

冯 磊, 吴培培, 褚 轩, 等. 稳定表达人 TMPRSS2 蛋白质悬浮生长 MDCK 细胞系的构建[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1084-1090.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.022

稳定表达人 TMPRSS2 蛋白质悬浮生长 MDCK 细胞系的构建

冯 磊, 吴培培, 褚 轩, 陈 丽, 王伟峰, 侯继波

(江苏省农业科学院/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了构建能稳定表达人Ⅱ型跨膜丝氨酸蛋白酶(TMPRSS2)的重组 MDCK 细胞,并考察该重组细胞株对禽流感 H9 亚型病毒的增殖能力,采用基因工程的方法,将 TMPRSS2 基因克隆入真核表达载体中获得重组表达载体 pIRES-TMPRSS2。采用 25 000 线性 PEI 进行悬浮生长 MDCK 细胞的转染操作,经两轮 G418 抗性筛选获得能够稳定表达该蛋白质的重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞。RT-PCR、Western blot 以及间接免疫荧光检测(IFA)的结果显示,TMPRSS2 已在该重组细胞株中正常表达。该重组细胞的悬浮比生长速率达到 0.438 d^{-1} ;在 3 L 反应器中,最大细胞密度可达到 $1\text{ ml } 6.83 \times 10^6$ 个。在对 6 株禽流感 H9 亚型病毒的连续盲传试验中,经 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞盲传的子代病毒可以获得较高的血凝效价和半数组织感染滴度。

关键词: MDCK 细胞; 稳定转染; 跨膜丝氨酸蛋白酶; 禽流感病毒

中图分类号: Q813.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1084-07

Establishment of suspension-cultured MDCK cell line expressing type II transmembrane serine protease(TMPRSS2)

FENG Lei, WU Pei-pei, CHU Xuan, CHEN Li, WANG Wei-feng, HOU Ji-bo

(*Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Nanjing 210014, China*)

Abstract: To establish recombinant MDCK cells expressing type II transmembrane serine protease(TMPRSS2) and to investigate the influence of the MDCK cells on the replication of avian influenza virus, the gene of TMPRSS2 was cloned into the eukaryotic expression vector to generate recombinant pIRES-TMPRSS2. The recombinant plasmid was transfected into MDCK-Sus cells by linear 25 000 polyethyleneimine (PEI) by means of single-cell suspension culture. The recombinant MDCK-Sus-TMPRSS2 cell clone was achieved by two rounds of resistance selection to G418 solution. Western blot and IFA test revealed that TMPRSS2 protein was expressed and was located on cell membrane. The specific suspension growth rate and the maximum cell density of recombinant MDCK-Sus-TMPRSS2 cells reached 0.438 d^{-1} and $1\text{ ml } 6.83 \times 10^6$ cells. Six strains of avian influenza virus subtype H9 were adapted to 15 passages in recombinant MDCK-Sus-TMPRSS2 cells, and acquired much higher HA titers and 50% tissue culture infective doses(TCID₅₀) than those in parental MDCK-Sus cells.

Key words: MDCK cell; stable transfection; transmembrane serine protease; avian influenza virus

收稿日期: 2015-02-14

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303046);江苏省农业科技自主创新基金项目[SCX(13)5036]

作者简介: 冯 磊(1979-),男,江苏南通人,博士,副研究员,从事兽用生物制品工程技术研究。(Tel) 025-84392068; (E-mail) fenglnt@hotmail.com

通讯作者: 侯继波, (E-mail) houjibo@jaas.ac.cn

目前采用连续传代细胞系,如 MDCK 细胞、Vero 细胞等替代 SPF 鸡胚在生物反应器中进行禽流感病毒的大规模增殖制备是科研单位、兽用疫苗生产企业竞相开展的研究热点^[1-3]。禽流感病毒表面的 HA 蛋白质与宿主细胞上病毒受体结合的先决条件是 HA 蛋白质在其碱性氨基酸(Lys 或 Arg)位点进行有效裂

