

猪血凝性脑脊髓炎病毒 JS-2025 株分离与鉴定

朱文龙^{1,2,3}, 张梦迪^{1,2,3}, 刘长城^{1,2,3}, 景然^{1,2,3}, 任方超^{1,2,3}, 何启盖^{1,2,3},
张梦佳^{1,2,3,4*}, 李文涛^{1,2,3,4*}

- 1 华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉
- 2 生猪健康养殖协同创新中心实验室, 湖北 武汉
- 3 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉
- 4 湖北洪山实验室, 湖北 武汉

朱文龙, 张梦迪, 刘长城, 景然, 任方超, 何启盖, 张梦佳, 李文涛. 猪血凝性脑脊髓炎病毒 JS-2025 株分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2025, 65(12): 5605-5616.

ZHU Wenlong, ZHANG Mengdi, LIU Changcheng, JING Ran, REN Fangchao, HE Qigai, ZHANG Mengjia, LI Wentao. Isolation and identification of the porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain JS-2025[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(12): 5605-5616.

摘要: 猪血凝性脑脊髓炎病毒(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, PHEV)属于 β 冠状病毒属成员, 在大多数猪群中流行, 也是已知唯一可引起猪神经症状的冠状病毒。【目的】分析中国分离的猪血凝性脑脊髓炎病毒(PHEV)毒株的基因组特征及其系统发育关系。通过深入研究病毒株的生物学特性, 系统评估其在我国猪群中的流行病学现状, 阐明其遗传变异模式和进化趋势, 为开发针对性防控产品提供科学依据。【方法】对中国江苏地区某规模化猪场送检的疑似 PHEV 阳性样本进行 RT-PCR 检测, 并分离 PHEV, 通过间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)染色和透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)对分离的病毒进行验证。根据 PHEV JS-2025 株全基因组测序结果对全基因组、S 基因、HE 基因和 NS2 基因进行了基因组系统发育分析和同源性比较。【结果】成功从脑组织样品中分离获得 1 株 PHEV, 命名为 PHEV JS-2025。IFA 结果显示细胞质中出现明显的荧光信号; 电镜观察可见直径约 150 nm 的典型冠状病毒颗粒。病毒在 HRT-18 细胞中增殖良好, 72 h 时病毒滴度达到峰值, 半数组织培养感染剂量(tissue culture infectious dose 50%, TCID₅₀)约为 10^{4.3} TCID₅₀/mL。PHEV JS-2025 能够感染 HRT-18、NPTR、LLC-PK1 细胞, 且对 Caco-2 细胞具有一定感染性。全基因组测序结果显示, PHEV JS-2025 全长 30 044 bp, 与 14 个已知 PHEV 毒株核苷酸一致性均在 94.9% 以上, 属于 rvPHEV-L-1

资助项目: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-35); 中央高校基本科研业务费专项资金(2662023DKPY004); 湖北省自然科学基金(2023AFB437); 国家自然科学基金(32473007)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Earmarked Fund (CARS-35), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662023DKPY004), the Natural Science Foundation of Hubei Province (2023AFB437), and the National Natural Science Foundation of China (32473007).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Mengjia, zhangmengjia0210@mail.hzau.edu.cn; LI Wentao, wentao@mail.hzau.edu.cn

Received: 2025-06-08; Accepted: 2025-08-08; Published online: 2025-09-05

谱系，其 NS2 基因在第 19 个氨基酸位点出现提前终止导致 NS2 蛋白功能性缺失。【结论】成功分离并鉴定了 1 株来自江苏地区的新型 PHEV 毒株 JS-2025。该毒株具有独特的细胞趋向性特征，能够感染人源肠道细胞系，提示其具有潜在的跨种传播风险。NS2 基因的截短突变可能影响病毒的致病性。本研究为深入了解 PHEV 的遗传进化特征和流行病学特点提供了重要的科学依据，对猪血凝性脑脊髓炎(PHE)的防控具有重要意义。

关键词：猪血凝性脑脊髓炎病毒；分离鉴定；遗传演化分析

Isolation and identification of the porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain JS-2025

ZHU Wenlong^{1,2,3}, ZHANG Mengdi^{1,2,3}, LIU Changcheng^{1,2,3}, JING Ran^{1,2,3}, REN Fangchao^{1,2,3}, HE Qigai^{1,2,3}, ZHANG Mengjia^{1,2,3,4*}, LI Wentao^{1,2,3,4*}

1 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

2 The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Wuhan, Hubei, China

3 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan, Hubei, China

4 Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan, Hubei, China

Abstract: Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV), a member of the betacoronavirus genus, is widespread in swine herds and the only known coronavirus causing neurological diseases in pigs. **[Objective]** To characterize the genomic features and phylogenetic relationship of a PHEV strain isolated from China. By investigating the biological properties of the virus, we assessed its epidemiological status and identified genetic variation patterns and evolutionary trends, providing a scientific basis for developing targeted prevention and control strategies. **[Methods]** RT-PCR detection was performed on suspected PHEV-positive samples collected from a large pig farm in Jiangsu Province, China, followed by virus isolation. The isolated virus was validated by indirect immunofluorescence assay (IFA), transmission electron microscopy (TEM), and whole genome sequencing. Phylogenetic analysis was performed based on the complete genome, S gene, HE gene, and NS2 gene. **[Results]** A PHEV strain, designated as PHEV JS-2025, was successfully isolated from the brain tissue sample. IFA showed strong red fluorescence signals in the cytoplasm, and TEM revealed typical coronavirus particles with a diameter of approximate 150 nm. The strain showed vigorous propagation in HRT-18 cells, reaching the peak viral titer at 72 h, with a 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) of about 10^{4.3} TCID₅₀/mL. PHEV JS-2025 could infect HRT-18, NPTR, and LLC-PK1 cells, and to a lesser extent, human intestinal Caco-2 cells. Whole genome sequencing revealed that the genome of PHEV JS-2025 was 30 044 bp in length, with over 94.9% nucleotide sequence identity to 14 reference PHEV strains, clustering within the rvPHEV-L-1 lineage. Of note, a mutation in the NS2 gene caused a premature termination at amino acid 19, resulting in the functional loss of the NS2 protein. **[Conclusion]** A novel PHEV strain JS-2025 from Jiangsu Province was successfully

isolated and identified. This strain exhibits unique cellular tropism and can infect human intestinal cell lines, showing a risk of cross-species transmission. The truncated NS2 gene may affect the pathogenic mechanism of this strain. This study aids in understanding the genetic evolutionary characteristics and epidemiological features of PHEV and has implications for the prevention and control of PHE.

