

二株鼠痘病毒在組織培养中致細胞病变 作用及血球吸附性状的观察

郭輝玉 楊利昌 吳安然

(北京协和医院檢驗科)

鼠痘病毒又名小白鼠脫脚病病毒^[1],是 Marchal^[2]于1929年在英国实验室的鼠羣中發現的。1945年 Burnet 証明它与牛痘病毒有密切的免疫学关系^[3,4]。鼠痘在世界各地实验室的小白鼠羣中流行很广^[5-7]。近年国内亦报告过本病在鼠羣中的流行并分离出病毒^[7-9]。本实验室用肝炎标本进行病毒的分离过程中,曾从小白鼠分离出二株病毒(H32及H312)。病毒对小白鼠有高度的致病性,传代后,經腹腔、脚掌皮下或脑內注射小鼠,均能引起动物有規律的死亡。在感染发病的小鼠肝脏、脚掌皮肤及感染鸡胚的絨毛尿囊膜的組織切片中,均发现典型的嗜酸性胞浆內包涵体。感染鸡胚絨毛尿囊膜的生理盐水悬液能凝集鸡紅血球。感染病毒的組織培养液,对乙醚处理及金霉素与土霉素的作有抵抗力。根据上述特性証明,分离的病毒是鼠痘病毒。在鉴定过程中,曾对这两株病毒进行了猴腎等16种动物細胞培养,包括紅血球吸附試驗的观察。本文报告这项工作的結果。

一、材料与方方法

(一) 鼠痘病毒悬液的制备 将两株病毒分別接种于3—4周的小白鼠腹腔,5—6天,动物发病后剖杀,取肝脏加 Hanks 液研磨制成10%組織悬液,以3,000轉/分的速度沉淀20分钟后,吸取上清,冰冻保存备用。

(二) 細胞培养的种类及方法 共采用猴腎等16种动物細胞做試驗(表1)。用胰酶分散法作成各种单层細胞培养。生长液用含4—20%牛血清的0.5%水解乳白蛋白的 Hanks 液。維持液用含2%牛血清的0.5%水解乳白蛋白的 Earle 氏液。

(三) 在細胞培养中接种、传代及滴定病毒的方法 細胞长成单层后,吸去旧生长液。用維持液将感染的小白鼠肝脏悬液或細胞培养液做10倍連續稀释,每个稀释度接种細胞2—4瓶,每瓶0.1毫升。病毒与細胞接触10分钟后加入1—2毫升維持液。細胞对照瓶不种病毒或接种正常鼠肝悬液。細胞瓶放36°C 溫箱培养,每天用低倍显微镜观察細胞变化。由于分离出的两株病毒对各种单层細胞的致病特点表现为灶性破坏(見后),根据单层細胞出現病灶的多少分为四种程度:

+	10个以下的病灶	++	10—20个病灶
+++	>20个病灶	++++	弥漫性破坏

以接种病毒后第5—7天的結果为准。选择“++”作为細胞病变作用的終点。計算病毒的 TCID₅₀ 滴度。

在細胞培养中进行病毒传代的方法如下:当单层細胞出現“+++”以上的病变时,将感染細胞培养液連同原細胞瓶冰冻融化一次,然后将培养液接种下一代細胞。

(四) 血球吸附試驗^[9] 单层細胞培养接种病毒并于36°C 培养2—3天后取出,于每瓶中加入1%紅血球生理盐水悬液0.1毫升,放回36°C 溫箱或放置室溫15—30分钟,使紅血球沉降到单层細胞上。

本稿收到日期为1962年2月。

观察前将培养瓶轻轻水平摇动数次,使下沉而不被吸附的血球从单层细胞洗下,然后在低倍显微镜下观察红血球的吸附现象。

(五) 血球吸附抑制试验 单层细胞培养接种 10—32 TCID₅₀ 的病毒剂量后,放 36°C 培养 2 天,取出吸除旧维持液。每瓶用 1—2 毫升的 Hanks 液洗涤细胞一次,然后加入 0.1 毫升不同稀释度的免疫血清或正常血清及 0.4 毫升的维持液。继续放温箱中作用 1/2—1 小时,取出,按血球吸附试验法加入鸡红血球悬液,30 分钟后观察结果。

