

单纯疱疹病毒Ⅱ型使人胚肺细胞转化的实验研究

曹宗离 仇素英 董杰德

陈晨华 曾莉 于修平 宋元弟

(山东医科大学, 微生物学教研室, 济南)

提要

用紫外线灭活的单纯疱疹病毒Ⅱ型使人胚肺细胞发生转化, 获得三系转化细胞。转化细胞呈多角形, 似上皮细胞。细胞形态符合瘤细胞特征。细胞染色体数目明显增多, 呈超二倍体型。体外培养时, 细胞长满单层后极易堆集重叠生长成锥体细胞群, 提示细胞的生长接触抑制消失。用间接免疫酶试验证实转化细胞内存在HSV特异抗原。HSV抗原在第51代转化细胞内仍持续存在。

关于单纯疱疹病毒(HSV)与人类宫颈癌的关系问题, 近十多年来国外许多学者从血清流行病学调查及从癌组织中检测HSV抗原和HSV DNA等方面进行了大量工作。我室也曾进行了宫颈癌病人血清中抗HSV抗体及宫颈脱落细胞中HSV抗原的检测^[1,2,3], 以上研究结果均提示HSV与宫颈癌的发生有一定的关系。HSV对体外培养细胞的转化作用为HSV的致癌性进一步提供了有力的证据。根据国外文献报道, 已被转化的细胞有田鼠、小鼠及大鼠的胚胎成纤维细胞^[4-10], 以及人胚肺细胞^[11-13]。在国内, 除湖北医学院报道了HSV对咽喉癌(HEP—2)传代细胞引起的某些改变外^[14], 尚未见有其他报道。

我室用紫外线(UV)灭活的HSV—2转化人胚肺二倍体细胞, 获得了三系转化细胞, 并对其进行了形态学、生长情况、抗原性、染色体数目等方面的鉴定, 现将结果报告如下。转化细胞的其他特性将另文报道^[15,16]。

材料与方法

一、病毒灭活: HSV-2 SaV株, 购自北京中国预防医学中心病毒研究所。在乳兔肾及人胚肺细胞上传代。灭活前将培养物在-20℃反复冻融三次, 再经超声波处理, 然后作适当稀释使病毒浓度分别为 $10^3\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 及 $10\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 。将上述病毒液加于6cm平皿中, 每皿1ml。置平皿于30W紫外灯管下30cm处照射。根据预试结果, 一部分平皿照射30分钟, 另一部分照射40分钟。

本文于1987年1月7日收到

本文中细胞学检查承我校病理学教研室于慎良教授协助进行。本总结承中国医学科学院肿瘤研究所李申德教授指正, 特此致谢。

二、感染方法：采用下列二种方法进行比较。

(一) 细胞单层感染法：取已长满单层的HBL细胞(第五代)数小方瓶，分组感染经紫外线灭活30分钟及40分钟的病毒液，病毒浓度为 $10\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ ，感染剂量约为每5000个细胞一个 TCID_{50} 。

(二) 细胞悬液感染法：将长满单层的HEL细胞(第11代)用胰酶消化，加营养液吹打制成细胞悬液。于细胞悬液中加等量病毒液感染。将感染后的混合液用营养液稀释成相当于 $1:2$ 传代的体积，分装于小方瓶中培养。用这种方法以两种不同浓度的病毒液分别感染两组细胞以比较不同感染剂量的转化效果。一组感染剂量为 $10\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ ，相当于2000个细胞一个 TCID_{50} ；另一组为 $1000\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ ，相当于20个细胞一个 TCID_{50} 。

用未灭活的HSV-2感染HEL细胞并以空白营养液模拟感染正常HEL细胞作为对照。

以上各组细胞均置 37°C 培养观察并按时传代。

三、细胞内HSV抗原检测：用间接免疫酶法^[2]。待检细胞或于培养瓶中直接固定后检查，或制成细胞滴片检查。免抗HSV-2免疫血清由本室自制^[1]，中和效价 $1:320$ — $1:640$ 。辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG抗体购自北京生物制品研究所。底物用DAB。为了解转化细胞内HSV抗原的持续存在情况，我们对各次代的转化细胞进行了HSV抗原的跟踪检测。共检测了下列各代细胞：

