

副流感病毒在不同传代细胞中增殖的比较

赵素兰 赵新生 蒋泓 张礼壁

(中国预防医学科学院病毒学研究所)

摘要 利用乳地鼠肾 BHK₂₁C₁₂ 传代细胞增殖副流感病毒 I、II、III 型获得成功。其病毒的增殖滴度与人胚肾细胞相似,血球吸附 $10^{-4.5}$ 。为副流感病毒的传代、保存、大量抗原的制备,为病毒的诊断和血清学调查提供了一种有效的传代细胞系。

关键词 副流感病毒;人胚肾细胞培养;传代细胞培养

原代猴肾细胞和人胚肾细胞是副流感病毒分离和增殖的首选细胞,但来源困难,使分离和研究工作受到限制。人源的传代细胞,如 Hela、Hep-2、KB,虽有报道能使副流感病毒有所增殖,但其敏感性较差。本文比较了一些传代细胞系对副流感病毒的敏感性,发现乳地鼠肾细胞的一个系,对副流感病毒 I、II、III 型具有较好的敏感性,其增殖病毒滴度与人胚肾细胞相似,现将结果报道如下。

材料和方法

(一) 病毒

副流感 I 型病毒 HA₂ 株,已在人胚肾细胞传六代,猴肾细胞传一代。副流感 II 型病毒 Greer 株,在人胚肾细胞传一代,猴肾细胞传五代。副流感 III 型病毒 HA₁ 株,已在人胚肾细胞传一代,猴肾细胞传五代。

(二) 细胞

人胚肾原代细胞,用 0.25% 胰酶消化人胚肾皮质,按常规 4℃ 冷消化制备。Vero 细胞, Hela 细胞, BHK-21 细胞, HL 细胞, Hep-2 细胞, BHK₂₁C₁₂ 细胞等传代细胞均用 EDTA 消化传代, 37℃ 静置培养,长成片后感染病毒。

(三) 培养液

人胚肾细胞的生长液为含 10% 小牛血清的 0.5% 水解乳白蛋白液, pH7.0, 传代细胞的生长液均为 10% 小牛血清的 Eagle's 液, pH7.4—7.6, 感染病毒后均用 2% 小牛血清的

Eagle's 液 pH7.4, 生长液和维持液均含 100u/ml 的青霉素、100μg/ml 的链霉素和 200 μg/ml 的卡那霉素。

(四) 病毒生长的测试方法

用血球吸附试验检测病毒在细胞中的增殖,部份还取培养液作血凝素的检测。用血球吸附抑制试验,作增殖病毒特异性的检定和病毒的分型。

实验结果

(一) 副流感病毒 I、II、III 型在不同细胞中的增殖

将副流感病毒的不同型别分别接种于多种细胞,于第 4 和第 7 天用血球吸附法检测病毒的繁殖情况(表 1)。从(表 1)结果可以看到 I、II、III 型均能较好地在 BHK₂₁C₁₂ 细胞中增殖,与原代人胚肾细胞的结果相似,其它种传代细胞,增殖效果较差。

值得指出的是副流感 I 型感染 Hela 细胞后会出现细胞融合病变,血凝素滴度也能达到 1:32,但 II 型不呈融合病变亦无血凝和血球吸附现象,III 型有时出现细胞融合病变,有血球吸附现象其血凝素滴定 1:64。

(二) 副流感病毒在 BHK₂₁C₁₂ 细胞中传代适应和出现血球吸附的程度和天数

将在人胚肾中传代的副流感病毒感染 BHK₂₁C₁₂ 细胞,经表 2 可以看出,不论 I、II、III 型,第一代时在第四天均未能出现血球吸附现象,然而传至第二代,则在感染后第四天,约

表1 副流感病毒 I、II、III 型在各种不同细胞中的增殖

细 胞	副 流 感 I 型			副 流 感 II 型			副 流 感 III 型		
	1 代	2 代	3 代	1 代	2 代	3 代	1 代	2 代	3 代
人胚肾	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Vero	±	/	/	±	/	/	±	/	/
Hela	+	++	/	-	-	/	+	/	/
BHK-21	±	/	/	±	/	/	±	/	/
HL	+	±	-	+	+	-	++	±	-
Hep-2	±	/	/	±	/	/	±	/	/
BHK ₂₁ C ₁₃	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

