

中药大黄对脊髓灰质炎 III 型病毒的减毒作用*

廖德福 张惠芬

(中国医学科学院医学生物研究所, 昆明)

中草药对病毒的抑制作用, 国内早有报道^[1,2], 而应用于病毒的减毒及毒种的育选工作, 则报道甚少。本文着重总结中药大黄对脊髓灰质炎(以下简称脊灰)病毒的减毒作用。

材料与方 法

1. 野毒株的来源: 从吉林省马龙县和河南省郑州市未服过脊灰活疫苗的健康儿童分离到 III 型野毒株, 又从湖南省小儿麻痹患者分离到 III 型野毒强毒株。分别编号为 66-13, 66-51, 480 和 H38, H45。

2. 组织培养: 用恒河猴肾原代单层细胞管进行。

3. 中草药: 金银花、斑蝥、紫花地丁、大黄、桉叶、钩藤等 20 余种, 均为煎剂。经初步筛选, 发现桉叶、大黄、钩藤对脊灰病毒的抑制作用较强, 最适浓度(病毒与等量药物混合, 置 30℃ 处

理过夜后, 病毒滴度下降 2—2.5 log 的药物浓度为最适浓度): 桉叶为 60 毫克/毫升; 大黄 15.65 毫克/毫升; 钩藤 31.25 毫克/毫升。

4. 减毒方法: 将药物的最适浓度分别与等量的原倍病毒液混合, 置 30℃ 处理过夜(16—20 小时), 然后加入与上述混合液等量的磷酸缓冲液 (PBS) 稀释, 以终止药物对病毒的持续作用, 并消除药物对猴肾细胞的毒性作用。经稀释的药物病毒液 0.2 毫升接种于已形成单层的猴肾细胞管, 每管加 0.8 毫升维持液, 置 34℃ 培养, 当细胞病变达“++++”时收获病毒。以上处理方法反复多次。

5. 减毒程度的检查: 将上述反复处理传代的病毒样品, 于不同传代水平测定其温度特征“T”(rct/39.5℃) 和蚀斑抑制特征“D”。

* 本项工作承本所病理组及检定室有关同志参加。

表 1 大黄处理传代对脊髓灰质炎 III 型野毒株“T”特征的影响

毒株名称	处理传代次数 (累计)	病毒滴度 (\log_{10} TCD ₅₀ /ml)		对数差	“T”特征性质*
		37°C	39°C		
66-13	未处理	6.67	5.7	0.97	+
	5	7.33	>5.5	<1.83	±
	10	7.33	3.76	3.57	±
66-51	未处理	6.67	6.0	0.67	+
	5	7.67	>5.5	<2.17	±或+
	10	7.33	>4.5	<2.83	±或+
480	未处理	7.0	6.3	0.7	+
	5	7.5	>5.5	<2.0	±
	10	7.5	3.5	4.0	±
	19	7.0	>3.5	<3.5	±或+
H38	未处理	6.67	>6.5	<0.17	+
	5	7.0	>5.5	<1.5	+
	10	7.5	2.33	5.17	-
	19	7.67	≤1.0	≥6.67	-
H45	未处理	7.0	6.03	0.97	+
	5	7.0	>5.5	<1.5	+
	10	7.5	>4.5	<3.5	±
	19	6.33	>3.5	<2.83	±或+

