



## 不同动物源性细胞系对猪丁型冠状病毒的易感性

瞿欢<sup>1</sup>, 胡靖飞<sup>1</sup>, 李施倩<sup>1</sup>, 肖黛<sup>1</sup>, 张路文<sup>1</sup>, 付嘉钰<sup>1</sup>, 赵玉佳<sup>1</sup>, 陈汭<sup>1</sup>, 文翼平<sup>1</sup>, 伍锐<sup>1</sup>, 赵勤<sup>1</sup>, 颜其贵<sup>1</sup>, 文心田<sup>1</sup>, 曹三杰<sup>1,2,3</sup>, 黄小波<sup>1,2,3\*</sup>

1 四川农业大学动物医学院, 猪病研究中心, 四川 成都 611130

2 农业农村部兽药药物与兽医诊断技术四川科学观测实验站, 四川 成都 611130

3 四川农业大学国家级动物类实验教学示范中心, 四川 成都 611130

瞿欢, 胡靖飞, 李施倩, 肖黛, 张路文, 付嘉钰, 赵玉佳, 陈汭, 文翼平, 伍锐, 赵勤, 颜其贵, 文心田, 曹三杰, 黄小波. 不同动物源性细胞系对猪丁型冠状病毒的易感性. 微生物学报, 2022, 62(2): 672–685.

Qu Huan, Hu Jingfei, Li Shiqian, Xiao Dai, Zhang Luwen, Fu Jiayu, Zhao Yujia, Chen Rui, Wen Yiping, Wu Rui, Zhao Qin, Yan Qigui, Wen Xintian, Cao Sanjie, Huang Xiaobo. Susceptibility of cell lines from different animal species to porcine deltacoronavirus. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 672–685.

**摘要:**【目的】探究猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)能否在不同动物源性细胞系中感染和增殖。【方法】本研究将 PDCoV 四川分离株 CHN-SC2015 接种来自仓鼠、家禽、猴、人和猪的 12 种细胞系, 将病毒在每种细胞系中盲传至少 5 代并通过逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、间接免疫荧光试验(IFA)和测序鉴定。【结果】PDCoV 在 Vero、PAM、PK15、ST 和 LLC-PK1 细胞中的 P1 表现出明显的细胞病变效应(CPE), 且在 PAM、PK15、ST 和 LLC-PK1 细胞上有不同程度的增殖, 但在 Vero 和 PAM 细胞的后续传代中 CPE 逐渐消失; 除 3 种易感细胞外(PK15、LLC-PK1 和 ST), 病毒拷贝数随着传代次数的增加而逐渐降低, 而在 DEF、Marc-145、HEK-293、ZYM-SIEC02 和 PAM 细胞的 P4 或 P5 中不能检测到 PDCoV; PCR 结果显示, 只有在 CEF 和 Vero 细胞的 P5 中还能检测到 PDCoV; IFA 的结果表明, PDCoV 可以感染除 BHK-21 和 ZYM-SIEC02 以外的大多数细胞, 在 PK15、LLC-PK1 和 ST 细胞的 P1、P3 和 P9 均可以观察到特异性免疫荧光, 因此仅 3 种细胞系(PK15、LLC-PK1 和 ST)适合病毒的连续传代, 在 P9 病毒滴度分别可达  $10^{7.11}$ 、 $10^{7.00}$  和  $10^{7.37}$  TCID<sub>50</sub>/mL; 在不同的细胞系中传代后,

**基金项目:** 四川省国际科技创新合作项目(2021YFH0153); 四川省科技计划(2020YFS0011)

Supported by the Sichuan International Science and Technology Innovation Cooperation Project (2021YFH0153) and by the Sichuan Science and Technology Project (2020YFS0011)

\*Corresponding author. E-mail: rsghb110@126.com

Received: 26 May 2021; Revised: 30 August 2021; Published online: 8 November 2021

PDCoV 的 *S* 基因序列累计有 14 个核苷酸和相应的 12 个氨基酸突变。【结论】本研究表明, PDCoV 可在体外感染多种细胞, 提示其可能存在跨种传播潜力。

**关键词:** 猪  $\delta$  冠状病毒; 细胞系; 易感性; 感染; 跨物种传播

## Susceptibility of cell lines from different animal species to porcine deltacoronavirus

QU Huan<sup>1</sup>, HU Jingfei<sup>1</sup>, LI Shiqian<sup>1</sup>, XIAO Dai<sup>1</sup>, ZHANG Luwen<sup>1</sup>, FU Jiayu<sup>1</sup>, ZHAO Yujia<sup>1</sup>, CHEN Rui<sup>1</sup>, WEN Yiping<sup>1</sup>, WU Rui<sup>1</sup>, ZHAO Qin<sup>1</sup>, YAN Qigui<sup>1</sup>, WEN Xintian<sup>1</sup>, CAO Sanjie<sup>1,2,3</sup>, HUANG Xiaobo<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Research Center of Swine Disease, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

<sup>2</sup> Sichuan Science-Observation Experimental Station of Veterinary Drugs and Veterinary Diagnostic Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 611130, Sichuan, China

<sup>3</sup> National Teaching and Experiment Center of Animal, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

**Abstract:** [Objective] To explore whether porcine deltacoronavirus (PDCoV) can infect and proliferate in different animal species-derived cell lines. [Methods] The Sichuan isolate CHN-SC2015 of PDCoV was inoculated in twelve cell lines derived from hamster, poultry, monkey, human and swine. After at least five blindly passages in each cell line, the virus was identified by RT-PCR, RT-qPCR, indirect immunofluorescence assay (IFA), and sequencing. [Results] PDCoV caused distinct cytopathic effect (CPE) in Vero, PAM, PK15, ST, and LLC-PK1 cells at the 1st passage (P1) and proliferated to various degrees in PAM, PK15, ST, and LLC-PK1 cells, while the CPE gradually disappeared during subsequent passages in Vero and PAM cells. Except that in the three susceptible cell lines (PK15, LLC-PK1, and ST), the viral copies of the infected cell lines gradually decreased with the increase in passages, and PDCoV could not be detected at P4 or P5 of DEF, Marc-145, HEK-293, ZYM-SIEC02, and PAM cells. PCR results showed that PDCoV could be detected only in CEF and Vero cells at P5. The IFA results showed that PDCoV could infect other cell lines except BHK-21 and ZYM-SIEC02, and specific immunofluorescence was observed in PK15, LLC-PK1, and ST cells at P1, P3, and P9. Therefore, only three cell lines (PK15, LLC-PK1, and ST) were suitable for serial passage, with the virus titers up to  $10^{7.11}$ ,  $10^{7.00}$ , and  $10^{7.37}$  TCID<sub>50</sub>/mL at P9, respectively. After passage in different cell lines, CHN-SC2015 accumulated 14 nucleotide mutations corresponding to 12 amino acid mutations. [Conclusion] This study indicates that PDCoV can infect a variety of cells *in vitro*, suggesting that it may have the potential of cross-species transmission.

