

猪瘟病毒在 PK 细胞和 MPK 细胞中 繁殖过程的研究*

王 镇 陆 宇 周鹏程 翟中和 丁明孝

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 以猪瘟病毒疫苗 Thiverval 株(T 株)为实验材料,研究该病毒株在 PK-15 细胞中增殖的基本特性与规律。在 PK-15 细胞中,猪瘟病毒 T 株在感染后 12h 即可检测到子代病毒粒子。接毒后 48h,几乎所有的细胞都被病毒感染;到 60h,释放到培养液中有活性的病毒粒子达到最高峰,为 10^7 TCID₅₀/mL。培养液中的病毒粒子在 37℃ 半寿期只有 3 个小时。同时,建立了 MPK 细胞-CSFV T 株的感染模式,其 CSFV 的滴度可达 10^8 TCID₅₀/mL。在此基础上,用抗 CSFV 包膜蛋白 E2 和非结构蛋白 p120 的单克隆抗体显示了病毒在细胞中增殖的部位,进而应用电镜技术观察到成熟的病毒粒子及可能处在不同发育阶段的子代病毒粒子。

关键词 猪瘟病毒(CSFV),免疫荧光,猪瘟病毒 Thiverval 疫苗株,形态结构

分类号 S852.65 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0189-95

猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV 或称 Hog Cholera Virus, HCV)属黄病毒科(Flaviviridae),瘟病毒属(Pestivirus)^[1,2]。为有包膜的正链 RNA 病毒。直径为 40~60nm^[3]。强毒力的 CSFV 导致的急性猪瘟引起高热、大量内出血,致死率几乎是 100%^[4]。目前世界上多采用疫苗免疫来控制猪瘟的流行。50 年代初,周泰冲等研制的猪瘟病毒兔化弱毒疫苗株 C 株,在我国乃至世界范围内的猪瘟病的防治中起了重要的作用。然而,由于 CSFV 一般不引起细胞病变(Cytopathic effect, CPE),且滴度较低,特别是弱毒疫苗 C 株,在培养细胞中增殖,病毒滴度一般在 10^5 TCID₅₀/mL,即使用免疫荧光技术也很难检测病毒抗原的存在。因此,对了解病毒在细胞中繁殖的规律带来很大困难。至今猪瘟依然是危害我国养猪业最严重的疫病,而且在疫苗生产中也常常出现病毒毒价不稳定,甚至检测不到子代病毒等问题。

我国在 CSFV 的研究上主要侧重于流行病学与免疫接种方面,对 CSFV 在细胞中增殖过程的研究还未见报道。本文用 CSFV 弱毒疫苗株 Thiverval 株(T 株)为实验材料,较为系统地研究了 CSFV 在传代细胞 PK-15 中的繁殖特征,并进一步建立 CSFV T 株-MPK(mini-pig kidney)细胞的感染模式,其培养液中有活性的 CSFV 含量明显提高,从而为深入研究 CSFV 弱毒株繁殖特性打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 PK-15 细胞、CSFV T 株、CSFV C 株、FITC 标记的抗 CSFV 多克隆抗体:由中国

* 国家攀登计划资助项目(No. 85-44-02-05)

收稿日期:1997-11-19,修回日期:1998-04-01

兽药监察所惠赠。

1.1.2 MPK 细胞:由意大利 Ferrari 教授惠赠。

1.1.3 抗 CSFV 结构蛋白 E2 的单克隆抗体:由荷兰 Moormann 教授惠赠。

1.1.4 抗 CSFV 非结构蛋白 p120 的单克隆抗体:由德国 Thiel 教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及接毒条件:按常规细胞培养方法,用 D-MEM 培养液加 10% 无牛病毒性腹泻病毒抗体的胎牛血清作为 PK-15 细胞的培养液 (pH7.2);用 E-MEM 培养液加 20% 的胎牛血清作为 MPK 细胞的培养液 (pH7.2)。待细胞接近长满单层时接毒,于 37℃ 感染 1h 后,经 Hanks 洗涤,加维持液 (pH 为 7.6~7.8) 培养,维持液含 2%~4% 的胎牛血清。

