

慢病毒载体介导稳定表达 CD163 的 PAM 细胞系的建立及对 PRRSV 感染的研究

王向鹏, 魏蕊芳, 肖书奇, 周恩民*

(西北农林科技大学 动物医学院 兽医免疫学研究所, 杨凌 712100)

摘要: 本研究旨在通过慢病毒载体系统将猪源 CD163 转染入永生化的猪肺泡巨噬细胞(PAM)系(CRL-2843), 建立稳定表达 CD163 的 PAM 细胞系(PAM-CD163)及验证该细胞系对 PRRSV 的易感性。用 PCR 方法从 pJET1.2-CD163 载体上扩增 CD163 基因编码区, 通过酶切连接构建慢病毒表达载体 pTrip-CMV-CD163-IRES-pur。将该质粒与慢病毒包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G 共转染 293-T 细胞, 包装表达 CD163 的慢病毒。将收获的慢病毒在 Polybrene 的介导下转导至永生化的 PAM 细胞, 采用嘌呤霉素筛选和细胞有限稀释法筛选出稳定表达 CD163 的 PAM 细胞系。应用得到的细胞系进行 PRRSV 感染试验。经过 RT-PCR、间接免疫荧光试验、Western blot 和流式细胞术试验证实, 筛选出 1 株能稳定表达 CD163 的 PAM 细胞系, 命名为 PAM-CD163。该株细胞对 PRRSV 高度易感, PRRSV 在 PAM-CD163 细胞上的毒价可以达到 $10^{5.0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ 以上。建立了稳定表达 CD163 的 PAM 细胞系, 可以用于 PRRSV 的分离培养和细胞受体的研究。

关键词: CD163; 慢病毒载体; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 猪肺泡巨噬细胞

中图分类号: S858.285.3; Q789

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)11-1797-08

Generation of a Porcine Alveolar Macrophage Cell Line Stably Expressing CD163 by Lentiviral Vector for the Production of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

WANG Xiang-peng, WEI Rui-fang, XIAO Shu-qi, ZHOU En-min*

(Veterinary Immunology Institute, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The objectives of this study were to use the lentiviral vector pTrip-CMV-IRES-pur plasmid to deliver porcine CD163 into a porcine alveolar macrophage (PAM) cell line (CRL-2843), to generate a cell line stably expressing CD163 (designated PAM-CD163), and to evaluate its permissibility for PRRSV infection. The porcine CD163 coding sequences were amplified by PCR from pJET1.2-CD163 plasmid and inserted into downstream of CMV promoter in the lentiviral vector pTrip-CMV-IRES-pur plasmid. Monolayer of 293-T cells were cotransfected with three plasmids psPAX2, pMD2.G and pTrip-CMV-CD163-IRES-pur. The recombinant lentivirus expressing CD163 was harvested in the culture fluid. For transduction, the immortalized PAM cells (CRL-2843) were exposed to lentivirus in the presence of polybrene. The transduced cells were selected with puromycin and single cell colonies were isolated and expanded for PRRSV infection assay. The CD163 gene was transcribed by RT-PCR and the protein was expressed as identified

收稿日期: 2013-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(U0931003/L01, 31101690); 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA10A208-4)

作者简介: 王向鹏(1985-), 男, 河南洛阳人, 博士, 主要从事 PRRSV 细胞受体的研究, E-mail: wangxiangpeng2003@126.com; 魏蕊芳(1990-), 女, 河南郑州人, 硕士, 主要从事 PRRSV 细胞受体的研究, E-mail: weiruifang@nwsuaf.edu.cn。二人并列第一作者

* 通信作者: 周恩民, 教授, E-mail: zhouem@nwsuaf.edu.cn

by indirect immunofluorescence assay, Western blot and flow cytometry analyses. A PAM cell line (CRL-2843) stably expressing CD163 (designated PAM-CD163) was susceptible to PRRSV infection with the titer of $10^{5.0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹. A PAM cell line stably expressing CD163 was constructed and permissive to PRRSV infection. This cell line could be a valuable tool for PRRSV propagation and PRRSV cellular receptors study.

