

# 风疹病毒 814 株生物学性状研究

曾国华 李淑兰 庄贞禧 李金凤 廉锦章

(卫生部长春生物制品研究所, 长春)

风疹病毒(RV)引起儿童出疹性疾病,更严重的是致胎儿畸型。自从报道风疹病毒分离成功之后<sup>[1,2]</sup>,各家相继建立了许多风疹病毒株,并对其生物学性状作过许多报道<sup>[3-7]</sup>。近几年国内也有分离病毒成功的报道<sup>[8,9]</sup>,但是国内尚未见到对风疹病毒株生物学性状研究的报告。我们采用原代兔肾细胞分离长春地区风疹病毒数株,并对其中的 RV-814 株生物学性状进行了部分比较实验观察,以便为今后制备减毒风疹活疫苗奠定基础。

## 材料和方法

### (一) 病毒株

1. RV-814 株是从门诊临床诊断为风疹的儿童咽拭标本中分离,并在原代兔肾细胞(PRK)中适应传代。

2. Cendehill 疫苗株是从国外引进的减毒活疫苗株。

3. Judith 株是北京生物制品研究所赠给,在乳地鼠肾细胞(BHK<sub>21</sub>)中传代。

4. GOS 株是由卫生部药品生物制品检定所购得,在 BHK<sub>21</sub> 细胞上传代。

### (二) 免疫血清制备

将 GOS 和 Judith 株病毒接种于 BHK<sub>21</sub> 细胞,37℃培养,当细胞病变(CPE)达到++++时,倒掉培养液,用 Earles 液洗细胞二次,以便去掉小牛血清,更换不含血清的 199 培养液,再培养 1—2 天当 CPE 达到++++时将感染病毒的细胞瓶置低温反复冻融 3 次,经 2000rpm 离心沉淀 10 分钟,取上清

液作为抗原, RV-814 和 Cendehill 株制备抗原的方法除所用细胞为 PRK 与 GOS 和 Judith 不同外,其他制备过程均相同。取 2kg 体重的家兔在免疫前采血,分离血清(S<sub>1</sub>),然后从耳静脉注入 2ml 抗原,同时两侧前肢腋部皮下各注入 2ml,以后每周耳静脉注入 2ml,第 4 周试血,同时再加强免疫一针,在第 5 周采血,分离血清(S<sub>2</sub>)。

### (三) 支原菌检查

在本试验中对所使用的各株病毒及各传代细胞株都进行了严格的细菌学检查,检查方法按照生物制品规程(中华人民共和国卫生部,1979年9月版)、麻疹活疫苗制造及检定规程要求进行无菌试验,均不含有支原菌及杂菌。

## 结果与讨论

### (一) 病毒在细胞培养中致病变情况

RV-814 株病毒和 Cendehill 株在 RK<sub>13</sub> 细胞(兔肾传代细胞)内 CPE 表现是相似的(见图 1),病变细胞为梭形和星形拉丝,折光度增加,与正常 RK<sub>13</sub> 细胞(见图 2)有明显区别。RV-814 在 PRK 细胞上早期传代过程中镜检看不到 CPE,当传至第 18 代时,在 35℃ 培养感染病毒 10 天的细胞才出现风疹病毒特异性 CPE,伴随传代次数的增加,CPE 出现时间提前,病毒滴度增高,证明野毒株适应于细胞培养有一个过程,如图 3 所示。PRK 细胞的 CPE 与 RK<sub>13</sub> 细胞的 CPE 形态基本一致,因为一个是

本文承蒙长春市儿童医院马玉兰医生提供病例,本所孙衍庆、胡嘉弟、王申等同志制片、摄影,谨致谢意。

原代细胞另一个是传代细胞二者之间的 CPE 又有细微的不同,尤其是在 PRK 细胞上常有 10—20 个细胞集聚堆积(见图 4,这和小组织块长出的细胞不同),和正常的 PRK (见图 5)细胞排列紧密形成鲜明对照。RV-814 株在 BHK<sub>21</sub> 细胞上所见 CPE 是细胞折光度增强,细胞圆缩,但不形成星形、梭形或拉丝的细胞,这和 GOS、Judith、Cendehill 株在 BHK<sub>21</sub> 细胞上形成的 CPE 是一致的。风疹病毒致 BHK<sub>21</sub> 细胞产生 CPE 的速度比在 RK<sub>13</sub> 细胞上产生 CPE

