

蛋白二硫键异构酶 A 成员 4 调控细胞自噬促进牛病毒性腹泻病毒的复制

权子晨^{1,2}, 刘千硕^{1,2}, 于婷婷^{1,2}, 陈俊贞³, 陈如龙⁴, 靳征⁵, 史慧君^{1,2*}, 付强^{1,2*}

1 新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐

2 新疆动物临床医学研究重点实验室, 新疆 乌鲁木齐

3 新疆农业职业技术大学, 新疆 昌吉

4 新疆天莱农牧集团股份有限公司, 新疆 博乐

5 巴州若羌县畜牧兽医站, 新疆 巴州

权子晨, 刘千硕, 于婷婷, 陈俊贞, 陈如龙, 靳征, 史慧君, 付强. 蛋白二硫键异构酶 A 成员 4 调控细胞自噬促进牛病毒性腹泻病毒的复制[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 3981-3993.

QUAN Zichen, LIU Qianshuo, YU Tingting, CHEN Junzhen, CHEN Rulong, JIN Zheng, SHI Huijun, FU Qiang. Protein disulfide isomerase A4 regulates autophagy to promote replication of bovine viral diarrhea virus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 3981-3993.

摘要:【目的】为研究宿主蛋白二硫键异构酶 A 成员 4 (protein disulfide isomerase A4, PDIA4) 在牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 感染中的具体作用及分子机制, 阐明 PDIA4 在 BVDV 复制中的致病机制并为制定新型防控策略提供理论依据。【方法】Western blotting 和 qPCR 检测 BVDV 感染 MDBK 细胞后 PDIA4 的表达变化; 使用 Western blotting 和激光共聚焦显微镜检测 BVDV 感染后自噬相关蛋白 LC3 和 p62 的表达水平变化。分别构建 *pdia4* 敲低/过表达 MDBK 细胞系, 使用 Western blotting 检测 *pdia4* 敲低/过表达对 LC3 和 p62 蛋白表达的影响, 并用激光共聚焦显微镜观察 GFP-mRFP-LC3 荧光情况。对 *pdia4* 敲低/过表达细胞系分别进行饥饿和巴佛洛霉素 A1 (bafilomycin A1, BafA1) 处理, 感染 BVDV 后用 qPCR 检测 BVDV mRNA 水平, 免

资助项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项(2023A02007-2); 新疆维吾尔自治区“天山英才”青年科技拔尖人才项目(2022TSYCCX0049, 2024TSYCCX0033); 中央引导地方科技发展资金; 新疆维吾尔自治区天山创新团队计划(2025D14006); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2025D01E15, 2025D01A116); 国家自然科学基金(32260881)

This work was supported by the Major Science and Technology Special Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023A02007-2), the “Tianshan Talents” Young Scientific and Technological Leading Talents Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022TSYCCX0049, 2024TSYCCX0033), the Central Government Funds for Guiding Local Scientific and Technological Development, the Tianshan Innovation Team Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2025D14006), the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2025D01E15, 2025D01A116), and the National Natural Science Foundation of China (32260881).

*Corresponding authors. E-mail: SHI Huijun, shihuijunmm@163.com; FU Qiang, fq198505@gmail.com

Received: 2026-02-07; Accepted: 2026-04-07; Published online: 2026-04-16

疫荧光染色技术检测 BVDV dsRNA 水平。【结果】BVDV 感染显著上调内源性 PDIA4 表达；LC3 水平随 BVDV 感染时间延长逐渐升高，p62 先升后降；成功构建 *pdia4* 敲低和过表达细胞系；*pdia4* 敲低细胞中 LC3 和 p62 均显著升高，过表达细胞中 LC3 升高且 p62 降低；在饥饿或 BafA1 处理下，*pdia4* 敲低抑制 BVDV 复制，相反 *pdia4* 过表达促进 BVDV 复制。【结论】本研究表明 BVDV 感染上调宿主 PDIA4 表达，PDIA4 通过调控 LC3 和 p62 激活自噬流，正向促进 BVDV 复制，为解析 BVDV 致病机制及开发靶向防控策略提供理论支撑。

关键词：牛病毒性腹泻病毒；PDIA4；细胞自噬

Protein disulfide isomerase A4 regulates autophagy to promote replication of bovine viral diarrhea virus

QUAN Zichen^{1,2}, LIU Qianshuo^{1,2}, YU Tingting^{1,2}, CHEN Junzhen³, CHEN Rulong⁴, JIN Zheng⁵, SHI Huijun^{1,2*}, FU Qiang^{1,2*}

1 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, China

2 Xinjiang Regional Key Laboratory of Clinical Veterinary Medicine Research, Urumqi, Xinjiang, China

3 Xinjiang Agricultural Vocational and Technical University, Changji, Xinjiang, China

4 Xinjiang Tianlai Agriculture and Animal Husbandry Group Co., Ltd., Bole, Xinjiang, China

5 Ruolang County Station of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Bayingolin, Xinjiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the specific role and molecular mechanism of the host protein protein disulfide isomerase A4 (PDIA4) during bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection, thus providing a theoretical basis for elucidating the role of this protein in viral replication and developing novel prevention and control strategies. [Methods] Western blotting and qPCR were employed to analyze PDIA4 expression in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells following BVDV infection. The expression levels of autophagy-related proteins microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and sequestosome 1 (p62) were measured by Western blotting and laser confocal microscopy. MDBK cell lines with *pdia4* knockdown and overexpression were constructed. The effects of *pdia4* on LC3 and p62 expression were examined, and the autophagic flux was evaluated by a tandem GFP-mRFP-LC3 reporter system. Cells were subjected to starvation or treated with bafilomycin A1 (BafA1), followed by BVDV infection. Viral replication was assessed by measuring BVDV mRNA levels through qPCR and double-stranded RNA (dsRNA) levels through immunofluorescence staining. [Results] BVDV infection significantly upregulated the endogenous expression of PDIA4. The LC3 level increased progressively with infection time, whereas the p62 level showed an initial increase followed by a decrease. The cell lines with *pdia4* knockdown and overexpression were successfully established. *pdia4* knockdown significantly increased both LC3 and p62 levels, whereas *pdia4* overexpression increased the LC3 level and decreased the p62 level. Under starvation or BafA1 treatment, *pdia4* knockdown inhibited BVDV replication, whereas *pdia4* overexpression promoted BVDV replication.

[Conclusion] BVDV infection upregulates host PDIA4 expression. PDIA4 promotes BVDV replication by activating the autophagic flux through regulation of LC3 and p62. These findings provide new insights into the pathogenic mechanism of BVDV and offer a theoretical basis for developing targeted antiviral strategies.

