

不同种属细胞系感染 HCoV-OC43 VR1558 株的病变效应与复制动力学

吴依依¹, 刘冠雅², 高尚卿¹, 刘士元², 孙洁伟¹, 王梦微¹, 黄保英^{1*},
谭文杰^{1,2*}

1 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 国家卫生健康委员会生物安全重点实验室, 北京

2 包头医学院 公共卫生学院, 内蒙古 包头

吴依依, 刘冠雅, 高尚卿, 刘士元, 孙洁伟, 王梦微, 黄保英, 谭文杰. 不同种属细胞系感染 HCoV-OC43 VR1558 株的病变效应与复制动力学[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3136-3149.

WU Yiyi, LIU Guanya, GAO Shangqing, LIU Shiyuan, SUN Jiewei, WANG Mengwei, HUANG Baoying, TAN Wenjie. Cytopathic effects and replication kinetics of HCoV-OC43 VR1558 strain in cell lines derived from different species[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 3136-3149.

摘要: 【目的】探讨 HCoV-OC43 VR1558 株在不同种属细胞系中的致细胞病变效应与病毒复制增殖特征。【方法】选择来自人源(MRC-5、HRT-18、Huh7、Huh7.5、RD、HeLa)、非人灵长动物(LLC-MK2、Vero)和啮齿类动物(17Cl-1、Mv.1Lu、BHK-21、BHK-21-APN、Neuro 2a)的 13 种细胞系, 将 HCoV-OC43 VR1558 株感染上述细胞系, 分别于感染后连续观察细胞病变效应(cytopathic effects, CPE), 同时每天收集病毒感染的细胞与上清, 通过实时定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)监测病毒 RNA 核酸拷贝数变化, 通过病毒半数组织培养感染剂量(tissue culture infectious dose 50%, TCID₅₀)测定具有感染能力的活病毒载量, 绘制病毒复制动力学曲线。【结果】HCoV-OC43 VR1558 株感染上述不同种属来源的 13 种细胞系后均能观察到 CPE, 主要表现为细胞聚集、皱缩、变圆与脱落等特征; 其中, MRC-5、Mv.1Lu、HeLa 及 17Cl-1 4 株细胞 CPE 出现较快, 感染后 72 h 内即可观察到明显的细胞病变, 其他细胞直至感染后 120 h 才能观察到明显的 CPE, 且 HRT-18 与 Huh7.5 的 CPE 最轻。RT-qPCR 结果表明, 病毒感染后的 24 h 内核酸拷贝数上升最为明显, 但达到高峰期的时间与核酸拷贝数不同; 其中, 感染 Huh7.5 细胞后 24 h 达到高峰(10^7 copies/mL); 感染 17Cl-1、BHK-21-APN、Mv.1Lu、BHK-21 细胞后 48 h 到达高峰(10^7 – 10^9 copies/mL); 感染 MRC-5、LLC-MK2、Neuro 2a、

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2304100, 2021YFA1201003)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2304100, 2021YFA1201003).

*Corresponding authors. E-mail: TAN Wenjie, tanwj@ivdc.chinacdc.cn; HUANG Baoying, huangby@ivdc.chinacdc.cn

Received: 2025-01-08; Accepted: 2025-03-10; Published online: 2025-05-23

Vero 细胞后 72 h 达到复制高峰(10^6 – 10^9 copies/mL); 而感染 HRT-18、HeLa、Huh7 以及 RD 细胞后的病毒拷贝数在 96 h 后才达到高峰(10^8 – 10^9 copies/mL)。TCID₅₀检测结果显示, 病毒感染 24 h 内快速增殖, 但达到高峰期的时间与滴度不同; 感染 BHK-21-APN 细胞后 48 h 达高峰(2.68×10^7 TCID₅₀/mL); BHK-21、Neuro 2a 在感染后 72 h 达峰值(10^6 – 10^7 TCID₅₀/mL), 而 MRC-5、17Cl-1、HeLa、Huh7、Huh7.5、Mv.1Lu、LLC-MK2 及 RD 细胞于感染后 96 h 达到滴度峰值(10^6 – 10^8 TCID₅₀/mL), Vero 细胞至感染后 120 h 到达峰值(10^5 TCID₅₀/mL), 而 HRT-18 细胞则在感染后 144 h 达到峰值(10^8 TCID₅₀/mL)。【结论】HCoV-OC43 VR1558 株具有较广泛的细胞感染谱, 病毒感染不同种属来源 13 株细胞系后均能在 24 h 内快速复制增殖, 但达到高峰期的时间不同。最高感染滴度可达到 10^8 TCID₅₀/mL (在 MRC-5 和 HRT-18 细胞)。该研究为深入开展人冠状病毒 OC43 的复制特征、感染致病机制研究及抗病毒药物筛选评价提供参考。

关键词: 人冠状病毒 OC43; VR1558 株; 细胞病变效应; 核酸拷贝数; 半数组织培养感染剂

Cytopathic effects and replication kinetics of HCoV-OC43 VR1558 strain in cell lines derived from different species

WU Yiyi¹, LIU Guanya², GAO Shangqing¹, LIU Shiyuan², SUN Jiewei¹, WANG Mengwei¹, HUANG Baoying^{1*}, TAN Wenjie^{1,2*}

1 National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, NHC Key Laboratory of Biosafety, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

2 School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia, China

Abstract: [Objective] To study the cytopathic effects (CPE) and replication characteristics of HCoV-OC43 VR1558 strain in cell lines derived from different species. **[Methods]** Thirteen cell lines from humans (MRC-5, HRT-18, Huh7, Huh7.5, RD, and HeLa), non-human primates (LLC-MK2 and Vero), and rodents (17Cl-1, Mv.1Lu, BHK-21, BHK-21-APN, and Neuro 2a) were selected and infected with HCoV-OC43 VR1558 strain. CPE were observed for several consecutive days. Virus-infected cells and supernatants were collected daily. RT-qPCR was conducted to monitor the changes in viral RNA copy number. The load of viruses with infectious ability was determined based on the tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀), and the kinetic curves of viral replication in different cell lines were established. **[Results]** Following infection with HCoV-OC43 VR1558 strain, CPE were observed in all the 13 cell lines. CPE primarily manifested as cell aggregation, shrinkage, rounding, and detachment. CPE appeared early in MRC-5, Mv.1Lu, HeLa, and 17Cl-1 cells, being noticeable within 72 h post-infection (hpi). The virus induced CPE in other cell lines after 120 hpi, and CPE were the mildest in HRT-18 and Huh7.5 cells. RT-qPCR results indicated that the viral RNA copy number increased most significantly within 24 hpi, although the time to reach the peak and the peak copy number varied among cell lines. Specifically, the RNA

copy number in Huh7.5 cells reached the peak (10^7 copies/mL) at 24 hpi, and that in 17Cl-1, BHK-21-APN, Mv.1Lu, and BHK-21 cells reached the peaks (10^7 to 10^9 copies/mL) at 48 hpi. In MRC-5, LLC-MK2, Neuro 2a, and Vero cells, the replication peaks (10^6 to 10^9 copies/mL) occurred at 72 hpi. In HRT-18, HeLa, Huh7, and RD cells, the viral RNA copy number peaked after 96 hpi, reaching 10^8 to 10^9 copies/mL. TCID₅₀ assay results demonstrated rapid viral proliferation within 24 hpi, while the time to reach the peak titer and the peak titers varied. The peak titer (2.68×10^7 TCID₅₀/mL) in BHK-21-APN cells was observed at 48 hpi. In BHK-21 and Neuro 2a cells, the peak titers (10^6 to 10^7 TCID₅₀/mL) were observed at 72 hpi. In MRC-5, 17Cl-1, HeLa, Huh7, Huh7.5, Mv.1Lu, LLC-MK2, and RD cells, the peak titers (10^6 to 10^8 TCID₅₀/mL) were observed at 96 hpi. In Vero cells, the virus strain reached the peak titer (10^5 TCID₅₀/mL) at 120 hpi, while the strain reached the peak titer of 10^8 TCID₅₀/mL in HRT-18 cells at 144 hpi. **[Conclusion]** HCoV-OC43 VR1558 strain exhibits a wide spectrum of cell tropism, demonstrating rapid replication and proliferation within 24 hpi across 13 cell lines derived from various species. However, the time to reach the replication peak varied among different cell lines. The highest viral titer achieved was 10^8 TCID₅₀/mL, observed in MRC-5 and HRT-18 cells. This study provides experimental reference for further investigation of the replication characteristics, infection mechanism, and pathogenicity of HCoV-OC43, as well as for the screening and evaluation of antiviral drugs.

