

Q 热立克次体在几种单层细胞培养中的比较研究

朱孝堃* 吴 谦 陈瑞珍 魏 曦

(中国医学科学院流行病防治研究所, 北京)

本文研究了 Q 热立克次体 Grita 株在鸡胚细胞等 5 种原代细胞及 FL 细胞等 3 种传代细胞中的繁殖特征。对其在某些细胞中的生长、繁殖性状作了比较研究和讨论。并提示了把这一方法应用于实际工作中的可能性。

立克次体在一般油浸显微镜下可以观察到, 但采用动物培养或组织碎片培养法等都不能确切地观察到立克次体在细胞内的繁殖过程。自从单层细胞培养法出现, 并用以培养立克次体之后, 这一困难就获得解决。到目前为止已经有不少种立克次体在单层细胞培养中繁殖成功。并且对各种立克次体在细胞内的生长繁殖过程及其生物学性状积累了不少资料。

Weiss 等^[1]在 1956 年利用单层细胞培养, 成功地培养了 Q 热立克次体, 随后不断出现有关这方面的报导。但是, Q 热立克次体在不同的单层细胞培养中各有什么特点, 尚没有进行过系统的比较研究。为了观察 Q 热立克次体在单层细胞中的培养特征, 并探索这种方法在 Q 热防治工作中实际使用的可能性, 我们选择了 8 种单层细胞, 包括: 鸡胚细胞、鼠胚细胞、豚鼠和幼兔肾脏上皮细胞、豚鼠睾丸细胞等 5 种原代细胞、以及 Detroit-6 细胞、人胚肾细胞、人羊膜细胞 (FL 株) 等 3 种传代细胞, 用它们培养 Q 热立克次体, 观察并比较 Q 热立克次体的生长特点。

材料和方法

一、毒种

选择 Q 热立克次体 Grita 株 (II 相), 使用时已

在本实验室中通过鸡胚卵黄囊传代 28—44 次; 每次使用的毒种均系感染 7 日后解剖的新鲜卵黄囊, 在 -30° — -34°C 保存 1—6 日。在感染细胞的当天, 选择经涂片证明含有“++”立克次体的卵黄囊**, 在灭菌乳钵中充分研磨, 加入 Hanks 液, 制备成 10% (重量/容积) 的原液, 经 1,000 转/分离心沉淀 10 分钟, 除去粗大的颗粒。再以维持液 (详见后) 将此原液稀释成 1:4—1:100 的悬液, 备用。

二、细胞培养

8 种组织分别采用下述 3 种方法培养。

1. 鸡胚细胞、鼠胚细胞及豚鼠睾丸细胞: 以无菌手术取出 9 日龄鸡胚, 除去头、爪及内脑; 或取胎龄 16—18 日的鼠胚, 取其胸部皮肤肌肉及其肺脏; 或取体重 200 克左右豚鼠的睾丸, 去掉鞘膜及白膜, 采用其实质组织。将选好的组织分别剪成 1—2 毫米的碎块, 用 Hanks 液洗涤两次。加入 0.25% 胰酶溶液, 置 37°C 水浴中消化 15—20 分钟, 弃去胰酶溶液, 用少量营养液洗涤组织块后, 再加入适量的营养液, 用毛细吸管轻轻吹打组织块, 使其分散成单个细胞, 细胞悬液经 4 层纱布过滤, 再将细胞数调整成 4×10^5 — 5×10^5 毫升。在每个链霉素小瓶中接种 1 毫升细胞悬

