

## 甘蓝夜蛾核型多角体病毒感染小白鼠的试验

刘 召 南

(北京市农林科学院植物保护研究所, 北京)

甘蓝夜蛾核型多角体病毒 (*Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus 简称 MbNPV) 经口感染小白鼠, 通过组织病理学观察、免疫酶标染色、免疫荧光技术、<sup>125</sup>I 示踪, 以及感染鼠脏器匀浆回接甘蓝夜蛾幼虫等方法, 观察到病毒包涵体经由血液循环进入内脏, 在肝、脾、胰等处细胞质内滞留长达 45 天, 经口感染 90 天的肠系淋巴结匀浆回接甘蓝夜蛾, 可致典型 NPV 病, 死亡率为 9.1%。经腹腔注射感染的小鼠, 除有多角体在脏器滞留外, 还可见细胞有非特异性反应。

**关键词** 甘蓝夜蛾核型多角体病毒; 感染; 小白鼠

昆虫病毒已经不仅应用在经济作物和林木, 在蔬菜上也有一定规模的应用。应用病毒防治菜虫, 安全性问题尤为重要。国内外曾做了大量有关昆虫病毒对脊椎动物的安全性试验, 均未发现昆虫病毒在实验动物体内复制、滞留或引起异常反应<sup>[1-5]</sup>, 仅有关于感染后从粪便中检出有活性的多角体病毒的报道<sup>[6,7]</sup>。1988—1989 年由邢祖培等报道了甘蓝夜蛾及棉铃虫核型多角体病毒在小鼠、豚鼠、裸鼠体内滞留 15 天或 40 天<sup>[8-12]</sup>。本文报道 1986 年以来经口及腹腔感染实验小鼠的试验结果。

### 材料和方法

#### (一) 材料

昆明种小白鼠, 重 12—16g, 由中国药品生物制品检定所及中国兽药制品监察所提供。

甘蓝夜蛾核型多角体病毒 (MbNPV) 从北京郊区分离<sup>[12]</sup>, 由人工饲养的甘蓝夜蛾传代, 经反复差速离心及蔗糖密度梯度离心提取多角体备用。

抗多角体病毒血清系用提纯多角体抗原加不完全福氏佐剂免疫家兔制备, 凝集反应效价为 1:500—800。

甘蓝夜蛾由人工饲料饲养。

羊抗兔荧光抗体为军事医学科学院微生物流行病学研究所产品。

酶标染色用的 ABC 药盒来自美国 Vector 公司。

<sup>125</sup>I 由中国原子能研究所提供。

#### (二) 腹腔注射

每克体重注射约 10<sup>7</sup> 个多角体, 每只鼠注射 0.5ml, 一次注入。

注射后 10 天内, 每天观察并解剖一只鼠。11—12 天, 每 2 天解剖一只鼠。30 天、35 天各解剖一只鼠。

注射后每 5 天解剖 2 只鼠, 直至 35 天。

#### (三) 经口感染

每日每克体重给毒约 10<sup>7</sup> 个多角体。先计算每日每只鼠的饮水量, 将所需病毒加入饮水中, 任小鼠自然饮入。

1. 一次给毒: 观察 15 天。试验、对照各 10 只鼠。

2. 三次给毒(隔日一次): 每 15 天解

本文于 1990 年 5 月 11 日收到。

参加本研究工作的有: 中国药品生物制品检定所蔡锦霞, 北京市理化分析测试中心姜丽荣、高怡红, 北京市房山区卫生防疫站王砚英、张士清、王黎明, 北京市农林科学院植物保护研究所梁慧、彭风刚。

