

# 普氏立克次体的组织培养

## II. 培养普氏立克次体单层细胞的选择

安清武 卿乐怀\* 魏文彬

(成都生物制品研究所, 成都)

本文报告了从 9 种组织培养中选出 3 种, 即鼠胚皮肌细胞、鼠胚肺细胞及 Detroit-6 传代细胞均能使普氏立克次体发育良好。较详细地描述了此病原体在这些细胞中生长繁殖的规律, 并发现其在传代细胞中增殖高峰时, 能使受染细胞产生特异性的形态学变化。进一步证明普氏立克次体在细胞中的生长特点是在胞浆内繁殖, 在组织培养中不能长期传代。

作者曾报告<sup>[1]</sup>用鼠胚肺单层细胞培养普氏立克次体获得成功。但由于该类细胞产量太少, 不能满足研究工作的需要。为此又试验了 9 种单层细胞培养——胚胎组织三种、肾组织三种、睾丸组织一种及传代细胞两种等。现将结果报告如下。

### 材料与方 法

#### (一) 立克次体毒株

实验中主要采用普氏立克次体“Π”株鼠肺毒种<sup>[1]</sup>, 个别试验中使用了适应于鸡胚卵黄囊的“Π”种和莫氏立克次体“H”株鼠肺毒种。

#### (二) 原代单层细胞培养

1. 鼠胚皮肌细胞: 取即将分娩的小白鼠经消毒后剖腹取胚。一般每胎有 7—8 个鼠胚。将头、四肢及内脏去掉, 余下的组织剪成乳糜状加胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 每 ml 含  $2.5—3 \times 10^6$  细胞, 加与 [I] 报相同的生长液, 分装于放有一张  $1.2 \times 0.6$  cm 盖玻片的培养瓶中, 放  $37^\circ\text{C}$  静置培养, 4—6 天后形成致密的细胞单层。细胞培养时加有青、链双抗, 接种立克次体后不加双抗(下同)。

2. 鸡胚细胞: 按常规法制成细胞悬液。加与 [I] 报相同的生长液, 唯液中小牛血清的含量减少为 5%, pH7.6—7.8。每 ml 含  $3—4 \times 10^6$  细胞。

以后改用含 5% 小牛血清、0.5% 乳蛋白水解物 Hank's 液作生长液。接种量青霉素瓶 1ml, 克氏扁瓶 80ml, 在  $37^\circ\text{C}$  静置培养两天后形成单层。

3. 肾细胞: 主要来自雄性豚鼠、大白鼠和金地鼠, 其体重分别为 110 g, 60—80 g 及 50 g。无菌操作剪取皮质部分, 按常规法制成细胞悬液, 每毫升含  $3—4 \times 10^6$  细胞。生长液的成分及 pH 均与 [I] 报相同。分装培养瓶后放  $37^\circ\text{C}$  静置培养, 经 4—5 天形成单层。

4. 金地鼠睾丸细胞: 于取肾同时摘出睾丸, 剥去睾丸鞘膜后, 剪碎, 以 Hank's 液洗三次, 加入 0.25% 胰蛋白酶液, 在  $37^\circ\text{C}$  水浴中消化半小时, 经轻轻吹打后收集细胞悬液, 用脱脂纱布过滤, 以 800—1,000 转/分离心 5—10 分钟, 弃去上清液再以 Hank's 液洗一次后, 将细胞悬浮于与 [I] 报相同的生长液中, 每 ml 含  $1 \times 10^6$  细胞, 分装青霉素瓶中, 每瓶 1ml, 放  $37^\circ\text{C}$  静置培养。3—4 天换液 1 次, 7—8 天形成单层。

#### (三) 传代细胞培养

本文使用 Detroit-6 及 Walker 肉瘤 256 传代细胞株。按常规法分散和培养。其生长液为\*199 液 40%、0.5% 乳蛋白水解物 Hank's 液 40% 及小牛血清 20%。每 ml 含  $8 \times 10^5$  细胞, 分装青

本文于 1980 年 9 月 25 日收到。

\* 现在泸州医学院。

毒素瓶中,每瓶 1ml。由于 Detroit-6 细胞生长较快,2—3 天即应换液,3—4 天形成单层。

#### (四) 感染方法

将形成单层细胞管中的营养液倾去,用 Earle 液洗 2 次,然后加入 1:50 上述毒种悬液,在室温接触感染 1 小时,倾去毒种悬液再洗 1—2 次。维持液除传代细胞外均为 10% 小牛血清的 #199 培养液,调 pH 为 7.6,放 35°C 静置培养。感染后不需换液。

