

流行性乙型脑炎病毒感染性核酸(RNA) 感染鸡胚细胞干扰素产生的动态*

毛江森 黄蓓祥

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

在病毒组份中何者是刺激细胞产生干扰素的物质, 这一问题尚未有解决。不完全流感病毒(S抗原和RNA不足)是一种弱干扰因子^[1]的事实似乎指出, 病毒RNA或病毒内部的核蛋白是刺激细胞产生干扰素的主要的病毒组份。最近用自正常鼠胚组织提取的RNA^[2]和商品RNA^[3]在鸡胚细胞上研究干扰和干扰素的结果进一步支持RNA是刺激细胞产生干扰素的病毒组份的观点。然而, 商品RNA诱发的干扰素仅在13天后才能查到, 这种产生时序与病毒诱发者并不相似。

文献中利用病毒核酸来研究与干扰素产生的关系尚未见有报告, 这可能是考虑到病毒核酸感染后很快合成全病毒, 从而影响结果的分析。但是, 如果在病毒RNA和全病毒初发感染后对其病毒和干扰素的产生进行动态的比较, 或许有助于认识RNA在刺激干扰素产生中的作用。我们进行了这方面的研究, 发现用病毒RNA初发感染者干扰素滴度较全病毒初发感染者为低, 现将结果报告如下。

材料与 方法

病毒 小白鼠脑内传代的流行性乙型脑炎(以下简称流乙脑炎)京卫研₁株病毒用于提取核酸和制备干扰素, 中山株病毒为测定干扰素时的攻击病毒。

细胞 用胰蛋白酶消化11天胚龄的鸡胚制成单层细胞, 接种于小瓶中, 每瓶4毫升, 培养液为含5%小牛血清的0.5%水解乳蛋白 Hanks 溶液, 并含100单位/毫升的青霉素及链霉素和适量的 NaHCO_3 , 细胞于24小时生长成单层。

小白鼠 正常的3周龄小白鼠用于病毒繁殖、测定病毒和测定病毒核酸的感染性。

病毒RNA的提取 以冷酚自受病毒感染的小白鼠脑组织中提取, 详细方法同柳氏等^[4]的报告。提取出的RNA以核酸酶(RNase)处理和光密度测定证明其为RNA。在小白鼠脑内的感染滴度在2.66至 $>4.50 \log \text{LD}_{50}/0.03$ 毫升之间。提取出的RNA除注明者外均立即使用。

干扰素产生动态与病毒繁殖动态的实验 将单层细胞弃去原培养液, 每瓶用4毫升 Hanks 溶液洗2次并用含0.5M NaCl的 Hanks 溶液洗1次, 然后将细胞分成3组(每组10—12瓶), 分别加入: (1) RNA原液0.5毫升/瓶, (2) 与用于提取RNA的同批全病毒 10^{-6} 0.5毫升/瓶, (3) 磷酸盐缓冲液0.5毫升/瓶。置室温(22°C左右)5分钟后, 于每一瓶中各加入0.5%水解乳蛋白 Hanks 溶液3.5毫升, 并用5.6% NaHCO_3 将其pH调至7.20左右。置37°C培养, 每24小时取每组的标本2瓶, 吸取细胞外液测定病毒和干扰素滴度。

干扰素标本的制备及滴度的测定 以pH2透析过夜法制备, 以在鸡胚细胞上抑制中山株病毒空斑形成法测定, 以能抑制50%空斑形成单位的该标本最高稀释度的倒数为干扰素的滴度, 详细方法见作

* 技术协助刘金莲。

本文1964年10月15日收到。

者先前报告^[5]。

病毒的测定 在 3 周龄小白鼠脑内进行。标本按 10 倍稀释，每一稀释度采用 4 只小白鼠，每只接种 0.03 毫升。按 Reed-Muench 公式计算滴度($\log LD_{50}$)。

