

甲型流感病毒各代表株在鸡胚 腎組織培养上的表現*

陶三菊 王植倫

(中国医学科学院病毒学研究所,北京)

自从 Francis 等^[1]首先发现流感病毒能在鸡胚悬浮细胞组织培养生长以来, 一些作者曾对流感病毒在组织培养的繁殖进行了若干的探讨^[2-9]。为了进一步获得一种对流感病毒比较敏感而且来源容易、可实际应用于流感病毒研究的组织培养, 我们对甲型流感病毒各代表株在鸡胚腎组织培养上的表现进行了研究, 现将研究结果报告如下。

材料与方 法

病毒株 甲型流感病毒各代表株: 原甲型 PR8 株, 于本实验室通过鸡胚尿囊 21—23 代 (简称 E₂₁₋₂₃, 以下各株同), 亚甲型-FM1 株 (E₃₃₋₃₅), 亚甲型-3 洛 57-4 株 (E₂₀₋₂₂); 亚洲甲型敏感相毒株沪防 60-1 (E₁₂₋₁₄), 京防 61-6 (E₁₁), 不敏感相毒株兰生 60-2 (E₁₀₋₁₂), 贵 57-2 (E₁₄)。

以上各病毒均制备成尿囊液毒种, 其 EID₅₀/毫升分别为 PR8: 8.5—9.2, FM1: 8.5—9.2, 洛 57-4: 8.5—9.2, 沪防 60-1: 8.0—8.7, 京防 61-6: 9.0—9.5, 兰生 60-2: 7.5, 贵 57-2: 8.0, 分装保存于 -20℃ 冰箱, 临用时取出。

組織培养 取 18—20 日龄鸡胚腎, 用 0.125%—0.25% 胰酶于 37℃ 水浴中消化, 将细胞悬浮于营养液中, 按每管 (13 × 100 小试管) 含细胞量 24—30 万接种, 于 36℃ 温箱内培养, 一般于 72—96 小时即可长成单层。

营养液成分为含 0.5% 乳蛋白的 Hanks 液加入 10% 小牛血清, 其中含青霉素 100 单位/毫升和链霉素 100 微克/毫升。维持液为 199 综合培养基。

鸡胚感染滴定 用 10 倍递增稀释的病毒材料 0.1 毫升尿囊液接种 9—11 日龄的鸡胚, 于 36℃ 温箱培养 48 小时后取尿囊液测定血凝, 血凝阳性者认为有病毒存在, 按 Reed 和 Muench^[10] 法计算 EID₅₀。

血凝及血凝抑制試驗 实验按常规量在有凹洞的塑料板上进行^[11]。

抑制素的制备 见参考文献^[12]。

病毒感染 细胞长成单层后吸去生长液, 用 Hanks 液洗细胞 1 次, 每管感染 0.1 毫升病毒悬液, 置 36℃ 温箱中吸附 1 小时, 如系测定繁殖动态则用 Hanks 液洗细胞 3 次以去除残余之病毒, 随之加入 199 维持液 1 毫升; 其它试验则在病毒吸附后直接加入 199 维持液, 置 36℃ 培养。

細胞致病变滴度及血球吸附滴度的测定 以 10 倍递增稀释的材料 0.1 毫升感染组织培养, 每个稀释度接种 3 管, 置 36℃ 温箱中吸附 1 小时后加入 199 维持液, 于 36℃ 温箱中继续培养, 逐日观察病变, 共观察 3 天, 在第 3 天判定结果, 以 50% 病变作为终点。根据病变结果按 Reed 和 Muench 方法计算出滴度 (TCID₅₀)。并在感染后第 3 天按 Vogel 等^[13] 方法作血球吸附试验, 以 50% 血球吸附作为终点, 计算出血球吸附的滴度。

