

# 皮下接种流行性乙型脑炎病毒 RNA 引起 小白鼠产生对该病毒攻击的抵抗力

陈伯权 汪 媛 柳元元

(中国医学科学院流行病学防治研究所,北京)

本实验初步观察到,用不致死量乙型脑炎病毒感染性 RNA,对小白鼠皮下接种未引起病毒在动物体内繁殖,亦未见到明显的中和抗体产生,但接种后的动物对病毒攻击有一定抵抗力。

用热和含过氧化物的乙醚处理 RNA 后,同时破坏了 RNA 的感染性及引起动物产生抵抗力的作用。但用紫外光、超声波和 RNA 酶(在 2—4°C)处理时,虽然破坏了 RNA 的感染性,而不完全破坏其引起动物产生抵抗力的作用。

文中对病毒 RNA 引起动物产生抵抗力的作用原理进行了初步的讨论。

关于核酸(DNA 和 RNA)是否有免疫原性及能否产生抗体的问题,目前仍有争论。1940 年左右一些作者报告<sup>[1,2,3,4]</sup>若干细菌的 RNA 能从特异性血清中吸收抗体而产生沉淀。然而,1960 年报道<sup>[5]</sup>虽然观察到某些细菌的 DNA-蛋白质复合物具有高度的免疫原性,但其抗血清则缺乏对 DNA 的特异性反应。在病毒方面,1948 年有篇报告指出<sup>[6]</sup>,如果将萝卜黄斑病毒的 RNA 抽提出,剩余的病毒蛋白质的免疫原性大大降低。1961 年提出<sup>[7]</sup>,病毒性疾病的长期免疫,可能与病毒核酸在细胞中不断以某种形式复制而引起一定程度的免疫力有关。

为了解流行性乙型脑炎(简称乙型脑炎)病毒 RNA 是否具有引起动物对该病毒攻击的抵抗力和产生特异性中和抗体,进行了本实验。目的在于获得有关利用病毒核酸进行抗病毒免疫可能性的实验资料。

## 材料与 方法

一、病毒株:乙型脑炎病毒京卫研 1 株。

二、感染性核酸的提取:参看资料[8]进行。

三、抵抗力测定:取 17 日龄小白鼠(体重在 6—8 克之间)皮下接种 0.1 毫升不同稀释度的核酸(或病毒)为试验组。同时设正常小白鼠为对照组。二星期后,将各组动物分成 6—7 小组,每小组 4 只,以不同稀释度的京卫研 1 株进行皮下攻击,观察 3 周。按里德-明奇(Reed-Muench)<sup>[9]</sup>法分别计算试验组和对照组的 LD<sub>50</sub> 致死量。以对照组的 LD<sub>50</sub> 滴度减去试验组的 LD<sub>50</sub> 滴度,差数在 1 个对数以下为阴性,1.1—1.69 对数之间者为可疑,1.69 对数以上者为阳性,即认为有抵抗力。

四、血清中和抗体测定:在接种病毒或核酸后一定时间,从小白鼠颈静脉取血,分离血清,按稀释病毒固定血清法测定中和抗体。

五、病毒及其 RNA 感染力的滴定:脑内接种 3 周龄小白鼠,每只 0.03 毫升不同稀释材料,观察 2 周。按里德-明奇法计算 LD<sub>50</sub> 致死量。

## 实 验 结 果

一、接种感染性病毒 RNA 的动物对该病毒攻击的抵抗力

以等渗磷酸缓冲盐水制备病毒悬液,

本文 1973 年 7 月 6 日收到。

提取 RNA<sup>[6]</sup>，所得 RNA 的紫外光的光密度曲线为核酸的特有曲线，O. D. 260m $\mu$ /O. D. 280m $\mu$  在 2.0 左右。该制剂用 0.5 M NaCl-1/200M 磷酸缓冲盐水稀释后，经皮下接种小白鼠(6—8 克)，于二周后测定动物对该病毒攻击的抵抗力。同时，取一组小白鼠皮下接种 10<sup>-1</sup> 的感染性 RNA，接种后 1、3、5、7、9、12 天解剖小白鼠取脑，制成 10% 的鼠脑悬液，再在鼠脑内盲传一代分离病毒。