剖 5 只,直至 90 天。试验、对照同数。

3. 连续饲喂 90 天: 45 天解剖一半, 90 天解剖其余一半。试验、对照各 40 只鼠<sup>[13]</sup>。

#### (四) 观察方法

1. 大体解剖: 肉眼观察, 处死动物方法为颈动脉放血<sup>[14]</sup>。

2. 普通病理切片及超薄切片(均按常规方法): 观察细胞病理变化及细胞内病毒。

3. ABC 免疫酶标染色法(按 ABC 药盒操作程序进行<sup>[15]</sup>)和免疫荧光法(热印片、间接染色法<sup>[16]</sup>): 观察病毒在细胞内的存在。

4. 回接原宿至昆虫: 间接证明多角体在脏器内滞留。用经腹腔注射或经口感染 1—3 次的感染鼠脏器, 经甘油盐水浸泡后, 自来水洗净甘油, 无菌水冲洗多次, 或经冷冻后用次氯酸钠处理表面, 无菌水冲洗多次后匀浆, 加 1—2 倍重量的双抗水(含青、链霉素各 1000 单位)喂 3 龄甘蓝夜蛾幼虫。

5. <sup>125</sup>I 示踪: 用氯铵-T 法标记病毒包涵体(由中国原子能研究所标记)。每只鼠

灌入胃中  $1.8 \times 10^7$  个多角体。灌胃后 8、16、24、48 小时及 3、5、7 天分别取各脏器计数  $\gamma$  射线量, 用以观察病毒进入脏器的途径。

## 结 果

### (一) 腹腔注射

1. 解剖印象: 试验组小鼠多出现肝大、脾大、胰腺灰色变软等现象。

2. 普通病理切片: 小鼠感染的最初几天, 肝、胰细胞膨大, 染色反应偏酸, 肝部汇管区白细胞聚集。感染 10 天前后的肝切片有细胞破坏现象。21 天后, 以上各种现象不明显。

3. 酶标染色结果: 感染后 2—15 天, 小鼠肝、脾有极少数细胞质内显示阳性染色颗粒; 心、肝部血管内有可疑的阳性染色颗粒。感染 10 天, 胰腺有少数细胞显示阳性。

4. 超薄切片: 感染后几天内, 小鼠肝、胰细胞核有轻度水肿, 线粒体或水肿、或嵴消失、或呈杯状内含小核; 胰腺腺泡细胞粗面内质网增生(图 1)。感染 10 天前后的切片见细胞自溶。

在感染 15 天的鼠胰及 35 天的鼠脾,



图 1 经腹腔感染的小鼠胰腺腺泡细胞( $\times 12000$ )

Fig. 1 An acinus of infected mouse by intraperitoneal injection

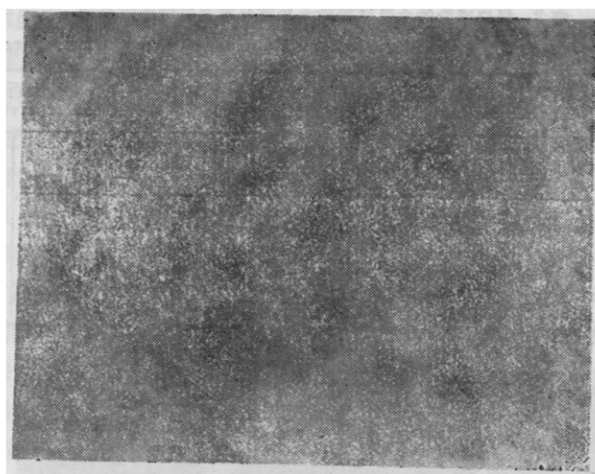


图2 胰腺细胞中的一个多角体 (×48000)

Fig. 2 A polyhedron in the pancreas cell

均发现有完整的多角体(图2)。

5. 脏器匀浆回接甘蓝夜蛾幼虫: 感染后2—35天的混合脏器, 都有感染甘蓝夜蛾致NPV病死的能力(表1)。

### (二) 经口感染

只感染1—3次的鼠, 无明显异常, 能正常产仔。连续饲喂的, 一个月之内, 食欲稍下降, 人走近时较易惊慌, 不能正常产仔。

表1 腹腔感染的小鼠脏器匀浆回接  
甘蓝夜蛾幼虫的结果

Table 1 The result of reinoculated cabbage armyworms with visceral homogenate from the intraperitoneal injected mice

