

# 卡介苗对流行性乙型脑炎病毒感染小鼠免疫的影响

李华一 严咏楷 白施恩

(微生物学教研室)

卡介苗能增强机体的非特异性免疫功能,亦能增强机体对某些病毒感染的抵抗力。据报道,卡介苗能增强小鼠对 I 型、II 型单纯疱疹病毒、流感病毒、脑心肌炎病毒、鼠肝炎病毒、口蹄疫病毒<sup>[1]</sup>和狂犬病毒的抵抗,并能减少人的感冒和流感的发病率,以及减少人单纯疱疹病毒感染的复发率<sup>[2]</sup>。目前尚未见到卡介苗对乙脑病毒(JBEV)感染宿主免疫影响的报道。本文初步探讨了卡介苗对 JBEV 感染小鼠死亡率和死亡时间的影响,并探讨了有效剂量的卡介苗对感染小鼠单核吞噬细胞系统功能、细胞免疫和体液免疫的影响。

## 材料和方法

**卡介苗** 用卡介苗丹麦株 1 号。由广东省生物制品研究所提供,每毫升含 75 毫克活菌(每毫克约含  $4 \times 10^8$  个活菌),活卡介苗(简称活卡)菌液于 60℃ 处理 1 小时即为灭活卡介苗(简称死卡)菌液。置于 4℃ 冰箱保存,使用前用生理盐水稀释。

**病毒** 用 JBEV 京卫研 1 株(京)。由中国医学科学院病毒所提供。病毒脑悬液对 3 周龄小鼠皮下感染的  $LD_{50}$  为  $10^{-5.5}$ 。病毒悬液在液氮中保存,用前经 3 周鼠脑内传代一次。病毒用 pH 7.3 的肉汤稀释。

**动物** 3 周龄小鼠(5~8 克)和 3 周龄以上小鼠(10~12 克),不分雌雄,由中山医科大学动物场提供。

**实验注射** 卡介苗于右侧腹股沟皮下接种,接种量为 0.1 毫升。病毒感染量均是  $100LD_{50}$ , 从左侧腹股沟皮下注入,注入量为 0.1 毫升。对照组小鼠接种生理盐水或正常鼠

脑悬液。

**C6/36 蚊细胞** 白纹伊蚊纯系 C6/36 株由北京医药生物制品检定所从国外引入。用于滴定病毒。

**培养液** 由 RPMI-1640 液与 Eagle 液等量混合配制而成。根据需要加入小牛血清和“三抗”等。用于培养腹腔巨噬细胞(M $\phi$ )和蚊细胞。

**腹腔 M $\phi$  吸附、吞饮和处理吞饮后的 JBEV 活性测定** 不用刺激物诱导腹腔细胞。首先断颈椎处死小鼠,每鼠腹腔注入 2 毫升含有肝素的培养液。无菌取出腹腔细胞液。同组 15 只小鼠的腹腔细胞液混合,计数。每个细胞瓶(55×22mm<sup>2</sup>)置入  $1.5 \times 10^7$  腹腔细胞,37℃ 孵育 2 小时,倒掉未粘附细胞,此时约剩下原腹腔细胞数的 70%,经染色证明,这些细胞中 90% 以上具有 M $\phi$  的形态。培养 24 小时后,吸出培养液,每瓶细胞加入 0.3 毫升  $10^{-2}$  稀释的 JBEV 悬液,于 37℃ 吸附 1 小时,每瓶再加入 2.7 毫升维持液,洗出未吸附的病毒。在 C6/36 蚊细胞中滴定未吸附、吞饮的病毒滴度。M $\phi$  继续培养的第 2、4、6 天,经冻融破坏 M $\phi$ ,滴定从 M $\phi$  内释放出的病毒滴度,能引起半数蚊细胞出现++细胞病变的最高病毒稀释度为病毒滴度。

