早期, mTOR 信号通路关键因子 *TOR\_1*、自噬小体组装和体膜延伸必要蛋白 *atg5* 和 *atg12* 基因 mRNA 的表达水平均呈上调趋势, 分别是对照组的 1.11 倍、2.85 倍和 1.19 倍; 感染中期, 自噬启动基因 *atg1* mRNA 表达量显著上调, 是对照组的 1.47 倍 ( $p < 0.05$ ), *atg12* mRNA 表达量呈上调趋势, 其他自噬相关基因表达量均下调; 感染后期, 自噬体成核相关基因 *Vps34* 显著上调, 是对照组的 2.11 倍 ( $p < 0.01$ ), 哺乳动物 LC3 酯化过程相关同源基因 *atg8* mRNA 表达量呈上调趋势(图 3b)。

### 3.3 病毒感染过程中自噬相关蛋白表达水平的变化

在 EhV99B1 感染的颗石藻 (*E. huxleyi*) BOF92 细胞中鉴定到一个高度保守的自噬核心相关蛋白 Atg8

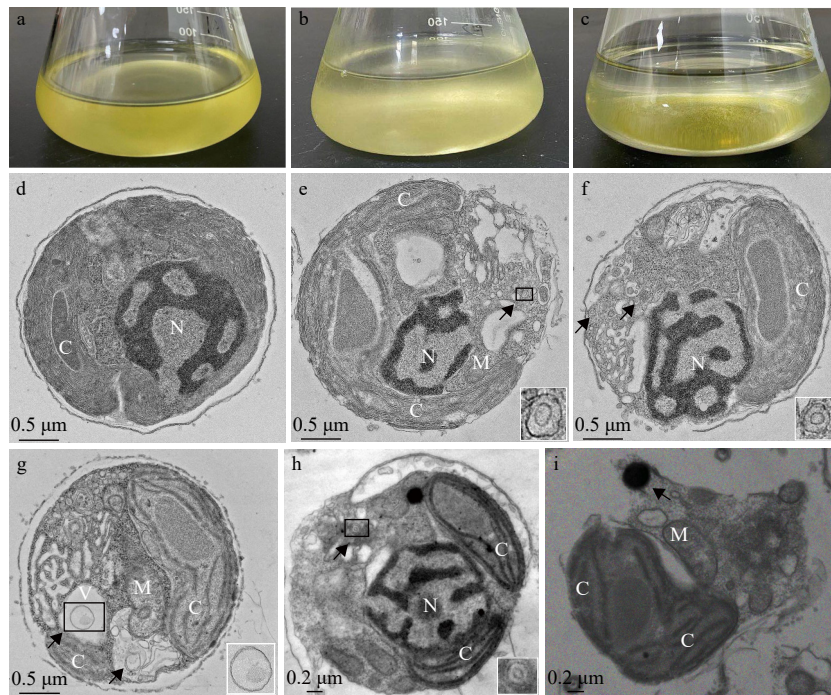


图1 EhV99B1 感染诱导颗石藻 (*E. huxleyi*) BOF92 细胞的裂解及细胞超微结构变化

Fig. 1 Infection dynamics and ultrastructure changes of *E. huxleyi* BOF92 during EhV99B1 infection

a-c. 病毒感染导致藻细胞裂解 (a. 未添加病毒的对照组; b. 病毒感染 24 h; c. 病毒感染 48 h); d-i. 病毒感染过程中藻细胞超微结构的变化 (d. 对照组; e-g. 病毒感染 24 h; h-i. 病毒感染 48 h); N 表示细胞核; C 表示叶绿体; M 表示线粒体; V 表示液泡; 黑色箭头指向自噬体或病毒颗粒, 图 e-h 右下角的方框为该图中箭头所指位置的局部放大图

a-c. Virus infection leads to algae cell lysis (a. uninfected culture; b. 24 h post infection; c. 48 h post infection); d-i. transmission electron micrograph of *E. huxleyi* cells during viral infection (d. uninfected cells; e-g. 24 h post infection; h-i. 48 h post infection); N: nucleus; C: chloroplast; M: mitochondrial; V: vacuole; black arrows point to autophagosome or virions, the insets in Fig. e-h show higher magnification of the boxed areas, depicting the double membrane vesicles

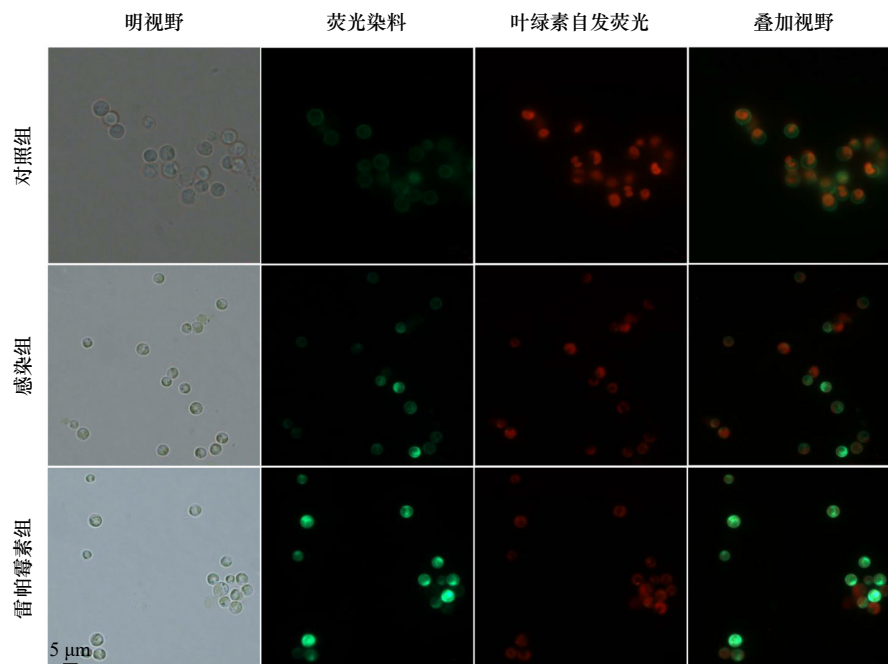


图2 颗石藻细胞中酸化区室的 LysoSensor 荧光标记结果

Fig. 2 Results of LysoSensor fluorescent labeling of acidizing compartments in *Emiliania huxleyi* cells