解,形成 HA1 蛋白质和 HA2 蛋白质,这二者之间由二硫键连接。HA1 蛋白质负责识别宿主细胞膜上的糖链受体,HA2 蛋白质的 N 端有一段融合肽负责病毒囊膜与宿主细胞膜的融合,在 H^+ 攻击下由病毒的 M2 蛋白质形成离子通道帮助病毒核酸向胞内释放,继而进入细胞核完成逆转录、复制、翻译表达等后续过程^[4]。禽流感病毒能够在 SPF 鸡胚中增殖的一个重要原因就是鸡胚尿囊液中含有大量的蛋白酶,能够对病毒粒子表面的 HA 蛋白质进行裂解^[5-6]。而禽流感病毒在体外培养的动物细胞,如 MDCK 细胞、Vero 细胞中增殖一般都需要在病毒增殖过程中添加经 TPCK 处理的胰蛋白酶^[7-9]。这种蛋白酶弱化了胰凝乳蛋白酶的活性,增强了对碱性氨基酸(如 Arg、lys)位点的裂解能力,从而能够保证禽流感病毒 HA 蛋白质的正确裂解^[10-11]。但外源蛋白酶的添加对宿主细胞的生长状态造成的影响是不可逆的,特别是病毒连续传代后的蛋白酶积累对宿主细胞生理状态影响极为严重,进而影响流感病毒的增殖效率。

如果流感病毒增殖细胞能稳定表达蛋白酶,并定位表达于细胞膜的外侧则可以省去添加外源的蛋白酶,既可完成对病毒粒子表面的 HA 蛋白质裂解,又不会对细胞自身产生影响。人 II 型跨膜型丝氨酸蛋白酶(Type II transmembrane protease serines, TMPRSS)是新近发现的一类特殊蛋白酶,该蛋白质从 N 端往 C 端依次是胞内结构域(Cyto. D)、跨膜结构域(TM)、主干区(低密度脂蛋白 A 类受体区 LDLRA、富含半胱氨酸的清道夫受体区 SRCR、原结构域 Pro)、消化结构域(Catalytic domain)^[12],其中跨膜区结合于细胞膜上,主干区和消化结构域则表达定位于细胞膜的外侧,具有对蛋白质消化酶解的功能^[13]。TMPRSS2 主要存在于前列腺中,最近也有报道称该蛋白酶在人类呼吸道上皮细胞中被发现^[14]。如果我们在流感病毒增殖宿主细胞中重组表达该跨膜类蛋白酶,其本身并不释放到培养液中,只是消化结构域表达定位到细胞膜外侧,对其细胞本身不存在任何蛋白质消化作用,但可以对初始结合于细胞膜上的病毒粒子 HA 蛋白质进行有效酶解,进而提高病毒感染效率,增加病毒的增殖滴度。

本试验试图构建能够稳定表达人 TMPRSS2 蛋白质的重组 MDCK 细胞系,并且能够在生物反应器中实现对该重组细胞株的单细胞全悬浮培养,为禽流感病毒在动物细胞上更好地适应传代以及大规模制备禽

流感疫苗的技术革新提供一条有效的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、禽流感病毒、载体、抗体等生物材料 单细胞悬浮培养的 MDCK-Sus 细胞由国家兽用生物制品工程技术研究中心对 ATCC 引进的贴壁生长 MDCK 细胞自行驯化适应并建系保藏。禽流感 H9 亚型病毒: A/chicken/Jiangsu/02/09 (JS02)、A/chicken/Jiangsu/03/11 (JS03)、A/chicken/JiaXing/02/11 (JX02)、A/chicken/XiGang/04/01 (XG04)、A/chicken/HangZhou/03/01 (HZ03)、A/chicken/HeNan/03/01 (HN03) 由国家兽用生物制品工程技术研究中心分离鉴定并保藏,真核细胞表达载体 pIRES 由国家兽用生物制品工程技术研究中心保藏,兔抗人 TMPRSS2 蛋白质的一抗购自 Santa Cruz 生物技术公司, FITC 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自杭州联科生物技术公司。

1.1.2 主要生物试剂 Trizol、M-MLV 逆转录系统、pMD19-T 载体、oligo dT、各种限制性内切酶、*Ex Taq* 酶、T4 DNA 连接酶等分子生物学材料均购自 TaKaRa 公司。质粒大提试剂盒、核酸胶回收试剂盒等购自 Qiagen 公司。DMEM、G418、Opti-MEM、PEI (25 000 线性)试剂等购自 Invitrogen 公司。TPCK 处理的胰蛋白酶、细胞悬浮生长培养基组分(大豆蛋白水解物、酵母提取物、转铁蛋白、激素、F-68 等成分)购自 Sigma 公司。细胞膜蛋白质抽提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 pIRES-TMPRSS2 表达载体的构建 采用 *Nhe I/Xba I* 双酶切含有人 TMPRSS2 蛋白质 ORF 的质粒载体以及 pIRES 质粒,将 TMPRSS2 目的片段及 pIRES 质粒的骨架片段进行电泳后回收,定量后进行核酸片段连接,转化至 DH5 α 中,挑选连接阳性菌落并大量扩增,质粒抽提后酶切验证重组真核表达载体 pIRES-TMPRSS2。经质粒大提后获得转染用质粒。