二、实验结果

(一) 二株鼠痘病毒对各种动物细胞培养的致细胞病变作用

将 H 32 及 H 312 二株鼠痘病毒的感染鼠肝悬液或感染细胞培养液,分别接种到猴肾等 16 种动物单层细胞(表 1)。结果除人羊膜细胞的病变出现迟缓而轻微外,其余 15 种细胞均于感染后 2—4 天即出现细胞病变,传代后更为明显。病变特点表现为灶性细胞破坏及多核融合细胞的形成。最初在单层细胞的局限性区域中出现细胞变圆,胞浆收缩等变化。在病灶中部或其四周可见细胞之间的界限模糊,细胞互相由原浆连接成融合胞浆的巨细胞。巨细胞大小不等,其中有数个或数十个细胞核堆聚一起,排列成菊花状或不规则地分布于毛玻璃样的细胞原浆中。随后,局限性的细胞病变灶继续扩大,被破坏的细胞从玻壁脱落,在单层细胞内形成空斑(图 1, 2),其直径可达 1—2 毫米。以后病灶或空斑互相连接,整片单层细胞均被破坏。

在两株鼠痘病毒感染各种细胞培养中,多核融合巨细胞的形成以猴肾、人胚肾、人胚肝及兔肾细胞最为显著(图 3—16)。人胚肾、人胚肝及兔胚肾细胞经苏木精-伊红染色后可以找到嗜伊红性的胞浆内包涵体。包涵体呈卵圆形或不整形,周围被一透亮环所围绕(图 9—12)。

表 1 两株鼠痘病毒在各种动物单层细胞培养中的 TCID₅₀ 滴度

细胞种类	病毒接种材料*	细胞病变出现时间(天)	在细胞培养中传代次数	各代病毒的 TCID ₅₀
猴肾	I	2—3	4	2.5—3.0
人胚肾	I	2—3	2	2.0—3.0
人胚肠	II	2	1	3.0
人胚肌	I	2—3	2	3.0—4.0
人胚肝	J	2—3	3	2.0—3.0
人羊膜	I	4—6	2	1.0
鸡胚肝	I	2—3	8	2.0—3.5
鸡胚肌	I	3—4	3	2.0—2.5
鸡胚肾	II	4	1	>1.0
鸡胚肺	II	4	1	>1.0
鼠胚肝	II	3	1	>1.0
鼠胚肌	I	2—3	3	2.5—3.5
兔胚肝	II	2	1	>1.0
兔胚肾	II	3	1	>1.0
HeLa	I	3—4	3	1.0—2.0
纤维肉瘤	I	3	1	2.5

* I = 感染病毒的鼠肝悬液; II = 感染病毒的鸡胚肝细胞培养液。

两株病毒在各种細胞培养中多数仅传代 1—2 次,在鸡胚肌、鼠胚肌、人胚肝、猴腎及 HeLa 細胞中传代 3—4 次,在鸡胚肝細胞中共传 8 代。各代病毒均引起明显的細胞病变。各代病毒的滴度总结于表 1。

