

甲型肝炎病毒在一株传代细胞 (MERN 株) 中的增殖

毛江森 谢汝英 黄柏章

陈念良 余佩华 丁占初

(浙江人民卫生实验院, 杭州)

用自甲型肝炎患者粪便中分离的甲型肝炎病毒(标本号 T086 和 T085), 感染正常人胚肾的传代细胞 (MERN 株), 在体外连续传代培养 5 代, 进行放射免疫、免疫电镜及免疫粘附血凝试验, 结果证明: 甲型肝炎病毒可以在这种细胞中增殖。在第三代含受感染的细胞悬液标本中, 发现一种含有大量甲型肝炎病毒的囊状体, 大小约 $657 \times 800 \text{nm}$, 由较坚韧的厚度为 9.6nm 的囊膜组成, 在中心区有直径约 180nm 较致密的类似“核心”的结构。

关键词 甲型肝炎病毒; 囊状体; 增殖

Provost 和 Hilleman 报道^[1], 甲型肝炎病毒可以在体外培养的细胞内增殖, 所用的细胞为来自猴胚肾的 FRhK-6 系细胞及狨猴肝原代细胞。Flehmg^[2] 用相同来源的 FRhK-4 系细胞得到了相似的结果。

我们在阐明甲型肝炎病人排病毒规律^[3], 以及证明甲型肝炎病毒可以在红面猴体内增殖^[4] 的基础上, 研究了甲型肝炎病毒在体外培养的细胞中增殖。证明甲型肝炎病毒可以在一株来自正常人胚肾的传代细胞 (MERN 株) 中增殖。同时发现与病毒增殖有关的含有病毒的囊状体, 现将结果报告如下。

材料与方法

(一) 甲型肝炎病毒 (HAV)

来自甲型肝炎患者潜伏期的粪便 (标本号为 T086 及 T085)。用差速离心-聚乙二醇沉淀及 Freon 113 处理法提取^[5], 置液氮冻存备用。

(二) 细胞

MERN 株传代细胞, 系 1963 年获得的正常人胚肾组织, 在体外适应传代而得^[6]。细胞培养液成分 (%): 新生牛血清 10, Eagle's 溶液 42, 0.5% 乳蛋白水解液 42, 青霉素、链霉素及卡那霉素溶液 (各 $10,000$ 单位/ml) 2, $5.6\% \text{NaHCO}_3$ 溶液 4。

用含 5% 新生牛血清的上述培养液作维持液。细胞置 30ml 的小方瓶中, 在 35°C 培养。

(三) 病毒的增殖

弃去细胞的原培养液, 加入甲型肝炎病毒悬液 $0.5 \text{ml}/\text{瓶}$, 置 35°C 2 小时后, 加入细胞培养液 $4.5 \text{ml}/\text{瓶}$, 以后每三天换维持液一次。一般在第十四天收获并传代。收获时, 收集原维持液, 用 0.2% 胰蛋白酶 Hanks' 液处理细胞约 10 分钟, 弃去胰蛋白酶 Hanks' 液, 加入原维持液并分散细胞。此含细胞的维持液供传代及检测用。以不接种病毒悬液与实验组并行进行传代的正常 MERN 细胞作为对照。

(四) 甲型肝炎病毒抗原 (HAAg) 的放射免疫测定

将实验组及对照组的标本用频率为 21 千赫的超声波处理 3 分钟。稀释液为含 50% 小牛血清、 0.2% Tween 20 以及 0.05% EDTA 的磷酸盐缓冲液。用于标记碘 ^{125}I 的甲型肝炎病毒抗体 (IgG), 系从甲型肝炎病人恢复期血清中提取。测定方法同前报^[7]。

(五) 甲型肝炎病毒的免疫电镜检测 (IEM)

