

# 麻疹病毒在各种組織培养中的 繁殖与病变

蕭 俊 張守德 庄貞禧

(长春生物制品研究所, 长春)

关于麻疹病毒在組織培养中繁殖与产生病变的研究, 許多作者們曾經有过报导。多数作者采用了人的各种組織如人胎腎<sup>[1]</sup>、羊膜<sup>[2]</sup>、絨毛膜<sup>[3]</sup>、白血球<sup>[4]</sup>或是由正常組織建立的传代細胞如羊膜株<sup>[5]</sup>、心細胞株<sup>[6]</sup>或是人的癌瘤細胞如 KB<sup>[7]</sup>、Hep-2<sup>[8]</sup>、HeLa<sup>[9,10]</sup>、Detroit-6<sup>[9]</sup>等。在动物細胞方面研究过的有猴腎<sup>[11]</sup>、狗腎<sup>[11]</sup>、牛腎<sup>[12]</sup>、鸡胚<sup>[13]</sup>与豚鼠脾的一株传代細胞<sup>[14]</sup>。但是这些細胞对麻疹病毒的敏感性是不一致的。有的如人胎腎、猴腎对天然麻疹病毒敏感, 有的如牛腎、鸡胚則需要一个适应的过程。在病毒繁殖量、病变出現、能否传代等方面也各有差别。对有些細胞文献中的报导互相矛盾。在研究麻疹免疫問題的过程中, 我們感到有必要探索各种組織培养对所研究的病毒株的敏感性, 以便于决定哪些种細胞适合于滴定或中和試驗, 哪些种可能用来获得減毒疫苗株或大量制造疫苗。本文报告有关的一些資料。

## 材料及方法

### 一、病毒株

麻 20 与麻 34 株为卫生部生物制品研究所于北京分离的两株麻疹病毒, 仅在人胎腎中传代。

列 4 株为苏联医学科学院实验医学研究所分离的毒株, 原名“Ленинград 4”<sup>[15]</sup>。取得时曾經在人胎腎細胞中传 26 代, 人羊膜細胞中传 41 代。

毒种传代历史以下列方法标记之:

人胎腎——HK, 人羊膜——HAM, 鸡胚——CE, 数字表示代数。如上述的列 4 株可以 HK<sub>26</sub>HAM<sub>41</sub>表示之, 或簡作列 4 HAM<sub>41</sub>。

### 二、組織培养

采用了两种方法: 組織块法以剪成小块的組織用鸡血浆固定于管壁; 单层法用 0.1—0.25% 胰蛋白酶于 37°C 消化, 分散的細胞于洗滌后悬于生长液中接种, 使直接在管壁上长成单层。

所用生长液与維持液均以 199 为基础(仅狗腎用 0.5% 水解乳白蛋白, 传代羊膜用 199 与 0.5% 水解乳白蛋白的等量混合液)。根据細胞不同而调节加入的牛血清浓度: 一般易于生长的細胞如鸡胚、猴腎用 1—2% 血清, 組織块用 5% 血清, 生长力較差的如初代人羊膜、猪腎、狗腎、羊腎或传代細胞如 FL、HeLa 等用 20% 血清。維持液适当减少血清浓度至 1—5%。所有組織培养液均系以 Earle 氏液配制。

人胎組織取自 7 个月以下的流产或刮宫胎儿。猪、狗及羊腎均取自幼年动物。豚鼠系胚胎組織。鸡胚为孵育 9—10 天者。传代羊膜細胞为 FL 株, 传代人胎腎系中国医学科学院病毒系所分离的 MERN 株<sup>[16]</sup>, HeLa, KB 及 Detroit-6 細胞为曾經适应于牛血清生长液者。

