doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.09.002

严重发热伴血小板减少综合征病毒培养以及病毒滴度检测方法的建立 *

胡南南[1] 鲍倡俊[2] 金 柯[1] 胡建利[2] 刘 源[1] 岳 明[1] 颜莹莹[1] 韩亚萍[1] 李 军[1△]

（1 南京医科大学第一附属医院感染病科 江苏 南京 210029；
2 江苏省疾病预防与控制中心急性传染病防控所 江苏 南京 210029）

摘要 目的：建立严重发热伴血小板综合征病毒(SFTSV)培养和病毒滴度检测的方法，为其致病机制研究奠定基础。**方法：**选取生长良好的 Vero 细胞铺六孔板接种 SFTSV，每隔 24 h 收集培养病毒上清检测 SFTSV 病毒复制拷贝数，从而选取最佳时间点收获病毒液并用浓缩离心管浓缩病毒液，保存备用。将 SFTSV 病毒液进行 10 倍比稀释，每梯度 200 μL 接种生长良好的单层 Vero 细胞，用 3 mL 高压灭菌的甲基纤维素 -DMEM 覆盖物覆盖每孔 Vero 细胞，约 9 d 后温和去除甲基纤维素 -DMEM 覆盖物，经预冷的 4 %甲醛固定细胞后，用结晶紫染色，PBS 洗脱 3 次，计算空斑数。**结果：**根据病毒繁殖生长情况，病毒在第 4 d 后达复制高峰并随后进入平台期，第 8 天病毒复制开始下降。参照甲基纤维素 - 结晶紫空斑法实验结果，病毒滴度为 6× 10^6 PFU/mL。**结论：**SFTSV 病毒培养以及滴度检测方法成功建立，选取 4 天后收获病毒上清最佳，甲基纤维素 - 结晶紫空斑法形成的空斑清晰可数。

关键词：严重发热伴血小板减少综合征病毒；非洲绿猴肾细胞；空斑试验；病毒滴度检测

中图分类号：R-33；R511；R446 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2018)09-1607-04

Development of Methods for Culture and Titer Determination of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus*

HU Nan-nan[1], BAO Chang-jun[2], JIN Ke[1], HU Jian-li[2], LIU Yuan[1], YUE Ming[1], YAN Ying-ying[1], HAN Ya-ping[1], LI Jun[1△]

(1 Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China; 2 Acute infectious disease prevention department, Centre for Disease Control and Prevention in Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To develop methods for culture and titer determination of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) and provide basis for the pathogenesis research. **Methods:** SFTSV was cultured in well-grown Vero cells plated in six well plate. Culture supernatant was collected to test copies of viral genomes every 24 h and the optimal harvest time was selected. Virus was condensed with Millipore centrifuge tube and conserved for next use. A series of 10-fold dilutions of virus were added into well-grown Vero cells with 200 μL every well. Vero cells were overlaid with 3 mL autoclaved methylcellulose-DMEM covering every well, the covering was removed gently by PBS after 9 days. Then, the Vero cells were fixed with 4 % pre-cooling formaldehyde and stained with crystal violet. After washing three times by PBS, the plaques were counted. **Results:** During the process of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus culture, virus reached the peak of replication at 4th day and then enter the plateau. Finally, replication of virus started to declined from 8th day. According to plaque assay, the viral titer was 6× 10^6 PFU/mL. **Conclusion:** A successive method to culture SFTSV and detect virus titer was developed. Culture supernatant was harvested at 4th days post-inoculated. Plaques were clearly visible by methylcellulose plaque assay.