1.2.2 G418 作用浓度的筛选 MDCK-Sus 细胞接种于 50 ml TPP 培养管(瑞士 TPP 公司,87050)中,其中培养体积为 10 ml,初始细胞密度为 $1 \text{ ml } 5 \times 10^5$ 个。在不同的培养管中加入不同浓度的 G418,浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 、600 $\mu\text{g/ml}$ 、700 $\mu\text{g/ml}$ 、800 $\mu\text{g/ml}$,置于

37 ℃、5% CO₂, 转速为 100 ~ 250 r/min 培养摇床上进行悬浮培养, 每日取样观察并测定细胞存活率, 培养 6 ~ 12 d, 记录细胞死亡情况, 确定 G418 的最小有效工作浓度。

1.2.3 阳离子聚合物介导的悬浮细胞转染 接种初始细胞密度为 1 ml 5×10^5 个的 MDCK-Sus 细胞株于 50 ml TPP 培养管中, 悬浮培养过夜后用于质粒转染。转染前将悬浮培养用培养基更换为 Opti-MEM 培养基孵育 10 min。以 10 ml 细胞悬液为 1 个转染单位, 采用 PEI 试剂介导的转染方法进行 MDCK-Sus 细胞的悬浮转染操作, 具体转染步骤见文献[15]。转染 8 h 后, 以 1 000 r/min 离心 3 min, 将含有剩余转染复合物的培养上清液去除, 更换成 MDCK-Sus 细胞株的正常悬浮培养基继续振荡悬浮培养。

1.2.4 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞克隆的筛选 转染后 18 ~ 24 h 的 MDCK-Sus 细胞株经离心回收按照 1 : 12 的比例重新分散至 15 ml 新鲜悬浮培养液中培养, 37 ℃、5% CO₂, 转速为 100 ~ 200 r/min, 悬浮培养液中 G418 的工作浓度为 300 μg/ml, 细胞初始密度大致为 1 ml 1×10^5 ~ 3×10^5 个。按照每 5 d 换 1 次液的频率进行 G418 持续筛选, 第一轮筛选时间大致为 3 ~ 4 周。选择能够在有 G418 筛选压力下持续增殖的重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞克隆继续悬浮培养传代。该传代操作以离心去除培养上清液并重悬细胞沉淀来实现。第二轮筛选中将 G418 筛选工作浓度提高至 600 μg/ml 继续加压筛选。最终获得能够在 G418 抗性筛选中稳定持续悬浮生长的重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞株。

1.2.5 RT-PCR、Western blot、间接免疫荧光鉴定 将筛选出来的 MDCK-Sus-TMPRSS2 重组细胞株经离心收集, PBS 清洗 3 遍后按 Trizol 法从细胞中抽提总 RNA, 具体方法参照 Trizol 试剂说明书。以 oligo dT 为逆转录引物按常规方法逆转录生成总 cDNA 后, 以其为模板, 进行 PCR 扩增。扩增引物为 p1: 5'-GGATGGCTTTGAACCTCAGGGTCACC-3', p2: 5'-GGCATTAAACCCTCACTAAAGGGAAG-3', 扩增程序如下: 95 ℃ 3 min; 98 ℃ 30 s; 60 ℃ 35 s; 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

将筛选出来的 MDCK-Sus-TMPRSS2 重组细胞株经离心收集、PBS 清洗 3 遍后用于膜蛋白质抽提。以 5% 浓缩胶和 8% 分离胶进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳, 采用半干式转膜操作将胶上蛋白质转移至

PVDF 膜上, 经 BSA 封闭后, 采用人 TMPRSS2 蛋白质的兔源一抗及 HRP 标记的羊抗兔二抗孵育有目的蛋白质的 PVDF 膜, 采用 DAB 显色剂显色鉴定目的蛋白质表达情况。

将筛选出来的 MDCK-Sus-TMPRSS2 重组细胞株经离心收集分为两份, 一份在 96 孔板中用于细胞静置培养, 待细胞展开生长后固定并进行免疫荧光检测; 另一份样品采用 75% 冷丙酮直接固定于 96 孔板中进行免疫荧光测定。以人 TMPRSS2 蛋白质的兔源一抗以及 FITC 标记的羊抗兔二抗进行检测, 经 PBS 清洗 3 遍后在荧光显微镜下观察重组人 TMPRSS2 蛋白质在 MDCK-Sus 细胞上的表达情况。上述鉴定试验均以母本 MDCK-Sus 细胞为空白对照, 按照相同操作步骤进行鉴定。

