



石迎, 陶洁, 李本强, 程靖华, 刘惠莉. 适应肠道细胞的猪德尔塔冠状病毒对仔猪的致病性分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(05):56-64.

SHI Ying, TAO Jie, LI Benqiang, CHENG Jinghua, LIU Huili. The pathogenicity of the intestinal cell-adapted porcine deltacoronavirus to piglets[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(05):56-64.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.05.05

适应肠道细胞的猪德尔塔冠状病毒对仔猪的致病性分析

石迎^{1,2} 陶洁^{1,2} 李本强^{1,2} 程靖华^{1,2} 刘惠莉^{1,2*}

(1. 上海市农业科学院 畜牧兽医研究所/上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;

2. 上海市种猪工程技术中心, 上海 201302)

摘要 为分析适应肠道细胞的猪德尔塔冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)对仔猪的致病性,本研究首先用ST细胞分离培养的PDCoV感染IPEC-J2细胞进行适应性试验,通过间接免疫荧光试验(IFA)检测PDCoV抗原,然后绘制病毒生长曲线,最后分析适应IPEC-J2细胞的PDCoV对仔猪的致病性。结果表明:1)经ST细胞分离培养的PDCoV可以感染IPEC-J2细胞并出现CPE,可在细胞内检测到PDCoV抗原,PDCoV在感染IPEC-J2细胞后48 h达到增殖高峰。2)适应IPEC-J2的PDCoV对仔猪具有肠致病性,仔猪出现明显腹泻症状,甚至出现死亡;剖检可见明显的肠道病变,病理组织学显示肠上皮细胞及肠绒毛病变,并通过免疫组化对抗原进行定位,发现PDCoV广泛分布于肠道上皮细胞。3)肠道免疫细胞因子分析发现PDCoV感染仔猪后肠道I型干扰素表达上调,同时激活体内Th1和Th2型肠道细胞免疫反应,诱导感染仔猪产生免疫细胞因子发挥抗病毒作用。综上,经ST细胞分离培养的PDCoV对IPEC-J2细胞具有较强的适应性,并对仔猪产生较强的致病性。本研究为PDCoV致病机制及抗病毒免疫进一步研究奠定基础。

关键词 猪德尔塔冠状病毒; IPEC-J2细胞; 仔猪; 免疫反应; 致病机理

中图分类号 S852.65

文章编号 1007-4333(2024)05-0056-09

文献标志码 A

The pathogenicity of the intestinal cell-adapted porcine deltacoronavirus to piglets

SHI Ying^{1,2}, TAO Jie^{1,2}, LI Benqiang^{1,2}, CHENG Jinghua^{1,2}, LIU Huili^{1,2*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences/Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetic Breeding, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Pig Breeding, Shanghai 201302, China)

Abstract To analyze the pathogenicity of the Porcine deltacoronavirus (PDCoV) adapted to intestinal cells in piglets, the IPEC-J2 cells were infected with PDCoV which was isolated from ST cells for adaptability testing. The PDCoV antigen was detected by indirect immunofluorescent assay (IFA), and then the virus growth curve was plotted. Finally, the pathogenicity of PDCoV adapted to IPEC-J2 cells in piglets was analyzed. The results showed that: 1) PDCoV isolated from ST cells could infect IPEC-J2 cells with CPEs and PDCoV antigen could be detected within the cells. PDCoV reached its proliferation peak at 48 hours after infecting IPEC-J2 cells. 2) PDCoV adapted to IPEC-J2 had intestinal pathogenicity in piglets, causing significant diarrhea symptoms and even death. Obvious intestinal histopathologic lesions were observed, and histopathological examination revealed lesions in intestinal epithelial cells and villi, and the antigen was

收稿日期: 2023-11-23

基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划资助(21YF1441300);上海市农业科学院青年科技人员“助跑”计划资助

第一作者: 石迎(ORCID:0000-0003-2599-7903), 助理研究员, 主要从事动物病毒学研究, E-mail: shiyingsunny@126.com

通讯作者: 刘惠莉(ORCID:0000-0002-8841-2282), 研究员, 主要从事动物疫病研究, E-mail: huilil@163.com

localized in the intestinal epithelial cells by immunohistochemistry. 3) Gut immune cytokine analysis revealed that the type I interferon expression was upregulated after PDCoV infection in piglets. Both Th1 and Th2 type intestinal cell immune responses were activated simultaneously, inducing the production of immune cytokines in infected piglets to exert antiviral effects. Taken together, PDCoV isolated from ST cells, has strong adaptability to IPEC-J2 cells, and exhibits strong intestinal pathogenicity in piglets. The study lays the foundation for further research on the pathogenic mechanism and antiviral immunity of PDCoV.

