

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.06.10

# 非洲猪瘟病毒入胞过程相关蛋白及分子机制的研究进展

宋新宇, 夏应菊, 刘业兵\*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心), 国家/WOAH 猪瘟参考实验室, 北京 100081)

[收稿日期] 2023-12-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 06-0079-07 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 非洲猪瘟病毒(ASFV)是非洲猪瘟的病原,可引发家猪和野猪急性、出血性死亡,目前尚无有效的疫苗和抗病毒药物。ASFV 是囊膜病毒,其囊膜蛋白的结构和功能可能是影响病毒入侵和细胞嗜性的重要因素。病毒入胞是病毒感染细胞的第一步,通常是通过细胞表面特定的分子与病毒蛋白相结合吸附于宿主细胞表面,以 ASFV 入胞过程的病毒蛋白或宿主因子为靶点或可有效抑制 ASFV 的复制。从 ASFV 入胞过程中起重要作用的囊膜蛋白出发,了解 ASFV 的入胞分子机制,为 ASFV 入胞深入研究以及治疗性药物和疫苗的研发提供参考。

**[关键词]** 非洲猪瘟病毒;囊膜蛋白;病毒入胞;分子机制

## Advances in Research on Proteins and Molecular Mechanisms of the Entry of African Swine Fever Virus

SONG Xin-yu, XIA ying-ju, LIU Ye-bing\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, National/WOAH Reference Laboratory for Classical Swine Fever, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LIU Ye-bing, E-mail: zjsliuyebing@163.com

**Abstract:** African swine fever virus (ASFV) is the causative agent of African swine fever, which can cause an acute and hemorrhagic disease affecting domestic pigs and wild boars. There is currently no effective vaccine or antiviral drug. ASFV is an enveloped virus, and its envelope protein may be involved in virus invasion and cell tropism. The process of virus entry into cells is the initial step of infecting cell through binding of specific molecules on the cell surface to viral proteins and adsorbing on the host cell surface, so viral proteins or host factors that target ASFV entry may be effective in inhibiting ASFV replication. In this review we summarized the current process in molecular mechanism of ASFV entry into cells, in order to explore the perspective of ASFV membrane protein and its function, which may be important for the development of therapeutic drugs and vaccines.

**Key words:** African swine fever virus; envelope protein; viral endocytic process; molecular mechanism

基金项目:“十四五”国家重点研发计划:非洲猪瘟活载体疫苗评价技术及体系的研究(2021YDF1801405)

作者简介:宋新宇,硕士研究生,从事兽医微生物及免疫学研究。

通讯作者:刘业兵。E-mail: zjsliuyebing@163.com

非洲猪瘟是一种急性、出血性的烈性传染病,几乎可以感染不同日龄的猪,高致病性毒株对猪可造成 100% 的死亡,世界动物卫生组织将 ASF 列为必须报告的动物疫病之一,目前尚无有效疫苗和药物<sup>[1]</sup>。非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)是该病的病原,其病毒颗粒呈二十面体结构,直径约为 200 nm,病毒衣壳是由类核、核壳、内囊膜、衣壳和外囊膜组成的多层结构<sup>[2]</sup>。病毒基因组是长 170 ~ 194kb 的线性双链 DNA 分子,不同的病毒株,长度不同<sup>[3]</sup>。猪单核-巨噬细胞是 ASFV 感染的主要靶细胞,也是目前可以模拟所有 ASFV 毒株感染的体外系统。此外,ASFV 也可以在某些传代细胞系中实现较低效率的复制<sup>[4]</sup>,如野猪肺泡细胞(Wild boar lung cell, WSL)、猪肾细胞(Porcine kidney cell, PK)和非洲绿猴肾细胞(Verda reno, Vero)等。ASFV 的感染周期始于病毒的粘附和入侵宿主细胞,其内化依赖于病毒与受体结合、膜融合、内吞、囊膜运输和核定位信号传代等多种细胞过程,涉及多种病毒蛋白和细胞相关因子的参与。因此,对 ASFV 入胞机制研究的不断深入,不但可以使我们更好地理解 ASFV 的致病性,而且针对寻找病毒靶点设计抗病毒药物和研制疫苗等具有重要意义。

