

流行性乙型脑炎病毒皮下感染小白鼠后 脑组织中抑制物质的初步观察

毛江森 黃禎祥

(中国医学科学院病毒学系, 北京)

繼 Issacs & Lindenmann 二氏^[1]发现用灭活的流感病毒处理鸡胚绒毛尿囊膜能产生干扰素以来,已証明若干人类病毒在組織培养系統或动物亦能产生干扰素或类干扰素(病毒抑制物质)^[2,3,6,10]。其中包括大病毒(如牛痘病毒)和小病毒(如脊髓灰白质炎病毒);含 DNA 的病毒和含 RNA 的病毒。这说明病毒引起細胞产生这种抵抗感染发展的物质的性能是很普遍的。然而,关于流行性乙型脑炎病毒干扰素尚未見有报告。

干扰素在病毒感染的发展及恢复过程中的作用已引起人們极大的兴趣。Issacs & Hitchcock 二氏^[5]研究了流感干扰素在小白鼠感染流感病毒恢复过程中的作用。某些研究^[9]指出,組織培养細胞带病毒状态的建立可能与干扰素的存在有关。由于以往的研究多半是在組織培养系統进行,利用完整机体产生干扰素的研究較少,对于干扰素在完整机体产生的条件及其在保护性反应的意义方面,了解得还很不够。因此,利用动物进行干扰素产生情况的研究是十分重要的。本文报告流行性乙型脑炎病毒——小白鼠系統中病毒抑制物质产生的情况的初步观察結果。

黃禎祥等^[7]发现流行性乙型脑炎病毒存在有对小白鼠皮下感染致死力不同的毒株,在本实验中作者亦选用两株皮下感染致死力不同的毒株,进行了产生病毒抑制物质的比較观察,以探討皮下感染致死力的高低与其产生病毒抑制物质的关系。

一、材料与方 法

病毒 实验用的流行性乙型脑炎病毒为中山株和京卫研₁株,前者对3周龄小白鼠皮下感染的滴度为 $< 2.00 \log LD_{50}/0.03$ 毫升,后者为 $7.00 \log LD_{50}/0.03$ 毫升左右;在小白鼠脑内感染的滴度則均为 $8.33-8.66 \log LD_{50}/0.03$ 毫升。病毒稀释液为10%脱脂牛奶199溶液,每次均用新鮮鼠脑組織病毒悬液。攻击用的病毒为西方馬脑脊髓炎(简称 WEE)鸡胚适应株,每次用新鮮的由鸡胚单层細胞繁殖的病毒,稀释液为199溶液,其滴度約 $8.50 \log TCD_{50}/0.1$ 毫升。

小白鼠 为本院动物房繁殖的3周龄小白鼠。

細胞 鸡胚单层纖維母細胞,用10—11天胚龄的鸡胚制备,每毫升含 $5-10 \times 10^5$ 个細胞,約24小时生长成单层。

病毒抑制物质标本的制备 将流行性乙型脑炎病毒稀释成 10^{-2} (約 $10^{6.5} LD_{50}$),接种于小白鼠腹股沟皮下,每只0.03毫升;对照組的小白鼠則接种以相同剂量的199溶液。每隔24小时放血处死小白鼠,每一实验組至少5只,剖取脑組織,以199溶液研磨成20%悬液。經3000轉/分离心沉淀20分钟,上清液分为2份,1份供滴定病毒含量,1份进行透析^[4],即将悬液装入透析袋中,置 pH2 的 Hanks 溶

