

# 仙台病毒抗血清与补体对靶细胞的免疫溶解作用

邓 钢 黄祯祥 陈勤生

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

靶细胞免疫溶解作用在病毒感染时所产生的免疫病理和疾病恢复等方面具有一定意义。本文报告了仙台病毒感染的地鼠肾细胞在病毒特异抗体和豚鼠补体作用下产生细胞溶解的体外试验结果。细胞溶解率可达 90% 左右。抗体补体对靶细胞的免疫溶解作用和下列因素有关:

1. 兔血清内有一种非特异性细胞溶解作用, 该因子经 56℃ 灭活 1 小时可去除。
2. 抗体对靶细胞的免疫溶解作用的产生需要足够量特异抗体的参与。当兔免疫血清稀释度为 1:100 时, 可引起 90% 左右细胞溶解; 血清稀释度高于 1:200 时, 试验和对照的细胞溶解率无差别。
3. 靶细胞的免疫溶解率和补体量有关。1:5 稀释度的补体量可引起绝大部分靶细胞溶解。
4. 靶细胞膜上的病毒抗原量和细胞溶解作用呈平行关系。病毒感染 18 小时后, 靶细胞表面已出现有足够的病毒抗原, 故此时可获得理想的靶细胞溶解的效果。靶细胞表面红血球吸附的程度可作为靶细胞膜上的病毒抗原数量测定的指征。
5. 兔免疫血清的细胞溶解率高于鸡免疫血清, 其原因可能与两者血清中所含的特异抗体量差别有关。

病毒特异性抗体和补体系统所致的细胞溶解作用, 在病毒感染和恢复方面具有一定作用<sup>[1-4]</sup>。淋巴脉络丛脑膜炎病毒的抗原抗体结合物在补体参与下, 可直接损伤小鼠的某些脏器, 并影响到疾病的发展和转归<sup>[1]</sup>。Old<sup>[5]</sup> 和 Eaton<sup>[6]</sup> 等用免疫溶解作用治疗小鼠肿瘤, 取得一定效果。据此, 我们对病毒特异抗体和补体介导的靶细胞的免疫溶解作用做了探讨, 现将结果报道如下:

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 病毒: 仙台病毒株系由本所毒种室供给。病毒接种于 10 天龄鸡胚, 置 35℃ 培育 48 小时, 收取尿囊液。于实验当天, 将病毒液以不含牛血清的细胞维持液以 1:10 稀释感染靶细胞。

2. 兔免疫血清制备: 将血凝滴度在 1:128 以上的仙台病毒液, 先经 1,000 转/分离心 5 分钟, 去除尿囊液中沉淀物, 用原病毒液免疫家兔。第一次用 10ml 病毒液经兔耳缘静脉注射, 间隔一周再进行 10ml 病毒液的腹腔注射, 腹腔免疫共两次。于末次注射后间隔一周, 采血分离血清, 置 -20℃ 冻存储用。血清用前经 56℃ 灭活 1 小时, 并用不含牛血清的靶细胞维持液稀释。

同时, 采用正常鸡胚尿囊液, 按上述方法制备正常兔对照血清。

兔免疫和正常血清经琼脂双扩散沉淀试验及聚丙烯酰胺凝胶电泳检查, 前者含有仙台病毒的特异性抗体, 其血凝抑制抗体滴度为 1:200; 后者无特异抗体存在。

3. 鸡免疫血清制备: 将仙台病毒液离心后, 以 3ml 病毒原液注入公鸡翼静脉。同时取 8ml 病

本文于 1980 年 4 月 26 日收到。

毒液注射鸡腹腔。以后,每隔 1—2 周按同法免疫,共 3 次。于末次注射后一周,采血分离血清,置低温条件下保存备用。血清经琼脂双扩散沉淀试验检查,含有病毒特异抗体,其血凝抑制抗体滴度为 1:60。用前血清以无菌生理盐水稀释成 1:5,经 56℃ 灭活 50 分钟,以去除非特异性因子。

4. 补体: 采多只健康豚鼠血,分离血清,混合保存于 -20℃ 备用。以 1:5 稀释用于试验。

5. 靶细胞: 以 1:10 稀释度的仙台病毒液 0.2 ml 感染原代地鼠肾细胞管,置 37℃ 培育 1 小时,用 Hank's 液洗涤细胞,加入含有 5% 牛血清的乳蛋白水解物 Hank's 液,置 37℃ 培养至所需要的时间止。