Keywords: human coronavirus OC43; VR1558 strain; cytopathic effects; nucleic acid copy number; tissue culture infectious dose 50%

人冠状病毒(human coronavirus, HCoV)作为一种重要的人兽共患病病原, 20 世纪以来已引发 3 次全球大流行, 是近年来备受关注的病原体^[1]。其中, 人冠状病毒 OC43 (human coronavirus OC43, HCoV-OC43)的人群检出率高, 是儿童呼吸道感染中最常见的冠状病毒, 甚至可引发免疫缺陷患者及婴幼儿重症感染, 并引发致死性脑炎, 具有重要的临床意义^[2-3]。鉴于 HCoV-OC43 与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)、严重急性呼吸综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)与中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)均为 β 属冠状病毒^[4], 但由于其低致病性, 可在生物安全二级实验室(biosafety level-2 laboratory, BSL-2)中操作, 已成为高致病性冠状病毒的重要模式病毒^[5-7]。

目前应用最为广泛的 HCoV-OC43 主要包括 ATCC 来源的 VR759 株与 VR1558 株, 推荐的培养细胞系为人直肠癌细胞(HRT-18 或 HCT-8)。VR759 株是 HCoV-OC43 的原型株, 在小鼠体内具有较高的致病力, 但在感染细胞中生长速度较慢且细胞病变不明显。申梁采用携带报告基因的 HCoV-OC43 VR759 重组病毒株进行了初步的敏感细胞系筛选, 发现幼年叙利亚地鼠肾细胞(BHK-21)、人直肠癌细胞(HRT-18)与人横纹肌肉瘤细胞(RD)均为 VR759 株敏感细胞系^[8], 小鼠神经细胞(Neuro 2a)也可感染 HCoV-OC43 VR759 株^[8-10]。与此相比, HCoV-OC43 VR1558 株是 VR759 株的组织细胞培养传代适应株, 两者在基因序列上存在差异^[11], 但由于其感染细胞后的病变效应较为明显, 已成为研究中常用的毒株^[12-13]。

细胞病变效应(cytopathic effects, CPE)是病毒感染后在宿主细胞中产生的形态学变化, 是

病毒感染和复制的重要指标^[14]；病毒的复制动力学是病毒在宿主细胞内感染和复制的过程，可以通过病毒核酸的增殖和活病毒的复制情况进行测定，能够反映病毒在特定宿主中的致病力等特性^[15]。已有多项研究报道了 HCoV-OC43 在不同细胞中的感染复制特性^[16-20]。例如，Schirtzinger 等采用人直肠癌细胞(HRT-18)、人胚肺细胞(MRC-5)与非洲绿猴肾细胞(Vero E6) 3 种细胞系探讨了 HCoV-OC43 作为 SARS-CoV-2 模式病毒在细胞病变及复制动力学方面的异同^[16]；Savoie 等采用人肝癌细胞(Huh7.5)、人直肠癌细胞(HRT-18)、MRC-5 与 Vero 细胞系研究了病毒的感染复制特性，并优化了病毒培养条件，确认了 33 °C 为最佳培养温度，采用 MRC-5 和 HRT-18 可获得高滴度 HCoV-OC43^[17]；Bracci 等^[18]采用人横纹肌肉瘤细胞(RD)、人胚肺细胞(MRC-5)、貂肺上皮细胞(Mv.1Lu)及恒河猴肾细胞(LLC-MK2)分析了 HCoV-OC43 感染细胞的病变特点，优化了病毒的空斑形成方法。然而，上述研究均来自不同的实验室，毒株传代次数存在差异、细胞来源各不相同、检测方法也不一致，难以直接用于平行比较。因此，HCoV-OC43 感染不同细胞的复制增殖速度、细胞病变程度以及在何种细胞中能获得较高病毒产量等问题尚不明确，仍需在同一研究体系中对 HCoV-OC43 VR1558 株在不同细胞中的感染特性进行系统的比较。

本研究选择 13 种不同种属与组织来源的细胞系，分别来源于人(MRC-5、HRT-18、Huh7、Huh7.5、RD、HeLa)、非人灵长类动物(LLC-MK2、Vero)、和啮齿类动物(17Cl-1、Mv.1Lu、BHK-21、BHK-21-APN、Neuro 2a)，分别代表了来自肺、肾、肝、肠、脾、脑组织的多种类型细胞。本研究系统分析了 HCoV-OC43 VR1558 株在不同细胞中的细胞病变效应与病毒感染复制特性，以期为深入开展 HCoV 的复制特征、

感染致病机制研究及抗病毒药物筛选评价提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

本研究所用的细胞均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心保存，使用含有 10% 胎牛血清(Omega 公司)的 DMEM 培养基(Gibco 公司)于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。其中，人恶性胚胎横纹肌肉瘤细胞(RD)、人宫颈癌细胞(HeLa)、幼年叙利亚地鼠肾细胞(BHK-21)、恒河猴肾细胞(LLC-MK2)均购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)；人肝癌细胞(Huh7.5)购自 Apath 公司，人肝癌细胞(Huh7)购自日本 JCRB 细胞保藏中心，貂肺上皮细胞(Mv.1Lu)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，小鼠脑神经瘤细胞(Neuro 2a)购自武汉普诺赛生命科技有限公司；小鼠脾脏成纤维细胞(17Cl-1)、人回盲肠癌细胞(HRT-18)、携带 APN 受体的仓鼠肾成纤维细胞(BHK-21-APN)均由广州医科大学赵金存教授惠赠；人胚肺细胞(MRC-5)与非洲绿猴肾细胞(Vero)均来自 ATCC，北京民海生物科技有限公司。HCoV-OC43 VR1558 株购自 ATCC，由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心保存。

1.2 HCoV-OC43 VR1558 株感染细胞

将 13 种细胞以 4×10^5 细胞/孔接种于 24 孔板，500 μ L/孔，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞培养至 80%–90% 汇合度后，吸弃培养基，将病毒按 MOI 为 0.01 的剂量接种至单层细胞中，33 °C 吸附 2 h。2 h 后，吸弃病毒液，换液为 500 μ L 含 2% FBS 的培养基，33 °C、5% CO₂ 条件下培养。将病毒吸附 2 h 后定义为 0 h，分别收获 24、48、72、96、120、144 h 的细胞与上清样本，冻存于 -80 °C。

1.3 细胞病变效应

HCoV-OC43 VR1558 株病毒感染后每隔 24 h 将细胞置于倒置显微镜(Olympus 公司)下观察。与未感染病毒的细胞对照组相比,若细胞出现皱缩、变圆、堆积、脱落等现象则判定为发生了细胞病变效应。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

