

普氏立克次氏体经鼻腔感染小白鼠后肺 中产生干扰素的初步观察

魏文彬 安清武 卿乐怀

(成都生物制品研究所, 成都)

小白鼠经鼻腔感染普氏立克次氏体后, 在肺组织的上清液体中能够获得一种干扰素。它对乙醚有抵抗力且不能透析; 每分钟 16,000 转的离心速度尚不能使它沉淀。酸透析和碱透析以及 60℃ 30 分钟均不能使其受到破坏。但可受到 0.01% 胰蛋白酶的破坏。

这种干扰素对于普氏立克次氏体和牛痘病毒有干扰作用, 例如它能使普氏立克次氏体在家兔皮内所引起的反应推迟、减轻和反应过程的缩短; 在鼠肺中的繁殖受到一定的抑制; 受到普氏立克次氏体感染的豚鼠的发烧期略短, 体重减轻略少, 而血清中的补体结合抗体却低于对照组(未经过干扰素处理)豚鼠血清的 4 倍。

近年以来学者们利用组织培养进行干扰素的制备和试验日益增多, 而在动物内产生干扰素的研究仍不应忽视。在我国毛、黄二氏^[1]首先是利用动物来研究流行性乙型脑炎病毒干扰素的产生。

作者利用动物经鼻腔感染普氏立克次氏体后, 发现在受感染小白鼠鼠肺组织悬液的上清液体中, 含有一种能够抑制普氏立克次氏体和牛痘病毒的物质。这种制品虽然是粗制的, 但与其它学者们所报告的干扰素, 在性质上极为近似。现将我们所进行的初步试验报告如下。

材料和方法

毒株 采用我国制造流行性斑疹伤寒灭活疫苗的普氏立克次氏体“王”种鼠肺毒株^[2]。试验时使用无杂菌污染的鼠肺, 立克次氏体含量丰富。稀释液用含有 2% M/15 磷酸缓冲盐的生理盐水。静脉内注射小白鼠时毒性为 2 LD₅₀=1:256 以上 (1 LD₅₀ 为使半数对照小白鼠死亡的立克次氏体悬液的稀释度, 2 LD₅₀ 为使全部小白鼠死亡

的稀释度。)

小白鼠 体重 14—16 克。

家兔 体重 2 公斤左右的白色家兔和青丝蓝(银灰色)家兔。

豚鼠 雄性, 体重 350—420 克。

立克次氏体干扰素的制备 用缓冲盐水将鼠肺毒株稀释成 1:28, 以每分钟 2,000 转的速度离心沉淀 5 分钟。取上清液体在乙醚麻醉下经鼻腔感染小白鼠, 每鼠滴入量为 0.05—0.1 毫升。4 天后, 解剖发病或濒死的小白鼠, 取出鼠肺, 经过研磨, 每 10 个鼠肺加 10 毫升盐水稀释。将此悬液在每分钟 2,000 转的速度下, 离心沉淀 5 分钟。取上清液体, 高速离心(离心时的温度为 8℃ 左右)以每分钟 16,000 转的速度, 离心沉淀 35 分钟。用巴斯德氏吸管, 小心地吸取上清液体, 分注于适当的容器内。在 60℃ 水浴中, 加热 30 分钟, 不时震荡容器以确保加热充分均匀, 然后在 40℃ 迅速冷却, 再进行最后一次每分钟 1,500 转的低速沉淀 10 分钟。将最后一次的上清液体, 通过无菌试验证明无菌生长后, 分装于青霉素小瓶中加盖塞紧, 保存于 4℃ 下, 等待灭活试验的结果。

