

人幼胚单层细胞的制备及其对一些病毒的敏感试验

程一權* 王廷瑞* 郑怀祖** 张 樟*

我们在实际工作中,考虑到人工流产的刮宫材料(45天以内的小胚芽)来源方便,胚龄较小,组织细胞的新陈代谢比较旺盛,推测可能适合于一般病毒的生长。故此进行了人幼胚单层细胞的制备,并与三个月以上的人胚肌皮细胞相比较。同时用一些常见的病毒作了敏感性试验。现将结果简述如下。

一、人幼胚单层细胞的制备

(一) 制备方法 取45天以内的小胚芽,去其头部及内脏,用剪刀剪成小块,并以Hanks液洗2—3次;按组织量加入3倍的0.25%胰酶(Difco, 1:250),置37°C水浴内消化15分钟;用毛吸管用力吹打,使细胞分散;然后用一层纱布过滤,将滤液离心沉淀;用营养液(牛血清10%, 0.5%乳蛋白水解物90%,青霉素100单位/毫升和链霉素100微克/毫升)稀释细胞,并计算其数目,按每瓶0.5毫升(含30万细胞)进行分装,于37°C静置培养。一般于24—36小时即可长成单层。

用上述方法,制成50多批细胞,维持时间可达20—28天(维持液成分:牛血清2%, 0.5%乳蛋白水解物98%,青霉素及链霉素同上)。

在人幼胚细胞制备过程中要注意下面几个问题: 1)取材: 如果取来的小胚芽是不成形的,且与绒毛膜相混时,必须将材料倒入含有Hanks液的容器中,仔细选取不呈绒毛状的组织。可用镊子轻轻钳住组织在液体中漂动,如为绒毛膜则较疏松,经轻轻一拉就容易断裂,而小胚芽组织则比较坚韧。胚胎组织如不能及时制备,则在4°C冰箱中可保存3天。2)细胞过滤: 用一层纱布过滤最为合适。如用两层以上,则会影响细胞的实得数日;如不过滤则组织间质较多,就会影响细胞的贴管。3)营养液与维持液: 在制备3个月以上的人胚肌皮细胞时,有时可用含有鸡胚浸出液的营养液及维持液;但对人幼胚细胞来说,如用鸡胚浸出液,即使细胞制成亦难于维持,这可能与细胞胚龄较小、代谢较旺盛、经鸡胚浸出液刺激后反易衰

老有关。营养液中的血清浓度也不宜超过10%,否则细胞中颗粒太多。

培养过程中,如维持液的pH明显下降时,应调节pH到7.2—7.4,这样往往能使细胞维持的时间延长达30天之久。

(二) 人幼胚单层细胞的类型 将生长成单层的组织培养玻片(培养48小时后)取出,常规制片检查,见有三种生长类型: 1) 上皮岛 系由连成膜片状的上皮细胞羣形成,呈圆形或不规则形的小岛状,周围均为成纤维细胞。岛直径约200—500微米(图1)。2) 上皮样的细胞羣 细胞核呈圆形,细胞轮廓也呈多边形,但细胞间隙较大,似乎并未连成膜片状,“岛”的外形不明显,上皮样细胞羣与周围之成纤维细胞有些交错(图2,图3)。3) 成纤维细胞 细胞呈细长梭形,或有两个以上的突起,但整个细胞仍不失长条的外形,细胞核呈长圆形,细胞的突起相互吻合,交叉成网状,网孔较大(图4)。在22毫米×11毫米大小的细胞盖片上,一般有8—10个上皮岛,四十余个上皮样细胞羣,其他均为成纤维细胞。

(三) 人幼胚细胞与3个月人胚细胞的比较 将小胚芽组织与3个月人胚组织各称取0.7克,用上述方法进行细胞制备并作比较,结果列于表1。

从表1可见到人幼胚细胞与3个月人胚细胞是不完全相同的,它容易被胰酶消化,经15分钟消化后,细胞产量较高,生长速度也较快,细胞类型亦不完全相同。

二、人幼胚单层细胞对一些病毒的敏感性试验

(1) 毒株及血清标本: 脊髓灰质炎病毒毒株(I、II、III型),腺病毒毒株(III、IV、VII型),流感病毒毒株(张57-4及长57-2)及20份急性黄疸型肝炎患者血清标本。

(2) 定性试验: 将上述人幼胚细胞长成单层

* 大连医学院微生物学教研组。

** 大连医学院组织胚胎学教研组。

本文1964年7月8日收到。

表 1 人幼胚细胞与 3 个月人胚细胞的比较

细胞来源	制成的细胞总数 (万)	制成的细胞瓶数 (30 万/瓶)	细胞贴管所需时间 (小时)	长成单层细胞所需时间 (小时)	细胞类型
人 幼 胚	1,700	50—56	3—4	24	上皮细胞 上皮样细胞 成纤维细胞
3 个月人胚	200	6	24	72—96	成纤维细胞

后,吸出营养液,分别接种以上各种病毒的原液 0.1 毫升(每株病毒各感染 4 瓶),于室温下静置 30 分钟,然后加入维持液(每瓶 1.2 毫升),置 37℃ 孵箱,以待病毒繁殖。同时用正常细胞 4 瓶作为对照。

(3) 定量试验:将定性试验阳性的毒株分别

以 10^0-10^{-4} 的病毒液接种于人幼胚细胞中,每瓶量为 0.1 毫升(各 4 瓶),余法均与上同。并作正常细胞对照(6 瓶)。接种后每日观察细胞有无病变,依 Reed-Muench 氏法计算 TCID₅₀。

