

汉坦病毒在原代人胚肾与人胚肺细胞中增殖及其特性的研究

刘葆钧¹ 戴家珠 王心禾 王晓琳² 沈关心²

(同济医科大学协和医院 武汉 430022)

(¹军事医学科学院微生物与流行病学研究所 北京 100071)

(²同济医科大学医学试验中心 武汉 430030)

近年来研究发现,汉坦病毒能在多种细胞株及人体细胞中增殖、适应。国内学者用人胚肺二倍体细胞(2BS)体外适应该病毒成功,但有关原代人胚肺、肾细胞的报道尚少。作者选用两株病毒及两种原代人胚细胞用于体外感染、观察,应用免疫荧光间接法及胶体金包埋前染色电镜技术对宿主细胞中增殖的病毒进行了动态观察及特异性定位研究,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 细胞的分离和培养

1.1.1 人胚细胞:取正常孕妇5—7个月水囊引产胚肾及肺组织,按常规方法分散细胞,5—7天后长满单层。

1.1.2 非洲绿猴肾上皮细胞(VeroE6):由安徽省医学科学研究所倪大石惠赠。

1.2 培养基和试剂

1.2.1 培养液:DMEM(Dulbecco. Co.),Eagles(日本产),小牛血清(FCS,由天津生物化学制品厂生产,批号:15283),pH值7.2—7.4,内含:HEPES(15mol/L),谷氨酰胺(300μg/ml),双抗(各200μ/ml),红霉素(100μg/ml),卡那霉素(100μg/ml)。生长液含10%FCS,维持液含5%FCS。

1.2.2 毒株:汉坦病毒标准株:76-118株及VeroE6细胞感染后病毒抗原阳性抗原片由倪大石提供;汉坦病毒国内地方株:Hubei-114株由湖北医学院病毒学研究所杨占秋提供^[1]。

1.2.3 抗体:出血热病人恢复期血清采自湖北省钟祥县医院传染科,由曹平提供。特异性单克隆抗体A₃₅株,购自中国预防医学科学院病毒学研究所。

荧光标记(FITC)羊抗人抗体:购自南京军区医学科学研究所免疫室(批号:90020);荧光标记(FITC)兔抗鼠抗体:购自武汉生物制品研究所(批号:9108)。胶体金标记A蛋白,直径6—10nm,由同济医科大学协和医院曾令兰提供。

1.2.4 显微镜:倒置显微镜(重庆光学仪器厂产品),相差显微镜(德国制造),荧光显微镜(Olympus, Nikon),电子显微镜(德国制造,EM-10C,Opton)。

1.3 病毒接种和细胞观察

取病毒原液0.1ml,加至培养细胞中,37℃吸附2小时后补足维持液,每2—3天换液一次。每天在倒置显微镜及相差显微镜下观察细胞形态,并与对照组细胞比较观察。第5、8、11、14、17、20天各留取培养上清液1.5ml于-70℃保存,备测病毒滴度。同时刮取细胞,涂片做间接免疫荧光检测病毒抗原。

1.4 病毒滴度

将VeroE6细胞在96孔板上培养,在冰浴中将培养上清液按10的倍比稀释,每个稀释度接种4孔,

方法同上。一周后收取细胞涂片用间接荧光法检测,以 Reed-Muench's 法计算出半数组织感染剂量(TCID₅₀),以培养天数为横坐标,TCID₅₀对数值为纵坐标画出生长曲线。

1.5 免疫荧光及胶体金染色电镜技术

间接免疫荧光试验见文献[2]。以羊抗 A₃₅为第一抗体,SPA-Au 为第二抗体,对感染病毒后第 17 天收获的 HEL 细胞及第 14 天收获的 HEK 细胞作包埋前胶体金染色,具体方法见文献[2]。

2 结果

2.1 正常细胞形态

人胚肺原代细胞形态似成纤维状细胞,原代人胚肾细胞似上皮样细胞,呈多角形或不规则形。

2.2 感染病毒后动态变化

两种细胞感染任一株病毒后均于第 5—7 天出现灶状分布的细胞病理改变,表现为细胞圆缩、融合、脱落,病变范围逐步扩大。同时刮取细胞涂片作荧光染色,其动态变化见表 1、2。

2.3 感染病毒后的细胞超微结构改变

常规电镜检测排除支原体污染。两种细胞中均出现线粒体萎缩、减少,粗面内质网增生,高尔基氏器囊性变,胞浆中有包涵体出现。胶体金技术电镜观察,可见原代人胚肺细胞浆中有巨大包涵体,有大量胶体金结合其上,偶见病毒样颗粒。放大后见病毒性包涵体中有晶格状排列的颗粒状结构,见图版 1-1、1-2。对照细胞无此出现。

3 讨论

我国学者曾先后多次从感染汉坦病毒的出血热病人、孕妇流产胎儿体内检出了病毒性抗原,证实该病毒可通过垂直途径传播^[3,4]。应用人胚肺二倍体细胞,脐静脉内皮细胞及人外周血 T 淋巴细胞等先后感染汉坦病毒成功^[5,6]。后来又观察到 VeroE6 细胞^[7]、金黄地鼠肾上皮细胞和 2BS 均有 CPE 出现。

