

不同細胞对 ECHO 6 D'Amori 毒株 的血凝能力改变的影响

曾毅 王政 顧方舟

(中国医学科学院病毒学系, 北京)

細胞系統对病毒的血凝能力的影响, 在一些文献中曾有报告, 如 Green 等^[1]及 Mogabgab 等^[2]报告, 不同細胞系統可以影响流感病毒的血凝能力。Cassel^[3]发现牛痘病毒在 Ehrlich 腹水瘤細胞传代时失去其血凝能力。Schmidt 等^[4]报告不同的 ECHO 病毒在猴腎細胞传代时血凝能力有不同的改变; 一些 ECHO 病毒(如 ECHO 6)在传代过程中血凝滴度表現不稳定; 而另一些 ECHO 病毒(如 ECHO 10)的血凝滴度則降低以至丧失。Maisel 等^[5]应用传代肿瘤細胞研究 ECHO 病毒的血凝能力时发现 ECHO 3、11、19 型病毒在 HeLa 及 KB 細胞上传至第三代即丧失其原有的血凝能力。这样的病毒即使再传于猴腎細胞其血凝能力亦不能恢复。

我們在研究“紅血球对腸道病毒的吸附及其与血凝的关系^[6]”的工作中发现, 无血凝能力的 ECHO 6 D'Amori 毒株在原代人腎細胞上連續传代时可以变为有血凝能力的毒株^[6]。因此, 有必要对不同細胞对 ECHO 6 D'Amori 毒株的血凝能力改变的影响作进一步的研究。本文报告原代人腎細胞, 原代人羊膜細胞及 KB 細胞对 D'Amori 毒株的血凝能力改变的影响。

材料和方法

細胞 原代人胚胎腎(简称原代人腎)及原代人羊膜細胞的培养液为含 10% 小牛血清的 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 溶液, 维持液为 199 溶液。KB 細胞为一株在本实验室传代维持的肿瘤細胞株, 培养液为含 15% 小牛血清的 199 溶液, 维持液为含 5% 小牛血清的 199 溶液。用于 KB 細胞维持液中的血清, 经检查証实不含有对 ECHO 6 D'Amori 毒株血凝的非特异性凝集及抑制物质。

病毒 ECHO 6 D'Amori 毒株保存于 -20°C 。用 ECHO 6 标准免疫血清作中和试验, 証明其确实属于 ECHO 6 病毒。并用血凝试验証明此株病毒无血凝能力。

病毒传代 病毒传代所用稀释液为 199 溶液。用不稀释即 10^{-0} 的病毒液及稀释 10^{-3} 和 10^{-5} 的病毒液 0.1 毫升接种于长成单层的細胞管中, 加入维持液 0.9 毫升, 培养于 37°C 。于細胞产生病理改变达 90% 以上(“+++”)时收获, 保存于 -20°C , 以备繼續传代时用。终末传代法系將病毒作 10^{-5} 至 10^{-8} 一系列稀释, 各稀释度均按 0.1 毫升病毒悬液加 0.9 毫升维持液接种于单层細胞管中, 取能产生“+++”病变的最高稀释度細胞管的病毒悬液再次作稀释传代。

血凝及血凝抑制試驗 試驗方法已描述于另一文中^[6]。

結 果

(一) 原代人腎細胞对 ECHO 6 D'Amori 毒株的血凝能力改变的影响 将 ECHO 6 D'Amori 毒株的 10^{-10} , 10^{-3} , 10^{-5} 的稀释度及出現病变的終末稀释度的病毒在原代人腎細胞連續传代,測定其各代的血凝滴度及病毒滴度,結果見表 1。用 10^{-3} 及 10^{-5} 稀释度传代所得結果基本相似,病毒传至第 4—7 代时出現血凝(血凝滴度为 1:2—1:4)。繼續传代,血凝滴度随传代次数增加而升高,最高达 1:64。而用 10^{-5} 稀释度及終末稀释度的病毒分別传 15 代及 9 代,各代血凝滴定的結果均为阴性。