1.2.6 重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞悬浮培养及生长曲线测定 重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞以 1 ml 3×10^5 个的初始密度接种于 250 ml 的培养摇瓶中, 放置于 37 ℃、5% CO₂, 转速为 120 r/min 的培养摇床中进行种子细胞悬浮培养, 以母本 MDCK-Sus 细胞为对照。在 3 L 生物反应器(荷兰 Applikon 公司产品)中, 重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞以 1 ml 3×10^5 ~ 5×10^5 个的初始密度接种于 1 600 ml 初始培养体积中, 设置培养转速 60 ~ 180 r/min, 培养温度 37 ℃, 溶解氧(DO)为 50%, pH 值为 7.1, 进行初始批式培养, 培养 96 h 后进行补料培养, 每 24 h 取样测定细胞密度, 计算细胞比生长速率。

1.2.7 禽流感 H9 亚型病毒在 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞上的适应传代 在 50 ml TPP 细胞培养管中, 以重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞、母本 MDCK-Sus 细胞为增殖细胞连续传代 6 株禽流感 H9 亚型病毒, 每种病毒连续传 15 代, 分别在第 1、第 5、第 10、第 15 代测定增殖病毒的 HA 效价和半数组织培养物感染滴度, 判断两种增殖宿主细胞对禽流感病毒的连续传代能力。仅母本 MDCK-Sus 细胞在连续传代增殖 6 株禽流感 H9 亚型病毒时添加 2 μg/ml 的 TPCK 处理的胰蛋白酶。

1.2.8 AIV-H9 亚型病毒 HA 效价及 TCID₅₀ 滴度的检测 采新鲜公鸡血, 经抗凝处理及 PBS 清洗后制成 0.5% 鸡血球 PBS 液。在 HA 检测 96 孔板上以 PBS 连续对倍稀释病毒检测样品至第 11 孔, 第 12 孔以 PBS 作为对照。每孔分别加入 25 μl 0.5% 鸡血球 PBS 液, 在振荡器上振动 10 s, 室温下作用

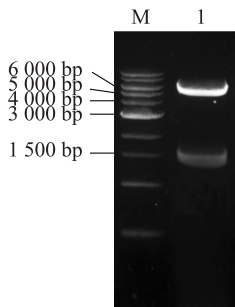
30~40 min。依据血球凝集程度判定反应结果,以出现完全凝集的最大稀释度为该病毒样品的血球凝集效价(HA titer)。

含有 10% 血清正常培养的 MDCK 细胞在 96 孔板中长至单层时接入连续 10 倍稀释的禽流感病毒样品,每个稀释度接入 8 孔,每孔 200 μ l 病毒稀释液,病毒稀释液中含有 0.5% 的血清和 5 μ g/ml 的 TPCK 处理的胰蛋白酶。3 d 后检测每孔培养上清液的 HA 效价,有 HA 效价即判定该孔为阳性,纪录每个稀释度的阳性孔数,按照 Reed-Muench 方法计算病毒滴度,以 1 ml lgTCID₅₀ 来表示。

2 结果

2.1 pIRES-TMPRSS2 载体的酶切验证

利用 2 个酶切位点将目的片段连入真核表达载体中,获得 pIRES-TMPRSS2 真核表达载体用于后续转染试验。*Nhe* I/*Xba* I 双酶切 pIRES-TMPRSS2 载体鉴定结果显示,目的片段大小为 1 492 bp,质粒载体骨架片段大致 5 500 bp,大小正确,如图 1 所示。经质粒大提获得质量较高的质粒,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值为 1.81,用于后续质粒转染试验。



M:DNA 分子量标准;1:pIRES-TMPRSS2 质粒经 *Nhe* I/*Xba* I 双酶切。

图 1 重组 pIRES-TMPRSS2 载体的 *Nhe* I/*Xba* I 双酶切电泳鉴定

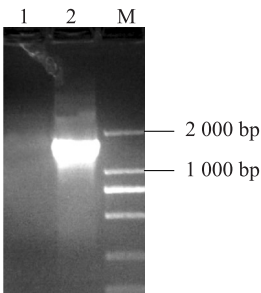
Fig. 1 Double enzymatic digestion of recombinant plasmid pIRES-TMPRSS2 with *Nhe* I/*Xba* I

