

# 流行性乙型脑炎病毒的溶血性及不同株的 溶血性、血凝性和毒力比较

朱家鸿 曾毅 丘福禧

(中国医学科学院流行病学防治研究所,北京)

作者发现流行性乙型脑炎(简称乙脑)病毒具有溶解红血细胞(简称溶血)的性能,并且这种性能可被特异性免疫血清抑制。出现明显的乙脑病毒溶血现象的条件是:在 pH6.4 时吸附病毒,然后在偏酸或偏碱的条件下,在 37°C 放置 4—6 小时。乙脑病毒除了能溶解鸽红血细胞外,还能溶解家兔红血细胞。冰冻融解和超声波处理不能提高乙脑病毒的溶血能力。

七株对小白鼠致死力较强的乙脑病毒都具有较高的血凝素滴度。对其中五株进行了溶血性能的测定,结果都有明显的溶血性。其中西安<sub>1</sub>株的一个弱毒变异株的血凝性极低,并且不引起溶血现象。

西安<sub>1</sub>强毒株和弱毒株的蚀斑滴度(PFU)相似。强毒株在金地鼠肾细胞中连续传代后,其血凝性和溶血性随着病毒对小白鼠致死力(LD<sub>50</sub>)的减弱而下降。弱毒株返回乳小白鼠脑内连续传代后,三者都回升,表明弱毒株的血凝性和溶血性确实发生了改变,并且这种改变可能与致死力的改变有关。

1948年 Morgan<sup>[1]</sup>首先发现流行性腮腺炎病毒能溶解某些动物的红血细胞,以后其他人报告新城鸡瘟病毒<sup>[2]</sup>、仙台病毒<sup>[3]</sup>和麻疹病毒<sup>[4]</sup>同样具有这种性能。1963年我们在研究红血细胞对乙型脑炎病毒的吸附和释放的过程中,发现乙型脑炎病毒能溶解红血细胞。这项工作是用乙脑病毒高株进行的。随后,我们对乙脑病毒不同株的溶血性、血凝性和毒力的关系进行了比较研究。

## 材料和方法

### 病毒

#### 1. 高株<sup>[5]</sup>(鼠脑第 26—31 代)

(1) 乳小白鼠脑病毒

(2) 组织培养病毒:为鸡胎成纤维细胞组织培养病毒<sup>[6]</sup>。

(3) 病毒提取:用生理盐水将 36—38% 甲醛溶液稀释成 1:30,加入洗涤过 3 次的鸽红血细

胞中,等量混合,置 37°C 恒温,8—12 小时后取出,用大量生理盐水洗涤 3 次。用 pH7.0 的磷酸缓冲液将甲醛处理过的鸽红血细胞配制成 10% 悬液。将感染了乙脑病毒的乳小白鼠脑研磨,用 pH9.0 的硼酸缓冲液配制成 1:10 的悬液,经 3,000 转/分离心 30 分钟,吸取上清液。将红血细胞悬液与以上病毒悬液等量混合,在 4°C 水浴中吸附 10 分钟。然后经 2,000 转/分离心 5 分钟,弃去上清液,将红血细胞轻轻地洗涤一次。将与原病毒液等量的 pH 9.0 硼酸缓冲液加到被沉淀下来的红血细胞中,充分摇匀,放置室温(18—22°C)释放 2 小时,并不断地摇动。

2. 京卫研<sub>1</sub>株(鼠脑 19—25 代)。

3. 中山株(鼠脑 76—82 代)。

4. 猪<sub>1</sub>株(鼠脑 19—25 代),1955 年从不显性感染的猪血液里分离得到。

5. 闽肥株(鼠脑 19—25 代),1960 年从福建惠安一死亡病人脑组织中分离得到。

本文于 1977 年 6 月 20 日收到。

6. 协,株(鼠脑 5—8 代), 1954 年北京协和医院检验科从死亡病人分离得到。

7. 西安,株(鼠脑 14—17 代), 从蚊分离得到。

8. 西安,弱毒株 HK<sub>100</sub>“12-1-7”<sup>[1]</sup>, 由北京药品生物制品检定所供给。该病毒用于本研究时, 再次用乙脑病毒免疫血清做蚀斑抑制试验, 证实确系乙脑病毒的弱毒株。