小鼠感染天数 Infected days of mice	试虫死亡率(%) The larvae death rate
2	61.1
3	5.7
5	21.4
6	31.7
7	31.1
10	45.8
14	46.4
16	0
18	26.0
23	8.7
30	20.0

解剖可见被感染鼠肝大、脾大或肾肿大的个体多于对照组(表2)。试验和对照鼠均有白色针尖大小点状病灶, 未见其它病变或肿瘤。连续饲毒90天的, 死胎、畸胎率达77.8%, 对照组正常。

感染24小时取血液涂片, 麦氏液染色, 可见含少量多角体。

从大量普通病理切片可见肝、胰细胞质内酸性染色颗粒增加, 肝汇管区有白细胞聚集现象(图3)。

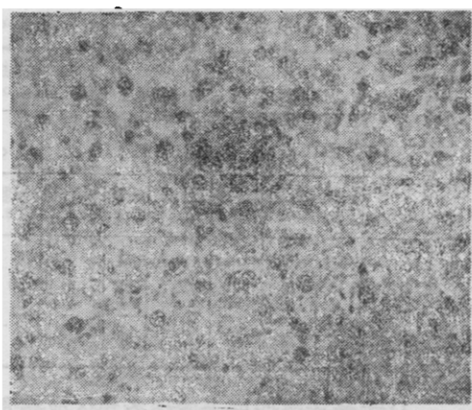


图3 肝汇管区白细胞聚集(经口感染15天)

Fig. 3 Aggregated leukocytes at vessels confluence of liver (15 days after oral)

表 2 经口感染的小鼠脏器肿大总百分率及脾脏大百分率

Table 2 The percentage of viscera tumefaction of infected mice per os

小鼠感染天数 Infected days of mice	脏器肿大总百分率(%) Total percentage of tumefaction		脾脏肿大百分率(%) Percentage of liver tumefaction	
	试验组 Tre.	对照组 Control	试验组 Tre.	对照组 Control
15	36.2	12.8	36.1	22
30	37.5	16.0	62.1	16
45	33.6	21.0	57.4	29
90	36.2	37.0	62.0	45

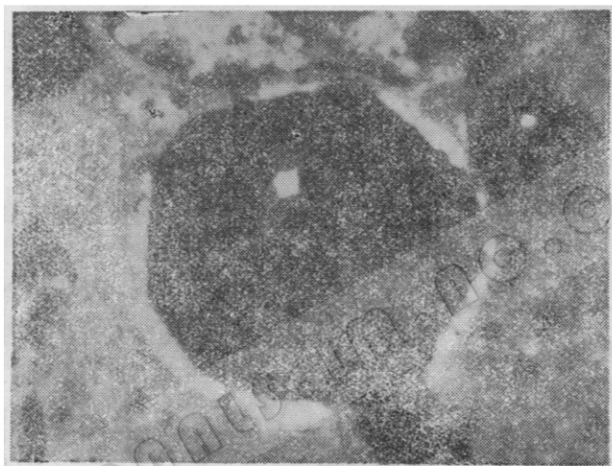


图 4 胰腺 B 细胞内多角形样结晶 (×13000)

Fig. 4 A polyhedral crystalloid in a pancreas cell B

表 3 急性经口感染的小鼠脏器匀浆回接甘蓝夜蛾幼虫结果

Table 3 The result of reinoculated cabbage armyworm with viscera of actually per os infected mice

小鼠感染 天数 Infected days of mice	试虫 NPV 病死亡率 (%) Death rate of the insects by NPV disease														试虫对照 Control insect
	肝 Liver		脾 Spleen		胰 Pancreas		胃 Stomach		肾 Kidney		肠淋巴 Lymph		混合内脏 Mixed viscera		
	处理 Tre.	对照 Contl.	处理 Tre.	对照 Contl.	处理 Tre.	对照 Contl.	处理 Tre.	对照 Contl.	处理 Tre.	对照 Contl.	处理 Tre.	对照 Contl.	处理 Tre.	对照 Contl.	
17	25	0	4.1	0	8.3	0	4.1	0	0	0	0	0	—	—	0
30	27.5	0	5.0	0	0	0	5.0	0	0	0	0	0	—	—	0
45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26.5	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.1	0	—	—	0