采用全自动核酸提取仪(西安天隆科技有限公司)提取病毒 RNA。按照 HCoV-OC43 荧光定量 RT-qPCR 方法测定病毒核酸含量^[21],检测靶标为 N 基因,引物序列为 F (5'-GCTCAGGAAGG TCTGCTCC-3') 和 R (5'-TCCTGCACTAGAGG CTCTGC-3'),探针序列为 FAM TTCCAGATCT ACTTCGCGCACATCC-TAMRA。按照 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents 试剂盒(Thermo Fisher 公司)说明书配制反应体系。PCR 反应条件:45 °C 10 min; 95 °C 15 min, 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 共 40 个循环。每个样本设 3 个复孔,通过标准曲线 $C_T=33.616-3.404 \lg \text{copies}/\mu\text{L}$ 计算核酸拷贝数,每组实验重复 3 次。

1.5 半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)滴定

将 BHK-21 细胞以 2×10^4 个/100 μL 接种于 96 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育至 80%-90% 汇合度。病毒样本冻融 1 次后,使用无血清 DMEM 以 1:10 作为起始稀释度进行 10 倍比梯度稀释,共设置 8 个稀释度。将稀释好的病毒液以每孔 100 μL 接种至 96 孔板中,每个稀释度设 6 个复孔,并设置 100 μL 无血清 DMEM 作为阴性对照。将细胞培养板置于 33 °C 培养。每天观察细胞病变效应,于接种病毒后的第 6 天记录各稀释度出现细胞病变效应的孔数,根据 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。每组实验重复 3 次。

1.6 统计分析

采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行分析与作图。结果以 mean $\pm$ SD 的形式展示。多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组比较

采用 *t* 检验(Student's *t*-test)。以 $P < 0.05$ 作为统计学上具有显著性差异的标准。

2 结果与分析

2.1 HCoV-OC43 VR1558 株在 13 种细胞系中的细胞病变情况

为了探讨 HCoV-OC43 VR1558 株在 13 种细胞系中导致的细胞病变效应,本研究以 MOI 为 0.01 感染 13 种细胞系(17Cl-1、MRC-5、HRT-18、HeLa、Huh7、Huh7.5、BHK-21-APN、Mv.1Lu、BHK-21、LLC-MK2、RD、Vero、Neuro-2a),在 33 °C 条件下培养后,于不同时间点观察了细胞病变效应。

HCoV-OC43 VR1558 株感染 MRC-5、HeLa、17Cl-1 以及 Mv.1Lu 细胞系后,48 h 便可观察到明显的细胞病变,并于 72 h 后出现细胞变圆脱落等现象(图 1)。其中,HCoV-OC43 VR1558 株感染 MRC-5 后,24 h 便可观察到细胞表面出现聚集变圆现象,48 h 后细胞由细长纺锤形进一步肿胀变圆,72 h 后细胞变圆明显且伴随大量细胞脱落。HCoV-OC43 VR1558 株感染 17Cl-1 后,24 h 细胞病变不明显,48 h 后细胞出现轻微的肿胀变圆,72 h 后细胞出现明显的聚集、皱缩且发生脱落。HCoV-OC43 VR1558 株感染 HeLa 后,24 h 即出现较明显的细胞聚集与变圆现象,48 h 后聚集变圆的细胞数增加,72 h 后细胞皱缩现象加剧。HCoV-OC43 VR1558 株感染 Mv.1Lu 后,24 h 局部出现轻微的细胞聚集现象,48 h 后细胞聚集皱缩现象加剧,72 h 后细胞进一步聚集、变圆且发生脱落。

HCoV-OC43 VR1558 株感染 BHK-21 与 RD 细胞系后,72 h 可观察到轻微的细胞病变,且在 120 h 后进一步加剧;而 LLC-MK2 与 BHK-21-APN 在感染后 120 h 才观察到明显的细胞病变现象(图 2)。其中,BHK-21 细胞感染后出现肿胀、变亮,聚集在一起并呈葡萄串状浮于正常细胞之上,120 h 后病变加剧,且病变全过程

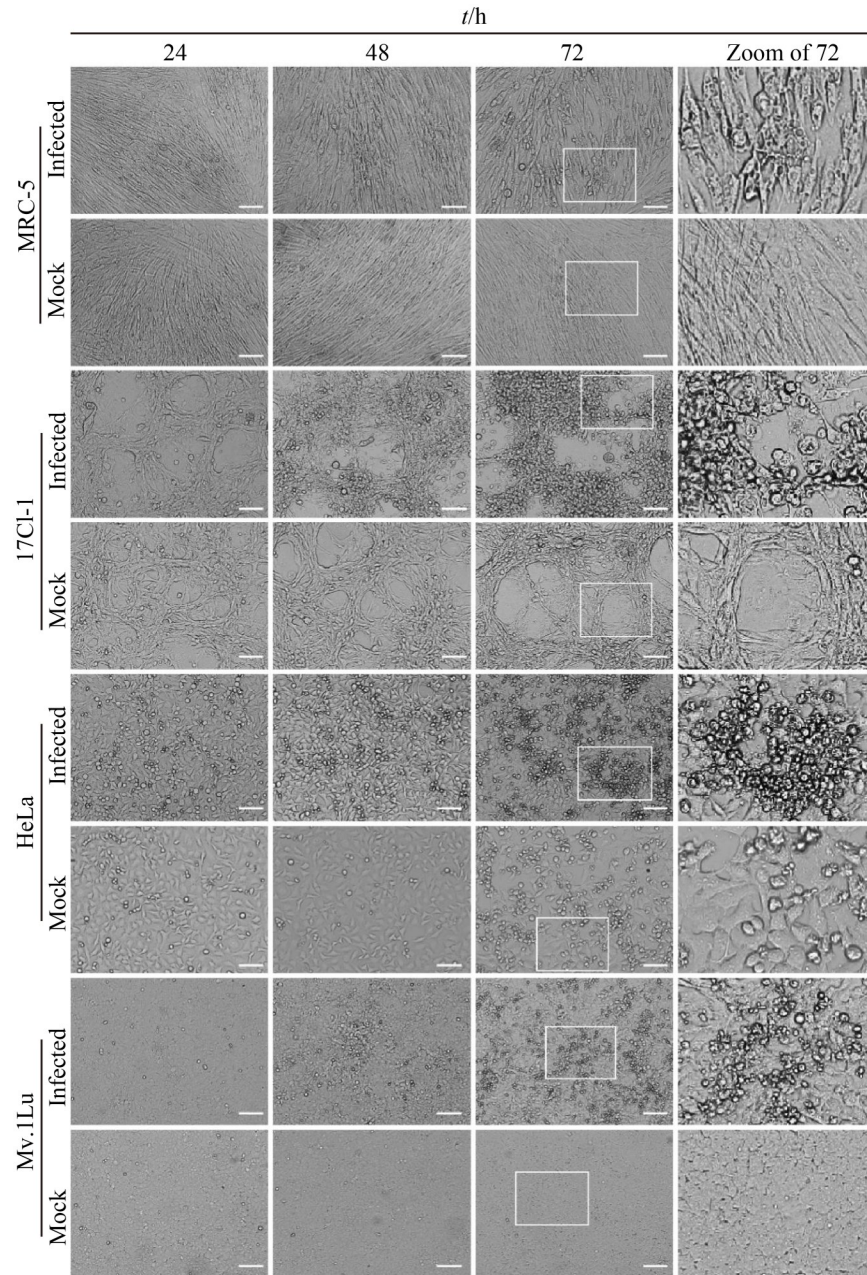


图1 HCoV-OC43 VR1558株感染4株细胞系后72 h可观察到的细胞病变。 MRC-5、17Cl-1、HeLa和Mv.1Lu细胞以 4×10^5 个细胞/孔的密度铺在24孔板上(第0天)。以0.01 MOI的HCoV-OC43 VR1558株感染细胞后,在33 °C培养144 h。每24 h在光学显微镜下观察细胞病变(10 $\times$)。比例尺为100 μ m。右侧为感染后72 h的CPE局部图。

Figure 1 Cytopathic effects (CPE) observed 72 hours post-infection (hpi) with HCoV-OC43 VR1558 strain in four cell lines. MRC-5, 17Cl-1, HeLa, and Mv. 1Lu cells were cultured in 24-well plates at a density of 4×10^5 cells/well (day 0). Cells were infected with HCoV-OC43 VR1558 strain at a multiplicity of infection of 0.01 and incubated at 33 °C for 144 h. CPE were observed daily under a light microscope (10 $\times$). The scale bar represents 100 μ m. The right panels show a zoomed view of CPE observed at 72 hpi.