要早 1—2 天。  
我们比较了 HeLa、FL、Vero、BHK<sub>21</sub>、RK<sub>13</sub> 5 种细胞对 4 株风疹病毒的敏感性,结果如表 1。RK<sub>13</sub> 和 BHK<sub>21</sub> 对这 4 株风疹病毒都很敏感,并有明显的 CPE。HeLa 和 FL 是不敏感的,不出现任何形态的 CPE。Vero 细胞感染病毒后第 2 天就出现一些圆缩细胞,随着培养时间的延长,圆缩细胞逐渐增多,但和对照组的细胞无法区别(对照组细胞也有部分圆缩)。这 4 株病毒在 RK<sub>13</sub> 细胞上产生同样的 CPE,而在

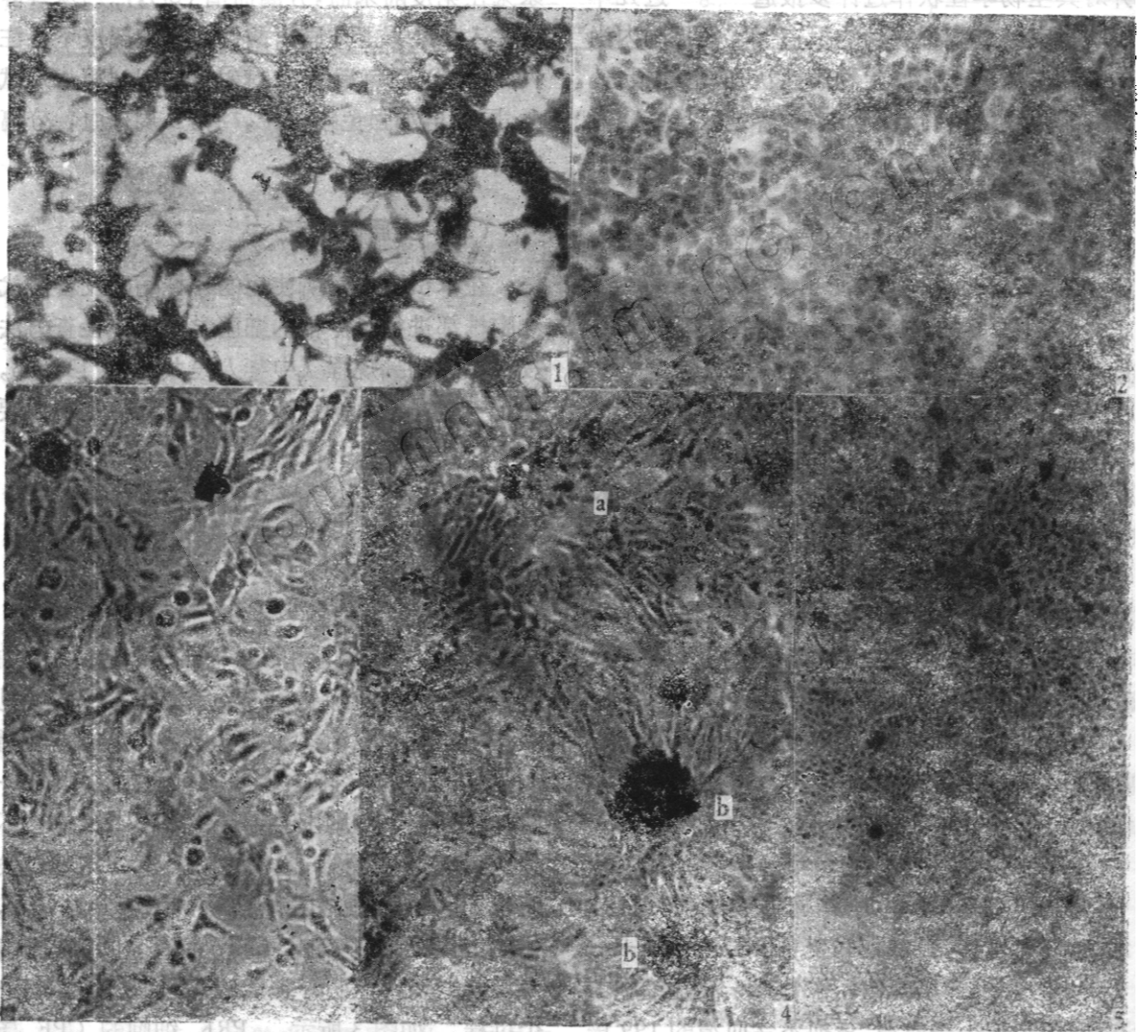


图 1 RV-814 株在 RK<sub>13</sub> 细胞的 CPE  
图 2 RK<sub>13</sub> 正常细胞  
图 3 RV-814-27 代感染 PRK 细胞第 8 天 CPE  
图 4 RV-814-27 代感染 PRK 细胞第 5 天 CPE (a 集聚堆积; b 组织块)  
图 5 正常 PRK 细胞

表 1 5 种传代细胞对风疹病毒的敏感性

病 毒 株	传 代 细 胞				
	HeLa	FL	Vero	BHK <sub>21</sub>	RK <sub>13</sub>
RV-814	—	—	±	+	+
Cendehill	—	—	±	+	+
Judith	—	—	±	+	+
GOS	—	—	±	+	+
细胞对照	—	—	—	—	—

注：“+”有 CPE，“±”疑似 CPE，“—”没有 CPE。

BHK<sub>21</sub> 细胞上产生另一种形态的同样 CPE，说明不同种类的细胞，病变表现也不同。

RV 在 BHK<sub>21</sub>、RK<sub>13</sub> 和 PRK 细胞中培养，可看到培养液变酸，说明被感染细胞糖酵解增加，葡萄糖很快被消耗而产生乳酸<sup>[12]</sup>，因此糖酵解率的增加就证明细胞感染后病毒大量增殖。