### 三、接种与观察方法

FL、HeLa 等传代细胞采用细胞悬液与病毒混合法,每管接种 1 毫升。单层或组织块则于每管加入 0.9 毫升维持液与 0.1 毫升病毒材料。于 35°—36°C 培育 2 天后逐日于显微镜下观察病变,必要时用火棉胶脱膜法将细胞从管壁脱下<sup>[1]</sup>,以 Bouin 氏液固定再以苏木精伊红染色后镜检。如不出现病变则尽可能延长观察时间,并根据 pH 情况定期换液直至细胞自行退化时,再进行传代。一般于传代同时转种初代人羊膜或 FL 细胞,以测知病毒存在。由于在第一代培养过程中至少曾换液一次,于传代或转种时病毒至少稀释  $10^{-3}$  以上,故传代或转种阳性时可认为肯定有病毒繁殖。滴定病毒时做 10 倍递减稀释,每个稀释度接种 3 管细胞,根据病变计算出 TCID<sub>50</sub>。

### 四、血球吸附试验

对人胎肾、初代人羊膜、鸡胚及 FL, MERN, KB, Detroit-6 等传代细胞株曾于感染病毒的第一代(7—14 天)作血球吸附试验<sup>[17]</sup>。将管内病毒液抽去后加入 0.5 毫升 0.2% 猴血球,于 37°C 培育 1 小时,用 Earle 氏液洗 2—3 次,再于低倍镜下检查,并与未感染的对照管比较。

## 试验结果

几株麻疹病毒在各种组织培养中的表现概括如表 1。

### 一、麻 34 与麻 20 人胎肾株

麻 34 人胎肾株(HK8-16)在人胎肾组织块、猴肾、初代人羊膜与 HeLa 细胞中均能繁殖传代并引起融合区与空泡病变,以苏木精伊红染色后可见到多核巨细胞与嗜伊红性核内包涵体。在人胎肾与猴肾中病变出现快而且广泛,染色观察巨细胞内有大量胞核聚集成堆,核内包涵体较大,有时一个或数个包涵体占满整个胞核;此外,胞浆内也常出现大小形状不等的深红色包涵体。如以 Bouin 作为固定剂时,在胞浆内与核内包涵体周围有一明显的空白晕,以福尔马林固定则无此效果。在人羊膜细胞中病变出现与进展均较缓慢,且各代不甚规则,巨细胞与核内包涵体也较少,以猴血球作吸附试验时仅见到散在的血球吸附。在 HeLa 细胞中的病变表现为细胞形状不整,颗粒较多,部分圆缩与小块融合区,染色观察有十多约含十数个核的巨细胞与一片浅红色胞浆,核内包涵体很小且不甚明显(图 1)。本株病毒在 FL, MERN, KB 与 Detroit-6 细胞中未见到明显病变。

于不同次试验中,曾将麻 34 株在几种细胞中进行滴定,与人胎肾组织培养中的滴度相比较。结果表明其在猴肾、初代人羊膜与 HeLa 细胞中的滴度均与人胎肾组织块中的滴度相接近。麻 34 株在猴肾单层细胞中繁殖达到的滴度依维持液成分而不同,在含血清的 199 中可达  $10^{2.5}$ — $10^{3.0}$ /0.1 毫升,在不含血清的 199 中仅达  $10^{1.5}$ — $10^{2.5}$ /0.1 毫升。

麻 20 人胎肾株(HK<sub>21</sub>)在狗肾细胞中直接观察,未见病变,但染色后巨细胞与核内包涵体都很明显。

### 二、列 4 人羊膜适应株

列 4 人羊膜适应株(HAM<sub>41-49</sub>)在各种人胎组织中均能繁殖,但仅在人胎肺,人羊膜与 FL 细胞中曾经多次传代。在人胎肺与人胎脾组织中镜下直接观察未见到病变;在人胎肺组织中染色观察最初几代仅见到少数极小的多核细胞,且无核内包涵体,传至 6 代后巨细胞与核内包涵体开始明显,并有大量红色胞浆内包涵体(图 2)。在人羊膜细胞中病变极为广泛,最初表现为空无一物的空白区或细胞间界限不清的集聚,继续培养则可见到含有许多细胞核的融合细胞,以猴血球进行吸附试验时则可见到血球成堆吸附,病变染色

