

禽网状内皮增生病毒在鸡成纤维 细胞培养上的长期无细胞病变感染

崔 治 中

(江苏农业学院, 扬州)

L. F. Lee

(美国农业部地方家禽研究所, 美国)

Non-Pathogenic Long-Term Infection of Reticuloendotheliosis Virus in Chicken Embryo Fibroblasts

Cui Zhi-zhong

(Jiangsu Agricultural College, Yangzhou)

L. F. Lee

(Regional Poultry Research Lab of USDA, USA)

鸡胚及鸡胚成纤维细胞(CEF)培养已广泛地用于病毒学研究及许多种病毒疫苗的生产。鸡胚及CEF培养中的潜在病毒感染可干扰病毒学研究及疫苗质量。禽网状内皮增生病毒(REV)是在免疫学上不同于禽白血病病毒的一群逆转录病毒,该群病毒的成员可分别在火鸡、鸡、鸭等禽类引起肿瘤、免疫缺陷综合症、生长迟缓等病理变化^[1]。在美国的一些流行病学调查表明,将近20%的鸡群有REV感染^[2],虽然由其引起的经济损失还不清楚。在江苏省调查的三个鸡场中,也发现有一个存在REV感染^[3]。我们的研究表明,在大多数由人工感染引起病毒血症的母鸡所产鸡蛋中可检出REV抗原^[4]。显然,REV很可能在鸡胚及CEF培养中自然引起潜在感染而又不引起明显的细胞病变。本文进一步用具体的试验资料证明,REV确能在CEF培养中与细胞长期共存,不断复制并释放到培养液中,但由于不引起明显的细胞病变而不易被发现。

正常CEF在体外培养中究竟能维持多久,现在还没有一个明确答案。在本研究中,这种可致肿瘤的病毒与CEF共存了近六个月,其生物学意义或许也是饶有兴趣的。

材 料 与 方 法

病毒 T株REV用于感染O-系CEF,这是从火鸡肿瘤病科中分离到的一个非缺陷性病毒株^[6]。

本文于1987年2月24日收到

鸡胚成纤维细胞 (CEF) : O-系是在美国农业部地方家禽研究所中维持的一个最特定病原品系, 包括无内源性鸡白血病毒病毒感染。11日龄的发育鸡胚用来制取原代 CEF。细胞培养液为添加4%犊牛血清的Leibovitz-McCoy培养液。细胞于转瓶或 Falcon 培养皿中, 在含有5%的CO₂的培养箱、37℃下培养。待CEF贴壁生长成单层后, 换以添加1%犊牛血清的相同培养液为维持液。以后每2—3天收集并更换培养液。为了传代细胞, 用0.025%胰蛋白酶溶液将CEF单层从转瓶或培养皿壁上消化下, 离心后将细胞沉淀再悬浮于新鲜的培养液。在传代过程中, 每个直径为150mm的培养皿(含20毫升培养液)接种约 20×10^6 CEF细胞。

病毒抗原的测定 用我们发展的酶标法^[4]测定感染细胞向培养液中释放的REV病毒抗原。简述如下: 96—孔微量酶标板经用对REV群共同性抗原单克隆抗体11A25和11C237^[5]包被后, 置于冰箱中保存备用。在测试时, 于各孔中分别加入100微升不同倍数稀释的感染细胞培养液, 在室温下置2小时后, 倾去培养液, 洗涤各孔。加100微升1:600兔抗REV血清, 放置2小时后洗涤。加1:1000山羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶标抗体, 置一小时后, 倾去并洗涤酶标板。最后于各孔中加入100微升底物溶液(溶于pH6.0的0.02mol/L磷酸盐缓冲液中的0.08%氨基水杨酸和0.005%过氧化氢混合溶液)。经40—60分钟后读数。用仅加有底物的孔将微量酶标反应读数计调至零点。当不同稀释度的待试培养液孔的读数为未感染CEF培养液的对照孔2.5倍以上时, 判为阳性。能表现阳性反应的感染细胞培养液的最大稀释倍数, 即是该培养液标本含有REV抗原的滴度。

结 果

接种于转瓶中并贴壁生长的原代CEF在感染REV后。连续培养了四个多月。每次换液时, 在倒置显微镜下检查细胞生长情况。细胞贴壁层一直保持良好完整。未见明显的细胞病毒变。在最初二个月内, 转瓶细胞培养液中REV抗原滴度维持在1:64~128, 以后逐渐下降至1:16~32。每次收集的细胞培养液在离心后均有明显的细胞碎片沉淀, 表明在这四个月中, 虽然没有用胰酶处理传代, 但细胞单层仍处于一个生长复制—脱落的动态平衡中。然后, 用胰酶将感染CEF从转瓶壁上消化下转入培养皿中培养传代。在传代过程中, 通常从一块培养皿消化下来的细胞再接种于二块新的培养皿中。如此每三天处理一次, 在近60天内共传了二十代。在此期间, 仍未见明显的细胞病变, 细胞生长复制贴壁的速度亦不变。但在二十次传代后, 培养液中REV抗原滴度降至1:8。其后, 将悬浮于含有5%DMSO的培养液中的感染细胞在液氮中保存了四个月。从液氮中取出后, 感染的CEF细胞又按上述方法在二十天内继续培养并传了六代后, 细胞停止繁殖、死亡。此期间培养液中REV抗原滴度降至1:2~4。

讨 论

CEF细胞培养虽已在病毒学研究中广泛地应用了许多年, 但对它在体外培养中究竟

能维持多久很少有具体的试验报道。本试验中最初是为了制备大量REV抗原, 将CEF接种于转瓶中并感染了REV。在连续收集病毒一个月后, 鉴于感染的CEF单层细胞仍表现良好, 促使我们将细胞培养维持下去, 看它在体外培养中究竟能持续多长时间。这次REV感染后的CEF在体外培养中竟持续了六个月, 经历了二十六次传代, 其原因之一可能与所采用的无特定病原的O-系鸡胚细胞有关。目前世界上有不少无特定病原鸡群, 但很少有几个是真正无内源性鸡白血病毒感染的品系。显然, 一些潜在病毒感染可能会影响CEF在体外培养中的活力。

鉴于REV感染在世界许多地方均已发现, 如果不使用SPF来源的鸡蛋, 在鸡胚及其细胞中可能存在的REV潜在感染将会干扰一些病毒在细胞培养上的生长及其相应的血清学反应或生产疫苗的质量。对于病毒学研究来说, 这是应引起重视的。

参 考 文 献

- [1] Witter, R.L., 1984, Reticuloendotheliosis. In *Diseases of poultry*. 8th Ed. M.S. Hofstad et al., Iowa State University Press, P.406-417.
- [2] Witter, R.L. et al., 1982, *Avian Diseases*. 26; 753-762.
- [3] 崔治中等, 1987, 中国畜禽传染病, No. 1, 37-38
- [4] Cui, Zhizhong et al., 1986, Abstracts of A.V.M.A 123d Annual Meeting, P.111.
- [5] Cui, Zhizhong et al., 1986. *J. Immunology*. 136; 4237-4242.
- [6] Robinsun, P.R. et al., 1974. *Avian Diseases*, 18; 237.