1.2.2 免疫荧光检测方法:将细胞培养在盖片上,在病毒感染后不同时间,用 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液 (含 0.85% 的 NaCl) 冲洗。放入纯丙酮中固定 15min,自然干燥后用于免疫荧光检测或存于 -20℃ 冰箱中备用。

固定后的细胞单层经 FITC 标记的抗 CSFV 的多抗,37℃ 温育 1h,0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液冲洗后,甘油封片。或与 CSFV 的单克隆抗体温育,BSA 封闭后,经与 FITC 标记的抗鼠抗体 (Sigma 公司) 温育,封片。用 Olympus 荧光显微镜于波长为 495nm 激发光下观察。或于激光共聚焦显微镜 Leica DMRBE 下观察。

1.2.3 CSFV 一步生长曲线测定:CSFV T 株病毒在 37℃ pH7.8 感染 PK 或 MPK 单层细胞 1h。Hanks 液洗涤后加入 pH7.6 的维持液,37℃ 培养,每隔 12h 取 0.5mL 维持液应用免疫荧光检测技术测定病毒滴度,绘制病毒一步生长曲线。

1.2.4 CSFV 的电镜观察:CSFV T 株感染 48h 的 MPK 单层细胞,或 CSFV C 株感染 96h 的 MPK 细胞,经 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液冲洗、0.5% 的戊二醛固定后刮取细胞,再用 2.5% 的戊二醛与 1% 的锇酸双固定,梯度乙醇脱水。Epon812 树脂包埋。超薄切片后经醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色,于 CM120 Biotwin 型透射电镜下观察。未经病毒感染的正常 MPK 细胞作为对照。

2 实验结果

2.1 CSFV T 株在 PK-15 细胞中的一步生长曲线

病毒感染后每隔 12h 取样,测定培养液中子代病毒的滴度,绘制出 CSFV T 株在 PK-15 细胞中繁殖的一步生长曲线 (图 1)。

病毒感染后 12h 即有感染性病毒粒子释放到细胞外,说明 CSFV T 株病毒在 PK-15 细胞中的增殖至少可在 12h 内完成。而后子代病毒以平均每小时 2×10^5 TCID₅₀/mL 的速率向细胞外释放。至感染后 60h,培养液中病毒的滴度达到最高峰,为 10^7 TCID₅₀/mL。随后病毒滴度以每小时减少 3×10^5 TCID₅₀/mL 的速率下降。至感染后 96h,病毒滴度趋于平稳,保持在 10^3 TCID₅₀/mL 左右。整个感染过程中细胞不出现明显的 CPE。

2.2 CSFV 抗原在细胞内的分布及相对量的变化时相

用 FITC 标记的 CSFV 多抗进行免疫荧光法检测,研究 CSFV T 株抗原在感染的

PK15 细胞中的分布。并对多聚甲醛和丙酮固定的细胞进行比较,结果表明前者只显示出微弱的荧光,而后者荧光染色明显,说明 CSFV 抗原在细胞表面很少,而主要存在于细胞内,特别是在核周的某些区域荧光更强,可清楚地勾画出细胞核的轮廓。显示出其抗原主要存在于核膜以及内质网和高尔基体富集的区域。在细胞质中,CSFV 抗原也并非均匀分布,在某些区形成荧光很强的小斑块(见图版 I 1a)。CSFV C 株感染细胞荧光较弱,使用激光共聚焦显微镜观察 CSFV C 株感染的 MPK 细胞,CSFV C 株的抗原在胞内存在的部位与 T 株相似,也是主要存在于宿主细胞核周围区域(见图版 I 1b)。

使用抗 CSFV 非结构蛋白 p120 的单克隆抗体进行免疫标记,荧光主要存在于细胞核周围和胞质内某些区域(见图版 I 1c)。使用抗 CSFV 包膜蛋白 E2 的单抗进行免疫标记,结果显示:E2 蛋白主要分布在类似的部位,显然这些部位很可能是病毒获得包膜,发育成为成熟病毒的部位(见图版 I 1d)。