选取血凝均已变为阳性的人腎 5 代、人腎 6 代、人腎 10 代(即在原代人腎細胞传 5 代、6 代、10 代的病毒,下同)的病毒作血凝抑制試驗。結果显示,这些病毒的血凝作用均

表 1 D'Amori 毒株的不同稀释度的病毒在原代人腎細胞連續传代的血凝滴度的比較

病 毒 稀 释 度	实 验	代 数									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	15
10^{-10}	1	—	—	—	—	—	—	1:4	1:16	1:32	
	2	—	—	—	1:4	1:8	1:16	1:16	1:32	1:64	1:64
	3	—	—	—	1:4	1:8	1:16	1:64			
10^{-8}	1	—	—	—	1:2	1:4	1:8	1:16			
	2	—	—	—	1:4	1:4	1:8	1:8			
10^{-5}	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
終 末	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

注: 空白格表示未做; “—” = 血凝阴性。

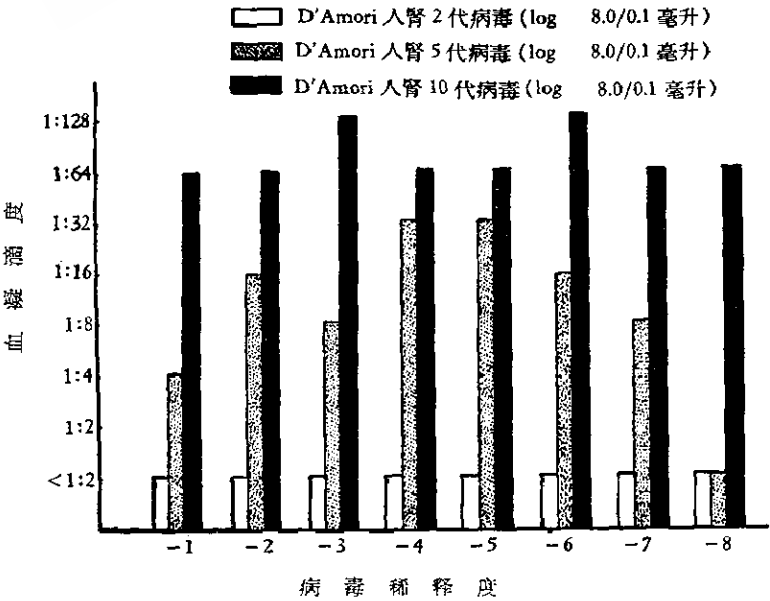


图 1 不同代数的 D'Amori 毒株各稀释度的病毒在原代人腎細胞培养的血凝滴度的比較。

能为 ECHO 6 特异性免疫血清所抑制,证实此有血凝能力的毒株仍为 ECHO 6 病毒。

为了解 D'Amori 毒株在原代人肾细胞上传代后病毒颗粒的血凝能力的改变情况,进一步作如下的实验:选取 D'Amori 毒株人肾 2 代(血凝阴性),人肾 5 代(血凝滴度 1:4),人肾 10 代(血凝滴度 1:64)的病毒,分别稀释成 10^{-1} 至 10^{-8} ,各稀释度按每管 0.1 毫升病毒悬液加入 0.9 毫升 199 溶液分别接种 4 管原代人肾细胞,培养于 37°C 。于细胞病变达“++++”时,按稀释度分别收获,测定其血凝滴度及病毒滴度。结果示于图 1,各代病毒的病毒滴度相似,但血凝能力有很大差别。血凝阴性的人肾 2 代各稀释度收获的病毒均仍为阴性,血凝刚变为阳性的人肾 5 代 10^{-1} 至 10^{-7} 稀释度收获的病毒,血凝为阳性;而 10^{-8} 稀释度的血凝则表现为阴性。血凝呈显著阳性的人肾 10 代 10^{-1} 至 10^{-8} 各稀释度全部为血凝阳性。