6. 鸡血球悬液: 血凝试验采用 1% 鸡血球浓度;靶细胞血球吸附试验用 1—20% 鸡血球浓度。

7. 台盼蓝 (Trypan blue) 染液: 用生理盐水配制成 0.15% 浓度,置 4℃ 备用。

## (二) 方法

1. 靶细胞免疫溶解试验: 将病毒稀释液按每管细胞 0.2ml 接种,对照细胞管只接种不含病毒稀释液。上述细胞管放 37℃ 恒温室,培育 1 小时,弃去残存的病毒液,用 pH7.6—7.8 的 Hank's 液洗涤细胞一次,加入细胞维持液,再根据试验需要置 37℃ 培育不同时间,然后将细胞分组进行实验。一部分用于血球吸附试验及血凝测定;另一部分用于细胞溶解试验。于细胞溶解试验组中,每管细胞加入 1:100 稀释度的兔血清 0.3ml,同时加入 1:5 稀释度豚鼠血清 0.3ml。将细胞置 37℃ 作用 1 小时,弃去多余的抗体和补体,加入 0.15% 台盼蓝液 0.5ml,置室温染色 30 分钟,以生理盐水轻洗细胞 3 次,在普通显微镜下,采用每个细胞管的五个固定位置,统计细胞溶解后被台盼蓝着色的面积,再按如下公式计算细胞溶解百分率。

$$\frac{\text{实验组细胞着色面积均数}(\%) - \text{各对照组细胞着色面积均数}(\%)}{100\% - \text{各对照组细胞着色面积均数}(\%)} \times 100\%$$

实验中除有正常细胞对照外,还有血清和补体对照。

2. 血球吸附试验: 靶细胞在 37℃ 培养一定时间后,弃清液。一部分培养液用于血凝测定;同

时向细胞管内加入 1% 浓度的鸡血球悬液,在室温下吸附 30 分钟,然后用生理盐水洗涤 3 次,置显微镜下计算红血球在细胞表面上的吸附百分率,以此做为判断细胞表面病毒抗原量,并以细胞液中血凝滴度做为病毒释放量的判断指标。

## 结 果

### (一) 兔免疫血清非特异性物质的去除

实验初始,我们以 1:20 浓度兔免疫血清进行实验,常呈现很高的非特异性细胞溶解,故如何去除该物质应是首先要解决的问题。

由表 1 可见,当兔血清经 56℃ 灭活 30 分钟后用于试验,在试验组细胞管中,有 75% 的细胞由于毒性作用从管壁脱落,可见如此处理的血清不能去除非特异性细胞毒物质。若将灭活时间延长 1 倍,则非特异性物质基本可除去,并呈现出特异性的细胞溶解现象,溶解率可达 100%。因此,在试验中兔血清均用 56℃ 灭活 1 小时。

### (二) 兔免疫血清溶解靶细胞的有效浓度

为了获得溶解作用的最低限度兔免疫血清的用量,用 1:50、1:80、1:100 和 1:200 等不同稀释度的兔血清进行实验。除病毒感染细胞后,需在 37℃ 培养 18 小时外,其余均按方法中有关部分进行试验。

当兔免疫血清的稀释度为 1:50—1:80 时,实验组的靶细胞溶解率为 100%。此时,显微镜下可见到该靶细胞核和胞浆肿胀、胞核着色较深、胞浆着浅蓝色、胞膜呈现破碎等现象。血清稀释度为 1:100 时,溶解率稍下降,但仍可达到 90% 左右。若血清进一步稀释到 1:200,则试验与各对照组无区别。

### (三) 豚鼠补体量与细胞溶解率的关系

表 1 兔血清热灭活时间对去除非特异性物质的影响

Table 1 Time of Inactivation of Rabbit Serum for the Elimination of the Non-specific Cytotoxicity

|                                  | 56℃ 30min               |                               | 56℃ 1h                  |                               |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
|                                  | 细胞脱落<br>Cell detachment | 细胞着色(%)<br>% of Stained cells | 细胞脱落<br>Cell detachment | 细胞着色(%)<br>% of Stained cells |
| 免疫血清+补体<br>Immune serum + Compl. | +++                     | 100                           | —                       | 100                           |
| 免疫血清对照<br>Immune serum           | —                       | 70                            | —                       | 20                            |
| 正常血清+补体<br>Normal serum + C      | —                       | 80                            | —                       | 30                            |
| 正常血清对照<br>Normal serum           | —                       | 80                            | —                       | 30                            |
| 补体对照<br>Complement               | —                       | 30                            | —                       | 30                            |
| 细胞对照<br>Cell                     | —                       | 30                            | —                       | —                             |

注: “+++”表示 75% 细胞脱落; “—”无细胞脱落。  
Notes: “+++” 75% cell detached; “—” no cell detached.