Keywords Porcine deltacoronavirus (PDCoV); IPEC-J2 cell; piglet; immunity; pathogenesis

猪病毒性腹泻病是目前规模化养殖场普遍存在的群发性传染病,对养猪业造成了巨大的经济损失。猪德尔塔冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)是近年来新发现的引起猪腹泻的肠道病毒,临床中常与其他腹泻类病毒混合感染,且症状相似,主要表现为腹泻、呕吐、脱水甚至死亡^[1]。复杂的病原构成及病毒的变异特性是导致腹泻频发且无法根治的一个重要原因^[2]。PDCoV是尼多病毒目冠状病毒科德尔塔冠状病毒属的一员,于2012年首次在香港展开的一项对鸟类和哺乳动物冠状病毒流行监测时被发现^[3]。迄今为止,许多国家均报道了PDCoV的出现,包括美国、加拿大、韩国、日本、中国、泰国、老挝和越南^[4-10],表明其已在全球范围流行。在发生腹泻的猪场中,猪感染PDCoV的阳性率高达7%~30%^[9]。PDCoV感染后仔猪表现的临床症状严重程度往往低于猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)^[2],然而,感染了PDCoV的猪更容易混合感染其他病毒,为临床诊断与疫病防控增加了难度^[1]。此外,最新研究报道PDCoV可以跨宿主感染牛和禽^[11-13]。2021年有研究报道,在3名海地儿童的血浆样品中鉴定出PDCoV^[14]。因此,PDCoV具有感染禽类、哺乳动物甚至人类的能力。冠状病毒具有高度变异性,其他同属的冠状病毒近年来引起的人类感染大流行也为研究者敲响了警钟。因此研究其致病性及致病机理不仅对猪养殖业至关重要,还可为公共卫生安全提出预警,保障人类健康。

PDCoV已成功在猪源的2种上皮细胞系猪肾近曲小管上皮细胞(Lilly laboratories cell-porcine kidney, LLC-PK)和猪睾丸细胞(Swine testis, ST)中分离并可稳定传代^[15]。虽然PDCoV的体外感染致病机制在这2种细胞中已进行了初步探究,由于肠道是PDCoV的靶器官,LLC-PK和ST细胞的感染机制并不能模拟体内感染的真实反应,因此选用肠道细胞进行感染及致病机制的体外研究,对于

PDCoV防控策略的开发更具指导意义。猪小肠上皮细胞(Porcine small intestinal epithelial cells, IPEC-J2)是一种非转化的、稳定的小肠柱状上皮细胞系^[16-17],由于其与肠细胞的生理和形态相似性,该原代细胞系已越来越多地用于肠上皮细胞与肠道细菌/病毒相互作用的细胞模型。IPEC-J2细胞曾用于PEDV和传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)感染肠道细胞的差异蛋白质组学及感染机制研究中^[18-21]。通过比较PEDV体外感染非洲绿猴肾细胞(Verda reno, Vero)^[21]和IPEC-J2细胞的相关数据发现,IPEC-J2细胞表征的体外感染数据与PEDV体内感染肠细胞的生理和病理结果一致性更高^[18],这也表明用IPEC-J2细胞研究肠道病毒的致病机制更能反应体内感染的真实情况。之前的研究发现,与LLC-PK和ST细胞相比,感染PDCoV的原始生物材料(比如猪粪便、肠道内容物或组织)不能有效地在IPEC-J2细胞增殖^[15],但是经过LLC-PK细胞增殖的PDCoV可以在IPEC-J2细胞中繁殖和传代^[22]。那么经过其他猪细胞增殖过的PDCoV对IPEC-J2细胞的易感染如何?因此,本研究用ST细胞分离培养的PDCoV感染IPEC-J2细胞,确认其对IPEC-J2的感染性和适应性,从而为进一步表征肠道病理奠定基础。并将适应了肠道细胞的PDCoV对仔猪的致病性进行初步分析,分别在组织病理水平和肠道免疫层面对其致病性进行了分析探讨,为PDCoV肠道细胞适应株的研究数据进行了完善补充,同时为后续PDCoV致病机制的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒株与实验动物

IPEC-J2细胞、ST细胞和病毒分离株PDCoV由本实验室保存,PDCoV由ST细胞扩增。5日龄仔猪购自上海浦东某猪场,健康状况良好,使用实

实验室建立的ELISA方法检测PDCoV抗体阴性。

1.2 主要试剂

PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Code 6110A)、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, Code RR820Q)试剂盒均购自TaKaRa公司;PDCoV-NmAb (DA0324-29)单克隆抗体购自上海佑隆生物科技有限公司;胰酶(Code SLCD2576)购自SIGMA公司;其他常规试剂均为分析纯。

1.3 PDCoV感染IPEC-J2细胞试验

细胞在以下培养基中繁殖和传代:DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco, USA)中添加5%胎牛血清(Fatal calf serum, FBS),1%青霉素/链霉素(Gibco)。

经过ST细胞分离增殖的PDCoV以1 MOI (Multiplicity of infection)感染IPEC-J2细胞,并传代培养。具体操作:待IPEC-J2细胞生长密度达到80%,进行感染试验。首先用PBS缓冲液洗涤细胞3次,病毒吸附1.5 h,DMEM洗涤一次,然后加入含15 mg/mL胰酶的病毒维持培养液,培养观察。72 h收取上清液进行传代培养,直至出现细胞病变。

1.4 PDCoV感染IPEC-J2细胞的免疫荧光反应

将IPEC-J2细胞接种于细胞培养六孔板上,待其密度达到80%,取病毒上清液0.1 MOI按上述方法接种,于细胞培养箱中培养48 h后进行间接免疫荧光检测。方法如下:经过4%多聚甲醛室温固定15 min,0.5% TritonX-100室温通透15 min,1% BSA室温封闭30 min后,以鼠源PDCoV单抗作为一抗室温孵育1 h,然后FITC羊抗鼠二抗(Sigma, 稀释400倍)进行室温反应1 h,最后加入500 μ L PBS在倒置荧光显微镜下观察。

