

温度和 pH 对流行性乙型脑炎病毒——鸡胚细胞系统干扰素的产生和病毒繁殖的影响

毛江森 黄禎祥 杭长寿

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

本文较系统地研究了在鸡胚细胞上温度和 pH 对流行性乙型脑炎病毒繁殖和干扰素产生的动态, 以及病毒繁殖与干扰素产生的相互关系。

温度是一个重要而明显的影响因素。在 31—38.5℃ 范围内, 随着培养温度的升高, 干扰素产生的滴度和速度也增加。文中讨论了温度对病毒感染的意义。

研究了不同 NaHCO_3 含量及不同 pH 对流行性乙型脑炎病毒繁殖和干扰素产生的影响。与病毒相比, 产生干扰素的适宜 pH 的上限较适宜繁殖病毒者为低。pH 7.10 不利于病毒的繁殖, 但不影响干扰素的产生, 相反, pH 7.80 有利于病毒的繁殖而不利干扰素的产生。影响病毒的繁殖及干扰素的产生取决于 pH, 而与 NaHCO_3 的浓度无直接关系。

研究的结果指出, 发烧及 pH 的改变通过干扰素的产生, 在病毒感染恢复机制中可能是重要的因素。

作者^[1]先前报告了流行性乙型脑炎病毒(以下简称流乙脑炎病毒)感染鸡胚细胞后, 培养液中测得有抑制西方马脑脊髓炎病毒繁殖的物质, 证明为干扰素。在制备若干批干扰素制品时, 发现各批干扰素和病毒的滴度波动较大。有必要在这一系统再研究影响干扰素的产生和病毒繁殖的因素。

影响干扰素产生的主要外界因素, 如 pH 及温度, 有过少数的报告^[2,3], De Maeyer 和 De Somer^[2]报告了两种 pH 对 Sindbis 病毒干扰素产生的影响。这一现象有必要作进一步系统的观察。Ruiz-Gomez 和 Isaacs^[3]报导了温度对 Chikungunya、O'nyongnyong 和 Kumba 等病毒诱发干扰素产生的影响。虽然比较了不同温度对干扰素滴度的影响, 但缺少动态的观察。深入地研究某些理化因素对干扰素产生的影响, 不仅

可了解制备高效价干扰素或高滴度病毒的条件, 而且有助于了解干扰素的产生与病毒繁殖的关系。为此, 本文报告了利用流乙脑炎病毒——鸡胚单层细胞系统研究温度和 pH 影响干扰素的产生和病毒繁殖的某些因素。

材料与方 法

制备干扰素的病毒除注明者外, 均为来自小白鼠脑内传代的新鲜的中山株病毒。每瓶细胞接种约 3,000 LD₅₀ 的病毒, 于 37℃ 吸附 2 小时后洗去游离病毒, 加入不含血清的 0.5% 水解乳蛋白 Hanks' 溶液, 除注明者外, 含 0.112% NaHCO_3 , pH 约为 7.20—7.30, 置 37℃ 培养。

制备干扰素和测定干扰素的细胞均为培养于 50 毫升扁瓶中的鸡胚单层细胞, 每瓶接种 3—5

技术协助刘金莲。

本文 1964 年 6 月 30 日收到。

毫升细胞悬液,24 小时成单层后约含 $5 \times 10^6 - 10^7$ 个细胞/瓶。

制备干扰素时采用 pI2.0 透析法,详细步骤同作者先前报告^[1]。

测定干扰素的方法采用在鸡胚细胞上抑制西方马脑脊髓炎病毒(WEE)或流乙脑炎中山株病毒空斑形成法。我们证明,这两种病毒对本实验制备的干扰素的敏感性是相同的。其中除实验 1 用 WEE 病毒外,余均用中山株病毒。以尚能抑制 50% 空斑形成的干扰素的最高稀释度的倒数作为干扰素的滴度,详细方法同文献^[1]。

