

脊髓灰质炎病毒对非灵长类细胞的感染性

孟 继 鸿

(南京铁道医学院微生物教研室, 南京)

摘要 传统认为脊髓灰质炎病毒(PV)仅能在人或灵长类细胞中增殖, 本文报道一株对 PV 高度敏感的非灵长类动物细胞——兔子宫内壁上皮传代细胞系(ZMRUE-85)。经与 HeLa、Hep-2、FL、MERN 和 MA104 等细胞的比较研究, 证实 PV 在 ZMRUE-85 细胞上能产生典型的溶细胞型病变和空斑, TCID₅₀ 和空斑滴度均近似或高于上述 5 种人或猴源细胞, 这对 PV 宿主范围、受体本质及其感染性和致病性的进一步研究可能有一定价值。

关键词 脊髓灰质炎病毒; 非灵长类动物细胞; 感染性

传统认为, 脊髓灰质炎病毒(PV)仅能在人或灵长类动物细胞中增殖, 而非灵长类细胞, 由于其缺乏 PV 受体, 对 PV 都不敏感^[1,2]。然而, 作者发现一株对 PV 高度敏感的非灵长类动物细胞——兔子宫内壁上皮传代细胞系(ZMRUE-85), 经与常用于 PV 培养的 HeLa、Hep-2、FL、MERN 和 MA104 等细胞的比较研究, 证实 PV 在 ZMRUE-85 细胞上的致细胞病变作用(CPE), 空斑形成及感染滴度均近似或优于上述 5 种人或猴源细胞, 为 PV 研究提供了一个非灵长类宿主细胞的感染模型。对此国内尚未见类似报道。

材料和方法

(一) 细胞、病毒及抗血清

ZMRUE-85 细胞为兔子宫内壁上皮传代细胞系, 由浙江医科大学生物化学教研室建系和鉴定^[3], 引入时已单独传代 38 代, HeLa、Hep-2、FL、MERN 和 MA104 细胞为实验室液氮保存细胞, 上述细胞均以含 10% 小牛血清的 Eagle MEM 营养液传代培养, 2—3 天长成单层后使用。PV 标准株 Mahoney 株(1 型, PV 1)、MEF-1 株(2 型, PV 2)和 Saukett 株(3 型, PV 3)均购自中国药品生物制品检定所, 按常规在 HeLa 细胞上增殖, 收获物上清贮于 -30℃ 备用。PV 型特异性抗血清由江苏省

卫生防疫站惠赠, 使用前 56℃ 30 分钟灭菌。

(二) 微量 TCID₅₀ 滴定

取消毒 40 孔或 96 孔组织培养板, 加入 10 倍系列稀释的 PV 悬液 0.05ml/孔, 每个稀释度重复 4 孔, 再加细胞悬液 0.1ml/孔(约含 3.5×10^4 细胞), 置 CO₂ 培养箱 37℃ 孵育 5 天, 逐日观察 CPE, 最后以 10% 福尔马林 1% 结晶紫固定染色, 按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

(三) 速成单层法空斑滴定

方法参照文献[4], 取消毒 16 孔或 24 孔组织培养板, 加入 10 倍系列稀释的 PV 悬液 0.1 ml/孔, 每个稀释度重复 4 孔, 再加以 0.02% EDTA 消化、含 20% 小牛血清的细胞悬液 0.4 ml/孔(约 4×10^5 细胞), 混匀, 置 CO₂ 培养箱 37℃ 孵育 60—90 分钟后吸尽孔内液体, 加入含 10% 小牛血清和 1% 琼脂糖的 Eagle MEM 营养凝胶 0.5ml/孔, 反置孵育 48 小时后, 再加含中性红凝胶 0.25ml/孔, 继续孵育至 56—60 小时, 计数空斑, 计算空斑滴度。如需保留实验结果, 也可用 10% 福尔马林和 1% 结晶紫固定染色。

