

紅血球对 Echo 6 D'Amori 毒株和脊髓灰質炎病毒的吸附及其与血凝的关系*

曾毅 王政 顧方舟

(中国医学科学院病毒学研究所,北京)

腸道病毒型別多,診斷步驟繁雜,亟需改进。血凝試驗的方法簡便,有些病毒已广泛应用,故近年来不少学者对腸道病毒的血凝性質进行了研究,发现 Echo 及 Coxsackie 病毒的某些型別具有凝集人 O 型紅血球的能力(以下簡称血凝能力),在診斷上可以应用血凝抑制試驗检查抗体及鉴定病毒^[1-4],但在应用上存在的主要問題有:(1)仍有很多型別的腸道病毒无血凝能力,如 Echo 1、2、5...; Coxsackie A 組病毒;(2)同型不同株的病毒的血凝能力有所不同,如 Echo 6 病毒的某些毒株有血凝能力, D'Amori 毒株則无血凝能力;某些 Echo 7 的毒株亦无血凝能力。因此进一步研究使无血凝能力的毒株变为有血凝能力的毒株是具有一定的理論意义及实用价值的。Maurseth 等^[5]报告在原代人羊膜細胞上传代病毒时,每代均用紅血球吸附处理后再連續传代,可以使无血凝能力的 Echo 6 D'Amori 毒株变为有血凝能力的毒株。Jungeblut 等^[6,7]曾报告脊髓灰質炎病毒(以下簡称 Polio 病毒)能吸附在人 O 型紅血球上。一般认为病毒吸附在紅血球上是血凝的先决条件^[8]。因此,我們试图采用 Maurseth 等的方法,使无血凝能力的 Polio 病毒变为有血凝能力的病毒,但实验获得阴性結果。进一步我們重复了 Maurseth 等的实验,获得与該作者基本上相似的結果,即能使无血凝能力的 D'Amori 毒株变为有血凝能力的毒株,但亦有不同之处,并有一些新的发现。现将結果报告如下。

材料及方法

細胞 所使用的細胞为原代人胚胎腎細胞(簡称原代人腎細胞)和原代人羊膜細胞,培养液为含 10—15% 小牛血清的 0.5% 水解乳蛋白 Hank's 溶液,維持液为 199。

病毒 Polio 病毒为 I 型的 Mahoney 标准毒株。Echo 6 病毒为 D'Amori 毒株。实验前用标准免疫血清作中和試驗鉴定。

紅血球 为人臍帶紅血球^[1]。

磷酸緩冲液(PBS) pH 为 7.2,作洗滌紅血球、血凝試驗和血凝抑制試驗的稀释液用。

血凝試驗 病毒悬液由 1:2 开始作倍比稀释,每管为 0.5 毫升,加 1% 的紅血球 0.1 毫升,混匀,放 4 °C, 2 小时后观察結果。能使紅血球凝集的最高稀释度即为該病毒的血凝滴度,1:2 仍无血凝現象者,表示該病毒无血凝能力。

血凝抑制試驗 用于鉴定病毒。将标准免疫血清作倍比稀释(血清的血凝抑制滴度为 1:640), 0.25 毫升的免疫血清加 0.25 毫升含 4 个血凝单位的病毒,放室溫一小时后加 1% 的紅血球 0.1 毫升,放

* 本文曾在中国微生物学会 1963 年年会遗传变异組上宣讀。

本文 1964 年 9 月 22 日收到。

4 °C、2 小时后观察结果。

紅血球吸附連續传代法 本实验方法与 Maurseth 等^[5]的方法同, 简述如下: 病毒悬液經每分鐘 3000 轉的速度离心沉淀 10 分钟, 吸取上清液。1.0 毫升的病毒悬液加 9.0 毫升 5% 的紅血球 PBS 悬液(即含 0.45 毫升的紅血球), 放 4 °C 1 小时, 每 10 分钟搖动一次, 然后用 PBS 洗滌紅血球, 每次 10 毫升, 共 5 次。将洗滌过的紅血球溶于 50 毫升的双蒸水中, 再加入 10 倍浓缩的 Hank's 溶液使成等渗, 病毒最后的稀释度为原来的 10^{-2} 。用此病毒悬液传代, 并滴定其病毒滴度, 此即为紅血球吸附的病毒量。吸去原代人腎細胞的生长液, 加入 1.0 毫升經紅血球吸附再释放的病毒悬液, 放 37 °C 1 小时, 然后吸去病毒悬液, 換以 1.0 毫升 199 溶液。細胞多在第二天全部破坏, 收获后放 -20 °C 保存。测定病毒的血凝滴度及一定代数的病毒滴度。再以同法經紅血球吸附传代。将不經紅血球吸附的病毒原液稀释成 10^{-3} 在原代人腎細胞連續传代以作对照。

