

猪流行性腹泻病毒分子生物学研究进展^{*}

孙东波, 冯 力^{*}, 时洪艳, 陈建飞

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 黑龙江哈尔滨 150001)

中图分类号: S852.659.6; S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2006)10-0011-04

摘 要: 猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞上培养成功后, 病毒全基因组的序列和分子结构特征, 结构蛋白和非结构蛋白的生物学特性和功能, 病原学、血清学和分子生物学的诊断技术, 体液免疫、细胞免疫和局部黏膜免疫的机理, 疫苗和病毒的细胞受体等方面得到了广泛的研究。但是, 与其他冠状病毒相比, 猪流行性腹泻病毒的研究还比较滞后, 许多研究还没有开展或不够深入, 为了能加快对猪流行性腹泻病毒研究进程, 对其最近的分子生物学研究进展做了综述, 为猪流行性腹泻病毒的深入研究提供参考。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 分子生物学

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的以腹泻、呕吐、脱水和对哺乳仔猪高致死率为主要特征的一种高度接触性肠道传染病^[1]。PEDV 与猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 同属于尼多病毒目 (Nidovirales) 冠状病毒科 (Coronaviridae) 冠状病毒属 (Coronavirus), 两种病毒感染后所引起的临床症状极其相似, 给养猪业带来严重危害^[2]。PED 是世界范围内发生的猪病之一, 1978 年在英国和比利时首次被报道, 此后中国、加拿大、匈牙利、德国、日本及韩国等多个国家相继报道了 PED 的发生, 造成严重的经济损失。当前, PED 发生率居高不下, 发病越来越复杂, 出现混合感染的报道, 倍受广大研究者的重视。各国学者在 PEDV 各个方面开展了一系列的研究工作, 本文根据目前研究结果对 PEDV 的分子生物学研究现状做一综述。

1 病毒的细胞培养

与其他冠状病毒相比, PEDV 的细胞培养相对比较困难, 从 PEDV 发现开始, 很多研究人员尝试用不同的方法将 PEDV 适应于细胞, 但用了近 10 年的时间都没有取得成功, 这在一定程度上制约了 PEDV 研究进程。直到 1988 年, Hofmann 等首次在培养基含胰酶的 Vero 细胞上成功繁殖出 PEDV, 并认为胰酶对 PEDV 纤突糖蛋白切割作用增强了病毒对 Vero 细胞的感染力, 此方法在 PEDV 分离、细胞培养和疫苗的研究中被广泛应用; 此后, Kusanagi K 等研究者对 PEDV 细胞培养进行了深入研究, 相继在仔猪膀胱、肾脏的原代细胞和 KSEK6、IB-RS-2、MA104、CPK、ESK 的传代细胞系上成功培养了 PEDV^[3]。PEDV 在细胞上的成功培养对其研究具有重要意义, 解决了 PEDV 研究的瓶颈问题, 为 PEDV 理化特性、疫苗及其相关分子生物学的研究奠定了物质基础, 使 PEDV 的研究进入了一个新阶段。

2 PEDV 的基因组结构和复制

2.1 基因组结构

PEDV 基因组是单股正链具有感染性的 RNA, 与其他冠状病毒相似, 其基因组 5' 端有一个帽子结构 (cap), 3' 端有 1 个 Poly (A) 尾, 基因组全长为 28 033 nt。基因组 5' 端非翻译区 (5' UTR) 位于基因 1 上游, 长 296 nt; 5' UTR 内含有长为 65 nt ~ 98 nt 的前导序列 (L) 和 1 个以 AUG 为起始密码子并拥有 Kozak 序列 (GUUcaugC) 和编码 12 个氨基酸的开放阅读框 (ORF); 目前, 除人冠状病毒 229E 毒株 (HCoV-229E) 外, 已知的其他冠状病毒成员都有 Kozak 序列, 但序列有所差异^[4]。基因组 3' 端非翻译区 (3' UTR) 长度为 334 nt, 末端连有 Poly (A) 序

^{*} 收稿日期: 2006-07-11

作者简介: 孙东波 (1978—), 男, 黑龙江密山人, 博士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学研究。* 通讯作者
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