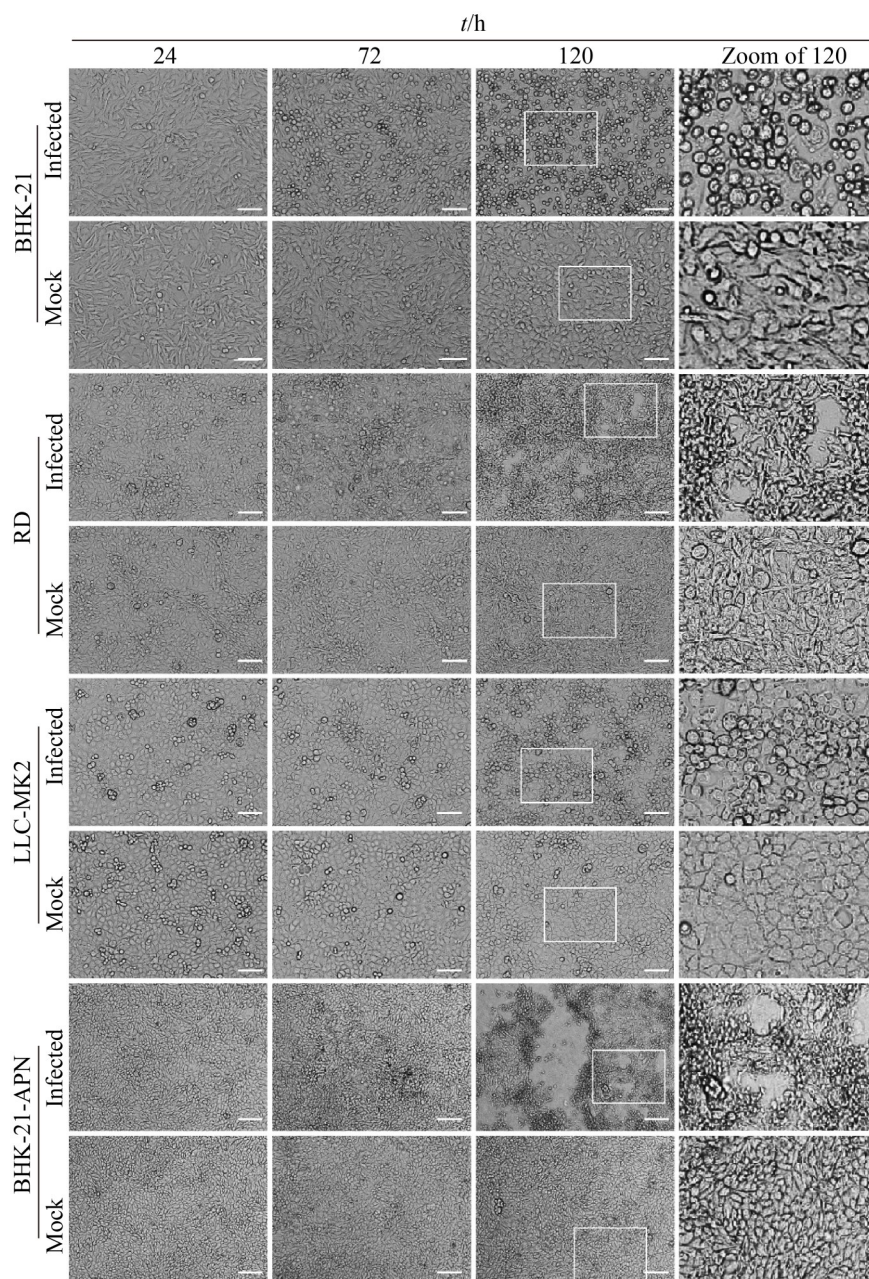


图2 HCoV-OC43 VR1558株感染4株细胞系后120 h可观察到的细胞病变。将BHK-21、RD、LLC-MK2和BHK-21-APN细胞以 4×10^5 个细胞/孔的密度铺在24孔板上(第0天)。以0.01 MOI的 HCoV-OC43 VR1558株感染细胞后, 在33 °C孵育144 h。每24 h在光学显微镜下观察细胞病变(10 $\times$)。比例尺为100 μ m。右侧图为感染后120 h的CPE局部图。

Figure 2 Cytopathic effects (CPE) observed 120 hours post-infection (hpi) with HCoV-OC43 VR1558 strain in four cell lines. BHK-21, RD, LLC-MK2, and BHK-21-APN were cultured in 24-well plates at a density of 4×10^5 cells/well (day 0). Cells were infected with HCoV-OC43 VR1558 strain at a multiplicity of infection of 0.01 and incubated at 33 °C for 144 h. CPE were observed daily under a light microscope (10 $\times$). The scale bar represents 100 μ m. The right panels show a zoomed view of CPE observed at 120 hpi.

未见细胞皱缩现象。RD 细胞在感染后 72 h 出现细胞变圆、变亮的现象, 并伴随部分细胞脱落, 120 h 后病变细胞皱缩脱落加剧, 并出现局部病灶脱落现象。LLC-MK2 细胞在感染后 120 h 观察到明显病变, 表现为细胞空泡化和轻微结块, 但未观察到细胞脱落现象。BHK-21-APN 细胞在感染 72 h 后出现皱缩, 并伴随部分死亡细胞堆叠, 直至 120 h 病变进一步加剧, 可见死亡细胞堆叠和大面积细胞脱落。

HCoV-OC43 VR1558 株感染 HRT-18、Vero、Neuro 2a、Huh7、Huh7.5 细胞后, 病变较为缓慢, 120 h 后才出现轻微的细胞病变(图 3)。HRT-18 细胞在感染后 72 h 仅观察到部分细胞皱缩, 直至 120 h 可观察到皱缩的细胞聚集并浮于单层细胞表面; Vero 细胞在病毒感染后 72 h 细胞形态表现为体积变小, 120 h 时病变加剧, 被感染的细胞皱缩堆积并形成局部病灶; Neuro 2a 细胞在病毒感染后 72 h 时可见病变细胞不规则皱缩并形成团, 120 h 时细胞团块数量进一步增加, 此外, 还能观察到相邻的细胞皱缩且有病变细胞脱落; Huh7 细胞在病毒感染后死亡细胞皱缩并形成细胞团块; Huh7.5 细胞感染后的病变情况并不明显, 镜下难以与正常细胞衰老相区分。

