

## 甲肝病毒在猴胚肾细胞和 Vero 细胞上的分离与适应

井申荣, 姜述德, 余芬, 王燕

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所, 云南昆明 650118)

## Isolation and Adaptation of HAV on MEK Cells and Vero Cells

JING Shen-rong, JIANG Shu-de, YU feng, WANG Yan

(Chinese Academic of Medical Science, Chinese Union Medical University, Institute of Medical Biology, Kunming 650107, China)

**Abstract:** HAV strains W and X were isolated and adapted to Rhesus monkey embryo kidney (MEK) cells from feces of hepatitis A patients, and identified to be HAV with blocking experiment, neutralizing experiment, indirect immunofluorescence (IF), immune electron microscopy (IEM) and RT-PCR. Antigenic titers of strains W and X P7 on MEK cells were 1:512, 1:1024, respectively and infective titers ( $\log_{10}TCID_{50}/mL$ ) of that were 8.17, 8.50 respectively. Only the isolate W was adapted to Vero cells. Antigenic titer of adapted strain W P6 on Vero cells on 21th day was 1:256 and infective titer ( $\log_{10}TCID_{50}/mL$ ) was 8.00.

**Key words:** HAV; MEK cells; Vero cells; Isolation; Adaptation

**摘要:** 使用恒河猴胚肾 (MEK) 细胞从临床标本中分离和适应了甲肝病毒 W 和 X, 通过阻断实验、中和实验、免疫荧光和免疫电镜实验、RT-PCR 对其进行特异性鉴定, 证明是甲肝病毒。W 株和 X 株第 7 代在 MEK 细胞上的抗原滴度分别为 1:512、1:1024, 感染滴度 ( $\log_{10}TCID_{50}/mL$ ) 分别为 8.17、8.50。只有分离株 W 可以适应于 Vero 细胞, 第 6 代 21d 抗原滴度为 1:256, 感染滴度 ( $\log_{10}TCID_{50}/mL$ ) 为 8.00。

**关键词:** 甲肝病毒; MEK 细胞; Vero 细胞; 分离; 适应

**中图分类号:** R373.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)03-0212-04

HAV 是危害人体健康的常见病原体, 为了预防甲型肝炎, 人们体外培养甲肝病毒用于制备甲肝疫苗。各国学者用不同的细胞分离培养 HAV, 但是大多数不是 WHO 推荐使用的细胞基质, 而 Vero 细胞和人二倍体细胞才是生产人用疫苗的良好基质, 同时 Vero 细胞适宜于微载体技术大规模培养。因此, 将 HAV 适应于 Vero 细胞尤为重要, 它是采用微载体技术大规模自动化生产甲肝灭活疫苗的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本的采集和处理

1997 年 5~6 月采集于昆明医学院第一附属医

院传染病科的住院患者粪便 9 例。20% 的粪便悬液, 离心, 活性炭吸附, 过滤除菌, 滤液 -20℃ 保存备用。

### 1.2 细胞

恒河猴胚肾 (Rhesus monkey embryo kidney, MEK) 细胞, 为次代猴肾细胞; Vero 细胞使用 135~159 代。培养液是 MEM (含 0.16% 水解乳蛋白及 2%~5% 的小牛血清)。

### 1.3 病毒滴度测定

长成单层的细胞, 接种病毒液, 35℃ 培养 28d 后收毒, ELISA 检测病毒的抗原滴度。测定感染滴度时, 将病毒液做 10 倍稀释, 每个稀释度种毒四个方

收稿日期: 2000-07-03, 修回日期: 2000-12-10

作者简介: 井申荣 (1968-), 男, 陕西省蒲城县籍, 助理研究员, 博士, 主要从事病毒疫苗的基础研究。

瓶的细胞,另设细胞对照两瓶,用 Read-Muench 法计算感染滴度( $\log_{10}TCID_{50}/mL$ )。

#### 1.4 HAV 特异性鉴定

阻断试验、中和试验、免疫电镜试验和免疫荧光试验分别参见文献<sup>[8,9,11]</sup>。AC-RT-PCR 核酸鉴定使用的 DNA 扩增引物按 HM-175/wt 的基因组序列<sup>[3]</sup>设计, S1: forward 5' GTC GAA TTC A<sub>58</sub> CT TGA TAC CTC ACC GC3'; S2: reverse 5' GCG GTC GAC G<sub>294</sub> CT AAT CAT GGA GTT GAC 3', 扩增全部片段大小是 255bp。方法见文献<sup>[14]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 HAV 的分离

