

森林脑炎病毒对鸡胚单层细胞的致病变作用及其实际应用

黄永成 包藏文 徐淑荣 辛 钧

(长春生物制品研究所)

从人尸脑组织或蝉分离出的森林脑炎病毒株感染鸡胚皮肤肌单层细胞时,均可出现明显的细胞病变,TCID₅₀滴度与小白鼠脑内毒力 LD₅₀相一致,可达 log 7.0—9.0。病毒如加有被确诊的森林脑炎病人恢复期血清或者免疫动物血清则不出现病变,证明细胞病变作用的特异性。病毒经鸡胚细胞传代后仍保持稳定的致病变作用。应用鸡胚细胞作血清中和试验与小鼠腹腔接种法中和试验测定的抗体结果相一致,而其敏感性和特异性都高于用小鼠法所测结果。本文对森林脑炎病毒在鸡胚细胞引起病变的条件和影响因素及其实际应用价值加以讨论。

森林脑炎病毒(以下简称森脑病毒)对多数组织细胞常不能引起明显病变,或者仅有不完全病变。由于鸡胚细胞制备方法简易且可大量获得,探讨森脑病毒于鸡胚细胞产生病变的条件很有实际意义。研究结果证明,森脑病毒感染鸡胚细胞后可引起明显而稳定的病变。本文报告其致病变作用的特点及其实际应用的结果。

材料和方法

(一) 毒株

“Coφ”株来自苏联,系1937年从远东疫区病尸脑分离出;“森张”株系1952年从我国东北林区某病尸脑分离出;“刘”、“崔”二株系1963年从病尸脑分离出;“蝉”系同年从一组雌性森林硬蝉分离出。上述毒株均系鼠脑传代系统,未发现任何变异现象。“MK-120”株系“森张”株适应于乳鼠肾细胞,曾连续传120代。

(二) 鸡胚单层细胞的制备

取10日龄鸡胚的肌皮组织,剪碎后加入0.25%胰酶,于37℃水浴中进行消化,每次20分钟。细胞生长液为含有0.2—0.5%乳白蛋白水解物的Hanks溶液,5%新生牛血清,加Na₂HCO₃调pH至7.6,生长液中并含有青霉素100单位/毫升和链霉素100微克/毫升。每培养管接种细胞悬液0.5毫升,含细胞80万个。试验用细胞

龄为20—40小时。细胞维持液为5%新生牛血清199液。

(三) 病毒滴度测定*

1. 小白鼠 LD₅₀: 体重10—12克小白鼠,按一般方法滴定,每稀释度脑腔接种4只,每只0.03毫升,接种后2周判定。

2. 细胞 TCID₅₀: 以细胞维持液将病毒稀释成不同倍数,每稀释度接种3—4个培养管。感染时每管细胞先换入维持液0.5毫升,接种病毒0.1—0.2毫升(简称换液法),或者不更换细胞生长液直接种入病毒0.1—0.2毫升(简称简化法)。病毒接种后置于37℃培养,逐日观察,于接种7日后判定。

(四) 中和试验

1. 小白鼠中和试验: 免疫动物血清或人血清不稀释,和不同稀释度的病毒等量混合,置37℃水浴1小时,然后每组接种10—12克小鼠4—6只,每只腹腔接种0.1—0.2毫升,观察21天判定结果。

2. 细胞中和试验: 血清以细胞维持液二倍连续稀释,加入等量的含有10³—10⁵ TCID₅₀的病毒,混合后置入37℃水浴90分钟。每稀释度接种3—4个培养管,每管0.2毫升。接种后第7日判定,按病变全部被中和或者半数以上细胞管被

本文于1979年4月3日收到。

* LD₅₀、TCID₅₀及血清中和指数均按Reed-Muench法计算。

中和为判定标准。中和抗体滴度以原血清的最终稀释度表示之。

(五) 免疫血清

马血清为低温酒精沉淀法精制,豚鼠血清为腹腔接种病毒 7 次免疫法制备。病人或疫苗接种者均采自东北某疫区的疑似病人或接种鸡胚组织培养灭活疫苗后不同时期的人。用前皆于零下 20—40℃ 保存,试验时经 56℃ 30 分钟灭活。