D'Amori 毒株血凝能力的获得及血凝滴度的增长与其病毒滴度无关,如表 2 所示,血凝阴性的人肾 2 代,血凝阳性的人肾 8 代(血凝滴度 1:32)及人肾 15 代(血凝滴度 1:64)的病毒滴度分别为 $7.5 \log_{10}\text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升, $7.75 \log_{10}\text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升及 $7.0 \log_{10}\text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升。

表 2 D'Amori 毒株在原代人肾细胞及原代人羊膜细胞连续传代的血凝滴度及病毒滴度的比较

代 数	原 代 人 肾 细 胞		原 代 人 羊 膜 细 胞	
	血 凝 滴 度	病 毒 滴 度	血 凝 滴 度	病 毒 滴 度
2 代	—	7.5*	—	7.0
8 代	1:32	7.75	—	7.3
15 代	1:64	7.0	—	7.5

注:“*” $\log_{10}\text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升;“—”= 血凝阴性。

(二) 原代人羊膜细胞对 ECHO 6 D'Amori 毒株的血凝能力改变的影响 在原代人羊膜细胞传代的方法,与在原代人肾细胞传代的方法相同。

用 10^{-9} 、 10^{-3} 、 10^{-5} 稀释度的 D'Amori 毒株在原代人羊膜细胞上连续传 10—15 代,仍全部为血凝阴性。

这些病毒的病毒滴度,如表 2 所示,第 2、8、15 代病毒的病毒滴度分别为 $7.0 \log_{10}\text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升, $7.3 \log_{10}\text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升及 $7.5 \log_{10}\text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升,与在原代人肾细胞传代的结果相似。再次表明了病毒的血凝能力与其致病变滴度无关。

对病毒在原代人羊膜细胞所表现出的与原代人肾细胞不同的性质作了进一步的探讨,用 ECHO 6 D'Amori 毒株人肾 1、2、3、4、5、6、7 代分别接种于原代人羊膜细胞及原代人肾细胞,测定血凝结果见表 3。血凝阴性的人肾 1、2、3 代病毒在原代人羊膜细胞上传出的病毒表现为血凝阴性、血凝阳性的人肾 4、5、6、7 代病毒在原代人羊膜细胞传代表现为血凝阳性。而在原代人肾细胞传代的结果:人肾 1 代、及人肾 2 代病毒传出的病毒(相当于原人肾 2 代、人肾 3 代)血凝为阴性,人肾 3 代传出的病毒(相当于原人肾 4 代)出现血凝。表 4 为用血凝阳性的 D'Amori 毒株人肾 7 代病毒及血凝阴性的人羊膜 15 代(在原代人羊膜细胞传 15 代的病毒,下同)病毒分别在原代人羊膜细胞及原代人肾细胞传代的结果。血凝阳性的人肾 7 代病毒在原代人羊膜细胞连续传 5 代,各代病毒的血凝滴

度并无改变。血凝阴性的人羊膜 15 代病毒在原代人肾细胞连续传 5 代,第 3 代出现血凝(滴度 1:8),第 4、5 代略有升高,均为 1:16。实验结果表明:在原代人羊膜细胞传代,病毒原来的血凝能力保持不变,即无血凝能力的 D'Amori 毒株在原代人羊膜细胞传代未获得血凝能力;有血凝能力的 D'Amori 毒株在原代人羊膜细胞传代,亦未丧失其血凝能力。

表 3 D'Amori 毒株在原代人肾细胞传代的不同代数的病毒同时在原代人羊膜细胞及原代人肾细胞培养的血凝滴度的比较

毒 株	HK-1 ⁺	HK-2	HK-3	HK-4	HK-5	HK-6	HK-7
	(-) ⁺	(-)	(-)	(+)*	(+)	(+)	(+)
人羊膜细胞	-**	-	-	1:2	1:8	1:32	1:32
人肾细胞	-	-	1:4	1:16	1:32	1:64	1:32

