

流行性乙型脑炎病毒——鸡胚单层 细胞系统中干扰素的产生动态*

毛江森 杭长寿 黄蓓祥

(中国医学科学院病毒学研究所,北京)

目前已证明有 20 余种病毒在适当的细胞系统中能产生可测的干扰素或病毒抑制物质^[1]。在虫媒病毒——鸡胚纤维母细胞系统产生的干扰素,已有过一些报告,如 Vilček^[2]用活的森林脑炎病毒、Ho^[3]用活的 Sindbis 病毒、Henderson 及 Taylor^[4]用活的 Mayaro 病毒接种于鸡胚纤维母细胞,分别产生对西方马脑脊髓炎,滤泡性口腔炎与 Sindbis 等病毒的繁殖或空斑形成有抑制作用的干扰素。关于流行性乙型脑炎病毒, Ho^[5]提到接种于鸡胚单层细胞不能查出有干扰素产生或仅产生微量。毛、黄二氏^[6]曾报告了皮下注射中山株病毒的小白鼠脑内有微量干扰素的存在。为了了解流行性乙型脑炎病毒——鸡胚细胞系统是否能产生明显的干扰素,在此系统中干扰素产生的动态及其与病毒繁殖动态的关系,我们进行了一系列的研究。

本文报告了流行性乙型脑炎病毒——鸡胚单层细胞系统中干扰素的产生动态及其与病毒繁殖动态的关系。

材料与 方法

病毒 以小白鼠脑内传代的流行性乙型脑炎中山株(94—99代)和京卫研₁株(34代)病毒的新鲜材料,用于制备干扰素。此病毒材料在三周鼠脑内的滴度约为 8.5 log LD₅₀ 左右。用在鸡胚单层细胞传代和繁殖的西方马脑脊髓炎病毒(以下简称 WEE)作为测定干扰素的攻击病毒,其在鸡胚单层细胞上的滴度约为 10⁸ 空斑形成单位,即 PFu/毫升。

鸡胚单层细胞 以胰蛋白酶消化 11 天龄的去头、爪和内脏的莱亨鸡胚制成。培养液为 5—7.5% 小牛血清的 0.5% 水解乳蛋白 Hank's 溶液,含有 0.11% NaHCO₃ 及常规量的抗菌素。于 50 毫升的扁瓶中接种细胞悬液 3—5 毫升,每毫升含细胞数约 5 × 10⁶,置 36—37°C 培养,经 24 小时左右细胞即呈纤维母细胞单层生长,可供制备及测定干扰素用。

小白鼠 本院繁殖的三周龄正常小白鼠,供滴定流行性乙型脑炎病毒用。

干扰素标本的制备 将已长成单层的鸡胚细胞,吸去原培养液,在实验组,除注明者外,接种 10⁻² 稀释,即相当于约 7 log LD₅₀ 的流行性乙型脑炎病毒悬液 0.5 毫升和 0.5% 水解乳蛋白 Hank's 溶液 4.5 毫升,对照组则以相应稀释度的正常鼠脑悬液代替病毒悬液作为接种材料。每一组至少接种 2 瓶,置 37°C 吸附 3 小时后,弃去原液,加入含 0.11% NaHCO₃ 的 0.5% 水解乳蛋白 Hank's 溶液 5 毫升/瓶,置 36—37°C 培养,于不同时间收获细胞外液(以 72 小时作为干扰素收获的标准时间)。此液体经离心沉淀后,上清液分为两份,一份供立即滴定病毒用;一份供 pH2 透析制备干扰素用^[6]。对照液作同样处理。

* 承本所刘宗柏、朱寿林大夫代为制备超速离心沉淀标本,特此致谢。
本文 1964 年 3 月 27 日收到。

干扰素的测定和结果的评定 以上述用干扰素标本和对照液标本处理过的鸡胚单层细胞,经 WEE 攻击后,观察空斑形成的数目。即将标本按 2 倍稀释,每一稀释度采用 2 瓶细胞,每瓶加入 4 毫升稀释好的标本液,置 36—37°C 约 20 小时,弃去标本液,加入能引起约 100 个空斑的 WEE 病毒,置 37°C 吸附 1 ½ 小时,吸去瓶内液体,加入营养琼脂复盖物,于室温凝固后,即置于 36—37°C,于 48—72 小时记录每瓶的空斑数目。空斑技术与 Hsiung 和 Melnick^[7] 的方法基本相同。