**Keywords:** porcine deltacoronavirus; cell lines; susceptibility; infection; cross-species transmission

冠状病毒是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 属于套式病毒目、冠状病毒科。正冠状病毒亚

科下分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  4 个属, 是动物和人类的重要病原体, 可引起各种呼吸系统、肠道和

神经系统疾病<sup>[1]</sup>。猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis coronavirus, TGEV)属于  $\alpha$  冠状病毒属,可引起仔猪严重腹泻和死亡<sup>[2-3]</sup>。 $\beta$  属的成员引发人类呼吸道感染,包括严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)和新型冠状病毒(SARS-CoV-2)等<sup>[4-5]</sup>。 $\delta$  属主要存在于各种鸟类和猪中<sup>[6]</sup>。蝙蝠是  $\alpha$  和  $\beta$  冠状病毒的重要宿主,禽类被认为是  $\gamma$  和  $\delta$  冠状病毒的重要宿主<sup>[6]</sup>。SARS-CoV 和 MERS-CoV 都起源于蝙蝠,并能跨物种传播感染其他动物甚至人类引起新的流行病,提示了冠状病毒在种间传播事件中的潜在风险<sup>[7]</sup>。

猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)可引起哺乳仔猪急性腹泻、呕吐、脱水 and 死亡,于 2012 年首次在香港的猪的样品中发现<sup>[6]</sup>。PDCoV 的暴发首先在美国报道,并在 2014 年迅速蔓延到 20 多个州,随后多个国家也发生该病的流行,给养猪业造成了严重的经济损失<sup>[8-10]</sup>。PDCoV 3'端 1/3 的基因组主要编码 4 种结构蛋白,即纤突蛋白(S)、小膜蛋白(E)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)和 3 种辅助蛋白 NS6、NS7 和 NS7a<sup>[11]</sup>。S 蛋白是一种高度糖基化的 I 型跨膜蛋白,除了介导病毒进入外,是决定宿主范围和组织嗜性的关键因素,也是宿主免疫应答的主要诱导因子<sup>[12]</sup>。冠状病毒的跨种传播一直是关注的热点。近年研究表明, PDCoV 也具有感染多种动物和细胞的潜力。Li 等研究表明, PDCoV 可使用哺乳动物和禽类的氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN)分子作为进入受体,并且可以在体外感染包括人、猪和鸡在内的多种细胞系<sup>[13]</sup>。PDCoV 还可以感

染鸡胚并连续传代,接种 PDCoV 的鸡表现出轻度腹泻并在粪便检测到少量病毒核酸<sup>[14]</sup>。此外, 3-7 日龄的小牛也可以感染 PDCoV,并且可以持续检测到粪便中的 PDCoV 核酸和特异性血清 IgG 抗体,但是没有明显的肠损伤或病理变化<sup>[15]</sup>。Lednicky 等首次报道, PDCoV 感染人类,在 369 名急性无名高热的儿童血样中,检测出了 3 份变异的 PDCoV<sup>[16]</sup>。这些研究提示, PDCoV 存在跨物种传播的潜力,可能具有公共卫生安全风险。

我们前期已分离获得西南地区第 1 株 PDCoV 毒株并进行了系统鉴定<sup>[17]</sup>,为了进一步评估 PDCoV 分离株 CHN-SC2015 是否也具有跨种感染的风险和潜力,本研究将该毒株在来自仓鼠、家禽、猴子、人和猪的 12 种细胞系中进行感染和传代,拟筛选高效培养 PDCoV 的细胞系和为评价其跨种传播风险提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒与细胞系

PDCoV CHN-SC2015 株(GenBank 登录号: MK355396.1)由本实验室从四川发生腹泻的仔猪中分离<sup>[17]</sup>,并在 LLC-PK1 细胞中连续传代,取第 15 代(P15)开展本研究。不同种属的 12 种细胞系(表 1),包括仓鼠(BHK-21)、猴(Vero、Marc-145)、人(HEK-293、HeLa)、猪(ZYM-SIEC02、PAM、PK15、LLC-PK1、ST)和家禽的 2 种原代细胞系(CEF、DEF)。猪肠上皮细胞系(ZYM-SIEC02)由西北农林科技大学兽医学院张彦明教授惠赠<sup>[18]</sup>。CEF 和 DEF 用 9 日龄 SPF 鸡胚和鸭胚制备。

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM、小牛血清购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 PAN 公司;总 RNA 抽提试剂盒购自

表 1 本研究来自不同物种的细胞系

Table 1 Summary of cell lines from different animal species in this study

Species	Origin	Cell name	ATCC® number
Hamster	Baby hamster kidney	BHK-21	CCL-10
Poultry	Chicken embryo fibroblasts	CEF	N/A
	Duck embryo fibroblasts	DEF	N/A
Monkey	African green monkey kidney	Vero	CRL-1586
	African green monkey kidney	Marc-145	CRL-12231
Human	Human embryonic kidney	HEK-293	CRL-1573
	Human cervical carcinoma epithelium	HeLa	CCL-2
Swine	Small intestinal epithelium	ZYM-SIEC02	N/A
	Porcine alveolar macrophages	PAM	N/A
	Porcine kidney	PK15	CCL-33
	Porcine kidney	LLC-PK1	CL-101
	Swine testis	ST	CRL-1746

N/A: not available.

生工生物工程(上海)股份有限公司; Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ II、PrimeSTAR Max Premix 购自宝生物(大连)有限公司; 兔抗 PDCoV N 蛋白多克隆抗体由本实验室制备; FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自博奥森生物技术有限公司。

## 1.2 PDCoV 在不同细胞上的增殖情况

将 12 种细胞分别铺于 T75 细胞瓶, 待细胞长至 90% 以上时, PBS 洗涤 3 次, 在含有 0.5 µg/mL (BHK-21、CEF、DEF 和 HeLa)、1.25 µg/mL (HEK-293、ZYM-SIE C02) 或 5 µg/mL (Vero、Marc-145、ST、PK15、PAM 和 LLC-PK1) 胰酶的新鲜 DMEM 中按感染复数(MOI)为 0.1 接种 PDCoV, 孵育 1.5 h, 弃液, 加入含胰酶或 2% 血清(HeLa 细胞)的维持液继续培养。在感染后 12、24、36、48、60、72 h 分别收集 500 µL 上清进行 RT-qPCR 分析, 并观察 CPE。

## 1.3 PDCoV 在不同细胞上的传代培养

细胞长至 90% 以上时, 接种 PDCoV 孵育 1.5 h, 弃液后加入含胰酶或 2% 血清(HeLa 细胞)的维持液于 37 °C 培养 4 d, 将细胞反复冻融

3 次, 在 4 °C 下以 8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液。所收病毒液继续传代, 病毒在每个细胞系中盲传至少 5 代, 进行 RT-PCR 及 RT-qPCR 检测。

## 1.4 RT-PCR 及 RT-qPCR 鉴定

提取不同代次病毒液的总 RNA, 反转录获得 cDNA, 针对 NS7 基因的上、下游引物: 5'-ATGGCTACTGGCTGCGTTAC-3' 和 5'-GCGTTTCCTGGGCTGATT-3' 进行 RT-PCR 鉴定。制备含有 PDCoV M 基因序列的 pMD18-T 质粒建立标准曲线, 使用 M 基因的上、下游引物: 5'-CCAATGGGTACATGGAGGT-3' 和 5'-GTGGCGGATTCTAACTGA-3' 进行 RT-qPCR 检测, 测定 PDCoV RNA 的含量, 反应条件如下: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。

## 1.5 易感细胞 TCID<sub>50</sub> 测定

分别取 PDCoV 在 LLC-PK1、PK15 和 ST 细胞上 P1、P3 与 P9 的病毒液, 在 LLC-PK1 细胞上测定病毒滴度。取 100 µL 病毒液, 按照 10 倍梯度进行系列稀释( $10^{-1}$ – $10^{-10}$ ), 同时设置两列空白对照, 待 LLC-PK1 长满 96 孔细胞板, PBS 洗 2 次后加入稀释好的病毒液, 每个稀释度 8 个重



复, 37 °C 孵育 1.5 h, 弃病毒液, 加入 150  $\mu$ L 含 5  $\mu$ g/mL 胰酶的维持液, 37 °C 继续培养。每日观察 LLC-PK1 细胞病变情况, 连续观察 4–7 d, 最后按照 Reed 和 Muench 氏法计算 TCID<sub>50</sub><sup>[19]</sup>。

