

乙型脑炎病毒核酸 (RNA) 的研究

IV. 病毒及其 RNA 感染对小白鼠脑组织 RNA 酶活性的影响*

柳元元 柳华晨

(中国医学科学院病毒系, 北京)

若干作者曾观察动物组织和细胞在病毒感染时酶活性的改变情况。Bauer 和 Bradley^[1] 报告, 许多嗜神经病毒和若干别的病毒如淋巴肉芽肿和牛痘等病毒感染均能引起小白鼠脑组织内黄嘌呤氧化酶活性的明显的增加。虽然有些作者^[2] 认为这种改变是由于注射异性物质时所产生的非特异性刺激的结果, 但是我们^[3] 在研究乙型脑炎病毒的实验中曾证明, 黄嘌呤氧化酶活性的增加是与病毒的繁殖密切相关的。

在不同的病毒——宿主体系中进行其他酶的研究获得不同的结果。例如, Kovacs^[4,5] 观察到, 在猴肾细胞感染了 Polio 病毒时, 细胞的酸性磷酸酶活性在感染后第三天增加到最高, 然后在第七天降到零; 而碱性磷酸酶活性则先降到零, 在第七天突然恢复到正常水平。另一方面, Okuyamat 和 Igoku^[6] 则观察到, 在 Polio 病毒感染时, 细胞的碱性磷酸酶活性在病毒繁殖的早期已增加到正常水平以上。

Kovacs^[6,7] 同时研究用 Polio 病毒感染猴子及用 MM 病毒感染豚鼠, 观察到脑组织中酸性及碱性 RNA 酶和 DNA 酶的活性均有改变。

在研究流感病毒时 Klameth^[8] 报告, 在感染后的前 8 小时内, 受染鸡胚绒毛尿囊膜中 RNA 酶的活性增加了 20—50%。

由于许多动物病毒的 RNA 本身具有感染性, 用病毒 RNA 感染时对组织酶活性的影响与用病毒感染时是否完全一致是值得研究的。有关病毒 RNA 感染对组织酶活性的影响的实验研究在文献中很少见到, 因此, 我们用乙型脑炎病毒及其感染性 RNA 感染小白鼠, 以观察该动物脑组织中 RNA 酶活性的改变情况。

材料和方法

1. 病毒悬液和感染性病毒 RNA 的制备 以无菌手续从感染了乙型脑炎病毒京卫研₁ 株后发病典型的小白鼠脑组织取出, 用 10% 脱脂牛奶生理盐水制备了 10% 的病毒悬液。感染性 RNA 是用冷石炭酸处理法并利用低频振荡器从 10% 的受染鼠脑悬液 (以 M/200 磷酸缓冲液 pH8.0 制备的), 按前述方法^[9] 提取的。

感染实验小白鼠时分别用上述的 RNA 制剂和以低速离心沉淀受染组织悬液后所得到的上清病毒

* 本实验中部分操作由汪媛同志协助完成, 特此致谢。
本文 1963 年 5 月 13 日收到。

液稀释到一定浓度后接种的。

2. RNA 酶活性的测定 本实验仅测定受染鼠脑组织中的硷性 RNA 酶活性。RNA 酶活性的测定是按下述方法进行的：0.5 毫升的酶悬液(即用三蒸水制备的 10% 脑组织匀浆)和 0.5 毫升的 RNA 底物(2 毫克的纯制酵母 RNA 溶解在 1 毫升 M/50 磷酸缓冲液中, pH7.5) 的混合系统在 37°C 作用 60 分钟后, 取出放在冰盘中, 立即加入 1.0 毫升 5% 硫酸汞溶液(用上清液)作沉淀剂, 小心振荡均匀, 在冰浴中放 20 分钟, 然后加入蒸馏水 4 毫升, 混合均匀。对照管含有与试验管同量的组织液和试剂, 但是组织液和底物是在分开加温后取出冷却然后相混合, 再加入沉淀剂。试验管和对照管均以 3,500 r.p.m. 离心沉淀 20 分钟以除去组织等沉淀物。然后用 Unicam S.P.500 型分光光度计测定上清液在 260 毫微米波长时的光密度。当试验管的光密度与其对照管比较, 在标尺上增加 0.01 格时, 定为增加了一个 RNA 酶的相对活性单位。