Key words: SFTSV; Vero; Plaque assay; Virus titer detection

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R511; R446 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)09-1607-04

前言

严重发热伴血小板减少综合征(Severe fever with thrombocytopenia syndrome，SFTS)是一种新发传染病，其主要临床表现为高热、血小板减少、白细胞减少以及胃肠道症状，严重者可发生多器官功能衰竭甚至死亡。目前，此病广泛分布于我国 20 个省份，在日本、韩国亦有报道，我国平均病死率达 7.8 %。临床上，该病缺乏有效的治疗药物及疫苗。SFTS 的病原体是严重发热伴血小板减少综合征病毒(Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus，SFTSV)，属于布尼亚病毒科白蛉病毒属[1-4]，通过非洲绿猴肾细胞(Vero)和犬巨噬细胞(DH82)体外培养分离进一步确认证实[4]。既往研究显示此病毒感染人体之后会引起免疫状态的改变，病毒载量和细胞因子风暴与病人的临床预后相关[5-9]，但具体机制尚不清楚。本研究通过 Vero 细胞进行病毒的培养以及空斑实验测定病毒滴度，旨在为下一步致病机制的探索奠定一定的基础。

* 基金项目：国家重大科技专项（2017ZX10203202-002-005）；科技部艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项（2017ZX10202201-003-009）
作者简介：胡南南，女，硕士研究生，研究方向：严重发热伴血小板减少综合征，E-mail: hnnnjmu@126.com
△ 通讯作者：李军，女，主任医师，博士生导师，感染科科主任，研究方向：严重发热伴血小板减少综合征，E-mail: dr-lijun@vip.sina.com
（收稿日期：2018-01-18 接受日期：2018-02-10）

1 材料与方法

1.1 材料

SFTSV JS14 株由江苏省疾病预防控制中心提供，非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 为本实验室保存。胎牛血清(Biological Industries 公司)，DMEM 基础培养基(美国 GIBCO 公司)，甲醛、甲基纤维素(Sigma 公司)，结晶紫(碧云天公司)，布尼亚核酸定量检测试剂盒 (中山达安公司)，7500 型 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)，CO_2 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司)，倒置显微镜(日本 NIKON)，15 mL 超滤离心管(美国 Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取 Vero 细胞，按常规方法在 T25 方瓶中传代，胰酶消化 3-5 min，完全培养基终止消化。培养基为含 10 % 胎牛血清、1 %青 - 链霉素的 DMEM 培养基，放置于 37 ℃、5 % CO_2 细胞培养箱进行培养。

1.2.2 病毒培养 病毒接种前一天，用 Vero 细胞铺六孔板，待细胞密度达 70 %~80 %，吸弃培养基，用 PBS 洗 2 次，加入 1 ml 细胞维持液 (含 2 %胎牛血清和 1 %青 - 链霉素) 稀释的病毒，置于培养箱中孵育 2 h，其间每隔 30 min 轻晃六孔板促进病毒吸附。病毒吸附完成后，吸弃病毒液，用 PBS 洗 3 次，加入 4 mL 细胞维持液，继续置于培养箱，每隔 24 h 收集 200 μL 上清置于 -80℃保存，持续收集 9 d，待测病毒拷贝数，操作步骤严格参照中山达安布尼亚核酸定量检测试剂盒说明书。

1.2.3 空斑试验 Vero 细胞接种病毒培养 4 d 后，将 Vero 细胞与上清反复冻融 3 次后离心去底部沉淀，取上清用 Millipore 离心管，4000× g、30 min 离心浓缩后病毒液分装，-80 ℃保存。将生长良好的 Vero 细胞铺 6 孔板，待细胞长成致密单层时，取 100 μL 收获的病毒液，用维持液进行 10 倍比稀释，每梯度吸取 200 μL病毒液，用 DMEM 维持液稀释后接种于 Vero 细胞，同时设置空白对照。放置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱孵育 2 h，期间每隔 30 min 晃动培养板促进病毒进入细胞，2 h 后吸弃病毒液，用 PBS 洗 3 次，然后每孔加入 3 mL 甲基纤维素 -DMEM 覆盖物(含 1 %甲基纤维素，2 %胎牛血清)，继续置于培养箱，每日观察细胞病变情况，约 9 d 后用预热的 PBS 冲洗，去除甲基纤维素 -DMEM 覆盖物，用预冷的 4 %多聚甲醛固定细胞 10 min，PBS 洗 2 次，加入结晶紫染色液染色 5 min，用 PBS 洗 2 次，室温干燥，计算空斑数。

