DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.02.004

流行性出血热病毒Vero-E6细胞病变株的分离和鉴定

朱德钟 刘启富 （微生物学教研室）

提 要 从EHF患者血清中分离到8株EHF病毒，在E 6细胞中传代适应过程中，发现有5株EHF病毒分别在第4～10代出现规律的细胞病变（CPE），对其中两个 CPE 株（HFN-04和-19）进行了一系列特异性鉴定试验。实验结果表明：（1）病毒的CPE发展与病毒增殖动态完全一致；（2）CPE株的主要生物学和理化性状均符合EHF病毒；（3）用CPE株病毒感染细胞抗原片检测EHF患者双份血清，其恢复期血清抗体均呈4倍以上增高反应；（4）病毒的CPE可被患者血清及EHF、KHF免疫血清所中和，不能被正常兔血清和 Reo 病毒1—3型多价血清所中和；（5）CPE株病毒感染的E6细胞几乎能完全吸收EHF患者血清及EHF、KHF抗血清中的特异性抗体；（6）CPE株病毒感染鼠脑悬液与EHF病毒A9株 McAb25-1致敏血球呈阳性血凝反应。据此，首次证实了EHF病毒至少有部分毒株能引起E6细胞规律性CPE。EHF病毒CPE株的发现为EHF的诊断和防治工作提供了有利条件。

关键词 流行性出血热病毒；Vero-E6细胞病变株

1978年Lee氏等用黑线姬鼠首次分离朝鲜出血热病毒（KHFV）成功后，曾以11种人和动物细胞（含绿猴肾传代细胞—Vero细胞），未发现有敏感细胞[1]。不久French等却成功地将KHFV适应到人肺癌细胞（A_{549}细胞）[2]，McCormick等又将KHFV适应到Vero-E6细胞，并发现可产生蚀斑[8]。此后宋氏[3]及其他学者[5-7][10-12]，先后证实我国分离的流行性出血热病毒（EHFV）也能在E6细胞和A_{549}细胞中传代适应，但他们都未观察到明显的细胞病变。而我们于1983年自四川南充地区12例EHF患者急性期血清中，用E6细胞分离到8株EHFV[15]，在E6细胞中传代适应过程却发现有5株EHFV产生规律性的细胞病变（CPE）。本文报导其中2个EHFV E6细胞CPE株（HFN-04，-19）的主要生物学和理化性状以及血清学鉴定结果。

材料和方法

一、病毒 EHFV-04，-19株系自四川EHF患者血清以E6细胞分离并在其中传至7代和13代的感染细胞培养物，-20℃冻存备用。

二、血清

1. EHF患者双份血清：采自南充地区人民医院。

2. EHFV抗血清：(1)抗EHFV-陈株[6]及抗KHFV76/118株兔血清由安徽省医科所倪大石教授惠赠；(2)抗Reo 1～3型血清由解放军302医院吴慎主任惠赠；(3)EHF病毒McAb-25-1致敏血球由病毒研究所陈伯权教授提供[14]；(4)其他血清由本校附属医院提供，-20℃保存。

三、E6细胞传代适应及IFA检测方法：按李氏报导[5]。

四、理化试验（耐酸性、核酸型及乙醚敏感性试验）及中和试验：按文献[13]。

五、小白鼠：昆明种，本校动物所提供。

结果

一、EHF病毒在E6细胞中出现CPE的代数及其CPE特点

在EHF患者急性期血清接种E6细胞并进行细胞传代适应过程中，每代除以IFA检测发现特异性免疫荧光细胞外，同时注意观察CPE。发现有5株于第2～6代IFA检测阳性的EHF病毒（04、02、05、08及19），分别在继续传代的第4～10代时出现CPE。其CPE特点为细胞核折光性增强，胞浆内颗粒增多，胞浆膜折皱或收缩变圆，直至全细胞层脱落；而同批对照E6细胞和另3株EHF病毒感染的E6细胞则无异常（图1～3）。

