

41-47

9116(7)

呼吸道合胞病毒自然温度敏感株的研究

I. 呼吸道合胞病毒自然温度敏感株的筛选及其特性的初步研究

周生华 董继华 田慕贞

(同济医科大学附属协和医院病毒室, 武汉 430022)

R373.1

A

摘要 本文利用离心蚀斑法从武汉地区 1978—1983 年及 1987—1992 年的 73 株呼吸道合胞病毒流行毒株中直接筛选出 17 株自然温度敏感株, 并以 33°/39.5°C 的 lgPFU 相差 ≥ 3 作为确定自然温度敏感株的标准。每年筛选出自然温度敏感株的比例平均为 15—17%; 根据毒株温敏性状的差异, 将呼吸道合胞病毒流行株分为 ts⁺, ts[±] 与 ts 毒株; 并初步发现 B 亚型毒株所含的自然温敏株的比例明显高于 A 型毒株 (P < 0.05)。初步测定 2 株该自然温敏株的遗传稳定性, 结果显示具有较稳定的特性。本文结果提示, 呼吸道合胞病毒在自然界不仅存在 A, B 两亚型变异, 也存在温敏性状的变异, 可能存在毒力的变异。

关键词 呼吸道合胞病毒 自然温敏株 筛选

呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus, RSV) 属于副粘病毒科肺炎病毒属, 广泛流行于世界各地, 是婴幼儿急性下呼吸道感染的重要病原体, 严重者可致死。由于其发病率高, 严重影响婴幼儿身体健康^[1], 世界卫生组织 (WHO) 已将 RSV 疫苗研制列为其疫苗开发中优先发展项目之一^[2]。近十年来, 虽然借助于单克隆抗体以及分子生物学技术, 对 RSV 的认识逐渐深入^[3-6], 但仍然存在有待探索的难题, 如致病机理、疫苗制备及预防效果等。

病毒的温度敏感株 (Temperature-sensitive strain, ts 株或温敏株) 一直是病毒学研究中有用工具^[7]。本室进行 RSV 自然 ts 株 (Naturally Occurring ts strain) 筛选的主要目的有: 了解自然界 RSV 流行株是否存在自然 ts 株及存在比例, 以便更多地认识 RSV 流行病学规律; 了解自然 ts 株的生物学特征, 以使用于探讨 RSV 致病机理。现将结果报告如下。

材料和方法

1 材料

1.1 RSV 毒株: 共 73 株。1978—1983 年 22 株, 1987—1992 年 51 株 (详见附表 1, 表 2, 表 3)。其中, 京-友-81 株及京 C-83 株为首都儿研所王之梁教授赠, 56-82 株为广州儿童医院病毒室常汝虚主任赠。Long 株为国际标准株。其余毒株均为本室历年从患儿鼻咽分泌物中所分离, 存于液氮备用。大部分毒株在 Vero 细胞上传 6 代以内。73 株中 A 亚型株 26 株, B 亚型株 47 株^[3, 6]。

本文于 1994 年 1 月 18 日收到, 5 月 9 日修回

- 1.2 细胞:病毒繁殖和蚀斑法筛选 RSV 自然 ts 株均用 Vero 细胞。本室常规 Eagle's 培养。
- 1.3 BALB/C 小鼠:大于 8 周龄,18—20g/只,由湖北医科院动物饲养中心提供。
- 1.4 甲基纤维素及凝胶覆盖物配制:甲基纤维素为 Sigma 公司出品。凝胶配制详见文献^[4]。

2 方法

2.1 离心蚀斑法筛选 RSV 自然 ts 株:离心蚀斑技术参见文献^[4]。即将 Vero 细胞悬液分装至两块 24 孔细胞培养板,0.9ml/孔。并立即加入 10 倍系列稀释的病毒液(稀释比例为 10^{-1} — 10^{-6}),0.1ml/孔,离心后置 37℃、5% CO₂ 培养箱吸附 90 分钟,去细胞上清, Hanks 液洗涤细胞 2 次,每孔加入 37℃ 水浴预热的 1.5% 甲基纤维素凝胶,1.0ml/孔,分别将上述两块培养板置 33℃(允许温度)和 39.5℃(非允许温度)培养 4 天。以甲醛-结晶紫固定并染色后的计数两温度稀释度蚀斑及蚀斑形成单位(PFU/ml),以 39.5℃ 的 PFU/ml 低于 33℃ 的 PFU/ml 3 个 lg 以上者(即 33℃/39.5℃ lgPFU 相差 ≥ 3)作为自然 ts 株标准。相差 < 2 为强毒力毒株,相差 ≥ 2 为中等毒力毒株。

