

# 流行性出血热病毒在长爪沙鼠肺肾原代细胞中增殖

朱智勇 唐汉英 翁景清 付桂明

(浙江省卫生防疫站, 杭州)

## 提 要

将来源于黑线姬鼠肺, 褐家鼠肺和流行性出血热(EHF)病人血液的三株EHF病毒, 在长爪沙鼠肺、肾细胞中传代培养。接种后第一代就能很好增殖, 滴度可达 $10^{6.0-6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml。随着传代次数的增加, 病毒增殖速度加快, 第三代在接种后2天即可检出感染细胞, 4—8天有50%左右的细胞感染。经传九代未见明显的细胞病变。病毒增殖的高峰在接种后9天左右。维持液中有牛血清, 冻融和超声波处理能提高病毒滴度。不同温度(33°C和37°C)和pH(含5%和3%CO<sub>2</sub>)培养对病毒增殖无明显影响。经传代的感染细胞仍能与EHFV单克隆抗体起反应, 并排除I II III型呼肠孤病毒的感染。

1983年我们发现长爪沙鼠(简称沙鼠), 对流行性出血热病毒(EHFV)敏感<sup>[1]</sup>, 因而试图将乳沙鼠的肺、肾原代细胞对EHFV传代适应, 以了解此病毒在敏感动物的原代细胞内增殖的特点, 为病毒的分离, 特性的研究及研制EHF疫苗提供新的正常动物细胞系统。

## 材料与方法

**一、病毒株:** R<sub>3</sub>株<sup>[2]</sup>, 自黑线姬鼠肺中分离, 已在黑线姬鼠体内传三代, 沙鼠中传一代; B<sub>5</sub>株<sup>[3]</sup>, 自EHF病人血清中分离, 经EHFV单克隆抗体证实属野鼠型病毒<sup>[4]</sup>, 已在黑线姬鼠体内传二代, 沙鼠中传一代; R<sub>28</sub>株, 自褐家鼠体内分离, 已在家兔和沙鼠体内各传一代。

**二、细胞培养:** 选用1—2周龄乳沙鼠放血处死, 按常规消毒取肺和肾组织分别剪碎后, 用0.25%胰酶versen溶液消化, 分装30ml或100ml培养方瓶, 于37°C培养, 制成单层细胞使用。培养细胞的溶液为含10%小牛血清的Eagles液, 并加有谷氨酰胺(使含300μg/ml), 青霉素(使含100μg/ml)和链霉素(使含100μg/ml)。病毒稀释液和维持液含3%的小牛血清, 用3.5%NaHCO<sub>3</sub>调pH至7.2左右培养。

**三、病毒接种与传代:** 将R<sub>3</sub>B<sub>5</sub>和R<sub>28</sub>三株EHFV悬液分别由脑内接种2—6日龄乳沙鼠, 经15—20天后杀鼠取脑, 于玻璃组织研磨器内用维持液制成10%悬液, 冻融二次, 经3000转/分离心15分钟, 取上清分别接种乳沙鼠肺、肾单层细胞, 每瓶1ml或2ml, 37°C吸附2小时后, 倒去悬液, 用维持液洗一次, 加5或10ml维持液, 36°C培养。每毒株细胞种2—4瓶, 不接种病毒细胞作为对照, 每隔3—4天换液一次, 必要时括取少量细胞用直接荧光技术检查病毒感染情况。当细胞感染至++~+++时, 冻融一次后, 以10<sup>-1</sup>的浓度接种新的单层细胞传代。

本文1985年10月5日收到

病毒学杂志 1(2). 1986

• 19 •

**四、病毒滴度的测定：**被检的培养细胞，经不同方法处理后，于2000转/分离心20分钟，取上清用维持液作 $10^{-1}$ 连续稀释（换吸管），接种已成片的乳沙鼠肺（肾）原代细胞，每稀释度接种2—4瓶，每瓶1ml，经14天后括取少量细胞在10孔载玻片上，每瓶涂二孔，待干后，丙酮固定，作直接荧光检查，根据病毒感染的情况计算TCID<sub>50</sub>/ml。

**五、荧光血清：**由本实验室制备的兔抗R<sub>3</sub>和兔抗R<sub>26</sub>两种荧光血清等量混合，原效价为1：16（+++），经1：4稀释后加1/万伊文思兰使用。EHFV单克隆抗体（25-1），来源于中国医学预防中心病毒研究所。