* 杨芙蓉同志参加部分技术工作。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

实验结果

一、甲型流感病毒各代表株在单层鸡胚肾细胞上的致病变作用

实验以 PR8、FM1、洛 57-4、沪防 60-1、兰生 60-2 尿囊液病毒 $10^6-10^{6.5}$ EID₅₀ 病毒量接种鸡胚肾单层组织培养,在不同时间观察其病变,结果 PR8 株一般未见有明显细胞致病变作用,在其它各株则于 20—24 小时均可见不同程度的细胞病变,初期表现为蝌蚪状细胞,以后圆化、颗粒增多、最后从管壁脱落,受损害的细胞从管壁脱落后常常可见少许残留的正常细胞。本试验所用几株病毒的病变没有发现明显的差异(图 1)。

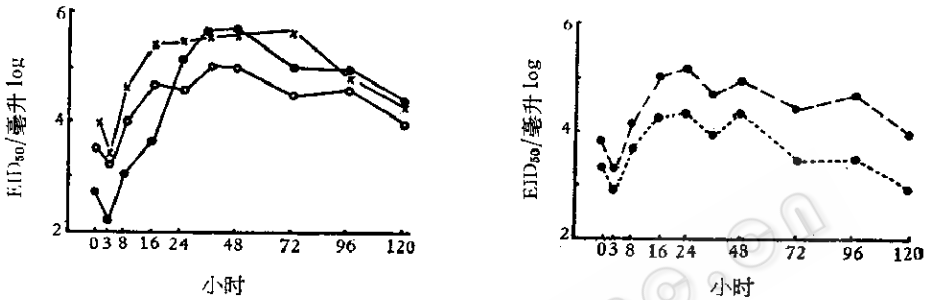


图 1 甲型流感病毒各代表株在鸡胚肾组织培养上的繁殖动态

●—● PR8 X—X FM1 ○—○ 洛 57-4 ●····· 沪防 60-1 ●---● 兰生 60-2

二、甲型流感病毒各代表株在鸡胚肾单层细胞培养的 TCID₅₀ 及血球吸附滴度

将 10 倍递增稀释的鸡胚尿囊液病毒接种鸡胚肾单层组织培养后,观察其 TCID₅₀ 及血球吸附滴度,实验结果见表 1。

表 1 甲型流感病毒各代表株尿囊液病毒在鸡胚肾组织培养的 TCID₅₀ 及血球吸附(HAd)滴度的测定

实验批号	PR8		FM1		洛 57-4		沪防 60-1		兰生 60-2	
	TCID ₅₀ * 毫升	HAd 毫升	TCID ₅₀ 毫升	HAd 毫升	TCID ₅₀ 毫升	HAd 毫升	TCID ₅₀ 毫升	HAd 毫升	TCID ₅₀ 毫升	HAd 毫升
1		6.5	5.8	5.8	5.5	6.5	3.5	4.5	6.8	7.8
2		6.8	6.4	7.0	7.5	7.5	4.5	4.8	6.8	7.3
3		6.5	6.5	6.8	5.5	5.5	3.5	3.5	6.5	6.5
4		7.0	6.8	6.8	5.8	5.8	3.5	3.5	5.5	6.3
平均		6.7	6.4	6.6	6.1	6.3	3.8	4.1	6.4	7.0

注 * 由于细胞病变作用不明显未能计算出 TCID₅₀ 滴度。

TCID₅₀ = 50%组织培养感染量。

HAd = 50%血球吸附滴度。

表内数据均以对数表示。

如表 1 所示,FM1、洛 57-4、兰生 60-2 3 株病毒在鸡胚肾组织培养的 TCID₅₀ 平均在 $10^{-6.0}$ /毫升以上,沪防 60-1 较低,TCID₅₀ 在 $10^{-3.8}$ /毫升左右,PR8 株则由于细胞病变作用不明显而不能算出 TCID₅₀。

除 PR8 株外,血球吸附滴度与 TCID₅₀ 之间基本上是平行的,而血球吸附滴度比同株病毒的 TCID₅₀ 平均高 0.2—0.6 个对数单位。

三、甲型流感病毒各代表株在鸡胚肾组织培养上的繁殖动态

病毒接种量为每个细胞 0.3—3 EID₅₀ (其计算方法是从已长成片准备感染病毒的鸡胚肾组织培养管中取出 3 管消化, 计算出平均每管所含细胞数, 以每管细胞数除每管感染的病毒量即得出每个细胞受感染的病毒量)。病毒感染后培育于 36℃ 温箱中, 在不同的间隔时间取出细胞培养管, 快速冰冻保存于低温冰箱中, 待各个时间的标本收集齐全后, 取出融化, 将细胞病毒液进行 EID₅₀ 滴定, 多数毒株进行 2—3 次试验, 实验的平均结果如图 1。