2.2 RSV 自然 ts 株遗传稳定性测定:取 RSV 自然 ts 株(60-78 株及 476-82 株)及 BALB/C 小鼠 4 只。以 0.06 mg/g 体重的戊巴比妥钠经腹腔麻醉后^[5],经鼻慢滴入 0.1ml 病毒液(约 1×10^5 PFU/0.1ml),每株病毒感染 2 只小鼠。5 天后,分别取每株病毒感染的小鼠肺研磨成 10% 悬液(W/V),取悬液接种至 Vero 细胞,当 CPE 出现时,连续在 Vero 细胞上传 5 代,分别测定各代 ts 性状。

结 果

1 RSV 自然 ts 株筛选

从 1978—1983 年和 1987—1992 年共 73 株 RSV 流行株中筛选出 17 株自然 ts 株。各株 ts 性状测定结果详见表 1,2,3。从表中结果可将本文的 73 株 RSV 流行株分为 ts⁺、ts[±] 和 ts 毒株。

2 RSV 自然 ts 株和亚型的关系

结合本室对 RSV 抗原亚型的研究^[3,5],发现 B 亚型流行株中含有较多的自然 ts 株(15/47, 31.92%),而 A 亚型毒株只含少量自然 ts 株(2/26, 7.69%)。两者所含 ts 株的比例有显著性差异($X^2 = 4.2, P < 0.05$)。

3 1989 年—1992 年 RSV 自然 ts 株发生率

从表 1 可见,1978 年—1983 年至 1987 年—1992 年相隔 10 年的 RSV 自然 ts 株发生率相差无显著性差异。但因 1978—1983 年每年毒株数量较少,有待今后增加毒株数来进一步证实上述结论。同时,比较 1989—1992 年逐年年间的 RSV 自然 ts 株发生率,结果亦无显著性意义,且自然 ts 株年发生率约为 15—17%,详见表 4。

4 RSV 自然 ts 株遗传稳定性测定

由于 BALB/C 小鼠肺部温度为 37℃,如感染的 ts 毒株遗传性不稳定,则在肺部 37℃ 环境繁殖一定时间,并连续在 Vero 细胞内传数代后,应可选择出返祖突变的非 ts 株。本实验用 60-78 株和 426-82 株测定后,再测定各代的 ts 性状,结果各代 33℃/39.5℃ lgPFU 均大于 3,说明该 2 株 RSV 自然 ts 株的 ts 性状是稳定的。

讨 论

本文利用离心蚀斑技术,从武汉地区 RSV 流行毒株中直接筛选出 ts 株,由于所筛选的毒株大部分限制在 Vero 细胞传 6 代以内,对每一毒株均重复测定三次,三次结果相差不超过 1 个 log,并且也同时测定了已在实验室传无数代的 RSV 国际标准株 RSV-Long 株,其两温度的 PFU 无明显差异。这说明本文所筛选出的 RSV ts 株等存在于自然流行株中,即自然 ts 株。这是

首次报道直接从自然界 RSV 流行株中筛选出较多的自然 ts 株。Faulkerer 等^[14],曾采用随机挑斑的方法从 RSV-2 毒株(1972 年由 P. S. Gardner 分离自英国一 5 月龄支气管炎患儿)的 482 个蚀斑中筛选出 1 个斑,据认为是 ts 株。我们对所筛选出的 ts 毒株挑斑分别测定各个蚀斑的 ts 性状,初步结果表明 ts 毒株所含的病毒颗粒绝大部分是 ts 毒株(资料将另发表)。分析其它研究者为何未发现 RSV 毒株存在自然 ts 株的原因,可能有:①所用细胞不同。Faulkenor 等^[14]都采用 BS-C-1 细胞,该细胞是从非洲绿猴肾细胞中培养而来的上皮样细胞;Wright 等^[15]则采用牛肾细胞(BK 细胞)及 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)。龚镇奎等^[16]曾比较 Vero 细胞、HeLa 细胞、Hep-2 细胞(人喉癌细胞)及人胚肺细胞等,发现 Vero 细胞对 RSV 最敏感,即 RSV 在 Vero 细胞上繁殖滴度高于其它几种细胞;②所采用方法不同。本文采用离心蚀斑法,作者已发现该法较常规蚀斑更优越、更敏感^[9]。

