

流行性乙型脑炎病毒灭活程度与 诱发产生干扰素能力间的关系

王樹声 黃禎祥

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

流行性乙型脑炎病毒(以下简称乙型脑炎病毒)感染鸡胚单层细胞后,在细胞外液中能查到非特异性病毒抑制物——干扰素。关于灭活病毒产生干扰素的问题,文献上报告不尽一致,流感^[1],牛痘^[2,3],流行性腮腺炎^[4,5],DA 粘类病毒^[6],新城鸡瘟、鸡瘟^[7]以及 Rous 肉瘤^[8]等病毒用紫外线照射或加热灭活后,接种到细胞上能产生干扰素以及干扰其他病毒;而腮腺炎病毒^[9]及 Sindbis 病毒^[10]—经灭活后则丧失其产生干扰素的能力。这种不一致的现象是值得进一步探讨的。本文报告乙型脑炎灭活病毒在鸡胚细胞系统干扰素产生与灭活程度的关系。

材料与 方法

乙型脑炎病毒 本实验采用京卫研₁病毒株,曾在三周龄小白鼠脑内传 23—26 代,病毒滴度为 $10^{-7.50}$ — $10^{-8.50}$ 。每次均用新鲜发病的鼠脑制成病毒悬液,离心沉淀,取其上清液。病毒采用 37°C , 56 — 58°C 水浴加热或福尔马林等方法灭活。

对照材料 用正常三周龄小白鼠脑悬液,其制备及处理与乙型脑炎灭活病毒相同。

鸡胚单层细胞(CEC) 以胰酶消化的去头、足、内脏的 11 天龄来克亨鸡胚制成。每扁瓶(50 毫升体积)接种 4 毫升细胞悬液,含细胞 1,500—1,600 万,放 37°C 培养 24—48 小时成单层细胞后使用。细胞培养液为 5% 牛血清及 0.5% 水解乳蛋白 Hank's 溶液,含常规量的抗菌素及适量的 NaHCO_3 。

小白鼠 在防蚊条件下饲养的三周龄小白鼠。

干扰素标本的制备 以鼠脑灭活病毒及正常鼠脑对照材料接种到鸡胚单层细胞,同时加入由 20% 199 和 80% 水解乳蛋白液混合的新鲜培养液(以下简称 199、LH 溶液), 37°C 培养 3 天,收获细胞外液,装入透析袋,经 pH 2, 4°C 透析处理 24 小时后移入沉淀管 1,500 转/分,离心 15 分钟,上清液分装小管, 4°C 保存备用,并在二周内测定其干扰素的效能。

干扰素测定方法 以在鸡胚单层细胞上抑制西方马脑脊髓炎病毒(以下简称 WEE)空斑形成的方法测定干扰素的效能。不同倍比稀释的干扰素液及对照液 3 毫升(稀释液用 0.5% 水解乳白蛋白 Hank's 溶液,以下简称 LH)加入单层细胞,放 37°C 孵育 20—24 小时,弃去上述液体,加入攻击病毒——鸡胚单层细胞传代之 WEE,接种量为 50—100 PFU/0.5 毫升,于 37°C 吸附 90—120 分钟后复盖含有营养液的琼脂层^[11], 3 天后计空斑数。以比对照组空斑数减少 50% 判为阳性,以其能抑制 50% 空斑形成的最大稀释度为干扰素的终点滴度。每个稀释度接种二瓶鸡胚细胞,空斑数取其平均数。

病毒测定

(1) 小白鼠脑内滴定 均用三周龄小白鼠。病毒稀释液为 LH 溶液,接种量为 0.03 毫升/每只小白鼠,每个稀释度接种 4 只。观察二周。

(2) 試管空斑法^[12] 鸡胚細胞悬液每毫升含 400 万, 每管接种 1 毫升, 长成单层后加入滴定材料 0.3 毫升, 吸附 90—120 分钟, 盖以含营养液琼脂层, 3 天后計数空斑。詳細方法于結果中一并說明。

实 驗 結 果

1. 乙型脑炎病毒經 56—58℃ 不同時間灭活后对其誘发产生干扰素能力的影响

新鮮发病的鼠脑用 Hank's 液制成 10% 病毒悬液經 3,500—4,000 轉/分离心 30 分钟, 吸取上清液, 用 Hank's 氏再稀释 10 倍, 分装小試管, 置于 56—58℃ 水浴中加热灭活, 于不同間隔取出, 用鸡胚单层細胞空斑法检查剩余病毒, 同时接种鸡胚单层細胞, 每組接种 3 个扁瓶, 每扁瓶接种 1 毫升灭活病毒, 同时加入 4 毫升 199、LH 溶液, 放 37℃ 孵育 3 天后, 收集培养液, 部分制备及測定干扰素用, 部分供检查有无活毒存在, 結果見表 1。

