DOI:10.16016/j.1000-5404.1979.03.003

两相Q热立克次体在鸡胚细胞中繁殖的初步研究

训练部微生物学教研室　谢佩蓉　朱红阳

Q热立克次体在原代或传代单层细胞上生长繁殖的研究已有不少报导①—⑦，由于采用的细胞株与检查方法的不同，不同相的Q热立克次体在不同细胞或同种细胞内的繁殖量及最早发现立克次体的时间不尽一致。国内对Q热立克次体在细胞培养中的繁殖动态研究不多，特别是Ⅰ相Q热立克次体尚未见报导。由于自人体或动物体初分离之Q热立克次体均属Ⅰ相，为探讨组织培养方法应用于Q热立克次体的实验检查及疫苗制备的可能性，有必要对Ⅰ相Q热立克次体在组织培养细胞中的繁殖情况进行研究观察。本文就Ⅰ相及Ⅱ相Q热立克次体在鸡胚纤维母细胞中的生长繁殖特点，以及应用离心吸附和感染细胞计数法于Q热立克次体的培养与检查，一并加以报告。

材料及方法

一、毒种

Q热立克次体Henzerling株，本室鸡胚卵黄囊及小白鼠腹腔交替传代10次；九里株鸡胚传代42次，经血清学及三胜黄试验测定分别为第Ⅰ相及第Ⅱ相。试验前取冰冻保存的强度感染的鸡胚卵黄囊，称重后置组织研磨器研磨，加维持液(2%小牛血清0.25%乳白蛋白水解物Eagl、液）⑧制成10%悬液，经每分钟2000转离心沉淀10分钟，吸取中层悬液，再以维持液稀释成10^{-2}备用。

二、细胞培养

取9～10日令鸡胚，按常规法经胰酶消化后之细胞悬液用四层纱布过滤后，用生长液稀释计数，以每毫升100万细胞数接种至盖片培养（盖片大小18mm×6mm，水平位置放于瓶底）每瓶1毫升，然后直立装入铝制饭盒内，置37℃孵育箱48小时，细胞长成单层，备用。

三、培养基

生长液：5%小牛血清0.25%乳白蛋白水解物Hanks液，每毫升加青霉素100单位，链霉素100微克。用7%$NaHCO_3$调pH至7.6。

维持液：2%小牛血清0.25%乳白蛋白水解物Eagle液，用7%$NaHCO_3$调pH至7.6未加抗菌素。

四、细胞的感染与立克次体的检查

取已长成单层的细胞培养瓶，吸去生长液，用Hanks液洗涤1次，加入10^{-2}立克次体悬液1毫升，于国产LXJ Ⅱ型号水平式离心机室温下以每分钟2000转离心10分钟，然后吸去立克次体悬液，用Hanks液洗涤1

※　※　※

(3) 氢溴酸苦甘草硷治疗86例喘息型慢支炎临床疗效的观察，第三军医大学附三院气管炎防治组，1978，9(内部资料)

(4) Hagen, P et al:J Pharmacal130:9,1960

(5) Westerink, B.H.C et al:J.Neurochem. 27: 692—706,1977,

(6) Miller.F.P.et al:Bioch em.pharmacol. 19:435,1970

(7) Head.R. J. et al:The Anst. J.of Exp. Biol. & Med. Scien.55(2):213,1977.

(8) Viktora, J. K. at al:Analytical. Biochem. 23:513—528,1968.

(9) Methods of Biochemical analysis 1971, 9—13—45,

(10) Chang. C. C.: Int.J. Neuropharmacol, 3:643—649,1964.

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

次，加入维持液1毫升，置37℃孵育，4～5天换液一次。于孵育前及孵育后的不同时间，取出盖片，以pH7.2 PBS荡洗一次，待干，甲醇固定10分钟，用去离子水荡洗一次，干后再用1:10稀释之姬姆萨染液染色一小时，水洗吸干，油镜检查。

对照细胞系用正常鸡胚卵黄囊同法制备的悬液，接种与检查方法与感染细胞同。

五、感染细胞计数

按Hahon等⑨荧光细胞计数法，首先在显微镜（1000×放大）下计数盖片的视野数，然后计数50个视野中感染细胞的总数，求出每视野的平均数，再按下列公式计算每毫升立克次体感染细胞单位：

每一视野立克次体感染细胞平均数×盖片之视野数×接种物的稀释倍数×2.36（培养细胞用盖片占培养瓶底面积的1/2.36）

六、鸡胚LD_{50}滴定

用7日令鸡胚，每胚接种10倍递增稀释的立克次体悬液0.2毫升于鸡胚卵黄囊，每一稀释度接种6只鸡胚，经37℃孵育12天，逐日观察鸡胚死亡情况，三天内死亡者弃去不算，以后死亡之鸡胚解剖涂片，用Gimenez氏染色法染色检查立克次体，以雷孟二氏法计算LD_{50}。