Key words: CD163; lentiviral vector; porcine reproductive and respiratory syndrome virus; porcine alveolar macrophage

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的以妊娠母猪繁殖障碍以及各年龄段猪呼吸道症状为主要特征的传染病, 该病是严重危害养猪业的病毒性传染病之一。其病原 PRRSV 为有囊膜、单股正链 RNA 病毒, 属于尼多病毒目, 动脉炎病毒科成员。PRRSV 具有很强的宿主细胞嗜性, 在猪源细胞中, 原代猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophage, PAM) 是其主要宿主细胞。除了原代 PAM 细胞, PRRSV 在体外主要感染猴肾细胞 MA-104 及其衍生的细胞系, 如 Marc-145。研究表明 PRRSV 的细胞嗜性主要由细胞上病毒的受体所决定^[1]。在原代 PAM 细胞上发现的 PRRSV 细胞受体主要有硫酸乙酰肝素 (heparin sulfate, HS)、唾液酸黏附素 (sialoadhesin, Sn) 和 CD163 蛋白。HS 主要参与 PRRSV 的吸附, Sn 进一步吸附 PRRSV 并介导 PRRSV 的内吞, CD163 主要参与 PRRSV 脱衣壳将基因组释放至细胞质中^[2]。在上述 3 个受体中, 只有将 CD163 分子转染至非易感细胞可以使细胞变成 PRRSV 的易感细胞, 说明 CD163 是 PRRSV 的主要细胞受体, 在其感染宿主细胞过程中具有重要作用^[3]。

前期研究发现将 SV40 病毒大 T 抗原转染至原代 PAM 细胞制备的永生化 PAM 细胞对 PRRSV 不易感^[4], 推测其对 PRRSV 不易感的一个重要原因就是该细胞不表达 PRRSV 细胞受体 CD163 分子。慢病毒载体是以 HIV 为基础经过基因改造而成的载体, 该载体介导的基因转导是近年来发展的一项新技术, 慢病毒载体的突出特点是插入外源基因容量大, 对分裂和非分裂细胞均具有较高感染能力^[5-6]。本研究旨在通过慢病毒载体系统将猪源 CD163 转染入永生化的 PAM 细胞系, 建立了 1 株稳定表达 CD163 蛋白的 PAM 细胞系, 该细胞系不仅可以用于 PRRSV 的分离和培养, 还可以用于

PRRSV 细胞受体的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒株、菌株和细胞 高致病性 PRRSV SD16 毒株 (GenBank 登陆号: JX087437. 1) 和 DH5 α 感受态细胞由本实验室保存; 永生化 PAM 细胞系 3D4/21 (ATCC 细胞号: CRL-2843) 购自 ATCC, Marc-145 和 293-T 细胞购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 质粒 慢病毒表达载体 pTrip-CMV-IRES-pur 和包装载体 pMD2. G (Addgene 质粒号: 12259) 和 psPAX2 (Addgene 质粒号: 12260) 由西北农林科技大学杜恩岐博士赠送; 带有 CD163 基因 (GenBank 登陆号: JX292263) 编码区序列的 pJET1. 2-CD163 载体由作者实验室前期构建。

1.1.3 主要试剂 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶和反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 限制性核酸内切酶 *Xba* I、*Bam*HI 以及 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司; 哺乳动物细胞 RNA 提取试剂盒和病毒 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; DMEM、PRMI-1640 细胞培养基和胎牛血清购自 Life Technologies 公司; X-tremeGENE HP DNA 转染试剂购自 Roche 公司; 嘌呤霉素购自 Merck 公司; TRITC 标记山羊抗鼠 IgG 和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 购自 Jackson 公司; CD163 (MCA 1853) 单克隆抗体购自 AbD Serotec 公司; GAPHD 单克隆抗体和 Polybrene 购自 Sigma-Aldrich 公司; ECL 化学发光试剂盒购自康为世纪公司; PRRSV N 蛋白单克隆抗体 6D10 由作者实验室制备并保存^[7]。

1.2 试验方法

1.2.1 重组慢病毒载体的构建和包装 通过 PCR 方法从 pJET1. 2-CD163 载体上扩增 CD163

基因编码区序列。引物序列:5'-GCTCTAGAAT-
GGTGCTACTTGAAGACTCTG-3'(CD163-F),下
划线为 *Xba* I 酶切位点;5'-CGGGATCCTCATT-
GTACTTCAGAGTGGTCTCCT-3'(CD163-R),
下划线为 *Bam*H I 酶切位点。PCR 反应条件:98
℃ 10 s;55℃ 15 s,72℃ 3 min 30 s,30 个循环;72
℃ 10 min。将扩增产物用 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切
后连接至 pTrip-CMV-IRES-pur 载体,转化至
DH5 α 感受态细胞。提取质粒进行酶切鉴定和测
序。构建正确的载体命名为 pTrip-CMV-CD163-
IRES-pur。重组慢病毒的包装过程按照文献方法
进行^[8]:293-T 细胞用血清体积分数为 10% 的
DMEM 培养基培养,用 X-tremeGENE HP DNA 转
染试剂将 pTrip-CMV-CD163-IRES-pur (2 μ g)、
pMD2.G(1 μ g)和 psPAX2(1 μ g)质粒共转染至 6 孔
细胞培养板培养的长成单层的 293-T 细胞,转染 16 h
后更换用血清含量为 3% 的 DMEM 培养基继续培养
48 h,收集包含慢病毒的细胞上清,测定其滴度^[9]。

