

HEPES 诱导增强HFRS病毒对 Vero-E₆ 细胞的致细胞病变作用

聂子林 俞永新

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

R373.32

提 要

本文报道了HEPES诱导增强HFRS病毒对Vero-E₆细胞的致细胞病变作用。病毒悬浮接种E₆细胞, 置37℃培养2—8天后在培养液中加适量HEPES, 24小时内即见明显的细胞病变出现。细胞病变的特点是感染细胞相互融合形成多核巨细胞或网状结构, 有时则出现泡沫样的空泡结构。HEPES诱导增强的细胞病变能被特异抗HFRS病毒免疫血清和单克隆抗体等中和抑制。HEPES的这一特性对建立简便的HFRS病毒实验方法等具有较大的意义。

关键词: HEPES HFRS 病毒 致细胞病变作用 Vero-E₆ 细胞

除个别报道外^[1,2], 一般认为肾综合征出血热(HFRS)病毒在Vero-E₆细胞上繁殖时不引起细胞病变(CPE)^[3,4]我们曾报道^[1]HFRS病毒感染E₆细胞后37℃培养5天, 然后在细胞培养上清中加适量N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸(HEPES)即可诱导感染细胞产生典型、规律的CPE。这种CPE的特点是感染细胞相互融合形成多核巨细胞或形成网状结构和泡沫样的空泡结构等。作者对HEPES的这一特性又作了进一步的研究, 现报告如下。

材 料 与 方 法

一、细胞 Vero-E₆细胞克隆008株由美国泛里特军事医学研究所Eckels博士惠赠, 实验时用含10%的灭活小牛血清的MEM培养基传代培养, 使用代数在30—50代之间。

二、毒株 血清和单克隆抗体 HFRS病毒76-118株(血清I型, 病毒滴度 1.0×10^5 PFU/0.1 ml)和UR株(血清II型, 病毒滴度 2.0×10^4 PFU/0.1 ml)由国外引进; HB₅株(血清I型, 病毒滴度为 2.0×10^5 PFU/0.1 ml)由安徽省医科所提供; L₃株(血清2型, 病毒滴度为 2.5×10^5 PFU/0.1 ml)由长春生物制品研究所提供。兔抗HFRS病毒B₅株免疫血清为安徽省医学科学研究所提供; 兔抗HFRS病毒SR-11免疫血清为本实验室自行制备。HFRS病毒单克隆抗体3D₃株为第四军医大学微生物教研室汪美先教授赠送。

三、HEPES 全名为2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsaure, 分子量为238.3道尔顿。用超纯水配制, 过滤除菌后备用。

· 本文于1991年11月25日收到, 1992年9月19日修回。

四、CPE诱导增强方法 病毒直接种入细胞悬液 ($1-5 \times 10^5$ 细胞/ml) 后, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 2—8 天 (换液一次), 无菌条件下加 $10-100 \text{mmol/L}$ 浓度的 HEPES, 37°C 继续培养 24 小时即可倒置显微镜下观察 CPE 的产生情况和病毒感染滴度。

五、CPE 特异性中和试验 按参考文献 [6] 进行, CPE 的诱导产生方法同上述。

六、HFRS 病毒半微量空斑方法 见文献 [7]。

结 果

一、HEPES 对 HFRS 病毒致 E_6 细胞病变作用的诱导增强效应

HFRS 病毒 76-118 株和 L_{99} 株的 10 倍连续稀释液接种入 E_6 细胞的悬液中, 37°C 培养 5 天后在培养液中加入 50mmol/L HEPES。结果加 HEPES 处理的感染细胞在 24 小时内均见 CPE 产生, 而未加 HEPES 处理的感染细胞及加 HEPES 处理的未感染细胞均无明显的 CPE 出现 (见表 1)。加 HEPES 处理后对感染细胞进行不同时间的动态观察, 结果见处理后 2 小时感染细胞开始出现形态上的改变, 24 小时内 CPE 发展到高峰 (见表 2)。CPE 的特征是感染细胞相互融合形成多核巨细胞或合胞体, 或出现网状结构和泡沫样的空泡结构等 (见图版 I 1—8)。