各甲型流感病毒株于感染组织培养后 3 小时病毒滴度均有下降, 而于 8 小时开始即有上升, 至 32—48 小时达到最高峰, 以后逐渐下降, 各株病毒在鸡胚肾组织培养繁殖后的

表 2 甲型流感病毒各代表株在鸡胚肾组织培养上的传代

病毒株		代 数					
		1	4	7	10	11	14
PR8	CPE	±	+	+	+		+
	HA/毫升	1.98	1.38	1.98	2.4		2.1
	EID ₅₀ /毫升	5.0	>5.5	7.5	6.7		7.3
	EID ₅₀ /HA	3.02	>4.12	5.52	4.3		5.2
FM1	CPE	+	+	+	+		+
	HA/毫升	0.9	0.9	1.68	2.4		2.1
	EID ₅₀ /毫升	5.3	≧5.3	≧7.3	7.8		8.3
	EID ₅₀ /HA	4.4	≧4.4	≧5.62	5.4		6.2
洛 57-4	CPE	+	+	+	+		+
	HA/毫升	1.8	1.2	2.1	2.28		2.1
	EID ₅₀ /毫升	4.8	>5.5	6.8	7.7		6.7
	EID ₅₀ /HA	3.0	>3.3	4.7	4.82		4.3
沪防 60-1	CPE	+	+	+		+	
	HA/毫升	1.2	1.2	1.2		1.20	
	EID ₅₀ /毫升	4.3	6.3	4.8		6.3	
	EID ₅₀ /HA	3.1	5.1	3.6		5.1	
兰生 60-2	CPE	+	+	+	+		+
	HA/毫升	1.98	1.08	1.98	2.7		2.28
	EID ₅₀ /毫升	4.5	>5.5	6.3	8.0		6.3
	EID ₅₀ /HA	2.52	4.42	4.32	5.30		4.02
京防 61-6	CPE	+	+	+		+	
	HA/毫升	1.5	1.2	1.2		1.20	
	EID ₅₀ /毫升	4.7	6.8	5.5		5.8	
	EID ₅₀ /HA	3.2	5.6	4.3		4.6	
贵 57-2	CPE	+	+	+		+	
	HA/毫升	1.8	1.98	1.98		2.28	
	EID ₅₀ /毫升	5.5	6.8	5.8		6.0	
	EID ₅₀ /HA	3.7	4.82	3.82		3.72	

注 CPE = 细胞病变。HA = 血凝滴度。EID₅₀ = 50% 鸡胚感染滴度。

“+”细胞病变阳性。“±”细胞病变可疑。

表内数据均为对数。

EID₅₀ 均可达 $10^{5.0}$ — $10^{6.5}$ /毫升,仅沪防 60-1 株稍低。

与此同时将同一份组织培养病毒材料作血凝滴定,发现一般于培养后 16—24 小时即可查出血凝素,血凝素以洛 57-4 及兰生 60-2 较高,一般可达 1:8—1:32,而沪防 60-1 很低,甚至查不出血凝素。

四、甲型流感病毒各代表株在鸡胚肾组织培养上连续传代结果

以 $10^{6.0}$ — $10^{7.0}$ EID₅₀ 尿囊液病毒接种鸡胚肾细胞,在 36°C 温箱中培养,48 小时收获即为第 1 代,再以此病毒培养液不稀释或 1:10 稀释继续传代,每代培养 48 小时,在传代过程中除观察细胞病变外,同时还进行血凝滴度及 EID₅₀ 的测定,传代结果见表 2。

从表 2 可以看到,甲型流感病毒各代表株在鸡胚肾细胞传代过程中血凝滴度及 EID₅₀ 逐渐增高,经传至数代后其滴度维持在一定的水平。虽然 PR8 株第 1、2 代时未观察到明显病变,但在传至第 3 代也可见细胞病变。