注：“±”为可疑，“-”为血球吸附阴性，“+-++++”代表不同程度的血球吸附，“/”未做。

表2 副流感病毒在 BHK₂₁C₁₃ 细胞中传代情况

病 毒	血球吸附阳性出现的天数		
	4	5	7
副流感 I 型 1 代	-	++	++++
副流感 I 型 2 代	+++	/	/
副流感 I 型 3 代	++++	/	/
副流感 II 型 1 代	-	/	+++
副流感 II 型 2 代	+++	/	/
副流感 II 型 3 代	++++	/	/
副流感 III 型 1 代	-	/	+++
副流感 III 型 2 代	+++	/	/
副流感 III 型 3 代	++++	/	/

“+”为 25% 的细胞有血球吸附，“++”为 50% 的细胞有血球吸附，“/”为未做。

表3 副流感病毒 I、II、III 型在 BHK₂₁C₁₃ 细胞中增殖的程度

型别	传代数	接种剂量	滴度(血球吸附法)	血凝素滴度
I	2	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	1:16 (1 代)—1:256 (4 代)
II	5	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	1:128 (1 代)—1:256 (5 代)
III	5	10 ⁻⁶	10 ^{-6.5}	1:32 (1 代)—1:256 (5 代)

75% 以上的细胞有血球吸附能力。实验说明，副流感病毒能适应生长于 BHK₂₁C₁₃ 细胞，其适应过程是很快的。

(三) 副流感病毒在 BHK₂₁C₁₃ 细胞适应后的病变增殖滴度

分别用血球吸附法和培养液血凝素滴定法来测试副流感病毒在 BHK₂₁C₁₃ 细胞中的病毒增殖程度，结果见表 3。

以 10⁻⁶ 的感染量，每瓶接种 0.8ml 加维持液至 8ml，生长至 3 天，取维持液中的病毒作血

凝素滴度，和在细胞管中作病毒滴度(血球吸附法)，经适应后血凝素滴度能高达 1:256，病毒滴度为 10⁻⁶—10^{-6.5}，与人胚肾细胞比较，病毒滴度均相似。经多次重复试验证明，副流感病毒在 BHK₂₁C₁₃ 细胞中增殖的滴度稳定。血球吸附现象均可被同型抗血清完全抑制。

讨 论

副流感病毒是急性呼吸道感染的重要病原之一，能引起婴儿和儿童的上呼吸道感染，支气管炎，支气管肺炎和格鲁布肺炎等，我国全年都有散布病例，有时也有局部的流行。由于病毒的分离工作需要用猴肾细胞和人胚肾细胞，使工作受到很大限制。文献报告 Hela, Vero^[1,2] 等人源的传代细胞也能增殖病毒，但由于敏感性较差而不能在分离病毒中使用。我们比较了七种细胞对常见的副流感病毒 I、II、III 型作了敏感性的测定，找到了 BHK₂₁C₁₃ 细胞能增殖 I、II、III 型副流感病毒，其病毒的增殖滴度与人胚肾细胞者相似。这样为副流感病毒的传代、保存和大量抗原的制备提供了有效的传代细胞系，为该病毒的诊断和血清学调查提供了方便的条件，能否直接用 BHK₂₁C₁₃ 细胞分离病毒，有待进一步工作。

BHK-21 细胞能增殖副流感病毒 Sendai 株^[3]，当完整病毒感染后有成熟病毒释放，而与缺损病毒同时感染，则使 BHK-21 发生持续感染。我们的工作表明不同的传代 BHK-21 细胞其敏感性各异，BHK₂₁C₁₃ 细胞比 BHK-21 细胞敏感，而且对 I、II、III 型副流感病毒都有较

好的增殖,发生这一情况可能与 BHK-21 细胞在传代过程中的代谢改变有关。

参 考 文 献

[1] Chanock R. M.: Parainfluenza viruses. in Diagnostic

Procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections Edited by Lennette E. H. and Schmidt N. J. American Public Health Association, Washington D C. P. 611—632, 1981.

[2] Kristensson K. and Orvell C.: *J. Gen. Virol.* 64: 1673, 1983.

[3] Roux I. et al: *Virology* 138: 118. 1984.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>