Keywords: bovine viral diarrhea virus (BVDV); protein disulfide isomerase A4 (PDIA4); autophagy

牛病毒性腹泻(bovine viral diarrhea, BVD)是由牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)感染引发的一种高度接触性传染病,其流行范围广、传播速度快,对养牛业危害严重^[1]。BVDV的危害兼具直接经济损失与间接防控成本:既导致动物死亡、生产性能下滑,又产生疫病防控相关的额外投入,已然成为全球范围内危害最严重的牛传染病之一^[2]。同时,持续性感染(persistently infected, PI)牛的管理、疫苗接种、诊断检测及治疗费用将进一步增加养殖场运营成本,单头感染牛年均直接经济损失达 42.1 EUR^[3]。目前,针对 BVDV 的防控主要依赖疫苗接种,但由于病毒基因型多样、易发生变异,现有防控措施仍存在局限性,因此深入探究 BVDV 的复制机制及宿主细胞的抗病毒调控网络具有重要意义。

蛋白二硫键异构酶 A 成员 4 (protein disulfide isomerase A4, PDIA4)属于蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)家族,是一类定位于内质网的催化酶。其核心功能为介导蛋白质二硫键的形成、断裂与重排,通过调控这一过程参与蛋白质的氧化折叠,确保蛋白质获得正确的空间构象。已有研究表明,PDIA4 在病毒的复制过程中发挥调控作用^[4]。PDI 家族通过自噬/自噬溶酶体途径抑制了埃博拉病毒结构蛋白的表达^[5]; *pdi1*、*pdi3*、*pdi4* 敲低能够降低 A 型和 B 型流感病毒在细胞中的复制^[6]; PDIA1、PDIA3、PDIA4 和 PDIA6 增加戊型肝炎病毒 ORF3 蛋白的表达,并且 PDIA3 和 PDIA6 与 ORF3 蛋白相互作用,从而促进戊型肝炎病毒的复制^[7]。然而,PDIA4 在 BVDV 复

制及相关调控机制中的作用尚未明确。

细胞自噬是真核生物中一种高度保守的细胞降解过程,通过形成自噬体包裹胞内异常蛋白、受损细胞器等物质,并与溶酶体融合完成降解,在维持细胞稳态、抵御病原体感染等过程中发挥双重作用。研究证实,自噬与 BVDV 的感染过程密切相关,能够显著影响病毒的复制与增殖^[8]。近年来研究发现,BVDV 感染与宿主细胞自噬之间存在复杂而精细的相互作用,病毒通过多种机制劫持自噬通路以促进自身复制与免疫逃逸,BVDV 的非结构蛋白 NS4B 抑制 mTOR 磷酸化,降低 p62 蛋白水平并增加 LC3-II 转化,直接诱导自噬流^[9];同时,BVDV 还可通过下调宿主 miRNA (bta-miR-221)解除对自噬关键基因 *atg7* 的抑制,激活 ATG7/LC3 自噬通路^[10]。PDIA4 是连接内质网应激和自噬的关键分子,通过 IRE1 α -XBP1s 分支介导的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)通路调控自噬流,PDIA4 缺失可特异性激活 IRE1 α -XBP1s 信号,导致细胞增殖受损和 G1 期阻滞,并伴随自噬通量的改变^[11],同时,PDIA4 本身可作为自噬降解的底物,研究发现 PDIA4 通过激活 PERK/ATF4/SLC7A11 轴增强肾癌细胞的铁死亡抗性;盐霉素(salinomycin, Sal)通过自噬降解 PDIA4,解除该抗性、诱导铁死亡、抑制肿瘤^[12]。目前,PDIA4 已被发现参与调控多种细胞过程,如免疫应答调控、细胞凋亡和自噬等^[13],但其是否通过影响自噬来调节 BVDV 复制目前尚不明确。

前期研究已证实 *pdi4* 是 BVDV 感染后差异表达的基因^[14]。本研究拟进一步探究 BVDV

感染后 PDIA4 的表达特征, 通过构建 *pdia4* 敲低与过表达细胞系, 验证其过表达是否可促进细胞自噬流的发生, 初步阐明 PDIA4 是否通过介导自噬信号通路参与调控 BVDV 增殖过程, 以期揭示 BVDV 致病机制、开发靶向抗 BVDV 防控手段提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和病毒

人胚肾细胞 HEK-293T 及牛肾细胞 MDBK, 中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库、BVDV 毒株 TC (BVDV 1b 亚型, CP 型)、大肠杆菌 Stbl3 细胞均由本实验室保存。pLenti-GFP (17448)、ptfLC3(21074)、pMD2. G(12259)、pSPAX2(12260)、lentiCRISPR v2(53961) 购自 Addgene 公司。

1.2 主要试剂和仪器

Anti-dsRNA mAb J2, SCICONS 公司; LC3 抗体, Abcam 公司; Anti-p62 (SQSTM1) pAb, MBL 公司; PDIA4 多克隆抗体(14712-1-AP)、GAPDH 多克隆抗体(10494-1-AP)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L) (SA00001-2)和 CoraLite594 标记驴抗小鼠 IgG(H+L) (SA00013-7), Proteintech 公司。

实时荧光定量 PCR 仪, 福际生物技术有限公司(成都); 倒置荧光显微镜, Nikon 公司; 低温高速离心机, ThermoFisher Scientific 公司; 二氧化碳细胞培养箱, Galaxy 公司。

1.3 BVDV 感染后 PDIA4 表达水平检测

1.3.1 qPCR 检测 *pdia4* 表达水平变化

BVDV 感染 MDBK 细胞 48 h 后收集细胞, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 反转录合成 cDNA。反转录体系(10 μ L): 2 $\times$ RT OR-EasyTM Mix 5.0 μ L, 总 RNA 500.0 ng, RNase-Free ddH₂O 补足至 10.0 μ L。反应程序: 42 $^{\circ}$ C 逆转录 15 min, 85 $^{\circ}$ C 失活 5 min。设计 PCR 特异性引

物(表 1), 由擎科生物股份有限公司西安分部合成。以 cDNA 为模板, 采用 qPCR 试剂盒检测 *pdia4* mRNA 表达水平, 内参基因为 *gapdh*。qPCR 反应体系(20 μ L): 2 $\times$ Real PCR EasyTM Mix-SYBR 10 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, DNase-Free ddH₂O 5.6 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 95 $^{\circ}$ C 熔解 30 s。

1.3.2 Western blotting 检测 PDIA4 表达水平变化

收集 BVDV 感染 48 h 的 MDBK 细胞, 加入 RIPA 裂解液(含终浓度 1% 的 PMSF 与磷酸酶抑制剂)提取总蛋白, 使用 BCA 法测定总蛋白浓度。取等量总蛋白进行 SDS-PAGE, 转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入兔源 PDIA4 (1:5 000)及兔源 GAPDH (1:5 000)一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤后, 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗, 室温孵育 1 h, 经 ECL 化学发光试剂盒显影, ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 PDIA4 蛋白的相对表达量。

1.4 BVDV 感染后细胞自噬水平变化检测

1.4.1 Western blotting 检测细胞自噬水平变化

将 MDBK 细胞接种至 6 cm 细胞培养皿,

表1 *pdia4*和*GAPDH*的qPCR引物序列

Table 1 qPCR primer sequences for *PDIA4* and *GAPDH*

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Product size/bp
<i>pdia4</i> -qPCR-F	TCCAGGACCCAGGAAGAAATTG	140
<i>pdia4</i> -qPCR-R	TCTACCAGGATGATGTCGGC	
<i>gapdh</i> -qPCR-F	AAGGTCGGAGTGAACGGATT	178
<i>gapdh</i> -qPCR-R	RCGTTCTCTGCCTTGACTGTG	

感染 BVDV (MOI=1), 于感染后 12、24、36、48 h 收集细胞, 提取总蛋白, Western blotting 检测自噬标志蛋白 LC3 和 p62 的表达水平。