2.2 HCoV-OC43 VR1558 株在 13 株细胞系中的复制动力学

为探讨 HCoV-OC43 VR1558 株在 13 株细胞系中的复制动力学, 本研究以 MOI 为 0.01 的 HCoV-OC43 VR1558 株感染了 13 株细胞系, 通过基于 N 基因的 RT-qPCR 测定了核酸拷贝数的动态变化以了解基于病毒核酸水平的复制动力学; 通过病毒感染细胞后的 TCID₅₀ 滴度测定, 探讨了基于病毒感染活性的复制动力学, 并对病毒的快速增殖时间、达到复制高峰的时间与病毒载量进行了分析与比较(表 1)。

RT-qPCR 结果显示, HCoV-OC43 VR1558 株在感染 13 种细胞系后, 24–48 h 内均可观察

到病毒核酸的快速增长, 之后逐渐稳定进入平台期。其中, 17Cl-1、Huh7.5 在病毒感染后 24 h 核酸拷贝数快速增长并进入平台期, 17Cl-1 在感染后 48 h 达到峰值(6.52×10^9 copies/mL) (图 4A、表 1); 而 Huh7.5 细胞感染后 24 h 达到核酸复制高峰(1.78×10^7 copies/mL) (图 4B、表 1)。此外, HCoV-OC43 VR1558 株在感染 9 株细胞系(BHK-21、Mv.1Lu、BHK-21-APN、MRC-5、LLC-MK2、Neuro 2a、Vero、Huh7、RD)后 48 h 内核酸拷贝数快速增长。其中, 病毒感染 Mv.1Lu、BHK-21 和 BHK-21-APN 后均于 48 h 达到峰值, 在 BHK-21 和 Mv.1Lu 中峰值核酸拷贝数均可达到 10^9 copies/mL (图 4C、4D), 在 BHK-21-APN 中核酸拷贝数峰值仅为 1.97×10^7 copies/mL (图 4E、表 1)。在 MRC-5、LLC-MK2、Neuro 2a 和 Vero 中 72 h 达到峰值, 核酸拷贝数分别为 3.17×10^9 、 1.28×10^9 、 6.91×10^8 与 2.42×10^6 copies/mL (图 4F、4G)。感染 Huh7、RD、HRT-18 和 HeLa 后 96 h 达到复制峰值, 核酸拷贝数分别为 7.89×10^8 、 6.80×10^8 、 1.71×10^9 和 2.03×10^8 copies/mL (图 4J–4M), 且在感染 HRT-18 后的拷贝数峰值显著高于 HeLa 细胞。

TCID₅₀ 测定结果显示, HCoV-OC43 VR1558 株在感染 17Cl-1 和 Huh7.5 后 24 h 病毒迅速增殖, 96 h 达到峰值, 滴度分别为 3.90×10^7 TCID₅₀/mL 与 2.80×10^7 TCID₅₀/mL (图 4A、4B)。此外, 感染 BHK-21、BHK-21-APN、MRC-5、LLC-MK2、Vero、Huh7 及 RD 细胞后 48 h 快速增长, 感染 BHK-21 细胞于 72 h 达到病毒滴度峰值(1.25×10^7 TCID₅₀/mL) (图 4C、表 1), 而感染 BHK-21-APN 细胞后 48 h 达到滴度高峰(2.68×10^7 TCID₅₀/mL) (图 4E、表 1)。感染 MRC-5、LLC-MK2、Huh7 及 RD 后于 96 h 达到高峰, 其中, 感染 MRC-5 后的病毒滴度最高(2.99×10^8 TCID₅₀/mL) (图 4F), 比 LLC-MK2 (图 4G)、Huh7 (图 4J) 的峰值高约 10 倍, 比 RD (图

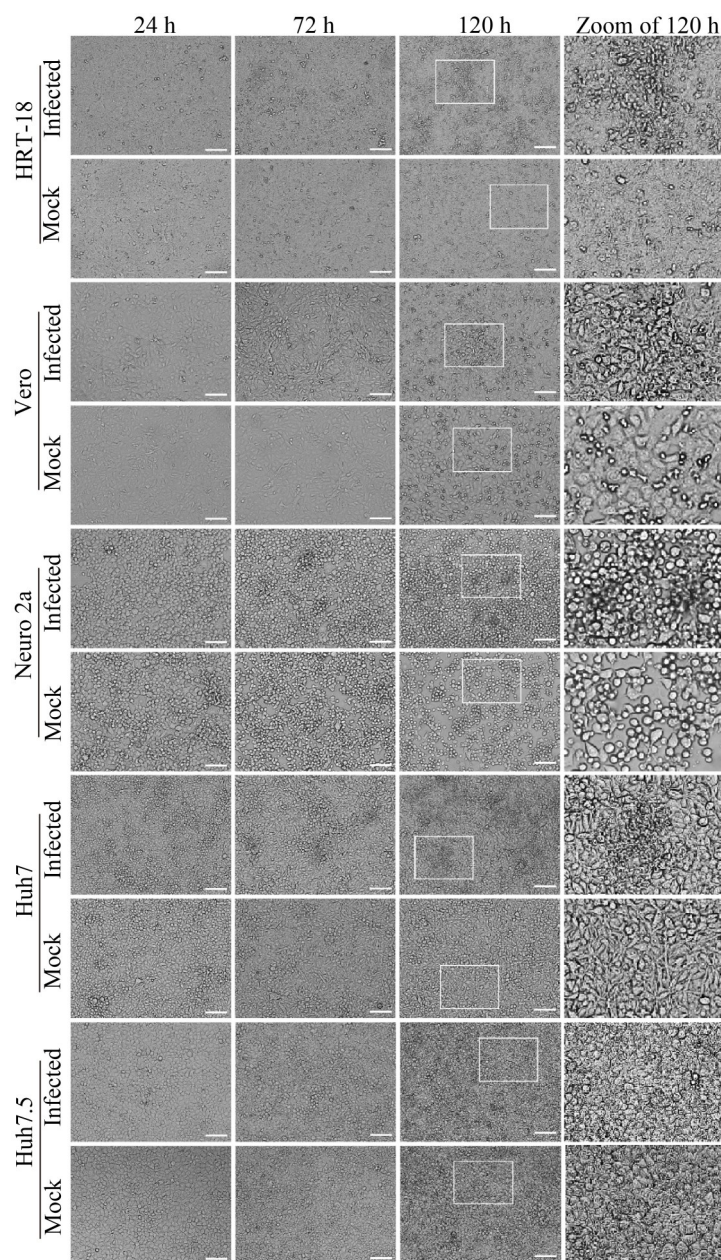


图3 HCoV-OC43 VR1558株感染5株细胞系后120 h可观察到轻微的细胞病变。 HRT-18、Vero、Neuro 2a、Huh7和Huh7.5细胞以 4×10^5 个细胞/孔的密度培养在24孔板上(第0天)。以0.01 MOI的HCoV-OC43 VR1558株感染细胞后,在33 °C孵育144 h。每24 h在光学显微镜下观察CPE,比例尺为100 μ m。右侧为感染后120 h的CPE局部图。

Figure 3 Mild cytopathic effects (CPE) observed 120 hours post-infection (hpi) with HCoV-OC43 VR1558 strain in five cell lines. HRT-18, Vero, Neuro 2a, Huh7, and Huh7.5 were cultured in 24-well plates at a density of 4×10^5 cells/well (day 0). Cells were infected with HCoV-OC43 VR1558 strain at a multiplicity of infection of 0.01 and incubated at 33 °C for 144 h. CPEs were observed daily under a light microscope (10 $\times$). The scale bar represents 100 μ m. The right panels show a zoomed view of CPE observed at 120 hpi.