1.5 PDCoV在IPEC-J2细胞上的病毒生长曲线

将病毒以0.1 MOI感染六孔板中长至80%的IPEC-J2细胞,做3个平行重复,吸附1.5 h后,使用DMEM培养基洗去未结合的游离病毒,最后用含有胰酶的病毒培养液2 mL维持细胞生长。在接毒后12、24、36、48、60和72 h分别收集细胞上清200 μ L并补维持液200 μ L。所有细胞上清样品使用IPEC-J2细胞测定半数组织培养感染量(50% Tissue culture infectious dose, TCID₅₀),根据不同时间点细胞上清中病毒的滴度(TCID₅₀/mL)绘制PDCoV在IPEC-J2细胞的病毒生长曲线。

1.6 适应IPEC-J2细胞的PDCoV对仔猪的致病性

1.6.1 试验设计

将10头5日龄仔猪随机分为2组:试验组与对照组。试验组仔猪每头口服5 mL($10^{5.0}$ TCID₅₀/mL)PDCoV(适应IPEC-J2细胞的第三代病毒),对照组口服等剂量DMEM,并进行隔离饲养。所有仔猪均保证充足奶粉,每4 h观察一次。

每天统计仔猪腹泻、饮水采食、死亡等临床表征,分别在感染后第2、4、6天剖检,采集仔猪小肠(十二指肠、空肠和回肠),一部分组织样品用4%甲醛固定用于制作病理切片,分别进行HE (Hematoxylin eosin)染色及免疫组化;另一部分组织样品,经过液氮研磨后,利用荧光定量RT-qPCR方法检测细胞因子表达量。

1.6.2 PDCoV感染仔猪后临床症状及肠道病理组织学观察

根据试验设计记录仔猪的临床症状,剖检仔猪观察病理变化,制作病理切片后进行组织病理学解析,通过免疫组化确定病原定殖部位。

1.6.3 荧光定量RT-qPCR检测肠组织中细胞因子表达量

Trizol法提取组织总RNA:小肠组织研磨液上清中加入RNAiso plus Reagent裂解,向上述混合液中加入氯仿混匀,离心后取上清液,加入等体积的异丙醇混匀沉淀RNA,最后经过75%乙醇洗涤后,加入20 μ L的DEPC水溶解沉淀即为总RNA。

反转录:以总RNA为模板,参照PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书进行基因组反转录,反转录合成的cDNA作为荧光定量RT-qPCR模板。

反应体系:样品cDNA 1 μ g、TB Green Premix Ex Taq™ II 10 μ L、ROX Reference Dye II 0.4 μ L、灭菌水7 μ L、上/下游引物(10 μ mol/L)各0.8 μ L,共20 μ L。每个样品3个重复孔,瞬间离心后,放入实时荧光定量PCR仪进行扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40个循环。反应结束后先加热至95 $^{\circ}$ C,然后降至60 $^{\circ}$ C,开始以0.5 $^{\circ}$ C/s递增至95 $^{\circ}$ C检测荧光信号得出扩增产物的溶解曲线。以GAPDH基因作为内参,将对照组细胞因子表达量设为1倍。引物信息见表1。

表 1 细胞因子荧光定量 RT-qPCR 引物	
Table 1 RT-qPCR related primers of cytokines	
名称	序列 (5'-3')
Name	Primer sequence (5'-3')
GAPDH-F	CTGAGACACGATGGTGAAGGT
GAPDH-R	CACCCCATTTGATGTTGGCG
IL-2-F	CCCTTGCACTCATGGCAAAC
IL-2-R	TAGCACTCCCTCCAGAGCTT
IL-4-F	ACACGACGGAGAAGGAAACC
IL-4-R	GTTCTGTCAAGTCCGCTCA
IL-6-F	CTGGGTTCAATCAGGAGACC
IL-6-R	GTTAGGGGTGGTGGCTTTGT
MCP-1-F	ATCAGCTCCCACACCGAAG
MCP-1-R	GGAGAATTAATTGCATCTGGCTGG
IFN- α -F	AGGGACTTTGGATCCCCTCA
IFN- α -R	CATCTCATGCACCAGAGCCA
IFN- β -F	TGGCTGGAATGAAACCGTCA
IFN- β -R	CCAGGCACAGCTTCTGTACT

1.7 数据分析

采用 SPSS25.0 软件对试验数据统计分析;各时间点之间采用 F 检验对数据进行差异显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著,每个样本重复 3 次,制图由 Graphpad5.0 完成。

2 结果与分析

2.1 PDCoV 在 IPEC-J2 细胞上的生长特性

PDCoV (1 MOI) 感染 IPEC-J2 细胞第二代开始出现细胞病变,表现为细胞圆缩脱落(图 1 (b)),继续传代至第三代后通过 RT-PCR 鉴定,目的条带大小 504 bp(图 2),继续传代至第六代。进一步通过间接免疫荧光试验进行验证,感染组 (0.1 MOI) 细胞着绿色荧光(图 1(d)),空白对照组无荧光,表明 PDCoV 在 IPEC-J2 进行了有效复制并可适应性传代。

2.2 PDCoV 在 IPEC-J2 细胞的生长曲线

PDCoV (0.1 MOI) 感染 IPEC-J2 细胞后,不同时间点收集细胞上清,测定 TCID₅₀ 绘制生长曲线(图 3)。结果表明,PDCoV 感染 IPEC-J2 细胞后 12 h 病毒滴度开始逐渐升高,并在感染 48 h 达到增殖高峰,病毒滴度为 10^{5.17} TCID₅₀/mL,随后在感染后 60 和 72 h 维持在相对较高的增殖滴度。

