

## 稳定表达貉犬瘟热病毒细胞受体 SLAM 的 Vero 细胞系的建立及应用

赵建军<sup>1</sup>, 闫如勋<sup>2</sup>, 张海玲<sup>1</sup>, 张蕾<sup>1</sup>, 胡博<sup>1</sup>, 白雪<sup>1</sup>, 邵西群<sup>1</sup>, 柴秀丽<sup>1</sup>, 闫喜军<sup>1,2\*</sup>, 吴威<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 中国农业科学院特产研究所预防兽医研究室, 长春 130112

<sup>2</sup> 吉林特研生物技术有限责任公司, 长春 130122

**摘要:** 【目的】信号淋巴激活分子 (SLAM 又称 CD150) 为犬瘟热病毒 (*Canine distemper virus*, CDV) 的细胞受体。本研究目的在于建立稳定表达犬瘟热易感动物貉 SLAM 基因的 Vero 细胞系, 用于犬瘟热诊断及 CDV 强毒株的快速分离。【方法】从重组质粒 pMD-18-T-rSLAM 扩增 rSLAM 基因编码区, 通过分子克隆技术构建真核表达质粒 pIRES2-EGFP-rSLAMhis。将该质粒转染 Vero 细胞后, 经 EGFP 荧光观察、G418 抗性压力和单细胞克隆化及 RT-PCR 筛选表达 rSLAM 阳性细胞系。应用获得细胞系对临床犬瘟热病例进行病毒分离, 对分离得到 CDV 进行 RT-PCR 鉴定及动物回归试验。【结果】经过 RT-PCR 和免疫组化试验证实, 本实验筛选获得一株能稳定表达 rSLAM 的 Vero 细胞系——Vero-rSLAM。该细胞系接种 CDV 阳性样品 36–48h 即可产生典型 CDV 致细胞融合病变, 而其亲本 Vero 细胞接种至 6d 均无可见细胞病变出现。应用 Vero-rSLAM 细胞系从狐狸、貉犬瘟热阳性病料中分离获得了 3 株犬瘟热病毒。其中犬瘟热病毒 LN(10) fl 株对易感狐狸、貉均可产生致死性感染。【结论】成功建立了稳定表达 rSLAM 的 Vero 细胞系, 用它分离的 CDV 对本动物保持较强的毒力。

**关键词:** 犬瘟热病毒, 貉, 信号淋巴细胞激活分子, Vero 细胞

**中图分类号:** S852      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1515-09

犬瘟热 (Canine distemper, CD) 是由副粘病毒科 (*Paramyxoviridae*) 麻疹病毒属 (*Morbillivirus*) 的犬瘟热病毒 (*Canine distemper virus*, CDV) 感染引起的多种动物共患传染病。其中犬科、鼬科、猫科等肉食兽最为易感, 感染后死亡率为 30%–80%<sup>[1–2]</sup>。近年来随着我国毛皮动物 (水貂、狐狸和貉) 养殖业的快速发展和养殖密度的增大, 犬瘟热在各地毛皮动

物养殖场广泛流行, 已成为威胁毛皮动物养殖业发展的“头号杀手”<sup>[3–4]</sup>。

CDV 分离技术是犬瘟热诊断和病毒致病性研究的重要手段。由于 CDV 囊膜对外界环境的抵抗力弱, 且病毒体外分离培养时缺乏敏感细胞系。造成 CDV (尤其强毒株) 分离成功率较低, 严重阻碍了

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2012ZL088)

\* 通信作者。Tel: +86-431-81158207; E-mail: [jianjunzhao2004@yahoo.com.cn](mailto:jianjunzhao2004@yahoo.com.cn); [yanxijungmp@163.com](mailto:yanxijungmp@163.com)

**作者简介:** 赵建军 (1980–), 男, 山东潍坊人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为犬瘟热病毒分子生物学研究。E-mail: [jianjunzhao2004@yahoo.com.cn](mailto:jianjunzhao2004@yahoo.com.cn)

**收稿日期:** 2012-06-03; **修回日期:** 2012-10-10

对 CDV 病原生物学及致病机制的研究<sup>[5]</sup>。Tatsuo 等(2001)证实 CDV 可利用犬信号淋巴细胞激活分子(SLAM 又称 CD150)作为感染宿主动物的细胞受体<sup>[6]</sup>。Seki 等(2003)应用建立的稳定表达犬 SLAM 的 Vero 细胞系(Vero-DST)较 Vero 和 B95a 细胞更快速且敏感地从犬瘟热病犬体内分离到病毒,分离得到的犬瘟热强毒滴度稳定并具有明显 CPE<sup>[7]</sup>。Ohishi 等(2010)通过对麻疹病毒属病毒(包括 MV、RPV、PPRV、CDV 和 CMV)及其特异宿主(人、牛、绵羊、犬和海豚)SLAM 分子结构研究证实,不同麻疹病毒属病毒对宿主动物交叉感染性与动物 SLAM 基因的遗传关系远近相关<sup>[8]</sup>。赵建军等(2010)分别克隆了犬瘟热易感动物狐狸、貉和水貂 SLAM 基因,并证实该 3 种 SLAM 可分别作为 CDV 感染宿主动物的细胞受体<sup>[9]</sup>。王君玮(2009)等研究显示,狐狸、貉感染 CDV 临床症状及病理变化较水貂更为明显<sup>[10]</sup>。推测 CDV 对不同动物 SLAM 亲和力不同是造成该差异的重要原因之一。