表 1 几株麻疹病毒在各种組織培养中的繁殖与病变

病毒株	传代历史	組 織 培 养	鏡下直 接观察	HE 染 色		血球吸附	传 代
				巨細胞	核內包涵体		
麻34	HK <sub>8</sub>	人胎腎組織	+++	+	+	○	+
麻34	HK <sub>16</sub>	人羊膜单层	++	+	+	+	+
麻34	HK <sub>16</sub> HAM <sub>31</sub>	传代人羊膜 (FL)	-	○	○	○	○
麻34	HK <sub>16</sub> HAM <sub>36</sub>	传代人胎腎(MERN)	-	○	○	○	○
麻34	HK <sub>16</sub> HAM <sub>36</sub>	KB	-	○	○	○	○
麻34	HK <sub>16</sub> HAM <sub>36</sub>	Detroit-6	-	○	○	○	○
麻34	HK <sub>15</sub>	HeLa	++	+	±	○	+(2)
麻34	HK <sub>11</sub>	猴腎单层	+++	+	+	○	+(8)
麻20	HK <sub>21</sub>	狗腎单层	-	+	+	○	○
列 4	HAM <sub>43</sub>	人胎腎組織	+++	+	+	+++	+(2)
列 4	HAM <sub>41</sub>	人羊膜单层	+++	+	+	+++	+
列 4	HAM <sub>43</sub>	人胎肺組織	-	+	+	○	+(8)
列 4	HAM <sub>43</sub>	人胎脾組織	-	±	-	○	+(1)
列 4	HAM <sub>41</sub>	人胎心肌組織	+	+	-	○	+(1)
列 4	HAM <sub>45</sub>	人胎睾丸組織	++*	○	○	○	+(2)
列 4	HAM <sub>45</sub>	传代人羊膜 (FL)	+++	+	+	+++	+
列 4	HAM <sub>47</sub>	传代人胎腎(MERN)	++	+	-	++	○
列 4	HAM <sub>47</sub>	KB	+++	+	-	+++	○
列 4	HAM <sub>47</sub>	Detroit-6	+++	+	-	+++	○
列 4	HAM <sub>42</sub>	狗腎单层	-	+	+	○	○
列 4	HAM <sub>49</sub>	猪腎单层	-	○	○	○	+(3)
列 4	HAM <sub>45</sub>	羊腎单层	-	○	○	○	-
列 4	HAM <sub>45</sub>	豚鼠胎肺組織	+	+	+	○	+(2)
列 4	HAM <sub>45</sub>	豚鼠胎心肌	-	○	○	○	-
列 4	HAM <sub>47</sub>	鸡胚单层	-	-	-	+++	+
列 4	HAM <sub>45</sub> CF <sub>15</sub>						
列 4	HAM <sub>45</sub>	鸡胚羊膜組織	-	○	○	○	+(1)

注：(1) 鏡下直接观察与血球吸附，+++ ++ +表示病变或血球吸附程度；  
(2) 染色观察+或-表示該項病变有无；  
(3) 传代+表示可长期传代，+(1)表示第一代轉种阳性說明病毒已繁殖，其它( )內数字表示曾經传递的代数，-表示第一代轉种阴性；  
(4) ○表示未做；  
(5) \*第一代未見病变，第二代为 ++。

观察如图 3。在 FL 細胞中病变于 2—3 日內即可出現，最初为較透明的融合区，以后色泽变深，顆粒增多，血球吸附也非常显著。在其他传代細胞株如 MERN，KB 与 Detroit-6 中，病变和血球吸附与 FL 細胞大致相似。本株在 FL 細胞中的滴度比在初代人羊膜中約高一个对数单位。