**六、直接荧光技术：**见（参考文献（5）），括取少量待检细胞于玻片上，干燥后丙酮固定，滴加EHF荧光抗体，37℃湿盒中作用30分钟。

## 结 果

**一、病毒接种：**经R<sub>3</sub>、B<sub>5</sub>、R<sub>26</sub>毒株接种乳沙鼠肺肾单层细胞后经不同时间检出病毒抗原的情况如表1。

表1 EHF病毒首次在乳沙鼠原代细胞上增殖

Table 1 propagation of EHF virus in primary cell culture of M. unguiculatus lung and kidney in the first passage

接种病毒后天数	肺 细 胞				肾 细 胞			
	R <sub>3</sub>	B <sub>5</sub>	R <sub>26</sub>	C	R <sub>3</sub>	B <sub>5</sub>	R <sub>26</sub>	C
7	⊕	⊕	—	—	⊕	⊕	—	—
14	++	++	—	—	++	++	—	—
21	+++	++	—	—	+++	+++	—	—
26			⊕	—			+	—
30			+	—			+++	—

⊕：能观察到个别细胞感染。Individual cell infection

C：对照Control

结果表明乳沙鼠的肺、肾原代细胞对来自家鼠型或野鼠型的病毒均敏感（见图）。R<sub>3</sub>和B<sub>5</sub>接种后7天即可观察到阳性细胞，14天可达“++”，而R<sub>26</sub>至26天才看到阳性细胞，这可能与接种病毒量的多少有关，因为R<sub>3</sub>和B<sub>5</sub>感染的乳沙鼠脑切片荧光远比R<sub>26</sub>感染的乳沙鼠脑切片强。

**二、病毒传代：**表2为三株EHFV的传代情况。从表2可知，EHFV能在乳沙鼠原代细胞上连续传代，随着代数的增加病毒增殖的速度也加快，在传代过程中未发现明显的细胞病变。

**三、传代病毒的鉴定：**传代病毒的感染细胞与EHFV单克隆抗体（25-1）仍起反应，而与I II III型呼肠孤病毒抗血清不起反应。

**四、影响病毒增殖滴度某些因素的观察。**

1. 传代次数：上述三株病毒在沙鼠肺肾细胞各传9代，测其各代滴度，未见明显提高。

表2 EHF病毒在乳沙鼠原代细胞上传代出现“++”的天数

Table 2 Days of appearance IF over ++ after inoculation in primary cell culture of *M. unguiculatus* in serial passage

代 数	肺 细 胞			肾 细 胞		
	R <sub>3</sub>	B <sub>5</sub>	R <sub>26</sub>	R <sub>3</sub>	B <sub>5</sub>	R <sub>26</sub>
1	14	14	30	14	14	27
2	10	10	6	9	12	6
3	6	6	4	6	6	4
4	8	8	4	8	8	4
6	7	7	4	4	7	4
8	8	8	6	7	7	4

R<sub>3</sub>和B<sub>5</sub>株第一代即可达 $10^{8.0}/\text{ml}$ 和 $10^{8.5}/\text{ml}$ , 以后各代一般均在 $10^{8.5}/\text{ml}$ 左右, R<sub>26</sub>有时可达 $10^{7.0}/\text{ml}$ 。肺肾二种细胞的病毒增殖滴度无明显差别。

2、冻融次数: 当肺、肾原代单层细胞病毒感染达“+++”时, 取上清液其滴度一般在 $10^{8.0}/\text{ml}$ , 若冻融一次可达 $10^{8.5}/\text{ml}$ 左右, 但冻融次数增加其滴度未见明显增高。

3、培养时间: 将R<sub>26</sub>感染的肾原代细胞第6天开始每三天换液一次, 换下的液体于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冻存, 共收6次, 前3次病毒滴度为 $10^{8.5}/\text{ml}$ 左右, 后三次为 $10^{8.0}/\text{ml}$ 左右。

4、培养温度: 比较 $37^{\circ}\text{C}$ 和 $33^{\circ}\text{C}$ 的培养结果表明, 这二种温度对EHFV增殖的滴度无明显差别。

