

研究报告

猪瘟病毒弱毒株感染对体外培养细胞增殖的促进作用*

王 镇 陆 宇 丁明孝

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘要: 猪瘟病毒(CSFV)能在多种体外培养细胞中增殖,却不使细胞产生病变(CPE)。使用原代细胞增殖 CSFV 弱毒疫苗。结果显示:病毒的增殖能够增加原代牛睾丸细胞的传代次数和维持时间。因此,CSFV 疫苗生产上能够在接毒后多次收获病毒。此外,CSFV 弱毒株还能够刺激体外培养的兔巨噬细胞增殖,使形成致密的单细胞层。使用传代细胞 PK15 增殖病毒,经流式细胞术检测发现 CSFV 弱毒的增殖不仅不改变 PK15 细胞的增殖周期,并且能够影响 G418 对 PK15 细胞增殖的抑制作用,促进其宿主细胞的增殖。CSFV 对体外培养细胞的增殖有促进作用,然而感染猪对猪机体的损伤却很严重。实验结果显示 CSFV 与其宿主细胞间相互作用的复杂性。

关键词: 猪瘟病毒, 增殖, 宿主细胞, 相互作用

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)02-0079-06

EFFECTS OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS LAPINIZED STRAIN ON ITS HOST CELLS

WANG Zhen LU Yu DING Ming-Xiao

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

Abstract: Classical Swine Fever Virus(CSFV) can multiplied in many kinds of culture cells, and its multiplication does not cause cytopathic effects(CPE) on their host cells. Cells can multiply with CSFV inside, and the existence of the lapinized strains of CSFV increase the passage number of cultured primary bovine testicular cells. In the vaccine production of CSFV, live virus vaccine can be ingathered many times once cells are inoculated. Besides, the lipinized Chinese strain of CSFV may stimulates the proliferation of the macrophage cells. Flow cytometry showed that the cell cycle of CSFV-infected PK15 cells is not affected by the multiplication of CSFV. Furthermore, the multiplication of CSFV can improve cell growth rate and reduce the disturbance of G418 to the normal cell cycle. Considering the severe damage to pigs caused by CSFV, it deduced the complicated interaction between CSFV and its host cells.

Key words: Classical Swine Fever Virus(CSFV), Multiplication, Host cells, Interaction

* 国家攀登计划资助项目 (No.85-44-02-05)

Supported by the grant from the national climb project (No. 85-44-02-05)

收稿日期: 1998-12-14, 修回日期: 1999-04-02

猪瘟病毒(Classical swine fever virus CSFV, 或称 Hog cholera virus HCV), 是有囊膜的正链 RNA 病毒, 属黄病毒科(Flaviviridae), 瘟病毒属(Pestivirus)^[1]。猪瘟病毒能在多种体外培养细胞中增殖时, 却不使细胞产生病变(cytopathic effect, CPE)^[2], 细胞能够带毒传代, 生长状态与不带毒的细胞相似。在原代细胞中, CSFV 的增殖甚至能够延长原代细胞的可传代次数, 原代细胞能够多次传代, 连续培养可达 10 个月之久。猪瘟病毒在猪体中却能够迅速增殖, 特异性地杀死某些种类的细胞, 并使机体死亡。猪瘟病毒与宿主细胞独特的相互作用是一个长期令人困惑不解的问题。但到目前为止, 人们主要侧重于病毒致病的研究, 对猪瘟病毒弱毒株增殖及其与宿主细胞相互作用方面还缺乏了解。

本文在对 CSFV 弱毒疫苗 Thiverval 株(T 株)及中国兔化弱毒株 C 株在传代与原代细胞中增殖特点研究的基础上, 对 CSFV 弱毒株增殖及其与宿主细胞间相互作用进行了探讨。此外, 还对新霉素类似物 G418 存在条件下, CSFV 的增殖对 PK15 细胞周期的影响进行了研究。期望通过对 CSFV 弱毒株感染的体外培养细胞生长状况的检测, 更加全面地了解 CSFV 弱毒株增殖与其宿主细胞的相互作用。

1 材料与方 法

1.1 材料

PK15 细胞、猪瘟病毒 T 株、C 株均由中国兽药监察所提供; 原代犊牛睾丸细胞由湖北生物制药厂提供; 兔巨噬细胞从家兔腹腔获得, 细胞密度 $75 \times 10^4/\text{mL}$; 试剂 G418、碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司。