1.4.2 激光共聚焦显微镜观察 LC3 定位情况

将 ptfLC3 与慢病毒包装质粒 pSPAX2、pMD2.G 按照质量比 2:2:1 混匀, 同时加入 5 倍体积浓度为 1 mg/mL 的 PEI 转染试剂, 共转染至 HEK-293T 细胞中, 48 h 后收集含有慢病毒颗粒的细胞悬液, 室温 1 500 r/min 离心 5 min, 上清过滤清除细胞碎片, 将获得的慢病毒液与相等体积完全培养基混合, 加入悬浮 MDBK 细胞中, 并添加终浓度为 8 µg/mL 的聚凝胺, 经嘌呤霉素(终浓度为 6 µg/mL)筛选 3 代次后感染 BVDV (MOI=1), 分别在感染后 24 h 和 48 h 于荧光显微镜下观察荧光情况。红绿荧光同时存在表明自噬流受阻, 当绿色荧光淬灭, 仅存在红色荧光时表明自噬流通畅。

1.5 *pdia4* 敲低/过表达细胞系的构建

1.5.1 *pdia4* 敲低载体构建

根据 GenBank 数据库中 *pdia4* 基因序列(登录号为 415110), 使用 Benchling (www.benchling.com)和 ChopChop (www.chopchop.cbu.uib.no)网站设计 sgRNA, 其序列见表 2, 由北京擎科生物工程股份有限公司合成 *pdia4* sgRNA 和 Scramble 序列, 并克隆至 LentiCRISPR v2-puro 载体中, 构建 LentiCRISPR v2-puro-*pdia4* sgRNA1/sgRNA2/sgRNA3/Scramble 质粒。

1.5.2 *pdia4* 过表达载体构建

从 GenBank 数据库获取 *pdia4* 基因(登录号为 415110) CDS 序列, 交由北京擎科生物工程股份有限公司合成 *pdia4* 基因并克隆至慢病毒质粒 pLVML-Myc-MCS-IRES-Puro 中, 构建 pLVML-Myc-*pdia4*-IRES-Puro 质粒。

1.5.3 *pdia4* 敲低/过表达细胞系的构建

采用无内毒素质粒小提试剂盒提取质粒, 分别将 LentiCRISPR v2-puro-*pdia4* sgRNA1/

表2 sgRNA序列

Table 2 sgRNA sequences

Primer names		Primer sequences (5'→3')
<i>pdia4</i> sgRNA1	Forward	GATCCTGAAGAAGGGCCAGG
	Reverse	CTAGGACTTCTTCCCGGTCC
<i>pdia4</i> sgRNA2	Forward	AGTCACACTTGTGCTGACCA
	Reverse	TCAGTGTGAACACGACTGGT
<i>pdia4</i> sgRNA3	Forward	AGGGTCGTTCTCCTTCAAGG
	Reverse	TCCCAGCAAGAGGAAGTTCC
Scramble	Forward	CACCGCACTACCAGAGCTAACTCA
	Reverse	AAACTGAGTTAGCTCTGGTAGTGC

sgRNA2/sgRNA3、Scramble、pLVML-Myc-*pdia4*-IRES-Puro(Myc-*pdia4*)、pLVML-Myc-MCS-IRES-Puro (Myc-MCS) 与慢病毒包装质粒 pSPAX2、pMD2.G 按质量比 2:2:1 混匀, 实验流程同 1.4.2 节。其中分别使用 3 个独立 sgRNA 和混合 sgRNA (sgRNA cocktail)感染 24 h, 得到 *pdia4* KD、Scramble、Myc-*pdia4*、Myc-MCS 细胞系, 通过 Western blotting 和 qPCR 对其进行鉴定。

1.6 *pdia4* 敲低/过表达对细胞自噬的影响

1.6.1 Western blotting 检测自噬相关蛋白 LC3 和 p62 表达水平变化

将 1.5.3 节构建的 Scramble、*pdia4* KD、Myc-MCS、Myc-*pdia4* 四种细胞系分别接种于 6 cm 培养皿, 培养 24 h 后收集细胞, 实验流程同 1.3.2 节, 其中兔源 LC3 和 p62 稀释比例分别为 1:2 000 和 1:5 000。ImageJ 软件分析条带灰度值, 计算 LC3-II/LC3-I 比值及 p62 蛋白相对表达量。

1.6.2 激光共聚焦显微镜观察 LC3 定位情况

为探究 PDIA4 对自噬流的影响, 将 ptfLC3 质粒分别转染至 Scramble、*pdia4* KD、Myc-MCS 及 Myc-*pdia4* 组细胞, 实验流程同 1.4.2 节。48 h 后, 通过共聚焦显微镜观察绿色荧光

蛋白(green fluorescent protein, GFP)和单体红色荧光蛋白(monomeric red fluorescent protein, mRFP)的分布及融合情况。

1.7 PDIA4 调控自噬影响 BVDV 复制检测

1.7.1 qPCR 检测 BVDV 5' UTR 水平

分别经饥饿和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ BafA1 处理 *pdia4* KD 和 *Myc-pdia4* 细胞系 12 h 后, 感染 BVDV (MOI=1), BVDV 感染 24 h 后收集细胞, 提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 使用引物 F (5'-CC TAGCCATGCCCTTAGTAGGACT-3') 和 R (5'-G GAACTCCATGTGCCATGTACA-3') 进行 qPCR, 检测 BVDV 5' UTR mRNA 的表达, 按 1.3.1 节配制 qPCR 反应体系。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。

1.7.2 免疫荧光染色检测 BVDV dsRNA 水平

通过间接免疫荧光试验检测 BVDV 在 *pdia4* KD 和 *Myc-pdia4* 细胞中的分布情况, 经饥饿和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ BafA1 处理 *pdia4* KD 与 *Myc-pdia4* 细胞 12 h 后, 接种 BVDV (MOI=1) 2 h, PBS 冲洗后改用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。用 PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲

醛固定 30 min, 0.1% Triton X-100 透化处理 20 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用 200 μL 预混封闭液(1% 山羊血清+3% BSA+1% Triton X-100), 室温孵育 1 h。与 J2 anti-dsRNA 一抗(1:1 200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 接着室温下用山羊抗小鼠 IgG594(H+L)抗体(1:200)孵育 2 h, 细胞核经 DAPI 染色后, 通过激光共聚焦显微镜进行观察。

1.8 统计学方法

所有实验重复 3 次及以上, 采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析, 所有数据以 mean $\pm$ SD 表示。组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析, *: $P<0.05$ 表示差异显著; **: $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 BVDV 感染对 MDBK 细胞中 PDIA4 表达的影响

BVDV 感染 MDBK 细胞 48 h 后, 采用 qPCR 和 Western blotting 分别检测 *pdia4* 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示, 与未感染对照组相比, BVDV 感染后 *pdia4* mRNA 水平显著上调($P<0.01$), 其蛋白表达水平也显著升高($P<0.01$) (图 1)。

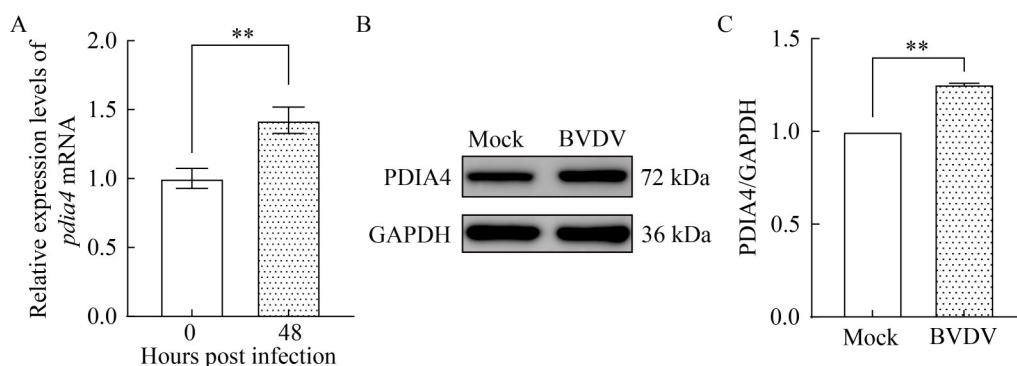


图1 BVDV感染后MDBK细胞中PDIA4的表达

Figure 1 Expression of PDIA4 in MDBK cells following BVDV infection. A: qPCR analysis of *pdia4* mRNA levels after BVDV infection; B: Western blotting analysis of PDIA4 protein expression; C: Quantitative analysis of PDIA4 protein levels normalized to GAPDH. Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments. **: $P<0.01$.

