

猪瘟病毒中国兔化弱毒疫苗株在原代牛睾丸细胞
中增殖特性的研究*

王镇, 陆宇, 丁明孝**

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

S858.285.3

~~S858.282.6~~

S852.651

摘要:以猪瘟病毒中国兔化弱毒疫苗株(CSFV C株)为实验材料,研究该病毒株在原代牛睾丸细胞中增殖的基本特性与规律。找到了一株能够使用免疫荧光技术进行检测的C株猪瘟病毒,并对病毒滴度的测定方法进行了改进,发展完善了荧光斑技术(F-PFU)。使用改进的病毒滴度测定方法,对接毒后培养上清中病毒滴度的变化趋势进行检测。在原代牛睾丸细胞中,接毒后5d,几乎所有的细胞都可被病毒感染;释放到培养液中有活性的病毒粒子达到 10^5 F-PFU/mL以上,后维持在该水平。对原代细胞中细胞种类随代次增加的变化趋势进行了观察,并对CSFV的增殖特点及生产中出现的一收毒价不稳定、多次收获病毒等现象的机制进行探讨。并对影响猪瘟病毒增殖的因素进行了实验,不仅加深了对猪瘟病毒C株在原代牛睾丸细胞中增殖规律的了解,还为疫苗生产中猪瘟病毒产量的提高提供新的思路。

关键词:猪瘟病毒(CSFV);猪瘟病毒中国兔化弱毒疫苗株(C株);免疫荧光技术;荧光斑技术(F-PFU);疫苗生产

中图分类号: S852.651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)02-0170-10

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)是一种危害严重的动物病毒,它引起的猪瘟每年给养猪业造成巨大的经济损失^[1]。目前世界上主要采用弱毒活疫苗免疫来防治猪瘟,以控制猪瘟的流行。在异源原代细胞中增殖的猪瘟兔化弱毒疫苗株(C株)是目前我国主要的弱毒疫苗。C株是我国五十年代经兔体传代选育出的一株具有良好免疫保护力的疫苗株。由于该疫苗株性能稳定、安全、保护性好,是国际上公认最好也是应用最为广泛的疫苗株。由于应用的需要,我国猪瘟病毒的疫苗生产也由兔脾淋巴疫苗、全乳兔疫苗逐步过渡到用组织培养生产的细胞疫苗。为避免猪体可能带有的病原体(包括病毒)对疫苗质量的影响,生产上一般使用异源细胞,如牛睾丸、羊睾丸、羊肾等原代细胞增殖CSFV C株疫苗^[2]。目前虽然在疫苗生产与使用中积累了丰富的经验,但研究工作多侧重于免疫接种程序及免疫效果等方面^[4-6],而对病毒的增殖,特别是弱毒疫苗在原代细胞中的增殖规律还缺乏了解。比如在疫苗生产中,平均每个细胞的病毒产量少于1个病毒感染单位,那么,究竟是每个细胞病毒产量低,还是仅

收稿日期:1998-12-21,修回日期:1999-01-01

* 基金项目:国家攀登计划资助项目(85-44-02-05)

作者简介:王镇(1965年-),女安徽潜山人,博士,从事细胞生物学、病毒学研究。现在美国纽约大学从事博士后工作。

** 通讯作者:丁明孝,(1944年-),男,辽宁大连人,现任北京大学生命科学学院教授、博士生导师,细胞生物学系主任。从事细胞生物学、病毒学研究。

有少数细胞感染?象这样最基本的问题尚不甚明了。

为此,我们使用猪瘟病毒弱毒疫苗 C 株感染的牛睾丸原代细胞作为实验体系,对病毒在原代细胞中增殖的规律进行研究。由于 C 株增殖力弱,较难用免疫荧光技术检测到感染细胞中病毒抗原的存在,生产上一直使用兔体温法检测 C 株病毒的滴度。我们在实验中通过比较不同来源的 C 株病毒,发现其中一株感染原代牛睾丸细胞后,宿主细胞质中能够检测到较强的荧光。从而为我们研究 C 株毒株在原代细胞中的增殖打下了基础。实验还对疫苗生产中出现的一些现象的机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

1.1.1 细胞:接牛睾丸细胞由湖北生物制药厂提供。

1.1.2 CSFV C 株:中国兽药监察所提供的种毒,由广州生物制药厂在兔体上复壮生产的细胞毒。兔体半数反应量为 10^{-5} 。

1.2 细胞培养及接毒条件

按常规细胞培养方法,用 D-MEM 培养液加 10% 无牛病毒性腹泻病毒抗体的胎牛血清作为原代牛睾丸细胞的培养液(pH7.2)。待细胞快长满单层时接毒,于 37℃ 感染 1 h 后,经 Hank's 洗涤,加维持液(pH 为 7.6~7.8)培养,维持液含 2% 的胎牛血清。

