

影响麻疹病毒血凝素滴度的 某些因素的探討*

曾毅 鄧裕美 黃禎祥

(中国医学科学院病毒学系, 北京)

自从 Peries 等^[1] 报告麻疹病毒具有凝集猴血球的特性之后, 近来有不少作者^[2-6] 证实了这一研究。但麻疹病毒的血凝滴度較低, 作血凝抑制試驗时, 一般均采用理化方法将血凝素加以浓缩。我們曾对麻疹病毒的血凝性質进行研究, 可以不經浓缩而获得滴度較高的血凝素。关于应用麻疹病毒血凝抑制試驗检查麻疹抗体的研究, 已有报告^[7]。现将影响麻疹病毒血凝素滴度的某些因素报告如下:

一、材料和方法

病毒 麻疹病毒 L₄ (列宁格勒-4) 株。在原代人羊膜細胞传过 35—37 代。病毒悬液于 4℃ 冰箱保存。

組織培养 采用原代人胚腎細胞、传代人腎細胞、原代人羊膜細胞和传代人羊膜細胞。原代細胞的培养液为 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 液加 10—15% 小牛血清。传代細胞的培养液为 199 溶液加 10% 小牛血清。細胞接种于 7×4×3 厘米的小瓶中, 每瓶加培养液 5 毫升, 待长成单层后应用。維持液采用含 5% 小牛血清的 199 溶液。作維持液的小牛血清应无非特异性凝集物質存在。

血球 自恆河猴 (*M. rhesus*) 股靜脉采血, 加至 Alsever 氏溶液中, 放 4℃ 下保存。用前先經 pH 8.0 的磷酸緩冲盐水洗滌 3 次, 再配成 1% 的血球悬液, 放 4℃ 保存。

血凝素 选择形态好、长成单层的組織培养, 吸去培养液, 每瓶接种 0.3 毫升病毒 (約 3000—9000 TCID₅₀), 在 37℃ 下靜置 30 分钟, 然后加入 5 毫升維持液, 放 33℃ 或 37℃ 培养, 随后逐日观察。原代細胞一般在接种病毒后第 5—6 天換液, 传代細胞在 2—3 天換液。有一部分細胞在感染病毒后直至收获时不再換液以資比較。待 90% 以上的細胞产生病变 (“++++”) 后收获。原代細胞的病变发展到 “++++” 时, 多在感染后的第 9—12 天, 传代細胞多在第 5—6 天。收获的液体經 1500rpm 离心沉淀 10 分钟。吸取上清液, 作血凝素滴定。

血凝試驗 用 pH 8.0 的磷酸緩冲盐水, 将血凝素从 1:2 开始作倍比稀释, 每管 0.4 毫升。加入 1% 血球悬液 0.2 毫升。將試管充分振蕩, 在 37℃ 靜置 1 小时后看結果。根据血球凝集程度, 分別記以 “+”、“++”、“+++”、“++++” 号。以能凝集紅血球达 “++” 的最高稀释度为一个血凝单位。

二、結 果

(一) 比較麻疹病毒在 33℃ 和 37℃ 培养的血凝滴度

用同剂量的麻疹病毒感染人腎細胞后, 分兩組同时分別放到 33℃ 和 37℃ 中, 以便觀

* 本文曾在北京市微生物学会 1962 年学术年会病毒組宣讀。
本文 1962 年 10 月 22 日收到。

察温度对血凝素产生的影响。结果见图 1 及表 1。

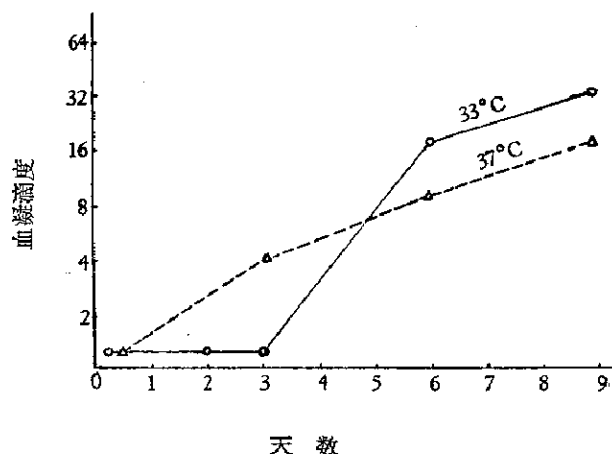


图 1 麻疹病毒在 33°C 和 37°C 培养的血凝滴度曲线 (原代人胚肾)