**腹腔 M $\phi$  吞噬鸡红细胞活性测定** 参照姚楚铮等<sup>[3]</sup>的方法。

**足垫迟发型超敏反应(DTH)测定** 参照 Thong<sup>[4]</sup>的方法。

**血球凝集抑制(HI)抗体测定** 参照《病毒检验》的方法。由于每只小鼠的血清量少,用微量测定法。

**溶血素测定** 参照 Salaman 的方法, 采用微量测定法。

## 结 果

### 一、卡介苗对 JBEV 感染小鼠死亡率和死亡时间的影响:

小鼠分 2 或 3 组, 其中 1 组或 2 组为试验

组, 剩下的 1 组为对照组。试验组接种卡介苗, 10 天后用病毒攻击, 观察 21 天, 每天观察 2 次, 逐日记录死亡小鼠数。

(一)不同剂量的死卡对 JBEV 感染小鼠死亡率和死亡时间的影响

结果见表 1, 实验结果提示, 所试剂量的死卡对 JBEV 感染小鼠的死亡率无明显影响,

表 1 不同剂量的死卡对 JBEV 感染小鼠死亡率和半数死亡时间的影响

实验	剂量(mg)	死亡数/总数	死亡率%	P	半数死亡时间(天)	P
1	7.5	34/51	66.7	>0.25	14.4	>0.25
	盐水	38/51	74.5		12.3	
2	7.5	38/50	76.0	>0.25	12.0	>0.5
	盐水	41/50	82.0		11.5	
3	3.75	32/51	62.7	>0.1	16.5	<0.05
	盐水	38/51	74.5		12.3	
4	3.75	35/50	70.0	>0.1	13.8	<0.005
	盐水	41/50	82.0		11.5	
5	1	46/58	79.3	>0.5	11.8	<0.05
	0.5	49/60	81.7	>0.5	11.2	<0.05
	盐水	49/60	81.7		13.0	
6	1	40/51	78.4	>0.5	12.7	>0.25
	0.5	39/52	75.0	>0.5	13.7	<0.01
	盐水	40/50	80.0		11.0	

只有每鼠接种 3.75 毫克死卡能延长感染小鼠的死亡时间, 两次实验中分别延长 4.2 天和 2.3 天。

(二)不同剂量的活卡对 JBEV 感染小鼠死亡率和死亡时间的影响

结果见表 2、表 3。实验结果提示, 所试剂量的活卡对 JBEV 感染小鼠的死亡率没有明显影响。在一次实验中接种 0.5 毫克组能延长感染小鼠的死亡时间, 但重复性不好, 故所试剂量的活卡对 JBEV 感染小鼠的死亡时间亦无明显影响。

### 二、死卡对 JBEV 感染小鼠单核吞噬细胞系统功能、细胞免疫和体液免疫的影响:

以上的实验提示, 每鼠接种 3.75 毫克死卡

能延长 JBEV 感染小鼠的死亡时间。因此, 有必要了解这一剂量对感染小鼠各项免疫功能的影响。把 10~12 克的小鼠分成 4 组, 第一组接种 3.75 毫克死卡, 10 天后用病毒攻击; 第二组注射生理盐水, 10 天后用病毒攻击; 第三组接种 3.75 毫克死卡, 不用病毒攻击; 第四组注射生理盐水, 10 天后注射正常鼠脑悬液, 分别进行下列观察。

(一)对 JBEV 感染小鼠腹腔 Mφ 吸附、吞饮病毒活性的影响

用病毒攻击后第 3 天, 观察了各组小鼠腹腔 Mφ 吸附、吞饮 JBEV 的活性(见表 4)。结果提示, 巨噬细胞被感染后的第 7 天, 病毒组的病毒滴度为  $8.24 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ , 比空白组

表2 不同剂量的活卡对 JBEV 感染小鼠死亡率和半数死亡时间的影响

实验	剂量(mg)	死亡数/总数	死亡率%	P	半数死亡时间(天)	P
1	3.75	15/38	39.5	>0.5	—	
	盐水	17/36	47.2		—	
2	3.75	11/32	34.4	>0.5	—	
	盐水	17/37	46.0		—	
3	1	31/44	70.5	>0.25	11.0	>0.05
	0.5	36/49	71.4	>0.25	13.5	>0.5
	盐水	40/50	80.0		11.0	
4	1	36/47	76.6	>0.5	11.0	>0.5
	0.5	37/50	74.0	>0.5	11.3	>0.5
	盐水	39/49	79.6		11.5	