对照组: 未添加病毒; 感染组: 病毒感染 48 h; 雷帕霉素组: 阳性对照, 采用终浓度为 10 μmol/L 的雷帕霉素处理藻细胞 48 h

Control group: uninfected cells; infected group: viral infected cells 48 h post infection; rapamycin group: 10 μmol/L rapamycin-treated cells for 48 h (positive control)

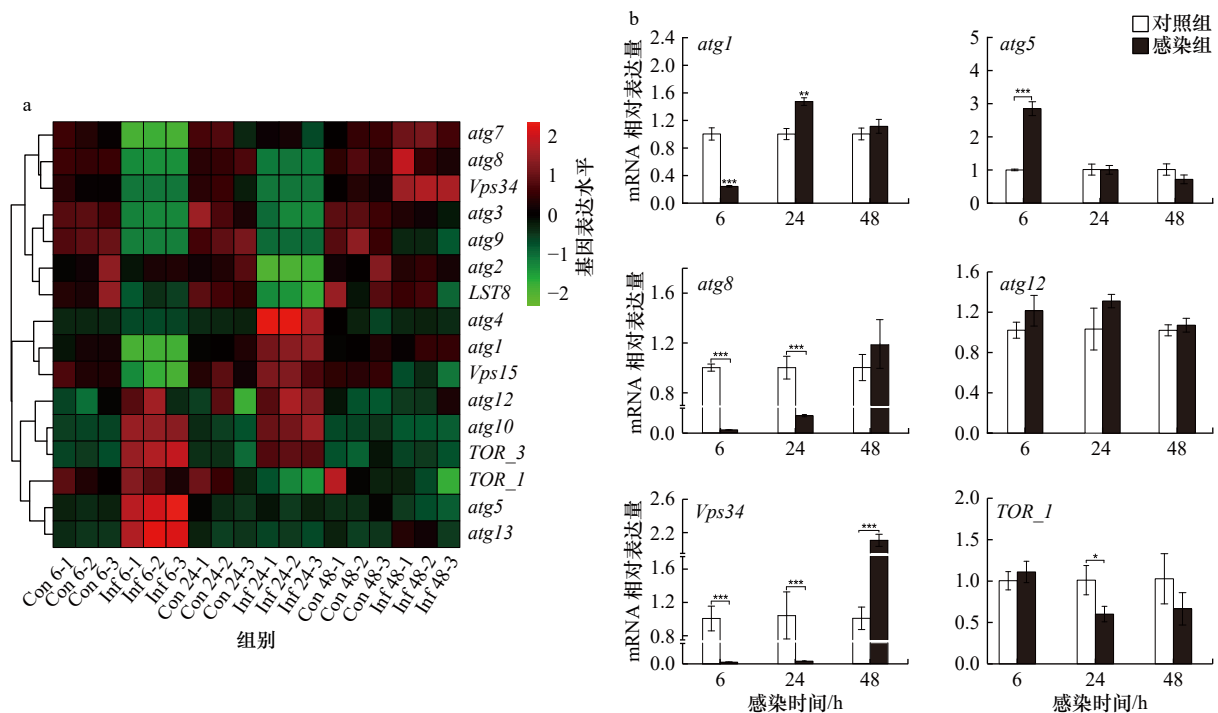


图 3 病毒感染对颗石藻细胞核心自噬相关基因表达水平的影响

Fig. 3 Relative expression level effect of core autophagy-related genes in *E. huxleyi* cells during viral infection

a. 核心自噬相关基因 qRT-PCR 结果聚类热图 (数值为感染组与对照组的比值), Con 6-1 表示对照组 1 6 h 后基因表达水平, Inf 6-1 表示感染组 1 6 h 后基因表达水平, 以此类推; b. 自噬相关基因相对表达量; \*表示差异显著 ( $p < 0.05$ ), \*\*表示差异较显著 ( $p < 0.01$ ), \*\*\*表示差异极显著 ( $p < 0.001$ )

a. qRT-PCR analysis profiles of autophagy related genes, the value is the ratio of infected group to control group. Con 6-1 represents the gene expression level of the control group 1 after 6 h, Inf 6-1 represents the gene expression level of the infected group 1 after 6 h, and so on; b. relative expression levels of selected autophagy related genes; \* indicates a significant differ ( $p < 0.05$ ), \*\* indicates more significant differ ( $p < 0.01$ ), \*\*\* indicates an extreme differ ( $p < 0.001$ )