表 1 比较麻疹病毒在 33°C 和 37°C 培养的血凝滴度

培养细胞	试验	温 度	
		37°C	33°C
原代人胚肾	1	1:8	1:16
	2	1:8	1:16
传代人肾	1	1:8	1:32
	2	1:8	1:32

从图 1 可以看到, 原代人胚肾细胞感染麻疹病毒后, 在 37°C 培养时, 血凝素在感染后第 3 天已开始上升, 第 9 天达高峰 (为 1:16)。在

33°C 时, 血凝素开始上升较缓慢, 但在第 9 天时, 其滴度超过了 37°C 的血凝滴度 (为 1:32)。表 1 的结果也说明在 33°C 时, 所产生的血凝滴度较 37°C 的血凝滴度高 2—4 倍。

(二) 不同细胞培养的麻疹病毒血凝滴度比较

用麻疹病毒感染四种不同细胞, 放在 33°C 下培养, 比较其血凝滴度。结果见表 2。

表 2 不同细胞培养的麻疹病毒血凝滴度比较 (33°C)

试 验	原代人胚肾	传代人肾	原代人羊膜	传代人羊膜
1	1:16	1:32	1:4	1:16
2	1:16	1:32	1:16	1:32
3	1:32	1:64	1:8	未做
4	1:16	1:64	1:8	未做

传代人胚肾细胞的血凝滴度为 1:32—1:64, 原代人胚肾细胞的血凝滴度为 1:16—1:32, 传代人羊膜细胞的血凝滴度为 1:16—1:32, 原代人羊膜细胞的血凝滴度为 1:4—1:16。由此看来, 在同种类细胞中, 传代细胞的血凝滴度较原代细胞的血凝滴度稍高。在不同种类细胞中, 人肾细胞的血凝滴度也较人羊膜细胞的血凝滴度稍高。

(三) 细胞病变和病毒滴度与血凝滴度的关系

每瓶传代人肾细胞接种 0.3 毫升 (约 3000—9000 TCID₅₀) 病毒, 加 5 毫升维持液, 放 33°C 培养。在第 3 天如细胞病变未发展到“++++”, 则给予换液, 待病变发展到“++++”时收获作血凝试验。

从表 3 可见, 每瓶细胞产生病变到达“++++”的时间并不完全一致, 可以从第 2 天至第 6 天。但此时病毒的感染滴度都在 log₁₀ 3.5 左右。而血凝滴度则与细胞病变达“++++”的时间长短有密切关系。在第 3 天以前, 细胞完全破坏, 血凝滴度较低, 为 1:2—1:8。在第 4 天后完全破坏者, 血凝滴度较高, 为 1:32—1:64。此外, 如果细胞病变发展不好, 即使在第 6—7 天收获, 其血凝滴度均很低。如在第 2—3 天换液, 则细胞状态较不换液的好,

表 3 细胞病变和病毒滴度与血凝滴度的关系
(传代人肾细胞, 33℃)

细胞病变到达 “++++”时	病毒滴度	血凝滴度
第 2 天	3.5*	1:2
第 2 天	3.5	1:4
第 3 天	2.5	1:8
第 3 天	3.5	1:8
第 4 天	3.5	1:32
第 4 天	4.0	1:32
第 6 天	3.5	1:32
第 6 天	未做	1:64

* 为 log₁₀ TCID₅₀/0.1 毫升。

而且细胞病变发展迅速,这样的血凝滴度都较高。原代细胞在感染病毒后第 5—6 天亦应换以新的维持液,否则细胞病变发展不好,血凝滴度不高。

(四) 血凝素对温度的稳定性

在无菌条件下将同批血凝素分装到带橡皮塞的试管中,每管 0.4 毫升量,然后分别放至 -15℃、4℃、33℃ 及 37℃ 下,观察不同温度对血凝素稳定性的影响。

所得结果是血凝素在 4℃ 保存 1 个月和在 -15℃ 保存 1 个半月,血凝滴度无变化。在 37℃ 保存时,血凝滴度第 2 天就下降 1/2,但以后直至第 1 周并不继续下降。在 33℃ 保存 3 天,血凝滴度不下降,第 4 天才下降 1/2。

