

流行性出血热病毒 (EHFV) 在传代人淋巴 细胞上的致病变作用增殖的研究

沈宏开 姚盖新

(安徽省医学科学研究所病毒室, 合肥)

提 要

流行性出血热病毒陈株、L₉₉和SR₁₁株接种传代人淋巴细胞克隆株Ly-A₆后第5~7日观察到CPE, 开始时受感染细胞浆内颗粒增多, 细胞圆缩、聚积成堆, 随后细胞膜模糊不清, 2~3天脱落, 同时制片IFA检测到胞浆内特异性荧光颗粒, 以上结果能被EHF免疫血清所中和。

接种病毒后的细胞单层用1%甲基纤维素加维持液覆盖, 第6日吸去覆盖液, 加5%甲醛-1%结晶紫固定染色可见到明显的PFU。

EHFV致病变细胞株的染得将为病原学研究提供了优越的基质细胞。

流行性出血热能在传代人肺癌-A549^[1]、Vero-E₆及MA-104^[2]、原代大鼠肺^[3]、人胚肺细胞培养上增殖, 间接免疫荧光法(IFA)能检测到特异性荧光颗粒, 但都未能观察到致病变作用(CPE)。为了获得EHFV致病的敏感传代细胞株, 为从事病毒分离传代及研究提供优越的基质细胞, 我们用EHFV陈株^[1]、L₉₉(分离于江西罗赛鼠)SR₁₁(分离于日本大鼠)分别接种于传代人淋巴细胞克隆株Ly-A₆后, 第5~7日可观察到明显的CPE, 同时作IFA检测到特异性荧光颗粒。用甲基纤维素覆盖可产生蚀斑。以上结果均能被EHFV免疫血清所中和, 具体叙述如下:

材 料 与 方 法

一. 传代人淋巴细胞克隆株的获得: 传代人淋巴细胞由上海生物制品所惠赠。生长液用MEM Eagle培养基, 加入10%小牛血清、300mmol/ml L-谷氨酰胺、青霉素100u/ml、链霉素100μg/ml、7.2%NaHCO₃调pH至7.5左右, 维持液含5%小牛血清, 其他成分同生长液。克隆是采用有限稀释法, 不加喂养细胞, 种96孔板2块, 共获得克隆39孔, 最后培养成单层传代的一株为Ly-A₆。

二. EHFV接种与CPE观察 按常规方法将EHFV陈株、L₉₉、SR₁₁分别作10倍连续稀释, 每个稀释度种细胞3管, 同时设正常细胞对照管, 放37℃吸附1小时后每管补足维持液至1ml, 放37℃培养, 每日在Olimpus100×下观察CPE并滴片进行IFA检测, 按Karber法分别计算TCID₅₀。

三. 中和试验 1. EHFV-陈株免疫血清制备按文献[4]进行, IFA滴度1:5120,

-70°C保存。

2. EHFV: 陈株 $ID_{50}10^4/0.03\text{ml}$ 感染 $Ly-A_6TCID_{50} 10^4/0.2\text{ml}$ 。

3. 中和试验: EHFV免疫血清作10倍稀释, 放56°C30分钟灭活后加入等量(W/W)不同稀释度病毒悬液, 放37°C温箱作用1小时, 每滴度接种细胞4管, 每管0.2ml, 同时设EHFV对照管及正常细胞对照管, 放37°C吸附1小时补足维持液至1ml, 放37°C培养。每日观察CPE直到第14日各管制片IFA检测分别计算中和指数。

四. 蚀斑形成试验 1. 24孔培养板, Denmark公司出品。

2. 甲基纤维素(英国进口国内分装)。

3. 方法: 用24孔板细胞单层, 接种不同稀释度病毒悬液, 37°C吸附1小时, 以1%甲基纤维素维持液覆盖, 37°C温箱培养, 第6日吸去覆盖的培养基, 用5%甲醛-1%结晶紫固定液染色20分钟, 自来水漂洗去除多余染料, 肉眼观察蚀斑形成。

结 果

一、CPE观察: 3株分离于不同来源的EHFV通过乳鼠传代的不同代次接种 $Ly-A_6$ 均能出现CPE, 其中陈株在乳鼠上传14代转种 $Ly-A_6$ 细胞后第5天出现CPE, L_{09} 第8代鼠脑悬液接种 $Ly-A_6$ 细胞第7天出现CPE, SR_{11} 用2代鼠脑悬液接种 $Ly-A_6$ 细胞第14天出现CPE, 同时滴片IFA检测发现感染细胞浆内有斑块状特异性荧光颗粒。随着在 $Ly-A_6$ 细胞上传代的增加 $TCID_{50}$ 明显升高, 见表1。

表1 3株EHFV接种 $Ly-A_6$ 细胞不同代次的感染性比较

Table 1 The Comparison of infectivity among three strains of EHFV of different passages in $Ly-A_6$ cell

