维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 1期
2002年2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(1):77-81
February 2002

猪瘟病毒野毒株持续感染细胞模型的建立*

应松成[1], 郑从义[1**], 屈三甫[1], 张楚瑜[1], 王在时[2]
(1.武汉大学生命科学学院,湖北 武汉 430072; 2.中国兽药监察所,北京 100081)

Model Establishment of the Cell Persistently Infected by a Field-isolated Virulent Strain of CSFV

YING Song-cheng[1], ZHENG Cong-yi[1**], QU San-pu[1], ZHANG Chu-yu[1], WANG Zai-shi[2]
(1. *College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan* 430072, *China*;
2. *China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing* 100081, *China*)

Abstract: A porcine kidney cell line(PK-15) was infected by a field-isolated virulent strain of classical swine fever virus (CSFV39). After the infected cells had subcultured 79 passages for near eight months, a steady model of the cell persistently infected by virus has been established, hence the CSFV39-PK15 cell line was procured. In this experiment immunofluorescence, RT-PCR assay and electron microscopy observation were used to identify the basic viral features in the CSFV39-PK15 cell. The results showed the 9th, 29th, 79th CSFV39-PK15 cell passages still harbored CSFV and they had the radical characteristics of viral persistent infection. This endeavor should be the foundation for the further research of CSFV persistent infection.

Key words: Classical swine fever virus(CSFV39); Persistent infection; Cell model; RT-PCR

摘要:采用猪瘟病毒野毒株(CSFV39)感染猪肾传代细胞系PK-15,经连续传79代,建立了稳定的病毒持续感染细胞模型,获得CSFV39-PK15细胞株。用免疫荧光、RT-PCR检测、透射电镜跟踪观察了CSFV39-PK15细胞株连续传代中病毒在细胞内的存在情况。结果表明第9,29,79代细胞仍有猪瘟病毒存在,表现出病毒持续感染的基本特征。这为深入研究猪瘟病毒持续感染机理奠定了基础。

关键词:猪瘟病毒株CSFV39;持续感染;细胞模型;RT-PCR
中图分类号:S852.651 **文章标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2002)01-0077-05

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV又称Hog Cholera Virus, HCV)属于黄病毒科(*Flaviviridae*)瘟病毒属(*Pestivirus*),为有囊膜的正链RNA病毒[1]。由其引起的猪瘟是猪的一种急性接触性传染性病毒病,对养猪业危害十分严重,是世界粮农组织和各国政府严密监控和检疫的主要家畜传染病之一[2]。

迄今国内外对CSFV的研究主要侧重于流行病学和分子病毒学方面,从病毒持续感染和细胞生物学角度研究的报道甚少。CSFV疫苗株感染一般不引起细胞病变(Cytopathic effect, CPE),且在培养细胞中病毒滴度很低,可以在细胞中持续存在[3]。但CSFV疫苗株在宿主细胞中的这种持续存在形式与流行病学上的病毒持续感染机制完全不同,因为CSFV野毒株在体内形成持续感染的例子未见报道。因此,研究CSFV野毒株持续感染机理对阐明二者间的差异非常必要。而建立稳定的持续感染细胞模型将是深入研究其机理的关键环节。

收稿日期:2001-03-19,修回日期:2001-06-25
* 基金项目:国家重点基础研究发展规划项目"973"(G1999011904)
作者简介:应松成(1977-),男,浙江金华籍,硕士研究生
** 通讯作者. Correspondence author. Tel:027-87682319, Email:cctcc@whu.edu.cn.

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究以猪瘟病毒野毒株(CSFV39)为实验材料,感染传代的猪肾细胞系(PK-15),建立了稳定传代的细胞模型,获得CSFV39病毒持续感染细胞株CSFV39-PK15。细胞株连续传79代,近8个月时间,保持了病毒持续感染细胞的基本特性,这为深入研究CSFV持续感染机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病毒和宿主细胞

1.1.1 PK-细胞系(135-136代) 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

1.1.2 病毒株 CSFV39野毒株,由中国兽药监察所提供。

1.1.3 FITC标记的抗CSFV多克隆抗体 由中国兽药监察所惠赠。

1.2 方法

1.2.1 PK-15细胞培养、接毒及连续传代条件 PK-15细胞按细胞培养常规方法培养,培养液为MEM培养基含10%无牛病毒性腹泻病毒抗体的胎牛血清(GIBCO产品)。待细胞铺长成70%单层时接CSFV39血毒,37℃吸附1h,吸走多余的病毒液,Hank's液洗涤,加维持液(含2%无牛病毒性腹泻病毒抗体的胎牛血清)培养。细胞形成单层后胰酶消化,常规传代。