列。3'UTR内含有由8个碱基(GGAAGAGC)组成的保守序列,起始于poly(A)上游的73 nt处。所有冠状病毒成员都包含这个序列,只是在基因组中位置不同。剩余基因组序列包括6个ORF,从5'~3'端依次为编码复制酶多聚蛋白1ab(pp1ab)、纤突蛋白(S)、ORF3蛋白、小膜蛋白(E)、膜糖蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)的基因。复制酶多聚蛋白基因(基因1)占全基因组2/3,长20 346 nt,包括ORF1a(12 354 nt)和ORF1b(8 037 nt)两个开放阅读框,二者之间有46 nt的重叠序列,重叠处有滑动序列(UUUAAAC)和假结结构,它们能使核糖体进行移码阅读,从而保证基因1的正确翻译。S基因、E基因、M基因和N基因分别编码病毒的结构蛋白,长度分别为4 152, 231, 681 nt和1 326 nt。ORF3基因长675 nt,编码非结构蛋白,在每两个相邻基因之间有基因间隔序列(IS),它与基因组和亚基因组mRNA的L序列3'端有7 nt~18 nt相同,在病毒基因组复制和翻译过程中发挥重要作用^[2,3]。

2.2 基因组复制

PEDV基因组复制与其他冠状病毒相似,病毒粒子通过膜融合侵入宿主细胞内,然后释放其具有感染性的基因组RNA。首先,基因1翻译一个多聚前体蛋白质,经共转译处理后产生RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)和其他合成病毒RNA的蛋白质。RdRp以基因组RNA为模板转录产生负链RNA,然后以负链RNA为模板合成不同长度的亚基因组mRNA(sgmRNA)和基因组RNA,所有sgmRNA的共同特征是5'端有与基因组RNA相同的L序列,3'端有一套相同的重叠序列。一般情况下,每个sgmRNA翻译合成其5'端ORF所编码的一种蛋白质,这样不同的sgmRNA在细胞质中合成了病毒所有结构蛋白。N蛋白与新合成的基因组RNA在细胞质中形成螺旋的核衣壳,核衣壳与固定在内质网和高尔基体之间空隙的M蛋白结合后再与E蛋白结合,E蛋白和M蛋白相互作用促使病毒粒子出芽,形成包裹的核衣壳。最后,包裹的核衣壳与在高尔基体内经糖基化等修饰的三聚体S蛋白结合,形成成熟的病毒粒子,通过类似融合的胞吐作用释放到细胞外^[2,4]。

3 PEDV的编码蛋白及其功能

3.1 非结构蛋白及其功能

(1)复制酶多聚蛋白1ab(pp1ab)。它是由基因

1编码的一个多功能蛋白质,预测分子质量为753 ku,有13个预测蛋白酶切割位点的非结构蛋白,经共转译处理后产生与病毒基因组复制相关的一系列蛋白质,主要功能包括负链RNA、前导RNA、sgmRNA和子代病毒RNA的转录作用以及对多聚蛋白切割产生具有功能产物的蛋白酶切割作用。因此,在病毒感染早期发挥重要作用^[2,5]。ORF1a主要编码蛋白水解酶,包括分别切割复制酶多聚蛋白N端和C端的类木瓜蛋白酶(PL-PRO)和类脊髓灰质炎病毒3C蛋白酶(3CL-PRO)。PL-PRO的切割活性对锌具有强依赖性。3CL-PRO识别底物的核心序列是[ILMV F]-Q-[SAGC]。另外,ORF1a编码蛋白还含有3个转膜域(TM)。ORF1b主要编码RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp),同时有3个蛋白结构域分别是锌指蛋白域(Z)也称金属结合域、螺旋酶域(Hel)和保守序列域(C)^[4]。

(2)ORF3蛋白。ORF3蛋白是编码分子质量为25.3 ku的非结构蛋白,通过限制性片段长度多态性分析适应Vero细胞的弱毒PEDV和野毒PEDV的ORF3,发现ORF3与病毒毒力有关^[6]。

3.2 结构蛋白及其功能

(1)S蛋白。S蛋白是由1 383个氨基酸组成、分子质量为180 ku~220 ku、位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白,在病毒粒子与细胞表面受体结合后通过膜融合侵入宿主细胞和在感染宿主体内介导中和抗体产生的过程中发挥重要生物学作用^[7]。S蛋白有27个~29个潜在的糖基化位点,在pH 4.0低渗非离子溶剂中溶解度最大。S蛋白从N端到C端分成3个结构域,即大的外部结构域、转膜结构域和短的羧基末端细胞质结构域。外部结构域有介导机体产生中和抗体的抗原表位和与宿主细胞表面大分子结合的受体结合域。羧基末端细胞质结构域主要是由疏水氨基酸组成的疏水区,对整个S蛋白起固定作用。PEDV的S蛋白在病毒粒子成熟后不能被细胞蛋白酶切割,而MHV和BCoV等冠状病毒的S蛋白能被切割成通过非共价键连接的S1和S2两个蛋白,这样能增强病毒的细胞融合力和感染力,PEDV S蛋白与TGEV S蛋白的同源性非常低,二者在血清学上没有交叉反应,但是根据TGEV中和表位推导的PEDV S蛋白中和表位制备的高免血清能够明显地抑制PEDV在Vero细胞上的蚀斑形成^[2,8],说明这两种病毒S蛋白中和表位的线性位置可能存在