2.2 MDCK-Sus-TMPRSS2 重组细胞的克隆、筛选及鉴定

转染后的细胞在 300 μ g/ml G418 筛选环境中经过 28 d 的筛选,获得了能够正常持续悬浮生长的重组细胞株。将存活的细胞株分散至含有 600 μ g/ml 的 G418 筛选 TPP 培养管中继续加压筛选,最终获得能够持续生长的 MDCK-Sus-TMPRSS2 重组细胞。

经 RT-PCR 检测发现重组 MDCK-Sus-TMPRSS2

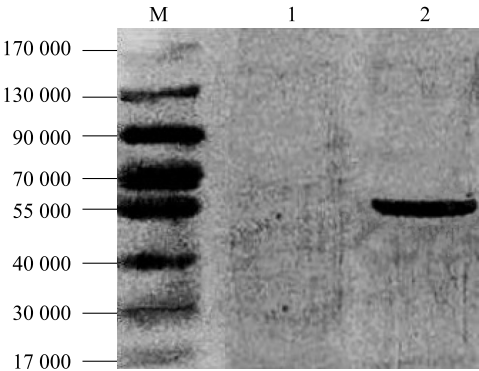
细胞株可扩增出 1 500 bp 左右的特异条带,与目的条带大小一致,而母本 MDCK-Sus 细胞的扩增结果为阴性,如图 2 所示。Western blot 检测发现重组 MDCK 细胞株表达了分子量为 53 000 的目的蛋白质,而母本 MDCK-Sus 细胞无目的蛋白质表达,如图 3 所示。经间接免疫荧光检测,悬浮生长的重组细胞株可以表达人 TMPRSS2 蛋白质,如图 4A 所示。同时静置培养该细胞,使其贴壁生长后,再用间接免疫荧光也可检测出人 TMPRSS2 蛋白质的特异性表达(图 4B),而对照母本细胞未见特异性荧光,如图 4C 所示。



M:DNA 分子量标准物;1:母本 MDCK-Sus 细胞(对照);2:重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞。

图 2 TMPRSS2 蛋白质的 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of TMPRSS2 by RT-PCR



M:蛋白质分子量标准物;1:母本 MDCK-Sus 细胞(对照);2:重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞。

图 3 MDCK 细胞中 TMPRSS2 蛋白质的 Western blot 检测

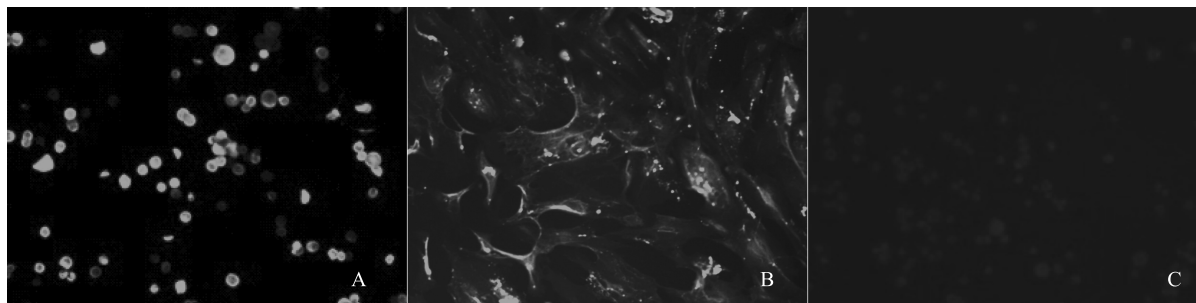
Fig. 3 Detection of TMPRSS2 in MDCK cells by Western blot

2.3 MDCK-Sus-TMPRSS2 重组细胞的悬浮生长性能

重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞的悬浮生长曲线如图 5 所示。与母本 MDCK-Sus 细胞比较,重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞的生长速率基本无变化,

在 250 ml 摇瓶中培养细胞获得最大的细胞密度为 1 ml 2.7×10^6 个, 平均比生长速率为 0.438 d^{-1} , 基本与母本细胞没有差异(母本细胞最大细胞密度 1 ml

2.65×10^6 个, 平均比生长速率为 0.453 d^{-1}), 说明经过外源基因转染及筛选操作后获得的重组细胞生长性能基本没有发生变化。



A: 悬浮培养 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞; B: 静置培养 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞; C: 母本 MDCK-Sus 细胞。

