维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第3期 中 国 病 毒 学 Vol. 13 No. 3
1998 年 9 月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1998

GC32 细胞对三种虫媒病毒的敏感性研究*

章域震 黄文丽 侯宗柳 袁庆虹

(云南省流行病防治研究所,大理 671000)

摘 要 用胃癌细胞株 GC32,对乙型脑炎、基孔肯雅、兰加特病毒进行敏感性研究。并用 BHK21 细胞作对照,发现 GC32 细胞对两种病毒的敏感性与对照细胞 BHK21 极为接近, BHK21 和 GC32 细胞对基孔肯雅、乙型脑炎和兰加特的免疫荧光实验,于感染后 48 h 或 72 h 都出现 +++ ~ ++++ 的阳性结果。两种细胞对基孔肯雅和乙型脑炎病毒都形成空斑,BHK21 细胞对基孔肯雅和乙型脑炎病毒的空斑形成单位分别为 5.65 和 5.36;GC32 对基孔肯雅和乙型脑炎病毒的空斑形成单位分别为 6.48 和 5.61。实验表明,GC32 细胞可以作为有关病毒实验的理想细胞株。

关键词 GC32 细胞,敏感性,空斑形成单位,空斑减少中和实验,免疫荧光实验

GC32 细胞是由本实验室从一例白族患者的转移淋巴中获得体外培养的细胞株[1]。细胞经 50 代以上培养,生长状况稳定、良好、贴壁紧密,细胞呈梭形和圆形鳞状(见图 1)。为了进一步证实 GC32 细胞在虫媒病毒组织培养中的实验室应用价值,我们以本实验室应用较广泛的对虫媒病毒敏感的 BHK21 细胞作对照,选择甲组病毒中的基孔肯雅(Chikungunya, CHIK)病毒和黄病毒中的乙型脑炎(JE)、兰加特(Langat, LGT)病毒为实验病毒,研究 GC32 细胞对虫媒病毒的敏感性和应用价值。

材料与方法

1 细胞

BHK21 传代细胞和 GC32 传代细胞。BHK21 细胞培养基为 MEM 和 0.5% 水解乳蛋白的 Hanks 液,从中国药品生物制品检定所引入;GC32 细胞由本实验室建立,以 1640 为培养基。常规传代培养。

2 病毒

JE(中山株)、LGT 和 CHIK(Ross 株)病毒均由中国药品生物制品检定所提供。

3 血清

LGT 病毒兔子免疫血清,CHIK 病毒(Ross 株)单克隆抗体,云南株 GHIK 病毒 B8635 血清和标准 Ross 株兔子免疫血清由本实验室制备。乙脑单克隆抗体由中国预防医学科学院病毒研究所提供。

4 空斑实验

4.1 病毒的空斑形成单位(PFU)测定 参照有关文献方法[2,3],采用半微量甲基纤维素法进行实验。

4.2 空斑观察实验 将 10^{-3} 稀释的 JE 和 CHIK 病毒悬液,10^{-2} 稀释的 LGT 病毒悬液,接种在含有 GC32 和

收稿日期:1997-10-27,修回日期:1998-02-20

* 云南省卫生厅科研基金资助课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

BHK21 细胞的 24 孔板上，依照半甲基纤维素法[2,3]操作，并于第二天观察空斑的形成时间、形态和发展状况。

4.3　空斑减少中和实验　按微量中和实验法稀释两种血清，再加等量的含 500PFU 的病毒液，混和后在 37 ℃中和 1 h，以下步骤按半微量甲基纤维素法[2,3]进行，于第 5 天观察结果。

5　细胞病变(CPE)观察

JE、CHIK、LGT 三种病毒于小方瓶中感染 GC32 细胞和 BHK21 细胞，同时设阴性对照，每天观察细胞病变状况。

6　免疫荧光实验(IFAT)

在细胞感染的不同时间(24、48、72 h)取受感染的细胞少许，制作细胞抗原片，用间接免疫荧光法进行检测。

结　果

1　细胞病变观察(CPE)

用 JE 病毒中山株和 CHIK 病毒 Ross 株感染两种细胞，24 h 观察后发现大约 50% 的细胞受感染，细胞呈圆缩和部分堆聚状态，细胞折光性增强；第三天，细胞病变进一步发展，尤其是 GC32 细胞对 CHIK 病毒具较强的敏感性，细胞病变较其它两种病毒明显，出现圆缩、堆聚、部分脱落(见图 2)，对于 JE 和 LGT 病毒，也出现圆缩、堆聚、脱落(见图 3 和图 4)三种不同的细胞病变。从总的观察来看，三种病毒对 GC32 细胞的细胞病变与 BHK21 细胞相似。

2　免疫荧光实验(IFAT)

CHIK 和 JE 病毒感染 GC32 细胞的荧光检测，于感染后 48 h 出现 +++ ～ ++++ 的阳性结果(见图 5)，LGT 病毒对 GC32 细胞则于感染 72 h 出现 +++ ～ ++++ 的荧光阳性结果，与 BHK21 细胞的检测结果相同。