1.2.2 慢病毒转导和细胞筛选 慢病毒转导参
考文献方法进行^[8]:将永生化的 PAM 细胞按照 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度培养于 96 孔细胞培养板,细胞培
养液为血清体积分数为 10% 的 PRMI-1640 培养基。
培养 24 h 后,弃去培养基,每孔加入包装好的重组慢
病毒液(MOI=1),加入 Polybrene (8 μ g $\cdot \text{mL}^{-1}$)。病
毒感染 6~8 h 后,更换新鲜培养基继续培养 48 h。
将细胞消化后转至 10 cm² 培养皿中培养,72 h 后更
换为含有嘌呤霉素(10 μ g $\cdot \text{mL}^{-1}$)的培养基对转导
的细胞进行筛选。每 2 d 更换一次含有嘌呤霉素的
培养基直到长出细胞克隆。挑选的一个直径 >0.5
mm 的细胞克隆,消化后采用有限稀释法在 96 孔
细胞培养板继续筛选,最后筛选出 1 株生长状态良好
具有嘌呤霉素抗性的细胞株进行以下试验。

1.2.3 筛选细胞的鉴定 通过 RT-PCR 检测筛
选细胞 CD163 基因的转录:用哺乳动物细胞 RNA 提
取试剂盒提取筛选细胞总 RNA,反转录为 cDNA 后
用 PCR 扩增 CD163 基因,PCR 反应条件参考 1.2.1
操作步骤。反应结束后取 PCR 产物用 0.8% 琼脂糖
凝胶进行电泳,凝胶成像系统分析结果。同时设立
检测永生化的 PAM 细胞 CD163 的转录作为阴性对照。

间接免疫荧光试验检测筛选细胞 CD163 的表
达:将筛选的细胞培养于 96 孔细胞培养板,待细胞
长成单层后,用 4% 的多聚甲醛室温固定细胞 15
min,PBS 洗涤 3 次,用含有 0.5% Triton X-100 的

PBS 透化细胞 10 min,PBS 洗涤 3 次,用 CD163 单
抗(1.5 μ g $\cdot \text{mL}^{-1}$)作为一抗在 37℃ 孵育细胞 1.5
h,PBS 洗涤 3 次,TRITC 标记山羊抗鼠 IgG (1:
200 稀释)作为二抗 37℃ 孵育细胞 50 min, PBS 洗
涤 3 次,在荧光显微镜下观察结果。同时设立检测
永生化的 PAM 细胞 CD163 的表达作为阴性对照。

Western blot 检测筛选细胞中 CD163 蛋白的
表达:用 RIPA 细胞裂解液裂解筛选的细胞,BCA
法进行蛋白质定量。每条泳道上样 30 μ g 蛋白,进
行 10% SDS-PAGE,结束后将蛋白转至 NC 膜,用
5% 的脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h 后,以 CD163 抗体
(0.5 μ g $\cdot \text{mL}^{-1}$)为一抗 4℃ 孵育过夜,PBST 洗涤 3
次,加入 HRP 标记山羊抗鼠 IgG(1:5 000 稀释)作
为二抗,37℃ 孵育 1 h,用 PBST 洗涤 3 次,用 PBS 洗
涤 1 次,用 ECL 化学发光试剂盒显色后观察结果。
设立检测细胞内 GAPDH 蛋白为内参对照。同时检
测永生化的 PAM 细胞 CD163 的表达作为阴性对照。

流式细胞仪检测筛选细胞和永生化的 PAM 细胞
CD163 蛋白的表达:收集 1×10^6 个处于对数生长期
筛选的 PAM 细胞和永生化的 PAM 细胞,用终浓度
为 10 μ g $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CD163 单克隆抗体与细胞在 4
℃ 孵育 30 min,用含有 0.1% 叠氮钠的 PBS 洗涤细
胞 3 次,用 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗鼠 IgG(1
:200 稀释)作为二抗于 4℃ 避光孵育细胞 30 min,
用含有 0.1% 叠氮钠的 PBS 洗涤细胞 3 次后用 2%
的多聚甲醛固定细胞,最后用流式细胞仪进行检测。
同时用流式细胞仪检测未用抗体染色的筛选的
PAM 细胞和永生化的 PAM 细胞作为阴性对照。