1. HEL-V-30'细胞第5、9、30代
2. HEL-V-40'细胞第5、19、51代。
3. HEL-V-M-1细胞第6、12、17、34、39代。

四、染色体检查：按常规方法进行^[15]，计数100个细胞的染色体数目。

结 果

一、形态及生长情况的改变：

用UV照射30分钟灭活的病毒感染的HEL细胞(下称HEL-V-30')及用UV照射40分钟灭活的病毒感染的HEL细胞(下称HEL-V-40')在第1、2代时均未出现HSV特异的CPE，亦未发生任何其它形态改变。传至第3代时，上述细胞单层中均出现多处多角形上皮样细胞灶(图1)。此种细胞灶随传代次数的增加而增多、扩大。HEL-V-30'及HEL-V-40'分别于第9代及第10代时扩展生长成单一的上皮样细胞单层，原培养物中的成纤维细胞已不可见(图2)。

用 $1000\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 及 $\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 二种剂量感染的HEL细胞悬液(下称HEL-V-M-1及HEL-V-M-3)，经24小时培养后生长成单层，细胞形态与感染前无区别。传代过程中亦未产生HSV特异的病变。当传至第5代时也开始出现多角形上皮样细胞转化灶。至第7代已长成为单一的上皮样细胞单层。

HEL-V-30'，HEL-V-40'及HEL-V-M-1生长迅速，按 $1:2$ 或 $1:3$ 传代时，

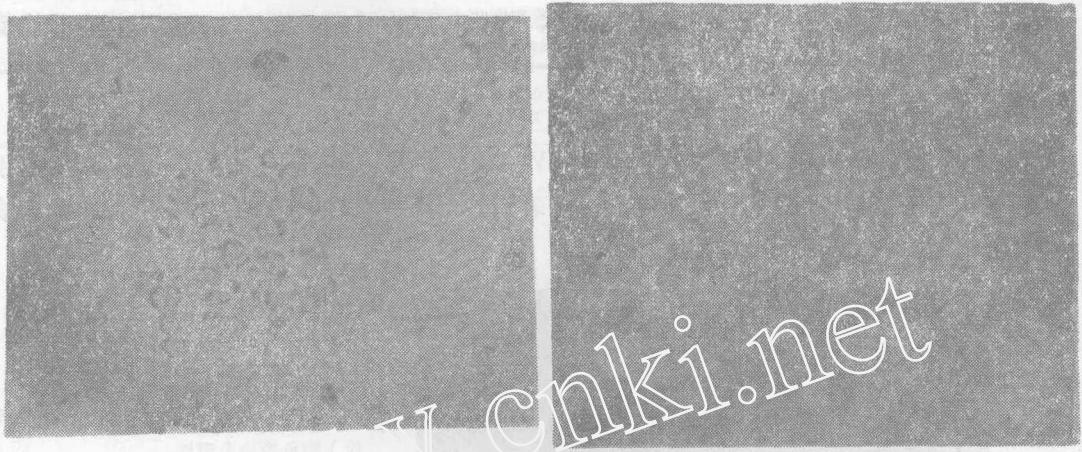


图1 HEL-V-30[‘]转化细胞系的转化灶(不染色)

Fig 1 Transforming focus from HEL-V-30 cell line (unstained)

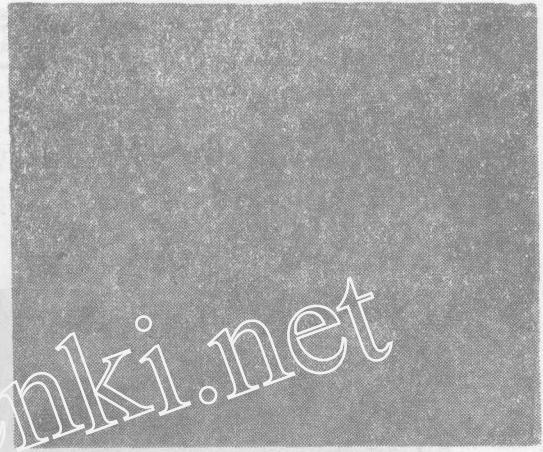


图2 HEL-V-30[‘]转化细胞, 示多角形上皮样细胞单层及堆集重迭的细胞群(不染色)

Fig 2 HEL-V-30 transformed cells, showing monolayer of polygonal epithelial cells and overlapped cell aggregates(unstained)

24—36小时即长满单层(正常HEL在相同条件下,需72小时以上才能长满单层)。此后再继续培养则生长成堆集重叠的锥体细胞群(图2)。说明细胞生长的接触抑制消失。

HEL-V-M-3在传代过程中细胞脱落不能继续传代。

各组对照细胞均未出现上述形态变化。

所获得的上述三系转化细胞现都已传至50代以上。

二、经姬姆萨染色后的形态检查结果:

三系细胞胞均呈现形态、大小及染色性不规则,细胞界限不清,染色质粗大且染色

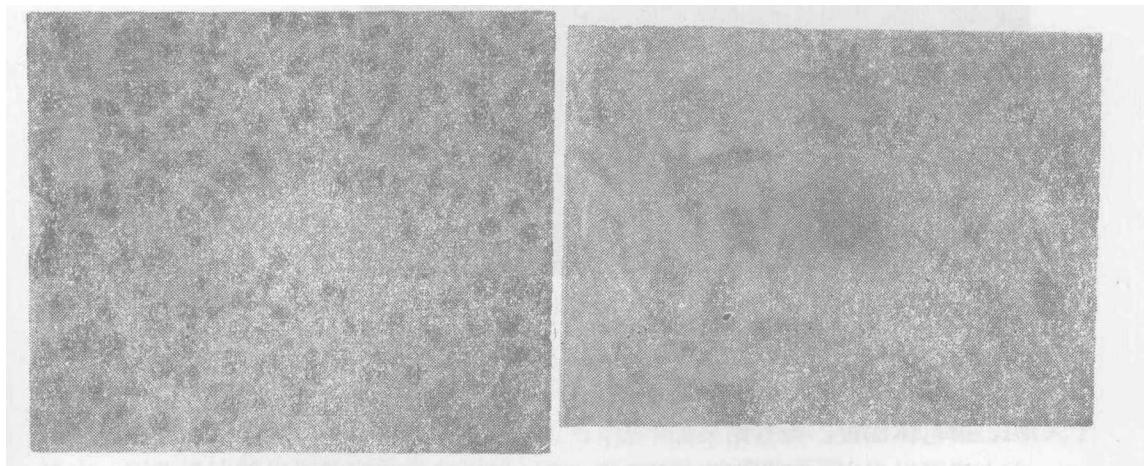


图3 HEL-V-M-1 转化细胞, 示瘤细胞特征(姬姆萨染色)

Fig 3 HEL-V-M-1 transformed cells, showing characteristics of tumor cell (Giemsa stained)



图4 HEL-V-40[‘]转化细胞(第5代)酶免疫染色阳性

Fig 4 HEL-V-40' transformed cell positively stained by immunoenzymatic technique. (the 5th passage)

较深。与正常HEL相比，形态差异很明显，细胞体积约增大二倍。细胞形态特点符合瘤细胞特征（图3）。

三、转化细胞内的HSV特异性抗原：三系转化细胞均表现免疫酶试验阳性（图4），说明均表达了HSV特异的抗原性。HEL—V—30'、HEL—V—40'及HEL—V—M—1分别于第30、51及39代仍呈阳性反应（图5），表明转化细胞内的HSV抗原至目前为止尚未表现出随细胞传代次数的增加而丢失现象。