1.3 免疫荧光检测方法

将细胞培养在盖玻片上,在病毒感染后不同时间,用 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液(含 0.85% 的 NaCl)冲洗。放入纯丙酮中固定 15 min,自然干燥后用于免疫荧光检测或存于 -20℃ 冰箱中备用。

固定后的细胞单层经与 FITC 标记的抗 CSFV 多抗于 37℃ 温育 1 h,0.01 mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液冲洗后,甘油封片。或与 CSFV 的单克隆抗体温育,BSA 封闭后,经 FITC 标记的抗鼠抗体(Sigma 公司)温育、封片。用 Olympus 荧光显微镜于波长为 495 nm 激发光下观察。

1.4 病毒滴度的测定—荧光斑法(fluorescent plaque formation unit, F-PFU)

将牛睾丸细胞培养在 24 孔培养板中的 10·10 mm 盖玻片上,细胞长成良好单层时,用一定稀释度的 CSFV C 株样品 37℃ 感染 1 h,Hank's 液洗涤。将 37℃ 保温的 2×MEM 维持液(含 4% 的血清)与融化后保温在 45℃ 等体积的 1.8% 琼脂混合均匀,在每个培养孔中加入 1 mL,于 37℃ CO₂ 培养箱中进行培养 36 h。去除覆盖在细胞表面的培养基凝胶,取出盖片固定后进行免疫荧光技术检测,统计荧光斑的数目,并根据下列公式计算病毒滴度:

$$F\text{-PFU}/\text{mL} = \text{荧光斑数目}/(\text{病毒稀释度} \times \text{接种量})$$

2 结果

2.1 CSFV 抗原在病毒感染过程中的变化时相

使用 CSFV 感染次代牛睾丸细胞,接毒后每隔 12 h 取样,并用免疫荧光法检测 CSFV 抗原在感染细胞中出现的时相及被感染细胞在整个细胞群体中所占比例。接毒后 24 h 的样品中可观察到荧光阳性细胞。尽管荧光强度较低,但已能清楚地勾划出细胞的形态;而在接毒 12 h 的样品中则检测不到荧光。

在接毒 48~72 h 的样品中出现荧光较强的 CSFV 感染细胞。阳性细胞呈单个或几个相邻分散在单层细胞中,其数量只占整个细胞群体的少数,阳性细胞不超过细胞总数的 10%。接毒后 72~108 小时是细胞群体中病毒感染的细胞数迅速增加的一段时间。在这段时间里,

阳性细胞由单个分散存在扩展到成团分布,有的部位阳性细胞已连成片。阳性细胞率达到50%左右。继续培养,CSFV感染细胞继续增多,直至全部细胞为阳性(图1),提示在CSFV C株疫苗的生产中,几乎所有的牛睾丸细胞都被病毒感染。