G418 储存液浓度为 $10\text{mg}/\text{mL}$; $10 \times \text{PI}$ 储存液浓度为 $0.05\text{mg}/\text{mL}$, 溶解在 PBS 缓冲液中。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与接毒条件: 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 PK15 细胞和牛睾丸细胞的培养液(pH7.2)。待细胞长满单层时换维持液(pH7.6~7.8)培养, 维持液含 2% 的胎牛

血清。PK15 细胞使用 G418(终浓度 $6\mu\text{g}/\text{mL}$)处理, 处理的同时接入猪瘟病毒弱毒株, 病毒的终浓度为 $10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 或在传细胞的同时接入病毒, 培养一段时间后使用流式细胞术检测细胞周期。接毒及未接毒的对照牛睾丸细胞培养瓶连续传代, 观察细胞的形态、生长速率、铺展细胞单层的时间及状况, 同时用免疫荧光技术及免疫金银技术^[3]检测, 以保证接毒细胞中 CSFV 的增殖及其抗原的存在。

从家兔腹腔得到的兔巨噬细胞于 37°C 5% 的 CO_2 培养箱中培养 4h 后即可接种猪瘟病毒 C 株。毒种是牛睾丸细胞上增殖的含病毒上清液, 按 10 倍梯度稀释至 10^{-6} , 按各稀释度等量加入培养的兔巨噬细胞中, 继续培养 4~5d, 观察并拍照。

1.2.2 免疫荧光检测方法: 将细胞培养在盖片上, 在病毒感染后不同时间, 用 $0.01\text{mol}/\text{L}$ pH7.2 的 PBS 缓冲液(含 0.85% 的 NaCl)冲洗。放入纯丙酮中固定 15min, 自然干燥后用于免疫荧光检测。固定后的细胞单层与 FITC 标记的抗 CSFV 的多克隆抗体, 37°C 温育 1h, $0.01\text{mol}/\text{L}$ pH7.2 的 PBS 缓冲液冲洗后, 甘油封片。用 Olympus 荧光显微镜于波长为 495nm 激发光下观察。

1.2.3 流式细胞计样品制备: 参照文献[4, 5]的方法进行。

接毒及未接毒对照细胞经胰酶消化, 经 $0.1\text{mol}/\text{L}$ pH7.2 的 PBS 缓冲液洗涤后, 用 1mL PBS 缓冲液悬浮细胞。细胞悬液迅速射入 10mL 4°C 预冷的 70% 乙醇固定液中。

样品经 $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min 去掉固定液, $0.1\text{mol}/\text{L}$ pH7.2 的 PBS 缓冲液洗涤沉淀, 并将沉淀细胞重新悬浮在 0.5mL PBS 缓冲液中。 37°C 使用 RNase(终浓度 $5000\text{U}/\text{mL}$)处理样品 37min, 以降解细胞质中的 RNA。之后加入 $150\mu\text{L}$ $10 \times \text{PI}$ 染色液, 避光冰浴染色 20min, 于 FACS 420 型流式细胞计上进行检测, 使用激发波长为 488nm。测定 10,000 个细胞的体积、荧光强度等指标, 结果用 Beton Dickinson 的 DNA-Cell-Cycle 软件进行分析, 计算出细胞

群体中处于各细胞周期的细胞比例。

1.2.4 CSFV 的增殖曲线测定: CSFVT 株在 37℃ pH7.8 下感作原代牛睾丸单层细胞 1h。Hank's 液洗涤后加入 pH7.6 的维持液, 37℃ 培养, 每隔 12h 取 0.2mL 维持液, 用免疫荧光技术测定释放到维持液中病毒滴度, 绘制病毒的增殖曲线。

2 实验结果

2.1 猪瘟疫病毒弱毒株在原代牛睾丸细胞中增殖的一步生长曲线

猪瘟疫病毒 T 或 C 株感染后每隔 12h 取样, 测定培养液中子代病毒的滴度, 绘制出 CSFV 弱毒株在原代牛睾丸细胞中增殖的一步生长曲线(图 1)。到接毒后 4d, 释放到培养液中有活性病毒粒子的量达到峰值, 为 10^5 TCID₅₀/mL。并且, 在随后的 24h 内, 有感染能力的病毒粒子的量仍保持稳定。