2.2 BVDV 感染对 MDBK 细胞自噬的影响

为分析 BVDV 感染对细胞自噬的影响，在不同感染时间点(12、24、36、48 h)检测自噬相关蛋白的表达水平。结果显示，随着感染时间延长，LC3- II /LC3-I 比值逐渐升高($P<0.01$)，在

36 h 左右达到峰值并维持在较高水平；p62 蛋白表达水平呈先升高后降低的变化趋势($P<0.01$) (图 2A–2C)。免疫荧光结果显示，BVDV 感染 24 h 和 48 h 后，GFP-mRFP-LC3 串联细胞中主要呈现红色荧光信号，绿色荧光明显减弱 (图 2D)。

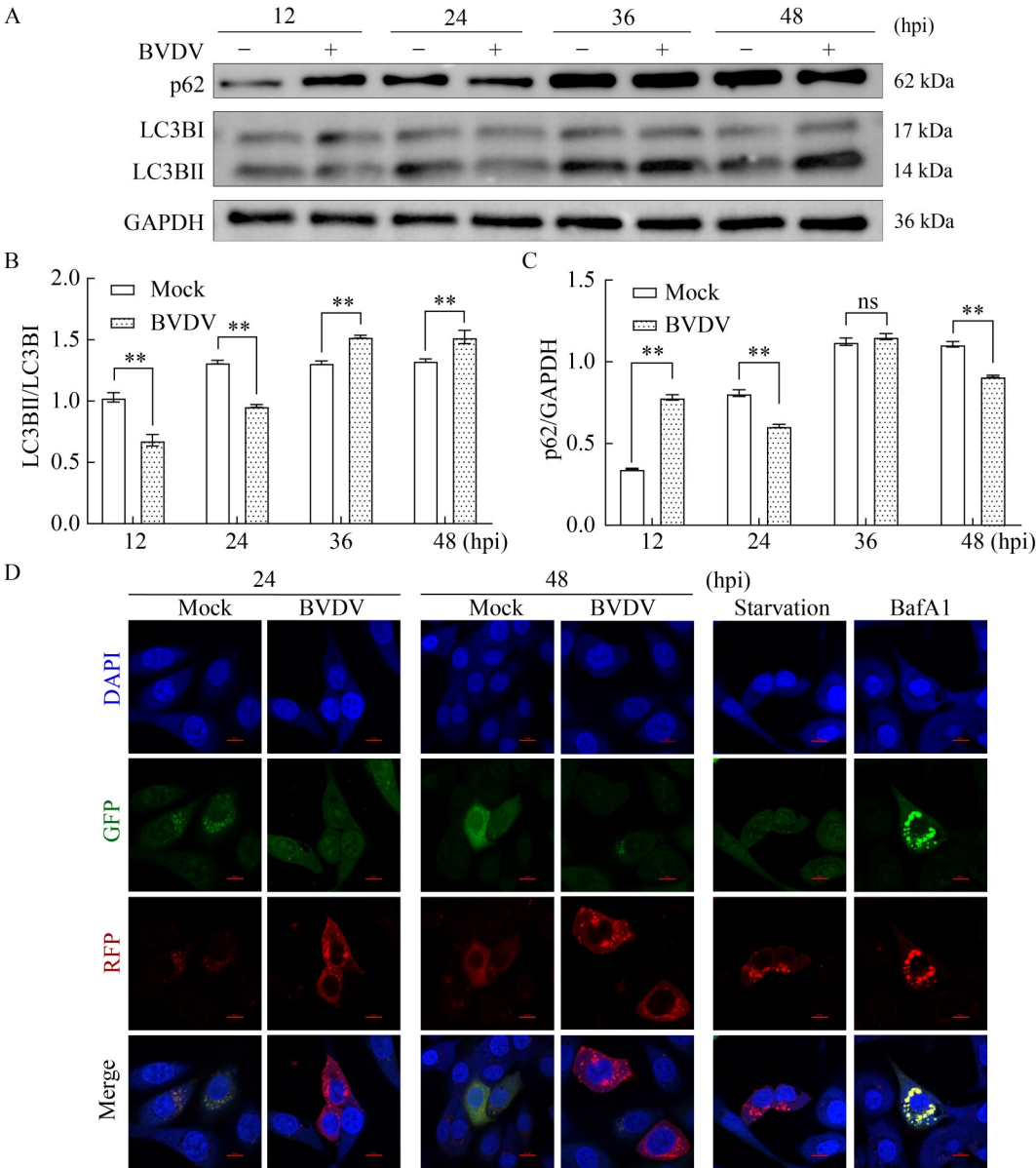


图2 BVDV感染后MDBK细胞自噬水平变化

Figure 2 Autophagy levels in MDBK cells following BVDV infection. A: Western blotting analysis of LC3 and p62 protein expression; B: Quantitative analysis of LC3-II/LC3-I ratio; C: Quantitative analysis of p62 protein levels normalized to GAPDH; D: Confocal microscopy analysis of autophagic flux using GFP-mRFP-LC3 reporter. Data are presented as mean±SD from three independent experiments. **: $P<0.01$.

2.3 稳定敲低/过表达 *pdia4* 细胞系的建立

为验证 *pdia4* 敲低或过表达对 BVDV 的影响, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *pdia4* 敲低或过表达细胞系, 并采用 qPCR 和 Western blotting 检测敲低或过表达效率。结果显示, 与 Scramble 对照组相比, 3 个 sgRNA 或混合 sgRNA (sgRNA cocktail) 均可有效敲低 *pdia4* ($P < 0.01$), 其中 sgRNA2 敲低效率最佳 (图 3A)。Western blotting 结果显示, 3 个 sgRNA 或混合 sgRNA (sgRNA cocktail) 均可使 PDIA4 蛋白表达

水平显著下调 ($P < 0.01$) (图 3C、3D)。综合 qPCR 和 Western blotting 结果, 后续实验均采用 sgRNA2 敲低细胞系完成。同时, 过表达 *pdia4* 后, 其 mRNA 和蛋白水平均显著上调 ($P < 0.01$) (图 3B、3E)。上述结果表明 *pdia4* 敲低和过表达细胞系构建成功。