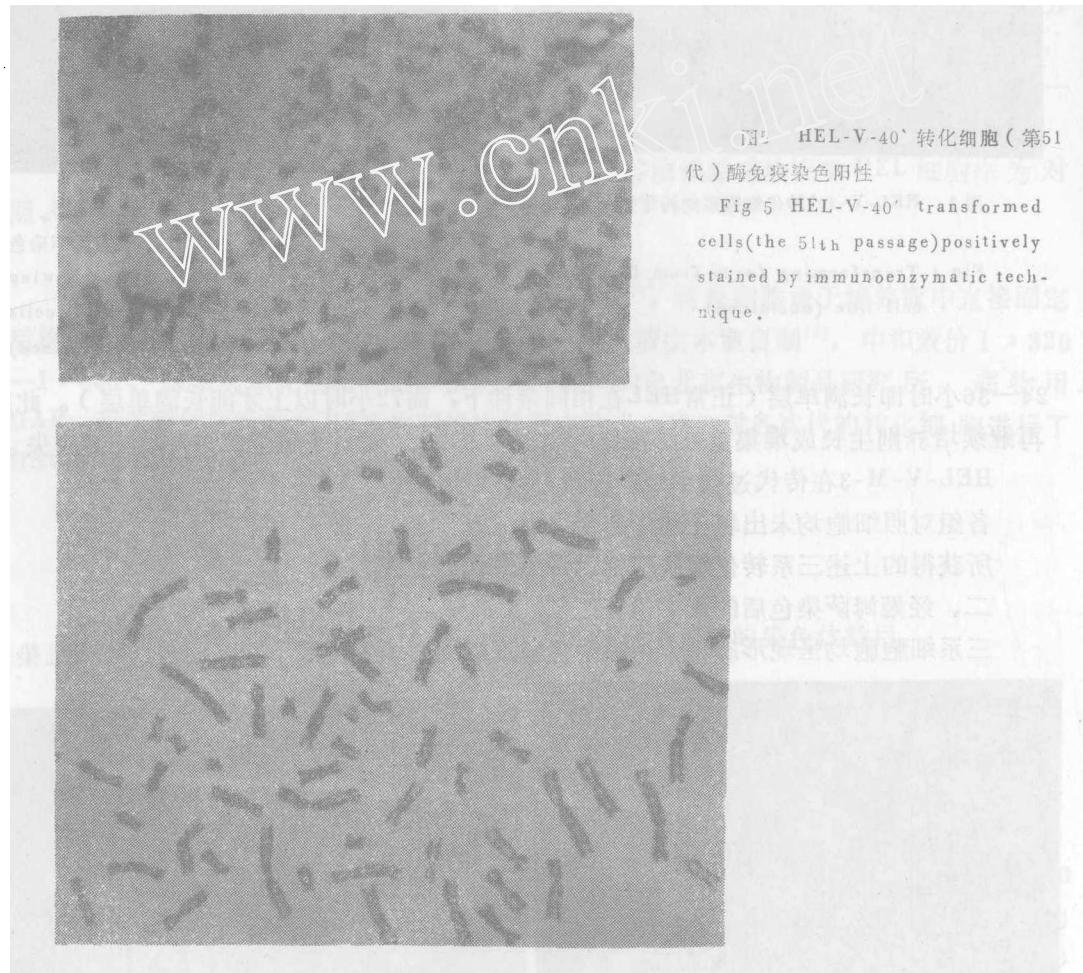


图4 HEL-V-40' 转化细胞(第51代) 酶免疫染色阳性

Fig 4 HEL-V-40' transformed cells(the 51th passage)positively stained by immunoenzymatic technique.

四、染色体检查：检查结果如下表：

由上表可以看出，转化细胞的染色体数目明显增加（图6），细胞由原来的二倍体型变为超二倍体型。

转化细胞染色体检查结果
Results of Chromosome Assay of Transformed Cells

染色体数目	正常 HEL	HEL-V-30' (第23代)	HEL-V-40' (第23代)	HEL-V-M-1 (第21代)
30	2		3	
32	4			
34	2		1	
36	5		1	
38	5			
40	12			1
42	11		1	2
44	6	1	1	1
46	53		2	
48		2	2	2
50				2
52	2			1
54		21	1	
56		14	13	
58		15	12	10
60		32	8	14
62			6	
64		13	11	34
66			17	4
68			4	17
70			6	2
72			2	4
74			1	
76				

讨 论

用人胚肺细胞为细胞模型进行转化实验难度较大。文献中报道的人胚肺转化细胞大都因存活时间太短，无法供作详尽的鉴定研究^[7,11-13]。我们用UV灭活的HSV-2作用于人胚肺传代细胞较成功地进行了转化实验，获得了三个细胞系。检查结果证明这三系细胞均具有瘤细胞特征并表达了HSV抗原性。

在原代人胚肺细胞单层中有两种形态不同的细胞：一种是成纤维细胞，另一种是上皮细胞。在传代过程中，成纤维细胞逐渐取代上皮细胞。我们用作转化实验的HEL细胞已传至第5代，此时，单层中成纤维细胞已占绝大多数，仅有极少数上皮细胞分散夹于其中。所获得的转化细胞究竟来自哪种细胞，尚待进一步实验证明。

用HSV-2作用于细胞进行转化实验的方法，文献报道有多种，其共同特点都在于使细胞不发生增殖性感染。用紫外线灭活病毒即在于改变病毒的遗传特性，使其裂解细胞产生CPE的功能破坏，而使细胞转化的功能不受影响。Rapp等指出^[17]，用紫外线灭活病毒必须严格控制照射剂量及时间。作者认为一般剂量应为42—46erg/S/mm²。关于

