

KMB₁₇细胞培养流感病毒的实验研究^①

王海璇¹, 杨怀德², 陈俊英¹, 魏晓露¹, 廖国阳¹, 李卫东¹

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118; 2. 昆明医学院, 云南 昆明 650031)

摘要: 探讨了流感病毒在 KMB₁₇细胞上培养的可行性. 将 3 株不同型别的流感病毒(A/Wisconsin/67/2005 H3N2, A/New Caledonia/20/1999 H1N1 和 B/Malaysia/2506/2004) 分别接种于 KMB₁₇细胞上, 在无血清的条件下于不同 pH 值和不同胰酶浓度的维持液中 35 ℃培养 72 h 后收获病毒, 测定血凝效价. 实验结果表明, 所用的 3 个毒株中的 H3N2 亚型毒株(A/Wisconsin/67/2005 H3N2) 血凝效价明显高于另外的 H1N1 亚型(A/New Caledonia/20/1999 H1N1) 和 B 型(B/Malaysia/2506/2004) 毒株. 因此认为 KMB₁₇细胞可作为培养流感病毒的备选培养基质.

关键词: 流感病毒; KMB₁₇细胞; 血凝效价

中图分类号: R 373.13 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2007)05-0536-05

流感病毒是严重危害人类健康的 1 种病原体. 每年, 在世界各地都有不同程度的流感流行. 由于流感病毒变异速度很快, 所以, 目前人类仍旧不能完全有效地控制流感的流行. 国际上已对流感实现了全球监测. 流感病毒的分离培养, 是各项流感研究工作的前提和基础. 目前实验室分离和培养流感病毒常用的培养基质主要是鸡胚和 MDCK 细胞等^[1,2], 但现有的各种培养基质仍存在着一定的局限性, 不能满足流感研究的发展需求. 因此, 寻找新的备选培养基质以满足流感研究的新需要具有积极的现实意义. KMB₁₇细胞属于人二倍体细胞, 是人胚肺成纤维细胞, 已应用于多种病毒的培养和疫苗生产中^[3]. 本文对 3 株不同亚型的流感病毒在 KMB₁₇细胞上的培养进行了初步的探索.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与毒种 KMB₁₇细胞以及流感病毒 A/New Caledonia/20/1999 H1N1, A/Wisconsin/67/2005 H3N2, B/Malaysia/2506/2004 均由本实验室(中国医学科学院医学生物学研究所疫苗研究室)保存.

1.1.2 试剂 DMEM/F12 培养基为北京清大天一生物制品公司生产, 使用时以蒸馏水按说明书配制,

经 0.22 μm 滤膜过滤除菌; 牛血清白蛋白(BSA)为 SIGMA 公司生产, 使用时以蒸馏水配成 0.1 g/mL 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌; 小牛血清(CS)为大理邓川蝶泉生物制品公司生产; TPCK 处理的胰酶(TR-TPCK)为 Worthington 生物制品公司生产, 使用时以无血清培养基配成 10 mg/100 mL 的溶液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌; 灭菌 Alsever's 液、0.87% 灭菌生理盐水及 1% 的鸡红细胞悬液由本实验室自行配制. 磷酸盐缓冲液(PBS)、66 g/L NaHCO₃ 溶液、3% 谷氨酰胺溶液、青霉素链霉素混合液(双抗)由中国医学科学院医学生物学研究所疫苗四室提供.

1.2 方法

1.2.1 KMB₁₇细胞的复苏及传代培养 从液氮冰箱中取出冻存的 KMB₁₇细胞于 37 ℃水浴迅速解冻后移入细胞培养瓶中, 用 DMEM/F12 完全培养基(每 100 mL 含 10 mL 小牛血清(CS), 2 mL 3% 谷氨酰胺溶液, 2 mL 66 g/L NaHCO₃ 溶液、1 mL 青霉素链霉素混合液)于 37 ℃静置培养至长成致密单层后进行传代扩增至实验所需数量.