由于 ts 性状一般是病毒减毒指标之一^[10],因而根据对武汉地区历年 RSV 流行毒株的 ts 性状的测定,表明自然界 RSV 流行株可能存在毒力的变异,其中 ts 株可能是毒力减弱的毒株。Hall 等^[11,12]研究发现受 RSV B 亚型感染的患儿病情较轻,而受 A 亚型感染的患儿病情较重。同时,Hall 等^[11]并发现 B 亚型株在细胞培养上繁殖较 A 亚型株慢。我们曾注意到 RSV B 亚型在细胞培养上的这种特性(资料未显示)。本研究结果显示,自然界 B 亚型 RSV 流行株含较多的自然 ts 株,而 A 亚型株则只含少量自然 ts 株($P < 0.05$)。这可能表明 B 亚型株的毒力较 A 亚型株弱。

目前已在几种病毒中发现有自然 ts 株存在,其中以流感病毒最明显。朱既明等^[10]的研究揭示,甲型流感病毒各年代流行株中自然 ts 株发生率每年相差较大,可低至 8%,高达 91%。这可能与该病毒的基因突变率较高有关。我们对 RSV 的研究发现,人类 RSV 流行株也存在较大的自然 ts 株,但每年发生率较平均,且从 1977—1983 年和 1987—1992 年的十年间的发生率亦无显著性差异。这可能说明,病毒自然 ts 株的发生在各种病毒中有其特有规律。

病毒 ts 株的遗传稳定性,即病毒的传代并不影响 ts 性状的遗传特性,这是病毒 ts 株作为减毒活疫苗候选株及其它研究工具时的一项重要指标。人工诱变获得的 ts 株已表明存在较多缺陷,并以遗传不稳定为其主要缺点;尽管多次诱变有可能得到较稳定的 ts 株,但又将引起许多不必要的突变,并可降低毒株的抗原性^[10]。因此,从七十年代至今,人工诱变的 RSV ts 株仍然没能应用于预防 RSV 的感染^[2]。这除了仍未阐明 RSV 的详细致病机理外,和 RSV 诱变 ts 株本身的缺陷也有一定关系。本实验将 2 株 RSV 自然 ts 株经 BALB/C 小鼠肺繁殖一代,并在体外经 Vero 细胞传 5 代后,仍然保持了 ts 性状,表明这种 ts 性状是稳定的。其余的 RSV 自然 ts 株的 ts 性状稳定性如何,有待进一步测定。

本文报道从 RSV 流行株直接筛选 RSV 自然 ts 株,且 B 亚型株中含较多自然 ts 株。这一结果说明,在 RSV 自然流行株中,不仅存在 A、B 两亚型的变异,也存在 ts 性状的变异,并可能说明存在毒力的变异。这为 RSV 流行病学提供了新的资料。同时这些自然 ts 株可能为 RSV 减毒活疫苗制备提供某些合适的疫苗候选株,也可作为将来研究 RSV 致病机理的有用工具。有关这些自然 ts 株的其它特性,正在进一步研究中。

表1 不同年代分离的RSV ts性状测定结果

Table 1 Character of isolated RSV in different years

| 分离年代 Time of isolated | 毒株数量 No. of strains | 33°/39.5°C IgPFU difference | | | P 值 | |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------|-------|------|-------|---------|
| | | 0-1.9 | 2-2.9 | ≥3.0 | ts% | P value |
| 1978-1983 | 22 | 7 | 8 | 7 | 31.81 | >0.05 |
| 1987-1992 | 51 | 9 | 32 | 10 | 19.60 | |

表2 不同年代所分离的RSVts性状测定及其亚型

Table 2 Ts character of all RSV strains isolated in different years and their subtypes

| RSV 毒株 RSV strains | 分离年代 Time of isolation | 33°/39.5°C IgPFU 差别 33°/39.5°C Ig PFU difference | 亚型 Subtype |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|
| 1-88 | 1987-1988 | 2.85 | B |
| 3-88 | " | 2.85 | B |
| 6-88 | " | 4.30 | H |
| 8-88 | " | 2.91 | H |
| 1-89 | 1988-1989 | 4.16 | B |
| 2-89 | " | 2.00 | B |
| 3-89 | " | 1.70 | B |
| 4-89 | " | 1.86 | B |
| 5-89 | " | 3.07 | H |
| 1-90 | 1989-1990 | 1.90 | B |
| 9-90 | " | 2.89 | A |
| 18-90 | " | 2.08 | H |
| 22-90 | " | 2.30 | B |
| 11-90 | " | 4.30 | B |
| 34-90 | " | 2.86 | B |
| 42-90 | " | 2.48 | A |
| 48-90 | " | 2.40 | A |
| 62-90 | " | 1.65 | A |
| 66-90 | " | 2.08 | A |
| 65-90 | " | 2.08 | B |
| 74-90 | " | 2.90 | B |
| 75-90 | " | 3.00 | B |
| 2-91 | 1990-1991 | 2.00 | B |
| 4-91 | " | 2.70 | A |
| 9-91 | " | 2.10 | H |
| 10-91 | " | 1.48 | H |
| 11-91 | " | 4.30 | A |
| 15-91 | " | 3.85 | B |
| 19-91 | " | 2.00 | A |
| 22-91 | " | 3.12 | H |
| 24-91 | 1990-1991 | 2.62 | B |
| 30-91 | " | 2.38 | A |
| 33-91 | " | 2.67 | A |
| 37-91 | " | 2.67 | A |
| 38-91 | " | 1.40 | A |
| 31-91 | " | 1.51 | A |