#### (五) 培养物的观察和滴定

自感染后逐日取出培养瓶中的盖玻片,按文献 [2] 方法染色镜检,观察不同时间的立克次体形态及计数细胞感染率。

1. 小白鼠感染试验: 逐日镜检时,分别取立克次体繁殖高峰时(一般为 4—6 天)的受染细胞制成悬液,离心沉淀后取上清经鼻接种 8—10g 小白鼠。将发病濒死的或观察到期(一般为 6 天)的小白鼠取肺制片、染色及镜检,按通用方法计算立克次体含量。正常细胞对照按同样方法处理。

2. 豚鼠感染试验: 取感染普氏立克次体的各类细胞培养物,倾去液体,刮取细胞打碎,加入原液量二分之一的 Hank's 液 (pH7.2—7.4) 制成悬液,经离心后,取上清液腹腔感染豚鼠,每只动物接种量 1.5—2.0ml。并附以正常细胞对照,按同样方法感染豚鼠。

接种后每天测量动物体温,并观察阴囊反应,共 21 天。然后采血作补体结合试验。

#### (六) 普氏立克次体在鸡胚细胞和鼠胚皮肤细胞的传代试验

取细胞感染率达到高峰时的培养瓶,倾去液体,刮下单层细胞打碎制成悬液,经离心后取上清液感染另一批正常的单层细胞培养管。感染方法及培养条件均与“(四)”相同。并作小白鼠感染试验。

## 结 果

### (一) 在单层细胞中的繁殖动态

1. 鼠胚皮肤细胞: 自感染后 24 小时可见到立克次体增殖的迹象。立克次体呈杆状及丝状,每个感染细胞的胞浆内有 3—5 个,约 4% 的胞浆中有原始小体(initial

bodies)。48 小时后约有 20% 的细胞受到感染。立克次体先侵犯上皮细胞,后侵犯纤维母细胞。72 小时有 50—60% 细胞感染,此时胞浆内有 30—50 乃至 70—80 个杆状立克次体。96 小时有 70—80% 细胞内充满了小杆状立克次体,有时在同一胞浆内仍可看到 3—5 条丝状立克次体(图版 I-1)。

第 5 天细胞感染率达 90% 以上,多数胞浆开始破裂而立克次体游离胞外。作者一再观察到纤维母细胞充满大量立克次体亦不易破裂;上皮细胞常因充满大量立克次体而破裂,这表明纤维母细胞胞壁较坚韧。

第 6—7 天后,细胞感染率无明显增多,细胞单层开始脱落,表明立克次体在细胞中繁殖高峰已过。

2. 鸡胚细胞: 感染立克次体 48 小时后,约有 15—30% 的胞浆内出现大小不等的空泡,此时应及时换液。4 天后约有 30—45% 的细胞内充满了球状立克次体。这时仍可看到上皮细胞先受到感染(图版 I-2)。空泡体积增大,用低倍镜观察时,发现这类细胞有圆变的倾向。感染后第 5—6 天有 60—70% 细胞充满了立克次体,但细胞退化,有些细胞核破碎,胞膜消失或界限不清,大量立克次体游离胞外(图版 I-3)。感染后期(第 7—9 天)单层细胞成片脱落,立克次体呈小球形,着色性减弱,此时往往不能使小白鼠感染(图版 I-4)。

3. 豚鼠肾细胞: 感染后 72 小时内查不出有立克次体增殖的迹象,但可见到空泡形成。96 小时后始可看到杆状立克次体,由 3—5 乃至 20—30 个不等,呈散在性分布。部分标本中可看到立克次体聚集呈团块状,并有大量空泡存在,在空泡间隙及多数细胞内有杆状立克次体。第 5—6 天后除杆状外仍可看到丝状立克次体。自第

7 天起细胞充满小杆状立克次体。有的细胞破裂，游离出的立克次体又侵犯邻近细胞，因之细胞呈继发性感染，故立克次体呈多形性。感染后第 9—10 天，立克次体开始自溶。由于豚鼠肾细胞维持时间长，直至 14 天仍可看到自溶的立克次体与丝状体并存的现象。

