

H3N2 流感病毒冷适应株的无血清培养

郭 琦 耿兴良 龙云凤 杨 帆 宋绍辉 刘 婧 戴宗祥 姜述德 廖国阳

摘 要 **目的** 探索无血清培养 H3N2 流感病毒冷适应株的适宜条件。**方法** 以无血清适应的 Vero 细胞为介质,对流感病毒冷适应株(H3N2)的培养条件进行优化,以得到较优的基础培养基、pH 值、TPCK 胰酶添加量及其补加时间、病毒接种量和病毒收获时间。**结果** H3N2 流感病毒冷适应株能够感染无血清适应的 Vero 细胞;经过优化,病毒培养液适宜 pH 为 7.15~7.64,BSA 和 TPCK 胰酶添加量均为 0.8~1.2 μg/ml,细胞培养 36h 接种病毒,接种量 MOI 为 0.05~0.10,于 25℃ 培养 168h 收获时病毒效价达最高。**结论** 优化了 H3N2 流感病毒冷适应株无血清培养的适宜条件。

关键词 无血清培养 流感病毒冷适应株 Vero 细胞

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.008

Cultivation of Cold-adapted Influenza Virus Strain H3N2 with Serum-free Medium. Guo Qi, Geng Xingliang, Long Yunfeng, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To explore a better serum-free culture condition for cold-adapted influenza virus strain H3N2. **Methods** By using serum-free adapted Vero cells as medium, we optimized the culture condition of cold-adapted influenza virus H3N2 including appropriate basal medium, pH values, supplementary volume and time of TPCK-treated trypsin, inoculum and harvest time of virus. **Results** The cold-adapted influenza virus strain H3N2 can infect the serum-free cultured Vero cells. Through the experiments we found the optimum pH value of virus culture solution was 7.15~7.64 and supplementary final concentration of BSA and TPCK-treated trypsin was 0.8~1.2 μg/ml respectively. If the virus inoculate in Vero cells which have been cultivated for 36h with 0.05~0.10 MOI and been cultured for 168h at 25℃, the virus will achieve the highest titer. **Conclusion** The culture conditions of the cold-adapted influenza virus strain H3N2 in serum-free media has been optimized.

Key words Serum-free medium; Cold-adapted influenza virus; Vero cells

流感病毒是威胁人类健康的主要病原体之一。目前对于流感病毒的主要有效预防方法依然是接种流感疫苗^[1]。流感减毒活疫苗能够以与自然状态下机体感染流感野毒株相同的机制引起机体产生长效的细胞免疫和体液免疫,使机体获得交叉免疫保护的同时不会产生较明显的感染症状^[1~3]。鉴于鸡胚生产流感病毒疫苗存在很多不足之处,WHO 推荐使用 Vero 细胞作为流感疫苗的生产介质^[4~8]。Vero 细胞培养流感病毒时,需要添加 TPCK-胰酶裂解 HA0 后病毒才能感染细胞。Vero 细胞培养使用的血清所含的类淀粉蛋白 P,是甲型流感病毒表面唾液酰化糖蛋白的抑制剂,可通过影响 TPCK 活性进而影响病毒的

产量,同时血清作为培养基因组分也存在较多弊端^[6,9~12]。而无血清培养,既可戒除血清对流感病毒产量的影响,又能使后期工艺纯化不受血清中复杂组分的左右^[10,11,13]。故本实验对无血清条件下培养 H3N2 流感病毒冷适应株的适宜条件进行了探索。

材料与方法

1. 材料:无血清培养的 Vero 细胞(SFM-Vero)第 140 代,甲型流感病毒冷适应株 A/Yunnan/1/2005 Vca(H3N2),均由中国医学科学院医学生物学研究所生物制品五室保存。TPCK-胰酶(Worthington 公司);BSA(北京鼎国生物公司);DMEM/F12 和 RPMI-1640 培养基(美国 Thermo 公司);MEM 基础培养基由医学生物学研究所溶液组配制;带 FITC 标记的兔抗山羊绿色荧光抗体(BD 公司)。BeckmanG25 离心机(Beckman 公司);细胞培养瓶、血凝板(Nunc 公司);细胞培养箱(宾德公司);H-7650 透射式电子显微镜(日立公司)。