3. 动物的接种及酶测定材料的制备 用不同剂量的病毒和病毒 RNA 制剂接种于数日 3—4 周龄的正常小白鼠脑腔。接种病毒时, 用 10^{-1} 和 10^{-7} 两种稀释度的病毒悬液, 其中分别含有平均 $10^{7.19}$ (从 $10^{6.33}$ — $10^{8.19}$) 及 $10^{0.80}$ (从 $10^{0.25}$ — $10^{1.50}$) LD₅₀/0.04 毫升 10% 脱脂牛奶生理盐水的病毒量。在接种 RNA 时, 用 10^{-1} 和 10^{-5} 两种稀释度的 RNA 制剂, 其中分别含有平均 $10^{3.55}$ (从 $10^{2.75}$ — $10^{4.50}$) 及 $10^{-1.55}$ (从 $10^{-2.75}$ — $10^{0.50}$) LD₅₀/0.04 毫升 0.5 M NaCl — $\frac{M}{200}$ 磷酸缓冲盐水 (pH7.8) 的病毒 RNA。在全部实验中, 每只小白鼠的接种量均为 0.04 毫升。在接种前, 对所用的感染材料均先用 3—4 周龄的正常小白鼠进行脑腔滴定, 以确定其毒力。

在接种后 5、24、48、72、96、120、148 及 172 小时, 每次从每组内随意取出二只小鼠, 取出脑组织, 将同组同时者混合在一起称量。然后加入 9 倍的三蒸水, 在一电动组织研磨器中以每分钟 1,250 转的速率研磨 2 分钟左右, 制成 10% 匀浆, 对这些组织匀浆不再加任何处理即放置在冰浴中作为测定酶的材料。酶活性的测定一般均在组织匀浆制成的当天内进行; 但是, 在少数情况下, 如果不能立刻测定, 则将组织匀浆放在 -20°C 的冰箱中冰冻保存。在三天内进行测定。

4. 病毒的滴定 滴定受染动物脑组织中病毒的 LD₅₀ 滴度时, 每次从各组取出二只受染小白鼠, 用 10% 的脱脂牛奶制备成 10% 的病毒悬液, 并用 10% 的脱脂牛奶按常规法稀释病毒, 以三周龄小白鼠作脑腔接种, 观察 2 周, 按常规法计算其 LD₅₀ 滴度。

实验结果

1. 正常小白鼠脑组织的 RNA 酶活性 总共测定了 184 只正常小白鼠脑组织的 RNA 酶活性(包括下面所作感染实验的正常对照; 每次用 2 只小白鼠)。结果见图 1。各次实验的平均值为 30.4 个单位; 其上限为 35.5 个单位, 下限为 24.3 个单位。在实验范围内, 未观察到不同年龄组(3—5 周龄)之间有明显的差别。

2. 病毒感染对鼠脑 RNA 酶活性的影响 感染了不同剂量的病毒之后鼠脑组织中 RNA 酶活性的变化如图 2 所示。酶活性滴定曲线上的每一点代表 8 次分开进行的实验的平均值。

