

流行性出血热病毒在各种鼠类巨噬细胞和 人外周血白细胞培养中的增殖

姚小剑 俞永新

(中国药品生物制品检定所, 北京)

提 要

本文证实了流行性出血热病毒(EHF)在体外培养的长爪沙鼠、金黄地鼠、Balb/c小鼠腹腔巨噬细胞和人外周血白细胞及单核细胞中的增殖。沙鼠和地鼠腹腔巨噬细胞对EHF病毒的敏感性要高于Vero-E₆细胞,而Balb/c小鼠腹腔巨噬细胞的敏感性却低于其他三种培养的细胞。

野鼠型EHF病毒(A₉株)和家鼠型EHF病毒(R₂₂株)在三种鼠腹腔巨噬细胞中的繁殖能力未见明显差异。

在人外周血白细胞中,其单核细胞对EHF病毒(A₉株)的敏感性高于淋巴细胞。病毒感染单核细胞后4天的病毒滴度可达 $10^{-3.0}$ 。

以上结果说明EHF病毒在单核巨噬细胞中能繁殖和释放感染性病毒,这表明单核巨噬细胞在鼠、人体内EHF病毒感染的建立及病毒在体内扩散至各器官过程中可能起很重要的作用,即起其靶细胞和扩散媒介的作用。

单核巨噬细胞和某些病毒之间的关系及在病毒感染发病机制中的作用已受到广泛的注意。一些学者认为:在某些病毒感染中,病毒是否能在巨噬细胞中繁殖以及繁殖能力如何被证明和它在体内的毒力有关;而巨噬细胞能否限制病毒的繁殖与宿主对病毒是否具有抵抗力有关^[1, 2, 3]。流行性出血热是目前流行严重的急性传染病,因此对此病的发病机制和病毒在体内扩散机制的研究有其重要的意义。探讨流行性出血热病毒和单核巨噬细胞之间的关系有助于了解流行性出血热病毒体内感染的早期建立,病毒在体内扩散过程及单核巨噬细胞在发病机制中的作用。1983—1986年国内学者^[4-7]分别在出血热患者的早期外周血白细胞及单核细胞中查出病毒特异荧光,并从中分离到流行性出血热病毒,本作者亦发现EHF病毒能在长爪沙鼠腹腔巨噬细胞培养中繁殖^[8]。但是EHF病毒能否在人外周血白细胞中,特别是单核细胞中繁殖和释放感染性病毒尚难以肯定。因此进一步了解我国EHF病毒在各种鼠类和人的单核巨噬细胞内的繁殖动态是很有必要的。

本稿于1986年12月7日收到

材料与方法

一、毒种

76-118株 E_6 细胞第3代(E_6P_3)、 R_3 株大白鼠肺原代细胞第7、10代($R_3LP_{7,10}$)、沟 $_3$ 株大白鼠肺原代细胞第4代(R_3LP_4)均由本出血热实验室提供。

A_9 株 E_6 细胞第11、15代(E_6P_{11-15})、 R_{22} 株 E_6 细胞第26、27代($E_6P_{26,27}$)由预防医学科学院病毒研究所宋干教授惠赠。

81-5H株乳鼠脑第5代(MEP₅)由陕西省卫生防疫站姜克俭大夫惠赠。

将 A_9 株 E_6P_{15} 和 R_{22} 株 E_{27} 毒株在沙鼠M ϕ 上传一代,再于 E_6 细胞传一代,收集毒种在 E_6 细胞上滴定3次后,在巨噬细胞中繁殖进行比较。

二、各种细胞的培养

(一) Vero- E_6 细胞的培养:按常规法培养和传代。

(二) 长爪沙鼠、金黄地鼠、Balb/c小鼠腹腔巨噬细胞的获得和培养

腹腔刺激物的制备和鼠腹腔巨噬细胞的获得和培养参见文献^[8]。刺激物用量:金黄地鼠:5 ml/只; Balb/c小鼠:2.5-3 ml/只。

(三) 人外周血白细胞的分离和培养

1. F-H液的配制:参照文献^[9]。

a. 60%泛影葡胺液(静脉注射液,中国信谊药厂产品)25ml和超纯水14.25ml混合。

b. 取Ficoll(分子量为400,000 pharmacia,上海化学试剂厂分装)9.55g加于106.2ml超纯水中。

c. 两溶液混合,测比重,经添加水或Ficoll粉剂使比重为1.077。配好的溶液高压消毒(10磅,10分钟),避光保存。

2. 人外周血白细胞(PBL)的分离和培养

血来自友谊医院健康供血者,立即加入肝素,使浓度为20IU/ml。将抗凝全血和含2 mg/ml EDTA的0.85%生理盐水等量混合,按3:1加在F-H液表面。离心(1000 r/m、30分钟),离心后可见管界内界限分明的五层。小心吸出白细胞层,与0.2mg/ml EDTA的RPMI-1640液混合,离心、去液三次(最后一次用生理盐水),用少量1640液重悬细胞,活细胞计数,以 2×10^6 细胞/ml的细胞悬液进行试验。

