

应用組織培養研究流乙脑炎病毒

中国协和医学院細菌免疫学系

1954—1957年度研究生

朱崗福

指導教授

張乃初

1957年12月印

本實驗的完成和下面各方面的幫助是分不開的：教育處及全系同志的大力支持及鼓勵；張乃初教授的耐心指導；本系病毒組同志在技術上的協助，尤其是吳安然講師及王美芳同志對我的幫助更大；實驗中所有照片皆由本院照像室蔣漢澄同志等協助攝製；論文寫就後由本處文印室段桂良同志協助籌劃繕寫印刷；在實驗過程中並常得院內外其他專家們如黃禎祥、湯飛凡、張鑒等教授的寶貴指示。作者敬對他們致以謝意。

應用組織培養研究流乙腦炎病毒

目 錄

(一) 流乙腦炎病毒對雞胚心臟的致細胞病變作用研究.....1—19

一、前言	1—3
二、實驗器材	3—7
三、實驗方法	7
四、實驗結果	7—9
五、討論	9—14
六、總結	14
文獻	15—18

(二) 在組織培養中流乙腦炎病毒干擾西方馬腦脊髓炎病毒的研究.....19—42

一、前言	19—20
二、實驗器材	20—21
三、實驗	21—31
1. 西方馬腦脊髓炎病毒的組織培養	21—23
2. 在組織培養中流乙腦炎病毒對西方馬腦脊髓炎病毒的干擾作用	23—27
3. 在組織培養中京工研A ₂ 株流乙腦炎病毒干擾西方馬腦脊髓炎病毒的敏感性	27—29
4. 在組織培養中京工研A ₂ 株流乙腦炎病毒干擾西方馬腦脊髓炎病毒的特異性	29—31
四、討論	31—32
五、總結	32—33
附錄 影響組織生長的因素	34—37
文獻	39—42

應用組織培養研究流乙腦炎病毒

(一) 流乙腦炎病毒對雞胚心肌塊的致細胞病變作用研究

一、前 言

運用組織培養方法以培養病毒已有五十年以上的歷史。1906年 *Alderschaff* 及 *Brauers* 二氏接種痘苗病毒於禽體的宰兔角膜獲得成功可認為是組織培養的雛型。1913年 *Steinhardt* 氏採用血漿懸滴培養法以培養痘苗病毒為組織培養應用於病毒學上奠定了最初的基础。隨後組織培養在各方面包括培养基組成、培養方法及結果判定等皆有不斷的創造及改進，關於這方面的材料部份已由 *Rubbins* 氏⁽¹⁾ 及 *Kopac* 氏⁽²⁾ 加以綜述。在發展過程中我國學者如李⁽³⁾、魏⁽⁴⁾、方、謝⁽⁵⁾、黃⁽⁶⁾ 等氏於早期亦作出了不少卓越的貢獻。病毒組織培養在創用初期，發展是相當緩慢的，主要局限於對痘苗病毒等幾個病毒的研究，工作亦比較零星。

1949年 *Enders* 氏等⁽⁷⁾ 運用非神經組織培養養髓灰白質炎病毒獲得了成功，這項發現很快地促起病毒工作者對組織培養的興趣，因之隨後病毒組織培養的报导有如雨后春筍接踵而來，其發展的迅速確實動人。1953年 *Enders* 氏⁽⁸⁾ 總結了過去病毒組織培養的成就。就在他文章發表後的四年中，原來認為不能培養的病毒如帶狀疱疹病毒⁽⁹⁾，以及難以培養的病毒如水痘⁽⁹⁾、腮腺⁽¹⁰⁾、流行性角膜結膜炎⁽¹¹⁾、傳染性肝炎^(12,13) 等病毒皆已獲得了陽性結果；當時認為已可培養的病毒，現在在判別病毒生長方法上亦有了更大的改進，例如在 *Enders* 氏的綜述中還提出需用猴體接種來證明組織培養中麻疹病毒的繁殖，而現在利用病毒的致細胞病變作用可以直接用鏡檢組織培養中細胞病變來判別病毒的存在及繁殖⁽¹⁴⁾。此外利用組織培養還不斷地發現了新的病毒例如腺體病毒、ECHO 病毒⁽¹⁵⁾。

流乙腦炎自1935年在病人屍腦中分離得病毒後已對他進行了下大的研究工作；雖然1938年 *Haagen* 氏等⁽¹⁶⁾ 已曾用組織培養來研究該病毒的繁殖及傳代，但隨後很少有人繼續從事該方面工作。