本研究旨在建立一种能稳定表达貉 SLAM 的 Vero 细胞系,该细胞系不仅可用于犬瘟热诊断及病毒强毒株分离,还可以用于不同宿主来源的 CDV 对该细胞系敏感性研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞、病毒和动物:**克隆有貉 SLAM 基因的重组质粒 pMD18-T- $\alpha$ SLAM<sup>[9]</sup>、Vero 细胞均有本实验室保存。2010 年采集自河北、吉林和辽宁省 3 份狐狸和貉 CDV 阳性病料(上海快灵生物技术公司免疫胶体金试纸条检测)由本实验室保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。实验用 6-8 月龄健康易感狐狸和貉(CDV 中和抗体小于 1:8)由中国农业科学院特产研究所毛皮动物实验基地提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:***Xho* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶、*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶和 *Ex Taq* 酶等均购自 TaKaRa 公司;真核表达载体 pIRES2-EGFP 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所仇华吉研究员惠赠;Midiprep High-pure 质粒提取试剂盒购于 Invitrogen 公司,转染试剂 FuGENE<sup>®</sup> HD 购自 Roche 公司,G418 购自 Amersco 公司,DMEM 培养基购自 GIBCO 公司。组氨酸单抗购自 Novagen 公司,免疫组化试剂盒 SP

Kit(Mouse)购自北京博奥森生物技术公司。DMI4000B 倒置荧光显微镜为德国徕卡公司产品。

### 1.2 重组表达载体 pIRES2-EGFP- $\alpha$ SLAMhis 的构建

**1.2.1 PCR 扩增:**以克隆有貉 SLAM 基因的重组质粒 pMD18-T- $\alpha$ SLAM 为模板,以 P1/P2 为扩增上、下游引物(P1:5'-CCG CTCGAG GCCACCATGGAT TCCAGGGGCTTCCTC-3'; P2:5'-CCG GAATTC TCA GTGATGGTGATGGTGCTCTCTGGGAACGTCAC-3',方框内为限制酶切位点,加粗部分为 Kozak 序列,下划线部分为 6 个组氨酸(6  $\times$  His)标签基因)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:模板 1  $\mu\text{L}$  (0.2 ng/ $\mu\text{L}$ ),上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ),*Ex Taq* 酶 0.3  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ),dNTP (各 2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$  5 min;95 $^{\circ}\text{C}$  30 s,62 $^{\circ}\text{C}$  1 min,72 $^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。

**1.2.2 载体的构建:**PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶回收后,经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后与同样酶切的 pIRES2-EGFP 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取菌落培养后提取重组质粒经酶切鉴定阳性重组质粒。阳性重组菌大量培养后经试剂盒纯化质粒使其达到可转染用标准。

### 1.3 G418 筛选浓度的确定

生长状态良好的 Vero 细胞经胰酶消化,按  $1 \times 10^4$  个/孔铺 96 孔板,第 2 天铺满后吸除 DMEM 细胞培养液,用无血清 DMEM 培养液洗细胞一次,每排孔加入含有不同浓度梯度 G418 的 DMEM 筛选培养基(浓度依次为 0、200、300、400、500、600、700、800、900 和 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),每个梯度设 8 个重复。每 3 d 更换一次筛选培养基,连续培养 10 d,每天观察细胞死亡情况,以第 10 天细胞全部死亡的最低 G418 浓度为最适筛选浓度。

### 1.4 Vero 细胞转染及克隆筛选

**1.4.1 细胞转染:**将 pIRES2-EGFP- $\alpha$ SLAMhis 重组质粒用无血清 DMEM 培养液适当稀释后,参照转染试剂 FuGENE<sup>®</sup> HD 说明书,转染长成 Vero 细胞单层的 6 孔 Vero 细胞培养板,并设置未转染质粒对照孔。将转染后细胞板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h,经倒置荧光显微镜观察 EGFP 蛋白表达情况。

**1.4.2 表达 EGFP 阳性细胞克隆的筛选:** 转染 Vero 细胞培养 3 d 更换含 800  $\mu\text{g/mL}$  G418 的 DMEM 筛选培养基, 每 3 d 换新的筛选培养基, 连续培养 10 d。每天观察细胞的生长状态并标记 EGFP 绿色荧光表达细胞簇位置, 待对照孔细胞 90% 以上死亡, 用胰酶消化存活 Vero 细胞簇, 按 1:30 的稀释倍数转入 100 mm 细胞培养皿。如此连续克隆阳性 Vero 细胞 3 次, 筛选 3–5 株稳定表达 EGFP 的 Vero 细胞 G418 抗性克隆株。将该 Vero 细胞克隆株更换为 400  $\mu\text{g/mL}$  G418 的 DMEM 维持培养基连续传代 10 次以上, 按常规方法冻存、复苏 2 次观察其传代稳定性。