结 果

一、森脑病毒对鸡胚细胞的致病变作用

许多研究者认为森脑病毒感染鸡胚细胞不能引起致病变作用。我们发现在感染病毒后 72 小时左右,于鸡胚单层细胞边缘区域的纤维细胞开始出现颗粒增多,胞浆收缩,细胞变圆等改变,且日益增多,日趋显著,少数细胞圆缩堆积成丛,同时从管壁上脱落。不同毒株所引起的细胞病变程度不尽相同,一般鼠脑病毒严重,组织培养病毒较轻,但同一浓度正常健康鼠脑则无何改变。关于病毒所致的病变情况见图版 I-1—4。

病毒对鸡胚细胞的 TCID₅₀ 与毒种的株别和毒力有一定关系,高者可达 log 9.0 以上。感染病毒后病变严重的细胞管其维持液 pH 显著不同于正常细胞对照, pH 常降至 7.0 左右,可借此做病变的初步判定。经 H.E. 染色所见,多数细胞收缩变成细长梭形,彼此离解,细胞间隙增大,细胞呈渐进性坏死,尤以细胞层周边部为重。此外,并见有细胞变圆、体积缩小,胞浆呈强嗜酸性染色,大部份细胞核裂解成大小不等颗粒,少数细胞核圆缩、浓染。

二、森脑病毒对鸡胚细胞致病变作用的特异性

1. 病变的普遍性

6 株病毒分别接种后都可出现相似的病变。早在 1937 年从苏联分离出的“Coφ”或者 1963 年在东北林区分离的“崔”和“刘”株以及从蝉分离出的毒株均引起相似的病变。

2. 病变的可传性

取 Coφ 株病毒 10⁻⁸ 感染鸡胚细胞后出现明显病变时,同法再传代,如此终末稀释传递三次以上,病变仍有规律地出现。曾取 MK-120 株于鸡胚细胞终末传递 10 代,病变规律,滴度稳定,经传代后病毒可被原株免疫血清所中和,证明具抗原性。此结果可说明这种改变不是由细胞自身退化或者接种材料的毒性作用等非特异性的改变。

3. 病变的稳定性

鼠脑病毒制成 10% 悬液,定量分装后置 -40℃ 保存,每周滴定一次。先后以“Coφ”和“森张”株各滴定 10 次以上,各株 TCID₅₀ 变动在 8.5—9.0 间,证明了病变作用的可重复性和稳定性,这点在实际应用上具有重要意义。

4. 病变的特异性

应用细胞中和试验方法,以 1:200 稀释的“刘”和“崔”豚鼠免疫血清和确诊的森脑患者 1:40 及 1:80 稀释的血清可中和 10 和 1,000 TCID₅₀ “Coφ”株病毒的病变作用,证明了病毒致病变作用的特异性。

三、影响细胞病变的几种因素

1. 细胞龄

常用消化后于 37℃ 培育 20 小时的细胞,如培育 3 日以上时其病变程度则较 20 小时者轻。5 日龄细胞的 TCID₅₀ 虽可达 6.50,但其病变程度较 1 日龄细胞轻微,病变发展慢,仅于细胞层边缘局部发生病变。

2. 细胞类型

曾应用我所麻疹组制备的鸡胚细胞,

于 33℃ 培养 5 天,主要为类上皮细胞的单层细胞。分别接种 10^{-4} 和 10^{-7} 病毒时,经观察 7 天未见有明显病变,维持液 pH 也无显著改变,但同一毒种同时感染我们制备的以成纤维细胞为主的一日龄细胞则见到明显病变。根据试验结果认为,森脑病毒是选择性破坏鸡胚单层细胞中的成纤维细胞。

3. 病毒稀释液和细胞维持液

细胞维持液种类对细胞病变有一定影响,199 液比 SM-1 液(7 种氨基酸)病变严重,尤其当二种维持液均不加血清的情况下差别更为显著。维持液和稀释液中血清种类和浓度对滴度影响不大,试用成牛血清、新生牛血清以及马血清,各批号结果 $TCID_{50}$ 均在 9.0 以上。