3　空斑观察实验

CHIK 病毒对 BHK21 和 GC32 细胞的空斑观察实验于第三天开始染色观察，均可见点状圆形、边缘不整齐的空斑，数目较多，但 BHK21 细胞形成的空斑较大，融合现象较明显，同时空斑进展较 GC32 细胞快，感染过程较 GC32 短，第四天融合现象严重，无法观察空斑数量。GC32 细胞进展稍慢，空斑逐日扩大，至观察第 6 天，感染情况与 BHK21 细胞相同。JE 对两种细胞均形成空斑，BHK21 细胞空斑较大，约 2 nm，以后空斑继续扩大，均可达 4 nm 左右，BHK21 至第 5 天，GC32 至第 7 天大面积融合。LGT 病毒对两种细胞空斑实验未观察到空斑。

4　PFU 测定和半微量空斑减少中和实验(PRNT)

从表 1 可以看出，JE 和 CHIK 病毒对 GC32 和 BHK21 细胞的 PFU 值相接近，说明 GC32 细胞对 JE 病毒、CHIK 病毒的敏感性与 BHK21 细胞相似。半微量空斑减少中和实验的结果是以实验组空斑数比对照组减少 50% 为空斑中和实验阳性，该血清最高稀释度即为空斑中和实验的中和滴度。从表 2 可知，两种细胞比较，PFU 值与中和滴度是基本一致的，该两项实验表明，GC32 细胞对 JE 和 CHIK 病毒的敏感性较 BHK21 细胞稍高。

讨　论

GC32 细胞作为本实验室建立的胃癌体外培养细胞株，其优良性状早已得到认可，我们将细胞用于病毒感染、空斑和荧光等一系列实验时，以 BHK21 细胞印证，均可达到预期效果。