1.2.2 免疫荧光检测 采用免疫荧光多抗技术检测持续感染细胞中CSFV的存在状况,以正常PK-15细胞为阴性对照。待检细胞片用PBS(pH7.2)冲洗、纯丙酮固定15min,自然干燥,加FITC标记的抗CSFV多抗37℃温育1h,PBS(pH7.2)冲洗,封片液封片。Olympus荧光显微镜下观察并照相。

1.2.3 RT-PCR检测

1.2.3.1 引物设计:依据文献[4~6]中猪瘟病毒核苷酸序列设计引物。上游引物位于HCLV株98-119位置,序列为CCATGCCCATAGTAGGACTAGC,下游引物位于HCLV株890-911位置,序列为CTTCTCTTTACTCCCACTTGCG。预计扩增片段长度为814bp,引物由上海生物工程公司合成。

1.2.3.2 CSFV-39病毒株RNA的提取 按Promega RNA提取试剂盒说明书进行。

1.2.3.3 逆转录合成病毒cDNA第一链:取总RNA 1.5μL,加下游引物1μL(20pmol/L),70℃变性10min,快速置于冰浴3min,依次加5μL 5×M-MLV Buffer,5μL dNTPs(2.5mmol/L),0.5μL RNasin(50U/μL),42℃2min,1.5μL M-MLV RT酶(200U/μL),补水至25μL,37℃逆转录90min,72℃变性10min,-20℃保存备用。

图1 CSFV39-PK15细胞在传代过程中的形态变化

A.阴性对照PK-15细胞(×400);B.病毒感染后第30代细胞(空泡结构增加)(×400);

C.病毒感染后第79代细胞(细胞有卷成一团的趋向)(×200)。

Fig 1 Morphological changes of CSFV39-PK15 cells in the process of subculture

A. PK15 control cells(×400); B. The 30th passage CSFV39-PK15 cells post infection (Augmentation of the structure of empty bubbles)(×400); C. The 79th passage CSFV39-PK15 cells post infection (CSFV39-PK15 cells had a tendency to be a roll)(×200).

1.2.3.4 PCR扩增:取上述逆转录产物2μL,分别加入3μL 10×PCR Buffer,2.4μL $MgCl_2$(25mmol/L),2.5μL dNTPs(2.5mmol/L),上下游引物各1μL,TaqDNA聚合酶(200u/μL)0.7μL,补水至

维普资讯 http://www.cqvip.com

30μL。94℃预变性3min,以93℃30min,52℃35min,72℃120min进行循环反应,共33个循环,最后72℃保温10min。

1.2.3.5　电泳:取RT-PCR产物10μL,于1.5%琼脂糖凝胶中电泳。

1.2.4　CSFV39-PK15的电镜观察　细胞传代后48h用塑料刮棒刮下各代次的CSFV39-PK15单层细胞,800-1 000r/min离心10min,弃上清,沿离心管壁加入2mL 2.5%戊二醛固定液,4℃固定过夜。常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋、超薄切片、铀铅染色,在透射电镜下观察结果并拍照。以正常PK-15细胞作为对照。

2　结果

2.1　CSFV39-PK15细胞的形态特征

用CSFV39野毒株感染PK-15细胞,经持续传代后获得CSFV39-PK15细胞株。与正常PK-15细胞(图1A)相比,CSFV39-PK15细胞株增殖速度加快,但细胞形态未发生明显的变化,且细胞在传代过程中不出现明显的细胞病变(CPE)。然而,在高倍光镜下观察CSFV39-PK15细胞内空泡明显增多(图1B)。该细胞株传至70多代后细胞有卷成一团的趋向,但不影响细胞的正常生长(图1C)。

2.2　CSFV39-PK15细胞中病毒抗原的分布定位

用FIFC标记的CSFV多抗进行免疫荧光检测,证明病毒抗原主要分布在持续感染细胞的细胞质中,某些阳性细胞核周围的区域荧光更强,可以清晰的勾画出细胞核的轮廓,这与相关文献报道[3,7,8]相吻合。检测结果还显示,CSFV39-PK15细胞株在9,29,78代均呈猪瘟病毒抗原强阳性(彩版Ⅱ图2B,C,D),而对照细胞则呈阴性结果(彩版Ⅱ图2A)。

2.3　CSFV39病毒基因组的RT-PCR检测

猪瘟病毒基因组的5'非编码区由360～374个碱基组成并高度保守,是运用RT-PCR技术鉴定CSFV的首选区域[9,10]。N^{pro}为具有自我催化功能的蛋白水解酶,由164或168个氨基酸组成。其基因组序列在瘟病毒属中较为保守[11]。我们采用的引物为横跨猪瘟病毒这两段较保守的区域,适用于猪瘟病毒的特异检测。