实验结果

一、Ⅰ相及Ⅱ相Q热立克次体在鸡胚细胞中的繁殖情况

Q热立克次体Henzerling株（Ⅰ相）及九里株（Ⅱ相）感染鸡胚细胞，未经培养及培养后（4、8、12、16、20小时及1、2、3、4、5、6、7天）分别取片染色镜检，发现在吸附后未经培养的盖片中，有许多立克次体不规则地散在于细胞表面，此时细胞完好未见胞浆内空泡（图1）；Ⅰ相Q热立克次体于培养8～12小时，细胞表面之立克次体已经消失，直至48小时有些细胞胞浆内已出现空泡，空泡内立克次体个体比较清晰，呈球杆状、双球状等多形态，数量多少不等。随着培养时间的增加，胞浆内空泡逐渐增大，甚至取代了整个细胞浆，这时核被推至细胞膜附近，立克次体大量繁殖，几乎充满整个空泡，有的细胞已破裂，细胞外也可见到不少立克次体（见图2）。Ⅰ相立克次体于培养24小时可见胞浆内形成空泡，空泡内有立克次体呈球杆状，染色较深；培养后48小时的结果是形成空泡的细胞数增多，立克次体数也随之增多，且常聚集成团，立克次体个体较Ⅰ相立克次体小；继续培养所见的结果与Ⅰ相立克次体所见者基本相同，唯此种现象的出现较Ⅰ相立克次体为早，繁殖量也较多（见图3）。对照细胞未发现立克次体，胞浆内未见空泡形成（见图4）。

二、静止吸附与离心吸附对Q热立克次体生长繁殖的比较

用前述方法将Ⅰ相及Ⅱ相立克次体分别感染鸡胚细胞，培养并分成两组，一组经每分钟2000转离心10分钟离心吸附，另一组放37℃孵育箱静止吸附1小时，吸附后吸去立克次体悬液，用Hanks液洗涤一次，加维持液1毫升，培养瓶均置37℃孵育，于培养48、96小时分别取片，固定染色镜检，计算50个视野内立克次体感染细胞数，其结果列于表1：

表1 两种吸附方法对Q热立克次体生长繁殖结果的比较

立克次体	Henzerling株（Ⅰ相）感染细胞数/50个视野		九里株（Ⅱ相）感染细胞数/50个视野	
吸附方法 / 检查时间	离心（2000转/10′）	静止（37℃/1小时）	离心（2000转/10′）	静止（37℃/1小时）
48小时	78	0	396	159
96小时	155	5	404	221

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

从表1可以看出感染Ⅰ相立克次体离心吸附的培养物，于培养48小时后，50个视野中已发现78个感染细胞，而静止吸附者则尚未发现感染细胞，培养96小时后离心吸附者比静止吸附增加感染细胞数达31倍(155/5)；同样两种吸附方法对Ⅱ相Q热立克次体的繁殖量也有明显的不同。

三、Q热立克次体感染细胞计数与鸡胚卵黄囊半数致死量滴定的比较

用感染细胞计数法和鸡胚卵黄囊LD_{50}滴定法比较检查了Henzerling株（Ⅰ相）及九里株（Ⅱ相）Q热立克次体，前者为接种立克次体于鸡胚细胞后培养48小时取片，检查50个视野中感染细胞数，然后计算每毫升立克次体悬液的感染细胞单位；后者于接种鸡胚卵黄囊后孵育12天，按雷孟二氏法计算鸡胚LD_{50}，结果见表2：

表2 比较两种滴定Q热立克次体的方法

检查方法 / 立克次体	感染细胞计数 (1) ×10⁵/ml	鸡胚卵黄囊LD50 (2) ×10⁵/ml
Henzerling株（Ⅰ相）	16.7	0.8
九里株（Ⅱ相）	84.9	2.8

(1) 感染后48小时的结果
(2) 感染后12天的结果

表2结果表明两相Q热立克次体感染细胞计数滴定法48小时的效价均较鸡胚卵黄囊LD_{50}滴定法12天的效价为高，Ⅰ相约高21倍，Ⅱ相约高30倍。说明前法较后法敏感而快速。