2 结果

2.1 病毒增殖情况

Vero 细胞感染病毒后，每隔 24 h 收集上清检测病毒拷贝数，结果可见第 4 d 后达复制高峰并进入平台期，第 8 d 开始病毒复制下降(图 1)，镜下未见明显的细胞病变。

2.2 空斑试验

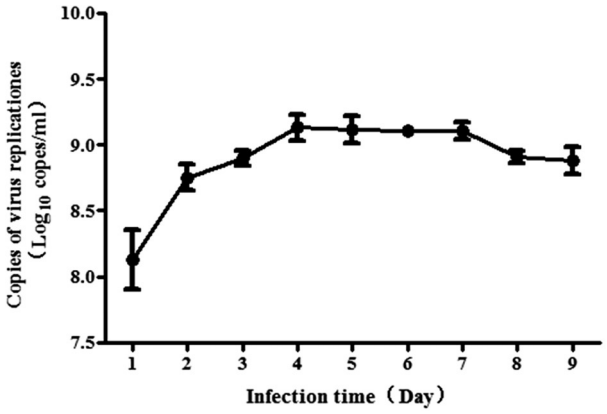

图 1 病毒增殖曲线

Fig.1 Proliferation curve of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

Vero 细胞接种 10 倍比稀释病毒液 9 d 后，去除甲基纤维素 -DMEM 覆盖物，用结晶紫染色可见空斑(图 2)以及镜下细胞图(图 3)。病毒滴度为 6× 10^6 PFU/ml。未发生细胞病变的区域，被结晶紫染紫色；发生细胞病变处，不能被结晶紫染色，呈现为无色空斑(图 2 b)。肉眼可见：空斑类圆形，直径 1~3 mm，边缘不甚规则，六孔板内散在分布，空斑较多时可以邻近空斑形成融合现象(图 2 a)。显微镜下可见形成空斑处细胞脱落，而未形成空斑处，细胞存留(图 3)。

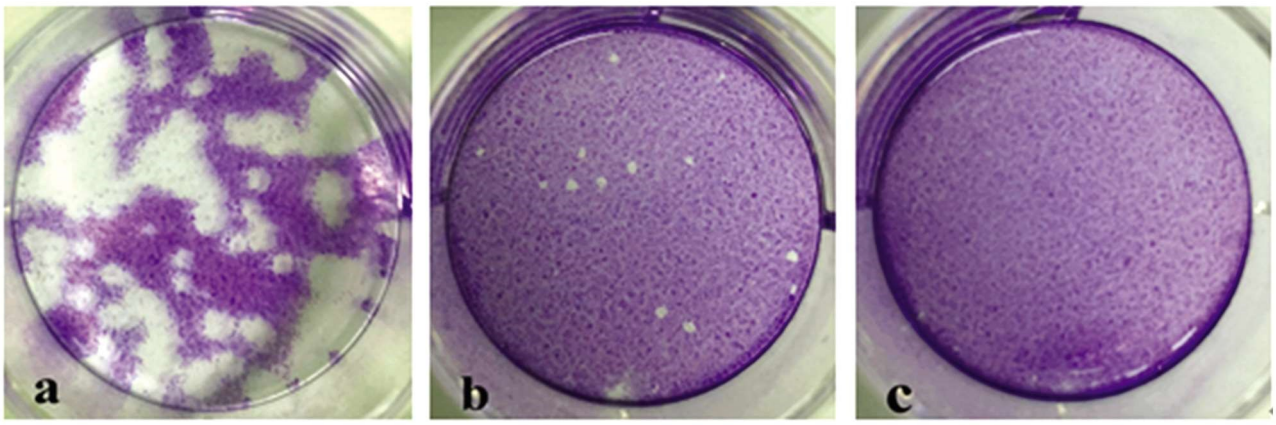

图 2 细胞空斑(a)SFTSV 感染 Vero 细胞，病毒浓度为 10^{-4} 的空斑；(b)SFTSV 感染 Vero 细胞，病毒浓度为 10^{-5} 的空斑；(c)未感染病毒的 Vero 细胞