待测标本经冻融后, 用 21 千赫超声波处理 3 分钟。抗甲型肝炎病毒血清, 系甲型肝炎病人的

本文于 1982 年 2 月 20 日收到。

浙江省电子显微镜室协助拍摄电镜照片; 张亮、华芬等同志协助放大电镜照片, 特此致谢。

恢复期血清,经免疫粘附血凝试验及 Abbott 放射免疫 HAVAB 药盒检测证明,含高效价的抗甲型肝炎病毒抗体。抗血清用 Hanks' 溶液稀释至 1:80 使用。每 0.9ml 待检测的细胞培养物加 0.1ml 抗血清,36℃ 孵育 1 小时后,置 4℃ 过夜。用 Beckman JA-21 转头,18,000 转/分离心 60 分钟。将沉淀物滴在铜网后,用 2% 磷钨酸 (pH6.8) 负染,在 Hitachi-600 型电子显微镜下观察。免疫粘附血凝试验 (IAHA) 方法同前报^[3]。Abbott HAVAB 放射免疫检测, HAVAB 放射免疫药盒系 Abbott 公

司赠给^[3]。

结 果

(一) 甲型肝炎病毒在 MERN 细胞内增殖的放射免疫检测结果

用放射免疫法检测了自第一代至第五代的标本中的 HAAg。结果 (表 1) 说明,自感染的第二代开始,标本中有 HAAg,其特异 cpm 为 1203—1739。

表 1 放射免疫法检测各代标本中 HAAg 的结果

Table 1 Detection of hepatitis A virus antigens by RIA in serial passage of HAV in MERN cell cultures

项 目 Items	代 数 Passage number				
	1	2	3	4	5
原接种物的稀释倍数 Total dilution of inoculum	2×10^{-7}	4×10^{-11}	8×10^{-15}	1.6×10^{-19}	3.2×10^{-22}
感染细胞收获时间(天) Days of harvest of infected cells	14	12	14	14	14
放射免疫 P/N 值 Radioimmunoassay P/N value	1.5	2.3	2.1	2.6	2.5
HAAg 特异 cpm HAAg specific cpm	484	1376	1203	1739	1603

注: 以每传代一次或换液一次为 10 倍稀释计算。

The dilution of the original inoculum was calculated for each passage level based on an approximate 1:10 dilution at each refeed and on similar dilution at each serial transfer.

(二) 免疫电镜的观察结果

用免疫电镜方法 (IEM) 检查第二、三和五代标本, 均观察到典型的甲型肝炎病毒颗粒 (图 1—3)。同时检查了未接种甲型肝炎病毒的正常 MERN 细胞和用相同方法制备的免疫电镜标本, 均未观察到任何病毒样颗粒。在第二、三和五代标本中观察到的病毒颗粒呈球状, 大小均一, 直径 27nm, 有空心与实心两种形态, 病毒颗粒被抗甲型肝炎病毒的抗体包裹而聚集, 特别是第五代的标本 (图 3), 抗体桥多而清晰。

图 2 是第三代标本的免疫电镜照片, 这份标本在收获后, 于 -30℃ 冻存。化冻

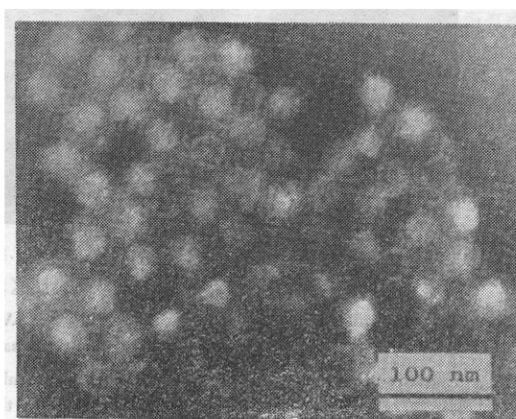


图 1 自感染甲型肝炎病毒的第二代 MERN 细胞分离的甲型肝炎病毒颗粒

Fig. 1 Immune electron micrograph of hepatitis A virus particles detected in the second serial passage of the virus in MERN cells