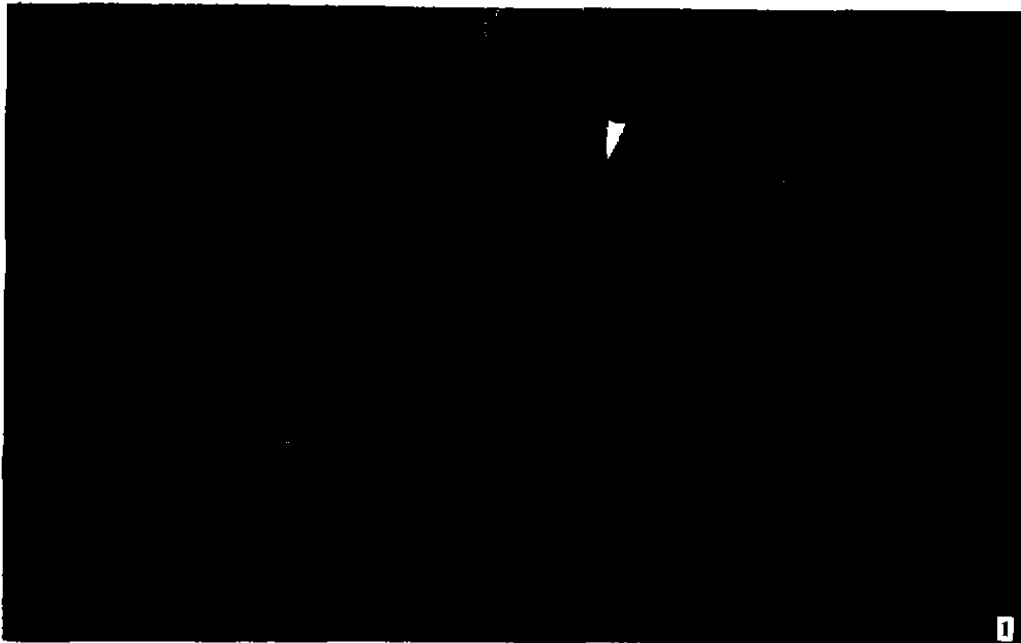


图1 CSFV感染的原代牛睾丸细胞中占优势的纤维状细胞,箭头示细胞质相叠现象(免疫荧光技术检测)(400×)

Fig.1 The fibroblast-like cells in CSFV C strain infected cultured primary bovine testicular cells, overlaped cytoplasm of cells could be observed (Detected by immunofluorescence technique)(400×)

2.2 荧光斑法检测 CSFV 滴度

由于感染 CSFV 的细胞经免疫荧光染色可检测到特异性荧光,结合噬斑测毒的原理,我们设计了使用琼脂封固与免疫荧光技术相结合的方法,统计病毒在细胞中扩散形成的荧光斑的数目,进而计算 CSFV 滴度。实践证明:"荧光斑(F-PFU)"法对细胞损伤小,琼脂的使用不引起显著的荧光本底,而且该方法与测定半数组织培养感染量(TCID₅₀)的方法相平行。因此我们使用这一方法测定并表示 CSFV 的滴度。

2.3 CSFV C 株在原代牛睾丸细胞中的增殖曲线

参照猪瘟兔化弱毒接种牛睾丸细胞培养疫苗制造及检测规程^[2],在实验室中模拟疫苗厂对牛睾丸细胞的培养及病毒接种。接毒后分别在 37℃ 培养,其间隔 24 h 取样,测定释放到培养液中病毒的滴度,绘制病毒在原代牛睾丸细胞中的增殖曲线。同时,每 4 天收获全部培养上清,并换入新鲜培养液,从一收到五收。测定所有样品中病毒滴度,并绘制每收病毒生长的一步生长曲线(图 2)。

由图可见,C 株在 37℃ 培养时,一收的滴度可达 10⁵ F-PFU/mL。此外,多次实验结果显示,接毒后,CSFV 在原代细胞中增殖传播的速度较慢,释放的子代病毒的数量在很大程度上依赖于细胞生长状态。若细胞状态不是最佳,培养液中病毒滴度达到 10⁵ TCID₅₀/mL 则需要

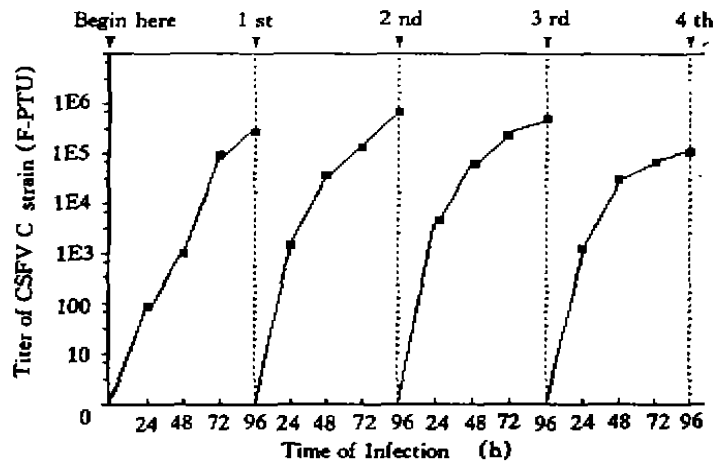


图 2 CSFV C 株在原代牛睾丸细胞中的增殖曲线

Fig. 2 The growth curve of CSFV C strain in primary bovine testicular cells

更长的时间,或达不到这一滴度。

2.4 带毒传代过程中细胞的形态变化

CSFV C 株在原代牛睾丸细胞增殖过程中,光镜观察显示带毒细胞形态完好,生长状态较为正常。使用免疫荧光技术检测 CSFV C 株主要在细胞质中增殖(图 1),其结构及非结构蛋白主要集中在细胞核周围的内质网和高尔基体富集的区域(图 3)。