5、维持液中牛血清的有无: 维持液中含有3%牛血清其病毒滴度要比不含牛血清的高1—2个滴度。

6、不同CO<sub>2</sub>含量: 经R<sub>26</sub>感染的肾原代细胞分别在含3%和5%CO<sub>2</sub>的条件下培养, 结果其病毒滴度基本相同。

7、超声波的影响: 感染R<sub>3</sub>的肾原代细胞达“+++”时, 测定培养液上清, 细胞经 $-70^{\circ}\text{C}$ 冻融一次、超声波(400mA)超击3分钟、15分钟和30分钟的五种不同处理, 其病毒滴度分别为 $10^{8.5}/\text{ml}$ 、 $10^{8.5}/\text{ml}$ 、 $10^{8.5}/\text{ml}$ 、 $10^{7.0}/\text{ml}$ 和 $10^{8.5}/\text{ml}$ 。

## 讨 论

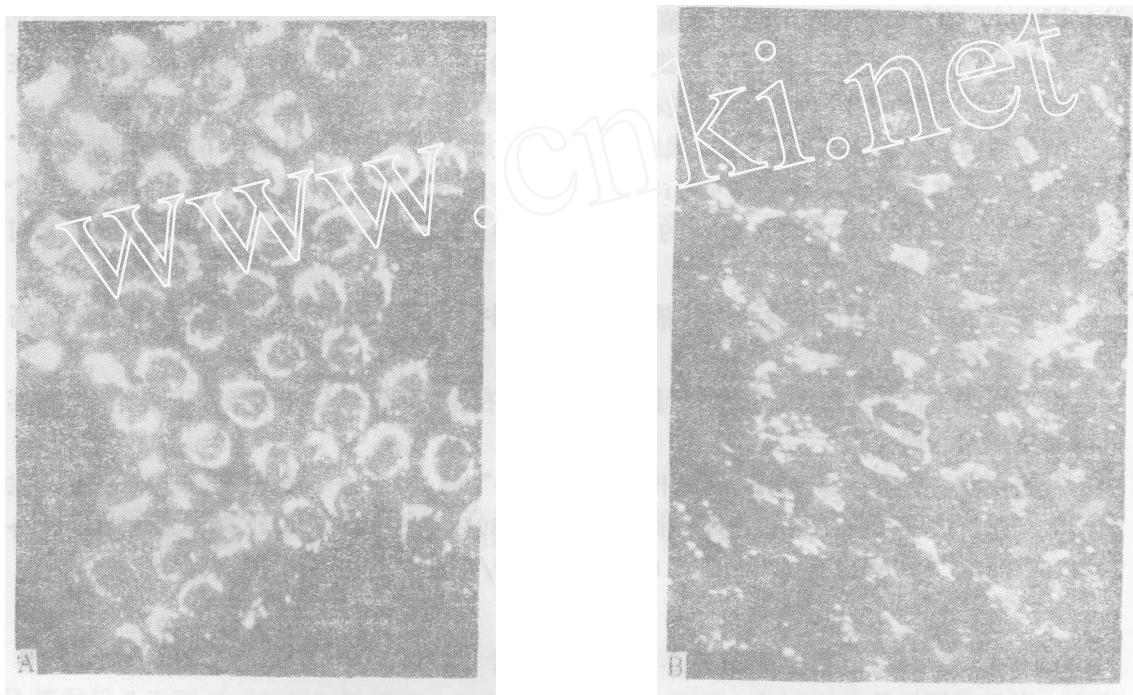
为研究EHFV在细胞中的适应和增殖的特性, 李镐汪等<sup>[6]</sup>和French等<sup>[7]</sup>曾将此病毒接种过猴肾, 人胚肾、人胚肝、鸡胚、大白鼠肝等10余种原代细胞, 认为均不敏感。但不久, 我国证明此病毒能在黑线姬鼠肺<sup>[2]</sup>, 大白鼠肺<sup>[8]</sup>和鸡胚<sup>[9]</sup>原代细胞中增殖; 本文证明乳沙鼠的肺、肾细胞亦敏感, 这表明EHFV亦是易培养且对各种原代细胞选择性不强的一种病毒。