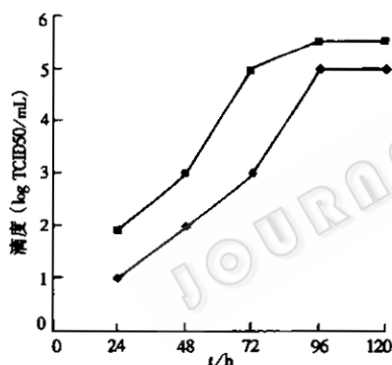


图1 CSFVT株在原代牛睾丸细胞中的增殖曲线

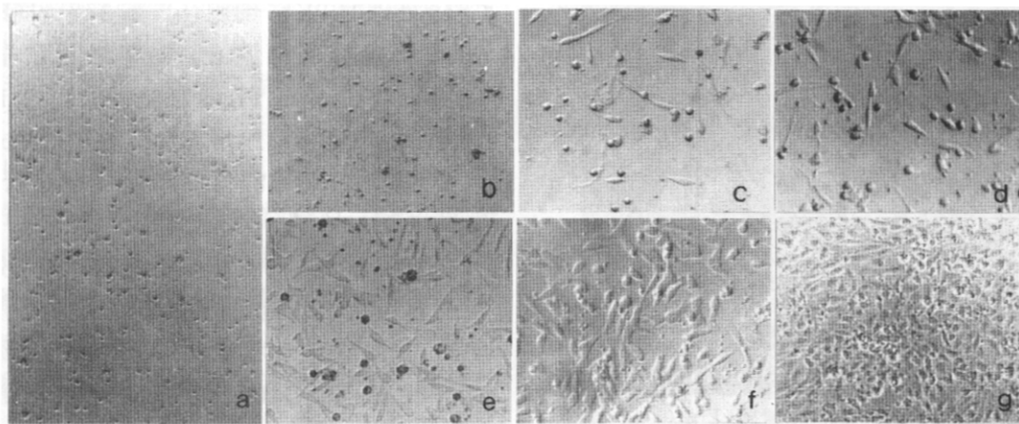


图2 感染CSFV C株4d的兔巨噬细胞生长状况

a 未接毒的对照细胞, b~g 接入的猪瘟疫病毒浓度按 $10 \times$ 梯度依次递增(稀释倍数从 10^{-6} 到 10^{-1} , $60 \times$)

2.2 CSFV 弱毒株感染增加原代牛睾丸细胞的传代次数

与 CSFV 强毒株一样, 猪瘟疫病毒弱毒株 T 株及 C 株感染的传代细胞 PK15 及原代牛睾丸细胞不出现明显的 CPE。接毒的原代和传代细胞还可以多次传代, 并将病毒直接传给子代细胞; 有时还可观察到处于细胞分裂中期的 CSFV 感染细胞, 表明 CSFV 的增殖对宿主细胞的分裂无显著影响。

带毒细胞与不接毒的正常传代细胞在生长速度、细胞形态等方面的差异不明显。对于原代细胞, 随细胞代次的增高, 正常的牛睾丸细胞生长能力降低, 细胞分裂能力下降, 细胞铺满单层需要一周或更长的时间。10 代后, 细胞难以继续传代。而接毒的原代细胞在较高代次时细胞生长状态明显好于正常对照细胞。带毒细胞比不带毒正常细胞更快地铺满单层, 并可多次传代。在实验中我们曾传至第 14 代, 细胞仍能够分裂并继续生长。此外, 与对照细胞相比, 接毒细胞铺满单层后维持时间延长, 40d 后仍能够传代。

2.3 CSFV C 株感染促进兔巨噬细胞的增生

向动物腹腔多次注射蛋白质、多糖等异物, 可以诱导产生大量的活化巨噬细胞。这是目前实验室获得大量巨噬细胞的常用方法^[6]。从兔腹腔获得的巨噬细胞培养 4h 后, 可以观察到细胞边缘向外突出伪足, 细胞作变形运动, 呈游走型散在生长, 但不能分裂, 更不能够形成致密单层细胞。接入猪瘟疫病毒 C 株, 37℃ 培养 4~5d,