本文 1974 年 8 月 27 日收到。

* 现在通讯处: 中国医学科学院肿瘤防治研究所。

** 按本实验室常规规定: 卵黄囊涂片在油浸镜头下观察, 每个视野见到 50 个以下的立克次体定为“+”; 50—100 为“++”; 100—200 为“+++”; 200 以上为“++++”; 阴性以“-”表示。

液*, 塞紧瓶口, 置 37℃ 孵育, 待形成单层后即可使用。

2. 豚鼠或幼兔肾上皮细胞: 取体重 200—300 克的豚鼠或 10—30 日龄的家兔, 以无菌手术取出肾脏, 削下肾皮质, 剪成 2 毫米大小的碎块, 用 Hanks 液洗涤 2 次, 加 0.4% 胰酶溶液, 静置 4℃ 冰箱过夜。次晨, 弃去胰酶溶液, 加入适量的营养液, 以毛细吸管轻轻吹打, 使组织块松散成为单个细胞, 用营养液将细胞浓度调整成 3×10^4 — 4×10^4 /毫升, 在每个链霉素小瓶中接种 1 毫升, 塞紧瓶口, 置 37℃ 孵育, 待长成单层后即可使用。

3. 传代细胞: 以 0.02% 乙二胺四乙酸二钠溶液消化传代细胞, 取得细胞后, 用营养液将其浓度调整成 2×10^4 — 3×10^4 /毫升, 每个链霉素小瓶中接种 1 毫升细胞悬液, 塞紧瓶口, 置 37℃ 孵育, 待长成单层细胞后使用。

三、营养液及维持液

传代细胞的营养液和维持液均为含 10% 胎牛血清的 199 培养基。原代细胞的营养液为含 4% 胎牛血清的 199 培养基。维持液系含 2% 胎牛血清的 199 培养基, 不加任何抗菌素。每毫升营养液中含 100 单位青霉素, 100 微克链霉素及 100 微克卡那霉素。

四、毒种感染细胞及其检查方法

取长成单层细胞的小培养瓶, 以 Hanks 液洗涤 2 次。每瓶接种 1 毫升前述立克次体悬液, 置 35℃ 孵箱中接触 1.5 小时, 随后, 弃去立克次体悬液, 用 Hanks 液洗涤 2 次, 加入 1 毫升维持液, 塞紧, 置 35℃ 孵育。

此后, 逐日取出 2—3 个培养管, 将其中的盖玻片用缓冲盐水漂洗, 甲醇固定 4—5 分钟, 以姬姆萨氏 (Giemsa) 染液染色 30—40 分钟, 水洗, 吸干后, 用油浸镜检查。

结果及讨论

一、在鸡胚细胞、鼠胚细胞及豚鼠肾脏上皮细胞中培养 Q 热立克次体的结果

上述 3 种细胞在感染 Q 热立克次体

20—24 小时后, 细胞形态良好。但在细胞外, 有聚集成片、染色稍淡、形态不很完整的立克次体。估计这是吸附在细胞表面的立克次体^[2], 因其具有独特的形态学特征, 不难与细胞内繁殖的立克次体区别。此时在细胞内看不到立克次体, 可称之为遮蔽期 (Eclipse phase)^[3]。第 2—3 日, 在少数细胞的胞浆中开始出现大小不等的空胞, 其中有双球形、小杆状或排列成短链状的立克次体, 其边缘染成淡紫色, 中央呈深紫色。空胞中的立克次体数目不等, 少至 1—2 个, 多到 20—40 个或更多 (图 1)。以后 1—2 天内立克次体数增加不多。培养 6—7 日细胞内立克次体增加很快, 许多细胞中都出现空胞, 其中有大量立克次体繁殖。特别大的空胞有时甚至取代了胞浆的位置, 将细胞核挤压至细胞的一旁 (图 2)。至第 8—9 日, 视野中所见到的细胞几乎都充满了立克次体, 看来此时已经是立克次体的繁殖高峰^[4]。有时亦能见到许多立克次体堆积在细胞浆的一旁, 其形态类似包涵体。第 10 日, 除在细胞内仍可以见到大量立克次体外 (图 3、4), 部份细胞已被胀破, 立克次体向外逸出, 故在细胞外, 或细胞碎片上亦能见到大量的立克次体。至第 12 日, 部分细胞开始圆缩、脱落。但在没有退化变性的细胞中仍有许多立克次体 (图 5)。