为了研究病毒抗原在细胞中出现及强弱变化的时相,在接毒后每隔一段时间取样进行免疫荧光染色。结果显示:接毒 6h 后,少数细胞的胞质中可检出微弱的荧光;接毒 9h,荧光增强并围绕细胞核形成较弱的荧光带。感染 12h 和 24h 细胞中荧光最强。然而在病毒感染 36h 以后,细胞中荧光强度逐渐较低,至感染后 60h,细胞中仅存在微弱的荧光(见图版 II 1a-f)。

2.3 CSFV 在单层细胞中的传播及释放病毒的存活时间

为研究病毒在单层细胞中传播的时相,以 10^2 TCID₅₀/mL 的病毒浓度感染细胞,在感染后不同时间计算 1cm² 盖片上免疫荧光染色阳性的细胞数量并绘制阳性细胞数随时间增加的曲线(图 2)。结果显示感染 12h 出现阳性细胞;感染 48h 后阳性细胞才明显增加,且以每小时约 12 个阳性细胞的速率近似呈线性增加。

为研究释放的病毒存活情况,我们将释放到培养液中的病毒放置在 37℃ pH7.6 的环境下,每隔 12h 取样,测定有感染能力的病毒,以确定 CSFV 在 37℃ 时病毒存活时间。如图 3 所示:CSFV 在培养液中平均半寿期只有 3h,即平均每 3h 有感染力的病毒粒

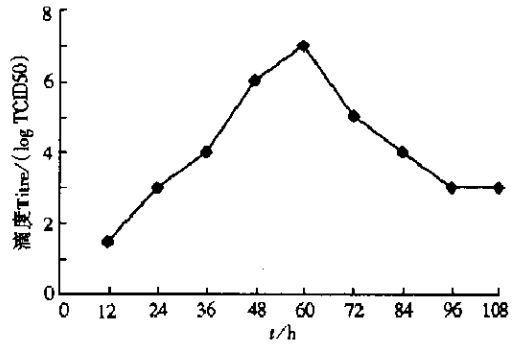


图 1 CSFV T 株在 PK-15 细胞中的一步生长曲线
Fig.1 The one step growth curve of CSFV Thiverval strain in PK-15 cell

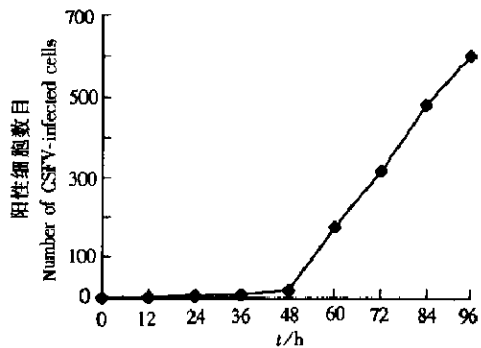


图 2 低感染复数下 CSFV 感染细胞随时间增加曲线, 10^2 TCID₅₀/mL CSFV Thiverval 株感染 PK-15 细胞
Fig.2 The curve of the number of CSFV infected cells under low multiplicity of infection, PK-15 cells infected by 10^2 TCID₅₀/mL CSFV Thiverval strain

子数减少一倍,但滴度的降低与时间并不呈严格的线性关系。开始病毒滴度下降的较快;12h后,培养液中95%以上的病毒均失去感染能力。12~48h病毒滴度变化不大;48h后滴度明显下降,至84h全部病毒失活。