五、鸡胚肾组织培养适应株和原株若干生物学性状的比较

上述实验结果表明,甲型流感病毒在鸡胚肾组织培养传代过程中能良好地适应。为了了解这种适应株在生物学性状方面有无改变,乃对适应株(以下简称 CEK 株)与原株(以下简称 E 株)在以下几种性状上进行比较。

1. 抗原性 以原株(E 株)的鸡免疫血清与 CEK 及 E 株进行单面的血凝抑制试验,结果原株的免疫血清对 CEK 株及 E 株的抑制滴度没有明显的差别。

2. 对 3 种抑制素的敏感性 以 α (鸡蛋清)、 β (正常小鼠血清)及 γ (加温的正常马血清)3 种抑制素分别与甲型流感病毒各株的 CEK 株及 E 株进行了血凝抑制试验,结果见表 3。

表 3 3 种抑制素对甲型流感病毒鸡胚肾组织培养适应株(CEK)及原株(E)的血凝抑制作用

病毒株	PR8		FM1		洛 57-4		兰生 60-2		沪防 60-1	
	E ₂₂	CEK ₁₈	E ₈₄	CEK ₁₈	E ₂₁	CEK ₁₃	E ₁₁	CEK ₁₃	E ₁₁	CEK ₁₁
α (鸡蛋清)	120	120	1120	960	560	480	240	240	60	30
β (正常小鼠血清)	<10	<10	140	120	<10	<10	<10	<10	<10	<10
γ (正常马血清)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	3840	2560

注 表内数字为血凝抑制滴度。

从表 3 可以看出, α 抑制素对甲型流感病毒各株有不同程度的抑制作用, β 抑制素仅对 FM1 有抑制,以及 γ 抑制素仅对亚洲甲型敏感相毒株有抑制作用,而 3 种抑制素分别对各株流感病毒的 E 株及 CEK 株的抑制滴度没有显著差别。

3. 温度对血凝素的影响 为了使实验在同样的条件下进行,将各甲型流感病毒鸡胚肾组织培养适应株在鸡胚尿囊传 1 代,收获其尿液作为 CEK 株的材料;并在加温前用正常尿液将 E 株及 CEK 株的血凝滴度调整到互相接近,然后将 E 株及 CEK 株同时分批放入 56°C、58°C、60°C、62°C 的水浴中加温 30 分钟后取出测定血凝滴度,其结果如表 4。

从表 4 可以看到,FM1、洛 57-4、兰生 60-2 等病毒的 E 株对 58°C 或 60°C 加温 30

表 4 不同加温处理对甲型流感病毒各代表株鸡胚肾组织培养适应株(CEK)及原株(E)血凝素的影响

病毒株 加 温	PR8		FM1		洛 57-4		兰生 60-2		沪防 60-1	
	E ₂₂	CEK ₁₄ E ₁	E ₂₅	CEK ₁₄ E ₁	E ₂₂	CEK ₁₄ E ₁	E ₁₂	CEK ₁₄ E ₁	E ₁₄	CEK ₁₁ E ₁
加温前	960	1920	960	1920	1920	1920	1920	960	240	240
56℃ 30 分钟	480	640	640	960	960	1920	960	480	120	240
58℃ 30 分钟	120	60	160	1280	480	960	480	480	160	160
60℃ 30 分钟	<5	<5	<5	120	80	640	80	480	240	240
62℃ 30 分钟	<5	<5	<5	<5	60	160	<5	15	120	120

注 表内数字为血凝滴度。

分钟血凝滴度降低远比 CEK 株显著,不同温度对沪防 60-1 E 株及 CEK 株作用后其血凝滴度没有显著的差异。此外还可以看到,沪防 60-1 株及洛 57-4 株经过 62℃ 30 分钟加温后其 E 株和 CEK 株的血凝素仍未被完全破坏。

