

ECHO 病毒的研究

1. 不同细胞对 ECHO 3、7、11、13、19 的敏感性*

楊利昌 吳安然

(中国医学科学院北京协和医院检验科)

腸道病毒的种类繁多,目前已确定的共有 61 型,其中包括脊髓前灰白质炎病毒(共 3 型),Coxsackie 病毒(共 30 型)及 ECHO 病毒(共 28 型)。ECHO 病毒对人的致病性尚未完全清楚,但已証明有很多型别与人类疾病有关,其中包括无菌性脑膜炎,夏季发疹,麻痺症及婴儿腹瀉等。动物和鸡胚对 ECHO 病毒都不敏感,組織培养是唯一可用的方法,不同型别的 ECHO 病毒对各种细胞的敏感性亦有所不同。

目前培养 ECHO 病毒主要采用猴肾(恆河猴及爪哇猴)细胞及人胚肾细胞^[1-3]。鉴于猴肾细胞来源较困难,成本高,而人胚肾细胞来源也有限,为了寻找其他对 ECHO 病毒敏感的细胞,我们除使用人胚肾外,还选择了 2 种较易获得的原代细胞(人胚肌皮和人羊膜)及两种传代细胞(MERN 和 HeLa),测定其对 5 型有血凝性能的 ECHO 病毒(ECHO 3、7、11、13、19)的敏感性。Kifrick 等^[4]曾报告人皮肤肌肉细胞及子宫细胞对某些 ECHO 病毒敏感。大部分作者认为羊膜细胞对 ECHO 病毒是敏感的^[5-8],而有一些作者报告它不适用于分离 ECHO 9 和 18 型病毒^[9,10]。许多作者认为 HeLa 细胞对 ECHO 病毒的敏感性很差^[8,9,11]。有关 MERN 细胞对 ECHO 病毒敏感性的材料仅有毛氏等^[12]报告的一篇认为它是敏感的,本文报导上述 5 种细胞对 ECHO 3、7、11、13、19 病毒敏感性测定的比较研究。

材料与 方法

1. 细胞培养 使用的细胞计有:人胚肾,人胎盘羊膜,人胚肌皮,传代人胚肾(MERN 株¹⁾)及 HeLa 细胞,培养于链霉素小瓶中,方法总结于表 1。

2. 病毒的传代和滴定 ECHO 3、7、11、13、19 等 5 型毒株¹⁾,均为原代人胚肾细胞组织培养液。取来后曾在本实验室用原代人胚肾单层细胞传代数次,最后感染 50 毫升药瓶培养的原代人胚肾细胞,在 36°C 培养 48—72 小时,当细胞全破坏后置低温冰冻(-25°C)及室温溶化 1 次,分装小瓶低温冰冻保存。其 TCID₅₀ 分别为: ECHO 3, 6.5; ECHO 7, 6.5; ECHO 11, 8.5; ECHO 13, 7.5; ECHO 19, 8.5。

病毒的传代: 细胞长成单层后,吸去旧营养液加入 0.9 毫升维持液,再接种 0.1 毫升 10⁻¹ 的病毒悬液,每份标本 3 瓶,置 36°C 培养,每天用低倍显微镜观察细胞病变。出现严重破坏时收集培养液,冰