在几种动物腎的单层細胞中，仅狗腎染色检查有明显病变，但在猪腎中可連續传 3 代，每代轉种初代人羊膜細胞均为阳性。

在豚鼠胎肺組織中于 6—7 天后出現融合病变，染色后見到明显的巨細胞与少数核內包涵体，而胞浆內則有大量紅色包涵体(图 4)；传一代也出現同样病变。

曾屢次将列 4 人羊膜适应株与鸡胚羊水适应株接种于鸡胚单层細胞中，第一代材料

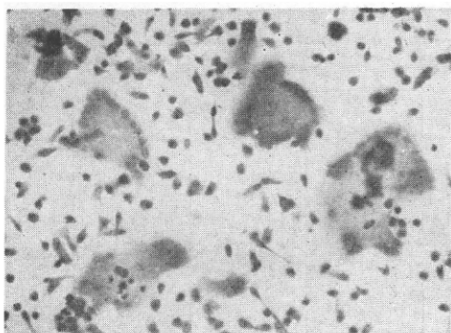


图1 麻34 HK<sub>13</sub> 接种于 HeLa 細胞中第6天的細胞病变。图示5个含十余个核的融合細胞，胞浆为浅紅色。HE 染色，160×。

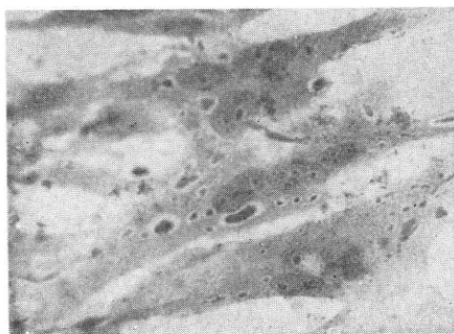


图2 列4 HK<sub>29</sub> HAM<sub>48</sub> 在人胎肺組織块培养中第6代第6天的細胞病变。图示三个含2—3核的小融合細胞，核內有几个小圓形或橢圓形的紅色包涵体，胞浆內有大量大小形状不一的紅色包涵体，周围有明显空白暈。HE 染色，640×。

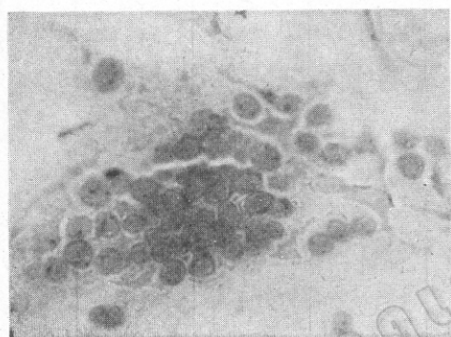


图3 列4 HK<sub>29</sub> HAM<sub>48</sub> 在初代人羊膜細胞中第16天的細胞病变。图示一个多核融合細胞，包涵体充滿核內。HE 染色，640×。



图4 列4 HK<sub>29</sub> HAM<sub>48</sub> 在豚鼠胎肺組織块培养中第7天的細胞病变。图示一个多核融合細胞与少数单核細胞，部分核內有1—2个小包涵体，胞浆內有大量大小形状不一的紅色包涵体，周围有明显空白暈。HE 染色，640×。

轉种 FL 細胞均为阳性，但繼續传代則結果不規律。如能将鸡胚細胞維持至二星期以上不脫落，則可以在其中連續传代。列4 HAM<sub>47</sub> 与 HAM<sub>48</sub> CE<sub>15</sub> 二系均已在鸡胚細胞中传至10代以上，迄今未見到明确病变，但血球吸附非常明显，收获的病毒在传代人羊膜中滴定可达  $10^{-2}$ — $10^{-4}$ 。

