

【论著】

[文章编号] J1004-8685(2003)02-0150-02

甲 3 型、乙型流感病毒在 MHL 混合细胞中增殖的研究

姜庆五¹, 居丽雯¹, 甘愉¹, 蒋露芳¹, 周联娣¹, 陆嘉良¹, 谈兆麟²

(1. 复旦大学公共卫生学院, 200032 上海; 2. 香港中文大学医学院微生物学系)

摘要 [目的] 建立 MHL 混合细胞瓶分离培养流感病毒的方法, 为进行流感监测及临床快速诊断打下基础。[方法] 采用 MDCK、HEP-2、LLC 混合细胞培养瓶和 MDCK 单一细胞培养瓶, 同时分别接种甲 3 型和乙型流感病毒标准毒株, 并设立阴性细胞对照组, 观察甲 3 型和乙型流感病毒毒株在混合细胞瓶和 MDCK 细胞瓶中的细胞病变效应 (CPE)、血凝滴度和单克隆抗体荧光染色情况。[结果] 病毒血凝滴度分别均为 1:160, 经 1:5 稀释的甲 3 型和乙型流感病毒接种 MHL 混合细胞瓶和 MDCK 细胞瓶经 37、48h 培养后, 感染甲 3 型病毒细胞出现细胞拉网、团聚病变现象, 感染乙型流感病毒细胞则出现明显细胞固缩、脱落现象, MDCK 单一细胞培养瓶 CPE 强于混合细胞培养瓶: 37、72h 培养后, 检测血凝滴度, 感染甲 3 型流感病毒的 MDCK 细胞和混合细胞均为 1:40。感染乙型流感病毒的 MDCK 细胞为 1:120, MHL 混合细胞为 1:20; 单克隆抗体检测, 感染甲 3 型和乙型流感病毒的 MDCK 细胞和混合细胞均呈阳性。[结论] 应用 MDCK、HEP-2、LLC 混合细胞瓶分离、培养, 不仅可对甲型流感爆发进行流行病学监测, 同时还可分离鉴定其它呼吸道病毒, 利于临床诊断、治疗和预防。

关键词 流感病毒; 混合细胞培养**Observation of influenza A and B viruses cultured in mixed cells**

Jiang Qingwu Ju Liwen Gan Yu Lu Fangjiang Lian Dizhou John S. Tam * School of Public Health, Fudan University, Shanghai, 2003, China; * Department of Microbiology, Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR.

Abstract We inoculate influenza A (H3) and B virus in a shell-vial of mixed cells of MDCK, Hep-2 and LLC-MK2 cells or shell vials of MDCK cells alone to observe for the presence of cytopathic effect (CPE), haemagglutination and monoclonal antibody-based immunofluorescence assay. Results demonstrated that after incubated at 37 for 24h, the mixed cell culture or MDCK cells alone which were inoculated with influenza A virus, cytopathic effect of viral infection were observed. The CPE observed in the MDCK cells alone vial was stronger than that of the mixed cell culture. After incubated at 37 for 72h, hemagglutination assay showed that for influenza A (H3) virus, the titres were both 1:40 in mixed cells vial and MDCK alone vial while influenza B virus inoculated in MDCK cells vial is 1:120 and inoculated in mixed cells vial is 1:20. Influenza A (H3) and B virus were detected in mixed cells vial or in MDCK cells vial by McAb-based immunofluorescence assay.

Key words influenza virus, mixed cells culture

[中图分类号] R373

[文献标识码] A

适合甲、乙型流感病毒增殖的敏感细胞株依次为分别为 Mr-Lu、pRhMK、MDCK 细胞^[1], 而引起上呼吸道感染的主要病毒并不都适合在上述细胞内增殖, 如呼吸道合胞病毒适合在 HEP-2 细胞中生长。因此, 培养分离检测不同的上呼吸道病毒要分别选用适当的敏感细胞株, 如果采用混合细胞瓶分离培养则可以检测数种主要的上呼吸道病毒^[2-5]。但混合细胞培养对主要上呼吸道病毒中的某些病毒, 比如甲、乙型流感病毒与单一敏感细胞培养是否有区别? 为此, 我们用甲 3 型和乙型流感病毒的标准毒株感染混合细胞培养瓶, 观察其细胞病变效应、血凝滴度和单克隆抗体荧光染色结果, 了解流感病毒在混合细胞培养瓶中的增殖情况。