Keywords: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; isolation and identification; genetic evolutionary analysis

猪血凝性脑脊髓炎(porcine hemagglutinating encephalomyelitis, PHE)是由猪血凝性脑脊髓炎病毒(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, PHEV)引起的一种高度接触性传染病, 又称冠状病毒性脑膜脑炎, 主要感染 1-3 周龄哺乳仔猪。该病以呕吐和脑脊髓炎为特征性临床表现, 是目前已知唯一可感染猪神经系统的冠状病毒^[1-2]。自 1958 年在加拿大安大略省首次暴发以来^[3], 该病已在全球范围内蔓延, 部分养殖场发病率高达 100%, 显著影响仔猪存活率, 给养猪业造成重大经济损失^[2]。

PHEV 属于冠状病毒科(Coronaviridae) β 冠状病毒属(Betacoronavirus, β -CoV), 是一种有包膜的非分节段单链正义 RNA 病毒。电镜下观察呈球形, 直径在 100-150 nm 之间, 具有典型的“冠状”结构特征。其结构蛋白包括: 刺突蛋白(S)、膜蛋白(M)、血凝素酯酶蛋白(HE)、核衣壳蛋白(N)和小膜蛋白(SM 或 E)^[4]。S 蛋白作为病毒颗粒表面的糖蛋白, 介导冠状病毒的吸附和侵入。M 蛋白是病毒包膜中含量最丰富的结构蛋白, 对病毒颗粒的形态起决定性作用^[2]。E 蛋白也是病毒颗粒包膜的组成部分。N 蛋白是含量最丰富的病毒蛋白, 在稳定基因组 RNA 功能方面发挥重要作用^[5]。M 蛋白与 E 蛋白以及 N 蛋白相互作用, 在子代病毒的组装和出芽过程中具有重要作用^[2,6]。HE 蛋白是一种特殊的糖蛋白, 是由二硫键连接的 2 个亚基组成的二聚体蛋白^[7-8]。HE 蛋白仅存在于 β 属冠状病毒 A 亚群和 C 型流感病毒中, 推测是冠状病毒与流感病毒进化过程中通过重组获得的, 其作用可能

与流感病毒的 NA 类似^[9]。

在自然条件下 PHEV 仅感染猪, 其中育肥猪和成年猪多表现为亚临床症状或潜伏感染, 感染率极高, 是主要传染源。该病毒主要经呼吸道传播, 在宿主呼吸道中复制^[10], 随后可通过周围神经系统扩散至中枢神经系统^[11], 引起宿主出现临床症状。目前市面上尚无有效的 PHEV 疫苗, 因此预防哺乳仔猪感染的有效方式是诱导母猪产生母源抗体, 从而为哺乳仔猪提供被动免疫保护。

目前, PHEV 的诊断主要结合临床综合诊断和实验室诊断。临床诊断是通过结合临床症状和病理变化进行, 如对感染动物的脑、脊髓和肌间神经丛进行病理切片观察^[12]。实验室诊断则依据实验技术对病原体及其抗体进行鉴定和确认, 包括逆转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)、病毒分离和免疫学方法。其中, RT-PCR 主要用于扁桃体、脊髓和口腔液样本中 PHEV 的鉴定。PHEV 可在多种细胞中增殖, 如 PK-15、N2a 和猪次代甲状腺细胞(SPTh), 其中 PK-15 和 SPTh 已被证实是对该病毒最敏感的细胞^[13], 但其对其他细胞的感染性尚待系统研究。

本研究采集江苏地区猪场疑似感染猪的脑组织样品, 经 PCR 检测和病毒分离鉴定后确定为 PHEV 感染, 将分离得到的毒株命名为 PHEV JS-2025 株, 并进一步对分离株进行生物学特性和遗传进化分析, 以期为江苏地区可能流行的 PHEV 毒株研究提供参考, 为我国 PHEV 研究提供重要材料。

1 材料与amp;方法

1.1 样品处理

在江苏省出现疑似 PHEV 感染病例时, 采集病死仔猪组织样本进行 PHEV 检测。收集扁桃体和脑组织样本, 保存于 DMEM 培养基中。将 PHEV 阳性的脑组织样本用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)制备成 10% 的组织匀浆。将悬液在 4 °C、4 500×g 离心 10 min, 经 0.22 μm 注射器滤器过滤后用作病毒分离接种物。

1.2 核酸提取和 RT-PCR 检测

总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书进行, 具体操作如下: 取 200 μL 样品与 1 mL TRIzol 裂解液混合, 室温孵育 5 min; 随后加入 200 μL 氯仿, 剧烈涡旋混匀后置于冰上 10 min; 4 °C、12 000×g 离心 10 min 后, 小心收集上清并与等体积异丙醇混合。将混合液颠倒混匀后室温静置 10 min, 再次离心。弃去上清, 加入 1 mL 无水乙醇洗涤, 4 °C、12 000×g 离心 10 min 后自然干燥。最后将 RNA 溶解于 RNase-free 水中, 分装后保存于-80 °C。

使用 PrimeScript™ RT 试剂盒(TaKaRa 公司)对每个样本进行 cDNA 合成。按照说明书, 采用高保真酶(PrimeSTAR Max DNA Polymerase, TaKaRa 公司)进行 PHEV-N 基因片段(289 bp)的 RT-PCR 检测。扩增所用引物为 PHEV-N-F (5'-TGCTGCCACGATGGTACTTT-3') 和 PHEV-N-R (5'-CTACGCGATCCTGAACTAGG-3')。

