

7302405

内部刊物

应用微生物与病毒

第二集



湖北省微生物研究所

一九七三年六月

25
25

毛主席语录

在生产斗争和科学实验范围内，人类总是不断发展的，自然界也总是不断发展的，永远不会停止在一个水平上。因此，人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进。

人的正确思想，只能从社会实践中来，只能从社会的生产斗争、阶级斗争和科学实验这三项实践中来。

古为今用，洋为中用。



目 录

专题综述

有关人癌肿的病毒病因问题

.....高尚荫 (1)

实验报告

肝炎病毒研究

Ⅰ、家兔腮淋巴结免疫制备抗肝炎缩合抗原血清

.....第一冶金建设公司职工医院检验科
湖北省微生物研究所肝炎组 (9)

肝炎缩合抗原的电子显微镜观察

.....湖北省微生物研究所电镜组 (13)

昆虫组织培养及其在病毒研究中的应用

.....湖北省微生物研究所组织培养组 (15)

制备抗甲种胎儿蛋白绵羊血清的两种方法

.....第一冶金建设公司职工医院检验科
湖北省微生物研究所肝癌免疫诊断组 (25)

耳垂全血肝炎缩合抗原连续对流免疫电泳方法的探讨

.....黄石市第四医院化验组 (27)

A₃菌种的毒性及致病性试验结果

.....湖北省微生物研究所石油蛋白组 (30)

“九二〇”在棉花上的应用及其效果

.....孝感县肖港区革委会生产组
湖北省微生物研究所“九二〇”组 (36)

鲜猪皮酶法制胶生产试验

.....武汉肉类联合加工厂明胶组
湖北省微生物研究所酶制剂组 (40)

经验交流

芳畷铜矿细菌冶铜实验

.....大悟县芳畷铜矿
湖北省微生物研究所细菌冶金组 (44)

“140”杀虫菌防治农林害虫田间试验简报..... (50)

“平平加”——一种优良的惰性乳化剂

.....湖北省微生物研究所煤脱硫组 (61)

国外资料

澳大利亚抗原作为血清性肝炎病毒在肝培养中增殖的标志..... (64)

病毒性肝炎的粪便(F)抗原..... (68)

人类病毒性肝炎病因的实验研究..... (70)

有关人癌肿的病毒病因问题

高尚荫

过去几十年来学者提出许多解释肿瘤的学说，其中有的由于新事实的支持得到了进一步的发展，但有的随着研究工作的深入逐渐被抛弃了。目前关于癌肿的病因有两种主要的学说即“多病因说”和“病毒说”。多病因说是指许多极不相同的因素都能引起癌肿：化学物质、物理因素、生物因素（包括病毒）。例如多病因说根据职业的癌肿的临床研究结果认为长期接触某些化学药品（如苯胺）导致癌肿的发生，同时也根据许多实验观察表明各种物质和外界影响都是致癌的。

在X—射线和紫外线、镭的影响下，煤焦油施用于皮肤或从煤焦油衍生的纯化学物质、性激素、胶体钷、砷等引入机体都能发生癌肿。被蠕虫和它们的卵子侵入的各种组织，由于长期的机械刺激而溃疡或糜烂的组织等也能引起癌肿，这里没有必要列举导致癌肿发生的所有物质和影响，它们的数目每年在增加，如果说这些物质以及其它因素都能作为癌肿发生的原因，则它们早已满足证实多病因学说了。近年来从分子水平上研究细胞转化为癌细胞的机制，这些物质以及其它因素之所以引起癌肿得到比较合理的解释，它们不是癌肿发病的根本原因（高尚荫，1973）。

肿瘤的病毒病因经过相当长时期的研究工作才被多数学者所承认。早期的基础研究证明鸡的白血病与肉瘤和近期的蛙的肾腺癌以及小白鼠乳腺癌都是由病毒引起的，但对这些较早期的观察在某些动物中几个个别例子的病毒病因，不认为能解释为癌肿病毒病因的普遍现象。几十年过去了，直到近来严格的实验对癌肿的病毒病因提供必要的证据人们的认识才转变过来。小白鼠白血病病毒的分离，后又发现多瘤病毒以及一系列肿瘤包括在组织培养中生长的多瘤病毒都能在小白鼠、家鼠和地鼠中引起肉瘤和上皮癌，这代表肿瘤的病毒病因研究的重要进展。在癌肿病毒领域中其它进展包括人腺病毒和SV40病毒的致癌作用、组织培养技术应用与癌肿的研究、电子显微术的改进大大地加快了癌肿研究的进展。肿瘤的病毒学说逐渐获得广泛的支持并逐渐成为对肿瘤的病毒病因研究的有利途径。