## 1 介导 ASFV 入胞的病毒蛋白

病毒吸附到宿主细胞膜是病毒入侵细胞的第一步,如流感病毒<sup>[5]</sup>依赖 HA 蛋白与细胞表面受体相结合从而介导病毒入胞。ASFV 基因组庞大且复杂,有 150 ~ 167 个开放阅读框(Open reading frames, ORFs),可以编码 150 ~ 200 种蛋白质,包括 68 种结构蛋白和 100 多种非结构蛋白<sup>[3]</sup>,在病毒感染、复制和免疫逃逸中发挥重要作用。ASFV 是较为特殊的双层囊膜病毒,内外囊膜中包含衣壳蛋白。囊膜蛋白和衣壳蛋白具有良好的抗原性,决定入侵宿主细胞的嗜性<sup>[6]</sup>。

1.1 外囊膜蛋白基本结构及功能 CD2v 是 ASFV 的 EP402R 基因编码的外囊膜蛋白,预测蛋白大小约为 45.3 kD<sup>[7]</sup>,在病毒致病机制、宿主定位和免疫逃逸中起重要作用。该蛋白由 N 端信号肽和一个跨膜结构域组成,其胞外结构域与 T 细胞和 NK 细

胞粘附受体 CD2 具有同源性<sup>[8]</sup>,可介导红细胞吸附受病毒感染的细胞表面。CD2v 胞质结构域,富含脯氨酸的重复序列,已被证明为一种细胞穿透肽<sup>[9]</sup>,其截短蛋白可以通过细胞膜进入细胞,也可携带 EGFP 进入 CHO 细胞。CD2v 与细胞 AP-1 蛋白相互作用,参与病毒的胞内转运。CD2v 胞质部尾端还可与细胞肌动蛋白适配蛋白 SH3P7 结合<sup>[10]</sup>,共定位于受感染细胞的病毒工厂周围,从而参与囊泡转运和信号转导等多种细胞功能。该蛋白也显示了良好的抗原性,CD2v/EP402R 基因缺失的 BA71  $\Delta$ CD2v 重组病毒对亲本强毒 ASFV BA71 株攻击的猪提供了保护作用<sup>[11]</sup>。

P12 是 ASFV 感染晚期表达的蛋白<sup>[12]</sup>,由 O61R 基因编码,蛋白大小为 6.7 kD,定位于病毒外囊膜蛋白,但也有学者认为其定位于病毒的内囊膜。利用杆状病毒表达并纯化的 P12 能阻断 ASFV 与易感细胞特异性结合从而阻止其感染<sup>[13]</sup>,这表明 P12 参与了 ASFV 病毒颗粒识别易感细胞中某种尚未未知的特异性受体,但其作为介导 ASFV 入胞的作用机制仍需进一步研究。

1.2 内囊膜蛋白基本结构及功能 P22 由 ASFV 基因 KPI77R 编码,蛋白大小为 20 kD,定位于病毒颗粒的内囊膜。最近,用高通量液相质谱鉴定了与 P22 相互作用的宿主蛋白<sup>[14]</sup>,GO 分析显示,P22 作为内囊膜蛋白在病毒结合和进入细胞中的可能发挥作用。KEGG 分析结果表明,ASFV P22 可与某些细胞途径,如环状 GMP 依赖性蛋白激酶(cGMP-PKG)信号传导途径、cAMP 信号传导途径和 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)信号传导途径,其中 cAMP 和 AMPK 分子与病毒复制密切相关,这些细胞通路揭示了 P22 能够影响 ASFV 复制。

P30 是由 ASFV 病毒基因 CP204L 编码的早期病毒蛋白,相对分子量约为 30 kD,也称 P32。P30 具有良好的抗原性,是病毒内化到宿主细胞中的重要蛋白<sup>[6]</sup>。P30 参与了肺泡巨噬细胞(Porcine alveolar macrophages, PAM)和 Vero 细胞感染周期的早期阶段<sup>[15]</sup>,用抗 P30 抗体预处理 PAM 和 Vero 细胞,可抑制 95% 以上的病毒内化。研究发现 P30

