

重水 (D_2O) 对流行性乙型脑炎病毒在鸡胚细胞繁殖的作用及其机制的研究*

毛江森 黄祯祥

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

在流行性乙型脑炎病毒——鸡胚单层细胞系统研究了重水 (D_2O) 对病毒的作用和作用的机制。在经 30—40% 重水处理的细胞繁殖的病毒感染滴度有明显的增高。实验证明, 这种感染滴度的增高不是由于细胞敏感性的增加。发现有两个因素与重水的上述作用的机制有关: 1) 重水处理的细胞繁殖的病毒对热 ($50^\circ C$) 稳定性有明显的增高; 2) 重水处理的细胞产生干扰素的滴度有一定的下降。

重水处理的细胞中繁殖出的病毒对热稳定性增加这一事实指出, 病毒结构中的氢原子被氘原子取代后, 病毒的结构趋向于稳定。这一结果将有助于阐明热灭活病毒的机制和病毒结构与功能的关系, 对于提高病毒的感染滴度和保存病毒亦可能有实际用途。

近年的研究指出, 重水 (D_2O) 能提高脊髓灰白质炎病毒减毒株在若干细胞中的繁殖滴度^[1,2]。但其作用机制尚不清楚。

以往的研究观察到 D_2O 对脊髓灰白质炎病毒繁殖的作用与病毒株对热敏感性的有关^[2]; D_2O 能提高对热敏感的减毒株 LSC, 2ab 在一株人胚肾传代细胞中繁殖的滴度, 而对于对热敏感性低的有毒株 Mahoney 却没有作用, 而且对前者的作用于 $40^\circ C$ 培养较在 $36^\circ C$ 或 $37^\circ C$ 明显。因此, 研究在 D_2O 中繁殖的病毒对热的稳定性或许有助于阐明这一问题。

在作者^[3]研究受流行性乙型脑炎病毒 (以下简称流乙脑炎病毒) 感染的鸡胚细胞干扰素产生的动态时, 观察到随着培养温度的升高, 干扰素产生的滴度亦提高, 病毒感染滴度降低。考虑到 D_2O 提高病毒感染滴度的作用可能与减少干扰素的产生有关。我们利用流乙脑炎病毒——鸡胚细胞系统研究了 D_2O 对热稳定性不同的二株

病毒的繁殖和干扰素产生的影响, 发现在 D_2O 培养基中繁殖的病毒对热稳定性有明显的提高。现将结果报告如下。

材料与方法

病毒 小白鼠脑组织繁殖的流乙脑炎中山株及京卫研 1 株病毒。后者对热的稳定性高于前者。

细胞 用 11 天龄鸡胚制成单层细胞, 接种于容量为 50 毫升的扁瓶中, 24 小时成单层后约含 5×10^6 — 10×10^6 个细胞/瓶。细胞培养液为含 4% 小牛血清的 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 溶液。细胞维持液为不含血清的上述溶液, pH 为 7.3 左右。

小白鼠 正常健康的三周龄小白鼠, 用于繁殖和滴定流乙脑炎病毒。

重水 纯度约为 99.5%, 高压灭菌后用 10 倍浓缩的 199 溶液 1 份加重水 9 份制成约 90% 浓度的 D_2O 溶液。使用时再用维持液稀释使 D_2O

* 技术助理刘金莲。

本文 1964 年 10 月 15 日收到。

浓度为 25—40%。对照液则以相同量的正常 199 溶液代替 D₂O。

病毒繁殖和干扰素标本的制备 弃去单层细胞的原培养液, 加入含 D₂O 的维持液或对照液, 置 37℃ 48 小时以后, 弃去之, 加入约 3000 LD₅₀ 的鼠脑病毒或相同浓度的正常鼠脑悬液, 于 37℃ 吸附 2 小时后洗去游离病毒, 再加入含 D₂O 及不含 D₂O 的维持液。置 37℃ 培养, 每 24 小时收获标本 2 瓶, 吸取细胞外液, 一部分立即在三周龄鼠脑内测定病毒, 其余置 4℃ 保存。待全部标本均收获后, 将标本分别置入透析袋中, 置 pH2 的 Hanks 溶液中于 4℃ 过夜, 第二天再将 pH 调至 7.6。如此处理的标本即供测定干扰素用。