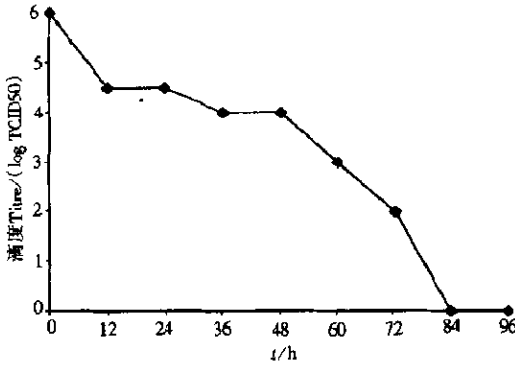


图3 CSFV在37°C时的半寿期

Fig. 3 The half-life period of CSFV at 37°C

滴度仍可达 10^5 TCID₅₀/mL。

2.5 猪瘟病毒形态的电镜观察

在感染 CSFV T 株或 C 株的 MPK 细胞中,均可观察到较多的成熟病毒粒子。直径约在60~70nm。某些病毒粒子周围可清晰地显示出病毒包膜及内部直径约40nm的核心结构(见图版 II-2)。此外,少数感染 CSFV 的 MPK 细胞的核形状发生了改变。

2.6 猪瘟病毒引起的宿主细胞病变

与绝大多数 CSFV 一样, T 株病毒的感染不引起细胞 CPE。但用抗 CSFV 多抗进行免疫标记时有些细胞中出现“空泡”样结构。DAPI 与免疫荧光对同一样品进行双染色后,发现所观察到的空泡样结构中存在 DNA,推测可能是细胞核病变所致(图版 I-2)。在电镜下,在病毒感染晚期细胞中可观察到某些细胞核的形状变得不规则,而且某些部位的细胞内膜明显加厚,胞质中出现大量纤维结构。

3 讨论

CSFV Thiverval 株(T株)是法国1972年从CSFV强毒Alfort株经仔猪原代细胞中传代后转到牛肌肉细胞中增殖,在29~30°C传代170代,得到的温度变异毒株,是法国曾广泛应用的疫苗株^[5]。邵振华等也曾对CSFV T株作了报导,但均未做进一步研究^[6]。猪瘟病毒 T 株是研究 CSFV,及其在其弱毒株在细胞中的繁殖规律及其与宿主细胞间的

2.4 CSFV T 株在 MPK 细胞中的一步生长曲线

病毒感染后每隔12h取样,测定培养液中子代病毒的滴度,绘制出 CSFV T 株在 MPK 细胞中繁殖的一步生长曲线(图4)。与使用 PK15 细胞相比,CSFV 在 MPK 细胞中增殖的速率较快。到接毒后60h,释放到培养液中有活性的病毒粒子的量达到峰值,为 10^8 TCID₅₀/mL,比使用 PK15 细胞培养提高约一个滴度。并且,在随后的24h内,有感染能力的病毒粒子的量仍稳定在 10^7 TCID₅₀/mL左右。至感染后108h,病毒

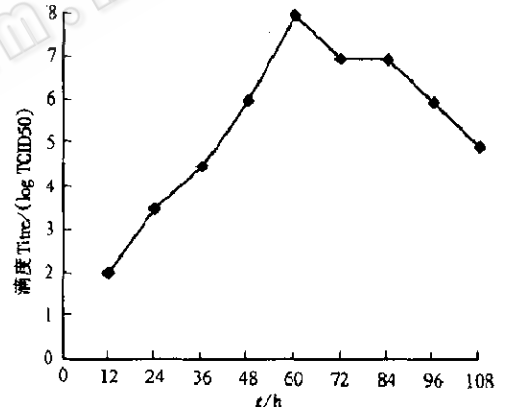


图4 CSFV T 株在 MPK 细胞中的一步生长曲线

Fig. 4 The one step growth curve of CSFV Thiverval strain in MPK cell

关系较为理想的实验材料。本实验首次建立了 T 株-MPK 细胞的感染模式,这不仅有助于对病毒自身复制规律的了解,而且对弱毒疫苗的生产也将会提供有意义的资料。

从猪瘟病毒弱毒疫苗 T 株在 PK15 细胞或 MPK 细胞中增殖的一步生长曲线中可以看出:病毒感染 60h 的培养液中其滴度达到最高值,随后迅速下降。如在距毒价最高峰时前或后 12h 收毒,毒价均降低一个滴度。由于病毒的半寿期只有 3 个小时,晚一天收毒,则释放到培养液中的有活性的病毒又会下降约二个滴度。这一结果提示:在疫苗生产中适时收毒或设法保护释放病毒活性可能是很重要的。