**红细胞** 为鸽、成鸡、家兔、绵羊的红血细胞, 经生理盐水洗涤 3 次。

**免疫血清** 为乙脑病毒特异性兔免疫血清, 经 56°C 30 分钟灭活, 加入 4 倍量的丙酮重复处理 2 次, 放置 37°C 恒温室, 使残余的丙酮挥发。然后加入相当于原血清量的 pH9.0 的磷酸缓冲液, 使蛋白质溶解。再经离心, 吸取上清液。该血清的血凝抑制滴度为稀释 1:160 时能抑制 8 个血凝单位。正常兔血清对照也按此法处理。

**病毒的冰冻融解** 将病毒悬液先放在低温酒精槽中快速冰冻, 5 分钟后, 转入 -50°C 的低温冰箱, 冰冻 30 分钟, 取出放于室温渐渐融解。按同样方法重复 3 次。

**病毒的超声波处理** 用上海中原电器厂出品的超声波发生器, 以每分钟一万四千赫兹的频率在 4°C 水浴中作用 2 小时。

**病毒的溶血试验和溶血性的测定** 用 pH9.0 的磷酸缓冲液<sup>[1]</sup>将病毒稀释成不同稀释度, 各 1 毫升, 加等量的用 pH6.2 磷酸缓冲液配制的 4% 鸽红细胞悬液。混合(pH 为 6.4)后, 置 4°C 水浴中吸附 10 分钟。经 1,000 转/分离心 5 分钟, 弃去上清液, 加入 2 毫升 pH6.2 的磷酸缓冲液。混匀后置 37°C 4—6 小时, 然后摇匀, 离心 10 分钟, 小心吸取上清液。经 1:3 稀释后, 测定光密度(用国产 71 型光电比色计, 滤光板波长为 420 毫微米)。用同样方法处理的灭活病毒作为对照管。

溶血性强弱以光密度表示。

**病毒的血凝性的测定** 用 pH9.0 的磷酸缓冲液稀释血凝素。用 pH6.2 的磷酸缓冲液配制 0.5% 鸽红细胞悬液。病毒与红细胞等量混合, 总量为 0.5 毫升。最后反应时的 pH 为 6.4。充分摇匀后静置于室温, 一小时后记录结果。

**病毒的致死力的测定** 病毒的致死力以脑内感染小白鼠的 LD<sub>50</sub> 来表示。用正常 3 周龄小白鼠, 脑内接种 10 倍稀释的病毒悬液 0.03 毫升, 每一稀释度接种小白鼠 4 只, 观察 2 周。按 Reed 和 Muench 方法计算。

**鸡胎成纤维细胞和金地鼠肾细胞的制备** 按张汉荆等<sup>[9]</sup>和俞永新等<sup>[10]</sup>的方法。

**病毒的 PFU 测定** 在长成致密的鸡胎成纤维细胞(每毫升 400 万细胞)小扁瓶中接种不同稀释度的病毒悬液 0.5 毫升, 在 37°C 吸附 2 小时。将残余病毒洗掉, 加入营养性琼脂<sup>[9]</sup> 4 毫升, 观察 6 天, 记录形成的蚀斑数。PFU 以按 Dulbecco 方法<sup>[11]</sup> 计算每毫升病毒悬液所形成的蚀斑数表示。

## 结 果

### 一、乙脑病毒的溶血性

#### (一) 乙脑病毒的溶血性与血凝素的关系

从表 1 可见, 随着血凝素量的降低, 其溶解红细胞的能力也减弱。不仅乳小白鼠脑病毒具有溶血性, 而且经红细胞吸附后释放的提取病毒和鸡胎成纤维细胞组织培养病毒也具有不同程度的溶血性。而正常细胞培养液、正常乳小白鼠脑悬液以

表 1 不同方法制备的乙脑病毒悬液的溶血性

病毒悬液	1:2,560	1:1,280	1:640	1:320	1:160
乳小白鼠脑病毒	0.499	0.340	0.140	0.105	—
提取病毒	0.478	0.352	0.124	0.068	—
组织培养病毒	—	—	0.112	0.049	0.012