### 1.6 不同代次 IFA 鉴定

细胞铺于含细胞爬片的 12 孔板中, 按 MOI=0.04 接种 PDCoV, 感染 36 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 4%多聚甲醛固定 30 min; 用 PBS 洗涤 3 次, 0.5% Triton X-100 通透 30 min; 用 PBS 洗涤 3 次后, 用 2% BSA 37 °C 封闭 1 h。然后在 4 °C 孵育兔抗 PDCoV N 蛋白抗体(1:200 稀释)过夜; 用 PBST (PBS+0.1% Tween-20)洗涤后, 避光孵育 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1:500 稀释) 1 h。最后一次洗涤后取出爬片, DAPI 进行核染。

### 1.7 不同细胞传代后 S 基因测序分析

参照 CHN-SC2015 株的 S 基因序列设计上、下游引物: 5'-CACCAGGACGCCTTCTTGTTGA GG-3'和 5'-CTACCATTCTTAACTTAAAGGA CG-3', 从不同细胞系传代样品中扩增 S 基因并与 LLC-PK1-P15 相比用 MEGA-X 软件进行测序比对, 分析核苷酸及氨基酸突变情况。程序如下: 98 °C 5 s, 55 °C 15 s, 72 °C 30 s, 34 个循环。

### 1.8 不同物种源 APN 的进化树分析

为分析不同物种源 APN 的序列差异及其

在不同种属细胞感染中的潜在相关性, 从 GenBank 中下载 25 个不同物种的 APN 序列, 利用 MEGA 7 软件, 采用邻接法, 基于 APN 的氨基酸序列构建系统发育树。

### 1.9 数据分析

本研究所有代表性结果都进行 3 次重复实验, 结果用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。显著性分析采用 Student's *t* 检验。统计显著性记为\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; *ns*:  $P>0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 PDCoV 在不同物种来源细胞系上的 CPE

PDCoV CHN-SC2015 株以 MOI=0.1 感染来自不同物种的 12 种细胞系, 并观察细胞在不同时间点的生长状态。HeLa 细胞对胰酶敏感, 因此用不含胰酶, 含 2%胎牛血清的 DMEM 作为维持液。结果显示, PDCoV 在 Vero、PAM、PK15、ST 和 LLC-PK1 细胞中的 P1 表现出明显的 CPE (图 1), 但在 Vero 和 PAM 细胞的后续传代中 CPE 逐渐消失。本研究 PDCoV 在 Vero 细胞 P1 中有大量的细胞融合, 并且在 48 h 可以显著观察到合胞体的形成(图 2A), 但从 P3 起未观察到明显的合胞体。

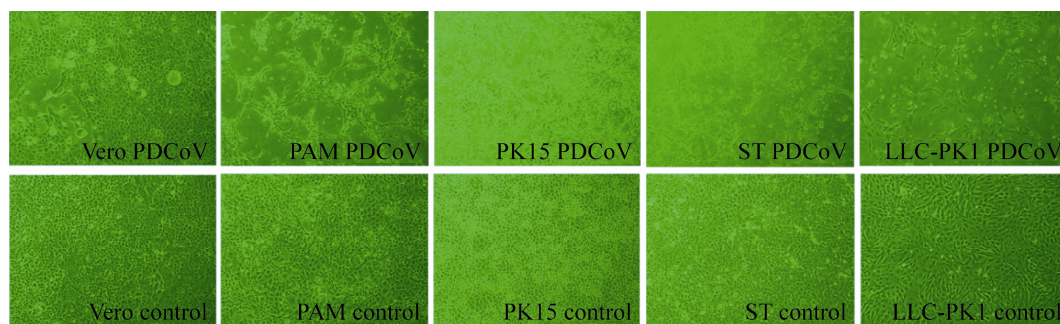


图 1 接种 PDCoV CHN-SC2015 株后 72 h 的不同细胞系中的 CPE

Figure 1 CPEs in different cell lines inoculated with PDCoV CHN-SC2015 at 72 hpi. Original magnification,  $\times 100$ .

## 2.2 PDCoV 在不同种属细胞系上的增殖鉴定

为了确定 PDCoV 是否在这些细胞系上增殖, 在不同的时间点收集 PDCoV 感染细胞 P1 的上清液, 用 RT-qPCR 检测病毒的 *M* 基因 RNA 水平。结果表明: (1) 病毒拷贝数在 BHK-21 细胞中几乎没有变化(图 2B); 在禽源(CEF 和

DEF)和 ZYM-SIEC02 细胞中随时间逐渐下降(图 2C、F); (2) 在猴源(Vero 和 Marc-145)和人源(HEK-293 和 HeLa)细胞中, 病毒拷贝数略有增加, 但之后逐渐减少(图 2D、E); (3) 病毒在猪源 PAM、PK15、ST 和 LLC-PK1 细胞上有明显的增殖。除此之外, PDCoV 在 ST 细胞中的病毒拷贝数最高(图 2F)。

