

白纹伊蚊细胞株——ACK₄的建立 及对六株虫媒病毒的影响

耿际泉、周朝益、麦家和、黄治清

(昆明军区后勤部军事医学研究所,昆明市)

Singh^[1] 报道,白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 细胞对分离登革热病毒比小白鼠乳鼠和 Vero 细胞更敏感,并产生特异性细胞病变。Pavi^[2] 又用于对登革热病毒的鉴定上,效果颇佳。鉴于此情况,我们参照 Singh 白纹伊蚊幼虫的组织培养方法^[3]加以改进,建立了白纹伊蚊细胞株——ACK₄,现已传至第 81 代。用登革热 II 型病毒和乙型脑炎病毒接种白纹伊蚊细胞,能产生细胞病变,用登革热 I、III、IV 型及基孔肯亚病毒虽未产生病变,但尚可繁殖与传代。现报告如下:

材料与方 法

一、白纹伊蚊

经过饲养繁殖,保存于放有干燥剂 60% NaOH 器皿中 7—9 天的蚊卵(由 59175 部队赠给)。

二、白纹伊蚊细胞的制备

将蚊卵收集于 100 毫升疫苗瓶中,加入丙酮洗 2—3 次(每次 2 分钟左右),再以 Whités^[4] 液浸泡 15—20 分钟后,无菌水洗涤 3 次,移入 RSS^[5] 液,置 28℃ 孵育 4 小时左右,待一龄幼虫孵育齐全,用吸管将密集的幼虫吸入试管(14×150 毫米)中,再用吸管将密集的幼虫导入空试管内,以此多次浓集幼虫和去除卵壳,待卵壳除

尽后,将幼虫置盐冰致冷(勿结冰),使幼虫自然沉集管底,再将浓缩的幼虫吸入青霉素瓶,把幼虫剪成数段,为便于剪碎,可加数滴胰酶成团再剪,用吸管把组织碎块吸入疫苗瓶中,加入 0.25% 胰酶 8—10 毫升,水浴 37℃ 消化 15—20 分钟后,1500 转/分离心 10 分钟,弃去上清,加入 0.25% 乳蛋白 Eagle 液(即 0.5% 水解乳蛋白加等量 Eagle 之 Earle 氏液,混合而成)。生长液加入 15—20% 的小牛血清,维持液加入 2% 的小牛血清,用吸管吹打数分钟,使组织块分散,吸取细胞悬液放入 100 毫升方瓶中,每瓶 15—20 毫升(细胞浓度 100 万/毫升),放 28℃ 静置培养 7—14 天形成细胞单层(培养过程中不必换液)。

三、细胞传代

在形成细胞单层的方瓶中,加入 10 毫升的 0.25% 胰酶,室温(20℃ 左右)消化 5 分钟,翻转方瓶 20—25 分钟,弃去胰酶,加入 0.25% 乳蛋白 Eagle 液,适当振摇,使细胞脱离瓶壁,并分散成单个细胞。一瓶可传种二瓶。

四、细胞冻存

将传代细胞制成细胞悬液(浓度 1.5—2.5×10⁶ 个/毫升),加入二甲基亚砜,使最终浓度为

* ACK₄ 为白纹伊蚊组织培养昆明第四株的代号。

10%，分装安瓶，火焰封口，4℃过夜，置液氮罐上端2小时（-80℃），再直接浸入液氮中，可长期保存。取出后于37℃水浴速融，将细胞悬液移入方瓶，用新鲜生长液补至总量15—20毫升，于28℃静止培养。

五、敏感性试验

1. 病毒：登革热病毒 I 型（Hawaii 株）、登革热病毒 II 型（New Guinea 株）、登革热病毒 III 型（株名不详）、登革热病毒 IV 型（H₂₄ 株）、乙型脑炎病毒（中山株）、基孔肯亚（Chikungunya）病毒的小白鼠乳鼠脑悬液或细胞冻融悬液（均由卫生部药品生物制品检定所供给）。

2. 小白鼠：1—3 日龄乳鼠，脑腔接种病毒悬液 0.02 毫升。

3. 白纹伊蚊细胞管：病毒各稀释度接种 4 支细胞管，每管 0.1 毫升（或 0.02 毫升）。细胞吸附 2 小时后，吸出未吸附上的病毒悬液，加 1 毫升维持液，28℃ 培养。以正常鼠脑制成的悬液接种细胞管作为对照。

试验结果

一、细胞的基本形态

白纹伊蚊原代幼虫细胞传种试管刚贴壁时，在显微镜下仅观察到一种圆形、透明的细胞，经 28℃ 培养 3 天后，可看到大多数呈梭状或圆形大小不一的上皮细胞，少数为线状的成纤维细胞（图 1）。传至 30 代以后，成纤维细胞消失，全部为圆形的上皮细胞。鉴于上述细胞

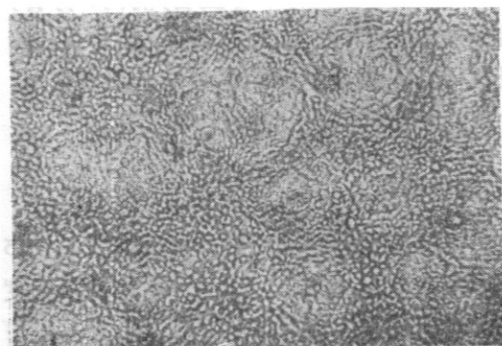


图 1 白纹伊蚊细胞形态（200×）

形态不同，我们认为 ACK₄ 是一株白纹伊蚊的混合细胞株（染色体为 6 对）。

二、原代细胞与传代细胞的生长情况

细胞悬液接种方瓶或试管后，1—2 天贴壁，第三天可以看到细胞胀大和二分裂现象，以后不断增殖向周围扩散形成小岛，原代细胞生长缓慢，一般 10—14 天形成细胞单层，细胞经过 5—6 次传代后，形成细胞单层的时间基本稳定在 3—4 天。以液氮冻存一年以上，细胞复苏后生长良好。

