

# 由恒河猴肾上皮细胞分离的隐性病毒

苏诚钦 张镜芳 朱南英 李质怀

(中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明)

1955 年 Rustigian 氏等<sup>[1]</sup>最先报导, 由恒河猴肾上皮细胞培养物中分离出 4 株以前未知的隐性病毒。其后, 许多学者<sup>[2-5]</sup>相继报告由恒河猴和爪哇猴的组织或排泄物中分离出大量隐性病毒。Hull 氏等<sup>[2,4]</sup>将这些新分离的病毒命名为猴病毒 (SV), 并根据它们在组织培养上细胞病变的特性, 归纳为 4 个细胞病变组, 总共包括 28 个血清型和 24 个未定型。除 *Macaca* 猴外, 1957 年 Malherbe 与 Harwin 二氏<sup>[6]</sup>还报导, 从非洲 *Vervet* 猴也分离出若干种细胞致病因子 (SA)。1960 年 Sweet 与 Hilleman 二氏<sup>[7]</sup>从 *Macaca* 猴肾组织培养物中分离出一种新的病毒, 命名为空泡形成病毒 (SV40)。

由于猴肾细胞被广泛利用来进行病毒学研究和疫苗生产, 因此, 猴体隐性病毒问题, 越来越大地引起人们的注意<sup>[7-10]</sup>。

两年来, 我们在脊髓灰质炎活疫苗生产和检定工作中, 曾由恒河猴肾上皮细胞分离到 6 株隐性病毒, 并对它们的细胞病变特征, 理化性质等进行了初步观察, 本文为这些观察的初步报告。

## 材 料 和 方 法

**1. 病毒分离和传代** 6 株隐性病毒均由未接种病毒的正常恒河猴肾单层上皮细胞分离而得, 分别命名为 III-32、62-111、62-186、62-192、62-202 及 62-257 株。它们都分别在恒河猴肾上皮细胞上传代 5—15 次, 都恒定产生细胞病变。所有病毒均于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

**2. 组织培养** 先后利用恒河猴 (*Macaca rhesus*) 肾和睾丸, 平顶猴 (*Macaca nemestrina*), 熊猴 (*Macaca assamensis*), 红面猴 (*Lyssodes speciosa* Melli), 藏酋猴 (*Lyssodes speciosa tibetanus*) 的肾脏, 以及人胚肾、皮肤、肌肉、人羊膜、兔肾等组织, 用胰酶消化法制备单层细胞管进行试验。各种组织的培养按常规方法进行。

**3. 细胞病变观察** 单层细胞管接种病毒后, 于  $37^{\circ}\text{C}$  培养, 每隔 1—2 天在显微镜下观察细胞形态。病变细胞标本用 10% 福尔马林固定, 用苏木素-伊红染色法染色, 最后用加拿大胶封固保存<sup>[11]</sup>。

**4. 化学物理性质** 取麻醉用乙醚与病毒液等量混合,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, 接种猴肾细胞管, 观察病毒对乙醚的抵抗力。

将病毒在不同温度 ( $22^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  及  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 保存后, 接种猴肾细胞管, 观察病毒对各种温度的稳定性。

**5. 动物试验** 将病毒按常规方法接种家兔和乳鼠, 观察病毒对该动物的致病性。

**6. 病毒滴度和中和试验** 用猴肾细胞培养管按常规病变方法进行。

## 实 驗 結 果

### 1. 細胞病变特征

III-32 病毒株接种猴肾单层上皮細胞管后, 細胞病变出現的时间頗不一致, 最早在第 3—4 天, 最晚可迟至 14 天以上。病变早期, 在苏木素-伊紅染色标本, 低倍显微镜下可見到細胞核增大, 胞浆內顆粒增多, 一部分細胞的胞浆內开始出现泡沫样空泡 (图 1a)。以后, 空泡样病变更为明显, 病变細胞数目逐漸增多, 病变区域逐漸扩大, 形成大小不等的空泡 (图 1b)。一般在空泡样病变出現后, 相繼出現多核融合細胞或融合細胞区 (图 1c)。病变晚期, 全部細胞自管壁脫落。在整个細胞病变期, 均未見有核內或胞浆內包涵体。

