维普资讯 http://www.cqvip.com

31-38

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar. 1993

轮状病毒新敏感细胞的筛选*

孟继鸿 张建琼 林 陵

(6)

R373.2

（南京铁道医学院微生物学教研室，南京210009）

提 要

轮状病毒（RV）的细胞培养问题尚未完全解决，其原因之一可能与敏感细胞较少有关。为此，我们进行了RV新敏感细胞的筛选，发现恒河猴胚肾传代细胞Frhk-4感染不同血清型的人和动物RV标准株Wa、DS-1、YO、ST-3、SA-11和UK后，37℃旋转或静止培养均能产生明显CPE。培养物经ELISA测定含RV抗原，用PAGE检测有特征性RV核酸图型，电镜超薄切片检查感染细胞可见RV颗粒，证实Frhk-4是RV的敏感细胞，这在国内外尚未见报道。同时与MA104和CV-1细胞的比较研究表明，三种细胞对Wa和DS-1的敏感性及增殖滴度，以CV-1最高，Frhk-4次之，MA-104最低。

关键词：病毒增殖 轮状病毒 Frhk-4细胞 敏感细胞

轮状病毒（RV）有A、B、C、D、E、F六个组，现仅有A组和C组的某些毒株可以进行细胞培养。虽采用胰蛋白酶处理病毒，旋转培养和在维持液中加入胰蛋白酶等手段，将人RV的细胞培养分离率提高到50%左右[1]，但病毒增殖滴度不高，有的毒株尚无致细胞病变作用(CPE)。因此，RV的细胞培养问题仍未完全解决。不少学者从研究RV敏感细胞入手，发现原代细胞如原代非洲绿猴肾细胞（AGMK）、原代弥猴肾细胞（CMK）比传代细胞对RV更敏感[2-3]。然而，原代细胞因来源、成本、制备等方面的问题，难以普及，人们仍乐意应用传代细胞。但目前对RV敏感的传代细胞种类甚少，常用的仅MA104和CV-1两种。为此，我们开展了RV新敏感细胞的筛选，发现恒河猴胚肾传代细胞Frhk-4对RV敏感。本文报告Frhk-4用于RV标准株培养及与MA104、CV-1比较的结果。

材 料 和 方 法

1. 细胞和病毒 MA104(引自江苏省农业科学院)、CV-1(引自安徽省医学科学院)、Frhk-4（引自南京军区军事医学研究所）、Hep-2（引自南京市儿童医院病毒室）和人胚肺传代细胞（HEL，引自湖北医学院病毒所）按常规均以含10%小牛血清的Eagle MEM营养液传代培养，长成单层后使用。人RV标准株Wa（1型，引自浙江医科大学微生物学教研室）、DS-1（2型，引

本文于1992年3月10日收到，6月13日修回。
*铁道部青年教师科学基金资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

自中国预防医学科学院病毒学研究所）、YO（3型，引自安徽省医学科学院）和ST-3（4型，来源同DS-1），动物RV标准株SA-11和UK（3型和6型，来源同Wa），在CV-1上增殖后，贮于－70℃备用。

2. 胰蛋白酶耐受试验 将Frhk-4、Hep-2和HEL等筛选细胞与MA104、CV-1分别传入24孔培养板内，置CO_2培养箱37℃孵育，长成单层后用Hanks液洗涤2次，加入含不同浓度胰蛋白酶（Difco，比活性1：250）的Eagle MEM维持液1ml/孔，继续孵育并于不同时间观察细胞对胰蛋白酶的耐受情况。

3. RV细胞培养 病毒以终浓度为10μg/ml胰蛋白酶37℃处理1小时，细胞在24孔培养板内或3.5×1.5cm小方瓶内长成单层后，以Hanks液洗涤2次，接种病毒悬液0.1ml/孔（瓶），并设正常对照，37℃吸附1小时后，弃去接种液，Hanks液洗2次，再加含1μg/ml胰蛋白酶的Eagle MEM维持液1ml/孔（瓶），24孔培养板置CO_2培养箱37℃静止培养，小方瓶于37℃旋转培养（位置需要调节好以免细胞脱落），定时观察CPE。