· 本文 1964 年 6 月 8 日收到。

取上述经过灭活的干扰素在乙醚麻醉下,经鼻腔感染小白鼠。如此在鼠肺中连续传三代,必须在任何 1 代鼠肺涂片上找不到立克次氏体,才能证明灭活有效合乎要求。

结 果

一、立克次氏体干扰素对于家兔皮内注射活立克次氏体和牛痘病毒的影响

1. 采用 Giroud 氏^[3]家兔皮内试验方法。将立克次氏体干扰素注射于剃过毛的家兔背部右侧皮内(试验组),注射的针数根据需要而定,每针注射液量为 0.1 毫升。在同一家兔背部左侧的皮肤注射用正常鼠肺制备的对照组,每针液体仍为 0.1 毫升。24 小时后,以活立克次氏体悬液稀释度为 10^{-1} — 10^{-4} 分别注射于试验组和对照组头天注射过液体的原来部位。以后逐日观察皮肤反应的出现,和反应的大小(以毫米计)。以有无浸润、红肿、中央部分的坏死和结痂,作为立克次氏体干扰素是否有效的依据,结果列于表 1。

由表 1 看出,经过干扰素处理的家兔皮肤,再注射活立克次氏体,较之注射过对照材料的家兔皮肤,出现的反应要晚、轻一些。例如 7 天之后,试验组除反应较小为 8×8 毫米外,只剩有轻度浸润、严重坏死

和黄色结痂;但对照组的反应则较大,为 10×10 毫米,除有轻度浸润,尚剩有轻度红肿、严重坏死、且结痂严重呈黑色。由本试验的初步观察,我们认为 Giroud 氏皮肤试验比较敏感,容易测出立克次氏体干扰素的作用。

2. 为了了解立克次氏体干扰素对其他病毒是否有效,我们试用了牛痘苗进行攻击。在本试验中的操作方法及使用的动物,与上述试验基本相似,所不同者,本试验用 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释度的牛痘苗病毒进行皮内注射。试验结果表明立克次氏体干扰素,对于减轻家兔对牛痘苗病毒的皮肤反应和缩短反应的持续期,同样地有效。

二、立克次氏体干扰素对于豚鼠实验性立克次氏体感染的影响

选用豚鼠 10 只,雄性;试验组和对照组各用 5 只。试验组的豚鼠预先经腹腔注射立克次氏体干扰素 4 毫升,24 小时后再经腹腔注射立克次氏体鼠肺悬液 1 毫升(稀释度为 1:76)。对照组的豚鼠则只接受活立克次氏体悬液,不经过干扰素的处理。注射后逐日测量体温、体重和睾丸反应。退热后 21 天,将各组的豚鼠血清合并,进行补体结合试验。兹将所观察到的变化列

表 1 立克次氏体干扰素对家兔皮内注射活立克次氏体 (Giroud 氏试验)的影响

活立克次氏体悬液的稀释度	试验组 (24 小时前注射干扰素)						对照组 (24 小时前注射对照材料)					
	反应出现的天数						反应出现的天数					
	2	3	4	5	6	7	2	3	4	5	6	7
10^{-1}	11×13* IR	12×13 IR	11×12 IRN	12×12 irN	9×9 iN	8×8 iNs	15×16 IR	14×17 IR	13×14 IRN	12×14 IrN	11×12 IrN	10×10 irNS
10^{-2}	— i	13×14 ir	10×12 IRn	10×10 in	6×7 in	4×5 in	10×12 IR	12×16 IR	12×13 IRn	11×12 Irn	10×10 Irn	8×8 irnS
10^{-3}	—	8×9 ir	7×9 i	5×6 i	4×5 in	—	10×11 IR	12×12 IR	12×14 IRn	10×11 Irn	12×12 IrN	8×8 irns
10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* 数字代表反应的毫米数; “—”无反应或反应已消失; I 显著浸润; R 显著红肿; N 显著坏死; S 黑色结痂; i 轻度浸润; r 轻度红肿; n 轻度坏死; s 黄色结痂。

于表 2。

表 2 立克次氏体干扰素对于豚鼠实验性立克次氏体感染的影响

观 察 项 目	试 验 组	对 照 组
发热期的平均天数	8.7	9.2
高热的平均度数	40.4	40.7
睾丸反应	++	+-
体重减轻的平均克数	35.5	44.0
补体结合抗体的效价	1:40	1:160