1 材料与方法**1.1 材料**

(1) MDCK 细胞, 34 代; HEP-2 细胞, 410 代; LLC 细胞, 309 代; 均由香港中文大学谈兆麟教授赠送。

(2) A/上海/49/78 (H3N2); B/北京/6/54 为本实验室保存毒株。

(3) 细胞生长液: D-MEM 母液加胎牛血清, 终浓度为

10%; 病毒培养液: D-MEM 母液加 TPCK-胰酶, 终浓度为 2μg/ml。

(4) 抗甲 3 型流感病毒单克隆抗体, 代码 MAB8254; 抗乙型流感病毒单克隆抗体, 代码 MAB8661; 抗 IgG 荧光标记抗体, 代码 AP124F, 均由 Chemical 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 MDCK 细胞培养瓶 MDCK 细胞在 T75 细胞瓶中长成单层细胞后, 经 EDTA-胰酶消化, 分装培养瓶中, 3ml/瓶 (细胞数为 $2 \sim 5 \times 10^5$ /ml), 然后置 37、5% CO₂ 温箱中长成 80% 左右的细胞单层。

1.2.2 混合细胞培养瓶 MDCK、HEP-2、LLC 三株细胞分别在 T75 细胞瓶中长成单层细胞后经 EDTA-胰酶消化, 分别对 MDCK、HEP-2、LLC 细胞悬液计数后混合, 制成细胞数为 1.5×10^5 /ml 的细胞悬液, 其中每株细胞细胞数分别为 5×10^4 /ml。将上述混合细胞悬液分装培养瓶中, 3ml/瓶, 置 37、5% CO₂ 温箱中长成 80% 左右的细胞单层。

1.2.3 病毒接种、检测 将血凝滴度均为 1:160, 经 1:5 病毒培养液稀释的甲 3 型、乙型流感病毒标准毒株 0.3ml 分别接种

MDCK 细胞各 5 瓶、混合细胞各 5 瓶,同时随机取 MDCK 细胞和混合细胞各 5 瓶,接种 0.3ml 病毒培养液,作为阴性对照。置 37℃、3500r/min 离心 1h。弃上清液,加入病毒培养液 2.5ml,置 37℃、5%CO₂ 温箱中培养。

第 2d 开始观察对照组、病毒感染 MDCK 细胞瓶和混合细胞瓶的细胞形态。待病毒感染 MDCK 细胞瓶、混合细胞瓶 CPE ++~+++ 后,取出对照组和病毒组细胞上清液进行血凝试验,同时刮下对照组、病毒组细胞滴于 12 孔玻片上每瓶细胞 2 孔。自然干燥,冷丙酮-甲醇固定,PBS 盐溶液清洗 3 次后,每孔加经 PBS1:100 稀释的相应单克隆抗体 50μl,37℃ 湿盒孵育 30min,PBS 盐溶液清洗 3 次,每孔加荧光标记抗 IgG 抗体 50μl,37℃ 湿盒孵育 30min,PBS 盐溶液清洗 3 次,晾干,滴加荧光镜油,置荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 细胞病变效应 (CPE) 感染甲 3 型及乙型流感病毒的 MDCK 细胞瓶和混合细胞瓶,第 2d 观察 CPE(±)。第 3d 甲 3 型流感病毒感染细胞即可见细胞拉网、团聚现象,CPE(++);乙型流感病毒感染细胞则主要表现为细胞固缩和细胞脱落现象,CPE(+++)。正常对照细胞无 CPE。

2.2 血凝试验 第 3d 检测病毒感染细胞和对照组细胞血凝滴度。感染甲 3 型流感病毒的 MDCK 细胞瓶和混合细胞瓶血凝滴度均为 1:40;感染乙型流感病毒的 MDCK 细胞瓶血凝滴度为 1:120,混合细胞瓶为 1:20。正常对照细胞瓶阴性。

2.3 单克隆抗体荧光染色 在检测血凝滴度的同时进行单克隆抗体荧光染色。低倍镜下,感染甲 3 型或乙型流感病毒的 MDCK 细胞和混合细胞,可见细胞及细胞碎片荧光着色明显;对照组则隐约可见染有黯淡荧光的完整细胞。高倍镜下,感染流感病毒的 MDCK 细胞和混合细胞,细胞周边有绿色荧光光环或荧光偏于一侧;对照组则见黯淡荧光细胞。比较混合感染细胞和 MDCK 感染细胞荧光着色情况,混合感染细胞则更能突显阳性感染荧光细胞。进一步实验显示,甲 3 型流感病毒血凝滴度 1:40,经 1:106 稀释后,感染混合细胞培养瓶,经 48h 培养后,单克隆抗体荧光染色,便可观察到强阳性结果。

3 讨论

MDCK、HEP-2、LLC 混合细胞瓶适合分离培养主要上呼吸道病毒。如甲 1、甲 3、乙型流感病毒,副流感病毒 1、2、3 型,呼吸道合胞病毒 A、B 型,腺病毒等。本实验,我们通过用甲、乙型流感病毒标准毒株,同时接种混合细胞培养瓶和 MDCK 细胞培养瓶,比较观察细胞病变效应、血凝滴度和单克隆抗体荧光染色情况。