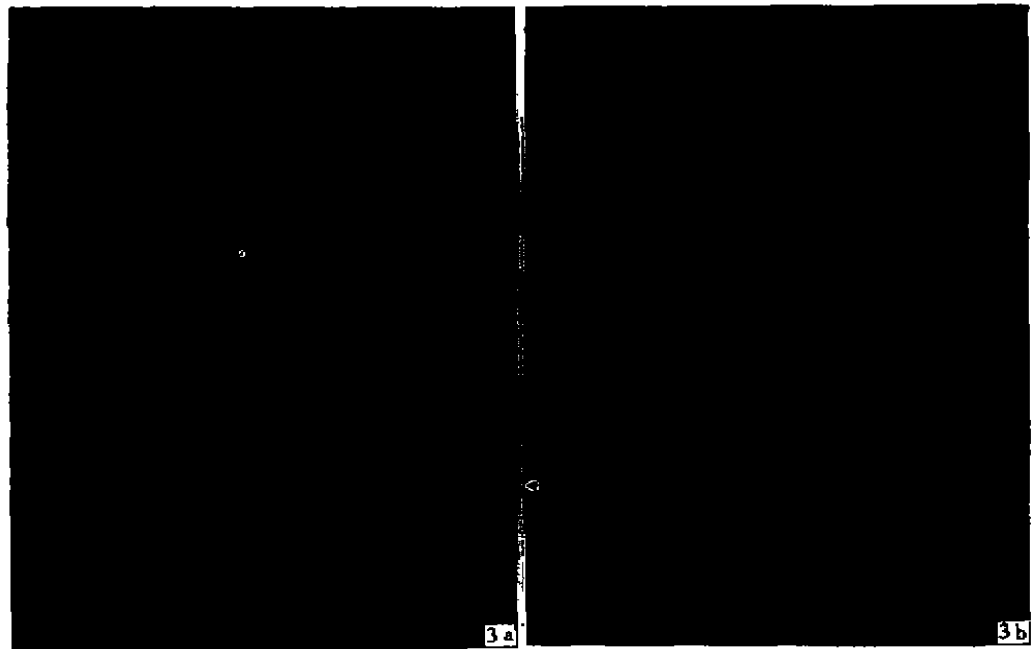


图3 CSFV的结构蛋白E2和非结构蛋白p120在C株感染的牛睾丸细胞中的分布(免疫荧光法检测)
a. E2; b. p120(400×)

Fig.3 The localization of CSFV structural protein E2 and p120 in bovine testicular cells infected by CSFV C strain (detected by immunofluorescence method)
a. E2; b. p120(400×)

原代牛睾丸细胞是由多种类型细胞组成的细胞群体。从细胞形态上大致可分为两大类。一类是成纤维状细胞,另一类是上皮形细胞。一般成纤维状的细胞生长速度快、大小均一,在传代后24h即可长成单层。接毒后,细胞内含有较多的病毒抗原,形成的细胞单层随培养时间的增加有逐渐变厚的趋势。细胞的胞质可部分相叠(图1)。接毒后3d即可观察到细胞单层出现间隙,并有老细胞脱落、新生细胞铺展这一新老细胞更替的现象(图4,5)。脱落的细胞也多为成纤维状细胞,而后病毒感染的细胞单层趋于某种平衡状态。接毒的细胞连续培养45d,细胞仍能按正常的1:3传代,且传代后细胞的生长状况良好。



图4 CSFV感染的原代牛睾丸细胞,箭头示细胞拉网、脱落现象(免疫荧光技术检测)(400×)

Fig.4 The fibroblast-like cells in cultured primary bovine testicular cells arrowhead shows the shed of fibroblast-like cells (Detected by immunofluorescence technique)(400×)

