

流感病毒胰酶不依赖性的研究^{*}

王磊^{**}, 杨怀德^{**}, 何秀莲, 李卫东

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所 生物制品五室, 云南 昆明 650118)

摘要: 在无胰酶条件下将流感病毒在 MDCK 细胞和 Vero 细胞上连续传代, 研究流感病毒生长对胰酶的依赖性. 选择出细胞培养流感病毒的适宜 pH 值, 在无胰酶条件下将流感病毒毒株在 Vero 细胞和 MDCK 细胞上连续传代, 然后将无效价的病毒收获液与原毒种混合后再进行传代. 获得了 6 株在 MDCK 细胞上无需胰酶就能扩增的流感病毒毒株.

关键词: 流感病毒; 胰酶; 连续传代

中图分类号: Q 813.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)04-0428-05

疫苗接种是防治流感发生和流行最有效的一种手段. 多年来流感疫苗的生产一直采用鸡胚培养, 在人体免疫预防中证明是安全有效的. 但也存在一定的局限性, 而且鸡胚来源的病毒在鸡胚中连续传代后常常引起 HA 的变异, 这种变异也可能发生在病毒其它节段, 结果使鸡胚来源的疫苗不能与人群中的流行毒株完全匹配^[1]. 为此 WHO 认为在考虑新流感全球大流行时, 疫苗的生产能力仍然是最令人担心的问题^[2]. 因此 WHO 大力推荐寻找理想宿主细胞替代鸡胚. 以培养的组织细胞作为流感病毒增殖基质生产疫苗, 具有经济方便, 更加可控, 能消除其他外界因素影响, 重复性好, 质量稳定并可大规模机械化生产, 内毒素含量将降低, 抗原性更接近自然流行株, 还可减少宿主蛋白成分, 减少变态反应等优点. 国外 20 世纪 90 年代就开始了用传代细胞制备流感疫苗的研究开发, 已进行了人体临床实验, 并证明是安全有效的^[3].

由于流感病毒在传代细胞上培养需依赖胰酶^[4], 因此病毒培养需要一个复杂的介质支持, 常用无血清培养基, 如使用含血清培养基则必须在接种病毒前把长成致密单层的传代细胞浸泡洗净残

余小牛血清, 再加入一定量病毒, 同时在培养基中添加一定浓度的 TPCK-胰酶, 以求获得高滴度的病毒液, 很不利于大规模生产. 而且由于无血清培养基和 TPCK-胰酶的价格都比较昂贵, 所以大大提高了生产成本, 导致细胞流感疫苗的成本高, 一直未能进入市场. 因此细胞适应的不依赖胰酶流感病毒毒株具有重要的理论意义和极大的实用价值.

本实验是通过在 MDCK 细胞和 Vero 细胞上多次的无胰酶传代培养多株分离出来的 A 型和 B 型流感病毒, 在传代的过程中将无效价毒种与原毒种混合后接种的方法来促使病毒适应无胰酶的培养条件.

1 实验材料

1.1 毒株 6 株甲型毒株代号为 NA₁₈₄, NA₁₈₃, NA_{上1999}, NH_{III 3}, NA₄₅₀, NH_{III 4-5}, 7 株乙型毒株代号为 NB₅₉₂₋₆, NB₃₆₁, NB₂₋₂, NB_{II 3-3}, NB₃₆₁₋₂, NB₄₈₇₋₆, NB₅₁₂₋₆, 共 13 株试验用流感病毒毒株, 这些毒株均由我室分离保存.

1.2 细胞 30 代以内的 MDCK 细胞, 150 代以内的 Vero 细胞, 医科院医学生物学研究所保存.

* 收稿日期: 2008-04-07

基金项目: 国家高科技发展计划项目(863)资助(2006A A02Z409); 云南省自然科学基金资助项目资助(2004C0720M, 2006YX29); 云南省技术创新人才项目资助(2003PY07).

作者简介: 王磊(1983-), 男, 湖北人, 硕士生, 主要从事毒疫苗方面的研究.

通讯作者: 李卫东, 男, 云南人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事疫苗研究方面的工作, E-mail: lwd@inbcams.com.cn.