3. 粘附白细胞和非粘附白细胞的分离

参照文献^[10]:将人PBL以 5×10^6 细胞/ml种入玻璃平皿(平皿先经小牛血清复盖,4℃过夜),经37℃3小时后,吸出上清中的非粘附细胞。然后用37℃预热过的Hanks液将平皿轻洗两遍,加入少量含0.2mg/ml EDTA、5%小牛血清的1640液,置4℃、1小时后,吹起粘附白细胞。分别将两种细胞悬液洗涤两次后,以 2×10^6 细胞/ml的悬液备作实验用。

三、感染细胞方法

将一定感染量病毒感染贴壁的巨噬细胞单层,37℃1小时后,去残液或不去残液,

直接加入培养液。在37℃、5%CO₂环境下培养,不同间隔时间取上清滴定病毒滴度和取细胞涂片检查细胞中抗原。

人粘附白细胞和非粘附细胞感染在小管内进行,吸附1.5hr后(37℃),离心、洗涤一次,再移种平板培养,其余方法同上。

四、检测方法

1. 细胞内抗原检测:

按常规法制作细胞涂片,用直接荧光法(DFA)^[11]检查荧光抗原,其标准参照文献^[12]:

(+): 1—10%阳性细胞; (++): 11—50%阳性细胞 (+++): 51—90%阳性细胞; (####): 91—100%阳性细胞。

2. 病毒滴度检测:

4℃下,10倍系列稀释病毒液,每个稀释度接种2孔(24孔板)或4孔(96孔板),培养9天后取细胞涂片,用DFA法检测阳性结果,并按Reed—Muench法计算其TCID₅₀。

结 果

一. EHF病毒在体外培养的鼠腹腔巨噬细胞(Mφ)中的繁殖:

1. 病毒在长爪沙鼠Mφ培养中的繁殖

将不同来源的EHF病毒株感染体外培养的沙鼠Mφ见表1,结果表明:各毒株感染Mφ后首代第8天均可查到较强的特异荧光。说明沙鼠Mφ对不同来源的EHF病毒株具有普遍的敏感性。

用相同E₆细胞感染量的A₉株和R₂₂株病毒同时感染培养的沙鼠Mφ,观察其繁殖曲线见图1。可见在感染早期,A₉株的繁殖速度要快于R₂₂株,但在繁殖高峰期,两株病毒的繁殖滴度未见差异,均达6.5个对数。说明沙鼠Mφ对A₉株和R₂₂株的敏感性

表1 不同来源出血热病毒体外感染沙鼠腹腔巨噬细胞后首代荧光检测结果

Table 1 The result of the first passage of different EHF virus replications in Mongolian gerbile peritoneal macrophage culture

病毒株 Viruses	76-118	A ₉	R ₃	R ₃	海 ₃	R ₂₂	81-5H
代数 passages	E ₆ -3	E ₆ -11	RL-10	RL-7	RL-4	E ₆ -26	MB-5
直接荧光 DFA	+++	+++	+++	+++	++	+++	+ (days6)

E₆: VERO-E₆细胞; RL: 大白鼠肺原代细胞; MB: 乳鼠脑;

•: 病毒感染后第8天细胞涂片的免疫荧光阳性细胞数。

E₆: VERO-E₆cell; RL: primary rat lung cell; MB: mouse brain.

•: DIF-positive cells in spot slide at the 8th day after infection.

无明显差异。感染后 20 天其病毒滴度仍有 4.0 个对数，显示 EHF 病毒在沙鼠 $M\phi$ 中存在和繁殖的时间较长。

2. EHF 病毒在金黄地鼠 $M\phi$ 培养中的繁殖

将 100 个 E_6 TCID₅₀ 感染量的 A₉ 株和 R₂₂ 株病毒同时感染体外培养的地鼠 $M\phi$ 后其繁殖曲线见图 2。结果表明两株病毒均可在此细胞中繁殖良好，其滴度未见其差异。高峰滴度均可达 5.0 个对数或更高。