目前对猪瘟病毒的核酸序列及其基因组结构虽然已有了较多的了解^[7~9],但 CSFV 在宿主细胞内成熟与释放的过程仍了解甚少^[10]。我们使用 CSFV 的多抗进行检测,免疫荧光显示 CSFV 的抗原主要存在于被感染细胞的胞质中,尤其是内质网及高尔基体较集中的细胞核周围。使用抗 CSFV 结构蛋白 E2 及非结构蛋白 p120 的单克隆抗体检测也得到类似的结果。E2 是 CSFV 的包膜糖蛋白,其存在的部位在一定程度上反应出 CSFV 结构蛋白的成熟部位以及 CSFV 的装配部位;p120 具有多种酶活性,在病毒复制过程中起重要的作用^[11~14],它存在的部位在一定程度上反映了病毒在胞内的复制部位,实验结果表明有丰富内膜系统的细胞核周围是 CSFV 在胞内增殖的主要部位。我们在电镜下首次观察到大量病毒粒子存在于胞质囊泡内,这为进一步研究 CSFV 形态发生这一难题提供了可能性。这也为 Thiel 等人^[15]提出的 CSFV 的包膜来自细胞内膜的推测提供了进一步的证据。

与绝大多数猪瘟病毒株一样,CSFV T 株在 PK15 及 MPK 细胞中增殖均不产生 CPE,然而如仔细观察病毒感染的细胞群体,不难发现有少数细胞内除细胞核外尚有一些类似空泡的结构。DAPI 染色证明其中含有 DNA,其形态与分布类似凋亡细胞中正在形成的凋亡小体。电镜下也观察到感染细胞中细胞核的形变。那么,猪瘟病毒的增殖是否能导致某些细胞凋亡?然而另一方面,CSFV 感染的原代细胞又可较长时间地存活,显然 CSFV 可能编码诱导与抑制细胞凋亡的二类因子。要搞清楚这一点不仅涉及猪瘟病毒致病机理,也是一个非常有趣的涉及病毒与细胞相互关系基本理论的研究课题。在我们的实验中,病毒感染 36h 后,几乎所有细胞均被 CSFV 感染,细胞中发出较强的荧光。感染 48h 后,感染细胞中荧光减弱,提示细胞中 CSFV 特异性抗原量减少。似乎细胞与病毒达到了一种平衡,病毒在较低的水平上复制,细胞仍能维持正常的生长状况。究竟是有那些细胞因子或病毒因子参与了病毒与细胞间的相互作用还不清楚。荷兰 Moormann 实验室将猪瘟病毒的包膜糖蛋白 E^{ms}克隆并突变,使之失去原有的 RNase 活性,获得的 CSFV 突变体可导致被感染的猪肾组织凋亡。是否 CSFV 的 E^{ms}参与了病毒与细胞间的相互调节还有待进一步的实验证据。目前我们已克隆了 CSFV 的结构蛋白 E2 及非结构蛋白 NS5A、NS5B 和 p120 基因,期望能对病毒复制、装配过程以及病毒与细胞间的相互作用有一较深入的了解。

参 考 文 献

- [1] Wengler G. Family Flaviviridae. In: Franchi R I B, Fauquet C M, Knudson D L *et al.* ed. Classification and nomenclature of viruses, Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer Verlag, Berlin. 1991. 223~233.