1.3 病毒的分离鉴定

将过滤后的悬液接种于 HRT-18 细胞, 37 °C、5% CO₂ 培养。吸附 1 h 后, 加入含 1% 血清的 DMEM, 培养 5 d 后将剩余上清接种 HRT-18 细胞进行传代培养, 盲传 3 代并通过 RT-PCR、间接免疫荧光试验进行初步鉴定, 然后通过透射电镜观察进行进一步鉴定, 观察病毒颗粒形态。病毒培养液经 2 500×g 离心 30 min

去除细胞碎片后, 上清液以 30 000×g 离心 120 min, 沉淀重悬于水中。样品经磷钨酸(pH 6.4)染色后喷雾于 200 目铜网上, 然后进行透射电镜观察。

1.4 间接免疫荧光试验

将 PHEV JS-2025 以 0.01 的病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)感染 HRT-18 细胞, 感染后 72 h 收取细胞样品。用 PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% Triton X-100 透化 15 min, 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭 2 h, 4 °C PHEV S1 mAb (1:2 000)孵育过夜。用 PBST 洗涤 3 次后, 用 Alexa Fluor® 594 驴抗小鼠 IgG (H+L)在 37 °C 下孵育 45 min。最后用 PBST 洗涤细胞 3 次, 用 4',6-二氨基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液孵育 5 min, 最后在倒置荧光显微镜下观察图像。

1.5 半数组织培养感染剂量(tissue culture infectious dose 50%, TCID₅₀)的测定

提前 24 h 以 5×10³/mL 的细胞密度将 HRT-18 细胞铺于 96 孔细胞板中准备感染, 将 PHEV 进行连续 10 倍比稀释至 10⁻⁸, 然后将稀释好的病毒加入各细胞孔中, 每孔 100 μL, 每个稀释度重复 8 个孔, 同时设置不加病毒的正常细胞作对照。37 °C 培养 72 h 之后弃去上清, 采用间接免疫荧光试验进行 TCID₅₀ 的测定, 步骤同 1.4 节。最后用 Reed-Muench 方法计算 TCID₅₀。

1.6 病毒生长曲线的绘制

以 0.01 MOI 感染 HRT-18 细胞, 于 37 °C 细胞培养箱中培养, 分别在感染后 12、24、36、48、72、84、96 和 108 h (hpi)收集上清。利用间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)试验读取细胞病变孔数, 应用 Reed-Muench 法计算每个时间点的 TCID₅₀(步骤同 1.5 节), 以

收毒时间点为横坐标, TCID₅₀ 的对数为纵坐标建立病毒的多步生长曲线。

1.7 病毒的细胞嗜性

为研究 PHEV 的细胞感染谱, 将相同感染复数(MOI=0.01)的 PHEV 接种于不同细胞系中, 包括 Caco-2、Vero、HeLa、HEK-293T、Marc145、HRT-18、NPTR、LLC-PK1 和 N2a 细胞。感染 72 h 后, 使用实验室制备的靶向 PHEV-S 蛋白的单克隆抗体进行 IFA 试验以观察病毒在各细胞系中的感染情况。

1.8 病毒基因组扩增与测序

根据 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中可获得的 PHEV 毒株全基因组序列信息, 使用 DNA Club Primer Permier 5.0 和 DNAMAN 软件设计全基因组扩增引物。使用 PrimeSTAR Max 试剂盒对该毒株的 cDNA 进行扩增、回收和测序。通过整合参考序列组装和从头组装的结果获得最终的组装序列。序列数据已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 PV730382。扩增所

用的引物序列的详细信息见表 1。

1.9 基于全基因组、S 基因、N 基因和 M 基因的系统发育与同源性分析

从 GenBank 数据库获取了来自不同流行国家的 15 个 PHEV 全基因组序列。这些序列的 GenBank 登录号、分离年份和国家信息详见表 2。将本研究获得的序列与不同流行国家的病毒毒株进行比对。首先使用 DNASTar 软件(v7.0)中 MegAlign 功能的 ClustalW 方法进行序列比对, 随后使用 MEGA 软件(v12.0)的邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树, 自展值设为 1 000。

2 结果与分析

2.1 PHEV 分离结果

使用 PHEV-N 特异性引物对处理好的样本进行 RT-PCR 检测, 结果如图 1A 所示。2 个测试样本均成功扩增出 289 bp 的片段, 且经测序确认样本扩增的基因为 PHEV-N (图 1B), 这表

表1 PHEV全基因组扩增引物序列

Table 1 Primer sequences for PHEV complete genome amplification

Primers name	Fragment size (bp)	Primer sequences (5'→3')
PHEV-PD1-F	4 132	GATTGTGAGCGAATTGCGTGCGTG
PHEV-PD1-R		CACCATGTGCCATATGGCCGTTAGC
PHEV-PD2-F	4 332	GCGTAGTGTGTATAAAGCAGCTTGTGTGCG
PHEV-PD2-R		GTCAATTCAAGACCTGCCGACACAGC
PHEV-PD3-F	4 286	CTGCCAATACTGGTACGTCTGTTACAG
PHEV-PD3-R		GAGAGCCAAATCTGCCATACGCTCC
PHEV-PD4-F	4 222	GCGACGATTACGCAAAGGACAATACTG
PHEV-PD4-R		AAGAGGCTTTCTGATGCAACTGCCAC
PHEV-PD5-F	4 564	AGGAGCTGGATGCTTTGTGGATGA
PHEV-PD5-R		GCTGGAGTCGTACGAAACAAACTCCTG
PHEV-PD6-F	4 320	AGCTCTGGCAACCTCTACCATCTTT
PHEV-PD6-R		AGCCAAGCTTCGATATCGCAATTGG
PHEV-PD7-F	4 691	CTTCTAGCCTTTGACCAGGATGGTG
PHEV-PD7-R		GATCGGCCCACTTAAGGATGCCAT
PHEV-PD8-F	1 770	GACAGGATAGGCGATACTAGTGGT
PHEV-PD8-R		GTGATTCTTCCAATTGGCCATGATTAACCTC

