

从人外周血单个核白细胞分离甲型肝炎病毒

郑纪山 林建汶 李法卿

(南京军区军事医学研究所, 南京)

郑 启 裕

(南京市传染病医院)

乐 美 兆

(南京军区第八十一医院, 南京)

提 要

选择HAV-Ag免疫荧光阳性的人血单个核白细胞标本, 冻融后接种PLC/PRF/5细胞, 分离到两株HAV (NJ-3和H-1株), 并经血清学和形态学等鉴定证实。本实验提示: HAV不仅游离存在于血浆内, 而且可与血白细胞相伴随。采用免疫荧光法筛选白细胞标本作接种物, 方法简单, 可作为分离HAV的新材料的来源。

受到其它病毒可存在于人血白细胞的启示^[1,2], 我们于1985年采用间接免疫荧光法(IF)发现甲肝患者外周血白细胞中有甲肝病毒抗原(HAV-Ag)存在, 并采用敏感的PLC/PRF/5细胞株从人血单个核白细胞中分离到两株HAV (NJ-3株和H-1株)。现将病毒分离和鉴定结果报告如下。

材 料 与 方 法

一、血标本来源和处理: 分离病毒的血标本采自临床确诊的急性肝炎患者外周血。NJ-3株采自发病第7天的12岁患儿, H-1株采自发病第5日的两名患者(因采血量少而混合。肝素抗凝每毫升血10单位。血清经ELISA检测抗HAV-IgM阳性, 白细胞涂片作IF染色HAV-Ag阳性。抗凝的血标本经淋巴细胞分离液处理, 收集单个核细胞层(包括淋巴细胞和单核细胞), 经Hanks液反复洗涤, 冻融3—5次, -20℃存放备用。

二、PLC/PRF/5细胞株: 购自上海医科大学。生长液为含10%小牛血清的MEM Eagle's培养液, 维持液含2%小牛血清。

三、病毒接种与传代: PLC细胞经2—3天长成致密单层, 倾去培养液, 经无血清

本文于1987年6月15日收到。

Eagle's液洗涤后,接种单个核细胞冻融液,37℃吸附4小时,加入4ml维持液转至32℃培养。隔日换液,定期留取脱落细胞作IF检测。根据抗原检测及细胞生长情况择期传代。初代病毒1:1传,次代病毒作1:2—4传,以后按每瓶细胞接种1000个TCID₅₀。

四、IF检测HAV-Ag:将脱落细胞点片,或用胰酶消化PLC细胞点片,于5%CO₂ 37℃环境让细胞贴壁生长24小时,常规干燥固定。滴加兔抗HAV或甲肝恢复期血清(1:100稀释)于抗原片上,37℃温育30分钟,PBS洗涤后滴加4个工作单位羊抗兔或羊抗人IgG荧光抗体(上海生物制品研究所产品,用含0.2%伊文思蓝的PBS稀释),37℃孵育30分钟,洗涤后用荧光显微镜观察。

五、免疫酶染色测HAV-Ag:按上法制各抗原片,直接滴加HRP-抗HAV(1:30稀释),37℃孵育30分钟,洗涤干燥后加底物3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐,水洗干燥后封片用油镜观察。

六、免疫电镜观察:收获接种HAV的PLC细胞,冻融3-5次,7000r/m离心30分钟,取上清与等量1:10稀释的抗HAV血清混合,37℃孵育1小时再置4℃过夜,取液直接滴于100目铜网上,用1%琼脂糖凝胶吸去水份,3%磷钨酸染色1-2分钟,用透射电镜观察。

七、IF阻断试验和替代试验:为了证实病毒的特异性,我们采用HAV免疫前后的兔血清分别进行阻断,再相继加入甲肝患者恢复期血清和羊抗人荧光抗体进行IF阻断试验;用接种病毒和未接种病毒的PLC细胞抽提液代替从粪便中分离的HAV,用ELISA法测甲肝患者血清中的抗HAV-IgM。

八、TCID₅₀测定:取第4代病毒抽提液,用无血清Eagle's液作连续10倍稀释,每小瓶细胞接种0.1ml,15天后点片测HAV-Ag荧光,按kärber法^[3]计算TCID₅₀。

结 果

一、病毒分离与传代

(一)IF检测。初代培养中NJ-3株于第24天可以见到个别细胞HAV-Ag阳性,但荧光甚弱,于30天收获后接种第二代,第14天即可见到阳性细胞达10%。经连续传代后IF可达70%左右,且随培养时间延长而荧光强度增加。一般可在两周左右收获。H-1株初代培养至30天IF仍为阴性,传至第二代于培养30天时,IF阳性细胞亦仅只5%,现已传至第6代,维持培养20天也已达15—20%的阳性率。