表 1 HFRS 病毒感染的 Vero- E_6 细胞产生 CPE 的情况
Tab. 1 CPE of Vero- E_6 cells infected with HFRS viruses

毒株 Virus strains	试验组别 No of group	各稀释度内的 CPE CPE in virus dilutions				
		- 1	- 2	- 3	- 4	- 5
76-118	1	+++ / +++	+++ / +++	## / ##	## / ##	+++ / +++
	2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	3	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
L_{99}	1	+++ / +++	## / ##	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
	2	(±) / (±)	- / -	- / -	- / -	- / -
	3	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

1. HEPES 处理的感染细胞组
1. Infected cells treated with HEPES
2. 未用 HEPES 处理的感染细胞组
2. Infected cells without treatment of HEPES
3. HEPES 处理的未感染细胞组
3. Uninfected cells treated with HEPES

注: 细胞病变范围与“+”的判定标准: 75—100%; ##; 50—75%; +++; 25—50%; ++; 1—25%; +; 可疑; ±

二、不同感染天数用 HEPES 处理后 CPE 的产生情况

用 L_{99} 株的 10 倍连续稀释病毒液感染 E_6 细胞, 分别于感染后 2、3、4、5、6 天加 HEPES 处理, 结果处理后 24 小时内均见明显的 CPE 出现。根据不同天数出现的 CPE 计算病毒感染滴度 (CCID_{50}), 结果有一定的差异 (如图 9 所示)。从图上还可看出, 感染后 6 天用 HEPES 处理 CCID_{50} 达到高峰。

三、不同浓度 HEPES 对 CPE 的诱导增强作用

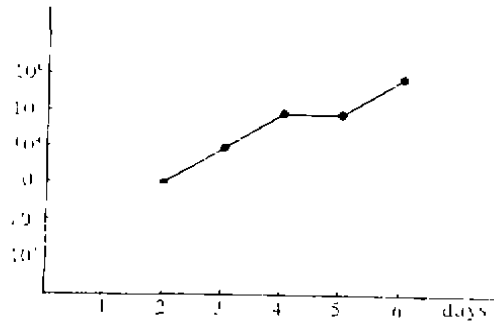


图 9 L₉₉株感染的细胞感染后不同时间用 HEPES 处理后的 CPE 发展动态

Fig. 9 The kinetics of CPE in L₉₉ strain infected cells treated by HEPES at different days post inoculation

L₉₉ 株感染细胞后 37℃ 培养 6 天, 然后加 10—100mmol/L 浓度的 HEPES 进行 CPE 诱导试验, 结果各浓度 HEPES 均能诱导 CPE 的产生 (见表 3)。各浓度组对 CPE 的诱导能力和产生的 CPE 特征等基本一致。

表 2 L₉₉ 株感染的 E₆ 细胞用 HEPES 处理后的 CPE 发展动态
Tab. 2 The kinetics of CPE on E₆ cells infected with L₉₉ strain and treated with HEPES

病毒稀释度 Virus dilutions	HEPES 处理后不同小时内的 CPE 强度 CPE in hours after being treated with HEPES								
	2	4	6	8	10	12	14	18	24
10 ⁻²	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++++
10 ⁻³	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	++++
10 ⁻⁴	+	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
10 ⁻⁵	+	++	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
10 ⁻⁶	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Control *	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* 对照, 未感染细胞

* Control, Uninfected cells

表 3 不同浓度的 HEPES 对 CPE 的诱导增强作用

Tab 3 Effect on CPE induction and enhancement with different concentration of HEPES

