

分析细胞代谢确定传染性法氏囊病病毒在鸡胚细胞上的增殖

李有根 聂峰光 戚艺华 顾 铭 欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 研究了接种病毒后的鸡胚成纤维细胞(CEF)代谢与传染性法氏囊病病毒(IBDV)增殖的关系,结果表明,感染细胞对未感染细胞葡萄糖消耗的相对增加量 α 可作为 IBDV 增殖的参数。 α 随感染过程而增加,当 α 达到最大值不再改变时,IBDV 增殖也达最大。此点可作为培养 IBDV 时的收毒点。

关键词 传染性法氏囊病病毒,鸡胚成纤维细胞,病毒增殖,细胞代谢

分类号 Q591.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0235-39

传染性法氏囊病是对养鸡业危害最为严重的病毒性传染病之一。目前对该病的主要预防方法是进行疫苗接种。疫苗的生产为传统转瓶生产,具有产量低,劳动强度大等缺点。利用生物反应器生产疫苗,具有高产量、高质量、低劳动强度等优点。但对病毒生长的在线监测问题没有解决。目前病毒生长情况用由细胞培养所获得的病毒滴度来反映,时间上滞后,无法在线反映病毒的生长情况,从而无法对病毒培养进行在线控制。采用间接的方法在线反映病毒的生长,文献报道很少。本文研究了接种病毒后的 CEF 代谢与 IBDV 增殖的关系,从代谢角度分析病毒在细胞上的生长情况。选取葡萄糖这个能在线监测的代谢参数与病毒增殖相关联,从理论和实验两方面论证了葡萄糖消耗与病毒增殖的关系。实验表明可用监测葡萄糖浓度来监测病毒增殖。为利用生物反应器大规模生产疫苗的在线监测提供了参考和依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

9~11 日龄无特定病原(SPF)的鸡胚由北京农林院畜牧兽医研究所提供,细胞制备方法见文献[1]。

1.2 病毒

传染性法氏囊病病毒(IBDV),(TCID₅₀ 为 6.25)由北京农林院畜牧兽医研究所提供。

1.3 培养基

细胞培养液:M199 培养液 + 6% 小牛血清(除特殊注明外)。

病毒培养液:M199 培养液 + 2% 小牛血清(除特殊注明外)。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞计数:方法见文献[2]。

收稿日期:1997-12-15,修回日期:1998-11-16。

1.4.2 病毒滴度：采用 Behren-Karber 法，以 TCID₅₀ 表示^[3]。

1.4.3 葡萄糖浓度：生化分析仪(YSI)。

1.5 细胞和病毒培养

1.5.1 接毒量对细胞代谢和病毒增殖的影响：用同一批制备的细胞悬液，与细胞培养液混合，细胞密度 2.5×10^5 mL。分装到 8 个 100mL 罗口培养瓶，每瓶 10mL，37℃ 培养 52h 后，细胞长成片。换病毒培养液，并按 1:10, 1:100, 1:1000(病毒原液与病毒培养液体积比，下同)比例分别接种 IBDV 各 2 瓶，余下 2 瓶为对照组。然后每隔一定时间对 4 种培养物各取 0.5mL，-30℃ 冰箱保存，0.2mL 测葡萄糖和 0.3mL 测病毒滴度。

1.5.2 血清浓度对细胞代谢和病毒增殖的影响：病毒培养液血清浓度分别为 2%、6%、10% 各 4 瓶，每种浓度 1:100 接种 IBDV 各 2 瓶，余下为对照组。其余同 1.5.1。

1.5.3 pH 对细胞代谢和病毒增殖的影响：病毒培养液 pH 分别为 6.8、7.2、7.6 的病毒培养细胞维持液各 4 瓶，其余同 1.5.2。

2 结果和讨论

2.1 病毒增殖与细胞培养关系的理论推导^[4]