* 本实验室崔维庆、王美芳以及中国医科大学微生物教研室赵玉兰同志等参加了部分工作。
本文 1963 年 6 月 14 日收到。

1) 承蒙本院病毒所赠给人胚肾传代细胞(MERN)及 ECHO 病毒,敬致谢忱。

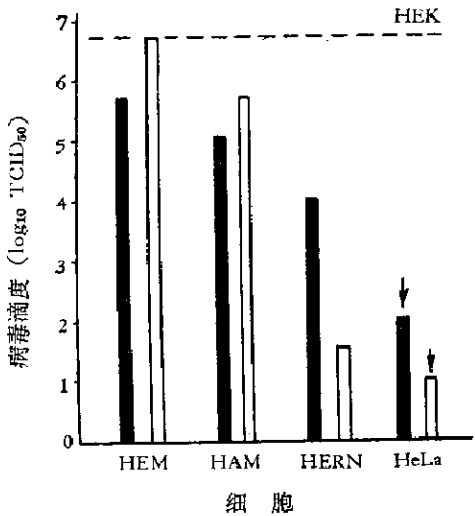


图 1a ECHO 3

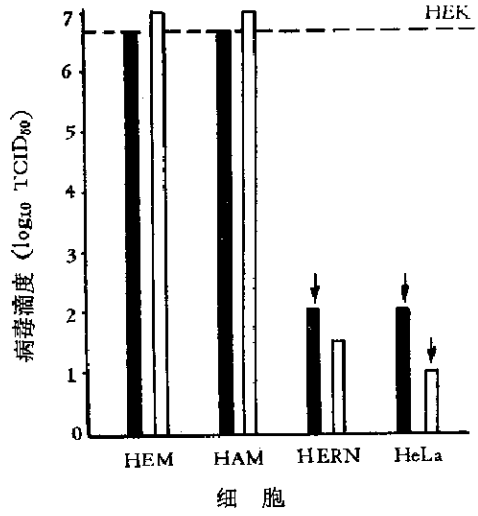


图 1b ECHO 7

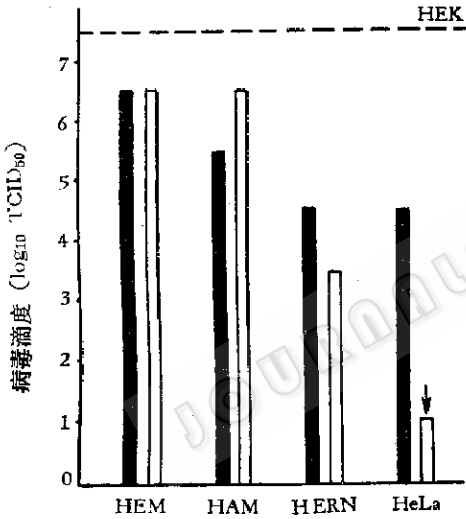


图 1c ECHO 11

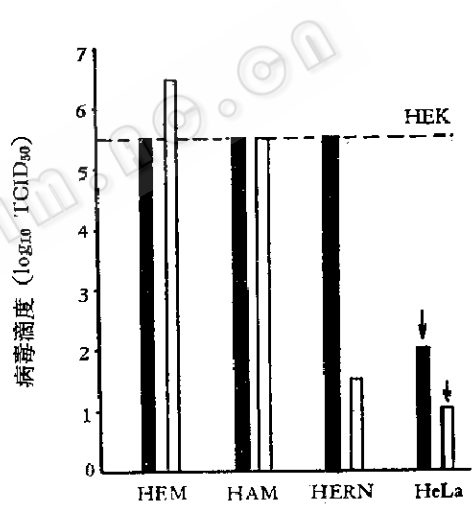


图 1d ECHO 13

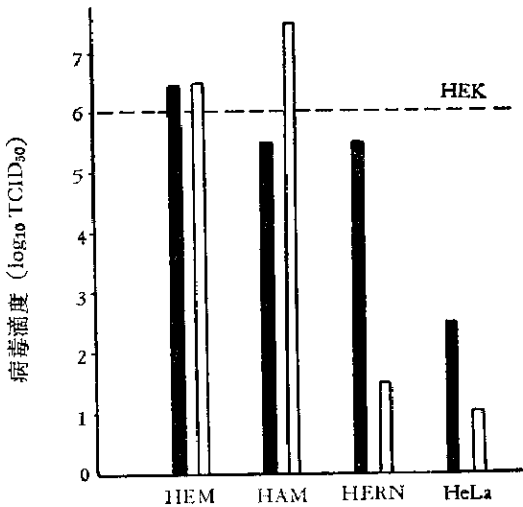


图 1e ECHO 19

注: ----- : 原代人胚肾细胞中传代的结果;
 ■ : 在原代人胚肾细胞中滴定的结果;
 □ : 本细胞中滴定的结果;
 ↓ : 表示病毒滴度“<”的意思;

