

传代细胞对 Echo 病毒的敏感性及其血凝能力改变的影响

曾毅 王政 顾方舟

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

正常细胞在体外长期培养后, 很多特性发生了改变, 如细胞形态、代谢、分裂速度、染色体数目、对病毒的敏感性等等。毛江森等^[1]报告 1 株传代人肾细胞 (MERN), 在体外经 5 个多月传 38 代之后, 对肠道病毒仍很敏感。但该细胞株经更长时间传代之后, 是否会改变其对肠道病毒的敏感性, 有必要作进一步的研究, 以确定其是否能作为实验室研究肠道病毒之用。文献报告^[2]传代肿瘤细胞 (HeLa 细胞和 KB 细胞) 对 Echo 病毒的敏感性低, 细胞病变不明显, 但有些型别经多次传代之后, 可以使细胞产生病变, Echo 病毒在该细胞传代, 其凝集人红血球的能力 (以下简称血凝能力) 会消失。我们^[3]及其他学者^[4,5]曾报告原代人肾细胞及原代人羊膜细胞对 Echo 病毒很敏感, 在该细胞上培养的某些型的 Echo 病毒具有血凝能力, 甚至无血凝能力的 Echo 6 D'Amori 毒株在原代人肾细胞连续传代后, 可以变为有血凝能力的毒株^[6]。而人肾细胞及人羊膜细胞在体外经过长期传代培养之后, 是否会影响 Echo 病毒的血凝能力呢? 这是值得研究的问题。本文报告传代正常细胞 (传代人肾和传代人羊膜细胞) 及传代肿瘤细胞 (KB 细胞) 对 Echo 病毒的敏感性及其血凝能力改变的影响。

材 料 和 方 法

1. 细胞 原代人胚肾细胞 (HK), 培养液为 0.5% 的水解乳蛋白溶液加 10% 的小牛血清。传代细胞有传代人肾细胞 (MERN) 株^[7] (在体外经 2 年半的长期培养), 传代人羊膜细胞 (FL 株) 及传代肿瘤细胞 (KB 细胞)。传代细胞的培养液为含 15% 小牛血清的 199 溶液, 维持液为含 5—10% 小牛血清的 199 溶液。传代人肾细胞和传代人羊膜细胞, 其来源为正常细胞, 为了避免与传代肿瘤细胞混淆, 将其称为传代正常细胞。MERN 细胞株的染色体众数为 73, FL 细胞株的染色体众数为 76。

2. 病毒 为有血凝能力的 Echo 3、6、7、11、12、13 和 19 型的标准毒株。其中 Echo 6 为本实验室通过原代人肾细胞连续传代获得有血凝能力的 D'Amori 毒株^[6]。

3. 病毒传代 将有血凝能力的 Echo 病毒接种于原代人肾细胞, 每管为 0.1 毫升, 加 0.9 毫升 199 溶液, 放 37℃ 培养, 待 90% 以上的细胞产生病变 (“++++”) 时收获, 放 -20℃ 冰箱保存, 测定病毒的血凝滴度, 并同时在原代人肾细胞, 传代人肾细胞, 传代人羊膜细胞和 KB 细胞滴定病毒滴度。将此批病毒做毒种在 3 种传代细胞连传 3 代, 传代方法与在原代人肾细胞传代相同。细胞病变达 “++++” 或当对照细胞出现非特异性退变时收获, 分别测定各代病毒的血凝滴度, 并将第 3 代的病毒在原代人肾细胞滴定病毒滴度, 最后将在传代细胞传 3 代的病毒传回原代人肾细胞, 以观察其血凝能力的改变情况。

4. 血凝试验 用 pH 为 7.2 的磷酸缓冲盐水将病毒悬液由 1:2 开始做倍比稀释, 每管 0.5 毫升, 加

0.1 毫升 1% 的人脐带红血球, 放 4℃ 冰箱, 2 小时后观察结果。能凝集红血球的病毒悬液的最高稀释度即为该病毒的血凝滴度, 1:2 无血凝出现者为血凝阴性。