讨　论

1．我们用鸡胚细胞培养Ⅰ相及Ⅱ相Q热立克次体的结果表明，Ⅱ相Q热立克次体较Ⅰ相发育快，繁殖力强。感染Ⅱ相Q热立克次体的鸡胚细胞于感染后24小时已可见少数细胞胞浆内有空泡形成，空泡内有少量立克次体，而感染Ⅰ相Q热立克次体的鸡胚细胞，一般于48小时才出现上述现象；另外在培养过程中Ⅱ相Q热立克次体于感染后3～4天，立克次体大量繁殖，多数视野能见到一个以上感染细胞，而Ⅰ相Q热立克次体需于感染后5～6天才可见此现象，且立克次体数量较Ⅱ相少，这与Kordova等④以两相Q热立克次体分别接种几种细胞株（D-6，羊膜及HEP-2）观察繁殖动态认为无明显差别的结果不完全相同；与kordova等⑦1970年的研究中报导Ⅱ相Q热立克次体在L细胞上的繁殖很好，而Ⅰ相则生长很差的结果也不尽一致，这种差异可能与Q热立克次体相变异的程度及其稳定性有别，以及对不同细胞株的敏感性不同有关。在朱孝坤等⑩以Ⅱ相Q热立克次体在几种单层细胞培养中的比较研究中说明，Q热立克次体在不同细胞株中的繁殖情况是不一致的。

2．利用离心力可促进病原因子吸附于细胞已为不少作者所证实。Weiss⑪等将普氏、Q热立克次体、砂眼及鹦鹉热病原体等4种病原因子，分别感染鸡胚内胚层细胞，以离心吸附与静止吸附相比较，结果证明离心吸附感染普氏立克次体较静止吸附者加强10,000倍，鹦鹉热病原体加强100倍，砂眼病原体加强10倍，Q热立克次体中等度加强。Hahon等⑨用免疫荧光技术检查Q热立克次体的研究中，获得了相似的结果。我们用感染细胞计数法检查Ⅰ相及Ⅱ相Q热立克次体的鸡胚细胞感染实验中表明，离心吸附较静止吸附既节省时间又促进了吸附的效率，提高了立克次体的感染率。离心吸附增加了立克

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

次体与细胞之间接触的机会，可促使其于短时间内吸附至细胞，达到同步感染的可能性。

3．通常立克次体的常规滴定，多用鸡胚卵黄囊 LD_{50} 滴定法，该法常因鸡胚个体差异较大，孵育为时较久，且于孵育过程中鸡胚常易出现非特异性死亡，影响结果的计算。Hahon 等[8]用荧光细胞计数法既敏感又快速。我们用感染细胞计数法与鸡胚卵黄囊半数致死量滴定法比较检查了Ⅰ相及Ⅱ相Q热立克次体也获得相似的结果，前者于48小时所得到的结果较后者12天检查的结果更为敏感，且细胞培养条件一般比较稳定，易于控制。在我们的实际观察中，认为此法用于Ⅰ相Q热立克次体更为准确，因为Ⅰ相Q热立克次体感染后之细胞层一般均较完好，繁殖之立克次体多在空泡内，感染细胞易于计数，而Ⅱ相Q热立克次体除定位于胞浆空泡内以外，也有散在于胞浆内者，计数时相邻细胞有时易混淆而影响计数的准确性。

結　论

1．比较观察了Ⅰ相及Ⅱ相Q热立克次体在鸡胚细胞中的生长繁殖特点，实验结果表明Ⅱ相较Ⅰ相立克次体发育快而繁殖力强，Ⅰ相立克次体一般在感染后48小时才见胞浆内出现空泡，空泡内含有散在的立克次体，于感染后5～6天立克次体大量增殖；而Ⅱ相立克次体于24小时即可检出，感染后3～4天已大量增殖。

2．用感染细胞计数法证明，离心吸附有促进Q热立克次体吸附于细胞的效能，从而有可能提高标本中立克次体的检出率。

3．用鸡胚细胞的感染细胞计数法来滴定Q热立克次体较鸡胚卵黄囊半数致死量滴定法敏感而快速。

参 考 文 献

1. Weiss, E. and Pietryl, H. C.: J. Bacteriol. 72:235, 1956.

2. Roberts, A. N. and Downs, C. M.: J. Bacteriol. 77:194, 1959.

3. Rosenherg, M. and Kordova, N: Acta. Virol. 6:176, 1962.

4. Kordova, N. and Brezina, R.: Ibid 7:84, 1963.

5. Rehacek, J. and Brezina, R.: Acta Virol. 8:380, 1964

6. Pospisil, V. F.: Acta Virol. 9:188, 1965.

7. Kordova, N. et al: Can. J. Microbiol. 16:125, 1970.

8. Eagle, H.: Science, 130:432, 1959

9. Hahon, N. and Cooke K. D.: J. Immunol. 97:492, 1966.

10 朱孝坤等：微生物学报，15（2）：139，1975.