**1.4.3 rSLAM 基因转录及蛋白表达检测:** 选取 1 株 EGFP 表达水平较高的 Vero 细胞克隆株第 F10、F15 和 F20 代提取 mRNA, 经 OligodT-18 引物反转录后, 应用引物对 P3/P4 (P3: 5'-CCCTGGGAA GTTGGGAAGCAGTTTG-3'; P4: 5'-GATGACACCAACGATACCCCTAAG-3') 对 rSLAM 基因 mRNA 进行检测; 应用组氨酸单抗对 Vero 细胞克隆株进行免疫组化试验验证 rSLAMhis 融合蛋白表达情况, 同时设置未转染的 Vero 细胞做阴性对照。

### 1.5 Vero-rSLAM 细胞系遗传稳定性分析

按以下方法对 Vero-rSLAM 细胞 F10、F15 和 F20 代及其亲本 Vero 细胞进行染色体众数及染色体畸变率分析: 将细胞系传代 24 h, 加秋水仙素至终浓度 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , 再培养 4 h 后收集细胞; 应用 8 mL 的 0.075 mol/L KCl 在 37℃ 低渗 20 min; 1000  $\times$  g 离心收集细胞; 加新配制固定液 (甲醛 3: 冰醋酸 1) 6 mL, 室温 15 min, 离心弃上清, 重复固定 1 次; 最后加适量固定液滴片, 75℃ 烘烤 2 h, 取出凉至室温, 经 0.25% 等渗胰酶浸润消化 10–15 s, 冲洗凉干, 滴加新配制的 5% Giemsa 染色液滴于玻片, 作用 30 min, 冲洗, 凉干后进行 G 显带, 在油镜下观察计数染色体数目。

### 1.6 细胞生长曲线测定

Vero-rSLAM 细胞经胰酶消化后按  $10^4$  个/孔铺一 24 孔细胞培养板, 连续培养细胞至 6 d, 每培养 24 h 取 2 孔细胞计数取平均值。同时设其亲本 Vero 细胞对照, 根据计数结果绘制细胞一步生长曲线。

### 1.7 CDV 分离与 RT-PCR 鉴定

取 3 份狐狸和貉 CDV 阳性组织病料 (脾脏和肺

脏) 分别用无菌 PBS (pH 值 7.4) 按 1:10 (g/mL) 比例研磨匀浆成悬液。将悬液冻融 2 次后, 于 4℃、8000  $\times$  g 高速离心机离心 20 min, 取上清用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌后置 -80℃ 备用。将处理上清按 1:100 (V/V) 比例接种长成单层的 Vero-rSLAM 细胞, 吸附 1 h 后更换为含 2% 胎牛血清、400  $\mu\text{g/mL}$  G418 的 DMEM 维持液培养 5–6 d, 同时设置正常 Vero 细胞病毒分离对照。每天观察 Vero-rSLAM 和 Vero 细胞状态, 待 60% 以上细胞出现 CPE 时收获病毒。将分离病毒连续传代 2–3 代后, 应用检测 CDV N 基因的 RT-PCR 方法进行病毒核酸鉴定, 试验方法按参考文献<sup>[1]</sup>进行。

### 1.8 CDV 分离株动物接种试验

选择 CDV LN(10) fl 株第 4 代, 进行狐狸、貉攻毒试验。每种动物设攻毒组 3 只, 对照 1 只。采用皮下注射攻毒方式, 攻毒剂量为  $4 \times 10^{2.39}$  TCID<sub>50</sub>/只, 对照组皮下注射 Vero 细胞。每天测定动物直肠体温, 观察记录动物状态。动物死亡前采集外周血分离血清测定 CDV 中和抗体效价, 动物死亡后剖检尸体观察主要组织脏器病变, 同时无菌采集其脾脏、肺脏应用 Vero-rSLAM 细胞系进行 CDV 再分离。

## 2 结果

### 2.1 pIRES2-EGFP-rSLAMhis 表达载体构建结果

以质粒 pMD18-T-rSLAM 为模板, 按方法“1.3”PCR 扩增获得 1100 bp 大小目的片段, 与预期大小相符合。构建得到真核表达质粒 pIRES2-EGFP-rSLAMh 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后生成大小约为 1100 bp 和 5300 bp 两条带 (图略), 表明真核表达质粒构建成功。

### 2.2 G418 最适浓度测定结果

Vero 细胞加不同浓度 G418 培养液后, 从第 2 天筛选组均有少量细胞死亡。筛选至 10 d, 200  $\mu\text{g/mL}$  组 40% 细胞死亡, 600  $\mu\text{g/mL}$  组 90% 细胞死亡, 超过 800  $\mu\text{g/mL}$  各组细胞均全部死亡, 确定 Vero 细胞对 G418 最适筛选浓度为 800  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.3 Vero 细胞系转染及筛选结果

pIRES2-EGFP-rSLAMh 质粒按“1.5”方法转染 Vero 细胞后, 依据荧光显微镜下 EGFP 蛋白表达情况 (图 1-B), 经 G418 抗性连续筛选 EGFP 表达阳性 Vero 细胞克隆 3 次, 最终获得 3 株 EGFP 稳定表达