图 4 TMPRSS2 蛋白质的间接免疫荧光(IFA)检测

Fig. 4 Identification of TMPRSS2 expression by IFA

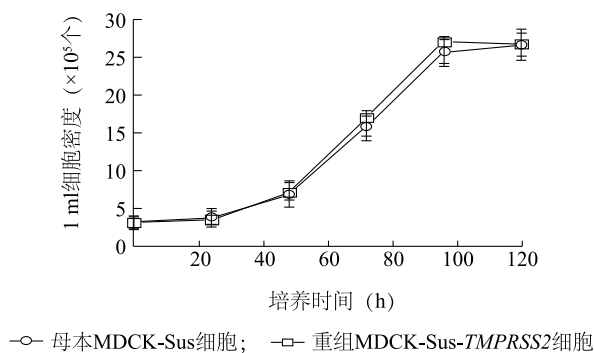


图 5 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞与母本 MDCK-Sus 细胞悬浮生长曲线

Fig. 5 Suspension growth curves of MDCK-Sus-TMPRSS2 cells and parental MDCK-Sus cells

为了验证该重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞是否具备大规模悬浮生长的能力, 在 3 L 生物反应器中对该重组细胞进行了分批(0 ~ 96 h)和补料式(96 ~ 168 h)联合培养, 培养周期可以达到 144 ~ 168 h, 在培养后期经补料培养后的最大细胞密度可达到 1 ml 6.83×10^6 个(图 6), 同时细胞存活率始终保持在 92% 以上, 说明该重组细胞株有望在种子细胞培养阶段和病毒培养阶段均可以保持较好的悬浮生长性能, 有利于禽流感病毒在生物反应器中的大量增殖。

2.4 不同 AIV-H9 亚型病毒在重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞上的连续传代培养

结果如表 1 所示, 在不使用 TPCK 处理的胰蛋白酶条件下, 重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞可以正常增殖 6 株禽流感 H9 亚型病毒, 且利用该重组细胞进行禽

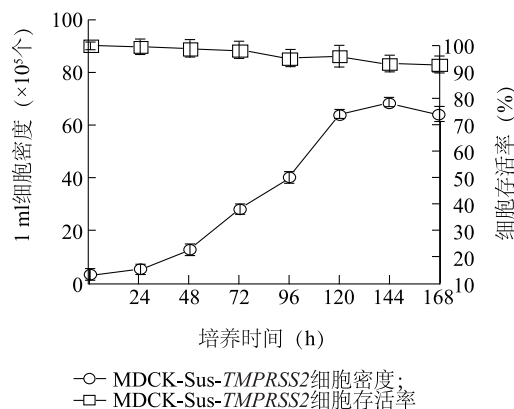


图 6 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞在 3 L 反应器中悬浮生长曲线

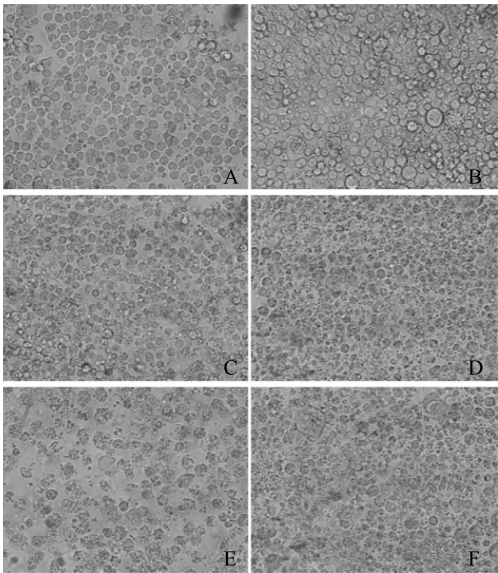
Fig. 6 Suspension growth curve of MDCK-Sus-TMPRSS2 cells cultured in 3-L bioreactor

流感病毒连续传代时可以逐步提高病毒的增殖效率, 在连续盲传 10 代后, 子代病毒的血凝效价仍保持较高的水平。母本 MDCK-Sus 细胞在 $2 \mu\text{g/ml}$ TPCK 处理的胰蛋白酶条件下连续增殖该 6 株禽流感病毒 5 代, 增殖效率与重组细胞株的增殖效率差异不大, 但连续增殖 10 代后, 其子代病毒的血凝效价逐步降低, 无法获得理想的增殖效果。重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 和母本 MDCK-Sus 细胞在连续盲传 15 代 JS03 株禽流感病毒接毒后, 母本 MDCK-Sus 细胞在接毒 24 h 后就呈现出细胞边缘毛糙皱缩现象, 病毒增殖后期呈现出细胞裂解不完全的现象, 病毒增殖效率不佳。MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞在接毒后 24 h, 细胞边缘清晰, 病毒增殖后期细胞感染充分, 裂解完全(图 7)。