(五) 冰冻融化和超声波对血凝滴度的影响

血凝素与刮下的细胞同时在冷冻机的酒精槽内冰冻 10 分钟后,于 37℃ 水浴融化,如此连续冻化 5 次,或用国产上海中原电器厂出品的超声波发生器以 20.4 千赫兹作用 10—15 分钟,然后在普通显微镜下观察作用后的细胞形态,并测定上清液的血凝滴度。实验结果表明,血凝素在冻化前后的滴度是一致的。而经超声波作用后血凝滴度升高 4 倍(见表 4)。单纯以上清液经超声波作用,血凝滴度无改变。在显微镜下观察,当冰冻融化时,细胞破裂不多,但超声波作用后,细胞破裂较多。

表 4 超声波对血凝滴度的影响

原血凝滴度	超声波作用后 血凝滴度*
1:8	1:32
1:8	1:32
1:2	1:8

* 血凝素上清液+细胞悬液

(六) 不同浓度的血球对血凝滴度的影响

表 5 不同浓度的血球对血凝滴度的影响

试 验	红 血 球 浓 度	
	1%	0.5%
1	1:8	1:16
2	1:16	1:32
3	1:16	1:32

用 3 批麻疹病毒血凝素分別加 1% 和 0.5% 濃度的紅血球懸液 0.2 毫升, 放在 37°C 下 1 小時, 結果如表 5 所示。當血球濃度為 0.5% 時, 其血凝滴度較血球濃度為 1% 時高 1 倍。

三、討 論

根據近兩年來不同學者對麻疹病毒血凝素的研究, 血凝滴度一般都不夠高。多以濃縮的血凝素作血凝抑制試驗。我們製備的血凝素滴度較高, 可能與以下幾個因素有關: (1) 細胞的種類: 從本實驗室所用的同批實驗的 4 種細胞看來, 傳代細胞的血凝滴度較原代細胞稍高, 人腎細胞的血凝滴度又較人羊膜細胞稍高, 而其中以傳代人腎細胞的血凝滴度最高, 為 1:32—1:64。這可能與細胞的敏感性有關。Peries 和 Rosen 報告^[1,6], 用 KB 細胞製備麻疹病毒的血凝素, 經理化方法濃縮 10 倍後, 其滴度分別為 1:80—1:160 和 1:64—1:128; Мастюкова^[3] 用 KB 細胞製備的血凝素滴度為 1:2—1:4; Rosanoff 報告^[2], 用原代人羊膜細胞製備的血凝素, 經 10 倍濃縮後的血凝滴度為 1:4, 用傳代人羊膜細胞製備的血凝滴度濃縮後為 1:8。由此看來, 我們所製備的麻疹病毒血凝素的滴度較上述作者未經濃縮前的血凝滴度高。(2) 細胞狀態: 細胞狀態與血凝滴度有密切的關係。如果細胞形態不佳, 血凝滴度往往很低或陰性。故製備血凝素時, 應挑選形態良好的細胞。此外, 我們還觀察到原代細胞在感染後第 5—6 天, 傳代細胞在第 2—3 天, 換以新鮮的維持液, 細胞狀態較佳, 而且有助於提高血凝滴度。特別是傳代細胞代謝旺盛, 不換維持液細胞容易衰老。(3) 細胞病變發展的程度和速度: 當病毒感染細胞後, 如細胞病變發展得不好, 或發展範圍不大而停滯, 血凝滴度常常很低或陰性。如在培養過程中, 換以新鮮維持液, 不僅能維持細胞的狀態良好, 而且對病變的繼續發展也有明顯的促進作用。此外, 細胞病變在短時間內發展過快, 如傳代細胞在第 3 天以前, 90% 以上的細胞已破壞, 則血凝滴度很低。這可能與病毒的感染量有關, 故病毒感染量不宜過大。Лозовская^[4] 已有類似的報告。(4) 培養細胞的溫度: 細胞在 37°C 培養所產生的血凝素, 雖出現較早, 但最後的滴度都低於在 33°C 培養的血凝滴度, 這可能是由於溫度對血凝素的滅活所致。因此, 製備血凝素時, 在 33°C 培養細胞較為合適。