表1 HCoV-OC43 VR1558株在13株细胞系中的感染特征

Table 1 Characteristics of HCoV-OC43 VR1558 strain infected 13 cell lines

细胞系 Cell lines	来源 Source	形态 Morphology	RNA		TCID ₅₀		CPE
			Peak (copies/mL)	t/h	Peak (TCID ₅₀ /mL)	t/h	
MRC-5	人胚肺细胞 Human embryo lung cell	成纤维细胞样 Fibroblast like	3.17×10 ⁹	72	2.99×10 ⁸	96	变圆, 聚集 Rounding, sloughing
HRT-18	人直肠癌细胞 Human rectal cancer cells	上皮细胞样 Epithelial like	1.71×10 ⁹	96	2.30×10 ⁸	144	皱缩, 堆积 Shrinking, stacking
17Cl-1	小鼠脾脏细胞 Mouse spleen cells	纤维母细胞样 Fibroblast like	6.52×10 ⁹	48	3.90×10 ⁷	96	变圆, 皱缩, 聚集 Rounding, shrinking, stacking
HeLa	人宫颈癌细胞 Human cervical cancer cells	上皮细胞样 Epithelial like	2.03×10 ⁸	96	3.67×10 ⁷	96	变圆, 皱缩, 聚集 Rounding, shrinking, stacking
Huh7	人肝癌细胞 Human hepatoma cells	上皮细胞样 Epithelial like	7.89×10 ⁸	96	3.03×10 ⁷	96	聚集, 堆积 Shrinking, clumping
Huh7.5	人肝癌细胞 Human hepatoma cells	上皮细胞样 Epithelial like	1.78×10 ⁷	24	2.80×10 ⁷	96	不明显 Not obvious
BHK-21-APN	幼年叙利亚地鼠肾细胞 Baby hamster Syrian kidney	成纤维细胞样 Fibroblast like	1.97×10 ⁷	48	2.68×10 ⁷	48	聚集, 脱落 Shrinking, sloughing
Mv.1Lu	貂肺上皮细胞 Mink lung epithelial cells	成纤维细胞样 Epithelial like	1.36×10 ⁹	48	1.78×10 ⁷	96	聚集, 脱落 Shrinking, sloughing
BHK-21	幼年叙利亚地鼠肾细胞 Baby hamster Syrian kidney	成纤维细胞样 Fibroblast like	2.14×10 ⁹	48	1.25×10 ⁷	72	变圆 Rounding
LLC-MK2	恒河猴肾细胞 Rhesus monkey kidney cells	成纤维细胞样 Epithelial like	1.28×10 ⁹	72	1.05×10 ⁷	96	空泡, 堆积 Vacuolization, clumping
Neuro 2a	小鼠神经元细胞 Mouse neuroma cells	神经元细胞 Neural cell like	6.91×10 ⁸	72	6.50×10 ⁶	72	堆积, 脱落 Clumping, sloughing
RD	人横纹肌肉瘤细胞 Human rhabdomyosarcoma cells	上皮细胞样 Epithelial like	6.80×10 ⁸	96	3.90×10 ⁶	96	变圆, 皱缩, 脱落 Rounding, shrinking, sloughing
Vero	非洲绿猴肾细胞 Africa monkey kidney cell	上皮细胞样 Epithelial like	2.42×10 ⁶	72	9.00×10 ⁵	120	皱缩, 聚集 Shrinking, stacking

4K)的峰值高约 100 倍。病毒感染 Vero 后 48 h 进入稳定增长期, 至 120 h 达到平台 (9.00×10⁵ TCID₅₀/mL) (图 4I)。TCID₅₀ 结果显示, 感染 Mv.1Lu、Neuro 2a 的增殖趋势与核酸拷贝数趋势略有不同, Mv.1Lu 在病毒感染 72 h 后进入增殖平台期, 于 96 h 达到滴度峰值 (1.78×10⁷ TCID₅₀/mL); 病毒感染 Neuro 2a 后快

速增长至 72 h 后滴度不再明显变化, 始终保持在 6.50×10⁶ TCID₅₀/mL 左右 (图 4D、4H)。HCoV-OC43 VR1558 株病毒感染 HRT-18、HeLa 后与核酸拷贝数复制趋势一致, 感染 HRT-18 后 144 h 到达峰值 (2.30×10⁸ TCID₅₀/mL), 在 HeLa 中于 96 h 到达峰值 (3.67×10⁷ TCID₅₀/mL) (图 4L、4M)。