1.2.2 病毒的接种与培养 取生长状态良好的 KMB₁₇细胞以 1:2 比例传代 37 ℃培养 72 h 后以磷酸盐缓冲液(PBS)润洗细胞面 3 次后接种病毒, 35 ℃吸附 1 h 后按实验所设不同条件组加入不同 pH

① 收稿日期: 2007-02-20

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目资助资助(2004C0070M); 2003 年度云南省科技厅创新人才引进项目(2003PY07).

作者简介: 王海璇(1979-), 女, 河北人, 硕士生, 主要从事病原生物学方面的研究.

通讯作者: 廖国阳, 副研究员, 主要从事病原生物学方面的研究, E-mail: liaogy@21cn.com.

不同胰酶浓度的病毒维持液(用 DMEM/F12 培养基配制,每 100 mL 含 1 mL 0.1 g/mL 的 BSA 溶液,1 mL 青霉素链霉素混合液,2 mL 3% 谷氨酰胺溶液,另外,66 g/L NaHCO₃ 溶液和 0.1 g/mL TPCK 处理的胰酶溶液按所设条件组不同加入不同量),于 35 °C 继续培养 72 h 后收获病毒。

1.2.3 1% 鸡红细胞悬液的制备 在 10 mL 注射器中先吸入 3 mL Alsever's 液(配方如下:葡萄糖 24.60 g,氯化钠 5.04 g,柠檬酸钠(含 2 个分子结晶水 9.60 g),蒸馏水 1 200 mL,配好后高压灭菌 4 °C 保存备用),然后从鸡翅静脉或心脏采血 3 mL,混匀,1 000 r/min 离心 30 min,弃上清。用等体积无菌生理盐水洗涤 3 次,前 2 次均 1 000 r/min 离心 20 min 弃上清,最后 1 次同速离心 30 min,弃上清。置 4 °C 待用。临用时用 0.87% 灭菌生理盐水配成 1% 的血细胞悬液。

1.2.4 血凝效价的测定方法 96 孔血凝板各行 2~12 列均加入 50 μL 0.87% 灭菌生理盐水,A~G 行第 1 孔分别加入各待测毒种原液 100 μL,H 行第 1 孔加入 100 μL 0.87% 灭菌生理盐水做阴性参照。用多道微量移液器从第 1 列吸出 50 μL,加入第 2 列,反复吹打后吸出 50 μL 加入第 3 列,如此类推做倍比稀释,至第 12 列反复吹打后吸出 50 μL 弃去。再使用多道微量移液器于血凝板所有孔中均加入 50 μL 0.1% 的鸡红细胞悬液,轻拍板壁混匀,静置 40~60 min,观察结果。效价判定及计算方法见文献[4]。

2 结果

2.1 3 株不同型别的流感病毒接种于 KMB₁₇ 细胞上的病变观察 流感病毒 A/Wisconsin/67/2005 H3N2 接种于 KMB₁₇ 细胞上能够观察到不同程度的细胞病变,与其它细胞(如 MDCK)接种流感病毒的病变相似,表现为细胞变圆、皱缩、脱落^[2]。起初,为局灶性的病变,后病变区域逐渐扩大。而其它 2 株接种后能观察到病变,但是不够明显。正常 KMB₁₇ 细胞(E 2 传代后 37 °C 培养 72 h)如图 1 所示。KMB₁₇ 细胞接种 A/Wisconsin/67/2005 H3N2 的病变情况如图 2 所示,其中图 2a, 2b, 2c 分别为接种病毒 24, 48, 72 h 的照片。KMB₁₇ 细胞接种 A/New Caledonia/20/1999 H1N1 的病变情况如图 3 所示,其中图 3a, 3b, 3c 分别为接种病毒 24, 48, 72 h 的照片。KMB₁₇ 细胞接种 B/Malaysia/2506/2004 的病变情况如图 4 所示,其中图 4a, 4b, 4c 分别为接种病毒 24, 48, 72 h 的照片(初始 pH 7.5)。