成纤维细胞增殖达到一定密度 ($\sim 10^5$ /cm²)，细胞将不再增殖^[5]。本文实验均在此密度(对于 CEF 为 2.3×10^5 /cm²)进行，可认为总细胞数 X_T 为常数。据此提出以下 3 点假设：(1)葡萄糖仅用于维持细胞生长(病毒为活体寄生物，其复制原料来自活细胞)；(2)染毒细胞与未染毒细胞的葡萄糖比消耗速率均为常数(忽略其它条件差异，仅考虑病毒对细胞影响)。(3)细胞染毒比例越大，病毒滴度越高(不考虑细胞和病毒个体差异，病毒数与染毒细胞数成正比；不考虑病毒失活，病毒数越多，病毒滴度越高)。

$$\text{由假设 1, 对实验样本有 } -\frac{dS_i}{dt} = q_{s|x_i}X_i + q_{s|x_u}X_u \quad (1)$$

$$\text{对照组有 } -\frac{dS_u}{dt} = q_{s|x_u}X_T \quad (2)$$

$$\text{由实验条件得 } X_T = X_i + X_u = \text{const} \quad (3)$$

$$\text{由(1)(3)得 } -\frac{dS_i}{dt} = (q_{s|x_i} - q_{s|x_u})X_i + q_{s|x_u}X_T \quad (4)$$

$$\text{由(4)得 } \Delta S_i = -\left[\int_0^t (q_{s|x_i} - q_{s|x_u})X_i dt + \int_0^t q_{s|x_u}X_T dt \right] \quad (5)$$

$$\text{由(2)得 } \Delta S_u = -\int_0^t (q_{s|x_u}X_T dt) \quad (6)$$

$$\text{由(5)(6)得 } \frac{\Delta S_i - \Delta S_u}{\Delta S_u} = \left(\int_0^t (q_{s|x_i} - q_{s|x_u}) \frac{X_i}{X_T} dt \right) / \int_0^t q_{s|x_u} dt \quad (7)$$

$$\text{令 } \alpha = -\frac{\Delta S_i - \Delta S_u}{\Delta S_u} = \frac{S_i - S_u}{S_0 - S_u} \quad (8)$$

$$\text{令 } x = \frac{X_i}{X_T} \quad (9)$$

$$\text{由假设 2 得 } q_{s|x_i} = \lambda q_{s|x_u} \quad (\lambda \text{ 为常数}) \quad (10)$$

$$\text{由(7)(8)(9)(10)得 } \alpha \int_0^t q_{s|x_u} dt = \int_0^t (1 - \lambda) q_{s|x_u} dt \quad (11)$$

$$\text{(11)两边微分并整理得 } x = \frac{1}{1 - \lambda} \left[\alpha + \frac{d\alpha}{dt} \left(\int_0^t q_{s|x_u} dt \mid q_{s|x_u} \right) \right] \quad (12)$$

$$\text{令 } f(t) = \int_0^t q_{s|x_u} dt \mid q_{s|x_u} \quad (13)$$

$$\text{合并(12)(13)得 } x = \frac{1}{1-\lambda} [\alpha + \frac{d\alpha}{dt} f(t)] \tag{14}$$

(14)两边微分并整理得

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{1-\lambda} \{ [1 + f'(t)] \frac{d\alpha}{dt} + \frac{d^2\alpha}{dt^2} f(t) \} \tag{15}$$

$$\text{当病毒滴度最高时,由假设 3 得 } x = x_{max}, \text{即 } \frac{dx}{dt} = 0 \tag{16}$$

$$\text{由(15)(16)得 } [1 + f'(t)] \frac{d\alpha}{dt} + \frac{d^2\alpha}{dt^2} f(t) = 0 \tag{17}$$

α 为常数显然是(17)的一个解

表明当 α 为常数时,病毒滴度最高。由于病毒本身也存在衰老死亡,所以最高病毒滴度在 α ~培养时间曲线的拐点处获得,此点即为收毒最佳点。

2.2 病毒增殖与细胞培养关系的实验结果

为了从实验上验证病毒增殖与细胞培养的上述关系,并排除不同因素对两者上述关系的影响,我们设计了上述 3 组实验,结果如下:

2.2.1 病毒量对细胞代谢和病毒增殖的影响: 病毒增殖动力学与接毒量(QOI)有关,为了了解不同接毒量对上述关系是否有影响,我们做了 1:10、1:100、1:1000 三个接毒梯度实验,结果(见图 1)可看出,不同接毒量对细胞代谢(本实验通过葡萄糖代谢参数 α 反映)和病毒增殖(本实验通过病毒滴度 TCID₅₀ 反映)都有影响。接毒量越大,细胞代谢受抑制越早且明显,细胞病变越快,病变高峰出现越早,但最高病毒滴度有一合适的接毒量,本实验最佳接毒比为 1:100。从图 1 还可看出,当葡萄糖代谢参数 α 为常数时,病毒滴度最高。所以最高病毒滴度在 α ~培养时间曲线的拐点处获得,此点即为收毒最佳点。

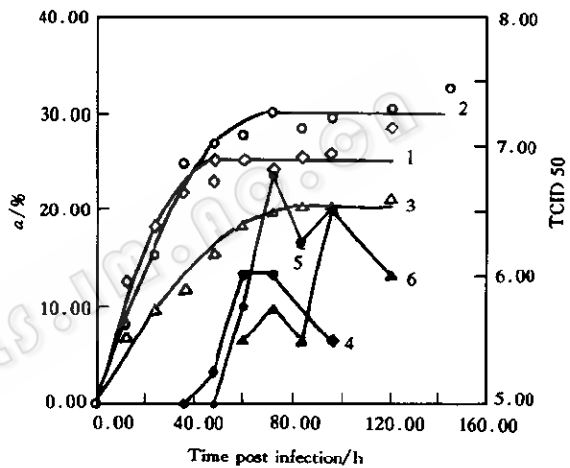


图 1 接毒量对细胞代谢和病毒增殖的影响
Fig.1 Effects of quantity of infection on metabolism of CEF and proliferation of IBDV

- 1. QOI 1:10 a;
- 2. QOI 1:100 a;
- 3. QOI 1:1000 a;
- 4. QOI 1:10 TCID 50;
- 5. QOI 1:100 TCID 50;
- 6. QOI 1:1000 TCID 50

2.2.2 血清浓度对细胞代谢和病毒增殖的影响: 我们选了 2%、6%、10% 3 种血清浓度的病毒培养液进行实验,结果如图 2。

由图 2 可看出,血清对细胞代谢很有影响,但血清对病变影响相对较小,病变高峰时 3 者的病毒滴度相差不大,这与人用病毒疫苗培养情况相似^[6]。不同血清浓度尽管对细胞代谢和病毒增殖都有影响,但也不影响由理论推导出的两者上述关系。

2.2.3 pH 对细胞代谢和病毒增殖的影响: 对病毒增殖和细胞代谢关系的影响,测定了

pH6.8、7.2、7.6 的培养液结果如图 3。

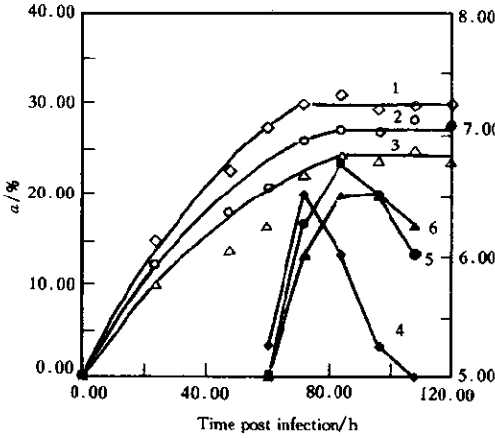


图 2 血清浓度对细胞代谢和病毒增殖的影响

Fig.2 Effects of serum concentration on metabolism of CEF and proliferation of IBDV

- 1. 2% serum a;
- 2. 6% serum a;
- 3. 10% serum a;
- 4. 2% serum TCID 50;
- 5. 6% serum TCID 50;
- 6. 10% serum TCID 50;

