

一株人胚肾传代细胞 (MERN株) 的生长和对肠道病毒的敏感性

毛江森 孙白英 刘金莲*

(中国医学科学院病毒学系)

Earle 氏等^[1] 早于 1943 年将一株鼠结缔组织的细胞 (L-株细胞) 在体外连续培养获得成功, 并连续传代至今。近年来, 各种细胞在体外连续培养的工作有了迅速的发展。Chang 氏^[2] 成功地建立了正常人体的结膜、肝、阑尾和肾脏等组织的传代细胞株。至今, 已有许多种类的人体和动物细胞可以在体外连续培养^[3]。国内有些学者^[4] 亦将人体的肿瘤或正常组织在体外进行连续培养, 并得到不少的传代细胞株。

广泛地将传代细胞应用于病毒学的研究, 这是近十年才开始的, Scherer 氏等^[5] 将一株来自人子宫颈癌瘤组织的 HeLa 细胞应用于病毒学的研究, 大大地促进这一工作的开展。至目前, 已有许多人和动物的传代细胞被应用于病毒学的研究工作^[7]。

人胚肾上皮细胞是已知人体组织中对人体病毒最敏感的细胞之一。但是, 传代人胚肾细胞并未广泛的应用。由于考虑到在体外长期培养的某些传代细胞株对病毒的敏感性已有明显的下降, 以及至目前为止尚未得到一株对 ECHO 病毒敏感的传代细胞株, 我们对一株曾经何申等^[4] 在体外连续培养 8 代的人胚肾传代细胞 (MERN 株) 的生长和对肠道病毒的敏感性进行了研究。

一、材料及方法

材料 人胚肾组织——自北京某产院获得剖腹产的六个月死胎, 于 8 小时内带至实验室, 以无菌技术取出两个肾脏, 供制备单个细胞悬液。血清为健康小牛血清。199 培养基的配制方法按本实验室讲义。实验所用的病毒株, 脊髓灰白质炎 I、II、III 型病毒分别为 Mahoney、MEF₁ 和 Saukett 株, I 型减毒株为 Lsc.2ab; ECHO 病毒 1—3, 5—15, 19 型; Coxsackie 病毒 B 族 1—5 型。上述病毒均经猴肾组织培养细胞繁殖, Coxsackie A 族 1—19 型病毒悬液以感染的乳鼠制备。

方法 (1) 人胚肾单层细胞的制备及体外连续培养: 将肾皮质剪成 2 毫米左右大小, 用 Hanks 溶液洗三次, 将组织置入一 250 毫升的锥形消化瓶中, 加入 0.10% 胰蛋白酶 (Difco, 1:250) 30 毫升, 置 37°C 10 分钟, 弃去第一次消化液, 再加入 30—40 毫升胰蛋白酶, 置 37°C, 消化 15 分钟, 在此期间轻轻摇动消化瓶, 如此进行多次消化直至组织块全部被消化完了为止。消化后收集细胞悬液经离心沉淀后, 用含有 15% 小牛血清的 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 溶液 (含 0.02% NaHCO₃ 并按常规加入抗菌素) 稀释成每毫升含 25 万细胞, 然后接种于小试管中, 细胞在第五天生长成单层, 呈梭形上皮细胞, 透明, 无明显颗粒。细胞长成单层后经中国医学科学院实验形态学系何申等用含 20% 人血清水解乳蛋白 Hanks 溶液培养基连续培养 8 代, 克服了细胞生长的迟滞时期。自第 9 代开始, 在本实验室继续传代。方法系待细胞长成单层后弃去培养液加入 0.03% 乙二胺四醋酸二钠 (Versene) 溶液, 在 37°C 作用 10—15 分钟, 使