4. 电镜超薄切片检查 将感染RV后的细胞刮下，离心后，沉淀用4%戊二醛固定，1%琼脂糖顶包埋，1%四氧化锇固定2小时；经丙酮梯度脱水后，Epon 812环氧树脂包埋，LKB-Ⅴ超薄切片机切片；醋酸双氧铀及柠檬酸铅染色，H-600型电镜观察照相。

5. RV-PAGE 按文献[4]进行。

6. RV-ELISA 采用卫生部兰州生物制品研究所生产的RV-ELISA试剂盒，按使用说明操作。以华东电子管厂生产的DG-3022A ELISA测定仪判定结果。

7. RV空斑滴定 参照文献[5]进行，凝胶复盖物内胰蛋白酶浓度改为1μg/ml。

结 果

1. 胰蛋白酶耐受试验

试验所用胰蛋白酶最终浓度分别为0（对照）、0.5、1、2、3、5、10和20μg/ml，于37℃孵育1、2、24、48或72小时，按时取出观察Frhk-4、Hep-2和HEL等筛选细胞以及MA104、CV-1细胞对胰蛋白酶的耐受情况。如不能耐受胰蛋白酶的作用，则细胞形态发生改变，表现为细胞变长、变圆、拉网、堆聚或脱落，结果如表1。可见细胞对胰蛋白酶的耐受性依次为MA104、CV-1、Frhk-4、Hep-2和HEL，但均随胰蛋白酶浓度的增高和作用时间的延长而降低。20μg/ml胰蛋白酶作用2小时，1μg/ml作用72小时，Frhk-4形态无变化，故可作为筛选RV敏感细胞的候选细胞。

2. RV在Frhk-4上的CPE

分别将RV标准株Wa、DS-1、YO、ST-3、SA-11和UK接种到Frhk-4后，无论旋转或静止培养均能出现明显CPE，表现为细胞变圆、脱落、有轻度拉网现象，见图1。如感染倍数为0.1～1，一般感染后10小时左右CPE开始出现，48小时左右CPE可达卅，但动物RV比人RV CPE进展较快。

3. 电镜超薄切片检查

分别将RV标准株Wa、DS-1、YO、ST-3、SA-11和UK接种到Frhk-4后，37℃静止培养，待CPE达＋～＋＋时，将感染细胞作电镜超薄切片检查，结果均能查出RV颗粒，或散在、堆聚在胞浆中，或存在于内质网和溶酶体中，且可为单层壳、双层壳或带包膜