3. EHF 病毒在 Balb/c 小鼠 $M\phi$ 培养中繁殖

当 Balb/c 小鼠 $M\phi$ 被 A₉ 株 (10E₆ TCID₅₀) 和 R₂₂ 株病毒 (100E₆ TCID₅₀) 感染后见图 3，

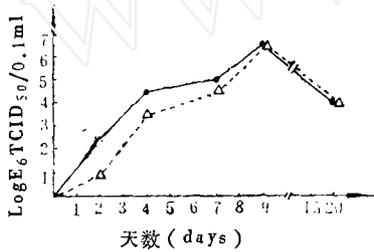


图 1 在沙鼠腹腔巨噬细胞培养中，A₉ 株和 R₂₂ 株的繁殖比较

Fig 1 Comparison of A₉ and R₂₂ strains replications in Mongolian gerbil peritoneal macrophage culture

(·-·-·): A₉ 株; (Δ---Δ) R₂₂ 株
A₉ strain; R₂₂ strain.

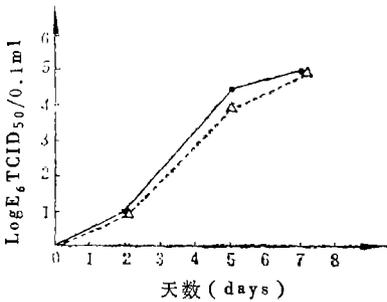


图 2 出血热病毒 A₉ 株和 R₂₂ 株在金黄地鼠腹腔巨噬细胞培养中的繁殖

Fig 2 Replications of A₉ and R₂₂ strains in Syrian golden Hamster peritoneal macrophage culture

(·-·-·): A₉ 株, 接种量: 100E₆ TCID₅₀
(Δ---Δ): R₂₂ 株, 接种量: 100E₆ TCID₅₀
(·-·-·): A₉ strain, virus inoculum, 100E₆ TCID₅₀
(Δ---Δ): R₂₂ strain, virus inoculum, 100E₆ TCID₅₀.

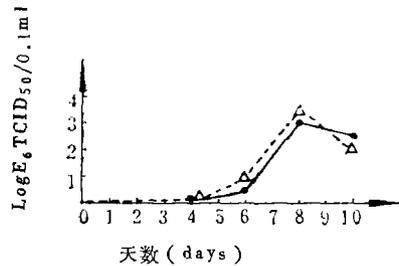


图 3 EHF 病毒在 Balb/c 小鼠腹腔巨噬细胞培养中的繁殖曲线:

Fig 3 Growth curves of EHF viruses in the Balb/c mouse peritoneal macrophage culture.

(·-·-·): A₉ 株, 感染量为 10E₆ TCID₅₀
(Δ---Δ): R₂₂ 株, 感染量为 100E₆ TCID₅₀
(·-·-·): A₉ strain, virus inoculum, 10E₆ TCID₅₀
(Δ---Δ): R₂₂ strain, virus inoculum, 100E₆ TCID₅₀

第 4 天的培养上清中未查到感染性病毒。第 8 天为高峰期、滴度仅达 3.0—3.5 个对数。表明此鼠 $M\phi$ 对出血热病毒的敏感性较差。两株病毒在此 $M\phi$ 上的繁殖能力亦未见差异。

在以上三种鼠腹腔巨噬细胞的体外感染中均未发现病毒对 $M\phi$ 有致病变作用。说明 EHF 病毒在鼠 $M\phi$ 中繁殖并没有明显损害细胞的结构和代谢过程。同时感染的 $M\phi$ 能大量向外界释放感染性病毒和抗原。

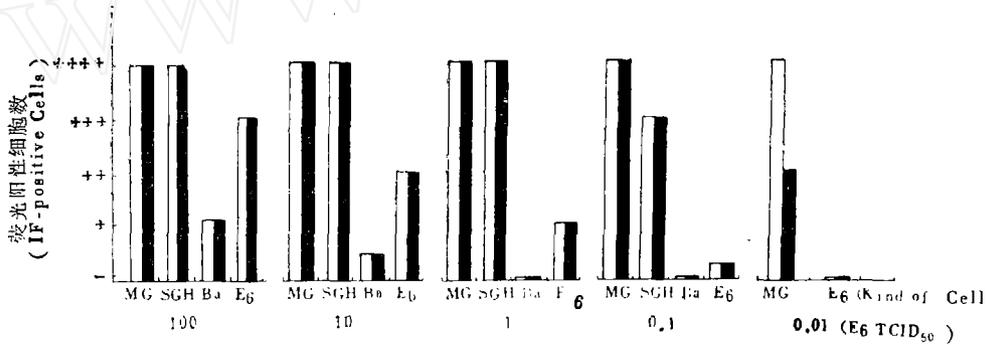
二. 各种鼠 $M\phi$ 和 Vero-E₆ 细胞对 EHF 病毒的敏感性比较