六、鸡胚肾和人胚肾组织培养对甲型流感病毒各代表株敏感性的比较

甲型流感病毒各代表株均以 $10^{6.0}$ EID₅₀ 尿囊液病毒同时分别感染鸡胚肾和人胚肾单层组织培养,于 36℃ 温箱中培育 48 小时后取组织培养病毒液在鸡胚尿囊进行滴定,结果如表 5 所示。在同样条件下,PR8 与洛 57-4 株在鸡胚肾组织培养的 EID₅₀ 比在人胚肾组织培养较高,其余毒株则未观察到显著的差别。

表 5 甲型流感病毒在鸡胚肾及人胚肾组织培养繁殖 EID₅₀ 滴度的比较

病毒株 实 验 组 批 号 组 织	PR8				FM1				洛 57-4				沪防 60-1				兰生 60-2			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
鸡胚肾(EID ₅₀ /毫升 log)	6.0	5.8		5.9	5.0	5.3		5.2	5.5	5.3		5.4	4.5	4.5		4.5	5.0	5.3		5.2
人胚肾(EID ₅₀ /毫升 log)	4.0	4.5	4.5	4.3	4.5	5.8	4.5	4.9	4.3	4.3	4.0	4.2	4.5	4.8		4.65	4.2	5.5	5.3	5.0

讨 论

关于流感病毒在不同组织培养上的繁殖,国外已有一些报告: Букринская^[14] 对亚洲甲型流感病毒 Huk 株在人胚肾等 10 种组织培养研究结果,认为人胚肾及猴肾为其敏感组织,于培养 18 小时测定其 EID₅₀ 分别为 5.0 及 5.5 个对数; Соловьев 等^[15] 观察到原甲型流感病毒 Шклявер 株及亚洲甲型流感病毒在猴肾组织培养繁殖 48 小时的 EID₅₀ 分别为 5.0 及 4.0 个对数。本实验结果表明甲型流感病毒各代表株尿囊液均能良好地在鸡胚肾组织培养繁殖, EID₅₀ 可达 5.0—6.0 个对数,仅沪防 60-1 较低。对甲型流感病毒在人胚肾及鸡胚肾组织培养繁殖 EID₅₀ 的比较结果表明,两种细胞对病毒的敏感性相似。总的看来,文献上报告对流感病毒较敏感的组织所获得的滴度与我们用鸡胚肾所获得的结果无大差别,但鸡胚肾组织培养易于获得,因此鸡胚肾组织培养在实际应用上可能比人胚

肾及猴肾组织培养更具有意义。但关于鸡胚肾单层组织培养在流感病毒分离上是否与人胚肾、猴肾细胞的敏感性相仿,尚有待以后研究阐明。

1957—1958年 Vogel 和 Shelokov^[13,16]报告了流感病毒感染的猴肾细胞能产生血球吸附现象,从而提供了一种新的测定病毒的方法。本文试验结果证明,在鸡胚肾组织培养进行流感病毒滴定时,血球吸附滴度比同株病毒的 TCID₅₀ 均稍高。特别值得提出的是 PR8 株虽然没有观察到明显的病变,但血球吸附滴度仍相当高,这说明可以利用血球吸附法在组织培养上滴定繁殖的病毒。

实验结果还表明,各甲型流感病毒株在传代过程中均能良好地适应于鸡胚肾组织培养。多数病毒株在传几代以后 EID₅₀ 与血凝滴度之比值比早代病毒的要高。

亚洲甲型流感病毒株由于对抗体的亲和性及对非特异性抑制素的敏感性不同而区分为敏感相(或不敏感相)与亲和相(或非亲和相)^[17]。本文研究的初步结果发现敏感相的沪防 60-1 株在鸡胚肾组织培养繁殖的 EID₅₀、TCID₅₀ 及血球吸附滴度均明显比不敏感相的兰生 60-2 株低;在传代过程中沪防 60-1 株的血凝素产生亦比兰生 60-2 株低。敏感相的京防 61-6 株及不敏感相的贵 57-2 株在鸡胚肾组织培养传代的初步结果,亦发现敏感相病毒株的血凝素较不敏感相病毒株的低。这种差异是否与亚洲甲型毒株的相别不同有关抑或仅是毒株间的差异,尚待进一步研究阐明。