维普资讯 http://www.cqvip.com

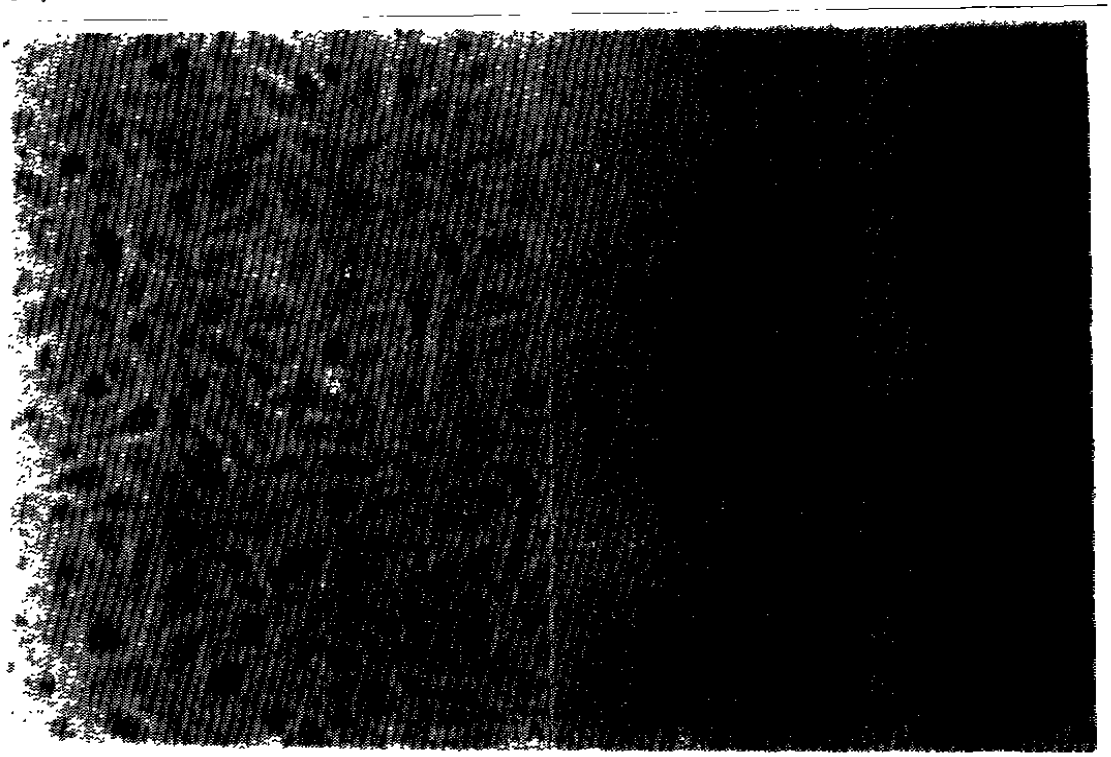

图1. RV在Frhk-4细胞上的CPE

Fig.1 Cytopathic effect of rotavirus on Frhk-4 cells

A. 正常Frhk-4细胞　　B. DS-1感染的Frhk-4细胞

A. Normal Frhk-4 cells　　B. Frhk-4 cells infected with DS-1 strain

的RV颗粒，如图2。

4. RV-PAGE

将RV标准株Wa、DS-1、YO、ST-3、SA-11或UK分别接种至Frhk-4、MA104和CV-1上，37℃静止培养后，各取培养物100μl，提取核酸，进行RV-PAGE。结果均为阳性。同份标准株在三种不同细胞上培养后，其核酸图型均相同，混合电泳也未见差异。

5. RV-ELISA

将RV标准株Wa、DS-1、YO、ST-3、SA-11或UK以相同感染倍数分别接种至Frhk-4、MA104和CV-1上，37℃静止培养后，以ELISA测定RV培养物抗原，结果均为阳性，但同份毒株在不同细胞上培养后，其上清液的抗原OD值高低不一，见表2。

6. Frhk-4、MA104和CV-1对RV敏感性的比较

将在CV-1上增殖的RV标准株Wa和DS-1分别在Frhk-4、MA104和CV-1三种细胞上同时进行空斑滴定，结果如表3。可见三种细胞对Wa和DS-1的敏感性依次为CV-1、Frhk-4和MA104。

7. 不同RV在Frhk-4、MA104和CV-1上增殖后滴度的比较

将RV标准株Wa和DS-1以相同感染倍数分别接种至Frhk-4、MA104和CV-1上。37℃静止培养后，在MA104细胞上进行空斑滴定，结果如表4。可见Wa和DS-1在CV-1上增殖滴度最高，Frhk-4次之，MA104上滴度最低。

