

感染病毒細胞活体螢光染色的研究

張礼璧 龐其方 鄭斌云

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

近年来利用吖啶橙 (Acridine Orange, 简称 A. O.) 染料对細胞作組織化学的研究日益增多, 但多数工作是将組織細胞用物理或化学方法先行固定杀死, 然后染色进行螢光显微镜观察。Armstrong^[1] 利用 A. O. 染色法研究經固定后細胞的核糖核酸 (RNA) 和去氧核糖核酸 (DNA) 成分。在病毒学領域里, 一些作者利用 A. O. 染色法检查細胞在感染病毒后, 細胞中 RNA 和 DNA 含量的变化情况^[2-5]。以上工作所用細胞均先固定杀死, 然后染色, 其研究目的在于探討細胞受病毒感染后所引起的組織化学变化。Maximovich^[6] 等报道用未經固定的感染材料 (經流感病毒感染后的小白鼠呼吸道上皮細胞) 用 A. O. 染色法检查流感特异性包涵体的存在, 但未探討細胞对病毒早期感染的反应性。

本文报道用低浓度 A. O. 作为活体染料对感染病毒后的生活細胞进行螢光染色, 试图寻求一种簡便方法在沒有或很少細胞病变的組織培养細胞中, 早期显出病毒的存在和繁殖。由于在文献中未找到类似的工作, 特提出本实验的一些初步資料, 并討論其应用的可能性。

材 料

吖啶橙 E. Merck 厂出品。以 Hank's 氏液配成 1:4000 溶液, 高压灭菌后放冰箱保存, 用时再作不同程度的稀释, pH 为 7.2—7.4。

鸡胚单层細胞 按一般方法将 9—10 天的鸡胚去除头、肢足与內脏后, 消化成細胞悬液, 以每毫升 60 万的細胞量接种在带有玻片的試管中, 培养液为 10% 小牛血清的水解乳蛋白液, 待細胞长成单层后, 用 0.5% 水解乳蛋白液作为維持液。

螢光显微镜 Leitz 厂出品, 以弧光为光源利用蓝光为激发光, 加黄色护目鏡观察, 并照相。

病毒 牛痘苗病毒, 于鸡胚絨毛尿囊膜传代, 实验应用者为 5—10 代, 血凝滴度为 1:320—1:640。

流感病毒 甲型 PR₈ 株, 在本实验室中传 15—25 代, 血凝滴度为 1:640—1:1280。

实验与结果

I. 影响活体細胞染色和观察的几个因素

(1) **不同浓度的染料对活体細胞生长的影响** 将不同浓度的吖啶橙, 在細胞悬液分装試管的同时加入試管中, 使最終的 A. O. 浓度分别为 1:4 万, 1:40 万, 1:400 万和 1:4000 万, 經 37°C 孵箱培养, 逐日观察細胞生长情况, 其結果如表 1。

表 1 不同濃度的吡啶橙对細胞生长的影响

培养天数和 生长情况 生长液中 A. O. 的浓度	1		2	3	4	5
	粘 管	生 长				
1:40,000	不佳	无	无	細胞脫落		
1:400,000	佳	不好	不好	不好	不好	不好
1:4,000,000	佳	較好	好	好	好	好
1:40,000,000	佳	好	好	好	好	好
未加 A. O. 的对照	佳	好	好	好	好	好

注：表中各項为綜合 10 管細胞生长的情况。

由表 1 可見，1:4 万 或 1:40 万 濃度的 A. O. 对細胞有不同程度的毒性作用，用 1:4000 万 濃度則无不良影响，而 1:400 万 濃度仅稍有影响，仍可作活体染色之用。

(2) 不同濃度的 A. O. 对細胞浆染色的影响 比較了 1:400 万 和 1:4000 万 二种濃度的 A. O. 活体染色情况，发现 1—2 分鍾后細胞已經着色，2 小时时已达到最濃的着色，但着色的深浅則以濃度大者較深，胞浆中紅色螢光顆粒的直径較大，数目較少，濃度小者着色較浅，胞浆內紅色螢光顆粒較小，数目較多(图 1,5)。在上述低濃度时，細胞核不易着色。以上的观察都是在活細胞上进行的。一旦将生长在玻片上的細胞自維持液中取出，暴露于室温的空气中經過半小时或更久，或在蓝色光照射下經 15 分鍾后，当細胞漸趋死亡时，上述胞浆中的紅色顆粒消失，整个細胞为一片弥散的黃綠色螢光所替代(图 4)。