目前在各类动物中（包括无脊椎动物）有几十种肿瘤是由病毒引起的，同时，某些植物的肿瘤（创伤肿瘤）也发现是由病毒引起的。人癌肿的病毒病因到现在还没有完全肯定，但除非认为人的癌肿与其它生物的癌肿完全不同，否则就不能认为提出人癌肿的病毒病因是没有理由的。

“人癌肿的病毒病因”的研究工作提出后产生了一些疑问，如人癌肿不是病毒引起的怎么办？病毒病因的研究能解决人癌肿的防治吗？长期来这些问题在世界上没有解决，进行这项工作有把握吗？短期内会出成果吗？等等。这些疑问提得很好，对考虑人癌肿的病毒病因问题启发很大，其实恩格斯在“反杜林论”中已作了明确的回答：“为了正确地确定象哺乳动

物的血液循环这样简单的事实，需要从盖仑到马尔比基之间多么长的一系列中间阶段，……为了比如说确定某种疾病的现象和致病的原因之间的合理联系，我们今天还缺乏多少中间环节！”（恩格斯：“反杜林论”人民出版社，1971年5月，湖北第一次印刷，第85—86页）。

研究人癌肿的病毒病因的意义可以从几个方面来说。从病因学看，人癌肿的病因是长期来争论的问题，通过实验提出可靠的证据来解决，对病因学是有一定意义的。

从实践说，如果人癌肿被实验证明确实是由病毒引起的，那么对癌肿的防治提供可能，如试制疫苗预防。目前恶性肿瘤疫苗已在鸡的神经淋巴瘤（所谓“马里克氏病”）得到成功（Okazasc, 1970; Allison, 1972），这是预防癌肿的第一个成功的疫苗。说明用疫苗预防人癌肿是有可能的。

从理论说，病毒病因的研究为进一步探索癌肿转化的机制提供基础。1970年在核糖核酸（RNA）肿瘤病毒中，反向转录酶（RDDP）的发现（Temin和Mizutani, 1970; Baltimore, 1970）第一次解释RNA病毒信息是怎样与细胞基因组结合，然后由一代传给下一代，在将来某一个时期活化起来引起“自发的癌肿”。揭示这类病毒在细胞内将信息从RNA转到DNA的机制有可能把两个过去互不相容的致癌假说即遗传假说和病毒假说统一起来，也就是说使正常细胞转化癌细胞的正是病毒的遗传物质。在转化过程中病毒和细胞的遗传功能有密切的关系，因此致癌病毒的研究和分子遗传学已联系在一起了。从这些观点出发，物理和化学因素的致癌作用，病毒性癌肿为什么不平行传染，在癌肿中不容易分离出病毒粒子等疑难问题也就比较容易理解了（高尚荫，1972、甲、乙）。

我们知道RDDP催化RNA→DNA的过程包括两个步骤：
$$\begin{array}{ccc} \text{RNA} & \rightarrow & \text{RNA} \rightarrow \text{DNA} \\ & & \begin{array}{cc} | & | \\ \text{DNA} & \text{DNA} \\ (\text{杂种}) & (\text{双股DNA}) \end{array} \end{array}$$

Spiegelman等的观察（Spiegelman等，1970）证明RDDP活性的比率在白血病细胞粗制抽提物中，DNA杂种（rA.dT）对DNA（dC.dG）大大高于正常白血细胞（rA.dT代表人工合成的RNA—DNA杂种包括腺嘌呤核苷酸盐和脱氧胸腺核苷酸盐的均聚物或齐聚物，dC.dG代表人工合成的双股DNA包括胸腺嘧啶脱氧核苷酸盐和鸟嘌呤脱氧核苷酸盐的均聚物），但rA.dT活性随化学治疗迅速地减低，这说明RDDP活性在肿瘤中是高于平常细胞的。因此有可能利用RDDP的活性的测定对癌肿进行诊断，这个生化途径可能比形态学诊断更灵敏，但在临床上具体使用时还需要进一步研究（Gallo, 1970）。

在癌肿治疗方面利用某些特异地抑制病毒RDDP活性的抑制物可能达到治疗目的，现在已发现的利福霉素衍生物就是一个例子，据最近报导，这类物质既能抑制RDDP活性，也能在组织培养中抑制小白鼠白血病病毒和肉瘤病毒形成转化灶（Gallo, 1972）。