表 1 乙型脑炎病毒經 56—58℃ 不同時間灭活后对其誘发产生干扰素能力的影响

灭活時間 (分)	灭活标本 余毒測定*	接种 CEC 后 3 天病毒滴定				干 扰 素 稀 释 度						干扰素滴度
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	对照	
0	+	c	c	c	c	0	0	2 [△]	10	23	65	>1:32
15	—	c	16.5 [#]	0	0	0	0	24	30	49		1:16
30	—	c	14	0	0	0	8	25	59	49		1:8
45	—	0	0	0		55.5						<1:2
60	—	0	0	0		65						<1:2

表 1. 2. 3 的标记說明: “*” 鸡胚单层細胞空斑滴定; “△” WEE 空斑数; “#” 小白鼠脑内滴定; “+” 脑炎病毒空斑数; “c” 空斑融合; “0” 无空斑。

从表 1 可以看出, 只有当灭活材料中还殘留有活病毒时, 細胞外液才能查到干扰素。干扰素的滴度与病毒材料被灭活的程度有关, 一旦病毒被完全灭活, 則不能产生干扰素。同时看到在經 56—58℃ 加热 15—30 分钟灭活的材料中的殘余病毒, 只有先接种到鸡胚細胞培养, 然后再用鸡胚細胞空斑法或鼠脑接种才能查到。

2. 乙型脑炎病毒經 37℃ 加热灭活后对其誘发产生干扰素能力的影响

由于上述实验多次重复获同样結果, 考虑是否因为 56—58℃ 加热灭活过于剧烈, 从而破坏了产生干扰素的能力。为此我們改用較为温和的 37℃ 加热灭活的方法。其他材料与方法同前。結果見表 2。

表 2 乙型脑炎病毒經 37℃ 加热灭活后对其誘发产生干扰素能力的影响

灭活時間 (天)	灭活标本 余毒檢查*	接种 CEC 后 3 天病毒滴定				干 扰 素 稀 释 度						干扰素滴度
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	对照	
1	—	c	c	40 [#]	2	0	0	27 [△]	33	56	66	1:16
2	—	0	0	0	0	61	58.5					<1:2
3	—	0	0	0	0	56						<1:2
4	—	0	0	0	0	52.5						<1:2

从表 2 可以看到, 37℃ 加热灭活所得之結果与 56—58℃ 加热灭活病毒相符合, 都是随着感染性的消失其产生干扰素的能力亦丧失。

3. 乙型脑炎病毒經福尔馬林灭活后对其誘发产生干扰素能力的影响

上述研究結果說明温度灭活的乙型脑炎病毒不能产生干扰素, 那么化学灭活法是否

会有所不同呢？在这方面 Alivisatos 及 Edipidis^[14]曾报告了 Polio I、II、III 型病毒经福尔马林灭活后能在人羊膜细胞上产生病毒抑制物。同时我们为了联系到乙型脑炎疫苗免疫机制中有无干扰素参与等问题，就进一步作了福尔马林灭活乙型脑炎病毒产生干扰素的实验。发病鼠脑用 pH 8.0 的磷酸缓冲液制成 20% 悬液，经 3,500—4,000 转/分离心 30 分钟，吸取上清液，加入等量 0.4% 福尔马林磷酸缓冲液 (pH 8.0)，使其最终福尔马林浓度为 0.2%，置 4℃ 冰箱灭活，每日摇二次。于不同时间取出，注入透析袋，于 4℃ 透析 24 小时 (透析液为 Hank's 溶液) 以去除福尔马林，将上述标本接种鸡胚细胞，每瓶 1 毫升，同时加入 199、LH 溶液 4 毫升，放 37℃ 培养 3 天后收获，进行病毒及干扰素测定，结果见表 3。

表 3 乙型脑炎病毒经福尔马林灭活后对其诱发产生干扰素能力的影响

灭活时间(天)	接种 CEC 后 3 天病毒测定 [#]	干扰素 1:2 稀释	对 照	干扰素滴度
1	+	0	58 ^a	>1:2
3	+	0		>1:2
5	+	0		>1:2
7	-	59		<1:2
9	-	53		<1:2