本稿收到日期为 1962 年 1 月 22 日。

* 承蒙本院何申同志赠予人胚肾传代细胞 (MERN 株) 敬致谢忱。

細胞分散，用手搖离心机低速离心沉澱 3 分鐘，棄去上清，細胞用下列培養液按原液量的 4—5 倍稀釋後，分裝，置 37℃ 培養。

生長液成分：	小牛血清	15%	抗菌素(鏈霉素，青霉素各 10000 單位/毫升)	1%
	199 溶液	81%	NaHCO ₃ (5.6%)	3%

細胞在第 3—4 天長成致密的單層，其間不換生長液。

(2) 細胞對病毒敏感性的測定：細胞生長成單層後，吸去生長液，每一小試管加入 0.2 毫升病毒懸液，於 37℃ 吸附 1 小時，洗去游離的病毒，然後加入下列維持液，置 36—37℃ 培養。

小牛血清	4%	0.2% 水解乳蛋白 Hanks 溶液	91%
NaHCO ₃ (5.6%)	4%	抗菌素(鏈霉素，青霉素各 10000 單位/毫升)	1%

每天觀察細胞病變，至第 10 天。按 Reed-Muench 二氏的公式計算病毒滴度。

二、實驗結果

(一) 人胚腎傳代細胞的生長

人胚腎傳代細胞自 1961 年 4 月 24 日至 10 月 4 日已傳代 38 次，每 4—5 天傳代一次，每次按 4—5 倍繁殖，可接種於試管、小扁瓶或羅氏瓶，其間不換生長液，在 4 天左右即可生長成單層。該細胞第 18 代的形態見圖 1，由圖可見，該細胞經體外連續培養後，其形

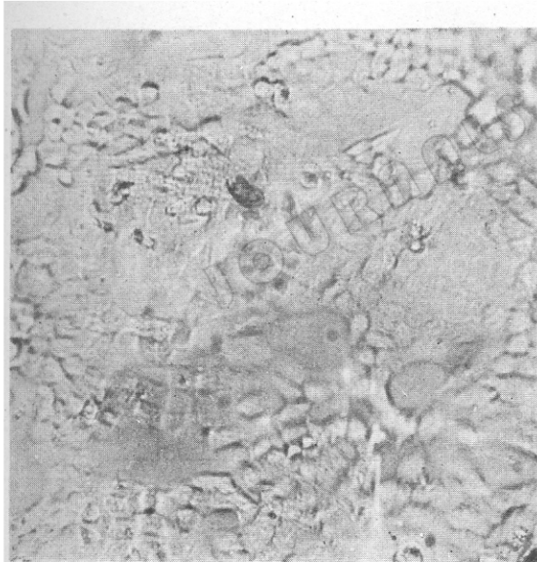


圖 1 傳代人胚腎細胞 (MERN)，18 代，多角形上皮細胞占優勢，× 120。

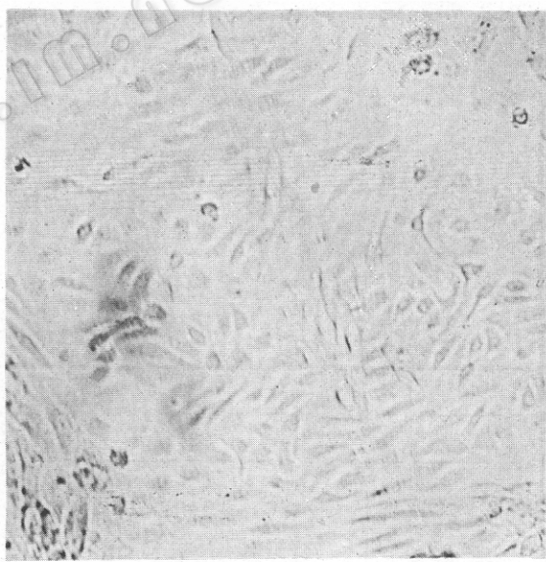


圖 2 原代人胚腎細胞 (MERN，5 個月)，梭形上皮細胞占優勢，× 150。

態已與原代人胚腎細胞不同(圖 2)，後者以梭形上皮細胞占優勢，而前者則以多角形細胞為主，並可觀察到不少核分裂的細胞。

該細胞第 2—8 代的培養基為含 20% 人血清的水解乳蛋白 Hanks 溶液，自第 9 代開始改用含 15% 的小牛血清培養基時能很快的適應，細胞生長旺盛，形態無明顯改變。在所使用的 9 批小牛血清中，除有 3 批對細胞生長有不良影響外，其餘均能使該細胞充分分裂生長。曾企圖減少該細胞生長液中血清的含量，但當血清含量減少至 10% 時，細胞生長的速度即明顯地下降。