表 2 不同稀释度兔免疫血清对靶细胞溶解的影响

Table 2 Influence of Dilution of Immune Rabbit Serum on the Cytolysis of Target Cells

| 补 体<br>Complement             | 免疫血清<br>Immune serum |      |       |       | 正常血清<br>Normal serum |      |       |       |
|-------------------------------|----------------------|------|-------|-------|----------------------|------|-------|-------|
|                               | 1:50                 | 1:80 | 1:100 | 1:200 | 1:50                 | 1:80 | 1:100 | 1:200 |
| 加入补体(%)<br>With complement    | 100                  | 100  | 90    | <10   | <10                  | 15   | <10   | <10   |
| 未加补体(%)<br>Without complement | <10                  | <10  | <10   | <10   | <10                  | <10  | <10   | <10   |

表 3 不同稀释度豚鼠补体对靶细胞溶解的作用

Table 3 Effect of Different Dilution of G. Pig Complement on Cytolysis of Target Cells

| 组 别<br>Group                  | 豚鼠补体稀释度<br>Dilution of G. Pig complement |      |      | 兔血清对照<br>Rab. serum control |
|-------------------------------|--|------|------|-----------------------------|
|                               | 1:5                                      | 1:10 | 1:20 |                             |
| 兔免疫血清(%)<br>Rab. I. S.        | 90                                       | 70   | <10  | <10                         |
| 正常兔血清(%)<br>Normal rab. serum | <10                                      | <10  | <10  | <10                         |
| 补体对照(%)<br>Complement         | <10                                      | <10  | <10  |                             |

豚鼠补体的质量可直接影响到靶细胞的免疫溶解作用<sup>[7,8]</sup>, 但补体用量与靶细胞溶解的关系如何, 尚不了解, 为此作了探

索。采用固定量的兔抗血清与稀释度 1:5、1:10 和 1:20 的新鲜豚鼠补体作用于仙台病毒感染 18 小时的靶细胞, 结果见

表 3。

当豚鼠补体稀释度为 1:5 时, 试验组靶细胞的溶解率可达 90%, 稀释度为 1:10 时, 溶解率为 70%; 若补体再进一步稀释, 试验组和对照组则无差别。由此看来, 若想获得 90% 以上靶细胞溶解率, 需要有足够的补体参与, 否则即使有足够量的特异抗体和靶细胞表面的病毒抗原存在, 细胞溶解的效果也将受到影响。

(四) 病毒抗原量对细胞溶解的影响

仙台病毒感染细胞后, 经不同时间培养, 再进行细胞溶解试验, 以观察靶细胞表面的病毒抗原量对细胞溶解的影响。试验组加 1:100 兔免疫血清及补体, 对照组加正常兔血清和补体。

从表 4 可见, 靶细胞在培养 12 小时后, 血球吸附达 50%, 但细胞溶解仅为 12.5%。随着培养时间的增加, 靶细胞血球吸附率上升至 80—90%, 细胞溶解率可达 90—95%。

上述结果表明, 靶细胞表面的病毒抗原量与靶细胞免疫溶解有直接关系。病毒感染细胞后 12 小时, 其细胞膜上的病毒抗原量不如靶细胞已培养了 18 小时以上者多, 因此细胞溶解率也有较大的差异。可见仙台病毒感染的靶细胞至少需要经过 18 小时以上的培养, 才有可能在靶细胞膜上出现足够的病毒抗原量, 从而获得较为

理想的靶细胞免疫溶解的效果。此外, 表中也说明在一定时间内病毒保存时间的长短对细胞溶解的影响不甚密切, 只要病毒感染后在细胞内经一定时间的繁殖, 于细胞膜上有足够量病毒抗原出现, 则有可能获得较为理想的细胞溶解效果。