实验结果的评定以对照组二瓶细胞的平均空斑数目为 100%, 计算实验组的空斑数目减少的百分比,即空斑减少百分比(%) = $\frac{\text{对照组空斑数} - \text{实验组空斑数}}{\text{对照组空斑数}} \times 100$ 。以实验组空斑数目减少 50% 或以上为有意义,并以尚能抑制 50% 空斑形成的干扰素最高稀释度为其滴度。

流行性乙型脑炎病毒滴定 所有标本均于收获的当天于小白鼠脑内滴定其病毒滴度,每一稀释度用小白鼠 4—5 只,每只接种 0.03 毫升,于第 14 天按 Reed 和 Muench 公式计算其病毒滴度(log LD₅₀)。

实验结果

1. 流行性乙型脑炎病毒——鸡胚单层细胞系统中干扰素的产生。

以中山株病毒接种于鸡胚单层细胞,于 72 小时收获细胞外液,经 pH2 透析处理后,测定其对 WEE 病毒空斑形成的抑制作用,结果列于表 1。在 5 次实验中表明,(1) 随着干扰素标本稀释度的增高,空斑减少的百分比逐步降低,由 100% 至 0%;(2) 当干扰素标本稀释度在 1:16 或其以下时,在试验组几乎不出现空斑,稀释度在 1:32—1:256 时尚能抑制 50% 以上的空斑形成。

表 1 流行性乙型脑炎病毒(中山株)感染鸡胚单层细胞 48—72 小时的细胞外液,经处理后对 WEE 病毒空斑形成的抑制作用

实验	标本的稀释度								抑制滴度
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
1	100*	100	—	100	96	78	60	14	1:128
2	—	100	84	83	70	0	0	—	1:32
3	—	100	—	100	95	80	0	0	1:64
4	—	—	—	100	82	66	56	—	1:128
5	—	—	—	—	—	—	76	66	>1:256

* 示空斑减少百分比,即以对照组空斑数目为 100 计算得的实验组空斑减少百分比,表内 100 指实验组空斑为 0,表内 0 指实验组与对照组空斑数目相同。

对该物质的某些性质亦进行了初步的研究。(1) 已知抑制滴度的干扰素标本和对照液再经 Phywe 牌超速离心机 40,000 转/分(105,000g)离心沉淀 2 小时,取上清液测定其滴度,结果说明,超速离心前后滴度均为 1:128,其抑制 WEE 病毒繁殖的成分不被 105,000g 超速离心所沉淀;(2) 实验证明 60°C 加温 1 小时并不降低其滴度;(3) 于 4°C 冰箱保存达 3 个月零 6 天仍保持其原来的抑制 WEE 空斑形成的滴度;(4) 该物质不能通过透析膜及在 pH2 几乎不被破坏(pH2 经 20 小时)。

2. 流行性乙型脑炎——鸡胚单层细胞系统中干扰素的产生与病毒繁殖的动态。为了在不同病毒接种量的情况下比较干扰素的释放动态,并观察其与病毒繁殖滴度的关系,每次实验以同批细胞进行。收获 3—24、3—48、3—72、3—96 及 3—120 小时的标本液,分别测定病毒及干扰素,结果列于图 1a, b, c。可以看出,在感染后 24 小时,用大量病毒