表2 本研究所用的PHEV毒株

Table 2 PHEV strains used in this study

Name	GenBank	Country	Host	Years
PHEV/67N/US/1970	MW165134.1	USA	Sus scrofa	1970
PHEV_CC14	MF083115.1	China	Sus scrofa	2014
PHEV_JL/2008	KY994645.1	China	Sus scrofa	2008
PHEV_VW572	DQ011855.1	Belgium	Sus scrofa	2006
PHEV-swine/USA/15TOSU1785	KY419106.1	USA	Sus scrofa	2015
PHEV-swine/USA/15TOSU1209	KY419107.1	USA	Sus scrofa	2015
PHEV-swine/USA/15TOSU0582	KY419105.1	USA	Sus scrofa	2015
PHEV-swine/USA/15TOSU1582	KY419110.1	USA	Sus scrofa	2015
PHEV-swine/USA/15TOSU2504	KY419103.1	USA	Sus scrofa	2015
PHEV/HLJ/2017	OQ305206.1	China	Sus scrofa	2017
PHEV/ZJ/2017	OQ305208.1	China	Sus scrofa	2017
PHEV/SC/2017	OQ305207.1	China	Sus scrofa	2017
rvPHEV4	OQ798824.1	China	Sus scrofa	2019
rvPHEV15	OQ798811.1	China	Sus scrofa	2019

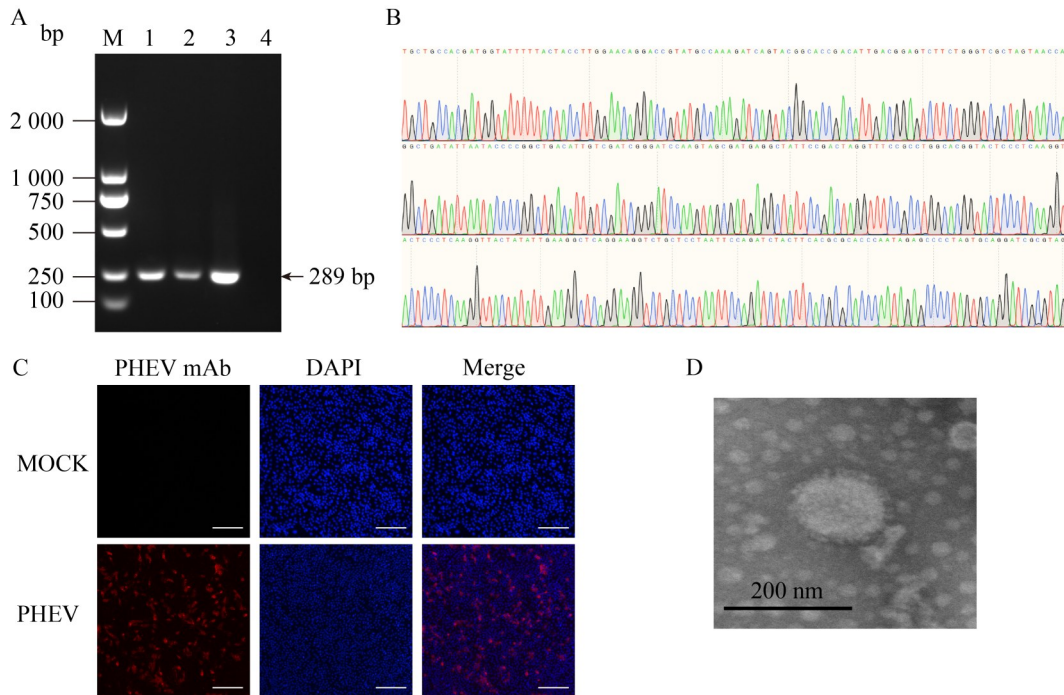


图1 组织样本的PHEV的分离鉴定。A: 组织样本的N基因片段扩增结果(M: DL2000分子量标志物; 1: 扁桃腺; 2: 脑组织; 3: PHEV阳性对照; 4: PHEV阴性对照); B: Sanger测序结果(N基因片段); C: HRT-18细胞上的间接免疫荧光结果(红色荧光代表PHEV病毒信号); D: 病毒电镜图。

Figure 1 Isolation and identification of PHEV from tissue samples. A: N gene fragment amplification results of tissue samples (M: DL2000 molecular weight marker; 1: Tonsil; 2: Brain tissue; 3: PHEV positive control; 4: PHEV negative control); B: Sanger sequencing results (N gene fragment); C: Indirect immunofluorescence results on HRT-18 cells (Red fluorescence represents PHEV virus signal); D: Electron micrograph of the virus.

明样本中存在 PHEV。

为进一步确认诊断结果, 使用 PHEV 阳性的脑组织进行病毒分离。将脑组织样本上清接种于 HRT-18 细胞中进行病毒分离。间接免疫荧光试验(IFA)显示, 细胞质中可见明显的红色阳性信号(图 1C)。此外, 对分离的病毒颗粒进行负染电镜形态学观察(图 1D), 分析显示存在典型的、直径约 150 nm 的冠状病毒样颗粒。综合特征性临床症状、PHEV 特异性片段的成功扩增, 以及 IFA 和电镜观察等结果, 确认该病毒为 PHEV, 并将其命名为 PHEV JS-2025。

2.2 PHEV JS-2025 在 HRT-18 细胞中增殖动态

根据 Reed-Muench 法, 增殖动态监测显示该病毒接种 HRT-18 细胞后病毒滴度在 24–72 h 逐渐提高, 在 72 h 病毒滴度达到峰值, 约为 $10^{4.3}$ TCID₅₀/mL, 随后开始缓慢下降(图 2)。

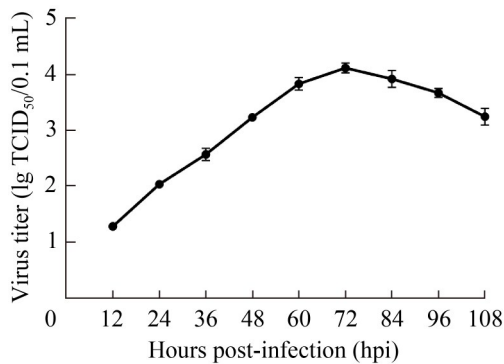


图2 PHEV JS-2025在HRT-18细胞中增殖动态。在HRT-18细胞中分析PHEV JS-2025的生长动力学。以 0.01的MOI感染细胞, 并在感染后12、24、36、48、72、84、96和108 h (hpi)收集上清, 通过TCID₅₀分析病毒滴度。

Figure 2 Proliferation of PHEV JS-2025 in HRT-18 cells. The growth kinetics of PHEV JS-2025 were analyzed in HRT-18 cells. Cells were infected at an MOI of 0.01 and supernatants were collected at 12, 24, 36, 48, 72, 84, 96, and 108 h post infection (hpi) and analyzed for viral titers through TCID₅₀.