表3 每鼠接种3.75毫克活卡后 JBEV 感染小鼠在一定时间内的死亡分布

实验	剂量(mg)	感 染 后 天 数							
		9		11		13		15	
		死亡数/总数%	死亡数/总数%	死亡数/总数%	死亡数/总数%	死亡数/总数%	死亡数/总数%	死亡数/总数%	死亡数/总数%
1	3.75	3/38 7.89	8/38 21.05	11/38 28.55	13/38 34.21				
	盐水	6/36 16.67	9/36 25.00	11/36 30.56	15/36 41.47				
2	3.75	3/32 9.38	7/32 21.88	8/33 25.00	10/32 31.25				
	盐水	3/37 8.11	7/37 18.92	13/37 35.14	15/37 40.54				

表4 每鼠接种3.75毫克死卡对 JBEV 感染小鼠腹腔Mφ 吸附、吞噬 JBEV 活性的影响

组 别	实验次数	病毒滴度log	均 数log
死卡+病毒组	1	6.49	6.84 ± 0.49
	2	7.19	
病毒组	1	7.89	8.24 ± 0.49
	2	8.59	
死卡组	1	6.49	6.84 ± 0.49
	2	7.19	
空白组	1	7.19	7.54 ± 0.49
	2	7.89	
对照组*	1	8.59	8.59
	2	8.59	

\* 对照组是将病毒悬液置入空细胞瓶，了解玻璃壁对病毒的吸附作用。

(7.54logTCID<sub>50</sub>) 高0.7个log(约5倍), 提示病毒感染能降低小鼠腹腔Mφ吸附、吞饮JBEV的活性; 死卡+病毒组的病毒滴度为6.84logTCID<sub>50</sub>, 比空白组低0.7log(约5倍), 提示接种死卡能增强小鼠腹腔Mφ吸附、吞饮JBEV的活性。

(二)对JBEV感染小鼠腹腔Mφ处理吞饮后的JBEV活性的影响

观察了各组小鼠腹腔Mφ吸附病毒后2、4、6天, Mφ处理被吞入的JBEV的活性(见表5)。从实验结果看, 感染病毒后第2天, Mφ内的病毒含量最高, 第4天滴度下降, 第6天则测不出病毒, 提示小鼠的Mφ在

表5 每鼠接种3.75毫克死卡对JBEV感染小鼠腹腔Mφ处理JBEV活性的影响

组别	病毒滴度log 腹腔Mφ感染后天数		
	2	4	6
死卡+病毒组	1.39	1.04±0.49	0
病毒组	1.74±0.49	1.39±0.98	0
死卡组	1.39	1.04±0.49	0
空白组	1.39	1.04±0.49	0

体外不支持JBEV复制。各组间的结果无多大差异。

(三)对JBEV感染小鼠腹腔Mφ吞噬鸡红细胞功能的影响

于攻击病毒后第12天观察各组小鼠腹腔Mφ的吞噬功能(见表6)。死卡+病毒组、死卡组 and 空白组之间的差别无显著性, 但与病毒组相比, 其差别有显著性。提示病毒感染能降低小鼠腹腔Mφ吞噬鸡红细胞的活性, 但预先接种死卡的感染小鼠却能把腹腔Mφ的这一活性维持在正常水平。然而, 接种死卡不能改变正常小鼠腹腔Mφ的吞噬功能。

(四)对JBEV感染小鼠DTH的影响

实验动物经JBEV攻击后第3天, 以绵羊红细胞(SRBC)致敏, 第8天发敏, 观察了发

敏后24、48和72小时足垫的肿胀程度(见表7)。结果表明, 24小时和48小时各组间的差

表6 每鼠接种3.75毫克死卡对JBEV感染小鼠腹腔Mφ吞噬鸡红细胞功能的影响

组别	实验次数	例数	吞噬率%
死卡+病毒组	1	10	23.60±5.75**
	2	14	30.43±10.14**
病毒组	1	12	21.20±6.21
	2	12	22.35±8.15
死卡组	1	12	34.22±14.89**
	2	12	35.16±9.12**
空白组	1	10	33.22±7.88*
	2	14	32.40±8.53*

