

恙虫病立克次体組織培养

II. 应用兔睾丸单层細胞培养恙虫病立克次体

馮慧敏 罗瑞仙 白施恩*

(中山医学院微生物学教研組, 广州)

近年来,組織培养技术进展很快,自 Dulbecco, Youngner 等氏(1952,1954)以胰酶消化組織获得单层細胞,培养脊髓灰質炎病毒获得成功以来,許多学者都証实多种病毒能于各种单层細胞培养中繁殖,并引起細胞病变,便于观察病毒的繁殖。故目前单层細胞培养技术不但广泛应用于病毒分离培养及鉴定,同时也是研究病毒与宿主細胞間关系及病毒变异等問題的重要工具之一。立克次体一般繁殖較慢,除Q热立克次体外,一般于单层細胞中致細胞病变的作用不明显,但能大量繁殖,涂片检查时,常可找到大量立克次体。近年来,組織培养技术漸用于恙虫病立克次体的研究。Bozeman 氏等(1956)应用鼠淋巴肉瘤 MB III 細胞的悬浮培养,研究立克次体的繁殖,发现培养 72 小时后,感染立克次体 (karp 株)的細胞数达 98%。Schaechter 氏等(1957)以 14 pf 鼠纖維母細胞培养恙虫病及洛磯山斑点热立克次体,于培养 3—4 日后,立克次体开始大量繁殖。Hopps 氏等(1959)利用 L929 鼠纖維母細胞,研究恙虫病立克次体的繁殖速度及培养成分、湿度等对恙虫病立克次体生长的影响,氯霉素及各种代謝抑制物对生长于 MB III 及 L 細胞中的恙虫病立克次体的影响。Cohn 氏等(1959)应用 MB III 及 L 細胞研究,影响恙虫病立克次体侵入細胞的各种因素。我国学者以 Hela 細胞培养恙虫病立克次体也获得成功。但上述用以培养恙虫病立克次体的組織都是細胞株,其中大部分为瘤腫細胞或恶性生长細胞(如 Hela 細胞、MB III 細胞、L 細胞等),故恙虫病立克次体虽然能于这些細胞中繁殖,但其应用还受到一定限制,如制备疫苗則不适用。

本实验室研究恙虫病立克次体組織培养时,发现恙虫病立克次体能于正常兔睾丸組織中大量繁殖,本文报导有关兔睾丸单层纖維母細胞的培养方法及恙虫病立克次体于該种細胞培养中繁殖的結果。

一、实验材料及方法

制备单层兔睾丸細胞培养的方法 取雄性成兔以仰臥位置固定于解剖板上,剪淨下腹部阴囊附近兔毛,以 2—3% 碘酒进行局部消毒,在乙醚麻醉下,以无菌手术取出二側兔睾丸,一般可以在阴囊上方两阴囊中部采取正中纵切口,长约 0.5—2 厘米,沿兩側精索进行剥离,即可取出睾丸。剥离睾丸鞘膜后,剪碎,以 Hank's 緩冲液洗淨后,加入 0.25% 胰酶(Difco, 1:300)在 37°C 水浴箱中消化 30 分钟,并以磁攪拌器进行攪拌,俟組織消化成带絲状碎块后,以 2—3 层紗布过滤,2500 轉/分离心沉淀 1 分钟,其沉渣再以 Hank's 緩冲液洗 1 次后,將細胞悬于营养液中,以毛细吸管反复吹吸將細胞混悬,用紅血球計算盘数細胞后,將一定浓度的細胞接种于 10 × 100 毫米小試管或鏈霉素瓶中,每管含营养液 0.7