可能与宿主蛋白 RPSA、DAB2、CAPG 和 ARPC5 的相互作用,从而参与了网格蛋白和巨胞饮作用介导的病毒内化过程<sup>[16]</sup>。

P54 是 ASFV 重要的结构蛋白之一,由 ASFV 基因 E183L 编码的早期表达蛋白<sup>[6]</sup>,大小为 25 kD,定位于内质网衍生出的内囊膜。P54 是 ASFV 主要的感染蛋白,也是病毒附着蛋白,在病毒吸附和复制方面发挥着重要作用,P54 抗体可抑制病毒与细胞的结合<sup>[17]</sup>。它可以接近细胞质中的动力蛋白,并特异性结合其轻链 LC8<sup>[18]</sup>,进而调控 ASFV 的胞内运输。

PE199I 又称为 J18L,是由 ASFV E199I 基因编码,蛋白大小为 20 kD,该蛋白的序列在不同的 ASFV 毒株高度保守,定位于 ASFV 内囊膜,N 端在胞膜外,C 端在胞内,为 I 型跨膜蛋白。研究表明,缺失 E199L 基因的 ASFV 病毒粒子不能完成膜融合<sup>[19]</sup>,此外,也不表达早期标记蛋白(P32)和晚期标记蛋白(P72),结果表明,缺乏 PE199L 蛋白病毒颗粒在早期病毒基因表达之前就已停止感染。

E248R 基因编码的 PE248R,蛋白大小为 28 kD,

定位于内囊膜,其序列 N 端包含肉豆蔻酰化位点,氨基酸序列 C 端为跨膜结构域,与痘病毒 L1 蛋白的氨基酸序列高度相似,病毒膜融合发挥了关键作用<sup>[20]</sup>。PE248R 是病毒进入细胞和膜融合所必需的,对比野生型毒株,E248R 缺失毒株感染细胞病毒滴度下降超过了 100 倍,且感染性也显著性降低<sup>[19]</sup>。

除了上述蛋白,衣壳蛋白也能够影响 ASFV 入侵的过程。P72 作为 ASFV 的重要抗原蛋白,是病毒二十面体的主要成分,衣壳蛋白可作为病毒吸附蛋白与宿主细胞受体分子结合,从而使得病毒吸附于细胞表面,还可以在感染初期将病毒基因组传递至宿主细胞。研究发现,不同浓度的抗 P72 抗体以剂量依赖的方式显著降低 ASFV 感染,此外,还证实 ASFV 病毒粒子通过 P72 与细胞膜 CD1d 蛋白相互作用介导 ASFV 进入细胞<sup>[21]</sup>。目前已知的 ASFV 蛋白结构很少,其中大部分蛋白的功能尚不清楚。因此,解析 ASFV 蛋白的结构和功能,可以更清楚地了解病毒与宿主之间的相互作用,以及 ASFV 复制和传播机制。

表 1 ASFV 囊膜蛋白及其功能

Tab 1 ASFV envelope proteins and their function

基因名称	蛋白名称	蛋白大小/kD	主要功能	参考文献
EP402R	CD2v	45.3	介导红细胞吸附,可作为细胞穿透肽,参与囊泡转运和信号转导等多种细胞功能	[7-11]
O61R	P12	6.7	ASFV 与宿主细胞结合的配体,介导病毒与特定受体相互结合	[12-13]
KP177R	P22	20	参与病毒内化和复制的细胞信号转导途径	[14]
CP204L	P30	30	可能参与了网格蛋白和巨胞饮作用介导的病毒内化过程	[6,15-16]
E183L	P54	25	可以结合动力蛋白轻链 LC8,发生特异性结合来调控 ASFV 的胞内运输	[6,17-18]
E199I	PE199I	20	促进 ASFV 与细胞膜融合	[19]
E248R	PE248R	28	促进 ASFV 与细胞膜融合	[19-20]