2.4 *pdia4* 敲低/过表达对细胞自噬的调控作用

为探究 PDIA4 对细胞自噬流的影响, 利用 Western blotting 检测 *pdia4* KD 和 Myc-*pdia4* 细

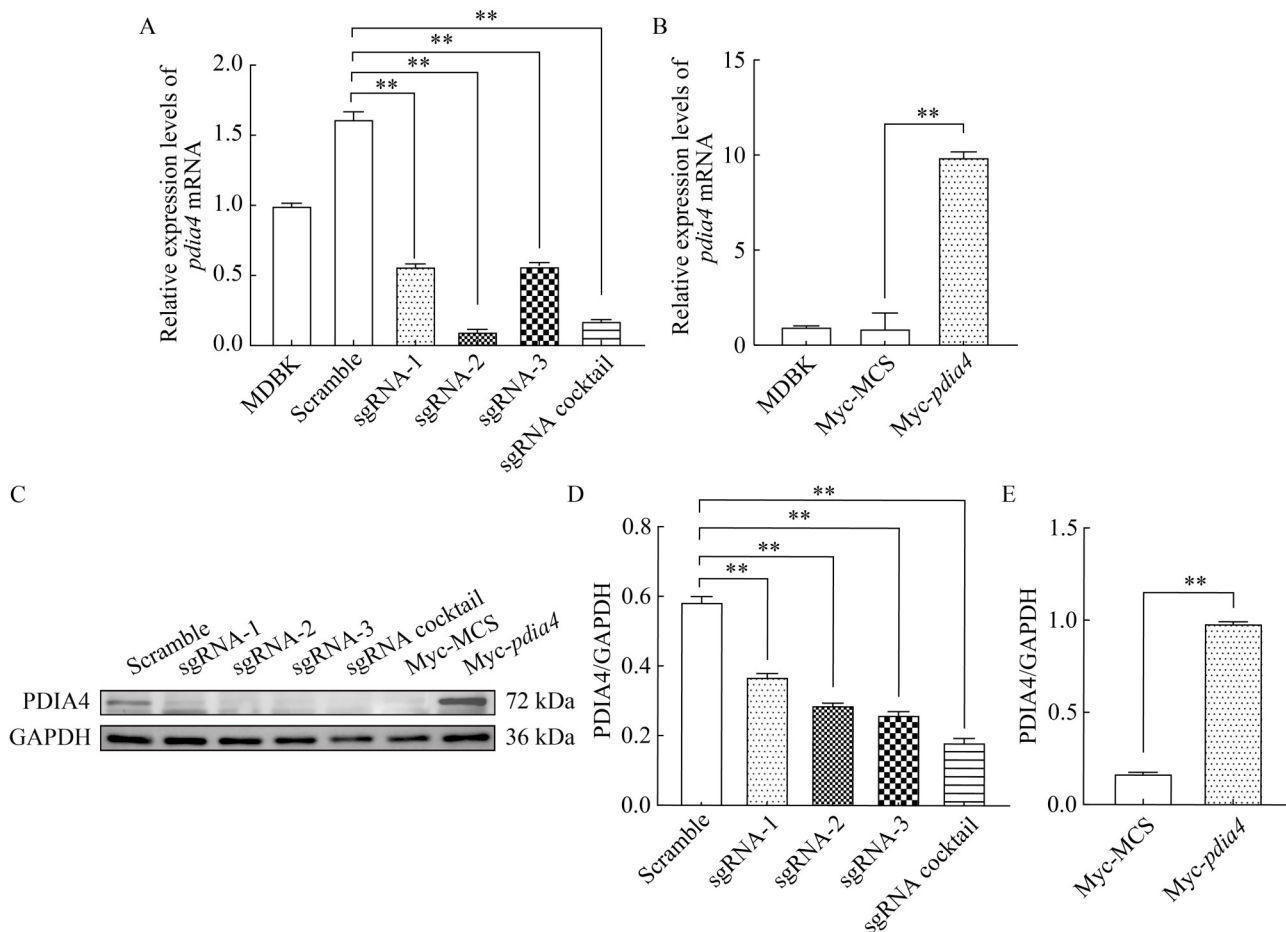


图3 *pdia4*敲低及过表达细胞系的鉴定

Figure 3 Validation of *pdia4* knockdown and overexpression cell lines. A: qPCR analysis of *pdia4* mRNA levels in knockdown cells; B: qPCR analysis of *pdia4* mRNA levels in overexpression cells; C: Western blotting analysis of PDIA4 protein expression; D: Quantitative analysis of PDIA4 protein levels after knockdown; E: Quantitative analysis of PDIA4 protein levels after overexpression. Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments. **: $P < 0.01$.

胞中自噬相关蛋白 LC3 和 p62 的表达水平。与 Scramble 组相比, *pdia4* 敲低后, LC3- II/LC3-I 比值显著升高($P<0.01$), p62 蛋白表达水平也显著升高($P<0.01$) (图 4A–4C)。免疫荧光染色结果显示, GFP-mRFP-LC3 串联细胞中 *pdia4* KD 组细胞内红绿荧光同时存在(图 4D), 表明自噬体形成但未能有效降解, 证实敲低 *pdia4* 阻断了自噬流。与 Myc-MCS 组相比, Myc-*pdia4* 组细胞中 LC3- II/LC3-I 比值显著升高($P<0.01$), 但 p62 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$) (图 4E–4G)。免疫荧光染色结果显示, Myc-*pdia4* 组细胞内绿色荧光淬灭(图 4H), 表明 *pdia4* 过表达可促进自噬流。上述结果说明, *pdia4* 敲低可导致自噬流受阻, 过表达 *pdia4* 可促进自噬流通畅。

2.5 PDIA4 调控细胞自噬影响 BVDV 复制

为检测 PDIA4 是否通过自噬调控 BVDV 复制, 经饥饿和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ BafA1 处理 *pdia4* KD 和 Myc-*pdia4* 细胞系 12 h 后感染 BVDV, 利用 qPCR 和免疫荧光检测细胞内 BVDV 5' UTR mRNA 和 dsRNA 的积累。结果显示, 与 Scramble 组相比, *pdia4* KD 组 BVDV 5' UTR mRNA 表达水平在相同处理条件下均显著降低($P<0.01$) (图 5A), *pdia4* KD 组 BVDV dsRNA 荧光强度也显著低于 Scramble 组(图 5C)。与 Myc-MCS 组相比, Myc-*pdia4* 组 BVDV 5' UTR mRNA 表达水平在相同处理条件下均显著升高($P<0.05$) (图 5B), Myc-*pdia4* 组 BVDV dsRNA 荧光强度显著高于 Myc-MCS 组(图 5D)。上述结果表明, PDIA4 通过促进细胞自噬进而促进 BVDV 的复制。

3 讨论

BVDV 属于黄病毒科瘟病毒属, 呈球形, 直径约 40–60 nm, 有包膜, 其基因组为单股正链 RNA。BVDV 可引起牛的多种疾病, 如呼吸道疾病、消化道疾病、繁殖障碍等, 给养牛业