抗性细胞克隆株。该细胞连续传 10 代以上,按常规方法冻存、复苏 2 次后,荧光显微镜观察表明 Vero

细胞克隆株 EGFP 蛋白能稳定表达(图 1-C)。

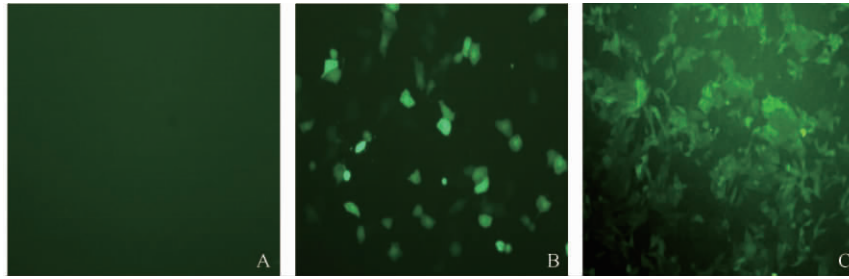


图 1 pIRES2-EGFP-rSLAMh 质粒转染 Vero 细胞后 EGFP 瞬时及稳定表达

Fig. 1 EGFP gene expression in Vero-rSLAM cells by fluorescence microscope. A: Vero cells untransfected; B: Vero cells transfected; C: The F10 passage of Vero cells transfected stably.

## 2.4 rSLAM 基因转录及蛋白表达结果

选取 1 株稳定高表达 EGFP 的 Vero 细胞克隆株 F10、F15 和 F20 代进行 rSLAM 基因 mRNA 的 RT-PCR 检测,结果显示该 Vero 细胞克隆株 3 个不同代次均扩增得到 655bp 特异阳性条带,而其亲本 Vero 细胞扩增结果为阴性(图略)。证实 rSLAM 基因在该 Vero 细胞克隆株的不同 3 个代次的中均发生了基因转录。基于氨基酸单抗的免疫组化试验同样证实该株细胞 rSLAMhis 融合蛋白在 Vero 细胞中的表达(图 2)。将该表达 rSLAM 的 Vero 细胞克隆株命名为 Vero-rSLAM 细胞。

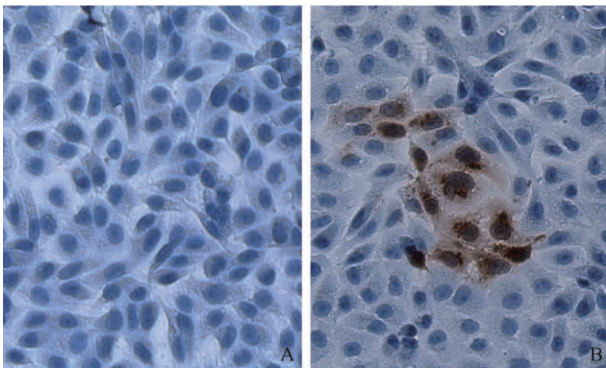


图 2 免疫组化试验对 rSLAMh 融合蛋白表达的检测结果

Fig. 2 rSLAMh fusion protein expression in Vero-rSLAM cells based on His McAb Immunohistochemistry assay. A: Vero cells; B: Vero-rSLAM cells.

## 2.5 Vero-rSLAM 细胞系遗传稳定性分析结果

分别选择 Vero-rSLAM 细胞 F10、F15 和 F20 代及其亲本 Vero 细胞 100 个中期分裂相细胞在油镜(10 × 100)下计数染色体数目,结果显示 3 个不同代次的 Vero-rSLAM 细胞与其亲本 Vero 细胞染

色体众数分布一致主要集中在  $54 \pm 2$  范围,所占比率为 46% - 57%,而染色体断裂、双着丝粒染色体及环状染色体畸变率低于 5%。证实 Vero-rSLAM 细胞系在细胞学上具有较高的遗传稳定性。

## 2.6 Vero-rSLAM 细胞系一步生长曲线

Vero-rSLAM 细胞系连传 10 代,经冻存/复苏 2 次,细胞生长传代依然稳定。Vero-rSLAM 细胞系生长曲线表明,该细胞系与其亲本 Vero 细胞生长特性基本一致。但细胞增殖总数略高于后者。Vero-rSLAM 细胞系传代 3d 进入对数生长期,5d 进入细胞生长平台期(图 3)。

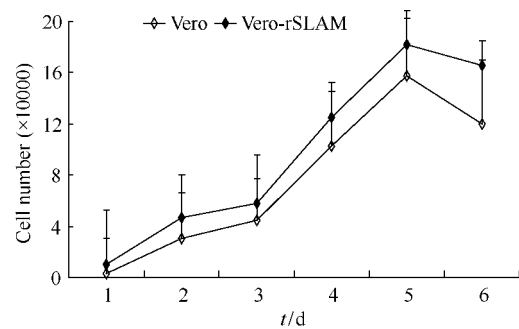


图 3 Vero-rSLAM 细胞系和 Vero 细胞系一步生长曲线

Fig. 3 Growth curve of the Vero-rSLAM cells and Vero cells.