+ HK: 代表原代人肾细胞,其后数字表示所传代数;
+ (-): 代表血凝阴性毒株;
* (+): 代表血凝阳性毒株;
** -: 血凝阴性。

表 4 D'Amori 毒株 HK-7 及 HAm-15 代病毒分别在原代人羊膜细胞及原代人肾细胞传代的血凝滴度的比较

毒 株	细 胞	代 数				
		1	2	3	4	5
HK-7 (HA+)	人羊膜细胞	1:32	1:16	1:32	1:32	1:32
HAm-15 (HA-)	人肾细胞	-	-	1:8	1:16	1:16

HK-7 = D'Amori 毒株在原代人肾细胞传 7 代的病毒;
HAm-15 = D'Amori 毒株在原代人羊膜细胞传 15 代的病毒;
HA+ = 血凝阳性;
HA- = 血凝阴性;
“-” = 血凝阴性。

(三) KB 细胞对 ECHO 6 D'Amori 毒株的血凝能力改变的影响 用 ECHO 6 D'Amori 毒株入肾 10 代(血凝滴度为 1:32)在 KB 细胞连续传 20 代,各代病毒的血凝均为阴性。但用 10⁻⁶ 的病毒传回至原代人肾细胞或人羊膜细胞立即出现血凝。各代病毒的病

表 5 D'Amori 毒株的血凝阳性(HA+)病毒在 KB 细胞连续传代的血凝滴度及病毒滴度

代 数	[△] HK-10	KB-1	KB-3	KB-5	KB-15	KB-3-HK-1	KB-3-HAm-1
病毒滴度	7.5*	6.3	6.5	6.5	6.3	7.5	7.0
血凝滴度	1:32	-	-	-	-	1:16	1:32

[△] HK 代表原代人肾细胞;
HAm 代表原代人羊膜细胞;
KB 代表 KB 细胞;
各细胞名称后数字为病毒在该细胞所传代数,如 KB-3-HK-1 为在 KB 细胞传 3 代后在原代人肾细胞传一代。
* log₁₀TCD₅₀/0.1 毫升。

病毒滴度均在 $6.0-6.5 \log_{10} \text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升左右(表 5), 比在原代人肾细胞或原代人羊膜细胞繁殖的病毒滴度($7.0-7.5 \log_{10} \text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升)稍低。

选取 KB 1、3、5、9、15 代(即在 KB 细胞上所传出的相应代数)的病毒, 在原代人肾细胞上进行稀释滴定, 分别收获各稀释度产生“++++”病变的细胞管, 测定其血凝滴度。结果如图 2 所示, KB 1 代从 10^{-1} 至 10^{-6} 各稀释度均表现为血凝阳性, 但自 KB 3 代至 KB 15 代, 10^{-1} 至 10^{-5} 的病毒仍旧出现血凝, 而 10^{-6} 则变为阴性。此外, 实验还证明, KB 细胞正常对照管的维持液对 D'Amori 毒株的血凝无抑制作用。