結 果

(一) 紅血球对 Echo 6 D'Amori 毒株的吸附及其与血凝的关系

1. 經紅血球吸附及未經紅血球吸附的 D'Amori 毒株分別在原代人腎細胞及原代人羊膜細胞連續传代的情况

由于人胚胎来源較容易, 原代人腎組織培养的制备較原代人羊膜細胞容易成功, 故我們采用原代人腎細胞作实验。实验結果见图 1, 經紅血球吸附的 D'Amori 毒株在第 3 代就出現血凝, 血凝滴度为 1:4, 在第 6、7 代血凝滴度为 1:16。但在对照实验中, 未經紅血球吸附传代的病毒在第 4 代亦出現血凝, 以后血凝滴度逐漸升高, 至第 7 代为 1:16。已变为有血凝能力的毒株用血凝抑制試驗鉴定属于 Echo 6 病毒。此結果与 Maurseth 等^[5]在原代人羊膜細胞传代的结果不同。从本实验的结果看来, 不能証明无血凝能力的 D'Amori 毒株变为有血凝能力的毒株是由于經紅血球吸附传代的结果。

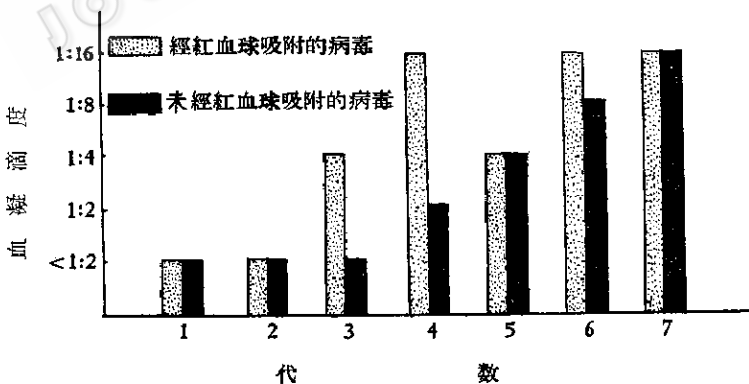


图 1 經紅血球吸附及未經紅血球吸附的 D'Amori 毒株在原代人腎細胞連續传代的血凝滴度的比較。

考虑到上述結果可能是所采用的細胞不同, 故进一步用原代人羊膜細胞重复本实验。实验結果与 Maurseth 等^[5]的报告相符(图 2)。經紅血球吸附在原代人羊膜細胞連續传代的 D'Amori 毒株, 在第 5 代出現血凝, 其滴度为 1:4, 在第 8、9 代为 1:8, 而在对照实验中, 未經紅血球吸附的病毒則从未出現血凝。

2. 紅血球吸附的病毒量及其与血凝的关系

用原代人腎細胞滴定原代病毒及經紅血球吸附并在原代人腎細胞上传代的第 1、3、7

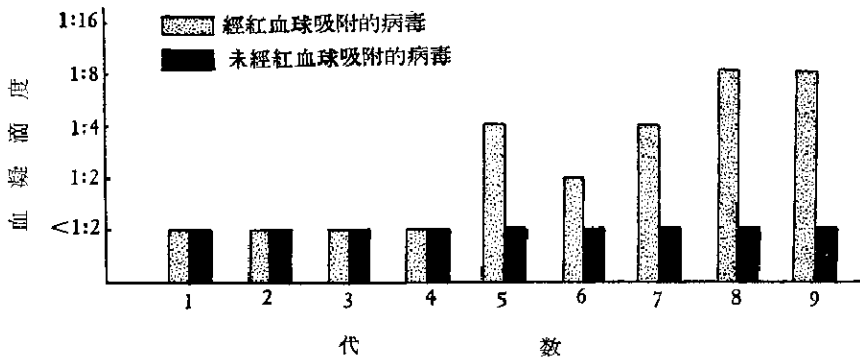


图 2 經紅血球吸附及未經紅血球吸附的 D'Amori 毒株在原代人羊膜細胞連續傳代的血凝滴度的比較。

代的病毒吸附于紅血球上的病毒量,并測定其血凝滴度。实验結果見表 1。D'Amori 毒株原代及經紅血球吸附傳代的第 1、3、7 代的病毒吸附于紅血球上的病毒量相似,为 30—50%,原代及第 1 代的病毒无血凝能力,而第 3、7 代的病毒已变为有血凝能力的毒株。由此看来,吸附于紅血球上的病毒量与血凝的出現无关。

