

氯化镁增强鸡胚细胞对森林脑炎病毒减毒株敏感性的研究

黄永成 胡淑贤

(长春生物制品研究所)

减毒活疫苗的免疫效果与病毒滴度有直接关系,如何提高病毒的滴度,增强其稳定性,是提高减毒活疫苗免疫效果的重要途径之一。本文报告,在鸡胚单层细胞培养森林脑炎(以下简称森脑)病毒减毒株,加有 10mM 氯化镁可提高细胞的敏感性,病变出现早、严重、滴度提高 0.5—1.5 log TCD₅₀,现将结果报告如下。

材料和方法

1. 减毒株:为我室驯化的 203 IIS₆ 株。用其制成减毒活疫苗于人体皮下接种 284 人,初步证明安全^[1]。试验时,将冻干毒种启封,经鸡胚单层细胞 (CEC) 传 2—3 代即可使用。

2. CEC 制备:选用 10 日龄鸡胚的肌皮组织,剪碎、洗净,加入 0.25% 胰酶,于 37℃ 消化 20 分钟,弃去胰酶,吹打,加入 Earle 氏液,经 1,000 转/分钟离心 10 分钟,倒出上清液,按每胚加入 20 毫升细胞生长液。细胞生长液为 0.25% 乳白蛋白水解物,并加有 5% 小牛血清和每毫升含有青链霉素 100 单位(或微克)。将细胞悬液

混匀后分注于青霉素瓶中,每瓶 0.5 毫升,置 36℃ 培养 20—24 小时,供感染病毒用。

3. 氯化镁 (MgCl₂·6 H₂O):北京化工厂出品。称取氯化镁 203 克加入 Earle 氏液中(此种液体 1,000 毫升为 1M),高压灭菌,试验前将其加入细胞生长液或病毒维持液中,使最终浓度含氯化镁 10 mM (即每 100 毫升液体加 1M 氯化镁 1 毫升)。

4. 脱脂牛乳:鲜牛奶经每分钟 3,000 转离心 30 分钟,除去奶油,取上清分装安瓿密封,经煮沸 15 分钟消毒后,置 4℃ 保存。

5. 病毒维持液:在细胞感染病毒时,用病毒维持液将毒种稀释成不同倍数,然后分别接种入每个细胞管内。试验用病毒维持液主要为 199 液或 0.25% 乳白蛋白水解物,在不同试验中并加有 10% 牛血清或者不同剂量的脱脂牛乳。

6. TCD₅₀ 测定:病毒滴定用 CEC,病毒稀释液为 10% 牛血清 199,每稀释度接种 2—4 个细胞管,每管接种 0.4—0.5 毫升,接种后 4 天判定结果,详细方法见另篇^[2]。

试验结果

一、氯化镁和硫酸镁对 CEC 的毒性测定

取一日龄细胞补加 0.5 毫升病毒维持液 (为 10% 牛血清 199 液), 并分别加 12.5、25、50 及 100mM 的氯化镁或硫酸镁, 然后立即观察对细胞的影响。置 36℃ 培养 24 小时, 发现加 50mM 以上 Mg^{++} 的各试验组对 CEC 均有严重毒性, 加 12.5—25 mM Mg^{++} 的微有毒性。接种后 48 小时各试验组的毒性反应均有所发展, 在接种后 72 小时观察, 加 25mM Mg^{++} 的试验组亦有一定的毒性反应, 加 12.5mM Mg^{++} 的试验组细胞接近正常。试验中加氯化镁或硫酸镁所得结果一致。由此初步认为, 在 CEC 的生长液或维持液中加 Mg^{++} 时, 一次加量不宜超过 12.5mM。

二、CEC 生长液或维持液加 Mg^{++} 培养病毒对滴度的影响

试验时于细胞生长液或病毒维持液中分别加入 10 mM Mg^{++} , 结果发现加入 Mg^{++} 后, 均比对照组出现的细胞病变早, 而且明显严重。病毒感染后同时期收获测定, 各试验组的病毒滴度亦有明显差别 (见表 1)。

表 1 细胞生长液及病毒维持液加 Mg^{++} 对病毒滴度的影响

实验组	Mg^{++} 加入		病毒滴度 ($\log TCD_{50}$)
	细胞生长液	病毒维持液	
1	+	+	≥ 7.5
2	+	-	6.5
3	-	+	6.5
4	-	-	5.5

* “+”加有 10 mM Mg^{++} ; “-”常规方法, 以下表同。

从表 1 结果可以看出, 在病毒感染后 3 天收获, 凡加 Mg^{++} 试验组均比不加者滴度高 1 $\log TCD_{50}$, 若生长液和维持液均加 Mg^{++} 时, 其效果更为显著, 滴度高 2 $\log TCD_{50}$ 。

三、细胞生长液和病毒维持液中加 Mg^{++} 对测定病毒 TCD_{50} 结果的影响

取同批消化制备的 CEC 分别加入两种细胞生长液, 一组按常规方法, 另一组在细胞生长液中加入 10 mM Mg^{++} 。各组细胞再分别加病毒维持液, 一种维持液为 10% 小牛血清 199, 另一种为前者同种病毒维持液中再加 10 mM Mg^{++} 。各组细胞管先补加病毒维持液 0.4 毫升, 然后将同批稀释成 10^{-3} — 10^{-7} 的病毒液接种入各组细胞内, 每管 0.1 毫升, 感染后 4 天判定。各组 TCD_{50} 测定结果见表 2。

从表 2 结果看出, 细胞管内加有 Mg^{++} 比未

表 2 细胞生长液和病毒维持液中加 Mg^{++} 对测定 TCD_{50} 结果的影响

实验组	Mg^{++} 加入		病毒稀释度					$\log TCD_{50}$
	细胞生长液	病毒维持液	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
1	+	+	+++*	+++	+++	±	±	6.0
2	+	-	+++	+++	+-	±	±	5.5
3	-	+	+++	+++	+++	+	-	6.0
4	-	-	+++	+++	--	--	--	4.5