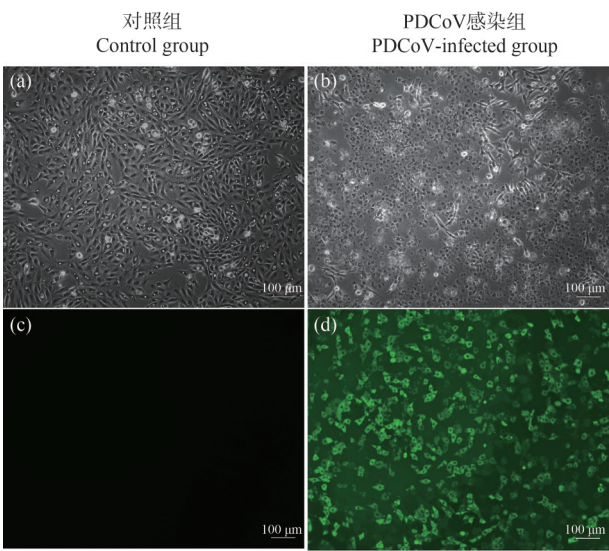
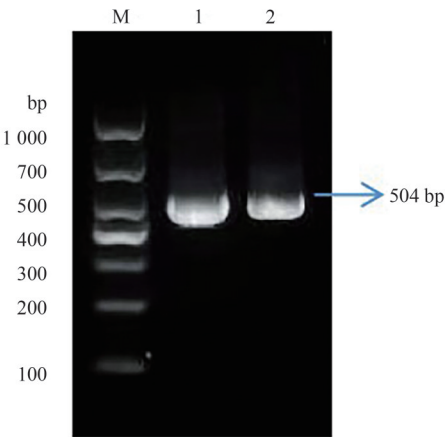


图 1 PDCoV 感染 IPEC-J2 细胞产生细胞病变
Fig. 1 The cytopathic effect in IPEC-J2 cells infected by PDCoV



M: DL1000 DNA marker; 1~2: 目的条带 Positive fragment
图 2 PDCoV 感染 IPEC-J2 细胞后的 RT-PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of PDCoV after infection in IPEC-J2 cells by RT-PCR

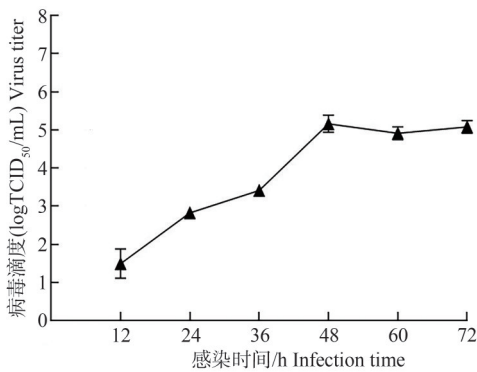


图 3 PDCoV 在 IPEC-J2 细胞的生长曲线
Fig. 3 The growth curve of PDCoV in IPEC-J2 cells

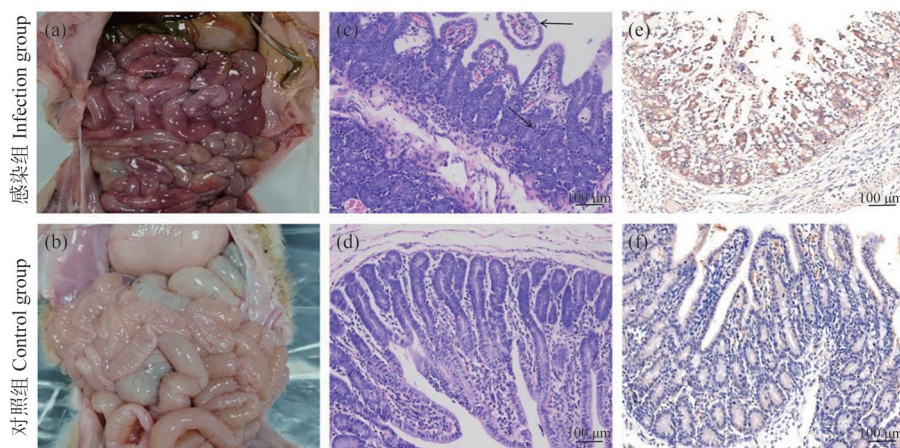
2.3 适应 IPEC-J2 细胞的 PDCoV 对仔猪的致病性分析

2.3.1 临床症状

仔猪感染 PDCoV 后每天观察猪只状况,在攻毒 20 h 开始,试验组 2 只仔猪(2 号和 5 号)出现水样腹泻,饮食明显减少,精神萎靡,于攻毒 32 h 后,形体眼观明显消瘦,持续到攻毒后第 6 天(其中 2 号在攻毒后 48 h 死亡,极度消瘦);另外 2 只仔猪(3 号和 4 号)于攻毒后 36 h 出现腹泻,采食减少,持续到攻毒后第 5 天逐渐好转;一只攻毒组仔猪(1 号)仅在攻毒后 24 h 出现短暂的厌食后逐渐恢复;而对照组仔猪在实验期间没有出现任何临床体征,采食及形体均正常。

2.3.2 病理组织学观察

为更直观的体现病变特征,将死亡仔猪进行了临床和组织病理学检查。剖检可以发现死亡的仔猪小肠壁严重充血(图 4(a)),对照组仔猪临床表现正常,剖检肠道正常(图 4(b))。对病变明显的空肠进一步进行组织病理学分析,HE 染色发现试验组仔猪空肠表现出弥散性、严重的肠绒毛萎缩断裂(图 4(c)),对照组仔猪的空肠绒毛完整,未见明显组织学病变(图 4(d))。免疫组化结果显示死亡仔猪的空肠中部上皮细胞中显示出高浓度的 PDCoV 抗原阳性(图 4(e)),阴性对照猪的空肠中未检测到 PDCoV 抗原阳性细胞(图 4(f))。



(a)(b)为剖检变化;(c)(d)为 HE 染色;(e)(f)为免疫组化。

(a)(b) is for autopsy; (c)(d) is for HE staining; (e)(f) is for immunohistochemistry.