在整个观察期中发现, 在这 3 种细胞内, Q 热立克次体主要是在胞浆中的空胞里繁殖。空胞的发展规律是由小到大, 由分散孤立到相互融合, 最后导致细胞破裂^[5]。至于空胞的形成是立克次体生长繁殖的原因, 还是繁殖造成的后果, 待进一步观察澄清。

感染细胞的核膜及核仁没有可见的变

* 为便于作细胞染色观察, 每个培养用的链霉素小瓶中均带有一块 8×22 毫米的盖玻片, 下同。

化,核内没有立克次体。这与 Q 热立克次体在 L 细胞内繁殖时所观察到的情况^[5]相一致。

把正常的鸡胚卵黄囊悬液接种在单层细胞中作对照培养,观察 10 日,个别细胞中虽出现少量空胞,但其中绝无与立克次体相似的颗粒。

将感染 Q 热立克次体后 10—15 日的鼠胚细胞或鸡胚细胞刮下,连同其维持液接种 7 日龄的鸡胚卵黄囊,经 7 日后解剖鸡胚,在其卵黄囊涂片中可以发现“++”——“+++”的立克次体。

将 Q 热立克次体的原液稀释为 1:4, 1:25, 1:50 及 1:100 的悬液,分别接种细胞培养管,经孵育后发现在所试的浓度范围内,立克次体在细胞内出现的早晚及其繁殖数量没有明显的差别。

二、Q 热立克次体在 FL 细胞及 Detroit-6 细胞中繁殖情况的观察

这两种细胞在感染 Q 热立克次体后 24 小时内,仅见细胞外有堆集成团的立克次体,个别细胞中有少量立克次体,其周围有不染色的透明晕。第 2 日,细胞浆中有许多成对、散在的立克次体,个别细胞中出现空胞,其中有少量立克次体。第 3 日在细胞浆中发现大量分散的立克次体,呈球形,短杆形或长杆形。胞浆中虽有少量空胞形成,但其中很少或没有立克次体。第 4—5 日,立克次体没有明显增加。第 7—8 日,立克次体显著增多,分散或丛集在细胞浆中,而不形成空胞(图 6)。第 9—10 日,细胞浆中分散的立克次体继续增多,偶然可见少量较小的空胞,其中有少许立克次体。与此同时,细胞开始圆缩、脱落。观察至第 14 日,仍然未见胞浆中有明显的空胞形成。

看来, Q 热立克次体在传代细胞中以在细胞浆中分散繁殖为主,与在原代细胞中显然不同。过去有人亦曾观察到这种现象^[5]。至于造成这种差别的原因尚有待进一步探讨。

Q 热立克次体可以随传代细胞代代相传,并且繁殖,如在 FL 细胞感染 Q 热立克次体后第 17 日,取 4 支感染细胞培养管,吸去维持液,取出细胞,作传代培养。传代后的次日,可见细胞浆中有分散的多形性立克次体。此后,立克次体逐渐增多,堆集成丛,至第 7 日细胞数显著增加,形成单层,其中大部分细胞里都有许多较粗大的立克次体。第 11 日取 6 支这种传过一代并感染有 Q 热立克次体的细胞,再传 1 代,次日发现存活细胞甚少,但其细胞浆中几乎均有小球形立克次体(图 7)。共观察 10 日,细胞数目一直较少,但存活的细胞中均有丰富的立克次体。有时可在并未完全分裂开的两个子细胞(或其中之一)里看到立克次体。有人^[6]曾经看到过类似的现象。

三、Q 热立克次体在人胚肾细胞中不能大量繁殖

Q 热立克次体感染人胚肾细胞后 24 小时内,看到胞浆较少,疏松,于细胞浆中或其边缘有双球形的立克次体样的颗粒。此后,直到第 14 日,除见到细胞浆中有少量的球形颗粒之外,均未见到典型的立克次体。将感染后 14 日的细胞刮下,连同维持液接种 7 日龄鸡胚 6 个,接种后第 5—8 日,6 个鸡胚全部死亡,其中第 6—8 日死亡的 4 个鸡胚卵黄囊涂片中,均观察到典型的 Q 热立克次体。