(Atg8a/Atg8b), 其分子量约为 16 kDa, 属于哺乳动物 LC3(微管相关蛋白 1 轻链 3)的同源物, 是自噬体膜上的标志性蛋白。EhV99B1 感染过程中, Atg8a (LC3II) 蛋白水平显著下调 ( $p < 0.05$ ), 感染早、中、晚期的表达水平与对照组的比值分别为 0.84、0.89 和 0.55, 而 Atg8b (LC3I) 则几乎检测不到 (图 4a, 图 4b); Vps34 蛋白主要参与自噬的启动成核阶段, 该蛋白表达量在感染早期显著上调 ( $p < 0.01$ ), 是对照组的 1.56 倍 (图 4a, 图 4c); p62 蛋白表达水平在整个感染过程中均显著下调 ( $p < 0.05$ ) (图 4d), 感染早、中、晚期的表达水平与对照组的比值分别为 0.78、0.85、0.53。p62 蛋白作为自噬配体与 LC3 相互作用, 负责招募特定“待降解货物”到自噬体膜上, 迅速与货物蛋白一起被降解, p62 蛋白下调能够促进自噬的发生。PI3K/Akt/TOR 级联反应通过雷帕霉素靶点复合体 (TORC1) 调控自噬, 其核心蛋白 PI3K 和 p-Akt (Thr 308) 的表达水平在感染中、后期均显著下调 ( $p < 0.01$ ), 与对照组的比值分别为 0.55 和 0.81 (图 4e 至 图 4g); p-TOR (Ser 473, 表示 TOR 蛋白的磷酸化位点发生在第 473 个丝

氨酸上) 在感染早期上调 ( $p < 0.05$ ), 是对照组的 1.32 倍, 感染中、后期则显著下调 ( $p < 0.01$ ), 与对照组的比值分别为 0.78 和 0.7 (图 4e, 图 4h)。

### 3.4 病毒感染对细胞线粒体功能的影响

病毒感染诱导细胞 ROS 水平显著上调 ( $p < 0.01$ ), 并呈现时间依赖性增加特征 (图 5)。MMP 水平在感染早期无明显变化, 感染中、后期均显著下调 ( $p < 0.01$ ) (图 6)。ATP 含量在感染早、中期与对照组无明显差别, 感染后期显著降低 ( $p < 0.01$ ) (图 7)。可见, 病毒感染促进细胞 ROS 的合成和积累, 线粒体膜结构受损, 从而影响 ATP 的合成。

## 4 讨论

自噬是细胞通过溶酶体 (动物) 或液泡 (如植物、酵母菌) 降解自身组分或清除入侵微生物以达到维持细胞内正常生理活动及稳态的一种细胞代谢过程。植物细胞自噬过程中, 一些小的液泡先出现在胞质中, 随后逐渐融合形成一个大液泡, 随着胞质被液泡取代, 胞内蛋白质和细胞器逐渐被降解导致细胞死

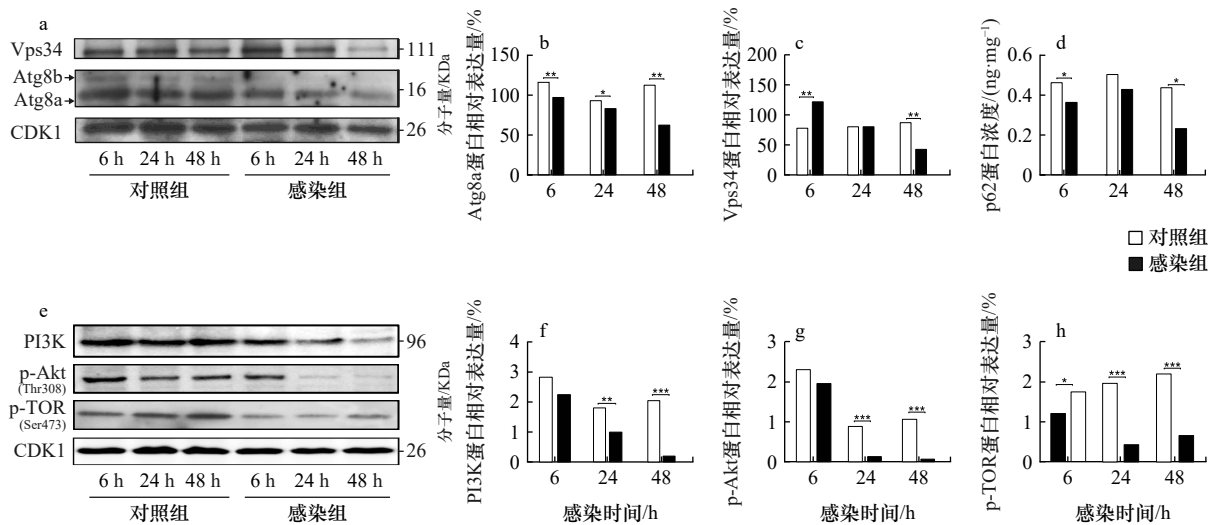


图4 病毒感染对颗石藻细胞核心自噬相关蛋白表达的影响

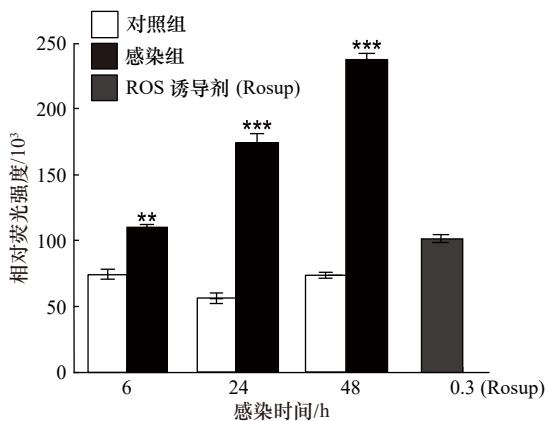
Fig. 4 Expression of core autophagy-related proteins in *E. huxleyi* cells during viral infection\*表示差异显著 ( $p < 0.05$ ), \*\*表示差异较显著 ( $p < 0.01$ ); \*\*\*表示差异极显著 ( $p < 0.001$ )\* Indicates a significant differ ( $p < 0.05$ ), \*\* indicates more significant differ ( $p < 0.01$ ), \*\*\* indicates an extreme differ ( $p < 0.001$ )