RV-814 株在 PRK 细胞中出现的病变除了与 Peetermans<sup>[10]</sup> 报告的风疹病毒在 PRK 细胞上形成星状、梭状和细胞之间松散拉丝之外，还有一种 10—20 几个细胞聚堆的病变形态，这种形态往往在星形拉丝病变之前出现，在国外资料中尚未见到，在国内何南洋<sup>[8]</sup>曾记叙过这种团聚病变。

(二) 不同 RV 株产生血凝素的差别

我们用 BHK<sub>21</sub> 细胞制备血凝素，细胞接种病毒后换入培养液(199 2份，0.5% 水解乳白蛋白 1 份，含 2% 小牛血清或经白陶土处理的小牛血清或牛白蛋白)，当 CPE 达到+++++时收获，反复冻融 3 次，用吐温 80 乙醚处理，使用 0.25% 鹅血球，检查血凝素产生情况，结果见表 2。表 2 表明用小牛血清培养液接种 RV-814 和 Cendehill 株病毒，各实验 2 次都测不到血凝素，而 Judith 和 GOS 都能测到较高滴度的血凝素，分别在 1:16、1:20 和 1:6—1:32 之间；在改用白陶土处理的小牛血清时，RV-814 株实验 8 次，7 次测不到血凝素，仅有一次为 1:2，而 Cendehill 实验 7 次分别为 0、1:4 各 2 次，1:6、1:12、1:14 各 1 次；改用牛白蛋白代替小牛血清时，RV-814 实验 7 次，

表 2 4 株 RV 血凝滴度比较

培养基	病毒株	实验次数	血凝滴度
含小牛血清	RV-814	2	0
	Cendehill	2	0
	Judith	2	16, 20
	GOS	13	6—32
含白陶土处理小牛血清	RV-814	8	0—2
	Cendehill	7	0—14
含牛白蛋白	RV-814	7	0—12
	Cendehill	2	6