实验结果说明, 在注射大剂量(平均每

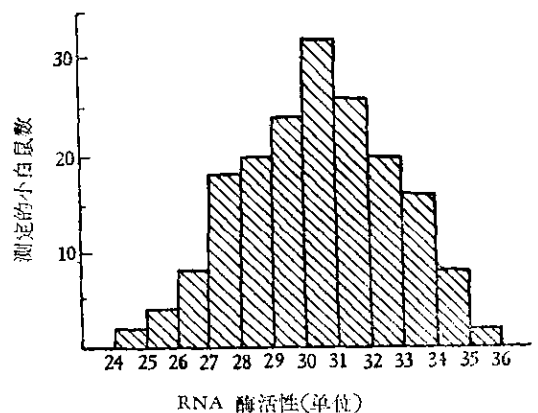


图 1 正常小白鼠脑组织中 RNA 酶活性的波动范围

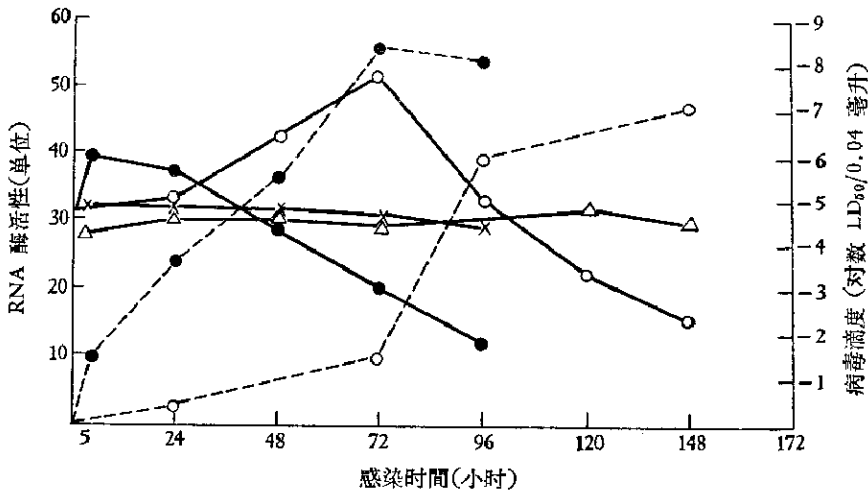


图2 病毒感染对小白鼠脑组织中 RNA 酶活性的影响

- 接种大量病毒时的 RNA 酶活性
- 接种大量病毒时病毒的繁殖曲线
- 接种小量病毒时的 RNA 酶活性
- 接种小量病毒时病毒的繁殖曲线
- x——x 接种脱脂牛奶时的 RNA 酶活性
- △——△ 正常小白鼠脑组织的 RNA 酶活性

鼠接种了 $10^{7.19}$ LD₅₀ 的病毒后 5 小时,脑组织 RNA 酶活性的增加虽然不大,但是是明显的。其增加的量大约为正常值的 29%;在感染后 48 小时酶活性恢复到正常水平;此后迅速降到正常以下,至感染后 96 小时达到最低水平。

为了了解在感染了大量病毒后,受染鼠脑组织中病毒的繁殖情况,以资与 RNA 酶活性的改变相比较,用大量的病毒感染一组小白鼠(每鼠接种了 $10^{7.25}$ LD₅₀),在不同时间后滴定其脑组织中病毒的 LD₅₀ 滴度。结果列在图 2。从这条曲线可以看出,在感染后 5 小时,病毒的繁殖已被测知;感染滴度在 48 小时后迅速增长,至 72 小时达到最高;于 96 小时稍有下降。受染小白鼠在感染后 72—96 小时死亡。没有动物能存活到 96 小时以后的。

注射少量(平均每鼠 $10^{0.80}$ LD₅₀)的病毒时观察到 RNA 酶活性有类似的变化,不同点在于酶活性的增加是延缓到感染以后 24 小时才开始。但是此时增加的量还不显著,最高的增长是在感染后 72 小时。此后逐渐降低到正常水平以下,于 148 小时后降到最低点。在少数实验中,当实验动物只注射了几个 LD₅₀ 剂量的病毒时,少数动物活 172 小时后,甚至在感染后二周内也不死亡。此时测定个别动物脑组织 RNA 酶的活性,观察到有一定程度的恢复。

在少量病毒感染的实验中,以每鼠 10 LD₅₀ 的病毒量感染了一组小白鼠,在不同时间后测定受染鼠脑内病毒的滴度。结果说明,明显的病毒繁殖现象是在感染后 72 小时才能看到的。在感染后 148 小时病毒的滴度达到最高。滴定个别活到 172 小时以后的动物脑内的病毒量结果很低($<10^{-4.5}$)。这也可能是由于动物的恢复或由于取样的误差(因为用来感染的病毒量很小),但这与 RNA 酶活性的恢复是一致的。

为了了解稀释病毒时所用的脱脂牛奶是否能产生非特异性刺激而引起动物脑内 RNA 酶活性的增加,用含 10% 脱脂牛奶的磷酸缓冲液生理盐水接种几组小白鼠,然后按上述方法在一定时间间隔后测定动物脑内的 RNA 酶活性。结果未能看到这些小白鼠与正常的