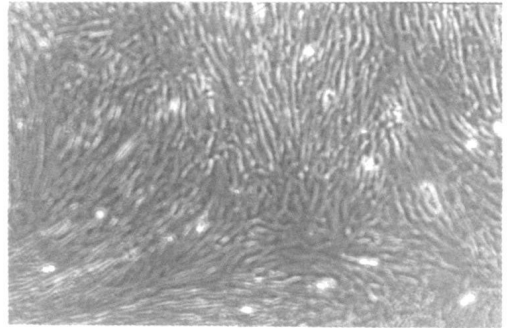


图 1 正常 KMB₁₇ 细胞(100×)

Fig. 1 Normal KMB₁₇ cells

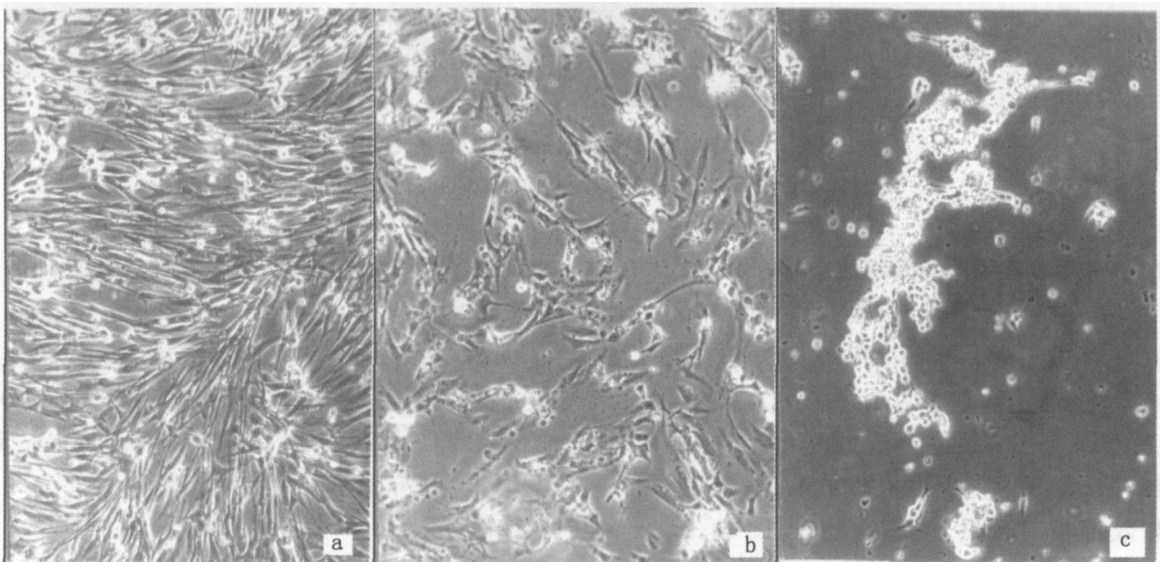


图 2 KMB₁₇ 细胞接种 A/Wisconsin/67/2005 H3N2 (100×)