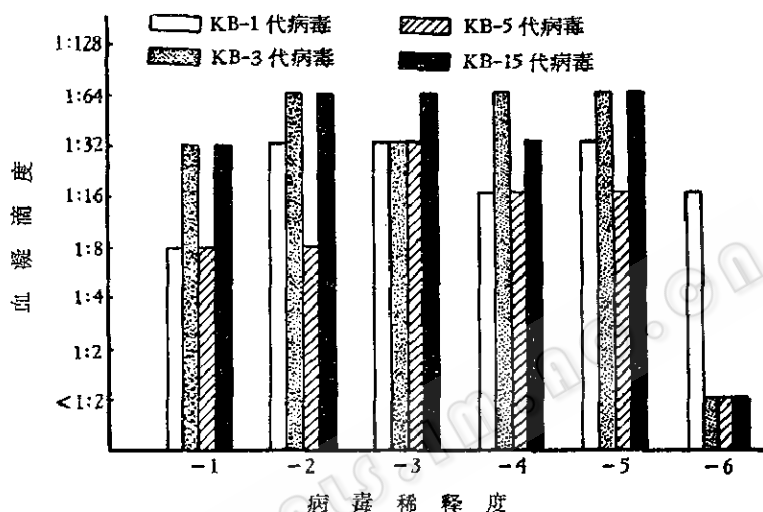


图 2 D'Amori 毒株的 KB-1 代, KB-3 代, KB-5 代及 KB-15 代各稀释度的病毒在原代人肾细胞培养的血凝滴度的比较。

讨 论

本实验所采用的 3 种不同细胞对 ECHO 6 D'Amori 毒株的血凝能力的影响各不相同。无血凝能力的 D'Amori 毒株在原代人肾细胞传代后变为有血凝能力的毒株, 其血凝滴度随传代次数增加而增长。我们发现 D'Amori 毒株可能是有血凝能力及无血凝能力的病毒颗粒的混合毒株^[6], 但有血凝能力的病毒颗粒很少, 在原代人肾细胞传代后有血凝能力的病毒颗粒不断增加, 终于出现血凝及血凝滴度不断升高。这可能是由于原代人肾细胞有利于有血凝能力的病毒繁殖。何以 10^{-6} 及 10^{-3} 的病毒在原代人肾细胞传代就能变为有血凝能力的病毒, 而 10^{-5} 及终末稀释度传代的病毒则否? 这可能是由于原 D'Amori 毒株中无血凝能力的病毒颗粒占绝大多数, 当 10^{-5} 或终末稀释度传代时, 有血凝能力的病毒颗粒很少或全无, 故不能累代增加而出现血凝。此结果与流感病毒之 O-D 相变异相似^[7]。

原来无血凝能力的 D'Amori 毒株在原代人羊膜细胞传 15 代仍不出现血凝。此结果与 Lahelle^[8,9] 的报告相符。在原代人肾细胞传代获得血凝能力的毒株, 再在原代人羊膜细胞传代亦不会失去其血凝能力。表明原代人羊膜细胞对 D'Amori 毒株的血凝能力无影响, 即有血凝能力的及无血凝能力的病毒颗粒均能很好繁殖。Bussell 报告^[10] ECHO 6 D'Amori 毒株和 Di Meo 毒株在原代猴肾细胞上传代培养无血凝, 而 ECHO 6 其他毒株

如 Forbes, Charles、D-1、Calhins 等就有血凝。看来,猴肾细胞对 D'Amori 毒株血凝能力的影响与原代人羊膜细胞相似。

D'Amori 毒株在 KB 细胞上传代何以无血凝出现呢? 其病毒滴度虽较在原代人肾细胞及原代人羊膜细胞传代时稍低,但仍为 $6.0-6.5 \log_{10} \text{TCD}_{50}/0.1$ 毫升,看来不是由于病毒滴度太低所致。KB 细胞正常对照管的维持液对 D'Amori 毒株的血凝无抑制作用,故与牛痘病毒在 Ehrlich 腹水瘤细胞培养的情况不同^[3],不是由于 KB 细胞维持液内有抑制物质存在的关系。那么,是否是由于 KB 细胞不适于有血凝能力的病毒颗粒繁殖而迅速为无血凝能力的病毒颗粒所代替呢? D'Amori 毒株人肾 10 代及 KB-1 代 10^{-1} 至 10^{-6} 稀释的病毒在原代人肾细胞上培养,均为血凝阳性,在同样情况下,KB-3 代至 KB-15 代 10^{-1} 至 10^{-5} 的病毒仍为血凝阳性,而 10^{-6} 则为血凝阴性,此表示大部分病毒颗粒已变为无血凝能力的病毒颗粒。由此看来, D'Amori 毒株在 KB 细胞上连续传代,虽然大部分病毒颗粒已变为无血凝能力的病毒颗粒,但传回至原代人肾细胞时又表现为血凝阳性。因此考虑到 D'Amori 毒株在 KB 细胞上传代表现为血凝阴性,可能主要的不是由于病毒颗粒血凝能力的改变,而是由于 KB 细胞不能供应 ECHO 6 D'Amori 毒株合成血凝素的物质基础,或者是合成血凝素的过程受到影响,故不能产生血凝。