表 1 不同 AIV-H9 亚型病毒在 2 种 MDCK 细胞上的连续传代培养

Table 1 AIV-H9 virus adaptation in MDCK-Sus-TMPRSS2 cells and MDCK-Sus cells to several passages

毒株	H9 亚型禽流感病毒的 HA 效价(lg2, 25 μl)							
	MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞				MDCK-Sus 细胞			
	1 代	5 代	10 代	15 代	1 代	5 代	10 代	15 代
JS02	6	7	8	8	5	6	5	4
JS03	5	8	9	9	5	8	6	5
JX02	5	5	8	8	4	5	5	4
XG04	4	7	8	9	4	6	5	4
HZ03	5	6	8	8	5	6	5	4
HN03	6	8	9	9	5	7	5	3

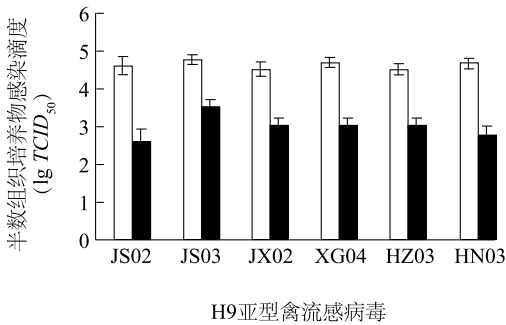


A、C、E:重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞分别接毒 24 h、48 h、72 h;B、D、F:母本 MDCK-Sus 细胞分别接毒 24 h、48 h、72 h。

图 7 JS03 株在重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞和母本 MDCK-Sus 细胞连续盲传禽流感病毒 JS03 株 15 代后的细胞形态

Fig. 7 The morphologies of MDCK-Sus-TMPRSS2 and MD-CK-Sus cells after AIV-JS03 strain adaptation to 15 passages

在 6 株禽流感 H9 亚型毒株的连续传代 15 代后,检测其病毒的半数组织培养物感染滴度,结果(图 8)显示,通过重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞增殖的 6 株病毒均可获得较高的病毒滴度,均高于 1 ml 4. 5lgTCID₅₀,说明病毒经重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞连续盲传后子代病毒粒子具有较好的感染性。由母本 MDCK-Sus 细胞连续盲传的子代病毒滴度均低于 1 ml 3. 5lg TCID₅₀,说明经母本 MDCK-Sus 细胞连续盲传的子代病毒的感染能力明显下降。



□ 重组MDCK-Sus-TMPRSS2细胞; ■ 母本MDCK-Sus细胞

图 8 禽流感病毒在重组 MDCK-Sus-TMPRSS2 细胞和母本 MDCK-Sus 细胞中连续盲传 15 代后的滴度

Fig. 8 AIV titers adapted in MDCK-Sus-TMPRSS2 and MD-CK-Sus cells to 15 passages

3 讨 论

2010 年 Bottcher-Friebertshauser 报道,在重组 MDCK 细胞中经强力霉素诱导表达的 TMPRSS2 蛋白酶可裂解细胞内新合成的流感病毒 HA 蛋白质,同时也可以裂解被吞入胞内尚未被蛋白酶裂解的流感病毒 HA 蛋白质,提高了流感病毒增殖滴度^[16]。在人肺变型病毒(HMPV)的增殖宿主 Vero 细胞中重组表达 TMPRSS2 蛋白质可有效切割该病毒 F 蛋白质,实现该病毒的高效增殖^[17]。在冠状病毒(SARS-CoV)的增殖试验中发现,在受体细胞表面成功表达 TMPRSS2 蛋白质将有效酶解 SARS 病毒的 S 蛋白质,大大增加因该病毒感染而造成的合胞体的形成比例^[18]。在 PEDV 的增殖过程中也发现,宿主细胞重组表达 TMPRSS2 蛋白质同样增强了对病毒 Spike 蛋白质的裂解能力,进而增强了病毒感染宿主细胞及子代病毒粒子向胞外释放的比例^[19]。