维普资讯 http://www.cqvip.com

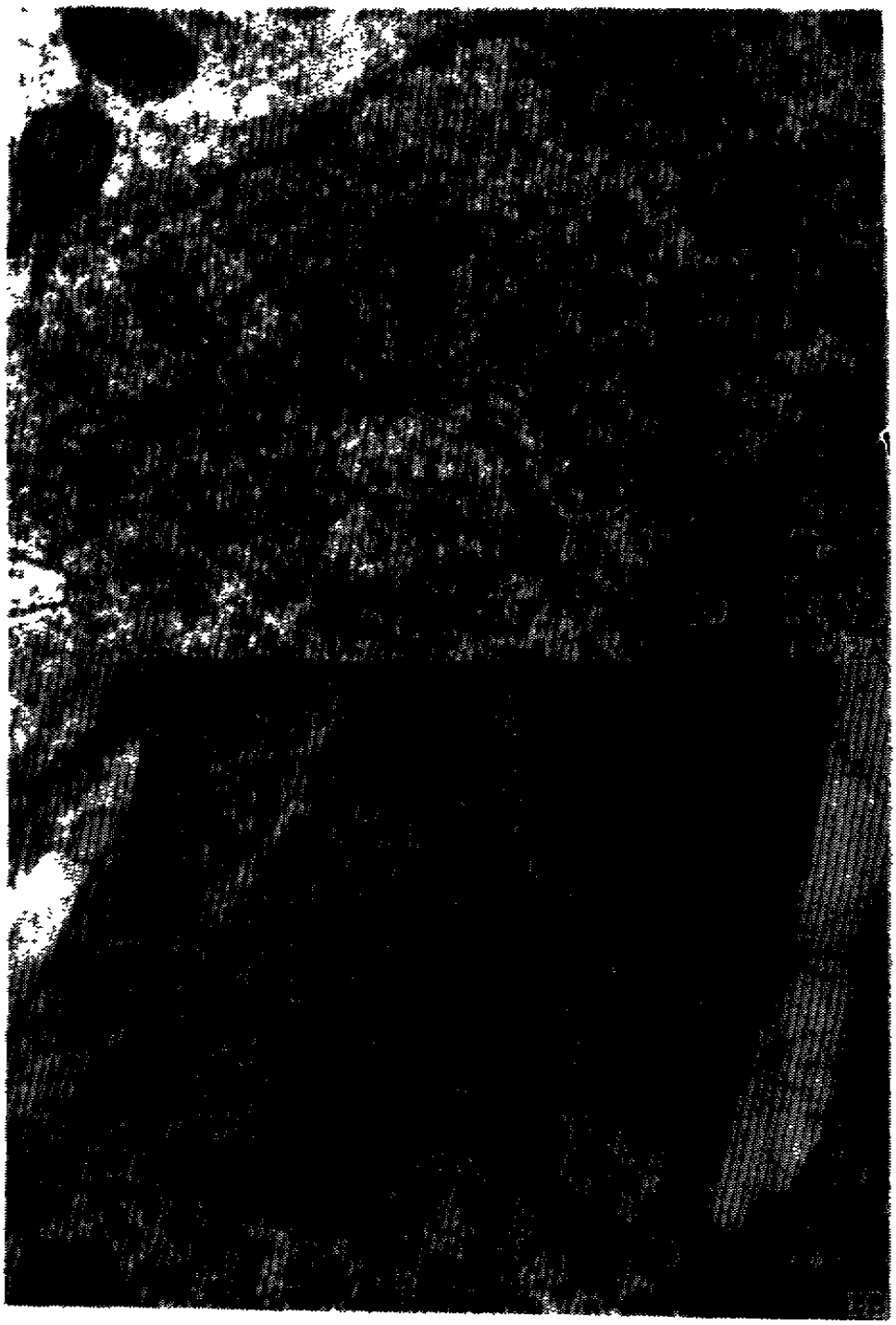

图2. RV感染Frhk-4细胞后的电镜超薄切片检查

Fig. 2 Electron micrographs of ultra-thin sections of Frhk-4 cells infected with rotaviruses

A. 感染SA-11后　　B. 感染Yo后

A. Infected with SA-11 strain　　B. Infected with Yo strain

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1. 不同细胞对胰蛋白酶的耐受程度

Taole 1. Tolerance to trypsin of different cells

作用时间（小时）Treatment time(hour)	细胞种类 Cell type	胰蛋白酶浓度（μg/ml）Concentration of trypsin(μg/ml)							
		0	0.5	1	2	3	5	10	20
1	MA104	−	−	−	−	−	−	−	−
	CV-1	−	−	−	−	−	−	−	−
	Frhk-4	−	−	−	−	−	−	−	−
	Hep-2	−	−	−	−	−	−	−	++
	HEL	−	−	−	−	−	−	−	+++
2	MA104	−	−	−	−	−	−	−	−
	CV-1	−	−	−	−	−	−	−	−
	Frhk-4	−	−	−	−	−	−	−	−
	Hep-2	−	−	−	−	−	−	−	++++
	HEL	−	−	−	−	−	−	+	++++
24	MA104	−	−	−	−	−	+	+	++++
	CV-1	−	−	−	−	−	+	+++	++++
	Frhk-4	−	−	−	−	+	++	++++	++++
	Hep-2	−	−	+	++++	++++	++++	++++	++++
	HEL	−	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++
48	MA104	−	−	−	−	−	+	++	++++
	CV-1	−	−	−	−	+	++	++++	++++
	Frhk-4	−	−	−	+	++	+++	++++	++++
	Hep-2	−	−	+	++++	++++	++++	++++	++++
	HEL	−	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
72	MA104	−	−	−	−	−	+	+++	++++
	CV-1	−	−	−	−	+	++++	++++	++++
	Frhk-4	−	−	−	+	++	+++	++++	++++
	Hep-2	−	−	++	++++	++++	++++	++++	++++
	HEL	−	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