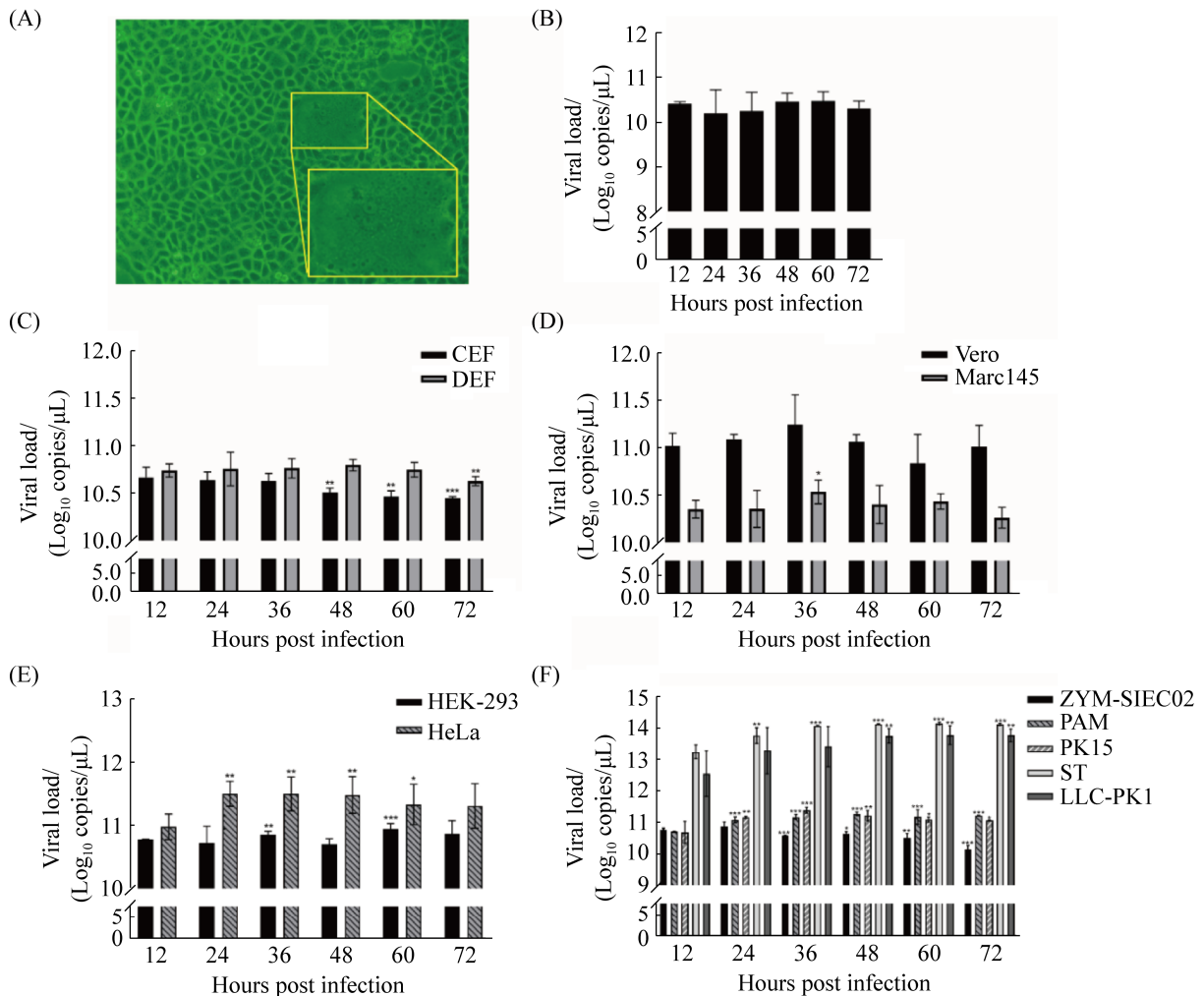


图 2 PDCoV 在不同物种来源细胞系上的增殖情况

Figure 2 Proliferation of PDCoV in cell lines from different animal species. A: cell fusion and syncytium formation were observed on Vero cells inoculated with PDCoV at 48 hpi; B: proliferation of PDCoV in hamster (BHK-21) cells; C: proliferation of PDCoV in poultry (CEF and DEF) cells; D: proliferation of PDCoV in monkey (Vero and Marc-145) cells; E: proliferation of PDCoV in human (HEK-293 and HeLa) cells; F: proliferation of PDCoV in swine (ZYM-SIEC02, PAM, PK15, ST, and LLC-PK1) cells. The viral loads of PDCoV was determined by the standard curve and is expressed as the mean (log<sub>10</sub> copies/μL)±standard deviation (SD). The *P*-value<0.05 was considered statistically significant compared with those at 12 hpi.

### 2.3 PDCoV 在不同种细胞上的连续传代

为了确定 PDCoV CHN-SC2015 株能否在 12 种细胞系中稳定传代, 将病毒在每种细胞系中盲传至少 5 代, 结果显示, 3 种细胞易感, 9 种相对不易感。收集在 9 种非易感细胞中传不同代次的病毒液进行 RT-qPCR 和 RT-PCR 检测, 而通过在 LLC-PK1 细胞上测定 TCID<sub>50</sub> 确定 PDCoV 在 3 种易感细胞(PK15、LLC-PK1 和 ST)上 P1、P3 和 P9 的病毒滴度(表 2)。结果显示, (1) 接种 PDCoV 的非易感细胞系中的 8 个(除 CEF 外), 病毒 RNA 载量随着代次的增加而逐渐降低, 其中, 在 DEF、Marc-145、HEK-293、ZYM-SIEC02 和 PAM 细胞的 P4 或 P5 中不能检测到 PDCoV (图 3)。然而, CEF 细胞 P2 中的病毒 RNA 载量出现短暂下降, 然后 P3 恢复到与 P1 相似的水平(图 3B)。PCR 结果显示, 只有在 CEF 和 Vero 细胞的 P5 中还能检测到 PDCoV (图 4)。(2) 随着 PDCoV 在 3 个易感细胞系上的连续传代, 感染滴度逐渐增加, 并且 P9 比 P1 增加约 10–100 倍(表 2)。

### 2.4 PDCoV 在细胞系中不同代次的 IFA 鉴定

接种 PDCoV 后, 部分细胞没有出现明显的 CPE, 因此用抗 N 蛋白的多克隆抗体进行 IFA 鉴定是否存在病毒感染。将 PDCoV 感染的 12 种细胞系的不同代次(易感细胞 PK15、LLC-PK1 和 ST 的 P1、P3 和 P9; 其他细胞中

的 P1、P3 和 P5)于 36 h 固定。结果表明: (1) 在 BHK-21 和 ZYM-SIEC02 细胞上未观察到 PDCoV N 蛋白特异性免疫荧光(图 5D、E); (2) 病毒 N 蛋白仅在家禽(CEF、DEF)、猴(Vero、Marc-145)、人(HEK-293、HeLa)和 PAM 细胞的 P1 中表达(图 5), 而且在 HeLa 细胞中感染有限, 抗原的表达低于其他细胞系(图 5C); (3) 在 PK15、LLC-PK1 和 ST 细胞的 P1、P3 和 P9 均可以观察到特异性免疫荧光, 并且在 LLC-PK1 细胞中表现出明显的合胞体形成(图 5D), 同样, 接种 PDCoV 的 ST 细胞 N 蛋白表达水平最高。这些结果表明, 大多数细胞不支持 PDCoV CHN-SC2015 株的稳定传代, 只有 3 种细胞系(PK15、LLC-PK1 和 ST)适合病毒的稳定增殖。

### 2.5 PDCoV 感染不同细胞后 S 基因的序列分析

在易感细胞(LLC-PK1、ST 和 PK15)中, PDCoV 连续传代至 P15。为了确定不同细胞系传代中 PDCoV 的 S 基因是否发生变异, 根据 PCR 结果(图 4)对 LLC-PK1、ST、PK15 的 P15; PAM、DEF、BHK-21 的 P2; Vero、CEF 的 P5; HEK-293、HeLa、Marc-145 和 ZYM-SIEC02 的 P3 扩增完整 S 基因并测序, 与 LLC-PK1 上 P15 (NMDCN0000NN9)比较 S 基因序列的变化。结果表明, S 基因全长 3 480 个核苷酸, 编码 1 159 个氨基酸, 病毒在 BHK-21 细胞上传代 2 次, 在 HeLa、Marc-145 和 ZYM-SIEC02 细胞传代 3 次后, S 基因序列无突变。其他细胞上(NMDCN0000NNA-G)共产生 14 个核苷酸和相应 12 个氨基酸的突变, 其中 1 443 和 2 277 位是同义突变, 在突变的氨基酸中, 162 位氨基酸是位于 S1 表面的糖基化位点(表 3、表 4)。

**表 2 不同代次 PDCoV 的感染性滴度(TCID<sub>50</sub>/mL)**  
Table 2 Infectious titers (TCID<sub>50</sub>/mL) of PDCoV of different generations

Parameter	Cell lines	Results of different generations		
		P1	P3	P9
Infectious titer/ (TCID <sub>50</sub> /mL)	PK15	10 <sup>6.00</sup>	10 <sup>6.12</sup>	10 <sup>7.11</sup>
	LLC-PK1	10 <sup>5.26</sup>	10 <sup>5.12</sup>	10 <sup>7.00</sup>
	ST	10 <sup>6.32</sup>	10 <sup>5.55</sup>	10 <sup>7.37</sup>