检测血凝滴度为 0、1:4、1:6 各 2 次，1:12 1 次，而 Cendehill 实验 2 次都是 1:6。为了尽量减少或除去  $\beta$  脂蛋白的非特异性抑制，在使用白陶土处理的小牛血清或牛白蛋白的情况下，可测得 RV-814 和 Cendehill 株的血凝素，这样就比使用普通小牛血清似乎稍好些。这 4 株 RV 产生血凝素强弱的不同，可能和各株病毒对 BHK<sub>21</sub> 细胞的适应有关。RV-814 和 Cendehill 株都是在 PRK 细胞上分离传代的，而 GOS 和 Judith 株早已在 BHK<sub>21</sub> 细胞上适应传代，所以后二株病毒要比前二株病毒产生血凝素高，也或许这就是不同株间的特性。

(三) 免疫荧光染色观察

将 RV-814 株病毒作 10 倍递增稀释，每个稀释度接种到带有盖玻片的 RK<sub>13</sub> 细胞管 37℃ 培养，在不同时间分别取出细胞片用冷丙酮固定，放置 4℃ 内，待全部取完后用间接法染色，感染病毒的细胞玻片经 RV-814 株免疫兔血清

处理,再用羊抗兔荧光抗体染色,同时设有正常细胞和感染病毒细胞对照,如表 3 所示。RV-814 接种 3,200、320、32、3.2、0.32 TCID<sub>50</sub> 于 RK<sub>13</sub> 细胞后在第 3 天就能看到特异性免疫荧光。与此同时能观察到 CPE 的只有感染 3,200 TCID<sub>50</sub> 管,随着接种病毒剂量的减少,出现 CPE 的时间相对推迟。用 0.32 TCID<sub>50</sub> 就要比 3.2

TCID<sub>50</sub> 晚一天才能看到特异性荧光,并随着培养时间的延长而更加明显。接种 0.32 TCID<sub>50</sub> 的培养管到第 7 天 CPE 也不明显。正常 RK<sub>13</sub> 细胞对照培养到第 7 天仍维持完整,未见特异性荧光。用免疫荧光染色检查风疹病毒比用 CPE 方法快,在出现 CPE 之前就可出现特异性免疫荧光。此法既敏感又迅速,可作为风疹

表 3 RV-814 株感染 RK<sub>13</sub> 细胞后免疫荧光染色与出现病变结果

接种病毒量 (TCID <sub>50</sub> )	观 察	RK <sub>13</sub> 细胞培养时间(天)					
		2	3	4	5	6	7
3,200	荧 光	—	+	+		+	+
	CPE	—	+	+		+	+
320	荧 光	—	+	+		+	+
	CPE	—	—	+		+	+
32	荧 光	—	+	+		+	+
	CPE	—	—	—	+	+	+
3.2	荧 光	—	+	+		+	+
	CPE	—	—	—	—	—	+
0.32	荧 光	—	—	+		+	+
	CPE	—	—	—		—	±
RK <sub>13</sub> 对 照	荧 光	—	—	—		—	—
	CPE	—	—	—		—	—

注：“+”表示有特异性荧光,有 CPE “—”表示没有特异性荧光,没有 CPE

病毒存在于细胞定性或定量的指标。

(四) 血凝抑制与中和试验

分别将 RV-814、Cendehill、GOS 和 Judith 4 株病毒的兔免疫血清经 56℃30 分钟灭活后,用含有 200 单位肝素 0.05M 氯化锰的 pH6.2 DGV 液<sup>[13,10]</sup>作 1:8 或 1:10 稀释,置 4℃作用 30 分钟,加压积鹅血球摇匀,4℃过夜,1000rpm 离心 10 分钟,上清液即为除去了非特异性凝集素的待检血清。用 6 × 12 孔微量血凝板进行血凝抑制试验。待检血清作倍比稀释,用 4 个单位血凝素,4℃结合 1 小时,然后加入 0.25% 鹅血球,全量为 0.075ml,以完全抑制血凝为判定终点。交叉血凝抑制试验结果如表 4。不同的 4 株风疹病毒免疫血清无论是使用 GOS 株