图5 病毒感染对颗石藻细胞 ROS 水平的影响

Fig. 5 Effects of virus infection on the levels of ROS in *E. huxleyi* cellsRosup 为阳性对照组; \*\*表示差异较显著 ( $p < 0.01$ ); \*\*\*表示差异极显著 ( $p < 0.001$ )Rosup indicates positive control group, \*\* indicates more significant differ ( $p < 0.01$ ), \*\*\* indicates an extreme differ ( $p < 0.001$ )

亡<sup>[28-29]</sup>。经刀豆素 A 处理的挪威云杉 (*Picea abies*) 胚柄细胞<sup>[30]</sup> 及莱茵衣藻<sup>[31]</sup> 均观察到因自噬流阻断而聚积在液泡中的自噬体, 表明刀豆素 A 可以阻止液泡酸化进而抑制液泡的水解酶活性。磷胁迫诱导颗石藻 *E. huxleyi* CCMP2090 细胞自噬体的形成, 并通过与液泡融合降解胞内物<sup>[21]</sup>。本研究在 EhV99B1 感染的 *E. huxleyi* BOF92 细胞中观察到典型的自噬体样双层膜囊泡, 部分自噬体出现在液泡内 (图 1), 且在感染 48 h 后出现明显的液泡酸化现象 (图 2)。有趣的是, 在 EhV201 感染 *E. huxleyi* CCMP2090 后 60 h, 每个宿

主细胞中子代病毒粒子的丰度却达到最高值 (约 300 个/cell)<sup>[22]</sup>。上述结果表明, 液泡酸化似乎并没有被宿主用作一种防御机制, 暗示 EhV 可通过诱导细胞自噬以利于其自身的增殖。正如在许多哺乳动物宿主-病原体系统中发现的一样, 自噬溶酶体降解可作为对抗病毒感染的细胞防御机制, 但许多 RNA 或 DNA 病毒均可通过调节自噬机制而利于自身的生存<sup>[32]</sup>。如在牛痘病毒 (*Vaccinia*)、虹彩病毒 (*Iridovirus*) 以及冠状病毒 (*Coronaviruses*) 等感染的宿主细胞中, 双层膜结构包裹细胞内容物的同时, 也为病毒组装提供了平台, 这些细胞内特殊的名为“病毒工厂”的隔间被认为更利于核酸分子和蛋白质的招募, 从而提高病毒的复制效率<sup>[33-34]</sup>。

自噬体的形成是由一系列称为 Atgs 蛋白或自噬相关蛋白的协同作用驱动。在颗石藻 (*E. huxleyi*) BOF92 中, Atg8 是哺乳动物 LC3 的同源物, Atg8a 与吞噬泡上的磷脂酰乙醇胺 (PE) 发生酯化反应延伸扩张吞噬泡膜以形成完整的自噬体。EhV 感染过程中只检测到酯化形成的 Atg8a-PE, 且其表达量随感染时间的推移逐渐降低。另外, 在 Atg8-PE 酯化及自噬体延伸过程中起重要作用的 *atg5* 和 *atg12* 基因在病毒感染早期均显著上调 (图 3), 进而加速 Atg5-Atg12 复合体的形成, 以参与自噬体膜的延伸并促进病毒增殖。在 EhV201 感染 *E. huxleyi* CCMP2090 过程中, 成熟的子代病毒粒子的外壳蛋白上包裹了丰富的宿主 Atg8 蛋白<sup>[22]</sup>。因此, 我们推测可能正是由于感染过程中病毒粒子的组装消耗了部分 Atg8a-PE, 从而导致 Atg8a 虽