接種時生長液的 pH 為 7.6—7.8，在細胞的整個生長過程中 pH 改變不明顯，至細胞

表 1 MERN 株細胞繁殖情况 (22—27 代)

实 驗 次 数	收 获 时 間 (天)	接 种 細 胞 数 (10 ⁴)	收 获 細 胞 数 (10 ⁴)	繁 殖 指 数
1	5	5	42.8	8.5
2	6	5	55.0	11.0
3	6	5	44.0	8.8
4	6	5	58.5	11.7

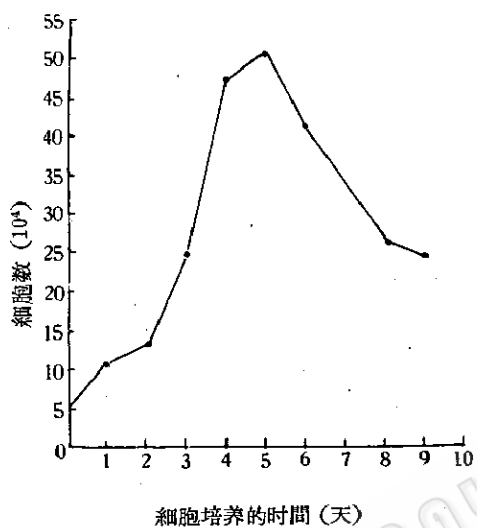


图 3 人胚腎传代細胞 (MERN) 的繁殖动态

生长成单层后, pH 才稍有下降, 至 pH 7.6。偶而当生长液的 pH 达 8.0 时, 細胞亦能积极的分裂。已长成单层的細胞更換含有 0.22 % NaHCO₃ 的維持液后, 一周內 pH 无明显改变。

人胚腎传代細胞的繁殖情况 (見表 1 及图 3)。由表 1 看出, 每一 13×100 毫米的小試管接种 5 万个細胞时 (在 0.5 毫升溶液中), 至第 6 天其繁殖指数为 8.5 至 11.7 之間, 每一小試管可收获 42—58 万个細胞。由图 3 可以看出細胞的繁殖动态, 接种細胞后 1 天, 細胞即繁殖上升至 11 万左右, 第 2 天以后, 細胞数呈直綫上升, 至第 5 天达最高峯 (55 万个細胞), 此后, 細胞数开始下降。必須指出的是, 在上述細胞繁殖过程中均未換生长液。

(二) 人胚腎传代細胞对腸道病毒的敏感性

表 2 为人胚腎传代細胞对腸道病毒的敏感范围。可以看出, 該細胞不仅对三型脊髓

表 2 MERN 株細胞对人腸道病毒的敏感范围

病 毒 型 別	Polio			Coxsackie		ECHO		
	I	II	III	B 族 1—5	A 族 1—19	1—3	5—15	19
来 源	猴 腎*	猴 腎	猴 腎	猴 腎	乳 鼠	猴 腎	猴 腎	猴 腎
敏 感 性	+	+	+	+	A 9.18	+	+	+

* 猴腎組織培养单层細胞。

灰白質炎病毒和 Coxsackie B 族 1—5 型病毒敏感, 对已試过的大多数 ECHO 病毒 (ECHO 1、2、3、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、19) 和少数 Coxsackie A 族 (A₉. 18) 病毒亦敏感。脊髓灰白質炎病毒和 ECHO 病毒对該細胞所致的細胞病变見图 4a 及图 4b, 病变的形态表現与原代人胚腎細胞所致者相似, 主要为細胞变圓, 畸形, 顆粒增多以致完全变性而自管壁脫落。