其次, 通過物理因素和減少血球濃度, 也可以提高血凝滴度。將感染後的細胞和病毒懸液一起凍化 5 次, 不能提高血凝滴度。在普通顯微鏡下觀察凍化後的細胞, 大部分未破裂。而通過 20.4 千赫茲頻率超聲波作用 10—15 分鐘, 血凝滴度提高 4 倍。在顯微鏡下, 可以見到較多的細胞已破成碎片。超聲波作用於血凝素上清液, 血凝滴度在作用前後均無變化。因此超聲波提高麻疹病毒血凝滴度的機制, 可能是通過一定頻率的振蕩作用, 使細胞破裂而釋放出細胞內的血凝素。不同作者在進行血凝試驗時, 常採用的紅血球濃度為 0.75—1% 0.2 毫升^[5] 和 0.5% 濃度 0.5 毫升。根據本實驗所得結果, 應用小量血球 (0.5% 0.2 毫升) 可以得到較高的血凝滴度。因此, 採用超聲波振蕩和減少紅血球的用量, 都可以提高血凝滴度, 因而可節省試驗中血凝素的用量。

四、總 結

本文報告有關麻疹病毒血凝素的研究。(1) 用傳代細胞製備血凝素的滴度較原代細

胞的稍高, 而人腎細胞制备的血凝素滴度也較人羊膜細胞的稍高。(2) 細胞状态和产生病变的时间与血凝滴度有密切的关系。細胞状态不佳, 病变发展不好或过快, 血凝滴度均不高。組織培养在感染病毒数天后, 換以新鮮維持液能維持細胞在良好的状态, 并可促进細胞病变的发展, 有助于血凝滴度的提高。(3) 細胞在 33°C 下培养的血凝素較在 37°C 下培养的高。(4) 用超声波振蕩和减少紅血球用量, 均可提高血凝滴度。

参 考 文 献

- [1] Peries, J. K. and Chany, C.: *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **251**: 820, 1960.
- [2] Rosanoff, E. I.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **106**: 563, 1961.
- [3] Мастюкова, Ю. Н. и Хавт, С. Л.: *Вопр. вирусол.*, (3): 339, 1961.
- [4] Лозовская, Л. С.: *Вопр. вирусол.*, (4): 486, 1961.
- [5] DeMeio, J. L. and Gower, T. A.: *Virology*, **13**: 367, 1961.
- [6] Rosen, L.: *Virology*, **13**: 139, 1961.
- [7] 曾毅、邓裕美: 中华医学杂志, **47**: 335, 1961.

STUDIES ON SEVERAL FACTORS AFFECTING THE HEMAGGLUTININ TITER OF MEASLES VIRUS

TSENG YI, TENG YÜ-MEI, HUANG CHEN-HSIANG

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

A study on several factors affecting the hemagglutinin titer of measles virus was made. Without concentrating the infectious tissue culture fluid, the hemagglutinating titre of 1:32—1:64 has been obtained. The following factors were found to be important in obtaining high titre hemagglutinin: 1). Type of cell culture used—continuous cell line was better than its corresponding primary cell culture and human renal cell culture better than human amnion cell culture; 2). With the same type of cells, cultures showing over-rapid development of CPE gave low titre of hemagglutinin, although the infectivity titre was found to be approximately the same as those giving high titre of hemagglutinin with late development of CPE culture. Change of maintenance medium after 5—6 days of infection in primary cell culture or after 2—3 days in continuous cell lines not only maintained the cell in good condition but also stimulated the rapid development of CPE. Thus leading to the production of high titre hemagglutinin; 3). Cell cultures incubated at 33°C gave a better production of hemagglutinin than those incubated at 37°C ; 4). Treatment of infected cell culture with ultrasonic wave increased the yield of hemagglutinin to 4 folds. By decreasing the concentration of red blood cell from 1% to 0.5%, the hemagglutinin titre could be raised to 2 folds.