Fig. 2 KMB₁₇ cells inoculated with A/Wisconsin/67/2005 H3N2

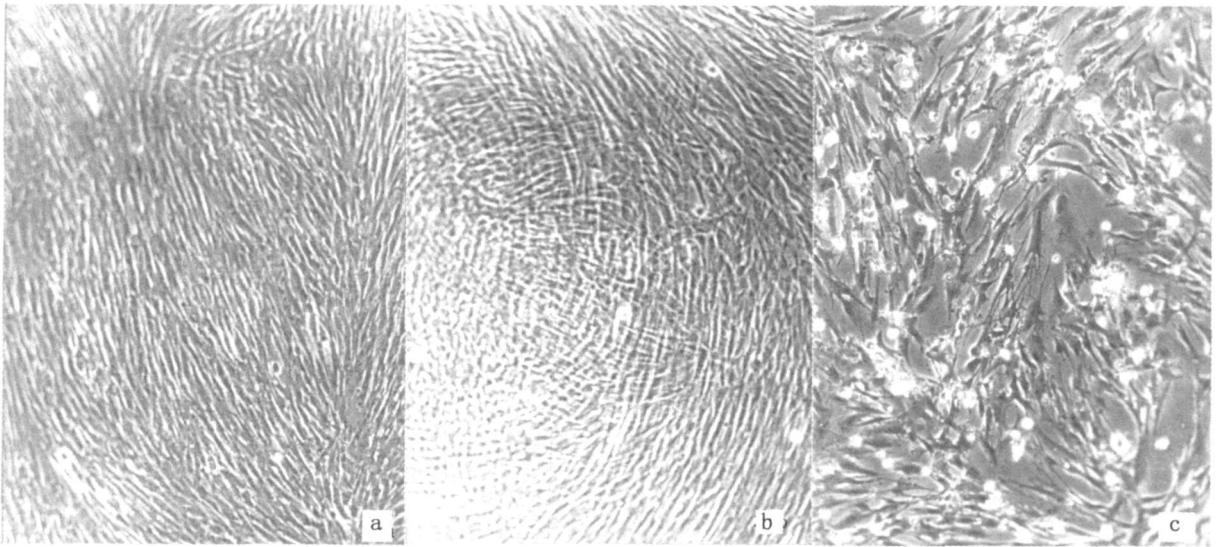


图 3 KMB₁₇细胞接种 A/New Caledonia/20/1999 H1N1

Fig. 3 KMB₁₇ cells inoculated with A/New Caledonia/20/1999 H1N1

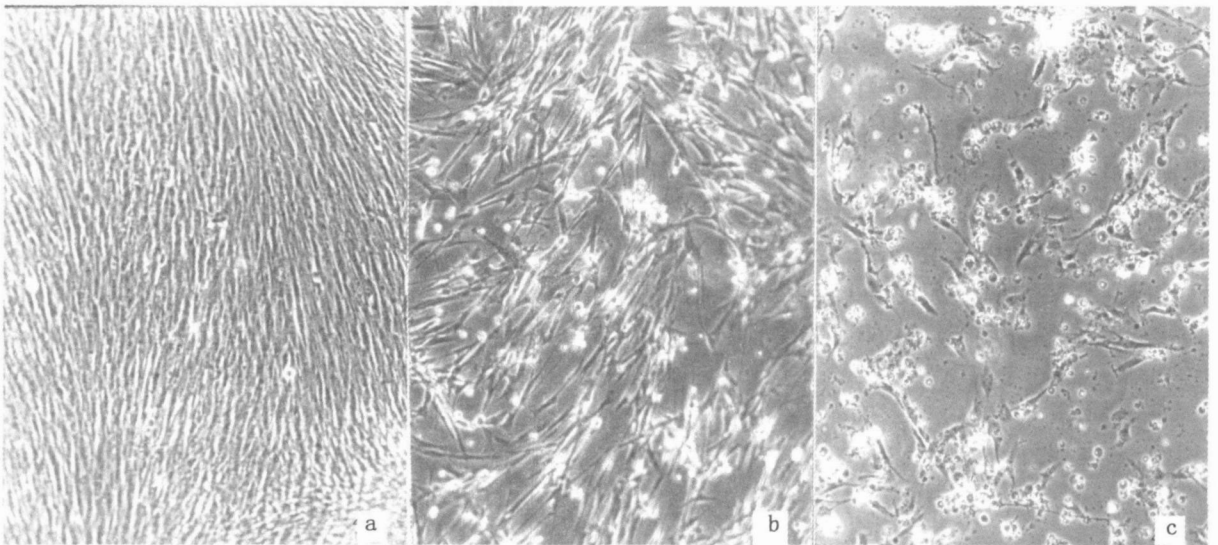


图 4 KMB₁₇细胞接种 B/Malaysia/2506/2004

Fig. 4 KMB₁₇ cells inoculated with B/Malaysia/2506/2004

2.2 3株病毒在不同条件组的血凝效价

(1) 在低 pH 条件组(每 100 mL 含 66 g/L Na₂CO₃ 溶液 1 mL, 初始 pH 7.5, TPCK 处理的胰酶终质量浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg/mL), 毒株 A/Wisconsin/67/2005 H3N2 的血凝效价相对较高, 最高达 1:128; B/Malaysia/2506/2004 血凝效价相对较低, 最高只达到 1:20; A/New Caledonia/20/1999 H1N1 血凝效价最低, 最高只有 1:1.5. 详见表 1.

(2) 在中 pH 条件组(每 100 mL 含 66 g/L

Na₂CO₃ 溶液 2 mL 初始 pH 8.0, TPCK 处理的胰酶终质量浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg/mL), 毒株 A/Wisconsin/67/2005 H3N2 的血凝效价较高, 最高达 1:160; B/Malaysia/2506/2004 血凝效价低, 最高只达到 1:8; A/New Caledonia/20/1999 H1N1 血凝效价最低, 最高只有 1:1.5. 详见表 2.

(3) 在高 pH 条件组(每 100 mL 含 66 g/L Na₂CO₃ 溶液 4 mL 初始 pH 8.5, TPCK 处理的胰酶终质量浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8,

1.0 μg/mL), 毒株 A/Wisconsin/67/2005 H3N2 的血凝效价较低, 最高达 1:64; B/Malaysia/2506/2004 血凝效价低, 最高只达到 1:7; A/New Cale-