表 1 經紅血球吸附連續傳代的 Echo 6 D'Amori 毒株吸附于紅血球上的病毒量及其与血凝的关系

病 毒		原 代 病 毒	經 紅 血 球 吸 附 傳 代 的 病 毒		
			1 代	3 代	7 代
病毒滴度	原液	6.25*	7.50	7.50	7.30
	紅血球吸附的病毒量	5.75	7.00	7.25	6.75
	紅血球吸附的病毒量的%	30%	30%	50%	30%
血 凝 滴 度		—	—	1:4	1:16

* log₁₀ TCID₅₀/0.1 毫升。

3. 应用大量紅血球吸附 D'Amori 毒株以分离有血凝能力及无血凝能力的病毒顆粒

將 D'Amori 毒株在原代人腎細胞傳至第 5 代及第 10 代的病毒懸液 1.0 毫升分別加 9.0 毫升 PBS, 再加 5.0 毫升紅血球, 放 4 °C 1 小时, 每 10 分鐘搖动一次。紅血球吸附病毒后的洗滌、溶解等方法与紅血球吸附傳代的方法相同。此部分病毒为紅血球吸附的病毒。然后将吸附前的病毒原液、吸附后的上清液和紅血球吸附的病毒分別用原代人腎細胞滴定病毒滴度, 每管接种 0.1 毫升, 每个稀釋度接种 4 管, 稀釋度为 10⁻¹—10⁻⁸。待細胞产生病变后收获, 放 -20 °C 保存。分別測定不同稀釋度产生病变的病毒懸液的血凝滴度。实验結果見图 3、图 4。第 5 代病毒原液的血凝滴度为 8.0 log TCID₅₀/0.1 毫升, 10⁻¹—10⁻⁷ 的病毒能产生血凝, 而 10⁻⁸ 无血凝; 紅血球吸附的病毒滴度为 7.5 log TCID₅₀/0.1 毫升, 10⁻²—10⁻⁷ 全部均有血凝; 紅血球吸附后, 上清液的血凝滴度为 6.0 log TCID₅₀/0.1 毫升, 全部为血凝阴性。第 10 代病毒原液的血凝滴度为 8.0 log TCID₅₀/0.1 毫升, 紅血球吸附的病毒滴度为 7.5 log TCID₅₀/0.1 毫升, 紅血球吸附后上清液的血凝滴度为 5.5 log TCID₅₀/0.1 毫升, 此三部分病毒均为血凝阳性, 其血凝滴度較第 5 代病毒的血凝滴度高。第 5 代病毒原液的 10⁻¹—10⁻⁷ 的病毒有血凝, 10⁻⁸ 无血凝, 表示第 5 代病毒可能含有有