结 果

(一) PV 在 ZMRUE-85 细胞上的 CPE 特征

将三型 PV 标准株分别接种至 ZMRUE-85

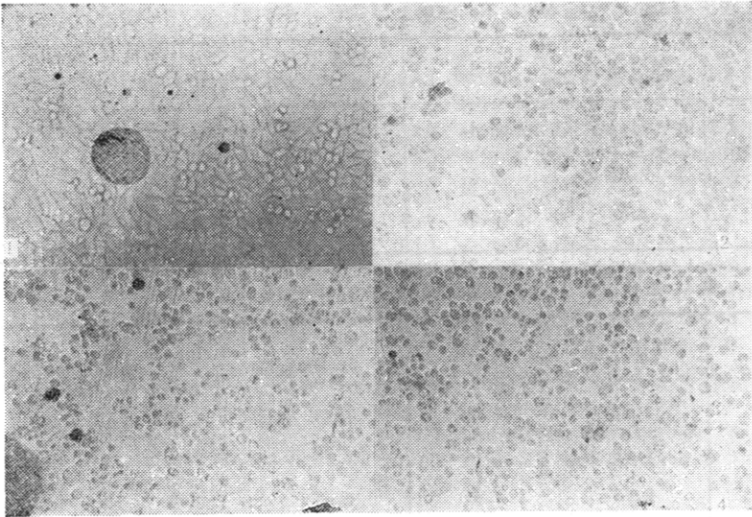


图1 PV (Mahoney 株)在 ZMRUE-85 细胞上的 CPE
1.正常 ZMRUE-85 细胞 2.早期 CPE 3.中期 CPE 4.晚期 CPE

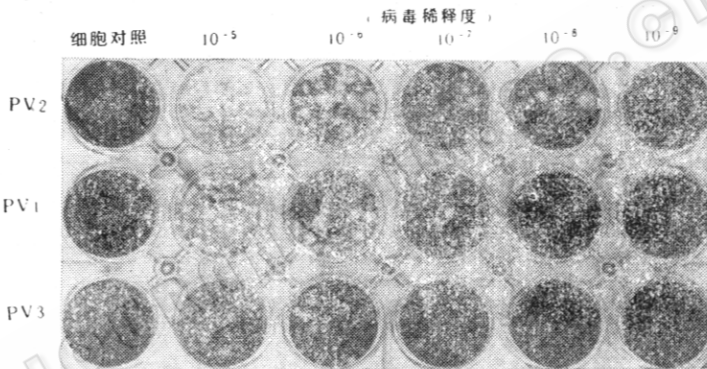


图2 三型 PV 在 ZMRUE-85 细胞上形成的空斑

细胞后,均能出现典型的溶细胞型病变,表现为细胞变圆、脱落、裂解(如图1)。而三型 PV 的 CPE 特征无明显区别。PV 在 ZMRUE-85 细胞上 CPE 出现时间与 HeLa、Hep-2、FL 细胞相同,但明显早于 MERN 和 MA104 细胞,且随感数复数的增加而缩短。

(二) PV 在 ZMRUE-85 细胞上的空斑形成特点

三型 PV 标准株均能在 ZMRUE-85 细胞上形成空斑(如图2)。一般孵育 20—24 小时开始出斑,与在 HeLa 和 FL 细胞上的出斑时间相同,但比 Hep-2、MERN 和 MA104 细胞上早 4—10 小时,孵育至 56—60 小时空斑基本

出齐,中性红染色后,呈现大小不一的圆形空斑,直径多在 2—4mm 之间,边缘较清晰,与在 HeLa、FL 和 MERN 细胞上产生的空斑相似,但略大于在 Hep-2 和 MA104 细胞上的空斑。三型 PV 在 ZMRUE-85 细胞上的空斑特征无明显区别。

(三) ZMRUE-85 细胞对 PV 感染的敏感性

采用微量 TCID₅₀ 滴定法,将三型 PV 标准株在 ZMRUE-85 及 HeLa 等细胞上分别进行感染性滴定,取两次滴定结果的平均值列于表 1。

应用速成单层法空斑技术,将三型 PV 株

表1 三型 PV 标准株在不同细胞上 TCID₅₀ 滴度的比较 (TCID₅₀/0.05ml)

	ZMRUE-85	HeLa	FL	Hep-2	MERN	MA104
PV1 (Mahoney)	8.23	8.50	8.17	7.75	7.59	7.08
PV2 (MEF-1)	9.09	9.37	9.28	8.92	9.00	7.67
PV3 (Saukett)	7.84	7.64	7.45	7.37	7.05	6.84

表2 三型 PV 标准株在不同细胞上空斑滴度的比较 (×10⁴PFU/0.1ml)

	ZMRUE-85	HeLa	FL	Hep-2	MERN	MA104
PV1 (Mahoney)	1.46	1.56	1.25	1.40	0.94	0.38
PV2 (MEF-1)	1.90	2.11	1.76	1.71	0.63	0.68
PV3 (Saukett)	0.73	0.65	0.64	0.68	0.38	0.20

准株在 ZMRUE-85 及 HeLa 等细胞上分别进行空斑滴定,取两次滴定结果的平均值列于表 2。

由此可见,ZMRUE-85 细胞对三型 PV 均高度敏感,尤其是对 PV3,其 TCID₅₀ 滴度和空斑滴度均高于从 HeLa、Hep-2、FL、MERN 和 MA104 细胞上获得的相应感染滴度。