小白鼠及受精鴨卵雞卵是對乙流腦炎病毒有着一定的敏感性的，但在實際用於診斷上還是很難使人滿意；為了改進本病的診斷及

预防工作，对流行乙脑炎病毒组织培养进行深入的研究具有重大的实用意义。有关本病毒组织培养的主要材料总结列表一。

表一 流行乙脑炎病毒组织培养结果的主要文献材料

作者	主要实验内容	实验结果
Haagen E. ⁽¹⁶⁾ (1938)	试验病毒在各种组织的懸液培养中繁殖及傳代情况	幼兔及小白鼠脑内接种均能支持病毒生长，且在继续傳代中病毒毒力下降；鸡胚各种组织皆适用，病毒经移种40代仍未出现毒力降低。
Kawakita Y. ⁽¹⁷⁾ (1939)	试验鸡胚组织对病毒的敏感性	至大和小白鼠脑内接种同样敏感，病毒经61次傳代仍能在培养物中测出（应用小白鼠脑内接种试验）。
川喜田愛郎 ⁽¹⁸⁾ (Kawakita Y.) (1939-40)	试验病毒繁殖曲线	病毒在培养后（鸡胚脑组织悬液培养）3-4天達最大量，约可维持至培养的第10天；随后下降，至培养的第25-50天消灭。
Kawakita Y. ⁽¹⁹⁾ (1948)	免疫血清对病毒的作用	病毒培养前或培养后一天内加入免疫血清可以完全中和病毒；免疫血清可杀灭病毒，而小仅是延缓病毒的繁殖。
Scherer W.F. ⁽²⁰⁾ (1954)	病毒在Hela细胞培养中繁殖情况及其所引起的致细胞病变作用	傳代14次的培养物仍能使小白鼠感染及死亡（第四代例外）；1-4代培养物中细胞在4-6天内全被破坏，5-13代时大部份细胞保持正常。
Mason H.C. ⁽²¹⁾ (1956)	全 上	病毒繁殖高峰在培养后48-120小时；病毒经傳40代仍无显著毒力下降；在第13及41代曾出现严重的细胞病变。
McCullum R.W. 等 ⁽¹⁹⁵⁷⁾ ⁽²²⁾	试验二株病毒在鸡胚肌皮塊、鸡胚细胞、Hela细胞、猴肾上皮细胞及Detroit-6细胞中生长情况及其所引起的致细胞病变作用	病毒经傳代10次以上仍有繁殖，病毒在培养的第4天達最高峰（应用小白鼠脑内接种试验）；M ₁ 22043株病毒在初15代培养中使鸡胚肌皮塊長出的成纤维母细胞发生病变，但培养液经未凍后就消失作用，二株病毒一般在培养后第五天皆能使Detroit-6细胞发生不完全性的破坏。

本实验利用鸡胚心肌组织块来培养流乙脑炎病毒，企图以观察组织细胞的损坏作为直接地判断病毒生长繁殖的指标。

二. 实验器材

1. 用具及其处理：

一) 培养瓶：作为悬浮培养采用50毫升三角瓶，旋转培养利用容积15毫升左右的抗生素小瓶（选择玻璃质料均匀，可用于显微镜下观察者）。培养瓶用约1%肥皂水刷洗，经清水冲净后泡于清洁液中⁽²³⁾2—3天，取出后用自来水冲洗10—15次，再以双蒸馏水洗3—5次，最后用四蒸馏水（由供应室获得的双蒸馏水是用金属蒸馏器製出，为防止水中可能混有金属杂质，在实验室中再经玻璃器重蒸馏二次）冲一次。洗好的培养瓶晾干（或烤乾）后加上瓶塞，用高压湿热灭菌（15磅15'）并于烤乾备用；瓶口的纱布棉塞包以坚韧的薄纸以防止瓶塞上絮屑落下，由于纸质硬性，所形成的褶缝可能使容器内外沟通，为了避免发生污染，採用二层色纸，将外层一纸翻下以罩住容器口（图1）。

二) 其它玻璃用具：滴管及细玻璃棒用清水冲净后浸泡于清洁液，注射器应用数次后加以浸泡清洁液处理，取出后和培养瓶相同予以澈底洗净；上述用具用毕后立即用水冲洗乾淨以免实验材料粘在上面，如有感染性者先经煮沸消毒。培养皿等其它容器的处理和培养瓶相同。组织搅碎器（Waring blender）除不用清洁液浸泡外和培养瓶同样洗刷，洗净后加入酒精煮至刀口面置於紫外线下灭菌二小时，临用前加入少量灭菌 Hank's 溶液洗一次。

三) 橡皮用具：橡皮管採用淡黄色透明橡皮，翻口橡皮塞由红色软橡皮製成。新的橡皮用具在用前皆经验与酸先后处理⁽²⁴⁾：用清水冲洗乾淨置于肥皂水中煮沸10—20'，在清水中洗淨后置於 $\frac{1}{2}$ N₂O₄H 中煮沸15'，取出用清水冲洗，再置入4% HCl 中煮沸15'，煮后经清水冲洗，再用双蒸馏水洗五次，最后用四蒸馏水冲洗一次。橡皮塞用高压湿热灭菌。橡皮管在煮时常用大肚滴管（图2）吸动管内液体使充分交换。

四) 其它用具：解剖鸡胚的解剖用具为避免生锈採用乾烤灭菌法（160°C，120'），用毕洗净后立即烤乾。针头用毕立即相隨用自来水、蒸馏水及酒精注洗，洗净的针头用高压湿热灭菌后加以烤乾。磁乳钵及金属沉淀管（制鼠脑液用）除不

浸泡清洗瓶体和培养瓶同样处理。

2. 培养基

一) 平衡盐液: 本实验中所采用的平衡盐液基本上是按1949年Hanks氏所拟处方⁽²⁴⁾配制, 但对其中酚红液的配法加以修改。

1) Hanks 原液:

溶液甲:

NaCl	32克	溶于四蒸馏水100毫升	合并加蒸馏水20毫升及哥罗仿0.4毫升
KCl	1.6 "		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8 "		
CaCl_2	2.8 "	溶于四蒸馏水20毫升	

溶液乙:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.608克	溶于四蒸馏水180毫升
KH_2PO_4	0.24 "	
葡萄糖	4.0 "	
0.4% 酚红*		20毫升
哥罗仿		0.4毫升

* 0.4% 酚红液配制法: 精确称酚红0.4克, 置于洗净的玻璃研钵中, 逐渐加入经滴定的 NaOH 液并于研磨, 使酚红完全溶解, 再加 NaOH 量为0.1N 11.28毫升 (或在0.1N 左右为相应量), 将已溶的酚红液倾入100毫升量瓶, 用四蒸馏水洗涤研钵数次, 所有洗液一併加入量瓶中, 最后加蒸馏水至量瓶上刻度, 摇匀, 储于 10°C 左右冷室中备用。

在实验后期由于所有的 NaCl 及葡萄糖纯度较差, 在配出的溶液中出现絮屑状物, 此种杂质採用滤纸(Whatman No. 1)过滤将其除去, 经此处理后的溶液在应用上未发现有何改变。或二种溶液的瓶口分别加上橡皮塞, 储存于 10°C 左右的冷室中, 一般应用一月, 最长可用至三月。

2) Hanks 用液:

溶液甲1份 + 溶液乙1份 + 四蒸馏水18份 $\xrightarrow{\text{混合}}$ Hanks 用液

用液分装成适量, 经湿热灭菌(9磅10')储存于 10°C 左右冷室中, 在一月内用完。临用前加入1.4% NaHCO_3 液使PH达7.6左右, 每10毫升Hanks用液中约需加入0.2毫升。 NaHCO_3 液用四蒸馏水配出, 经湿热灭菌(9磅10')后分装小瓶, 冻存于低温

冰箱中 (-15°C — -30°C)。

二) 鸡胚浸出液: 孵育10天的受精莱亨种鸡卵经灯光下检查后用75%酒精消毒卵壳, 用灭菌小刀在鸡卵中部将卵壳打开翻起, 用小弯镊夹鸡胚颈项将其取出, 拭除眼球, 置于Hanks用液(经调整PH并加入抗生素, 下同)中洗去胎外血液及胎液; 秤得所用鸡胚重量后将其倒入组织搅碎器中搅碎30", 加入等量Hanks用液再搅动30"; 将鸡胚悬液取出置于 37°C 水箱中加热30', 在加热过程中将容器摇动数次, 随后进行离心沉淀(先用2000转/分, 20', 再经15500转/分, 30')以取其上清液。制出的鸡胚浸出液分装适量, 冰凍保存(低温冰箱中)。在保存过程中会有沉淀物出现, 一般至一星期已達最高量, 为了使每批所用鸡胚浸出液前后接近一致, 制出的鸡胚浸出液皆經凍存一週后才用, 用前进行离心沉淀(2000转/分, 30')以除去沉淀物, 經如此处理的上清液虽再行冻藏亦不会有沉淀物形成。鸡胚浸出液一般应用1—2月, 最長曾用至四月, 未发现对組織生长有不同的影响。

三) 兔血清: 林取空腹兔心脏血液以分离血清, 血清經 56°C 30'加热灭活后分装小瓶, 冻存于低温冰箱中, 一般应用一月。在临用前血清再在 56°C 水箱中加热10—20'。

四) 抗生素: 用四蒸腦水配成每毫升含一万单位青霉素及二万微克双氢链霉素的混合液, 分装小瓶, 冻存于低温冰箱中, 一般应用1—2月。

五) 培养基成份:

Hanks用液 (PH 7.6)	85%
鸡胚浸出液	10%
兔血清	5%
抗生素	0.1毫克/10毫升培养基

在实验开始阶段, 培养基临用时配制; 以后将培养基配出儲存于 10°C 左右冷室中备用(瓶口加有橡皮塞), 此种培养基經儲存二週应用和新配出的培养基比較未发现有任何区别。按Duffy氏(25)报导, 流乙脑炎病毒在硷性环境中較为稳定; 因之在实验中所有的培养基PH皆调整至偏硷性(PH 7.6—7.8)。

3. 鸡血浆及血浆凝固液: 本实验中所用的抗凝剂是肝素, 前部分实验应用"Albott"牌的1%溶液, 后部分用"Leo"牌的粉剂; 肝素临用前皆配成0.05%生理鹽水溶液, 經9磅十分钟湿蒸灭活后儲存于 10°C 左右冷室中, 应用期不超过一月。取空腹

萊亨種湯（一步以下公稱）心血 17.5 毫升加入於一毫升 0.05% 肝素溶液，攪勻，用高速沉淀（2000 轉/分，20'）分取血漿，血漿儲存在 2—6°C 冰箱中，應用期不超過一月。血漿凝固液由 Hanks 用液（PH 7.6）一份、雞胚浸出液二份及兔血清四份配成，蒸乾配出後亦儲存於冰箱中，應用期一般不超過二週。血漿中約含等量凝固劑可在 $\frac{1}{2}$ —2' 內發生凝結。