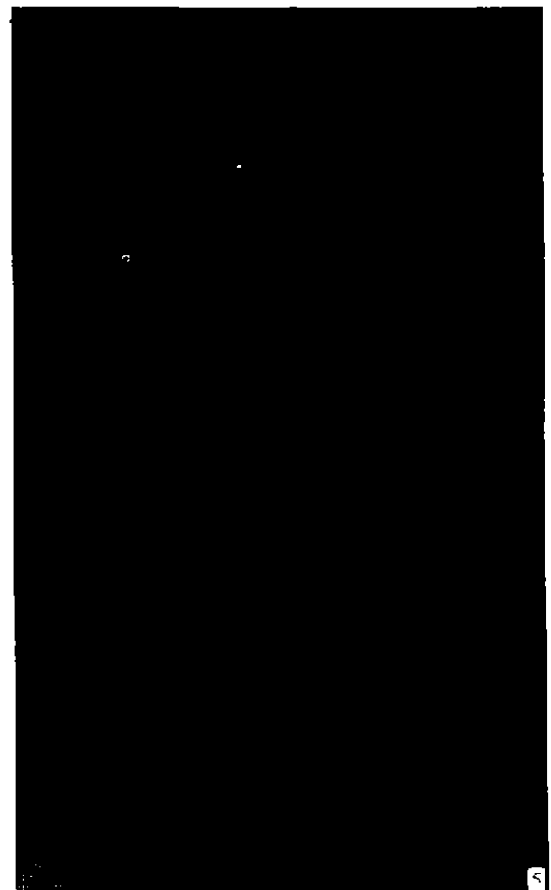


图5 原代牛睾丸细胞中新分裂细胞在脱落细胞留下的空隙中迅速铺展(使用抗CSFV抗体,用免疫荧光技术检测)(400×)

Fig.5 The newly grown cells on the space where old cells desquamated (detected by immunofluorescence technique, 400×)

随细胞带毒传代次数的增多,接毒后的牛睾丸细胞群体中细胞的类群也发生一些变化(图 6)。在传至 7 代以前的细胞群体中,成纤维状的细胞占优势。原来只占很小比例的上皮形细胞随细胞代次的增高会逐步增多,在整个细胞群体中所占比例也逐渐增大。在传至 10 代以后的细胞群体中上皮形细胞占有优势。此时虽然多数细胞形态大小较为均一,但常常可观察到一些体积较大的细胞(图 6)。同时细胞生长相对缓慢,需要几天或更长的时间才能铺满单层。与传代细胞明显不同的是:牛睾丸细胞在带毒传代过程中所有细胞均可检出病毒抗原。其中成纤维状细胞中病毒的抗原含量比较均一。

2.5 影响 CSFV C 株滴度的因素

2.5.1 PEG、DMSO 对 CSFV C 株滴度的影响

接毒的同时,在培养液中加入不同浓度的 PEG 或 DMSO,每隔 24 h 取培养上清测定病毒的滴度(图 7,8)。实验证明:PEG 对 CSFV 在牛睾丸细胞中的增殖有促进作用,并且产生的子代病毒量在一定的范围内随 PEG 浓度的增加而有所增加。DMSO 对 C 株增殖的影响不如 PEG 明显,但似乎对维持病毒滴度水平有作用。

2.5.2 L-Arginine 对 CSFV C 株在牛睾丸细胞中增殖的影响

在接毒的同时,向培养基中加入不同浓度的 L-Arginine,37 ℃ 培养 96 h 后,收集培养上清并测定病毒的滴度。实验结果显示,L-Arginine 对猪瘟病毒的增殖有一定的抑制作用,能够使 CSFV 产量降低一个滴度(图 9)。

3 讨论

随着分子生物学研究的深入,目前对 CSFV 的核酸序列、基因组结构有了一定的了解,但对 CSFV 的增殖过程,特别是在原代细胞中的增殖仍知之甚少^[7]。在猪瘟病毒疫苗生产上,我国主要用原代的牛睾丸或羊肾细胞增殖 CSFV 兔化弱毒 C 株。但 C 株病毒既不产生 CPE,又难以用免疫荧光技术检测。为了对 CSFV 弱毒疫苗株在原代细胞中的增殖状况有所了解,我们通过对不同来源的 C 株病毒进行研究,找到了一株能够使用免疫荧光技术对病毒感染细胞进行检测的 C 株病毒,这为我们了解 C 株在原代牛睾丸细胞中的增殖规律和疫苗生产中某些问题打下了基础。

使用抗 CSFV 多抗对 CSFV C 株感染的原代牛睾丸细胞进行检测,与传代细胞相同,CSFV 抗原主要存在于感染细胞的细胞质中^[8]。疫苗生产中 CSFV 的滴度较低,一般只有 10^5 TCID₅₀/mL。实验发现 CSFV 增殖过程中释放到培养液中的病毒的量与细胞群体中病毒感染的细胞(阳性细胞)数目密切相关。那么,是不是 CSFV 只感染原代牛睾丸细胞中的部分细胞,或者说只有某些类型的细胞才对 CSFV 敏感?为了解 CSFV 对原代细胞的感染情况,我们使用免疫荧光技术对接毒后的细胞进行检测。实验结果表明:弱毒疫苗 C 株在牛睾丸原代细胞中虽增殖较慢,但接毒 4~6 d 后几乎所有的细胞均可被病毒感染。由于 CSFV 能够在几乎所有的原代细胞中增殖,显然提高 C 株弱毒疫苗滴度的途径,主要应从病毒自身的繁殖及其与宿主细胞相互作用机制方面探索原因。