图 4 适应 IPEC-J2 细胞的 PDCoV 感染仔猪剖检变化及病理组织学变化

Fig. 4 The autopsic and histopathological changes in piglets infected with PDCoV adapted to IPEC-J2 cells

2.4 适应 IPEC-J2 细胞的 PDCoV 感染仔猪后肠道细胞因子变化

PDCoV 的靶器官是肠道,而肠道免疫也是机体天然免疫的第一道防线,为了进一步明确 PDCoV 感染后肠道免疫因子的表达规律,在攻毒后第 2、4、6 天分别剖杀 1 头腹泻仔猪,取小肠组织经液氮冷冻研磨后测定相关免疫因子的 mRNA 表达水平。结果发现试验组仔猪小肠细胞因子与对照组比较在不同时间段均有不同程度的升高。IL-6 和 MCP-1 在攻毒后第 2 天升高,后随时间逐渐降低,IL-2 和 IL-4 在攻毒后第 4 天显著上升 ($P < 0.05$);IFN- α 和 IFN- β 转录水平在攻毒后第 4 天显著升高 ($P < 0.05$),与对照组差异显著 ($P < 0.05$)

(图 5)。结果显示 PDCoV 感染仔猪后,先后诱发 Th1 型细胞促炎性和 Th2 型抗炎免疫反应,并激活动物机体 I 型干扰素表达,动物机体通过活化免疫系统释放细胞因子对抗病毒感染。

3 讨论

肠黏膜是肠道病原感染和入侵的最外侧屏障,肠道病毒通过黏膜上皮细胞受体进入肠道上皮细胞,进而定殖到相应的靶组织。PDCoV 对肠道亲嗜性高,剖检也发现肠道病变最为明显,包括肠管肿胀且肠壁变薄,是典型的肠炎症状,与临床腹泻症状吻合。肠道细胞是研究病毒对肠道致病机制不可或缺的细胞类型。研究发现,很多经过细胞分

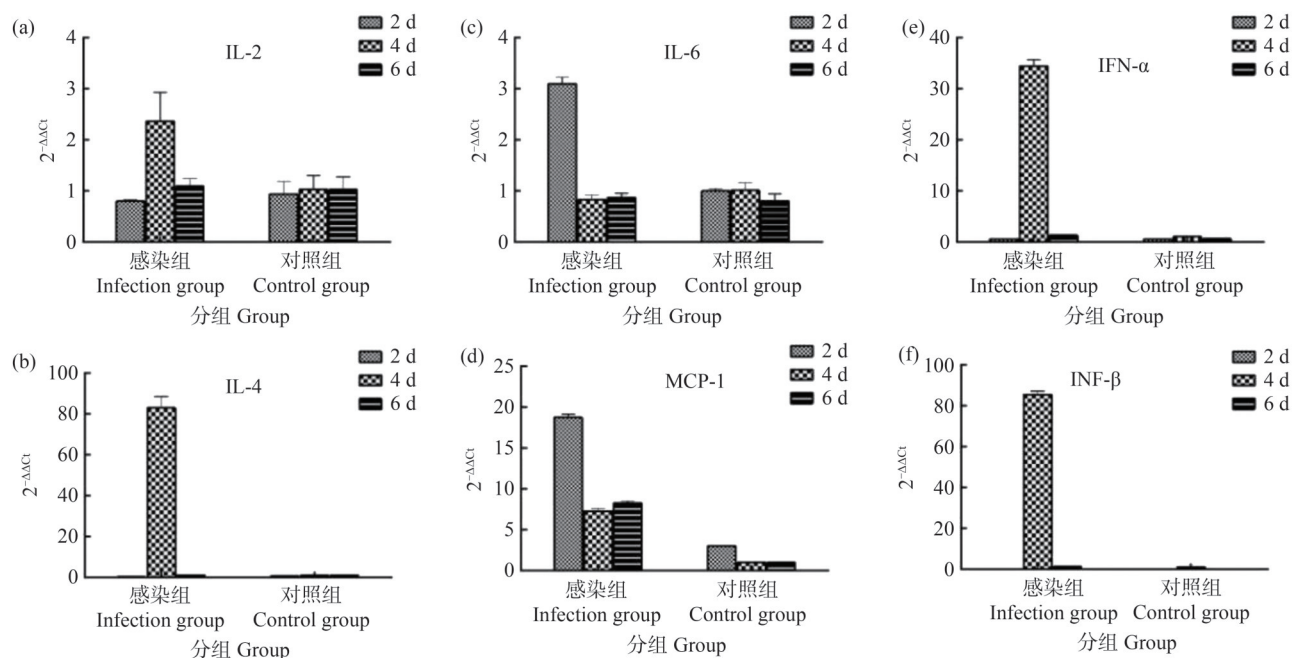


图5 适应 IPEC-J2 细胞的 PDCoV 感染仔猪后肠道细胞因子 mRNA 表达水平

Fig. 5 The mRNA expression levels of different cytokines in the intestine of piglets inoculated orally with IPEC-J2 cell-culture adapted PDCoV