1.2.4 PRRSV 感染试验 在 6 孔细胞培养板
中培养筛选的细胞,待细胞密度为 70%~80% 时,
用 0.1 MOI 的 PRRSV 感染细胞。感染 24 h 后用
RT-PCR、间接免疫荧光试验和 Western blot 检测
筛选细胞对 PRRSV 感染。同时设立 PRRSV 感染
Marc-145 细胞作为阳性对照,Marc-145 细胞用血
清体积分数为 10% 的 DMEM 培养,设立 PRRSV
感染永生化的 PAM 细胞作为阴性对照。

PRRSV 的 RT-PCR 检测按照文献方法进行^[10]:
用病毒 RNA 提取试剂盒提取感染细胞中的
病毒 RNA,反转录为 cDNA 后,使用引物为
PRRSV-F(5'-TGATGGGCGACAATGTCC-3')和
PRRSV-R(5'-CGCAGACAAATCCAGAGG-3')进
行 PCR 扩增,扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电
泳,凝胶成像系统分析结果。

用间接免疫荧光试验检测感染细胞中 PRRSV 抗原:一抗为 PRRSV N 蛋白单克隆抗体 6D10($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),二抗为 TRITC 标记山羊抗鼠 IgG(1:200 稀释),用荧光显微镜观察结果。

Western blot 检测:裂解 PRRSV 感染的细胞,之后进行 12% 的 SDS-PAGE,结束后将蛋白转移至 NC 膜,以 6D10($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)单抗作为一抗,以 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 作为二抗,用 ECL 化学发光试剂盒显色后观察结果。

1.2.5 PRRSV 在筛选细胞生长动力学测定

在 24 孔细胞培养板中培养筛选的细胞,待细胞密度为 70%~80% 时,用 0.1 MOI 的 PRRSV 感染细胞,在感染后的 12、24、36、48 和 60 h 分别收集细胞和细胞上清中的病毒。将收集的细胞通过反复冻融释放病毒。将细胞内的病毒和细胞上清分别接种至 Marc-145 细胞测定其病毒滴度,绘制病毒生长动力学曲线。同时设立 PRRSV 感染 Marc-145 细胞作为阳性对照。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体的构建和包装

通过 PCR 方法从 pJET1.2-CD163 载体中克隆出 CD163 基因编码区序列,编码区长度为 3 333 bp。用 *Xba*I 和 *Bam*H I 酶切 PCR 产物后将其连接至 pTrip-CMV-IRES-pur 载体。经过测序正确后得到慢病毒表达载体 pTrip-CMV-CD163-IRES-pur。将该载体与 pMD2.G 和 psPAX2 质粒共转染至 293-T 细胞,包装产生重组慢病毒。包装好的慢病毒除了携带有 CD163 基因编码区序列外,还有嘌呤霉素抗性基因,可以用嘌呤霉素对慢病毒转导的细胞进行筛选。

2.2 PAM-CD163 细胞的筛选及鉴定

将包装好的重组慢病毒按照 1 MOI 的剂量感染 PAM 细胞,经过嘌呤霉素持续筛选 2 周后,可以看到明显的细胞克隆团,结合细胞有限稀释法继续筛选,最终得到一株具有嘌呤霉素抗性的细胞株。对获得的细胞株进行鉴定和后续 PRRSV 感染试验(图 1~3)。用 RT-PCR 可以从该细胞中扩增出 CD163 基因,对照的永生化 PAM 细胞中未检测到 CD163 基因(图 1A)。

间接免疫荧光试验可以看到筛选的细胞中有红色的荧光信号,对照永生化 PAM 细胞无红色荧光信号(图 1B)。

Western blot 检测筛选细胞在 130 ku 处有目的条带,对照永生化的 PAM 细胞无目的条带(图 1C)。

为了进一步检测筛选的 PAM 细胞和永生化的 PAM 细胞中 CD163 的表达,用流式细胞仪对 2 种细胞中 CD163 的表达量进行了分析。分别以未用抗体染色的筛选的 PAM 细胞(图 3C)和永生化的 PAM 细胞(图 3D)为阴性对照,筛选的 PAM 细胞有 93.1% 的细胞用 CD163 抗体染色为阳性(图 3A),永生化的 PAM 细胞有 99.5% 的细胞用 CD163 抗体染色为阴性(图 3B)。以上结果说明筛选的细胞中 CD163 基因得到正确的表达,将该株细胞命名为 PAM-CD163,而永生化的 PAM 细胞中无 CD163 蛋白的表达。