(二) 感染病毒的单层細胞吸附紅血球的特性

1. 血球吸附的式样: 所試驗的猴腎、鸡胚肝、鸡胚肌、鼠胚肌与 HeLa 等 5 种細胞,感染两株鼠痘病毒后均能吸附鸡紅血球。紅血球吸附于单层細胞的病变灶上(图 17,18),排列成串或圍繞細胞成花环状。正常細胞对照或由于各种原因引起非特异性退变的正常細胞均无血球吸附作用。細胞单层接种病毒后的早期(24 小时),鏡下观察可能仅有微弱或可疑的細胞病变,但此时加入紅血球后却呈明显的吸附。单层細胞的病变越严重时,血球吸附越显著,甚至肉眼观察亦可見到堆聚成丛的血球吸附現象。病变細胞从玻壁脫落后,玻壁上的細胞殘迹或碎屑亦能吸附紅血球。单层細胞吸附血球后,在室温或 36°C 温箱繼續放置达 24 小时,亦不发现紅血球从单层細胞释放,說明感染細胞与紅血球呈相当紧密的結合。

2. 血球吸附譜: 从表 2 可見,感染病毒的鸡胚肝及猴腎单层細胞,能吸附成鸡及小白鼠的紅血球;但对鸡胚、豚鼠、兔、猴或人“O”型紅血球則无作用。同时发现,取血球吸附阳性的感染鸡胚肝及猴腎細胞培养液,加入成鸡或小白鼠紅血球生理盐水悬液在塑胶板的凹窩中混合,然后放室温或 4°C 1—2 小时,結果均不呈血球凝集現象。

3. 血球吸附抑制試驗: 曾用鸡胚肝,鸡胚肌及猴腎单层細胞,感染病毒 2 天后分別加入鼠痘免疫血清,牛痘苗免疫血清作血球吸附抑制試驗。初步实验发现,感染鼠痘病毒的单层細胞,加入未稀釋或 1:4 稀釋的未加温正常兔血清时,血球吸附現象即受到明显的抑制。但正常血清經过 56°C, 30 分钟加温后,这种抑制作用即被消除。故实验所用的血清均經加温处理,以除去其非特异性抑制作用。实验証明:两株病毒感染的鸡胚单层細胞,对鸡血球的吸附作用,都能被鼠痘免疫血清所抑制,抑制滴度为 1:4—1:8。牛痘苗免疫血清亦呈 1:8 的抑制作用。正常兔或小白鼠血清,正常人血清均无抑制作用。

表 2 兩株鼠痘病毒感染的单层細胞的紅血球吸附譜

紅 血 球 种 类	血球吸附的結果
萊亨鸡(成鸡)	+++
萊亨鸡(鸡胚)	—
人“O”型	—
恆河猴	—
兔	±
豚 鼠	—
小白鼠	+++

三、討 論

鼠痘病毒是痘类病毒的一种^[10],其理化及生物学性状文献中已有报导^[11-13]。但有关本病毒的組織培养研究却只有少数报告^[14-16]。本实验发现,分离的两株鼠痘病毒,对动物細胞培养的致病作用的范围很广。在猴腎、鸡胚肝等 16 种細胞均引起明显病变。典型的病变为灶性破坏及多核融合細胞的形成,在人胚腎等細胞中可以找到胞浆內的嗜伊紅性包涵体。这种变化与痘类病毒中,特别是牛痘苗病毒中,在各种組織培养中引起的細胞病变的特点相似^[17-23]。两株鼠痘病毒感染的单层細胞均能吸附成鸡及小白鼠的紅血球,而对鸡胚及豚鼠等紅血球則无此作用。这情况說明鼠痘病毒感染細胞的血球吸附范围同牛痘苗病毒在組織培养中的紅血球吸附譜及試管試驗中的紅血球凝集譜相似^[26-28]。值得注意

的是,在我們对捷克 Motol 株病毒^[29]及福建“5+6”株病毒的組織培养研究中^[30],发现这两株病毒对各种动物組織培养的致病范围及所表现的細胞致病作用的特点,以及在感染单层細胞呈现的血球吸附现象与血球吸附范围,均同我們分离出的二株鼠痘病毒非常相似。它們之間在免疫抗原性上有何关系,值得进一步研究。此外,实验发现两株痘类病毒感染細胞与鸡紅血球呈牢固結合,紅血球吸附后似乎不易再从細胞单层中释放。这种现象与流感病毒或副流感病毒感染鸡胚单层細胞吸附紅血球后不久即逐渐游离的情况不同^[31]。由于单层細胞接种鼠痘病毒后出现阳性的血球吸附,要比出现較明显的細胞病变作用为早,这种血球吸附作用能被鼠痘或牛痘免疫血清所抑制,并根据鼠痘病毒与牛痘苗病毒之間有密切的抗原关系^[3,4,32,33],应用組織培养作血球吸附及血球吸附抑制試驗,可以作为早期及快速鉴定鼠痘病毒的方法。