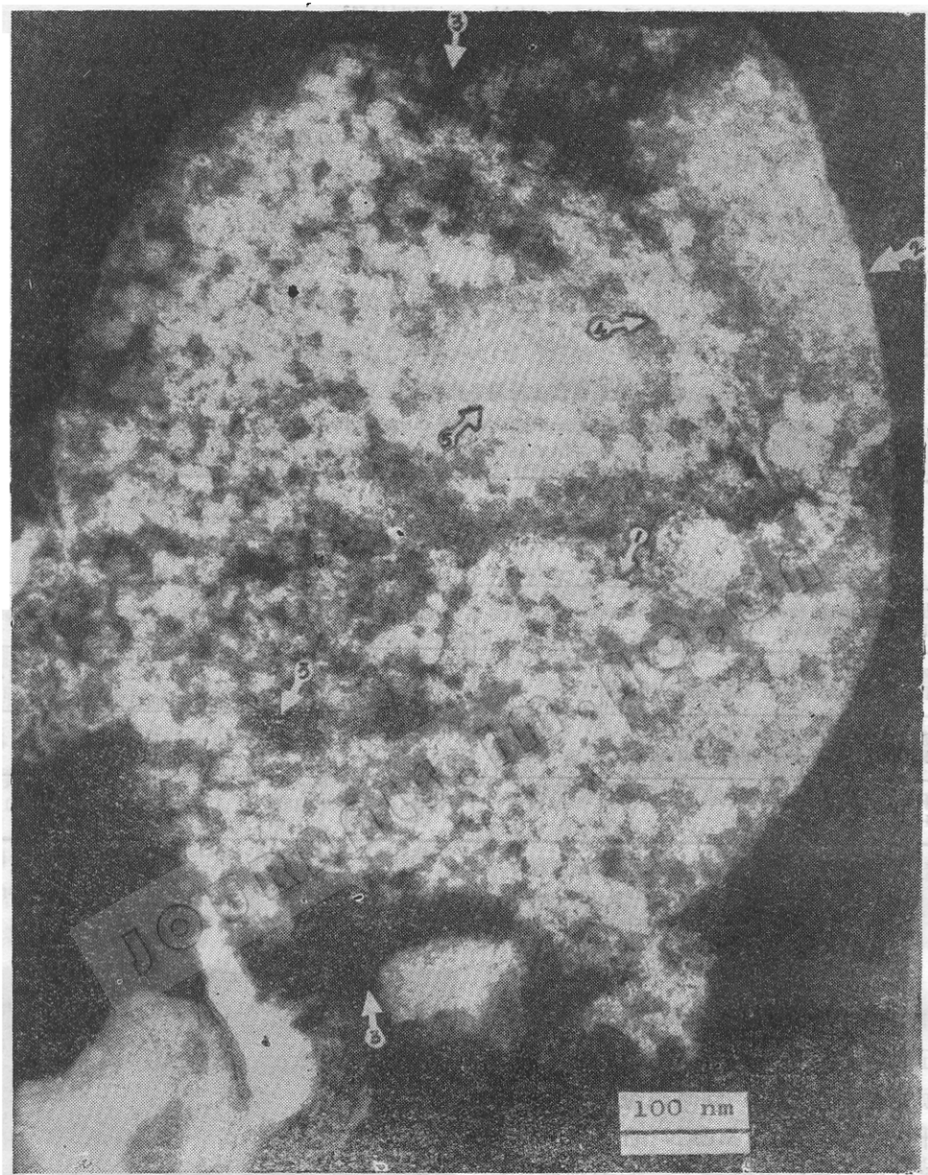


图2 自感染甲型肝炎病毒第三代 MERN 细胞中分离到的含甲型肝炎病毒的囊状体

箭头: 1.病毒颗粒; 2.囊膜; 3.囊状体破裂区; 4.脱落的囊膜结构; 5.囊状体中心致密区。

Fig.2 Immune electron micrograph of the "HAV-capsule" containing hepatitis A virus particles detected in the third serial passage of the virus in MERN cells

Arrow: 1.Hepatitis A virus particles; 2. Membrane of the "capsule"; 3. The ruptured sites; 4. Fragmentary membrane from the ruptured site; 5. The "core".