本株病毒在羊腎与豚鼠胎心肌組織中似乎不能繁殖。

## 討 論 与 結 論

在总结本項工作的时候，苏联作者 Доссер 等<sup>[18]</sup>与 Лозовская 等<sup>[19]</sup>相繼报告了各种組織培养对几株麻疹病毒的敏感性的研究結果。这些作者們一致認為人胎与猴的組織的敏感性最高，狗腎与小鸡腎比較差。对一些大动物的組織則有矛盾的結果，Доссер 观察到病毒在牛胎、猪胎与羊胎的腎或肺培养物中均可引起病变并連續传代，而 Лозовская 感染牛胎与羊胎腎都获得了阴性結果。在传代細胞中，Лозовская 认为 Нер-2 最敏感，但仍然比猴腎要差。这两組作者們虽然注意到毒株之間有所差异，但都沒有列出所研究的毒株的传代历史，也沒有着重研究毒株性質与細胞感染范围的关系。

麻疹病毒最初是在人胎腎与猴腎組織培养中分离的<sup>[1,20]</sup>。以后又陸續报导在初代人羊膜<sup>[21]</sup>、狗腎<sup>[11]</sup>、人胎肺<sup>[22]</sup>与 HeLa<sup>[23]</sup> 中分离出病毒。看来天然的麻疹病毒可以在这些細胞中繁殖。在我們的实验中,在人胎腎中传不多代的麻 34 株或麻 20 株除人胎肺未試外,能在这些細胞中引起病变,并可以传代。这些結果是与以上的报导符合的。除了灵长类細胞以外,狗腎对天然麻疹病毒敏感,可能反映了麻疹与犬瘟热病毒之間的生物学关系<sup>[24]</sup>。

列 4 株的細胞感染范围比較广泛。它与麻 34 株相比,至少有以下几点区别:在初代人羊膜中病变广泛,滴度也高;在 FL, MERN, KB, Detroit-6 等正常或癌瘤传代細胞中病变显著;在鸡胚細胞培养中可以繁殖传代;在各种組織培养中血球凝集与血球吸附都非常明显。此外,列 4 株也可在鸡胚羊膜腔中繁殖传代<sup>[25]</sup>。这些性質看来是病毒通过实验室变异而获得的。但是应当指出,并非每株人羊膜传代后的毒株必然获得这些性質,例如麻 34 株虽然在人羊膜細胞中传 31—36 代后在 FL 等細胞上仍然不引起病变。

列 4 株感染豚鼠胎肺后能引起病变,并可以传代;在猪腎中虽不見病变,但可以連續传递三代。有些作者曾报告麻疹病毒可以在一株豚鼠脾传代細胞中繁殖并产生病变<sup>[14]</sup>,也可以适应于豚鼠腎<sup>[26]</sup>或牛腎細胞<sup>[12]</sup>。看来豚鼠細胞与牛、猪的腎細胞对經过实验室适应的麻疹病毒是比較敏感的。

根据以上实验結果,FL 細胞便于供应,病变出現快而显著,适用于列 4 株的滴定与中和实验。在滴定麻 34 株时以 HeLa 細胞最为方便。为了降低麻疹病毒致病性以获得減毒疫苗株,可以考虑应用狗腎、猪腎、豚鼠胎肺或鸡胚細胞。为了大量培养病毒以制备疫苗,則除了鸡胚細胞以外,尚应进一步研究利用猪腎与豚鼠細胞的可能性。