人胚腎传代細胞对脊髓灰白質炎病毒的敏感程度見表 3。与 FL 株細胞比較的结果, 在六次实验中, 三型病毒在人胚腎传代細胞的滴度为 6.0 或 6.0 log₁₀ TCD₅₀ 以上, 而用 FL 株滴定时仅二次为 6.0 或 6.0 log₁₀ TCD₅₀ 以上。其中, II 型病毒在人胚腎传代細胞中的滴

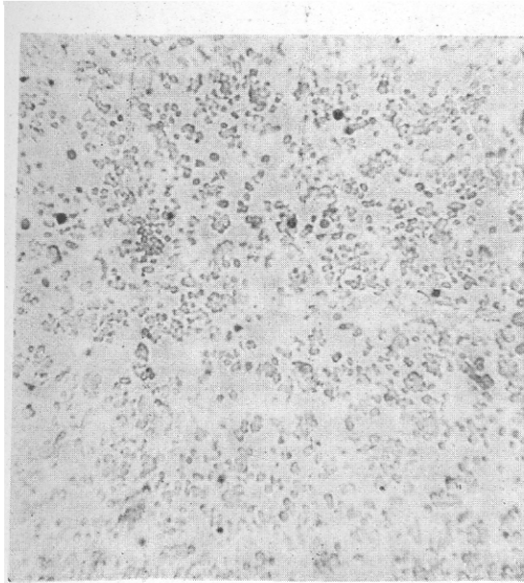


图 4a Mahoney 毒株感染人胚肾传代细胞 48 小时后的细胞病变 (人胚肾传代细胞 22 代, $\times 25$)

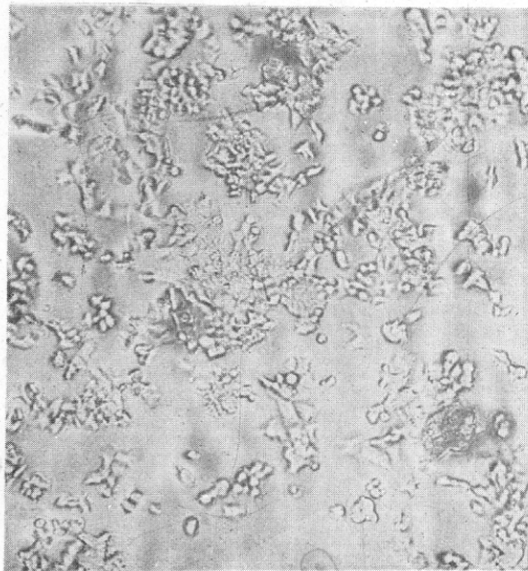


图 4b ECHO I 型病毒感染人胚肾传代细胞 (24 代) 24 小时后的细胞病变 ($\times 80$)

表 3 MERN 株细胞和 FL 株细胞对脊髓灰白质炎病毒敏感性的比较

病毒型别 \ 细胞	MERN 株 (20 代)	FL 株
I (Mahoney)	6.0*	5.0
	6.2	6.5
II (MEF ₁)	6.0	5.0
	6.2	5.5
III (Saukett)	6.2	5.7
	6.0	6.0

* 病毒感染滴度 (\log_{10} TCD₅₀)。

度比在 FL 株细胞高 0.7 至 1.0 \log_{10} TCD₅₀。由脊髓灰白质炎病毒在人胚肾传代细胞的繁殖情况中亦可看出 (见图 5), I 型病毒在人胚肾传代细胞中第 3 天其滴度即达 4.0 \log_{10} TCD₅₀, 第 5 天已接近最高滴度, 而在 FL 株细胞中第 3 天小于 2.5 \log_{10} TCD₅₀, 第