## 2.7 CDV 分离及 RT-PCR 结果

Vero-rSLAM 细胞分别接种 3 份病料后 36 - 48h 开始出现 CPE, LN(10) f1 株接毒细胞在 36h 即出现明显的细胞融合性合胞体, JL(10) r1、HeB(10) f1 株接毒细胞在 48h 开始形成明显 CPE。而同样接种 3 份病料的正常 Vero 细胞接毒至 6d 均未出现特异性 CPE(图 4)。分离病毒连续传 2 - 3 代后, RT-PCR

均扩增病毒培养物均获得 335bp 大小 CDVN 基因片段,与预期大小符合,证实该 3 株病毒为 CDV。

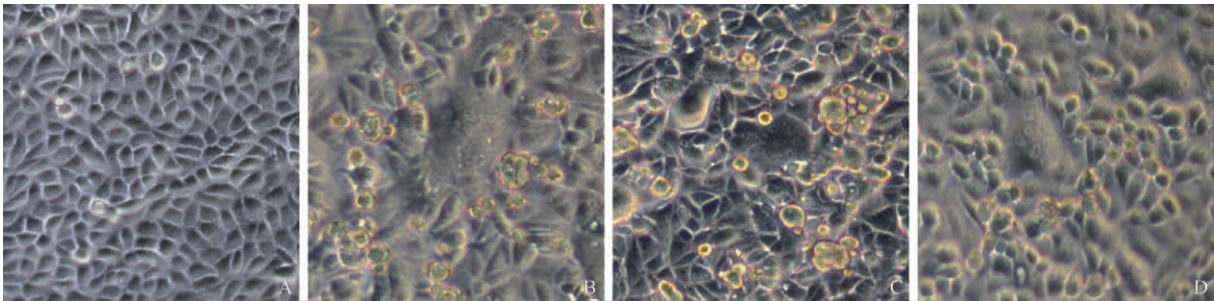


图 4 Vero 细胞和 Vero-rSLAM 细胞接种犬瘟热病毒后 CPE 图

Fig. 4 CPE of Vero and Vero-rSLAM cells inoculated by CDV positive samples. A: Vero inoculated with LN(10) fl (72hpi) ; B ~ D: Vero-rSLAM cells inoculated with LN(10) fl (36hpi) , JL(10) rl (48hpi) and HeB(10) fl (48hpi) , respectively.

2.8 LN(10) fl 分离株动物致病性试验结果

3 只狐狸攻毒后 3 - 4dpc 体温开始升高,在 5 - 6dpc 体温达到最高 (超过 40℃), 随后体温略有下降,2 只狐狸 (#1、#3) 14 - 17dpc 体温又重新上升并稽留 3d。#1 和 #2 号狐狸分别于攻毒后 19dpc 和 18dpc 死亡, #3 狐狸于攻毒后 22dpc 剖杀观察病变。对照狐狸试验全程体温、精神状态均未见异常 (图 5-A)。3 只攻毒狐狸试验过程中均可见足垫增厚、干裂, 出血性肠炎, 眼、鼻脓性结膜炎等典型犬瘟热症状。剖检可见明显膀胱出血点, 脾脏梗死等病变。

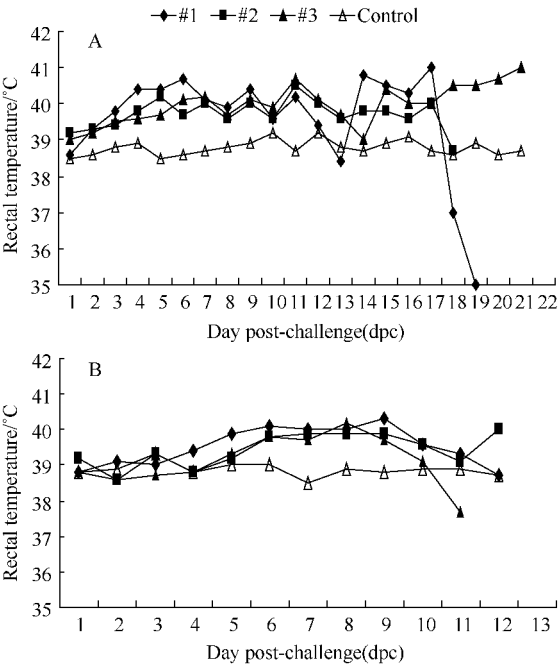


图 5 犬瘟热病毒 LN(10) fl 株攻毒狐狸、貉后体温变化图

Fig. 5 Rectal temperature of foxes and raccoon dogs inoculated by CDV LN(10) fl strain. A: Foxes; B: Raccoon dogs.

3 只貉攻毒 4 - 5dpc 体温开始升高,在 5 - 6dpc 体温达到最高 (超过 40℃); 随后 #2、#3 貉体温下降至 39℃ 以下。3 只貉相继于攻毒后 11 - 13dpc 发病死亡,对照貉试验全程体温、精神状态均未见异常 (图 5 - B)。3 只攻毒貉发病症状、剖检病变与狐狸类似,但较狐狸病变程度更为严重。

攻毒狐狸、貉死亡前血液 CDV 中和抗体测定结果显示,6 只动物犬瘟热中和抗体水平均不高于 1:8 (表 1),证实由于 CDV 强毒感染侵害动物免疫系统,造成动物无法产生针对 CDV 有效的免疫反应。而攻毒动物组织在 Vero-rSLAM 细胞系上病毒分离结果显示,所有攻毒动物 CDV 分离均呈阳性 (表 1),病料在接种 Vero-rSLAM 细胞 24 - 48h 均可产生明显 CPE。

表 1 攻毒动物血清 CDV 中和抗体测定及病毒分离结果  
Table 1 Serum Neutralizing antibody and CDV virus isolation results of challenged foxes and raccoon dogs

| Animal      | Number | Neutralizing antibody | Virus isolation |
|-------------|--------|-----------------------|-----------------|
| Fox         | 1      | 1:4                   | +               |
|             | 2      | <1:2                  | +               |
|             | 3      | 1:8                   | +               |
|             | 4*     | <1:2                  | ND              |
| Raccoon dog | 1      | <1:2                  | +               |
|             | 2      | 1:4                   | +               |
|             | 3      | 1:4                   | +               |
|             | 4*     | <1:2                  | ND              |

