

134-137

3162(5)

第7卷第2期
1992年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.7 No.2
Jun.1992

细胞分离戊型肝炎病毒的初步研究

殷书荣 刘玉堂[✓] 田 辛
鲍作义 蒋豫图 张习坦

R373.21

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京100071)

提 要

本文报告用 2BS 细胞分离戊型肝炎病毒 (HEV) 感染成功的猴肝脏标本中的 HEV 的初步结果, 将 2BS 细胞长成致密单层, 接种已知含有 HEV 的肝悬液, 盲传至第 4 代, 发现在第 27 天细胞出现了轻度的细胞病变 (CPE), 随着进一步的传代, 细胞病变时间逐渐提前。至第 7 代时, 在第 17 天就可见到 CPE, CPE 的主要特征是细胞间隙变宽, 透明度降低和轻度细胞破坏, 无大片细胞溶解和脱落现象。免疫电镜检查在第 5 代和第 6 代细胞培养液中见到很少的 27—34nm 的病毒颗粒。将第 4 代至第 7 代的细胞悬液 20ml 接种了 3 只恒河猴, 有 2 只猴在 24 天和 26 天出现了典型的 ALT 升高, 待这 3 只猴恢复正常后一年, 再次接种以上细胞悬液 20ml, 3 只猴全部发生了 ALT 升高, 并在胆汁中检测到 27—34nm 的病毒颗粒, 我们初步推测 2BS 适应的这株病毒很可能是戊型肝炎病毒。

关键词: ~~戊型肝炎病毒~~ 细胞培养 2BS 细胞 戊肝病毒

到目前为止, 许多国家^(1,2)和我们实验室⁽³⁾均利用动物分离出戊型肝炎病毒 (HEV)。但细胞分离 HEV 尚未成功。本文报告用 2BS 细胞分离 HEV 感染成功的猴肝脏标本中的 HEV 的初步研究结果。

材 料 和 方 法

一、感染材料 新疆一例经流行病学和血清学确诊的非甲非乙肝炎 (戊型肝炎) 病人潜伏期粪便感染恒河猴, 猴发生了典型的 ALT 升高和肝组织的肝炎特征改变。用猴肝组织制备成肝细胞悬液后再感染恒河猴也发生了典型的肝炎, 并从粪便中分离到较多的 HEV。用这种肝细胞悬液同时接种 2BS 细胞进行细胞分离 HEV 的研究。

二、细胞 胎儿肺经消化处理后, 用含 10% 小牛血清的 Eagle's 液在 25cm² 的细胞培养瓶中进行单层细胞培养, 当细胞传至第 5 代后, 细胞已很稳定地维持在 4 周以上。

三、培养方法 长成致密单层的 2BS 细胞分 4 组, 即接种肝悬液 1.0ml, 2.0ml, 3.0ml 和空白对照, 每组接种 2 瓶维持 2 周, 每组保留一瓶继续培养, 冻融其余细胞, 离心, 取上清液。每组再分为 4 组即接种细胞上清液 1.0ml, 2.0ml, 3.0ml 和空白对照组。细胞维持 2 周, 每组保

本文于 1991 年 4 月 24 日收到, 9 月 18 日修回

留一瓶继续培养, 按此程序盲传, 细胞维持温度为 33°C , 细胞维持液含 1% 小牛血清 Eagle's 培养基。

四、细胞培养液接种恒河猴

1. 接种物: 上述接种猴肝细胞悬液的第 4 代至第 7 代混合 2BS 细胞上清液。
2. 动物: 实验室繁殖的 3 只恒河猴, 年龄 1—1.5 岁, 并在实验室观察 2 周以上。
3. 接种途径和剂量: 静脉注射 20ml。
4. 采用赖氏法测定猴 ALT, 用 SPRIA 和 ELISA 检测猴抗-HAV-IgM、抗-HAV、HBsAg 和抗-HBc-IgM。

5. 免疫电镜方法 (IEM) 检测细胞培养液, 猴粪便和胆汁中的病毒颗粒。

细胞培养物冻融 3 次, 超声波粉碎, 离心除去细胞碎片, 3.0ml 上清加含 10% HE 病人急性期血清的 PBS 0.5ml 37°C 1 小时, 4°C 过夜, 40000g 离心 2 小时, 弃去上清, 沉淀物用 $40\sim 50\mu\text{l}$ PBS 悬浮, 覆盖铜网, 磷钨酸染色, 电镜观察。