结 果

一、传代细胞对 Echo 病毒的敏感性

首先观察传代细胞对 Echo 病毒的致细胞病变作用的敏感性。以同批 Echo 病毒悬液在传代人肾细胞、传代人羊膜细胞和 KB 细胞上滴定病毒滴度, 并以原代人肾细胞作对照。实验结果见表 1, Echo 3、6、7、11、12、13 和 19 型病毒在原代人肾细胞滴定的病毒滴度为 $\log_{10}$ 5.3—7.5/0.1 毫升, 而在 3 种传代细胞滴定的病毒滴度为 $\log_{10}$ < 1—3.0/0.1 毫升。此结果表明原代人肾细胞对 Echo 病毒的致细胞病变作用很敏感, 而传代正常细胞和肿瘤细胞的敏感性则大为降低。

其次观察 Echo 病毒在传代细胞上的繁殖情况。Echo 病毒在传代细胞连续传 3 代后在原代人肾细胞滴定病毒滴度。实验结果见表 1, Echo 病毒在传代人肾细胞和传代人羊膜细胞上繁殖后在原代人肾细胞滴定其病毒滴度为 $\log_{10}$ 5.3—7.5/0.1 毫升, 与在原代人肾细胞上繁殖的病毒滴度相似。在 KB 细胞上繁殖的病毒滴度亦与原代人肾细胞相似或仅低 1 log 左右。

表 1 传代细胞对 Echo 病毒的敏感性及其血凝能力改变的影响

病毒 型 别	原代人肾细胞 (HK)					传代人肾细胞(MERN)				传代人羊膜细胞(FL)				传代肿瘤细胞(KB)			
	病 毒 滴 度					1 代				2 代				3 代			
						1 代				2 代				3 代			
	HA 滴度	HK	MERN	FL	KB	HA 滴度	HA 滴度	HA 滴度	病毒 滴度	HA 滴度	HA 滴度	HA 滴度	病毒 滴度	HA 滴度	HA 滴度	HA 滴度	病毒 滴度
Echo 3	1:1024	6.5*	1.5	1.3	1.0	—	—	—	6.0†	—	—	—	6.3†	—	—	—	5.0†
Echo 6	1:32	7.5	2.5	3.0	2.5	1:16	1:16	1:32	7.5	1:32	1:16	1:32	7.0	—	—	—	6.5
Echo 7	1:2048	6.3	2.0	1.5	1.3	—	—	—	6.0	—	—	—	6.5	—	—	—	6.0
Echo 11	1:2048	6.8	1.7	2.0	1.0	1:64	1:64	1:128	6.5	1:256	1:128	1:128	7.3	—	—	—	5.0
Echo 12	1:4096	6.5	1.5	1.5	1.3	1:256	1:128	1:512	6.5	1:128	1:512	1:256	6.5	—	—	—	6.5
Echo 13	1:2048	5.3	1.3	1.0	<1.0	—	—	—	5.5	—	—	—	5.3	—	—	—	5.0
Echo 19	1:1024	7.0	1.0	1.0	<1.0	—	—	—	5.7	—	—	—	5.5	—	—	—	6.0

* $\log_{10}$ /0.1 毫升; † 在 HK 细胞滴定; “—”血凝阴性。

二、传代细胞对 Echo 病毒的血凝能力改变的影响

实验结果如表 1 所示, Echo 3、7、11、12、13、19 型病毒在原代人肾细胞培养, 其血凝滴度较高为 1:1024—1:4096。Echo 6 D'Amori 毒株原来是无血凝能力的毒株, 在原代人肾细胞传代后变为有血凝能力的毒株, 第 10 代的血凝滴度为 1:32。Echo 病毒在传代人肾细胞和传代人羊膜细胞上传代, 第 1—3 代的结果基本上相似, Echo 6 型病毒的血凝滴度没有变动, Echo 11、12 型病毒的血凝滴度较在原代人肾细胞培养的血凝滴度低, 为 1:64—1:512; 而 Echo 3、7、13、19 型病毒的血凝则全部变为阴性。在 KB 细胞传代的 Echo 各型病毒的血凝亦全部变为阴性。从表 1 还可以看出 Echo 病毒血凝能力的降低或消失与病毒滴度关系不大, 因为在传代细胞传代的病毒滴度并不降低, 或仅稍微降低。