(3) 不同酸碱度对染色的影响 发现凡适合于細胞生长的 pH，对 A. O. 染色无不良影响，然而細胞在 pH 5—6 的維持液中培养 1—2 天后，再經 A. O. 染色检查，此时胞浆中紅色螢光顆粒不被显示或很少显现。

(4) 活体染色后立即观察和經固定后观察的差异 已經活体染色的标本再以各种固定剂固定，发现以丙酮、甲醇、Carnoy 液固定者其紅色螢光顆粒均消失，代之以一片黃綠色的螢光染色，且三种固定剂都能使 A. O. 活体染色脫色，而使細胞的螢光变浅，其中尤其以丙酮的作用最为显著。若以 10 % 甲醛固定，則紅色螢光顆粒減少至一半左右，若延长固定時間至 1 小时以上或增加固定液中甲醛的濃度，則不能見到胞浆中的紅色螢光顆粒。

II. 牛痘病毒感染細胞后的 A. O. 活体染色

待培养在带有玻片試管中的細胞在玻片上长成单层后，接种 0.1 毫升病毒悬液 (10^{-2} 及 10^{-5} 二組)，繼續 37℃ 培养，間隔不同時間后加入 A. O.，使維持液中 A. O. 的濃度最終为 1:4000 万，2 小时后进行螢光鏡观察。

实验分別以正常細胞，接种正常鸡胚尿膜悬液的細胞，加热灭活病毒悬液的細胞和病毒加特异性免疫血清中和后接种的細胞作为对照，其結果如表 2。

由表 2 可以看出，实验組与对照組中，胞浆內紅色顆粒的多寡有明显的差异，胞浆中紅色顆粒的減少，可被認為系感染牛痘病毒的結果(图 2)，这种变化发生在細胞病变以前。紅色顆粒減少的現象在加热灭活組，免疫血清中和組和其他对照組中均不能見到。



图1 正常鸡胚细胞吖啶橙活体染色，600 倍照相，放大到 1000 倍。

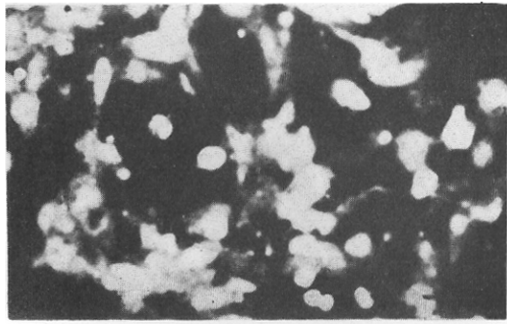


图2 牛痘病毒感染鸡胚细胞 48 小时后吖啶橙活体染色，600 倍照相，放大到 1000 倍。

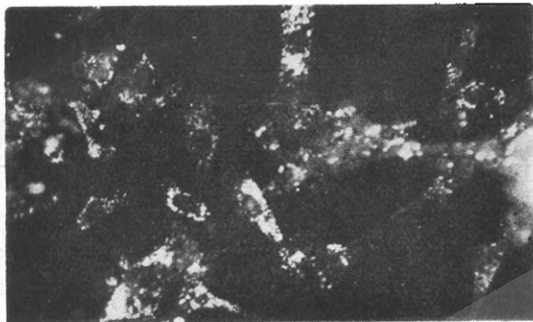


图3 鸡胚细胞接种加热灭活牛痘病毒的吖啶橙活体染色，600 倍照相，放大到 1000 倍。

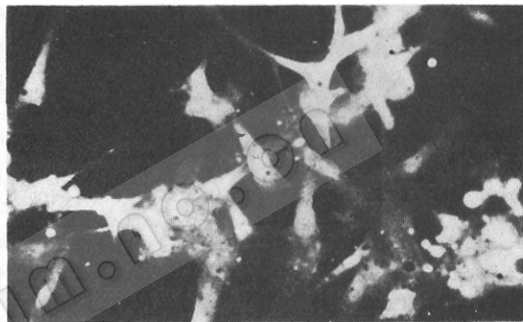


图4 同图3，视野经暴露紫外光下 10 分钟后的变化(胞浆内红色颗粒消失，代之以一片黄绿色荧光) 600 倍照相，放大到 1000 倍。

需要说明的是，在感染病毒组的细胞管中，并非每个细胞都表现出红色荧光颗粒的减少，部分细胞其 A. O. 染色情况与正常对照组没有明显区别。这部分细胞可能是尚未受病毒感染，或者是受到病毒感染的初期而不显示活体荧光染色上的差异。