有明显的差异。在另一实验中,接种含 10% 正常鼠脑组织的 10% 脱脂牛奶亦未见对实验动物脑内 RNA 酶活性有明显的影响(图 2)。

3. 病毒 RNA 感染对鼠脑 RNA 酶活性的影响 结果见图 3。在酶活性的滴定曲线中每一点代表 7 次分开实验结果的平均值。

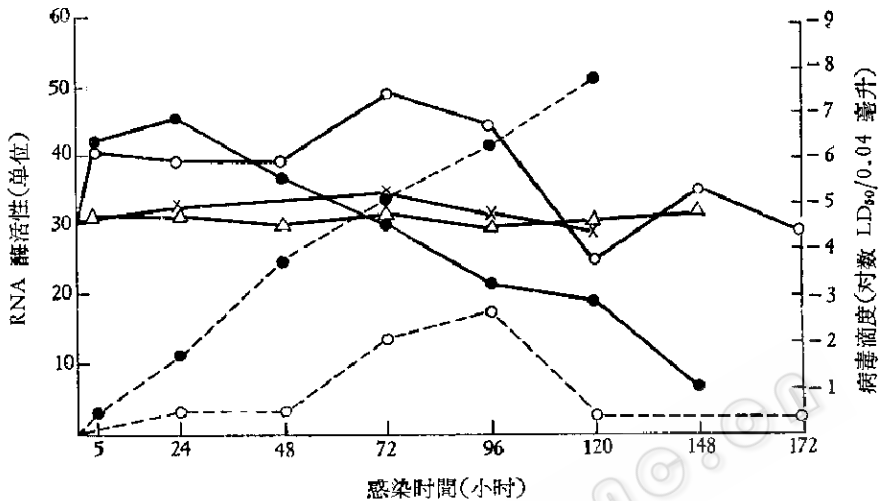


图3 病毒 RNA 感染对小白鼠脑组织中 RNA 酶活性的影响

- 接种大量病毒 RNA 时的 RNA 酶活性
- 接种小量病毒 RNA 时病毒的繁殖曲线
- 接种大量病毒 RNA 时病毒的繁殖曲线
- ×—× 接种正常鼠脑组织 RNA 时的 RNA 酶活性
- 接种小量病毒 RNA 时的 RNA 酶活性
- △—△ 正常小白鼠脑组织的 RNA 酶活性

当注射较大剂量(平均每鼠接种了 $10^{3.55} LD_{50}$)的 RNA 时,可以看到在感染后 5 小时酶活性平均增加了 39%,这和上述注射大量病毒时的结果相似,但较明显。在 72 小时之内,其值缓慢地下降到正常水平以下;在 148 小时以后,降到很低的水平。此后全部受染的动物均死亡。为了了解病毒的繁殖情况,用病毒 RNA 感染一组小白鼠(每鼠接种了 $10^{3.75} LD_{50}$),同样于不同时间测定受染鼠脑内的病毒繁殖情况。结果表明,病毒感染滴度与酶活性的变动关系与上述用病毒感染时相似。在这种情况下,病毒量的增长于感染后 24 小时起即直线上升,至 120 小时后达到最高。

用极少量(平均每鼠接种了 $10^{-1.55} LD_{50}$)的病毒 RNA 进行感染时(用这种剂量的 RNA 感染时全部对照小白鼠在二周的观察时间内均不死亡),虽然 RNA 酶活性和用较大的 RNA 感染时相似,在感染后 5 小时即开始增加,但是整个曲线与上述的有一些差异。从图中可见,在接种了极少量 RNA 后,于感染后 5 小时即迅速增加的酶活性在以后的 48 小时内保持稳定的水平,至 72 小时突然出现一个较高的峰。在某些实验中,增加的量差不多达到正常值的 100%。在 120 小时降到正常水平,以后不再下降。

为了比较用这样小量的 RNA 感染后病毒在鼠脑组织内的繁殖情况,用病毒 RNA 感染一组小白鼠(每鼠接种了 $10^{-1.75} LD_{50}$),于不同时间后滴定受染脑组织中的病毒 LD_{50} 滴度。结果表明,在感染后 72—96 小时病毒滴度有很低的增加;在此以前和以后未能在受染脑组织中查到病毒的存在。