其余 5 株病毒在猴肾上皮細胞的病变情况, 基本与 III-32 株病毒相同。

### 2. 对各种細胞培养物的敏感性

III-32 病毒株在恆河、平頂、紅面、藏酋以及熊猴肾上皮細胞培养物都可产生相同的細胞病变, 即形成泡沫样空泡和多核融合細胞。病毒在猴肾細胞培养物的繁殖滴度都比较低, 而且滴度的增长极慢。接种 14 天后, 病毒最高滴度, 恆河猴和紅面猴肾培养物均为

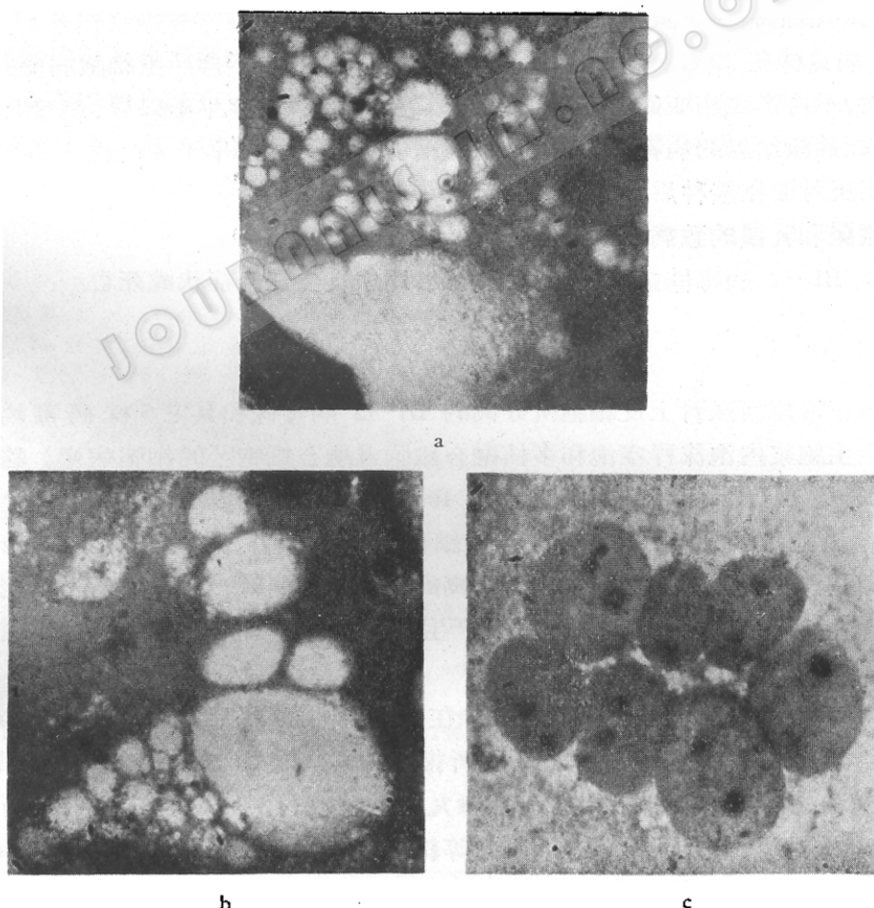


图 1 III-32 病毒株在恆河猴肾单层上皮细胞苏木素-伊紅染色标本的细胞病变, 900 $\times$ 。

- 胞浆內出現泡沫样空泡病变;
- 空泡病变增大及加多;
- 形成多核融合细胞。

$10^{3.0}$  TCD<sub>50</sub>/毫升, 平頂猴为  $10^{2.8}$  TCD<sub>50</sub>/毫升。病毒在上述 3 种細胞培养物經過十多次传代后, 滴度仍未見提高。

III-32 病毒株的繁殖情况与培养时间的长短有着密切关系。在 37°C 培养 7 天以下的病毒液, 在猴腎細胞传代时, 一般都不能产生細胞病变, 在 37°C 培养时间越长的病毒液, 传代时細胞管产生病变的比例越大。試驗表明, 在 37°C 培养 28 天的病毒液, 接种猴腎細胞管时, 細胞病变率可达到 100%。