HEK: 原代人胚肾细胞传代材料;
 HEM: 原代人胚肌皮细胞传代材料;
 HAM: 原代人羊膜细胞传代材料;
 MERN: 传代人胚肾细胞传代材料;
 HeLa: HeLa 细胞中传代材料。

图 1 ECHO 3, 7, 11, 13, 19 在 5 种细胞传代后在本细胞及人胚肾细胞滴定结果

表1 细胞培养总结表

细 胞		人胚肾	人胚肌皮	人胎盘羊膜	MERN	HeLa
胚 龄		3 个月以上	3 个月以下			
消 化 方 法	消 化 液	0.25% 胰酶	0.25% 胰酶	0.25% 胰酶	0.02% Versene	0.02% Versene
	温 度	37°C 水箱	37°C 水箱	37°C 水箱	室 温	室 温
	时 间	10—20 分钟	30 分钟	4 小时	10 分钟	10 分钟
	次 数	多 次	1 次	1 次	1 次	1 次
	过 滤 与 否 洗 涤 次 数	过 滤 或 不 1 次	过 滤 1 次	过 滤 1 次	不 —	不 —
接 种 量(小瓶)		30—40万/0.5 —0.7毫升	70—100万/0.5 —0.7毫升	30—40万/0.5 —0.7毫升	9—10万/0.5 —0.7毫升	9—10万/0.5 —0.7毫升
培 养 液	牛 血 清(%)	15	3—5	20	20	20
	0.5%乳蛋白水解物 (Hanks 液配成,%)	85	97—95	80	80	80
pH		7.6	7.4	7.4—7.6	7.4—7.6	7.4—7.6
换 液 时 间 (天)		2	不 换	2—3	不 换	不 换
长 成 单 层 时 间(天)		4—5	2—3	5—7	2—3	2—3
维 持 液	牛 血 清(%)	2	2	2	2	2
	199(%)	49	49	49	49	49
	0.5%乳蛋白水解物 (Hanks 液配成,%)	49	49	49	49	49
	pH	7.8—8.0	7.6—7.8	7.6—7.8	7.8—8.0	7.8—8.0
维 持 时 间 (天)		7—10	7—10	10—15	5—7	5—7
形 态		上 皮 细 胞	成 纤 维 细 胞	上 皮 细 胞	上 皮 细 胞	上 皮 细 胞

注: 1. 牛血清为混合牛血清;

2. 培养液及维持液每毫升均含 100 单位青霉素及 100 γ 链霉素;

3. 如维持液 pH 降低可加入适量的 NaHCO_3 调节。

冻融化 1 次后稀释为 10^{-1} 接种 0.1 毫升于下一代细胞, 如果感染的细胞不产生明显的破坏则观察到 6—7 天后按上述方法处理传代, 如此连续传 4 代。每代收集的培养液均作血凝效价的测定, 最后一代的感染细胞培养液除测定血凝效价外, 并测定其在本细胞及原代人胚肾细胞的 TCID₅₀。

病毒滴定: 用维持液将感染细胞培养液作 10 倍递增稀释, 每个稀释度接种细胞 2—3 瓶, 每瓶 0.1 毫升, 另加维持液 0.9 毫升。细胞对照管不接种病毒或接种正常组织培养液, 每天观察细胞病变至第 7 天, 按 Read-Muench 二氏公式计算 TCID₅₀。

3. 血球凝集试验^[13-15]

血球: 收集本院血库献血者“O”型血球。全血按 1:5 之比例保存于 Aisever 氏溶液, 置 4°C 约可保存 3 周。使用前以 0.85% 生理盐水 (pH 7.0) 洗 3 次, 配成 1% 血球悬液。