4. 大白鼠肾细胞：该细胞感染普氏立克次体后没有观察到立克次体增殖的征象。但对莫氏立克次体极为敏感。立克次体繁殖高峰出现较迟（一般在第 7—15 天才达到高峰），但立克次体的形态仍以小杆状为主，繁殖极期时呈球杆状。

5. 金地鼠睾丸细胞：感染后 24 小时少数细胞受到侵犯，立克次体在细胞内易形成团块状。每个团块由数个至几十个立克次体组成。第 3—4 天，立克次体数量增多，少数细胞充满大量立克次体时，细胞破裂而立克次体游出胞外，呈放射性分布。有时充满立克次体的细胞体积增大。感染可持续到第 10—14 天。金地鼠睾丸细胞中的立克次体形态特点为杆状，始终未见到球状。

6. 金地鼠肾细胞：普氏立克次体在这类细胞中的繁殖与睾丸细胞截然不同。感染后第 3 天可在细胞中查到立克次体团块，但数量远较睾丸细胞为少。感染后期（第 8—10 天）有 60—70% 的细胞充满大量的杆状立克次体。

7. 鼠胚肺细胞：基本上与 [I] 报相同。

8. Detroit-6 传代细胞：这种细胞感染普氏立克次体 24 小时后，在胞浆中有 2—3—5 个立克次体，离核较近。有时可见到 3—5 个形成团块，周围有丝状立克次体。有些胞核收缩，染色质着色较深，但仍可看到 3—5 个核仁。48 小时后立克次体数量增多，每个细胞有 10—30 个不等，位于胞浆边缘呈蛇状。72 小时后立克次体

突然增至无法计数，约有 20% 的细胞充满立克次体，另有 30% 的细胞内有 2/3 面积被立克次体侵犯，此时胞膜尚未变形。96 小时后约有 80—85% 细胞充满小杆状立克次体，少数细胞破裂，立克次体游离胞外。这时细胞有两种重要的形态学上的变化。其一为巨大细胞的出现，较正常细胞大 7—8 倍至 10 倍以上。除胞浆内充满立克次体外，并有大量的空泡呈散在性分布，可持续到 8—9 天（图版 I-5）。另一重要的形态学特征为融合细胞样的细胞团（Syncytium-like cellular aggregates）的形成。这种细胞团由许多细胞组成，核与核之间以二维元（平面的）（two dimensional）方式紧密排列，因此整个细胞在外观上与融合多核巨大细胞极为近似（图版 I-6）。

第 6—7 天后大多数细胞失去正常的细胞形态，少数细胞在形态上仍较完整但折光性减弱。第 7—8 天后则有大量的立克次体游离胞浆之外。

9. Walker 氏肉瘤 256 传代细胞：此细胞感染普氏立克次体后没有见到立克次体增殖的迹象。这类细胞对普氏立克次体不敏感，但到 72—96 小时有 90% 细胞变圆，部分细胞脱落，显系中毒的表现。经小白鼠感染试验证明，普氏立克次体在 Walker 氏肉瘤传代细胞中不能增殖。

## （二）在三种组织培养中的生长曲线

为了比较鼠胚皮肤、鸡胚和 Detroit-6 三种单层细胞对普氏立克次体的敏感性与细胞感染率的关系，分别抽取每种细胞于感染后 2、4、6 及 8 天的培养管中的盖玻片固定、染色，进行镜检，计算出每种细胞的感染率，结果见图 1。

由上图中明显看出 Detroit-6 传代细胞和鼠胚皮肤细胞对普氏立克次体具有较高的敏感性。这两种细胞的感染率与立克次体增殖高峰成正比。Detroit-6 细胞中

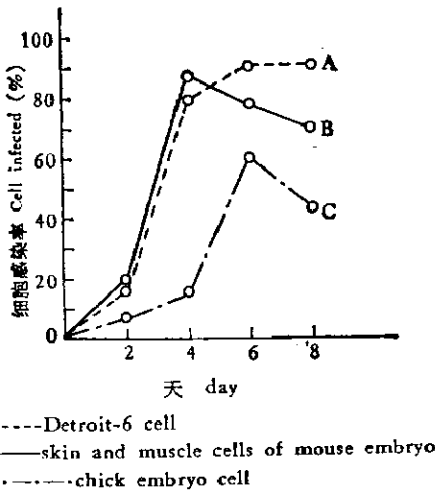


图 1 普氏立克次体在三种组织培养中的生长曲线(细胞感染率)