相似之处。目前, PEDV S 蛋白中和表位在以烟草花叶病毒为载体的无烟碱烟草植物中得到了成功表达, 表达蛋白免疫接种后, 对仔猪具有良好的保护作用, 为 PEDV 转基因植物疫苗研究奠定了物质基础^[9]。

(2)N 蛋白。N 蛋白是由 441 个氨基酸组成、分子质量为 55 ku~58 ku、磷酸化的核衣壳蛋白, 与病毒基因组 RNA 相互缠绕形成病毒核衣壳。N 蛋白有 6 个~7 个潜在的磷酸化位点, 在 pH 9.0 低渗非离子溶剂中溶解度最大; N 蛋白有 3 个相对保守的结构域, 位于中间的是一个能与病毒 RNA 前导序列结合的 RNA 结合域; N 蛋白在病毒 RNA 合成过程中发挥重要作用, 它能与细胞膜和磷脂结合, 促进病毒组装和 RNA 复制体的形成。N 蛋白在 PEDV 的结构蛋白中所占比例最大, 在感染的细胞中能得到大量表达。猪在感染 PEDV 的早期, 体内就能产生抗 N 蛋白的高水平抗体, 又鉴于其冠状病毒 N 蛋白保守性强, 所以利用 N 蛋白来建立 PEDV 分子生物学诊断技术具有很好的应用前景^[10]。

(3)M 蛋白。M 蛋白是由 226 个氨基酸组成、分子质量为 27 ku~32 ku 的膜糖蛋白, 在病毒粒子的组装和出芽过程中具有重要作用。M 蛋白在感染细胞中位于高尔基体内, 不能被转运到细胞膜, 由 3 个结构域组成, 即暴露于病毒囊膜外短的糖基化 N 末端区、病毒囊膜中大的 C 末端区和中间为 α 螺旋区。在补体存在的条件下, 抗 M 蛋白囊膜外抗原表位的单克隆抗体能中和病毒的感染性。另外, M 蛋白能介导机体产生 α 干扰素, 所以 M 蛋白可以作为 PEDV 基因工程疫苗的候选抗原^[11]。

(4)E 蛋白。E 蛋白是由 76 个氨基酸组成、预测分子质量为 8.8 ku、位于病毒囊膜上的小包膜蛋白, 对病毒的组装和出芽是必要的。目前, 研究者将 PEDV 的 E 基因和 M 基因导入甲病毒载体 (pS-FV), 在 BHK-21 细胞中得到了成功的表达, 为进一步探讨 E 蛋白和 M 蛋白在抗病毒中的作用奠定了基础^[12]。

4 诊断技术

PED 与 TGE 的临床症状极其相似, 所以根据临床症状来诊断 PED 是非常困难的。最初在实验室中, 主要依靠病毒分离、病毒中和试验和免疫荧光等检测 PEDV 抗原和抗体的病原学诊断方法, 这些方法都能对 PED 做出准确的诊断, 但是操作复杂而且耗时^[13-14]。随着分子生物学的发展, PCR 技术被

应用到 PEDV 诊断技术中。Jung K 等以 M 基因和 N 基因为靶基因建立了 RT-PCR 方法来检测 PEDV, 在粪便样品中能检测到 PEDV 的最低含量为 100 TCID₅₀^[15]。为能高通量检测样本, Rodak L 等^[16]利用 PEDV M 蛋白的单克隆抗体建立了敏感性高、特异性高的竞争阻断 ELISA 诊断方法, 适于 PEDV 流行病学调查。Song D S 等通过 RFLP 技术分析了 PEDV 的细胞致弱毒株 DR13 和现地分离毒株的 ORF3, 发现 DR13 毒株的 ORF3 序列在 *Hind*III 和 *Xho* II 限制性酶切位点处发生了变化, 这使 DR13 毒株作为抗 PEDV 感染的弱毒标记疫苗成为可能。

5 组织嗜性和免疫

PEDV 主要利用其 S 蛋白与猪肠道细胞表面受体结合, 通过膜融合侵入细胞内, 集中在猪小肠绒毛上皮细胞中复制, 新生病毒通过粪便和呕吐物排出体外。PEDV 属于冠状病毒群, 同群的猪传染性胃肠炎病毒、猫传染性腹膜炎病毒、人呼吸道冠状病毒 229E 的细胞受体都是其宿主的氨基肽酶 N (APN)。研究表明, 猪可溶性 APN 在体外能提高仔猪抗 PEDV 抗体水平和促进 PEDV 在 Vero 细胞中增殖, 这揭示了猪 APN 对 PEDV 的感染性和复制起重要作用^[17]。目前, 抗 PEDV 的免疫机制不是十分清楚, 预防 PED 广泛应用的免疫方法是对怀孕母猪进行免疫接种, 然后通过母源抗体使仔猪获得人工被动免疫保护。由于 PEDV 具有肠道组织嗜性的特点, 在抗 PEDV 感染免疫过程中除体液免疫和细胞免疫外, 局部肠黏膜免疫系统发挥着不可替代的作用。我国研制的 TGE 和 PED 系列疫苗采用了猪后海穴免疫接种, 此免疫接种途径除激活体液免疫和细胞免疫外, 还激活了肠道局部黏膜免疫, 所以与常规免疫接种途径相比具有更好的免疫效果^[18-19]。