* “+++”表示 2 个细胞管的细胞病变 (CPE) 结果, “+”为阳性; “±”为可疑; “-”为阴性。

加者检测病毒滴度其结果高 1.0—1.5 $\log TCD_{50}$, 进一步说明 Mg^{++} 可提高或增强细胞的敏感性, 如在 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度病毒量少的情况下其效果尤为明显。

四、病毒维持液 199 液和乳白蛋白水解物加 Mg^{++} 对病毒增殖的影响

取同批消化制备的细胞, 分别加或不加 Mg^{++} 的细胞生长液进行培养, 在感染病毒时, 先抽尽细胞生长液再换入以不同病毒维持液稀释成 1:100 的毒种 1 毫升, 培养 3 天后收获进行毒力滴度测定, 其结果见表 3。

从表 3 结果看出, 细胞生长液中加 Mg^{++} 的病毒滴度较未加者高。应用乳白蛋白做维持液与 199 液试验结果一致, 说明以乳白蛋白水

表 3 199 和乳白蛋白病毒维持液加 Mg^{++} 对病毒增殖的影响

实验组	细胞生长液	病毒维持液	病毒滴度 ($\log TCD_{50}$)
1	加 Mg^{++} 组	199 + Mg^{++}	6.0
2		乳白蛋白 + Mg^{++}	6.0
3		199	5.5
4		乳白蛋白	6.0
1	正常组	199 + Mg^{++}	5.0
2		乳白蛋白 + Mg^{++}	5.0
3		199	≤ 4.5
4		乳白蛋白	5.0

解物替代 199 制备森脑减毒口服活疫苗时, 在病毒滴度方面二者无明显差别。

五、病毒维持液加 Mg^{++} 和不同剂量脱脂牛乳对提高病毒滴度的影响

从表 1 和表 3 结果对比可以看出, 在病毒培养过程中维持液内不加血清时不仅滴度降低显著, 还影响对滴度的稳定性。

我们试用脱脂牛乳代替血清, 以提高病毒滴度和增强其稳定性并同时观察加 Mg^{++} 的效果。用 0.25% 乳白蛋白 Earle 氏液为基础液, 加入不同剂量的脱脂牛乳为病毒维持液培养病毒, 三天后收获测定各试验组的 TCD_{50} , 其结果见表 4。

表 4 病毒维持液加 Mg^{++} 和不同剂量脱脂牛乳对病毒滴度的影响

实验组	细胞生长液	病毒维持液中脱脂牛乳含量(%)	病毒滴度 ($\log TCD_{50}$)
1	加 Mg^{++} 组	5*	4.75
2		10	5.50
3		20	6.25
4	正常组	5	4.40
5		10	4.00
6		20	5.50

* 100 毫升乳白蛋白水解物加 5 毫升脱脂牛乳。

从表 4 结果可以看出, 在病毒维持液中加入 20% 的脱脂牛乳, 可明显提高病毒的滴度, 并进一步证明在细胞生长液中加入 Mg^{++} 对提高病

毒的滴度也是重要因素。

讨 论

在细胞培养病毒过程中, 于细胞生长液和病毒维持液中加入 Mg^{++} 可增强细胞的敏感性, 提高病毒的滴度, 其作用机制尚不完全清楚。

在培养脊髓灰白质炎^[3]、流感^[4]和森脑病毒过程中 Mg^{++} 的作用, 均可增强细胞的敏感性和提高病毒滴度。由于试验用细胞种类不同, 其对 Mg^{++} 的毒性耐受作用和增强效果也不同, 如在猴肾细胞培养流感^[4]和脊髓灰白质炎病毒^[2]时应用 Mg^{++} 的剂量为 20 和 25 mM, 而应用 CEC 培养森脑病毒时只能用 10mM, 但是猴肾细胞培养脊髓灰白质炎病毒时使用 12.5mM 剂量其效果不如 25mM 显著^[2]。

值得提出的, Mg^{++} 能增强细胞敏感性的效果对同一种病毒的强弱毒株似有不同, 如 Wallis 和 Melnick 报告^[2] 脊髓灰白质炎病毒 1 型弱毒株在猴肾细胞培养时加有 25mM Mg^{++} , 可提高病毒滴度 0.3—1.4 $\log TCD_{50}$, 平均为 0.8; 2 型弱毒株可提高 0.4—1.2 $\log TCD_{50}$, 平均亦为 0.8; 而在强毒株 1、2、3 型病毒均无明显地增强作用。我们应用森脑病毒弱毒株研究时, 证明在细胞生长液和病毒维持液中加入 10 mM Mg^{++} , 可提高病毒滴度 0.5—1.5 $\log TCD_{50}$ 。Dobrocka 和 Mayer 报告^[5] 应用森脑病毒强毒株试验时, 无论在病毒维持液或细胞生长液及维持液中均加 Mg^{++} 时, 仍不能提高病毒的滴度。从这两种病毒研究结果, 似可认为 Mg^{++} 对弱毒株病毒滴度的提高是显著的, 这对减毒活疫苗的制备是有实际应用价值的。

参 考 文 献

- [1] 黄永成等: 生物制品通讯, 9:1, 1980。
- [2] 黄永成等: 微生物学报, 20(2):196, 1980。
- [3] Wallis, C. & Melnick, J. L.: Virology, 16: 122, 1962.
- [4] Vonka, V.: Arch. ges Virusforsch, 15: 514, 1965.
- [5] Dobrocka, E. & Mayer, V.: Acta Virol., 11: 557, 1967.