表 1 2 株汉坦病毒在原代人胚肺细胞中的增殖

感染后 天 数 (d)	76-118 株			Hubei-114 株		
	细胞病变	抗原阳性率 (%)	病毒滴度 (TCID ₅₀)	细胞病变	抗原阳性率 (%)	病毒滴度 (TCID ₅₀)
5	—	10		—	10	
8	+	20	10 ^{2.5}	+	20	10 ^{5.5}
11	+	40	10 ^{3.5}	++	40	10 ^{6.5}
14	++	50	10 ^{4.5}	++	50	10 ^{6.5}
17	+++	60	10 ^{5.5}	+++	60	10 ^{7.5}
20	+++	70	10 ^{6.5}	+++	80	10 ^{7.5}
23	+++	80	10 ^{7.5}	+++		

表 2 2株汉坦病毒在原代人胚肾细胞中的增殖

感染后 天 数 (d)	76-118 株			Hubei-114 株		
	细胞病变	抗原阳性率 (%)	病毒滴度 (TCID ₅₀)	细胞病变	抗原阳性率 (%)	病毒滴度 (TCID ₅₀)
5	—	5		—	5	
8	+	20	10 ^{4.0}	+	10	10 ^{4.5}
11	+	40	10 ^{5.0}	+	40	10 ^{5.0}
14	++	60	10 ^{5.5}	++	50	10 ^{4.5}
17	++	70	10 ^{6.5}	++	60	10 ^{3.5}
20	++	80	10 ^{4.5}	++	70	10 ^{2.5}
23	++	80	10 ^{5.0}	++	70	

注:log TCID₅₀/0.1ml,间接免疫荧光法测得在 VeroE6 细胞中的滴度。

本实验结果表明两株病毒,汉坦株及汉坦病毒国内地方株均能在两种原代人胚细胞中增殖,Hubei-114 株在两种细胞中增殖时其高峰滴度在第 11 天,而 76-118 株在两种细胞中高峰出现在 14—17 天。

两种人胚原代细胞感染两株病毒后均出现 CPE 改变,呈逐渐加重趋势,病变最严重的时间均在病毒增殖高峰之后,由此推断病毒滴度下降可能与细胞病变衰老有关。HTV 感染 HEL 及 HEK 细胞后引起的 CPE 及生长曲线特点,与该病毒感染 VeroE6、金黄地鼠肾上皮细胞及人脐静脉内皮细胞电镜下超微结构改变也较为相似^[6]。胶体金电镜证实胞浆包涵体中有大量病毒特异性抗原,胞浆中可见病毒抗原层出现。作者认为病毒增殖与细胞病变有密切关系,但尚不足以说明病毒与病变之间有直接的因果关系,有待于进一步研究证实。

汉坦病毒能通过胎盘进入胎儿体内增殖并导致严重后果^[3,4]。本研究直接用原代人胚脏器细胞感染病毒成功,表明原代人胚肺、肾细胞在体外对汉坦病毒具有较高的敏感性。肾综合征出血热的发病机理中病毒直接致病作用学说已渐被证实,本试验结果为其提供了新的依据。

致谢 承朱关福教授审阅本文,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 杨占秋,林雨霖,曲春枫. 湖北医学院学报,1988,9(4):301—304.
- [2] 张 哲,陈 辉. 病理组织染色技术,沈阳:辽宁科学技术出版社,1988.272.
- [3] 杨为松,白宪光,张文彬,等. 中国公共卫生,1987,6(2):85—89.
- [4] 王学武,姜玉芳,王琪美,等. 中华传染病学杂志,1989,7(2):87—89.
- [5] 朱 平,杨为松,刘 健,等. 中华医学杂志,1989,69(10):588—590.
- [6] 王晶翼. 中华微生物与免疫学杂志,1989,9(3):137.
- [7] 董关木,俞水新. 病毒学杂志,1990,6(2):106.

PROPAGATION OF THE HTV IN PRIMARY HUMAN EMBRYONIC KIDNEY AND LUNG CELL CULTURE

Liu Baojun¹ Dai Jiazhu Wang Xinhe

Wang Xiaolin² Shen Guanxin²

(Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022)

(¹Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

(²Experimental Medical Center, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

Abstract 2 strains of Hantaan virus (HTV, 76-118, Hubei-114) have been propagated successfully in cultured primary human embryonic kidney (HEK) and lung (HEL) cells. Cytopathic effect (CPE) was observed in the two kind of cells on day 5 to 7 postinoculation which showed the cell became round and clustered, then detached. The replicating peak of the Hubei-114 in two kinds of cell cultures appeared on the 11th day and another strain on the 14th or 17th day after infection. The ultrastructure changes were observed with EM and IEM, which stained by ICGT before embedding. It was discovered that the mitochondria atrophied and decreased, and inclusion bodies in the cytoplasm of HEK and KEL cells. A large amount of gold granulae were found in the inclusion bodies and the virions were seen occasionally. Contamination with other agents have been ruled out.

Our data suggest that the replicating characters of HTV in these cell systems might be possible for the pathogenicity of HFRS for human.

Key words Hantaan virus (HTV), Human embryonic kidney (HEK) and lung (HEL), Immunofluorescence assay (IFAT), Immunocollodial gold-labelling (ICGT)

图 版 说 明

1. HEL 感染 Hubei-114 后 14 天, 颗粒状包涵体 (IB), 囊泡中有病毒颗粒 (V) (免疫胶体金技术 25000×);

2. HEL 感染 76-118 后 17 天, 胞浆中可见病毒颗粒 (V) (免疫胶体金技术 12500×)。