四、摘 要

从小白鼠分离出的两株鼠痘病毒对各种細胞培养的致病范围很广,接种到猴腎、鸡胚肝等 16 种单层細胞中,都引起明显的細胞病变,表现为灶性破坏及多核融合巨細胞的形成,在胞浆中可找到嗜伊紅性包涵体。感染病毒的单层細胞对成鸡及小鼠紅血球有吸附作用。这种现象能被加入的鼠痘或牛痘免疫血清所抑制。由于阳性的血球吸附要較明显的細胞病变出现为早,应用組織培养作血球吸附及血球吸附抑制試驗,可能作为早期及快速鉴定鼠痘病毒的方法。

参 考 文 献

- [1] Fenner, F., *J. Immunol.*, **63**: 341, 1949.
- [2] Marchal, J., *J. Path. and Bact.*, **33**: 713, 1933.
- [3] Burnet, F. M., *Nature*, **155**: 543, 1945.
- [4] Burnet, F. M. and Boake, W. C., *J. Immunol.*, **53**: 1, 1946.
- [5] Bernard, A., Briody, *Bact. Rev.*, **23**: 61, 1959.
- [6] Trentin, J. J., *Science*, **117**: 226, 1953.
- [7] 湯飞凡, 王用輯: 中华医学杂志, **37**: 66, 1951.
- [8] 中国医学科学院病毒系研究論文汇编, 59 頁, 1959.
- [9] Vogel, J. G., and Shelokov, A., *Science*, **126**: 358, 1957.
- [10] Andrewes, C. H., *Nature*, **173**: 620, 1954.
- [11] Buddingh, G. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56**: 561, 1952.
- [12] Fenner, F., and Burnet, F. M., *Virology*, **4**: 305, 1957.
- [13] Downie, A. W., and Dumbell, K. B., *Ann. Rev. Microbiol.*, **10**: 237, 1956.
- [14] Downie, A. W. and McGaughey, C. A., *J. Path. and Bact.*, **40**: 147, 1935.
- [15] Barski, G. and Comefert, F., *Ann. Inst. Past.*, **98**: 112, 1960.
- [16] Porterfield, J. S. and Allison, A. C., *Virology*, **10**: 23, 1960.
- [17] Noyes, W. F., *P.S.E.B.M.*, **83**: 426, 1953.
- [18] Ryden, F. W. and Randall, C. C., *Amer. J. Path.*, **33**: 293, 1957.
- [19] Lavillaureiz, J., *Ann. Inst. Past.*, **92**: 735, 1957.
- [20] Schwöbel, W., and Mayr, A., *Zentr. f. Bakt. I. Abl. Orig.*, **167**: 187, 1956.
- [21] Cutchins, E. and Warren, J., *P.S.E.B.M.*, **97**: 456, 1958.
- [22] Соловьев, В. Д. и Мастюкова, Ю. Н., *Вопр. Вирус.*, **4**: 470, 1959.
- [23] Соловьев, В. Д. и Мастюкова, Ю. Н., *Вопр. Вирус.*, **6**: 342, 1958.
- [24] Plowright, W. and Ferris, R. D., *Brit. J. Exp. Path.*, **39**: 424, 1958.
- [25] Pumper, R. W., *Amer. J. Hyg.*, **69**: 79, 1959.
- [26] Shelokov, A. et al., *P.S.E.B.M.*, **97**: 802, 1958.
- [27] Driessen, J. H. and Greenham, L. W., *Arch. f. Virusforsch.*, **9**: 45, 1959.