后,经 21 千赫超声波处理 3 分钟,按常规方法免疫电镜观察。观察到在一囊状体中有大量甲型肝炎病毒颗粒。这一囊状体呈

椭圆形,大小约 $675 \times 800\text{nm}$,由囊膜状结构所包裹,囊膜厚度约 9.6nm ,近中心区有致密的中心体。大部分囊状体保持完整的

表 2 MERN 细胞中增殖的甲型肝炎病毒的血清学鉴定

Table 2 Serological identification of the antigen extracted from the infected MERN cells with paired sera of hepatitis type A

血 清 Sera used	HAAg (来自 MERN 细胞) (From MERN cells*)	HAAg (来自猴肝组织) (From marmoset liver)	
	IAHA 结果判定 Possible or negative	Abbott-HAVAB-RIA cpm	结果判定 Positive or negative
阴性血清对照 Negative control	—	4049	—
阳性血清对照 Positive control	+	409	+
甲型肝炎病人血清: Hepatitis A patients:			
葛×× 发病前 14 天 Go SH 14 Days before illness	—	3385	—
发病后 71 天 71 Days after illness	+	619	+
俞×× 发病前 24 天 Yu ZT 24 Days before illness	—	3506	—
发病后 60 天 60 Days after illness	+	466	+
感染的红面猴血清: Infected stump-tailed monkeys:			
第一代 接种前 4 天 No. MA-1 4 Days prior to inoculation	—	4235	—
(The first 接种后 132 天 passage) 132 Days posterior to inoculation	+	1266	+
第二代 接种前 7 天 No. MB-11 7 Days prior to inoculation	—	3622	—
(The second 接种后 169 天 passage) 169 Days posterior to inoculation	+	562	+

注: Abbott-HAVAB-RIA: Abbott HAVAB 放射免疫药盒试验, 本次试验的抗体阳性阈 (cutoff) 为 2361 (cpm).
IAHA: 免疫粘附血凝试验, 测定时阴性血清对照及所有感染前血清均做 1:16 稀释, 阳性血清对照及所有感染后血清则做 1:128 稀释。

* 来自 MERN 细胞的 HAAg 为传至第三代收获的细胞中提取。

Notes: Abbott HAVAB was kindly supplied by Abbott Laboratories. The "cutoff" in this test is 2361 cpm.
IAHA: Immune adherence hemagglutinating assay, 1:16 dilution was used with all sera of pre-infection, 1:128 dilution was used in convalescent sera.

* Derived from the infected MERN cells at passage 3.

形状,但在两端及近边缘区有破裂。这种含病毒的囊状体在正常的 MERN 细胞的免疫电镜标本中从未见到。

(三) 病毒的血清学鉴定结果

用感染甲型肝炎病毒第三代的 MERN 细胞中提取的甲型肝炎病毒抗原,对甲型肝炎患者及 HAV 实验感染红面猴的双份血清进行 IAHA 反应,并与用 Abbott HAVAB 放射免疫药盒测定的结果作对

照。结果(表 2)表明,从感染的 MERN 细胞中提取出的抗原,能与四份甲型肝炎双份血清中的恢复期血清及一份阳性血清起反应,而不能与发病前的血清或阴性血清起反应,与用 HAVAB 放射免疫药盒测定的结果相同。

讨 论

实验结果证明: 1. 传统的传代细胞也

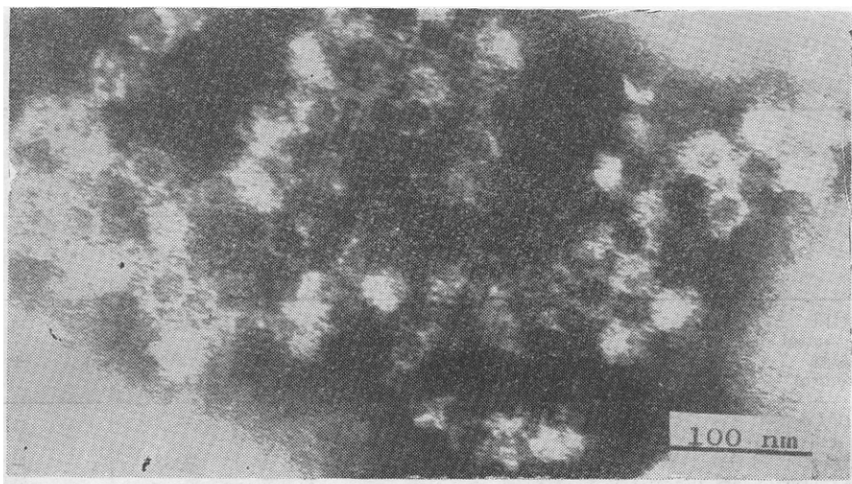


图3 自感染甲型肝炎病毒的第五代 MERN 细胞中分离到的甲型肝炎病毒颗粒

Fig. 3 Immune electron micrograph of hepatitis A virus particles detected in the fifth serial passage of the virus in MERN cells