表 4 交叉血凝试验结果

血凝素	免 疫 血 清				
	814-7	814-24	Cendehill	GOS	Judith
GOS	160	160	160	320	320
RV-814		128	64	256	128

注: 814-7 是第 7 代病毒  
814-24 是第 24 代病毒

血凝素,还是使用 814 株血凝素,都同样发生血凝抑制,各株间的血凝抑制效价尽管没有显著差异,但也看出 Cendehill 株偏低,GOS 株偏高的倾向。血凝抑制试验证明 RV-814-24 代对兔的免疫原性不比 RV-814-7 代的免疫原性低。Huygelen<sup>[14]</sup>曾报告野毒株与减毒株最不同的特性是减毒株对实验动物缺少免疫原性,而对人

却能引起很好的免疫应答使抗体升高。推理 RV-814-24 代尚未达到减毒株的水平。

中和试验采用中和细胞病变方法。将 RV-814 GOS 和 Judith 病毒经 2000rpm 离心的上清液稀释成 100T CID<sub>50</sub>/0.1ml., 再将 RV-814、GOS 和 Judith 免疫血清作倍比稀释, 取各倍比稀释的血清和含 100 TCID<sub>50</sub>/0.1ml. 的病毒等量混合, 4℃ 中和过夜, 接种到 RK<sub>13</sub> 细胞瓶中, 每瓶种入 0.2ml, 每个稀释度种 3 管, 37℃ 培养, 每天镜检, 当病毒对照管出现明显病

(中和效价分别为 1:96、1:85、1:32) 0.1ml 完全中和掉, 这和 HPV-77DK 疫苗株<sup>[17]</sup>相似。

(五) RV-814 株在 PRK 细胞上生长繁殖动态

实验用 3 瓶感染病毒的 PRK 细胞为一组 (每瓶接种病毒量为 18,000TCID<sub>50</sub>, 35℃ 吸附 1.5 小时, 倒掉病毒液用 Earles 液洗细胞一次, 然后换入新维持液), 每 24 小时收毒一次, 每组病毒液混合, 同时换入新维持液, 连续收获 17 次。收获液经 2000rpm 离心 10 分钟, 上清液用 PK<sub>13</sub> 细胞作病毒滴定, 如图 6 所示。病毒滴度

表 5 三株 RV 的交叉中和试验

免疫血清	风 疹 病 毒		
	GOS	RV-814	Judith
GOS	42—128 (85)	64	
RV-814	32—64 (48)	64—128 (96)	64
Judith		64	32

注: ( ) 内为二次试验的平均值

变时为判定终点 (该实验重复 2 次), 3 株风疹病毒的交叉中和试验结果如表 5。用 GOS 免疫血清可以中和 RV-814 病毒, 中和效价 1:64, GOS 株自身的中和效价平均为 1:85 (第 1 次 1:42, 第 2 次 1:128), 二者间无明显差别。用 Judith 免疫血清也可中和 RV-814 病毒, 中和效价 1:64, Judith 株的自身中和效价为 1:32, 二者间的差别没有意义。用 RV-814 免疫血清与 GOS、Judith 病毒中和, 其中和效价分别平均为 1:48、1:64, RV-814 自身的中和效价平均为 1:96。中和效价相差不超过 4 倍均视为无意义。由上述三种不同的风疹病毒株进行了 7 种交叉中和试验, 病毒间的抗原性未见明显差别。任何一株病毒的免疫血清都可同样地中和掉另外的二株病毒, 中和试验证明不同病毒株的免疫血清和各株病毒之间可以互相交叉中和。RV-814 株的抗原性与 GOS、Judith 株未见明显区别。如果病毒剂量 > 100TCID<sub>50</sub>/0.1ml. 则不能被 RV-814、GOS Judith 株免疫的兔血清