## 2 ASFV 跨膜过程及分子机制

病毒进入宿主细胞不仅是感染的第一步,也是细胞嗜性和致病性的关键因素。ASFV 基因组庞大且结构复杂,进入细胞途径和机制也有一定的复杂性,涉及与细胞受体相结合、信号激活和内吞作用等。

**2.1 ASFV 与细胞受体** 病毒受体是存在于宿主细胞膜表面能够被病毒吸附蛋白识别并与其结合的分子复合物,不仅是引起病毒感染的第一步,还决定了病毒的宿主范围、组织以及细胞嗜性。关于 ASFV 进入 Vero 和 PAM 细胞的研究表明,ASFV 是通过受体介导的内吞和沿溶酶体内途径转运进入细胞的,这种途径依赖于温度、能量、胆固醇和低 pH 值<sup>[22]</sup>,但 ASFV 细胞受体尚不明确。细胞表面的 I 型跨膜糖蛋白 CD163 曾被认为是 ASFV 的受体之一,该受体的细胞外结构域由 9 个富含半胱氨酸的清道夫受体结构域组成,约有 100 ~ 110 个氨基酸残基<sup>[23]</sup>,主要存在于巨噬细胞表面。当猪外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分化为成熟的巨噬细胞时,CD163 的表达增加,ASFV 感染也随之增加。当巨噬细胞与抗 CD163 特异性抗体孵育时,ASFV 与细胞的结合减少 50% 以上<sup>[24]</sup>。然而,CD163 在 ASFV 感染中的作用还存在争议,虽然 CD163 基因敲除的猪对 Georgia07 株 ASFV 有一定的抵抗力,但仍会被感染<sup>[25]</sup>。Siglec - 1 为免疫球蛋白类凝集素受体,又称 CD169,通常在巨噬细胞上高水平表达,也被描述为多种病毒的受体,如可介导猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)的内吞过程<sup>[26]</sup>。ASFV 对同时过表达 CD163 和 CD169 的 PK15 和 3D4 - 21 感染能力与野生型细胞相比明显增强,还发现在 PAM 细胞中沉默 CD163 和 CD169 能显著抑制 ASFV 感染<sup>[27]</sup>,这说明了 CD169 也可能是 ASFV 的潜在受体,需要进一步验证 CD169 和 CD163 如何参与 ASFV 进入细胞。

**2.2 网格蛋白介导的内吞作用** 当病毒与细胞表面受体结合后,网格蛋白在细胞膜聚集,细胞膜凹

陷形成 85 ~ 110 nm 内陷小窝,如图 1 所示途径 1,在动力蛋白的介导下内陷小窝最终脱离细胞膜,形成网格蛋白包被囊泡,最终将内吞物质传递给内体<sup>[28]</sup>。这个过程依赖能量和各种衔接蛋白,如网格蛋白相关的衔接复合物 - 2(AP - 2)、EPS15 和 AP180 等。许多病毒依赖该方式完成细胞入侵,如囊膜病毒——丙型肝炎病毒<sup>[29]</sup>。Hernaez B 等<sup>[30]</sup>证实 ASFV 结构蛋白 P17(pE120R)和网格蛋白存在共定位关系,用细胞膜抑制剂、网格蛋白抑制剂和内陷小窝形成抑制剂等孵育细胞,发现 ASFV 在细胞中的感染明显降低且呈现出剂量依赖性关系,结果表明网格蛋白和动力蛋白介导 ASFV 的内吞作用。Weng 等<sup>[21]</sup>证实 ASFV 病毒粒子与宿主膜蛋白结合后,通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞。值得注意的是,网格蛋白形成的包膜囊泡仅适用中小型病毒(50 ~ 100 nm),而 ASFV 细胞外直径为 200 nm,属于大型病毒(200 ~ 300 nm),这表明在 ASFV 入胞过程中可能多种内吞机制相互配合或者有其他蛋白参与膜动力学以促进囊泡变形,从而使得大颗粒病毒有效内化。这在其他大型病毒中已得到证实,如水疱性口膜炎病毒(70 nm × 200 nm)<sup>[31]</sup>通过局部肌动蛋白组装以完成网格蛋白介导的内化。