表 2 经传代细胞传 3 代的 Echo 病毒在原始人肾细胞培养一代的血凝滴度

病毒型别		Echo 3	Echo 6	Echo 7	Echo 11	Echo 12	Echo 13	Echo 19
毒 株	HK ⁺	1:1024	1:32	1:2048	1:2048	1:4096	1:2048	1:1024
	MERN-3†	—	1:16	1:128	1:64	1:256	1:512	—
	FL-3*	—	1:32	1:64	1:128	1:512	1:64	—
	KB-3**	1:32	1:16	1:256	—	1:256	1:8	—

†HK = 在人肾细胞传代的病毒; †MERN-3 = 在传代人肾细胞传 3 代的病毒; *FL-3 = 在传代人羊膜细胞传 3 代的病毒; **KB-3 = 在 KB 细胞传 3 代的病毒; “—”血凝阴性。

经 3 种传代细胞传 3 代的 Echo 病毒传回至原始人肾细胞, 以检查其血凝能力是否能恢复。结果见表 2, 在原始人肾细胞传 1 代时, 除 Echo 19 MERN-3、Echo 19 FL-3、Echo 19 KB-3、Echo 3 MERN-3、Echo 3 FL-3 及 Echo 11 KB-3 6 株病毒的血凝仍阴性外, 其余各株病毒均有血凝, 但较原来在人肾细胞培养的血凝滴度为低。将此 6 株病毒在原始人肾细胞连续传代, 除 Echo 19 MERN-3 及 Echo 19 KB-3 2 株病毒分别在第 7 代及第 5 代出现血凝外 (图 1)。其余 4 株病毒在第 2 代就恢复血凝, 血凝滴度均随传代的次数增加而不断上升, 最终可以达到与原来在原始人肾细胞培养的血凝滴度。

由上述结果看来, 传代细胞对 Echo 病毒的血凝能力有显著的影响, 可以使病毒的血凝能力降低或消失, 尤以 KB 细胞为甚。在 KB 细胞上各型病毒均无血凝, 但将病毒传至原始人肾细胞并连续传代之, 其血凝能力可以完全恢复。从病毒来看, Echo 3、7、13、19 型病毒的血凝能力易受影响, 特别是 Echo 19 型病毒在传代人肾细胞及 KB 细胞传 3 代再传回原始人肾细胞时, 要经过多次传代才能恢复其血凝能力。

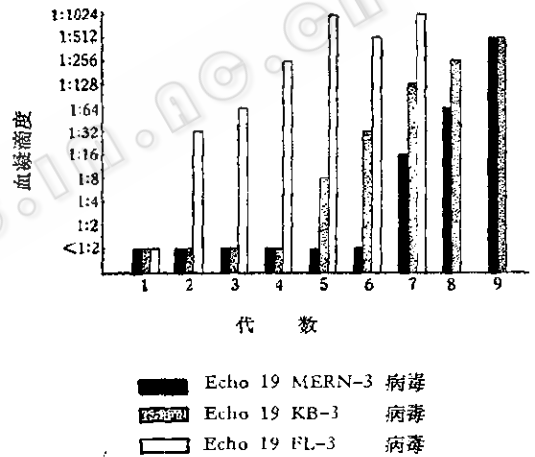


图 1 经传代细胞传 3 代的 Echo 19 病毒在原始人肾细胞连续传代的血凝滴度

讨 论

我们将传代人肾细胞(MERN 株)^[1]在传了 2 年半后(约 200 代)再检查其对 Echo 病毒的敏感性,发现 Echo 病毒虽然能在此株细胞上大量繁殖,但该细胞对 Echo 病毒的致细胞病变作用的敏感性则大为降低。此表明正常人肾细胞经长期体外培养之后,对 Echo 病毒的敏感性可由显性感染(有明显的细胞病变)趋向于不显性感染(对病毒的致细胞病变作用的敏感性降低),而且 Echo 病毒在该细胞传代后,其血凝能力也减弱或消失。何申等^[7]报告此株细胞在体外传 12 代后很多特性已与肿瘤细胞相似,但在 38 代对 Echo 病毒仍很敏感^[1]。看来,传代细胞对病毒致细胞病变作用的敏感性的改变是在其他特征改变之后发生的。因此,要判定传代细胞对病毒的敏感性,最好在细胞经较长期传代培养之后