二、EHF病毒在E6细胞培养中CPE发展的动态

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

5个EHF病毒E6细胞CPE株中任选了04和19两株接种E6细胞后，每隔一天以IFA和CPE平行观察病毒繁殖动态(表1)。表1可见两株病毒在E6细胞中规律地于接种后第4和第6天开始出现CPE，同时IFA阳性细胞也开始出现，两者呈平行发展，表明该CPE是特异性的。

表1 EHF病毒在E6细胞中CPE和IFA动态观察

病毒株	代数	观察项目	接种后天数					
			2	4	6	8	10	12
HFN-04	7	CPE*	−	+	++	++	++	++
		IFA△	−	10	30	60	90	≃100
−19	13	CPE*	−	−	+	++	++	++
		IFA	−	−	10	30	60	>90

注：* 表示病变细胞数量和CPE程度；
△ 表示阳性荧光细胞占总细胞数的%

三、EHF病毒在E6细胞中CPE和IFA滴定比较

EHF病毒04和19株分别以10倍稀释法在E6细胞中滴定$TCID_{50}$，平行地用CPE和IFA观察，结果两种观察指标所得感染滴度完全一致（04株为$10^{6.5}$，19株为$10^{6.0}$）。

四、EHF病毒E6细胞CPE株的特异性鉴定

1．生物学试验

(1)．包涵体染色　以HFN-04和19株病毒感染的E6细胞(呈CPE "++"时)及正常E6细胞同时用姬姆萨氏与HE染色，镜检均未找到包涵体；

(2)．血凝和血吸附试验　取HFN-04和19株感染E6细胞的维持液及细胞层与"O"型人红细胞作直接血凝和血吸附试验均为阴性结果；

(3)．过滤试验　EHF病毒04和19株悬液各2份，一份经0.2μ滤膜过滤，另一份作对照，同时接种E6细胞培养，结果证明04和19株病毒均能通过0.2μ滤孔；

(4)．对Hela细胞的敏感性　将HFN-04和19株病毒分别接种Hela细胞，连续传代三次，用IFA检测证明病毒未增殖；

(5)．对小白鼠的感染性　将HFN-04和19株病毒悬液分别脑内接种鼠婴（2～6天）及成年（3～4周）小白鼠，前者于第一代接种后14～17天发生脑炎症状而死亡，脑肺切片中可查见特异性荧光细胞；而后者1个月后仍不发病，脑肺切片也未找到特异性抗原，血清中则有EHF病毒抗体（1:160～1:320）。

2．理化试验

表2 物理和化学因子对HFN-04和-19两株病毒的作用

试验	方法	结果 -04株	结果 -19株
物理因子耐温性	A 60℃ 30′	0/4△	0/4
	56℃ 30′	2/4	2/4
	B 4℃ 30′	4/4	4/4
耐酸性	A pH3.0 4℃ 60′	$10^{1.0}$	$10^{1.0}$
	B pH7.4 4℃ 60′	$10^{6.0}$*	$10^{6.0}$
紫外线照射	A 15W 30cm 30′	0/4	0/4
	B 未照射、室温 30′	4/4	4/4
化学因子核酸型	A含5 IUDR 50μg/ml	$10^{6.0}$*	$10^{5.5}$
	B不含IUDR	$10^{6.5}$	$10^{6.0}$
乙醚敏感性	A 病毒液+20%乙醚 4℃ 20小时	$10^{1.0}$	$10^{1.0}$
	B 病毒液+20%乙醚 4℃ 20小时	$10^{6.5}$	$10^{6.0}$

注：A为试验组，B为对照组，* 为$TCID_{50}$/ml。△ 为IFA阳性细胞管数/接种管数。

表2可见HFN-04和-19病毒经60℃30分钟完全灭活，56℃30分钟部分灭活，不耐酸，紫外线照射有良好效果；对乙醚敏感，而5 IUDR50μg/ml对它们均无抑制作用。这些性状与EHF病毒完全相符[11]。