## 参 考 文 献

- [1] Enders, J. F. & Peebles, T. C.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **86**(2):277—286, 1954.
- [2] Milovanovic, M. V., Enders, J. F. & Mitus, A.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **95**(1):120—127, 1957.
- [3] Wright, J.: *Lancet*, **1**:669—670, 1957.
- [4] Berg, R. B. & Rosenthal, M. S.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **106**(3):581—585, 1961.
- [5] Frankel, J. W. & West, M. K.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **97**(4):741—742, 1958.
- [6] Girardi, A. J., Warren, J., Goldman, C. & Jefferies, B.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **98**(1):18—22, 1958.
- [7] Dekking, F. & McCarthy, K.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **93**(1):1—2, 1956.
- [8] Black, F. L., Reissig, M. & Melnick, J. L.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **93**(1):107—108, 1956.
- [9] Quoted from Enders, J. F., Peebles, T. C., McCarthy, K., Milovanovic, M., Mitus, A. & Holloway, A.: *Am. J. Public Health*, **47**(3):275—282, 1957.
- [10] Oddo, F. G., Flaccomio, R. & Sinatra, A.: *Virology*, **13**(4):550—553, 1961.
- [11] Frankel, J., Burnstein, T. & West, M. K.: *Federation Proceedings*, **17**(1):511, 1958.
- [12] Schwarz, A. J. F. & Zirbel, L. W.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **102**(3):711—714, 1959.
- [13] Katz, S. L., Milovanovic, M. V. & Enders, J. F.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **97**(1):23—29, 1958.
- [14] Mascoli, C. C., Stanfield, L. V. & Phelps, L. N.: *Science*, **129**:894—895, 1959.
- [15] Сморodinцев, А. А., Войчук, Л. М., Шикина, Е. С., Батанова, Т. Б., Быстрыкова, Л. В. и Перадзе, Т. В.: *Acta Virologica*, **4**(4):201—214, 1960.
- [16] 毛江森、孙白英、刘金蓮:微生物学报, **9**(1):42—47, 1963.
- [17] Rosanoff, E. I.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **106**(3):563—567, 1961.
- [18] Доссер, Е. М., Дорофеев, В. М., Фадеева, Л. Л., Рапопорт, Р. И., Шеболдаева, А. Д.: *Вопрос. Вирусол.*, (4):11—17, 1962.
- [19] Лозовская, Л. С. и Лохова, С. В.: *Вопрос. Вирусол.*, (5):576—581, 1962.

- [20] 湯飞凡、吳紹沅、黃元桐、聞仲权: 中华医学杂志, **44**(8):729—734, 1958。
- [21] Ruckle, G.: *J. Immunol.*, **78**(5):330—340, 1957.
- [22] Сергиев, П. Г. и Шамраева, С. А.: *Ж.М.Э.И.*, (7):47—51, 1956.
- [23] Shingu, M. & Nakagawa, Y.: *Kurume Med. J.*, **7**(2—3):82—88, 1960.
- [24] Warren, J.: *Advances in Virus Research*, **7**:27—60, 1960.
- [25] 朱既明、萧俊、张守德、武文焕、曾国华、章以浩、王子柱: 进一步减毒的麻疹活疫苗的研究 I. 在人羊膜细胞、鸡胚与鸡胚细胞中传代的麻疹病毒的某些性状与减毒过程的观察(待发表)。
- [26] Smorodintsev, A. A., Boychuk, L. M., Shikina, E. S., Peradze, T. V., Kuzmicheva, A. T., Bystryakova, L. V. and Batanova, T. B.: *Am. J. Dis. Child.*, **103**(3):384—389, 1962.

## MULTIPLICATION AND CYTOPATHOGENIC EFFECT OF MEASLES VIRUS IN VARIOUS TISSUE CULTURE

HSIAO CHUN, CHANG SHOU-DE AND CHUANG CHEN-HSI

(National Vaccine and Serum Institute, Changchun)

The behaviour of three strains of measles virus in various primary and continuous tissue culture systems was studied with the following technics: Cytopathic effect (CPE) both by direct microscopy and after hematoxylin-eosin staining, Lemadsorption of rhesus erythrocytes and transfer to susceptible cells after various number of passages in the particular systems. Human an embryonic kidney, human amnion, monkey kidney, dog kidney and HeLa cells were found to support virus multiplication with CPE of recently isolated virus strains passed in human kidney cells only (strain 20 and 34). The laboratory adapted strain, Leningrad 4, on the other hand, showed in addition, will marked CPE and Lemadsorption in a number of cell systems including chicle embryo fibroblast, guineapig embryo lung, FL, MERN, KB and Detroit-6. Pig kidney cells was able to support the multiplication of Leningrad 4 without CPE. The practical significance of these findings is discussed.