** : 共同第一作者.

1.3 试剂 DMEM/F12培养基, 购自清大天一生物公司; 100 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA), 购自北京夏斯生物技术公司; 100 μ g/mL 的 TPCK-胰酶, 购自 Worthington Biochemical Corporation; 6.6% NaHCO₃ 溶液, 小牛血清, 消化用胰酶, 3% 的谷氨酰胺, 10 000 U/mL 的双抗等均由中国医学科学院医学生物学研究所研究提供。

2 实验方法

2.1 病毒生长维持液 pH 值的选择 长满单层 MDCK 细胞的 24 个小方瓶分为 4 组。按照 0.6% 谷氨酰胺, 1 μ g/mL TPCK-胰酶, 10 mg/mL 牛血清白蛋白, 100 U/mL 双抗, 其余加 DMEM/F12 培养基配成病毒生长维持液。然后在其中分别加入 0.66%, 1.32%, 1.98%, 2.64% 的 NaHCO₃ 调节维持液的 pH 值。

将小方瓶中细胞生长液倒干净后用灭菌 PBS 清洗细胞面 2 次除去血清。每瓶加入 1 mL 维持液和 0.1 mL 病毒液, 35 $^{\circ}$ C 吸附 2 h 后每瓶加入 9 mL 维持液, 35 $^{\circ}$ C 培养。

72 h 后收毒, 每瓶加入收毒液(1.32% NaHCO₃, 10 mg/mL BSA, DMEM/F12) 1.5 mL, -20 $^{\circ}$ C 和常温反复冻融收获病毒液 3 次, 得到病毒液后 PBS 稀释, 用 1% 鸡血细胞做血凝效价检测。

2.2 Vero 细胞和 MDCK 细胞上病毒不添加 TPCK-胰酶的培养 流感病毒毒株在长成致密单层的 Vero 细胞和 MDCK 细胞上以不含 TPCK-胰酶的病毒生长维持液 35 $^{\circ}$ C 培养, 72 h 后收毒。测血凝效价。

将在 Vero 细胞上培养了 6 代, 收获的没有效价的病毒与原病毒毒种混合后, 再次接种在 Vero 细胞上。连续培养 6 代, 测血凝效价。

将 MDCK 细胞上培养了 3 代后仍然有血凝效价的毒株和没有血凝效价的毒株分类。有血凝效价的继续按照上述的传代方法来进行无胰酶培养; 没有血凝效价的病毒收获液与原病毒液按照 1:1 的比例混合, 然后接种在 MDCK 细胞上, 继续培养。

2.3 加 TPCK-胰酶回复培养 无胰酶条件下能生长的病毒毒株在 MDCK 细胞上接种, 在病毒生长维持液中加 TPCK-胰酶。35 $^{\circ}$ C 培养, 72 h 后收毒, 3 次冻融后 PBS 稀释, 测血凝效价。与无胰酶条件培养下的病毒效价对比。

3 结果

3.1 病毒生长维持液 pH 值的选择 4 个浓度的 NaHCO₃, 2 个病毒株的培养结果(分别为 3 瓶细胞的平均效价)如表 1。通过该比对可以看出 2 种病毒均为当加入到维持液中的 NaHCO₃ 体积分数为 1.32% 的时候(此时其维持液的 pH 值在 7.4 左右), 病毒的效价最高(分别为 512 和 256)。因此将 0.6% 谷氨酰胺, 1 μ g/mL 胰酶 TPCK, 10 mg/mL 牛血清白蛋白, 100 U/mL 双抗, 1.32% NaHCO₃, DMEM/F12 作为病毒生长维持液的配比。

表 1 NaHCO₃ 体积分数(pH 值)对病毒生长的影响
Tab. 1 The effect to the growth of virus of the percentage of NaHCO₃ (pH)

病毒种类	0.66%	1.32%	1.98%	2.64%
H ₃ N ₂	128	512	128	16
B ₄₈₇	64	256	32	8

3.2 Vero 细胞和 MDCK 细胞上无胰酶的病毒培养结果 流感病毒毒株于无胰酶的条件下在 Vero 细胞上的传代, 连续 6 代收获的病毒均无效价。将第 6 代收获的病毒液与病毒原液混合后在 Vero 细胞上同样传 6 代, 效价仍然为 0。该结果表明所有的病毒毒株在无胰酶的条件下均不能在 Vero 细胞中生长。