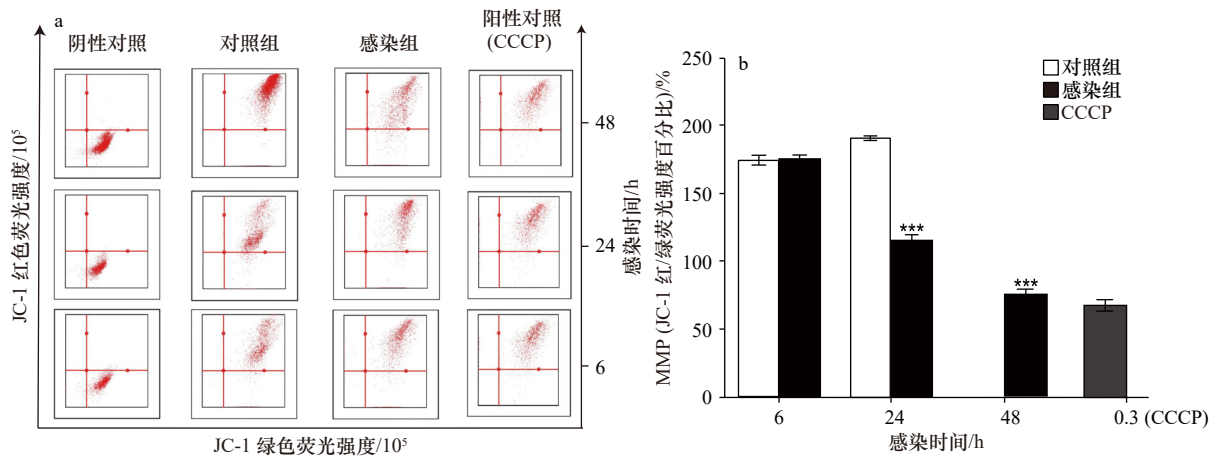


图 6 病毒感染对颗石藻细胞膜电位 MMP 的影响

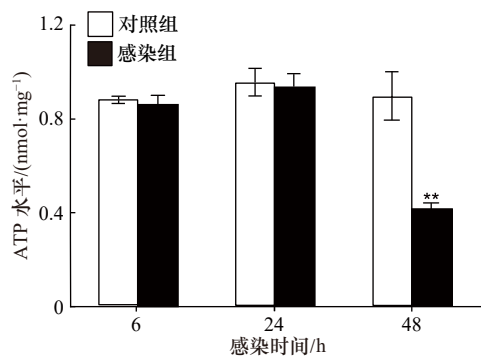
Fig. 6 Effects of virus infection on the levels of MMP in *E. huxleyi* cellsCCCP 为阳性对照组; \*\*\*表示差异极显著 ( $p < 0.001$ )CCCP indicates positive control group; \*\*\* indicates an extreme differ ( $p < 0.01$ )

图 7 病毒感染对颗石藻细胞中 ATP 含量的影响

Fig. 7 Effects of virus infection on the contents of ATP in *E. huxleyi* cells\*\*表示差异较显著 ( $p < 0.01$ )\*\* indicates more significant ( $p < 0.01$ )

然在转录水平持续上调,但蛋白丰度则持续降低,这也进一步证实该蛋白作为成熟 EhV 包膜蛋白成分之一参与子代病毒粒子的组装。新近几篇有关 EhV 感染的脂质组学研究结果也进一步证实这一现象,即病毒感染过程中,宿主细胞内及病毒粒子膜包上均富集了大量的 PE,约占细胞总脂的 1.5%<sup>[14,35]</sup>。可见,在“病毒细胞(virocell)”中,自噬过程产生的膜在释放到宿主细胞外之前就有一部分与 Atg8a-PE 蛋白一起被作为病毒的结构成分用于子代病毒粒子的组装。另外,参与自噬激活阶段的 *Vps34* 基因在病毒感染过程中,其转录水平和蛋白水平的表达模式类似(图 3,图 4)。在 EhV 感染的 *E. huxleyi* CCMP 2090 细胞中,作者没有检测 *Vps34* 在蛋白水平的变化,但感染过程中该基因在 mRNA 水平的变化与本研究结果一致<sup>[22]</sup>。在酵母和哺乳动物细胞中,*Vps34* 主要在蛋白水平调控自

噬<sup>[36]</sup>,*Vps34* 通过与 Beclin 结合形成 *Vps34* 复合体诱导不依赖于 mTOR 的自噬过程<sup>[37]</sup>。因此,在感染后期,*Vps34* 基因的转录水平显著上调,然后以蛋白复合体形式被消耗。这也在一定程度上解释了 EhV 感染的细胞中,*Vps34* 基因转录高峰出现在感染后期的原因(图 3)。综上,EhV 感染过程中细胞自噬总体呈现正向调控趋势。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是自噬调节中研究最多的靶蛋白之一。PI3K/Akt/mTOR 信号通路由 PI3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(PKB/Akt)和 mTOR 3 个作用分子组成,通过催化多个靶标的磷酸化,从而调节自噬。例如,人乳头瘤病毒 HPV16 在感染人角质细胞早期,通过激活生长因子受体(GFR)启动 PI3K/Akt/mTOR 信号途径抑制宿主细胞自噬<sup>[38]</sup>。类似的,在 EhV 感染早期,PI3K 基本维持在正常表达水平,其下游 Akt 被磷酸化,具有活性形式的 p-Akt 进一步催化 TOR 的磷酸化(图 4e),从而抑制自噬的启动,以利于病毒粒子的复制和组装。EhV 感染中、后期,PI3K 蛋白丰度显著降低,进而抑制其下游 Akt 和 TOR 的磷酸化级联反应(图 4e),从而有序地启动细胞自噬。

自噬与凋亡之间存在着复杂的交互调控——二者能被多种应激刺激共同激活、共享多个调节分子,甚至互相协调转化。凋亡特征蛋白酶 Caspase 可以直接与自噬相关蛋白 Atgs 发生互作,从而抑制自噬发生、启动细胞凋亡或促进自噬体形成;而自噬不仅可以抑制细胞凋亡、促进细胞存活,还可以通过 Caspase 依赖性或非依赖性途径促进细胞死亡<sup>[39]</sup>。尽管浮游植物中有关自噬和凋亡之间的关联性研究较少,但浮游植物中存在 Caspase 同源物——Metacaspase<sup>[5]</sup>

和自噬相关蛋白 Atgs<sup>[24]</sup>, 且存在类似细胞凋亡、类凋亡和自噬等途径的 PCD<sup>[40]</sup>。如在 EhV201<sup>[22]</sup> 和本研究的 EhV99B1 感染的特异性宿主藻细胞中均检测到高丰度的 *atg5* 基因转录本, 而 Atg5 则被认为是自噬和凋亡之间的转换器<sup>[11]</sup>。近年, ROS 由于具有调节细胞存活和细胞死亡信号通路的能力而在抗癌策略研究中备受关注<sup>[41-42]</sup>。如血凝性脑脊髓炎病毒(HVJ)感染人前列腺癌 PC3 细胞后, 能够触发 ROS 的产生, 并通过复杂的信号途径诱导 ROS 剂量依赖的凋亡和自噬<sup>[41]</sup>。在浮游植物中也发现类似的现象, 如高盐胁迫诱导微星鼓藻 (*Micrasterias denticulata*) 细胞 ROS 的合成, 其含量变化在细胞凋亡和自噬转换之间起作用, 即当 ROS 含量较低时伴随着自噬小体的形成, 而当 ROS 含量迅速升高则诱导细胞凋亡<sup>[43]</sup>。