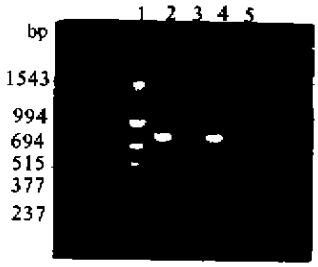

图3　CSFV39-PK15细胞的RT-PCR检测电泳图谱

泳道1,PCR marker;2,第9代CSFV39-PK15细胞;3,第29代CSFV39-PK15细胞;4,第79代CSFV39-PK15细胞;5,正常PK15细胞对照。

Fig.3　Electrophoretogram of RT-PCR assay in CSFV39-PK15 cells of different passages

Lane 1, PCR marker; 2, The 9th passage CSFV39-PK15 cells; 3, The 29th passage CSFV39-PK15 cells; 4, The 79th passage CSFV39-PK15 cells; 5, PK15 control cells.

猪瘟病毒感染PK-15细胞后,各取8、28、78代CSFV39-PK15细胞进行RT-PCR检测。经RNA提取,病毒RNA逆转录成cDNA,特异引物对扩增,PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳。结果显示,CSFV39-PK15细胞株不同代次细胞中均可用RT-PCR扩增出特异片段,片段长度与预期相一致,均为814bp(图3),而正常PK-15细胞扩增结果为阴性。

2.4　CSFV39-PK15株病毒颗粒的电镜观察

对第9、29、79代的CSFV39-PK15细胞株进行电镜观察,可以清晰地观察到成熟的猪瘟病毒粒子,病毒粒子呈球型,直径多为70nm左右,有囊膜包裹,内含50nm的电子致密的核衣壳(图4A,B,C)。但各代次中电镜能观察到的病毒粒子密度太低,这可能与猪瘟病毒的特性有关,也可能是病毒持续感染的结果。

维普资讯 http://www.cqvip.com

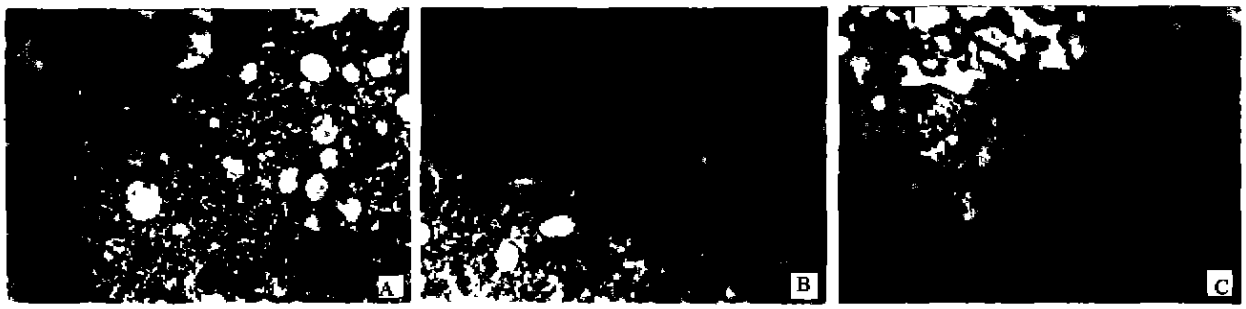

图4 CSFV39-PK15细胞中病毒颗粒的电镜观察(×11000)

A,第9代CSFV39-PK15细胞;B.第29代CSFV39-PK15细胞;C,第79代CSFV39-PK15细胞。

Fig.4 Electron microscopy observation of CSFV particles in CSFV39-PK15 cells(×11000)

A, The 9th passage CSFV39-PK15 cells post infection; B, The 9th passage CSFV39-PK15 cells post infection; C, The 9th passage CSFV39-PK15 cells post infection.

3 讨论

持续性病毒感染是病毒学研究的热点领域之一,许多病毒如乙型肝炎病毒,人乳头瘤病毒,水痘-带状泡疹病毒,EB病毒等都可以引起持续感染,并对机体造成严重的危害。在体内病毒构成持续感染必须具备两方面的功能,即首先具备调控其溶解细胞的功能,使病毒不裂解细胞而得以持续存在;其二具有能逃逸宿主免疫系统识别与清除的功能[12,13]。由于机体内在消除病毒感染方面存在多种途径,受多种免疫机制的调节,故在机体水平上深入研究病毒持续感染机制有一定局限性,而在体外细胞水平上研究则有其优越性,即细胞的同质性,培养条件的可控性,病毒感染的单一性,测定技术的灵活性等。然而,体外研究病毒持续感染的机制,其核心技术就是建立病毒持续感染的细胞模型。我们用猪瘟病毒野毒株(CSFV39)感染PK15细胞,建立了持续感染细胞模型,经过鉴定其一般特性与其它病毒持续感染基本相似,为深入研究猪瘟病毒持续感染机制奠定了基础。