| | | | |
|------------|-----------|------|---|
| 48-91 | " | 2.52 | B |
| 49-91 | " | 2.57 | B |
| 61-91 | " | 2.08 | A |
| 24-92 | 1991—1992 | 2.48 | B |
| 48-92 | " | 3.30 | B |
| 54-92 | " | 2.00 | B |
| 66-92 | " | 2.90 | A |
| 89-92 | " | 2.00 | B |
| 90-92 | " | 2.30 | A |
| 97-92 | " | 2.60 | B |
| 114-92 | " | 2.90 | B |
| 120-92 | " | 3.92 | A |
| 121-92 | " | 2.70 | B |
| 122-92 | " | 2.52 | A |
| 125-92 | " | 1.34 | A |
| 13-78 | 1977—1979 | 2.60 | B |
| 29-78 | " | 1.18 | B |
| 22-78 | " | 1.60 | B |
| 18-78 | " | 2.56 | B |
| 64-78 | " | 1.51 | B |
| 60-78 | " | 4.23 | B |
| 209-79 | 1978—1979 | 2.12 | B |
| 216-79 | " | 3.46 | B |
| 214-80 | 1979—1980 | 2.00 | B |
| 253-80 | " | 1.05 | A |
| 283-80 | " | 2.48 | B |
| 321-80 | " | 2.48 | A |
| Jingyiu-81 | 1980—1981 | 3.02 | B |
| 363-81 | " | 3.31 | A |
| 56-82 | 1981—1982 | 1.70 | A |
| 440-82 | " | 3.51 | B |
| 476-82 | " | 4.00 | B |
| 537-82 | " | 2.85 | A |
| 544-82 | " | 2.70 | A |
| 538-83 | 1982—1983 | 1.20 | B |
| Jing c-83 | " | 4.60 | B |
| long-56 | 1956—1957 | 1.26 | A |

表3 筛选的RSV自然 α 株及其所属亚型Table 3 α strains isolated in different years and their subtypes

| RSV 自然 α 株 α strains RSV | 毒株分离年代 Time of isolation | lgPFU/ml | | 33/39.5 lgPFU 相差 33/39.5 lgPFU difference | 亚型 Subtype |
|-------------------------------------------|-----------------------------|----------|------|----------------------------------------------|---------------|
| | | 33 | 39.5 | | |
| 60-78 | 1977-1978 | 6.7 | 2.47 | 4.23 | B |
| 216-79 | 1978-1979 | 5.93 | 2.48 | 3.46 | B |
| 363-81 | 1980-1981 | 7.21 | 3.90 | 3.31 | A |
| Jingyu-81 | 1980-1981 | 6.50 | 3.48 | 3.02 | B |
| 440-82 | 1981-1982 | 5.81 | 2.30 | 3.51 | B |
| 476-82 | 1981-1982 | 6.60 | 2.60 | 4.00 | B |
| Jing c-83 | 1982-1983 | 6.30 | 2.70 | 4.60 | B |
| 6-88 | 1987-1988 | 7.13 | 3.11 | 4.03 | B |
| 1-89 | 1988-1989 | 6.58 | 2.69 | 4.16 | B |
| 5-89 | 1988-1989 | 6.54 | 3.47 | 3.07 | B |
| 11-90 | 1989-1990 | 7.30 | 3.00 | 4.30 | B |
| 75-90 | 1989-1990 | 6.48 | 3.48 | 3.00 | B |
| 11-91 | 1990-1991 | 7.40 | 2.74 | 4.30 | A |
| 15-91 | 1990-1991 | 6.70 | 2.85 | 3.85 | B |
| 22-91 | 1990-1991 | 6.81 | 3.89 | 3.12 | B |
| 48-92 | 1991-1992 | 6.18 | 3.18 | 3.00 | B |
| 120-92 | 1991-1992 | 7.04 | 3.11 | 3.93 | B |