一氧化氮(nitric oxide, NO)广泛分布于生物体内的各组织中,具有重要的生物学作用。最近又发现 NO 参与了病毒与宿主细胞间的相互作用,在细胞抵御病毒感染、延缓或防止病毒扩散等方面起着重要的作用^[9,10]。为了解培养液中 NO 的水平是否影响 CSFV C 株的滴度,

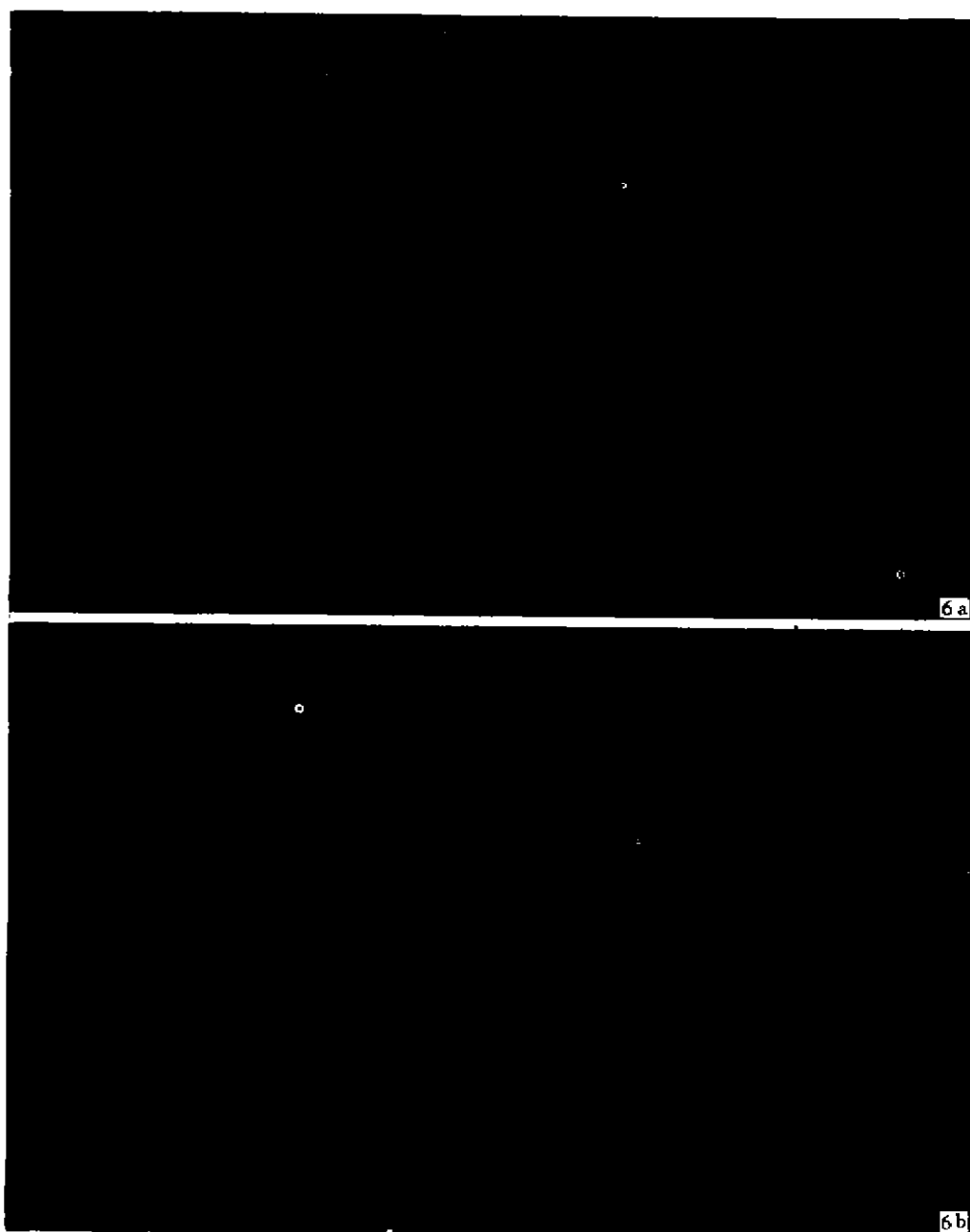


图 6 原代牛睾丸细胞随代次的演变

a. 纤维状细胞占优势的低代次带毒细胞(第 5 代), 由于细胞层较厚, 细胞不在同一个焦平面上; b. 上皮形细胞占优势的高代次带毒细胞(第 13 代), 示大小不均一的细胞(400 \times)