粪便和胆汁中的病毒颗粒的电镜检查参照文献 [3, 4]。

结 果

一、细胞形态观察

致密单层 2BS 细胞接种 HEV 感染成功的猴肝细胞悬液后, 在 3.0ml 肝悬液接种瓶盲传至第 4 代, 在接种后第 27 天出现了轻微的变化。在 1.0ml 和 2.0ml 肝悬液接种瓶在第 6 代时细胞也出现了同样的变化。随着进一步的传代, 细胞病变时间逐渐提前, 至第 7 代时, 17 天就可以见到细胞病变 (CPE), CPE 的主要特征是细胞间隙变宽, 透明度降低, 轻度细胞破坏, 无大片细胞脱落现象。

二、细胞培养物中病毒颗粒免疫电镜检查

在接种肝细胞悬液后的第 5 代以及后续的培养物中 观察到 27—34nm 的病毒样

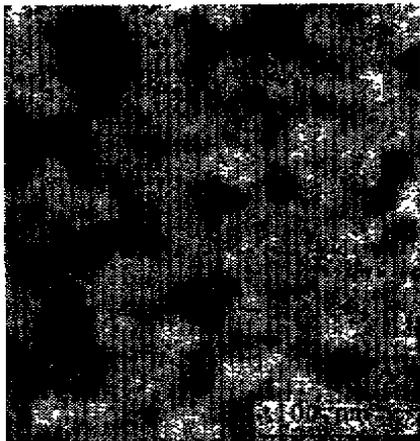


图 1. IEM ($\times 200,000$) 第 6 代细胞培养物中的病毒样颗粒

Fig 1. IEM ($\times 200,000$). Virus-like particles observed in cell cultures in the sixth passage

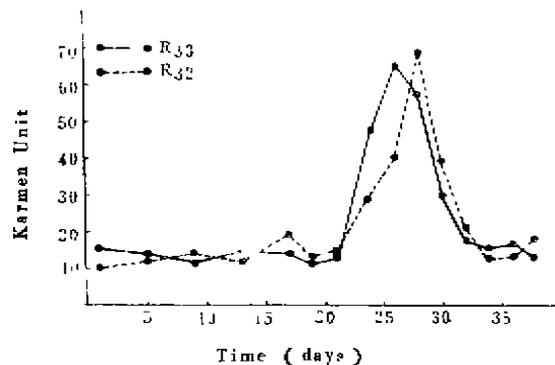


图 2. R₃₂、R₃₃ 接种 HEV 细胞培养物后的 ALT 变化

Fig 2. ALT levels in Rhesus monkeys (R₃₂ and R₃₃) inoculated with cell cultures of HEV

颗粒,病毒颗粒的形态特征与猴粪便中分离的 HEV 相似(图 1)。

三、细胞培养物接种恒河猴

第 4 代至第 7 代的细胞培养物混合, 10000r/m 离心, 上清液注射 3 只恒河猴后, 有 2 只在第 24 天和 26 天开始出现 ALT 异常升高, 持续时间约一周, 肝组织出现肝炎的特征表现(图 2)。

在这两只猴 ALT 恢复正常后一年, 再次攻击上述细胞培养物, 3 只猴均发生了 ALT 升高, ALT 的峰值较第一次为高(图 3)。在这 3 只猴 ALT 升高期间的粪便中用 IEM 观察到集聚的典型的 27—34nm 的病毒颗粒, 并在其中一只尸检的猴胆汁中也观察到同样的病毒颗粒(图 4)。

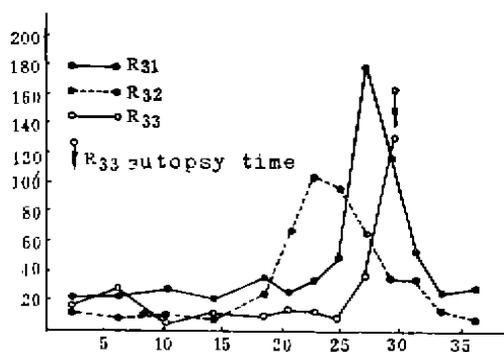


图 3. R₃₁、R₃₂、R₃₃在第一次接种 HEV 细胞培养物 ALT 恢复正常后一年再次接种 HEV 细胞培养物后的 ALT 变化

Fig. 3. ALT levels in Rhesus monkeys (R₃₁, R₃₂ and R₃₃) inoculated with cell cultures of HEV one year after the first inoculation

