

重水 (D_2O) 对脊髓灰白质炎减毒株及有毒株在组织培养中繁殖的影响

毛江森 顾方舟

(中国医学科学院病毒学系)

关于 D_2O 对病毒繁殖的影响近年来才有报告。Rothstein 氏^[1]观察到 D_2O 对大肠杆菌噬菌体 T_2 的繁殖有抑制作用,但对 T_7 的繁殖却有促进作用。1960年 Carp 氏等^[2]报告脊髓灰白质炎病毒 CHAT 株在经 25% 或 40% D_2O 作用的猴肾或 HeLa 细胞中,用含同样浓度 D_2O 之维持液培养后,其产生的病毒量较对照组高 5—10 倍。本文中研究了 D_2O 对 LSc-2ab (Sabin 氏减毒株) 和 Mahoney 株在人肾原代及传代细胞中繁殖的作用;并探讨了影响此作用的一些因素。

一、材料和方法

病毒: 脊髓灰白质炎病毒 I 型 Mahoney 株在本试验室用人肾原代细胞繁殖, LSc-2ab 株为我国制造的第一批毒种母液^[3]。

重水: 纯度为 99.5%, 用 199 培养液配成 90% 浓度, 经玻璃滤器除菌, 在 4°C 下保存备用。

细胞: 用于繁殖病毒的细胞除注明者外均为人胚肾传代细胞 (MERN)^[4]。细胞皆用 13×100 毫米的试管培养。每管接种细胞 5—10 万。3 天后一般均生长成致密的单层。经换以维持液后即可供病毒繁殖之用。用于测定病毒滴度的细胞均为原代人胚肾细胞。细胞生长液为 199 培养基加 15% 小牛血清。供繁殖病毒用的细胞维持液为含 4% 小牛血清和 0.22% $NaHCO_3$ 的 199 培养基。测定病毒滴度用的细胞维持液为含 0.22% $NaHCO_3$ 的水解乳蛋白 Hanks 溶液。所有培养液中均加入常规量的青霉素及链霉素。

病毒的繁殖: 每次试验用同一批细胞。除特殊目的外, 将已生长 24 小时的细胞换以含 D_2O 的生长液, 于长成致密的单层后吸去生长液。每管接种 0.1 毫升 1:100 的病毒液。在 37°C 放 1 小时后, 用 Hanks 溶液洗去未吸附的病毒, 然后加入含有 D_2O 的维持液, 置 36°C 培养。当细胞完全产生病变时收获病毒, 并测定其滴度。

病毒滴定: 每次试验均用同一对人胚肾消化所得的单层细胞滴定。将标本用 Hanks 溶液按十倍稀释之。每一稀释度用 4 管细胞。每管接种 0.2 毫升。36°C 培养, 第 7 天观察结果, 并按 Reed-Muench 氏公式计算滴度。试验结果以“滴度差”表示, 即在含有 D_2O 培养液中繁殖的病毒滴度 ($\log_{10} TCD_{50}$) 减去不含 D_2O 培养液中繁殖的病毒滴度。

二、试验结果与讨论

1. D_2O 对 LSc-2ab 株及 Mahoney 株在 MERN 细胞或人肾原代细胞中繁殖滴

度的影响

結果見表 1:

表1 D₂O 对 LSc-2ab 及 Mahoney 株繁殖的影响

試 驗	毒 株	細 胞	D ₂ O (%)		log ₁₀ TCD ₅₀	滴 度 差 (log ₁₀ TCD ₅₀)	病毒量比 (H ₂ O:D ₂ O)
			生 长 液	維 持 液			
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	Lsc-2ab	MERN	—	—	4.50		
			25	25	5.66	+1.16	1:14
			—	—	4.66		
		MERN	25	25	5.50	+0.84	1:6.9
			—	—	4.77		
		MERN	40	40	5.66	+0.89	1:7.7
			—	—	5.33		
		MERN	25	25	6.66	+1.33	1:21
			—	—	5.50		
		MERN	40	40	7.00	+1.50	1:31
			—	—	5.33		
1	Mahoney	MERN	25	25	7.00	+1.67	1:46
			—	—	5.33		
		MERN	40	40	7.00	+1.67	1:46
			—	—	5.50		
		原代人腎	40	40	6.33	+0.83	1:6.7
			—	—	5.33		
		原代人腎	40	40	6.50	+1.17	1:14
			—	—	4.83		
2	Mahoney	MERN	25	25	5.66	+0.84	1:6.9
			—	—	5.13		
		MERN	50	50	6.33	+1.20	1:15
			—	—	6.50		
		MERN	25	25	6.33	-0.13	
			—	—	5.50		
		MERN	25	25	5.50	0.00	
			—	—	5.50		
3	Mahoney	MERN	25	25	5.24	-0.26	
			—	—	5.66		
		MERN	25	25	5.50	-0.16	
			—	—	5.88		
		MERN	25	25	5.75	-0.13	
			—	—	6.50		
		MERN	50	50	6.00	-0.50	
			—	—	6.00		
4	Mahoney	MERN	50	50	5.60	-0.40	
			—	—	5.88		
		MERN	50	50	5.50	-0.38	
			—	—	5.50		