* 广州市恙虫脑炎研究組。

本文 1962 年 6 月 14 日收到。

毫升(鏈霉素瓶用 1 毫升),以橡皮塞塞紧,置 37°C 孵箱中靜置孵育。

培养液的配制方法 Hank's 緩冲液 79.5%,水解乳蛋白 0.5%,灭活山羊或兔血清 20%,青霉素 100 单位、鏈霉素 100 微克/毫升。

立克次体株来源 何株(1957 年 6 月 15 日)、梁株(1959 年 6 月 19 日)、徐株(1960 年 5 月 31 日)各自病人血液接种于小白鼠腹腔中分离得。恙株(1957 年 5 月 8 日自太平洋背展恙虫 [*Gahrliepia (Walchia) pacifica*] 接种于小白鼠分得)、49 株 (1956 年 3 月 12 日自沟鼠 *Rat. novogicus* 脾悬液接种于小白鼠分得)。上述各株立克次体均于小白鼠中不断传代保存,并偶然通过大白鼠。感染組織培养立克次体材料是以上述各株立克次体接种于小白鼠腹腔,于小白鼠发病濒死时,以 3 毫升无菌肉湯洗小白鼠腹腔,将腹腔洗液置 4°C 冰箱中 1 夜,經涂片証实含大量立克次体及无菌試驗証实无杂菌后,即可用。

感染辜丸細胞的方法 将已长成单层的兔辜丸細胞营养液吸出,加入感染小白鼠腹腔洗液于細胞片上,室溫靜置 30 分鐘后,用毛細吸管将腹腔洗液吸出弃去,加入新鮮营养液,其成分与細胞培养者同,但不加入抗菌素,置 28°C 中培养,于感染后一般不需換液。

检查立克次体的方法 检查时将营养液吸出,以 0.3—0.5 毫升接种于小白鼠腹腔,一般經 7—10 天潛伏期后,小白鼠发病,腹腔液涂片检查,可見大量細胞内外立克次体。将吸去营养液后余下的細胞片,用毛細吸管刮下,置于玻片上,用另一玻片压成薄片,以甲醇固定, Giemsa 液染色后鏡检。此外,也可用接种环刮取小片細胞,置于玻片上,再压成薄片,染色检查如上述。

恙虫病立克次体于組織細胞上传代的方法;經涂片証实已繁殖大量立克次体的組織培养管,可用以进行繼續传代,传代时,將細胞片刮下,用毛細吸管打碎后,將带有立克次体的細胞悬液感染已长成片的兔辜丸单层細胞。感染方法与用小白鼠腹腔洗液感染时相同。

二、实 驗 結 果

辜丸細胞生长情况的观察 細胞生长情况与接种細胞数有密切关系,根据我們的經驗,以 30 万細胞/管(10 × 100 毫米)較合适。接种后第 1 日,細胞附于管壁,但大部分仍为圓形,第 2 日开始变长,第 3 日換液,一般于 4—5 日长成一片纖維母細胞,細胞透明,体积較大,若接种細胞量太多,常发生早期脫落及成团傾向。

立克次体繁殖情况的观察 (一) 培养日数与立克次体量的关系 感染立克次体后的兔辜丸細胞,一般于第 2 日涂片,已能找到立克次体,但其量不多。感染后 8—9 日,感染細胞的百分比显著增高,立克次体也明显增多,常能于細胞内外找到大量立克次体。但

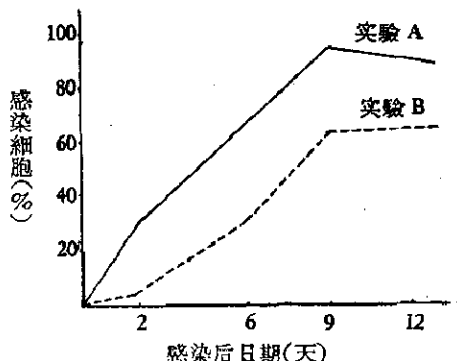


图 1 組織細胞被感染的数量与時間的关系

注:图中所示感染細胞百分比,只是相对数字,由于制片时用压片法,故可能部分細胞被压碎而將立克次体释出,故实际感染細胞数可能較图中所示为大,一般涂片中細胞外立克次体較細胞內多。