立克次体下降较为缓慢。鸡胚细胞对普氏立克次体的敏感性及其细胞维持的时间都不如前两种细胞长久。立克次体刚开始增殖时,单层细胞即行脱落。

本试验结果表明: 1. 立克次体增殖达到高峰之前, 细胞感染率与培养天数成比例关系; 2. 细胞感染率与受染细胞中的立克次体含量亦成比例; 3. 细胞感染率与毒种接种浓度有密切关联。如用 1:50—1:100 毒种悬液接种感染时, 则细胞感染率为 75—92%。若毒种稀释成 1:200 时则细胞感染率仅有 30%; 4. 细胞感染率与毒种的新鲜度也有关系。

### (三) 在单层细胞中的传代试验

作者重点研究了鼠胚皮肤和鸡胚细胞的传代试验。在鸡胚细胞中传至第 3 代时培养物对小白鼠的致病力明显降低, 取鼠肺涂片镜检难以检出立克次体。在鸡胚细胞传代中的立克次体形态极易变为微小球形, 着色性弱, 显然是立克次体毒性减弱的象征。

在鼠胚皮肤细胞中传代与鸡胚细胞极为近似, 但立克次体的形态变化较为缓慢, 仍能维持传至第 14 代。细胞感染率急剧

下降, 由第 10 代的 23% 降至第 14 代的 2%, 结果立克次体的形态亦由杆状逐渐变为球形, 最后使传代试验中断。

### (四) 动物感染试验

1. 小白鼠感染试验: 作者选择四种立克次体细胞培养物, 镜检证明立克次体增殖达到高峰时, 分别制成悬液, 按前述方法感染小白鼠, 结果列入表 1。

表 1 细胞培养物感染小白鼠的结果

细胞种类	鼠肺中立克次体含量
Detroit-6 细胞	++
鼠胚皮肤细胞	++
鼠胚肺细胞	++
鸡胚细胞	-或±

由上表中明显看出, 鸡胚细胞对普氏立克次体的敏感性最差, 因此很难使小白鼠感染发病致死。鼠胚皮肤细胞、鼠胚肺细胞及 Detroit-6 传代细胞三者敏感性上是很相似的。除细胞感染率高, 立克次体形态较稳定外, 感染小白鼠时常使动物发病致死。由此可见, 上述三种细胞适于繁殖及研究等用。其中鼠胚皮肤细胞最优越, 不仅敏感性高, 而且细胞产量多, 维持时间长。Detroit-6 传代细胞因系肿瘤细胞, 在实际应用上具有很大的局限性。

2. 豚鼠感染试验: 实验组豚鼠于接种后第 3—4 天发热, 体温平均为 40.2°C, 持续 5—7 天, 然后降至正常。对照组动物在此期间内无发热现象。实验组于体温下降后两周采心血作补体结合试验, 结果表明实验组的补体结合滴度对普氏立克次体抗原为 1:160—1:320, 而对照组血清则为阴性。

## 讨 论

试验结果初步从 9 种组织培养中选出 3 种对普氏立克次体敏感的细胞, 即鼠胚皮肤细胞、鼠胚肺细胞和 Detroit-6 传代

细胞。并证明普氏立克次体能在鸡胚细胞中增殖,但其形态易变成微小球形。经小白鼠感染试验证明毒力明显减弱,因而不能引起发病致死。又因鸡胚细胞生长旺盛,生长液变酸较快,可能是导致培养物中立克次体衰亡的重要因素之一。当然试验所用的生长液及维持液是否适宜,还需作进一步探讨。

据作者的经验,普氏立克次体能在鸡胚细胞中增殖,但很不规律。采用鼠胚皮肤细胞和鼠胚肺细胞培养时则无上述缺点。因此我们认为适用于有关立克次体的物质代谢、微细结构及遗传变异的研究。

Detroit-6 传代细胞系癌细胞,除不适于疫苗生产外,可用于毒种分离、抗原制造及免疫荧光快速诊断等研究工作。应当指出普氏立克次体感染 Detroit-6 细胞时极易形成巨大细胞和融合样细胞团,故可认为是一种特异性的形态学变化。