Fig.2 Cell plaques. (a) SFTSV infected Vero cells with a virus concentration of 10^{-4}; (b) SFTSV infected Vero cells with a virus concentration of 10^{-5} plaque; (c) Uninfected Vero cells

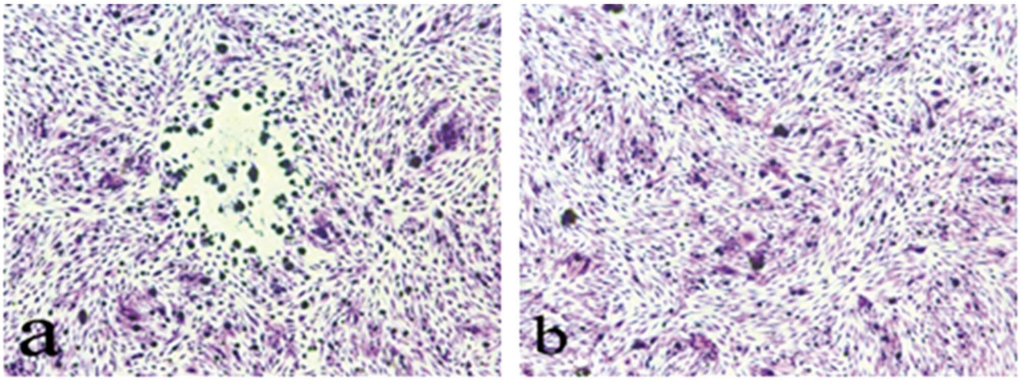

图 3 (a)镜下空斑形成处;(b)镜下正常细胞图

Fig.3 (a) The plaque under the microscope; (b) Vero cells under the microscope

3 讨论

SFTSV 于 2009 年第一次被分离,2010 年被确认为一种新病毒并且被正式命名。人感染该病毒后无特异性临床表现,少数人可死于多器官功能衰竭,但具体致病机制尚不明确[1]。迄今为止,关于 SFTSV 的致病机制研究主要集中在两个方面:一是固有免疫的削弱,二是细胞因子风暴介导的免疫激活。Sun 等和 Peng 等[9,10]研究显示 SFTS 患者细胞因子 TNF-α、IL-6、IL-10 等升高,IFN-γ 水平降低;韩等[11]研究亦发现 SFTSV 感染后的疾病严重程度和预后与病毒载量以及 IL-6、IL-10 等细胞因子水平有关,死亡患者 " 细胞因子风暴 " 更为复杂,病毒如何引起人体免疫系统受损,又如何引起 " 细胞因子风暴 " 将有待进一步的探讨。因此,完善 SFTSV 培养及准确定量的方法将有助于开展 SFTS 致病机制、治疗以及疫苗等研究。