4. 病毒感染方法

经胰酶消化分散的细胞与病毒同时接种于培养管内,待细胞生长成单层后(1 日龄)再接种病毒,此两种感染方法均可出现明显病变,而且 $TCID_{50}$ 无显著差别。为了简化操作,不再换去原细胞生长液,直接种入病毒,与换入新细胞维持液方法比较,其结果如表 1。

表 1 同株病毒于鸡胚细胞、传代猪肾细胞和小白鼠脑腔接种三种方法测定结果

病毒株	鸡胚细胞		传代猪肾细胞		小白鼠 (10-12 克)
	换液法	简化法	换液法	简化法	
Coφ	9.25* (7.50)**	>9.50 (8.50)	7.25	8.25	8.75
森张	8.25 (7.50)	>9.50 (9.50)	9.50	>9.50	8.50
刘	9.25 (9.00)	>9.50 (9.25)	9.25	9.25	8.50
崔	>9.50 (6.75)	>9.50 (8.50)	>9.50	9.25	8.68

* 以细胞病变程度“+”为判定标准;

** 以“++”为判定标准。

从表 1 看出,简化法与换液法 $TCID_{50}$ 结果无显著差别或略高。

四、病毒对鸡胚细胞的致病变作用在实际工作中的应用

1. 病毒对鸡胚细胞的 $TCID_{50}$ 与小白鼠 LD_{50} 的关系

(1) 病毒在鸡胚细胞中的生长曲线:取 1 日龄细胞除去生长液,换入维持液,每细胞管感染 MK-120 株病毒 500 $TCID_{50}$,置 37℃ 培育。于感染后 1、3、5、7 日取 3—5 管混合,分别接种鸡胚细胞和小白鼠脑腔测定感染滴度,结果如图 1。

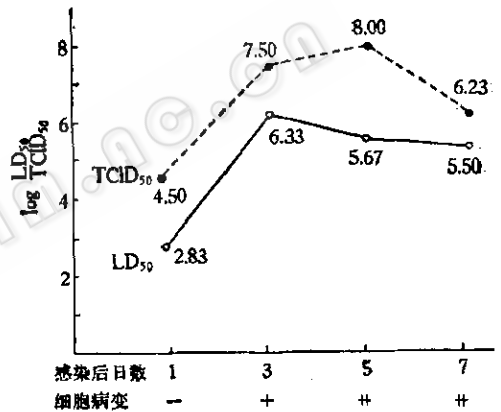


图 1 MK-120 株病毒于鸡胚细胞中的生长曲线

从图 1 可见,病毒的生长曲线按鸡胚细胞的 $TCID_{50}$ 与小白鼠 LD_{50} 计算二者结果相平行, $TCID_{50}$ 约高出 LD_{50} 一个 \log 。

(2) 病毒对鸡胚细胞和传代猪肾细胞病变滴度的比较:猪肾和传代猪肾细胞对森脑病毒的敏感性已被许多研究者所证实。从表 1 结果可以看出,同一毒株同时分别接种于鸡胚细胞、传代猪肾细胞和小白鼠脑腔三组结果相似,而两组细胞 $TCID_{50}$ 均高于小鼠 LD_{50} 。

2. 细胞中和试验

(1) 病毒定量、血清变量法中和试验:应用同一批精制高价马免疫血清以鸡胚细胞、传代猪肾细胞和小白鼠三种方法同时

表 2 细胞法和小鼠腹腔法中和试验结果比较 (病毒定量、血清变量)

毒株	方 法	病毒滴度 (log LD ₅₀ 或 TCID ₅₀)	试验用病毒 剂量 (log LD ₅₀ 或 TCID ₅₀)	免疫血清稀释倍数				
				1:160	1:320	1:640	1:1,280	1:2,560
Coφ	鸡胚细胞	>9.50	2.50	0/3*	0/3	0/3	0/3	2/3
	传代猪肾细胞	9.25	2.25	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3
	小白鼠	8.75	1.75	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
森张	鸡胚细胞	8.75	1.75	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	传代猪肾细胞	9.75	2.75	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3
	小白鼠	9.25	2.25	0/4	0/4	2/4	1/4	3/4