3．血清学鉴定

(1)．EHF病毒E6细胞CPE株对EHF患者双份血清的检查

用HFN-04和-19株病毒感染E6细胞抗原片及军科院提供的HF8205株抗原片，平行检查5例EHF患者双份血清，结果如表3所示，5例患者恢复期抗体水平均有四倍以上增高，而且抗体滴度也与军科院HF8205株完全一致。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

表3 HFN-04和-19株病毒抗原片检测EHF患者双份血清

病例	病日	IFA抗体效价（倒数）		
		HFN-04	HFN-19	军科院HF_{8205}
1	4	20	20	20
	15	320	320	320
2	3	<20	<20	<20
	13	5120	5120	5120
3	5	80	80	80
	14	1280	1280	1280
4	6	80	80	80
	17	1280	1280	1280
5	5	20	80	20
	15	1280	1280	1280

(2). 吸收试验 用HFN-04和-19两株病毒感染的E6细胞和正常E6细胞分别吸收安徽陈株、KHF76/118抗血清以及04、19患者恢复期混合血清后，再以04，19株抗原片来测定吸收后血清抗体效价。结果如表4所示，两种EHF病毒抗血清及患者恢复期血清经正常E6细胞吸收后，抗体滴度不受影响，而经04和19病毒感染细胞吸收后，则IFA抗体效价显著降低，表明它们之间抗原一致性。

表4 HFN-04和-19病毒对EHF病毒抗血清和患者血清的吸收试验

病毒抗原	吸收细胞	吸收后IFA抗体效价(倒数)		
		皖陈	EHF>6/118	患者血清
HFN-04	正常E_6	640	1280	640
	-04感染E_6	40	40	40
HFN-19	正常E_6	640	1280	640
	-19感染E_6	40	40	40

(3). 中和试验 按4倍稀释法以维持液稀释血清与等量100TCID50病毒液（04和19株）混合，37℃作用30分钟后接种E6细胞，同时作病毒、血清和细胞对照。以CPE观察判定终点。结果（表5）正常兔血清和Reo 1—3型混合血清均无中和作用，而两种EHF病毒抗血清及患者血清则显示几乎完全一致的血清学反应。

表5 HFN-04和-19株病毒对EHFV抗血清，Reo 1—3型抗血清及患者血清的中和试验

病毒株	血清中和抗体效价（倒数）				
	皖陈	KHF76/118	患者	Reo1—3	正常兔
HFN-04	1280	1280	1280	<20	<20
HFH-19	5120	5120	>5210	<20	<20

(4). EHF病毒单克隆抗体致敏血球的反向间接血凝试验

用HFN-04株感染小鼠脑悬液作自1:10起始的倍比稀释，同时以正常小鼠脑悬液同样稀释作对照，与EHF病毒A9株单克隆抗体25-1致敏的血球做反向间接血凝，结果正常鼠脑<1:10，而感染鼠脑血凝效价为1:160，表明HFN-04株病毒与我国EHF病毒A9株[3]具有一致的组抗原[14]。

讨 论

从四川省南充地区EHF患者急性期血清中分离到8株EHF病毒[15]，在E6细胞中传代适应过程发现有5株（HFN-02、04、05、08及19）病毒分别于第4～10代出现规律性的细胞病变（CPE）。对其中两株病毒（HFN-04和19）的CPE进行了一系列的特异性鉴定试验。试验结果表明：（1）病毒在E6细胞培养中CPE的发展与病毒繁殖动态完全一致；（2）CPE株病毒的主要生物学性状和理化性状完全与EHF病毒相符[11]；（3）用CPE株病毒感染细胞的抗原片检测EHF患者双份血清，其恢复期血清抗体均呈4倍以上增高反应；（4）病毒的CPE能被