\*\*该均数与同次实验的病毒组间的差别有高度显著性(P<0.01)

\*该均数与同次实验的病毒组间的差别有显著性(P<0.05)

别无显著性; 但在发敏后72小时, 死卡+病毒组和死卡组的足垫肿胀程度与病毒组有显著差别(P<0.01)。而死卡+病毒组与死卡组间的差别以及病毒组与空白组间的差别均无显著性。这提示, 每鼠接种3.75毫克死卡能使DTH稳定和持久。

(五)对JBEV感染小鼠抗体滴度的影响

在JBEV攻击后第12天, 测定了血清中HI抗体的滴度(见表8)。结果表明, 死卡+病毒组能检出HI抗体的小鼠占60%, 病毒组占56%, 两者间无多大差异。此外, 两组的抗体平均滴度也无明显差异。没有感染JBEV的小鼠则测不出HI抗体。

(六)对JBEV感染小鼠溶血素滴度的影响

各组小鼠用JBEV感染后第3天和第8天, 曾分别经SRBC免疫, 在第12天测定溶血素滴度(见表9)。结果提示, 感染JBEV或接种死卡后不影响小鼠产生溶血素的滴度。

表7 每鼠接种3.75毫克死卡对 JBEV 感染小鼠足垫迟发型超敏反应的影响(mm)

组别	实验次数	例数	小鼠足垫发敏后时间(小时)		
			24	48	72
死卡+病毒组	1	11	0.56±0.21	0.31±0.10	0.24±0.09**
	2	15	0.65±0.17	0.38±0.09	0.29±0.12**
病毒组	1	13	0.49±0.18	0.26±0.09	0.08±0.06
	2	13	0.57±0.23	0.30±0.13	0.08±0.06
死卡组	1	12	0.54±0.08	0.31±0.08	0.27±0.07**
	2	12	6.67±0.24	0.35±0.10	0.31±0.08**
空白组	1	10	0.56±0.16	0.31±0.10	0.13±0.08
	2	14	0.68±0.15	0.32±0.11	0.14±0.12

\*\*此均数与同次实验的病毒组和空白组均数的差别有非常显著的统计学意义(P<0.01)。

表8 每鼠接种3.75毫克死卡对 JBEV 感染小鼠血凝抑制抗体滴度的影响

样本来源	例数	阳性数	%	血凝抑制抗体滴度			平均滴度 (几何均数±标准差)
				8	16	32	
死卡+病毒组	25	15	60.0	8	5	5	16.8±1.7
病毒组	23	13	56.5	8	3	2	11.3±1.7
死卡组	5	0					
空白组	5	0					

表9 每鼠接种3.75毫克死卡对 JBEV 感染小鼠溶血素滴度的影响

样本来源	例数	溶血素滴度					平均滴度 (几何均数±标准差)
		8	16	32	64	≥128	
死卡+病毒组	24	0	2	10	5	7	56.7±2.3
病毒组	22	3	1	5	6	7	52.5±2.7
死卡组	24	1	3	11	2	7	45.9±2.4
空白组	23	1	4	3	9	6	52.9±2.2

## 讨 论

本文探讨了皮下接种不同剂量的死卡或活卡对 JBEV 感染小鼠死亡率和死亡时间的影响。结果表明,用100LD<sub>50</sub>病毒量攻击前10天,接种上述剂量的死卡或活卡,对 JBEV 感染小鼠的死亡率没有明显影响,只有每鼠接种3.75毫克死卡才能延长感染小鼠的死亡时间。提示每鼠皮下接种3.75毫克死卡能部分增强小鼠对 JBEV 的抵抗力。目前尚未见到皮下接种死卡影响动物病毒感染资料。但有人报道,