观察细胞的增殖情况,发现接入 CSFV C 株的巨噬细胞明显增殖,并形成致密的单层。进一步实验表明:巨噬细胞的增生程度与接入 CSFV 的浓度成正相关性(图 2)。

2.4 猪瘟疫病毒弱毒株的感染对 PK15 细胞的增殖周期无明显影响

为了研究 CSFV 弱毒株对宿主细胞周期的影响,选用细胞类型较为单一的传代细胞 PK15 进行实验。使用流式细胞术对正常及 CSFV T 株及 C 株感染的 PK15 细胞的细胞周期进行检测。为保持实验所用细胞的一致性,对照及接毒细胞使用同一瓶传代得到的子代细胞。在细胞铺满单层时接毒培养,对照细胞同时换维持液。免疫荧光检测病毒在细胞中的增殖情况(如图 3)。接毒后培养 24h,感染 CSFV T 株的细胞成团分布,约占细胞总数的 15% 左右;培养 48h,几乎所有的细胞均被 T 株病毒感染。流式细胞术检测,得到二维点图,并对整个细胞群体中的细胞周期进行分析(表 1)。

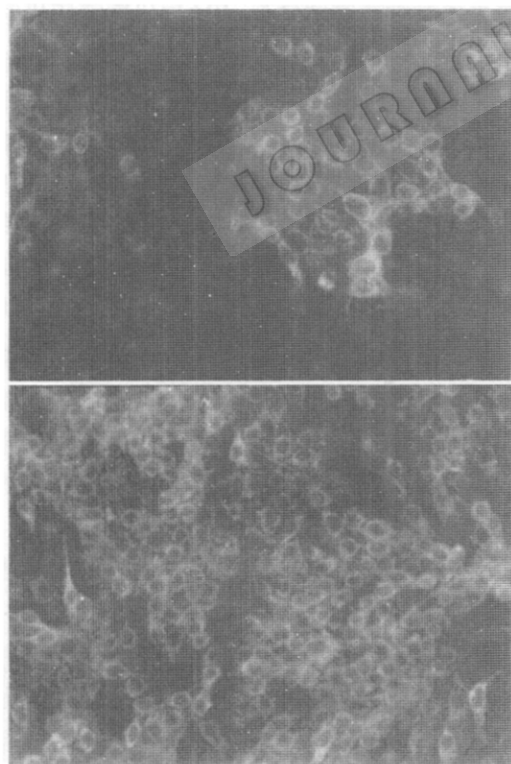


图3 猪瘟疫病毒感染的PK15细胞(免疫荧光技术检测)

A 感染后24h, B 感染后48h(150×)

表1 猪瘟疫病毒T株感染对PK15细胞周期的影响

样品	细胞周期(所占比率%)	
	G1/G0期	S+G2+M期
a PK15+CSFV T株 培养24h	62	38
b PK15细胞	60	40
c PK15+CSFV T株 培养48h	70	30
d PK15细胞	70	30

接毒后培养 24h 或 48h,接毒与对照样品中处于分裂间期及分裂期的细胞在细胞群体中所占比例相似。使用 C 株病毒感染 PK15 细胞,也得到同样的结果。表明 CSFV 弱毒株的增殖对其宿主细胞增殖的细胞周期无显著影响。

2.5 CSFV T 株影响 G418 对 PK15 细胞增殖的抑制作用

低浓度的 G418 对 PK15 细胞的生长具有一定影响。在铺展约 70% 的 PK15 细胞培养瓶中加入终浓度为 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418, 37°C 培养 24h。光学显微镜观察表明加入 G418 的培养瓶中细胞分裂缓慢,24h 后细胞仍然未长满单层,而对照组细胞则已铺满单层。值得注意的是,若在 G418 处理的同时接入猪瘟疫病毒弱毒株,则该细胞与对照细胞一样,经过 24h 后细胞均长满单层。