干扰素的测定 以在鸡胚单层细胞上抑制中山株病毒空斑形成法测定。以能抑制 50% 的空斑形成单位的干扰素的最高稀释度为该干扰素滴度。详细方法同前报告^[3]。

病毒的测定 在三周龄鼠脑内进行, 方法同前报告^[3]。

实验结果

1. D₂O 对流乙脑炎病毒在鸡胚细胞中繁殖的作用

在鸡胚单层细胞研究了 D₂O 对病毒繁殖的作用。D₂O 的浓度为 25—36%。图 1 为 3 次实验的平均结果。

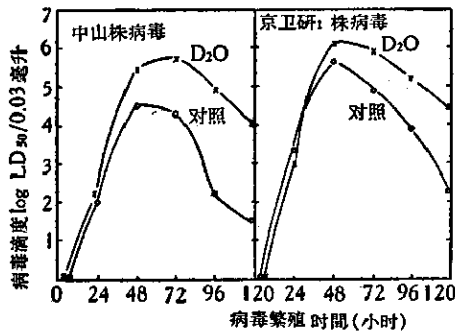


图 1 D₂O 对流行性乙型脑炎病毒在鸡胚细胞繁殖动态的影响

由图 1 看出: 1) D₂O 组病毒的最高滴度高于对照组; 2) 病毒滴度的差别在对热稳定性差的中山株较京卫研 1 株大; 3) 在病毒繁殖的最初 24 小时 D₂O 组及对照组的

病毒滴度并无明显差别, 以后随培养时间的延长差别才愈加明显。

2. D₂O 对中山株病毒在鸡胚细胞上空斑形成的作用

上述实验说明, D₂O 处理的细胞能使中山株病毒滴度提高 1 个对数以上。为了了解这种作用是否是通过细胞对病毒敏感性提高, 又研究了 D₂O 对病毒空斑形成的作用。在不同实验中, 经 36% 或 40% D₂O 处理 48 小时的鸡胚细胞接种约 100 个空斑单位的中山株病毒, 37℃ 吸附 1½ 小时后覆盖以含 30% 或 36% D₂O 的营养琼脂, 37℃ 培养 3 天后计空斑数, 见表 1。表 1 为 3 次实验的结果, 说明 D₂O 组和对照组的空斑数目并无差别。

表 1 D₂O 对流乙脑炎中山株病毒在鸡胚细胞空斑形成的作用

实验次数	培养基	培养液 % D ₂ O	琼脂 覆盖物 % D ₂ O	空斑数目 (个)
1	H ₂ O	—	—	68 87 87 71
	D ₂ O	40	30	79 85 84 78
2	H ₂ O	—	—	88 79 84
	D ₂ O	36	36	76 69 71
3	H ₂ O	—	—	41 41 44
	D ₂ O	36	36	38 33 34

3. D₂O 处理的细胞合成的病毒对热的稳定性

将中山株病毒接种于经过 36% D₂O 或对照液处理过的细胞, 吸附和洗去游离病毒后加入含 36% D₂O 或对照液的维持液。37℃ 培养 48 或 72 小时, 吸取细胞外液, 平均分装于 13 × 100 毫米的试管中, 每管 2 毫升。用橡皮塞紧塞管口后置 50℃ 水浴中, 每间隔一定时间 (见图 2) 取出 2 管立即置于 4℃ 冰浴中。最后测定其病毒滴度并计算其剩余病毒。图 2 是 3 次实验的结果。