* 分子为细胞病变管数或小鼠死亡数;分母为接种细胞管数或小鼠数。

表 3 以小白鼠和细胞法测定血清中和抗体结果比较 (病毒变量、血清定量)

病 毒 株	方 法	病毒滴度 (log LD ₅₀ 或 TCID ₅₀)		中和指数 log LD ₅₀ 或 TCID ₅₀
		病毒对照	病毒+免疫血清**	
Coφ	鸡胚细胞	8.50	4.25	4.25
Coφ	传代猪肾细胞	6.50	<3.00*	>3.50
森张	鸡胚细胞	7.75	<4.00*	>3.75
森张	传代猪肾细胞	8.00	<4.00*	>4.00
森张	小白鼠	7.50	<3.00*	>4.50

* 10⁻³ 或 10⁻⁴ 组细胞均被中和或小鼠均无死亡。

** 小鼠法为原倍血清;细胞法为 1:1,000 稀释的血清。

对“森张”和“Coφ”两个毒株进行中和试验,结果见表 2。

由表 2 结果看出,“Coφ”株用三种方法,结果基本一致,血清中和滴度在 1:1,280 以上;而“森张”株小鼠法血清中和滴度较低,为 1:640。

(2) 血清定量、病毒变量法: 固定血清倍数为 1:1,000,加不同剂量的病毒进行中和试验,同时应用原倍血清以小鼠腹腔法做对照,其结果如表 3。

从表 3 明显看出,鸡胚细胞、传代猪肾细胞与小鼠法结果相近。但细胞法所用血清为 1:1,000,而小鼠法为原倍,从而说明细胞法较小鼠法敏感。

(3) 森脑组织培养疫苗人群接种后血清中和抗体测定: 于成人接种疫苗后不同时期采血,取血清以小鼠腹腔法和鸡胚细胞法分别进行血清抗体测定,结果见表 4。

除表 4 内双份血清外尚测定了部份单

份血清,实际上以鸡胚细胞法测定了 33 人共计 59 份血清,其中 S₁(免疫前) 20 人, S₂(接种两次疫苗后一月) 22 人, S₃(接种三次疫苗后一月) 17 人。在 20 人 S₁血清中以鸡胚细胞法测定结果,中和抗体滴度均<1:8,其中 14 人同时进行了小鼠法,其中和指数均<log 0.68 (0 者 3 人, 0.13 者 2 人, 0.26 者 1 人, 0.67 者 7 人, 0.68 者 1 人)。另外,从小鼠法结果, S₂ 或 S₃ 血清中和指数<1.70 的 8 例中,按组织培养法除一例外均有所增长,并有 5 例增长了 4 倍或者更多。依此法结果可以认为,测定中和抗体时细胞法较小鼠法为灵敏。为了比较两种方法的敏感性,将所有试验过的血清抗体检定结果列在图 2。

从图 2 血清中和抗体滴度和中和指数关系来看,在低水平抗体时细胞法较小鼠法敏感性高,在高水平抗体时则两种方法结果呈平行关系。

表 4 人群接种组织培养疫苗后中和抗体测定结果

接种者	血 清	细胞法中和 倍数	小鼠法中 和 指 数 (log LD ₅₀)	接 种 者	血 清	细胞法中和 倍数	小鼠法中 和 指 数 (log LD ₅₀)
10	S ₁	<8	—	117	S ₁	<8	0
	S ₂	32(16—32)	0.12		S ₂	<8	0.37
13	S ₁	<8	0.13	1	S ₁	<8	0.67
	S ₂	8	1.11		S ₂	16	1.34
16	S ₁	<8	—		S ₃	32	1.67
	S ₂	8	1.0	6	S ₁	<8	0.67
21	S ₁	<8	—		S ₂	<16	1.0
	S ₂	16(8—16)	0.12		S ₃	>256	3.17
30	S ₁	<8	—	68	S ₁	<8	0
	S ₂	>32(>32)	0.85		S ₂	<16	0.17
37	S ₁	<8	—		S ₃	256(80—320)	2.17
	S ₂	>32(>32)	1.53	72	S ₁	<8	0.67
51	S ₁	<8	0.68		S ₂	<16	0.67
	S ₂	<8	0.30		S ₃	128	2.37
56	S ₁	<8	0.26	106	S ₁	<8	0.67
	S ₂	16	1.30		S ₂	>32	1.34
83	S ₁	<8	—		S ₃	>128	2.17
	S ₂	16(16)	1.55	120	S ₁	<8	0
95	S ₁	<8	0.13		S ₂	<8	1.37
	S ₂	32	2.22		S ₃	80—320	2.12