综上所述,细胞系统对病毒的血凝能力的影响很大。在研究病毒的血凝能力时应考虑到这个问题。

关于细胞系统对病毒的血凝能力的影响,文献报告还不多。今后对这个问题应进一步研究,以期使更多无血凝能力的病毒成为有血凝能力的病毒,这对病毒的快速诊断很有意义,对研究病毒的变异问题也具有一定的理论价值。

摘 要

(一) ECHO 6 D'Amori 毒株 10^{-0} 及 10^{-3} 稀释的病毒在原代人肾细胞上传至第四代就出现血凝,即可以使无血凝能力的毒株变为有血凝能力的毒株。用 10^{-5} 及终末稀释度的病毒传代,则不能产生血凝。

(二) D'Amori 毒株无论是 10^{-0} 、 10^{-3} 或 10^{-5} , 在原代人羊膜细胞上传代均无血凝出现,但已获得血凝能力的 D'Amori 毒株传于原代人羊膜细胞,则能保持其原有的血凝能力。

(三) 已获得血凝能力的 D'Amori 毒株在 KB 细胞上传 1—20 代均无血凝出现,但一旦传回至原代人肾细胞,就能产生血凝。

(四) 本文就不同细胞对 D'Amori 毒株的血凝能力影响的机制进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] Green, I. J. et al.: *J. Immunol.*, **78**:233, 1957.
- [2] Mogabgab, W. J. et al.: *J. Immunol.*, **76**:314, 1956.
- [3] Cassel, W. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **110**:89, 1962.
- [4] Schmidt, J. et al.: *Am. J. Hyg.*, **75**:74, 1962.
- [5] Maisel, M. D. et al.: *Arch. Fur. Ges. Virusforsch.*, **11**:209, 1961.
- [6] 曾毅、王政、顾方舟: *微生物学报*, **10**: 357, 1964.
- [7] Burnet, F. M.: *Animal Virology* Second Ed., p. 143, Academic Press, New York/London 1960.

- [8] Lahelle, O.: *Virology*, 5:110, 1958.
[9] Lahelle, O.: *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 44:413, 1958.
[10] R. H. Bussel, et al.: *J. Immunol.*, 88:38, 1962.

THE INFLUENCE OF DIFFERENT KINDS OF HUMAN CELL CULTURES ON THE HAEMAGGLUTININATING CAPACITY OF THE D'AMORI STRAIN OF ECHO 6 VIRUS

TSENG YI, WANG CHENG AND KU FANG-CHOU

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

The D'Amori strain of ECHO 6 virus has been known to be unable to agglutinate human erythrocytes. By means of rapid passage in primary human embryonic kidney cell cultures using low dilution of the virus (10^{-0} or 10^{-3}), a D'Amori strain with haemagglutinating capacity was obtained. However, this could not be obtained by using high dilution of the virus (10^{-5} terminal dilution). Attempts to obtain a D'Amori strain with haemagglutinating capacity by cultivating different dilutions of the virus in human amniotic cell cultures have failed, although the strain with haemagglutinating capacity obtained from passage in human embryonic kidney cell cultures could maintain its capacity in human amniotic cell cultures. The D'Amori strain with haemagglutinating capacity lost its capacity when cultivated in KB cells but regained it when cultivated again in primary human embryonic kidney cell cultures or in primary human amniotic cell cultures. The mechanism of the influence of different human cell cultures on the haemagglutinating capacity of the D'Amori strain is discussed.