液中于 4℃ 过夜, 然后将 pH 调至 7.6, 再经 3000 转/分离心沉淀 20 分钟, 取上清液供测定病毒抑制物质用。

病毒抑制物质的测定 将上述标本按 1:1 浓度加入已长成单层的鸡胚纤维母细胞小管, 置 37℃ 培养 24 小时后, 吸去上述液体, 加入约 300TCD₅₀ 的 WEE 病毒, 置 37℃ 吸附 1 小时后, 用 Hanks 溶液洗 1 次, 再加入 1:1 浓度的标本液, 置 37℃ 培养, 在 20 小时内收获并立即在鸡胚单层细胞上滴定 WEE 病毒量。滴定时采用细胞病理变化 (CPE) 的方法, 将收获的病毒培养液按 10 倍稀释, 每一稀释度接种 4 支细胞管, 每管接种 1 毫升。置 37℃ 培养, 以 3 天后的结果为最终滴度, 按 Reed-Muench 公式计算 log TCD₅₀。

如表 1 所列, 以本实验方法将同一份标本在同时作多次滴定时, 滴度相差偶而可达 0.5 log TCD₅₀, 根据本实验室的经验, 在用蚀斑技术滴定时也有这种波动。因此在判断结果时必须考虑到这一因素。

表 1 用细胞病理变化滴定时病毒滴度的波动

实验	滴定数	滴 定 结 果										最大滴度差 (log TCD ₅₀)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	3	6.33*	6.00	6.33								0.33
2	10	5.33	5.33	5.00	5.00	5.33	5.33	5.33	5.50	5.33	5.33	0.50
3	5	8.00	7.66	8.00	8.00	7.66						0.34

* 病毒滴度 log TCD₅₀。

实验结果的判断, 以对照组的病毒量为 100, 计算实验组的病毒, 并算出实验组的病毒减少的百分数, 以实验组的病毒量减少至 90% 以上为有显著意义 (阳性), 89—79% 为可疑。

二、实验结果

(一) 流行性乙型脑炎病毒抑制物质的提取与鉴定

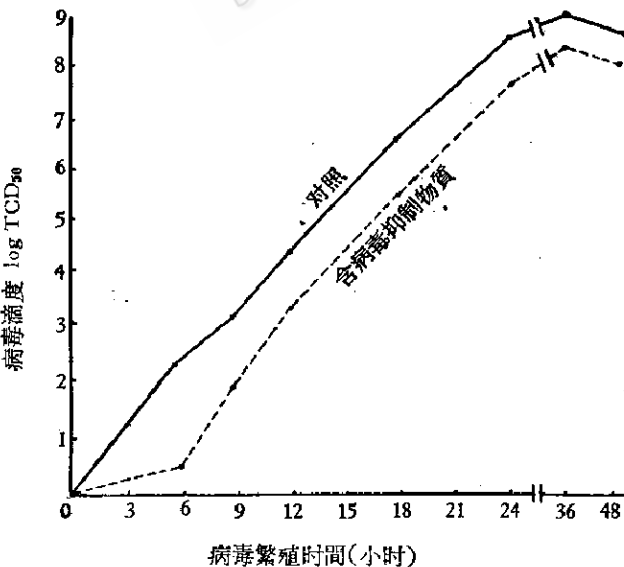


图 1 流行性乙型脑炎病毒抑制物质对 WEE 病毒在鸡胚单层细胞中繁殖动态的影响。

以约 10^{6.5} LD₅₀ 的中山株病毒皮下接种小白鼠, 在第 5 天剖取脑组织, 按前述的方法制备病毒抑制物质的标本, 其对 WEE 病毒在鸡胚单层细胞中繁殖滴度的影响见表 2。在

表 2 流行性乙型脑炎中山株病毒皮下接种 3 周龄小白鼠后, 其脑组织悬液对 WEE 病毒在鸡胚单层细胞中繁殖滴度的影响

实验	对照组 滴度 log TCD ₅₀	实验组 滴度 log TCD ₅₀	实验组病毒减少的百分数
1	8.00	7.00	90
2	6.66	5.66	90
3	7.33	6.00	95
4	7.33	6.50	85
5	6.00	5.00	90