从1949年以来在癌肿研究资料中对人癌肿病毒的发现有不少的报导（Zilber和Abelev, 1968），但后来证明这些报导的根据并不太可靠。为什么长期来这问题得不到解决？病毒与人癌肿之间的关系还不十分明确的主要原因是因为从人癌肿中所得病毒并不能说明癌肿是由这些病毒引起的，因为脊椎动物往往带有许多病毒，这些病毒并不引起可认识的疾病，但它们集中在癌细胞内并能进行增殖。例如伯氏淋巴瘤是热带，特别是非洲儿童的一种高度恶性肿瘤，在这种癌肿的组织培养中发现它可能是伯氏淋巴瘤细胞中的所谓“随伴”病毒。又如疱疹病毒和何杰金氏病与宫颈癌的关系可能也是同样的。从淋巴瘤病人胸膜腔分离出来的所谓“ESP—1”病毒最初被认为是人淋巴瘤病毒，但后来由实验证明它的来源可能是鼠类白血

病病毒 (Todora, 1970)。

早在1882年霍克提出,在肯定一种微生物引起一种疾病之前必须满足三个基本条件:(1)从疾病的大多数病例中能分离出来;(2)分离出来的微生物能在纯种培养中生长;(3)把这微生物再接种到健康的动物中引起同样的疾病。对解释人癌肿病毒来说这三个条件还是应当遵守的,但是第一和第二条就很难达到,第三条不能满足。因为多年来从病毒致癌作用的观察表明在肿瘤中找不到致癌的病毒,要从人癌肿中找到病毒更困难了,就是找到了病毒也还有可能是与癌肿无关的“随伴”病毒。

霍克的第二条也难满足,因为病毒仅能在细胞(或动物)中生长,而细胞和动物往往带有它们自己的病毒并且不能象细菌培养基那样进行灭菌。

至于第三条就根本不可能满足了,因为在健康人身上诱导癌肿是绝对不允许的。

这样说怎样知道从人癌肿中分离出来的病毒是癌肿的病原呢?是不是人癌肿的病毒病因的研究不可能得到结果呢?不是,虽然我们不能得到直接的证据,但把各种间接的证据结合起来是可以证明人癌肿的病毒病因的。

如果人癌肿确实是由病毒引起的,那为什么长期来从癌肿中没有分离出病毒呢?原因是多方面的,但主要的原因可能是由于进行这方面工作者认为人癌肿象其它人的病毒性疾病,如流行性感冒或脊髓灰白质炎一样是由病毒粒子引起的,因而注意在癌肿细胞中找病毒粒子,其实从近年来癌肿病毒的分子生物学研究看,细胞中的病毒不一定以粒子的形式而存在,却可能是由细胞内含有遗传信息和RNA肿瘤病毒相似的细胞基因组在人癌肿表现出来,正如有关肿瘤病毒学说之一的所谓“致癌基因学说”所提出的(Huebner和Todora, 1969)。这个学说逐渐得到越来越多的实验支持,如内源性RNA肿瘤病毒信息在正常动物(啮齿类和鸟类)细胞内通过诱导而得到病毒粒子。如果在人体癌肿细胞中也含有这种信息则在少数人的致癌基因中也可能作为病毒粒子而表现出来,现在一般认为人横纹肌肉瘤病毒就是这样一个例子。因此证实病毒病因不仅意味着在癌细胞内寻找完整的病毒粒子也应包括发现病毒信息,这方面的研究必须深入到分子生物学领域中去,近几年来癌肿病毒的研究已向这方面发展并取得了一定的成果。

人癌肿的病毒病因工作可由三个途径——生物学、生物化学和流行病学来探索。

一、生物学途径

1. 从癌肿或癌细胞组织培养中分离病毒粒子

早在1907年一位意大利医生(Ciuff, 1907)发现用人的乳头瘤或疣的无细胞滤液注入志愿者的皮肤下能发生疣,这是用肿瘤无细胞滤液发现肿瘤病毒的第一个例子。此后鸡白血病病毒(Ellerman和Bang, 1908),鸡肉瘤病毒(Rous, 1911)等基本上都是用这方法在鸡体内发现的。在相当长时间内只能在家禽引起肿瘤的病毒,因而认为是特殊的例子。随后家兔纤维瘤(Shope, 1932),家兔乳头瘤(Shope, 1933)等病毒相继发现。曾用人癌肿物质无细胞滤液接种到各种动物,但还没有得到可靠的结果。将人型腺病毒接种到新生地鼠能引起地鼠产生肿瘤(Trentin, 1962),这个发现给人癌肿病毒在动物中发生肿瘤带来希望,但十年来没有成功。最近报导(Peeples, 1973)人癌肿物质通过在低等动物体内传代后分离的RNA肿瘤病毒并且从实验结果证明分离出来的病毒不是动物病毒,而是人癌肿的病毒(Peeples, 1973)。