注: 表内数字为光密度。表 2—4 均同。

及灭活的乳小白鼠脑病毒都不引起溶血现象。

为进一步证实这种溶血现象是由病毒所引起,在未经稀释的病毒悬液(血凝素滴度为 1:5, 120) 中加入等量不同稀释度的乙脑病毒特异性兔免疫血清,在室温和 10 分钟,然后再进行溶血性的测定。图 1

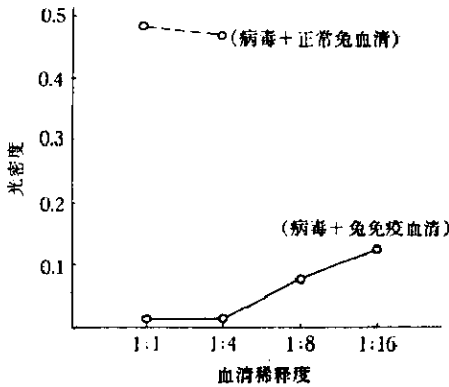


图 1 特异性兔免疫血清对乙脑病毒溶血性能的抑制作用

表明,溶血现象能被特异性兔免疫血清抑制,随着免疫血清稀释度的升高,其溶血现象相应地增加。而正常兔血清不能抑制病毒的溶血性。

## (二) 乙脑病毒的溶血条件

1. pH 对溶血的影响: 溶血现象的出现与病毒吸附在红血细胞时的 pH 有关,也与溶血试验进行时的 pH 有关。从表 2 可见,吸附的 pH 为 6.4 时产生的溶血现象比 pH 为 7.0 时明显。进行溶血试验时的 pH,在偏酸 (pH 6.2) 时溶血现象明显,在偏碱 (pH 9.0) 时也较明显。

2. 温度对溶血的影响: 吸附病毒的红血细胞分别放置在 37°C、22°C 和 4°C 进行溶血试验。表 3 的结果表明,在 37°C 时溶血现象最明显,其次是在 22°C,而在 4°C 时最差。

3. 红血细胞的种类对溶血的影响: 比

表 2 pH 对乙脑病毒溶血性的影响

吸附 pH	溶血 pH	乙脑病毒的血凝素滴度				
		1:5, 120	1:2, 560	1:1, 280	1:640	1:320
6.4	6.2	0.642	0.618	0.588	0.312	0.116
	7.0	0.264	0.185	0.072	0.028	0.012
	8.3	0.427	0.294	0.248	0.117	0.060
	9.0	0.620	0.464	0.386	0.200	0.020
7.0	6.4	0.182	0.152	0.104	0.070	
	8.3	0.120	0.077	0.032	0.015	
	9.0	0.169	0.118	0.056	0.028	

表 3 温度对乙脑病毒溶血性的影响

编号	温度 (°C)		
	37	22	4
1	0.632	0.305	0.080
2	0.562	0.240	0.130

较了乙脑病毒对不同种类的红血细胞的溶血性。表 4 的结果表明,乙脑病毒对鸽和家兔红血细胞都具有溶血作用,对成鸡红

血细胞有极弱的溶血作用,而对绵羊红血细胞不引起溶血。

4. 超声波和冰冻融解对溶血的影响: 乳小白鼠脑病毒和组织培养病毒经超声波处理,其溶血性和血凝素滴度无改变。病毒经 3 次冰冻融解,其溶血性和血凝性都稍有下降。

## (三) 溶血现象出现与血凝素释放动态的比较

将在 pH 为 6.4 时吸附病毒的红血细

表 4 乙脑病毒对不同种类的红血细胞的溶血性

红血细胞种类 \ 血凝素滴度	1:5,120	1:2,560	1:1,280	1:640	1:320
鸽	0.512	0.348	0.206	0.10	0.03
家兔	0.432	0.350	0.260	0.215	0.19
成鸡	0.012	0.009	<0.001	—	—
绵羊	<0.001	<0.001	—	—	—