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

EHF患者恢复期血清、EHF抗血清和KHF抗血清所中和，而不能被正常血清和Reo病毒1—3型多价血清中和；(5) CPE株病毒感染细胞几乎能完全吸收EHF患者血清、EHF和KHF抗血清中的特异性抗体。(6)CPE株病毒感染鼠脑悬液与EHF病毒A9株McAb25-1致敏血球的反向间接血凝结果阳性。据此，充分证明这些在E6细胞中出现CPE的病毒是EHF病毒。

文献报导EHF病毒在E6细胞中增殖后可产生蚀斑[8]，但不引起明显的细胞病变[3][5][7][10-12]。而本文却首次证实EHF病毒至少有部分毒株可在E6细胞中规律地产生细胞病变。由于细胞病变的发展与病毒增殖动态完全一致，可很方便地利用CPE的观察来代替复杂昂贵的IFA检测法进行病毒定量测定和中和试验。这就为流行性出血热防治研究工作中的病毒分析诊断、疫苗选株[4]、血清流行病学调查以及疫苗效果考核等实际工作提供了有利条件。

在同一地区不同患者分离到的8株EHF病毒中还有3株（HFN-29、34和35）至今（在E6细胞中已传10代以上）尚未出现明显的CPE。这3株EHF病毒在E6细胞中的病毒荧光分布模式与CPE株有所不同。前者常呈颗粒状散在于胞浆内，而后者多在胞浆内片状融合（见图4—5）。是否这3株EHF病毒的增殖能力尚未达到致E6细胞CPE的临界点？抑或它们对E6细胞的毒力较低？此外，对E6细胞致CPE能力不同的这两组EHF病毒是否尚未存在其他方面的差别？均尚待进一步探讨。

（承蒙南充地区人民医院邢光辉院长、第四军医大学汪美先教授、安徽省医科所倪大石教授以及军事医学科学院李钟铎主任帮助，特此致谢！）。

参考文献

1. Lee HW, et al. J Infect Dis 1978; 137 (3):98～308
2. French GG, et al. Science 1981; 211: 1046～1048
3. 宋干，等。中华微生物学和免疫学杂志 1982; 2(5):269～273
4. Kifamura T. 病毒学报1985; 1(2): 197
5. 李钟铎，等。中华流行病学杂志1983; 4:198～201
6. 倪大石，等。中华医学杂志1983; 63: 65～68。
7. 罗兆庄，等。中华微生物学和免疫学杂志1985; 5(2): 79～81
8. McCormick JB, et al. Lancet 1982; 1: 765
9. 廖化新，等。中华微生物学和免疫学杂志1984; 4(2):124～127
10. 向近敏，等。湖北医学院学报1985; 6 (1):1～6
11. 宋干，等。中华微生物学和免疫学杂志 1983; 3(2):76～79
12. 谢运菊，等。四川医学1984; 5(1): 2～4。
13. 中国医学科学院流研所编。常见病毒病实验技术。科学出版社，1978
14. 陈伯权，等。中华微生物学和免疫学 1985;5(3):136～139。
15. 朱德钟，等。第三军医大学学报1987; 9(1):92～93

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

in the tissue of the cystic duct. The difference of NA concentration between the cystic duct tissue and other biliary tissues was statistically significant($P<0.01$), while the difference among the tissues other than that of the cystic duct was not remarkable($P>0.05$).

Immunohistochemical study revealed that there are 4 kinds of immunoactive peptidergic nerves, i. e. nerves with vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P(SP), L-enkephalin (L-ENK), and somatostatin (SOM) respectively. The 4 kinds of nerves distribute extensively in all the tissue layers of the extrahepatic biliary tract and participate in the formation of all the nerve plexuses. Among them, VIP nerves are the richest, then the SP and L-ENK nerves, and the SOM nerves the sparsest. In general, peptidergic nerves are densely distributed in the sphincter of Oddi.

Finally the physiological significance of the peptidergic nerves was discussed.