4. 組織塊 實驗中所用組織塊採取 9—11 天（一般多用 10 天）雞胚心肌製成：氣室部蛋殼先用碘酒及酒精消毒后用鑷子打開及除去，用小剪鑷破殼膜及胚膜，勾住雞胚頂端稍拉出，置於 Hanks 用液中，自胸骨下取出心臟，除去心臟上大血管，並將血痕洗淨，吸去 Hanks 用液后用直頭小剪刀將心臟隨意剪成大塊；然後加入少量 Hanks 用液，仔細將大塊心肌剪成約一平方毫米大小的小塊，剪好的組織塊再用 Hanks 用液洗 2—3 次以除去此組織碎屑及組織塊邊緣部受損細胞；最後加入少量培養基待用。本實驗中所用組織塊皆在臨用時製成。

5. 腦炎病毒：腦炎病毒皆取自初生 1—2 天的感毒（腦內接種）乳鼠腦，一般於病發病瀕死時取腦；應用培養基製成乳鼠腦懸液（每個乳鼠腦加培養基 2.5 毫升作為 10^{-1} ）皆經高速寒冷高速沉淀（10000 轉/分 60'）而用其上清液，如此使接種材料中病毒含量較為均勻，且可避免其它非培養基中細胞混入而混淆結果。

為了避免鼠腦本身可能具有非預期的作用，在全部實驗中皆用同窩乳鼠作成正常對照鼠腦液（對照乳鼠及感毒乳鼠分開哺育）。

各種病毒在實驗開始時分別作成一批真空冰凍乾燥材料儲存於低溫冰箱中（一般為 -25°C，但冰箱時常損壞，此時溫度可上升至 0°C 以上）备用，每次實驗時取出一支乾燥材料通過乳鼠（腦內接種）一代後應用，由一支材料傳出的病毒至多應用連續三代的鼠腦。

本實驗中所用的流乙腦炎病毒有下列三株：一）京卫研 42 株——本株病毒由中國醫學院在病人腦組織中分得（1949），應用時已經小白鼠腦內傳代 33 次；在本實驗中該株病毒的小白鼠 LD_{50} 介乎 $10^{-7.33}$ — $10^{-8.33}$ 。

二）5607 株——此株病毒由本系在病人腦組織中分得（1956），應用時僅經小白鼠腦內傳代四次；該病毒的小白鼠 LD_{50} 介乎 $10^{-6.22}$ — $10^{-7.23}$ 。

三）中山株——該株毒種得自美國，傳代次數不詳；在本實驗中其小白鼠 LD_{50} 介乎 $10^{-7.67}$ — $10^{-9.33}$ 。

在實驗過程中流乙腦炎病毒除一次實驗外皆在臨用時由乳鼠腦製出；病毒液大多皆經小白鼠

(三週) 腦內接種測定 LD_{50} 。病毒接種入組織培養物與 LD_{50} 操作時間相隔最長不超過30'；病毒液的稀釋在盛冰塊的小盞或特制冰盒(圖3)中進行，稀釋液採用培養基或10%兔血清鹽水(如接種組織養的病毒材料亦需稀釋，則以培養基用作稀釋液，所得稀釋材料同時用於組織培養及測定小白鼠 LD_{50} ；但如組織培養需用濃的病毒液，則應用兔血清鹽水稀釋後作 LD_{50})。

三. 實驗方法

在斜置的50毫升三角瓶中(圖4)置以心肌組織塊10—20塊，加入0.4毫升流乙腦炎病毒(實驗培養物)或正常鼠腦液(對照培養物)，接觸適當時間(室溫或35°C水箱中)後加入3.6毫升培養基進行懸浮培養，培養瓶口用翻口橡皮塞塞緊(圖1)。

為了盡量避免組織塊固貼瓶底發生生長，每天用手將瓶振搖數次。在培養過程中每隔2—4天換取培養基一次；在換入新培養基前將組織塊用Hanks用液洗滌一次(三毫升)，移作旋轉培養(每瓶懸浮培養物移作二瓶旋轉培養，每瓶懸浮培養物祇用作一次檢查)。

旋轉培養的操作：在斜置的抗生素小瓶中(圖4)加入血漿一滴於瓶底一側，用彎頭滴管(圖2)放置組織塊四塊於瓶壁上端1/3處。在加有血漿處再加以凝固液一滴，用扁平圓尖細玻璃棒(圖2)迅速將血漿及凝固液刮勻後塗佈於瓶壁一側的下端1/2處，隨即將組織塊用玻璃棒推下至血漿層，並排成一定位置(圖5)，使瓶底側面呈近乎水平狀讓血漿及凝固液混合材料流至瓶壁。迅速旋轉培養瓶，使混合液在附貼組織塊處經過一次，隨即將瓶口向上斜置，使多餘的混合液流下並凝固在瓶底一側。