带来严重的经济损失^[15]。PDIA4 是 BVDV 感染后差异表达的蛋白, 也是最大的 PDI 家族成员之一, 由 645 个氨基酸组成, 含有 3 个经典的 CGHC 活性位点, 主要参与蛋白质折叠和错误折叠蛋白的清除, 对维持细胞内蛋白质稳态至关重要^[16]。同时, PDIA4 还是一种具有细胞内外双向功能的氧化还原酶^[17]: 在细胞内, 它作为内质网定位的蛋白质折叠催化剂, 通过氧化还原活性维持蛋白稳态, 是正常细胞功能的基础保障; 在细胞表面, 它可作为跨膜信号枢纽, 与细胞外因子相互作用, 激活尚未被充分揭示的细胞内通路, 如介导中性粒细胞渗透和甲状腺球蛋白成熟^[18–19]。本研究发现 PDIA4 可显著促进 BVDV 的复制, 这与已有报道中 PDIA4 抑制人类乳头瘤病毒 16 型(HPV16)^[20]和流感病毒复制的结论不同^[21], 但与其促进多瘤病毒侵袭的作用方向一致^[22]。这种差异凸显了 PDIA4 功能的复杂性, 其效应可能高度依赖于特定病毒与宿主相互作用的背景, 提示同一宿主因子在不同感染模型中可能发挥不同的功能。

自噬是一种基本的细胞代谢过程, 可清除异常或多余的细胞内容物, 并通过溶酶体介导的降解回收代谢底物以维持细胞内稳态^[23]。自噬过程的关键标志蛋白包括 LC3 和 p62, LC3 蛋白可分为胞质型 LC3- I 和自噬体膜结合型 LC3- II, LC3- II 水平与自噬活性正相关。自噬接头蛋白 p62 作为连接 LC3- II 与泛素化底物的桥梁, 其水平与自噬活性负相关, 并在自噬溶酶体中被降解^[24]。已有研究表明, 自噬既可能被宿主利用来降解病毒蛋白、抑制猪流行性腹泻病毒复制, 又可被病毒利用其 N 蛋白选择性降解宿主抗病毒蛋白, 从而促进自身复制^[25]。PDIA4 对自噬的调控并非通过随机通路实现, 而是靶向自噬核心分子与关键信号节点发挥精准调控作用: 其主要通过调控 LC3 (*atg8*)的脂化转化、Beclin-1 自噬起始复合物组装、*atg7* 泛素结合系统活性, AKT/mTOR/ULK1 信号轴和 PERK/ATF4 内质网应激通路实现对自噬流的正

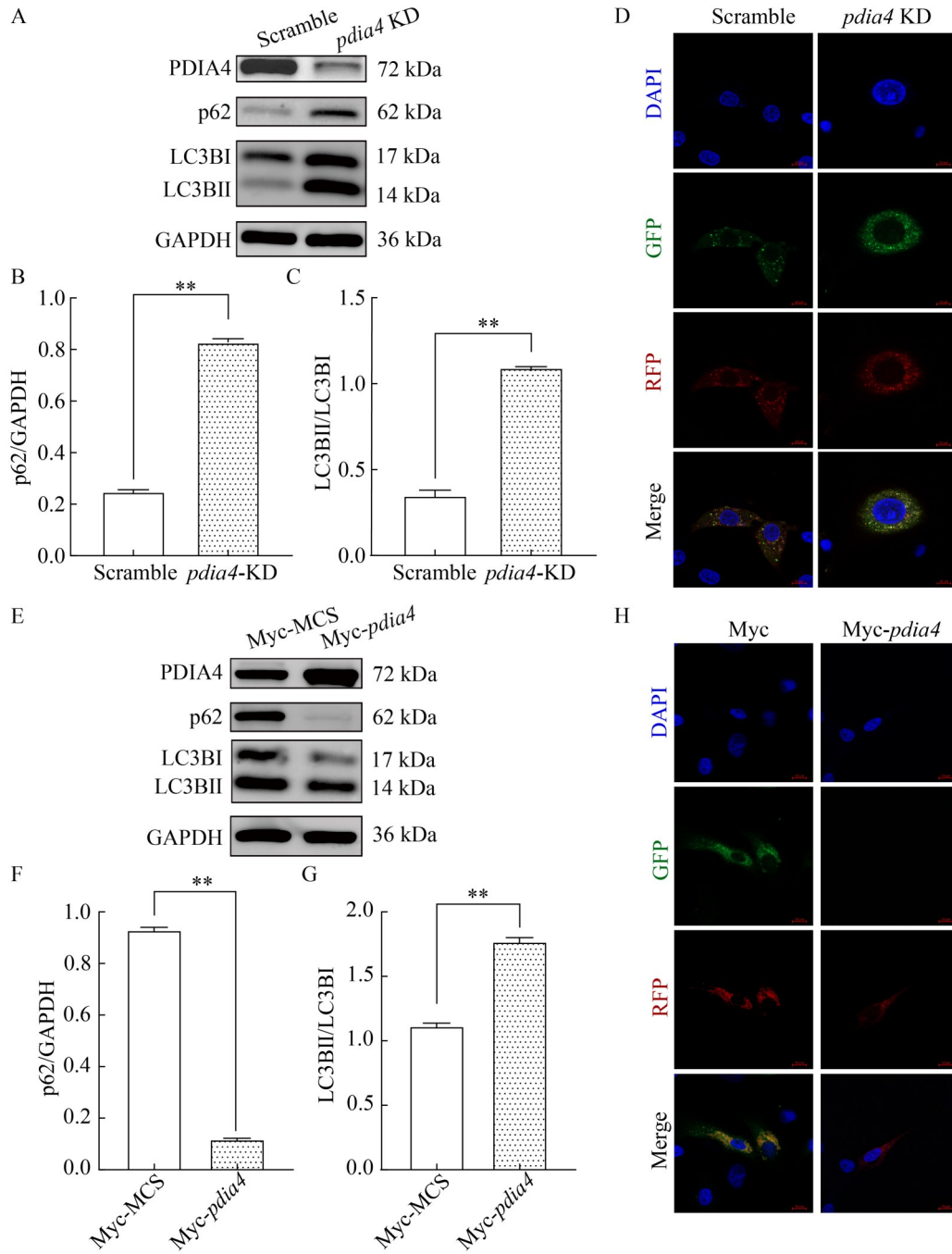


图4 PDIA4对自噬流的调控作用

Figure 4 Effects of PDIA4 on autophagic flux. A: Western blotting analysis of LC3 and p62 in *pdia4* knockdown cells; B: Quantitative analysis of p62 protein levels; C: Quantitative analysis of LC3-II/LC3-I ratio; D: Confocal microscopy analysis of autophagic flux in *pdia4* knockdown cells; E: Western blotting analysis of LC3 and p62 in *pdia4*-overexpressing cells; F: Quantitative analysis of p62 protein levels; G: Quantitative analysis of LC3-II/LC3-I ratio; H: Confocal microscopy analysis of autophagic flux in *pdia4*-overexpressing cells. Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments. **: $P<0.01$.