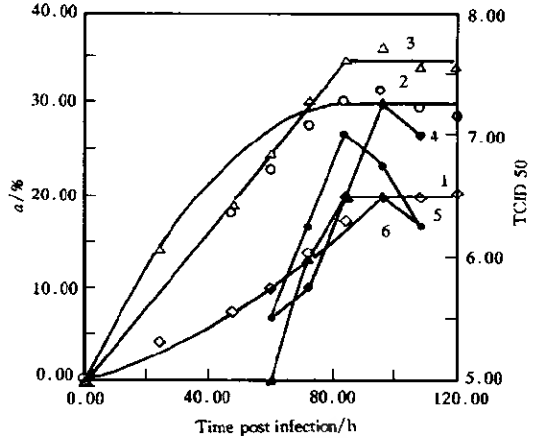


图 3 pH 对细胞代谢和病毒增殖的影响

Fig.3 Effects of pH on metabolism of CEF and proliferation of IBDV

- 1. pH6.8 a;
- 2. pH7.2 a;
- 3. pH7.6 a;
- 4. pH6.8 TCID 50;
- 5. pH7.2 TCID 50;
- 6. pH7.6 TCID 50

由图 3 可看出, pH 越高, 葡萄糖代谢参数 α 越大, 病变越快, 但病变高峰时病毒滴度低, 最大病毒滴度随 pH 增大而减小, 这与有关文献报道一致^[7]。但在测定的 pH 值范围内也不影响由理论推导出的上述两者关系。

综合上述实验结果表明, 细胞代谢(本实验通过葡萄糖代谢参数 α 反映)和病毒增殖(本实验通过病毒滴度 TCID50 反映)有很好的相关性。 α 随培养时间延长而增大, 达到最大值后, 将不再随时间变化, 趋向于常数。TCID50 先随时间延长而增大, 达到最大值后, 随时间呈下降趋势。两者的最大值在同一时间取得, 此点即为病毒培养最佳收毒点。

符号说明

- X_u 未感染细胞密度/(cells/L)
- X_i 感染细胞密度/(cells/L)
- X_T 总细胞密度/(cells/L)
- S_u 未接毒培养时葡萄糖浓度/(mol/L)

- S_i 接毒培养时葡萄糖浓度/(mol/L)
- q_{SiX_i} 染毒细胞葡萄糖比消耗速率/(mol/cell.L)
- q_{SiX_u} 染毒细胞葡萄糖比消耗速率/(mol/cell.L)

致谢 本文的实验得到了北京农林院畜牧兽医研究所的大力支持, 在此表示由衷的感谢。

参 考 文 献

- [1] 刘宝全主编. 兽医生物制品学, 北京: 中国农业出版社, 1995: 41~42.
- [2] M. Butler 等著, 肖成祖等译. 哺乳动物细胞工程—实用方法, 北京: 军事医学科学院出版, 1993: 93. 26~27.
- [3] H. G. Purchase 主编, 唐桂运译. 禽病分离鉴定实验室手册(第三册), 北京: 农业出版社, 1993: pp. 236~244.
- [4] R. Singhvi *et al.* *Cytotechnology*, 1996, 22: 79~85.
- [5] R. I. 弗雷什尼编, 潘李珍等译. 实用动物细胞培养技术, 北京: 世界图书出版公司, 1996: pp. 1~3.
- [6] 董树沛等. 生物工程学报, 1993, 9: 137~141.
- [7] 张立等. 华东理工大学学报, 1996, 22: 707~711.

Determination of Infections Bursal Disease Virus (IBDV) on Chicken Embryo Fibroblast (CEF) Cells Using Metabolic Analyzing

Li Yougen Nie Fengguang Qi Yihua Gu Ming Ouyang Fan

(State Key Laboratory of biochemical Engineering, Institute of Chemical metallurgy,
The chinese Academy of Scienuces, Beijing 100080)

Abstract The relationship of metabolism of chicken embryo fibroblast (CEF) cells and proliferation of infections bursal disease virus (IBDV) on them was studied. This shows that the relative increase in glucose consumption in infected cells in comparison to uninfected cells α could be considered a parameter of IBDV proliferation. It increases as IBDV proliferation progress and then its plateaus as the proliferation peak. This point could be used as a harvest time in a IBDV production process.

Key words Infections bursal disease virus (IBDV), chicken embryo fibroblast (CEF) cell, cell metabolism, virus proliferation