结果(表 1)，动物在接种不致死量的感染性 RNA 后均呈不同程度的抵抗力，抵抗力的高低与 RNA 的感染滴度似无明显关系。滴度较低者反而获得较高的抵抗力，而用 10<sup>-1</sup> 浓度的 RNA 接种者，则比用 10<sup>-2</sup> 或 10<sup>-3</sup> 稀释度接种者获得较高的抵抗力。二次病毒分离结果均为阴性。

表 1 接种乙型脑炎 RNA 后小白鼠对病毒攻击的抵抗力

RNA 滴度* log LD <sub>50</sub> (脑内)	接种量		接种后动物死亡率 (%)	抵抗力指数 (log)	病毒分离
	稀释度	按计算相当 log LD <sub>50</sub> ** (脑内)			
<1.95	10 <sup>-1</sup>	<0.95	0	>4.30	
<2.15	"	<1.15	0	>6.20	
<2.40	"	<1.40	0	>4.90	阴性
2.15	"	1.15	0	5.50	阴性
4.90	10 <sup>-2</sup>	2.90	0	2.56	
5.73	10 <sup>-3</sup>	2.73	0	3.88	
5.13	"	2.15	0	2.87	

\* RNA 提取物的感染性滴度。  
\*\* 接种的感染性 RNA 的实际感染量。

## 二、皮下接种微量和不致死量病毒后动物对病毒攻击的抵抗力

为了了解动物抵抗力的产生，是否由于接种了活的 RNA，在动物体内引起微量病毒的繁殖而产生抗体，从而使动物具

有免疫力。用小于或等于 0.49 log LD<sub>50</sub> 的病毒经皮下接种小白鼠，在二周内部份动物死亡。将活存者分组，进行抵抗力测定。由表 2 可见，接种 0.49 log LD<sub>50</sub> 者有 55% 的小白鼠死亡，其活存者对病毒攻击有抵抗力，其他组均无抵抗力。

表 2 接种小量活病毒后小白鼠对病毒攻击的抵抗力

病毒滴度* log LD <sub>50</sub> (脑内)	接种量		接种后动物死亡率 (%)	抵抗力指数 (log)
	稀释度	按计算相当 log LD <sub>50</sub> ** (脑内)		
8.49	10 <sup>-8</sup>	0.49	55	2.34
8.65	10 <sup>-8</sup>	0.67	20	1.34
8.83	10 <sup>-9</sup>	1.83	20	0
8.65	10 <sup>-10</sup>	2.65	0	1.43
8.49	10 <sup>-10</sup>	2.49	0	0.86

\* 原液病毒的滴度。  
\*\* 实际接种的致死量。

## 三、接种病毒 RNA 和微量病毒后动物血清中和抗体的比较

在接种病毒 RNA 和微量病毒后一周、二周、一月，分别由小白鼠颈静脉采血测中和抗体，结果见表 3。接种病毒者在 1—2 周内产生较高的中和抗体，但对病毒攻击的抵抗力却较低。用病毒 RNA 接种者则相反。

表 3 接种病毒或其 RNA 后小白鼠血清中和抗体水平的比较

材料	接种量		抵抗力指数 (log)	血清中和抗体 (log)		
	稀释度	感染剂量 log LD <sub>50</sub> (脑内)		一周	二周	一月
病毒	10 <sup>-8</sup>	0.69	1.34	2.33	2.58	0.67
	10 <sup>-8</sup>	≥0.77	0	0	0	0.33
RNA	10 <sup>-1</sup>	2.90	2.56	0.33	0.33	0
	10 <sup>-3</sup>	2.73	3.88	—	1.34	—
	10 <sup>-3</sup>	2.15	2.87	—	1.40	—

#### 四、用不同方法处理感染性病毒 RNA 后对其引起动物抵抗力的影响

在表 1 中我们观察到, 病毒 RNA 免疫小白鼠后获得的抵抗力, 与 RNA 的感染性无明显关系。提取的 RNA 感染滴度低者, 反而获得较高的免疫力。这种现象是否由于在提取病毒 RNA 的过程中, 由于超声波的强度不同或其他因素, 使部分 RNA 遭到破坏, 而这种降解的 RNA 仍具有一定的免疫作用。为此, 分别用加热、含过氧化物的乙醚(以 KCl 试剂测定)、紫外光照射、超声波和 RNA 酶(在 2—4°C 作