III-32 病毒株在兔腎, 恆河猴睪丸, 人胚腎, 肌肉, 皮肤, 人羊膜的細胞培养物上, 都不产生細胞病变。

### 3. 中和試驗

曾利用脊髓灰質炎 1、2、3 型, Coxsackie A 9, B1—B5 型, ECHO 1—9 型特异免疫血清和典型麻疹患者恢复期血清与 III-32 病毒株在猴腎細胞管进行中和試驗, 結果該病毒均未能被上述血清中和。

### 4. 对乙醚和溫度的稳定性

III-32 病毒株經乙醚在 4°C 过夜处理后, 在恆河猴腎細胞管仍可产生与未处理的对照标本相同的細胞病变。試驗表明, 該病毒对乙醚有抵抗性。

III-32 病毒株在 22°C 保存一周后, 接种于猴腎細胞管, 不再产生細胞病变。在 4°C 保存一个月后, 不再产生病变或病变延迟出現。在 -20°C 保存半年以后, 病变出現时间延緩。在 37°C 連續培养的病毒液, 传代时病变出現时间一般都早于 4°C 或 -20°C 保存者, 前者病变出現时间在接种后 3—4 天, 而后者一般在 7 天以后。

### 5. 对家兔和乳鼠的致病性

所有經 III-32 病毒株感染的家兔或乳鼠, 均未发生任何症狀或死亡。

## 討 論

我們由正常恆河猴腎上皮細胞所分离的 III-32 病毒株和其它 5 株病毒均可在猴腎上皮細胞产生胞浆内泡沫样空泡和多核融合細胞或融合細胞区的細胞病变。这种特异性的病变与 Hull 氏等<sup>[2,11]</sup>所报导的病毒, SV40 病毒<sup>[7]</sup>以及麻疹病毒<sup>[12]</sup>虽有所类似, 但又不尽相同。其他作者所报导的病毒在猴腎細胞培养物上或产生空泡病变, 或形成多核融合細胞, 但是沒有一种病毒如同我們所分离的一样能够同时产生以上两种病变。此外, SV40 和麻疹病毒在病变細胞的核内都可产生包涵体<sup>[12,13]</sup>, 而我們分离的病毒在病变細胞上沒有发现。

III-32 病毒株的細胞敏感范围很狭, 除在 5 种亚洲猴腎細胞上可产生病变并繁殖外, 对其他組織都不敏感, 这与 Hull 氏等<sup>[4]</sup>所报告的某些对人羊膜敏感的猴病毒 (SV25、28、36、59) 和麻疹病毒<sup>[12]</sup>以及对恆河猴睪丸組織敏感的 SV40 病毒<sup>[7]</sup>, 都有所区别。此外, 由于該毒株对兔腎, 人胚腎, 皮肤, 肌肉等組織培养物以及家兔, 乳鼠都沒有敏感性, 因而可以认为, III-32 毒株不属于“B”病毒, 脊髓灰質炎病毒, 其他某些腸道病毒和某些呼吸道病毒<sup>[14-16]</sup>。这一論断, 也可由一部分中和試驗的結果得到証明。

用 37°C 連續培养的病毒液传代时, 細胞病变出現时间比 4°C 或 -20°C 保存者为早。原因可能是这种病毒的繁殖周期较长, 当 37°C 連續培养时繁殖可以連續进行, 而 4°C 或

—20℃ 保存时,繁殖受到中断。如此,在同一单位时间内,单个细胞受病毒颗粒感染的数目,37℃ 連續培养传代的病毒液将肯定比 4℃ 或 —20℃ 保存者为多,因而细胞病变出现时间也较早。这一假定有待更多的试验材料予以证明。

## 摘 要

1. 两年来,我們从未曾接种过病毒的正常恆河肾上皮细胞培养物分离到 6 株自发性隐性病毒,并对其中的 III-32 毒株比较系统地进行了细胞病变特征,繁殖特性,理化性质,细胞敏感性和动物致病性等方面的研究和观察。