使用 MEK 细胞从 9 例标本中分离出 HAV 毒株 W、X, 随培养代次增加, 抗原滴度也增加(见表 1)。而使用 Vero 细胞从所有粪便悬液中分离 HAV 都未成功。

表 1 HAV 毒株在 MEK 细胞上各代次的抗原滴度

Table 1 Antigenic titers of HAV strains of different passages in MEK cells

| 毒株<br>Strains | 代次 Passages |      |      |       |      |       |        |        |
|---------------|-------------|------|------|-------|------|-------|--------|--------|
|               | P1          | P2   | P3   | P4    | P5   | P6    | P7     | P8     |
| W             | ±           | 1:32 | 1:64 | 1:256 | 1:64 | 1:64  | 1:256  | 1:512  |
| X             | 1:4         | 1:16 | 1:32 | 1:128 | 1:64 | 1:512 | 1:1024 | 1:1024 |

Note: ± result doubted by ELISA.

### 2.2 鉴定 HAV 的特异性

2.2.1 阻断试验 HAV 毒株 W 及 X 经与抗-HAV 抗体阳性血清及阴性血清反应, ELISA 测定 OD 值, 结果判定: 阳性血清与 HAV 反应后皆为阴性, 而阴性血清与 HAV 反应后都为阳性, 因此从抗原性方面证明 W、X 毒株都是 HAV。

2.2.2 中和试验 阳性血清与毒株 W、X 中和后经 MEK 细胞增毒, ELISA 测定为阴性; 阴性血清与毒株 W、X 中和、增毒, ELISA 测定为阳性, 因此从感染性方面证明所分离的两株毒种是 HAV。

2.2.3 免疫荧光及免疫电镜观察 其中 W 荧光显微镜下可见细胞质内有黄绿色砂粒状荧光颗粒(见封 3 彩图版 1)。从病毒在细胞内的繁殖位置证明这两个毒株是 HAV。

W 株在电镜下既有空心颗粒, 也有实心颗粒(见封 3 彩图版 2), 直径都为 27nm, 从形态学上证明这两株病毒为 HAV。

2.2.4 核酸鉴定 AC-RT-PCR 扩增这两株毒种的部分 5' NCR, 结果见封 3 彩图版 3。所扩增的片段大小与预计的相同, 因此从核酸上证明这两株毒株

都是 HAV。

### 2.3 传代性适应

HAV 毒株 W、X 在 MEK 细胞上进行了传代性适应, 每个培养周期为 28d, 测定每代的抗原滴度, 毒种的抗原滴度随代次的增加而增大(见表 1), WP8 为 1:512, XP8 为 1:1024。

将 MEK 细胞上适应至第 4 代的毒株 W、X 接种在 Vero 细胞上进行适应, 盲传 3 代, 并测定抗原滴度, W 可以适应到 Vero 细胞, 而 HAV 毒株 X 仍不能适应到 Vero 细胞。毒株 W 各代次的抗原滴度随其在 Vero 细胞传代次数增加, 抗原滴度也随之升高(见表 2)。第 12 代时增加到 1:1024。用 MEK 细胞和 Vero 细胞培养 HAV 时, 都未见有细胞病变。

表 2 HAV 毒株在 Vero 细胞上各代次的抗原滴度

Table 2 Antigenic titers of HAV strains of different passages in Vero cells

| 毒株<br>Strains | 代次 Passages |    |     |      |       |       |       |        |        |  |
|---------------|-------------|----|-----|------|-------|-------|-------|--------|--------|--|
|               | P1          | P2 | P3  | P4   | P5    | P6    | P8    | P10    | P12    |  |
| W             | -           | -  | 1:4 | 1:32 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 | 1:1024 |  |
| X             | -           | -  | -   | -    | -     | -     | -     | -      | -      |  |