**2.3 巨胞饮介导的内吞作用** 在某些因素刺激下,细胞膜出现皱褶,形成大且不规则的内吞小泡,非选择性地胞饮细胞外营养物质和液相大分子,如图 1 所示途径 2,细胞的巨胞饮涉及肌动蛋白的驱动、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  的调节以及内吞巨噬细胞机制的典型信号传导过程,如 Rac1 - Pak1 途径、PI3K 和酪氨酸激酶激活等<sup>[32]</sup>。因此,对肌动蛋白学和  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  的依赖性等特征来判断病毒是否利用巨胞饮途径进入细胞,痘苗病毒<sup>[33]</sup>、猪伪狂犬病毒<sup>[34]</sup>和牛副流感病毒<sup>[35]</sup>等利用该方式进入宿主细胞。ASFV 进入 Vero 和 IPAM 细胞包括巨胞饮作用的大部分特征,如扫描电镜下可见 ASFV 引起细胞的膜扰动和褶皱现象,使用细胞松弛素 D(肌动蛋白抑制剂)和离子交换剂阿米洛利( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  的抑制剂)则可有效抑制 ASFV 感染和进入细胞<sup>[36]</sup>。然而,关

于 ASFV 通过巨胞饮作用进入细胞的机制一直存在争议, Hernaez 等<sup>[37]</sup>做出了相反的结论, 认为 ASFV 在进入 Vero 或 PAM 细胞的过程中不诱导膜扰动, 推测这些相互矛盾的证据与采用不同方法评估病毒摄取、使用不同的靶细胞类型和非高度纯化的病毒有关, 但是不排除作为专性免疫细胞的巨噬细胞具有非选择性吞噬 ASFV 的情况。

2.4 利用凋亡小体入胞 前期的研究表明, 在酸性情况下, ASFV 通过与细胞表面受体结合, 将病毒包膜与靶细胞膜融合, 进入宿主细胞。ASFV 结构的复杂性也提示了 ASFV 进入细胞过程的复杂性, 可能不仅仅是如之前提及的 CD163 或 CD169 所决

定的。ASFV 可以通过网格蛋白和巨胞饮介导的内吞作用进入宿主细胞, 针对这两种途径的研究, 使用相关的抑制剂, 并不能完全阻止 ASFV 的感染, 说明可能还存在其他的入胞机制。最新的研究发现, ASFV 利用细胞外囊泡—凋亡小体作为胞间传播的载体, 如图 1 所示途径 3。研究发现, ASFV 感染 PAM 细胞并诱导细胞凋亡, 在感染后期释放含有大量病毒粒子的凋亡小体。差速离心方法分离得到高纯度的凋亡小体组分, 可以被 PAM 细胞吞噬并产生有效感染<sup>[38]</sup>, 提示 ASFV 可劫持正常的细胞通路以进行胞间扩散, 以逃避宿主的反应。