近年来利用组织培养研究肿瘤病毒，将肿瘤无细胞滤液接种到各种细胞的组织培养中，观察是否引起细胞的转化或病变，从而分离病毒。这种实验应用于人癌肿病毒的分离还没有得到成功。根据动物肿瘤的情况，在肿瘤中往往找不到病毒，即使找到了病毒，它们的量也是极少的，更困难的问题是所释放出来的少量病毒需要有敏感的指示细胞（指能转化或发生病变的细胞）。人癌肿病毒必须有指示细胞和一个测定系统，到目前为止两者都没有解决，因此用这方法分离人癌肿病毒是有一定的困难的，可是近年来由于“缺陷型病毒”的发现（Rubin, 1964），使在组织培养中分离肿瘤病毒有了新的希望。劳氏肉瘤病毒（RSV）是一种所谓“缺陷型病毒”，它本身不能繁殖，需要另一种“辅助病毒”才能产生子代病毒。缺陷型RSV不能制造病毒粒子的正常外壳，必须由辅助病毒来辅助制造，也就是说RSV的外壳是由辅助病毒的基因组编码的。至于RSV的缺陷性和致癌性质的关系当时是不清楚的（Watson, 1965）。类似这种情况也发现于SV₄₀病毒和“腺病毒7”。SV₄₀病毒的一种缺陷型不能诱导病毒外壳蛋白质的合成，它只有在有腺病毒7存在时才能在猴细胞内繁殖，腺病毒7的作用是提供外壳蛋白质。这些缺陷病毒粒子对肿瘤诱导是有关系的，并且认为只有缺陷病毒才是致癌的（Rapp和Butel, 1970）。最近（Peeples, 1973）报告由鼠类肉瘤病毒转化的人细胞中获得的病毒制剂接种于小白鼠、家鼠、猫和几种人细胞中测定都不能发现病毒，但用猫白血病毒或横纹肌肉瘤病毒再感染这些细胞，能诱导感染性鼠类肉瘤病毒，这也是一个缺陷型病毒在另一种病毒再感染时出现病毒粒子的例子。根据缺陷型病毒的存在以及它们可能是致癌的，在组织培养中接种人癌肿的无细胞滤液的同时以另一种病毒再感染可能导致人癌肿病毒粒子的出现，因为有的人癌肿病毒是缺陷型病毒也是很可能的。

2. 组织培养中诱导病毒粒子

大多数或所有脊椎动物的细胞内含有“C-型”RNA肿瘤病毒的基因组，它们以直线方式从亲代传给子代（Huebner和Todora, 1969）。依赖宿主的基因型和各种改变了的环境因素，在它们细胞的培养中可能产生病毒。从1969年以来获得许多新的证据，表明从“正常的”或转化的癌细胞中通过各种方法能诱导出感染性病毒粒子，这些方法包括化学药品，如甲基胆蒽、5-溴脱氧尿核苷、5-碘脱氧尿核苷（Lowy等, 1971）、胰岛素和氢化可的松（McGrath, 1970）、植物血凝素（Schafer等, 1970）等，物理因素如X-射线和紫外光照射以及培养条件的变更〔如人网状肉瘤的神经节细胞的组织培养在37°C通过9代没有发现病毒，但转到30°C 18小时细胞的抽提物在“KB”细胞上出现许多病变斑，表示有病毒的存在（Gevandan等, 1971），经常移置的高浓度细胞〔如小白鼠的胚胎细胞组织培养，用经常移置的高浓度细胞，细胞“自发地”释放出C型RNA病毒粒子（Huebner, 1968）〕。现在从各种动物细胞中成功地分离出C型RNA肿瘤病毒的有牛（Ferrer等, 1971）、猪（Howard等, 1967）、猴（Wolfe等, 1971）、猫（Jarnett等, 1970）、家鼠（Klement等, 1971）、狒狒（Kalter, 1973）、地鼠（Todora等, 1971）、蛇（Gilden等, 1970）、狗（Chapman等, 1967）、小白鼠（Aarosson等, 1971）、鸡（Taylor等, 1971）等。鸡、小白鼠和猫的C型病毒的研究较为详细，它们是“自发”肿瘤的已知病因。以上事实的重要意义在于假设C型病毒基因组的表达也可能同样地在某些人的癌肿中发现，从而从人癌肿细胞内诱导病毒粒子不是不可能的，事实上现在已有初步的报导，如从人横纹肌肉瘤细胞中分离出致癌的病毒（McAllister等, 1972），从脂肪肉瘤细胞中诱导出类似鸟和鼠肉瘤病毒的粒子（Morton等, 1969）。

