

甲₃型流感病毒在小白鼠肺部的繁殖

柳元元 张颖妹 夏丽娟 董永坤

(中国医学科学院病毒研究所生化组, 北京)

甲₃型流感病毒与 DEAE-D 溶液同时接种鼠肺后, 再用 DEAE-D 溶液进行鼻腔刺激, 继续传若干代后, 病毒很快呈现对鸡红血球有凝集作用, 并使动物死亡。血凝滴度和小白鼠 LD₅₀ 滴度分别达 1:64 和 5.0—6.0。用鸡胚病毒的抗血清进行抑制时, 抑制滴度与鸡胚病毒相似, 但是不被甲₃型和仙台病毒的抗血清所抑制。

用原毒株的灭活疫苗免疫小白鼠, 然后用鼠肺病毒加 DEAE-D 攻击, 疫苗表现高的保获代价(用正常尿囊液接种作为对照)。

本文讨论了利用 DEAE-D 刺激所获得的鼠肺病毒进行抗流感病毒的药物筛选。

流感病毒小白鼠实验模型, 对于鉴定流感疫苗及筛选有效的抗流感病毒的化学药物的工作具有重要意义。但是目前除了甲₃型及甲₁型病毒已获得能在鼠肺繁殖并能使小白鼠致死的毒株外^[1,2], 其它如甲₂型及甲₄型虽能在鼠肺繁殖, 但未能呈现血凝反应, 亦不致死小白鼠。由于缺乏目前流行毒株的实验模型, 对疫苗的鉴定工作除了通过现场观察外, 实验室中只能在免疫小白鼠后, 用经过小白鼠传代但不完全适应的病毒攻击, 然后用鸡胚测定免疫组和对照组动物肺部繁殖的病毒量^[3], 或测定血清中的抗体水平来确定效果。这对鉴定疫苗及探寻药物的效力来说多少是盲目的, 但目前不少实验室仍用甲₃或甲₁型鼠肺病毒来筛选抗目前流行毒株的化学药物。应该注意, 甲₃型病毒在若干生物学性质方面毕竟和甲₃、甲₁型有所不同, 为了获得确实有效的结果, 还须用甲₃型病毒的动物模型进行试验。

我们曾用低渗盐水刺激以加速甲₃型流感病毒在鼠肺的适应^[4]。本文报道利用 DEAE-D 刺激使甲₃型流感病毒京防 75-39

株在普通瑞士小白鼠肺部繁殖, 并呈现血凝作用, 同时引起小白鼠死亡的实验结果。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 病毒株: 京防 75-39 株第 10 代尿囊液病毒。

2. 0.01 M 磷酸缓冲生理盐水(PBS); PH 7.4, 每毫升含青霉素 200 单位, 链霉素 200 微克。

3. DEAE-D(DEAE-葡聚糖)水溶液, 每毫升含 DEAE-D 4 毫克。

4. 小白鼠: 普通健康三周瑞士小白鼠, 体重 9—10 克。

(二) 方法

1. 鼠肺传代实验: 取尿囊液病毒 0.5 毫升, 加入等量 DEAE-D 水溶液。DEAE-D 的最后浓度为 2 毫克/毫升。用小白鼠 5—8 只, 在乙醚轻度麻醉下, 经鼻腔接种病毒液 0.02 毫升, 隔 6 小时后再用 DEAE-D 溶液(2 毫克/毫升)在同样麻醉条件下鼻腔接种 0.02 毫升作为刺激(第 7 代起改为 18 小时后刺激)。动物于室温下饲养 2—2.5 天, 然后由颈动脉放血致死, 无菌手术取出鼠肺,

本文 1978 年 9 月 28 日收到。

生理盐水洗净。取病变较严重之肺组织用 PBS 制成 20% 悬液,3000 转/分离心 30 分钟,弃沉淀并测定上清液的血凝滴度。

向 0.5 毫升鼠肺上清液中加入 0.5 毫升 DEAE-D 水溶液,同上法接种另一组小白鼠,同样用 DEAE-D 刺激、收获、制备 20% 悬液,如此连续往下传代。另用 0.05 M 的低渗盐水代替 DEAE-D 溶液,同样传代作为比较。