Key words: Cholinergic nerve; Adrenergic nerve; Peptidergic nerve; Gall bladder; Extrahepatic bile ducts

(p.134)

Isolation and Identification of cytopathogenic Effect Strains of Epidemic Hemorrhagic Virus in Vero-E_6 Cell Culture

Zhu Dezhong, Liu Qifu (Department of Microbiology, Third Military Medical College)

Five strains out of the 8 of epidermic hemorrhagic fever(EHF)virus isolated from the serum of the acute phase of EHF patients in Nanchong, Sichuan were found to have cytopathogenic effect(CPE)through 4th to 10th passages in Vero-E6 cell culture. The biological, physico-chemical and antigenic characteristics of HFN-04 and HFN-19, 2 out of the 5 CPE strains, were identified. The results were as follows:

(1) The CPE development and the dynamic proliferation of the virus are consistent.

(2) The main biological and physico-chemical characteristics of the 2 CPE strains are the same as those of EHF virus.

(3) When paired samples of EHF patients' serum were tested with the slide antigens of E6 cells infected with these CPE strains, all the convalescent serum demonstrated an increase by 4 fold or more of the IFA titer.

(4) The CPE of the virus can be neutralized by EHF patient's serum or EHF and KHF antisera, but not by normal rabbit serum or the

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

multivalent serum of Reovirus type 1—3.

(5) The E6 cells infected by CPE strains of virus can almost fully absorb the specific antibodies in EHF patients or in EHF and KHF antisera.

(6) The suspension of the mouse brain infected by CPE strains can form positive agglutination reaction with the sentitized blood cells by EHF virus strain A9 McAb 25-1.

On the basis of our observation, it can be concluded that at least certain strains of EHF virus can produce CPE in Vero-E6 cell culture.

Key words: Epidemic hemorrhagic fever virus; Cytopathogenic effect; Vero-E6 cell

(p.139)

Determination of DNA content in Different Human Lung Cancers with Microspectrophotometer

Wang Dengshun, et al (Department of Pathology, Third Military Medical College)

The DNA contents of 39 surgically resected specimens of different histopathological kinds and types of human lung cancer were determined with microspectrophotometer. Among them, 3, 6, and 5 cases were diagnosed as well, moderately and poorly differentiated squamous cell carcinoma; 3, 5, and 5 as well, moderately and poorly differentiated adenocarcinoma; and 3 and 6 cases as large and small cell types of undifferentiated carcinoma respectively.

It was found that the DNA contents of different histopathological kinds and types of lung cancers were significantly different($P<0.01$). The histograms of various kinds and types of lung cancers based on the values of DNA contents were also different.

On the basis of this study, it is suggested to make more precise classification of human lung cancers according to the DNA contents, and the histograms of the DNA contents of lung cancers are helpful in the identification of the pathological kinds and types of the cancers.

Key words: DNA; Microspectrophotometer; Human lung cancer; Pathology; Quantification

(p.143)

Applied Anatomy of the Platysma

Cheng Gengli, et al (Department of Anatomy, Third Military Medical College)