由表 2 看出, 经过立克次氏体干扰素处理的豚鼠与对照组的豚鼠相比较: 发热期的平均天数略短, 体重减轻的平均克数要少, 血清中的补体结合效价低于对照组豚鼠的 4 倍, 可见立克次氏体干扰素有保护作用。至于高热的平均度数两组间的差别不显著; 而睾丸反应(红肿)则试验组高于对照组。我们的解释是睾丸反应只适合于鼠型斑疹伤寒莫氏立克次氏体的评价, 不适合于普氏立克次氏体。另外对照组豚鼠只接受过 1 针的注射, 腹膜及睾丸所受的刺激不如试验组豚鼠接受过两次注射的强烈。

三、小白鼠经鼻腔接种立克次氏体后, 在不同的间隔时间, 对攻击毒株普氏立克次氏体的繁殖的影响

取立克次氏体干扰素, 经鼻腔接种小白鼠为试验组。取缓冲盐水经鼻腔接种另 1 批小鼠为对照组 I。取没有感染立克次氏体的正常鼠肺, 按制备干扰素的同样方法, 制备出对照材料; 取其经鼻腔接种另 1 批小鼠为对照组 II。在不同的间隔时间, 用 1:72 稀释的普氏立克次氏体毒株, 经鼻腔向三组小鼠分别进行攻击。96 小时后, 将以上各组的濒死或活杀的小鼠鼠肺制成涂片, 按 Здродовский 氏^[4]石炭酸复红法染色后, 在油浸镜下(720×)检查鼠肺涂片。按该氏提出的标准, 记下每个涂片上的立克次氏体含量: 每个视野中有一些单

个的立克次氏体为“+”, 500—100 个为“++”, 100 以上为“+++”。试验共进行两次, 结果比较接近。现将两次试验结果“+”的平均数值列于表 3。

表 3 立克次氏体在鼠肺中繁殖的情况

由小鼠接受干扰素到感染立克次氏体的时间(小时)	感染后 96 小时鼠肺中立克次氏体的量(数值为“+”的平均值)		
	试验组	对照组 I	对照组 II
17	2.8	3.0	3.0
24	2.2	2.6	3.0
36	1.0	1.6	1.9
48	0.5	0.8	1.4

试验组 经干扰素处理的小鼠;

对照组 I 未经干扰素处理的小鼠;

对照组 II 经对照材料处理的小鼠。

由表 3 看出: 试验组小鼠预先接受干扰素, 17 小时后感染立克次氏体, 其肺中立克次氏体的含量为 2.8 个“+”号, 而对照组 I 和 II 含量各为 3 个“+”号, 差别不显著。但小鼠接受干扰素 24—48 小时, 对照组 I 和 II 的立克次氏体含量的“+”号数值较试验组为高。可见预先经过干扰素处理的(试验组)小鼠对于攻击入侵的立克次氏体的繁殖有一定的抑制现象。而经过对照材料处理的小鼠(对照组 II)和经过盐水处理的小鼠(对照组 I)肺中立克次氏体的繁殖非常丰盛, 比干扰素处理组中的立克次氏体为多。

四、立克次氏体干扰素的一些物理化学性质

1. 温度稳定性 将立克次氏体干扰素在 56℃ 水浴中放置半小时, 约有 1/3 的制品灭活不充分, 因而使 Giroud 氏试验有减轻反应的作用。而 60℃ 水浴中加温半小时, 可全部灭活, 而其干扰作用却不致受到影响。

2. 胰蛋白酶 干扰素中加 0.01% 的胰蛋白酶, 在 37℃ 下作用 1 小时, 经 4℃ 过夜后, 在 60℃ 下加温 5 分钟, 以破坏其

中之胰蛋白酶。结果完全丧失干扰的作用。

3. 稳定性及不可透析性 通过透析试验证明立克次氏体干扰素不能通过透析袋。将干扰素分别放在 pH2 及 pH10 的条件下透析(在 4℃ 过夜),以后分别调回至 pH7.2 (仍在 4℃ 过夜)。结果均不能使干扰素受到破坏。