2. 鼠肺病毒血凝滴度测定：按常规,加血球后 20 分钟观察结果。

3. 鼠肺病毒 LD₅₀ 滴度测定：将鼠肺病毒先用 DEAE-D 水溶液稀释 1 倍,成 10% 悬液,然后用含 DEAE-D (2 毫克/毫升)的 PBS 溶液作 10 倍递增稀释到 10⁻⁸ 稀释度。接种到 9—10 克三周龄小白鼠鼻腔,每个稀释度 5 只,每只接种 0.02 毫升,感染病毒 18 小时后用 DEAE-D 溶液刺激,观察两周。死亡动物分别按稀释度解剖,取出鼠肺,同一稀释到混合制成 20% 悬液,离心,滴定其血凝效价。

4. 流感疫苗对小白鼠保获效价的鉴定：取三周龄小白鼠 (9—10 克) 若干只,在乙醚轻度麻醉下,鼻腔接种京防 75-39 株尿囊液灭活疫苗

0.02 毫升/只,小白鼠苏醒时再经腹腔接种同样疫苗 0.5 毫升/只,免疫后第 8 天通过鼻腔接种 10LD₅₀/0.02 毫升的鼠肺病毒悬液 (含 DEAE-D 2 毫克/毫升),18 小时后再依上述方法用 DEAE-D 刺激。对照组用 12 天龄正常鸡胚尿囊液代替病毒接种,同样攻击、刺激。动物被观察两周。

5. 血凝抑制试验：按常规,在室温下 20 分钟即可观察结果。

实 验 结 果

(一) 在 DEAE-D 的作用下,甲₁型流感病毒在鼠肺的繁殖

在 DEAE 的作用下,甲₁型流感病毒京防 75-39 株感染小白鼠鼻腔后,于第 3 代起即呈现血凝反应。同时肺部呈较明显的病变,说明已开始适应。第 7 代起 (于感染后 18 小时刺激) 血凝滴度即稳定于 1:64 (以鼠肺组织计算为 1:640)。于感染后用低渗盐水刺激,传到第 11 代的鼠肺病毒,其血凝反应仍为阴性。见表 1a, 1b。

表 1a 在 DEAE-D 的作用下京防 75-39 株流感病毒在鼠肺的繁殖

| 传代次数 | 刺激时间 (感染后 小时) | 血 凝 滴 度 | | | | | | | | | 用各代鼠肺悬液接种鸡胚受染尿囊液的血凝滴度 |
|------|---------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----------------------|
| | | 1:2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | |
| 1 | 6 | (+++) | +++ | +++ | ++ | + | — | — | — | — | 1:24 |
| 2 | 6 | (+++) | ++ | + | + | ± | — | — | — | — | 1:128 |
| 3 | 6 | (+++) | (+++) | ++ | + | — | — | — | — | — | 1:320 |
| 4 | 6 | (+++) | (+++) | (+++) | + | — | — | — | — | — | 1:512 |
| 5 | 6 | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) | ++ | + | — | — | — | 1:896 |
| 6 | 6 | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) | ++ | — | — | 1:896 |
| 7 | 18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | — | 1:896 |
| 8 | 18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | 1:1024 |
| 9 | 18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ± | — | — | 1:1024 |
| 10 | 18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | 1:1536 |
| 11 | 18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | — | — | 1:1536 |
| 12 | 18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | — | — | — | — |
| 正常 | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| 正常 | 18 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |

注：(++) 表示虽完全凝集但形状不典型。

表 1b 在 DEAE-D 的作用下京防 75-39 株流感病毒在鼠肺的繁殖

| 传代次数 | 刺激时间 (感染后 小时) | 血凝滴度 1:1 悬液 | 用鼠肺悬液接种 鸡胚受染尿囊液 的 HA 滴度 |
|------|---------------------|----------------|-------------------------------|
| 1 | 6 | — | — |
| 2 | 6 | — | — |
| 3 | 6 | — | 1:128 |
| 4 | 6 | — | — |
| 5 | 6 | — | 1:224 |
| 6 | 6 | — | — |
| 7 | 6 | — | — |
| 8 | 6 | — | 1:256 |
| 9 | 6 | — | — |
| 10 | 6 | — | 1:256 |
| 11 | 6 | — | — |

注：—表示未做。

(二) 鼠肺病毒的 LD₅₀ 滴度

滴定 3 周龄小白鼠经 DEAE-D 刺激传到第 8 代的鼠肺病毒的 LD₅₀ 效价, 结果为 5.0(见表 2)。

表 2 京防 75-39 鼠肺流感病毒株的 LD₅₀ 效价及死亡鼠肺悬液的 HA 滴度

| 病毒 稀释度 | 死亡鼠数/ 接种鼠数 | 平均死亡 数 | 计算 LD ₅₀ 效价 | 死亡鼠肺内 病毒 HA |
|------------------|---------------|-----------|---------------------------|----------------|
| 10 ⁻¹ | 5/5 | 4.2 | 5.0 | 1:64 |
| 10 ⁻² | 5/5 | 3.8 | | 1:64 |
| 10 ⁻³ | 5/5 | 4.8 | | 1:64 |
| 10 ⁻⁴ | 5/5 | 6.0 | | 1:64 |
| 10 ⁻⁵ | 2/5 | 6.5 | | 1:4 |
| 10 ⁻⁶ | 1/5 | 8.0 | | 1:4 |