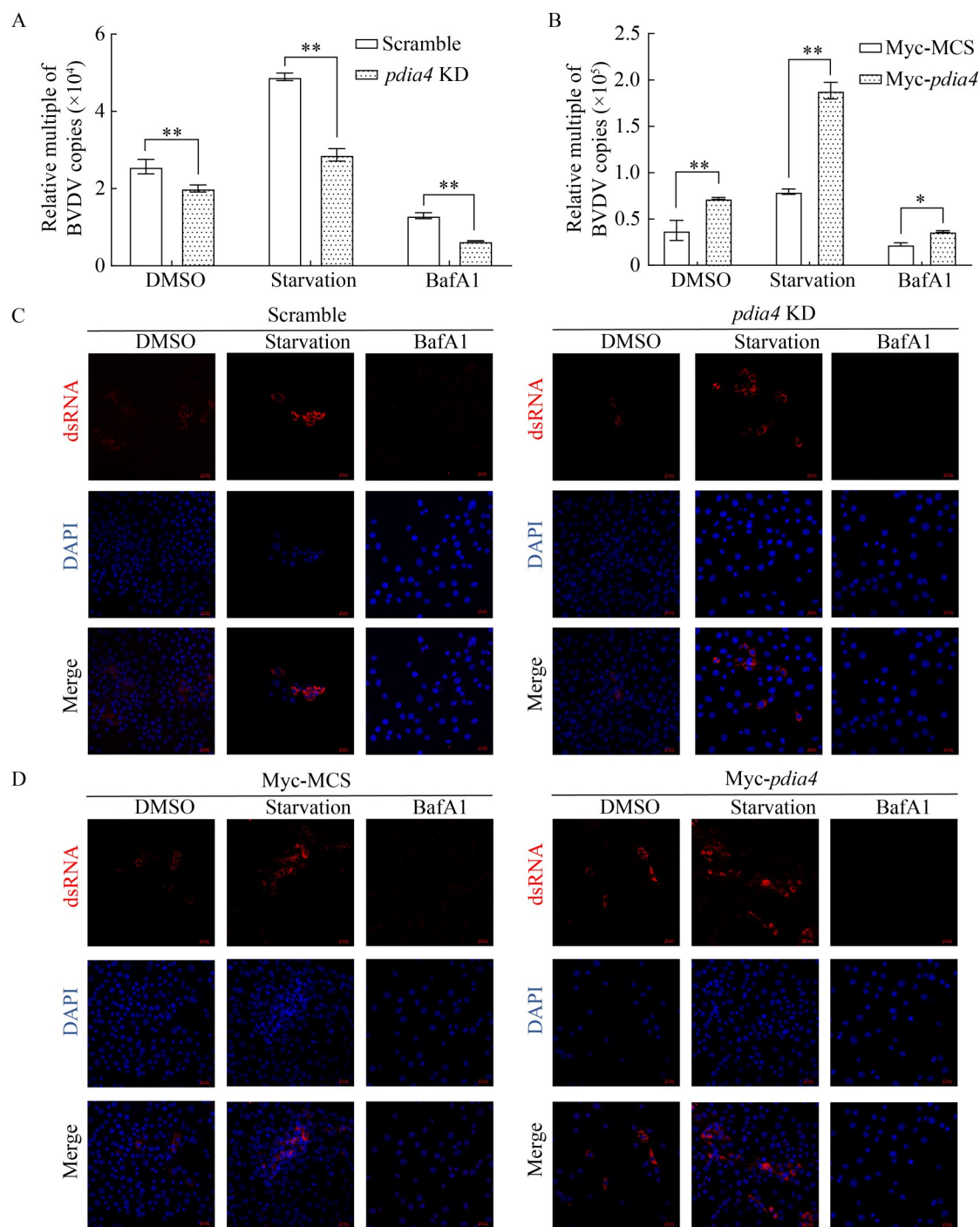


图5 PDIA4通过自噬调控BVDV复制

Figure 5 PDIA4 regulates BVDV replication through autophagy. A: qPCR analysis of BVDV mRNA levels in *pdia4* knockdown cells under autophagy modulation; B: qPCR analysis of BVDV mRNA levels in *pdia4*-overexpressing cells; C: Immunofluorescence detection of dsRNA in *pdia4* knockdown cells; D: Immunofluorescence detection of dsRNA in *pdia4*-overexpressing cells. Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments. **: $P<0.01$; *: $P<0.05$.

向驱动;同时,PDIA4 还可通过靶向线粒体自噬受体 PHB2、解除其对 LC3 的结合抑制进一步强化自噬进程。本研究通过 Western blotting 验证了 BVDV 对自噬的影响。结果显示,BVDV 感染早期(12 h) p62 蛋白水平升高,而在感染后期(24 h 和 48 h) p62 降解显著,同时 LC3- I 向 LC3- II 转化增加,表明 BVDV 感染能够激活细胞自噬,与已有研究结论一致^[26]。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术与慢病毒介导成功构建了 *pdia4* 基因敲低细胞系与过表达细胞系。结果发现,*pdia4* KD 可显著上调 LC3- II 和 p62 的表达,抑制 MDBK 细胞的自噬水平;而 *Myc-pdia4* 在显著上调 LC3- II 的同时使 p62 显著降解,促进 MDBK 细胞的自噬水平。免疫荧光染色检测 GFP-mRFP-LC3 荧光变化显示,*pdia4* KD 细胞中红绿荧光同时存在,表明自噬流受阻;*Myc-pdia4* 细胞中绿色荧光淬灭,表明自噬流通畅,进一步验证了 PDIA4 对自噬的正向调控作用。为探究 PDIA4 影响 BVDV 复制的途径,在 *pdia4* 敲低和过表达细胞中分别经饥饿或 BafA1 处理以促进或抑制自噬后感染 BVDV,利用 qPCR 检测细胞中 BVDV 5' UTR mRNA 水平。结果发现,激活自噬可显著上调 BVDV 5' UTR mRNA 水平,但 *pdia4* KD 组的上调幅度显著低于 Scramble 对照组;抑制自噬则降低 BVDV 5' UTR mRNA 水平,且 *pdia4* KD 组的抑制效应更强。反之,*Myc-pdia4* 组在促进或抑制自噬条件下均可显著增强 BVDV 5' UTR mRNA 水平的变化,说明 PDIA4 通过自噬途径调控 BVDV 的复制。上述结果表明,BVDV 感染可上调宿主细胞内 PDIA4 的表达,而 PDIA4 能够通过促进自噬流进而促进 BVDV 的复制。

尽管本研究明确了 PDIA4 通过自噬正向调控 BVDV 复制的现象与基本过程,但尚未阐明 PDIA4 调控自噬的具体分子靶点及互作机制,同时缺乏动物模型的验证,无法完全反映自然感染过程中 PDIA4 与自噬在 BVDV 致病中的实际作用。后续研究中可寻找 PDIA4 在自噬通路

中的直接互作蛋白以揭示作用靶点,并在动物感染模型中验证靶向 PDIA4 或自噬的干预效果,在体内水平验证 PDIA4 对自噬及病毒复制的调控效应,评估其治疗潜力,以期抗 BVDV 研究提供新靶标。

4 结论

本研究明确了 BVDV 感染可上调宿主细胞内 PDIA4 的表达,且 PDIA4 能够通过促进自噬流来促进 BVDV 的复制。通过实验验证了 BVDV 感染能够激活细胞自噬,以及 PDIA4 对自噬的正向调控作用,并证实 PDIA4 通过自噬途径影响 BVDV 的复制。该发现从分子层面揭示了 BVDV 借助宿主 PDIA4 和自噬通路完成复制的机制,为病毒与宿主相互作用网络提供了新见解。同时,PDIA4 作为关键调控节点,可作为抗 BVDV 感染的潜在宿主靶点,为后续靶向阻断病毒复制通路、研发新型抗病毒药物及开展抗病育种研究提供重要的理论依据,对畜牧业疫病防控具有应用价值。