"−" 表示细胞耐受胰蛋白酶的作用，形态无变化。

"+～++++" 表示细胞不耐受胰蛋白酶的作用和不耐受的程度，形态改变。

"−" Indicated that cells were tolerant to the effects of trypsin and had no morphologic changes.

"+～++++" indicated that cells were sensitive to the effects of trypsin and produced morphologic changes. The more "+", the more sensitive degree.

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2. 不同RV在不同细胞上增殖后抗原滴度的比较

Table 2. Comparison of antigen titers of different RVs produced on different cells

细胞种类 Cell type	抗原平均OD值* Average OD value of antigens					
	Wa	DS-1	Yo	ST-3	SA-11	UK
Frhk-4	0.20	0.17	0.23	0.18	0.25	0.55
MA104	0.30	0.22	0.38	0.15	0.40	0.43
CV-1	0.37	0.16	0.47	0.19	0.48	0.50

*表中数字为一次实验的平均值，但另外实验的结果与此相似。

The figures are averages in the one test and similar to the another test.

表 3. 不同细胞对RV敏感性的比较

Table 3. Comparison of susceptibilities to RVs of different cells

病毒株 Virus strain	空斑滴度(PFU/ml)* Plaque titer(PFU/ml)		
	Frhk-4	MA104	CV-1
Wa	7.0×10^4	5.0×10^4	9.0×10^4
DS-1	2.5×10^5	1.0×10^5	6.0×10^5

*注同表2

Note is the same above

表 4. 不同RV在不同细胞上增殖后滴度的比较

Table 4. Comparison of titers of RVs produced on different cells

病毒株 Virus strain	空斑滴度(PFU/ml)* Plaque titer(PFU/ml)		
	Frhk-4	MA104	CV-1
Wa	3.0×10^5	5.0×10^4	5.0×10^5
DS-1	4.5×10^5	6.5×10^4	6.0×10^5

*注同表2

Note is the same above

讨 论

RV细胞培养时，常规用10μg/ml的胰蛋白酶处理病毒后接种至敏感细胞上，吸附1小时后再加含1μg/ml胰蛋白酶的维持液进行培养。因此所筛选的细胞能否耐受上述浓度胰蛋白酶的作用和一定长的作用时间至关重要。通过胰蛋白酶耐受试验，我们首先从Frhk-4、Hep-2和HEL三种细胞中得到了能"耐受胰蛋白酶"的Frhk-4作为筛选RV敏感细胞的候选细胞，而Hep-2和HEL由于不能耐受胰蛋白酶作用而筛去。

将不同血清型的人和动物RV标准株Wa、DS-1、YO、ST-3、SA-11和UK接种至Frhk-4后，旋转或静止培养均能产生明显CPE。培养物经ELISA测定均含RV抗原。用PAGE检测均有特征性RV核酸图型。电镜超薄切片检查，在感染细胞内可见RV颗粒。所有这些均证实RV能在Frhk-4内增殖，表明Frhk-4是RV的敏感细胞。对此，国内外尚未见报道。

Frhk-4是恒河猴胚肾传代细胞，可用于甲型肝炎病毒的培养[6]。MA104虽也是恒河猴胚肾传代细胞，但两者形态有所差别。在相同培养条件下，前者细胞稍大稍长，而后者多边形明显，立体感稍弱。与CV-1（非洲绿猴肾传代细胞）相比，三种细胞的生长特性又有较大不同：CV-1生长快，但维持时间短；MA104则相反，生长慢，维持