2. 实验方法:(1)冷适应株 H3N2 对无血清 Vero 细胞的感染性检测:使用 SFM-Vero 细胞铺至细胞爬片。培养 24h 后接种病毒,设立阴性对照孔。先后加多聚甲醛溶液、

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2012AA02A404);国家科技部国际科技合作项目(2011DFR30420)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者:廖国阳,研究员,电子信箱:liaogy@imbcams.com.cn

Triton-100、甲醇及 BSA 溶液。加羊抗 H3N2 血清及 FITC 标记兔抗羊抗体孵育后封片观察。(2) 无血清培养流感病毒冷适应株 H3N2 的条件优化:①接种病毒胞龄的选择:使用 MTT 法在波长 490nm 处测定吸光度值(A),按照均数±标准差($\bar{x} \pm s$)求出区间,剔除不在此区间的 A_{490} 值,求得平均值后,绘制细胞生长曲线,根据曲线选取不同点接种病毒,确定适合流感病毒冷适应株增殖的适宜细胞胞龄^[10];②基础培养基的选择:分别以 DMEM/F12、1640、MEM: DMEM/F12(1:1) 的混合液、MEM 为基础培养基培养病毒,每个条件做 4 个平行, (25.0±0.5)℃ 培养相同时间后收获病毒液,测定其血凝效价^[14];③pH 值对流感病毒产量的影响:使用 DMEM/F12 配制病毒培养液,调整病毒培养液 pH 分别为 6.89、7.15、7.37、7.64、7.84、7.97 培养 H3N2 流感病毒相同时间后测定血凝效价;④BSA-TPCK 胰酶添加量对流感病毒产量的影响:以组合的方式向病毒培养液中添加不同含量的 BSA 和 TPCK 胰酶,培养相同时间后收获病毒并测定血凝效价;⑤病毒培养过程中 TPCK 胰酶补加时间及补加量的优化:分别在病毒培养的 24、48、72、96h 补加 TPCK 胰酶,每次均按照 0.3、0.6、1.0、1.3μg/ml 的终浓度分别进行补加,培养相同时间后测定病毒血凝效价;⑥病毒接种量对其产量的影响:在之前优化的条件下,分别按照 MOI 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 的量接种流感病毒,培养相同时间后测定血凝效价,确定适宜接种量;⑦病毒收获时间的确定:按优化出来的条件培养病毒,每隔 12h 进行取样,测定病毒的血凝效价,绘制病毒大致的增殖曲线,并依此来进一步优化病毒的收获时间;⑧病毒完整性检测:使用电子显微镜对无血清培养的 H3N2 流感病毒冷适应株进行形态观察,并与 10% 血清培养的病毒形态进行对比。

结 果

1. 病毒侵染性实验:免疫荧光实验显示,被流感病毒感染的细胞呈现出绿色荧光,阴性对照基本不显示荧光。说明 H3N2 流感病毒冷适应株可以在无血清培养基培养的 Vero 细胞中增殖(图 1)。

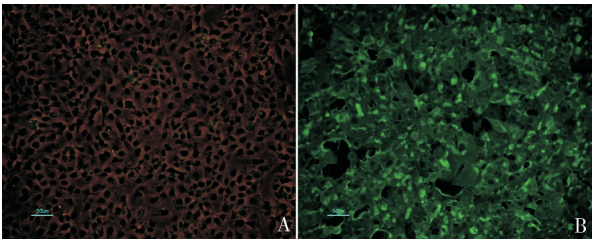


图 1 冷适应株 H3N2 流感病毒在 SFM-Vero 细胞上的免疫荧光(×100)