从大量超薄切片未发现多角体或病毒粒子,也未见明显病变,仅在口服 45 天的鼠胰 B 细胞质中见到一种不明的、大型多

角形结晶样物(图 4)。

免疫荧光法检查结果表明,小鼠饲毒 3—56 天,在肝、脾细胞质内均可见极少罕

绿色荧光体或翠绿色丝缕状荧光。

$^{125}\text{I}$  示踪结果表明, 感染 8 小时即在血液、心、肝、脾、肺、肾中有较高的放射量, 其中约有 80% 在肠道和肝部。感染 16 小时, 肠系淋巴结也有较高放射量。5 天之内, 放射性衰减不明显。至第 7 天, 肠道放射量几乎下降到零, 肝的放射量减少了 85%, 其余各脏器放射量平均减少了 92% (此结果将另文报道)。

脏器匀浆回接甘蓝夜蛾幼虫共 35 次, 以能引起幼虫出现典型多角体病并且死亡为回接成功, 计成功率达 51.4%。其中, 饲毒后 30 天以内的小鼠肝、胰、脾、胃以及饲毒 45 天的混合脏器均可回接成功。饲毒 3 次后, 至 90 天取肠系淋巴结回接, 致死率达 9.1% (表 3)。回接结果表明病毒主要滞留在肝脏。

## 讨 论

1. 试验结果表明, MbNPV 不仅经腹腔注射后能进入实验小鼠脏器, 经口感染后也能进入脏器。用  $^{125}\text{I}$  标记的多角体灌胃, 8 小时后血液有放射性, 表明多角体入胃后随血液进入全身。免疫酶标、免疫荧光及电镜观察结果表明, 多角体滞留在细胞质中, 且两周内不能完全被排除。由回接试验观察滞留时间为 45 天和 90 天, 免疫荧光观察为 56 天。滞留部位在肝、脾、胰。因此可以说, MbNPV 可人为地感染实验小鼠。

但各种试验均未发现病毒复制, 病理切片虽见肝、胰细胞有些反应, 但未证明是特异性病变。从表 1 中靶虫致死率看, 很像是病毒量在小鼠体内有周期性的变化, 但试验未经严格定量, 无重复, 鼠数也不够, 故暂不能说是复制的迹象。按照“病原微生物侵入动物机体, 并在其中生长繁殖所引起的一系列变化的总和, 称为传染”这

一定义, 目前还不能说是病毒感染了小鼠。

2. 由普通病理切片看, 腹腔感染 10 天左右的鼠肝脏, 少数细胞被破坏, 在超薄切片中又见细胞自溶, 二者可能有关连。但因无病毒复制的迹象, 且未同时见多角体存在, 故不能认为是病毒直接所致。此现象与细胞染色偏酸、肝汇管区白细胞聚集等现象联系起来看, 可认为是免疫反应。

经口感染的小鼠肝、脾、肾肿大多于对照组, 肝、胰细胞染色反应偏酸, 肝汇管区白细胞聚集等现象, 也因未见病毒复制, 以认为是机体的免疫反应为宜。

3. 昆虫病毒是昆虫的病原物, 自然界中并不曾发现昆虫病毒引起的脊椎动物疾病, 脊椎动物的免疫系统自然不能识别它们。所以, 甘蓝夜蛾核型多角体病毒进入小鼠体内后, 需要一定的时间被小鼠免疫系统识别后方能排除。

但在口服病毒后 90 天小鼠肠系淋巴结有病毒滞留这一事实虽未有报道, 但应引起重视: 多角体能在免疫系统滞留并保持活性, 那末, 多角体是否会在淋巴系统长期隐伏而造成后患呢? 看来, 此结果还需重复验证。

4. 电镜观察到多角体病毒在脾网状细胞内, 大量内脏涂片显示多角体在单核细胞内, 注射病毒的豚鼠、裸鼠肝和胰切片示多角体分别在枯否细胞和末房细胞<sup>[8,9]</sup>, 而且 Döller 等人用 MbNPV 喂猪后, 检查血清, 未发现抗体产生<sup>[6]</sup>。因此认为, 多角体进入小鼠脏器后, 主要通过吞噬作用被排除。