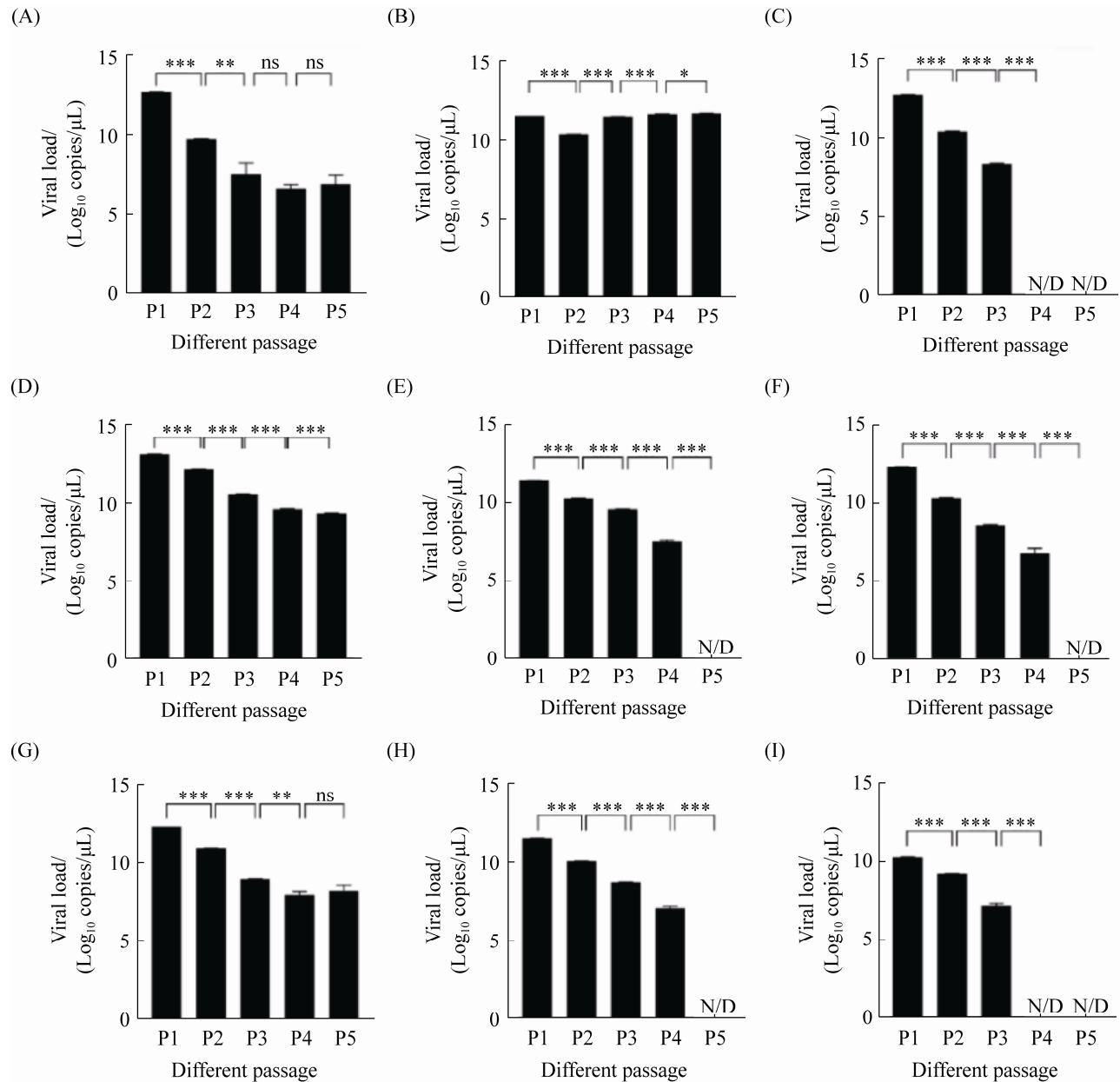


图3 连续传代期间细胞系中 PDCoV 的病毒含量变化

Figure 3 Viral loads of PDCoV in different cell lines during serial passages. A: viral load of PDCoV in BHK-21 cells; B: viral load of PDCoV in CEF cells; C: viral load of PDCoV in DEF cells; D: viral load of PDCoV in Vero cells; E: viral load of PDCoV in Marc-145 cells; F: viral load of PDCoV in HEK-293 cells; G: viral load of PDCoV in HeLa cells; H: viral load of PDCoV in ZYM-SIEC02 cells; I: viral load of PDCoV in PAM cells. The viral load of PDCoV was determined by the standard curve and is expressed as the mean ( $\log_{10}$  copies/ $\mu$ L) $\pm$ standard deviation (SD). N/D: not detected.

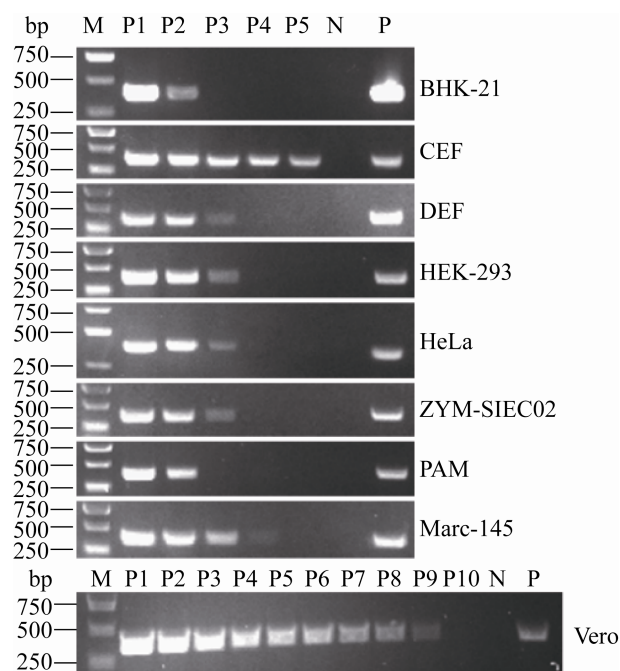


图 4 不同代次的 RT-PCR 检测

Figure 4 RT-PCR detection of different generations. M: DL2000 marker; N: negative control; P: positive control.

## 2.6 不同种属动物 APN 的系统发育分析

从 GenBank 获得的 25 个不同物种的 APN 序列进行了系统发育分析, 结果表明, APN 广泛分布于动物物种之间, 并形成 4 个不同的簇和许多小分支, 表明 APN 物种的多样性和特异性(图 6)。其中, 仓鼠、鸡与鸭、猴与人和猪的 APN 序列分布在不同的分支中, 与猪的氨基酸序列同源性分别为 53.26%、64.02%、65.70%、78.45% 和 78.64%, 而人与猴的 APN 序列同源性达 98.55%, 鸡与鸭的 APN 序列同源性达 91.21%。

## 3 讨论与结论

多数新发感染人类的病原体来自动物, 特别是近年来反复出现并导致流行的冠状病毒。SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 均能

跨物种传播感染人类引起疾病流行, 提示了冠状病毒在种间传播事件中的潜在风险<sup>[7]</sup>。包括人、猴、猪、鸡、蝙蝠等在内的 21 种细胞系对 SARS-CoV 显著易感, 表明这种蝙蝠来源冠状病毒跨物种传播的可能性<sup>[20]</sup>。检测猪群中 PDCoV 时发现, PDCoV 与 SpCoV HKU17 密切相关, 表明 PDCoV 可能从鸟类传播到哺乳动物<sup>[6]</sup>。PDCoV 还可在体外感染鸡肝癌和 DF-1 细胞以及人的 Huh7 细胞<sup>[13]</sup>。但这些研究均只是在细胞上接种 1 次后检测病毒感染的结果, 并不能确定病毒能否在这些细胞上稳定传代。本研究为了掌握 CHN-SC2015 毒株的适应性, 通过连续传代检测分析, 证明 PDCoV CHN-SC2015 株可以感染来自鸡、鸭、猴、人和猪的 10 个细胞系, 但只有 3 种细胞系(PK15、LLC-PK1 和 ST)适合 PDCoV 的连续增殖。Liang 等证实, PDCoV 可感染鸡胚并继代, 且可在 P5 中检测到病毒核酸, 而且接种 PDCoV 的鸡表现出轻微的腹泻症状<sup>[14]</sup>, 本研究 CHN-SC2015 株可感染鸡胚原代 CEF 细胞, 再次证明 PDCoV 对鸡的感染潜力。