这种现象可能是 Grita 株 Q 热立克次体,对人胚肾细胞适应性不强,故不能繁殖,但也不死亡,而成机械性携带。一旦进入适当的环境后,又恢复其生活力,重新开

始繁殖。

值得注意的是,在我们所使用的3种传代细胞中,在接种立克次体之前,也能在细胞外发现许多细小的、染色稍淡的球形颗粒,成对或呈链状排列,如图8所示,极易误认为细胞外立克次体,必需仔细鉴别。

四、Q热立克次体在幼兔肾细胞与豚鼠睾丸细胞中的培养结果

用这两种细胞培养Q热立克次体,感染后分别观察10和11日,在细胞内外均未见到立克次体。

展 望

以单层细胞培养繁殖立克次体的方法,过去大多用来研究立克次体的形态、繁殖、代谢等方面的机理。从我们的实验结果看来,除前面已经讨论到的内容之外,还可以看出以下几点线索:

1. 鸡胚细胞等对Q热立克次体有较高的敏感性,而且立克次体在这些细胞中能大量繁殖,说明组织培养有可能成为试制Q热诊断用抗原和疫苗的新途径。

2. 鸡胚细胞等,在接种立克次体后2—3天内,已经在细胞中出现较多的立克次体。能否把这种方法与其他试验方法例

如免疫荧光相结合,用于Q热早期诊断呢?值得深入研究。

3. 在鸡胚细胞等中,接种的立克次体浓度相差25倍(1:4及1:100)时,立克次体出现的早迟和繁殖数量的多少没有明显的差别。表明有可能用单层细胞培养作为直接从病人或动物体内分离立克次体的一种手段。

4. 由于单层细胞培养,尤其是传代细胞培养来源和使用都比较方便,因而它有可能成为一种价廉、易行的保存立克次体毒种的办法。

以上诸点只是经过初步实践后的一点认识,是否切实可行,有待进一步实践。尤其是使用I相立克次体时,其结果如何,更应在实践中解决。

参 考 资 料

- [1] Weiss, E. et al.: *J. Bact.*, 72:235—241, 1956.
- [2] Weiss, E. et al.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 103: 691—695, 1960.
- [3] Kordová, N. et al.: *Acta Virol.*, 7:84—87, 1963.
- [4] Schaechter, M. et al.: *Virology*, 3: 160—172, 1957.
- [5] Roberts, A. N. et al.: *J. Bact.*, 77: 194—204, 1959.
- [6] Minamishima, Y. et al.: *Ibid.*, 88: 1195—1196, 1964.

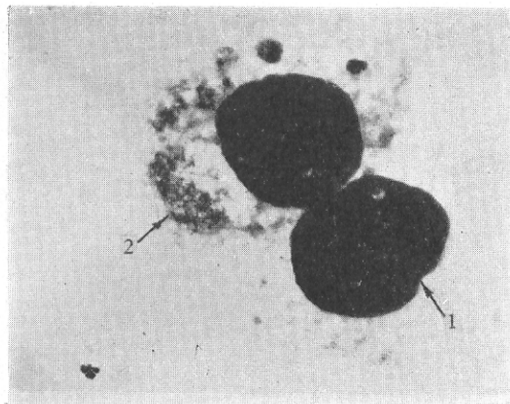


图 1 鸡胚细胞感染 Q 热立克次体后第 3 日, 细胞浆中出现数个空胞, 其中有数目不等的立克次体 (835 \times ; 以下均同此)