表 3 说明经福尔马林灭活在 5 天以内者，病毒未完全灭活，接种的细胞外液查出有干扰素；而灭活在 7 天以上的，未能查到活病毒，也不能证明有干扰素。

4. 灭活的乙型脑炎病毒并不表现有自家干扰的现象

上述结果证明在灭活病毒接种的鸡胚细胞外液中不能发现干扰素，但是这并不能排除灭活病毒对活病毒有干扰作用的可能。文献上曾报告过所谓有“不完全干扰素”或“细胞内干扰素”的存在^[15]，为此我们进一步作了自家干扰的实验。病毒悬液的制备同第一部分 56—58℃ 加热灭活病毒的实验。病毒经 56—58℃ 60 分钟水浴加热灭活后，接种到鸡胚单层细胞，每瓶 1 毫升，对照则用同浓度的正常鼠脑悬液与灭活病毒同样处理、接种至细胞。实验组与对照组均于 37℃ 孵育 4—5 小时后，加入乙型脑炎活病毒 (稀释成 10⁻⁵ 的病毒液 0.5 毫升)，37℃ 吸附 90 分钟后将未吸附的活病毒与上述处理液一并吸出弃去，用 Hank's 液洗 3—4 次，再加入 199、LH 溶液，置 37℃ 培养，分别于 0、18、42、66 小时取出标本，在小白鼠脑内滴定病毒。结果见表 4 实验 1 部分。

从表 4 实验 1 资料中看出，实验组和对照组病毒繁殖滴度几乎是一致的，看不出灭活病毒对活病毒的繁殖有任何明显的抑制作用。但是应该考虑到上述结果究竟是灭活病毒本身已失去其干扰能力呢？还是由于灭活病毒量的不足或者灭活病毒与细胞孵育时间不够长的关系。因此我们又作了增加 10 倍灭活病毒量 (表 4 中实验 2 部分) 以及延长灭活病毒与细胞的孵育时间至 22 小时 (表 4 中实验 3 部分) 的实验。很明显，从表 4 实验 2、3 的资料中仍然看不出有自家干扰的现象。

5. 乙型脑炎灭活病毒对同株活病毒产生干扰素能力的影响

Ho 和 Breinig^[16] 报告 Sindbis 病毒经灭活后不能产生干扰素，但它能与活病毒起协同作用，增加活病毒产生干扰素的量。Burke 和 Isaacs^[7] 报告，灭活病毒能提早活病毒产生干扰素的时间。我们就用表 4 中实验 1 的材料，进行了干扰素量的测定，结果见图 1。

从图 1 中没有看到象灭活的 Sindbis 病毒能增加活病毒产生干扰素的量，同时也没有

表 4 乙型脑炎灭活病毒对同种活病毒干扰现象的观察

实验	灭活病毒及对照	灭活病毒及对照材料接种量 (1.0 毫升)	灭活病毒与细胞在37℃孵育时间 (小时)	攻击病毒 (0.5 毫升)	接种活病毒后不同时间 (小时) 的病毒滴度 ⁺			
					0	18	42	66
1	56—58℃ 60 分钟 灭活之病毒	10 ⁻² 丰	4—5	10 ⁻⁵ 丰	<10 ⁰	10 ^{-3.88}	10 ^{-4.00}	10 ^{-2.50}
	56—58℃ 60 分钟 灭活之正常鼠脑液	10 ⁻²	4—5	10 ⁻⁵	<10 ⁰	10 ^{-3.88}	10 ^{-3.50}	10 ^{-2.77}
2	56—58℃ 60 分钟 灭活之病毒	10 ⁻¹	4—5	10 ⁻⁵	<10 ⁰	10 ^{-2.44}	10 ^{-3.50}	10 ^{-5.38}
	56—58℃ 60 分钟 灭活的正常鼠脑液	10 ⁻¹	4—5	10 ⁻⁵	<10 ⁰	10 ^{-2.71}	10 ^{-4.50}	10 ^{-4.78}
3	56—58℃ 60 分钟 灭活之病毒	10 ⁻¹	22	10 ⁻⁵	<10 ⁰	10 ^{-1.87}	10 ^{-4.50}	10 ^{-8.50}
	56—58℃ 60 分钟 灭活之正常鼠脑液	10 ⁻¹	22	10 ⁻⁵	<10 ⁰	10 ^{-1.50}	10 ^{-4.00}	10 ^{-8.00}