表 2 不同剂量牛痘病毒感染细胞后活体染色的比较

病毒量(毫升)	10 ⁻² 0.1	10 ⁻³ 0.1	对 照
时间(小时)			
感染病毒后 24	胞浆：黄绿色(亮度++)， 部分细胞内有红色荧光颗粒 胞核：黄绿色(亮度+++)	胞浆：黄绿色(亮度+)， 大部分细胞内有红色荧光颗粒 胞核：黄绿色(亮度++)	胞浆：淡绿色(亮度+)， 全部细胞有红色荧光颗粒 胞核：基本上不染色
感染病毒后 48	胞浆：黄绿色(亮度+++)， 大部分细胞无红色荧光颗粒 胞核：黄绿色(亮度+++) 细胞病变：+++	胞浆：黄绿色(亮度++)， 大部分细胞内红色荧光颗粒减少 胞核：黄绿色(亮度++) 细胞病变：± → +	同 上
感染病毒后 72	染色情况同上 细胞病变：++++	胞浆：黄绿色(亮度++)， 大部分细胞中或少或无红色荧光颗粒，部分细胞仍有红色颗粒 胞核：黄绿色(亮度++) 细胞病变：++	同 上

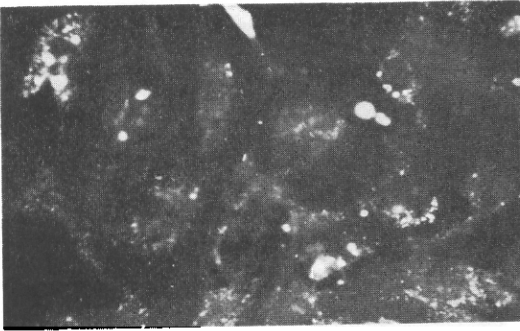


图 5 正常鸡胚细胞培养 48 小时吖啶橙活体染色, 600 倍照相, 放大到 1,000 倍左右。

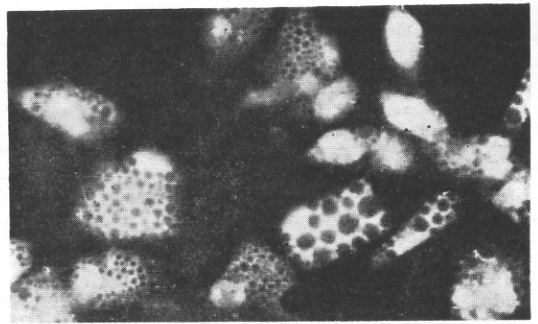


图 6 感染流感病毒 48 小时后吖啶橙活体染色, 细胞内形成巨大红色荧光颗粒, 600 倍照相, 放大到 1000 倍左右。

III. 流感病毒感染细胞后的 A. O. 活体染色

按与接种牛痘病毒相似的方法, 在细胞管内接种 0.1 毫升不同稀释度的 (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) PR₈ 株病毒, 该病毒原液的血凝滴度为 1:640—1:1280, 待培养 24、48、72、96 小时后, 在观察前 2 小时加入 A. O. 染料, 使最终浓度为 1:400 万, 然后作镜检。

实验同时分别以正常细胞, 接种正常鸡胚尿液的细胞, 接种加热灭活病毒的细胞, 以及接种经免疫血清中和的病毒悬液的细胞作为对照。结果发现, 1:400 万 A. O. 染色的对照细胞(图 5) 其荧光图象基本上同 1:4000 万 A. O. 染色者(图 1), 仅胞浆内的细小红色颗粒较大一些, 但感染病毒的实验组细胞中出现一种特殊巨大红色荧光颗粒的细胞(图 6), 此种细胞胞浆内的巨大红色荧光颗粒含量不等, 有时每视野 (1 毫米²) 仅一个, 有时达十数个, 在细胞死亡后这种红色荧光颗粒消失。为方便起见我们称这种细胞为巨颗粒细胞, 其出现情况如表 3:

表 3 不同剂量流感病毒接种细胞后, 巨颗粒细胞出现情况

病毒剂量 培养时间(小时)	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	对 照 组
24	0—2*	偶 见	—	—
48	1—5	0—2	—	—
72	1—7	0—4	—	—
96	3—10	0—5	—	—