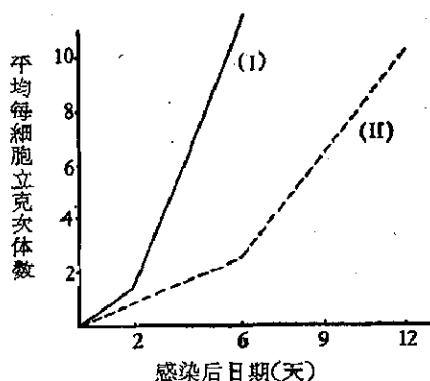


图 2 組織細胞內立克次体生长数与時間的关系

注:图中所示平均立克次体数是数 50 个細胞后的平均数,但由于制片时許多立克次体被压出,同时常发现細胞內有成堆立克次体,由于无法数出,只按 50 个計算,实际每細胞所含立克次体較图示为多。

随培养日数增加,立克次体繁殖量将更趋丰富,13日后涂片,常可见视野中满布立克次体,偶见链状形成。感染 20 日以上,细胞常易脱落,故以感染后 20 日内涂片及传代较佳。

(二) 立克次体接种量与立克次体生长的关系 以 0.3 毫升肉汤洗感染小白鼠腹腔洗液为原液,以营养液进行 1:2、1:4、1:8 稀释后,感染细胞,结果发现感染时的立克次体浓度与达到丰富繁殖所需的日数有关。感染立克次体量较少时,需较长时间,立克次体始能繁殖丰富。如图 2,感染时实验 I 所用的腹水含立克次体量为+++ ,较实验 II(++)多。于感染后 6 日涂片,实验 I 培养管,可见细胞内外充满立克次体,而实验 II 则需经较长时间(12 日以上),立克次体始能达到这样丰富。但在这两实验中,立克次体的最后浓度差别不大。

三、討 論

根据本实验室过去的经验,恙虫病立克次体能在固体斜面组织块中生长,但其缺点是生长不够规律,同一批培养管或同一管内不同组织块涂片结果,有时差异很大。应用兔睾丸单层细胞培养,则无上述缺点,使用不同来源立克次体株,不同批或同批各管细胞涂片结果,均差异不大,立克次体生长丰富而规律,经常能发现大量细胞内外立克次体。同时由于细胞外立克次体很多,故便于提纯。因此,应用兔睾丸单层细胞培养恙虫病立克次体,可能是提供制备疫苗、抗原及纯立克次体材料的一种理想方法。

上述实验结果说明恙虫病立克次体于兔睾丸单层细胞中繁殖的速度较一般病毒慢, Hopps 等氏的实验证明恙虫病立克次体于 MB III 细胞中,每天只繁殖 3 代,并认为这可能是该种立克次体的固有特性之一。此外, Cohn 氏等认为培养基的成分及立克次体的活性对其侵入细胞的能力有明显影响,在冰箱中放置时间过久的立克次体,侵入细胞的能力显著降低,我们用以感染细胞的小白鼠腹腔洗液是经放置冰箱中 1 夜,无菌试验证实为无菌后,始进行感染,可能于此过程中,部分立克次体已经灭活。如 Bozeman 及 Hopps 等氏,均证实恙虫病立克次体于缓冲液中,其传染滴度迅速下降,于有蛋白质的缓冲液中,其传染滴度虽降低较慢,但仍不断降低,故进入细胞内的立克次体量减少,需培养较长时间始能繁殖大量。我们只用普通肉汤洗小白鼠腹腔,是否其中所含成分,不是立克次体侵入细胞的最适宜环境,有待今后进一步探讨。同时,我们选用的培养温度较低(28°C),可能也是立克次体繁殖较慢的原因之一。

此外,立克次体与一般小病毒不同,病毒能于较简单的维持液中繁殖,而立克次体于无血清培养基中,传染滴度不断下降,故不能用普通的维持液支持立克次体的繁殖。过去学者们培养恙虫病立克次体时,培养基中所用的血清含量均较大,如 Plotz 氏(1946)以固体斜面培养恙虫病立克次体时,血清用量为 29%, Bozeman, Schaechter, Cohn, Hopps 等氏使用 40—50% 马血清,我们证明有水解乳蛋白存在时,培养基中只需加入 20% 山羊或兔血清,已足以供应立克次体繁殖的需要。同时,我们实验室的经验证明要支持恙虫病立克次体生长所要求的血清种类不很严格,用山羊、兔或牛血清,立克次体均能丰富繁殖,但使用兔血清时,需注意某些流行区家兔有自然感染立克次体的可能性。