血凝素的测定: 在凹孔塑料板中进行, 每孔加入以生理盐水 2 倍稀释的组织培养液 0.4 毫升, 然后加入 0.2 毫升上述 1% “O”型血球悬液, 振荡后置 36°C 孵育 45—60 分钟, 取出置室温 (20°—25°C) 15—20 分钟, 记录结果。以最高稀释度仍出现“卅”凝集者作为终点。

结 果 和 讨 论

1. 5 型 ECHO 病毒在 5 种组织培养细胞传代后病毒滴度改变的情况 ECHO 3、

7、11、13、19 型病毒在原代人胚腎細胞, 人胚肌皮細胞, 人胎盤羊膜細胞, MERN 細胞及 HeLa 細胞等傳 4 代後, 于原代人胚腎細胞及本細胞中滴定病毒的毒力, 其結果見圖 1a-e。

實驗結果表明: 經原代人胚腎細胞, 人胚肌皮細胞及人羊膜細胞傳 4 代後, 其毒力無論在本細胞或原代人胚腎細胞中滴定均無顯著的差別。但是通過 MERN 細胞及 HeLa 細胞傳代後, 毒力却有明顯的降低。

由于本實驗未作第 1 代本細胞滴定, 故不能與第 4 代本細胞滴定的結果比較, 因此未能肯定經 4 次傳代後其在本細胞中之 $TCID_{50}$ 是否升高或降低。

根據上述結果說明, 本實驗所用 3 種原代細胞對 ECHO 3、7、11、13、19 五型病毒的敏感性相差不大, 原代人胚腎細胞似較敏感, 但也有例外, 如對 ECHO 7 來說原代人胚肌皮細胞與原代人羊膜細胞要比它高 0.5 個對數, ECHO 13 在原代人胚肌皮細胞的滴度比它高 1 個對數, ECHO 19 在原代人羊膜細胞的滴度比其高 1.5 個對數。總的看來, 原代人胚肌皮細胞對此 5 型 ECHO 病毒的敏感性介於原代人胚腎與原代人羊膜細胞之間, 且滴度一般也比較高。這 3 種敏感性差異不大的細胞, 對於製備 ECHO 病毒免疫抗體帶來一定的方便, 可採用其中的 1 種細胞製備免疫原, 另 1 種細胞用於免疫抗體的測定, 這樣可能減少非特异性組織抗體的作用。

實驗結果也証實了許多學者的觀察^[4-6], 即除了原代人胚腎以外, 原代人胚肌皮細胞及原代人羊膜細胞對大多數型別的 ECHO 病毒是敏感的。因而可以考慮採用此兩種原代細胞進行 ECHO 病毒的分離工作。

在後兩種細胞中, 經 MERN 細胞傳 4 代後滴定, 除 ECHO 11 達 3.5 以外, 其餘 4 型的病毒毒力幾乎消失, 但在人胚腎細胞中滴定除 ECHO 7 型外, 其餘 4 型均達 4.0 以上, 甚至和前 3 種原代細胞的滴度相同 (ECHO 13)。說明此 4 型 ECHO 病毒雖然在 MERN 細胞中病變表現的不明顯, 但病毒仍能繁殖, 因經過 4 次傳代後, 原始病毒液已被稀釋 10000 萬倍, 在原代人胚腎細胞中滴定 $TCID_{50}$ 仍達 4.0 以上。毛氏等^[12]最近報告 MERN 株細胞在體外傳 38 代仍保持與原代人胚腎相似的腸道病毒敏感範圍, 其中也包括了本實驗所採用的 5 個型別的 ECHO 病毒 (本實驗所用的 5 型 ECHO 病毒與毛氏等所採用者同)。這種不同的結果, 可能和毛氏等未進行連續傳代有關, 而是將感染各型 ECHO 病毒的猴腎細胞組織培養材料感染 MERN 細胞第 1 代的結果。根據該文中報導 ECHO 1 型病毒感染 24 小時, 即出現了明顯的細胞病變, 到第 4 天滴度已達高峯。本實驗所用 ECHO 病毒感染 MERN 細胞後, 自第 1 代開始細胞病變的發展即很遲緩, 一般在感染後第 5 天才出現, 且到第 6—7 天仍未能破壞全部細胞, 這可能是由於細胞在不同實驗室長期傳代後 (本實驗用的 MERN 細胞為第 85—135 代) 對病毒的敏感性起了改變。此種現象在文獻中^[16-19]還不是少見的。說明體外傳代細胞會改變其對病毒的敏感性, 應該引起重視。上述 5 型 ECHO 病毒經 HeLa 細胞傳 4 代後, 除 ECHO 11 及 ECHO 19 在原代人胚腎細胞中滴定, $TCID_{50}$ 達 4.5 及 2.5 外, 其餘 3 型無論在原代人胚腎和本細胞中滴定时均為陰性。說明 HeLa 細胞對上述 5 型病毒不敏感。同時應該指出如果用濃的病毒懸液感染 HeLa 細胞, 適當延長細胞的維持時間至 8—10 天仍可見 ECHO 11 對 HeLa 細胞較明顯的破壞作用。按 Archetti 等^[11]報告, HeLa 細胞對 ECHO 病毒不太敏感, 不適于病