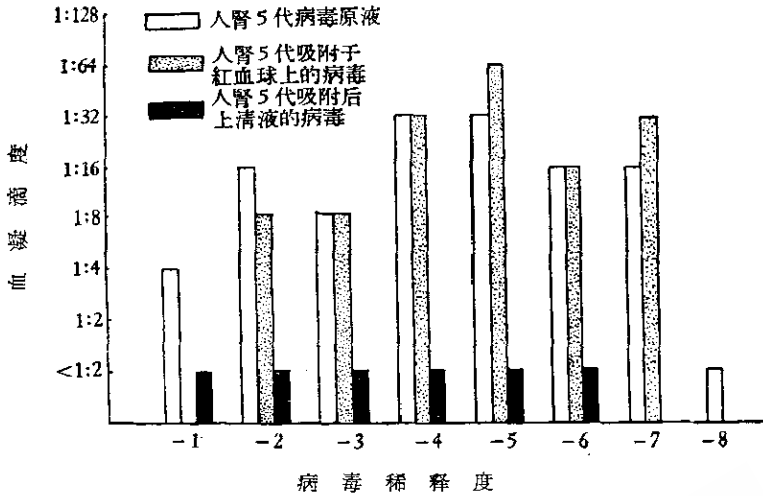


图3 D'Amori 毒株人肾第五代原液、吸附于红血球的及吸附后上清液的不同稀释度的病毒在原代人肾细胞培养的血凝滴度的比较。

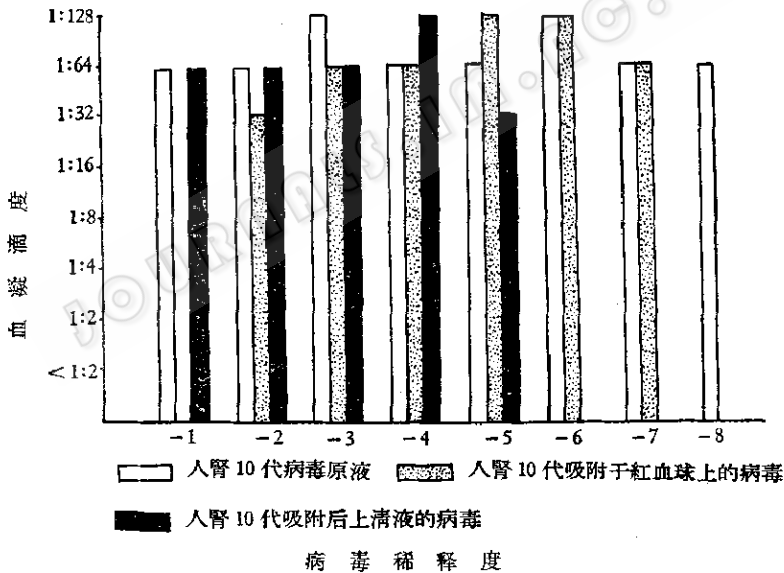


图4 D'Amori 毒株人肾10代原液、吸附于红血球的及吸附后上清液的不同稀释度的病毒在原代人肾细胞培养的血凝滴度的比较。

血凝能力及无血凝能力的二种病毒颗粒， 10^{-8} 相当于病毒的终末稀释度，只有占最多数的病毒颗粒才能在终末稀释度表现出来，故第5代病毒大部分仍为无血凝能力的病毒颗粒，但已有相当多的有血凝能力的病毒颗粒可以产生血凝，其血凝滴度较低（如 10^{-1} 病毒的血凝滴度为1:4）。此时用大量红血球吸附，可以将有血凝能力及无血凝能力的病毒颗粒分开。第10代的病毒已全部的或绝大部分的变为有血凝能力的病毒颗粒，故用大量红血球吸附一次，不能将有血凝能力及无血凝能力的病毒颗粒分开。

(二) 红血球对 Polio 病毒的吸附及其与血凝的关系

本实验所采用的方法与红血球吸附 D'Amori 毒株的方法完全相同。实验结果见表

2, Polio 病毒經紅血球吸附, 并在原代人腎細胞傳了 10 代, 均不能获得具有血凝能力的病毒, 而紅血球吸附的病毒量为 5—10%, 并不因吸附傳代的次数增加而有所增加。

表 2 經紅血球吸附連續傳代的 Polio 病毒吸附于紅血球上的病毒量及其与血凝的关系

病 毒		原 代 病 毒	經 紅 血 球 吸 附 傳 代 的 病 毒		
			1 代	7 代	10 代
病毒滴度	原液	6.75*	5.50	7.00	6.50
	紅血球吸附的病毒量	5.50	4.20	6.00	5.50
	紅血球吸附的病毒量的%	5.6%	5%	10%	10%
血 凝 滴 度		—	—	—	—

* $\log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1$ 毫升。

进一步的实验将吸附每毫升病毒的紅血球量由 0.45 毫升改为 0.002 毫升, 吸附的时间由 1 小时改为 10—15 分钟, 共傳了 14 代, 也未能获得具有血凝能力的毒株, 紅血球吸附的病毒量为 0.022—0.1%。

討 論

Maurseth 等^[5]报告紅血球对无血凝能力的 D'Amori 毒株的吸附量小于 1%, 随着紅血球吸附并在原代人羊膜細胞傳代的次数增加, 紅血球吸附的病毒量亦随之增加, 在第 6 代出現血凝时, 紅血球吸附的病毒量增加至 25%。本实验的结果亦证实无血凝能力的 D'Amori 毒株經紅血球吸附并在原代人羊膜細胞上傳代, 确实能变为具有血凝能力的毒株。但所不同的是紅血球吸附无血凝能力及有血凝能力的 D'Amori 毒株的病毒量无甚差别, 均为 30—50%。紅血球对 Polio 病毒的吸附量为 5—10%, 同样地并不因吸附傳代而增加。