由表 1 可見, 在 11 次試驗中, LSc-2ab 株在經過含 25—50% D₂O 培养液培养的細胞中和含同样浓度 D₂O 維持液中繁殖的滴度恆高于对照組。滴度差由 +0.84—+1.67

\log_{10} TCD₅₀, 即病毒量高 6.9—46 倍。但在同一条件下, D₂O 对有毒株 (Mahoney) 則不能增高其繁殖滴度。在 8 次試驗中, 試驗組滴度大多低于对照組。滴度差为 0—0.5 \log_{10} TCD₅₀

从 LSc-2ab 株在含 D₂O 的 MERN 細胞中滴定时滴度的进展 (图 1) 来看, 試驗組病毒滴度自第一天起即高于对照組。到第四天滴度差达 +1.0 \log_{10} TCD₅₀, 并一直維持到第七天。

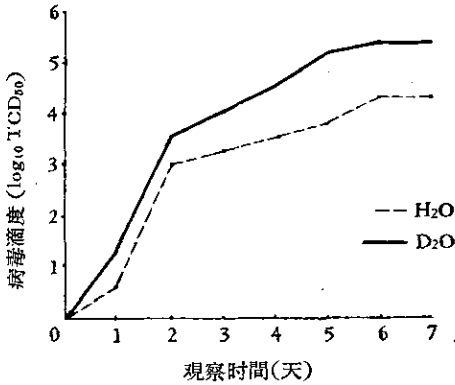


图 1 LSc-2ab 在 D₂O 及 H₂O 培养基中 CPE 滴度的比較

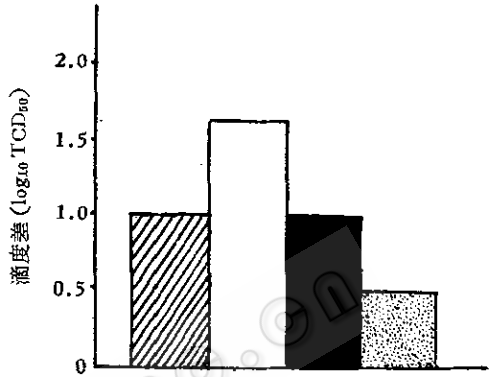
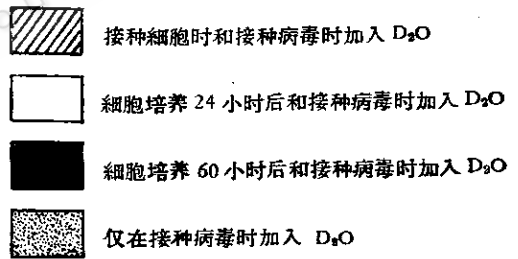


图 2 D₂O 对 LSc-2ab 繁殖的影响与 D₂O 加入培养基中時間的关系



上述結果証实了 Carp 氏等人的观察, D₂O 能明显地提高脊髓灰白質炎 I 型滅毒株在組織培养上的繁殖滴度; 同时我們观察到 D₂O 对有毒株 (Mahoney) 的繁殖并无促进作用。有可能利用此一差別作为研究病毒遗传特征的标记之一。

2. 影响 D₂O 作用的一些因素

由上述試驗結果来看, 在 D₂O 的作用下, LSc-2ab 株在細胞內繁殖滴度較对照組高。为了了解 D₂O 这种作用是在于細胞本身抑或在于病毒, 我們于細胞生长的不同時間加入含 25% D₂O 的培养液, 再在維持液中加入同样浓度的 D₂O; 或只在維持液中加入 D₂O, 并比較 LSc-2ab 株的繁殖滴度。結果见图 2。