3. 细胞融合

有意识地将不同动物细胞或植物细胞在培养中混合,结果产生染色体物质的合并。最初是非双倍体小白鼠细胞间的杂交(Barski等,1960),随后体细胞杂交领域逐渐扩大到各种类型的细胞,这就是60年代初期发展起来的所谓“细胞融合”,细胞融合方法除在遗传学研究上的广泛应用外,也应用于肿瘤研究。肿瘤细胞和非肿瘤细胞融合后产生恶性杂种(Ephrussi等,1969)。转化的细胞可认为是含有病毒基因组而不表现的细胞,和正常细胞融合,在正常细胞的影响下有可能产生病毒粒子。目前转化细胞和正常细胞融合后,产生病毒的例子很多,如猴细胞和SV₄₀病毒转化的细胞融合后的异核体(两种不同细胞的细胞核的复体)诱导出感染性SV₄₀病毒(Fenner,1971),又如转化的哺乳动物细胞和鸡细胞融合形成异核体后产生病毒,细胞融合的频率增加导致产生病毒量的增加(Svobda,1971),又如劳氏肉瘤病毒感染家鼠细胞并不产生病毒,用另一种病毒再感染也不能诱导出病毒,但如果和鸡细胞融合后就出现了病毒粒子。

细胞融合诱导病毒的机制还不清楚,但有两种可能,正常细胞对转化的细胞内存在的病毒基因组(致癌基因组)起“去抑制作用”或对转化的细胞提供为病毒成熟所需要的“去抑制”的功能(Svoboda和Hlozaneck,1970)。(根据“致癌基因学说”认为在正常情况下,致癌基因组处于被抑制的状态因而不表现出来,“去抑制”后,基因组就表现出来了),到现在还没有将人癌肿细胞和正常细胞(人的或动物的)融合诱导病毒的实验,但值得一试!

4. 癌肿病毒的特异性抗原

六十年代初期在劳氏肉瘤发现有结构性病毒抗原,又在多瘤病毒肿瘤发现有非结构性抗原,这些新抗原确实是由病毒基因组编码的,所以有特异性。到目前为止凡研究过的由病毒引起的肿瘤系统都有相同的新抗原,由病毒编码的新抗原的病毒—肿瘤系统陆续在增加,说明这是一个普遍现象,根据这现象,通过免疫学途径探索人癌肿的病毒病因也是可能的。

在病毒编码的特异性抗原,特别是“T抗原”或“新抗原”(为已知动物病毒转化的细胞内的抗原,由病毒基因组编码)发现后,学者认为通过这种方法能比较容易地建立人癌肿和已知病毒间的任何可能的病因关系,在发现人型腺病毒能在新生地鼠中致癌事实后,这种可能性得到进一步的发展。建立人癌肿和已知病毒间的关系可通过两种可能的途径:在实验动物中产生“对号”的抗血清寻找在人癌肿的特异性抗原,用含有腺病毒T抗原的特异性动物病毒或在体外转化的人细胞作为抗原在癌肿病人血清中测定特异性抗体,就是没有一种特异性病毒,如果一系列的人癌肿表示含有一种共同的新的、不平常的抗原而这种抗原又不存在于自发肿瘤的正常组织中,则可以认为是一种还不知道的病毒的共同病因。前一个途径到目前还没有成功,但后一个途径在几种人癌肿类型中得到了正的结果(Habel,1969)。

近年来通过免疫学途径对几种人癌肿的病毒病因得到初步的结果,如所谓“伯氏肿瘤”(非洲淋巴瘤)和儿童淋巴性白血病具有共同的抗原和交叉反应(用荧光抗体染色法),同时在伯氏肿瘤组织细胞培养中发现有类似疱疹病毒的病毒,伯氏肿瘤病人的血清抗体和这病毒能发生反应,但还不能说这病毒就是病因,虽然100%的伯氏病例都含这种抗体,因为在有些健康人的血清中也有。更值得注意的是伯氏肿瘤抗原和有些伯氏细胞培养的抽提物起作用的沉淀抗体也发现于咽癌病人。此外伯氏抗原和蛙的罗氏肾腺癌之间具有类似的病毒抗原(用琼脂扩散法)。还有其它例子都说明人癌肿的某些类型含有相同的新抗原,这些新抗原