The platysma of 50 sides of abult cadavers were studied under operating

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

图1　颗粒细胞核外膜向胞浆内凸入（长↑），核周间隙内含有大量复制小泡，并可见核周间隙与复制多泡体相通（短↑）。接种后84小时。×31,500

图2　颗粒细胞胞浆内微聚体与核周间隙相连，并可见微聚体向其内释放小泡的现象（↑）。接种后120小时。×31,600

图3　蒲氏细胞内有以微聚体（↑）为中心的内质网作放射状排列的结构。微聚体很小，内质网中含有很少病毒粒子和复制小泡。接种后132小时。×56,200

图4　高尔基神经细胞内微聚体相连成串，并与复制多泡体相连。后者略呈放射状排列；多聚体释放小泡入多泡体（↑），接种后132小时。×32,000

图5　间脑神经细胞内三个大小不等的椭圆形微聚体，其中可见多孔形者（↑）。接种后120小时。×33,100

图6　大脑皮质神经细胞中的微聚体与内质网构成的放射状结构（长↑），胞浆内还可见微粒体（短↑）。接种后108小时。×28,500

图7　间脑神经细胞内含有以微聚体为中心的复制多泡体作放射状排列的结构。微聚体较大，复制多泡体内含有较多的病毒粒子和复制小泡。接种后120小时。×32,100

图8　大脑皮质神经细胞可见放射状结构中的微聚体有向内质网释放小泡的现象（↑）。接种后120小时。×42,300

图9　小脑坏死颗粒细胞核膜破坏（↑），核内外均可见大量病毒粒子。接种后95小时。×19,000

流行性出血熱病毒Vero-E6细胞病变株的分离和鉴定

（正文见第139页）

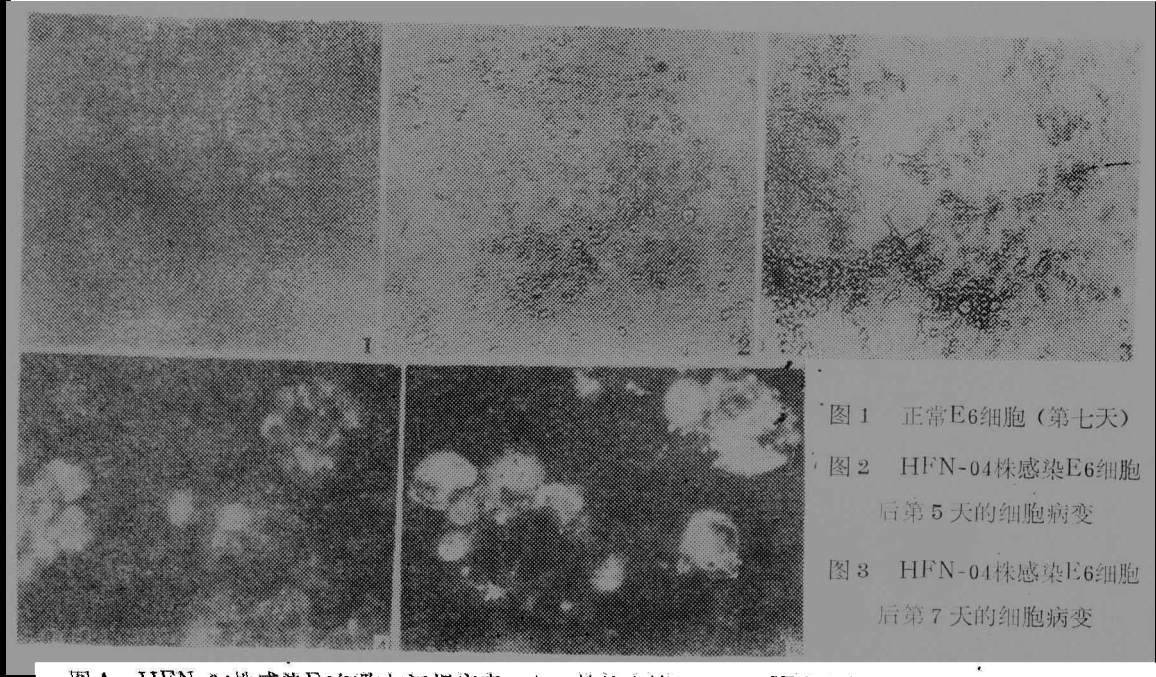


图1　正常E6细胞（第七天）

图2　HFN-04株感染E6细胞后第5天的细胞病变

图3　HFN-04株感染E6细胞后第7天的细胞病变

图4　HFN-34株感染E6细胞与汉坦病毒76/118株抗血清（1:80）IFA染色，胞浆内多呈散在颗粒状特异荧光

图5　HFN-04株感染E6细胞与汉坦病毒76/118株抗血清（1:80）IFA染色，胞浆内多呈片状融合特异荧光

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n