测定病毒的方法同文献^[1]。

其它的有关材料和方法同实验结果一并叙述。

实验结果

(一) 流乙脑炎病毒感染鸡胚细胞后,病毒的繁殖与干扰素的释放动态

为了了解干扰素和病毒产生的时序、速度和高度,观察了每 24 小时干扰素和病毒产生的情况。即每间隔 24 小时吸取培养瓶中的全部维持液,加入等量的新维持液继续置 37℃ 培养。测定干扰素和病毒的滴度,结果见图 1。

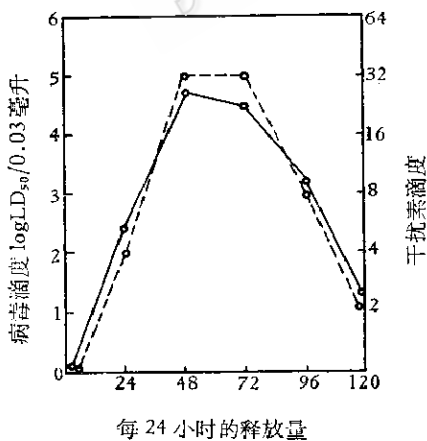


图 1 流乙脑炎病毒感染鸡胚细胞后干扰素和病毒的释放动态
○——○病毒 ○——○干扰素

干扰素的释放曲线指出,在 2—24 小时干扰素的滴度很低,干扰素主要在 24—48 和 48—72 小时之间产生和释放,此后,滴

度即明显下降。病毒滴度曲线的坡度与干扰素相似。

进一步的研究,以同批细胞和同量病毒在同一时间比较了“分次”和“累积”收获维持液的病毒和干扰素曲线;一组于接种病毒后的 2—24,2—48……2—120 小时收获,称为累积收获组,另一组的收获方式同图 1 实验,即为分次收获组。结果如图 2。

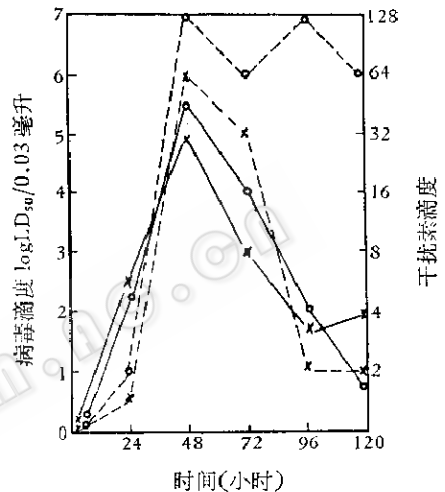


图 2 累积收获与分次收获流乙脑炎病毒滴度与干扰素滴度的比较

○——○病毒,累积 ○——○干扰素,累积
×——×病毒,分次 ×——×干扰素,分次

两种收获方式的病毒曲线没有明显差别;但干扰素的曲线则有明显的不同,在 48 小时以前没有明显差别,但以后累积组基本上维持同一水平,而分次组滴度则迅速下降。这说明由于干扰素的耐温性,因此干扰素滴度无明显下降。

(二) 温度对流乙脑炎病毒在鸡胚细胞上的繁殖滴度和干扰素产生动态的影响

实验以同批细胞感染病毒后,分别置 31、33.5、35 及 37℃ 培养;另一实验放 37℃ 及 38.5℃ 培养。每次实验均于每间隔 24 小时吸尽维持液进行病毒及干扰素滴度的测定,并换入新的维持液。病毒和干扰素产生的动态如图 3。相似的实验共进行三次,结果基本相同。