1. 细胞核。2. 空胞内的立克次体。

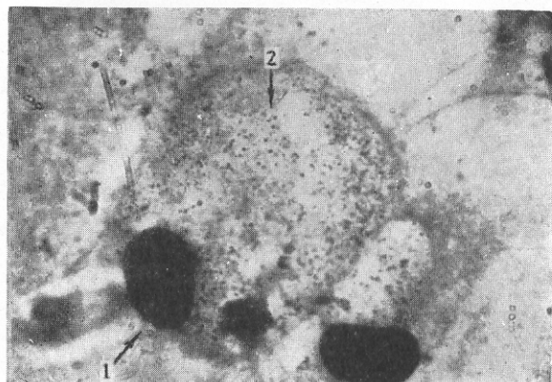


图 2 鼠胚细胞感染 Q 热立克次体后第 6 日, 细胞浆中出现巨大的空胞, 取代了整个胞浆位置, 将细胞核压迫至细胞的一旁, 空胞中充满立克次体 1. 细胞核。2. 空胞内立克次体。

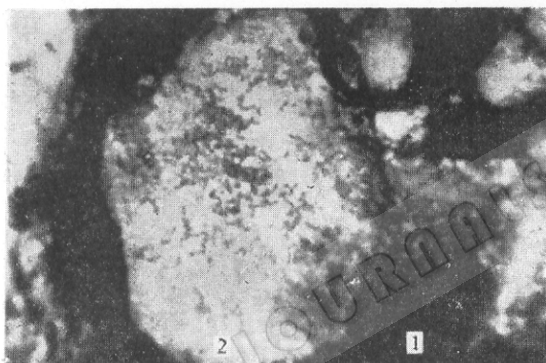


图 3 豚鼠肾脏细胞感染 Q 热立克次体后第 10 日, 空胞占据了整个胞浆位置, 其中有大量的立克次体 1. 细胞核。2. 空胞中有大量的立克次体。

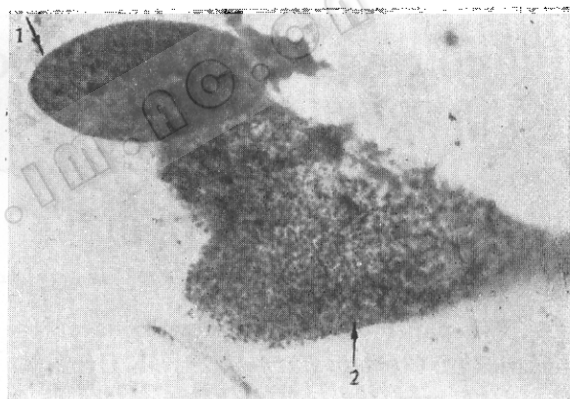


图 4 鼠胚细胞感染 Q 热立克次体第 10 日, 胞浆空胞中充满了立克次体 1. 细胞核。2. 空胞中有极多量的立克次体。

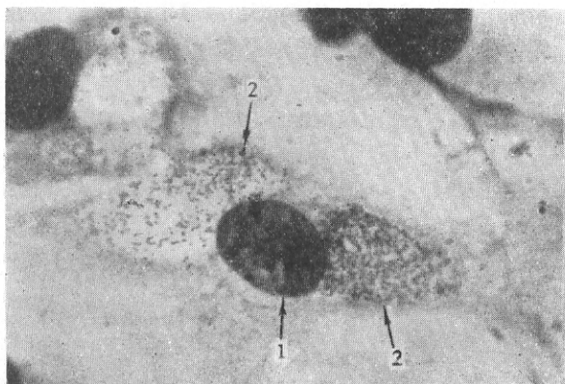


图 5 鼠胚细胞感染 Q 热立克次体后第 12 日, 细胞形态完整, 胞浆空胞中有大量立克次体 1. 细胞核。2. 空胞内立克次体。

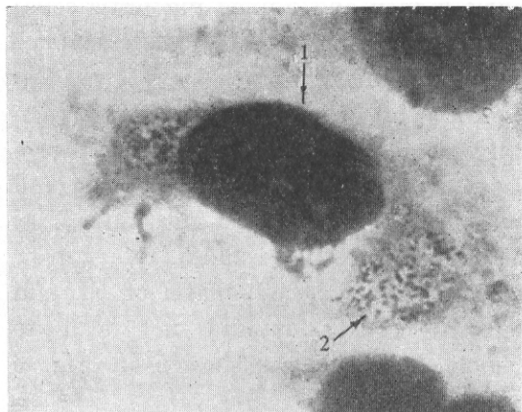


图 6 FL 细胞感染 Q 热立克次体后第 7 日, 胞浆内立克次体集集成丛, 但未形成空胞 1. 细胞核。2. 细胞浆内立克次体。

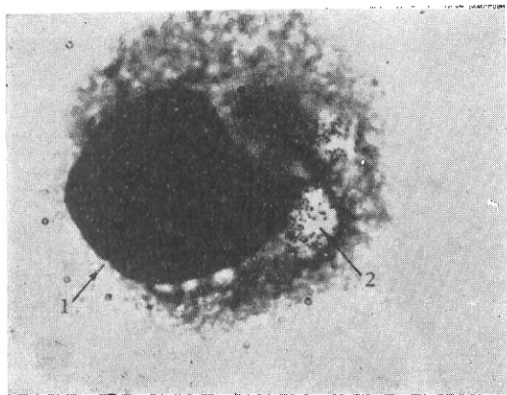


图7 感染Q热立克次体的FL细胞,传至第3代时,于传代的次日,在胞浆中发现大量丛集立克次体。

1. 细胞核, 2. 细胞浆内立克次体。

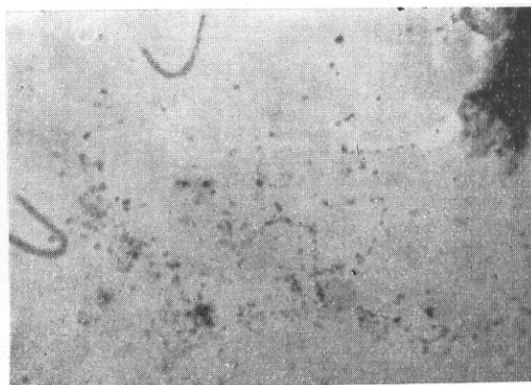


图8 人胚肾传代细胞的细胞外,可以见到许多排列成链状的小颗粒,应注意与细胞外立克次体相区别

COMPARATIVE STUDIES ON MULTIPLICATION OF *COXIELLA BURNETI* IN VARIOUS MONOLAYER TISSUE CULTURES

CHU HSIAO-KUN WU CH'EN CHEN LUI-CHENG WEI SHE

(Institute of Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

This paper reports the growth characteristics of *Coxiella burnetii*, Strain Grita, in eight varieties of monolayer tissue cultures, i.e., primary tissue cultures of chicken and mouse embryo fibroblasts; epithelial cells of guinea pig and young rabbit kidney and guinea pig testis cells; Detroit-6, FL cell and human embryo kidney cell lines.

Coxiella burnetii multiply luxuriantly in cytoplasmic vacuoles of fibroblasts of chicken and mouse embryo and epithelial cells of guinea pig kidney, as shown in Fig. 1, 2, 3, 4 and 5. They grew equally well in the cytoplasm of FL and Detroit-6 cells, but did not lead to vacuole formation, as shown in Fig. 6

and 7. However, the growth of Grita strain in human embryo kidney cells was sparing and their growth in young rabbit kidney cells and guinea pig testis cells was even less.

It is interesting to note that *Coxiella burnetii* could be passaged along with the passage of the infectious FL cells, and such phenomenon was observed in three successive passages.

The results suggest that, the growth of Rickettsia in monolayer tissue cultures might be of value for the early diagnosis of Q-fever, for the isolation of the infectious agents directly from patients or animals, and for the preparation of diagnostic antigen and vaccine.