图 2 说明, 经 D₂O 处理的细胞合成的

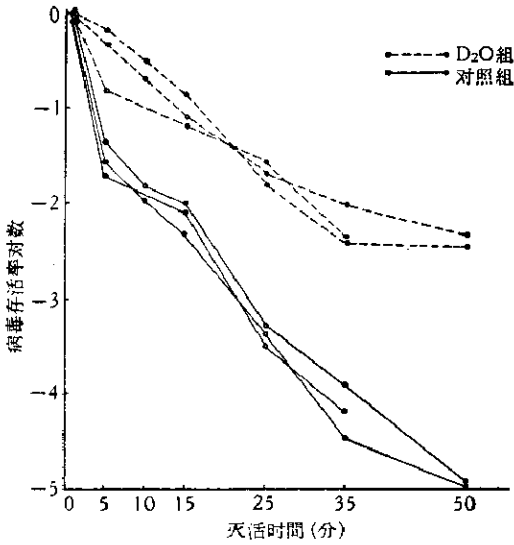


图2 在 D_2O 培养基和 H_2O 培养基繁殖的中山株病毒于 $50^{\circ}C$ 灭活速率的比较

病毒对热的稳定性明显地高于对照组。

4. 在试管内 D_2O 对正常细胞繁殖的病毒热稳定性的作用

上述实验指出,经 D_2O 处理的细胞合成的病毒,对热的稳定性明显地提高了。但是,仍不能排除这种提高是不是由于 D_2O 在细胞外对病毒的保护作用的可能性。为此,将不加入 D_2O 的培养基细胞中繁殖的中山株病毒分为二份,其中一份加

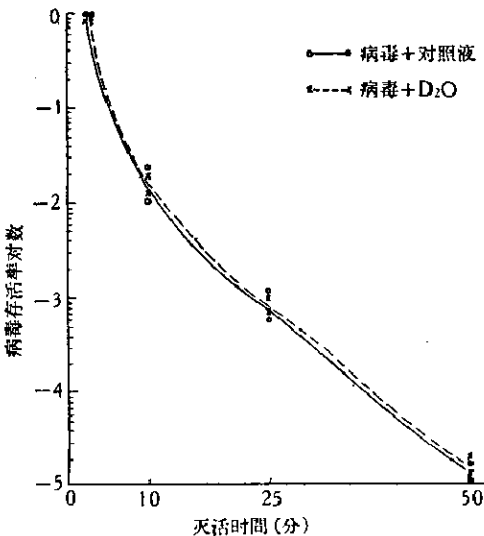


图3 正常细胞繁殖的中山株病毒在试管内加与不加 D_2O 于 $50^{\circ}C$ 灭活速率的比较

入最终浓度为 36% 的 D_2O ,另一份加入相同量的对照液。然后进行与实验 3 相似的 $50^{\circ}C$ 加温。加温后不同时间的剩余病毒见图 3。

图 3 说明, D_2O 在试管内对病毒的热稳定性无直接的影响。

5. D_2O 对流行性乙型脑炎病毒在鸡胚细胞中干扰素产生的影响

流行性乙型脑炎病毒感染细胞后,于不同时间测定 D_2O 组及对照组的干扰素滴度及病毒滴度。 D_2O 的浓度为 36%。图 4 是 3 次相似的实验结果中的 1 次。

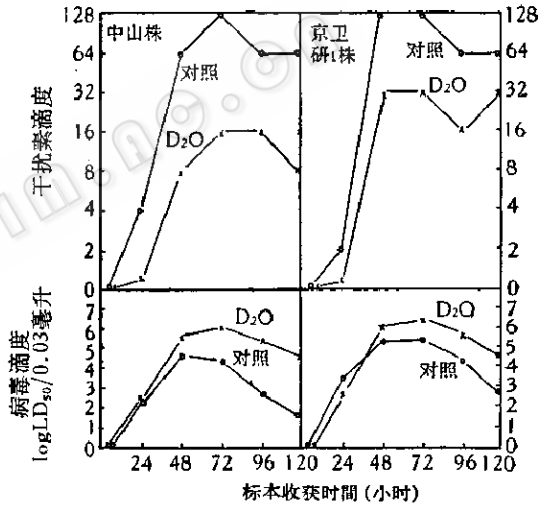


图4 D_2O 对流行性乙型脑炎病毒在鸡胚细胞干扰素产生的影响以及与病毒繁殖的相互关系

结果说明, D_2O 组干扰素的曲线低于对照组,而与病毒曲线相反。这在对热稳定性差的中山株病毒尤为明显。

讨 论

与 D_2O 能提高对热稳定性较差的减毒脊髓灰质炎病毒的滴度相似^[1,2], D_2O 对流行性乙型脑炎病毒在鸡胚细胞上亦有同样类似的作用。从本实验的结果说明,在 D_2O 对病毒繁殖作用的机制中有两个因素,即增加病毒对热稳定性的作用和减少干扰素的产生。