2.3 病毒的细胞嗜性

PHEV 以相同的病毒剂量(MOI=0.01)分别感染 Caco-2、Vero、HeLa、HEK-293T、Marc145、HRT-18、NPTR、LLC-PK1 和 N2a 细胞 72 h。随后通过免疫荧光试验(IFA)检测 PHEV 在各细胞系中的感染情况。如图 3 所示, PHEV 能够成功感染 HRT-18、NPTR 和 LLC-PK1 细胞。虽然未观察到明显的细胞病变效应, 但 PHEV 在 HRT-18 细胞中表现出最佳的感染性。此外, PHEV 还能感染少部分 Caco-2 细胞, 而在其他受试细胞系中未见成功感染。

2.4 基于全基因组、S、HE 的基因分析

为全面了解所分离的 PHEV JS-2025 毒株的遗传特征及其与其他 PHEV 毒株的关系, 本研究成功获得了 PHEV JS-2025 毒株的全基因组序列, 其全长为 30 044 bp。对 PHEV JS-2025 株全基因组核苷酸序列进行分析发现, PHEV JS-2025 与其他 14 个毒株在核苷酸水平上具有 94.9% 以上的遗传相似性。其中, 它与 1972 年在比利时分离出的 VW572 株相似性最高, 一致性达 99.2%; 而与 PHEV/HLJ/2017 的遗传亲缘性较低, 为 94.9%。全基因组的系统发育树分析表明, PHEV JS-2025 株所在的分支与 VW572 毒株分支亲缘关系较近(图 4A)。

对 S 基因的分析结果呈现出不同情况。PHEV JS-2025 株与 rvPHEV4 的相似性最高, 其亲缘关系与 PHEV/SC/2017 毒株较近, 属于 rvPHEV-L-1 谱系。这一结果与 HE 基因比对结果相似。对基因组 NS2 同源性和系统发育树进行分析后发现, PHEV JS-2025 株的 NS2 基因在第 19 个氨基酸处出现了提前终止的现象, 导致缺乏功能性 NS2 蛋白(图 4B–4D)。

3 讨论与结论

冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个属。 β 属冠状病毒包括 PHEV、牛冠状病毒(BCoV)、人冠状病毒(HCoV-OC43 和 HCoV-HKU1)以及严重急

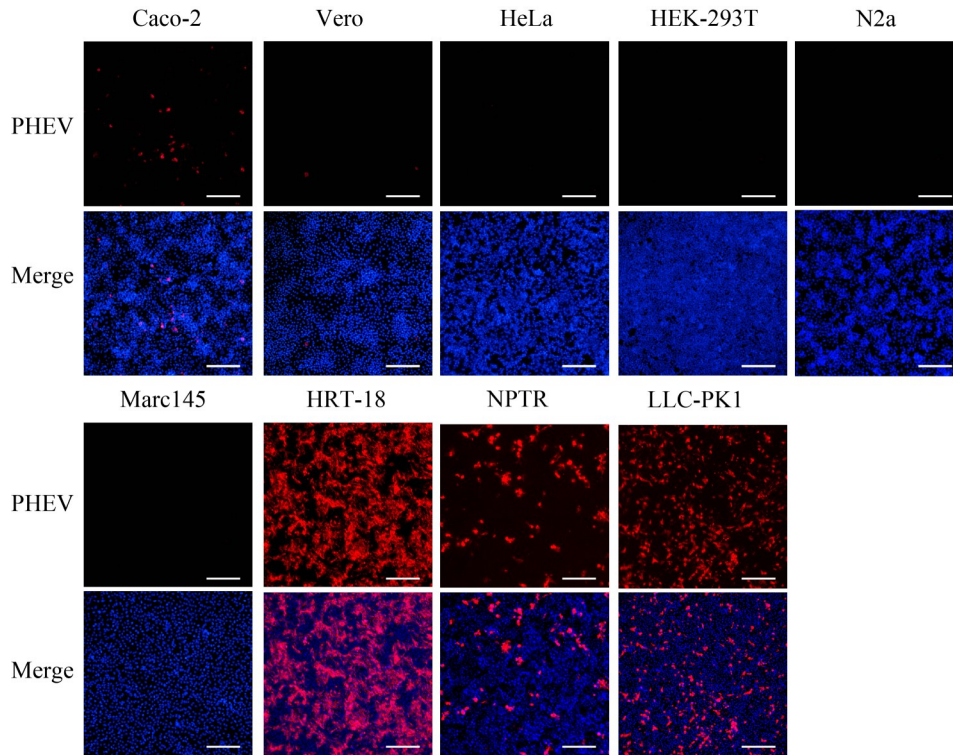


图3 PHEV JS-2025细胞嗜性。细胞经固定后与PHEV mAb过夜孵育，使用山羊抗鼠IgG 594显示阳性反应(红色)，细胞核用DAPI对比染色(蓝色)。比例尺为200 μm 。

Figure 3 Tropism of PHEV JS-2025 cells. Cells were fixed and incubated with PHEV mAb overnight. Positive reactions were shown using goat anti-mouse IgG 594 (red). Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar 200 μm .