毒分离,但是在适应过程中,所試 1—13 型 ECHO 病毒,其中除 ECHO 4 外,其余 12 个型別經传代 5 次后均能适应于 HeLa 細胞,只是滴度有所降低。Faulkner 氏等^[9]用猴腎細胞由病毒性脑膜炎患者材料中分离出 ECHO 9 型病毒,但用 HeLa 及人羊膜細胞却未获得阳性結果。Stulberg 氏等^[19]以 ECHO 1—16 型病毒在 HeLa 細胞传 3 代以后,有 9 型 (ECHO 2、4、5、9、11、13、14、15、16) 呈阴性,其余 7 个型別毒力均有所降低或明显下降。

总之,应用传代細胞时必需注意細胞敏感性的改变,細胞形态的改变往往导致細胞敏感性的改变。据 Zakstelskaya 氏等^[17]的报告认为細胞敏感性的降低与細胞中梭形上皮細胞的減少是平行的。Stulberg 氏等^[19]也发现 1 株人皮肤纖維样細胞 (Dt-196, Fb-L 株) 原来对 16 个型別的 ECHO 病毒中的 15 个型別敏感,但从这株細胞传出的上皮样細胞 (Dt-196 Ep-L 株) 却对所有 16 个型別的疾病不敏感。本实验所用的 MERN 細胞,以多角形上皮細胞占优势,与毛氏使用时的細胞形态上无明显差别。Beeuwkes 氏^[6]发现第 4 代人羊膜細胞失去对 ECHO 9 的敏感性,此失去敏感性的細胞,其細胞化学也起了改变,原来苏丹反应 (Sudan Reaction) 为強阳性的变成弱阳性。因此, MERN 株細胞对 ECHO 病毒敏感性的改变,虽未伴有形态学的改变,但是否在細胞化学及細胞代謝方面有所改变,此点本实验未做深入探討。

2. 5 个型別的 ECHO 病毒在 5 种細胞传代的血凝实验結果表 2 說明 ECHO 3、7、11、13、19 型病毒在 5 种細胞中传 4 代,每代的血凝情况。可看出上述病毒在人胚腎細胞,人胚肌皮細胞和人羊膜細胞中传代后均能产生血凝素。但在 MERN 或 HeLa 細胞传代后,自第 1 代开始便失去了血凝的能力。每代的血凝結果有的波动較大,可能是由于 ECHO 病毒的血凝条件与血凝素产生的影响因素較多^[20,21]所致,这一方面有待进一步的研究。

表 2 5 型 ECHO 病毒在 5 种組織培养細胞传代的血凝的比較

ECHO 病毒	代数	原代人胚腎細胞	原代人胚肌皮細胞	原代人羊膜細胞	MERN 細胞	HeLa 細胞
3	1	32 [△]	<4	32	—	—
	2	128	64	<4	—	—
	3	128	128	16	—	—
	4	128	64	32	—	—
7	1	64	64	32	—	—
	2	256	128	<4	—	—
	3	256	256	256	—	—
	4	512	256	256	—	—
11	1	64	<4	8	—	—
	2	64	16	<4	—	—
	3	128	32	32	—	—
	4	128	64	32	—	—
13	1	128	<4	64	—	—
	2	512	64	<4	—	—
	3	512	512	64	—	—
	4	512	256	64	—	—
19	1	128	128	64	—	—
	2	256	128	128	—	—
	3	512	64	256	—	—
	4	512	128	128	—	—