离增殖的肠道病毒,比如 PEDV、TGEV 以及其他肠道冠状病毒均可以感染 IPEC-J2 细胞^[18-21],因此选用 IPEC-J2 细胞作为 PDCoV 感染肠道的模型细胞。之前的研究分别使用 LLC-PK、ST 及 IPEC-J2 细胞进行 PDCoV 的分离鉴定^[15],发现 IPEC-J2 细胞不能有效支持猪肠道内容物或者肠道拭子中 PDCoV 的分离和繁殖,与本研究团队前期研究结果一致。因此本研究假设,与 LLC-PK 或 ST 细胞相比,如果使用比原始粪便样本中所含滴度更高的病毒感染 IPEC-J2 细胞,则可能会增加 IPEC-J2 细胞对 PDCoV 临床样本的易感性。于是本研究使用经过 ST 细胞培养的 PDCoV 尝试感染 IPEC-J2 细胞,结果发现, PDCoV 可以在 IPEC-J2 细胞稳定传代并表现出细胞病变,与之前的研究结论相似,有学者发现经过 LLC-PK 细胞培养的 PDCoV 可以在 IPEC-J2 细胞中繁殖和传代^[22],但是与 LLC-PK 和 ST 细胞^[15]增殖滴度相比较, PDCoV 在 IPEC-J2 的病毒滴度偏低,高峰值达到 $10^{5.17}$ TCID₅₀/mL。近期有学者发现猪氨肽酶 N(pAPN)是 PDCoV 入侵细胞的重要受体^[23-24],因此, LLC-PK、ST 和 IPECJ2

细胞中 pAPN 表达水平的差异可能会影响对 PDCoV 的易感性。目前,已有学者在 IPEC-J2 细胞层面展开了 PDCoV 致病机制的相关研究。研究表明,2 种先天免疫相关的 miRNA(ssc-miR-30c-3p 和 ssc-miR-374b-3p)显著抑制 PDCoV 在 IPEC-J2 细胞的复制^[25],参与抗病毒先天免疫反应。此外, PDCoV 编码的非结构蛋白 5(nsp5)通过裂解 POLDIP3 (DNA polymerase delta interacting protein 3)抑制其抗病毒作用,促进了 PDCoV 在 IPEC-J2 细胞的感染^[26],是 PDCoV 逃逸宿主免疫应答的一种策略。可见, IPEC-J2 是 PDCoV 致病机制研究的重要模式细胞,本研究将实验室现有 PDCoV 感染 IPEC-J2 细胞并可以适应性传代,为后续研究其致病机制奠定基础。

LLC-PK 和 ST 细胞分离的 PDCoV 感染试验仔猪引起急性水样腹泻,经常伴有急性、轻度至中度呕吐,最终导致脱水、体重减轻、嗜睡和死亡^[27-28]。 LLC-PK 和 ST 细胞增殖的 PDCoV 感染 11~14 日龄的 Gn 仔猪(Gnotobiotic piglet, Gn piglet)后 3~4 d 表现出严重的水样腹泻或呕吐,病理组织学显示弥

慢性、严重的萎缩性肠炎,萎缩的绒毛上皮内有轻度至中度的小肠胞质空泡^[29-30]。LLC-PK来源的PDCoV经IPEC-J2细胞培养传代后感染10日龄Gn仔猪,出现水样腹泻和呕吐,表现肠致病性,并在急性感染期间诱导全身先天和促炎细胞因子反应^[22]。本研究中ST来源的PDCoV经IPEC-J2细胞培养传代后感染5日龄商品阴性仔猪除了出现上述临床表现和病理变化外,出现了仔猪死亡的情况,同样经过IPEC-J2细胞适应的PDCoV感染仔猪表现致病性的差异,可能是因为本研究使用的是商品阴性仔猪,有研究表明,通过试验手段感染Gn猪或商品猪会表现不同的临床症状^[31],然而,在相似的试验条件下,与Gn猪相比,商品猪对PDCoV的易感性更高^[28]。但也可能是因为感染仔猪的日龄、感染剂量及饲养环境等因素的不同。此外,有研究发现ST培养的PDCoV(3×10^4 TCID₅₀/mL)口服感染5日龄商品阴性仔猪后,除了表现与本研究相似的临床症状及肠道病理变化外,并未出现仔猪死亡^[31];相似的试验条件(动物来源和日龄)下,同样是ST来源的病毒,经过IPEC-J2细胞适应后对仔猪的致病性增强,出现了生产中存在的死亡现象,再次表明利用IPEC-J2细胞研究肠道病毒的致病机制更能反应体内感染的真实情况,但是尚需进一步更严谨的比较研究。

动物机体对PDCoV感染进行免疫应答的过程中,PBMIC细胞群体及其分泌的白介素类细胞因子起着重要作用,是机体抵抗病毒感染的第一道防线。本研究发现,PDCoV感染的仔猪小肠中IL-6和MCP-1的表达量在攻毒后率先升高,在发生感染时机体快速生成IL-6是急性炎症反应的表现,表明PDCoV诱导了Th2型免疫应答,产生促炎细胞因子,与PEDV感染IPEC-J2细胞中促炎因子(IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF- α)mRNA水平升高相似^[18]。IL-2和IL-4在攻毒后第4天上升显著,表明Th1型免疫反应激活。同时,I型干扰素(IFN- α 和IFN- β)转录水平在攻毒后第4天显著升高,表明PDCoV感染诱发了机体的干扰素抗病毒效应^[32]。然而,这些抗炎和促炎