小白鼠在第 3 天开始死亡, 8 天后不再死亡。将 10⁻¹ 到 10⁻⁴ 稀释度接种后在 5 天死亡的鼠肺组织(均呈 100% 的肺病变)制成悬液, 滴定其血凝效价, 结果均为 1:64, 而用 10⁻⁵—10⁻⁶ 稀释度接种后在 7 天后死亡所制备的鼠肺悬液, 血凝效价则甚低, 病变亦较轻。滴定第 10 代 LD₅₀ 为 5.8, 第 11 代为 6.0。甲₁ 型鼠肺病毒在 PBS 中于 2—4℃ 冰箱内放置时 LD₅₀ 效价容易下降, 故宜新鲜传代, 于一周内使用。

用低渗盐水刺激所得的鼠肺病毒, 虽能感染鸡胚(表 1b), 但传到第 10 代时仍不能致死小白鼠。

(三) 血凝抑制实验

用京防 75-39 株、兰生 601 株(甲₁)及仙台病毒的免疫血清对 DEAE-D 刺激获得的京防 75-39 株进行血凝抑制实验。结果表明, 经 DEAE-D 刺激获得的鼠肺病毒仍保留原来的甲₁ 型特异性, 对甲₁ 型流感及仙台病毒的抗血清无交叉现象(表 3)。

(四) 疫苗对小白鼠的保护作用

用京防 75-39 株鼠肺第 10 代病毒作攻击株, 观察用 75-39 株鸡胚灭活疫苗的免疫效果, 结果免疫组与对照组有非常显著的差别。(见表 4)

表 3 京防 75-39 株、兰生 601 株及仙台病毒免疫血清对鼠肺适应病毒进行血凝抑制实验

| 血 清 | 病 毒 | 血 凝 抑 制 滴 度 | | | | | | | | |
|----------|-----------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1:10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 2560 |
| 京防 75-39 | 75-39 E ₁₁ | — | — | — | — | — | — | — | ++++ | ++++ |
| | 75-39 M ₉ | — | — | — | — | — | — | — | ++++ | ++++ |
| | 601 E ₂₁ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 兰生 601 | 601 E ₂₁ | — | — | — | — | — | — | ++ | ++++ | ++++ |
| | 75-39 E ₁₁ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| | 75-39 M ₉ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 仙 台 | 75-39 E ₁₁ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| | 75-39 M ₉ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| | 601 E ₂₁ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |

表 4 疫苗对小白鼠的保护试验

| 疫苗毒株 | 攻击毒株 | 免疫鼠数 | 死亡鼠数 | 死亡 % | 保护倍数 |
|--------------------|---------------|------|------|------|-------|
| 京防 75-39 鸡胚尿囊液灭活疫苗 | 京防 75-39 鼠肺毒株 | 47 | 2 | 4.6 | 15.39 |
| 正常鸡胚尿液 (对照) | 同上 | 47 | 33 | 70.2 | |

注： $\chi^2 = 23.01$ ； $P < 0.001$ 。

讨 论

DEAE-D 能够提高病毒核酸的感染力^[5-7]，对若干病毒也具有类似的作用^[8-10]。Koch 等证明了 DEAE-D 提高病毒核酸的感染力是由于抑制了 RNA 酶的活性^[11]。关于这方面的研究见 Pagans 的综述^[12]。

低渗盐水刺激可加速流感病毒 FM₁ 株对小白鼠肺的适应^[3]，但是对甲₁型无明显作用。用 DEAE-D 刺激能迅速促进京防 75-39 株在小白鼠肺部繁殖而呈现血凝反应，同时使小白鼠致死，其 LD₅₀ 达 5.0—6.0。但是必须在接种后 18 小时内再用 DEAE-D 刺激一次。至于多次传代后是否可以不再加刺激尚须进一步研究。所获得的鼠肺病毒的 HA 滴度/LD₅₀ 滴度为 1.8—2.8 log。这与从 FM₁ 毒株观察到的结果相似^[13]。