EhV 感染过程中, 病毒编码的辅助代谢基因 (vAMGs) 通过“劫持”宿主鞘脂类代谢途径大量合成 vGSLs, 并伴随着 ROS 和谷胱甘肽 (GSH) 的产生<sup>[44-46]</sup>、

细胞内部物质快速降解、光合作用效率降低<sup>[47]</sup>、凋亡相关蛋白 metacaspase 活性显著升高、凋亡小体等典型的细胞凋亡特征<sup>[5-6]</sup>。研究发现, 植物细胞中存在氧化物酶体、线粒体、内质网及核糖体等自噬现象, 而这些细胞器均是产生 ROS 的主要部分, 暗示 ROS 在细胞自噬中起关键作用<sup>[48]</sup>。本研究中, EhV99B1 感染能够诱导宿主 ROS 水平时间依赖性的积累, 并显著抑制细胞膜电位 MMP 和 ATP 水平, 导致线粒体功能受损, 并通过调节 PI3K/Akt/TOR 信号通路诱导细胞自噬 (图 8)。综上, EhV 通过 vGSLs 的积累产生更多的 ROS 的机制诱发自噬, 随着感染时间的延长, 最终细胞终将被病毒裂解死亡——由自噬转向凋亡, 可见, ROS 在 EhV 诱导的自噬和凋亡“串话”中起一定的转换作用。病毒感染诱导的颗石藻细胞自噬和凋亡对自然海域中该藻的生命周期、赤潮消亡及种群动力学过程都有着深远的影响, 并在海洋碳、硫生物地化循环及全球气候变化中起到举足轻重的作用。

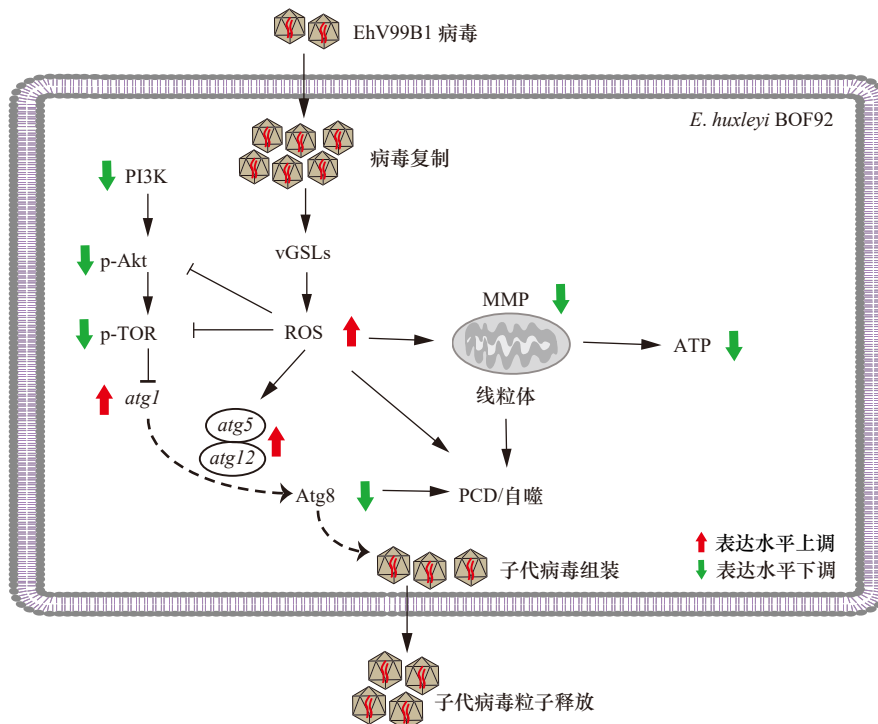


图 8 病毒感染诱导颗石藻细胞自噬示意图

Fig. 8 Schematic diagram of virus induced autophagy in the *E. huxleyi*-EhV system

图中粗箭头所示为 *atg1*、*atg5* 及 *atg12* 的 mRNA 表达水平、Atg8、PI3K、p-Akt 及 p-TOR 的蛋白表达水平和 ROS、MMP 和 ATP 含量的变化  
Thick arrows indicate the mRNA expression level of *atg1*, *atg5*, *atg12*, protein expression levels of Atg8, PI3K, p-Akt, p-TOR and contents of ATP, ROS, MMP

#### 参考文献:

- [1] 张健, 李佳芮, 杨璐, 等. 球石藻及其生态功能[J]. 海洋科学, 2018, 42(2): 150-158.  
Zhang Jian, Li Jiarui, Yang Lu, et al. Coccolithophores and their characteristics[J]. Marine Sciences, 2018, 42(2): 150-158.
- [2] Daniels C J, Poulton A J, Balch W M, et al. A global compilation of coccolithophore calcification rates[J]. *Earth System Science Data*, 2018, 10(4): 1859-1876.