SFTSV 具有广泛的细胞嗜性,可感染肝、肺、肾等多器官细胞以及部分免疫系统来源的细胞系 [12],杜燕华等证实 Vero 细胞适合分离培养 SFTSV [13],故本研究选取 Vero 细胞接种 SFTSV。接种后 4 天内,病毒对数增殖,根据病毒生长曲线,可选择病毒复制高峰 4 d 后收获病毒液,这一研究结果和既往研究结果相似 [12,14]。空斑试验是测定病毒滴度的经典方法,比 TCID50 法更具有说服力。每个空班代表单个具有感染力的病毒颗粒繁殖,被破坏的死细胞不能染色而出现白斑。理论上一个空斑代表一个具有感染力的活病毒,其可以精确测定病毒感染单位量同时还可以检测活病毒感染能力[15-17]。传统空斑实验是琼脂糖 - 中性红法,但此法琼脂糖对温度要求高,倒置培养皿会增加液体外漏的安全风险且中性红易褪色保存时间较短,故要选取一个合适的方法避免上述局限性。既往研究显示汉坦病毒、肠道病毒 EV71、RSV、SARS-CoV 以及 MERS-CoV 等[18-26]均可有空斑现象,并且甲基纤维素 - 结晶紫法优于琼脂糖 - 中性红法,但国内外未见甲基纤维素 - 结晶紫空斑法用于 SFTSV 的报道,也未见 SFTSV 琼脂糖 - 中性红空斑法和甲基纤维素 - 结晶紫空斑法两者之间优劣比较。本研究发现 SFTSV 甲基纤维素 - 结晶紫空斑法形成的正常细胞着紫色的背景下,病变处不着色的类圆形空白斑,直径 1~3 mm,清晰可数,为 SFTSV 病毒滴度检测提供了一种新的方法。此方法操作简单、经济方便,能精确计算病毒感染单位量用于基础研究,且实验结果亦可长期保存。另外,空斑实验过程中要注意选取细胞代数小、状态好的细胞铺板;吸弃病毒液过程迅速,避免细胞干掉脱落影响空斑结果。最近文献报道琼脂糖 - 中性红法对 SFTSV p50 株进行病毒滴度检测[27],形成的空斑略有融合,但由于与本实验所选病毒株有所差异,故无法进行客观比较,本研究亦未使用琼脂糖 - 中性红法对 SFTSV 进行病毒滴度检测,无法比较两种空斑试验法的优劣,在以后的研究中会进一步完善。

综上所述,本研究成功运用 Vero 细胞培养严重发热伴血小板减少综合征病毒并且完成甲基纤维素－结晶紫法对病毒滴度的检测,建立了测定 SFTSV 病毒滴度的新方法,为后续进一步研究 SFTSV 相关致病机制等奠定了一定的基础。

参 考 文 献(References)

[1] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. N Engl J Med, 2011, 364 (16): 1523-1532

[2] Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan[J]. J Infect Dis, 2014, 209(6): 816-827

[3] Kim KH, Yi J, Kim G, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19 (11): 1892-1894

[4] 李德新.发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒概述[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(2): 81-84
Li De-xin. Fever with thrombocytopenia associated with a Novel Bunyavirus in China[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2011, 25(2): 81-84

[5] Xu W, Li XK, Lu QB, et al. Association between peripheral γδ T cell subsets and disease progression of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection[J]. Pathog Dis, 2017, 75(7)

[6] Liu J, Wang L, Feng Z, et al. Dynamic changes of laboratory parameters and peripheral blood lymphocyte subsets in severe fever with thrombocytopenia syndrome patients [J]. Int J Infect Dis, 2017, 58: 45-51

[7] Sun LP, Hu YJ, Niyonsaba A, et al. Detection an devaluation of immunofunction of patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. Clin Exp Med, 2014, 14(4): 389-395

[8] Liu MM, Lei XY, Yu H, et al. Correlation of cytokine level with the severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. Virol J, 2017, 14(1): 6

[9] Sun Y, Jin C, Zhan F, et al. Host cytokine storm is associated with dis-

ease severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. J Infect Dis, 2012, 206(7): 1085-1094

[10] Peng C, Wang H, Zhang W, et a1. Decreased monocyte subsets and TLR4-mediated functions in patients with acute severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) [J]. Int J Infect Dis, 2016, 43: 37-42

[11] 韩亚萍,董莉,孔练花,等.病毒载量和细胞因子在发热伴血小板减少综合征致病机制中的作用 [J]. 中华传染病杂志, 2014, (9): 538-544
Han Ya-ping, Dong Li, Kong Lian-hua, et al. Viral load and cytokines in the pathogenesis of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2014, (9): 538-544

[12] 何程程,李阿茜,刘林,等.发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒细胞嗜性研究[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(1): 10-13
He Cheng-cheng, Li A-qian, Liu Lin, et al. The susceptibility of culture cells to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2014, 28(1): 10-13