在细胞培养中, 外源蛋白酶通过促进细胞膜融合增强 PDCoV 的复制, 即使没有胰酶, PDCoV 也能在 LLC-PK1 细胞中复制, 但无可见的 CPE, 其病毒滴度相对胰酶处理组更低<sup>[21]</sup>。本研究通过胰酶耐受试验选择各细胞接毒的最适胰酶浓度, 发现 HeLa 细胞对胰酶敏感, 因此用含 2% 血清的 DMEM 作为维持液, HeLa 细胞感染 PDCoV 后 N 蛋白表达水平低于其他细胞系, 表明胰酶可能在 PDCoV 感染过程中发挥重要作用。PDCoV 具有广泛的组织嗜性, 除了肠道和粪便外, 还可以在心、肝、脾、肺、肾和胃等内脏器官中检测到<sup>[17]</sup>。据报道, 来自 PDCoV 感染主要部位的 IPI-2I 和 IPEC-J2 细胞对 PDCoV 易感, 尽管 CPE 只能在 IPEC-J2 细



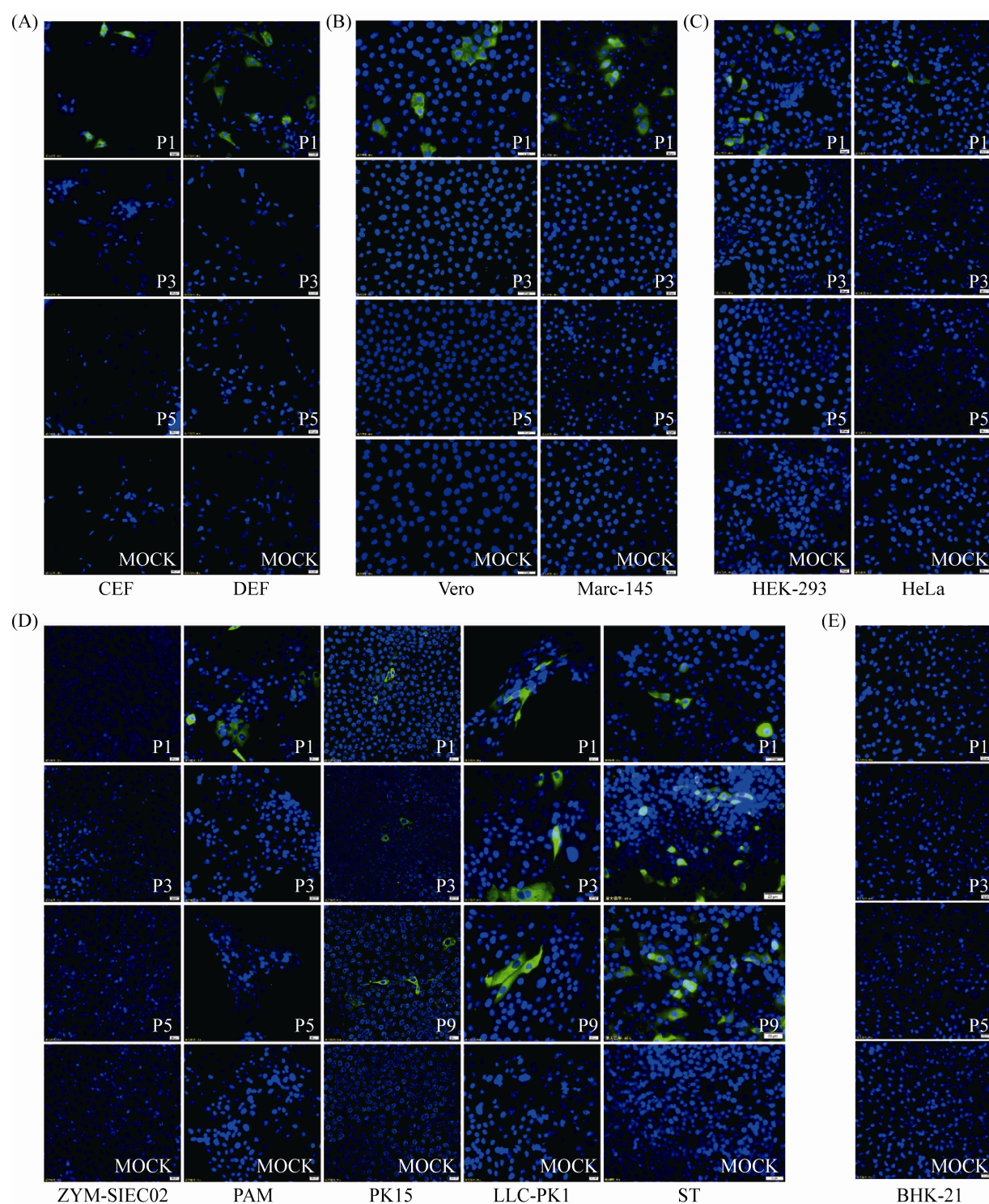


图 5 PDCoV 感染细胞的不同代次的 IFA 鉴定

Figure 5 Identification of PDCoV-infected cells at different generations by IFA. A: poultry (CEFs and DEFs); B: monkey (Vero and Marc-145); C: human (HEK-293 and HeLa); D: swine (ZYM-SIEC02, PAM, PK15, LLC-PK1 and ST); E: hamster (BHK-21) cells. FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG was used as secondary antibody (green). DAPI was used to detect nuclei (blue). Original magnification,  $\times 400$ .

表 3 PDCoV 接种不同细胞系后 S 基因的核苷酸变异分析

Table 3 Nucleotide variation analysis of the S gene of PDCoV after infection of different cell lines

Passage	Nucleotide position													
	484	500	578	787	1 188	1 443	1 450	1 769	2 277	2 389	2 636	2 767	2 813	3 092
LLC-PK1-P15	G	A	A	G	T	A	C	A	C	G	C	A	A	C
ST-P15	G	A	A	G	T	A	C	A	C	G	C	A	A	C
PK15-P15	T	C	A	T	A	A	G	A	C	T	T	A	A	C
PAM-P2	G	A	A	G	T	A	G	T	C	G	C	A	A	C
Vero-P5	T	C	C	T	A	G	C	A	T	G	C	A	A	T
HEK-293-P3	G	A	A	G	T	A	C	A	C	G	C	A	A	T
CEF-P5	T	C	A	T	T	A	G	T	C	G	T	A	A	C
DEF-P2	T	C	C	T	A	G	C	A	C	G	C	G	G	T

The colors red, yellow, blue, orange represent the nucleotide A, T, C, G after mutation, respectively.

表 4 PDCoV 接种不同细胞系后 S 基因的氨基酸变异分析

Table 4 Amino acid variation analysis of the S gene of PDCoV after infection of different cell lines

Passage	Amino acid position											
	162	167	193	263	396	484	590	797	879	923	938	1 031
LLC-PK1-P15	D	H	D	V	N	Q	E	D	S	T	N	T
ST-P15	D	H	D	V	N	Q	E	D	S	T	N	T
PK15-P15	Y	P	D	L	K	E	E	Y	L	T	N	T
PAM-P2	D	H	D	V	N	E	V	D	S	T	N	T
Vero-P5	Y	P	A	L	K	Q	E	D	S	T	N	I
HEK-293-P3	D	H	D	V	N	Q	E	D	S	T	N	I
CEF-P5	Y	P	D	L	N	E	V	D	L	T	N	T
DEF-P2	Y	P	A	L	K	Q	E	D	S	A	S	I

The colors red, yellow, blue, orange represent the the amino acids corresponding to mutated nucleotide A, T, C, G, respectively.