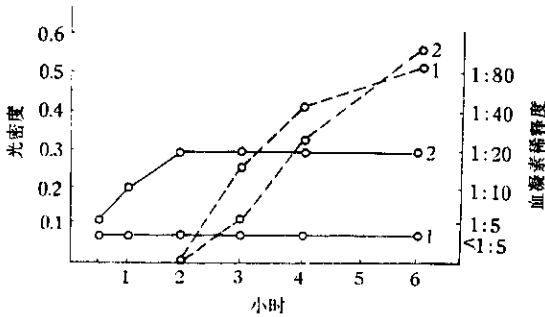


图 2 乙脑病毒的溶血现象出现与血凝素释放动态的比较  
“o---o”为光密度。“o—o”为血凝素。  
1. 在 pH6.2 时。 2. 在 pH8.3 时。

胞置于不同的 pH (pH6.2 及 pH8.3) 进行溶血试验和血凝素释放的观察。从图 2 可见, 在 pH 8.3 时血凝素的释放较溶血现象出现为早, 2 小时已达高峰。而在 pH6.2

时, 释放的血凝素滴度始终小于 1:5。在 pH8.3 和 6.2 时进行溶血试验, 4—6 小时后才出现明显的溶血现象, 在 6 小时最明显, 其最终的溶血能力无明显差别。

## 二、不同株乙脑病毒的溶血性、血凝性和毒力的比较

### (一) 不同病毒株的血凝性和致死力的比较

用七株乙脑病毒, 脑内接种乳小白鼠, 测定所产生的血凝素滴度 (HA)。同时脑内接种 3 周龄小白鼠, 测定致死力。还接种鸡胎成纤维细胞, 测定病毒的蚀斑滴度。从表 5 可见, 这七株病毒的致死力都较高,

表 5 不同株乙脑病毒的血凝性和致死力的比较

病毒材料	测定	病毒株						
		京卫研 <sub>1</sub>	闽肥	猪 <sub>17</sub>	高	中山	西安 <sub>14</sub>	协 <sub>4</sub>
鼠脑病毒	HA/0.25 毫升	1:2,560	1:5,120	1:5,120	1:10,240	1:5,120	1:2,560	1:5,120
	LD <sub>50</sub> /0.03 毫升	7.5	7.50	7.66	8.0	7.77	7.50	7.50
	LD <sub>50</sub> /HA	4.09	3.79	3.87	3.99	4.06	4.09	3.79
组织培养病毒	HA/0.25 毫升	1:160	1:320	1:320	1:320	1:160	1:160	1:160
	LD <sub>50</sub> /0.03 毫升	5.50	5.50	5.67	6.0	5.67	5.50	5.67
	LD <sub>50</sub> /HA	3.30	2.90	3.15	3.49	3.46	3.30	3.46

注: 测定 1:10 的乳小白鼠脑病毒悬液时, 以此液为 10° 计算。

各病毒株都有血凝素, 并且滴度差别不明显。

### (二) 不同病毒株的血凝性和溶血性的比较

为了解病毒弱毒株的血凝性和溶血

性, 我们用五个强毒株和一个弱毒株西安<sub>14</sub> HK<sub>100</sub>“12-1-7” HK<sub>6</sub> 感染乳小白鼠, 分别测定血凝性和溶血性。从表 6 可见, 五个强毒株都有血凝性和溶血性, 各株之间的滴度差别不大。弱毒株的血凝素滴度很低,

表 6 不同株乙脑病毒的血凝性和溶血性的比较

病毒株	高	京卫研 <sub>1</sub>	中山	猪 <sub>17</sub>	西安 <sub>14</sub>	西安 <sub>14</sub> 弱毒株
测定						
血凝素滴度	1:5,120	1:2,560	1:5,120	1:2,560	1:5,120	1:5
溶血性(以光密度表示)	4.980	3.250	5.250	4.280	4.764	<0.001

为 1:5, 并且未测出溶血性; 而其蚀斑滴度与强毒株相似。

(三) 不同代数的西安<sub>14</sub>病毒株的血凝性和致死力的比较

将病毒在金地鼠肾细胞中传代培养, 测定不同代数病毒的 HA、LD<sub>50</sub> 及 PFU。从表 7 可见, 西安<sub>14</sub>在早代时血凝素滴度和 LD<sub>50</sub> 都较高, 随着在金地鼠肾细胞中传代

次数的增多, 其血凝素滴度和 LD<sub>50</sub> 趋于下降。“12-1-7”株则连续3代都未测出血凝性, LD<sub>50</sub> 也很低。蚀斑滴度在各代基本上一致。