EHFV	Passage	CPE $TCID_{50}/0.2\text{me}$	IFA $TCID_{50}/0.2\text{me}$
Chen strain	P ₂	10^4	10^4
	P ₆	10^6	10^6
L_{09}	P ₁	10^5	10^5
	P ₆	10^7	10^8
SR_{11}	P ₂	10^2	10^2
	P ₄	10^8	10^8

三株EHFV在 $Ly-A_6$ 细胞上CPE产生形态一致。接种细胞开始颗粒增多, 逐渐圆缩, 细胞膜界限不清, 聚集成团, 随后脱落。对照管细胞单层生长良好, 见图1、2。

二、中和试验: 陈株EHFV免疫血清中和陈株EHFV致病变作用。中和试验细胞生长良好, CPE出现比病毒对照管同一滴度晚2~3天, 试验管比对照管低 $100TCID_{50}$, 中和指数为100, 用IFA验证结果同CPE观察法, 而且同一滴度中和试验管感染细胞特异性荧光颗粒少, 感染细胞百分数明显低于对照管。

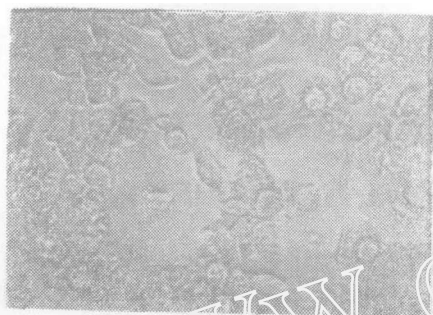


图1 陈株EHFV感染Ly-A₆5日后出现的CPE, (100×)

Fig1 CPE of Ly-A₆ cell infected by Chen strain of EHFV for five days.



图2 正常Ly-₆细胞对照, (100×)

Fig2 Contrast of uninfected Ly-A₆ cell

三、蚀斑形成试验: EHFV 陈株 (F₁-Ly 代) 以不同稀释度接种培养板后, 用 1% 甲基纤维素复盖, 6 日后吸去培养液, 滴加 1% 结晶紫染色后可见到明显的蚀斑。随着稀释度增高而蚀斑减少, TCID₅₀ 同于 CPE 及 IFA 检测结果。

讨 论

一、流行性出血热是急性传染病, 流行较广泛, 对人类健康危害极大。1976 年以来虽然病原分离工作有了突破, 但 EHFV 对以往所用的基质细胞都无明显致病变作用, 结果得依靠设备昂贵的荧光技术来判断, 从而限制了对本病病原的深入研究。传代人淋巴细胞较为方便, EHFV 对它有明显的致病变作用, 而且有蚀斑产生, 这就为以后更好地开展病原学方面的研究提供了方便和可靠的检测指标。另外 EHFV 接种传代人淋巴细胞后第 5 日出现 CPE, 同时滴片检测到细胞浆内有大块的特异性荧光颗粒, 由于细胞培养时间短, 因而滴片易于成功, 这样就为进行流行病学调查、临床特异性诊断以及抗原分型等方面研究提供了优质抗原片。

二、EHFV 感染传代人淋巴细胞后病毒复制快、增殖滴度高并且有 CPE 产生, 进一步说明了人淋巴细胞是 EHFV 亲和性较强的细胞, 为发病机理的研究提供了一定依据。

参 考 文 献

- [1] Ho Wang Lee, Pyung Woo Lee., 1981, *Science*, V.211, 6 MA RCH P1046—1048.
- [2] 沈宏开等, 1987, 安徽医学, 8(3).
- [3] 苏诚钦等, 1985, 安徽医学, 6(2).36.
- [4] 沈宏开等, 1986, 安徽医学, 7(4).31.

Study of Cytopathic Effects and Reproduction of Epidemic Hemorrhagic Fever Virus(EHFV) in Human Lymphocyte Cell Line

Shea Hong-kai Yao Yi-xin

(*Department of Virology, Anhui Institute of Medical Sciences, Hefei*)

A human lymphocyte cell line was inoculated with Chen, L99, and SR11 strains of EHF virus respectively. Cytopathic effects (CPE) were observed for 5—7 days after inoculation. First of all, the cells granulated and rounded up, then cell degeneration occurred rapidly. The clustered and clumped cells still adhered on the glass surface without forming syncytium. Some 48—72 hours after the CPE appeared, the cells fell off completely from the glass surface. Specific immunofluorescent particles were examined in the cytoplasm of infected cells on the 5th day after inoculation. The CPE and fluorescence could be neutralized by monospecific antisera of EHF virus. Virus infected cell monolayers overlaid with methyl cellulose. After a 6 day's incubation at 37°C, the burden was collected, and 5% formalin-1% crystal violet was added to fix the strains, plaque forming unit (PFU) was counted. Because EHF virus could produce characteristic cytopathic effects and form plaques in the human lymphocyte cell line, this cell line would be supplied as a more advanced cell culture than others for the laboratory study of EHF virus.