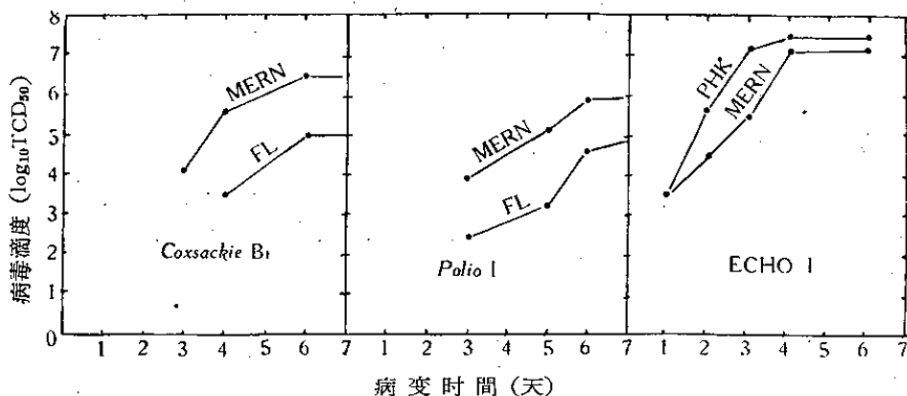


图 5 人胚肾传代细胞 (MERN) 对肠道病毒的敏感性与人羊膜传代细胞 (FL 株) 或人胚肾原代细胞比较 (注: PHK——人胚肾原代细胞)

5 天滴度远未接近最高滴度。上述結果証明，人胚肾传代細胞对脊髓灰白質炎病毒的敏感性較 FL 株細胞为高。用 Coxsackie B 族 I 型病毒也得到相似的结果(见图 5)。

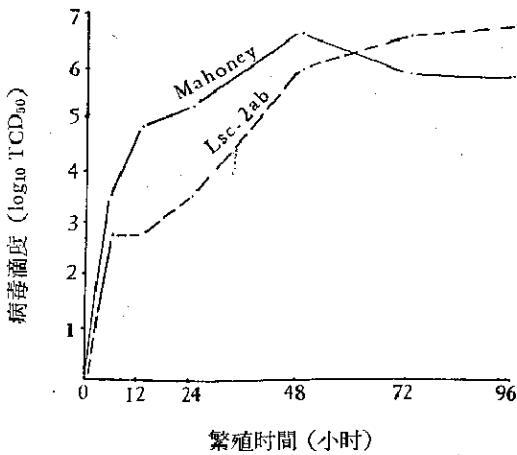


图 6 脊髓灰白質炎病毒在人胚肾传代細胞 (MERN) 中繁殖动态。

7.2 log₁₀ TCD₅₀，接近終点滴度 (7.5 log₁₀ TCD₅₀)。上述結果說明，人胚肾传代細胞对 ECHO I 型病毒是相当敏感的，但較人胚肾原代細胞稍差。

三、討 論

我們用胰蛋白酶消化的方法制备原代单层細胞，經何氏等在体外培养 8 代和本實驗室繼續培养后，获得一株在体外能稳定生长，繁殖指数高的人胚肾传代細胞，这一方法与 Fogh 氏^[1]的报告相似。

該細胞的传代間隔較短 (每約 4—5 天传一代)，接种时細胞的稀释倍数較低，可能是使得該細胞較快的适应和繁殖速度較高的原因之一。从該細胞的生长速度来看，較 Chang^[2] 氏和 Fogh^[3] 氏的报告为高。平均繁殖指数在 10 左右。如此高的繁殖指数对該細胞在病毒学研究中的应用是十分有利的。

該細胞的生长对血清的要求并不十分严格，較容易适应不同种族的血清，能在許多批号的小牛血清培养基中生长。虽然如此，亦发现某些批血清对該細胞生长有不良影响。

与其他传代細胞或与原代人胚肾細胞比較，传代人胚肾細胞生长时可以适应較高的 pH，甚至在 pH 8.0 时，該細胞尚能充分分裂。在本实验所用培养基的条件下，細胞在生长代謝过程中 pH 的改变并不十分明显。这在病毒学研究的应用中是有实际意义的。