肝炎患者血清标本的感染:根据 Rightsel 氏法的原则进行^[1]。

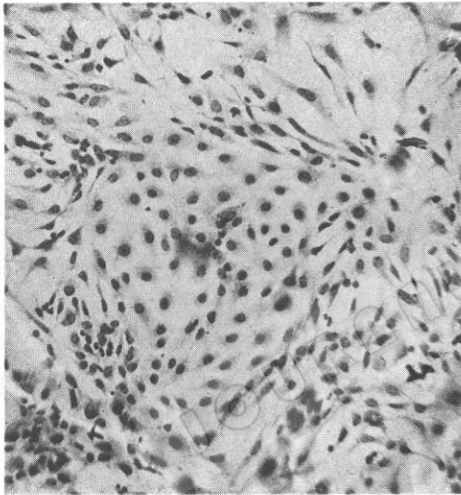


图 1 人幼胚单层细胞培养 48 小时,中央区可见上皮岛,周围为成纤维细胞。×100

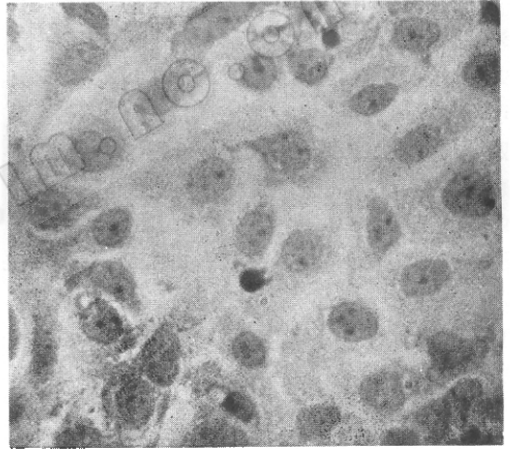


图 2 人幼胚单层细胞培养 48 小时,照片所示为一上皮样细胞群。×430

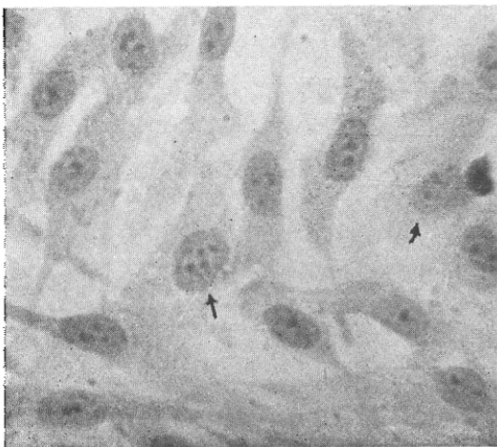


图 3 夹杂在成纤维细胞之间的零散的上皮样细胞(见↑)。×430

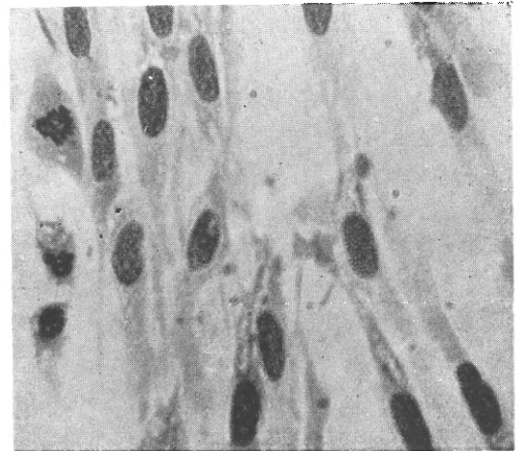


图 4 典型的成纤维细胞,左上方可见有丝分裂。×430

人幼胚单层细胞对一些病毒的敏感性试验结果见表 2。

表 2 人幼胚单层细胞对一些病毒的敏感性试验的结果

毒株型别		定性结果	定量结果 (TCID ₅₀)	出现病变的最早时间
脊髓灰质炎病毒	I	细胞有病变	$> 10^{-4}$	24—72 小时
	II	细胞有病变	10^{-4}	24—72 小时
	III	细胞有病变	$> 10^{-4}$	48—96 小时
腺病毒	III	细胞有病变	10^0	5 天后开始
	IV	细胞有病变	$> 10^{-4}$	3 天后开始
	VII	细胞有病变	10^{-2}	3 天后开始

从表 2 可以看出, 脊髓灰质炎病毒 (I、II、III 型) 及腺病毒 (III、IV、VII 型) 均能引起人幼胚单层细胞的病变。各型脊髓灰质炎病毒的病变出现较早, 病毒滴度 (TCID₅₀) 均达 10^{-4} 或以上。而各型腺病毒的病变则出现较晚, 病毒滴度除第 IV 型较高 ($> 10^{-4}$) 外, 第 VII 型与第 III 型均低。至于两株流感病毒及肝炎患者的血清标本, 强于 37°C 下孵育 20 天以上, 细胞仍然与正常对照一样透明清晰。

初步的敏感性试验表明, 人幼胚细胞对所试的脊髓灰质炎病毒毒株还是敏感的。已知腺病毒

在 3 个月以上的人胚肌皮细胞上是很难生长的^[2], 但在人幼胚细胞上可以引起病变, 这也许与本细胞中除成纤维细胞外还含有上皮及上皮样细胞有关。因此, 我们认为从上述二类病毒性疾病患者的标本分离病毒时, 本细胞可能有一些实用价值。对其他病毒的敏感性试验仍有待进行。

参 考 文 献

- [1] Richtsel, W. A.: *J. Amer. Med. ASSOC.*, **177**: 10, 671-673, 1961.
- [2] Дрейзин, Р. С.: *Вопросы Вирологии*, **3**: 371—375, 1961.