由于本实验所用的病毒 RNA 系直接从受染鼠脑组织提取的。因此,我们进行下面

的实验以观察注射正常鼠脑组织 RNA 时是否能引起 RNA 酶活性的增加。重复的实验证明,在注射了正常鼠脑组织 RNA 后,于不同时间间隔测定实验动物脑内 RNA 酶活性,结果未见明显的改变(图 3)。

讨 论

上面所提到的 Kovacs^[4,5,7] 及 Okuyamat, 和 Igaka^[6] 的工作未曾结合病毒的繁殖来研究整个感染过程中的酶活性的改变,亦未研究接种的病毒量与酶活性改变的关系。虽然 Klamert^[8] 观察到在流感病毒感染 2、4、6 和 8 小时后 RNA 酶活性有增加情况,但是未进行更长时间的观察,亦未结合病毒的繁殖情况进行研究。

考虑到 Polio 病毒及流感病毒的核酸均为戊糖核酸,那么可以提出下面的问题:在这些病毒感染组织和细胞中, RNA 酶活性的改变与病毒的侵入和繁殖(其本质可能认为是病毒 RNA 的引入和合成)是否有密切的关系?对其他含 RNA 的病毒同样可以提出这个问题。

本实验表明,乙型脑炎病毒或其 RNA 感染小白鼠时,动物脑组织中 RNA 酶活性有一定的增加,然后明显地降低。但是在用 RNA 感染或用大剂量病毒感染时,增加速率较快,而在小量病毒感染时反应缓慢。在所有的情况下,当受染脑组织中繁殖的病毒量积聚到相当高的水平以后,组织中 RNA 酶活性明显地降到正常水平以下;当对照动物不死亡或从疾病中恢复时,其酶活性也恢复正常。这可以清楚看出,酶活性的改变为病毒侵入与繁殖的结果。

Kovacs 和 Kovacs^[10] 在研究 Polio 病毒感染猴肾细胞的实验中观察到感染后,碱性 RNA 酶和酸性 RNA 酶的活性均有明显的改变,他认为这二种 RNA 酶中之一的作用可能为破坏宿主细胞的 RNA,而另一种 RNA 酶则与病毒 RNA 的合成有关。

假如我们认为组织中 RNA 酶活性的迅速增加是细胞对病毒感染(主要是对病毒 RNA 的侵入)的一种初级抵抗的表现,那么可能解释为什么在不同感染条件下增加的速率有不同。当注射病毒 RNA 时,裸露的核酸直接侵入细胞内激起细胞的抵抗反应这一点是易于解释的,而完整的病毒颗粒则需要一个缓慢期,以便使病毒核酸释放出来。但是释放所需要的时间可能不长,因为用大量病毒感染时,反应虽然较低但同样地迅速。这样看来,用小量病毒感染时反应的延缓可能主要不是由于 RNA 的释放缓慢,而是由于进入细胞的病毒颗粒所释放的 RNA 在数量上不足以引起明显的酶活性改变,以便能够用实验方法测定出来,除非细胞内合成了足够数量的病毒 RNA。

如果上述假定是可以接受的,那么怎样解释当注射极少量的(不致死量的)病毒 RNA 时酶活性也有迅速增加的现象。如所周知,几乎所有的感染性病毒 RNA 的感染力远比其原来的病毒材料为低。若干作者认为这是由于细胞外 RNA 酶^[11]对病毒 RNA 的破坏作用。另一些作者^[9,12] 认为,细胞外 RNA 酶的作用不是病毒 RNA 低感染力的唯一原因。根据本实验结果看来,细胞对病毒感染的初级反应所引起的 RNA 酶活性的增加可能为病毒 RNA 低感染力的重要原因。这就是说,用从病毒材料中提出的 RNA 制剂进行感染时,如果能抑制或避免细胞内 RNA 酶的作用,那么 RNA 的感染滴度必当能提高;换句话说,在一定量的上述任一种稀释度的病毒 RNA 中所含的感染单位(LD₅₀ 滴度)应