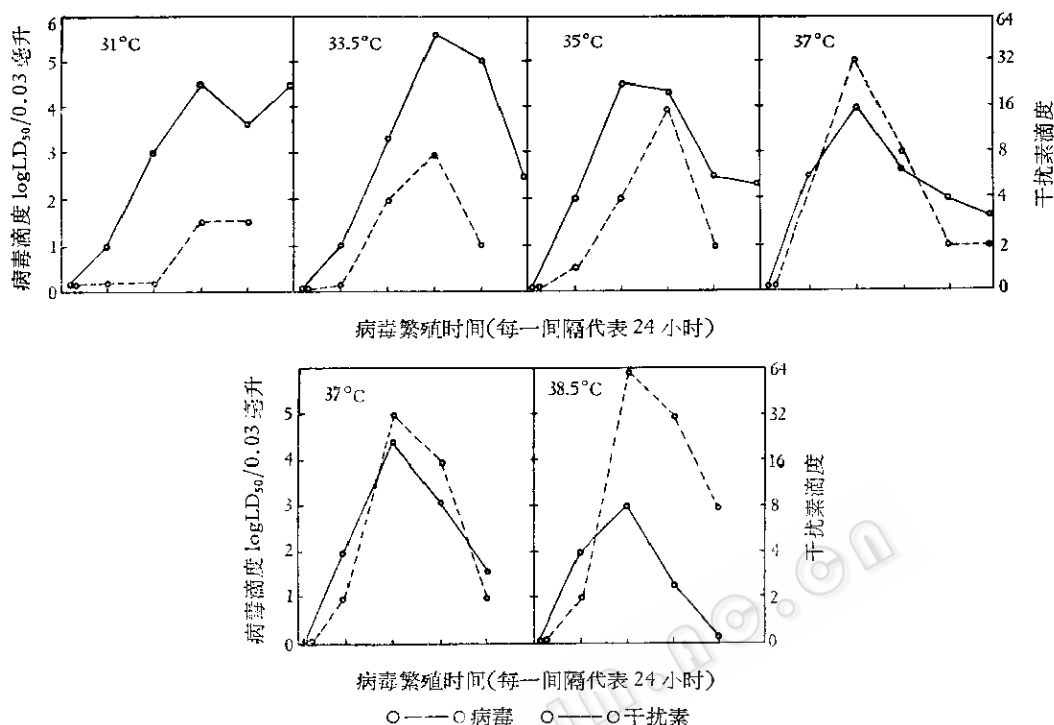


图3 温度对流感乙脑炎中山株病毒在鸡胚单层细胞中病毒繁殖和诱发干扰素产生的影响

结果说明:(1)病毒滴度的高峰在31°C和33.5°C为72小时,而35°C—38.5°C为48小时,其中以33.5°C的滴度为最高;(2)干扰素产生的曲线随着温度的增加而升高,出现的速度随温度增加而加快,在33.5°C以下干扰素的滴度很低;(3)38.5°C是在所比较的温度中干扰素滴度最高、病毒滴度最低的培养温度。

(三) 病毒培养物中不同 NaHCO_3 含量和不同 pH 对干扰素产生和病毒繁殖的影响

同一批细胞接种病毒置37°C2小时后,洗去游离病毒,加入含不同量 NaHCO_3 的维持液并用电 pH 计测其 pH,置37°C培养48小时收获(收获时每一组的 pH 较原 pH 下降约0.1—0.2)。测定病毒和干扰素的滴度,结果列于表1。

可以看出:(1)当 NaHCO_3 含量在0.056—0.224%之间,其相应的 pH 在7.10

—7.60之间,干扰素的滴度最高,高于或低于上述 pH 时干扰素的滴度均明显降低;(2)当 NaHCO_3 含量在0.112—0.560%时其相应的 pH 在7.30—7.95之间,病毒的滴度最高;(3)0.336% NaHCO_3 pH 7.80及0.560% NaHCO_3 pH 7.95时干扰素与病毒的差距最大,而在 pH 7.10时二者差距最小。

为了进一步阐明 pH 及 HCO_3^- 何者是影响上述结果的主要因素。选择3种不同的 NaHCO_3 含量,并以 HCl、 CO_2 及 NaOH 调成不同的 pH,观察干扰素和病毒的滴度,结果列于表2。

表2说明:(1)当 pH 达到7.55时,不论 NaHCO_3 的含量自0—0.224%,病毒繁殖均达5.33—6.00 $\log \text{LD}_{50}/0.03$ 毫升的最高滴度,干扰素的滴度亦达高峰;(2)不论以 HCl 或 CO_2 调 pH,亦不论原先是否含有 NaHCO_3 ,当 pH 为6.75或低于6.75时,