维普资讯 http://www.cqvip.com

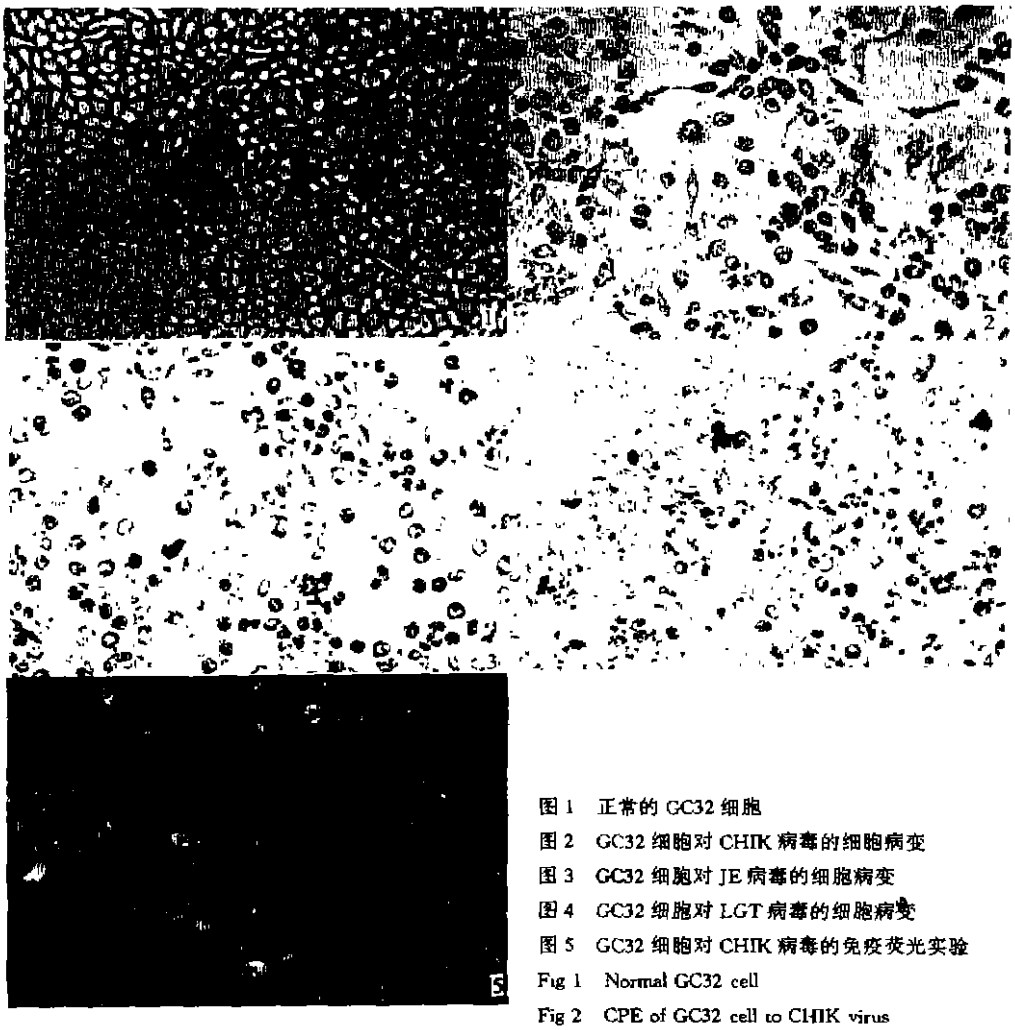

图1 正常的GC32细胞
图2 GC32细胞对CHIK病毒的细胞病变
图3 GC32细胞对JE病毒的细胞病变
图4 GC32细胞对LGT病毒的细胞病变
图5 GC32细胞对CHIK病毒的免疫荧光实验
Fig 1 Normal GC32 cell
Fig 2 CPE of GC32 cell to CHIK virus
Fig 3 CPE of GC32 cell to JE virus
Fig 4 CPE of GC32 cell to LGT virus
Fig 5 IFAT of GC32 cell to CHIK virus

表1 BHK21和GC32细胞对CHIK和JE病毒的PFU值的比较

Table 1 The comparison of PFU of CHIK and JE viruses in GC32 and BHK21 cells

细胞 Cells	病毒 Viruses	$\frac{PFU}{mL}_{log}$
	CHIK	JE
BHK21	5.65	5.36
GC32	6.48	5.61

表2 CHIK病毒空斑减少中和实验结果

Table 2 Determination results of PRNT of CHIK virus

细胞 Cells	CHIK病毒抗体 Antibodies against CHIK virus	
	Ross	B8635
BHK21	1:4	1:4
GC32	1:16	1:16

维普资讯 http://www.cqvip.com

就其性状而言,比目前应用较广泛的 BHK21 细胞贴壁更为紧密,生长更为迅速,维持时间更长。在显微镜下观察,两种细胞都呈均匀规则。

GC32 细胞对虫媒病毒 JE、CHIK 和 LGT 的敏感性在细胞病变观察实验(CPE)中得到充分的证明,免疫荧光实验也提供了有力的证明,三种虫媒病毒对两种细胞均呈现 +++ ~ ++++ 的阳性结果,其结果与对照细胞 BHK21 相似,尤其是 CHIK 病毒对实验细胞和对照细胞都具有较强的敏感性,这表明 GC32 细胞对虫媒病毒的敏感性与 BHK21 细胞接近。

空斑测定较为简单,但却可准确地了解病毒的感染性,获得比 50% 细胞培养感染滴度(TCD50)更精确的结果[3]。在空斑测定中,我们观察到 BHK21 细胞对 JE 和 CHIK 病毒所形成的空斑较大,GC32 所形成的空斑稍小,但两种病毒所形成的空斑均呈圆形、毛状边缘。在 PFU 测定实验中,我们得到的数据证明 GC32 细胞对 JE 和 CHIK 病毒的敏感性与 BHK21 细胞接近,相差不到一个数量级,说明 GC32 细胞和 BHK21 细胞对 JE 和 CHIK 病毒的敏感性极为接近。此外,LGT 病毒对两种细胞均不形成空斑,原因有待进一步研究。

综上所述,我们可以得出 GC32 细胞对三种虫媒病毒的敏感性至少与 BHK21 细胞相一致的结论,且 GC32 细胞生长状态稳定、迅速,每代培养时间较长,贴壁紧密,表明具有相当的实验室应用价值和潜力,可以作为实验室病毒分离、病毒鉴定、病毒纯化、免疫荧光等实验较理想的细胞株。

参 考 文 献

1　张天寿、袁晓平、杨兰萍.人胃低分化腺癌细胞系的建立及其单克隆抗体的研制.云南医药,1992,13(6):362－364

2　侯宗柳、黄文丽、自登云.森林脑炎病毒在几种细胞上的空斑技术研究及其应用.中国媒介生物学及控制杂志,1993,4(特刊 3):173－175

3　自登云,陈伯权,俞永新主编.虫媒病毒与虫媒病毒病.第 1 版,昆明:云南科技出版社,1995,433－436

Susceptibility of GC32 Cell to Three Strains of Arbovirus

Zhang Yuzhen　Huang Wenli　Hou Zhongliu　Yuan Qinghong

(*Yunnan Provincid Institute of Epidemic Diseases Control and Research, Dali, Yunnan Province* 671000)

Abstract　GC32 cell line established by authors from a carcinoma patient is susceptible to JE and Chikungunya. The susceptibility of GC32 cell to JE and Chikungunya is similar to that of BHK21 regarded as control. BHK21 and GC32 cells infected by JE, Chikungunya and Langat viruses make "+++ ~ ++++" results by IFAT. Both BHK21 and GC32 cells to JE and Chikungunya form plaques. The PFU of BHK21 cell to JE and Chikungunya are 5.36 and 5.65 and GC32 cell to JE and Chikungunya are 5.61 and 6.48, respectively. The results showed that GC32 cell line is a suitable cell strain for studying virus.

Key words　GC32 cell, Susceptibility, Plaque forming unit, Plaque reduction neutralization Test, Immuno fluorescent antibody test