为进一步确定是否是由于 CSFV 弱毒株的增殖影响了 G418 对细胞生长的抑制作用,我们对正常细胞、G418 处理细胞及 CSFV T 株感染细胞的周期进行了检测。设立 4 组实验进行比较。第 1 组为正常对照细胞(a);第 2 组为加 G418 处理的 PK15 细胞(b);第 3 组为同时加入 G418 及接毒的细胞(c);第 4 组为已全部被 CSFV T 株感染的 PK15 细胞再加入 G418(d)。上述 4 组细胞再继续培养 36h 后进行流式细胞术检测,并对细胞群体的细胞周期进行分析。结果如表 2。

结果表明:a 与 b 样品组细胞群体中处于间期及分裂期的细胞比例相差很大,提示所用浓度的 G418 在一定程度上影响了 PK15 细胞的生长状态。在 G418 处理的同时接毒的样品(c),培养 36h 后,CSFV 能够在多数细胞中增殖。其结果是在细胞群体中处于间期的细胞比

表2 G418与CSFV T株感染对PK15细胞周期的影响

样品	细胞周期(所占比率%)	
	G1/G0期	S+G2+M期
a PK15细胞	49	51
b PK15+G418 培养36h	73	27
c PK15细胞+G418+CSFV T株 培养36h	55	45
d 带毒的PK15细胞+G418 培养36h	49	51

率介于 a 与 b 组之间。而在细胞传代时接毒的 d 组中,则处于 G1/G0期的细胞比例更接近对照样品细胞(a)。使用 C 株进行实验也得到了同样的结果。上述结果表明 CSFV 弱毒株的增殖能影响 G418 对 PK15 细胞进入细胞周期的抑制作用,在 CSFV 感染的细胞群体中检测不出 G418 的抑制作用。

3 讨论

实验结果显示:CSFV 弱毒株对其宿主细胞的增殖具有促进作用。在 CSFV 感染牛睾丸细胞的实验中,带毒的细胞与不接毒的正常细胞在生长速度、细胞形态等方面没有明显的差别。但随着细胞代次的增高,带毒的牛睾丸细胞比不带毒细胞的生长周期缩短,生长状态也优于后者;且细胞贴壁较牢,维持时间较长。不接毒的原代细胞在传 10 代后,细胞难以生长。而带毒细胞传 14 代,细胞仍能够长成良好单层。由于细胞能够带毒传代,且带毒的细胞能够维持较长的时间。因此,在猪瘟病毒疫苗生产上是很有意义的。可以 1 次接毒,4~5d 收获 1 次,并可连续收毒 10 次之多。带毒的细胞传代后也可继续收获病毒。

巨噬细胞是一类具有吞噬功能的游走型细胞,在体外培养可贴壁。活化的巨噬细胞能够展现出伪足,但一般不增殖。体外培养可维持 1 个月左右。然而,接入猪瘟病毒后,兔巨噬细胞不仅能增殖,还可形成致密的单细胞层,且对巨噬细胞增殖的促进作用与猪瘟病毒的接种浓度成正相关。

我们对 CSFV 弱毒株感染的 PK15 细胞的周期分布进行了检测。流式细胞术检测了 CSFV T 株或 C 株感染的 PK15 细胞。与正常

对照相比,CSFV 的增殖基本上不影响 PK15 细胞的分裂周期,接毒 24h 及 48h 的细胞处于分裂期及间期的细胞比例与对照组相似。但 CSFV 的感染及增殖却明显地影响了 G418 对细胞增殖的抑制作用。

G418(Geneticin),遗传霉素,是一种低分子量的氨基糖苷类抗生素。不同种类的细胞对 G418 处理的反应不同。有些细胞,如 CHO 细胞,对 G418 十分敏感,1~5μg/mL 的 G418 的即可使其死亡。而有些细胞,如:PK15,对其则有一定程度的耐受性。本实验使用的 G418 浓度为 6μg/mL,此浓度作用下,PK15 细胞形态没有明显的改变,但却对 PK15 的生长有一定的抑制作用。G418 处理的细胞在随后的培养中几乎不分裂,流式细胞术检测也证实 G418 的加入,使进入分裂期的细胞数下降。然而接入 CSFV T 株后,病毒的增殖却能使受到 G418 抑制的细胞继续分裂,并在与正常细胞相近的时间内铺满单层。经流式细胞术检测,处于细胞周期各时期的细胞数也趋于正常。实验证明 CSFV 弱毒株的感染确实影响了 G418 对细胞的抑制作用。进一步分析 CSFV 弱毒株感染的细胞中与 G418 处理细胞中的基因转录与多肽合成显然有助于了解 CSFV 通过何种途径影响 G418 对细胞生长的抑制作用,也有助于发现与此相关的 CSFV 特异的基因产物。