Vero-E₆ 细胞是目前公认为对 EHF 病毒最敏感的细胞之一而被广泛运用。为了探讨

各鼠腹腔巨噬细胞对此病毒的敏感性。本文将各鼠Mφ和E₆细胞进行了敏感性比较。将不同感染量的A₉株和R₂₂株病毒同时感染沙鼠Mφ、地鼠Mφ、Balb/c小鼠Mφ和Vero-E₆细胞后,第10天取细胞涂片作直接荧光检测,结果见图4。可见其敏感性为:沙鼠Mφ和地鼠Mφ均高于E₆细胞,以沙鼠Mφ为最高,而Balb/c小鼠Mφ的敏感性低于E₆细胞。

三. EHF病毒在体外培养的人外周血白细胞(PBL)中的繁殖

将EHF病毒A₉株感染培养的人PBL后,观察其繁殖情况,试验共进行了4次,其结果培养液内感染第八天的病毒滴度较感染早期(4天前)的病毒滴度高1.5、1.5、1.2、1.5LogTCID₅₀,其代表曲线见图5。可见A₉株病毒能在人PBL中繁殖。但繁殖滴度不高。



病毒感染量 (Virus inoculum)
图4 不同鼠腹腔巨噬细胞和E₆细胞对出血热病毒A₉株(□)和R₂₂株(■)感染的敏感性比较(感染后第10天)

Fig4 Sensitivity comparison of different kinds of mouse macrophages and VERO-E₆ cell to EHF Viruses A₉ strain (□) and R₂₂ strain (■) at the 10th day after infection

MG: 沙鼠腹腔巨噬细胞 (Mongolian gerbile peritoneal macrophage)
SGH: 金黄地鼠腹腔巨噬细胞 (Syrian golden hamster peritoneal macrophage)
Ba: Balb/c小鼠腹腔巨噬细胞 (Balb/c mouse peritoneal macrophage)
E₆: VERO-E₆细胞 (Vero-E₆ cell line)

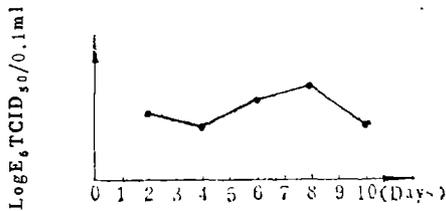


图5 EHF病毒A₉株在人外周血白细胞培养中的繁殖曲线

Fig5 Growth curve of EHF virus A₉ strain in Human peripheral blood leukocyte culture

病毒感染量为10000E₆TCID₅₀.
virus inoculum: 1000E₆TCID₅₀.
病毒吸附后未去残渣和洗涤
Virus inoculum was not removed and washed after incubation

为了明确在人PBL中,单核细胞和淋巴细胞对EHF病毒的敏感性。将相同感染量病毒分别感染人外周血粘附白细胞和非粘附细胞。其结果见表2。结果表明不论是检测粘附白细胞的培养上清病毒滴度或是感染细胞荧光强度均高于非粘附白细胞。说明前者对病毒的敏感性要高于后者,即在人PBL中,单核细胞对病毒的敏感性高于淋巴细胞。

讨 论

本文报道了我国分离的EHF病毒在体外培养的长爪沙鼠、金黄地鼠和Balb/c小鼠腹腔巨噬细胞(Mφ)中的繁殖。三种鼠Mφ对EHF病毒均敏感,但其程度不一。在与Vero

-E₆细胞的敏感性比较可见:沙鼠M ϕ 、地鼠M ϕ 对病毒的敏感性比E₆细胞要高,而Balb/c小鼠M ϕ 的敏感性却低于E₆细胞。此敏感性差异可能不同鼠种对EHF病毒的抵抗力有关。

表2 人外周血粘附白细胞和非粘附白细胞对EHF病毒A₉株的敏感性比较

Table 2 Comparison of the sensitivity of human peripheral blood adherent and non-adherent leukocytes to EHF virus A₉ strain.