能增强小鼠对葡萄球菌感染的抵抗。临床上亦报道,皮下接种死卡能使感冒和流感的发病率降低<sup>[6]</sup>。如论证充分,可说明接种死卡后宿主对病毒感染有一定的抵抗作用。此外,尚未见到不同剂量的死卡对宿主免疫功能影响的报道,但高剂量的活卡能抑制免疫反应。本实验中,每鼠接种7.5毫克死卡是否与此有关,还值得研究。而1毫克或0.5毫克死卡不影响宿主对 JBEV 抵抗力的原因,也许是接种的死菌数太少,缺乏有效的免疫刺激。至于本实验3种剂量的活卡缺乏免疫增强作用的原因,可能

与所用的卡介苗菌株和给予的途径、时间等因素有关。

本文还探讨了每鼠皮下接种3.75毫克死卡对 JBEV 感染小鼠各项免疫功能的影响。结果发现,感染 JBEV 能使小鼠腹腔 M $\phi$  吸附、吞饮 JBEV 的活性减弱,而预先接种死卡的小鼠却能增强这一活性。此外,还发现各组小鼠的腹腔 M $\phi$  在体外不支持 JBEV 的复制。体外培养的小鼠腹腔 M $\phi$  是否支持 JBEV 的复制,尚未见文献报道。有人研究了 Semliki Forest 病毒、Yellow Fever 病毒、west Nile 病毒、EEE 和 WEE 等虫媒病毒,发现只有 Semliki Forest 病毒能在小鼠腹腔 M $\phi$  内复制,其它的病毒则不能<sup>[6]</sup>。单核吞噬细胞系统是宿主防御体系的重要防线。它的作用先于细胞免疫和体液免疫出现,并有调节免疫的功能。M $\phi$  在抵抗某些病毒感染中起着重要作用。注入硅胶损害 M $\phi$  后,能使 Yellow Fever 病毒较早地侵入脑内。用抗淋巴细胞血清破坏 M $\phi$ ,可降低小鼠对狂犬病毒的抵抗力<sup>[7]</sup>。病毒感染细胞被 T 细胞破坏后,病毒的清除取决于 M $\phi$  群<sup>[8]</sup>。此外,接种卡介苗豚鼠的腹腔 M $\phi$  能使流感病毒的滴度降低<sup>[9]</sup>。本文结果也提示,接种一定量的死卡能使 JBEV 感染小鼠腹腔 M $\phi$  吸附、吞饮 JBEV 的活性增强。这一作用可能会使进入脑内的病毒量减少,有利于特异性免疫发挥作用。JBEV 感染后抑制小鼠腹腔 M $\phi$  吸附、吞饮病毒活性的机理尚不清楚。

实验还发现, JBEV 感染小鼠能降低腹腔 M $\phi$  吞噬鸡红细胞的活性,而接种死卡能使 M $\phi$  吞噬鸡红细胞的活性维持在正常范围。这与小鼠抗 JBEV 感染的关系如何还不清楚,但 M $\phi$  清除异物的功能正常,有利于自身稳定。JBEV 引起腹腔 M $\phi$  吞噬鸡红细胞活性下降的原因,可能与病毒对免疫反应的非特异调节作用有关。

本文还发现,接种死卡能使 DTH 更为稳定、持久。DTH 是细胞免疫反应的体内模型。因此,也提示小鼠细胞免疫反应稳定持久。细胞免疫在抵抗病毒感染时具有重要作用。把

JBEV 感染小鼠的脾细胞转输给易感小鼠后,可使受者获得抗 JBEV 的免疫力。乙脑病人的细胞免疫功能下降,用转移因子和免疫核酸治疗能提高病人的细胞免疫功能,促使疾病好转<sup>[10]</sup>。死卡增强感染小鼠对 SRBC 细胞免疫反应与抗 JBEV 免疫的关系如何? 还值得研究。从整体的观点出发,对 SRBC 的细胞免疫反应可能在一定程度上反映了整体的细胞免疫水平。

体液免疫在宿主抗 JBEV 感染中起着一定作用。但从本文的结果来看,死卡对感染小鼠的 HI 抗体滴度和溶血素滴度没有明显影响。因只测定了一个时间的结果,不能较好地反映抗体的消长情况,却也能反映在一定时间死卡对抗体产生的影响。