4\* = control animal “ND” = Not been done

3 讨论

对 CDV 分离及体外培养主要依靠 3 类细胞:肺巨噬细胞、淋巴细胞等原代细胞,MDCK 和 Vero 传



代细胞系,EB 病毒转化的 B95a 细胞系<sup>[5]</sup>。大量应用结果表明以上细胞在分离 CDV (尤其强毒株) 时均存在不足之处: (1) 作为原代细胞的肺巨噬细胞和淋巴细胞,其在制备、培养及病毒传代存在较高的技术要求; (2) B95a 在操作时具有分泌 EB 病毒的危险,对生物安全防范要求较高, (3) CDV 强毒株在 MDCK 或 Vero 细胞上需盲传数代才能适应,因此在适用过程中容易造成毒力减弱。近年来,随着 SLAM 作为麻疹病毒属病毒感染受体的证实,其在病毒分离及病毒与受体相互作用机制研究方面已得到广泛应用<sup>[12-16]</sup>。目前,国内外研究人员已分别建立了稳定表达犬 SLAM 的 Vero 和 CRFK 细胞系,并将其用于 CDV 强、弱毒株分离和增殖特性研究<sup>[17-19]</sup>。而最近麻疹病毒属受体家族的成员又得以丰富: Muhlebach 等 (2011 年) 和 Pratakpiriya 等 (2012) 相继证实在神经元细胞和上皮细胞中表达的连接素 Nectin4 分子可分别作为麻疹病毒和 CDV 的受体,该研究结果合理解释了 CDV 在宿主体内对 SLAM 表达阴性细胞 (如消化道和膀胱上皮细胞、神经元等) 的广泛感染的分子机理<sup>[20-21]</sup>。在国内,对鸡胚成纤维细胞 (CEF) 和 Vero 细胞上 CDV 未知受体的鉴定也有所突破: Chen 等 (2011 年) 应用病毒铺覆蛋白印迹技术 (VOPBA) 证实分别在 CEF 和 Vero 细胞上低水平表达的分子量大小为 57 kDa 和 42 kDa 膜蛋白可作为 CDV 识别该两种细胞的受体<sup>[22]</sup>。

本研究在先前克隆并鉴定犬瘟热易感狐、貉和水貂 SLAM 作为 CDV 感染受体的基础上<sup>[9]</sup>,选择貉 SLAM (rSLAM) 作为构建稳定表达 Vero 细胞系的靶基因。考虑到 rSLAM 须作为膜蛋白供 CDV H 蛋白识别,在构建表达载体时保留了 rSLAM 本身的信号肽和跨膜区。鉴于 SLAM 表达量与 CDV 感染滴度成正相关<sup>[23]</sup>,本研究在 rSLAM 基因上游引入了能增强蛋白翻译功能的 Kozak 序列。基于 IRES 翻译起始的 rSLAM 和 EGFP 非融合性二元表达载体,虽然表达载体与 Vero 细胞基因组随机重组后 EGFP 蛋白的表达无法直接反映 rSLAM 基因表达量,但借助其表达的强绿色荧光有助于细胞克隆的挑选纯化。因本实验室未获得针对 SLAM 蛋白特异的单克隆或多克隆抗体,本研究于 rSLAM 基因序列下游引

入了融合表达 6 个 His 标签的基因序列,可用针对组氨酸标签的单抗进行 rSLAMhis 融合蛋白的免疫学检测。荧光显微镜观察和免疫组化试验分别证实了 EGFP 基因和 rSLAMhis 融合蛋白在 Vero-rSLAM 细胞系中的稳定表达。通过对 Vero-rSLAM 细胞系第 10、15 和 20 代分别提取细胞总 RNA 后应用 rSLAM 特异引物进行 RT-PCR 试验,证实 rSLAM 在 3 个不同代次的 Vero-rSLAM 细胞系中均发生了基因转录。对以上 3 个代次 Vero-rSLAM 细胞的染色体众数及畸变率计算结果表明 3 个不同代次的 Vero-rSLAM 细胞与其亲本 Vero 细胞一致,染色体众数分布主要集中在  $54 \pm 2$  范围,且染色体畸变率低于 5%。证实 Vero-rSLAM 细胞系在细胞学上具有较高的遗传稳定性。Vero-rSLAM 细胞系与其亲本 Vero 细胞系一步生长曲线测定结果表明两者生长特性基本一致,但在生长密度上前者略高于后者。推测可能是由于 G418 压力作用导致 Vero-rSLAM 细胞生长密度增加。