- [3] Jensen L Ø, Mousing E A, Richardson K. Using species distribution modelling to predict future distributions of phytoplankton: case study using species important for the biological pump[J]. *Marine Ecology*, 2017, 38(3): e12427.
- [4] 孙军. 今生颗石藻的有机碳泵和碳酸盐反向泵[J]. *地球科学进展*, 2007, 22(12): 1231–1239.  
Sun Jun. Organic carbon pump and carbonate counter pump of living coccolithophorid[J]. *Advances in Earth Science*, 2007, 22(12): 1231–1239.
- [5] Liu Jingwen, Cai Weicong, Fang Xian, et al. Virus-induced apoptosis and phosphorylation form of metacaspase in the marine coccolithophorid *Emiliania huxleyi*[J]. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(3): 413–422.
- [6] Bidle K D, Haramaty L, Barcelos E Ramos J, et al. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(14): 6049–6054.
- [7] Kuhlisch C, Schleyer G, Shahaf N, et al. Viral infection of algal blooms leaves a unique metabolic footprint on the dissolved organic matter in the ocean[J]. *Science Advances*, 2021, 7(25): eabf4680.
- [8] Bidle K D. The molecular ecophysiology of programmed cell death in marine phytoplankton[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7: 341–375.
- [9] Bidle K D. Programmed cell death in unicellular phytoplankton[J]. *Current Biology*, 2016, 26(13): R594–R607.
- [10] Yang Meng, Liu Yule. Autophagy in plant viral infection[J]. *FEBS Letters*, 2022, 596(17): 2152–2162.
- [11] 孙彦鹤, 周广舟, 王雨润, 等. 病毒诱导的细胞自噬与凋亡的串话关系研究进展[J]. *病毒学报*, 2020, 36(4): 735–743.  
Sun Yanhe, Zhou Guangzhou, Wang Yurun, et al. Research progress in the crosstalk between the autophagy and apoptosis induced by viruses[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2020, 36(4): 735–743.
- [12] 张杨, 孙弯弯, 陆丽丹, 等. 细胞自噬与凋亡相互作用分子机制的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(9): 1342–1346.  
Zhang Yang, Sun Wanwan, Lu Lidan, et al. Research progress on molecular mechanism of the interaction between autophagy and apoptosis[J]. *Basic and Clinical Medicine*, 2021, 41(9): 1342–1346.
- [13] Luo Chunshan, Liang Junrong, Lin Qun, et al. Cellular responses associated with ROS production and cell fate decision in early stress response to iron limitation in the diatom *Thalassiosira pseudonana*[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(12): 5510–5523.
- [14] Zeng Jun, Liu Sishangyu, Cai Weicong, et al. Emerging lipidome patterns associated with marine *Emiliania huxleyi*-virus model system[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 521–528.
- [15] Vardi A, Van Mooy B A S, Fredricks H F, et al. Viral glycosphingolipids induce lytic infection and cell death in marine phytoplankton[J]. *Science*, 2009, 326(5954): 861–865.
- [16] Bramucci A R, Case R J. *Phaobacter inhibens* induces apoptosis-like programmed cell death in calcifying *Emiliania huxleyi*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5215.
- [17] Pérez-Pérez M E, Couso I, Crespo J L. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Autophagy*, 2012, 8(3): 376–388.
- [18] Pérez-Martín M, Blaby-Haas C E, Pérez-Pérez M E, et al. Activation of autophagy by metals in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2015, 14(9): 964–973.
- [19] Pugkaew W, Meetam M, Ponpuak M, et al. Role of autophagy in triacylglycerol biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* revealed by chemical inducer and inhibitors[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(1): 15–22.
- [20] Barreto Filho M M, Durand P M, Andolfato N E, et al. Programmed cell death in the coccoid green microalga *Ankistrodesmus densus* Korshikov (Sphaeropleales, Selenastraceae)[J]. *European Journal of Phycology*, 2022, 57(2): 193–206.
- [21] Shemi A, Schatz D, Fredricks H F, et al. Phosphorus starvation induces membrane remodeling and recycling in *Emiliania huxleyi*[J]. *New Phytologist*, 2016, 211(3): 886–898.
- [22] Schatz D, Shemi A, Rosenwasser S, et al. Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms[J]. *New Phytologist*, 2014, 204(4): 854–863.
- [23] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(2): 132–141.
- [24] 卢雪, 蔡伟聪, 刘静雯. 浮游植物细胞自噬作用特点及研究方法[J]. *微生物学杂志*, 2020, 40(4): 105–113.  
Lu Xue, Cai Weicong, Liu Jingwen. Features and research methods summarization on phytoplankton cell autophagy[J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 40(4): 105–113.
- [25] Nissimov J I, Pagarete A, Ma Fangrui, et al. Coccolithoviruses: a review of cross-kingdom genomic thievery and metabolic thuggery[J]. *Viruses*, 2017, 9(3): 52.
- [26] Castberg T, Thyraug R, Larsen A, et al. Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliania huxleyi* (Haptophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(4): 767–774.
- [27] 隋馨莹, 徐平, 段昌柱, 等. p62蛋白的分子功能及其在疾病中的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(4): 1374–1389.  
Sui Xinying, Xu Ping, Duan Changzhu, et al. Advances in molecular function of p62 protein and its role in diseases[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(4): 1374–1389.
- [28] 刘洋, 张静, 王秋玲, 等. 植物细胞自噬研究进展[J]. *植物学报*, 2018, 53(1): 5–16.  
Liu Yang, Zhang Jing, Wang Qiuling, et al. Research progress in plant autophagy[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, 53(1): 5–16.