2. 所有 6 株病毒在猴肾上皮细胞培养物上都产生相同的特异性病变,即产生胞浆内泡沫样空泡和多核融合细胞。未见有核内或胞浆内包涵体。

3. III-32 毒株对恆河、平頂、紅面、藏酋及熊猴的肾上皮细胞培养物都有敏感性,对兔肾,人胚肾,皮肤,肌肉,人羊膜,恆河猴睾丸的细胞培养物以及乳鼠和家兔都不敏感。在猴肾细胞培养物的繁殖滴度都很低,接种 14 天以后,最高滴度只有  $10^{3.0}$  TCD<sub>50</sub>/毫升。在猴肾细胞培养物上经过十多次传代,滴度仍未见提高。

4. III-32 毒株未能被脊髓灰质炎 1、2、3 型, Cocksackie A9、B1—B5 型, ECHO 1—9 型特异免疫血清以及典型麻疹患者恢复期血清所中和。

5. III-32 毒株对乙醚有抵抗性。该病毒在 22℃ 保存不超过 1 周, 4℃ 不超过 1 个月, —20℃ 不超过半年。用 37℃ 連續传代培养的病毒液,接种猴肾细胞培养物时,细胞病变出现时间比 4℃ 或 —20℃ 保存者为早。

## 参 考 文 献

- [1] Rustigian, R. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 88:8, 1955.
- [2] Hull, R. N. et al.: *Am. J. Hyg.*, 63:204, 1956.
- [3] Cheever, F. S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 67:427, 1957.
- [4] Hull, R. N. et al.: *Am. J. Hyg.*, 68:31, 1958.
- [5] Kalter, S. S.: *Bull. W. H. O.*, 22:319, 1960.
- [6] Malherbe, H. et al.: *Brit. J. Exp. Path.*, 38:539, 1957.
- [7] Sweet, B. H. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105:420, 1960.
- [8] Блиников, К. С.: *Вопр. Вирусологии*, 6: 701, 1960.
- [9] Goffe, A. P. et al.: *Lancet*, 1:612, 1961.
- [10] Melnick, J. L. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109:965, 1962.
- [11] Enders, J. F. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86:277, 1954.
- [12] Ruckle, G.: *J. Immunol.*, 78:330, 1957.
- [13] Hsiung, G. D. et al.: *J. Exp. Med.*, 114:975, 1961.
- [14] Hull, R. N. et al.: *J. Am. Hyg.*, 71:15, 1960.
- [15] Kelly, S. et al.: *Am. J. Publ. Hlth.*, 52:455, 1962.
- [16] Deibel, R.: *Virology*, 8:262, 1959.

## LATENT VIRUS ISOLATED FROM TISSUE CULTURES OF RHESUS MONKEY KIDNEY CELLS

C. C. SU, J. F. CHANG, N. Y. CHU AND Z. H. LI

*(Medical and Biological Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Kun-Min)*

In 1961—1962 we isolated 6 cytopathogenic agents from uninoculated monkey kidney cell cultures. Among them, III-32 strain has been studied in detail. All isolated strains could produce cytoplasmic vacuoles and multinucleated giant cells on rhesus monkey kidney cell cultures. III-32 strain could produce the same cytopathogenic changes on kidney cell cultures of 5 Asia monkey species. However the tissue cultures of rhesus monkey testis, human embryonic kidney, muscle and skin, and of human amniotic membrane, rabbit kidney cells, suckling mice and rabbits were all insusceptible to III-32 strain.

The cytopathogenic changes of III-32 strain on monkey kidney cell cultures occurred very slowly. The titre of the virus did not increase over  $10^{3.0}$  TCD/ml. This virus could be preserved for not more than half a year at  $-20^{\circ}\text{C}$ , over a month at  $4^{\circ}\text{C}$ , and a week at  $22^{\circ}\text{C}$ . When the virus cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  were inoculated directly into cell cultures, it would propagate much better than that preserved at  $4^{\circ}\text{C}$  or  $-20^{\circ}\text{C}$ . This virus showed resistance to ether.

III-32 strain could not be neutralized by measles convalescent serum, nor by the immune sera for poliovirus types 1—3, coxsackie virus types A9 and B1—B5, and those for ECHO virus types 1—9.