HEPES 浓度 Concentration of HEPES (mmol/L)	各病毒稀释度 CPE 强度 CPE in virus dilution					pH 值 pH values
	- 2	- 3	- 4	- 5	Control*	
0	-	-	-	-	-	7.0~7.5
10	+++	+++	++++	++	-	7.0~7.4
20	+++	+++	++++	+	-	6.5~7.4
30	+++	+++	++++	+	-	6.5~7.3
40	+++	++++	++++	++	-	6.5~7.2
50	+++	++++	++++	+++	-	6.5~7.0
75		++++	++++	+++	-	6.3~6.6
100		++++	+++	+++	-	6.0~6.2

* 未感染细胞

* Uninfected cells

四、CPE的特异性鉴定——细胞中和试验

结果如表4所示。76-118株和L₉₉株在HEPES诱导下产生的CPE能被兔抗HFRS病毒B₁株或SR-11株免疫血清和HFRS病毒型特异单克隆抗体等中和抑制。

表4 HFRS病毒免疫血清和单克隆抗体对CPE的特异鉴定

Tab. 4 Identification of specific CPE by HFRS virus immune sera and monoclonal antibody (McAb)

病毒株 Virus strains	血清或单克隆抗体 Anti-sera or McAb	各稀释度强度 CPE in virus dilutions						中和指数 Neutralizing indices
		-1	-2	-3	-4	-5	-6	
L ₉₉	SR-11	++	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	10000
	Control*	+++	##/##	##/##	##/##	##/##	##/##	
76-118	B ₁	+/+	-/-	-/-	-/-			≥10000
	3D _A	+/+	+/+	-/-	-/-			≥1000
	Control	##/##	##/##	##/##	##/##	+/+		

*对照: 正常兔血清

* Control: Normal rabbit serum

五、HEPES诱导增强CPE作用在滴定病毒感染滴度中的应用

HFRS病毒76-118株、L₉₉株、UR株和HB₁₁株等在E₀细胞中测得的CCID₅₀结果见表5。结果表明此CPE方法与空斑方法具有相近的敏感性。

表5 用CPE法和空斑法测定病毒感染滴度的结果比较

Tab. 5 Comparison of infective titer of HFRS viruses measured by CPE and plaque assay in Vero-E₁ cells

病毒株 Virus strains	各稀释度CPE强度 CPE in virus dilutions						CPE感染滴度 CCID ₅₀ /0.1ml	空斑形成单位 PFU/0.1ml
	-1	-2	-3	-4	-5	-6		
76-118	##/##	##/##	##/##	##/##	##/##		≥10 ^{5.5}	1.0 X 10 ⁵
UR		##/##	+/+	+/+	-/-	-/-	10 ^{4.5}	2.0 X 10 ⁴
L ₉₉	##/##	##/##	##/##	##/##	##/##	-/##	10 ^{4.5}	2.5 X 10 ⁵
HB ₁₁		##/##	##/##	##/##	+/+	-/##	10 ^{6.0}	2.0 X 10 ⁶

讨 论

HFRS病毒的某些毒株能引起Vero-E₀细胞产生CPE已见个别报道^(1,2)。但这些毒株对E₀细胞的致病能力较弱,表现在其引起CPE的条件不稳定和CPE的特征性不很明显等。

我们在国内外首次报道了用HEPES处理可诱导HFRS病毒感染的Vero-E₀细胞产生细胞病变,即病毒感染细胞后常规条件下培养,然后在培养上清中加入适量HEPES,继续培养24小时即见典型、规律、特异、高滴度的CPE产生。HEPES诱导HFRS病毒在Vero-E₀细胞上产生的CPE的特征与HFRS病毒在Vero细胞上产生的CPE相似⁽³⁾,主要是感染细胞相互融合形成多核巨细胞,或形成网状结构和泡沫样的空泡结构等。