用一定时间)处理病毒 RNA, 然后经皮下接种动物, 观察动物在接种后产生抵抗力的情况。结果(表 4)指出, 用加热及用含过氧化物的乙醚破坏的病毒 RNA 失去对小白鼠脑内的感染性, 同时也丧失了使动物产生抵抗力的作用。超声波、紫外光虽部分破坏其感染力, 但仍保留其引起动物产生抵抗力的作用。RNA 酶处理完全破坏其感染性, 但却不完全破坏其引起动物产生抵抗的作用, RNA 酶处理时间较长者, 对动物产生的保护作用反比时间短者为高。

表 4 用不同方法处理的病毒 RNA 接种小白鼠后观察其对病毒攻击的抵抗力

处 理 方 法	实 验 次 数	灭 活 情 况		接 种 量		抵 抗 指 数 (log)	
		处理前滴度 log LD <sub>50</sub> (脑 内)	处理后滴度 log LD <sub>50</sub> (脑 内)	稀 释 度	按计算相当 log LD <sub>50</sub> (脑 内)		
加 热 (80°C 17 分)	1	4.37	<1.5	10 <sup>-2</sup>	<1.5	1.41	
含 过 氧 化 物 的 乙 醚	1	5.00	<1.5	10 <sup>-2</sup>	<1.5	0.71	
	2	5.00	<1.5	10 <sup>-2</sup>	<1.5	0.21	
	3	5.00	>3.5	10 <sup>-1</sup>	>2.5	1.41	
	4	5.00	>3.5	10 <sup>-1</sup>	>2.5	1.22	
超 声 波 (1500 赫 150 分)	1	4.37	<1.5	10 <sup>-2</sup>	<1.5	3.00	
	2	5.00	>3.5	10 <sup>-2</sup>	>1.5	2.26	
	3	5.00	>3.5	10 <sup>-2</sup>	>1.5	3.66	
紫 外 光 (15 瓦 灭 菌 灯 75 分)	1	5.00	1.67	10 <sup>-2</sup>	1.67	2.37	
	2	5.00	2.00	10 <sup>-2</sup>	0	2.57	
	3	5.00	2.00	10 <sup>-2</sup>	0	2.22	
RNA 酶 (10 微克/毫升)	60 分	1	5.00	<1.50	10 <sup>-2</sup>	>1.50	2.21
		2	>5.00	<0.50	10 <sup>-2</sup>	>2.50	2.30
	5 分 10 分 39 分	3	5.33	<0.50	10 <sup>-1</sup>	>1.50	0
		''	''	''	''	''	1.52
		''	''	''	''	''	1.75
	10 分 50 分 100 分	4	4.75	<0.50	10 <sup>-1</sup>	>1.50	1.00
		''	''	''	''	''	1.27
		''	''	''	''	''	2.74

## 讨 论

据报告,用酵母 RNA 或精子 RNA 静脉注射或混合在高蛋白食物中喂小白鼠,可以提高动物对 MM 病毒的抵抗力<sup>[10]</sup>。用石碳酸从胰脏核糖体抽提 RNA,分别将核糖体或其 RNA 接种小白鼠,可使动物增加免疫耐受性<sup>[11]</sup>。本文的表 1、2、3 指出,乙型脑炎病毒 RNA 经皮下注射小白鼠后,虽然脑内查不到有病毒繁殖,血液查不出明显的中和抗体,但动物对病毒攻击却有相当的抵抗力。相反,用少量病毒皮下感染、活存者血液虽然有明显的中和抗体,但动物对病毒攻击的抵抗力却不如用 RNA 免疫者。这些说明 RNA 引起动物保护作用的原理,可能与中和抗体无关。那么,这种抵抗力是怎样产生的呢?许多报告<sup>[12-14]</sup>指出,用多种微生物和组织 RNA 或 DNA 大量接种细胞组织培养时,均能引起干扰素的产生。因此本实验中观察到的抵抗力可能是由于病毒 RNA 诱发干扰素的结果。