一般在室溫中放置10—20'後加入培養基一毫升，塞上翻口橡皮塞就可放置在旋轉鼓上進行培養(圖6)；旋轉鼓置於35°C水箱中，每小時旋轉速度平均是10轉。

培養物每天用低倍擴大顯微鏡(60X)檢查一次，前後連續觀察三天；檢查內容包括用測微器粗量地測量組織塊四周長出的成纖維母細胞範圍大小及觀察所長出的細胞有無破壞情況。

在顯微鏡載物台上的移動架處加上一薄片中央挖空的木板，將貼有組織塊的小瓶置於木板上，利用移動架就可隨意穩定地移動小瓶至合適的鏡檢位置(圖7)。

四. 實驗結果

腦胚心肌塊經三株流乙腦炎病毒(京研A₂株、5607株及中

山株)以各种方式感染(不同的病毒浓度不同的接触时间,不同的悬浮培养时间等)后进行转培养,其结果与对照培养物(组织块经正常减脑液作用者或未经处理的组织块)相比不能发现有显著的生长上的差别;培养物一般在培养第一天只能用镜检才可发现长出的细胞,自培养二天后就可由肉眼看到在组织块四周有一薄层形成(图5),该薄层完全由成纤维母细胞组成(图8)。

所采用的流乙脑炎病毒对鸡胚心肌细胞各种感染方式及结果总结在表二:

表二 三株流乙脑炎病毒对鸡胚心肌细胞的感染方式及结果

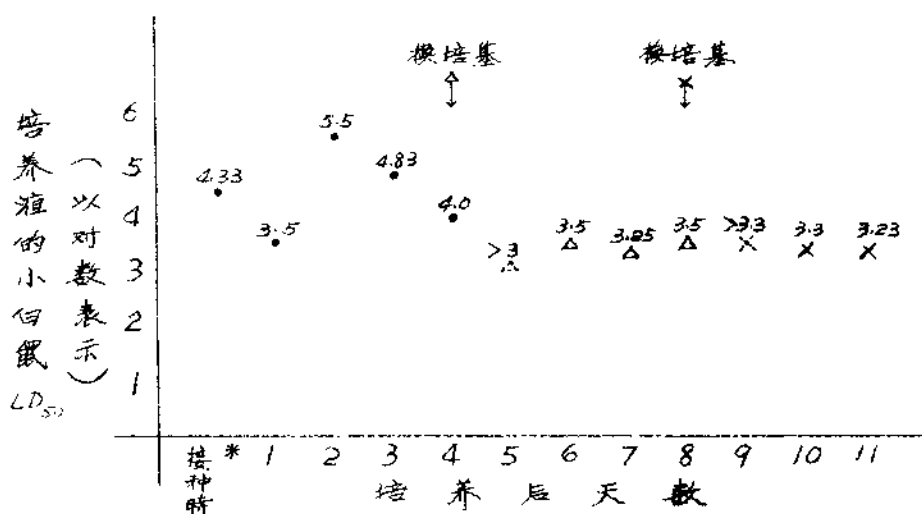
病毒株	病毒浓度	所用病毒的小白鼠 LD ₅₀	病毒与组织块接触时间(35℃)	悬浮培养时间(天)	悬浮培养过程中培养基的更换	移作转培养后镜检所得结果
京研4 ₂	10 ⁻¹	10 ^{-8.17}	30'	1	每三天换一次,同时加入相应浓度冻存的病毒液	感染组织块生长一般与对照组织块比较,无显著差别
	10 ⁻¹	10 ^{-7.33}	40'	0, 2		
	10 ⁻¹		30'*	2, 4, 6		
	10 ⁻³		60'	7, 8, 12	每四天换一次,不再加入病毒液	
	10 ⁻³	10 ^{-8.33}	60'	12		
	10 ⁻⁵	10 ^{-6.1}	60'	2, 3, 4	每三天换一次,同时加入相应浓度冻存时病毒液	
	10 ⁻⁵	10 ^{-7.5}	60'	2, 3, 4, 5, 6		
	10 ⁻⁶	10 ^{-7.33}	60'	6		
	10 ⁻⁶		30'	7, 8, 9		
	10 ⁻⁶	10 ^{-7.5}	30'	9, 10		
5607	10 ⁻¹	10 ^{-6.22}	30'	0, 2, 4	每二天换一次,有的同时加入冻存时病毒液,有的不加以作比较	
	10 ⁻¹		60'	0, 2, 4**	每二天换一次,同时加入冻存病毒液	
	10 ⁻¹	10 ^{-6.5}	60'	0, 2	未换培养基	
	10 ⁻¹		100'	0, 1, 2		
	10 ⁻¹	10 ^{-7.23}	30'	1, 4, 6, 8	每四天换一次,有的同时加入冻存的病毒液,有的不加以作比较	
中山	10 ⁻¹	10 ^{-9.33}	30'	1, 4, 6, 8**		

* 外加在室温中接触100'(25℃)

† 速冻保存几天的病毒液(保存浓度是10⁻¹,原有LD₅₀=10^{-7.5}).