細胞形态的改变、生长速度的加快和生长时适应較高的 pH，說明人胚肾传代細胞經过体外培养以后，細胞的性質已起了深刻的变化。

实验結果指出，該細胞經过体外传代 38 次仍保存与原代人胚肾相似的对腸道病毒的敏感范围。許多其他細胞株虽然其原代細胞对 ECHO 病毒敏感，但其传代細胞則失去其敏感性，如人羊膜传代細胞 (FL 株) 对 ECHO 病毒的大多数型別均不敏感。本实验中人胚肾传代細胞对 ECHO 病毒的敏感性与原代人胚肾相似，但可看出，它的敏感性比原代細胞已有下降。

不少作者曾观察到随着细胞在体外培养代数的增加,对病毒的敏感性也不断地在改变,即使某些较稳定的细胞株,如 FL 株细胞,亦观察到对脊髓灰白质炎病毒的敏感性降低^[3]。因此,继续观察该株细胞对肠道病毒,特别是对 ECHO 病毒的敏感性是必要的。

FL 株细胞被認為是对脊髓灰白质炎病毒高度敏感的传代细胞之一,我們比較了人胚肾传代细胞和 FL 株细胞对脊髓灰白质炎病毒和 Cocksackie B 族病毒的敏感性。結果指出,該细胞对上述病毒的敏感程度較 FL 株细胞稍高。

除本文报告的病毒外,人胚肾传代细胞对其他病毒敏感情况是值得进一步研究的。

四、小 結

本文报告了一株人胚肾传代细胞(MERN 株)的生长和对肠道病毒的敏感性。

該株细胞已在实验室中培养 5 个月,经历了 38 代,其生长速度較快,繁殖指数較高,能适应于普通动物血清和高 pH 的培养基中生长,五个月来維持上皮细胞形态。

該株细胞对脊髓灰白质炎病毒, Cocksackie B 族 1—5 型、A 族 9.18 型病毒和 ECHO 1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、19 型病毒等均敏感。

参 考 文 献

- [1] Earle, W. R., *J. Natl. Cancer. Inst.*, 4:165, 1943.
- [2] Chang, R. S., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 87:440, 1959.
- [3] Swim, H. E., *Ann. Rev. of Microbiology*, 13:141, 1959.
- [4] 何申、白玉清：正常人胚肾和纤维母细胞株的建立, 未发表資料。
- [5] Fogh, J. & Lund, R. O., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 94:532, 1957.
- [6] Scherer, W. F. et al., *J. Exp. Med.*, 97:695, 1953.
- [7] Ross, J. D. & Syvertson, J. J., *Ann. Rev. Microbiology*, 11:459, 1957.

OBSERVATIONS ON THE GROWTH AND MULTIPLICATION OF A STABLE LINE OF HUMAN EMBRYONIC KIDNEY CELLS (MERN STRAIN) AND THEIR SUSCEPTIBILITY TO ENTERO-VIRUSES

MAO CHIANG-SHEN, SHUN YE-YING AND LIU CHIN-LIAN

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

The growth characteristics of a stable line of human embryonic kidney cells (MERN Strain) and their susceptibility to entero-viruses were studied. This cell line, in the form of simple monolayer culture on glass, has been maintained by 38 successive transfers over a period of 5 months. Its rate of growth and multiplication was rapid. Sera from most of the calves tested were found to be suitable for its growth. Furthermore, MERN cells were found to support the growth and were susceptible to the cytopathogenic effect of the following viruses: poliomyelitis virus types 1, 2, and 3; Cocksackie virus, types 9 and 18 of Group A and types 1—5 of Group B; Echo virus types 1—3, 5—14, and type 19. Comparative susceptibility of MERN cells, FL cells, and primary human embryonic kidney cells to polio virus, Cocksackie virus Group B type 1, and Echo virus type 1 was also studied.