Fig. 6 The changes of cell types of primary bovine testicular cells among cell passage

a. The fibroblast-like cells (5th passages); b. The epithelioid cells (13 th passages)(400 \times)

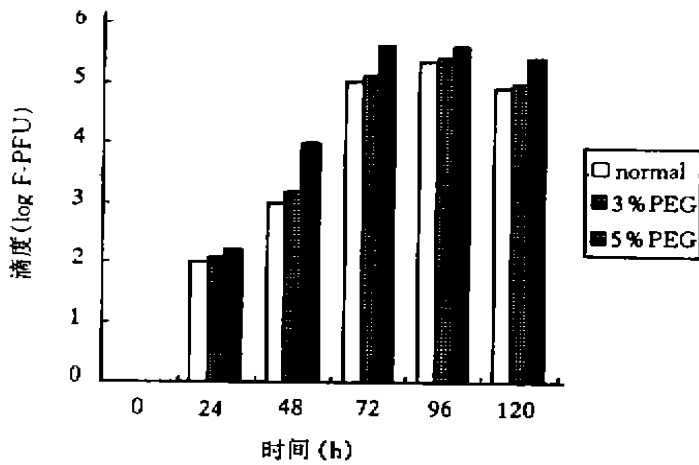


图 7 PEG 对 CSFV C 株在牛睾丸细胞中增殖的影响

Fig.7 The effects of PEG on the multiplication of CSFV in bovine testicular cells

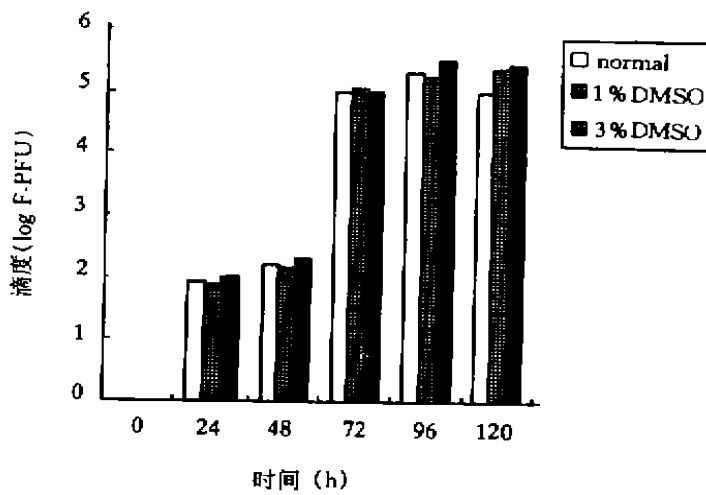


图 8 DMSO 对 CSFV C 株在牛睾丸细胞中增殖的影响

Fig.8 The effects of DMSO on the multiplication of CSFV in bovine testicular cells

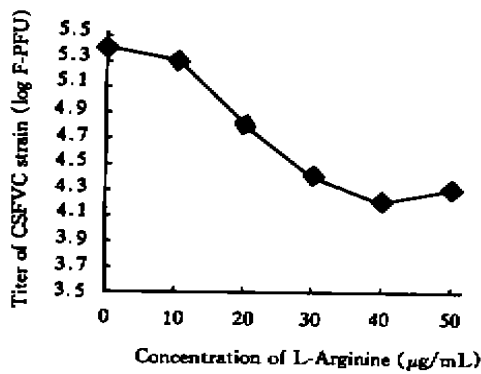


图 9 不同浓度 L-Arginine 对 CSFV C 株在牛睾丸细胞中增殖的影响

Fig.9 The effects of L-Arginine on the multiplication of CSFV in bovine testicular cells

我们尝试在培养液中加入 NO 的前体物 L-Arginine。发现 L-Arginine 的加入能够抑制 CSFV 的增殖,并使病毒的产量下降一个滴度。推测疫苗生产中牛睾丸细胞内的 NO 水平可能是影响猪瘟病毒增殖的因素之一。

CSFV感染的原代细胞不产生CPE,细胞能够带毒传代并将病毒传给子代细胞。尽管CSFV在原代细胞中一般要4至6d才能感染全部细胞,但此后病毒感染的细胞内的荧光强度较传代细胞中均匀。由于原代细胞群体是由多种类型细胞组成的,且不断有衰老的细胞脱落和新细胞铺展。经一段时间后,当病毒与细胞之间的相互作用达到某种平衡状态时,释放到培养液中的病毒的量也稳定在一定水平。此时所有细胞内均有CSFV的复制,并且能在较长一段时间内维持一定的病毒产量。CSFV感染细胞的时相和病毒增殖曲线的实验,在一定程度上为疫苗生产中出现的第一次收获病毒时毒价不稳定,而二收、三收毒价较稳定的现象提供了一些证据,并能够解释疫苗生产中4~5d收毒一次,并可连续收毒十次之多等现象。