脱落细胞IF阳性后,再作贴片细胞IF检测,可以见到大小不等的荧光颗粒存在于PLC的胞浆内(图1,2)。未接种的对照PLC细胞IF检测为阴性。

(二)免疫酶染色。在感染细胞的胞浆内有大小不等的棕褐色酶染颗粒。对照细胞为阴性。

在整个病毒分离与传代过程中,未见细胞病变。

二、病毒鉴定

(一)免疫电镜观察。NJ-3株和H-1株均可观察到直径为27—30nm大小的成堆病

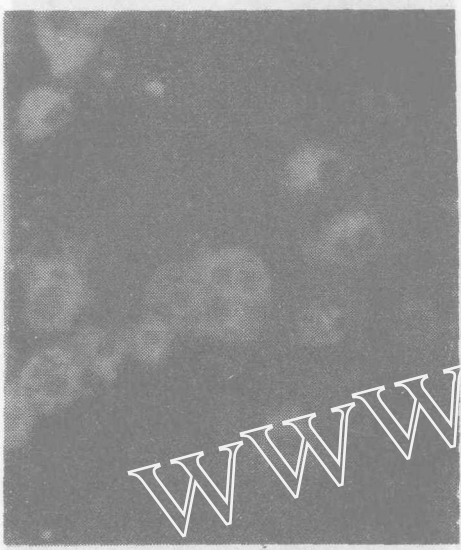


图1 第7代HAV NJ-3株接种PLC/PRF/5细胞后第12天间接IF染色,IF颗粒存在于胞浆内。

Fig 1 Photomicrograph of HAV-NJ-3 strain serially passed 7 times at the 12th day after infecting PLC/PRF/5 cells stained by IF. The IF granules are present in the cytoplasm.

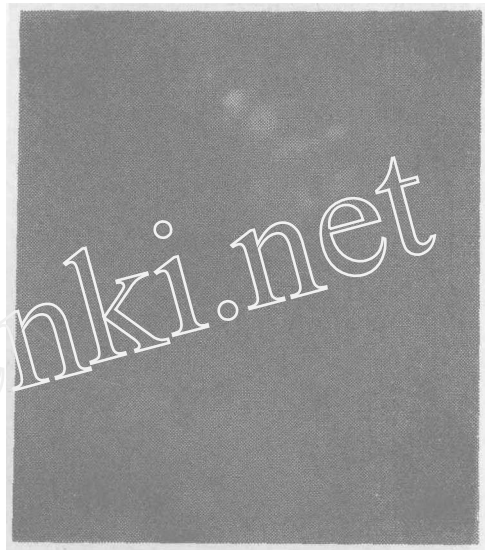


图2 第7代HAV H-1株接种PLC/PRF/5细胞后第12天间接IF染色。

Fig 2 Photomicrograph of HAV H-1 strain serially passed 7 times at the 12th day after infecting PLC/PRF/5 cells stained by IF.

毒颗粒,呈空心 and 实心两种形态(图3,4)。

(二) IF阻断试验。甲肝抗体阳性兔血清可阻断NJ-3和H-1的IF染色,阴性兔血清则不能。

(三) 用NJ-3株病毒抽提液代替人粪便中分离的HAV-Ag,测病人血清中的抗HAV-IgM。阴性及阳性标本各20份。用NJ-3株检测之阳性率与用粪便HAV-Ag检测结果完全一致。但用NJ-3株作抗原所测标本之P/N值略低于后者,可能与抗原量有关,如加以浓缩有可能提高前者的OD值。

(四) 第4代NJ-3的TCID₅₀为 $10^{-5}/0.1\text{ml}$ 。

讨 论

自1979年Provost^[4]首次分离HAV成功以来,至今用以分离甲肝病毒的材料主要是病人粪便,亦有取材于病人血清及实验感染动物肝脏的报道^[5-8]。本研究应用PLC/PRF/5细胞从甲肝患者发病早期的外周血单个核白细胞中分离到两株HAV,并经血清学、形态学检查证实其特异性。

在本研究中,我们用IF法在相当数量的早期甲肝患者外周血白细胞中可以测到HAV-Ag,呈大小两种荧光颗粒,并能用敏感的PLC细胞分离到HAV。这一结果提示,HAV不仅可在血浆中游离存在,形成短暂的病毒血症期,而且可与血白细胞相伴随。即使在抗HAV-IgM存在的情况下,仍可用IF法测出血白细胞中的HAV-Ag,这可能与中