* 指 37°C 与 39.5°C 的病毒滴度对数差 ≥5 时为“T-”性质, <2 时为“T+”性质, <5 而 >2 时为“T±”性质。

6. 蚀斑纯化: 按常规蚀斑法进行。

7. 恒河猴神经毒力检查: 经脊髓和脑内注射两个途径, 检查毒株对恒河猴残余致麻痹力, 以确定毒株的减毒程度。

8. 病毒滴度的检查: 按常规细胞病变法 (\log TCD₅₀/ml) 或蚀斑法 (\log PFU/ml) 进行。

9. 毒株的外源因子或潜在因子的检查: 用乳鼠检查柯萨奇病毒, 豚鼠检查结核杆菌, 家兔检查“B”病毒。

10. 血清型检查: 用原倍病毒及型特异性血清在猴肾细胞管进行。

试验结果

一、大黄对脊灰 III 型野毒株“T”特征的影响

野毒株经中药大黄处理传代后, 体外“T”、“D”特征均发生相应的改变。现以体外“T”、“D”特征为初筛指标, 其结果见表 1。

由表 1 看出, 不同野毒株对大黄的敏感性不同, 其中 H38 毒株最敏感。

二、中草药对 H38 毒株的减毒作用

比较大黄、桉叶、钩藤三种药剂对 H38 毒株的减毒作用, 结果见表 2。经大黄处理传代 10 次后, “T”特征即由“+”转“-”, 而且保持稳定。桉叶处理传 10 代后, “T”特征亦转“-”, 但不够稳定。而钩藤处理传 16 代后方转“-”。以上结果表明大黄的减毒效果最好。

三、检查三个斑的毒株体外特征性质及对猴体的神经毒力

H38 毒株经大黄处理 19 次后进行蚀斑纯化, 根据各个斑毒株的“T”和“D”特征性质, 选三个斑的毒株(定名为 CNIII₁, CNIII₂, CNIII₃) 对正常恒河猴的脊髓接种, 检查这些斑的神经毒力。用 H38 原始毒株的猴体注射作为对照。每株各注射 6 只恒河猴。注射猴体的三个斑的毒株体外特征性质及对猴体神经毒力结果(见表 3、表 4)。

表 3 和表 4 的结果表明, 上述选用的三个斑毒株的体外特征均为“T-”、“D-”性质, 对猴体神经毒力与原始株比较有所减低, 但仍有一定的残余毒力。注射 H38 原始株的 6 只

表 2 大黄、桉叶、钩藤处理 H38 毒株后对其“T”特征的影响

药物名称	处理及传代次数 (累计)	病毒滴度 logTCD ₅₀ /ml		对数差	“T”特征性质*
		37℃	39.5℃		
大 黄	未处理	6.67	6.5	0.17	+
	5	7.0	>5.5	<1.5	±
	10	7.5	2.33	5.17	-
	19	7.67	<1.0	>6.67	-
桉 叶	未处理	6.67	6.5	0.17	+
	5	7.67	>5.5	<2.17	±
	10	7.5	2.5	5.0	-
	19	7.33	2.5	4.83	±
钩 藤	未处理	6.67	6.5	0.17	+
	5	7.67	>5.5	<2.17	±
	10	7.67	3.5	4.17	±
	16	7.0	1.67	5.33	-
	19	6.5	<1.0	>5.5	-

* “T”特征判断标准同表 1。

表 3 四次传代纯化后接种猴体脊髓的三个斑的毒株体外特征

毒株名称	“T”特征*				“D”特征**			
	病毒滴度 (logTCD ₅₀ /ml)		滴度对数差	特征性质	病毒滴度 (logPFU/ml)		滴度对数差	特征性质
	37℃	39.5℃			NaHCO ₃ 高浓度	NaHCO ₃ 低浓度		
CNIII ₁	6.33	<1.0	>5.33	-	6.67	<4.0	>2.7	-
CNIII ₂	7.23	1.0	6.23	-	7.4	4.7	2.7	-
CNIII ₃	7.0	0.33	6.67	-	6.7	<4.0	>2.7	-
H38 原始株	7.67	7.5	0.17	+	7.2	6.5	0.7	+

* “T”特征性质同表 1。

** “D”特征性质即病毒在 NaHCO₃ 高浓度下与低浓度下的滴度对数差 ≥ 2 时为“D -”性质, < 1 时为“D +”性质, < 2 又 > 1 时为“D ±”性质。

表 4 三个斑的毒株接种猴体脊髓后的神经毒力检查

毒株名称	注射剂量 (logTCD ₅₀ /ml)	注射猴数	临床症状*	组织病理学检查			
				极 轻	轻 度	中 度	重 度
CNIII ₁	6.33	3	1/3	—	1	1	1
	5.33	3	1/3	2	—	1	—
CNIII ₂	7.23	3	1/3	2	—	1	—
	6.23	3	1/3	2	—	1	—
CNIII ₃	7.0	3	2/3	2	—	—	1
	6.0	3	2/3	1	—	—	2
H38 原始株	7.67	3	2/3 [△]	—	—	—	2
	6.67	3	3/3	—	—	—	3