莫氏立克次体在单层细胞中生长特性与普氏立克次体相似,唯立克次体形态呈单一小杆状。莫氏立克次体大量增殖时可检出莫氏细胞,而且数量亦较多,与动物试验感染极其近似。

试验证明,上述三种动物的肾细胞及睾丸细胞对普氏立克次体也很敏感。但大白鼠肾细胞只对莫氏立克次体敏感而对普氏立克次体不敏感,其机理可能与动物种属有关。

用鸡胚细胞和鼠胚皮肤细胞进行立克次体传代试验,结果不能令人满意。这与 Carponi 和 Gamet<sup>[3]</sup> 以及 Кокорин 等<sup>[4]</sup> 报告相同。

除因细胞来源不同对普氏立克次体的敏感性有所差别外,我们还注意到,即使选用对普氏立克次体敏感的细胞,亦需掌握

好两个基本条件,即均匀致密的细胞单层和培养细胞的最适营养液。正如 Cohn 等<sup>[5]</sup> 认为营养液的成分及立克次体的活力对侵入细胞的能力有明显的影 响。Hopps 等<sup>[6]</sup> 亦强调,使细胞培养物得到适当的营养才能有利于立克次体的生存和增殖。本文进一步证明用含 10% 小牛血清的 #199 营养液是培养鼠胚皮肤细胞和维持立克次体活力的最适培养基。

近年, Wike 等<sup>[7]</sup>、Mcdade 等<sup>[8]</sup> 以及 Weinberge 等<sup>[9]</sup> 相继报告,将鸡胚细胞立克次体蚀斑检查法列为鉴定立克次体毒株主要指标之一。Weinberge 等<sup>[9]</sup> 又报告,用鸡胚细胞的蚀斑抑制法建立了一种新的中和试验方法。Omsbee 等<sup>[10]</sup> 以鸡胚细胞等 5 个检定系统对 7 种致病性立克次体感染力的比较,结果表明 Q 热立克次体最富有感染力;而加拿大立克次体感染力最低。并指出 5 个系统中以鸡胚细胞最灵敏;小白鼠检定系统最不敏感。由此可见,上述作者用鸡胚细胞只限于立克次体蚀斑技术的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 魏文彬等: 微生物学报, 12(1): 34, 1966.
- [2] Gimenez D. F.: *Stain Technol.*, 39: 135, 1964.
- [3] Carponi M. and A. Gamet. *Ann. Inst. Pasteur*, 103: 75, 1962.
- [4] Кокорин И. Н. и др: *Вопр. Вирусол.*, 2: 232, 1961.
- [5] Cohn, Z. A. et al.: *J. Exp. Med.*, 109: 271, 1959.
- [6] Hopps, H. E. et al.: *J. Immunol.*, 82: 101, 1959.
- [7] Wike, D. A. et al.: *Infect. Immunol.*, 5: 715, 1972.
- [8] Mcdade, J. E. et al.: *Appl. Microbiol.*, 19(6): 963, 1970.
- [9] Weinberg, E. H. et al.: *J. Bact.*, 98(2): 398, 1969.
- [10] Omsbee, R. et al.: *Infect. Immunol.*, 19: 239, 1978.

## TISSUE CULTURE OF *RICKETTSIA PROWAZEKI*

### II. THE CHOICE OF APPROPRIATE CELL CULTURE SYSTEMS FOR THE CULTIVATION OF *RICKETTSIA PROWAZEKI*

An Qingwu Qing Lehuai\* Wei Wenbin  
(Chengdu Institute of Biological Products, Chengdu)

Among nine kinds of different cell culture systems that had been tested, three was found to be suitable for the cultivation of *Rickettsia prowazeki*, viz., skin and muscle cells of mouse embryo, mouse embryo lung cells and Detroit-6 cell line.

The mode of multiplication and growth of rickettsia in those cell cultures were described in detail. It was noteworthy to observe that in infected Detroit-6 cells there were definite specific morphological changes in the cells themselves, i.e., formation of giant cells and

fusion of cell aggregates. The authors considered this was a useful marker.

Although chick embryo fibroblasts were satisfactory for the cultivation of typhus rickettsia, but their rate of metabolism was rather speedy and rickettsia thus cultivated therein tended to lose their virulence rather rapidly.

The authors confirmed the similar inability of long term serial passages of *R. prowazeki* in those cell systems as described by other authors.

\* Luzhou Medical College, Sichuan.