5 次实验中, 实验组的病毒滴度稍低于对照组, 平均约低 1 log。实验组的病毒减少百分

率 1 次为 85% 外,其余在 90% 或 90% 以上。

图 1 表明,經病毒抑制物質处理过的鸡胚单层細胞, WEE 病毒的繁殖受到一定程度的抑制,繁殖曲綫在 6—48 小时的观察中恆低于对照組,在感染后 12—21 小时滴度的相差較为恆定,在 0.8—1.0 log 之間。因此,在以后鉴定抑制物質时, WEE 病毒培养液的收获都在感染后 12—20 小时之間。

本实验中对所提取的病毒抑制物質的性質进行了初步的研究,結果指出,該病毒抑制物質在 pH 2 經 20 小时仍穩定,耐透析,在 4℃ 存放 6 周仍保持其抑制效能。

(二) 流行性乙型腦炎病毒抑制物質产生的动态

研究了小白鼠皮下接种中山株病毒后脑內病毒抑制物質出現的动态,結果列于表 3。在 3 次实验中,除 1 次于接种后 1 天在脑內即可查出有病毒抑制物質外,其余 2 次均在 2 天后出現。病毒抑制物質一般持續至第 6 天,第 10 天以后則查不出。在所检查的 11 天内,病毒抑制物質的測定結果有一定的波动,即使在 2—6 天内,有时亦查不出有病毒抑制物質的存在。

表 3 中山株病毒皮下接种 3 周齡小白鼠后,其脑內病毒抑制物質出現的动态

	接种病毒后时间(天)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	79*	95	90	90	85	95	79				
2	0	90	95	0	90	90	68	79	90	0	0
3	97	90		85	95			53	0	0	0

* 实验組病毒減少百分数。

(三) 病毒抑制物質的产生与流行性乙型腦炎病毒对小白鼠皮下感染致死力的关系

将中山株和京卫研₁株病毒皮下接种 3 周齡小白鼠后 2—6 天内从其脑內病毒抑制物質測定的結果列于表 4。有关中山株病毒的 3 次实验,13 份标本中病毒抑制物質阳性者共 10 份;在同一時間内,接种京卫研₁株病毒的 12 份标本中阳性者仅 1 份。

表 4 中山株与京卫研₁株病毒皮下接种小白鼠后,脑組織中病毒抑制物質的比較

毒 株	检查份数	病毒抑制物質		
		阳 性	可 疑	阴 性
中 山 株	13	10*	2	1
京卫研 ₁ 株	12	1	5	6

* 份数。

图 2 表明中山株和京卫研₁株皮下接种后小白鼠脑內病毒的滴度和病毒抑制物質含量的关系。小白鼠皮下接种中山株病毒后的第 1 天至第 8 天,脑內仅偶而查出有微量病毒,滴度不超过 1 log LD₅₀;脑內病毒抑制物質的检查,7 天中有 4 天阳性、3 天可疑。用京卫研₁株所得的結果却与此相反,脑內病毒不断增加直至第 7 天,滴度达 8.50 log LD₅₀,