用体外培养细胞增殖CSFV,产量往往较低。如何提高滴度是CSFV疫苗生产中亟待解决的问题。文献报道PEG、DMSO能很好地维持体外培养细胞的形态,并且PEG还具有促进有囊膜病毒的囊膜与宿主细胞膜融合的作用^[11,12]。我们的实验也初步显示PEG对CSFV在牛睾丸细胞中增殖有一定的促进作用。并且在一定的浓度范围内,PEG对CSFV增殖的促进作用与其浓度呈正相关性。但DMSO对CSFV的作用不明显。结果为提高C株滴度提供了一条思路,即在研究传统的向培养基中加入病毒保护剂的同时,也应同时考虑一些易于病毒感染的生化因子的作用,以更有利于提高病毒的滴度。

参 考 文 献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第二版,北京:科学出版社,1997,652~664
- [2] 卢淑瑜,王茂祥,吴华君.猪瘟兔化弱毒接种牛睾丸细胞旋转培养制造猪瘟冻干苗的研究[J].中国兽医杂志,1989,15(2):6~8
- [3] 陈大权,朱忠梁,刘书峰,等.注射猪瘟细胞苗引起仔猪过敏反应因素的初步探讨[J].中国兽药杂志,1995,29:35~38
- [4] 李敬圣,王俊东,蔡建平,等.硒对猪瘟疫苗强化作用的研究[J].畜牧兽医学报,1995,26:441~445
- [5] 苏承忠,熊仲良,梁开烈,等.猪瘟兔化弱毒接种牛睾丸细胞苗对仔猪免疫期试验[J].中国畜禽传染病,1992,65(4):13~14
- [6] 郑自才,石谦,黄昌祥,等.猪瘟兔化弱毒接种牛睾丸细胞苗免疫程序研究[J].畜牧兽医学报,1995,26(2):160~167
- [7] Moormann R J M, van Gennip H G P, Miedema G K W, *et al.* Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus [J]. J Virol, 1996, 70:763~770
- [8] 王慎,陆宇,翟中和,等.畜禽重大疫病免疫防制研究[C].北京:中国农业科技出版社,1997,126~131
- [9] Bi Z and Reiss C. Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide [J]. J Virol, 1995, 69:2208~2213
- [10] Karupiah G, Xie Q, Buller R, *et al.* Inhibition of Viral Replication by Interferon- γ -induced Nitric Oxide Synthase [J]. Science, 1993, 261:1445~1448
- [11] Gripon P, Diot C, Gullouzo C G. Reproducible High Level Infection of Cultured Adult Human Hepatocytes by hepatitis B Virus: Effect of Polyethylene Glycol on Adsorption and Penetration [J]. Virol, 1993, 192:534~540
- [12] Rohde W, Pauli G, Henning J, *et al.* Polyethylene Glycol-Mediated Infection with Avian Sarcoma Virus [J]. Arch. Virol, 1978, 59:55~59

Some Multiplication Properties of the Lapinized Chinese Strain (C strain) of Classical Swine Fever Virus in Primary Bovine Testicular Cells

WANG Zhen, LU Yu, DING Ming-xiao

(College of Life Science, Peking University, Beijing, 100871, China)

Abstract: Some multiplication properties of the Lapinized Chinese strain of Classical Swine Fever Virus (CSFV C strain) in primary bovine testicular cells were studied. One CSFV C strain which can be detected by immunofluorescence technique was found and a new method in titering called flurescent plaque formation unit (F-PFU) was developed. It took about 5 days for all cells of primary bovine testis to be infected by CSFV and the titre of progeny virions in medium was 10^5 F-PFU/ml from then on. The cell types of cultured bovine testicular cells changed along with cell passages. The mechanism of some phenomena in vaccine production was showed and some factors which effect the multiplication of CSFV C strain in primary bovine testicular cells were studied. Aknowledgements on the multiplication of CSFV C strain in primary bovine testicular cells were enriched and a new way to raise the titer of CSFV was suggested.

Key words: Classical Swine Fever Virus (CSFV); The Lapinized Chinese strain of CSFV (CSFV C strain); Immunofluorescence technique; Flurescent plaque formation unit (F-PFU); Vaccine production