实 验 结 果

以流乙脑炎病毒 RNA 及同批的全病毒接种于同批细胞后，每 24 小时测定病毒和干扰素的滴度，3 次实验的结果列于图 1。图 1a 中 RNA 的接种量($>4.50 \log LD_{50}$)大于全病毒接种量($3.50 \log LD_{50}$)；图 1b 中 RNA ($2.66 \log LD_{50}$)与全病毒 ($3.00 \log LD_{50}$) 的接种量相近；图 1c 中 RNA ($2.50 \log LD_{50}$)的接种量较全病毒($3.66 \log LD_{50}$)少。实验结果说明，(1) RNA 与全病毒初发感染其病毒繁殖曲线基本相似；(2) 不论 RNA 的接种量大于、等于或少于全病毒，其干扰素滴度均低于全病毒接种组，低 4 倍或 4 倍以上；(3) 并未观察到 RNA 组干扰素的出现较全病毒早，在接种后 24 小时未查出有明显干扰素的释放，干扰素恒出现于有相当的病毒繁殖滴度以后。

在另一实验中，作者以在 4—8℃ 保存 24 及 48 小时经在小白鼠脑内接种证明已无感染性的病毒 RNA 接种于鸡胚单层细胞，在 120 小时内既无病毒繁殖亦未查到干扰素。

为了观察在 RNA 初发感染组干扰素滴度低的原因，是否由于在提取核酸的过程中通过选择而选出诱发干扰素产生能力低的病毒的可能性，进行了下述实验。将图 1a、b 48 小时收获的 RNA 组及全病毒组的病毒标本再立即感染新的鸡胚单层细胞，并测定

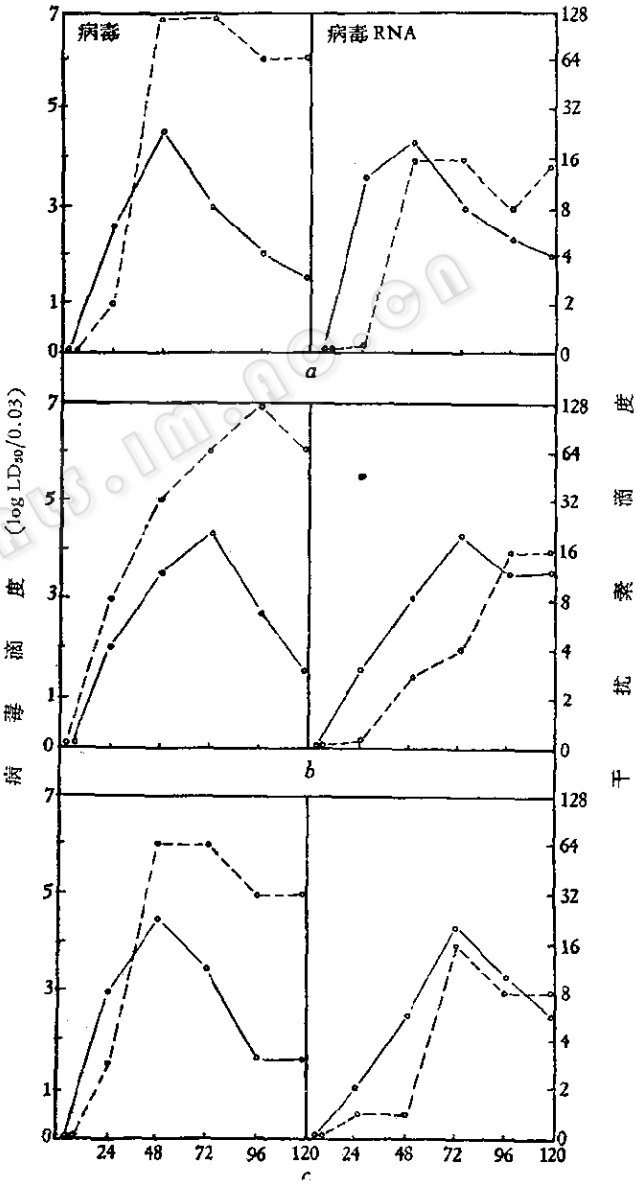


图 1 流乙脑炎京卫研₁株病毒 RNA 初发感染鸡胚细胞干扰素和病毒滴度与全病毒初发感染者的比较
○——○ 干扰素； ○——○ 病毒

病毒繁殖和干扰素产生的动态,结果列于表 1。表 1 说明,上述 2 组病毒诱发干扰素产生的滴度没有明显的差异。

表 1 流乙脑炎京卫研₁株病毒 RNA 初发感染后合成的病毒再接种于鸡胚单层细胞干扰素产生的动态

实 验	组 别	接种病毒的来源	检查内容	结 果			
				24 ⁵⁾	48	72	96
1	对照组	全病毒 ¹⁾	病 毒 ³⁾	2.00	4.33	3.50	1.66
			干 扰 素 ⁴⁾	未查	64	128	64
	实验组	RNA ²⁾	病 毒	4.5	4.00	2.50	1.66
			干 扰 素	未查	8	128	128
2	对照组	全病毒	病 毒	2.33	4.33	3.00	2.00
			干 扰 素	1	64	64	32
	实验组	RNA	病 毒	2.00	4.33	3.50	2.33
			干 扰 素	<1	32	64	32