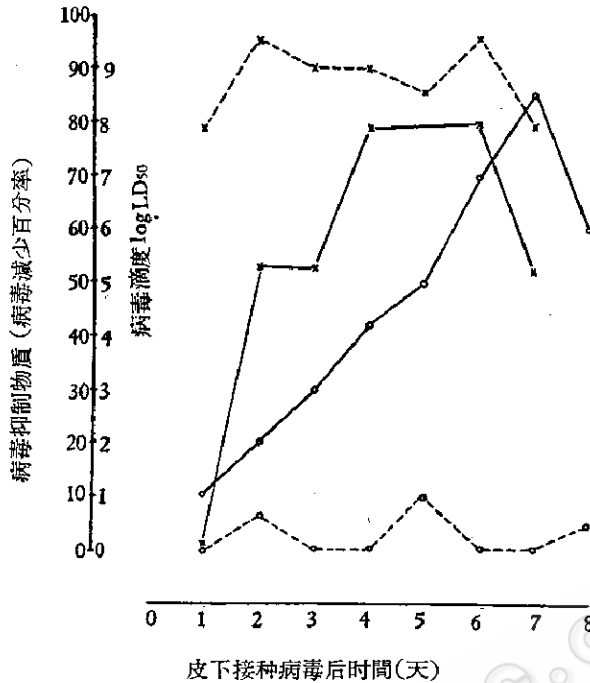


图2 中山株与京卫研1株病毒皮下接种3周龄小白鼠后,脑内病毒的滴度与病毒抑制物质的关系。

- 中山株病毒滴度
- ×·····× 中山株病毒抑制物质
- 京卫研1株病毒滴度
- ×——× 京卫研1株病毒抑制物质

但病毒抑制物质的检查除2次可疑外,均为阴性。

上述结果说明,流行性乙型脑炎中山株和京卫研1株病毒皮下接种小白鼠后脑内病毒抑制物质的出现和含量不同,这与病毒皮下感染力的高低似有一定关系:即皮下感染力高者脑内病毒抑制物质阳性出现少,反之则阳性多。

三、讨 论

初步的实验结果说明,以流行性乙型脑炎中山株病毒自然途径(皮下接种)感染小白鼠,在其远隔部位(脑组织)查出有微量的病毒抑制物质的存在,这可能指出在自然情况下机体受病毒感染时,会产生病毒抑制物质来抵抗感染的发展,但是,由于所查到的这种物质是相当微量的,它抑制WEE病毒的繁殖并不十分明显的,因此,它在抵抗病毒感染发展中的确切的作用尚难肯定。

病毒抑制物质在病毒感染和机体保护性反应中的作用是目前引起注意的问题之一。很早以前, Hodes & Webster 二氏^[8] 即已观察到用 St. Louis 脑炎活病毒皮下免疫小白鼠后,脑内保护力出现很早,而与血清中中和抗体的出现不相符合。Issacs & Hitchcock^[5] 二氏的研究指出,小白鼠感染流感病毒后,干扰素比中和抗体出现得早,在感染的恢复过程中干扰素可能起着重要的作用。我们观察了中山株病毒皮下接种小白鼠后脑内病毒抑制物质出现的动态,说明它产生迅速(在病毒接种后48小时就可查出),一般维持至第6天,个别可到第10天。根据本实验室以往的研究,用中山株活病毒皮下免疫小白鼠,在此

短時間內不論血液中或腦組織內均查不到有中和抗体的存在。这可能指出病毒抑制物質是机体在受病毒感染后短時間內抵抗感染发展而产生的重要物質。

中山株病毒对小白鼠的皮下致死力很低,用約 $10^{6.5}$ LD₅₀ (腦內) 病毒皮下接种并不引起小白鼠死亡;而京卫研₁ 株皮下感染的病毒 LD₅₀ 仅小于腦內感染的 $1 \log$ LD₅₀ 左右。它們产生病毒抑制物質的情况又有不同,前者能在腦內查出病毒抑制物質,后者則不一定。Enders 氏^[13]也指出,一株減毒的麻疹病毒在人羊膜細胞中产生的干扰素高于有毒株。这說明在一定的宿主細胞条件下,毒力不同的毒株引起机体产生病毒抑制物質的量有一定的不相同,至于 2 株病毒皮下接种小白鼠后腦內病毒抑制物質含量不相同是否与此 2 毒株在神經外組織繁殖能力的不同有关也是值得进一步探討的。作者^[11,12] 以往的研究說明,中山株与京卫研₁ 株病毒皮下接种小白鼠后,在神經外組織前者繁殖能力很低,病毒血症時間短;后者繁殖能力强,病毒血症時間亦长,并指出这种不同的性質与发病机制可能有重要关系。本文的結果指出,这 2 株病毒引起宿主抑制物質产生的不同,可能在感染和发病机制中也起一定的作用。当然,亦必須說明,查出有病毒抑制物質的存在并不就是証明它在感染和发病机制中起肯定的作用,目前,关于干扰素在机体抗感染中的作用尚缺乏十分肯定的直接証据。