- [2] 陆宇, 陈建国, 丁明孝. 中国病毒学, 1996, 11(3): 201~207.
- [3] Moening V. *Vet Microbiol*, 1990, 23: 35~54.
- [4] Terpstra C. *Br Vet J*, 1991, 147: 397~406.
- [5] Launais M. *Rev Med Vet*, 1972, 123: 1537~1554.
- [6] 邵振华, 杨晓林. 兽医药品通讯, 1987, 1: 19~23.
- [7] Moormann R J M, van Gennip H G P, Miedema G K W *et al.* *J Virol*, 1996, 70: 763~770.
- [8] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H-J. *Virology*, 1989, 171: 555~567.
- [9] Moormann R J M, Warmerdam P A M, van der Meer B *et al.* *Virology*, 1990, 177: 184~198.
- [10] 王镇, 丁明孝. 微生物学通报, 1998, 25(1): 57~59.
- [11] Wiskerchen M, Collett M S. *Virology*, 1991, 184: 341~350.
- [12] Tamura J K, Warrenner P, Collett M S. *Virology*, 1993, 193: 1~10.
- [13] Warrenner P, Collett M S. *J Virol*, 1995, 69: 1720~1726.
- [14] Tautz N, Meyers G, Thiel H-J. *Virology*, 1993, 197: 74~85.
- [15] Thiel H-J, Stark R, Weiland E *et al.* *J Virol*, 1991, 65: 4705~4712.

THE MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS AND SOME CHARACTERISTICS OF ITS MULTIPLICATION

Wang Zhen Lu Yu Zhou Pengcheng Zhai Zhonghe Ding Mingxiao

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Some characteristics of the multiplication of classical swine fever virus(CSFV) Thiverval strain were studied by means of the immunofluorescence technique. Under optimum culture conditions, the concentration of CSFV in the culture liquid multiplied by MPK cells is ten times higher than by PK-15 cells. The half-life period of CSFV at 37°C is 3hour. The location of CSFV's replication in host cells is detected by the monoclonal antibodies of the structural protein E2 and the non-structural protein p120 of CSFV. Based on the above results, the ultrastructure of CSFV particles inside host cells was further studied using electron microscope and the changes of the ultrastructure of CSFV-infected cells are shown. The possible reasons for lower viral titre are also discussed in this paper.

Key words Classical swine fever virus (CSFV), Immunofluorescence technique, CSFV Thiverval strain(T strain), Morphological structure

图 版 说 明

Explanatin of plates

图版 I

1. CSFV 抗原在宿主细胞内的定位: a. CSFV T 株感染的 PK15 细胞(使用抗 CSFV 的多抗检测); b. CSFV C 株感染 MPK 细胞(使用抗 CSFV 多抗检测的激光共聚焦扫描显微镜照片); c. CSFV T 株感染的 PK15 细胞(使用抗 CSFV 包膜蛋白 E2 的单抗检测); d. CSFV T 株感染的 PK15 细胞(使用抗 CSFV 非结构蛋白 p120 的单抗检测)。
2. CSFV 感染细胞中细胞核形态的变化: a. DAPI 染色; b. FITC 标记的 CSFV 多抗的免疫荧光染色。

图版 II

1. CSFV 抗原在细胞中的分布及其扩展: a. 9h; b. 12h; c. 24h; d. 36h; e. 48h; f. 60h.
2. CSFV 感染的 MPK 细胞, 箭头示胞质中的病毒粒子(标尺 = 500nm)

Plate I

1. The locaton of CSFV antigen in its host cells: a. CSFV T strain infected PK15 cells(using CSFV-special antibody); b. CSFV C strain infected MPK cells(using CSFV-special antibody); c. CSFV T strain infected PK15 cells (using CSFV E2-special monoclonal antibody); d. CSFV T strain infected PK15 cells(using CSFV p120-special monoclonal antibody).
2. The morphorlogy changes of cell nucleus in CSFV infected cells: a. stained by DAPI; b. stained by immunofluorescence method.

Plate II

1. The emergence of CSFV antigen in PK-15 cells and its time dependent changes: a. 9h; b. 12h, c. 24h, d. 36h, e. 48h, f. 60h.
2. CSFV-infected MPK cell, the arrow indicates the virus particals inside the cytoplasm. Bar = 500nm