* 为每一视野 (1 毫米²) 中所见巨颗粒细胞数, 该视野相当于 10×42 倍所见(视野内的细胞总数平均为 100 个左右)。

如所周知, PR₈ 株病毒在鸡胚纤维母细胞上不引起明显的细胞病变, 尤其在少量病毒感染时更然。但这一见解是对用低倍光学显微镜作常规检查时适用的, 严格说来, 精细检查时有可能发现其病变的存在, 但不如一般细胞病变一样易被看出。有鉴于此, 本实验分别以光学显微镜检查经 H. E. 染色后的流感感染细胞, 并用相差显微镜观察与荧光显微镜检查 A. O. 活体染色巨颗粒细胞出现情况作比较, 并将感染病毒的细胞管取其维持液作血凝滴度测定, 比较各种方法检查的灵敏程度, 其结果如表 4:

表 4 各種方法檢出流感病毒感染比較

方 法 \ 時 間 (天)	一	二	三
一般光學顯微鏡觀察	—	—	—
光學顯微鏡加 H. E. 染色	—	±	±
相差顯微鏡觀察	—	+	+
螢光顯微鏡加 A. O. 活體染色	+	++	+++
細胞維持液血凝滴度	○	○	○
維持液傳入尿囊後血凝滴度	1:1280	1:1280	1:2560

注：感染細胞的病毒懸液為 1:640 血凝滴度的 10^{-2} 稀釋液，“+”→“+++”代表細胞病變程度，“—”為未發現病變者。

由表 4 結果看，螢光鏡法檢查最為敏感，其次為相差顯微鏡檢查。

如果將接種流感病毒細胞管的維持液，再接種雞胚尿囊，經 37℃ 二天孵育後，尿液中血凝滴度又可恢復到 1:1280，這說明在細胞培養管中有 PR₈ 株病毒的存在，然而取出的維持液立即作血凝測定，所以不能發生陽性反應，可能與病毒量較少有關。如果將含有 1:400 萬 A. O. 的維持液的流感病毒感染組，用同法將維持液傳入雞胚尿囊，二天後，尿液的血凝滴度也在 1:1280 左右，這一結果有助於說明少量 A. O. 存在時不明顯影響流感病毒的复制。

討 論

用低濃度 A. O. 染料在細胞生活狀態下進行染色，既不影响細胞的正常生活能力，又能使細胞染色，而且染料染色時所需的 pH 與正常細胞所需者相同，這點對工作很有利，加以低濃度 A. O. 不明顯影響病毒在細胞內的繁殖，因此可以作為活體染料來研究病毒與細胞的關係。相反，如將 A. O. 濃度提高到 1:400,000 以上，長期與細胞共處的條件下則細胞生長情況不良，顯然系染料對細胞的毒性作用的結果。故我們採用 1:4,000,000—1:40,000,000 之間的 A. O. 濃度作為活體染色。

如果組織培養細胞直接暴露於室溫空氣中或在藍光及紫外光的照射下，則在短時間內細胞開始變性，正常螢光活體染色的特徵——胞漿內紅色細小的螢光顆粒消失，代之以一片弥散性黃綠色染色。細胞如果處於 pH 5 的維持液環境下，螢光着色也變成弥散性黃綠色。實驗所用二種病毒（牛痘，流感），分別感染細胞後所引起的螢光着色改變也有所不同，牛痘感染組的細胞，胞漿內紅色螢光顆粒逐漸消失，在感染後期變成弥散的黃綠色螢光；流感感染組的細胞又呈另一種圖像——胞漿中出現巨大的紅色螢光顆粒，如果培養時間過久，少數細胞圓縮，此種細胞也呈黃綠色。

細胞因牛痘病毒感染所引起的黃綠色與細胞因 pH 不適合（pH 呈酸性時）所引起的黃綠色，在實驗中是不難區別的：（1）因牛痘病毒感染所致的黃綠色，系一種漸進性的過程，即從一個時間觀察各個視野下的細胞，所見並非一概全呈黃綠色，有的細胞仍有紅色顆粒，而因 pH 不適合所引起的黃綠色，幾乎所有視野下的細胞都是一致的；（2）因 pH 偏酸所致的黃綠色，不僅可從維持液中酚紅指示劑的顯黃而發現，而且還可以在調整 pH 後，再以 A. O. 染色而又顯紅色顆粒來證明。

关于引起不同螢光着色的机制問題,很值得进一步研究。我們认为这些螢光图象的改变,可以因病毒感染所引起,也可以由其他因素作用于細胞所引起,有如細胞病变一样,可以为各种不同因子所导致。但在螢光活体染色的試驗中,結合着特异性免疫血清的中和对照,就可显示其特异性。值得重視的是螢光着色改变比細胞病变更为敏感。由流感的實驗結果看,活体螢光染色法检查較一般方法为敏感。活体螢光染色法的又一价值在于細胞被不引起病变的病毒所感染时,有显示病毒的存在的可能,这一方面工作有待进一步研究。