毒株在 MDCK 细胞上无胰酶条件下传代 3 次后, NA₁₈₄, NA₁₈₃, NA_{上1999}, NB₃₆₁, NH_{III-3}, 这几个毒株有效价, 继续在 MDCK 细胞上传代到第 9 代; 而 NB₂₋₂, NB_{II3-3}, NH_{III4-5}, NB₃₆₁₋₂, NB₄₈₇₋₆, NB₅₁₂₋₆, NB₅₉₂₋₆, NA₄₅₀ 等没有血凝效价, 结果见表 2。

3 次传代后没有效价的毒株的病毒收获液与原毒种以 1:1 的比例混合后于无胰酶的条件下, 在 MDCK 细胞上传代 9 代, 其中有 5 株效价逐渐增加至稳定如表 3 所示。

1 个甲型毒株(NA_{上1999}) 和 5 个乙型毒株(NB_{II3-3}, NB₃₆₁₋₂, NB₄₈₇₋₆, NB₅₁₂₋₆, NB₅₉₂₋₆) 7~9 代的效价已经趋于稳定, 可以得出这 6 个毒株基本上适应了 MDCK 细胞上无胰酶条件下的生长。而其余的 7 株病毒的效价在传代的过程中逐渐

表 4 6 株不依赖胰酶流感病毒株加胰酶培养后的效价

Tab. 4 The hemagglutinin titers of six virus which adapted to the no- trypsin conditon in the existence of trypsin

毒株代号	NB ₁₁₃₋₃	NB ₃₆₁₋₂	NB ₄₈₇₋₆	NB ₅₁₂₋₆	NB ₅₉₂₋₆	NA _{上1999}
加胰酶培养	512	256	512	128	256	256
不加胰酶培养	512	128	256	128	256	128

4 讨 论

在病毒生长维持液中对病毒的生长影响最大的是 TPCK-胰酶浓度和 pH 值, 由于要做的是无胰酶的病毒筛选, 因此这次主要是通过控制加入的 NaHCO₃ 的浓度来调节病毒生长维持液中 pH 值. 其他的条件均参考本室以前的研究结果. 流感病毒感染 MDCK 细胞, Vero 细胞, 甚至 KMB-17 细胞^[15]. 但是 MDCK 细胞是流感病毒最好的细胞生长载体, 很多病毒在细胞上的分离都是用 MDCK 细胞来进行的. 因此这次是采用了 MDCK 细胞来做 pH 的选择. 病毒采用分离出来的在 MDCK 细胞上有很高血凝效价的甲型 (NH₁₁₁₄₋₅) 和乙型 (NB₄₈₇₋₆) 病毒各 1 株, 结果也比较准确地得到了适宜的 pH 值.

从结论可以看出在 Vero 细胞上对病毒进行无胰酶条件下的适应过程中, 病毒不能生长. 其主要原因可能是 Vero 细胞在孵育中不断地分泌出一种大于 50 ku, 小于 100 ku 的蛋白抑制因子, 该因子能游离于基质中, 能灭活胰酶的活性^[4]. 同时本研究认为该因子能够阻止病毒产生裂解的血凝素, 干扰病毒的吸附, 因此病毒在 Vero 细胞上不管怎么样也不能适应无胰酶条件下的生长. 这个原因可能需要对病毒血凝素的裂解机制以及该蛋白抑制因子的认识做进一步的研究.

在 MDCK 细胞上的无胰酶条件下的适应取得了比较好的结果, 最终获得了 6 个有稳定效价的毒株. 从适应这些毒株的过程来看, 对于病毒的适应就是要在适宜的条件下对病毒连续的传代, 让病毒能在连续传代的过程中产生突变来适应新的生长环境. 同时也可以通过将传代后得到的无效价的病毒液与原病毒液进行混合来传代, 这样有利于病毒的突变. 对于这个方法的原因我们认为可能是因为传代得到的没有效价的病毒液中实际是有病毒颗粒的, 但是这种病毒颗粒不能表现出血凝效价, 在加入原病毒液混合后再接种到细胞上就会使这 2

种病毒相互之间发生基因的重配, 产生出的病毒既能适应无胰酶的环境, 也能表现出血凝效价. 对于这个设想要用进一步的实验来证实, 比如对无效价的病毒收获液中病毒 RNA 的检测来确定病毒的存在以及对有效价毒株基因的克隆和比对. 关于这方面的实验已经在我室开展.