对 3 份狐狸、貉临床犬瘟热阳性病料病毒分离试验的结果与 Nakano 等 (2009) 研究结果一致: Vero-rSLAM 细胞系在接种 3 份 CDV 阳性样品 36 - 48h 均产生明显合胞体 CPE,而接种 Vero 细胞系 6d 无特异 CPE 出现<sup>[19]</sup>。证实 2 种不同宿主源 CDVH 蛋白均能特异识别在 Vero-rSLAM 细胞膜上表达的 rSLAMhis 融合蛋白,且 rSLAM 蛋白 C 端 6 × his 标签的引入并未影响病毒 H 蛋白与 rSLAM 的结合。Seki 等 (2003) 和仁超等 (2011) 分别建立的表达犬 SLAM 的 Vero-DST 细胞在接毒 24 h 即形成 CDV 典型 CPE,病毒分离敏感性比本研究建立的 Vero-rSLAM 细胞系高<sup>[7,24]</sup>。其原因可能是: (1) 不同 CDV 毒株对不同动物受体的亲和力有所差异, (2) 样品接种时活病毒量差异。为评价 Vero-rSLAM 细胞系分离的 CDV 对动物致病性,选取狐源 CDV LN (10) f1 株对同日龄的狐狸、貉进行平行攻毒试验。在相同攻毒剂量下,攻毒貉在病程、病变及死亡率 (3/3) 上均明显严重于狐狸 (2/3)。攻毒动物濒死前血清 CDV 中和抗体测定结果均为阴性 ( $\leq 1:8$ ),动物病变组织 CDV 再分离试验均呈阳性 (表 1)。表明该强毒株感染动物导致其免疫产生了对 CDV 的免疫抑制,符合 CDV 感染动物临床病理学的报

道<sup>[10]</sup>。攻毒试验结果表明该分离株对动物较强的毒力,同时验证了貉感染犬瘟热的高发病率和死亡率<sup>[4]</sup>。作为同为犬科动物的犬、狐狸和貉,其 SLAM 基因序列具有较高的相似性(大于 98.6%),与 CDVH 蛋白相互作用的 8 个关键氨基酸完全保守<sup>[8-9]</sup>。如排除病毒在感染动物体内对酶复制系统利用差异的影响,推测 CDV 与不同 SLAM 亲和力差异可能导致动物对犬瘟热易感程度的差别。因此表达不同动物 SLAM 的表达细胞系建立,不仅对犬瘟热诊断及病毒分离有着重要意义,还为该病毒与受体作用机制的研究提供了平台。

## 参考文献

- [1] Appel MJ, Summers BA. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, 1995, 44:187-191.
- [2] Appel MJ, Yates RA, Foley GL, Bernstein JJ, Santinelli S, Spelman LH, Miller LD, Arp LH, Anderson M, Barr M, Pearce-Kelling S, Summers BA. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1994, 6: 277-288.
- [3] Zhao JJ, Yan XJ, Wu W. Genetic variations and cellular receptors of Canine distemper virus——A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(7):1-6. (in Chinese)  
赵建军, 闫喜军, 吴威. 犬瘟热病毒基因变异及其细胞受体研究进展. *微生物学报*, 2008, 48(7):1-6.
- [4] Zhao JJ, Yan XJ, Chai XL, Chai XL, Martella V, Luo GL, Zhang HL, Gao H, Bai X, Zhang L, Chen T, Xu L, Wang FX, Shao XQ, Wu W. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1-2):34-42.
- [5] Lednicky JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM. Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. *Journal of Virological Methods*, 2004, 118(2):147-57.
- [6] Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *Journal of Virology*, 2001, 75(13): 5842-50.
- [7] Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *Journal of Virology*, 2003, 77(18):9943-50.
- [8] Ohishi K, Ando A, Suzuki R, Takishita K, Kawato M, Katsumata E, Ohtsu D, Okutsu K, Tokutake K, Miyahara H, Nakamura H, Murayama T, Maruyama T. Host-virus specificity of morbilliviruses predicted by structural modeling of the marine mammal SLAM, a receptor. *Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases*, 2010, 33(3):227-241.
- [9] Zhao JJ, Zhang HL, Gao H, Zhao CF, Chai XL, Chen T, Yan XJ, Wu W. Molecular Cloning and eukaryotic expression of canine distemper virus receptor gene SLAM of fox, raccoon dog and mink. *Acta Theriologica Sinica*, 2010, 30(1):79-86. (in Chinese)  
赵建军, 张海玲, 高晗, 赵春霏, 柴秀丽, 陈涛, 闫喜军, 吴威. 狐、貉和水貂犬瘟热病毒受体 SLAM 的基因克隆及其真核表达. *兽类学报*, 2010, 30(1):79-86.
- [10] Wang JW, Ren WJ, Jiang P, Wang ZL, Guo PY. Clinical and pathological observations of mink, fox and raccoon dog canine distemper. *Acta Theriologica Sinica*, 2009, 29(1):75-80. (in Chinese)  
王珺玮, 任炜杰, 姜平, 王志亮, 郭培元. 貂、狐、貉群犬瘟热临床及病理学研究, *兽类学报*, 2009, 29(1):75-80.
- [11] Wang FX, Yan XJ, Chai XL, Shao XQ, Jiang LL. Establishment and application of RT-PCR for detection of canine distemper virus. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2005, 27(4):14-17. (in Chinese)  
王凤雪, 闫喜军, 邵西群, 柴秀丽, 姜丽丽. 毛皮动物犬瘟热 RT-PCR 方法的建立与应用. *特产研究*, 2005, 27(4):14-17.
- [12] Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *Journal of General Virology*, 2006, 87:2767-79.