—: 未做; ()内数字为第二次试验结果。

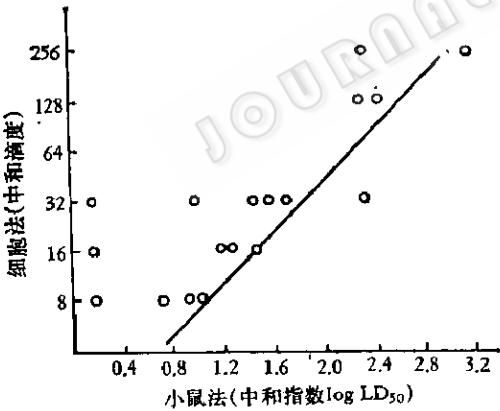


图 2 细胞法与小鼠法血清抗体测定滴度的相关性

讨 论

鸡胚细胞制备方法简易,容易获得,病毒增殖良好,在森脑病毒的研究上已早被广泛应用,但在细胞病变的研究上则不多,一般认为病毒对鸡胚细胞无明显的破坏作用^{[1-7][10]}。Libikova^[8]应用“Соф”株病毒和细胞同时接种,于感染后4—5天观察到

细胞的破坏作用,当加有特异免疫血清后则不再发生,但由于病变不能规律传代,从而认为不是由病毒直接引起的特异性变化。Morimoto等^[9]将猪肾细胞传递7代以后的森脑病毒转种鸡胚细胞未见病变,但于鸡胚细胞再连续传递6代时却发现细胞病变。Анджапаридзе等^[10]将森脑病毒于猪肾细胞分别在33℃传70代,40℃传80代结果对小白鼠嗜神经性无改变,而获得了对鸡胚纤维细胞的破坏作用。

根据上述试验结果,森脑病毒虽未经细胞传代适应对鸡胚皮肤肌细胞也具有病变作用,而且明显、稳定、规律。这个结果与文献上报告不同,这可能与毒株、细胞制备方法、培养方式,感染条件等许多因素有关。森脑病毒对其它细胞敏感性方面也有类似现象的报告,如苏联与捷克实验室保存的HeLa细胞^[11],人胚皮肤肌细

胞^{[1][12-14]}、传代猪肾细胞等^[15-16]。

在我们的具体条件下可确认为, 鸡胚细胞病变是由病毒所致的特异性变化, 主要根据如下: (1) 几株病毒均有此特性; (2) 以病变 TCID₅₀ 终末稀释可连续传递; (3) 同一毒种多次试验获得一致结果, 且所测得的 TCID₅₀ 较稳定; (4) 病变可被原株免疫血清所中和; (5) 病变可被确诊为森脑病人恢复期血清所中和。

关于影响致病变作用的条件和因素, 初步探讨结果认为不仅与病毒株别、细胞维持液有关, 更主要是细胞类型。森脑病毒主要破坏鸡胚成纤维细胞而不易在上皮细胞引起病变, 这点与流行性乙型脑炎^[17]、东方马脑脊髓炎^[18]、委内瑞拉马脑脊髓炎^[19]等病毒均选择性破坏成纤维细胞的特性相似。