用干扰素诱生剂能明显地降低 JBEV 感染小鼠和地鼠的死亡率。皮下接种死卡能否诱导产生干扰素,目前尚无报道。因此,死卡所引起的免疫防护作用是否涉及到干扰素的诱生,还需进一步探讨。

## 小 结

1. 卡介苗在一定程度上能增强小鼠对 JBEV 感染的抵抗力,但与所用的卡介苗剂量和剂型有关。本文所用不同剂量的活卡或死卡均不能降低 JBEV 感染小鼠的死亡率,除每鼠接种3.75毫克死卡能延长感染小鼠的死亡时间外,其它所试剂量没有这一作用。

2. 感染 JBEV 能使小鼠腹腔 M $\phi$  吸附、吞饮 JBEV 的活性减弱,而预先接种死卡的小鼠却能增强这一活性。还发现各组小鼠的腹腔 M $\phi$  在体外不支持 JBEV 的复制。

3. JBEV 感染小鼠能降低腹腔 M $\phi$  吞噬鸡红细胞的活性;接种死卡能使 M $\phi$  吞噬鸡红细胞的活性维持在正常范围。

4. 接种死卡能使 JBEV 感染小鼠的 DTH 更为稳定、持久。

5. 接种死卡对 JBEV 感染小鼠的 HI 抗体、溶血素抗体的滴度没有明显的影响。

### 参 考 文 献

- [1] Floc'H F, et al. Increased resistance to virus infection of mice inoculated with BCG. *Ann Immunol* 1976; 127: 173.
- [2] Anderson F D, et al. Recurrent herpes genitalis: treatment with mycobacterium bovis (BCG). *Obstet Gynecol* 1974; 43:797.
- [3] 姚楚铮,等.金钱草对免疫反应的影响 I.免疫抑制作用. *中国医学科学院学报* 1981; 3(2):123.
- [4] Thong Y H, et al. Effect of tetracycline treatment on immunological responses in mice. *Clin Exp Immunol* 1980; 39:728.
- [5] 长沙市防治气管炎办公室.长沙市 22 个幼儿园应用死卡预防感冒的效果观察. *长沙医药* 1975; (1):18.
- [6] Groen G, et al. Interaction of mouse peritoneal macrophages with different arbovirus in vitro. *J gen virol* 1976; 34: 353.
- [7] Turner G S, et al. Interaction of mouse peritoneal macrophages with fixed rabies virus in vivo and in vitro. *J gen virol* 1976; 30:223.
- [8] Mcfarland H F, et al. In vitro of cell-mediated immunity in an acute viral infection. *J Immunol* 1974, 113:173.
- [9] Ganguly R, et al. In vitro resistance to influenza virus infection of macrophage induced by BCG. *Ind J Med Res* 1977; 66:889.
- [10] 福建省转移因子治疗乙脑协作组.转移因子治疗乙脑 24 例疗效观察. *新医学* 1976; 7 (9):423.

## Effects of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) on the Immunity of Mice to Japanese B Encephalitis Virus (JBEV) Infection

Li Huayi    Yan Yongkai    Pai Shien

(Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences)

### Abstract

1. Different doses of inactivated and living BCG we tested did not reduce the mortality rate of JBEV infected mice; in different doses of BCG we tested, only the 3.75mg inactivated BCG could delay the death time of tested mice;
2. The activation of peritoneal macrophages of infected mice nonspecific absorbed JBEV was enhanced, if the mice were injected 3.75mg inactivated BCG; the phagocytosis cock erythrocytes activation of peritoneal macrophages was also higher than that of virus infected group;
3. The peritoneal macrophages of each experiment group were ineffective host cells for JBEV;
4. The delayed type hypersensitivity (DTH) for the sheep RBC of the mice injected 3.75mg inactivated BCG was longer and more steady than that of control group;
5. No significant different in hemagglutination inhibition antibody titer was found between the BCG vaccinated group and control group;
6. The hemolysis titer was not effected by injected 3.75mg inactivated BCG per mouse.