维普资讯 http://www.cqvip.com

时间长；而Frhk-4则介于两者之间，生长比MA104快，维持时间比CV-1长，在实际应用中有一定的优越性。此外，从三种细胞对RV标准株的敏感性和增殖滴度来看，以Wa和DS-1试验的结果表明，CV-1最高，MA104最低，Frhk-4也介于两者之间。Birch等[7]曾比较过MA104和CV-1对RV的敏感性，用CV-1进行RV分离培养，其分离率比MA104高，我们的结果与此类似。

在动物RV细胞培养研究中，Estes等[8]曾比较过多种原代细胞如AGMK、原代恒河猴肾细胞（RhMK）、原代人胚肾细胞（HEK）、人胚肺细胞（M_7）和多种传代细胞如恒河猴肾细胞（MA104和LLC-MK_2）、绿猴肾细胞（Vero、CV-1、BSC-1）、Buffalo绿猴肾细胞（BGM）、鼠成纤维细胞（L929）和兔肾细胞（RK13）对SA-11的敏感性，发现只有在MA104、CV-1、BSC-1和BGM上能获得高滴度增殖。最近Superti等[1]报道人结肠癌细胞系HT-29比MA104对人RV有更高的敏感性，可用于人RV的分离培养。我们筛选到的RV敏感细胞Frhk-4能否直接从腹泻粪便标本中分离RV，尚在进一步研究中。此外，我们曾报道将刀豆素A加入营养液在细胞生长过程中预处理MA104和CV-1细胞，能显著增加人RV的空斑数目和增殖滴度，加速CPE的发展[9]，但Frhk-4有无此特性尚待研究。

参考文献

〔1〕 Superti F, et al., 1991, *Arch.Virol.*, 116：159.

〔2〕 Ward RL, et al., 1984, *J.Clin.Microbiol.*, 19：748.

〔3〕 Aboudy Y, et al., 1989, *J.Virol.Methods*, 25：251.

〔4〕 张建琼等，1991，中国病毒学，6(4)：329。

〔5〕 孟继鸿等，1989，中国人兽共患病杂志，5(2)：9。

〔6〕 Flehmig B., 1980, *Med.Microbiol.Immunol.*, 168：239.

〔7〕 Birch CJ, et al., 1983, *J.Med.Virol.*, 11：241.

〔8〕 Estes MK, et al., 1979, *J.Virol.*, 31：810.

〔9〕 孟继鸿，1991，中华微生物学和免疫学杂志，11(5)：331。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Screening a New Cell Line Susceptible to Rotavirus

Meng Jihong Zhang Jianqiong Lin Ling

(*Department of Microbiology, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009*)

The difficulties of rotavirus(RV) propagation in cell culture were not overcome completely, because not all groups of RV or not all strains of the same group of RV could replicate in vitro as yet. One of the reasons of the difficulties might be that there ware only a few kinds of cells susceptible to RV. In order to screen a new cell line for RV propagation, three continuous cell lines (Frhk-4, Hep-2, HEL) were used as screened cell and six strains of RV(Wa, DS-1, Yo, St, Thomas-3, SA-11, UK)were used as model. Since trypsin was routinely used in RV propagation, the tolerance to trypsin of the screened cells was examined at first. Only Frhk-4 cell was tolerant to 20 μg/ml trypsin for 2 hours and 1 μg/ml for 72 hours at 37℃ at least. After the six strains of RV were inoculated into the cultures of Frhk-4 cell respectively and the cultures were incubated at 37℃ with or without rotation, distinct CPE developed. RV antigens and nucleic acids were detected in the infected cultures by ELISA and PAGE, respectively. RV particles were observed in the ultra-thin section of infected Frhk-4 cell by EM. In addition, the susceptibilities to RV of Frhk-4, CV-1 and MA104 cells and viral titers on these cells were compared. Frhk-4 cell was more sensitive to RV than MA104 cell, although CV-1 cell was the highest. All these results indicated that Frhk-4 cell is a new cell line susceptible to RV and may be a useful model for the study of RV infection.

Key words: Viral propagation Rotavirus Frhk-4 cell