donia/20/1999 H1N1 血凝效价最低, 最高只有 1:1.25. 详见表 3.

表 1 低 pH 条件组的血凝效价
Tab. 1 HA titers at lower pH condition

流感病毒株	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK
	0.2 μg/mL	0.4 μg/mL	0.6 μg/mL	0.8 μg/mL	1.0 μg/mL
A/Wisconsin/67/2005 H3N2	I 40	I 14	I 32	I 128	I 128
A/New Caledonia/20/1999 H1N1	I 1.5	I 1.25	I 1.5	I 1.25	I 1.25
B/Malaysia/2506/2004	I 3.5	I 8	I 10	I 24	I 20

表 2 中 pH 条件组的血凝效价
Tab. 2 HA titers at middle pH condition

流感病毒株	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK
	0.2 μg/mL	0.4 μg/mL	0.6 μg/mL	0.8 μg/mL	1.0 μg/mL
A/Wisconsin/67/2005 H3N2	I 32	I 32	I 40	I 32	I 160
A/New Caledonia/20/1999 H1N1	I 1.5	I 1.25	I 1.5	I 1.25	I 1.25
B/Malaysia/2506/2004	I 3.5	I 7	I 7	I 7	I 8

表 3 高 pH 条件组的血凝效价
Tab. 3 HA titers at higher pH condition

流感病毒株	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK	TR- TPCK
	0.2 μg/mL	0.4 μg/mL	0.6 μg/mL	0.8 μg/mL	1.0 μg/mL
A/Wisconsin/67/2005 H3N2	I 14	I 32	I 40	I 64	I 40
A/New Caledonia/20/1999 H1N1	I 1.25	I 1.25	0	0	I 1
B/Malaysia/2506/2004	I 2.5	I 1.75	I 3.5	I 3.5	I 7

3 讨论

(1) 在显微观察中, 尤其要注意区分因其它原因引起的非特异性的细胞脱落死亡, 后者一般是成片的, 而非局灶性的. 2 者在接种病毒早期较易区分, 后期则很难区分. 因此显微观察的初步判断仍需经后续的效价检测来进一步确认.