病毒繁殖滴度与干扰素滴度均降低, 过低的 pH 不适合病毒的繁殖, 同样亦不适合干扰素的产生;(3)干扰素的产生与 CO₂ 含量的多少无明显关系。

表 1 不同 pH 对流乙脑炎病毒在鸡胚细胞中繁殖和诱发干扰素产生的影响

pH	相应的 NaHCO ₃ 量 (%)	病毒滴度 logLD ₅₀ /0.03 毫升	干扰素滴度
6.75	0.013	3.62	16
7.10	0.056	4.62	128
7.30	0.112	5.32	64
7.60	0.224	6.00	128
7.80	0.336	5.78	32
7.95	0.560	5.36	16

温度采用 34.5℃, 实验共进行 5 批共 15 次, 结果见表 3。

上述结果指出, 平均滴度在 6.0 log LD₅₀/0.03 毫升左右。

表 3 在较低温度及较高 pH 条件下京卫研株病毒在鸡胚细胞繁殖的滴度

实验批号	滴定数	滴度波动 logLD ₅₀ /0.03 毫升	平均滴度 logLD ₅₀ /0.03 毫升
1	4	5.83—6.37	6.00
2	3	5.75—6.37	6.00
3	4	5.83—6.50	6.23
4	3	5.83—6.50	6.18
5	1	—	6.50

注: 温度 34.5℃; pH7.80; NaHCO₃0.336%。

表 2 不同 NaHCO₃ 及不同 pH 对流乙脑炎病毒在鸡胚细胞中繁殖及诱发干扰素产生的影响

NaHCO ₃ 量%	pH	调 pH 方法	病毒滴度 logLD ₅₀ /0.03 毫升	干扰素滴度
0	6.55	— ⁽¹⁾	3.66	16—32
	7.55	+ NaOH ⁽²⁾	5.55	128
	6.55	+ NaOH → + CO ₂ ⁽³⁾	3.00	<8
0.028	6.75	—	3.33	32—64
	7.55	+ NaOH	5.33	256
0.224	7.55	—	6.00	128—256
	6.75	+ HCl	3.50	32
	6.75	+ CO ₂	3.60	16

注: (1) 维持液原 pH; (2) 用 NaOH 调 pH; (3) 用 NaOH 调至 7.55, 再用 CO₂ 调至 6.55。

(四) 在鸡胚细胞中高繁殖滴度流乙脑炎病毒的培养

目前流乙脑炎鸡胚细胞疫苗滴度不高且不稳定, 为了得到较高及较稳定的病毒繁殖滴度, 根据上述结果, 将培养时的 pH 选择为 7.80(含 0.336% NaHCO₃)的 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 溶液(在个别实验中以 199 溶液代替水解乳蛋白溶液)。在此 pH 干扰素产生较少, 滴度较低而不影响病毒产量。以可供制造组织培养灭活疫苗的京卫研株病毒约 3,000 LD₅₀ 感染约 10⁷ 个细胞, 考虑到该株病毒的耐温性较中山株强, 培养

讨 论

病毒繁殖需要合适的温度与酸碱度是已知的事实。与干扰素的产生联系起来研究则很少。我们较系统地研究了这些因素影响病毒和干扰素产生的动态。结果说明: 温度与 pH 对病毒和干扰素产生的关系是十分密切的, 以致不能离开温度和 pH 来谈病毒繁殖和干扰素产生的滴度。与病毒繁殖一样, 产生干扰素也有其合适的温度与 pH 范围。在本病毒——细胞系统中, 31℃—38.5℃, 温度升高有利于干扰素产生但病毒感染滴度下降, 在过低的温度(31℃)病毒繁殖滴度也下降。高滴度的干扰素产生后伴随着病毒感染滴度的明显下降, 这可能是, 温度对病毒繁殖滴度的作用部分地受到干扰素的影响。但不是唯一的, 因为随温度的升高病毒的灭活速度亦加快。在酸碱度方面, 有较宽的 pH 范围适合于产生干扰素。pH7.10 并不较 pH7.60 产生更多的干扰素, 在 pH6.75 干扰素的产量反而降低。与病毒相比较, 适合于产生干扰素的 pH 上限要较适宜于产生病毒的上限低。在 pH 7.10 虽然显示出不利于病毒的繁殖, 但干扰素的产生却十分良好;

pH 7.80 则不利于干扰素的产生,而病毒繁殖却十分旺盛。实验结果同时亦表明, NaHCO_3 的浓度与干扰素和病毒的产生没有直接的关系, pH 是主要的因素。