病毒感染细胞后可引起感染细胞融合已有很多报道。这种融合现象可发生在生理 pH 值范围(如副粘病毒和疱疹病毒)或低 pH 值条件下(如披膜病毒和 HFRS 病毒等)^[8,9]。这种融合现象与病毒膜上的融合蛋白(F 蛋白)有关,有些病毒的 F 蛋白在生理 pH 值条件下即能呈现胞膜融合活性,而有些病毒则只有在特定条件下(如 pH 的改变)其 F 蛋白的结构和构象发生改变时才能发挥胞膜融合作用^[10,11,12,13]。HFRS 病毒在低 pH 值条件下^[8,14,15]和正常液体培养条件下(pH 值 7.0 左右)^[1,14]均可引起感染细胞相互融合。但通过调节 pH 值在 4.9—6.3 之间时 HFRS 病毒引起感染细胞融合的能力较低,融合灶内的细胞界限依然可辨,有时需通过酶染或姬姆萨染色才能在显微镜下观察到。而 HEPES 诱导感染细胞相互融合的现象则与此不同,HEPES 诱导的细胞融合为感染细胞大片(或灶)融合,细胞界限完全消失,有时还形成泡沫样的空泡结构等,因此无需复杂的染色过程即可判定 CPE 的结果。HEPES 诱导感染细胞融合的 pH 值范围较大(6.0—7.4 之间),因此,其引起感染细胞相互融合除与 pH 值有关外可能还存在其它机制,有关其详细机制值得深入广泛研究。

参 考 文 献

- [1] 董关木等, 1990, 病毒学报, 6: 81。
- [2] 朱德钟等, 1987, 第三军医大学学报, 9: 139。
- [3] Lee HW et al., 1978, *J. Infect. Dis.* 137: 298.
- [4] French GR et al., 1981, *Science*, 211: 1046.
- [5] 聂子林等, 1991, 中华微生物学和免疫学杂志, 11: 185。
- [6] 聂子林等, 1990, 中华微生物学和免疫学杂志, 10: 109。
- [7] 姚小剑等, 1988, 病毒学报, 4: 347。
- [8] Summers PL et al., 1989, *Virus Research*, 12: 383.
- [9] Arikawa J et al., 1985, *Arch. Viro.* 86: 303.
- [10] Edwards J et al., 1983, *J. virol.*, 45: 1090.
- [11] Kimura J et al., 1983, *J. Gen. Virol.*, 69: 1247.
- [12] Skehe J et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 968.
- [13] Yoshida T et al., 1989, *Virology*, 70: 571.
- [14] Tumura M et al., 1989, *J. Gen. Virol.*, 70: 289.
- [15] 许万平等, 1991, 中华微生物学和免疫学杂志, 11: 144。
- [16] 聂子林等, 1991, 病毒学报, 7: 107。

Induction and Enhancement of CPE in HFRS Viruses Infected Vero-E6 Cells by HEPES

Nie Zilin Yu Yongxin

(*National Institute for the Control of Pharmaceutical and
Biological Products, Beijing 100050*)

We have found that HEPES could induce and enhance the CPE caused by HFRS viruses in cultured Vero-E₆ cells. The infected cells were treated with 10-100mmol/L HEPES at 2-8 days post inoculation, several hours later, polykaryocytoses, networks and vacuoles appeared in the cell cultures. It could be seen under microscope without staining. On the contrast, no CPE was found in the untreated infective Vero-E₆ control cells or treated uninfected control cells. The Vero-E₆ cells infected with 76-118, L₉₈, HB₁₆, UR strains developed CPE after treated with HEPES.

The CPE enhanced by HEPES could be reduced by rabbit anti-HFRS virus B₅ or SR-11 immune sera and HFRS virus type-specific monoclonal antibody. The infective titers measured by the CPE was consistent with that by plaque assay. The mechanism of HEPES enhancing CPE in infected cell cultures and its application in the fields of virology need to be further studied.

Key words, HEPES HFRS viruses Cytopathic effect Vero-E₆ cells