2.3 PRRSV 感染 PAM-CD163 试验

将 PRRSV SD16 毒株感染 PAM-CD163 细胞后 24 h 后,提取病毒 RNA,用 RT-PCR 检测病毒核酸,结果如图 2A 所示:可以扩增出 230 bp 的 PRRSV 特异性目的条带。永生化 PAM 细胞接毒后用 RT-PCR 检测未扩增出 PRRSV 目的条带。间接免疫荧光试验结果如图 2B 所示:PRRSV 感染 PAM-CD163 细胞可以看到特异的红色荧光信号,永生化 PAM 细胞接毒后无红色荧光信号。Western blot 检测可以从 PRRSV 感染的 PAM-CD163 细胞中检测出 N 蛋白特异的目的条带,永生化 PAM 细胞接毒后检测不到 N 蛋白特异性目的条带(图 2C)。以上结果说明通过慢病毒载体介导稳定表达 CD163 的 PAM 细胞可以被 PRRSV 感染,而永生化的 PAM 细胞对 PRRSV 不易感。

2.4 PRRSV 在 PAM-CD163 细胞生长动力学测定

用 PRRSV SD16 毒株感染 PAM-CD163 细胞,在感染后的不同时间收集细胞内和细胞外病毒,测定其病毒滴度,同时设立 PRRSV 感染 Marc-145 细胞作为阳性对照。结果显示(图 4):PRRSV 感染 PAM-CD163 细胞所产生的病毒滴度略低于其在 Marc-145 细胞上所产生的病毒滴度。PRRSV 感染 PAM-CD163 细胞 48 h,细胞内病毒滴度最高可以达到 $10^{5.75} \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$,细胞外病毒滴度最高可以达到 $10^{5.25} \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对照 Marc-145 细胞在 PRRSV 感染 48 h 时细胞内病毒滴度最高可以达到 $10^{6.5} \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$,细胞外病毒滴度最高为 $10^{6.125} \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

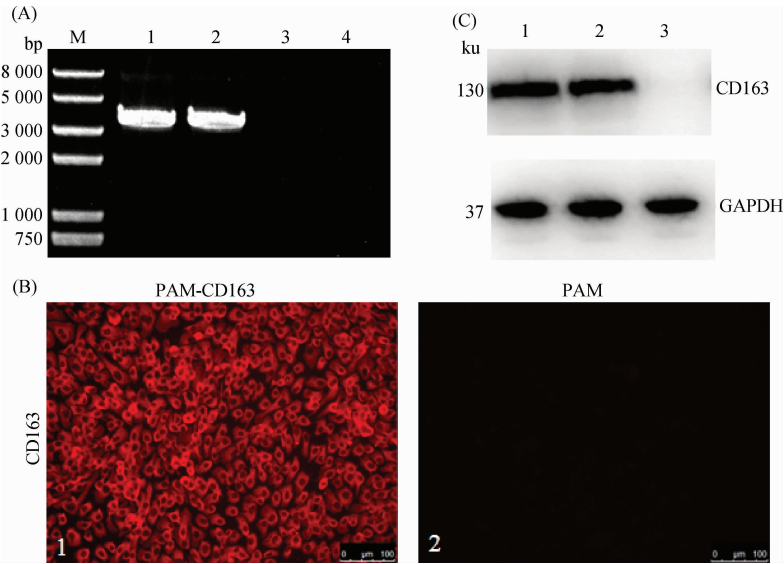


Fig. A RT-PCR 检测筛选细胞 *CD163* 基因的转录(M. DNA 相对分子质量标准;1、2. 筛选细胞 *CD163* 基因的检测;3. 永生化的 PAM 细胞 *CD163* 的检测;4. 阴性对照); Fig. B 间接免疫荧光试验检测 *CD163* 的表达($175\times$, 1. 筛选细胞中 *CD163* 的检测;2. 永生化的 PAM 细胞中 *CD163* 的检测); Fig. C Western blot 检测筛选细胞 *CD163* 的表达(1、2. 筛选细胞 *CD163* 的检测;3. 永生化的 PAM 细胞 *CD163* 的检测)

Fig. A Detection the transcription of *CD163* in selected cells by RT-PCR (M. DNA marker; 1, 2. *CD163* gene transcription in selected PAM cells; 3. No *CD163* gene transcription in immortalized PAM cells; 4. Negative control); Fig. B Indirect immunofluorescence assay of *CD163* protein expression ($175\times$, 1. *CD163* protein expression in selected PAM cells; 2. No *CD163* protein expression in immortalized PAM cells); Fig. C Western blot analysis of the *CD163* protein expression (1, 2. *CD163* protein expression in selected PAM cells; 3. No *CD163* expression in PAM cells)