“+” 三周龄小白鼠脑内滴定乙型脑炎病毒之 LD₅₀；“丰” 鼠脑病毒或正常鼠脑稀释成 10⁻² 的灭活悬液；
“丰” 鼠脑病毒稀释成 10⁻⁵ 的活病毒。

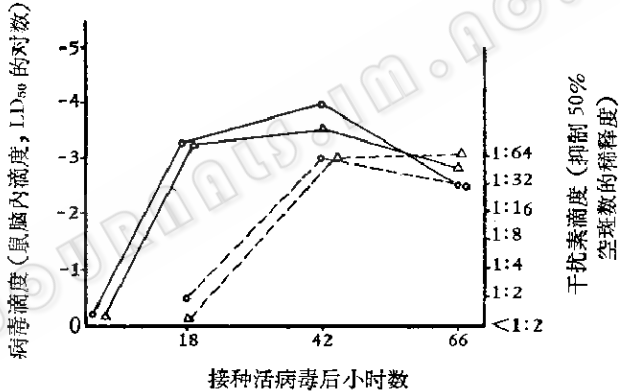


图 1 乙型脑炎灭活病毒对活病毒干扰素产生的影响以及干扰素产生与病毒繁殖的关系。

- 56—58℃ 灭活病毒处理的细胞加入活病毒后繁殖滴度；
- △——△ 56—58℃ 灭活的鼠脑处理的细胞加入活病毒后繁殖滴度；
- ……○ 56—58℃ 灭活病毒处理的细胞加入活病毒后产生干扰素的滴度；
- △……△ 56—58℃ 灭活鼠脑悬液处理的细胞加入活病毒后产生干扰素的滴度。

发现在干扰素产生时间上有所提前。这些现象也都符合上述自家干扰缺如的结果。

讨 论

1957 年 Isaacs 和 Lindenmenn^[1] 首先报告了从加热灭活流感病毒接种到鸡胚绒毛尿囊膜,在培养液内获得非特异性病毒抑制物即干扰素。迄今大约有 20 余种活的或灭活的病毒在很多种机体、细胞水平上分离得干扰素或类干扰素^[4]。看来产生干扰素是病毒-细胞系统相互作用的一种普遍现象。一般认为干扰素是伴随着病毒繁殖过程中所产生的。病毒经灭活后能否保持此一特性的规律性是值得研究的。本文的工作说明了乙型脑炎病毒经加热或福尔马林灭活后,在丧失感染性的同时也失去了产生干扰素的能力以及引起

自家干扰的能力, 干扰素只能在灭活标本中还含有残余活病毒的情况下才能分离到。在自家干扰現象的研究中也說明确实被灭活的病毒并不干扰活病毒的繁殖以及影响活病毒产生干扰素的量。Lockart^[1] 在 WEE 的自家干扰中报告了延长灭活病毒与細胞孵育時間(12 小时)可以获得阳性結果; Петерон 和 Лй Юй^[3] 在牛痘病毒的自家干扰中认为灭活病毒与細胞孵育時間以 0—6 小时为最佳。但是本研究采取了上述的最优孵育時間仍然看不出明显的差別, 进一步說明灭活的乙型脑炎病毒对同种活病毒无干扰能力。在自家干扰的实验中, 灭活病毒的量是足够大的, 平均每个細胞大約有 22—220 LD₅₀ 的灭活病毒, 而攻击病毒的量却相对很小, 平均大約 0.001 LD₅₀/細胞。关于乙型脑炎病毒經灭活后不能产生干扰素的机制問題, 我們认为病毒产生干扰素的能力多半是与病毒的繁殖能力相互联結着的, 从图 1 的材料中看出, 病毒繁殖曲綫与干扰素产生的曲綫是密切相关的, 干扰素的滴度有規律地随着病毒的繁殖而增加, 因而当病毒被确实灭活后, 联同感染性一起就失去了刺激細胞产生干扰素的能力。对于某些病毒如流感^[1]、牛痘^[1]等于加热灭活后仍能产生干扰素, 固然可能与病毒的性質不同有关, 但我們认为应该进一步排除灭活材料中少量活病毒存在的可能性。从本实验中可以看到, 灭活材料中的少量活病毒不論用小白鼠脑內接种或者用試管空斑法均不能查到, 但通过鸡胚单层細胞大量接种后可以查出活病毒来。这就說明这种“灭活”材料所产生的干扰素实际上是由活病毒产生的; 同时由于灭活病毒时的一些灭活条件之間有較大的差別, 因此为判別病毒是否确实被灭活, 必須应用更严格的余毒检查方法。

乙型脑炎病毒經灭活后失去其产生干扰素的能力, 以及即使以大量灭活病毒短期和长期的与細胞接触并不影响活病毒的繁殖, 同时干扰素又对温度十分稳定, 这就为处理提取这一类病毒的干扰素提供了簡便方法, 即可不必用 pH 2 透析法而利用加热灭活方法。