胞中传代 3 次后才能被观察到<sup>[22-23]</sup>。然而，在本研究中，PDCoV CHN-SC2015 株不能感染 ZYM-SIEC02 细胞(一种猪小肠上皮细胞系)<sup>[18]</sup>，可能是不同分离毒株存在不同的细胞易感性。Woo 等证实，PDCoV 不仅可以感染猪肺组织，在鼻咽样本中也检测到该病毒，表明除了粪-口传播外，呼吸道也可能是 PDCoV 感染的途径<sup>[24]</sup>。本研究发现，PDCoV 可在体外感染 PAM 细胞且存在一定水平的增殖，这再次证实，PDCoV 具有感染呼吸道的潜力，但 PDCoV 在 PAM 细胞上连续传代至 P5 后用 RT-qPCR 检测不到病毒，可能与毒株的细胞适应性差异相关，因而 CHN-SC2015 毒株不完全适应该细胞。

在病毒感染过程中，N 端 S1 与细胞受体结合，C 端 S2 介导膜融合，我们前期研究发现，PDCoV S 蛋白的 S1-CTD (aa 278–616)区域可能是主要的中和表位<sup>[25]</sup>，本研究结果显示，该区域发生了 3 个氨基酸突变(表 4)。然而，一些研究表明，冠状病毒的宿主范围在其融合亚基突变后也发生了变化，表明 S2 区域在宿主范围扩大中也具有显著意义<sup>[26]</sup>，但仍需要进一步的研究来阐明其潜在机制。本研究根据 PDCoV 在不同细胞系传代后的 PCR 结果，选择能检测到的最高代次扩增 S 基因，共发生 14 个核苷酸和相应的 12 个氨基酸突变。第 162 位氨基酸是 S 蛋白表面的糖基化位点，与 S1 表位的屏蔽和宿主

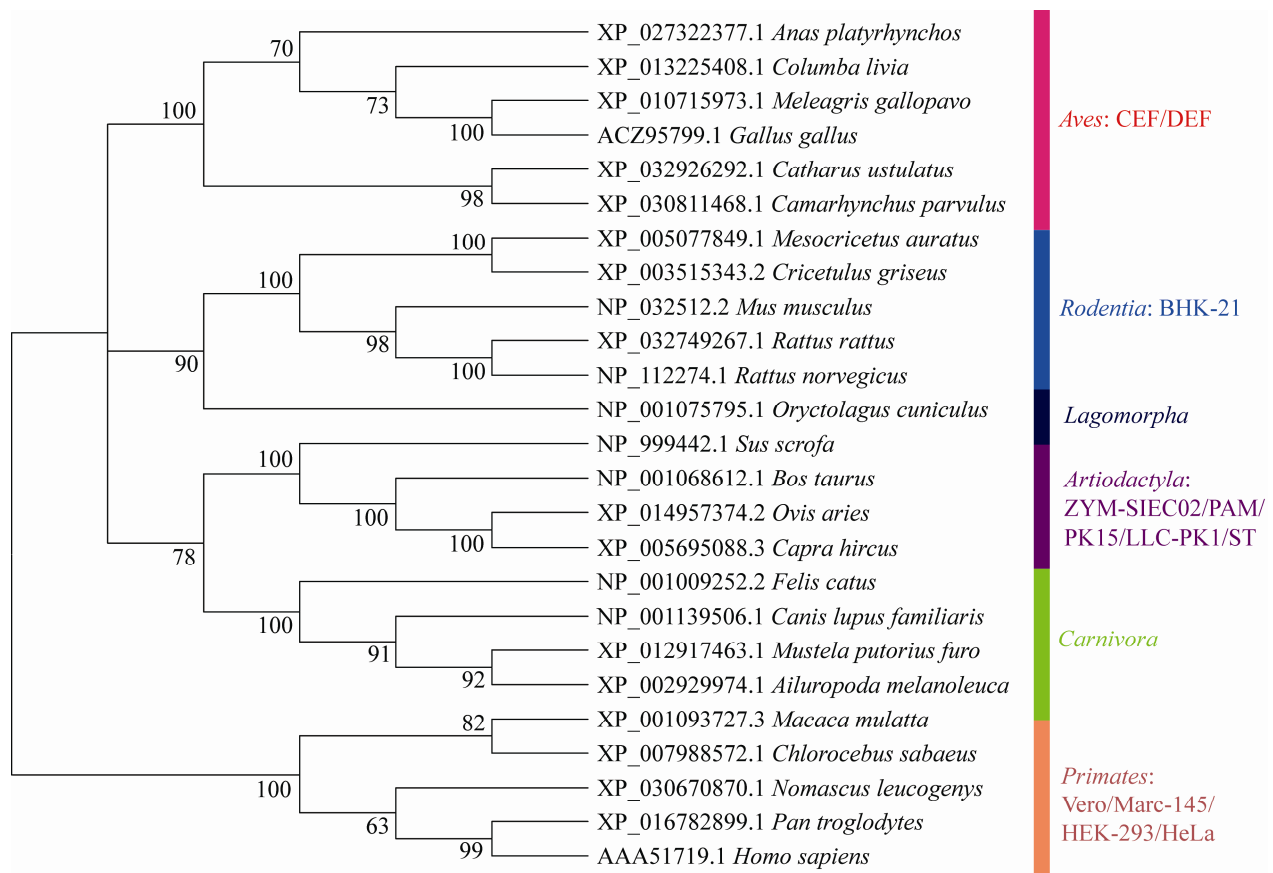


图 6 不同物种 APN 氨基酸序列的系统发育分析

Figure 6 Phylogenetic analysis of APN amino acid sequence from different species. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1 000 trees in MEGA 7 software. Only bootstrap values >70% are shown at the branch points. Reference sequences obtained from GenBank are indicated by GenBank accession numbers and species names.

免疫监测的逃避有关<sup>[27]</sup>。Lednický 等研究显示, 一个在 NSP15 与 S1 发生氨基酸点突变的 PDCoV 毒株引起 3 例临床案例<sup>[16]</sup>, 提示 PDCoV 可能对人类的致病性。因此, S 基因的突变可能也是导致 PDCoV 扩大宿主范围产生跨物种传播的重要原因之一。

APN 广泛存在于各种组织和细胞中, 尤其在小肠绒毛上皮细胞中高效表达, 且已被证明是人冠状病毒 229E、犬冠状病毒、猫传染性腹膜炎病毒和 TGEV 的特异性受体<sup>[28-29]</sup>, 而它是否是 PEDV 和 PDCoV 的受体仍存在争议<sup>[30-31]</sup>。Wang 等证实, 与 LLC-PK1 和 ST 细胞中 pAPN

的内源性表达不同, Vero 和 BHK-21 细胞缺乏 APN 表达<sup>[32]</sup>, 但本研究显示, PDCoV 也可感染 Vero 细胞, 且在 P9 仍可检测到病毒, 因此提示存在 PDCoV 的某种未知受体。同时, 本研究比较了不同种属源的 APN 序列, 结果显示, 本研究中涉及的仓鼠、鸡、鸭、猴、人与猪源 APN 氨基酸序列同源性分别为 53.26%、64.02%、65.70%、78.45%和 78.64%, 说明其间差异较大, 但 PDCoV 可同时感染这些细胞, 提示确实存在 APN 之外的某种受体。Li 等发现, APN 在猪、猫、人和鸡中的表达可以显著增强 PDCoV 对非易感 HeLa 细胞的感染, 且在 APN