表4 RSV各流行年代所分离的自然 α 株数量及所占的比例

Table 4 Number and rate of RSV strains in different years of isolation

| 毒株分离年代 Time of isolation | 检测毒株数量 No. of strains | 自然 α 株数量 No. of α strains | % |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|-------|
| 1977-1978 | 7 | 1 | |
| 1978-1979 | 2 | 1 | |
| 1979-1980 | 4 | 0 | |
| 1980-1981 | 2 | 2 | |
| 1981-1982 | 5 | 2 | |
| 1982-1983 | 2 | 1 | |
| 1987-1988 | 4 | 1 | |
| 1988-1989 | 5 | 2 | |
| 1989-1990 | 13 | 2 | 15.39 |
| 1990-1991 | 17 | 3 | 17.65 |
| 1991-1992 | 12 | 2 | 16.67 |

注: * 包括国际标准株:RSV-long(1956年由Chanock分离)

Note: * Including the international standard;RSV-long strain

参 考 文 献

- McIntosh K, Chanock RM. Respiratory syncytial virus, Virology, New York, Raven Press, Second Edition, 1990; 1045
- Pringle CR. Progress toward control of the acute respiratory viral diseases of childhood. Bull WHO, 1987; 65(2): 133-137
- 田慕贞, 董继华, 余福助, 等. 抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体的制备及其对呼吸道合胞病毒株抗原性的分析. 中国病毒学, 1992; 7(2): 181
- Sullender WM, Mufson MA, Anderson L, J, et al. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B RSV. J Virol, 1991; 65(10): 5425-5434

- 5 张然,董继华,周生华,等.呼吸道合胞病毒 A、B 亚型变异的进一步研究. 同济医科大学学报, 1994;33(3):226
- 6 余福勋,董继华,田慕贞. 抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体的制备及其对病毒蛋白特异性的识别. 同济医科大学学报, 1992;12:90
- 7 Ramig RF. Principles of animal virus genetics, Virology, New York, Raven Press, Second Edition, 1990, 95
- 8 周生华,田慕贞,董继华. 呼吸道合胞病毒离心蚀斑法的建立. 中华实验和临床病毒学杂志, 1994; (待发表)
- 9 Graham BS, Perkins MD, Wright PF, et al. Primary respiratory syncytial virus in mice. J Med Virol. 1987;68:2781
- 10 朱既明,田淑芳,任贵方. 关于《甲型流感病毒自然温度敏感株(ts)的发现及其意义》的几点讨论. 病毒学报, 1989;5(3):295-301
- 11 Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, et al. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years; associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. J Infect Dis. 1990;126(6):1283-1290
- 12 McConochie KM, Hall CB, Walsh EE, et al. Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype. Pediatr, 1990;117:52
- 13 Yurlove TI, Govzdilova DA, Zvereva EP, et al. Some regularities in variations of respiratory syncytial virus strains during their epidemiological circulation. Acta Virol, 1983;27:251-256
- 14 Faulkner GP, Shirodaria PV, Fallet EAC, et al. Respiratory Syncytial Virus ts mutants and nuclear immunofluorescence. J Virol, 1976;20(2):487-500
- 15 Wright PF, Woodend WG, Chanock RM. Temperature-sensitive mutants of respiratory syncytial virus. J Infect Dis, 1970;122(6):501-512
- 16 费镇奎,董继华,田慕贞. 从培养细胞中提高呼吸道合胞病毒产量的条件初探. 中华微生物与免疫学杂志, 1985;3:154-157

Selection and Preliminary Characterization of Naturally Occurring Temperature-Sensitive Strains of Respiratory Syncytial Virus (RSV)

Zhou Shenghua Dong Jihua Tian Muzhen

(Department of Clinical Virology, Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022)

Seventeen naturally occurring ts strains of RSV were selected directly from 73 strains circulating in nature. The ts character was examined by parallel plaque assay and reexamined three times for each strain. Based on the 33°C/39.5°C lgPFU difference, the RSV circulating strains could be divided into three groups of strain, namely, ts⁺, ts[±] and ts. Our study suggested that there are more naturally occurring ts strains among the subtype B RSV than among subtype A (P<0.05), and the proportion of ts strains of RSV in nature was approximately the same from 1987 to 1992. Preliminary experiments showed that the naturally occurring ts strains of RSV are genetically stable.

Key words Respiratory syncytial virus, Naturally occurring temperature-sensitive strain