由于 D₂O 的处理, 使繁殖出的病毒对热稳定性增加, 因此, 细胞外液中病毒灭活的速率减低而导致感染性病毒颗粒积累增加。从图 1 结果来看, D₂O 组与对照组病毒繁殖曲线的差距开始于 24 小时以后, 并且随时间的延长而愈加明显, 这是符合病毒耐温性的改变是 D₂O 提高病毒感染滴度的重要因素这一推论的。而 D₂O 的处理不能使病毒的空斑形成数目增加, 则不支持 D₂O 提高病毒滴度是通过改变细胞对病毒敏感性这一可能性。由于在正常细胞中繁殖的病毒并不因在加温时加入 D₂O 而增加其稳定性(图 3), 而必须是由 D₂O 处理的细胞中合成的病毒才具有这种性质(图 2)。这说明, D₂O 不是简单的保护作用, 而是由于在 D₂O 处理的细胞中合成的病毒颗粒中掺合氘原子后, 病毒性质的改变。D₂O 与病毒同时接种并不明显提高脊髓灰白质炎病毒滴度的作用^[2], 而必须在病毒感染前加入, 其作用才更明显, 这种现象也支持了上述的论点。这种病毒性质的改变是一种表现型的改变 (Phenotypic change)。因在脊髓灰白质炎病毒的研究中曾观察到^[2], 经 D₂O 处理的细胞繁殖的病毒再培养于正常细胞时, 其子代又回复到原来的性质。

关于为何病毒结构中氢原子被氘原子部分地取代后会增加其对热的抵抗力的机制的问题尚不清楚。是否病毒结构中氘键或碳氘键的存在使病毒更易维持其原来的结构, 这是值得考虑的。

D₂O 的另一个作用是经 D₂O 处理的细胞受流乙脑炎病毒感染后干扰素的产生减少, 这也同样是有利于提高病毒滴度的

一个因素。D₂O 使得干扰素产生减少的机制是值得思考的。考虑有两个主要的可能性: 1) D₂O 直接作用于细胞产生干扰素的代谢过程; 2) 因 D₂O 改变了病毒的对热稳定性使之不易被灭活, 从而减少诱发干扰素的产生。我们没有资料支持或否定前一种可能性。一般认为, D₂O 能使机体酶促反应迟缓, 代谢速率下降。关于后一种可能性, 我们认为, 在 D₂O 处理的细胞中繁殖的病毒由于结构中部分的氢原子被氘原子所取代, 而导致了热稳定性的增加, 从而减少了培养液中灭活或半灭活病毒的含量, 而这种病毒可能是诱发干扰素产生的病毒。以上现象可以和最近有关热处理的病毒产生干扰素较好的观察联系起来。Gifford^[4] 观察到经 35℃ 处理 4 小时的 Chikungunya 病毒较未处理者能产生更多的干扰素。我们^[3]亦观察到培养温度的升高能使受流乙脑炎中山株病毒感染的鸡胚细胞产生更多的干扰素, 并指出这可能是由于在 38.5℃ 较在 33℃ 有更多的灭活或半灭活病毒的积聚而刺激细胞产生更多的干扰素。

本研究的结果阐明, D₂O 对病毒的作用机制不仅在理论上对病毒性质的认识和研究有较重要的意义, 在实际上对热稳定性低的毒株的分离、培养和保存亦有价值。

参 考 文 献

- [1] Carp, R. I., Kritchevsky, D. and Koprowski, H.: *Virology*, **12**: 125, 1960.
- [2] 毛江森、顾方舟: 微生物学报, **9**: 65—70, 1963.
- [3] 毛江森、黄祯祥、杭长寿: 微生物学报, **10**: 339—343, 1964.
- [4] Gifford, G. E.: *Nature*, **200**: 91, 1963.

ENHANCEMENT OF VIRUS TITER OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS PROPAGATED IN CHICK EMBRYO CELLS BY D₂O

MAO CHIANG-SHEN AND HUANG CHEN-HSIANG

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

Japanese B encephalitis virus when grown in D₂O treated cells was found to have a higher titer than the control. The difference was found to be greater in the heat-labile Nakayama strain than the more heat-stable Peking strain. The increase in the yields of virus was found to be related to the

lower production of interferon and greater heat stability of the virus when grown in D₂O treated cells. Thus, two factors were found to play in the mechanism of D₂O action, namely: an increase in heat stability of the virus and a decrease in interferon production.