作者贡献声明

权子晨:实验操作、论文撰写;刘千硕:协助实验操作;于婷婷、陈俊贞:数据处理;陈如龙:提供技术支持;靳征:参与论文讨论;史慧君:研究构思和设计;付强:论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Al-Kubati AAG, Hussen J, Kandeel M, Al-Mubarak AIA, Hemida MG. Recent advances on the bovine viral diarrhea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 665128.
- [2] Fountain J, Brookes V, Kirkeby C, Manyweathers J, Maru Y, Hernandez-Jover M. One size does not fit all: exploring the economic and non-economic outcomes of on-farm biosecurity for bovine viral diarrhoea virus in Australian beef production[J]. *Preventive Veterinary*

- Medicine, 2022, 208: 105758.
- [3] Pinior B, Garcia S, Minviel JJ, Raboisson D. Epidemiological factors and mitigation measures influencing production losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection: a meta-analysis[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(6): 2426-2439.
- [4] Aguilar-Hernández N, Meyer L, López S, DuBois RM, Arias CF. Protein disulfide isomerase A4 is involved in genome uncoating during human astrovirus cell entry[J]. *Viruses*, 2021, 13(1): 53.
- [5] Wang B, Zhang J, Liu X, Chai QQ, Lu XR, Yao XY, Yang ZC, Sun LL, Johnson SF, Schwartz RC, Zheng YH. Protein disulfide isomerases (PDIs) negatively regulate ebolavirus structural glycoprotein expression in the endoplasmic reticulum (ER) via the autophagy-lysosomal pathway[J]. *Autophagy*, 2022, 18(10): 2350-2367.
- [6] Kim Y, Chang KO. Protein disulfide isomerases as potential therapeutic targets for influenza A and B viruses[J]. *Virus Research*, 2018, 247: 26-33.
- [7] Sheng YM, Deng YY, Li XX, Ji PP, Sun XW, Liu BY, Zhu JH, Zhao JK, Nan YC, Zhou EM, Hiscox JA, Stewart JP, Sun YN, Zhao Q. Hepatitis E virus ORF3 protein hijacking thioredoxin domain-containing protein 5 (TXNDC5) for its stability to promote viral particle release[J]. *Journal of Virology*, 2024, 98(4): e01649-23.
- [8] Zhao YQ, Wang XF, Zhang JL, Wu Y, Wang J, Wang JF. Melatonin inhibits bovine viral diarrhoea virus replication by ER stress-mediated NF- κ B signal pathway and autophagy in MDBK cells[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1431836.
- [9] Wang BY, Liu KY, Wei SY, Wang M, Zhou JC, Wu SS, Dong YZ, Ma YX, Liu HY, Yu LQ, Ma JZ, Song BF. BVDV non-structural protein 4B promoted autophagy by regulating p62/LC3- II molecule[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2025, 286: 110973.
- [10] Chen ZH, Wang JY, Lu BC, Meng WX, Zhu YF, Jiang QF, Gao D, Ma ZH, Zeng HJ, Chen JP, Liu SZ, Wang Z, Jia K. Reduction of microRNA-221 in BVDV infection enhances viral replication by targeting the ATG7-mediated autophagy pathway[J]. *Irish Veterinary Journal*, 2025, 78: 10.
- [11] Yu WJ, Zhan JM, Wang YX, Cao X, Yu AY, Rao YX, Huang C, Zhang X, Lu SN, Liu YH, Chen C, Li ZY. Single-cell transcriptomics identifies PDIA4 as a marker of progression and therapeutic vulnerability in multiple myeloma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2025, 23: 1136.
- [12] Kang LC, Wang DK, Shen TY, Liu X, Dai B, Zhou DH, Shen H, Gong JB, Li G, Hu YJ, Wang P, Mi X, Zhang YY, Tan XY. PDIA4 confers resistance to ferroptosis via induction of ATF4/SLC7A11 in renal cell carcinoma[J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(3): 193.
- [13] Xu MW, Xu H, Wan WW, Jian XQ, Jin RM, Wang L, Wang JS, Xiao GF, Zhang LK, Chen HB, Wen YX. PDIA4 is a host factor important for lymphocytic choriomeningitis virus infection[J]. *Viruses*, 2023, 15(12): 2343.
- [14] Li SN, Hu XY, Tian RX, Guo YT, Chen JZ, Li Z, Zhao XY, Kuang L, Ran DL, Zhao HQ, Zhang XH, Wang JQ, Xia LN, Yue JB, Yao G, Fu Q, Shi HJ. RNA-Seq-based transcriptomic profiling of primary interstitial cells of Cajal in response to bovine viral diarrhoea virus infection[J]. *Veterinary Research Communications*, 2019, 43(3): 143-153.
- [15] Zhong JX, Sun F, Zhou M, Fu KQ, Yang HJ. Molecular characteristics and pathogenicity analysis of bovine viral diarrhoea virus strain isolated from persistently infected cattle[J]. *Animals*, 2026, 16(1): 153.
- [16] Li HY, Liu Q, Xiao K, He ZX, Wu C, Sun JJ, Chen X, Chen SH, Yang J, Ma QQ, Su J. PDIA4 correlates with poor prognosis and is a potential biomarker in glioma[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2021, 14: 125-138.
- [17] Wang ZY, Zhang H, Cheng Q. PDIA4: The basic characteristics, functions and its potential connection with cancer[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 122: 109688.
- [18] Menon S, Lee J, Abplanalp WA, Yoo SE, Agui T, Furudate SI, Kim PS, Arvan P. Oxidoreductase interactions include a role for ERp72 engagement with mutant thyroglobulin from the rdw/rdw rat dwarf[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(9): 6183-6191.
- [19] Di Jeso B, Morishita Y, Treglia AS, Lofrumento DD, Nicolardi G, Beguinot F, Kellogg AP, Arvan P. Transient covalent interactions of newly synthesized thyroglobulin with oxidoreductases of the endoplasmic reticulum[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(16): 11488-11496.
- [20] Campos SK, Chapman JA, Deymier MJ, Bronnimann MP, Ozbun MA. Opposing effects of bacitracin on human papillomavirus type 16 infection: enhancement of binding and entry and inhibition of endosomal penetration[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(8): 4169-4181.
- [21] Heaton NS, Moshkina N, Fenouil R, Gardner TJ, Aguirre S, Shah PS, Zhao N, Manganaro L, Hultquist JF, Noel J, Sachs D, Hamilton J, Leon PE, Chawdury A, Tripathi S, Melegari C, Campisi L, Hai R, Metreveli G, Gamarnik AV, Marazzi I. Targeting viral proteostasis limits influenza virus, HIV, and dengue virus infection[J]. *Immunity*, 2016, 44(1): 46-58.
- [22] Walczak CP, Tsai B. A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(5): 2386-2396.
- [23] Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N, Rubinsztein DC, Partridge L, Kroemer G, Labbadia J, Fang EF. Autophagy in healthy aging and disease[J]. *Nature Aging*, 2021, 1(8): 634-650.
- [24] Sánchez-Martín P, Saito T, Komatsu M. p62/SQSTM1: 'Jack of all trades' in health and cancer[J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(1): 8-23.
- [25] Zhai XY, Kong N, Zhang Y, Song YY, Qin WZ, Yang XY, Ye CQ, Ye MQ, Tong W, Liu CL, Zheng H, Yu H, Zhang W, Yang X, Zhang GP, Tong GZ, Shan TL. N protein of PEDV plays chess game with host proteins by selective autophagy[J]. *Autophagy*, 2023, 19(8): 2338-2352.
- [26] Shin SU, Han DG, Cho HC, Kim EM, Choi KS. Non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus 2 induces autophagy to enhance its replication[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2023, 9(1): 405-416.