如图 2 所示, 在接种病毒前 12 小时 (即細胞培养 60 小时) 加入 D₂O, 对病毒滴度均有提高作用, 但如果只在維持液中加入 D₂O, 則对滴度的提高沒有明显的作用。因此, 病毒滴度的提高是由于細胞受 D₂O 作用之故。

此外, 我們发现 D₂O 的浓度以及在 D₂O 存在下培养病毒的温度对 LSc-2ab 及 Mahoney 株繁殖滴度有不同的影响。

图 3 指出, 病毒在 36℃ 培养时, D₂O 浓度低于 18%, 对 LSc-2ab 株的繁殖滴度无明显影响。但浓度超过 75% 时, 对 LSc-2ab 株的繁殖有明显的抑制作用。D₂O 的浓度以 25—50% 最为适宜。但是高浓度 D₂O 对 Mahoney 株繁殖的抑制作用不似对 LSc-2ab 明显。前者滴度差 -1.47 \log_{10} TCD₅₀, 而后者为 -3.58 \log_{10} TCD₅₀。病毒在 40℃ 培养时, D₂O 对

表2 D₂O 对 LSc-2ab 及 Mahoney 株 T-特征的影响

試 驗	毒 株	log ₁₀ TCD ₅₀ /0.2 毫升		EOG*	T-系数 ⁺⁺	T-特征 [†]
		36℃	40℃			
25% D ₂ O	LSc-2ab	5.66	1.00	4.66	0.96	T ⁻
			1.33	4.33	0.81	T ⁻
	Mahoney	5.66	5.00	0.66	0.13	T ⁺
		5.83	4.66	1.17	0.26	T ⁺
	对 照△	4.66	0.00	4.66		
		5.00	0.00	5.00		
50% D ₂ O	LSc-2ab	6.33	4.00	2.33	0.45	T [±]
		6.33	4.00	2.33	0.45	T [±]
	Mahoney	5.33	5.00	0.33	0.06	T ⁺
		5.66	5.50	0.16	0.03	T ⁺
	对 照△	5.00	0.00	5.00		
		5.26	0.00	5.26		
75% D ₂ O	LSc-2ab	2.00	3.50	-1.50		
		2.50	3.00	-0.50		
	Mahoney	4.50	4.50	0.00	0.00	T ⁺
		3.66	4.00	-0.34		
	对 照△	5.66	0.50	5.16		
		6.00	0.33	5.67		
			平均	5.41		

* 生长效率;

⁺⁺ T-系数=样品之 EOG: 对照之 EOG.

△ 对照为 LSc-2ab 在无 D₂O 存在下, 于 36℃ 及 40℃ 滴定.

[†] T-特征按 Benyesh-Melnick M; Melnick J. 之計算法确定, 即 0.00—0.29 为 T⁺; 0.30—0.75 为 T[±]; > 0.75 为滅毒株 T⁻.

表3 在 D₂O 培养基中繁殖的 LSc-2ab 株其子代之 T-特征

試 驗	D ₂ O 浓 度 (%)	T-特 征	
		36℃	40℃
1	40	5.66 ⁺	<0.50
2	25	6.33	<0.50
3	40	7.00	<0.50
4	25	6.50	<0.50
5	25	6.66	<0.50
6	40	7.00	<0.50
7	25	5.00	<0.50

“+” 病毒滴度, log₁₀ TCD₅₀/0.2 毫升.

上述二株病毒繁殖的影响与 $36^\circ C$ 比較有明显不同。可以看出,在 D_2O 作用下,随着培养温度的提高,滴度差的正值也越高。

脊髓灰白質炎滅毒株与有毒株可用温度特征(T-特征)加以鉴别。LSc-2ab 株在 $40^\circ C$ 中几乎不能繁殖,而有毒株在 $36^\circ C$ 及 $40^\circ C$ 中繁殖滴度沒有差別。但 LSc-2ab 株的这个特征在 D_2O 影响下发生了明显的改变(表 2)。

由表 2 可見, LSc-2ab 株在不同浓度 D_2O 中培养时,其 T-系数有显著差別: 25% D_2O T-系数为 0.96 及 0.81, 仍保留 T⁻ 之特征; 而 50% 則为 0.45, T-特征变为 T[±]; 在 75% D_2O 中培养时, $40^\circ C$ 培养的病毒滴度甚至超过 $36^\circ C$ 培养的病毒滴度。但 Mahoney 株之 T-特征未受 D_2O 之影响。