Note: - negative by ELISA

### 2.4 HAV 毒株在 MEK 细胞及 Vero 细胞上的增殖动力学

由 MEK 细胞培养的 W P7 21d、X P7 28d 抗原量即 OD 值最高(见图 4), HAV 增殖达到最高峰, 测定其抗原滴度分别为 1:512、1:1024, 感染滴度分别为 8.17、8.50。P6 在 Vero 细胞增殖高峰位于 21d, 此时的抗原滴度为 1:256, 感染滴度是 8.00。

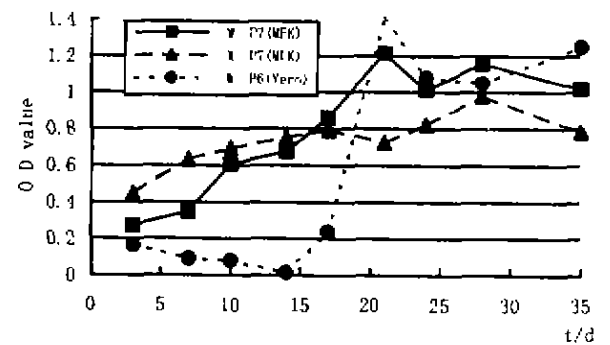


图 4 HAV 毒株在 MEK 和 Vero 细胞中的增殖动态

Fig. 4 Time-course of growth of HAV strains in MEK and Vero cells

### 2.5 Vero 细胞适应株 W 的带毒传代

将 Vero 细胞的适应株 W 的第 10 代进行带毒传代。培养时间从原来的 21d 缩短至 14d、10d, 每代抗原滴度保持在 1:1024。培养过程中, 未见到细胞病变现象。

### 3 讨论

甲肝灭活疫苗具有良好的免疫原性、安全性和效力,具有广阔的应用价值和市场前景。但制备甲肝病毒的传统生产工艺难以满足对病毒抗原的需求,而自动化大规模生产的微载体培养技术可以解决这一问题。Vero 细胞是适宜于微载体技术大规模培养和生产人用疫苗的良好基质。

应用微载体—Vero 细胞培养甲肝病毒的首要工作是将甲肝病毒很好地适应到 Vero 细胞中,然而文献报道甲肝病毒在 Vero 细胞中不易适应<sup>[12]</sup>或是适应后病毒滴度不高、周期长<sup>[6,7,10]</sup>。为此我们从临床标本中用 MEK 细胞分离 HAV 毒株,并进一步适应到 Vero 细胞中,在此基础上应用微载体培养 Vero 细胞制备了甲肝灭活疫苗<sup>[15]</sup>。

Binn 等<sup>[1]</sup>认为低代次的细胞尤其是胚系细胞对 HAV 敏感,而传代细胞分离 HAV 较难;即使分离适应成功,滴度不高,如 Vero 细胞、BS-C-1 细胞<sup>[6,7,10,12]</sup>;我们的实验结果也证明了这一点,直接用 Vero 细胞及 MEK 细胞从粪便中分离 HAV,前者盲传三代也未见分离 HAV,而后者从第 1 代就发现了 HAN,第 2 代、3 代病毒已有大量繁殖(见表 1)。因此,使用 MEK 细胞分离 HAV 是比较好的选择,有利于尽快获得 HAV 毒株。MEK 细胞适应株第 4 代病毒再来适应 Vero 细胞,分离株 W 在第一、二代时为阴性,第三代时显阳性,抗原滴度为 1:4,此后随着培养代次的提高,抗原滴度在不断增加。Gregersen 等<sup>[5]</sup>称之为预适应(Pre-adaption)。由于 MEK 细胞与 Vero 细胞都属于猴类肾细胞,HAV 相继适应于这两种同类型细胞相对容易<sup>[1]</sup>。