性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)。同属 β 属冠状病毒的 SARS-CoV-2 已被确认可能源自动物^[14]。这种具有高致病性的 β 冠状病毒的人兽共患暴发凸显了冠状病毒显著的适应能力、基因可塑性以及广泛的宿主感染范围^[15]。因此，本研究进一步探究了另一种哺乳动物 β 冠状病毒 PHEV 的进化特征。

自 1958 年加拿大首次发现 PHE 以来，多项血清学调查表明 PHEV 感染已在全球广泛传播^[16-17]。中国首次记录的 PHE 暴发发生在 1985 年。1994 年，中国台湾暴发 PHE，致死率高达近 100%，给当地养猪业造成重大经济损失^[18]。目前，PHE 的典型临床表现为新生仔猪出现呕吐和消瘦综合征(VWD)或脑脊髓炎^[1,19]。然而，PHEV 呈地方性流行，在个别养殖场更常

见成年猪的亚临床或隐性感染^[12,18]。病毒通过长期隐性传播很可能发生基因突变，导致毒力随时间增强。因此，了解该病原体的遗传特征和流行病学趋势至关重要。

本研究对疑似感染猪的样本进行 RT-PCR 检测，基于 RT-PCR 结果和后续的测序分析初步诊断确认为 PHEV 感染。将组织上清接种到 HRT-18 细胞上并盲传至第 3 代，随后使用 PHEV 单克隆抗体进行免疫荧光验证。实验结果显示明显的阳性信号，为确认病原体为 PHEV 提供了进一步证据。此外，通过负染电镜观察确认了 PHEV 的存在，进一步证实了诊断结果。

人兽共患病的传播对全球公共卫生构成重大威胁。在最受关注的病原体中，人兽共患冠状病毒表现出向人类和其他重要家养物种跨种

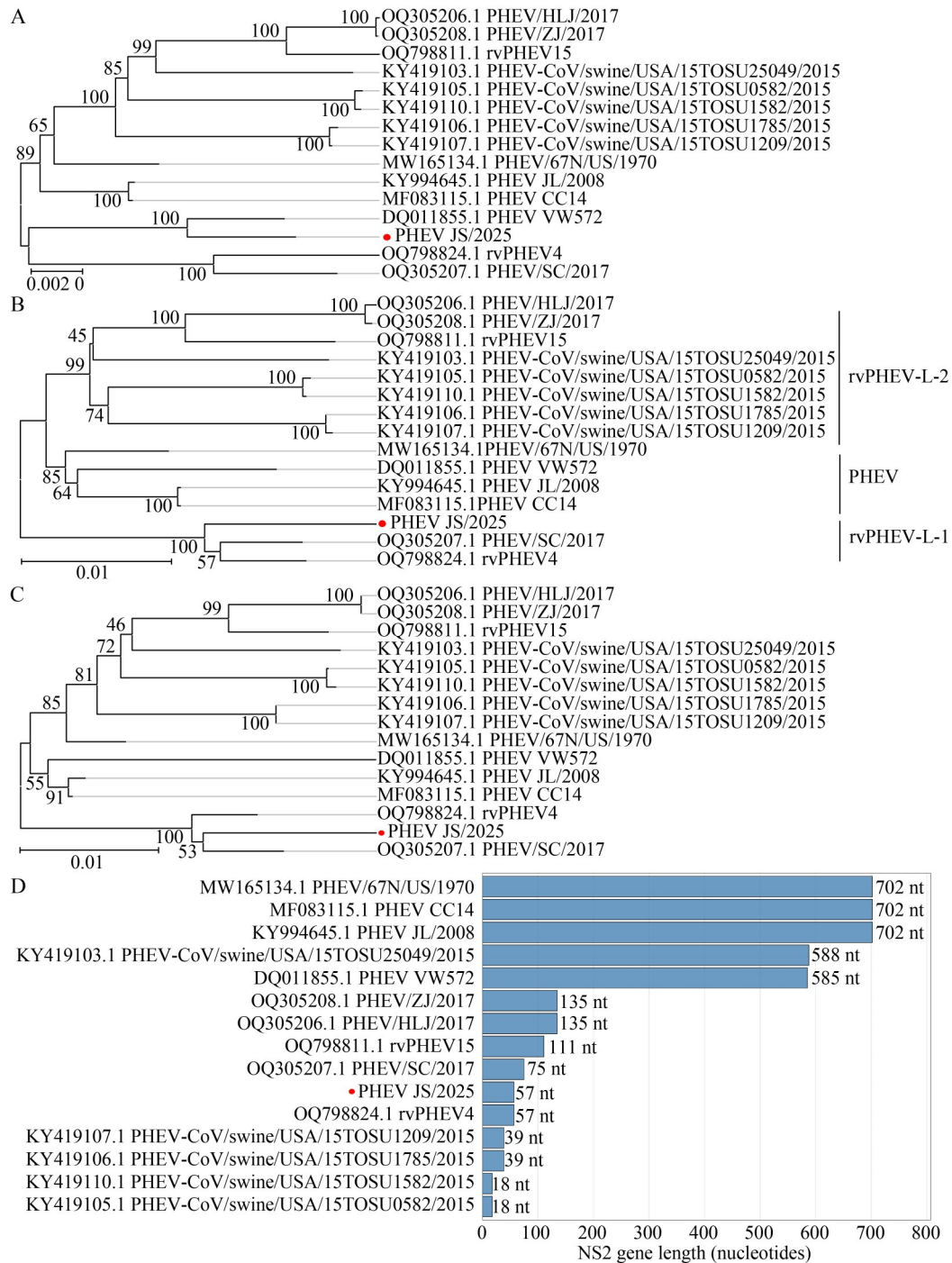


图4 基于PHEV JS-2025基因组核苷酸序列的序列分析。A: 全基因组核苷酸序列遗传演化分析; B: S基因核苷酸序列遗传演化分析; C: HE基因核苷酸序列遗传演化分析; D: NS2基因缺失分析。

Figure 4 Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences corresponding to the whole genome sequence. A: Genetic evolution analysis of whole genome nucleotide sequences; B: Genetic evolution analysis of S genome nucleotide sequences; C: Genetic evolution analysis of HE genome nucleotide sequences; D: Characterization of NS2 gene deletion patterns.