** 移作转培养时可引组织块所长出的细胞出现破坏现象,对照培养物细胞生长正常。

虽然組織塊生長在我們所用的實驗條件下沒有發現顯著的受流乙腦炎病毒的影響，但在初步的實驗中可以看到病毒是在懸浮培養中進行着繁殖。用 10^{-3} 京上研 A2 株病毒作懸浮培養；每四天換培養基一次，不再加入病毒液，在換取培養基時組織塊用 Hanks 用液洗一次（三毫升）；在培養過程中每天取一瓶培養物測定其培養液的小白鼠 LD_{50} （腦內接種，未稀釋的培養液作為 10^0 ）：



*該次病毒液的 $LD_{50} = 10^{-8.33}$ ，接種入培養物的病毒濃度是 10^{-3} ，經加入培養基後又被稀釋 10 倍；因之將未經培養的培養液 LD_{50} 亦作 $8.33 - 4 = 4.33$ 。

在上圖可以看到病毒在培養過程中，它的 LD_{50} 有上升現象；且當培養物經過二次換取培養基並同時將組織塊洗滌，而病毒在培養液中仍保持相當高的 LD_{50} ；這些現象似能說明病毒在組織培養中是有所繁殖的。

五、計 論

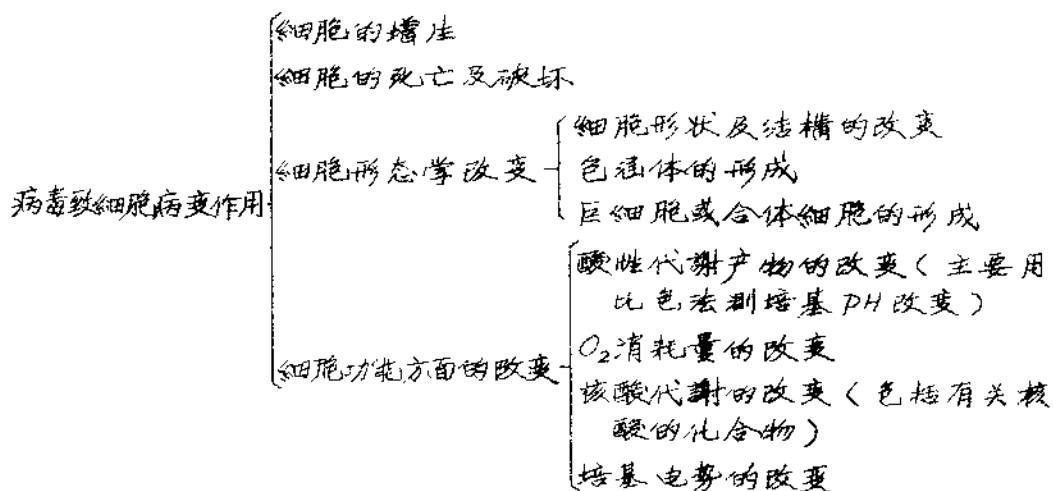
在早期病毒組織培養主要依靠動物試驗來證明病毒的存在及繁殖，這亦是病毒組織培養的廣泛應用受到限制的原因之一。1932年 *Ivanovics* 及 *Hyde* 二氏⁽²⁶⁾ 在進行家兔腦丸組織懸滴培養時，發現大量家兔病毒 III 對此組織有顯著抑制生長作用；有時亦可見到先有少量細胞生長，隨即生長停止，且發生細胞破壞現象。這是文獻上最早記載在組織培養中觀察病毒引起細胞破壞的報導。至於在這方面研究有關人體致病性病毒，則要推我國學者最先從事此項工作。1942年黃氏⁽²⁶⁾ 利用鵝胚肌塊懸滴

培养来培养西方马脑脊髓炎病毒，发现经病毒感染过的组织块不再出现细胞生长；同时指出利用组织培养来判定病毒量较小白鼠脑内接种为敏感。

病毒致细胞病变作用的发现对改进组织培养工作实在是一项重大的贡献，它给予判別組織培养中病毒存在及繁殖以一种方便而准确的方法，可惜当时未被世人所重视。

待1949年 Enders 氏等⁽⁷⁾利用人体非神经组织培养脊髓灰白质炎病毒时，再度发现病毒能规律地引起组织退变现象，从此才使病毒致细胞病变作用被广泛应用作检查病毒生长的指标，对此后新病毒的发现及旧病毒诊断工作的改进起了辉煌的向导作用。

1954年 Enders 氏⁽²⁷⁾及 Lynn 氏⁽²⁸⁾分别就病毒致细胞形态学上的改变种类及细胞的退变程度作了分类综述。在目前看来这样的分类是不够全面的，已有实验报导的病毒致细胞病变作用可以归纳如下：



在实验开始时（1955年9月）我们曾企图利用分散的鸡胚腿肌细胞来培养流乙脑炎病毒，并想利用观察培养物的 pH 改变及测量培养物中核糖量的变化来证明病毒的生长繁殖。因为组织块用作病毒组织培养是存在着一定缺点的；首先组织块的大小难以切得完全相同，而组织块内外层细胞所获得的营养料及 O₂ 量是不相同的⁽²⁹⁾；此外组织块的定量不易，需有特殊的装置⁽³⁰⁾，即使组织块定量后由于细胞间质的存在，其中细胞数仍不能相等，此种间质尚有吸附病毒的作用，可使病毒接触细胞的机会减少⁽³¹⁾，亦就是说将会减低组织培养的敏感性。当时文献上已有 HeLa 细胞培养流乙脑炎病毒的报告⁽²⁰⁾，但因国内还未获得该株细胞，就计划利用分散的鸡胚腿肌细胞来作病毒培养。由于考虑到