* 分母代表注射的猴数, 分子代表有临床麻痹的猴数。

[△] 示有一只未见针迹, 不予统计。

猴除 1 只未见针迹外, 其余 5 只均在四天内发生四肢瘫痪, 瘫痪后第二天死亡, 5 只猴的中枢神经系统组织经病理学检查均显示重度脊灰病变。该结果说明, H38 原始株经大黄 19 次处理后的毒力已有明显下降。

四、中 III₄ 毒种母液猴脑接种后的神经毒力检查

将减毒效果最好的 CNIII₄ 毒株用大黄继续处理传代 6 次, 然后经两次蚀斑纯化。根据“T”“D”特征的结果选出一个更为理想的斑

(中 III₄ 株) 并制成毒种母液。用中 III₄ 株进行两次猴脑注射, 共注射 48 只猴, 经 21 天的临床观察, 未发现任何临床表现, 中枢神经系统组织病理学检查, 亦均未见脊灰病变(见表 5)。其它检定项目亦均符合脊灰减毒活疫苗的现行鉴定标准。后经 1068 名婴幼儿服用中 III₄ 毒株制备的疫苗, 证明中 III₄ 毒株制备的疫苗对人体安全有效, 免疫原性良好。为进一步了解中 III₄ 株的遗传性质, 又将中 III₄ 株在猴肾原代单层细胞上连续传代 10 次, 证明它的“T”“D”

表 5 中 III₄ 毒种母液猴脑接种后的神经毒力检查

毒株名称	接种剂量 (log ₁₀ TCD ₅₀ /ml)	接种猴数*	临床表现	病理学组织检查			
				极 轻	轻 度	中 度	重 度
中 III ₄	7.5	26	0/26	—	—	—	—
	6.5	22	0/22	—	—	—	—

* 两项中各有一只未见针迹, 不予计数。

特征均无明显改变。关于该毒种经人体肠道繁殖后的遗传稳定性及其它性质, 尚待研究。

讨 论

1. 本文用中药大黄诱使脊灰病毒 III 型野毒株发生变异, 并使其对人、猴的神经毒力下降, 但在毒力下降的同时常伴有病毒在 40℃ 和酸性环境下繁殖能力降低的现象, 这表明毒种对猴神经毒力与“T”、“D”特征之间有一定的相关性。当毒种的“T”、“D”体外特征显示“—”时, 它们对猴体仍有一定的神经毒力, 故“T”、“D”特征只能作为试验室的初筛指标, 而不能作为鉴定标准。

2. 在脊灰活疫苗毒种育选过程中, 不论用何种诱变剂, 都有一定的温度因子参予, 因病毒一般在 34℃ 下繁殖。Vonk^[3] 认为, 35℃ 对病毒弱毒颗粒具有一定的选择作用, 本试验选用 34℃ 为选育温度。

3. 本文用大黄为诱导剂, 初步育选出中 III₄

减毒株, 经 46 只猴脑注射, 证明该株对猴体已无神经毒力。又经 1068 名婴幼儿服用, 均证明该毒株是安全有效的, 免疫原性良好。但该毒株经人体肠道传代后的遗传稳定性如何, 尚待研究。

4. 在毒种育选^[4]过程中, 比较多地采用了蚀斑纯化技术, 这是因为已发生变异的病毒群体不均一性的缘故。如一个毒株就总体而言已是“T—”性质, 然而从中挑选出的子代斑中, “T”特征有的甚至仍属“T+”性质。猴体的结果也证明了这种不均一性。由此说明, 蚀斑纯化在育选毒种过程中的重要作用。

参 考 文 献

- [1] 中医研究院中药研究所病毒组: 新医药学杂志, 1: 26, 1973。
- [2] 马振亚等: 陕西新医药, 8: 42, 1979。
- [3] Vonk, V. et al.: Progr. in Med. Virology, 9: 205—248, 1967。
- [4] 昆明医学生物研究所 III 型毒种组协作组: 微生物学报, 16(1): 41—47, 1976。