特别值得提出的,本实验发现用超声波、紫外光、RNA 酶(2—4℃作用)处理 RNA,虽然破坏其感染性,但并不完全破坏其对动物的保护作用。用 RNA 酶处理 5—10 分钟对小白鼠产生的保护作用,反而不如处理时间长者(60 和 100 分钟)。这是否由于一定条件下灭活的 RNA 或经处理而降解的 RNA 片段,仍保留其产生干扰素或引起其他免疫的功能,这些问题值得进一步研究。

近来不少学者报告,人工合成的聚核

苷酸及双链病毒 RNA 具有刺激动物体内产生抗体与干扰素的作用,对这些化学物质引起动物对病毒感染的抵抗力也进行了一些研究<sup>[15]</sup>。用超声波处理人工合成的聚 IG: c 及聚 I: c 以降低其分子量,可增加其诱导干扰素产生的作用,并减少其毒性<sup>[16]</sup>。这些材料可能有助于解释本实验中用 RNA 酶和超声波处理所获得的结果。

## 参 考 资 料

- [1] Menzel, A. E. O. & Heidelberger, M.: *J. Biol. Chem.*, 124:307, 1938.
- [2] Sevag, M. G., Laekman, D. B. & Smolens, J.: *J. Biol. Chem.*, 124:425, 1938.
- [3] Heidelberger, M. & Scherp, H. W.: *J. Immunol.*, 37:563, 1939.
- [4] Laekman, D. B., Mudd, S. & Sevag, M. E.: *J. Immunol.*, 40:1, 1941.
- [5] Olitzki, A. L.: *Brit. J. Exp. Path.*, 41: 623, 1960.
- [6] Matthews, R. E. F.: *J. Gen. Microbiol.*, 2: XXVII, 1948.
- [7] Herriott, R. M.: *Science*, 134:256, 1961.
- [8] 柳元元、詹美云、许兆祥、柳华晨、关学勤: *微生物学报*, 8: 231, 1962.
- [9] Reed, L. J. & Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, 27:493, 1938.
- [10] O'Dell, T. B. Wright, H. N. & Beiter, R. N.: *J. Pharmacol.*, 107:232, 1953.
- [11] Trakattelis, A. C., Axelrod, A. E., Montjar, M. & Lamy, E.: *Nature*, 202:154, 1964.
- [12] Isaacs, A., Cox, R. A. & Roten, Z.: *Lancet*, II:113, 1963.
- [13] Roten, Z., Cox, R. A. & Isaacs, A. A.: *Nature*, 197:564, 1963.
- [14] Jensen, K. F., Neal, A. L., Owens, R. E. & Warren, J.: *Nature*, 200:433, 1963.
- [15] Beers, R. F. & Braun, W.: "In Biological Effects of polynucleotides" pp. 138-248, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1971.
- [16] Shiokawa, K. & Yaoi, H.: *Arch. Für Virusforsch.*, 38:109, 1972.

## DEVELOPMENT OF RESISTANCE IN MICE AGAINST SUBCUTANEOUS CHALLENGE WITH JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS AFTER INJECTION OF THE VIRUS RNA

CHEN BO-CHUAN, WANG YÜAN & LIU YÜAN-YÜAN

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

When sublethal doses of Japanese B encephalitis viral RNA, extracted from infected mouse brains, were introduced subcutaneously into two-week old mice, the animals developed resistance against subcutaneous challenge with lethal doses of Japanese B encephalitis virus. Neither viral multiplication in the brain, nor neutralizing antibody production in the blood was observed. This RNA, after treatment with supersonic vibration, ultraviolet radiation or RNase, partially or totally lost its infectivity, yet retained its ability of introducing resistance in the animals. It was suggested by the au-

thors, that the development of such resistance was due to some mechanisms, stimulated by the injected RNA, other than antibody production. Whether it was accomplished by interferon formation or by cellular immunity of special patterns was still unclear. As the degraded RNA remained effective to induce resistance against virus challenge, it may be suggested that the RNA fragments thus produced after various treatments, seemed to possess certain informations responsible either for stimulating interferon formation or other cellular immunity mechanisms.