感染后不同天数 Days after infection	感染后培养上清的病毒滴度 Virus titer of supernatant after infection			
	粘附白细胞 adherent leukocyte		非粘附白细胞 non-adherent leukocyte	
	2	1.5	(±)*	1.67
4	3.0	(+)	1.5	(±)
8	1.0 [▲]	(++)	<1.0 [▲]	(±)

*: 个别阳性细胞

: individual positive cells

▲: 上清至冻融两次后测定

: supernatant frozen and thawed twice before titration

长爪沙鼠对EHF不同病毒株体内攻击具有广谱敏感性^[13]。本实验表明沙鼠M ϕ 对国内分离的A₉株、R₃株、沟₃株、R₂₂株、81-5H株及南朝鲜分离的76-118株体外感染均具有高的敏感性,不需传代适应便可查到很强的荧光。说明沙鼠M ϕ 体外感染和沙鼠体内感染的敏感性是一致的。

A₉株和R₂₂株分别是国内重型疫区分离的姬鼠型毒株^[14]和轻型疫区分离的家鼠型毒株^[15]。在三种鼠M ϕ 中,此两株病毒的繁殖能力未见明显差异。此结果与此两株病毒在大白鼠肺原代细胞培养中^[16]和Vero-E₆细胞培养中^{[14][15]}的繁殖滴度无明显差异的结果相一致。

本文证实了EHF病毒A₉株能够在体外培养的人外周血白细胞中繁殖,其繁殖高峰在第8天左右,滴度可达3.5logE₆TCID₅₀。并且发现人外周血单核细胞对该病毒的敏感性高于淋巴细胞。此结果和Nagai的研究结果^[10]相似,但B-1株繁殖滴度高峰仅为1.0Log左右(第10天)。低于本文结果,其原因有待进一步研究。

本文从体外肯定了我国EHF病毒在鼠腹腔巨噬细胞和人外周血单核巨噬细胞之间的关系。说明单核巨噬细胞是EHF病毒感染的敏感细胞。这使我们对EHF病毒在体内感染的过程有了进一步的了解:在鼠体内和人体内,单核巨噬细胞系统可能在EHF病毒感染的早期建立及病毒扩散至全身各器官的过程中起重要的作用。由于病毒在单核巨噬细胞中繁殖、释放,但并不导致CPE现象和细胞死亡,这就为病毒在体内单核巨噬细胞中较长时间的繁殖和释放感染性病毒和抗原提供了可能性。有关病毒在单核巨噬细胞中繁殖与EHF发病机理的关系有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mogensen, S. C. et al., 1979, *Microbiol. Rev.* 43(1): 1-26.
- [2] Zisman, B. et al., 1971, *J. Immunol.* 107: 236-242.
- [3] Hirsch, M. S. et al., 1970, *J. Immunol.* 104(5): 1160-1165.
- [4] 李法卿等, 1983, 待发表.
- [5] 陈伯权等, 1985, *中华微生物学和免疫学杂志*, 5(2): 82.
- [6] 李法卿等, 1980, *中华流行病学杂志*, 4: 230.
- [7] 杨为松等, 1986, *中华传染病学杂志*, 4(2): 101-102.
- [8] 姚小剑等, 1986, 《病毒学报》待发表.
- [9] Blyum, 1966, *Scand. J. clin. Lab. Invest. Suppl.* 21(9): 77-87.
- [10] Nagai, T. et al., 1985 *J. Gene Virol* 66(6): 1271-1278.
- [11] 朱智勇等, 1985, *中国公共卫生*, 4(1): 36-38.
- [12] 严玉辰等, 1982, *中国医学科学院学报*, 4, (2): 67.
- [13] 朱智勇, 1984, *微生物学报* 24(1): 92-95.
- [14] 宋干等, 1982 *中华微生物学和免疫学杂志* 2(5): 271.
- [15] 宋干等, 1982, *微生物学报* 22(4): 373-377.
- [16] 杭长寿等, 1984, *中国医学科学院学报* 6(5): 353.

Studies on Replication of Epidemic Hemorrhagic Fever Virus in Cultured Macrophages Derived from Rodents and Human Blood

Yiao Xiao-jian Yu Yong-xin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

It was found that the epidemic hemorrhagic fever(EHF)viruses could be replicated well in cultured peritoneal macrophages derived from *Mongolian gerbiles*, *Syrian golden hamster* and Balb/c mice as well as in cultured human peripheral blood leukocyte. The sensitivity of macrophages from *Mongolian gerbiles* and *Syrian golden hamster* were higher than Vero-E₈-cells, however, the macrophage from Balb/c mouse was less sensitive than the other three.

No obvious difference was observed for the replicating ability in the macrophages between virus strains derived from *Apodemus* (A₀) and *Rattus* (R₂₂).

In human peripheral blood leukocyte, the monocyte was more sensitive than the lymphocyte. 4 days after infection virus titer could reach to 10⁻³ in the supernatant of the monocyte.

These data suggest that the macrophages play an important role and act as a target cell and carrier for replication and transfer of EHF virus in mice and human beings. Thus the final infection can be established.