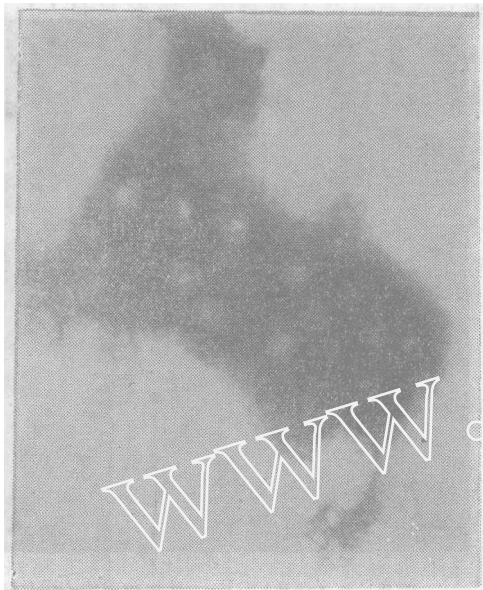


图3 HAV NJ-3株免疫电镜, 磷钨酸负染。
(50000×3.5)

Fig 3 Immunoelectron micrograph of HAV NJ3 strain negatively stained by phosphotungstic acid. (50000×3.5)

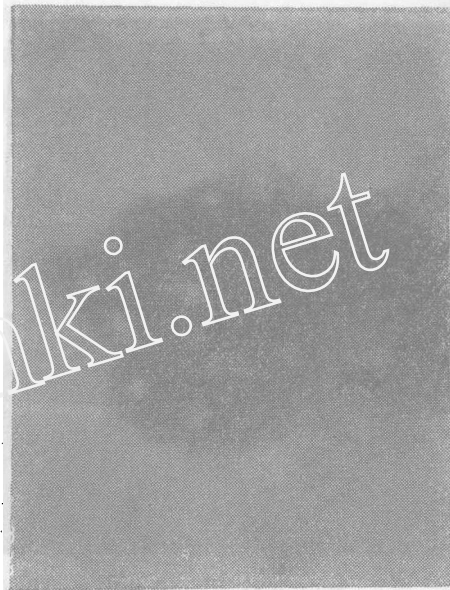


图4 HAV H-1株免疫电镜, 磷钨酸负染。
(50000×3.5)

Fig 4 Immunoelectron micrograph of HAV H-1 strain negatively stained by phosphotungstic acid. (50000×3.5)

和抗体不易作用于细胞内有关。

与用粪便悬液作接种物相比^[7], 白细胞接种物对传代细胞几无毒性。而且吸附后无须倾去接种物, 且在初代培养中, 接种标本的 PLC 可与对照细胞维持培养同样长的时间, 是为一分离 HAV 的新的材料来源。与从粪便标本分离 HAV 之方法比较有一定的优越性。

两株 HAV 初次荧光出现时间不同, 可能与采血量及白细胞中感染的 HAV 数量有关。但经传代, 二株病毒的 IF 阳性率不同, 可能反映了不同毒株间的差异。

从外周血白细胞中分离到 HAV, 对于研究病毒在细胞内的定位, 病毒传播及细胞免疫功能, 以及甲肝的发病机理均有一定意义。HAV 存在于白细胞内究竟为吸附吞饮过程, 抑或能在其中增殖, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Scott, R.M. et al; 1980, *J. Infect. Dis* 141(1); 1-6
- [2] 李法卿等, 1985, 江苏医药. (10); 23
- [3] 戴华生, 1984, 《新实验病毒学》第一版, 人民卫生出版社 p135.
- [4] Provost, P.J, 1879, *PSEBM*, 160; 213
- [5] 胡孟冬, 1982, 上海医学. 5; 249
- [6] Daemey, R.J. et al, 1981, *Inf Immun* 32(1); 388
- [7] 郑纪山等, 1986, 江苏医药. 12(11); 582

Isolation of Hepatitis A Virus in Vitro Directly from Peripheral Blood Mononuclear Cell of Patients with Hepatitis A

Zheng Ji-shan, Lin Jian-wen, Li Fa-qing

(*Institute of Military Medicine, Nanjing Command, PLA, Nanjing*)

Zheng Qi-ge

(*Nanjing Hospital for Infectious Disease Nanjing*)

Le Mei-zhao

(*81th Hospital, Nanjing Command, PLA, Nanjing*)

HAAg were detected from the samples of peripheral blood mononuclear leukocytes of patients with hepatitis A using IF technique. The positive samples were frozen and thawed 3 times and inoculated into PLC/PRF/5 cell cultures. Two strains of HAV were isolated. The isolates proved to be HAV based on specific activity in serologic tests and morphology. The results of our studies suggested that HAV be present not only in the serum freely but also associated with leukocytes. It is a simple method to screen the samples of blood leukocytes using IF technique and to isolate HAV from the positive samples. This method provides a new way for isolating HAV.