可以支持甲型肝炎病毒的增殖；2. 直接来自病人粪便的含甲型肝炎病毒的材料也可以感染组织培养细胞。这与 Provost 和 Hilleman^[1] 最初报道的不同。他们用的病毒是在猕猴中适应传代的甲型肝炎病毒 CR326 株，所用的细胞是原代猕猴肝和来自猴胚肾的增殖倍数低、难于长期传代的 FRhK-6 系细胞。我们从甲型肝炎患者粪便中分离出的甲型肝炎病毒，在传代细胞中增殖也获得了成功，这与 Flehmig 和 Provost 等的报道相似^[2,8-10]。值得指出的是：我们所用的 MERN 株传代细胞，是 1963 年取自一健康产妇产工流产的正常胎儿的肾组织，在体外连续培养而获得的，在国内使用已 20 年，曾用于肠道病毒^[6] 及麻疹病毒的研究。它有较强的适应性，细胞增殖指数高，在体外较易培养，因此在增殖甲型肝炎病毒方面有较大的实用价值。

在感染后第三代的 MERN 细胞提取物中，观察到一含甲型肝炎病毒的囊状体。关于囊状体可能的功能，有两种解释：1. 它是病毒增殖的地方，也是病毒合成与装配的场所；2. 它是细胞对病毒增殖反应的

产物，是细胞合成用以包裹病毒使其感染受到局限的结构。虽然甲型肝炎病毒的理化性质与肠道病毒相似^[11]，但它是已知的在体外细胞中较难培养的病毒之一。目前，除知道该病毒是在胞浆内增殖外^[1]，对其在细胞内增殖的机理很少了解^[12]。因此，对该病毒难以在体外细胞中增殖的原因并不清楚。囊状体是否与该病毒的增殖机理有关，是否与该病毒在体外细胞中较难增殖有关，值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Provost, P. J. and M. R. Hilleman: *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 160: 213—331, 1979.
- [2] Flehmig, B.: *Medical Microbiology & Immunology*, 168: 239—248, 1980.
- [3] Mao, J. S. et al.: *J. Infect. Dis.*, 143: 654—659, 1980.
- [4] ———: *ibid.*, 144: 55—66, 1981.
- [5] 毛江森等: 微生物学报, 20: 222—224, 1980.
- [6] ———: 同上, 9: 42—47, 1963.
- [7] ———: 中国科学, 1981 年第 6 期, 765—772.
- [8] Provost, P. J. et al.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 167: 201—206, 1981.
- [9] Denhardt, F. et al.: *Prog. Med. Virol.*, 27: 109—113, 1981.
- [10] Daemer, R. J. et al.: *Infection & Im-*

- munity*, 32: 388—393, 1981.
- [11] Siegl, G. and G. G. Frosner: *J. Virol.*, 26: 43—53, 1978.
- [12] Locarnini, S. A. et al.: *ibid.*, 37: 216—225, 1981.

PROPAGATION OF HEPATITIS A VIRUS IN STABLE CELL LINE (MERN) IN VITRO

Mao Jiangsen Xie Ruying Huang Bozhang Chen Nianliang
Yu Peihua Ding Zhanchu

(*Zhejiang Institute of Experimental Medicine & Hygiene, Hangzhou*)

The stable cell line (MERN) originated from human embryonic kidney was infected with hepatitis A virus (HAV) isolates TO86 and TO85. Multiplication and identity of HAV in the cell cultures were demonstrated with the procedures of immune electron microscopy, radioimmunoassay and immune adherence. A "capsule" containing a numerous HAV particles was

discovered in the infected cell culture at the third passage by procedure of immune electron microscopy with negative staining. The possible role of the "HAV-capsule" in the propagation of HAV was discussed.

Key words

Hepatitis A virus (HAV); Capsule; Propagation