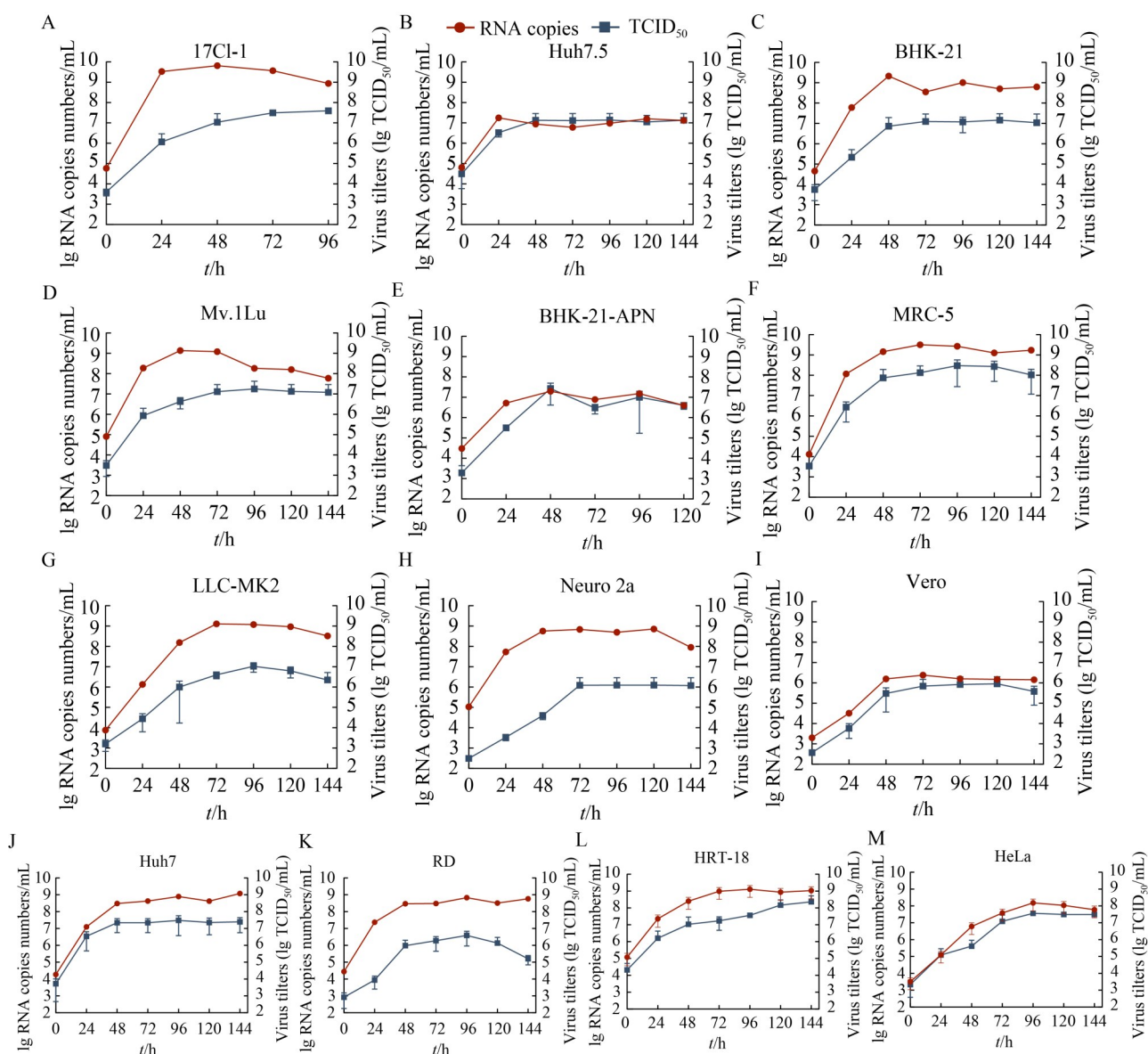


图4 HCoV-OC43 VR1558株在13种细胞系中的复制动力学

Figure 4 Replication kinetics of HCoV-OC43 VR1558 strain in 13 cell lines. A–B: Viral RNA copies increasing rapidly within 24 hours in 17Cl-1 (A) and Huh7.5 (B). Sample collection for 17Cl-1 continued until 96 hours post-infection (hpi) as the cells died. C–K: Virus RNA copies increasing significantly in 48 hours. The RNA replication kinetics in BHK-21 (C), Mv.1Lu (D), and BHK-21-APN (E), peaking at 48 hpi. Sample collection for BHK-21-APN infected cells continued until 120 hpi as the cells died. F–I represented the replication kinetics for MRC-5 (F), LLC-MK2 (G), Neuro 2a (H), and Vero (I), respectively. RNA copies peaked at 72 hpi. J–K represented the replication kinetics of HCoV-OC43 VR1558 strain infected Huh7 and RD, respectively. RNA copies peaked at 96 hpi. L and M: Replication kinetics of the virus in HRT-18 and HeLa, showing virus RNA copies increasing slowly within 96 hours. Circular symbols represent the RNA copies, while square symbols represent the TCID₅₀ titration results.

3 讨论与结论

冠状病毒是一类具有重要公共卫生意义的人类传染病病原, HCoV-OC43 与高致病性的冠状病毒 SARS-CoV-2、SARS-CoV 及 MERS-CoV 同为 β 冠状病毒属。自 1967 年被发现以来, HCoV-OC43 在全球范围内广泛存在, 是常见的季节性冠状病毒。由于 HCoV-OC43 在已知的人类冠状病毒中的检出率高但致病力较弱, 常作为高致病性冠状病毒研究的模式病毒。然而, 随着 HCoV-OC43 感染引发致死性肺炎和脑炎相关病例的出现, 以及新的临床分离株的鉴定^[22-23], 其潜在威胁不容忽视。系统开展 HCoV-OC43 不同毒株在多种类型细胞模型中的感染复制特性研究, 将为深入了解该病毒的致病力提供重要依据。本研究初步探讨了 HCoV-OC43 VR1558 株对 13 种细胞系的感染特性, 并系统描述了病毒感染上述细胞导致的细胞病变效应、病毒核酸拷贝数变化及感染性病毒载量变化, 为深入开展 HCoV-OC43 感染致病特性研究提供了参考。

在细胞系的选择方面, 本研究对 HCoV-OC43 VR1558 株在 3 种不同种属(人、猴、鼠)来源的 13 种细胞中的感染特点与复制特性进行了研究。研究结果发现, HCoV-OC43 VR1558 株均可感染上述 13 种细胞系, 虽然在不同细胞系中表现出的细胞病变效应不同、病毒达到复制高峰期的病毒载量不同, 但均能出现病毒核酸拷贝数的增加和感染性病毒颗粒的增殖, 说明该病毒的组织细胞感染谱较宽泛, 为进一步开展该病毒多组织与多物种的感染致病特性提供了依据。值得一提的是, HCoV-OC43 虽然在人群中主要引发呼吸道感染, 但其具有一定的嗜神经性, 可导致人或小鼠神经元的损伤和死亡^[24]。虽然有研究报道了 HCoV-OC43 VR759 株对小鼠神经细胞 Neuro 2a 的感染^[8-10], 但尚未见 HCoV-OC43 VR1558 株感染神经细胞后的系统报道。本研究对 HCoV-OC43 VR1558 株感染 Neuro 2a

细胞后的感染特性与复制动力学的数据, 为深入开展 HCoV-OC43 的神经感染特性研究及抗神经系统感染药物筛选评价提供了参考。

HCoV-OC43 VR1558 株以 MOI 为 0.01 剂量感染 13 种细胞后, 细胞病变出现的时间与形态与已有研究基本一致, 主要表现为: MRC-5、HeLa、17Cl-1 以及 Mv.1Lu 4 株细胞可在感染早期观察到较为明显的细胞病变(72 h), 而 BHK-21 与 RD 细胞虽然 72 h 能观察到 CPE, 但 120 h 时才更为明显, LLC-MK2 与 BHK-21-APN 细胞则需更长时间(120 h)才能观察到细胞病变, 且 HRT-18、Vero、Neuro 2a、Huh7、Huh7.5 细胞感染的病变最慢且最轻(120 h)。然而, 研究报道病毒感染 Huh7.5 后会导致细胞脱落^[17], 而本研究中 Huh7.5 在 HCoV-OC43 VR1558 株感染后 120 h 仍未观察到细胞病变, 可能与不同研究体系的细胞来源、感染剂量及毒株不同有关。值得注意的是, HCoV-OC43 VR1558 株虽然在大多数细胞中能引起一定程度的细胞病变效应, 但病变的程度各异, 出现的时间较长, 提示研究者在进行 HCoV-OC43 感染致病特性研究时应同时采用多种指标, 且还应探索更加高效快捷的病毒滴度测定方法, 以进一步提高研究的通量与效率。

本研究对 HCoV-OC43 VR1558 株感染 13 种细胞后的感染活性进行了分析。病毒感染后平台期的 TCID₅₀ 结果表明, HCoV-OC43 VR1558 株感染 MRC-5 与 HRT-18 细胞后的病毒滴度较高(10^8 TCID₅₀/mL), 所需时间分别为 4 d (96 h) 与 6 d (144 h), 而在 Neuro 2a、RD 与 Vero 细胞中的病毒滴度最低(10^5 – 10^6 TCID₅₀/mL); 在其他 10 种细胞系中的病毒滴度均能达到 10^7 TCID₅₀/mL, 所需时间分别为 3–4 d。该结果提示, 选择 MRC-5 与 HRT-18 细胞更有助于获得更高感染活性的病毒, 这与前期研究结果一致。此外, 本研究证明了 HCoV-OC43 VR1558 株也能感染 17Cl-1 细胞系, 感染后 48 h 便可形成明显的细胞病变, 且 4 d (96 h) 后即可

达到增殖高峰(3.90×10^7 TCID₅₀/mL), 表现出了较快的复制能力、明显的细胞病变和较高的病毒滴度。考虑到 17Cl-1 是一种来源于小鼠胸腺的纤维母细胞系, 在病毒学研究中被广泛用于培养小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)等鼠冠状病毒^[25], 本研究不仅为 HCoV-OC43 的生物学特性研究提供了一个新的候选细胞系, 也为在同一体系中开展抗 HCoV-OC43 与 MHV 等冠状病毒的广谱抗病毒药物筛选评价研究提供了又一平台。

本研究仍存在一定的局限性。例如, 不同毒株与不同感染剂量对病毒的复制动力学有一定的影响, 本研究采用 MOI 为 0.01 感染剂量开展了 HCoV-OC43 VR1558 株的感染复制特征的研究, 尚需更多毒株与不同剂量感染条件下的细胞病变与复制动力学研究与比较; 同时, 虽然有研究发现 33 °C 是 HCoV-OC43 的最佳培养温度^[17], 但也有研究发现部分细胞中 37 °C 更有利于病毒空斑形成^[20], 因此仍有待分析 37 °C 条件下病毒在不同细胞系中的感染特点; 此外, 虽然本研究选用了来源人与动物的 13 种细胞系, 涵盖了肺、肾、肝、肠、脾、脑组织等多种组织来源, 但仍需采用更多物种与组织来源的细胞探讨 HCoV-OC43 的感染谱。