传播的较高倾向^[20]。蝙蝠已被确认可能是所有影响动物和人类的冠状病毒的来源^[21]。同时，PHEV 被认为起源于牛冠状病毒，而牛冠状病毒可能是通过啮齿类适应进化自蝙蝠病毒^[22]。为研究 PHEV 对不同类型细胞的感染性和选择性，并深入了解其宿主嗜性和传播倾向，本研究使用 PHEV JS-2025 毒株进行了细胞趋向性试验。结果表明，PHEV JS-2025 毒株能在人肠道细胞(HRT-18 和 Caco-2 细胞)、猪呼吸道细胞(NPTR 细胞)和猪肾细胞(LLC-PK1)中复制。这提示随着自然进化和循环，该病毒可能扩大其宿主范围并感染人类。这些发现为理解 PHEV JS-2025 的生物学特性、跨种传播潜力以及病毒在不同宿主环境中的选择性偏好提供了重要信息。尽管 PHEV JS-2025 是从猪脑组织中分离获得的，但其在体外未能有效感染 N2a 细胞，这可能是在脑组织分离过程中病毒主要来源于感染的胶质细胞^[23]。这些非神经元细胞可能充当病毒在中枢神经系统(CNS)中的主要宿主，支持其体内神经嗜性，但分离株在体外传代后偏好非神经元细胞系。

全基因组序列分析显示，PHEV JS-2025 与之前报道的 14 个 PHEV 毒株的核苷酸相似性超过 94.9%，与 1972 年在比利时分离的 VW572 毒株的相似性最高(99.2%)。这种跨地理区域和时间段的高度保守性表明 PHEV 具有相当的基因组稳定性，这与之前对其他冠状病毒的观察结果一致^[12,15,24]。然而，基于 S 和 HE 基因的系统发育分析显示出与全基因组分析不同的进化关系，这表明 PHEV JS-2025 与 rvPHEV4 和 PHEV/SC/2017 的亲缘关系更密切，属于 rvPHEV-L-1 谱系。这些基因特异性系统发育之间的差异可能反映了作用于单个病毒基因的不同进化压力或 PHEV 进化过程中潜在的重组事件。需要注意的是，本研究在数据可及性方面存在一定局限性。目前，GenBank 数据库中 PHEV 完整基因组序列的地理覆盖范围相对有限，这在一定程度上制约了对该病毒全球分布

格局和进化动态的深入解析。为更全面地阐明 PHEV 的分子流行病学特征和进化规律，未来研究亟需构建多国协作的病原体基因组监测体系，通过标准化的数据采集和共享机制，在严格遵循生物安全伦理规范和数据隐私保护原则的前提下实现全球范围内 PHEV 基因组数据的实时整合与分析。

β -冠状病毒中的 NS2 蛋白作为 2',5'-磷酸二酯酶(PDE)发挥作用，拮抗 OAS-RNase L 通路，从而通过降解 2'-5'寡腺苷酸并阻止 RNase L 激活，使病毒能够逃避宿主先天免疫反应，这种酶活性在 A 谱系 β -冠状病毒中是保守的，包括小鼠肝炎病毒(MHV)和猪血凝性脑脊髓炎病毒(PHEV)，这强调了其在感染期间抑制抗病毒防御的作用^[25]。第 19 个氨基酸位置的过早终止可能截断 NS2 的功能结构域，潜在地改变病毒复制适应性并赋予变异株诸如增强呼吸道嗜性等适应性^[26]。与其他 β -冠状病毒 NS2 变异的比较分析揭示了缺失或过早终止的模式，如在 PHEV 呼吸道变异株(rvPHEV)和相关毒株如 HKU14 中观察到的，表明进化压力倾向于组织特异性适应或宿主免疫逃避^[27]。

JS-2025 中 NS2 编码的提前终止可能影响其毒力、复制效率或免疫逃避能力。此外，尽管缺乏功能性 NS2 蛋白，JS-2025 仍能在多种细胞类型中有效复制，这表明 NS2 可能并非 PHEV 复制的必需基因，或者其功能可能被其他病毒蛋白所补偿。

综上所述，本研究成功分离并鉴定了一株来自中国江苏省的新型 PHEV 毒株。PHEV JS-2025 表现出独特的细胞趋向性和遗传特征，尤其是 NS2 基因的提前终止。这些发现为 PHEV 毒株的遗传关系和进化模式提供了重要信息，揭示了其潜在的起源、传播途径，以及监测病毒突变和进化的重要性，表明该病毒在地方性压力下会发生显著的进化。

作者贡献声明

朱文龙：数据分析，撰写文章；张梦迪：方法论，项目管理；刘长城：验证；景然：软件程序；任方超：实验验证，监督管理；何启盖：方法论，审阅，项目支持；张梦佳：获取基金、提供资源；李文涛：提出概念，撰写、审阅。