四、結 論

本文介绍了兔睾丸单层细胞的培养方法及恙虫病立克次体于该种细胞中生长繁殖的

規律。証明兔辜丸細胞适于恙虫病立克次体的生长繁殖,經 28°C 培养 10—15 天,能經常获得非常丰富的立克次体。立克次体并能于該种組織中传代。

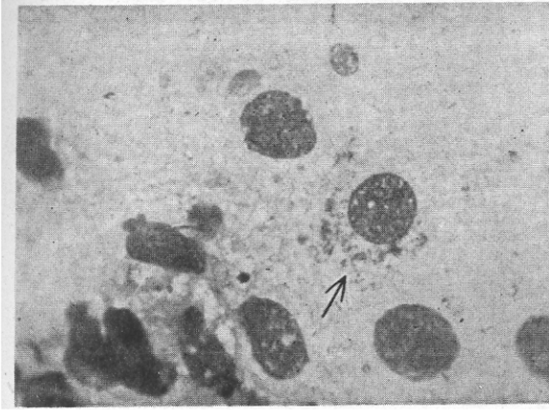


图 3 “恙”株恙虫病立克次体感染兔辜丸单层細胞后 10 日涂片。

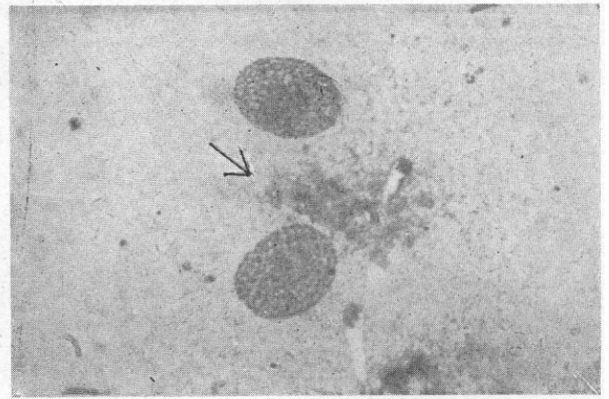


图 4 “恙”株恙虫病立克次体感染兔辜丸单层細胞后 5 日涂片。

参 考 文 献

- [1] Youngner, J. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**:202, 1954.
- [2] Bozeman, F. M. et al.: *J. Immunol.*, **76**:475, 1956.
- [3] Schaechter, M., *Virology*, **3**:160, 1957.
- [4] Hopps, H. E. et al.: *J. Immunol.*, **82**:172, 1959.
- [5] Hopps, H. E. et al.: *J. Immunol.*, **82**:161, 1959.
- [6] Cohn, Z. A. et al.: *J. Exp. Med.*, **109**:271, 1959.
- [7] 福建流行病学研究所: *流行病学* **6**:39, 1959.
- [8] 馮慧敏等: *微生物学报*, **8**:126, 1960.
- [9] 于庶恩等: *微生物学报*, **5**:183, 1957.

TISSUE CULTURE OF RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI

II. RABBIT TESTIS MONOLAYER TISSUE CULTURE FOR CULTIVATION OF RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI

FENG HUI-MIN, LO JUI-HSIAN AND PAI SHIH-EN

(Department of Microbiology, Chungshan Medical College, Canton)

The trypsinized monolayer tissue culture of rabbit testis fibroblasts was found to be suitable for the cultivation of rickettsia tsutsugamushi. This tissue culture contained 20% rabbit or goat's serum, 0.5% lactalbumin hydrolysate and 79.5% Hank's BSS.

Peritoneal fluid of infect mice was used to inoculate the tissue culture. After 10—15 days incubation at 28°C., large number of extra and intracellular rickettsiae could usually be found from the cell smears, but no cytopathogenic effect was seen. The time of "peak multiplication" varied with the concentration of the inoculum. When inocula with various concentrations of rickettsiae were used, it was found that the lower the concentration of rickettsiae inoculated, the slower the time for rickettsiae to reach "peak multiplication". However, at the end of incubation period, was no difference in the final concentration of rickettsiae found.