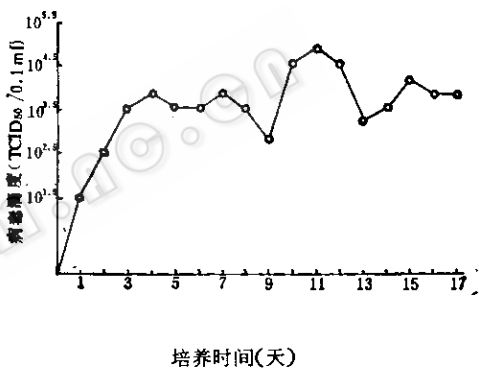


图 6 RV-814-27 代感染 PRK 细胞病毒繁殖动态曲线

第一天为 10<sup>1.5</sup>, 第 2 天为 10<sup>2.5</sup>, 第 3 天为 10<sup>3.5</sup>, 第 4 天为 10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1ml, 呈直线上升, 此后一直到第 8 天稳定在 10<sup>3.5</sup>—10<sup>3.75</sup> 之间。在第 10—12 天又明显升高。第 14—17 天病毒滴度仍维持在 10<sup>3.5</sup>—10<sup>4.25</sup> 之间。第 9 天和第 13 天两次病毒滴度不高, 可能是由于技术误差所引起。图 6 曲线所表明的病毒颗粒在细胞内复制之后可连续释放, 并能维持较长的时间, 至第 17 天仍不见衰减。感染病毒的细胞虽有明显的 CPE, 但不很快死亡, 且能较长期地维持下去。

(六) RV-814 株在细胞内和上清液病毒滴度

实验用 17 瓶感染病毒的细胞 (每瓶接种病毒量为 18000 TCID<sub>50</sub>, 35℃ 吸附 1.5 小时, 倒

掉病毒液,用 Earles 液洗细胞一次,换入新维持液)。每天随机取出一瓶,收获培养液,经 2000rpm 离心 10 分钟取上清,为上清液病毒。细胞用 Earles 液洗一次,将洗液吸尽,加入新维持液,置 -25℃ 反复冻融 3 次,使细胞膜破碎,将细胞内病毒释放到维持液中,经 2000rpm 离

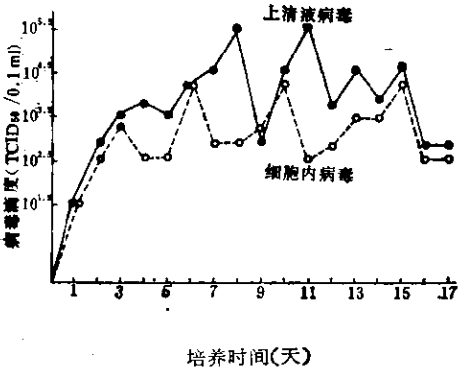


图 7 RV-814-27 代感染 PRK 细胞后  
细胞内和上清液病毒滴度比较曲线

心 10 分钟取上清,即为细胞内病毒,上述细胞内和上清液病毒用 RK<sub>13</sub> 细胞进行滴定,如图 7 所示。上清液病毒滴度比细胞内病毒滴度高。在细胞内成熟的病毒很快释放到培养液内,在细胞内已经完成复制尚未释放的病毒也保持着较高的水平。在前 3 天的比较中,上清液和细胞内病毒滴度差别不大,在第 4 天之后上清液较细胞内病毒滴度明显升高,一直到第 14 天,其中第 6、9 天上清液病毒和细胞内病毒滴度没有大的差别,第 9 天病毒滴度无论是细胞内还是上清液都较低,这可能由于滴定误差或随机抽样瓶间误差所造成。但就总体结果来看,上清液病毒量比细胞内病毒量多,在细胞被感染后观察 17 天的全过程中,结果是一致的。病毒的这种特性有利于多次收获培养液,并适于制造疫苗<sup>[5]</sup>。

RV 感染传代细胞 (RK<sub>13</sub>、BHK<sub>21</sub>) 或原代细胞 (PRK) 都很快使培养液变酸,一般在感染后 48 小时,最迟在 72 小时要换液,否则细胞单层在酸代谢产物作用下不能维持良好状态。