图 1 筛选细胞的 *CD163* 表达鉴定

Fig. 1 Detection the expression of *CD163* in selected cells

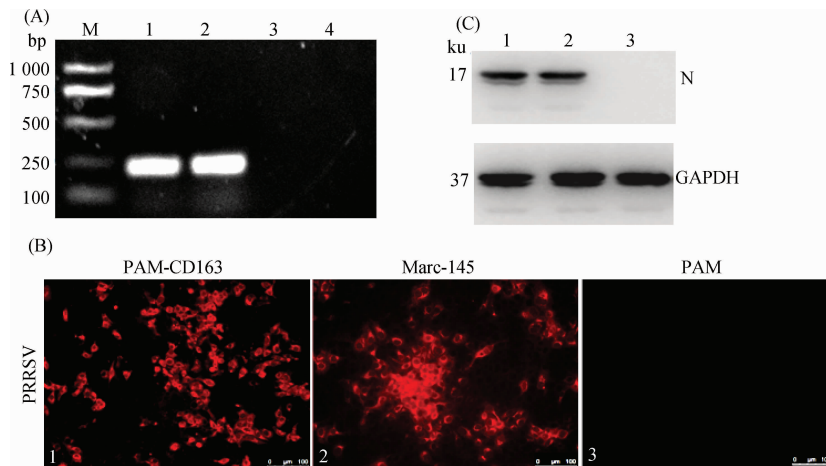
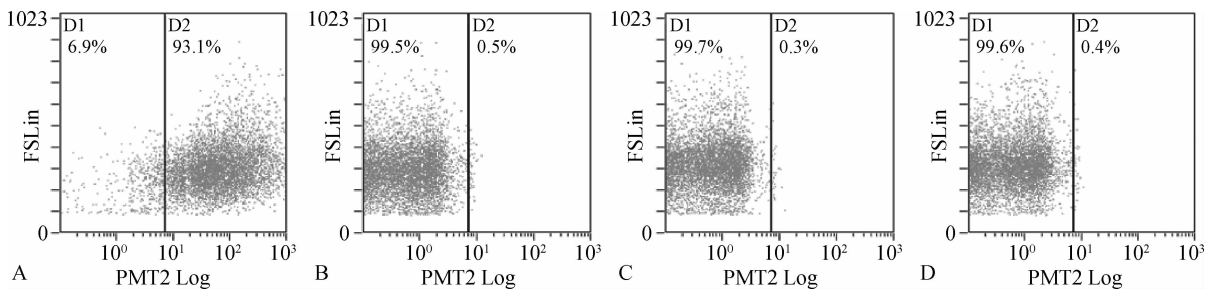


Fig. A RT-PCR 检测 PRRSV 感染 PAM-*CD163* 细胞(M. DNA 相对分子质量标准;1. PRRSV 感染 PAM-*CD163* 细胞扩增结果;2. PRRSV 感染 Marc-145 细胞扩增结果;3. PRRSV 感染永生化的 PAM 细胞扩增结果;4. 阴性对照); Fig. B 间接免疫荧光试验检测 PRRSV 感染 PAM-*CD163* 细胞($200\times$, 1. PRRSV 感染 PAM-*CD163* 细胞;2. PRRSV 感染 Marc-145 细胞;3. PRRSV 感染永生化的 PAM 细胞); Fig. C Western blot 检测 PRRSV N 蛋白(1. PRRSV 感染 PAM-*CD163* 细胞;2. PRRSV 感染 Marc-145 细胞;3. PRRSV 感染永生化的 PAM 细胞)

Fig. A Detection of viral RNA by RT-PCR (M. DNA marker; 1. PRRSV-infected PAM-*CD163* cells; 2. PRRSV-infected Marc-145 cells; 3. PRRSV-infected immortalized PAM cells; 4. Negative control); Fig. B Indirect immunofluorescence assay of PRRSV infectivity in PAM-*CD163* cells ($200\times$, 1. PRRSV-infected PAM-*CD163* cells; 2. PRRSV infected Marc-145 cells; 3. PRRSV-infected immortalized PAM cells); Fig. C Western blot identification of viral N protein synthesis (1. PRRSV-infected Marc-145 cells; 2. PRRSV-infected PAM-*CD163* cells; 3. PRRSV infected immortalized PAM cells)