当比用一般的感染力滴定法所表现者为多。这种看法当然不排除其他与 RNA 感染力降低有关的因素,其中的几种因素我们在前一篇文章中^[9]已经加以讨论了。

实验中观察到的 RNA 酶活性的降低及病毒滴度的增加之间的协调关系可能说明脑炎病毒感染的致病机制。病毒繁殖时合成的某些物质对细胞合成 RNA 酶的能力可能起破坏作用。而当受染动物恢复时,这种能力又可能恢复。特别在接种微量的病毒 RNA 时,虽然在受染动物脑内病毒有很低程度的繁殖,但动物无一死亡,而与此同时观察到受染动物脑组织中的 RNA 酶活性相应增加,然后恢复正常。

摘 要

用乙型肝炎病毒或其 RNA 感染小白鼠时,观察到脑组织中 RNA 酶活性有先增加而后降低的现象。在注射病毒 RNA 或大量病毒材料时, RNA 酶活性增加速率较快,而在用少量病毒接种时,酶活性的增加缓慢。在各次实验中,当受染鼠脑中病毒繁殖到一定数量时,酶活性开始下降,同时随着病毒滴度的上升,继续降到明显地低于正常水平,直到动物死亡。当接种很少量(或不致死量)的感染性材料时,一些(或全部)动物恢复健康,测定其中一部分动物脑组织的 RNA 酶活性也有恢复正常的情况。

作者根据实验材料的分析提出一种看法:受染脑组织中 RNA 酶活性的增加可能为细胞对乙型肝炎病毒感染的一种初级抵抗反应,而其后酶活性的降低可能解释为与病毒的致病机制有关。

文中同时讨论到细胞内 RNA 酶的生成与病毒 RNA 的低感染力的关系。

参 考 文 献

- [1] Bauer, D. J., Bradley, P. L.: *Brit. J. exp. Path.*, **37**:447, 1956.
- [2] Sellars, M. I.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**:457, 1956.
- [3] Liu Yuan-yuan & Hou Yun-te: *Acta Microbiologica Sinica*, **7**:172, 1959.
- [4] Kovacs, E.: *J. Exp. Med.*, **104**:589, 1956.
- [5] Kovacs, E.: *Biochem. Z.*, **330**:113, 1958.
- [6] Okuyamat, T., & Igaku, S.: *Zasshi.*, **11**:1, 1957.
- [7] Kovacs, E., & Kovacs, L.: *Naturwissenschaften*, **44**:520, 1957.
- [8] Klamerth, O.: *Z. Naturforsch.*, **14b**:76, 1959.
- [9] Liu Yuan-yuan, Hsü Chao-hsiang, Chen Li-te, Chan Mei-yün, & Liu Hua-chen, *Scientia Sinica*, **11**: 925, 1962.
- [10] Kovacs, E.: *Giorn. mal. infettive e parassit.*, **10**:189, 1958.
- [11] Ellem, K. A. O., & Colter, J. S.: *Virology*, **11**:434, 1960.
- [12] Sprunt, K., Koenig, S., & Alexander, H. E.: *Virology*, **13**:135, 1961.

STUDIES ON INFECTIOUS RNA OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

IV. CHANGE OF RNASE ACTIVITY IN MOUSE BRAINS DURING VIRUS AND RNA INFECTIONS

LIU YÜAN-YÜAN AND LIU HUA-CHEN

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

An increase followed by a decrease of RNase activity was demonstrated in mouse brains during infection of the animals with Japanese B encephalitis virus or with its infectious RNA. The rate of increment was rapid after introduction of either large or small doses of RNA or after large doses of virus. It was delayed, however, in case when small doses of virus were injected. In all cases, when the quantity of virus synthesized in the infected brains reached a certain level, the enzyme activity began to decrease and continued to drop significantly below normal level in agreement with the increase of virus titre until the animals died of infection. When a very small dose (or a sublethal dose) of infectious material was injected, some (or all) animals recovered from infection and the enzyme activity in the brains returned to normal value.

Basing on the analysis of experimental data, the authors suggest that the increase of intracellular RNase activity in the brains might be a primary resistance of the cells against Japanese B encephalitis virus infection, and the decrease of enzyme activity would be interpreted as the result of pathogenic effect of the virus.

The possibility that the low infectivity titre of the viral RNA might be due to the prompt increase of intracellular RNase activity in the infected tissue was also discussed.