- [13] Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiology Immunology*, 2002, 46 (3) :135-42.
- [14] Ohno S, Seki F, Ono N, Yanagi Y. Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. *Journal of General Virology*, 2003, 84: 2381-8.
- [15] Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, Yanagi Y. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *Journal of Virology*, 2001, 75 (4) :1594-600.
- [16] Tanaka K, Minagawa H, Xie MF, Yanagi Y. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Archives of Virology*, 2002, 147 (1) :195-203.
- [17] Shi HX, Zhang XR, Wu YT. The construction of Vero cell line expressing canine CD150 gene. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2008, 18 (11) :5-10. (in Chinese)  
时红星, 张小荣, 吴艳涛. 表达犬 CD150 的 Vero 细胞系的建立. *中国比较医学杂志*, 2008, 18 (11) :5-10.
- [18] Nielsen O, Smith G, Weingartl H, Lair S, Measures L. Use of a SLAM transfected Vero cell line to isolate and characterize marine mammal morbilliviruses using an experimental ferret model. *Journal of Wildlife Diseases*, 2008, 44 (3) :600-11.
- [19] Nakano H, Kameo Y, Andoh K, Ohno Y, Mochizuki M, Maeda K. Establishment of canine and feline cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule for canine distemper virus study. *Veterinary Microbiology*, 2009, 133 (1-2) :179-83.
- [20] Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prufer S, Uhlig KM, Leonard VHJ, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*, 2011, 480, 530-533.
- [21] Pratakipiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in the neurovirulence. 2012, *Journal of Virology* doi:10.1128/JVI.00824-12.
- [22] Chen J, Liang X, Chen PF. Canine distemper virus utilizes different receptors to infect chicken embryo fibroblasts and Vero cells. *Virologica Sinica*, 2011, 175 (26) :139-145.
- [23] Sarkar J, Balamurugan V, Sen A, Saravanan P, Sahay B, Rajak KK, Rasool TJ, Bhanuprakash V. Singh K R. Sequence analysis of morbillivirus CD150 receptor-signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) of different animal species. *Virus Genes*, 2009, 39 (3) :335-341.
- [24] Ren C, Huo GT, Chen YS, Chen L, Zhang LL, Li J, Chen W, Zhao DM. Comparative study on the cell sensitivity of Canine distemper virus in Vero and Vero-DST cell lines. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2011, 21 (1) :36-39. (in Chinese)  
任超, 霍桂桃, 陈益山, 陈丽, 张兰兰, 李佳, 陈武, 赵德明. Vero 及 Vero-DST 细胞对犬瘟热病毒敏感性比较. *中国比较医学杂志*, 2011, 21 (1) :36-39.



# Establishment and application of a Vero cell line stably expressing raccoon dog SLAM, the cellular receptor of canine distemper virus

Jianjun Zhao<sup>1\*</sup>, Ruxun Yan<sup>2</sup>, Hailing Zhang<sup>1</sup>, Lei Zhang<sup>1</sup>, Bo Hu<sup>1</sup>, Xue Bai<sup>1</sup>, Xiqun Shao<sup>1</sup>, Xiuli Chai<sup>1</sup>, Xijun Yan<sup>1, 2\*</sup>, Wei Wu<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Division of Preventive Veterinary Medicine, Institute of Special Economic Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

<sup>2</sup> Jilin Teyan Biotechnological Co. Ltd, Changchun 130122, China

**Abstract:** [Objective] The signaling lymphocyte activation molecule (SLAM, also known as CD150), is used as a cellular receptor by canine distemper virus (CDV). Wild-type strains of CDVs can be isolated and propagated efficiently in non-lymphoid cells expressing this protein. Our aim is to establish a Vero cells expressing raccoon dog SLAM (rSLAM) to efficiently isolate CDV from pathological samples. [Methods] A eukaryotic expression plasmid, pIRES2-EGFP-rSLAMhis, containing rSLAM gene fused with six histidine-coding sequence, EGFP gene, and neomycin resistance gene was constructed. After transfection with the plasmid, a stable cell line, Vero-rSLAM, was screened from Vero cells with the identification of EGFP reporter and G418 resistance. Three CD positive specimens from infected foxes and raccoon dogs were inoculated to Vero-rSLAM cells for CDV isolation. Foxes and raccoon dogs were inoculated subcutaneously LN (10) f1 strain with  $4 \times 10^{2.39}$  TCID<sub>50</sub> dose to evaluate pathogenicity of CDV isolations. [Results] The rSLAMh fused gene was shown to transcript and express stably in Vero-rSLAM cells by RT-PCR and Immunohistochemistry assay. Three CDV strains were isolated successfully in Vero-rSLAM cells 36–48 hours after inoculation with spleen or lung specimens from foxes and raccoon dogs with distemper. By contrast, no CDV was recovered from those CD positive specimens when Vero cells were used for virus isolation. Infected foxes and raccoon dogs with LN (10) f1 strain all showed typical CD symptoms and high mortality (2/3 for foxes and 3/3 for raccoon dogs) in 22 days post challenge. [Conclusion] Our results indicate that Vero-rSLAM cells stably expressing raccoon dog SLAM are highly sensitive to CDV in clinical specimens and the CDV isolation can maintain high virulence to its host animals.

**Keywords:** canine distemper virus, raccoon dog, signaling lymphocyte activation molecule (SLAM), vero cells

(本文责编:王晋芳)