图 2 PAM-*CD163* 细胞对 PRRSV 的易感性鉴定

Fig. 2 Detection of PRRSV infectivity in PAM-*CD163* cells

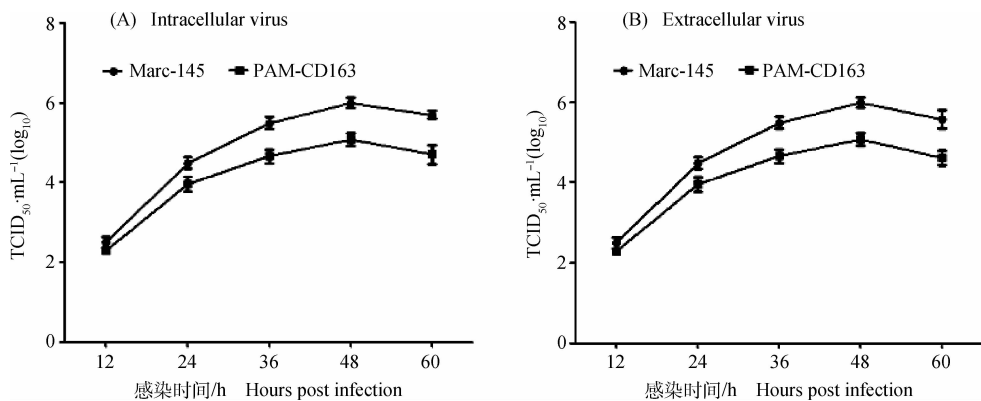


A. 流式细胞术检测 PAM-CD163 细胞中 CD163 的表达; B. 流式细胞术检测永生化的 PAM 细胞中 CD163 的表达; C. PAM-CD163 细胞阴性对照; D. 永生化的 PAM 细胞阴性对照

A. The flow cytometry analysis of CD163 expression in PAM-CD163 cells; B. The flow cytometry analysis of CD163 expression in immortalized PAM cells; C. PAM-CD163 cells negative control; D. Immortalized PAM cells negative control

图 3 流式细胞术检测 PAM-CD163 和永生化的 PAM 细胞中 CD163 的表达

Fig. 3 Detection the expression of CD163 in PAM-CD163 cells and immortalized PAM cells by flow cytometry analysis



A. PRRSV 感染 PAM-CD163 和 Marc-145 细胞细胞内病毒生长动力学曲线; B. PRRSV 感染 PAM-CD163 和 Marc-145 细胞细胞外病毒生长动力学曲线

A. Growth kinetics of intracellular PRRSV on PAM-CD163 and Marc-145 cells; B. Growth kinetics of extracellular PRRSV on PAM-CD163 and Marc-145 cells

图 4 PRRSV 在 PAM-CD163 细胞生长动力学曲线

Fig. 4 Growth kinetics of PRRSV on PAM-CD163 and Marc-145 cells (Values represent $\bar{x} \pm s$ of three experiments)

3 讨论

PRRSV 具有典型的嗜单核细胞/巨噬细胞特性。原代 PAM 细胞是 PRRSV 天然宿主细胞, 由于该细胞制备代价高、制备过程麻烦、不同批次细胞之间存在差异且容易被其他微生物污染, 因此限制了该细胞在体外用于 PRRSV 的分离和培养^[11]。目前体外用于 PRRSV 分离和培养的细胞主要是 Marc-145 细胞, 该细胞系来源于猴, 而非来源于猪, 因此该细胞的应用有可能受限于自然宿主相关的研究。此外与感染原代 PAM 细胞相比, PRRSV 感染 Marc-145 细胞通过不同的途径进入细胞, 会导致病

毒在 Marc-145 细胞生长的适应性^[12]。因此建立一株猪源细胞用于 PRRSV 的分离和培养对于研究 PRRSV 的生物学特性是十分必要的。前期有学者建立了永生化的 PAM 细胞, 但该细胞对 PRRSV 不易感, 经过检测发现该细胞不表达 PRRSV 受体 CD163 蛋白。本研究利用慢病毒载体系统将 PRRSV 受体 CD163 基因转导至该细胞, 使 CD163 蛋白稳定表达, 从而实现了该细胞对 PRRSV 的易感, 由此说明永生化的 PAM 细胞对 PRRSV 不易感的原因之一是该细胞不表达 PRRSV 受体 CD163 分子。

目前应用于筛选稳定表达外源基因细胞系的载体主要有普通单质粒载体(如 pcDNA3.1 载体)、转座子载体和逆转录病毒载体等。慢病毒载体属于逆转录病毒的一种, 具有广泛的细胞感染谱, 可以高效

感染处于分裂期和非分裂期的细胞,能够携带大片段的外源基因在逆转录酶的作用下高效地整合至宿主细胞染色体中^[13]。目前应用的慢病毒属于复制缺陷型病毒,具有很好的生物安全性,是一种理想的用于筛选稳定细胞系的基因转移载体。作者前期曾尝试用普通的 pcDNA3.1 载体将 CD163 基因编码区稳定转染至永生化 PAM 细胞,但是由于该细胞的常规转染效率低,使得后期稳定细胞系的筛选工作难度较大。利用慢病毒载体包装的慢病毒,可以在较短的时间(3~4 周)内筛选得到稳定表达 CD163 的 PAM 细胞系,解决了该细胞系对外源基因难以高效导入的问题。本研究使用的慢病毒表达载体带有 CMV 启动子,多克隆酶切位点后为内部核糖体进入位点序列(internal ribosomal entry site, IRES),IRES 后为嘌呤霉素抗性基因。IRES 元件的应用可以保证 CD163 基因的编码区序列和嘌呤霉素抗性基因单独表达,两者互不影响^[14]。慢病毒转导后的 PAM 细胞可以使用嘌呤霉素进行抗性筛选,嘌呤霉素较其他常用的抗生素,如 G418 和潮霉素 B 等相比,筛选细胞的效率较高,最快可以在 48 h 内将阴性细胞杀死,免去了使用其他抗生素筛选稳定克隆较长的时间周期。