为了跟踪猪瘟病毒在PK-15各细胞代次的存在情况,我们使用了免疫荧光、RT-PCR检测、电镜观察三种方法。免疫荧光抗体技术因为操作简便,快速,是鉴别诊断CSFV的常用方法,但是由于CSFV和同属的BVDV和BDV存在较强的交叉免疫反应,故基于抗原-抗体反应的免疫荧光多抗检测技术存在一定的缺陷,而且免疫荧光技术不能清晰地检测出微弱的病毒抗原,很有可能将阳性细胞判为阴性。因此引入第二种方法RT-PCR是必要的。RT-PCR技术检测CSFV在国外已有报道[9,10],其特异性强、灵敏度高,能检测出微量的病毒RNA。我们选用了猪瘟病毒基因组保守区域两端的引物,用RT-PCR技术检测CSFV,结果表明该方法重复性好,特异性强(图3)。为了进一步证明CSFV的病毒颗粒持续存在,我们分别对CSFV39-PK15的9、29和79代次的细胞进行电镜观察,结果在病毒持续感染细胞的各代次细胞中都观察到了病毒粒子,形态大小基本一致。

病毒必须要在细胞内才能表现出它们的基本生命形式。病毒在细胞内的增殖过程是病毒与细胞相互作用的极为复杂的过程,绝大多数病毒在细胞内复制装配并释放,可以呈现致宿主细胞的病变(CPE)效应。然而猪瘟病毒并不出现明显的细胞病变。目前病毒持续感染存在几种可能的机制:其一是病毒变异机制,病毒核酸中一些重要基因组有缺失,故不能单独复制,感染性的病毒颗粒较少;其二,病毒温度敏感突变机制,温度敏感变变株也是构成病毒持续存在的原因,如新城疫病毒在L细胞培养中建立的持续感染,发现分离出的毒株与亲代毒株间有明显的差别,对42℃~43℃的温度敏感,因失

维普资讯 http://www.cqvip.com

去原有的RNA多聚酶,故不能复制出子代RNA,具有ts株的特性[12];其三,病毒基因整合机制,病毒基因整合于宿主细胞染色体上也是病毒持续存在的一种策略,RNA病毒可通过逆转录成cDNA中间体而整合到宿主细胞染色体上[13]。至于CSFV39株是以何种机制在PK15细胞中构成持续感染?宿主细胞对病毒有何应急反应?有待深入研究。

参考文献

[1] Wengler G. Family Flavivirdae. In: Franchi R I B, Fauque C M, Knudson D L *et al*. ed. Classfication and nomenclature of viruses, Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Berlin: Springer Verlaf, 1991, 223-233

[2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社, 1985, 505-533.

[3] 王镇,陆宇,周鹏程,等. 猪瘟病毒在PK细胞和MPK细胞中繁殖过程的研究[J]. 微生物学报, 1999, 39(3):189-195.

[4] 王家富. 猪瘟病毒兔化弱毒株和石门强毒株基因组结构分析[D]. 武汉:武汉大学, 1999.

[5] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nuleotide sequence of the genome of hog cholera virus[J]. Virology, 1989, 171:555-567.

[6] Moormann R J M, Warmerdam P A M, Van D M B, *et al*. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E_1[J]. Virology, 1990, 177:184-198.

[7] Mengeling W L, Pirtle E C, Packer R A. Persitent infection of an established porcine kidney cell lline with selected strains of hog cholera virus[J]. Am J Vet Res, 1970, 31:2019-2024.

[8] 王镇,陆宇,丁明孝. 猪瘟病毒中国兔化弱毒疫苗株在原代牛睾丸细胞中增殖特性的研究[J]. 中国病毒学, 2001, 15:170-178.

[9] Diaze de Arce H, Nunez J I, Ganges L, *et al*. An RT-PCR assay for the specific detection of classical swine fever virus in clinical samples[J]. Vet Res, 1998, 29(5):431-440.

[10] Hofmann M A, Brechtbuchl K, Staeuber N. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region[J]. Arch Virol, 1994, 139:217-229.

[11] Collett M S, Wiskerchen M, Welniak, *et al*. Bovine viral diarrhea virus genomic orgnization[J]. Arch Virol, 1991, 3(Suppl): 7088-7095.

[12] 闻玉梅. 医学分子病毒学及其应用[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1995, 21-29.

[13] 闻玉梅,等. 现代医学微生物学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1999, 790-799.