进行。

原代人羊膜细胞对 Echo 病毒很敏感,在此细胞培养的病毒的血凝滴度也很高^[1,2],但原代人羊膜细胞在长期体外传代培养之后,很多特性也发生了改变,该细胞对 Echo 病毒的敏感性及其对血凝能力的影响与传代人肾细胞相似。KB 细胞对 Echo 病毒的致细胞病变作用的敏感性亦很差,对病毒的血凝能力的影响更为显著。此结果与 Maisel 等^[2]在 KB 细胞上所获得的结果相似。因此,传代细胞不适宜作为 Echo 病毒的实验诊断用。

KB 细胞对 Echo 6 D'Amori 毒株血凝能力的不良影响及其可能的机制在前一文^[6]中已讨论。本实验从其他一些 Echo 病毒的同样研究中进一步证实了这一现象。

与 Maisel 等^[2]的报告不同,某些毒株经 KB 细胞传代丧失血凝能力后再传回原代人肾细胞仍能恢复其血凝能力。这可能有两个问题存在。首先是选用的细胞不同。我们用人肾细胞, Maisel 等^[2]用的是猴肾细胞,而后者可能具有与原代人羊膜细胞相似的特性^[6]。其次是连续传代的问题,如 Echo19 MERN-3 及 Echo19 KB-3 毒株只有在原代人肾细胞连续传代之后才能恢复其血凝能力。

有趣的现象是在传代人肾细胞及传代人羊膜细胞上传代的 Echo 6、11、12 型病毒仍能产生血凝,但同型病毒在 KB 细胞上就不能产生血凝。我们将此 3 型病毒在 Detroit-6 细胞(传代肿瘤细胞)上传代,亦获得与 KB 细胞相似的结果。前 2 种细胞的来源为正常细胞,后 2 者为恶性肿瘤细胞。正常细胞在体外长期传代之后,很多特性已改变与肿瘤细胞相似,难于鉴别。传代正常细胞与传代肿瘤细胞对 Echo 6、11、12 型病毒产生血凝的表现不同,这是由于细胞的来源不同(正常或肿瘤),或者是由于恶性变程度的不同,而是否能用 Echo 6、11、12 型病毒的血凝试验将其他传代正常细胞与肿瘤细胞鉴别。这些是值得进一步探讨的问题。

小 结

一、经长期体外培养的传代正常细胞(MERN 和 FL 株)及传代肿瘤细胞(KB 细胞)虽能支持 Echo 病毒的大量繁殖,但对 Echo 病毒的致细胞病变作用的敏感性则大为降低,不适宜作为 Echo 病毒的实验诊断用。

二、传代细胞对 Echo 病毒的血凝能力有显著的不良影响,能使病毒的血凝能力减弱或消失,只有当其传回至原代人肾细胞并连续传代时才能恢复其原有的血凝能力。

参 考 文 献

- [1] 毛江森等:微生物学报, 9: 42, 1963。
- [2] Maisel, M. D. et al.: *Arch. Fur. Ges. Virusforschung* 11: 209, 1961。
- [3] 曾毅、王政:中华医学杂志, 50: 85, 1964。
- [4] LaHelle, O.: *Virology*, 5: 110, 1958。
- [5] LaHelle, O.: *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 44: 413, 1958。
- [6] 曾毅、王政、顾方舟:微生物学报, 11:125, 1965。
- [7] 何申等:肿瘤研究论文集,上海科学技术出版社, 15 页, 1962。

SUSCEPTIBILITY OF CONTINUOUS CELL LINES TO ECHO VIRUSES AND THEIR INFLUENCE ON THE HAEMAGGLUTININATING ACTIVITY OF ECHO VIRUSES

TSENG YI, WANG CHEN AND KU FANG-CHOU

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

The susceptibility of several continuous cell lines (human embryonic kidney cell line MERN, human amniotic cell line FL and KB cells) to the cytopathic effect of Echo viruses was significantly lower than that of primary human embryonic kidney cells, even though the infectious titre of Echo viruses in both kinds of cells was similar. Thus, the continuous cell lines were not suitable for laboratory diagnosis of Echo virus infection.

When Echo viruses were cultivated in continuous cell lines, the haemagglutinating ability of the viruses became lost or decreased except for Echo 6 virus in MERN and FL cell lines. However, when the 3rd passage of Echo viruses in continuous cell lines was transferred back to primary human embryonic kidney cells, the haemagglutinating activity was regained from the first to the seventh passage.