从本实验结果看来, D'Amori 毒株可能是有血凝能力及无血凝能力的病毒顆粒的混合毒株, 但有血凝能力的病毒顆粒很少, 这两种病毒顆粒在原代人羊膜細胞上都能同样地繁殖, 因有血凝能力的病毒顆粒总是相对地占极少数, 故表现为血凝阴性。經紅血球吸附并在原代人羊膜細胞上傳代后, 有血凝能力的病毒顆粒似能优先吸附在紅血球上, 故它能屢代增加, 终于使无血凝能力的 D'Amori 毒株变为有血凝能力的毒株, 而且应用大量紅血球吸附含一定比例的有血凝能力及无血凝能力的病毒顆粒时 (如原代人腎第 5 代病毒), 能将此两种病毒顆粒分开。此外, 本实验亦发现 D'Amori 毒株不經紅血球吸附, 在原代人腎細胞連續傳代, 亦能使无血凝能力的毒株变为有血凝能力的毒株, 这可能是原代人腎細胞有利于有血凝能力的病毒顆粒繁殖, 其繁殖速度較无血凝能力的病毒顆粒快, 故連續傳代后, 有血凝能力的病毒顆粒屢代增加, 终于成为有血凝能力的毒株。关于細胞对 D'Amori 毒株的血凝能力改变的影响, 有必要作进一步的研究, 研究结果将于另文报告。

至于 Polio 病毒經紅血球吸附傳代何以不能成为有血凝能力的病毒呢? 这可能是 Polio 病毒的血凝条件与 Echo 病毒有所不同, 采用 Echo 病毒的血凝条件不能显示出 Polio 病毒的血凝现象; 亦可能是 Polio 病毒确实是无血凝能力。此外, 其他无血凝能力

的 Echo 病毒, 是否可以用紅血球吸附传代的方法而获得有血凝能力的病毒呢? 这是值得进一步研究的问题。

总 结

1. 无血凝能力的 Echo 6 D'Amori 毒株經紅血球吸附, 并在原代人羊膜細胞上連續传代之后, 可以变为有血凝能力的毒株。紅血球对有血凝能力及无血凝能力的病毒吸附的病毒量相似, 但有血凝能力的病毒顆粒似能优先吸附在紅血球上。应用大量紅血球吸附 D'Amori 毒株, 可以将有血凝能力及无血凝能力的病毒顆粒分开。

2. 无血凝能力的 Echo 6 D'Amori 毒株不經紅血球吸附, 在原代人腎細胞連續传代, 亦能变为有血凝能力的毒株。

3. 无血凝能力的 Polio 病毒經紅血球吸附, 并在原代人腎細胞連續传代, 不能变为有血凝能力的病毒。

参 考 文 献

- [1] 曾毅, 王政: 中华医学杂志, 50:85, 1964.
- [2] Schmidt, J. et al.: *Amer. J. Hyg.*, 75:74, 1962.
- [3] Busscl, R. H. et al.: *J. Immunol.*, 84:47, 1962.
- [4] Rosen, L., Keen, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107:626, 1961.
- [5] Maurseth, A. et al.: *Acta pathol. et microbiol. Scandinav.*, 50:444, 1960.
- [6] Jungeblut, C. W. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83:249, 1953.
- [7] Jungeblut, C. W. et al.: *J. Pediat.*, 44:28, 1954.
- [8] Anderson, S. G.: *The Virus*, 3:21, Edited by Burnet, F. M. and Stanley, W. M., Academic Press, New York London, 1959.

ADSORPTION OF ECHO 6 D'AMORIS STRAIN AND POLIOVIRUS ONTO ERYTHROCYTES AND ITS RELATION WITH HEMAGGLUTINATION

TSENG YI, WANG CHENG AND KU FANG-CHOU

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

When the Echo 6 D'Amoris strain, which originally did not possess the hemagglutinating capacity, absorbed onto human erythrocytes and eluted from them, was cultivated in primary human amniotic cell cultures, and this procedure was carried out repeatedly, a hemagglutinating variant of D'Amoris strain was obtained. The virus concentration of both hemagglutinating and non-hemagglutinating strain eluted from erythrocytes was similar, but it seems that the virus particles with the hemagglutinating capacity were adsorbed preferentially onto the erythrocytes. Thus, by the method of adsorption and elution, the virus particles with or without the hemagglutinating capacity could be separated. By the same method we failed to obtain a strain of poliovirus with hemagglutinating capacity. A hemagglutinating variant could also be obtained when the non-hemagglutinating D'Amoris strain was serially cultivated in primary human embryonic kidney cell cultures.