三、M.M. 与 Eagle 培养基的比较

使用 M. M.^[2] 培养基，做过 12 次细胞培养都未成功，虽然 1—2 天细胞也贴瓶壁，但通过 14 天的连续观察，未见细胞生长。改用 0.25% 乳蛋白 Eagle 之 Earle 液作为生长液，同样 28℃ 静止培养，细胞 1—2 天贴壁后，开始繁殖生长。说明生长液的选择是白纹伊蚊细胞株建立成败与否的关键。

四、影响因素的控制

1. 防污染：一定要用丙酮，Whit's 液冲洗蚊卵，以消除表面的细菌霉菌等。孵育幼虫时，青、链霉素浓度应适当加大。制备幼虫细胞过程中，操作程序多，时间长，须特别注意空气污染。

2. 保持适当的胰酶浓度：消化细胞所需胰酶的适宜浓度为 0.25% 时效果较佳，0.1% 的胰酶浓度不易使瓶壁的细胞消化下来，获得单个细胞少，影响细胞传代。

3. 控制 pH：白纹伊蚊细胞生长的最适 pH 为 7.0—7.2，pH 高于 7.6 或低于 6.8，细胞生长均不佳。

4. 旋转培养：将白纹伊蚊细胞管置 17 转/小时转鼓于 28℃ 旋转培养，两天出现大片细胞脱落，仅有个别细胞管保持 5 天后才开始出现脱落。

五、细胞的敏感性观察

用登革热 II 型病毒和乙脑病毒接种细胞

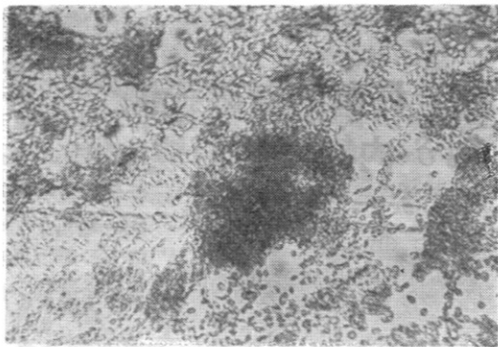


图2 乙脑病毒在白纹伊蚊细胞产生的细胞病变 (200×)

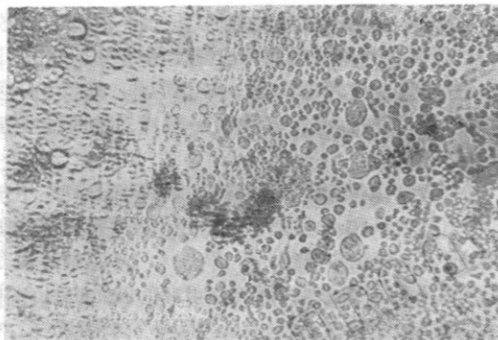


图3 登革热Ⅱ型病毒在白纹伊蚊细胞产生的细胞病变 (200×)

管, 3—4 天细胞出现不同程度的膨大和拉长, 4—5 天膨大的细胞颗粒增加, 透明度减少, 5 天后许多病变的细胞堆积在一起, 形成大的细胞融合 (图 2)。登革热Ⅱ型病毒细胞病变的膨大和拉长可比正常细胞大 3—8 倍, 形成明显的病变 (图 3), 10 天后细胞开始逐渐脱落。登革热Ⅱ型病毒病变细胞冻融后, 传代仍出现细胞病变, $TCID_{50}$ 可达 10^{-4} — 10^{-5} , 仅低于小白鼠乳鼠一个 LD_{50} 。对登革热 I、III、IV 和基孔肯亚病毒接种该细胞株虽不产生细胞病变, 但

将此细胞冻融传代, 脑腔接种小白鼠乳鼠 LD_{50} 可达 10^{-2} — $10^{-3.7}$ 。

讨 论

1. 按 Singh 介绍的白纹伊蚊细胞组织培养方法。生长液用 M. M. 培养基, 细胞培养过程中要换生长液, 留 1/3 旧液, 加入 2/3 新鲜生长液。传代细胞消化用 0.1% 胰酶, 37℃ 消化 2—3 分钟, 用吸管轻轻吹打下来。我们反复试验, M. M. 培养基都不能促使细胞的生长繁殖, 其原因何在尚待研究。本试验改用 0.25% 乳蛋白 Eagle 液, 细胞生长良好。细胞换液一次换掉, 不需留旧液, 对细胞生长并无影响。传代细胞的消化用 0.25% 胰酶消化 5 分钟比 0.1% 胰酶效果好。用盐冰降温使蚊幼虫停止运动下沉, 若重新放置室温数分钟又恢复运动, 对制备细胞没有影响。

2. 登革热 I、III、IV 型病毒接种细胞管不产生细胞病变, 这一结果与国外报道的均产生细胞病变不一致, 是因我们所用毒株均为实验室长期在小白鼠乳鼠传代, 国外是用新分离毒株, 还是因白纹伊蚊蚊种来源不同, 而导致细胞的敏感性不同, 还是有其他原因, 尚待今后进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Singh, K. R. P.: *Bull. WHO*, 40(6): 982, 1969.
- [2] Pavi, K. M.: *ibid*, 40(6): 984, 1969.
- [3] Singh, K. R. P.: *Curr. Sci.*, 36: 506, 1967.
- [4] Peleg, J.: *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 12: 820, 1963.
- [5] Rinaldini, L. M.: *Exp. Cell. Res.*, 16: 477, 1959.