(四) ZMRUE-85 细胞对 PV 易感的稳定性

将同一 PV1 材料分装 5 份,贮于 -30℃,于不同时间在不同代次的 ZMRUE-85 细胞上进行微量 TCID₅₀ 滴定,5 次滴定结果分别为 8.77、8.23、8.23、7.50 和 7.67 TCID₅₀/0.05ml,变异系数为 6.27%,说明 ZMRUE-85 细胞对 PV 的易感性有良好的重复性和稳定性。

(五) 病毒特异性鉴定

将接种于 ZMRUE-85 细胞上增殖的 PV 2,以特异性 PV2 抗血清进行中和试验,结果 40 单位/0.05ml 的抗血清能完全抑制 PV 2 在 HeLa 细胞上产生 CPE,中和指数 > 10⁶,说明在 ZMRUE-85 细胞上增殖的病毒确系 PV 2。

讨 论

PV 早期只能在神经组织中增殖,是一种严格的嗜神经性病毒,自 Enders 等(1949)发

现 PV 可在人胚皮肤或纤维细胞中增殖后,PV 的研究工作有了重大突破,相继发现人及其它灵长类动物的多种细胞对 PV 敏感,可以产生明显的 CPE,然而只有通过转染的方式,PV 的感染性核酸方可在非灵长类动物细胞内复制,产生出完整的病毒颗粒,而这种完整的 PV 颗粒不能直接再感染非灵长类细胞^[2]。Ozaki^[5]为了证实 PV 在猪肾细胞系(PS 细胞)中的增殖,采用了兔抗 PV、抗兔 IgG 和兔抗 PS 三者搭桥的复杂方法,进行人工吸附才获得成功。

Sheffield 等^[6]发现由 Westwood(1957)建立的兔胚肾传代细胞 ERK-1 对三型 PV 均敏感,并可产生 CPE,这是 PV 直接感染非灵长类细胞的首次报告,但有人怀疑它们可能在传代过程中被敏感的灵长类细胞如 HeLa 细胞所污染。继后的研究发现豚鼠脾传代细胞 GPS-1^[7]、鸡胚绒毛尿囊膜传代细胞^[8]、成年兔肾传代细胞^[9]以及由鸡胚心肌组织获得的一株上皮样细胞^[10]也对 PV 敏感,有的可出现 CPE。但这些非灵长类细胞的原代细胞大多对 PV 不敏感,只有传代后才变为易感,Mascoli 等^[7]认为这种传代细胞可能已发生了某种改变或已转化,具有了与灵长类细胞相似的共同抗原。本实验所用 ZMRUE-85 细胞是兔子子宫内膜上皮传代细胞系,引入本室前系单独传代,同一实验室无其它细胞同时培养,此外,该细胞具有明显

的兔子宫内膜上皮细胞的生物学特征,染色体众数值为66条,荧光雌激素受体呈强阳性,一定浓度的孕酮对细胞生长有抑制作用,而雌二醇则具促进作用^[3],因此可排除被其它PV敏感细胞污染的可能。

本实验结果表明 ZMRUE-85 细胞对 PV 高度敏感,可产生明显的 CPE,形成典型空斑,这种发现虽从为 PV 增加一个敏感细胞而言无重大意义,但为澄清 PV 仅能在灵长类细胞内增殖这一传统概念提供了又一证据,也有助于进一步了解 PV 的宿主范围、受体的本质及其感染性和致病性。

参 考 文 献

- [1] 顾方舟主编:脊髓灰质炎,第1页,上海科学技术出版社,1984。
- [2] Holland JJ, et al.: *J. Exp. Med.* **110**: 65, 1959.
- [3] 傅清等:兔子宫内膜体外培养 ZMRUE-85 细胞系的建立及其生物学特性检验,1985年浙江省科学技术进步奖,第000546号。
- [4] 孟继鸿,张建峰:微生物学通报,**14**(1): 36,1987,
- [5] Ozaki Y.: *Microbiol Immunol*, **22**: 731, 1978.
- [6] Sheffield FW and Churcher GM.: *Bris J Exp Path*, **38**: 155, 1957.
- [7] Mascoli CC, et al.: *Science*, **129**: 894, 1959.
- [8] Dunham WB and Ewing FM.: *Proc Soc Exp Biol Med*, **95**: 637, 1957.
- [9] Drew RM.: *Science*, **126**: 747, 1957.
- [10] Prier JE and Sullivan R.: *Science*, **129**: 1025, 1959.