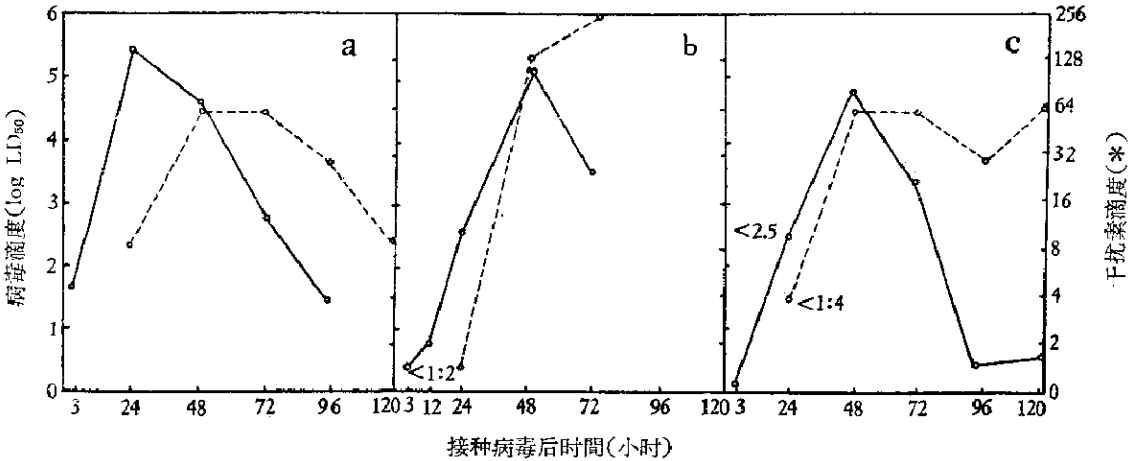


图1 鸡胚单层细胞接种不同量流行性乙型脑炎病毒繁殖和干扰素产生动态的比较

- a. 病毒接种量为 7 log LD₅₀/每瓶细胞；
- b. 病毒接种量为 4 log LD₅₀/每瓶细胞；
- c. 病毒接种量为 2 log LD₅₀/每瓶细胞。

注：实线示病毒；虚线示干扰素；*：干扰素稀释度的倒数。

接种时干扰素滴度为 1:8，而中量及小量接种者均未查出有明显的干扰素(最低检查浓度为 1:2 及 1:4)。不论用大量或小量病毒接种，高滴度的干扰素均于 48 小时开始出现，48—72 小时达高峰。此后，在大量病毒接种者，干扰素滴度有一定的下降，而小量病毒接种者则无明显下降，一直维持至 120 小时。病毒繁殖曲线说明，大量病毒接种在 24 小时病毒滴度达最高峰，而小量病毒接种则在 48 小时达高峰，然后均开始下降。细胞病理变化的观察表明，大量病毒接种者细胞于 72 小时开始脱落，而小量病毒接种者直至 96 小时仍无明显病理变化。

3. 中山株与京卫研₁株病毒在鸡胚单层纤维母细胞上干扰素滴度的比较 以相同的病毒量接种于同批细胞，于 72 小时收获细胞外液，比较其干扰素的滴度。如表 2 所示，两者之间未观察到干扰素的滴度有明显的差异。

表 2 流行性乙型脑炎中山株与京卫研₁株病毒接种鸡胚单层细胞干扰素滴度的比较

实 验	干 扰 素	
	中 山 株	京 卫 研 ₁ 株
1	1:64	1:64
2	1:32	1:32
3	1:64	1:32

讨 论

流行性乙型脑炎在鸡胚单层细胞中能产生抑制 WEE 病毒空斑形成的物质。初步研究表明，这一物质的性质与干扰素的性质是相似的。Ho 氏^[5]用乙型脑炎病毒在鸡胚细胞系统中未能证明有干扰素产生是否与所使用的毒株不同有关。

本实验的结果与 Wagner 氏^[8]所获得的流行性感冒病毒干扰素和 Vilček^[2]所报告

的森林脑炎病毒干扰素一样,是属于干扰素滴度较高的病毒——细胞系统。高滴度的干扰素无论在干扰素的理论研究 and 实际应用上都是重要的。由干扰素产生的动态与病毒繁殖之间的关系的研究指出,细胞外液中干扰素的曲线与病毒繁殖曲线一样有其本身的动态,同时它出现的早晚和维持的情况又与病毒的接种量有关。据目前所知,干扰素自身是不能复制的,因此,干扰素产生的这些动态,决定于病毒与细胞相互作用的结果。

本实验观察到大量病毒与小量病毒接种,干扰素的曲线不尽相同(如图 1a、1c)。经重复实验说明,大量病毒接种者干扰素滴度在 48—72 小时达高峰,之后有相当程度的下降,而小量病毒接种者未观察到有明显的下降,这是值得讨论的。作者认为,大量病毒接种时,由于在 72 小时以后极大部分细胞发生严重的病理变化,以致干扰素不能继续产生,这是可以理解的。但是已释放的具有耐温性的干扰素的滴度为什么会有下降呢?是否说明细胞外液中的干扰素会伴随细胞的破坏而破坏?这是值得考虑的。