细胞因子对PDCoV感染仔猪的作用是有益或有害的尚需要进一步研究。

本研究发现PDCoV可以感染IPEC-J2细胞并适应性传代,更好地模拟PDCoV在猪小肠中的感染条件,为后续研究不同猪肠道冠状病毒(PDCoV、PEDV或TGEV)之间或与肠道细胞相互作用的差异提供模型参考,并为研究病毒在IPEC-J2细胞中共感染的相互作用奠定基础。此外,本研究表明,IPEC-J2细胞培养传代的PDCoV在仔猪中具有肠致病性,仔猪出现明显腹泻症状,甚至出现死亡,剖检可见明显的肠道病变,并且会同时激活肠道Th1和Th2型细胞免疫反应,诱导感染仔猪产生免疫细胞因子;同时激活仔猪的先天免疫反应,产生I型干扰素发挥抗病毒效应,初步探讨了肠道免疫屏障在PDCoV的IPEC-J2适应株感染后发挥的作用,为后续肠道免疫机制的深入探讨奠定基础。

4 结 论

本研究发现经过ST细胞分离增殖的PDCoV可以感染猪肠道细胞IPEC-J2,经过适应IPEC-J2细胞的PDCoV对仔猪表现较强的肠致病性,为PDCoV肠道致病机制的深入研究奠定基础。

参考文献 Reference

- [1] Jung K, Hu H, Saif L J. Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 50-59
- [2] Koonpaew S, Teeravechyan S, Frantz P N, Chailangkarn T, Jongkaewwattana A. PEDV and PDCoV pathogenesis: The interplay between host innate immune responses and porcine enteric coronaviruses[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 34
- [3] Woo P C Y, Lau S K P, Lam C S F, Lau C C Y, Tsang A K L, Lau J H N, Bai R, Teng J L L, Tsang C C C, Wang M, Zheng B J, Chan K H, Yuen K Y. 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 [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008
- [4] Lee S, Lee C. Complete genome characterization of Korean porcine Deltacoronavirus strain KOR/KNUI4-04/2014[J]. *Genome Announcements*,

- 2014, 2(6): e01191-e01114
- [5] Wang L Y, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227-1230
- [6] Suzuki T, Shibahara T, Imai N, Yamamoto T, Ohashi S. Genetic characterization and pathogenicity of Japanese porcine deltacoronavirus [J]. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2018, 61: 176-182
- [7] Dong N, Fang L R, Yang H, Liu H, Du T, Fang P X, Wang D, Chen H C, Xiao S B. Isolation, genomic characterization, and pathogenicity of a Chinese porcine deltacoronavirus strain CHN-HN-2014 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 196: 98-106
- [8] Janetanakit T, Lumyai M, Bunpong N, Boonyapitsopa S, Chaiyawong S, Nonthabenjawan N, Kesdaengsakonwut S, Amonsin A. Porcine deltacoronavirus, Thailand, 2015 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(4): 757-759
- [9] Dong N, Fang L R, Zeng S L, Sun Q Q, Chen H C, Xiao S B. Porcine deltacoronavirus in mainland China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2254-2255
- [10] Pérez-Rivera C, Ramírez-Mendoza H, Mendoza-Elvira S, Segura-Velázquez R, Sánchez-Betancourt J I. First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico [J]. *Transboundary And Emerging Diseases*, 2019, 66(4): 1436-1441
- [11] Boley P A, Alhamo M A, Lossie G, Yadav K K, Vasquez-Lee M, Saif L J, Kenney S P. Porcine deltacoronavirus infection and transmission in poultry, United States¹ [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(2): 255-265
- [12] Liang Q Q, Zhang H L, Li B X, Ding Q W, Wang Y B, Gao W M, Guo D H, Wei Z Y, Hu H. Susceptibility of chickens to porcine deltacoronavirus infection [J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 573
- [13] Jung K, Hu H, Saif L J. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2357-2362
- [14] Lednicky J A, Tagliamonte M S, White S K, Elbadry M A, Alam M M, Stephenson C J, Bonny T S, Loeb J C, Telisma T, Chavannes S, Ostrov D A, Mavian C, Beau De Rochars V M, Salemi M, Morris J G. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children [J]. *Nature*, 2021, 600(7887): 133-137
- [15] Hu H, Jung K, Vlasova A N, Chepngeno J, Lu Z Y, Wang Q H, Saif L J. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1537-1548
- [16] Brosnahan A J, Brown D R. Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156(3/4): 229-237
- [17] Vergauwen H. *The IPEC-J2 Cell Line* [M]. The Impact of Food Bioactives on Health. Cham: Springer, 2015: 125-134
- [18] Lin H X, Li B, Chen L, Ma Z, He K W, Fan H J. Differential protein analysis of IPEC-J2 cells infected with porcine epidemic diarrhea virus pandemic and classical strains elucidates the pathogenesis of infection [J]. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(6): 2113-2120
- [19] Zhao S S, Gao J K, Zhu L Q, Yang Q. Transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus infection induces dramatic changes in the tight junctions and microfilaments of polarized IPEC-J2 cells [J]. *Virus Research*, 2014, 192: 34-45
- [20] Xia L, Dai L, Yu Q H, Yang Q. Persistent transmissible gastroenteritis virus infection enhances enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 adhesion by promoting epithelial-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(21): e01256-e01217
- [21] Guo X Z, Hu H, Chen F Z, Li Z H, Ye S Y, Cheng S, Zhang M J, He Q G. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of Vero cells infected with virulent and CV777 vaccine strain-like strains of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 130: 65-75
- [22] Jung K, Miyazaki A, Hu H, Saif L J. 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 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 221: 49-58
- [23] Wang B, Liu Y, Ji C M, Yang Y L, Liang Q Z, Zhao P W, Xu L D, Lei X M, Luo W T, Qin P, Zhou J Y, Huang Y W. Porcine deltacoronavirus engages the transmissible gastroenteritis virus functional receptor porcine aminopeptidase N for infectious cellular entry [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(12): e00318-e00318
- [24] Zhu X Y, Liu S D, Wang X L, Luo Z C, Shi Y J, Wang D, Peng G Q, Chen H C, Fang L R, Xiao S B. Contribution of porcine aminopeptidase N to porcine deltacoronavirus infection [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 65
- [25] Jiang S, Chen J F, Li X L, Ren W K, Li F X, Wang T, Li C, Dong Z M, Tian X X, Zhang L, Wang L L, Lu C, Chi J J, Feng L, Yan M H. Identification and integrated analysis of lncRNAs and miRNAs in IPEC-J2 cells provide novel insight into the regulation of the innate immune response by PDCoV infection [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 486
- [26] Wu Y, Li M W, Tian J, Yan H X, Pan Y D, Shi H Y, Shi D, Chen J F, Guo L J, Feng L. Broad antagonism of coronaviruses nsp5 to evade the host antiviral responses by cleaving POLDIP3 [J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(10): e1011702
- [27] Jung K, Hu H, Eyerly B, Lu Z Y, Chepngeno J, Saif L. Pathogenicity of 2 Porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4): 650-654
- [28] Ma Y M, Zhang Y, Liang X Y, Lou F F, Oglesbee M, Krakowka S, Li J R. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States [J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00064
- [29] Jung K, Hu H, Saif L J. Porcine deltacoronavirus induces apoptosis in swine testicular and LLC porcine kidney cell lines in vitro but not in infected