综上所述, 本文在同一体系中对 HCoV-OC43 VR1558 株在 13 种细胞系中引起的细胞病变特征与复制动力学开展了系统研究, 明确了 HCoV-OC43 VR1558 株在上述细胞中的感染复制特性、证实了其具有较广的细胞感染谱, 为后续研究 HCoV-OC43 的生物学特性、抗病毒药物筛选及感染致病机制提供了参考。

作者贡献声明

吴依依: 方案设计、实验操作、数据管理、方法设计、初稿写作; 刘冠雅: 提供材料、实验操作; 高尚卿: 实验操作、数据管理; 刘士元: 初稿写作, 提供材料; 孙洁伟: 初稿写作, 数据管理; 王梦微: 实验操作、提供材料; 黄

保英: 方案设计、数据管理、提供资源、审查和编辑写作; 谭文杰: 方案设计、项目管理、提供资源、监督指导、审查和编辑写作。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] LAWRENCE P, HEUNG M, NAVE J, HENKEL C, ESCUDERO-PÉREZ B. The natural virome and pandemic potential: disease X[J]. *Current Opinion in Virology*, 2023, 63: 101377.
 - [2] NILSSON A, EDNER N, ALBERT J, TERNHAG A. Fatal encephalitis associated with coronavirus OC43 in an immunocompromised child[J]. *Infectious Diseases*, 2020, 52(6): 419-422.
 - [3] ZENG ZQ, CHEN DH, TAN WP, QIU SY, XU D, LIANG HX, CHEN MX, LI X, LIN ZS, LIU WK, ZHOU R. Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018, 37(2): 363-369.
 - [4] LU RJ, ZHAO X, LI J, NIU PH, YANG B, WU HL, WANG WL, SONG H, HUANG BY, ZHU N, BI YH, MA XJ, ZHAN FX, WANG L, HU T, ZHOU H, HU ZH, ZHOU WM, ZHAO L, CHEN J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
 - [5] HU YM, MA CL, SZETO T, HURST B, TARBET B, WANG J. Boceprevir, calpain inhibitors II and XII, and GC-376 have broad-spectrum antiviral activity against coronaviruses[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2021, 7(3): 586-597.
 - [6] Le COUPANEC A, DESFORGES M, KAUFER B, DUBEAU P, CÔTÉ M, TALBOT PJ. Potential differences in cleavage of the S protein and type-1 interferon together control human coronavirus infection, propagation, and neuropathology within the central nervous system[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(10): e00140-21.
 - [7] HU YM, MA CL, WANG J. Cytopathic effect assay and plaque assay to evaluate *in vitro* activity of antiviral compounds against human coronaviruses 229E, OC43, and NL63[J]. *Bio-protocol*, 2022, 12(3): e4314.
 - [8] 申梁. 基于人冠状病毒 OC43 重组病毒抗病毒高通量筛选平台的建立及初步应用[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心博士学位论文, 2017.
- SHEN L. Development and application of a high-throughput antiviral screening platform based on recombination recombinant human coronavirus OC43

- p>expressing the luciferase reporter gene[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2017 (in Chinese).
- [9] ST-JEAN JR, DESFORGES M, ALMAZÁN F, JACOMY H, ENJUANES L, TALBOT PJ. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(7): 3670-3674.
 - [10] 李芳. 人冠状病毒 OC43 引起致死性脑炎致病机制研究[D]. 广州: 广州医科大学博士学位论文, 2023.
LI F. Pathogenesis of fatal encephalitis caused by human coronavirus OC43[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of Guangzhou Medical University, 2023 (in Chinese).
 - [11] YE F, WANG N, GUAN QG, WANG MW, SUN JW, ZHAI DS, HUANG BY, ZHAO Y, TAN WJ. Rapid generation and characterization of recombinant HCoV-OC43-VR1558 infectious clones expressing reporter *Renilla luciferase*[J]. *Biosafety and Health*, 2024, 6(6): 350-360.
 - [12] XIE PF, FANG Y, BALOCH Z, YU HH, ZHAO ZY, LI RQ, ZHANG TT, LI RF, ZHAO JC, YANG ZF, DONG SW, XIA XS. A mouse-adapted model of HCoV-OC43 and its usage to the evaluation of antiviral drugs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 845269.
 - [13] ADAIR A, TAN LL, FENG J, GIRKIN J, BRYANT N, WANG MY, MORDANT F, CHAN LJ, BARTLETT NW, SUBBARAO K, PYMM P, THAM WH. Human coronavirus OC43 nanobody neutralizes virus and protects mice from infection[J]. *Journal of Virology*, 2024, 98(6): e0053124.
 - [14] PELLETT PE, MITRA S, HOLLAND TC. Basics of virology[J]. *Handbook of Clinical Neurology*, 2014, 123: 45-66.
 - [15] NIKIFORUK AM, LEUNG A, COOK BWM, COURT DA, KOBASA D, THERIAULT SS. Rapid one-step construction of a Middle East respiratory syndrome (MERS-CoV) infectious clone system by homologous recombination[J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 236: 178-183.
 - [16] SCHIRTZINGER EE, KIM Y, DAVIS AS. Improving human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) research comparability in studies using HCoV-OC43 as a surrogate for SARS-CoV-2[J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 299: 114317.
 - [17] SAVOIE C, LIPPÉ R. Optimizing human coronavirus OC43 growth and titration[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13721.
 - [18] BRACCI N, PAN HC, LEHMAN C, KEHN-HALL K, LIN SC. Improved plaque assay for human coronaviruses 229E and OC43[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e10639.
 - [19] MAHARJAN S, KANG M, KIM J, KIM D, PARK S, KIM M, BAEK K, LEE Y, KWON HJ. Apoptosis enhances the replication of human coronavirus OC43[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2199.
 - [20] NIYOMDECHA N, BOONARKART C, THONGON S, AUEWARAKUL P. Comparative study of the propagation and plaque titration conditions for human coronavirus OC43 as a surrogate for SARS-CoV-2[J]. *Archives of Virology*, 2024, 169(10): 214.
 - [21] NIU PH, SHEN J, ZHU N, LU RJ, TAN WJ. Two-tube multiplex real-time reverse transcription PCR to detect six human coronaviruses[J]. *Virologica Sinica*, 2016, 31(1): 85-88.
 - [22] MORFOPOULOU S, BROWN JR, GRAHAM DAVIES E, ANDERSON G, VIRASAMI A, QASIM W, CHONG WK, HUBANK M, PLAGNOL V, DESFORGES M, JACQUES TS, TALBOT PJ, BREUER J. Human coronavirus OC43 associated with fatal encephalitis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2016, 375(5): 497-498.
 - [23] ZHANG ZY, LIU WK, ZHANG SN, WEI PL, ZHANG L, CHEN DH, QIU SY, LI XB, ZHAO JX, SHI YX, ZHOU R, WANG YQ, ZHAO JC. Two novel human coronavirus OC43 genotypes circulating in hospitalized children with pneumonia in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 168-171.
 - [24] DESFORGES M, Le COUPANEC A, DUBEAU P, BOURGOUIN A, LAJOIE L, DUBÉ M, TALBOT PJ. Human coronaviruses and other respiratory viruses: underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system [J]. *Viruses*, 2019, 12(1): 14.
 - [25] CHEN CJ, MAKINO S. Murine coronavirus-induced apoptosis in 17Cl-1 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and bid cleavage[J]. *Virology*, 2002, 302(2): 321-332.