- [29] 黄晓, 李发强. 细胞自噬在植物细胞程序性死亡中的作用[J]. 植物学报, 2016, 51(6): 859–862.  
Huang Xiao, Li Faqiang. Roles of autophagy in plant programmed cell death[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2016, 51(6): 859–862.
- [30] Minina E A, Filonova L H, Fukada K, et al. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants[J]. *Journal of Cell Biology*, 2013, 203(6): 917–927.
- [31] Pérez-Pérez M E, Couso I, Heredia-Martínez L G, et al. Monitoring autophagy in the model green microalga *Chlamydomonas Reinhardtii*[J]. *Cells*, 2017, 6(4): 36.
- [32] Kirkegaard K, Taylor M P, Jackson W T. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(4): 301–314.
- [33] Randow F, Münz C. Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity[J]. *Trends in Immunology*, 2012, 33(10): 475–487.
- [34] Wileman T. Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication[J]. *Science*, 2006, 312(5775): 875–878.
- [35] Fulton J M, Fredricks H F, Bidle K D, et al. Novel molecular determinants of viral susceptibility and resistance in the lipidome of *Emiliana huxleyi*[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(4): 1137–1149.
- [36] Kim J, Kim Y C, Fang Chong, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy[J]. *Cell*, 2013, 152(1/2): 290–303.
- [37] Lin Tianji, Ruan Shijuan, Huang Dingbang, et al. MeHg-induced autophagy via JNK/Vps34 complex pathway promotes autophagosome accumulation and neuronal cell death[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(6): 399.
- [38] Surviladze Z, Sterk R T, DeHaro S A, et al. Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2508–2517.
- [39] Tsapras P, Nezis I P. Caspase involvement in autophagy[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2017, 24(8): 1369–1379.
- [40] 李杰, 丁奕, 项荣, 等. 浮游植物程序性细胞死亡研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(11): 2743–2748.  
Li Jie, Ding Yi, Xiang Rong, et al. Programmed cell death in phytoplankton[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(11): 2743–2748.
- [41] Qian Miao, Tan Haiming, Yu Ning, et al. Inactivated Sendai virus induces ROS-dependent apoptosis and autophagy in human prostate cancer cells[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2018, 31(4): 280–289.
- [42] Zhang Yun, Yan Ming, Kuang Shumeng, et al. Bisphenol A induces apoptosis and autophagy in murine osteocytes MLO-Y4: involvement of ROS-mediated mTOR/ULK1 pathway[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 230: 113119.
- [43] Affenzeller M J, Darehshouri A, Andosch A, et al. PCD and autophagy in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*[J]. *Autophagy*, 2009, 5(6): 854–855.
- [44] Sheyn U, Rosenwasser S, Ben-Dor S, et al. Modulation of host ROS metabolism is essential for viral infection of a bloom-forming coccolithophore in the ocean[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(7): 1742–1754.
- [45] 田雪, 蔡伟聪, 苏金净, 等. 病毒感染海洋球石藻 *Emiliana huxleyi* 的转录组分析[J]. 海洋学报, 2019, 41(12): 103–112.  
Tian Xue, Cai Weicong, Su Jinjing, et al. Transcriptome analysis of marine microalga *Emiliana huxleyi* in response to virus infection[J]. *Haiyang Xuebao*, 2019, 41(12): 103–112.
- [46] Zhang Enquan, Gao Jingjing, Wei Zehua, et al. MicroRNA-mediated regulation of lipid metabolism in virus-infected *Emiliana huxleyi*[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(11): 2457–2466.
- [47] Kimmance S A, Allen M J, Pagarete A, et al. Reduction in photosystem II efficiency during a virus-controlled *Emiliana huxleyi* bloom[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2014, 495: 65–76.
- [48] 马丹颖, 季东超, 徐勇, 等. 活性氧调控植物细胞自噬的研究进展[J]. 植物学报, 2019, 54(1): 81–92.  
Ma Danying, Ji Dongchao, Xu Yong, et al. Advances in the regulation on autophagy by reactive oxygen species in plant cells[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2019, 54(1): 81–92.

## Virus-induced autophagy in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*

Xu Yuxuan<sup>1</sup>, Lu Xue<sup>1</sup>, Zhang Enquan<sup>1</sup>, Wan Jiyue<sup>1</sup>, Zhang Shumiao<sup>1</sup>, Liu Jingwen<sup>1</sup>

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** To understand the characteristics of autophagy induced by virus infection in microalgae *Emiliana huxleyi*, we used diverse techniques including transmission electron microscopy, fluorescence microscopy, immunolabeling and biochemical methodologies to investigate the role of autophagy in the interaction between *E. huxleyi* BOF92 and its specific virus EhV99B1. The results showed that virus infection induced autophagy and vacuolar

acidification in host cells, concomitant with up-regulation of autophagy-related genes such as *atg1*, *atg5*, *atg8* and *atg12* ( $p < 0.01$ ) and Vps34 protein involved in the induction and nucleation of autophagosomes ( $p < 0.01$ ). The expression level of autophagy marker protein p62 was significantly down-regulated ( $p < 0.05$ ) during viral infection, indicating enhanced autophagic flux and activated autophagy. The expressions levels of negative regulatory factors such as phosphatidylinositol (PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and phosphorylated target of rapamycin protein (p-TOR) were significantly decreased in the late stage of viral infection ( $p < 0.01$ ). Moreover, the level of reactive oxygen species (ROS) increased dramatically ( $p < 0.01$ ), accompanied by a significant reduction in mitochondrial membrane potential (MMP) and ATP levels ( $p < 0.01$ ) during viral infection. In conclusion, EhV99B1 infection induces ROS production and mitochondrial membrane damage in host cells, and initiates autophagy by regulating the PI3K/Akt/TOR signal pathway. Therefore, autophagy, as a unique form of programmed cell death, is of great significance to the individual survival and population dynamics of phytoplankton respond to environmental and biological stress.

**Key words:** *Emiliana huexlyi*; virus; autophagy; autophagy-related genes; mitochondrial function; PI3K/Akt/TOR signal pathway