- intestinal enterocytes *in vivo*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 182: 57-63
- [30] Hu H, Jung K, Vlasova A N, Saif L J. Experimental infection of gnotobiotic pigs with the cell-culture-adapted porcine deltacoronavirus strain OH-FD22[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(12): 3421-3434
- [31] Chen Q, Gauger P, Stafne M, Thomas J, Arruda P, Burrough E, Madson D, Brodie J, Magstadt D, Derscheid R, Welch M, Zhang J Q. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets[J]. *Virology*, 2015, 482: 51-59
- [32] Annamalai T, Saif L J, Lu Z Y, Jung K. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2015, 168(3/4): 193-202

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 石迎, 博士, 助理研究员。博士毕业于中国农业科学院上海兽医研究所, 现于上海市农业科学院畜牧兽医研究所工作, 主要从事猪病毒性腹泻病的致病机制及免疫防控研究。主持上海市科委扬帆计划1项, 上海市农业科学院院助跑计划1项, 先后参与国家和省部级项目10余项。近3年, 第一作者发表SCI论文2篇, 参与发表论文13篇, 参与申请发明专利7项, 获得授权发明专利3项, 实用新型专利1项, 获得生物安全证书2项。参与获得上海市农业科学院科技成果三等奖1项, 入选上海市闵行区春申金字塔杰出人才。



通讯作者简介: 刘惠莉, 预防兽医学博士, 硕士导师, 三级研究员。上海市农业领军人才、上海市闵行区领军人才, 上海市第十三届、十四届政协委员。现任上海市农业科学院畜牧兽医研究所所长, 中国畜牧兽医学会员理事, 上海市畜牧兽医学会员副理事长兼秘书长。农业农村部(部省共建)区域特色畜禽品种疾病防控重点实验室主任、上海市农业科学院动物疾病检测诊断中心主任、上海市农业遗传育种重点实验室副主任、上海市农业科学院动物疾病防控卓越团队首席。《中国动物传染病学报》编委、《国外畜牧学-猪与禽》编委会主任。曾任上海市生猪产业技术体系岗位专家, 现任上海市肉鸽产业技术体系疾病防控与生物安全专业组组长。主要从事畜禽及宠物疾病诊断技术、病原致病机理、粘膜免疫及新型疫苗制剂研究。研发了粘膜佐剂蛋白并用于畜禽口服及喷鼻疫苗研制; 分离鉴定新发腹泻病原并进行免疫制剂研究, 获得理想免疫效果; 证实了腹泻临床多病原感染是导致高死亡率的主要原因, 并揭示了病原共感染协同增强致病作用的机制; 建立了猪腹泻、犬重要疾病液相芯片检测技术并获得应用。获得上海市科技进步二等奖、三等奖各1项, 上海市优秀标准化技术成果三等奖1项、上海市星火科技进步二等奖1项; 获农业农村部生物安全证书3项、授权发明专利5项、制订上海市地方技术标准2项。主笔发表论文60余篇, 其中SCI论文16篇, 2017年入选中国精品科技期刊顶尖学术论文领跑者。