(四) 西安<sub>14</sub>弱毒株返回乳小白鼠脑内连续传代后血凝性、溶血性、致死力和蚀斑滴度的改变

将西安<sub>14</sub>弱毒株 HK<sub>100</sub>“12-1-7”HK<sub>7</sub> 以

表 7 乙脑病毒西安<sub>14</sub>强毒株和弱毒株不同代数的血凝素滴度和感染力

病毒株	代数	HA	-logLD <sub>50</sub> /0.03 毫升	-logPFU/毫升
西安 <sub>14</sub>	HK <sub>5</sub>	1:320	6.0	5.26
”	HK <sub>6</sub>	1:80	6.0	5.34
”	HK <sub>7</sub>	1:80	5.77	5.26
”	HK <sub>29</sub>	1:16	1.0	5.97
”	HK <sub>30</sub>	1:16	1.5	5.90
”	HK <sub>31</sub>	1:16	1.33	5.91
“12-1-7”	HK <sub>7</sub>	<1:1	1.33	5.15
”	HK <sub>8</sub>	<1:1	1.33	5.30
”	HK <sub>9</sub>	<1:1	0.5	4.89

\* 在金地鼠肾细胞培养中的病毒悬液。

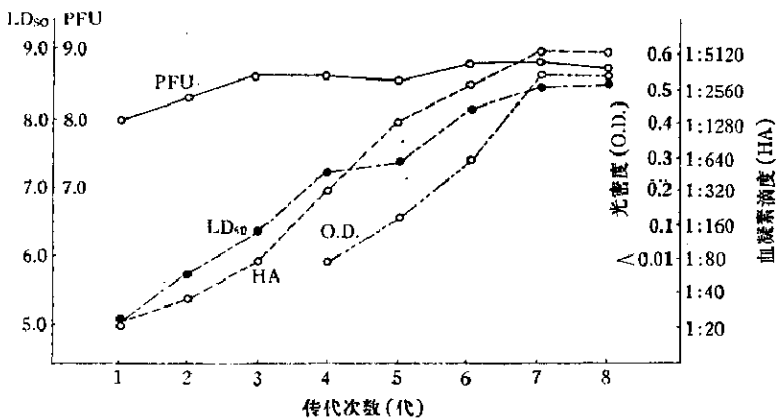


图 3 乙脑病毒西安<sub>14</sub>弱毒株返回乳小白鼠脑内连续传代后的变化

原液0.02毫升脑内接种乳小白鼠(4天龄),在第1、2代时乳小白鼠第6天才发病;随着传代次数的增加,乳小白鼠发病的潜伏期逐渐缩短;传至第6代时,感染病毒后的乳小白鼠第3天就发病。将所收获的各代发病的脑组织进行血凝性、溶血性、LD<sub>50</sub>及PFU的测定。从图3可见,在最初几代时,血凝素滴度和致死力都较低,未能测出溶血性。随着传代代数的增加,血凝性、溶血性和致死力都升高,第7—8代时达高峰,与原强毒株相似。各代的蚀斑滴度无显著差别,滴度波动在一个对数以内。

## 讨 论

我们发现乙脑病毒能溶解红血细胞。这种溶血性可被特异性免疫血清抑制,而对照不发生溶血现象。在我们的研究过程中,见到 Karabatsos<sup>[12]</sup> 报告东方和西方马脑脊髓炎病毒也有溶血性。由此可见,不仅粘液类病毒有溶血性,而且节肢动物传播的病毒也具有这种性能。这对进一步认识病毒的生物学性质有一定的意义。

乙脑病毒溶解红血细胞需要一定的条件。在pH为6.4时吸附病毒,然后在偏酸或偏碱的条件下,放置在37℃ 4—6小时后,出现明显的溶血。推测可能在pH为6.4时,病毒在红血细胞表面上的吸附较牢固,引起红血细胞表面结构或功能的改变,从而导致溶血现象。也可能在pH 6.4时,红血细胞吸附的病毒量较多,所以溶血现象比较明显。