摘 要

一、甲型流感病毒各代表株均能良好地在鸡胚肾组织培养繁殖: PR8、FM1、洛 57-4、兰生 60-2 等株 EID₅₀ 一般可达到 5.0—6.0 个对数,但沪防 60-1 稍低;多数毒株均能产生明显的细胞病变;病毒在感染鸡胚肾组织培养后 32—48 小时为繁殖高峯。

二、甲型流感病毒各代表株均能良好地在鸡胚肾组织培养中传代适应,在最初几代 EID₅₀ 及血凝滴度逐渐增高,以后维持在一定的水平。

三、利用血球吸附试验测定流感病毒在鸡胚肾组织培养的繁殖滴度,是一种比较敏感和可靠的方法。

四、在鸡胚肾组织培养传代适应的病毒株与原株之间的抗原性及对非特异性抑制素的敏感性无显著的差别。

五、关于鸡胚肾组织培养与人胚肾、猴肾组织培养之间对流感病毒的敏感性的差异及鸡胚肾组织培养的实用价值进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] Francis, T. Jr and Magill, T. P.: *Science*, **82**:353, 1935.
- [2] Mogabgab, W. J., Green, I. J. and Dierkhising, C. C.: *J. Lab. Clin. Med.*, **44**:899, 1954.
- [3] Mogabgab, W. J., Green, I. J. and Dierkhising, O. C.: *Science*, **120**:320, 1954.
- [4] Mogabgab, W. J., Simpson, G. I. and Green, I. J.: *J. Immunol.*, **76**:314, 1956.
- [5] Mogabgab, W. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **89**:654, 1955.
- [6] Henle, G., Girardi, A. and Henle, W.: *J. Exp. Med.*, **101**:25, 1955.
- [7] Maassab, H. F.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **45**:1035, 1959.
- [8] Wright, B. S. and Sagik, B. P.: *Virology*, **5**:573, 1958.
- [9] Mannweiler, E. and Lippelt, H.: *Arch. f. d. Ges. Virusforsch.*, **10**:636, 1961.
- [10] Reed, L. J. and Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, **27**:493, 1938.

- [11] 全国流行性感冒中心研究室: 流行性感冒手册, 89 页, 人民卫生出版社, 1958。
[12] 刘锦棠、童葵塘、朱既明: 微生物学报, 7 (4):284, 1959。
[13] Vogel, J. and Shelokov, A.: *Science*, 126:358, 1957。
[14] Букринская, А. Г.: *Acta Virol.*, 4:146, 1960。
[15] Соловьев, В. Д., и Алексеева, А. А.: *Ж.М.Э.И.*, (5):16, 1959。
[16] Shelokov, A. and Vogel, J.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 97:802, 1958。
[17] 王植仑、薛凤举: 微生物学报, 10(3):302, 1964。

BEHAVIOR OF INFLUENZA A VIRUSES IN CHICK EMBRYO KIDNEY TISSUE CULTURES

T'AO SAN-CHÜ AND WANG CHIH-LUN

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

The propagation of influenza A viruses in chick embryo kidney cells has been studied. The results of experiments showed that the EID₅₀ titres of the classical A virus PR8 strain, A prime virus FM1, Lok-57-4 strains, and Asian virus LS-60-2 strain generally reached log 5.0—6.0, but that of SP-60-1 strain was lower. After infection of the tissue culture, the FM1, Lok-57-4, LS-60-2, SP-60-1 viruses produced cytopathogenic effects on the cells, but the PR8 strain did not do so in earlier passages. When the cultures were infected with allantoic fluid viruses, the TCID₅₀ titres of FM1, Lok-57-4, LS-60-2 strains reached log 6.0, however, that of SP-60-1 was only log 3.8. The peak of the virus multiplication curve in chick embryo kidney cells was usually found at 32th-48th hour after infection.

Influenza A viruses were readily adapted to chick embryo kidney cells, the EID₅₀ titres and HA titres were gradually increased during passages, and then maintained at a certain level.

The quantity of virus propagated in this culture could be determined by means of the hemadsorption test, which has been proved to be a comparatively sensitive and reliable method.

No differences of antigenic structures and sensitivity to non-specific inhibitors between the original strains and the strains adapted in chick embryo kidney cells were found.