在我们的试验中,利用 PEI 这种阳离子聚合物介导将人 TMPRSS2 蛋白质表达载体悬浮转染至母本 MDCK-Sus 细胞中,从而获得了重组 MDCK-Sus-TM-PRSS2 细胞。该重组细胞可以在不添加 TPCK 处理的胰蛋白酶条件下连续盲传适应 6 株 H9 亚型禽流感病毒,有效增殖获得子代禽流感病毒。且在盲传代次较高的情况下,仍然可以正常完成病毒的增殖过程,病毒增殖适应良好,表现出较高的 HA 效价和半数组织感染滴度。而在对照母本 MDCK-Sus 细胞中,病毒的增殖适应随盲传代次提高而逐渐下降,这可能是由 TPCK 处理的胰蛋白酶积累,从而影响宿主细胞生理状态,也可能与子代病毒粒子中非完整病毒粒子或非感染性病毒粒子的比例上升有关,具体机理仍然有待研究。

此外本试验中获得的重组细胞株既能够稳定表达 TMPRSS2 蛋白质,同时也具有与母本细胞一致的单细胞悬浮生长能力,在生物反应器中获得较高的细胞培养密度,为日后大规模悬浮培养禽流感疫苗提供了一株良好的备选宿主细胞。

参考文献:

- [1] PAN S C, KUNG H C, KAO T M, et al. The Madin-Darby canine kidney cell culture derived influenza A/H5N1 vaccine: a phase I trial in Taiwan [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2013, 46(6): 448-455.
- [2] LOMBARDO T, DOTTI S, RENZI S, et al. Susceptibility of different cell lines to Avian and Swine influenza viruses [J]. J Virol Methods, 2012, 185(1): 82-88.
- [3] HU W, ZHANG H, HAN Q, et al. A vero-cell-adapted vaccine donor strain of influenza A virus generated by serial passages [J]. Vaccine, 2015, 33(2): 374-381.
- [4] SIDORENKO Y and REICHL U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells [J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 88(1): 1-14.
- [5] SPACKMAN E and KILLIAN M L. Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1161: 125-140.
- [6] KANDEIL A, BAGATO O, ZARAKET H, et al. Proteolytic enzymes in embryonated chicken eggs sustain the replication of egg-grown low-pathogenicity avian influenza viruses in cells in the absence of exogenous proteases [J]. J Virol Methods, 2014, 202: 28-33.
- [7] ZHOU F, ZHOU J, MA L, et al. High-yield production of a stable vero cell-based vaccine candidate against the highly pathogenic avian influenza virus H5N1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(4): 850-854.
- [8] VAN WIELINK R, KANT-EENBERGEN H C, HARMSSEN M M, et al. Adaptation of a Madin-Darby canine kidney cell line to suspension growth in serum-free media and comparison of its ability to produce avian influenza virus to Vero and BHK21 cell lines [J]. J Virol Methods, 2011, 171(1): 53-60.
- [9] TSENG Y F, HU A Y, HUANG M L, et al. Adaptation of high-growth influenza H5N1 vaccine virus in Vero cells: implications for pandemic preparedness [J]. Plos One, 2011, 6(10): e24057.
- [10] AO Z, PATEL A, TRAN K, et al. Characterization of a trypsin-dependent avian influenza H5N1-pseudotyped HIV vector system for high throughput screening of inhibitory molecules [J]. Antiviral Res, 2008, 79(1): 12-18.
- [11] BERTRAM S, GLOWACKA I, STEFFEN I, et al. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin [J]. Rev Med Virol, 2010, 20(5): 298-310.
- [12] MATSUYAMA S. Protease-dependent cell entry mechanism of coronaviruses [J]. Uirusu, 2011, 61(1): 109-116.
- [13] BOTTCHE E, FREUER C, STEINMETZER T, et al. MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition [J]. Vaccine, 2009, 27(45): 6324-6329.
- [14] BARON J, TARNOW C, MAYOLI-NUSSLE D, et al. Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses [J]. J Virol, 2013, 87(3): 1811-1820.
- [15] FENG L, GUO M, ZHANG S, et al. Improvement in the suspension-culture production of recombinant adeno-associated virus-LacZ in HEK-293 cells using polyethyleneimine-DNA complexes in combination with hypothermic treatment [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2008, 50(2): 121-132.
- [16] BOTTCHE-FRIEBERTSHAUSER E, FREUER C, SIELAFF F, et al. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors [J]. J Virol, 2010, 84(11): 5605-5614.
- [17] SHIROGANE Y, TAKEDA M, IWASAKI M, et al. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2 [J]. J Virol, 2008, 82(17): 8942-8946.
- [18] MATSUYAMA S, NAGATA N, SHIRATO K, et al. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2 [J]. J Virol, 2010, 84(24): 12658-12664.
- [19] SHIRATO K, MATSUYAMA S, UJIKE M, et al. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells [J]. J Virol, 2011, 85(15): 7872-7880.

(责任编辑:袁 伟)