关于干扰素在组织培养中对病毒感染的作用,已有一些报告^{9,10}。在本实验中图 1a、b、c 表明干扰素的滴度与病毒繁殖滴度的关系。对这些曲线进行比较的结果,我们认为,流行性乙型脑炎病毒在鸡胚细胞中的早期繁殖与干扰素的关系不大,这可能是由于干扰素的出现和达高峰较病毒晚一些,而细胞外液中的干扰素抑制病毒感染发展的作用需要一定的时间和累积一定的浓度才能明显地表现出来。由于干扰素高峰的出现及维持往往伴随着病毒繁殖滴度的下降或不繁殖,因此作者认为干扰素对病毒的晚期繁殖有一定的抑制作用。特别是当病毒接种量小时,如前所指出的,在 48 小时以后,病毒已无明显的繁殖。但是,当大量病毒接种时,干扰素对病毒后期的繁殖的抑制作用是较难肯定的,因为病毒在 48 小时以后的无明显繁殖亦可能由于细胞广泛地发生病变的结果。

摘 要

本文报告了流行性乙型脑炎病毒——鸡胚纤维母细胞系统中干扰素的产生动态。

在 5 次实验中干扰素抑制西方马脑脊髓炎病毒 50% 空斑形成的滴度为 1:32—1:128。

由下述性质研究的结果说明该物质的性质与以前报告的干扰素相似,不能通过透析膜,在 pH2 稳定,经 60°C 1 小时加热不被破坏,在 4°C 可较长期保存,经 105,000g 超离心不被沉淀。

研究了在受感染的鸡胚细胞培养物中干扰素产生动态和病毒繁殖动态的关系,观察到干扰素的高峰在 48—72 小时,比病毒的高峰稍晚。干扰素达高峰后滴度的维持与病毒的接种量有关。大量接种时达高峰后滴度有一定的下降,小量接种时则无明显下降,直至 120 小时。

比较了小白鼠皮下致死力不同的中山株与京卫研₁株病毒,它们在鸡胚细胞中所产生的干扰素在滴度水平上,未观察到有明显的差异。

参 考 文 献

- [1] Ho, M.: *New Eng. J. Med.*, **266**:1258, 1962.
- [2] Vilček, J.: *Nature*, **187**:73, 1960.
- [3] Ho, M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **11**:81, 1961.

- [4] Henderson, J. R., & Taylor, R. M.: *Virology*, **13**:477, 1961.
[5] Ho, M.: *New Eng. J. Med.*, **266**:1367, 1962.
[6] 毛江森, 黄禎祥: 微生物学报, **9**:247, 1963.
[7] Hsiung, G. D., & Melnick, J. L.: *Virology*, **1**:533, 1955.
[8] Wagner, R. R.: *Virology*, **13**:323, 1961.
[9] Glasgow, L. A., & Habel, K.: *J. Exp. Med.*, **115**:503, 1962.
[10] Baron, S., & Isaacs, A.: *New Scientist*, **11**:81, 1961.

THE PRODUCTION OF AN INTERFERON FROM JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS-INFECTED CHICK EMBRYO CELL CULTURES

MAO CHIANG-SHEN, HAING CHAING-SHOW AND HUANG CHEN-HSIANG

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

An interfering substance with properties similar to interferon was demonstrated in Japanese B Encephalitis virus-infected chick embryo cell cultures. The titer of this substance, as estimated according to the plaque inhibition method with WEE as a challenge virus, varied from 1:32 to 1:128.

The dynamic of its production from the infected cell cultures was studied. The results indicate that the maximum inhibitory activity was observed in the cell culture fluid at 48—72 hours after virus inoculation, which was later than the maximum titer of virus multiplication.

The maintenance level of the inhibiting substance in the infected cell was found to be related to the amount of virus inoculated. After the maximum titer of substance had been attained, some lowering of the level was observed when large dose of the virus was inoculated, while it showed no marked decrease for a period of 5 days when small inoculum was used.

A comparison of the production of this substance between high (Peking strain) and low (Nakayama strain) peripheral pathogenic strains in cell cultures showed no difference in titer.