(2) 人二倍体细胞相较于鸡胚和 MDCK 细胞来说用于人用疫苗的生产有很多优点, 其无致毒性, 安全性高于其它细胞, 易于规模化生产, 而且它

对多种病毒具有广泛的敏感性, 用其制备病毒性疫苗还可以克服使用原代细胞时在其培养物中可能存在的各种潜在致病因子的危险, 是当前病毒性疫苗生产较为理想的细胞基质. KMB₁₇细胞已应用于多种人用疫苗的生产中^[5]. 已有研究者利用人二倍体细胞 MRC-5 进行了流感病毒培养的相关研究, 认为该种细胞可用做分离流感病毒^[6]. KMB₁₇与 MRC-5 相似, 均属人胚肺成纤维细胞, 对流感病毒也有一定的敏感度, 有望通过更深入的研究开发成为流感疫苗生产用细胞株. 但由于此细胞对胰

酶的耐受力不够强,因此在后续的研究中可能需要改变细胞的培养条件以增强其耐胰酶能力,或者筛选不依赖胰酶的毒株作为生产用毒株以解决细胞对胰酶的耐受力不强的问题.另外,在病毒的传代、保存、收获及纯化方面,还需要做大量的研究工作.

(3) 从本实验各条件组所得的血凝效价结果来看, KMB₁₇ 细胞对 H3N2 亚型的流感毒株(A/Wisconsin/67/2005 H3N2) 相对较敏感. 此株 H3N2 亚型的病毒在低 pH 值条件组(初始 pH 7.5) 和中 pH 条件组(初始 pH 8.0) 和较高的 TR-TPCK 终质量浓度条件下(0.8 μg/mL 和 1.0 μg/mL) 所得血凝效价较高. 因此在本实验所选的培养条件中, 初始 pH 7.5~8.0, TR-TPCK 终质量浓度 0.8~1.0 μg/mL 是相对适宜的培养 H3N2 亚型的条件. 对于 H1N1 亚型和 B 型则有 2 种可能的解释: 其一, KMB₁₇ 细胞对这 2 个型别的毒株不敏感; 其二, KMB₁₇ 对这 2 个型别的毒株敏感, 但由于本实验所选择的培养条件不适宜这 2 个型别的毒株增殖, 因此检测到的血凝效价很低. 这需要后

续的深入研究方能确定.

参考文献:

- [1] 赵常智, 周军, 李宙. 细胞法和鸡胚法分离流感病毒实验研究[J]. 中国公共卫生管理, 2006, 22(6): 490-491.
- [2] 范东瀛, 陈俊英, 张新文, 等. 流感病毒在不同细胞中适宜培养条件的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 510-512.
- [3] 郭仁, 曹逸云, 戴振洲, 等. 人二倍体细胞株 KMB₁₇ 的特性[J]. 中国医学科学院学报, 1981, 3(4): 226-230.
- [4] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [5] 胡云章, 邵聪文, 袁天喜, 等. 人胚肺二倍体细胞株 KMB₁₇ 在培养过程中的自然凋亡[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1999, 21(2): 102-105.
- [6] MARÍA DE ONA, SANTIAGO MELÓN, PEDRO DE LA IGLESIA, et al. Isolation of influenza virus in human lung embryonated fibroblast cells (MRG-5) from clinical samples[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(7): 1948-1949.

Studies on culturing influenza viruses with KMB₁₇ cells

WANG Hai-xuan¹, YANG Hua-de², CHEN Jun-ying¹,
WEI Xiao-lu¹, LIAO Guo-yang¹, LI Wei-dong¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union of Medical College, Kunming 650118, China;
2. Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract: In order to explore the feasibility of culturing influenza virus on KMB₁₇ cells and optimize the culture condition, four strains of influenza virus were inoculated on KMB₁₇ cells, they were cultured in serum free medium under different pH condition and different trypsin concentration. Then, they were been harvested after 72 hours, and the HA titers were detected. The HA titers of the H3N2 subtype strain are significantly higher than the other two stains(one is H1N1 subtype and the other is B type). It was concluded that, under some condition, KMB₁₇ cells can be an alternative medium for influenza viruses cultivation.

Key words: influenza virus; KMB₁₇ cells; HA titer