在原代 PAM 细胞中发现的 PRRSV 细胞受体,只有将 CD163 基因转染至 PRRSV 非易感细胞中可以使细胞变成易感细胞,说明 CD163 在 PRRSV 感染宿主细胞过程中具有重要的作用。本研究使用慢病毒载体筛选得到的细胞系,经过 RT-PCR、间接免疫荧光试验、Western blot 试验和流式细胞术检测,结果均为阳性,说明筛选的细胞中 CD163 基因得到了正确的表达。由于慢病毒可以将外源基因稳定整合至细胞染色体上,理论上讲可以在细胞内永久稳定表达。PRRSV 感染试验证明筛选的细胞系对 PRRSV SD16 毒株高度易感,细胞内和细胞外的病毒滴度均可以达到 $10^{5.0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ 以上,略低于其在 Marc-145 细胞上的毒价。如何提高 PRRSV 在筛选的 PAM-CD163 细胞上病毒毒价是下一步研究的方向。PRRSV 在 PAM-CD163 细胞的毒价在 $10^{5.0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ 以上,可以用于 PRRSV 的分离和培养。这些工作为后续的 PRRSV 分离培养和 PRRSV 生物学特性以及 PRRSV 细胞受体的研究奠定了基础。

4 结 论

构建了表达 CD163 基因的重组慢病毒载体,包

装后产生重组慢病毒,转导至永生化的 PAM 细胞后筛选得到 1 株稳定表达 CD163 的 PAM 细胞系。PRRSV 感染试验表明,筛选的细胞对 PRRSV 高度易感,病毒滴度可以达到 $10^{5.0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ 以上。

参考文献:

- [1] VANDERHEIJDEN N, DELPUTTE P L, FAVOREEL H W, et al. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages [J]. *J Virol*, 2003, 77(15): 8207-8215.
- [2] VAN BREEDAM W, DELPUTTE P L, VAN GORP H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 7): 1659-1667.
- [3] WELCH S K, CALVERT J G. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection [J]. *Virus Res*, 2010, 154(1-2): 98-103.
- [4] WEINGARTL H M, SABARA M, PASICK J, et al. Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility [J]. *J Virol Methods*, 2002, 104(2): 203-216.
- [5] KIM Y J, KIM Y S, LAROCHELLE A, et al. Sustained high-level polyclonal hematopoietic marking and transgene expression 4 years after autologous transplantation of rhesus macaques with SIV lentiviral vector-transduced CD34+ cells [J]. *Blood*, 2009, 113(22): 5434-5443.
- [6] YAMAGUCHI T, MORIKAWA A, MIYOSHI H. Comparison of gene-trapping efficiency between retroviral and lentiviral vectors in mouse embryonic stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 297-303.
- [7] 邱洪凯. 蓝耳病病毒克隆测序、单克隆抗体制备及唾液酸粘附素的克隆表达[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.
- [8] DU E Q, TIKOO S K. Efficient replication and generation of recombinant bovine adenovirus-3 in nonbovine cotton rat lung cells expressing I-SceI endonuclease [J]. *J Gene Med*, 2010, 12(10): 840-847.
- [9] 吴锦艳, 田 宏, 郑海学, 等. 逆转录病毒载体介导的 T7 RNA 聚合酶在猪源细胞 PK15 及 SK6 中的稳定表达[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(4): 527-532.
- [10] 郝晓芳, 周艳君, 田志军, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(9): 704-709.

- [11] DELRUE I, VAN GORP H, VAN DOORSSELAE-RE J, et al. Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CD163 [J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 48. [2013-10-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908558/pdf/1472-6750-10-48.pdf>.
- [12] COLLINS J E, BENFIELD D A, CHRISTIANSON W T, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4(2): 117-126.
- [13] COCKRELL A S, KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(3): 184-204.
- [14] BARANICK B T, LEMP N A, NAGASHIMA J, et al. Splicing mediates the activity of four putative cellular internal ribosome entry sites [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4733-4738.

(编辑 白永平)