福尔馬林灭活的乙型脑炎病毒不产生干扰素的証明, 并結合在小白鼠接种疫苗后脑內未发现干扰素的初步研究指出, 可能干扰素并不参与乙型脑炎灭活疫苗的免疫机制。

摘 要

1. 本文报告了乙型脑炎病毒經 56—58℃ 或 37℃ 加热灭活和福尔馬林灭活后, 接种鸡胚单层細胞不能产生干扰素, 不表現有自家干扰現象, 而只有当灭活材料殘留有活病毒时才能分离到干扰素。

2. 由于乙型脑炎病毒經加热灭活后丧失其产生干扰素和引起自家干扰的能力, 以及結合干扰素对温度稳定性的特性, 这就为采取加热灭活处理此类病毒干扰素提取方法提供了依据。这一方法較 pH 2 透析法快速、簡便。

参 考 文 献

- [1] Isaacs, A. and Lindenmenn, J.: *Proc. Roy. Soc. London S. B.* **147**:258, 1957.
- [2] Glasgow, L. and Habel, K.: *J. Exp. Med.* **115**:503, 1962.
- [3] Петерон, О. И., и Лй Юй: *Вопр. Вирус.* **2**:159, 1963.
- [4] Henle, W., et al.: *J. Exp. Med.* **110**:525, 1959.
- [5] Cantell, K.: *Arch. f. g. virusforsch* **10**:510, 1960.
- [6] Hsiung, G. D.: *P. S. E. B. M.* **108**:357, 1962.
- [7] Burke, D. C.: *British J. Exper. Path.* **39**:452, 1958.

- [8] Bader, J. D.: *Virology* **16**:436, 1962.
[9] Vilček, J.: *Acta virologica*, **7**:107, 1963.
[10] Ho, M. and Breinig, M. K., *J. Immunol.* **89**:177, 1962.
[11] 陈伯权、许兆祥、柳元元、范瑞莲: *微生物学报*, **9**(1):53, 1963.
[12] 张汉荆、王逸民、郑云凯: *微生物学报*, **9**(3):250, 1963.
[13] Alivisatos, G. P. and Edipidis, Th.: *Zeitschr. f. Immunataforsch. u. Exper. Therap.*, **119**:344, 1960.
[14] Ho, M.: *The New England J. of medicine* **266**:1258, 1962.
[15] Lockart, R. Z. Jr.: *Virology*, **10**:198, 1960.

STUDIES ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE DEGREE OF INACTIVATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS AND THE PRODUCTION OF INTERFERON

WANG, S. S. AND HUANG, C. H.

(*Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

Isaacs found that in suspended chick embryo allantois membrane, inactivated influenza virus yield more interferon than active virus. In sharp contrast, Vilček found that inactivated Tick-borne encephalitis virus failed to elicit interferon. The present paper deals with the studies of different methods and degree of inactivation of Japanese B encephalitis virus, Peking strain, on interferon production. An 1% infected mouse brain virus suspension in 0.5% lactalbumin hydrolysate medium was divided into several tubes and kept at 56—58°C. After appropriate intervals, the material was taken out and tested for the presence of virus and its ability to elicit interferon production in chick embryo cells. The presence of virus was tested both by inoculating the material into mice and indirectly by a more sensitive method, first inoculating the material into chick embryo monolayer cells, then tested for virus by inoculating the tissue culture fluid into mice. Results indicate that there was interferon production in the virus material inactivated at 56—58°C for 15 and 30 minutes, but no yield of interferon when the inactivation period was prolonged to 45—60 minutes. When this was correlated with the infectivity it was found that at 56—58°C for 15—30 minutes, infective virus was still present whereas at 56—58°C for 45—60 minutes, no live virus was detectable. Similar results of the relation of the infectivity and interferon production were obtained when inactivation was carried out at 37°C and with 0.2% formalin. The detection of small amount of live virus from inactivated material was successful only when the indirect method was used.

Studies on the ability of different degrees of heat inactivated virus to interfere with the homologous virus multiplication also showed that complete inactivation of virus did not interfere the virus multiplication nor the production of interferon. This further confirms the fact that complete inactivation of virus lost its power to elicit interferon production.

The fact that interferon is heat stable and Japanese B encephalitis virus can be completely inactivated at 56°C 45—60 minutes together with the finding that completely inactivated material does not influence the virus multiplication nor interferon production suggest that such a simple method as inactivation, may be prefer than the acid dialysis method usually employed for this purpose.