A. 荧光显微镜下 SFM-Vero 细胞阴性对照;B. 荧光显微镜下接种冷适应株 H3N2 流感病毒的 SFM-Vero 细胞

2. H3N2 流感病毒冷适应株培养条件的优化:
(1) 细胞胞龄的选择:依据生长曲线,分别在细胞培养

测定病毒血凝效价^[11]。结果显示胞龄为 36h 接种培养出来的病毒效价最高,为 1:256。(表 1)。(2) 基础培养基的选择:以 DMEM/F12 为基础培养基培养病毒时,病毒效价为 1:240 均比其他培养基高,确定 DMEM/F12 为基础培养基(表 2)。(3) 病毒培养液 pH 值的确定:本实验表明,当培养液的 pH 值呈现弱碱性即 pH 值为 7.15~7.64 时,培养出的病毒血凝效价最高为 1:240(表 3)。(4) BSA 和 TPCK 胰酶添加量对流感病毒产量的影响:通过测定病毒收获液的血凝效价后发现,BSA 和 TPCK 胰酶添加的终浓度均在 0.8~1.2μg/ml,可达到 1:224(表 4)。(5) TPCK 胰酶补加量和补加时间对流感病毒产量的影响:病毒培养 96h 后按照 1μg/ml 终浓度补加 TPCK 胰酶,病毒效价最高为 1:256,测定血凝效价结果(表 5)。(6) 接种量对病毒产量的影响:培养条件得到初步的优化以后,病毒的接种量也是影响病毒产量的一个重要因素。从培养结果看,流感病毒接种量在 0.05~0.10MOI 时,病毒效价最高可达 1:256 且稳定。(7) 病毒收获时间的确定:绘制出病毒大致的增殖曲线如图 3。确定病毒的收获时间为 168h,血凝效价最高,为 1:256。(8) 病毒完整性检测:如图 4 所示,无血清条件下培养出的流感病毒轮廓清晰,形态完整。与对照中 10% 血清培养的病毒相比,形态差异无统计学意义。

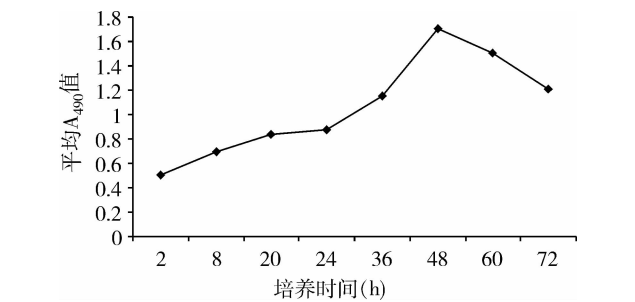


图 2 细胞生长曲线

表 1 不同胞龄的 SFM-Vero 细胞接种 H3N2 流感病毒后的平均血凝效价				
胞龄(h)	12	24	36	48
平均血凝效价(1:X)	48	224	256	128

表 2 不同基础培养基对病毒效价的影响				
培养基种类	PRMI-1640	MEM	DMEM/F12: MEM (1:1)	DMEM/F12
平均血凝效价(1:X)	120	144	176	240

表 3 不同 pH 值对病毒效价的影响

pH 值	6.68	6.89	7.15	7.37	7.64	7.84	7.97
平均血凝效价(1:X)	44	72	240	240	240	120	88

表 4 TPCK 胰酶和 BSA 添加量对病毒效价的影响

BSA 浓度 (μg/ml)	血凝效价(1:X)					
	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml
0	16	20	24	12	7	7
0.4	24	32	112	80	48	48
0.8	32	40	224	224	96	24
1.2	20	32	224	224	80	32
1.6	16	24	160	112	64	48

表 5 不同时间补加不同量的 TPCK 胰酶后的病毒效价

TPCK 胰酶补加 时间(h)	血凝效价(1:X)			
	0.3	0.6	1.0	1.3
24	16	16	14	10
48	12	12	16	14
72	96	128	128	128
96	192	224	256	224

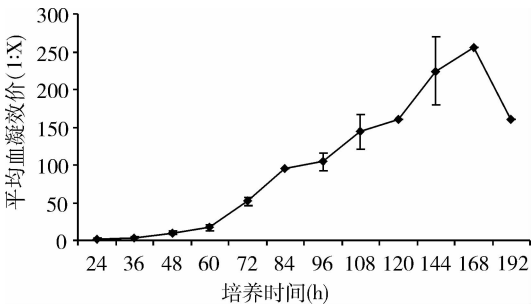


图 3 病毒增殖曲线

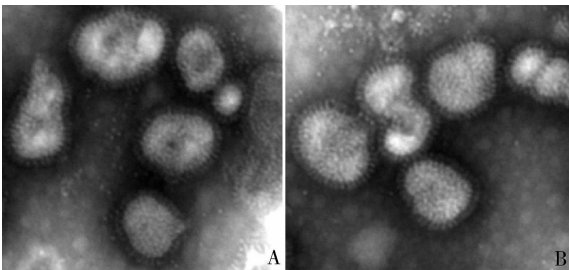


图 4 不同血清条件培养的 H3N2 流感病毒的形态(×15000)