(五) 兔和鸡免疫血清的溶解效果

为选择适宜的动物免疫血清进行试验, 用仙台病毒感染家兔和莱亨鸡。

仙台病毒感染靶细胞后, 放 37℃ 分别培养至 8、12、16、18 和 24 小时再进行溶解试验。由表 5 可见, 在病毒感染 8 小时的靶细胞中, 两种免疫血清, 基本上均无溶解作用。感染 18 小时靶细胞中, 血球吸附率均在 70% 左右, 血凝滴度为 1:3—1:4; 但细胞溶解效果却有较大差异。兔血清的细胞溶解可达 90%, 而鸡的仅达 60%, 这可能与使用动物不同有关, 还可能与免疫血清的病毒特异抗体含量有关。兔免疫血清的血凝抑制抗体效价为 1:200, 而鸡的仅为 1:60。因此, 可能随着抗体量的变动, 造成了抗体和靶细胞表面病毒抗原相结合数量上的差异。自然要导致靶细胞被溶解的差别。

讨 论

通过细胞膜以芽生方式释放出成熟的病毒可在细胞膜表面, 在补体的参与下, 经

表 4 靶细胞表面病毒抗原量与细胞溶解的关系

Table 4 Relation between the Target Cell Surface Viral Antigens and Cytolysis

| 病毒感染时间(小时)<br>Time after infection (h) | 组 别<br>Group | 鸡血球吸附(%)<br>Hemadsorption | 台盼蓝着色(%)<br>Stained cells |
|--|--------------|---------------------------|---------------------------|
| 12                                     | 试验 (E)       | 50                        | 12.5                      |
|  | 对照 (C)       | 50                        | 10                        |
| 18                                     | 试验 (E)       | 80                        | 90                        |
|  | 对照 (C)       | 80                        | 15                        |
| 24                                     | 试验 (E)       | 90                        | 95                        |
|  | 对照 (C)       | 90                        | 17.5                      |

E = Experiment C = Control

表5 仙台病毒家兔和鸡免疫血清对靶细胞溶解作用的比较

Table 5 Comparison between the Rabbit and Chicken Sendai Virus Immune Serum on the Cytolysis of Target Cells

| 血清<br>Serum            | 试验<br>Experiment             | 组别<br>Group | 病毒感染时间<br>Time of virus infection (h) |     |       |     |      |
|------------------------|------------------------------|-------------|---------------------------------------|-----|-------|-----|------|
|                        |                              |             | 8                                     | 12  | 16    | 18  | 24   |
| 兔免疫血清<br>Rab. I. S.    | 细胞溶解(%)<br>Cytolysis (%)     | 试验 (E)      | 20                                    | 30  | 80    | 90  | ≈100 |
|                        |                              | 对照 (C)      | 10                                    | 20  | 20    | 20  | 20   |
|                        | 血球吸附(%)<br>Hemadsorption (%) | 试验 (E)      | —                                     | 20  | 50    | 70  | 80   |
|                        |                              | 对照 (C)      | —                                     | —   | —     | —   | —    |
|                        | 血凝滴度<br>Hemagglutination     | 试验 (E)      | —                                     | —   | 原液(+) | 1:3 | 1:4  |
|                        |                              | 对照 (C)      | —                                     | —   | —     | —   | —    |
| 鸡免疫血清<br>Chicken I. S. | 细胞溶解(%)<br>Cytolysis (%)     | 试验 (E)      | 25                                    | 65  | /     | 60  | /    |
|                        |                              | 对照 (C)      | 25                                    | 20  | /     | 20  | /    |
|                        | 血球吸附(%)<br>Hemadsorption (%) | 试验 (E)      | 10                                    | 20  | 50    | 60  | /    |
|                        |                              | 对照 (C)      | —                                     | —   | —     | —   | /    |
|                        | 血凝滴度<br>Hemagglutination     | 试验 (E)      | —                                     | 1:4 | 1:4   | 1:4 | /    |
|                        |                              | 对照 (C)      | —                                     | —   | —     | —   | /    |

注: “—”表示阴性结果; “/”未测。Notes: “—” negative; “/” not tested.

与病毒特异抗体的作用, 导致受感染的靶细胞发生免疫溶解。可产生这种作用的病毒有淋巴脉络丛脑炎病毒<sup>[7]</sup>、仙台<sup>[9]</sup>、痘苗<sup>[1]</sup>、单纯疱疹<sup>[10-13]</sup>、新城鸡瘟<sup>[6,9]</sup>、腮腺炎<sup>[14]</sup>及苏联春夏型脑炎<sup>[15]</sup>等病毒。由此可见, 上述的细胞溶解作用在病毒感染中广泛地存在。此种作用一方面可导致病理的产生, 另外, 据报道还释放出一种因子, 吸引白血球向损伤的细胞部位移动, 因此细胞溶解在病毒性感染的炎症发生上也有一定作用<sup>[1, 16]</sup>。从某些小鼠病毒性肿瘤的研究结果看<sup>[15, 6]</sup>, 这种作用在某些肿瘤的免疫治疗方面, 或许有一定意义。