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] PENZAERT MB, CALLEBAUT PE. Characteristics of a coronavirus causing vomiting and wasting in pigs[J]. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 1974, 44(1): 35-50.
- [2] MORA-DÍAZ JC, PIÑEYRO PE, HOUSTON E, ZIMMERMAN J, GIMÉNEZ-LIROLA LG. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: a review[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 53.
- [3] ROE CK, ALEXANDER TJ. A disease of nursing pigs previously unreported in Ontario[J]. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 1958, 22(9): 305-307.
- [4] 李文杰, 金永振, 孙玉梅, 张峻晨, 朱文龙, 李文涛. 猪血凝性脑脊髓炎研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2025, 45(5): 1095-1102.
LI WJ, JIN YZ, SUN YM, ZHANG JC, ZHU WL, LI WT. Progress in porcine hemagglutinating encephalomyelitis[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2025, 45(5): 1095-1102 (in Chinese).
- [5] DONG B, GAO W, LU HJ, ZHAO K, DING N, LIU WF, ZHAO JK, LAN YG, TANG B, JIN Z, HE WQ, GAO F. A small region of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus spike protein interacts with the neural cell adhesion molecule[J]. *Intervirology*, 2015, 58(2): 130-137.
- [6] ZHANG J, LI Z, LU HJ, SHI JC, GAO R, MA Y, LAN YG, GUAN JY, ZHAO K, GAO F, HE WQ. Evidence of microglial immune response following coronavirus PHEV infection of CNS[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 12: 804625.
- [7] SASSEVILLE AM, BOUTIN M, GÉLINAS AM, DEA S. Sequence of the 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(Pt 10): 2411-2416.
- [8] De GROOT RJ. Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2006, 23(1): 59-72.
- [9] ZENG QH, LANGEREIS MA, van VLIET ALW, HUIZINGA EG, de GROOT RJ. Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(26): 9065-9069.
- [10] LORBACH JN, WANG LY, NOLTING JM, BENJAMIN MG, KILLIAN ML, ZHANG Y, BOWMAN AS. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus and respiratory disease in exhibition swine, Michigan, USA, 2015[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(7): 1168-1171.
- [11] MEYVISCH C, HOORENS J. An electron microscopic study of experimentally-induced HEV encephalitis[J]. *Veterinary Pathology*, 1978, 15(1): 102-113.
- [12] DONG B, LU HJ, ZHAO K, LIU WF, GAO W, LAN YG, ZHAO JK, TANG B, SONG DG, HE WQ, GAO F. Identification and genetic characterization of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus from domestic piglets in China[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2329-2337.
- [13] ANDRIES K, PENZAERT M. Propagation of hemagglutinating encephalomyelitis virus in porcine cell cultures[J]. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B*, 1980, 27(4): 280-290.
- [14] ZHOU P, YANG XL, WANG XG, HU B, ZHANG L, ZHANG W, SI HR, ZHU Y, LI B, HUANG CL, CHEN HD, CHEN J, LUO Y, GUO H, JIANG RD, LIU MQ, CHEN Y, SHEN XR, WANG X, ZHENG XS, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [15] BAHOUSSI AN, GUO YY, SHI RZ, WANG PH, LI YQ, WU CX, XING L. Genetic characteristics of porcine hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus: identification of naturally occurring mutations between 1970 and 2015[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 860851.
- [16] LI YC, BAI WZ, HIRANO N, HAYASHIDA T, TANIGUCHI T, SUGITA Y, TOHYAMA K, HASHIKAWA T. Neurotropic virus tracing suggests a membranous-coating-mediated mechanism for transsynaptic communication[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2013, 521(1): 203-212.
- [17] LI Z, LAN YG, ZHAO K, LV XL, DING N, LU HJ, ZHANG J, YUE HQ, SHI JC, SONG DG, GAO F, HE WQ. miR-142-5p disrupts neuronal morphogenesis underlying porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus infection by targeting Ulk1[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 155.
- [18] CHEN KY, ZHAO K, SONG DG, HE WQ, GAO W, ZHAO CB, WANG CL, GAO F. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for rapid detection of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 172.
- [19] QUIROGA MA, CAPPUCIO J, PIÑEYRO P, BASSO W, MORÉ G, KIENAST M, SCHONFELD S, CÁNCER JL, ARAUZ S, PINTOS ME, NANNI M, MACHUCA

- M, HIRANO N, PERFUMO CJ. Hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus infection in pigs, Argentina[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(3): 484-486.
- [20] EDWARDS CE, YOUNT BL, GRAHAM RL, LEIST SR, HOU YJ, DINNON KH 3rd, SIMS AC, SWANSTROM J, GULLY K, SCOBAY TD, COOLEY MR, CURRIE CG, RANDELL SH, BARIC RS. Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(43): 26915-26925.
- [21] THAKOR JC, DINESH M, MANIKANDAN R, BINDU S, SAHOO M, SAHOO D, DHAWAN M, PANDEY MK, TIWARI R, EMRAN TB, DHAMA K, CHAICUMPA W. Swine coronaviruses (SCoVs) and their emerging threats to swine population, inter-species transmission, exploring the susceptibility of pigs for SARS-CoV-2 and zoonotic concerns[J]. *The Veterinary Quarterly*, 2022, 42(1): 125-147.
- [22] DECARO N, MARTELLA V, SAIF LJ, BUONAVOGLIA C. COVID-19 from veterinary medicine and one health perspectives: what animal coronaviruses have taught us[J]. *Research in Veterinary Science*, 2020, 131: 21-23.
- [23] 石俊超. PHEV 入侵 CNS 途径及内质网应激介导神经细胞抗病毒反应的机制研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2022.
- SHI JC. Pathways of PHEV invasion into the CNS and mechanisms of endoplasmic reticulum stress mediated neuronal antiviral response[D]. Jilin: Jilin University, 2022 (in Chinese).
- [24] SHI JC, ZHAO K, LU HJ, LI Z, LV XL, LAN YG, GUAN JY, HE WQ, GAO F. Genomic characterization and pathogenicity of a porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain isolated in China[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(5): 672-683.
- [25] GOLDSTEIN SA, THORNBROUGH JM, ZHANG R, JHA BK, LI YZ, ELLIOTT R, QUIROZ-FIGUEROA K, CHEN AI, SILVERMAN RH, WEISS SR. Lineage a betacoronavirus NS2 proteins and the homologous torovirus berne pp1a carboxy-terminal domain are phosphodiesterases that antagonize activation of RNase L[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(5): e02201-16.
- [26] HE WT, LI DY, BAELE G, ZHAO J, JIANG ZW, JI X, VEIT M, SUCHARD MA, HOLMES EC, LEMEY P, BONI MF, SU S. Newly identified lineages of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus exhibit respiratory phenotype[J]. *Virus Evolution*, 2023, 9(2): vead051.
- [27] GOLDSTEIN SA, FEELEY TM, BABLER KM, HILBERT ZA, DOWNHOUR DM, MOSHIRI N, ELDE NC. Hidden evolutionary constraints dictate the retention of coronavirus accessory genes[J]. *Current Biology*, 2024, 34: 5685-5696. e5683.