温度和 pH 影响干扰素产生的机理仍不清楚,是否与它影响病毒灭活的程度和量的多少有关系是值得追究的一个方面。

本实验结果提示出: 温度和酸碱度在机体抗病毒感染中的作用机制可能与干扰素有关。而且由于正常的 37°C 体温亦不是本病毒繁殖的合适温度,而有利于干扰素的产生,这是否也是某些弱毒力的和对热稳定性较低的毒株形成不显性感染的因素之一,也是值得考虑的。

以常规方法在鸡胚单层细胞中培养流乙脑炎病毒时,干扰素的滴度是很高的,即使间歇地吸去培养液以除去干扰素并未能提高病毒繁殖滴度,这可能说明细胞中已有足量的干扰素存在。由此看来,在实际

工作中考虑如何减少干扰素的产生及释放是很重要的。例如,在较低温度较高 pH; 在鸡胚细胞上利用盖以琼脂的空斑法培养病毒,由于前者减少了干扰素的产生,后者使干扰素的扩散减少,可能有利于病毒的繁殖和细胞病变的出现。另外,在高滴度病毒的制备方面,将培养温度下降为 34.5°C , 培养液 pH 7.80, 不利于干扰素产生而有利于病毒繁殖,能使流乙脑炎病毒在鸡胚细胞上的感染滴度恒定在 $6.00 \log \text{LD}_{50}/0.03$ 毫升或以上。这对于目前流乙脑炎病毒鸡胚组织培养疫苗的制备可能有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] 毛江森、杭长寿、黄祯祥: 微生物学报, **10**: 339—343, 1964。
- [2] De Maeyer, E. and De Somer, P.: *Nature*, **194**: 1252—1253, 1962。
- [3] Ruiz-Gomez, J. and Isaacs, A.: *Virology*, **19**: 8—12, 1963。

THE EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON THE PRODUCTION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS AND INTERFERON IN EMBRYO CELL CULTURES

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

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

The effect of temperature and pH on the dynamics of interferon production and of virus multiplication was studied with the Japanese B encephalitis virus—chick embryo cell system.

The optimal temperature for virus growth was found to be 33.5°C when 5 different temperatures of incubation were compared (31, 33.5, 35, 37 and 38.5°C). Following an increase in the temperature there was a corresponding drop in the virus titre, a difference of about 2.5 log LD₅₀ between 33.5° and 38.5°C. In contrast, the yield of interferon showed a progressive increase with higher temperature. The yield of interferon at 38.5°C was 8 and 21 times more than those at 33.5° and 31°C respectively.

The optimal pH range for interferon production was found to be between pH 7.1 to 7.6, and a drop of pH to 6.75, or an increase of pH to 7.8 resulted in a lower yield. However, the upper limit of the optimal pH for inducing interferon

formation was found to be lower than that for the virus growth. At pH 7.8, the yield of interferon was poor but a good yield of the infective virus was found. In contrast, at pH 7.1, an environment unfavourable for virus multiplication, a good yield of interferon was obtained.

Using pH 7.8 and an incubation temperature at 34.5°C, favorable for virus growth and unfavorable for the interferon production, the titers of Peking strain of Japanese B encephalitis virus propagated in chick embryo cells were always 6.00 log TCD₅₀/0.03 ml or above.

These studies suggest that the effect of temperature and pH on the virus growth may be partially explained by the production of interferon. Thus, it may provide some evidence for the suggestion that fever and pH variation which usually occur in virus infection in man and animals may play an important role in the recovery from virus infection.