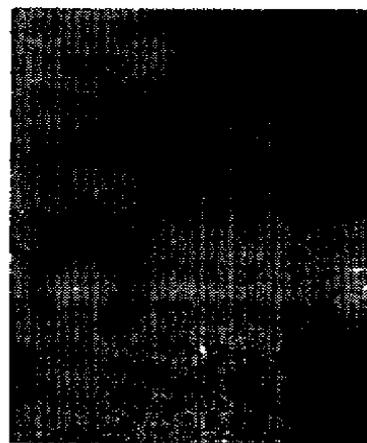


图 4. IEM(×300, 000). 接种 HEV 细胞培养物的猴 (R₃₃) 胆汁中的病毒样颗粒

Fig. 4. IEM(×3000, 000). Virus-like particles observed in bile fluid from a monkey (R₃₃) inoculated with cell cultures of HEV

讨 论

1987 年 Pillot 等^[5] 报告 PLC/PRF-5, HEP-G-2 或 MRC-5 细胞培养散发非甲非乙型肝炎病人急性期粪便中的病毒, 在 PLC/PRF-5 细胞中检测到相关的抗原, 并认为这种抗原牢固地结合于细胞上。1989 年 Soe 等^[1] 报告用食蟹猴肝细胞培养 HEV, 细胞中观察到病毒样颗粒, 未观察到细胞超微结构的变化。我们实验室用经证明有感染性的恒河猴肝组织悬液接种 2BS 细胞, 在 3 周左右的时间里出现轻微的细胞病变, 并在细胞培养物中观察到病毒样颗粒, 感染恒河猴后出现肝炎症状。由于病人和猴感染戊型肝炎病毒后产生的抗体水平低^[7], 我们相隔一年, 用细胞培养物再次攻击恒河猴, 猴都发生了肝炎的症状。虽然我们还不能用特异的血清学方法检测其中的抗原(现正在研究中), 并由于病毒量少尚不能用生化方法鉴定该病毒。但从上述结果可以初步推测细胞

培养物中含有致动物肝炎病毒, 并且很可能是戊型肝炎病毒。细胞培养物中未检测到甲型肝炎和乙型肝炎病毒抗原。

参 考 文 献

- [1] Balayan, MS, et al., 1983, *Intervirology* 20: 23.
- [2] Bradley, DW, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6227.
- [3] 殷书荣等, 1990, *病毒学杂志* 5: 265.
- [4] Uchida, T, et al., 1990, *Japan. J. Exp. Med.* 60: 23.
- [5] Pillot, J, et al., 1987, *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* 138: 145.
- [6] Seo, S, et al., 1989, *Liver* 9: 135.
- [7] Bradley, DW, et al., 1988, *J. Gen. Virol.* 69: 731.

Preliminary Report of Cell Culture of Hepatitis E Virus

Yin Shu-rong Liu Yu-tang Tian Xin
Bao Zuo-yi Jiang Yu-tu Zhang Xi-tan

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Hepatitis E virus (HEV) was isolated in human embryonic lung cell inoculated with liver tissue suspension from an HEV-infected rhesus monkey. Slight cytopathic effect (CPE) appeared at the 27th day after 4 blind passages of viruses in cell cultures to at 17th day after 7 passages. Low amounts of 27—34nm virus-like particles (VLPs) in cell cultures were visualized by immunoelectronmicroscopy (IEM). 2 of 3 rhesus monkeys inoculated with 20ml of pool of cell cultures from 4 to 7 passages developed significant elevation of ALT levels and all of those monkeys inoculated with the same cell cultures one year after their recovery developed typical hepatitis. 27—34nm VLPs in their bile juice were found by IEM. It is concluded that those cell culture-adapted viruses may be hepatitis E virus.

Key words, Hepatitis E virus Cell culture Human embryonic lung cell