Wyde 等 1977 年报告^[14]，将甲₁型流感病毒在无胸腺、无毛的纯系小白鼠 BALB/C 株肺部传到第 9 代，鼠肺病毒对该系小白鼠的 LD₅₀ 滴度为 4.20，但是即使传到第 11 代，其 10⁻¹ 悬液亦未能使该小白鼠全部死亡。而且纯系小白鼠在一般实验室内难以饲养。

DEAE-D 促进甲₁型流感病毒在鼠肺繁殖的机理尚不清楚。用尿囊液病毒接种鸡胚，传到第 3 代后，将受染鼠肺悬液接种鸡胚尿囊腔，尿囊液即呈较高的血凝反应，说明病毒从第 3 代起已能在鼠肺内繁殖。可以认为 DEAE-D 抑制了鼠肺组织中某

种抗流感血凝反应的物质^[13]。

DEAE-D 的浓度小到每毫升 0.2 微克时，亦能呈现非特异性的凝集鸡红血球的作用。但是，在接种鼠肺后 30 小时，已不表现任何非特异性凝集作用。

用本实验所得的鼠肺病毒鉴定京防 75-39 株疫苗的保护效价，结果甚为满意。免疫组小白鼠的死亡率仅为对照组的 6.06%。由于攻击的病毒剂量为 10 LD₅₀，而对对照组亦未全部死亡，这是否与接种正常尿囊液有关，尚须进一步研究。

血凝抑制实验证明，京防 75-39 鼠肺病毒具有本毒株特异的抗原性，因而可供鉴定用，目前流行毒株制备的疫苗效价，预期对筛选抗目前流行毒株的化学药物工作，可能有一定意义。

参 考 文 献

- [1] Andrewes, C. H., P. P. Laidlow and W. Smith: *Lancet*, 11: 859, 1934.
- [2] Smith, W., C. H. Andrewes and P. P. Laidlow: *Lancet*, 11: 66, 1933.
- [3] Grunert, R. R., C. E., Hoffman: in "Proceeding of the 8th International Congress of Chemotherapy Athens" Vol. II, P. 856, Kaikos, C. C. Ed. Hellenic Society for Chemotherapy, Athens, 1974.
- [4] 柳元元、戴莹、黄祯祥：人民保健，8:735,1951。
- [5] Pagans, J. S., J. H. McCutchan and A. Vaheri: *J. Virology*, 1: 891, 1967.
- [6] Pagans, J. S., A. Vaheri: *Arch. ges Virusforsch*, 17: 456, 1965.
- [7] McCutchan, J. H., J. S. Pagans: *J. Nat. Cancer Inst.* 41: 351, 1968.
- [8] Somers, K. D., W. H. Kirsten: *Virology*, 36: 351, 1968.

- [9] Kaplan, M. M., T. J. Wiktor, R. F. Maes, et al.: *J. Virology*, 1: 145, 1967.
- [10] Vogt, P. K.: *Virology*, 33: 175, 1967.
- [11] Koch, G. N. Quintrell and J. M. Bishop: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 24: 304, 1968.
- [12] Pagans, J. S.: in "*Progr. Med. Virology*", Vol. 12: 81, 1970.
- [13] 柳元元、李佩筠、戴莹: 微生物学报, 6(3):287, 1958.
- [14] Wyde, P. R., R. B. Couch, B. F. Mackler, et al.: *Infect and Immunity*, 15: 221, 1977.

MULTIPLICATION OF AN A₃ STRAIN OF INFLUENZA VIRUS IN MOUSE LUNG

Liu Yuan-yuan Zhang Ying-mei Xia Li-juan Dong Yong-kun

(*Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences
Research Group in Biochemistry, Beijing*)

An A₃ strain of influenza virus was passed in mouse lungs with the addition of a DEAE-D solution to the inoculum and the animals were stimulated afterwards with the same solution. The virus showed hemagglutinating activity to chick RBC within a few passages, and produced lethal effect towards 3—4 weeks-old mice. The HA titre and LD₅₀ were around 1:64 and 5.0—6.0 respectively. The hemagglutinating titres were reduced by anti-serum against the original chick allantoic fluid virus to such extent as those of the original virus but not by

anti-sera of A₃ strain and sendal virus.

The mice vaccinated with an attenuated vaccine prepared from the original virus strain and challenged with the mouse lung-adapted virus followed by DEAE-D stimulation showed high resistance as compared with a normal allantoic fluid control.

The possibility of using this DEAE-D mouse lung adapted virus in the selection of effective chemicals or herb medicine for therapy purposes of influenza virus infection is discussed.