A. 无血清培养的 H3N2 流感病毒;B. 10% 血清培养的 H3N2 流感病毒

讨 论

流感病毒减毒活疫苗能够引起机体持久而多样的免疫反应,为流感的预防提供了新思路^[15]。目前主要使用流感病毒冷适应株,温敏株或是复制缺陷株作为减毒活疫苗备选株^[16]。已上市的减毒活疫苗均

是以鸡胚为介质生产的,而使用细胞生产减毒活疫苗仍在研发中。Vero 细胞培养流感病毒时,需添加 TPCK 胰酶裂解流感病毒 HA0 蛋白,促进流感病毒吸附在细胞表面,使其能够有效增殖^[11]。常规细胞培养中残留的血清成分会影响 TPCK 胰酶的活性,从而影响流感病毒的产量。无血清细胞培养技术无疑是流感病毒减毒活疫苗制备的最佳选择,美国百特公司亦使用该技术培养流感病毒。本研究对 H3N2 流感病毒冷适应株的无血清培养条件进行优化。

免疫荧光实验显示 H3N2 流感病毒冷适应株对无血清培养的 Vero 细胞有感染性,为此对其无血清培养条件进行初步优化。细胞培养 36h 后接种病毒,所得病毒效价较高,此时细胞刚生长成致密的单层,且细胞活力高,对流感病毒敏感。培养时间短于 36h,细胞对 TPCK 胰酶的耐受力较低;超过 36h,由于胞龄过长,细胞对病毒的敏感度下降,最终均影响病毒产量。同时,实验优选出 DMEM/F12 为病毒培养的基础培养基。病毒培养液的 pH 值为 7.15 ~ 7.64 时既不影响细胞状态又不影响 TPCK 胰酶活性,较适合病毒增殖。此外 BSA 作为培养液中的重要成分可单独或与 TPCK 胰酶共同影响病毒产量。当 BSA 和 TPCK 胰酶的添加终浓度均为 0.8 ~ 1.2 μg/ml 时,病毒效价较高。培养过程中由于培养液 pH 值的变化,TPCK 胰酶的活性受到影响,病毒再次感染受限。病毒培养 96h 后补加终浓度为 1 μg/ml 的 TPCK 胰酶能得到较高效价的病毒。过早补加 TPCK 胰酶,会影响细胞生长状态。

除培养条件外,病毒接种量也是影响病毒产量的重要因素。病毒的接种量低,不能完全感染细胞;接种量太高,则会形成缺陷干扰颗粒(defective interfering particles, DIP),影响病毒正常感染^[11]。接种 0.05 ~ 0.10 MOI 的病毒,培养 168h 后收获病毒效价最高。病毒培养时间过短,病毒未完全从感染的细胞中释放,病毒产量较低;培养时间过长,病毒易降解。

综上所述,本研究在确认了 H3N2 流感病毒冷适应株在无血清适应的 Vero 细胞上的感染性后初步优化了其无血清培养的条件,为安全有效的流感减毒活疫苗的生产和研发提供了依据。

参考文献

- 1 Lanthier PA, Huston GE, Moquin A, *et al.* Live attenuated influenza vaccine (LAIV) impacts innate and adaptive immune responses[J]. Vaccine, 2011, 29(44): 7849 - 7856
- 2 Barrett PN, Portsmouth D, Ehrlich HJ. Vero cell culture - derived pandemic influenza vaccines: preclinical and clinical development