敲除后 PDCoV 感染未被完全阻断<sup>[13]</sup>, 表明该病毒具有 APN 非依赖性进入途径, 可能具有某种共同受体。总的来说, 鸡胚、雏鸡、火鸡和小牛对 PDCoV 易感, 再次提示病毒跨物种传播的潜在风险<sup>[13–15,33]</sup>。2021 年 Lednicky 等在 369 名急性无名高热的儿童血样中检测出了 PDCoV, 首次报道 PDCoV 感染人类<sup>[16]</sup>。本研究也证实, PDCoV 可以感染人类来源的 HEK-293 和 HeLa 细胞, 在 P1 有轻微的增殖, 但在体外不能完全适应, 表明 PDCoV 有跨物种屏障感染人类的风险。在人类历史上, 冠状病毒跨种传播造成了动物或人类疫情, 因此, 关注猪源冠状病毒 PDCoV 的跨种传播潜力, 在防控猪病发生和公共卫生安全方面具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Su S, Wong G, Shi WF, Liu J, Lai ACK, Zhou JY, Liu WJ, Bi YH, Gao GF. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(6): 490–502.
- [2] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161–163.
- [3] Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *Journal of Virology*, 1990, 64(10): 4761–4766.
- [4] De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(8): 523–534.
- [5] Li H, Liu SM, Yu XH, Tang SL, Tang CK. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 55(5): 105951.
- [6] Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, Bai R, Teng JLL, Tsang CCC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus *Deltacoronavirus* supports bat coronaviruses as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronaviruses as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995–4008.
- [7] Lu GW, Wang QH, Gao GF. Bat-to-human: spike features determining ‘host jump’ of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(8): 468–478.
- [8] Li GW, Chen Q, Harmon KM, Yoon KJ, Schwartz KJ, Hoogland MJ, Gauger PC, Main RG, Zhang JQ. Full-length genome sequence of porcine *Deltacoronavirus* strain USA/IA/2014/8734. *Genome Announcements*, 2014, 2(2): e00278–e00214.
- [9] Song D, Zhou X, Peng Q, Chen Y, Zhang F, Huang T, Zhang T, Li A, Huang D, Wu Q, He H, Tang Y. Newly emerged porcine *Deltacoronavirus* associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 575–580.
- [10] Lee S, Lee C. Complete genome characterization of Korean porcine *Deltacoronavirus* strain KOR/KNU14-04/2014. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01191–e01114.
- [11] Fang PX, Fang LR, Hong YY, Liu XR, Dong N, Ma PP, Bi J, Wang D, Xiao SB. Discovery of a novel accessory protein NS7a encoded by porcine *Deltacoronavirus*. *The Journal of General Virology*, 2017, 98(2): 173–178.
- [12] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, 2016, 3(1): 237–261.
- [13] Li WT, Hulswit RJG, Kenney SP, Widjaja I, Jung K, Alhamo MA, Van Dieren B, Van Kuppeveld FJM, Saif LJ, Bosch BJ. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): E5135–E5143.
- [14] Liang QQ, Zhang HL, Li BX, Ding QW, Wang YB, Gao WM, Guo DH, Wei ZY, Hu H. Susceptibility of chickens to porcine *Deltacoronavirus* infection. *Viruses*, 2019, 11(6): 573.
- [15] Jung K, Hu H, Saif LJ. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine *Deltacoronavirus*, but not with the swine enteric *Alphacoronavirus*, porcine epidemic diarrhea virus. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2357–2362.
- [16] Lednicky JA, Tagliamonte MS, White SK, Elbadry MA, Alam MM, Stephenson CJ, Bonny TS, Loeb JC, Telisma T, Chavannes S, Ostrov DA, Mavian C, De Rochars VMB, Salemi M, Glenn Morris J. Emergence

- of porcine delta-coronavirus pathogenic infections among children in Haiti through independent zoonoses and convergent evolution. *medRxiv*, 2021, DOI: 10.1101/2021.03.19.21253391.
- [17] Zhao YJ, Qu H, Hu JF, Fu JY, Chen R, Li C, Cao SJ, Wen YP, Wu R, Zhao Q, Yan QG, Wen XT, Huang XB. Characterization and pathogenicity of the porcine *Deltacoronavirus* isolated in southwest China. *Viruses*, 2019, 11(11): 1074.
- [18] Wang J, Hu GD, Lin Z, He L, Xu L, Zhang YM. Characteristic and functional analysis of a newly established porcine small intestinal epithelial cell line. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e110916.
- [19] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27(3): 493–497.
- [20] Yang YL, Qin P, Wang B, Liu Y, Xu GH, Peng L, Zhou JY, Zhu SJ, Huang YW. Broad cross-species infection of cultured cells by bat HKU<sub>2</sub>-related swine acute diarrhea syndrome coronavirus and identification of its replication in murine dendritic cells *in vivo* highlight its potential for diverse interspecies transmission. *Journal of Virology*, 2019, 93(24): e01448-19.
- [21] Hu H, Jung K, Vlasova AN, Chepngeno J, Lu ZY, Wang QH, Saif LJ. Isolation and characterization of porcine *Deltacoronavirus* from pigs with diarrhea in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1537–1548.
- [22] Jung K, Miyazaki A, Hu H, Saif LJ. Susceptibility of porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells to infection with porcine *Deltacoronavirus* (PDCoV) and serum cytokine responses of gnotobiotic pigs to acute infection with IPEC-J2 cell culture-passaged PDCoV. *Veterinary Microbiology*, 2018, 221: 49–58.
- [23] Wang XL, Fang LR, Liu SD, Ke WT, Wang D, Peng GQ, Xiao SB. Susceptibility of porcine IPI-2I intestinal epithelial cells to infection with swine enteric coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 2019, 233: 21–27.
- [24] Woo PC, Lau SK, Tsang CC, Lau CC, Wong PC, Chow FW, Fong JY, Yuen KY. Coronavirus HKU15 in respiratory tract of pigs and first discovery of coronavirus quasispecies in 5'-untranslated region. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(6): e53.
- [25] Chen R, Fu JY, Hu JF, Li C, Zhao YJ, Qu H, Wen XT, Cao SJ, Wen YP, Wu R, Zhao Q, Yan QG, Huang Y, Ma XP, Han XF, Huang XB. Identification of the immunodominant neutralizing regions in the spike glycoprotein of porcine *Deltacoronavirus*. *Virus Research*, 2020, 276: 197834.
- [26] De Haan CAM, Te Lintelo E, Li Z, Raaben M, Wurdinger T, Bosch BJ, Rottier PJM. Cooperative involvement of the S1 and S2 subunits of the murine coronavirus spike protein in receptor binding and extended host range. *Journal of Virology*, 2006, 80(22): 10909–10918.
- [27] Shang J, Zheng Y, Yang Y, Liu C, Geng Q, Tai W, Du L, Zhou Y, Zhang W, Li F. Cryo-electron microscopy structure of porcine *Deltacoronavirus* spike protein in the prefusion state. *Journal of Virology*, 2018, 92(4): e01556-17.
- [28] Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellicchio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, 1992, 357(6377): 420–422.
- [29] Benbacar L, Kut E, Besnardeau L, Laude H, Delmas B. Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *Journal of Virology*, 1997, 71(1): 734–737.
- [30] Oh JS, Song DS, Park BK. Identification of a putative cellular receptor 150 kDa polypeptide for porcine epidemic diarrhea virus in porcine enterocytes. *Journal of Veterinary Science*, 2003, 4(3): 269–275.
- [31] Shirato K, Maejima M, Islam MT, Miyazaki A, Kawase M, Matsuyama S, Taguchi F. Porcine aminopeptidase N is not a cellular receptor of porcine epidemic diarrhea virus, but promotes its infectivity via aminopeptidase activity. *The Journal of General Virology*, 2016, 97(10): 2528–2539.
- [32] Wang B, Liu Y, Ji CM, Yang YL, Liang QZ, Zhao PW, Xu LD, Lei XM, Luo WT, Qin P, Zhou JY, Huang YW. Porcine *Deltacoronavirus* engages the transmissible gastroenteritis virus functional receptor porcine aminopeptidase N for infectious cellular entry. *Journal of Virology*, 2018, 92(12): e00318-18.
- [33] Boley PA, Alhamo MA, Lossie G, Yadav KK, Vasquez-Lee M, Saif LJ, Kenney SP. Porcine *Deltacoronavirus* infection and transmission in poultry, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(2): 255–265.

(本文责编 李磊)