照射时间，一般以照射5—8分钟转化效率最高，时间过长，病毒即失去大部分转化能力^[8,9,17]。我们对紫外线灭活病毒所需的最适照射剂量及时间进行了多次试验。因为没有紫外线剂量测定仪，遂根据所用的30W紫外光灯管推算出相当于42erg/S/mm²照射剂量的距离为30cm（推算方法见附录）。在此条件下，照射30'—40'才能使病毒灭活。这与上述作者的结果相距甚远。其原因是多方面的；紫外线灯管的质量是重要的影响因素。此外，不同毒株对紫外线的敏感性也有相当大的差异^[18]。

实验中我们比较了三种不同感染剂量的转化效果。结果表明5000个细胞感染一个TCID₅₀即足以使细胞转化，过大的剂量对于转化效率并未显示任何区别。

可以推知，转化细胞内表达HSV特异抗原性，是细胞中曾存在有HSV基因的结果，但这种基因的真实存在尚须直接证明。有些作者的实验证明在转化细胞内并不是始终都能测出HSV基因，因而提出“打了就跑”（hit and run）的病毒致癌机制^[13,19]。目前我们正在用核酸杂交技术测定转化细胞内的HSV DNA片段的研究，初步获得阳性结果。

〔附录〕 紫外线照射剂量推算法：

1. 紫外线灯管所产生的能量一般按其标明的瓦数的30%估算。一瓦=10⁷erg/秒、故30W的灯管的能量约等于30×30%×10⁷erg/秒。

2. 按42erg/S/mm²的照射剂量，则30W灯管所产生的总能量可复盖的面积(S)等于：

$$S = 30 \times 30\% \times 10^7 / 42 \text{mm}^2 = 21.43 \times 10^5 \dots\dots (1)$$

3. 本实验室所用的30W紫外线灯管长度为920mm，其发射出的紫外线可及的圆柱面积(S)为：

$$S = 2\pi R \times \text{柱高} (\text{即管长}) = 2 \times 3.14 \times 920 \times R$$

$$= 5777.6 \times R$$

$$R = \frac{S}{5777.6} \dots\dots (2)$$

4.(1)代入(2)

$$R = \frac{21.43 \times 10^5}{5777.6} = 37.1 \text{mm}$$

R即为相当于达到42erg/S/mm²的照射剂量的距离。

参 考 文 献

- (1) 山东医学院微生物学教研室, 1980, 山东医学院学报, 2: 12
- (2) 仇素英等, 1984, 山东医学院学报, 1: 21。
- (3) 王浩舟, 1985, 山东医学院学报, 4: 60,
- (4) Duff R, et al., 1971, *J Virol*, 8: 496.
- (5) Duff R, et al., 1971, *Nature (New Biol)* 233: 48.
- (6) Duff R, et al., 1973, *J Virol*, 12: 209.
- (7) Rapp F., 1979, 在武汉学术报告。
- (8) Boyd A L, et al., 1975, *Int J Cancer*, 16: 526.
- (9) Duff R, et al., 1975, *J Virol*, 15: 490.
- (10) Darai G, et al., 1977, *Nature*, 205: 744.

- [11] Klaus G, et al, 1973, *Cancer Res*, 33 : 1535.
- [12] Darai G, et al, 1973, *Nature(New Biol)*, 241 : 268.
- [13] Kucera L S, 1976, *J Gen Virol*, 30 : 257.
- [14] 郑志明等, 1980, 湖北医学院报 1(4) : 27.
- [15] 仇素英等, 1986, 首届全国病毒学学术会议论文集, P.169.
- [16] 陈晨华等, 1986, 首届全国病毒学学术会议论文集, P.170.
- [17] Rapp F, et al, 1978, *Arch Virol*, 56(1-2) : 77.
- [18] Denise A, et al, 1983, *Nature*, 302 : 3.
- [19] Skinner B, et al, 1976, *Brit J Exper Path*, 57 : 361.

Transformation of Human Embryonic Lung Cells by Ultraviolet Irradiation Inactivated Herpes Simplex Virus Type 2

Cao Zong-li Qiu Su-ying Dong Jie-de
Chen Chen-hua Zeng-li Yu Xiu-ping Song Yuan-di

(Department of Microbiology, Shandong Medical University, Jinan)

Three transformed human cell lines were obtained after infection of human embryo lung cells with ultraviolet irradiation inactivated HSV-2. The transformed cells appear polygonal resembling epithelial cells. They are morphologically compatible with neoplastic cells. Chromosome examination showed hyperdiploid karyotype. In vitro, after confluence of monolayers they continue to grow into pyramidal masses indicating loss of contact inhibition. Indirect immunoenzymatic test revealed the presence of HSV antigen in the transformed cells. Expression of HSV antigen persisted up to the 51th passage.