4. 对乙醚的稳定性 干扰素与等量的乙醚充分混匀,在室温(22℃)作用 1 小时,待分层后再放 4℃ 过夜。次日将水层导出,并在 37℃ 水浴中放置 1 小时,以驱除残留的乙醚。经过火焰试验证明将乙醚完全排除后,按前法进行干扰素作用的测定,结果表明干扰素不致受到乙醚的破坏。

讨 论

小白鼠经鼻腔感染普氏立克次氏体后,在肺组织中能够产生一种类似干扰素的物质。这种干扰素不能被乙醚破坏,不同于用流行性感胃病毒制备的干扰素,我们称之为立克次氏体干扰素。

这种干扰素的一些物理化学性质,和文献上所报告的许多干扰素是基本相似:对胰蛋白酶的敏感性,对温度相对不敏感性,对酸和碱的不敏感性等……。尤其以对酸的灭活能力具有抵抗性这一点,已经广泛地为许多学者所公认,当作鉴定真正干扰素的一个指标。

我们认为家兔皮内试验是测知立克次氏体干扰素是否有效的一种比较敏感的试验。

立克次氏体干扰素在立克次氏体感染和恢复过程中的作用是本文研究内容之

一,这也正如由其他病毒制备出的干扰素在病毒性疾患和机体保护性反应中的作用是目前各国学者感到极大的兴趣的研究课题之一。立克次氏体干扰素不仅能够抑制立克次氏体在鼠肺中的繁殖,并能使受感染豚鼠的某些症状有所减轻(发热期缩短,体重减轻不急剧);特别是它能够减低补体结合抗体的效价,与对照组的血清相比较,相差竟达 4 倍。原因有待阐明。

本文中所使用的普氏立克次氏体干扰素未经过浓缩和稀释,我们发现稀释后效果不明显。这点与 Ho 氏^[5]的报告相似。普氏立克次氏体干扰素除对普氏立克次氏体和牛痘病毒有干扰作用,对其他类型的立克次氏体和病毒的作用,尚待进一步研究证明。

初步观察,立克次氏体干扰素的有效期在 4℃ 下至少可保存三个月。

附记:本文完成初稿时,国内外对于立克次氏体干扰素尚无人报告。于修稿期间见到 Hopps、河野和 Smadel 等有关恙虫热立克次氏体产生干扰素一文的快报摘要(*Bact. Proc.*, P. 115, 1964)。

参 考 文 献

- [1] 毛江森、黄祯祥:微生物学报, 9: 247—252, 1963。
- [2] 赵树萱、林艳容、许兆奎、吴启文:生物制品通讯, 2: 40, 1957。
- [3] Giroud, P.: *Compt. Rend. Soc. Biol., Paris*, 127: 864—866, 1938。
- [4] Здродовский, П. Ф. и Голиневич, Е. М.: *Учение О Риккетсиях и Риккетсиозах*, 139—140, 1956。
- [5] Ho, M.: *New Engl. J. Med.*, 266: 1367—1371, 1962。

SOME OBSERVATIONS ON THE PRODUCTION OF RICKETTSIAL INTERFERON FROM MOUSE LUNG

WEI WEN-PIN, AN CH'ING-WU AND CH'ING LO-HUAI

(Serum and Vaccine Institute, Chengtu)

An interferon-like substance was found in the supernatant fluid of a suspension of mouse lung tissue after intranasal instillation of virulent material of *Rickettsia prowazeki*. It was ether-resistant, a feature quite distinct from other interferons. It could not be sedimented at 16,000 r.p.m. for 35 minutes. It was non-dialysable, retaining its activities after acid and alkali treatment, but was completely destroyed after exposure to trypsin.

An interfering effect was observed on intracutaneous inoculation of this material for virulent *rickettsia* and vaccinia injected into the rabbit skin.

In the experimental rickettsial infection in guinea pigs, some amelioration of clinical symptoms was observed in the interferon-treated group of animals: The duration of fever was slightly shortened and the loss of body weight was slightly less.

A group of mice inoculated intranasally with this interferon was found to withstand partially the challenging effect of an intranasal inoculation of *rickettsia*.

The activity of rickettsial interferon was at least 3 months when it was kept at 4°C.