“△” 血凝滴度的倒数; “—” 表示 1:2 时仍为阴性。

小 结

ECHO 3、7、11、13、19 型病毒在人胚肾细胞、人胚肌皮细胞、人羊膜细胞、MERN 细胞及 HeLa 细胞传 4 代后,证实前 3 种细胞敏感并能产生血凝素,后 2 种细胞敏感性稍差。本实验发现 MERN 株细胞改变了其对 ECHO 病毒的敏感性,对此并进行了讨论。对人羊膜细胞及人胚肌皮细胞用来进行分离 ECHO 病毒的可能性也加以讨论。

参 考 文 献

- [1] Committee on the ECHO viruses: *Science*, **122**:1187, 1955.
- [2] Romos, M. and Sabin, A. B.: *Am. J. Pub. Health.*, **46**:295, 1956.
- [3] Romos, M. and Sabin, A. B.: *J. A. M. A.*, **167**:147, 1958.
- [4] Kifrich, S. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **67**:311, 1957.
- [5] Labelle, O.: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **40**:436, 1957.
- [6] Bernkoff, H. and Rosins, A.: *Am. J. Path.*, **36**:1215, 1957.
- [7] Melean, O. M. and Melnick, J. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**:656, 1957.
- [8] Lehmann-Grube, F.: *Arch. fur gesamte virusforschung.*, **11**:276, 1961.
- [9] Faulkner, E. S. et al.: *Canad. M. A. J.*, **77**:439, 1957.
- [10] Eichenwald, H. F. et al.: *J. A. M. A.*, **166**:1563, 1958.
- [11] Archetti, I. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**:265, 1957.
- [12] 毛江森等: *微生物学报*, **9**: 42, 1963.
- [13] Labelle, O.: *Virology*, **5**:110, 1958.
- [14] Rosen, L.: *Am. J. Hyg.*, **71**:242, 1960.
- [15] Rosen, L. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**:626, 1961.
- [16] Becuwkes, H.: *Antonie van Leeuwenhoek* (Journal of Microbiology and Serology), **26**:311, 1960.
- [17] Zakstelskaya, J. YA and Fan I-lan.: *Acta Virologica*, **6**:214, 1962.
- [18] Li, C. P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**:265, 1957.
- [19] Stulberg, C. S. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97**:355, 1958.
- [20] Bussell, R. H. et al.: *J. Immunol.*, **88**:39, 1963.
- [21] Podoplekin, V. D.: *Acta Virologica*, **7**:131, 1963.

STUDIES OF ECHO VIRUS

I. SENSITIVITY OF DIFFERENT CELLS TO ECHO VIRUSES

YANG LEE-CHANG AND WU AN-JAN

(Department of Clinical Laboratory, Peking Union Hospital, Peking)

The comparative susceptibility of 5 tissue culture cells, including 3 primary human embryonic cells (kidney; skin muscle; amnion) and 2 human cell lines (MERN and HeLa) to 5 types (3, 7, 11, 13, 19) of ECHO virus was studied.

After 4 serial passages in each of the 5 tissue culture cells, the TCID₅₀ was determined. It was found that the human embryonic skin muscle cells and human amnion cells were as sensitive as the human embryonic kidney cells to the 5 types of ECHO virus tested, while MERN and HeLa cells were less sensitive. Haemagglutinin titer of cell culture fluid, of each virus passage was also determined, and positive results were only obtained from that of the primary cell cultures. The sensitivity of MERN cell to ECHO virus noted in this communication is different from that previously reported by others, and its possible mechanism was discussed.