- [J]. Expert Review of Vaccines, 2013, 12(4): 395 - 413
- 3 Belshe R, Lee M - S, Walker RE, *et al.* Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine [J]. Expert Review of Vaccines, 2004, 3(6): 643 - 654
- 4 Murakami S, Horimoto T, Ito M, *et al.* Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion [J]. Journal of Virology, 2012, 86(3): 1405 - 1410
- 5 Tree JA, Richardson C, Fooks AR, *et al.* Comparison of large - scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains [J]. Vaccine, 2001, 19(25 - 26): 3444 - 3450
- 6 Hu AY, Tseng YF, Weng TC, *et al.* Production of inactivated influenza H5N1 vaccines from MDCK cells in serum - free medium [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14578
- 7 Kistner O, Barrett PN, Mundt W, *et al.* Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine [J]. Vaccine, 1998, 16(9 - 10): 960 - 968
- 8 Organization WH. Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: memorandum from a WHO meeting [J]. Bulletin of the World Health Organization (WHO), 1995, 73(4): 431 - 435
- 9 Job ER, Bottazzi B, Gilbertson B, *et al.* Serum amyloid P is a sialylated glycoprotein inhibitor of influenza A viruses [J]. PLoS one, 2013, 8(3): e59623
- 10 耿兴良, 戴宗祥, 段盼盼, 等. Vero 细胞培养流感病毒的低血清培养基的筛选 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(5): 687 - 690
- 11 刘铮, 孙明波, 高菁霞, 等. 低血清培养 Vero 细胞和流感病毒条件的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(6): 593 - 595
- 12 Butler M. Serum - free media: standardizing cell culture system [J]. Pharmaceutical Bioprocessing, 2013, 1(4): 315 - 318
- 13 田石华, 孙明波, 张新文, 等. 无血清微载体培养 Vero 细胞和 H1N1 流感病毒条件的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(6): 639 - 642
- 14 唐静, 马磊, 周芳烨, 等. 流感病毒快速诊断试剂中 HA 抗原热稳定性的研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(16): 8935 - 8936
- 15 Tlaxca JL, Ellis S, Remmele RL. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2014; 1 - 23
- 16 Zheng D, Yi YL, Chen Z. Development of live - attenuated influenza vaccines against outbreaks of H5N1 influenza [J]. Viruses, 2012, 4(12): 3589 - 3605 (收稿日期: 2015 - 01 - 19)
(修回日期: 2015 - 02 - 03)

柔性可延展能量收集装置的心脏表面缝合实验研究

张 巍 王龙飞 戎天华 陆炳卫 郑 军 冯 雪 马维国

摘 要 近年来,以纳米技术制造柔性可延能量收集装置(ultra - flexible energy harvester, UFEH)为能源的供应方法提供了新的思路。利用动物实验验证此类材料在生物体内的大范围应用需通过动物实验进行相容性验证。**方法** 通过小型猪动物实验,研究 UFEH 在生物体内的工作状态,通过家兔对比实验,验证长期佩戴时生物体内相容性。**结果** 于小型猪实验中,器件贴合良好,工作状态符合设计要求,贴合前后实验动物心功能相同,最高输出电压可达 3V。在家兔对照实验中,实验组家兔存活时间与对照组一致,各项生理指标正常,未出现意外死亡、瘫痪、心功能下降等。**结论** 压电设备于生物体内运行正常,对生物体组织伤害小,输出电压可达到商用级别;但仍需通过结合不同医用材料并对设备进行升级完善,可逐步完成生物体内长期植入目的。柔性可延展压电设备为体内收集机械能提供了新的思路与新的方法,符合我国自主创新的研究方向,为今后逐步实现能源清洁化,医用设备能源自给提供了可靠思路。

关键词 柔性可延展设备 生物发电 生物体相容性

中图分类号 R654.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.009

Ultra - Flexible Energy Harvester: in vivo Testing on Epicardium Zhang Wei, Wang Longfei, Rong Tianhua, *et al.* Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China

Abstract Objective Ultra - flexible energy harvester (UFEH) is a kind of new energy resources based on piezoelectric theory. The biocompatibility of these materials should be proved through experiment. **Methods** We validate the biocompatibility of piezoelectric

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11320101001)

作者单位:100029 北京市心肺血管疾病研究所、首都医科大学附属北京安贞医院(张巍、王龙飞、戎天华、陆炳卫、郑军、马维国);100083 清华大学工程力学系(冯雪)

通讯作者:马维国,硕士生导师,电子信箱:wgma@yahoo.com