有人认为乙脑病毒的绝大多数病毒株具有血凝性<sup>[13,14]</sup>,但是也有人<sup>[15,16]</sup>认为各株之间的滴度差别明显,或个别株无血凝性。我们用不同的强毒株感染乳小白鼠和鸡胎成纤维细胞,结果都能测出较高的血凝素滴度、致死力和明显的溶血性。各作者用

不同株所测定的血凝性不一致,可能与各实验室的具体条件不同有关。我们认为乙脑病毒的血凝性和溶血性可能是该病毒强毒株的共性。

我们观察到西安<sub>14</sub>强毒株经金地鼠肾细胞传代后,随着致死力下降,其血凝性和溶血性都降低;甚至消失。将西安<sub>14</sub>弱毒株返回乳小白鼠脑内连续传代,结果随着传代次数的增加,乳小白鼠发病的潜伏期逐渐缩短,血凝性、溶血性和致死力逐渐上升。这表明西安<sub>14</sub>弱毒株的血凝性和溶血性确实发生了改变,并且这种改变可能与致死力的改变有关。进一步应用挑选蚀斑的方法,了解不同病毒颗粒的血凝性、溶血性与致死力的关系,对乙脑病毒的变异和减毒株的选择可能有一定的意义。

## 参 考 资 料

- [1] Morgan, H. R., et al.: *J. Exper. Med.*, **88**: 503—514, 1948.
- [2] Kilham, L.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **71**:63—66, 1949.
- [3] 铃木敏三: *Virus*, **6**: 222—231, 1956.
- [4] DeMeio, J. L.: *Virology*, **16**:342—344, 1962.
- [5] 黄祯祥、戴莹: *微生物学报*, **6**: 42—52, 1958.
- [6] 朱家鸿、丘福禧、曾毅: *微生物学报*, 待发表.
- [7] 李河民、俞永新、敖坚、方珍: *微生物学报*, **12**: 41—49, 1966.
- [8] Clarke, D. H. and Casals, J.: *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, **7**:561—573, 1958.
- [9] 张汉荆、王逸民、郑云凯: *微生物学报*, **9**: 253—260, 1963.
- [10] 俞永新、敖坚、雷文绪、李河民: *微生物学报*, **8**: 260—268, 1962.
- [11] Dulbecco, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.)* **38**:747—752, 1952.
- [12] Karabatsos, N.: *J. Immunol.*, **91**:76—82, 1963.
- [13] 藤田信男: *Virus*, **2**: 202—209, 1952.
- [14] 波多野基一: *Virus*, **2**: 187—194, 1952.
- [15] Sabin, A. B. and Buescher, E. L.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **74**:222—230, 1950.
- [16] 周培安: *微生物学报*, **4**: 67—75, 1956.

# THE HEMOLYTIC ACTIVITY OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS AND COMPARISON OF THE HEMOLYTIC ACTIVITY, HEMAGGLUTINATING ACTIVITY AND VIRULENCE OF DIFFERENT STRAINS

Zhu Jia-hong, Zeng Yi and Qiu Fu-xi

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

The authors found that Japanese B encephalitis virus possessed hemolytic activity which could be inhibited by specific immune serum. The factors conditioning the appearance of hemolysis were as follows: Virus was adsorbed to the red blood cells at pH 6.4 and then adjusted to acid or alkaline condition and incubated at 37°C for 4—6 hours. Definite hemolysis occurred in tubes containing virus, while in the control, there was no hemolysis at all. Both pigeon and rabbit red blood cells could be hemolyzed by Japanese B encephalitis virus. Freezing and thawing and ultrasonic vibration did not raise the hemolytic activity.

Seven strains of Japanese B encephalitis virus which were highly lethal to mice when inoculated intracerebrally all

possessed rather high titers of hemagglutinin. Hemolytic activity was determined in 5 strains, all gave positive results. An attenuated line of the Si-An-14 strain had very low hemagglutinating activity, and showed no hemolysis.

The plaque-forming titers of the virulent and attenuated lines of the Si-An-14 strain were similar. Hemagglutinating and hemolytic activities and virulence decreased, after serial passages in gold hamster kidney cell cultures. When the attenuated strain was passaged successively in the brain of suckling mice, all these 3 properties returned, showing that changes in hemagglutinating and hemolytic activities of the attenuated strain were possibly correlated with its change in virulence.