注: 1) 全病毒接种鸡胚细胞后 48 小时收获的细胞外液;
2) RNA 接种鸡胚细胞后 48 小时收获的细胞外液;
3) 病毒滴度(logLD₅₀/0.03 毫升);
4) 干扰素滴度;
5) 接种标本后时间(小时)。

讨 论

一般认为,病毒 RNA 是干扰素的诱发者, Isaacs^[2,6]认为“干扰素是细胞对外来核酸的反应”。但是,我们的结果似未支持上述观点。如图 1 所指出的,由 RNA 初发感染者,在 24—48 小时其干扰素滴度和整个干扰素曲线均明显低于全病毒初发感染组。这种滴度的降低似乎不是由于 RNA 接种量的不足,例如,在图 1a 中,感染性 RNA 的接种量大于全病毒一个对数,如果包括非感染性 RNA 时则更大大超过全病毒组的 RNA 含量,但是其干扰素滴度却低于全病毒组。这个结果可能指出单纯病毒 RNA 不是良好的或不是唯一的干扰素诱发者。但从不完全流感病毒(有完整的病毒蛋白质外壳而内部 RNA 及 S 抗原不足)仅是一种弱干扰因子^[1]的事实又指出病毒外壳蛋白质不是干扰素的诱发因子而是与内部 S 抗原或 RNA 有关。

以上事实结合本研究的結果,促使我們提出以下的推論: 干扰素诱发因子可能是病毒内部结构中核酸与某种蛋白的结合物。这种看法尚需进一步的研究。

除上述推論外,是否本实验中 RNA 初发感染组干扰素曲线低的原因乃由于在 RNA 的提取物中除了病毒 RNA 外尚有脑組織 RNA 或其他物質,它們抑制了干扰素的产生,是值得考虑的。

摘 要

在流乙脑炎病毒——鸡胚单层细胞系統中研究了由京卫研₁株病毒 RNA 初发感染诱

发干扰素产生的动态。实验以冷酚法提取的病毒 RNA 及同批的全病毒分别接种于鸡胚细胞, 每 24 小时测定病毒滴度和用抑制空斑形成法测定干扰素滴度。结果说明, 由 RNA 原发感染者其干扰素曲线在 120 小时内每检查时均低于全病毒组, 干扰素出现的速度亦稍慢, 在感染第 24 小时未观察到有明显的干扰素释放。对出现上述现象的可能原因进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] Pauker, K. and Henle, W.: *Virology*, **6**: 198, 1958.
- [2] Rotem, Z., Cox, R. A. and Isaacs, A.: *Nature*, **197**: 564, 1963.
- [3] Jensen, K. E., Neal, A. L., Owens, R. E. and Warren, J.: *Nature*, **200**: 433, 1963.
- [4] 柳元元、唐美云、许兆祥、柳华晨、关学勤: 微生物学报, **8**: 231, 1962.
- [5] 毛江森、杭长寿、黄祯祥: 微生物学报, **10**: 339, 1964.
- [6] Isaacs, A.: *Nature*, **192**: 1247, 1961.

DYNAMICS OF INTERFERON PRODUCTION IN CHICK EMBRYO CELL CULTURE INFECTED WITH INFECTIVE RNA OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

MAO CHIANG-SHEN AND HUANG CHEN-HSIANG

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

Infective RNA of Japanese B encephalitis virus, Peking strain, was extracted from infective mouse brain suspension by cold phenol method. Dynamics of interferon production and virus multiplication in chick embryo cell culture after infection with infective viral RNA were compared with those infected with complete virus. The results indicate that the interferon production in the viral RNA infected group was always lower and appeared 24 hours later than those infected with complete virus during 120 hours observation. This difference holds true even when the infective dose of viral RNA used was 1 log higher than that of complete virus. No difference in the virus multiplication curve pattern was found between the 2 groups. The possible explanation of above phenomenon was discussed.