6 展望

上述资料表明, 近年来对 PEDV 分子生物学的研究已取得一定的进展, 但是与其他冠状病毒成员相比, 其研究还相对落后许多, 尤其在 PEDV 的新型高效疫苗、反向遗传操作、黏膜免疫机理和病毒致病机制等方面还有待深入的研究。随着对 PEDV 研究越来越广泛和深入, PEDV 的研究也将同其他冠状病毒一样, 收获累累硕果。

参考文献:

- [1] Pensaert M B, Deboucq P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. Arch Virol, 1978, 58(3): 243-247.

- [2] Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, et al. Fields virology (4th ed) [M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [3] Kadoi K, Sugioka H, Satoh T, et al. The propagation of a Porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines[J]. New Microbiol, 2002, 25(3):285-90.
- [4] Brian D A, Baric R S. Coronavirus genome structure and replication[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 287: 1-30.
- [5] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. Completion of the Porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. Virus Genes, 2001, 23(2): 137-144.
- [6] Song D S, Yang J S, Oh J S, et al. Differentiation of a Vero cell adapted Porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3[J]. Vaccine, 2003, 21: 1833-1842.
- [7] Kang T J, Seo J E, Kim D H, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of Porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(2): 378-383.
- [8] Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the Porcine epidemic diarrhea virus[J]. Mol Cells, 2002, 14(2): 295-299.
- [9] Kang T J, Kim Y S, Jang Y S, et al. Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of Porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine[J]. Vaccine, 2005, 23 (17-18): 2294-2297.
- [10] Lee H K, Yeo S G. Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of Porcine epidemic diarrhea virus Chinju99 [J]. Virus Genes, 2003, 26(2): 207-212.
- [11] Fan J H, Li Y J. Cloning and sequence analysis of the M gene of Porcine epidemic diarrhea virus LJB/03[J]. Virus Genes, 2005, 30(1): 69-73.
- [12] 余丽芸, 侯喜林. 流行性腹泻病毒 M 基因与甲病毒载体重组 RNA 的构建[J]. 动物医学进展, 2005, 26(5): 73-76.
- [13] Kim O, Chae C. *In situ* hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets[J]. Vet Pathol, 2000, 37: 62-67.
- [14] 李建强, 柳纪省, 胡永浩, 等. 猪传染性胃肠炎病毒分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2): 1-4.
- [15] Jung K, Chae C H. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between Porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe[J]. J Virol Methods, 2005, 123(2): 141-146.
- [16] Rodak L, Valicek L, Smid B, et al. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces[J]. Vet Microbiol, 2005, 105(1): 9-17.
- [17] Oh J S, Song D S, Yang J S, et al. Effect of soluble porcine aminopeptidase N on antibody Production against porcine epidemic diarrhea virus[J]. J Vet Sci, 2004, 5(4): 353-357.
- [18] 王 明, 马思奇, 冯 力, 等. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻穴位针刺免疫的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1997, 19(6): 6-13.
- [19] Bae J L, Lee J G, Kang T J, et al. Induction of antigen specific systemic and ucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen[J]. Vaccine, 2003, 21: 4052-4058.

Progress on Molecular Biology of Porcine epidemic diarrhea virus

SUN Dong-bo, FENG Li, SHI Hong-yan, CHEN Jian-fei

(Division of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

Abstract: After Porcine epidemic diarrhea virus was successfully cultured in Vero cell, some progresses were obtained regarding entire genomic sequences and structural feature, biological property and function of structural and non-structural protein, diagnostic technique of etiology, serology and molecular biology, immune mechanism, vaccine and cell receptor of Porcine epidemic diarrhea virus. But research process of Porcine epidemic diarrhea virus fell behind other coronavirus members, many researches had not been done about Porcine epidemic diarrhea virus. To accelerate research course of Porcine epidemic diarrhea virus, progress of molecular biology of Porcine epidemic diarrhea virus was reviewed to serve as reference for advanced research of Porcine epidemic diarrhea virus.

Key words: Porcine epidemic diarrhea virus; molecular biology