本次实验表明乳沙鼠的肺、肾原代细胞与沙鼠一样, 对家鼠型和野鼠型EHF毒株均敏感, 鼠脑悬液第一代接种即可使肺肾、肾原代细胞感染, 随着传代次数的增加, 病毒增殖速度明显加快, 第三代后经4—8天培养, 即可使50%的细胞感染。本文使用来源于家鼠型的R<sub>26</sub>株, 增殖速度明显地比野鼠型毒株R<sub>3</sub>、B<sub>5</sub>二株快, 荧光强度也以R<sub>26</sub>株为最强。荧光的形

态R<sub>3</sub>和B<sub>5</sub>颗粒状多见，而R<sub>26</sub>以片状和丝状多见，病毒增殖的滴度三者基本相似，一般可达10<sup>8.0</sup>/ml，R<sub>26</sub>有时可达10<sup>7</sup>/ml。这表明不同的毒株在此细胞上增殖的特性也不完全一样。

为使滴度增高，本文研究了各种条件对EHFV增殖的影响，结果表明：培养物经冻融或超声波处理能使病毒滴度增高，这说明培养物细胞内仍保存着大量的EHFV，这与乙型脑炎病毒在地鼠肾中增殖病毒几乎大部释放到培养液的情况不同，这可能与EHFV在沙鼠肺、肾原代细胞上增殖不出现细胞病变有关。EHFV在含有3%牛血清溶液中增殖的滴度，要比无牛血清的溶液高，这由于决定病毒滴度高的主要原因是细胞内病毒量的多少，因此牛血清除了能保护已释放到培养液中的病毒外，更重要的是牛血清给细胞提供营养，使病毒得到良好的增殖。此外，培养温度和CO<sub>2</sub>的含量对病毒的滴度影响不大，这些无不与沙鼠原代细胞感染EHFV后，不出现病变这一特性有关系。

EHFV在乳沙鼠原代肺、肾细胞增殖的滴度，一般能达10<sup>8.0</sup>的TCID<sub>50</sub>/ml，基本上符合研制疫苗的要求，当然，如果创造条件能把滴度稳定地建到10<sup>7.0</sup>或更高，其效果一定更好。



EHF病毒在乳沙鼠肾（A）、肺（B）原代细胞上的特异荧光（×700）

EHF virus in primary cell culture of *M. unguiculatus* (IFA, 700) A. Kidney cell B. Lung cell

## 参 考 文 献

- [1] 朱智勇等, 1984, 微生物学报 24(1): 92.
- [2] 朱智勇等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志 3(2): 73.
- [3] 朱智勇等, 1984, 浙江医学 6(6): 1.
- [4] 陈伯权等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(3): 136.
- [5] 朱智勇等, 1985, 中国公共卫生 4(1): 36.
- [6] Lee.H.W, et al, 1978, J.Infect.Dis, 137 (3): 248.
- [7] French,G.R.1981, Science, 211 (3): 1046.
- [8] 杭长寿等, 1984, 中华微生物学和免疫学杂志 4(3): 165.
- [9] 严玉辰等, 1985, 安徽医学院学报 20(2): 1.

## PROPAGATION OF EHF VIRUS IN CELL CULTURES OF MERIONES UNGUICULATUS LUNG AND KIDNEY TISSUES

Zhu Zhi-yong Tang Han-ying Weng Jing-qing Fu Qui-ming

(Zhejiang Health and Anti-Epidemic Station, Hangzhou)

3 strains of epidemic hemorrhagic fever(EHF)virus from lung tissues of Apodemus agrarius and Rattus norvegicus and blood of patient with EHF were inoculated in primary cell culture of Meriones unguiculatus lung and kidney tissues. In the first passage, a good multiplicaton was observed and TCID 50/ml of the primary cell culture of kidney tissues were  $10^{8.0}$  (for R<sub>3</sub> strain) and  $10^{8.5}$  (for B<sub>6</sub> strain). After passage 3, on the 2nd day after inoculation, specific immunofluorescence to EHF virus antigen was detected in the cell cytoplasm by direct immunofluorescence technique, 4—8 days, 50% of cell were infected. Cytopathogenic effect was not observed at initial or subsequent passages. EHF virus could multiply to high titers above 9th day after infection. Studing growth conditions in above primary cell culture showed that: Multiplication of EHF virus was much better in the maintenance medium with 3% calf serum Treatment of the whole cell culture with freezing and thawing and with ultrasonic wave could increase the virus titers; The titers of EHF virus in 33°C incubation were similar to those in 37°C, so were 5% CO<sub>2</sub> to 3% CO<sub>2</sub>.