应用组织培养法进行森脑病毒中和试验文献上曾有过一些报道, 证明其结果与小鼠法相一致或更为敏感^{[12][20-23]}。由于应用猪肾、人胚皮肤肌来源有困难, 不同实验室保存的 HeLa 细胞对病毒的敏感性不完全一致, 使广泛应用受到了限制。鸡胚细胞对病毒的敏感性受外界条件因素的影响较传代细胞株或者他种动物组织为小, 而且制备方法简易、价格低廉。另外, 细胞中和试验在森脑病毒上应用比小鼠法简便, 不仅可节省大量小白鼠, 而且判定结果时间短, 血清用量少 (每次 0.1 毫升即可), 这样可考虑不必从静脉采血, 可试用微量采血法, 这将给诊断、流行病学调查以及有关科学研究工作提供有利条件。

参 考 文 献

- [1] Mayer, V.: Biology of virus of tick-borne encephalitis complex (ed. H. Libikova), Czechoslovak Acad. Sci., Praha, 1962, pp. 145—151.
- [2] Levkovich, E. N. and L. G. Karpovich: *ibid.*, pp. 161—165.
- [3] Gaidamovich, S. Ya. and V. R. Obukhova: *ibid.*, pp. 191—194.
- [4] Zasukhina, G. D.: *ibid.*, pp. 228—231.
- [5] Анджапаридзе О. Г. и Н. Н. Богомолова: *Вопр. вирусол.*, 2: 136—143, 1961.
- [6] Levkovich, E. N. and G. D. Zasukhina: *Acta Virol.*, 3: 73—81, 1959.
- [7] Morimoto, T. et al.: *Japan J. Exp. Med.*, 32: 163—183, 1962.
- [8] Libikova, H.: 同文献 1, pp. 40—49.
- [9] Morimoto, et al.: *Arch. Fur Virusforsch.*, 13: 511—528, 1963.
- [10] Анджапаридзе О. Г. и др.: *Вопр. вирусол.*, 2: 165—167, 1965.
- [11] Libikova, H.: *Acta Virol.*, 7: 516—524, 1963.
- [12] Засухина Т. Д.: *Вопр. вирусол.*, 2: 198—204, 1959.
- [13] Henmi, M.: *Virus*, 8: 406—415, 1958.
- [14] Засухина Т. Д. и Е. Н. Левкович: *Вопр. вирусол.*, 4: 234—238, 1957.
- [15] Malkova, D. et al.: 同文献 1, pp. 205—207.
- [16] Семенов Б. Ф.: *Вопр. вирусол.*, 2: 143—146, 1961.
- [17] 郭辉玉: *微生物学报*, 8: 116—124, 1960.
- [18] Medearis, D. N. and S. Kibricks: *P. S. E. B. M.*, 97: 152—158, 1958.
- [19] 池田英夫: *Virus*, 5: 286—297, 1955.
- [20] Засухина Т. Д.: *Вопр. вирусол.*, 2: 250—252, 1960.
- [21] Libikova, H. and J. Vilcek: *Acta Virol.*, 4: 165—172, 1960.
- [22] Libikova, H. and J. Vilcek: *Acta Virol.*, 5: 379—385, 1961.
- [23] Libikova, H. et al.: *Acta Virol.*, 5: 262, 1961.

CYTOPATHIC EFFECT OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN CHICK EMBRYO CELLS AND ITS APPLICATION

Huang Yung-cheng Bao Zang-wen Xu Shi-rong Xin Jun

(*Changchun Serum and Vaccine Institute, Changchun*)

Some strains of tick-borne encephalitis virus exerted a marked cytopathogenic effect on fibroblast cell cultures prepared from the skin-muscle tissue of chick embryo. The specificity of the CPE was confirmed by neutralization test with homologous immune serum. The CPE of the virus and its propagation were evident in each passage.

The cytopathogenic titers in monolayer cell cultures varied from 7.0 to 9.0 log TCID₅₀, corresponding approximately

to the virus titer estimated in mice.

A simple and sensitive neutralization test for tick-borne encephalitis virus in chick embryo monolayer cell cultures was elaborated. Based on these results this method might be applied in the diagnosis and serological survey of tick-borne encephalitis.

The role of the above mentioned factors which influenced the cytopathogenicity of the tick-borne encephalitis virus was discussed.