病毒如能在組織細胞中繁殖，則不論其毒力如何，至少亦得改變細胞的新陳代謝情況，因之企圖利用一種較簡便的方法—— PH 的改變差異，及一種較精細的方法——用各種化學方法測定培養物中核醣量的改變作為判別病毒生長繁殖的指標，后者在當時雖未見有文獻報告，但根據細胞及病毒主要組成成份是核醣的事實，準備作初步嘗試性的試驗。實驗採用 $1:400$ 胰蛋白酶消化雞胚腿肌皮塊以獲取細胞，應用約 $600-5600$ 萬細胞進行靜置、低低速振盪及高速振盪等三種培養方式，在培養過程中每天觀察培養基 PH 的改變（直接比色法），培養至一定時間取出細胞經洗滌後用化學方法測量核醣（曾用返測核醣磷及醣的方法⁽³²⁻³⁵⁾）。所得的結果常出乎意料之外，難以作出分析及解釋；當時主要的困難是培養在培養過程中指示劑有時會顯出異常的紅色，使不能用直接比色法測量 PH ；細胞經培養後用離心沉澱將其集中可以發現有量的增加，但測量核醣時不能獲得相應的結果；由於實驗計劃時間的限制不能作深入的試探研究，祇得暫時放棄對此實驗計劃的實施。現在已知的失敗原因有：獲取細胞時採用了較高速度的離心沉澱（ 4000 轉/分），所用的胰蛋白酶亦不合标准要求，這樣使細胞在操作過程中更易損傷及死亡；此外我們所用的測量核醣方法作為判別少量細胞改變可能還不夠敏感及準確。

在上述企圖失敗後實驗就改變至另一方向：利用雞胚組織塊來培養流乙腦炎病毒，並以觀察組織細胞破壞作為判別病毒生長繁殖的指標。實驗最初採用全雞胚組織作培養材料，由於偶然發現腿肌塊及心肌塊所長出的成纖維母細胞在形態上有所區別，前者多呈細長梭形（圖9），而后者多呈菱形（圖8）；考慮到不同細胞對病毒的反應可能不同，為了避免將來分析結果時可能發生混淆，決定採取一種組織進行培養，由於心肌較易切成一定大小的組織塊，於是就以心肌塊作為實驗材料。上面已經提過病毒致細胞病變作用可以分為多方面，其中檢查細胞功能改變的一部分方法已經初試失敗，利用細胞形態改變因受實驗的培養條件所限制不能進行高倍鏡檢，於是決定採用一種最簡便的識別標誌——觀察組織細胞生長的破壞來判別病毒的生長繁殖。

細胞的破壞並不一定由病毒所引起，已發現大便及血清等材料中可含毒性物質而使細胞發生非特異性的破壞現象，因之在作組織培養時必需同時加有對照培養物，並以中和試驗証實細胞破壞的特異性；在本實驗中對於對照培養物是予以應有的重視。

其它微生物亦可能使细胞发生破坏，例如 *Holland* 氏报导猪布魯氏菌及伤寒桿菌皆能使鸡胚成纤维母细胞破坏⁽³⁶⁾；在本实验中亦曾发现污染真菌的鸡胚心肌成纤维母细胞出现破坏现象（图10），不过这些非预期的细胞破坏现象是易于识别的（培养基成混濁，真菌的集落出现）。

鸡胚心肌块在培养初期可能会出现少量非特异性的细胞破坏（图11），但在培养过程中会逐渐消失（图12），此可能是组织块上带着的受损细胞在培养过程中逐渐恢复，亦可能是受损细胞死亡后脱落，而由新生细胞补充局部空位，这种非特异性破坏现象亦曾见於人羊膜细胞培养物中⁽³⁷⁾。在实验过程中发现有几批鸡胚心肌块培养物中於胞浆内出现不同程度的空胞状颗粒物（图13），这对本实验的结果判断尚无显著妨碍，但如要利用较精细的细胞病变作为判别标准就可能引起困难；为了推究其发生原因曾进行了一些实验分析，但还未能作出结论：

1. 不是正常鼠脑的作用——同一批鼠脑不能使不同批的鸡胚心肌皆发生病变。

2. 应用7—11天各种日龄的鸡胚心肌并未发现日龄与病变的发生有明显的关系。

3. 在文献中有人认为葡萄糖的缺乏可以引起胞浆中颗粒增加⁽³⁸⁾，但亦有相反的意见⁽³⁹⁾；亦有人报导在组成培养基的材料中可能有其它微生物的污染^(40,45)；但在本实验中由於同批的培养基不能使不同批的鸡胚心肌皆发生病变，因之培养基成分与病变发生的关系亦不明显；*Paff* 氏报告⁽⁴¹⁾ 当培养基偏酸时易使鸡胚心肌发生空胞性退变，不过在本实验中这种实验大多出现在培养的第二天，该时培养基的PH仍偏於碱性。