从我们的实验结果看:猪瘟病毒的增殖能够促进体外培养细胞的生长和增殖;无论是 CSFV 强毒株还是弱毒株,它们的感染使原代牛睾丸细胞的传代次数增加。弱毒株还使兔巨噬细胞增生,并铺展形成单细胞层。CSFV 是如何作用于宿主细胞? CSFV 弱毒株感染促使原代细胞的传代次数增加,并促进巨噬细胞增生

的机制目前还不清楚。使用 G418 处理传代细胞 PK15, 细胞生长受到抑制时, CSFV 弱毒株的增殖能明显地缓解 G418 造成的抑制作用。然而, 在自然界中猪瘟病毒感染的猪却迅速发病, 呈现全身症状, 且死亡率很高。瘟猪尸体解剖发现死猪的扁桃体发炎, 部分组织坏死。使用免疫荧光技术检测 CSFV 的抗原, 发现存在 CSFV 抗原的细胞形态结构完好, 而坏死的细胞中检测不到病毒的抗原。推测 CSFV 本身可能存在着二类因子。一类因子能够促进其宿主细胞的生长。另一类因子作用于其他细胞, 诱导细胞死亡。对这二类因子的研究, 有利于了解 CSFV 的致病机理, 并且对 CSFV 的疫苗生产也是很有意义的。

一些实验表明 CSFV 的 E^{ms} 和非结构蛋白 NS3 可能参与了对宿主细胞生长与死亡的调控过程。1997 年 Bruschke 等报道纯化的 CSFV C 株结构蛋白 E^{ms} 对猪肾细胞 (SK 细胞) 的蛋白合成有促进作用, 但又可诱导淋巴细胞凋亡^[7]。然而 Hulst 等人通过定点突变将 E^{ms} 的催化活性区域的 His 替换为 Lys, 使 E^{ms} 的 RNase 活性丧失。这一 CSFV 突变株却能够诱导猪肾细胞 SK6 (swine kidney) 凋亡^[8]。这一近乎矛盾的结果说明 CSFV 与宿主细胞相互作用的复杂性。

CSFV 的非结构蛋白 NS3 可能也参与对其宿主细胞相互作用。Meyers 等人发现几株导致培养细胞产生 CPE 的 CSFV 均是由于突变或 DI 颗粒表达了一定量的 NS3^[9,10]。为此, 我们室已克隆了 E^{ms} 和 NS3 及与之相关的基因片段, 以

进一步研究 CSFV 与宿主细胞相互作用的方式及相关因子。同时, cDNA 消减杂交技术也有助于从特异基因表达方面了解 CSFV 与细胞的相互作用。显然对 CSFV 弱毒株与宿主细胞相互作用的方式及相关因子的研究对了解及揭示猪瘟病毒致病机理及持续感染是非常有意义的。

参 考 文 献

- [1] Wengler G. Family Flaviviridae. In: Franchi R I B *et al* (eds), Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Berlin: Springer Verlag, 1991, 223~233.
- [2] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学 (第二版). 北京: 科学出版社, 1997, 652~664.
- [3] 王 镇, 张 海, 丁明孝. 微生物学通报, 1998, 25 (6): 356~359.
- [4] Ubol S, Park S, Budiardjo I *et al.* J. Virol., 1996, 70: 2215~2220.
- [5] 张鸿卿, 连慕兰. 细胞生物学实验方法与技术. 北京: 北京师范大学出版社, 1992, 127~130.
- [6] 高伟良. 动物细胞培养. 台湾: 金名图书有限公司出版, 1994, 213~224.
- [7] Bruschke C J M, Hulst M M, Moormann R J M *et al.* J Virol., 1997, 71: 6692~6696.
- [8] Hulst M M, Panoto F E, Hoekman A *et al.* J. Virol., 1998, 72: 151~157.
- [9] Meyers G and Thiel H-J J. Virol., 1995, 69: 3683~3689.
- [10] Meyers G, Thiel H-J, Rumenapf T J. Virol., 1996, 70: 1588~1595.