W 株可以进一步适应到 Vero 细胞上,而 X 株却未能,说明 HAV 各毒株间虽然抗原性相同,但在组织细胞上的繁殖能力及适应能力存在株间差异<sup>[1,2,4,10,12]</sup>。毒株 W 在 MEK 细胞和 Vero 细胞的增殖动态很大的差别,MEK 细胞中抗原随培养时间而平缓增加,Vero 细胞中 HAV 抗原量在前 14d 无变化,17d 才有所增加,21d 达到增殖高峰,此后在 35d 略有下降。由此看来 HAV 毒株 W 在 MEK 细胞中为平缓上升,Vero 细胞为爆发式增长,显示出同一毒株在不同细胞中生长特性的差异,即潜伏期在不同细胞中有长有短。其它 HAV 毒株在不同细胞也存在类似的现象<sup>[4]</sup>。即使同是人胚肺二倍体细胞,但

细胞株不同(2BS 与 SL7),对同一毒株的潜伏期也有明显的差异<sup>[13]</sup>。

由于 HAV 毒株多数都不裂解细胞形成 CPE,因此利用该特性在细胞中形成持续感染(persistent infection),使宿主细胞长期带有 HAV 而不断地传代,这样就省去了种毒这个步骤,对于快速稳定获得病毒产量很有帮助。从我们的实验结果来看,不管种毒培养 W 株,还是带毒传 W 株,高代次时都能达到 1:1024,带毒传代的 WTen 株培养 5 代,每代抗原滴度都维持在 1:1024,但没有继续提高的迹象,似乎是 Vero 细胞中 HAV 病毒达到了饱和状态。

### 参考文献

- [1] Binn LN, Lemon SM, Marchwicki RN, et al. Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures[J]. J Clin Microbiol, 1984, 20: 28-33.
- [2] Bradley DW, Schable CA, McCausland KA, et al. Hepatitis A virus: growth characteristics of in vivo and in vitro propagated wild and attenuated strains[J]. J Med Virol, 1984, 14: 373-386.
- [3] Cohen JL, Goehart JR, Purcell RH, et al. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses[J]. J Virol, 1987, 61: 50-59.
- [4] Daemr RJ; Feinstone SM; Gust ID; et al. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage[J]. Infect Immun, 1981, 32: 388-393.
- [5] Gregersen JP, Mehdi S, Mauler T. Adaptation of hepatitis A virus to high titre growth in diploid and permanent cell cultures[J]. Med Microbiol Immunol, 1988, 177: 91-100.
- [6] Kojima H, Shibayama T, Sato A, et al. Propagation of human hepatitis A virus in conventional cell lines[J]. J Med Virol, 1981, 7: 273-286.
- [7] Locanini SA, Coulepis AG, Westaway EG, et al. Restricted replication of human hepatitis A virus in cell culture: Intracellular biochemical studies[J]. J Virol, 1981, 37: 216-225.
- [8] 王兆荃,董祥家,马力,等.组织培养甲型肝炎病毒及其应用[J].中华传染病杂志,1986,4(4):187-190.
- [9] 丛树梅,陈虹,张玉梅,等.人胎肺细胞制备 HAAg 的研究[J].中华医学检验杂志,1991,14(2):93-95.
- [10] 史江,郑纪山,张云.甲型肝炎病毒灭活试验方法的研究 I.甲型肝炎病毒在不同细胞株中的增殖及其免疫荧光法检测[J].中国消毒学杂志,1993,10(4):198-201.
- [11] 陈统球,钟光六,阳选祥,等.在人二倍体细胞上分离和适应的甲型肝炎病毒株[J].中国医学科学院学报,1996,18(1):29-32.
- [12] 高峰,刘崇柏.我国不同粪便来源 HAV 在细胞培养上繁殖特性的比较[J].实验和临床病毒学杂志,1989,3(3):21-24.
- [13] 焦永真,邵焕英,王宪明,等.用人胚肺二倍体细胞(2BS 和 SL7)分离甲型肝炎病毒[J].病毒学报,1988,4(2):126-130.
- [14] 李君文,张符光,晁福寰,等.一步单管反转录 PCR 检测水中甲型肝炎病毒[J].中国卫生检验杂志,1996,6(2):63-66.
- [15] 井申荣,尹卫东,万宗举,等.微载体培养 Vero 细胞和 MEK 细胞试制甲肝灭活疫苗[J].免疫学杂志,2000,16(4):260-263.