至于兔免疫血清对靶细胞免疫溶解的效果较鸡免疫血清为好, 其原因可能与血清中所含的抗体量有关。用血凝抑制试验测定, 兔免疫血清的血凝抑制抗体要高于

鸡免疫血清。此外, 动物种类不同是否有影响, 仍值得探讨。Eaton<sup>[9]</sup> 等曾报告抗病毒的兔免疫血清经 56℃ 灭活, 有提高细胞溶解的作用。本试验所得的上述不同血清的细胞溶解效果, 也可能与采用的是经 56℃ 灭活的兔免疫血清有关。

## 参 考 文 献

- [1] Notkins, A. L.: in *Progress in Immunology*, Ed. by B. Amos, p. 779, 1971.
- [2] Porter, D. D.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 25: 383, 1971.
- [3] Rawls, W. E. & Tompkins, W. A. F.: in *Viral Immunology & Immunopathology*, Ed. by A. L. Notkins, p. 99, 1975.
- [4] Notkins, A. L.: in *Progress in Immunol.* First International Congress of Immunol., Ed. by B. Amos, p. 779, 1971.
- [5] Old, L. J. et al.: *Cancer Res.*, 23: 1063, 1963.
- [6] Eaton, M. D. & Scala, A. R.: *Proc. Soc. Exp.*

- Biol. Med.*, **132**: 20, 1969.
- [7] Wiktor, T. L. et al.: *J. Immunol.*, **101**: 1271, 1968.
- [8] Philip, R. Roane & Roizman, B.: *Viol.*, **22**: 1, 1964.
- [9] Eaton, M. D. & Scala, A. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **133**: 615, 1970.
- [10] Minagawa, T. & Yamada, M.: *Japan J. Microbiol.*, **15**: 341, 1971.
- [11] Brier, A. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **68**: 3073, 1971.
- [12] Roane, P. R., Jr. & Roizman, B.: *Viol.*, **22**: 1, 1964.
- [13] Smith, J. W. et al.: *J. Immunol.*, **109**: 554, 1972.
- [14] Oldstone, M. B. A. & Dixon, F. J.: *J. Immunol.*, **107**: 1274, 1971.
- [15] Telisch, V. M. et al.: Abstr. 15 Meet Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis AMS. USSR, Moscow, p. 79, 1975.
- [16] Synderman, R. C. et al.: *J. Infect. Dis.*, **126**: 207, 1972.

## IMMUNOCYTOLYSIS OF TARGET CELLS BY ANTISERUM OF SENDAI VIRUS AND COMPLEMENT

Deng Gang Huang Zhenxiang Chen Qinsheng

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Immunocytolysis of virus-infected cells by antiserum and complement is one of the mechanism in viral immunopathology and recovery of the disease. This paper shows the in vitro immunocytolysis of hamster kidney cells infected with Sendai virus by its specific antibodies together with guinea pig complement. The positive rate of immunocytolysis in the experiments was about 90 per cent. Several conditions influencing the specific immunocytolysis are found as follows: 1. A nonspecific heat labile factor causing cytotoxicity was found in rabbit serum, which could be destroyed by heat treatment at 56°C for one hour; 2. To obtain maximum immunocytolysis, sufficient amount of antibodies was needed. The 100% immunocytolysis occurred with immune rabbit serum at 1:50—1:80 dilution and about 90% immunocytolysis occurred at 1:100 dilution, but when the immune serum was diluted to 1:200, there was no difference in the immunocytolysis rate between the experiment and the controlled group; 3. The rate of immunocytolysis is related to

the amount of the complement used. Most of the target cells were destroyed by the antibodies when the dilution of guinea pig serum used was 1:5; and the immunocytolysis was decreased if the complement was diluted to 1:10—1:20; 4. The experiments showed a parallel relationship between the amount of virus antigen on the membrane of target cells and the degree of cell immunocytolysis. The satisfactory results were obtained when sufficient virus antigens appeared on the surface of target cells 18 hrs after the virus infection. The degree of hemadsorption of the target cells could be used as an index for measuring the amount of virus antigen on target cells. It showed that a satisfactory cell immunocytolysis could be obtained when over 80% positive hemadsorption occurred on the target cells; 5. The immunocytolysis rate of rabbit immune serum was found to be higher than the cock immune serum in the experiment which was probably related to the lower antibody titer in the cock serum.