活体螢光着色机制可能主要是通过細胞本身主动的“飲液机能”(Pinocytosis)而使 A. O. 进入細胞。若經固定剂固定細胞后以高浓度 A. O. 染色,此时細胞已失去飲液机能,染料主要是通过細胞膜的渗透作用而进入細胞。二者在染色机制上是有区别的,后者能显示胞浆內 RNA (橙紅色螢光)和核內的 DNA (綠色螢光)成分,但已不能形成类似活体螢光染色时的紅色螢光細小顆粒。我們也曾研究細胞經固定后以高浓度 A. O. 染色,观察病毒感染細胞后的 RNA 和 DNA 消长情况,結果表明想从 RNA 与 DNA 的改变中寻求早期区别病毒感染細胞与否,确是存在着一定困难,不如活体螢光染色法敏感。

用 A. O. 活体螢光染色法检查受病毒感染的細胞时,发现并非每个細胞都同时受到感染,有的細胞早,有的迟,另有一些細胞始終未发现有受到感染的迹象。这点完全符合作者^[7]利用螢光抗体法观察脑炎病毒感染細胞的結果,受染細胞的多寡取决于接种的病毒量以及受染細胞培养的时间。另外,还有一种可能,即认为此等未被发现有病毒感染迹象的細胞,实际上已有病毒感染,只是限于方法学而不能被显现而已。

小 結

1. 以 1:400 万到 1:4000 万浓度的吖啶橙螢光染料在 pH 7.2—7.8 条件下可作为活体螢光染色研究細胞与病毒的关系,既不影响細胞的存活,也不明显影响病毒的繁殖。

2. 經牛痘病毒感染的鸡胚纖維母細胞,用活体螢光染色观察,发现在早期感染时即与对照组有明显的区别。

3. 以流感 PR₈ 株病毒感染鸡胚纖維母細胞后用活体螢光染色进行观察,可发现有特殊的巨大紅色螢光顆粒的細胞。

4. 本文論述了活体螢光染色性質和可能机轉,以及其在病毒学研究中应用的可能性。

参 考 文 献

- [1] Armstrong, J. A., Niven, J. S. F.: *Nature*, **180**:1335, 1957.
- [2] Niven, J. S. F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**:84, 1959.
- [3] Loh, P. C., and Rigg, H. L.: *J. Exp. Med.*, **114**:149, 1961.
- [4] Anderson, E. S., et al.: Fluorescence microscopy: Observation of virus growth with aminoacridines, Symposium Soc. Gen. Microbiol. 9th, 224, 1959.
- [5] Rhim, J. S. et al.: *Virology*, **17**:342, 1962.
- [6] Maximovich, N. A., Petrovskaya, O. G.: *Acta, Virol.*, **6**:127, 1962.
- [7] 张礼璧、庞其方、杜信令: *中华医学杂志*, **48**: 316, 1962.

STUDIES OF VIRUS-INFECTED CELLS BY MEANS OF SUPRAVITAL FLUOROCHROME STAINING

CHANG LEE-PEE PANG CHI-FANG CHEN PING-YIUN

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

In recent years, the fluorescent dye—Acridine orange (A. O.) has been used to detect the RNA and DNA components in the cells. Moreover, it has been proved that A. O. is a vital fluorochrome. In this report, the authors employed the fluorochrome A. O. as a supravital stain to study the morphology of the virus-infected cells. The results obtained are briefly described as follows:

1. 1:4,000,000 to 1:40,000,000 dilution of A. O. solution could be used as a supravital stain at pH 7.2—7.8. This solution has neither cytotoxic effect on the chick embryo fibroblasts nor unfavorable effect on virus multiplication in these cells.

2. 1:40,000,000 A. O. was added to cultures of chick embryo fibroblasts which were infected with vaccinia virus, incubated for 24 hours at 37°C and then examined under the fluorescent microscope. The cytoplasm of the infected cells showed yellowish-green fluorescence, while the fluorescent small red granules present in normal cells disappeared.

3. Whereas in cells infected with influenza virus PR₈ strain, a different phenomenon was observed. While the small red fluorescent granules also disappeared, but instead, large red fluorescent particles were seen. This fact illustrates that in place of cytopathogenic effect, the use of A. O. supravital stain can detect the infection of influenza virus in the cells. The authors discussed the possible usefulness of this method in virological studies.