- [28] Burnet, F. M. and Stone, J. D., *Aust. J. Exp. Biol and Med. Sci.*, 24:1, 1946.
 [29] Kubelka, V. et al., *Zentr. f. Bakt. 1. Abl. Orig.*, 171:401—412, 1958.
 [30] 楊利昌等：捷克 Motol 株病毒及福建“5 + 6”株病毒組織培養性狀的觀察，未發表。
 [31] 未發表資料。
 [32] Dickinson, L., *J. Hyg.*, 46:378—382, 1948.
 [33] McCarthy, K. and Habbert, D., *J. Path. and Bact.*, 79:416—419, 1960.

CYTOPATHOLOGY AND HEMADSORPTION IN ECTROMELIA VIRUS INFECTED TISSUE CULTURES

KUO HUI-YÜ, YOUNG LEE-CHANG, AND WU AN-JAN

(Department of clinical laboratory, Peking Union Hospital, Peking)

Two strains of ectromelia virus were isolated from albino mice in our laboratory during the course of a study of the etiology of human infectious hepatitis. The two newly isolated viruses produced typical cytopathogenic effect consisting of focal necrosis and formation of multinuclear giant cells with eosinophilic and intracytoplasmic inclusion bodies in all of the 16 kinds of monolayer cell cultures tested. Positive hemadsorption of the infected monolayer cells was obtained with chicken or mouse erythrocytes. The hemadsorption could be inhibited by the addition of ectromelia or vaccinia immune serum but not by normal rabbit or mouse serum. It was found that positive hemadsorption could be demonstrated before the appearance of definite cytopathogenic effect in tissue cultures after the inoculation of ectromelia virus, so it appears that the hemadsorption test and hemadsorption-inhibition test might prove to be a practical and sensitive method for an early and rapid identification of ectromelia virus.

圖 版 說 明

圖版 I

- 圖 1 正常雞胚肝細胞對照 (100×)
 圖 2 雞胚肝細胞，接種鼠痘病毒後引起的灶性破壞 (100×)
 圖 3 正常猴腎細胞對照 (100×)
 圖 4 猴腎細胞，接種鼠痘病毒後引起的多核融合巨細胞的病變 (100×)
 圖 5 正常人胚腎細胞對照 (100×)
 圖 6 人胚腎細胞，接種鼠痘病毒後引起的融合細胞病變 (100×)
 圖 7 正常人胚肝細胞對照 (100×)
 圖 8 人胚肝細胞，接種鼠痘病毒後引起的多核融合細胞病變 (100×)

圖版 II

- 圖 9 正常人胚肝細胞對照 (H. E. 染色) (100×)
 圖 10 人胚肝細胞接種鼠痘病毒後引起的細胞病變：圖示多核融合細胞及嗜伊紅性胞漿內包涵體 (I.) (H. E. 染色, 100×)
 圖 11 正常兔胚腎細胞對照 (H. E. 染色) (100×)
 圖 12 兔胚腎細胞接種鼠痘病毒後引起的細胞病變：圖示多核融合細胞及嗜伊紅性胞漿內包涵體 (I.) (H. E. 染色, 100×)
 圖 13 正常人胚肌皮細胞對照 (100×)
 圖 14 人胚肌皮細胞，接種鼠痘病毒後引起的細胞病變 (100×)
 圖 15 纖維肉瘤細胞，正常對照 (100×)
 圖 16 纖維肉瘤細胞，接種鼠痘病毒後引起的多核融合細胞形成 (100×)
 圖 17 雞胚肝細胞接種鼠痘病毒後引起的病灶對雞紅血球的吸附現象 (100×)
 圖 18 猴腎細胞，接種鼠痘病毒後引起的病灶對小白鼠紅血球的吸附現象 (100×)