[13] 杜燕华,黄学勇,邓文斌,等.新布尼亚病毒在非洲绿猴肾细胞中的培养与分离鉴定[J].中华预防医学杂志, 2012, 46(2): 169-172
Du Yan-hua, Huang Xue-yong, Deng Wen-bin, et al. Culture, isolation and identification of new bunyavirus in African green monkey kidney (Vero) cells[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2012, 46(2): 169-172

[14] Xu Chen, Haiyan Ye, Shilin Li, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus inhibits exogenous Type I IFN signaling pathway through its NSs in vitro[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0172744

[15] Lu X, Wang L, Bai D, et al. Establishment of national reference for bunyavirus nucleic acid detection kits for diagnosis of SFTS virus[J]. Virol J, 2017, 14(1): 32

[16] Chaudhary V, Zhang S, Yuen KS, et al. Suppression of type I and type III IFN signalling by NSs protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus through inhibition of STAT1 phosphorylation and activation[J]. J Gen Virol, 2015, 96(11): 3204-3211

[17] Jiao Y, Zeng X, Guo X, et al. Preparation and evaluation of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for detection of total antibodies in human and animal sera by double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 372-377

[18] Rang A, Heider H, Ulrich R, et a1. A novel method for cloning of non-cytolytic viruses[J]. J Virol Methods, 2006, 135(1): 26-31

[19] Handke W, Oelschlegel R, Franke R, et a1. Hantaan virus triggers TLR3-dependent innate immune responses [J]. J Immunol, 2009, 182 (5): 2849-2858

[20] Yu HT, Jiang H, Zhang Y, Nan XP, et a1. Hantaan virus triggers TLR4-dependent innate immune responses [J]. Viral Immunol, 2012, 25(5): 387-393

[21] Huang HI, Chio CC, Lin JY, et al. Inhibition of EV71 by curcumin in intestinal epithelial cells[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191617

[22] Schiavoni I, Scagnolari C, Horenstein AL, et al. CD38 modulates respiratory syncytial virus-driven proinflammatory processes in human monocyte-derived dendritic cells[J]. Immunology, 2017

[23] Wong HH, Fung TS, Fang S, et al. Accessory proteins 8b and 8ab of severe acute respiratory syndrome coronavirus suppress the interferon signaling pathway by mediating ubiquitin-dependent rapid degradation of interferon regulatory factor 3[J]. Virology, 2017, 515: 165-175

[24] 蒋虹,乔红伟,丛喆,等.SARS-CoV 细胞空斑试验[J].中国比较医学杂志, 2009, 19(8): 65-66
Jiang Hong, Qiao Hong-wei, Cong Zhe, et al. Plaque Assay in SARS-CoV Titration [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2009, 19 (8): 65-66

[25] De Wilde AH, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, et al. Coronaviruses and arteriviruses display striking differences in their cyclophilin A-dependence during replication in cell culture[J]. Virology, 2017

[26] De Wilde AH, Raj VS, Oudshoorn D, et al. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-α treatment [J]. J Gen Virol, 2013, 94 (Pt 8): 1749-1760

[27] Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, et al. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells[J]. J Virol Methods, 2017, 244: 4-10

(上接第 1636 页)

[47] Roy-Carson S, Natukunda K, Chou HC et al. Defining the transcriptomic landscape of the developing enteric nervous system and its cellular environment[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 290-293

[48] Goforth PB, Myers MG Jr. Roles for Orexin/Hypocretin in the Control of Energy Balance and Metabolism[J]. Curr Top Behav Neurosci, 2016, 17(3): 134-138

[49] Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD, et al. Glutamatergic enteric neurons[J]. J Neurosci, 1997, 17(12): 4764-4784

[50] Gasic G. Systems and molecular genetic approaches converge to tackle learning and memory[J]. Neuron, 1995, 15(3): 507-512

[51] Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, et al. Neuropeptide Y, and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats [J]. Endocrinology, 1984, 115(1): 427-429

[52] Liu M-T, Seino S, Kirchgessner AL. Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system [J]. J Neurosci, 1999, 19(23): 10305-10317