Kessler N 等曾报道在 Ultra-MDCK (U-MDCK) 细胞上发现不依赖胰酶流感病毒毒株^[6], Sugimura T 等也报道流感病毒可在无胰酶条件下于 ESK (embryonic swine kidney) 细胞上复制^[7], 而现在这个结果也说明了有些流感病毒毒株在 MDCK 上完全有可能在没有胰酶的条件下生长. 这次试验最终得到了 5 株乙型的病毒毒株和 1 株甲型的毒株, 而用于试验的是随机选择的甲、乙型毒株数量相当, 由于毒种数量的限制, 不能完全的说乙型毒株在无胰酶的条件下更加容易在 MDCK 细胞上生长, 但是该结果可以在一定程度上为以后流感病毒毒株无胰酶条件下的适应提供一定的经验, 同时也可以探讨一下究竟是什么机制在病毒对胰酶的依赖性上起决定性的作用.

以这些获得的毒株作为基础, 在将来的实验中克隆出其全基因组 cDNA, 通过与适应前的毒株基因进行比对, 寻找突变基因位点. 进一步利用反向遗传学技术回复其突变, 寻找流感病毒中胰酶不依赖相关基因位点. 如果这些基因位点不是在 HA 和 NA 基因上, 可以将突变株的其余 6 个基因与流行病毒株的 HA, NA 基因通过八质粒共转染系统进行重配^[8], 得到的病毒株既能在无胰酶的条件下生长, 同时也有流行病毒株的抗原特性, 在生产流感疫苗上有很大的作用^[9].

参考文献:

- [1] HOFFNABB E, KRAUSS S, PEREZ D, et al. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines[J]. Vaccine, 2002, 20(25-26): 3165-170.
- [2] 雷殿良. 流感疫苗 (WHO 最新立场性文件) [J]. 刘春暖节, 译. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(1): 69-72.

- [3] MACDONALD N, WEIR E, LANGLEY J M. Influenza and the influenza vaccine[J]. CMAJ, 2007, 177(9): 1 028-1 028.
- [4] KAVERIN N V, WEBSTER R G. Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero(W H O) cells by loss of trypsin activity[M]. J Virol, 1995, 69: 2 700-2 703.
- [5] 王海璇, 廖国阳, 李卫东, 等. KMB_(17) 细胞培养流感病毒的实验研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(5): 536-540.
- [6] KESSLER N, THOMAS-ROCHE G, GERENTES L, et al. Suitability of MDCK cells grown in a serum-free medium for influenza virus production [J]. Dev Biol Stand, 1999, 98: 13-21.
- [7] SUGIMURA T, MURAKAMI Y, OGAWA T. The susceptibility of culture cells to avian influenza viruses [J]. J Vet Med Sci, 2000, 62(6): 659-660.
- [8] WANG Z, DUKE G M. Cloning of the canine RNA polymerase I promoter and establishment of reverse genetics for influenza A and B in MDCK cells[J]. Virol J, 2007, 4(1): 98-102.
- [9] STECH J, GARN H, WEGMANN M, et al. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin[J]. Nat Med, 2005, 11(6): 683-689.

Research of the independence to trypsin of influenza virus

DING Shi-lei, YANG Hua-de, HE Xi-lian, LI Wei-dong

(Institute of Medical Biology, China Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: The experiment focused on obtaining the influenza virus in MDCK cell lines and Vero cell lines in the absence of trypsin by the way of continuous virus passage. First, the optimal pH conditions in which the virus can grow in the mammal cell lines was chosen. Then the virus separated and conserved by the lab were continuously cultivated in the Vero cell lines and MDCK cell lines in the absence of trypsin in the optimal conditions. After some passages, the original virus were mixed with the virus which have no Hemagglutinin titers, then these mixed virus and the virus which had the Hemagglutinin titers were cultivated in the cell lines. As a result there were six virus that can adapt to the condition in the absence of trypsin.

Key words: influenza virus; trypsin; continuous passage