5. 一般情况, 当妊娠期过量接触病毒, 会引起遗传变异。曾试验证明, 菜粉蝶颗粒体病毒剂量在每公斤体重 4000 亿颗粒体时, 对大白鼠胚胎有轻微毒性<sup>[11]</sup>。连续饲喂 90 天, 每只鼠每天摄入  $12-16 \times 10^7$  个多角体, 这样大的量引起畸胎、死胎, 是

否为致畸效应,尚待进一步研究。

6. 回接试验表明滞留在小鼠体内的病毒还有活性,<sup>125</sup>I 示踪却反映进入鼠体的病毒第 7 天大部分被排除,这似乎是矛盾的。其实,经口入胃的病毒绝大部分都由排泄系统排除,只有少量进入细胞的病毒才滞留下来。示踪试验第 7 天肠道虽测不出放射量,而其它脏器还能测出不同的量,恰好说明这一点。

此外,如果降低对小鼠的感染剂量后,回接靶虫仍能成功,就不能排除多角体病毒在小鼠体内复制的可能。

### 参 考 文 献

- [1] 北京市农林科学院植保所昆虫病毒协作组: 北京农业科学, 3:17—22, 1986。
- [2] 袁砚修等: 微生物学通报, 9(3): 101—105, 1982。
- [3] 李汉帆等: 生物防治通报, 1(4): 15—19, 1985。
- [4] 福原敏彦: 植物防疫, 34(10): 12—17, 1980。
- [5] Burges, H. D. et al.: *Entomophaga*, 25(4): 329—340, 1980。
- [6] Gabriele, D. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(4): 1229—1233, 1983。
- [7] Groner, A. et al.: *Entomophaga*, 27(2): 155—157, 1982。
- [8] 邢祖培等: 华北农学报, 3(1): 67—71, 1988。
- [9] 宫芸秀等: 华北农学报, 4(3): 105—109, 1989。
- [10] 彭凤刚: 微生物学报, 29(5): 394—396, 1989。
- [11] 姜晋如: 微生物学报, 29(6): 470—473, 1989。
- [12] 刘召南等: 生物防治通报, 3(2): 84—86, 1987。
- [13] Food and Agriculture Organization of the United Nations: *The use of Viruses for the Control of Insect Pests and Disease Vectors*, Published by FAO and WHO, Rome, pp. 47—48, 1973。
- [14] 施新猷: 医学动物实验方法, 施新猷主编, 人民卫生出版社, 北京, 第 120、150 页, 1986。
- [15] HSU SM et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 29(4): 577—580, 1981。
- [16] 杜平: 医用实验病毒学, 杜平主编, 人民军医出版社, 北京, 第 146—148 页, 1985。
- [17] 余潜: 医学微生物学, 余潜主编, 人民卫生出版社, 北京, 第 544—660 页, 1983。

## AN EXPERIMENT ON INFECTION OF MICE WITH *MAMESTRA BRASSICAE* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS

Liu Shaonan

(Institute of Plant Protection, Beijing Municipal Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing)

Mice were infected per os with *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus (Mb-NPV). Through the pathological assay, the ABC immunoenzymatic method, the immunofluorescence technique, the <sup>125</sup>I labeling, and reinoculating cabbage armyworms with visceral homogenate from the infected mice, it was observed that polyhedrosis virus could enter the viscera of the mouse through blood circulation and persist in the cytoplasm of its liver, spleen and pancreas for 45 days. Reinoculating cabbage armyworms with the in-

testinal lymph homogenate, 90 days after oral infection, could result in a typical NPV disease with a mortality of 9.1%. Observation indicated that polyhedrosis virus might persist in the viscera of the mouse infected by intraperitoneal injection. Non-specific reaction was also observed in the viscera cells.

### Key words

*Mamestra brassicae* Nuclear Polyhedrosis Virus; Infection; Mice