11. Weiss, E. and Dressler, H. R.: PSEBM. 103:691, 1960.

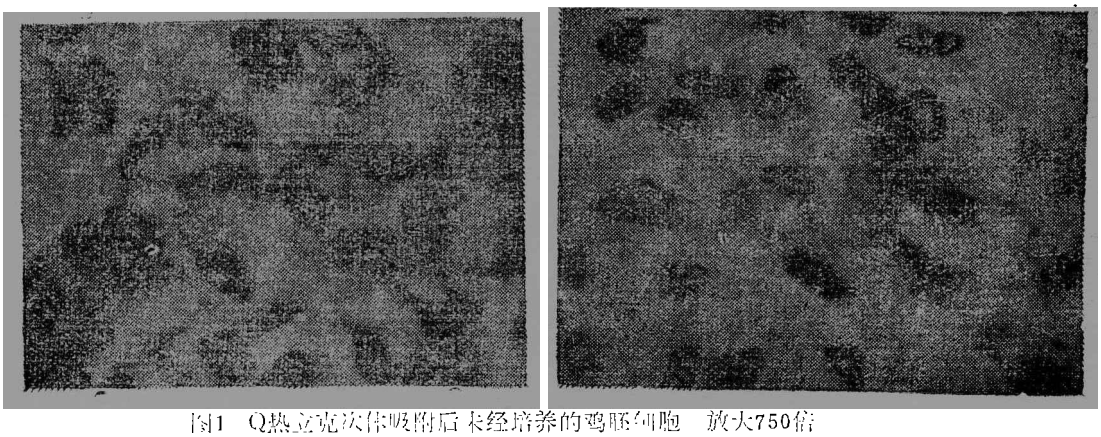
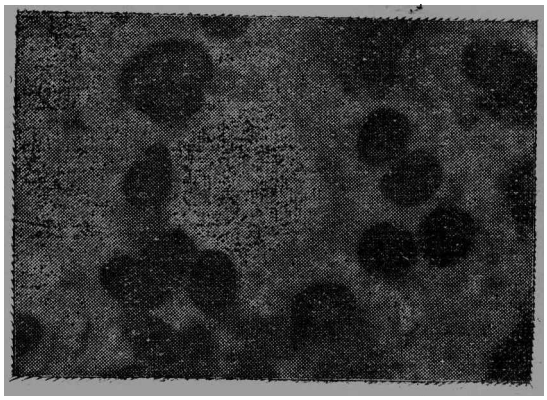


图1　Q热立克次体吸附后未经培养的鸡胚细胞　放大750倍
左图：Ⅰ相Q热立克次体（细胞上面可见许多散在的立克次体）
右图：Ⅱ相Q热立克次体（同　　上）

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



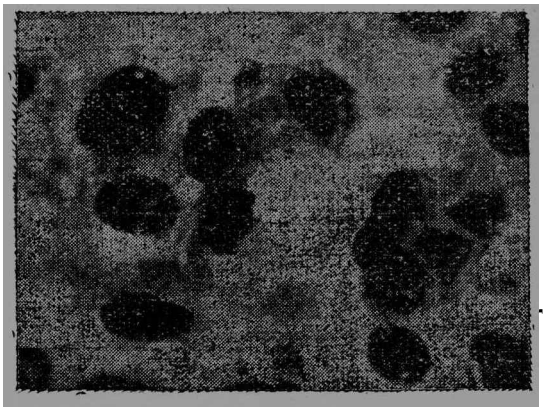




图2　Ⅰ相Q热立克次体感染的鸡胚细胞　放大750倍

上图：感染48小时后的细胞（感染细胞胞浆内有少量散在的立克次体）
下图：（左）感染后72小时的细胞（感染细胞胞浆空泡内含较多散在的立克次体）
（右）感染后5天的细胞（感染细胞增多，胞浆空泡内含大量立克次体）

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







图3　Ⅱ相Q热立克次体感染的鸡胚组织　放大750倍

上图：感染后24小时的细胞（感染细胞胞浆内出现空泡，内含少量立克次体）

下图：（左）感染后48小时的细胞（感染细胞胞浆内空泡增大，内含较多的立克次体）

（右）感染后4天的细胞（感染细胞数增多，胞浆内空泡更大，内含大量成团的立克次体）

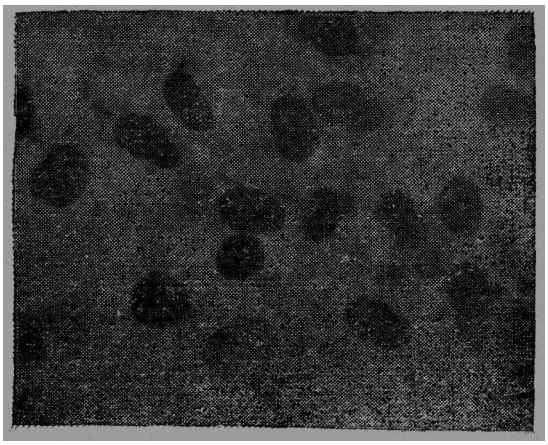


图4　未感染细胞（接种正常鸡胚卵黄囊悬液后培养5天的单层细胞）　放大750倍

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