3.1 细胞病变效应 甲 3、乙型流感病毒接种混合细胞培养瓶和 MDCK 细胞培养瓶经 37℃、48h 培养均出现细胞病变效应,MDCK 细胞培养瓶 CPE 强于混合细胞瓶。这可能是因为混合细胞瓶中存在有不适合流感病毒增殖的细胞,但仍可以看到,其中适合流感病毒增殖的细胞 CPE 很强。同时由于我们接种的是流感病毒的标准毒株,所以细胞病变效应产生较快。

3.2 血凝滴度 经 37℃、72h 增殖后,感染甲 3 型流感病毒的 MDCK 细胞瓶和混合细胞瓶血凝滴度没有明显区别。感染乙型流感病毒的 MDCK 细胞瓶血凝滴度明显高于混合细胞瓶。这可能是因为,MDCK 细胞瓶中含有较多适合流感病毒增殖的

细胞,经培养相同时间后,其上清液中含有更多的病毒颗粒,呈现较高的血凝滴度。

3.3 单克隆抗体荧光染色 感染混合细胞和感染 MDCK 细胞经单克隆抗体荧光染色与未感染病毒的对照细胞比较,均呈阳性结果。但感染混合细胞较感染 MDCK 细胞在荧光显微镜下阳性细胞更突显。这可能是因为混合细胞中含有对流感病毒不敏感的细胞株,掺合在其中使敏感细胞荧光亮点就更突显出来,便于观察阳性荧光细胞。同时我们还对甲 1 型流感病毒感染细胞的刮片用抗甲 3 型单克隆抗体进行荧光染色,结果未见阳性荧光细胞。提示单克隆抗体荧光染色检测病毒特异性较高,运用不同的单克隆抗体甚至可进一步鉴定病毒的型与亚型。血凝滴度为 1:40 甲 3 型流感病毒标准毒株,经 1:105 稀释后感染混合细胞瓶,37℃、48h 培养后,单克隆抗体荧光染色呈阳性,说明混合细胞瓶培养甲 3 型流感病毒是敏感的,可用单克隆抗体荧光染色进行快速检测。

对上呼吸道感染标本的病毒培养检测,通常是根据经验怀疑为某一病毒感染,然后选用适合该病毒增殖的细胞株进行分离培养 1wk^[6],再用相应的单克隆抗体标记技术鉴定(因为观察细胞病变和血凝滴度都为非特异性诊断)。但上呼吸道病毒感染的临床症状往往很相似,显然传统细胞株分离培养检测上呼吸道病毒有时不能得到阳性结果,而且培养时间较长。用混合细胞瓶分离培养上呼吸道主要病毒,并用荧光标记单克隆抗体技术鉴定,不但可以进行病毒的快速检测,且比较传统细胞更易于观察阳性荧光细胞,用抗不同病毒、或不同型与亚型的荧光标记单克隆抗体则可鉴别混合细胞瓶中感染的不同病毒、病毒型与亚型。因此采用 MDCK、HEP-2、LLC 混合细胞瓶分离、培养,不仅可以对易造成爆发流行的甲型流感病毒人群感染情况进行流行病学监测,同时还可以分离鉴定其他主要上呼吸道病毒,由于 48h 可出结果^[6],利于临床诊断和治疗,以及避免临床滥用抗生素。

参考文献

- [1] Yung T. Huang and Brian M. Turchek. Mink Lung Cells and Mixed Mink Lung and A549 Cells for Rapid Detection of Influenza Virus and Other Respiratory Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38(1):422-423.
- [2] Jose M. Navarro - Mari, Sara Sanbonmatsu - Gamez, et al. Rapid Detection of Respiratory Viruses by Shell Vial Assay Using Simultaneous Culture of HEp - 2, LLC - MK2, and MDCK Cells in a Single Vial. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. 37(7):2346-2347.
- [3] Johnston, S., and C. Siegel. A comparison of direct immunofluorescence, shell vial culture for influenza A and B. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1991, 14:131-134.
- [4] Matthey, S., D. Nicholson, et al. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. *J. Clin Microbiol.* 1992. 30:540-544.
- [5] Mendoza, J., J. M. Navarro, A. Rojas, and M. de la Rosa. Evaluation of immunofluorescence, two enzyme immunoassays and the shell vial assay for detection of respiratory syncytial virus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1991. 10:40-42.
- [6] Caroline K. Y. Fong, Mi Kyung Lee, and Brigitte P. Griffith. Evaluation of R - Mix FreshCells in Shell Vials for Detection of Respiratory Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38(12):4660-4662.

(收稿日期:2002-11-18)