4. 所用的用具皆經仔細洗滌处理，因之与病变的发生估计不会有很大的关系。

5. 最值得懷疑的是可能所用鸡胚有微生物感染，因当发现此种病变现象数频繁时正值鸡胚孵育死亡率最高的时期；曾将出现上述病变的组织培养液进行小白鼠脑内及腹腔合併接种，未能观察到有任何症状发生；一般細菌学检查亦得阴性结果；但因未作深入的病原体检查，不能将隐性感染的可能性除外；最近 *Manaker* 氏报导 *Rous* 肉瘤病毒可以引起鸡胚细胞胞浆颗粒增加⁽⁴²⁾，是否鸡胚中可能含有该病毒或是其它原因尚有待於以后再发现该项病变时作深入广泛的研究才有可能加以阐明。

本实验应用低倍镜检，未能发现流乙脑炎病毒对鸡胚心肌成纤维母细胞有恒定的显著的破坏作用。虽在实验过程中曾发现5607株及中山株病毒偶而引起鸡胚心肌成纤维母细胞破坏，不过未能得到重复出现，难以作为可靠的阳性结果。影响病毒性质细胞病变的因素是相当复杂的⁽⁴⁰⁾，而它们的作用又可以相互交叉地发生；因之单就本实验结果还不能否定所有脑炎病毒皆不会对鸡胚发生恒定的致病作用。

在本实验中对某些影响病毒性质细胞病变的因素已予注意。

考虑到病毒株间的生物性差异，因而选择了三株病毒（二株是长期在实验室中保存的，一株是新分离的）来进行实验，但这是很不够的。对病毒量的影响因素已给予相当多的重视：采用不同浓度的病毒液进行接种；将病毒先在悬液培养中经不同时间的培养，使其有适量的增加；在培养过程中换取培养基时运用重复感染及一次感染二种实验方式；为了减少可能发生的自杀干扰现象在换取培养基时先将组织块洗涤以除去些可能黏附在表面的死病毒。对於环境的影响因素在实验中亦有所注意：在文献上提到培养方式可以影响病毒的致细胞病变作用⁽²⁷⁾，因之在本实验中使病毒先后地经过悬液培养及反转培养；且为了考虑到培养时间⁽¹⁾及培养温度⁽²⁷⁾对病毒性质细胞病变的影响，实验采用了不同时间的悬液培养，同时将培养物置於对脑炎病毒繁殖最适宜的湿度中（ 35°C ）。不过这些注意未能使我们获得阳性的致细胞病变作用。

本实验中所用的培养基内血清种类还值得考虑：在动物组织的组织培养中大多採用馬血清作为培养基组成成份之一，由於我国馬匹对流乙脑炎隐性感染很普遍⁽⁴³⁾，本实验中为了避免馬血清中可能含有流乙脑炎病毒抗体而影响实验结果，因之没有採用馬血清。Harrison氏在培养聖路易士脑炎病毒於鸡胚组织块时，所用培养基中含有正常兔血清⁽⁴⁴⁾，因在实验中取用兔血较为方便，就决定在培养基中加用兔血清；不过家兔对流乙脑炎病毒是不敏感的，应用此种动物血清是否会影响细胞病变出现是值得注意的问题，因之可以考虑应用不含抗体的馬血清来进行实验研究。

如要进一步来探究流乙脑炎病毒的致细胞病变作用，在目前可以考虑到下面几个方向：按黄氏最近报导^(45,46)，各株流乙脑炎病毒的毒力可有较大的区别；而McCollum氏⁽²²⁾的工作亦证明了不同流乙脑炎病毒株具有不同的致细胞病变作用；因之可以採

取更多株的病毒，尤其是選擇毒力最強的病毒株來繼續進行試驗。
較廣泛的試驗流乙腦炎病毒對各種細胞的作用亦是一個試驗方向；McCollum氏(22)已報導流乙腦炎病毒能引起 Detroit-6 細胞發生破壞，該細胞是一種人體癌性骨髓細胞，在目前國內尚未獲得該株細胞時值得試用易於獲得的小白鼠腹水瘤細胞及正常骨髓細胞來進行組織培養。最近 Imam 氏等報導付腎皮質素能顯著提高小鼠對流乙腦炎病毒的感受性(49)，在脊髓灰白質炎病毒的組織培養中已發現該劑可以加速細胞病變的出現(48)，因之亦可將此劑試用於流乙腦炎病毒組織培養以觀察是否具有相似的效果。

六. 總 結

1. 雞胚心肌塊經三株流乙腦炎病毒(京Ⅱ研42株、5607株及中山株)以各種方式(不同的病毒濃度、不同的接觸時間、不同的懸浮培養時間、不同的感染次數)感染後，在移種於旋轉培養中，連續三天應用60倍擴大鏡檢，不能發現有顯著的細胞破壞現象。

2. 討論了在實驗中所遇到的非預期的細胞病變現象。提出在實驗中已注意到的影響病毒性細胞病變的因素；並指出一些繼續進行探究流乙腦炎病毒致細胞病變作用的方向。