RV 感染原代或传代细胞后虽然可见到广泛的 CPE,但细胞仍能较长期地维持下去,RV 感染 BHK<sub>21</sub> 细胞后的新陈代谢早有研究<sup>[12]</sup>,这与腺病毒感染 HeLa 细胞虽然发生广泛 CPE,而细胞仍不被杀死<sup>[16]</sup>的现象似乎相似。

(七) RV-814 株病毒对温度的稳定性

将 RV-814-25 代的病毒液 (不含血清的 199 培养液)经 2000rpm 离心 10 分钟,取上清液分装在小瓶内不加任何保护剂。取一瓶放 4℃ 为对照,其它瓶放 37℃ 水浴中,经不同时间取样,放置于 4℃,取完样品后一同滴定。病毒的稳定性如图 8。实验结果表明在 37℃ 2 小时之内病毒滴度迅速下降达一个对数值,2—4 小时稍有下降,4—8 小时内相对稳定不变,在第 8 小时为 10<sup>3.25</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1ml, 到第 12 小时下

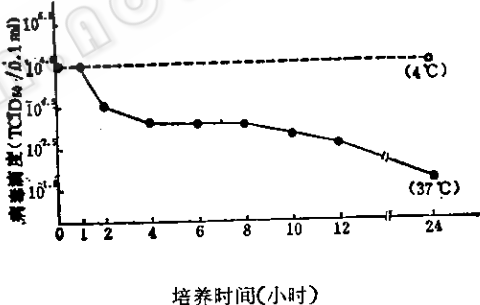


图 8 RV-814 株的稳定性观察

降至 10<sup>2.5</sup>,虽有下降,但幅度较小。从第 12 小时至 24 小时滴度下降至 10<sup>1.75</sup>,在这 12 小时内下降不到一个对数值,在此阶段病毒滴度在一个低水平上,灭活速度与前头 12 小时相比下降较慢。与此同时滴定的对照滴度不变。从病毒在 37℃ 稳定曲线观察,不耐热的病毒颗粒在前 2 个小时内很快灭活,以后便进入缓慢选择、逐渐淘汰阶段。

总之, RV-814 与国内外风疹病毒株的生物学性状基本相同,因此,我们将 RV-814 株在 PRK 细胞连续传代,希望通过传代降低它的致病性,保留免疫原性,作为制备风疹活疫苗的预选毒株。

## 参 考 文 献

- [1] Weller, T. H. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111: 215—225, 1962.
- [2] Parkman, P. D. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111: 225—230, 1962.
- [3] Meyer, H. M. et al.: *New. Eng. J. Med.*, 275: 575—580, 1966.
- [4] Parkman, P. D. et al.: *J. Immun.*, 95: 743—752, 1965.
- [5] Parkman, P. D. et al.: *Amer. J. Dis. Child.*, 110: 390—394, 1965.
- [6] Parkman, P. D. et al.: *New Eng. J. Med.*, 275: 569—574, 1966.
- [7] Stewart, G. L. et al.: *New. Eng. J. Med.*, 276: 554—557, 1967.
- [8] 何南祥等: 浙江医科大学学报, 4: 169—172, 1979.
- [9] 宫荫蓼等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(5): 284, 1982.
- [10] Peetermans, J. et al.: *Arch. Ges. Virusforsch.* 21: 134—143, 1967.
- [11] Huygelen, et al.: *Amer. J. Dis. Child.*, 118: 362, 1969.
- [12] Vaher, A. and Cristofalo, V. J.: *Archiv F. Virusforschung Bd.* 21 (3—4): 425, 1967.
- [13] 戴 斌等: 中华预防医学杂志, 15(2): 69, 1981.
- [14] 戴 斌等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1(3): 203, 1981.
- [15] Musser, S. J. et al.: *Amer. J. Dis. Child.*, 118: 355—361, 1969.
- [16] Fisher, T. N. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* 95: 47—51, 1957.