四、总 結

流行性乙型腦炎中山株病毒皮下接种 3 周齡小白鼠后,經 pH 2 透析处理过的 20% 腦組織悬液能抑制西方馬腦脊髓炎病毒 (WEE) 在鸡胚单层細胞中的繁殖。但是,这种抑制作用并不是十分明显的。

研究了小白鼠接种中山株病毒后腦組織中微量的病毒抑制物質出現的动态,結果說明,病毒抑制物質出現的時間很早(接种病毒后 2 天),但持續的時間不超过 10 天。

比較了 2 株对小白鼠皮下致死力不同的毒株(中山株和京卫研₁ 株)产生病毒抑制物質的情况,結果指出,皮下致死力低的毒株(中山株)皮下接种后腦內病毒抑制物質的含量較皮下致死力高的毒株(京卫研₁ 株)明显。

参 考 文 献

- [1] Issacs, A. & Lindenmann, J.: *Proc. Roy. Soc. B.*, **147**:258, 1957.
- [2] Ho, M. & Enders, J. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**:385, 1959.
- [3] Hitchcock, G. & Porterfield, J. S.: *Virology*, **13**:363, 1961.
- [4] Lindenmann, J., Burke, D. C. and Issacs, A.: *Brit. J. Exp. Path.*, **38**:531, 1957.
- [5] Issacs, A. & Hitchcock, G.: *Lancet*, **II**:69, 1960.
- [6] Vilcek, J.: *Nature (London)*, **187**:73, 1960.
- [7] Huang, C. H.: *Acta Virologica*, **1**:36, 1957.
- [8] Hodes, H. L. & Webster, L. T.: *J. Exp. Med.*, **68**:263, 1938.
- [9] Henle, W., Henle, G., Deinhardt, F. and Berg, V. V.: *J. Exp. Med.*, **110**:525, 1959.
- [10] Nagano, Y. & Kojima, Y.: *C. R. Soc. de Biol.*, Paris, **152**:1627, 1958.
- [11] Huang, C. H. & Wong, C.: Relation of the peripheral multiplication of Japanese encephalities virus to the pathogenesis of the infection in mice, *Acta Virologica*, (in press).
- [12] 汪 璫、黃禎祥:微生物学报, **8**: **93**, 1960.
- [13] Enders, J. F.: *Trans. Coll. Phycns. Philad.*, **28**:68, 1960. (*Bull. Hyg.*, **36**:414, 1961).

OBSERVATION ON THE VIRUS INHIBITORY SUBSTANCE (VIS) FROM MOUSE BRAIN AFTER SUBCUTANEOUS INOCULATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

MAO CHIANG-SHEN, HUANG CHEN-HSIANG

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

Investigations on conditions determining the production of interferon have largely been made on different tissue culture systems. This has the limitation in interpreting the role of interferon in controlling the course of infection. We have successfully demonstrated the production of interferon like substance in the mouse brain after subcutaneous inoculation of a low peripheral pathogenic strain (Nakayama) of Japanese B encephalitis virus to 3-week-old mice. At different intervals after infection, VIS was prepared from the brain by dialyzing against Hank's solution at pH 2. Using WEE as challenging virus and chick embryo monolayer cells as culture system, VIS was found as early as 2 days and persisted up to 10 days after subcutaneous inoculation.

By using a high peripheral pathogenic strain (Peking) as infecting virus, no detectable VIS was demonstrated in the brain at any time after subcutaneous inoculation. Thus, the role of virus factor in determining the production of VIS is demonstrated. The relation of this property to the peripheral pathogenicity requires further studies.