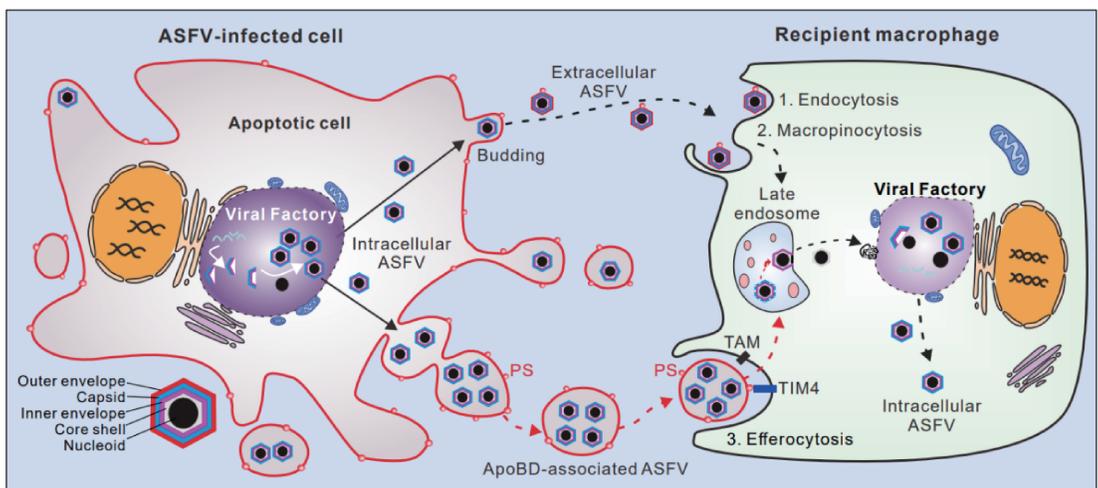


图 1 ASFV 入侵机制模式图<sup>[38]</sup>

Fig 1 Diagram of ASFV intrusion mechanism<sup>[38]</sup>

### 3 抑制 ASFV 入胞药物的研究进展

在有效的 ASFV 疫苗尚未研制出的情况下, 研究抗 ASFV 药物是防控 ASFV 的重要选择, 植物源药物在抗 ASFV 上展示了良好的前景。天然黄酮化合物——芹菜素在体外有抗 ASFV 作用, 尤其是在病毒感染早期作用显著, 能减少 ASFV 复制、抑制蛋白合成和病毒工厂形成。2019 年 Hakobyan A 等<sup>[39]</sup>证实芹菜素衍生物芫花素以剂量依赖性显著抑制 ASFV 的复制, 并在 ASFV 感染早期和晚期使用该药物均可造成病毒滴度和蛋白表达显著下降, 表明芫花素可能影响病毒入胞和出胞过程。2022 年, 国内学者发现可以抑制 ASFV 感染的分子——盐

酸小檗胺<sup>[40]</sup>, 从草药小檗中分离得到的双苄基异喹啉生物碱, 该药物已经被证实对牛病毒性腹泻病毒有抗病毒活性<sup>[41]</sup>, 该药物阻断 ASFV 感染 PAM 细胞、PK15 细胞和 3D4/21 细胞感染的早期阶段, 对 ASFV 有显著的抗病毒作用。最近, 发现一种钙通道阻断剂——汉防己碱, 在体外实验中发现其具备抑制 ASFV 入胞活性, 并阐明了其抗 ASFV 活性的新机制, 主要是通过抑制 PI3K/Akt 通路阻断巨胞饮作用, 有效抑制 ASFV 的内化<sup>[42]</sup>。细胞微管在 ASFV 复制周期中的发挥重要作用, 如病毒进入、细胞内转运和病毒工厂形成等, Sirakanyan 等人<sup>[43]</sup>针对微管蛋白的晶体结构, 利用计算机筛选出能够与

微管蛋白相互作用并抑制 ASFV 感染的新型化合物,故靶向细胞微管形成是针对 ASFV 的抗病毒药物发现中有吸引力的宿主靶点。

病毒入胞过程中的关键靶点可设计出抗病毒药物,但目前报道的抗 ASFV 化合物仅仅是体外研究结果,尚未经过体内试验验证。尽管这些小分子化合物在体外实验中表现出良好的抑制 ASFV 感染的作用,但是具体作用机制还需要进一步研究。