需要指出, LSc-2ab 株在 D_2O 影响下所产生病毒后代之 T-特征并未改变(表 3)。

表 3 結果說明, 在 D_2O 作用下培养病毒的温度是影响 D_2O 作用的重要因素, 同时又与病毒株的温度敏感性有密切关系。

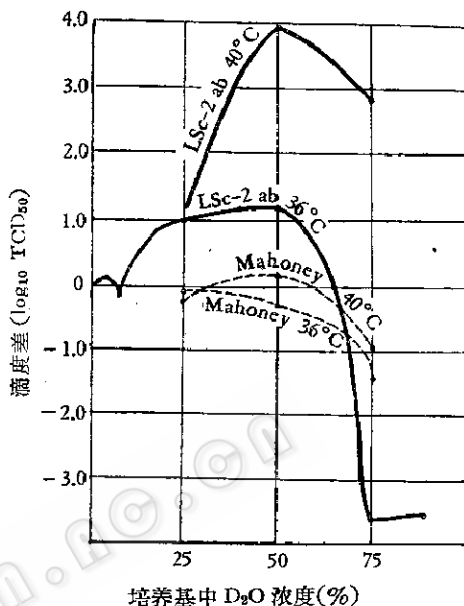


图 3 D_2O 对脊髓灰白質炎 I 型病毒繁殖的影响与 D_2O 浓度、培养温度的关系

三、小 結

我們用 LSc-2ab 株所作的試驗結果指出, LSc-2ab 株在含 25—50% D_2O 的組織培养中繁殖滴度恒高于对照组, 而且証明 D_2O 的浓度和在 D_2O 作用下培养病毒的温度是一个重要因素。 D_2O 低于 18% 时对病毒的繁殖无促进作用, 高于 75% 时則病毒繁殖受到抑制。从試驗結果可以认为, D_2O 是作用于細胞才能产生这种作用。同时, 我們观察到 25—50% D_2O 可以改变 LSc-2ab 株的 T-特征, D_2O 对 Mahoney 株沒有这些作用, D_2O 对病毒繁殖的影响与病毒株对温度的敏感性有密切关系。

关于 D_2O 对滅毒株繁殖的影响的机制, 目前尚无資料可以說明。进一步研究这一問題, 可能有助于闡明病毒的繁殖机制和不同毒力毒株繁殖机制不同的原因。我們发现在 $36^\circ C$ D_2O 中繁殖的 LSc-2ab 株的子代, 其 T-特征并无改变。因此, 有可能利用 D_2O 提高病毒繁殖滴度, 以用于脊髓灰白質炎活疫苗的生产。試驗結果指出, 有可能利用 D_2O 对不同毒力毒株繁殖的影响作为研究病毒遗传特征的标记。

参 考 文 献

- [1] Rothstein, E. L., et al.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **84**: 721, 1960.
- [2] Carp, R. I., Kritchewsky, D., and Koprowski, H.: *Virology* **12**: 125, 1960.
- [3] 顧方舟、董德祥、蔣竞武、閻仲权等: 脊髓灰白質炎口服疫苗制造和检定的几点經驗, 脊髓灰白質炎活疫苗資料彙編, 1961.
- [4] 毛江森、孙日英、刘金蓮: 一株人胚腎传代細胞(MERN)的生长和对腸道病毒的敏感性, 未发表資料。

EFFECTS OF DEUTERIUM OXIDE ON THE MULTIPLICATION OF VIRULENT AND ATTENUATED POLIOVIRUSES IN TISSUE CULTURE

MAO CHIANG-SHEN AND KU FANG-CHOU

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences)

A medium containing 25—50% Deuterium oxide (D_2O) markedly promoted the growth of an attenuated type I poliovirus, LSc—2ab in MERN cells which come from a stable line of human embryonic cells, or in primary human embryonic kidney cells, by increasing the titre from 6 to 46 times. It was found that the concentration of D_2O , the time of adding D_2O , as well as the temperature of incubation influenced the growth of this virus. Besides, the effect of D_2O was highly selective, as it had no effect on the multiplication of the Mahoney strain of type I poliovirus. Although the mechanism of this effect is still unknown, it seems to indicate that the promoting effect is intimately associated with the thermal sensitivity of the virus, as D_2O altered the T—Marker of the LSc—2ab virus, but was without effect on the Mahoney strain.