#### 4 小结与展望

非洲猪瘟作为重大接触性传染性疾病,其高度致死性给养殖业带来巨大经济损失。ASFV 颗粒含有多种囊膜蛋白,在病毒内化过程中发挥重要作用。干扰病毒与受体结合是目前设计抗病毒药物的一个重要思路,例如利用 CRISPR/Cas9 技术将造血干细胞中人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)受体基因 *CCR5* 剔除掉,在移植至同时患有艾滋病和急性淋巴细胞白血病患者体内,尽管敲除 *CCR5* 的效率只有 17.7%,在移植四周后,依然有效阻止了 HIV 的复制和感染,并使患者白血病处于完全缓解状态<sup>[44]</sup>。病毒与宿主细胞的相互作用对 ASFV 完成感染至关重要,CRISPR/Cas9 等现代分子生物学技术以及高通量的药物筛选,可为 ASFV 蛋白的空间结构和入胞分子机制的探索提供有力基础,而对 ASFV 受体复合体的进一步研究将有助于深入探索可以使我们针对病毒生命周期中新的靶点研制疫苗设计、抗病毒药物等。总之,深入研究 ASFV 入胞过程将对 ASF 的预防和治疗有重要意义。

#### 参考文献:

[1] Alejo A, Matamoros T, Guerra M, *et al.* A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. *J Virol*, 2018, 92(23): e01293–18.

[2] Gaudreault N N, Madden D W, Wilson W C, *et al.* African swine fever virus: An emerging DNA arbovirus[J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 215.

[3] Njau E P, Machuka E M, Cleaveland S, *et al.* African swine fever virus (ASFV): Biology, genomics and genotypes circulating in Sub-Saharan Africa[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2285.

[4] Meloni D, Franzoni G, Oggiano A. Cell lines for the development

of African swine fever virus vaccine candidates: An update[J]. *Vaccines*, 2022, 10(5): 707.

- [5] Zhao C, Pu J. Influence of host sialic acid receptors structure on the host specificity of influenza viruses[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2141.
- [6] Wang G, Xie M, Wu W, *et al.* Structures and functional diversities of ASFV proteins[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2124.
- [7] 王曼,沈宇清. 非洲猪瘟病毒结构蛋白 CD2v 的功能研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(22): 2734–2744.
- Wang M, Shen Y Q, Progress of functional studies on the structural protein CDZv of African swine fever virus[J]. *Chinese Journal of Immunology*. 2021, 37(22): 2734–2744.
- [8] Zhu J J. African swine fever vaccinology: The biological challenges from immunological perspectives[J]. *Viruses*, 2022, 14(9): 2021.
- [9] Yang S, Zhang X. Identification of a new cell-penetrating peptide derived from the African swine fever virus CD2v protein[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 957–962.
- [10] Pérez N D, García U E, Martínez B M, *et al.* CD2v interacts with adaptor protein AP-1 during African swine fever infection[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123714.
- [11] Monteagudo P L, Lacasta A, López E, *et al.* BA71ΔCD2: A new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities[J]. *J Virol*, 2017, 91(21): e01058–17.
- [12] Lopera M J, Osorio J E, He Y, *et al.* Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and modified vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2017, 185: 20–33.
- [13] Angulo A, Viñuela E, Alcamí A. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12[J]. *J Virol*, 1993, 67(9): 5463–5471.
- [14] Zhu X, Fan B, Zhou J, *et al.* A high-throughput method to analyze the interaction proteins with p22 protein of African swine fever virus *in vitro*[J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 719859.
- [15] Gómez P, Rodríguez F, Oviedo J M, *et al.* Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization[J]. *J Virol*, 1996, 70(8): 5689–5694.
- [16] Chen X, Chen X, Liang Y, *et al.* Interaction network of African swine fever virus structural protein p30 with host proteins[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 971888.
- [17] Rodríguez F, Ley V, Gómez P, *et al.* The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability[J]. *Virus Res*, 1996, 40(2): 161–167.
- [18] Gómez P, Rodríguez F, Oviedo J M, *et al.* The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps

- of virus attachment and both contribute to the antibody – mediated protective immune response [J]. *Virology*, 1998, 243 (2): 461 – 471.
- [19] Matamoros T, Alejo A, Rodríguez J M, *et al.* African swine fever virus protein pE199L mediates virus entry by enabling membrane fusion and core penetration[J]. *mBio*, 2020, 11(4): e00789 – 20.
- [20] Rodríguez I, Nogal M L, Redrejo M, *et al.* The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event[J]. *J Virol*, 2009, (23): 12290 – 300.
- [21] Chen X, Zheng J, Liu C, *et al.* CD1d facilitates African swine fever virus entry into the host cells via clathrin – mediated endocytosis[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12(2): 2220575.
- [22] Angulo A, Aleami A, Viñuela E. Virus – host interactions in African swine fever: The attachment to cellular receptors [J]. *Arch Virol Suppl*, 1993, 7: 169 – 183.
- [23] Akila P, Prashant V, Suma M N, *et al.* CD163 and its expanding functional repertoire[J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413 (7/8): 669 – 674.
- [24] Lithgow P, Takamatsu H, Werling D, *et al.* Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 168(2 – 4): 413 – 419.
- [25] Popescu L, Gaudreault N N, Whitworth K M, *et al.* Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1 [J]. *Virology*, 2017, 501: 102 – 106.
- [26] Zhang X, Guo C. Recent advances in inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through targeting CD163 [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1006464.
- [27] Gao Q, Yang Y, Luo Y, *et al.* Adaptation of African swine fever virus to porcine kidney cells stably expressing CD163 and Siglec1 [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1015224.
- [28] Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin – mediated endocytosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(5): 313 – 326.
- [29] Benedicto I, Gondar V, Molina F, *et al.* Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress[J]. *J Virol*, 2015, 89 (8): 4180 – 4190.
- [30] Hernaez B, Alonso C. Dynamin and clathrin – dependent endocytosis in African swine fever virus entry[J]. *J Virol*, 2010, 84(4): 2100 – 2109.
- [31] Cureton D K, Massol R H, Saffarian S, *et al.* Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(4): e1000394.
- [32] Salloum G, Bresnick A R, Backer J M. Macropinocytosis: mechanisms and regulation [J]. *Biochem J*, 2023, 480 (5): 335 – 362.
- [33] Schmidt F I, Bleck C K, Mercer J. Poxvirus host cell entry[J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(1): 20 – 27.
- [34] Lv C, Lin Y, Sun E Z, *et al.* Internalization of the pseudorabies virus via macropinocytosis analyzed by quantum dot – based single – virus tracking [J]. *Chem Commun*, 2018, 54 (79): 11184 – 11187.
- [35] Pan W, Hui N, Wang H, *et al.* Entry of bovine parainfluenza virus type 3 into MDBK cells occurs via clathrin – mediated endocytosis and macropinocytosis in a acid – dependent manner [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 259: 109148.
- [36] Sánchez E G, Quintas A, Pérez D, *et al.* African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(6): e1002754.
- [37] Hernández B, Guerra M, Salas M L, *et al.* African swine fever virus undergoes outer envelope disruption, capsid disassembly and inner envelope fusion before core release from multivesicular endosomes[J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(4): e1005595.
- [38] Gao P, Zhou L, Wu J, *et al.* Riding apoptotic bodies for cell – cell transmission by African swine fever virus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(48): e2309506120.
- [39] Hakobyan A, Arabyan E, Kotsinyan A, *et al.* Inhibition of African swine fever virus infection by genkwanin [J]. *Antiviral Res*, 2019, 167: 78 – 82.
- [40] Zhu J, Huang L, Gao F, *et al.* Berbamine hydrochloride inhibits African swine fever virus infection *in vitro* [J]. *Molecules*, 2022, 28(1): 170.
- [41] Wang J, Yang G, Zhang L, *et al.* Berbamine hydrochloride inhibits bovine viral diarrhea virus replication via interfering in late – stage autophagy [J]. *Virus Res*, 2022, 321: 198905.
- [42] Qian B, Hu Y, Liu C, *et al.* Tetrandrine (TET) inhibits African swine fever virus entry into cells by blocking the PI3K/Akt pathway [J]. *Virus Res*, 2023, 339: 199258.
- [43] Sirakanyan S, Arabyan E, Hakobyan A, *et al.* A new microtubule – stabilizing agent shows potent antiviral effects against African swine fever virus with no cytotoxicity [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1): 783 – 796.
- [44] Xu L, Wang J, Liu Y, *et al.* CRISPR – edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1240 – 1247.