不存在于相应的正常组织中。但是必须注意到这些研究都包括用产生于异源动物种类的抗肿瘤或抗正常组织血清,分析结果比较困难,但由某一种病毒引起的癌肿,不论它们的组织类型或解剖的位置,具有一种共同的抗原的基本事实是肯定的,因此利用各种血清学技术探索人癌肿的病毒病因是一个极有希望的途径。

5. 电子显微镜术

近年来在人白血病和人乳腺癌细胞中观察到类似引起动物相应肿瘤的病毒粒子,虽然也有人癌肿细胞中没有发现类似的例子,在电子显微镜下精确地鉴定病毒存在着一定的困难,但由于技术方法的改进如负染色法、铁朊免疫术等在不同程度上能显示特殊的形态结构区别同样大小和形状的粒子。事实上,“EB”病毒是在电子显微镜中第一次发现的(Epstein, 1967)。无疑地电子显微镜的观察结合其它方面的证据,对鉴定病毒是有帮助的,但仅靠这工具不能或至少很难解决人的癌肿的病毒病因问题。

二、生物化学途径

1. 反向转录酶的测定

前面已提及在RNA肿瘤病毒中反向转录酶(RDDP)的发现。现在知道研究过有RDDP的RNA病毒至少有40种,其中33种是阳性,33种中的27种是已知的肿瘤病毒,其余6种的4种大概是致癌的,另两种,泡沫病毒和绵羊髓质脱失性脑炎病毒一直认为不具有致癌的可能性,但最近报告绵羊髓质脱失性脑炎病毒也能将正常小白鼠细胞转化为癌细胞,因此只有泡沫病毒是唯一有RDDP活性而不致癌的例外(Gallo, 1972),但是泡沫病毒属于一类所谓不太了解的病毒——“慢性病毒”,它的致癌可能性还是存在的。测定RDDP的阳性结果可以了解一种粒子是否癌肿病毒。利用这途径得到人的几种粒子,如从有乳腺癌家庭历史的妇女的乳汁中发现有RDDP,虽然这些粒子还不能在组织培养中生长(Spiegelman等, 1970),RDDP活性和致癌病毒的关系并不是绝对的,最近报导在正常细胞中也发现有RDDP活性,但如果测定RDDP的同时也测定病毒的RNA是否60—70S(S是沉淀常数的所谓Svedberg单位),可以比较肯定是致癌病毒,因为两者的结合是致癌RNA肿瘤病毒的特性(Schlom, 1972)。

2. 分子杂交

另一种寻找人癌肿病毒的生化方法是利用所谓“分子杂交”(Spiegelman, 1970)寻找病毒信息(DNA)。试以乳腺癌为例:用小白鼠乳腺癌病毒和RDDP制成的病毒RNA的DNA拷贝(这拷贝含有病毒RNA的遗传信息),将这DNA曝露于人乳腺癌组织的RNA中观察能否产生杂交反应,有反应说明小白鼠肿瘤病毒RNA制成的DNA和人癌肿RNA具有某些共同的遗传信息,这种“同源”表示两者之间有一定的关系。

三、流行病学途径

流行病学研究也是探索人癌肿的病毒病因的一个可以考虑的途径。如果在人癌肿中找到一种可能是病毒粒子,如白血病的C型粒子或乳腺癌的B型粒子,把粒子存在于相应的组织中联系这癌肿在人群中的发病率有可能得到人癌肿的病毒病因的线索(Shah等, 1972)。以乳腺癌为例:选择包括乳腺癌发病率不同的地区进行病例调查,联系妇女乳汁中B型粒子

存在的频率或数目和健康妇女的情况作对照,如果在乳汁中B型粒子的数目高于对照,这就加强了乳腺癌是由B型粒子引起的可能性。如果先检查在正常喂乳妇女的乳汁中的B型粒子,然后跟随癌肿的发生则更能得到两者的明确关系。从牛淋巴瘤的流行病学研究的结果,表明这肿瘤似乎是由于传染性的病因(病毒病因)(Jarrett, 1970)。

结 束 语

人癌肿的病毒病因问题是目前有关癌肿基础研究的一个活跃的领域。最近我国医学代表团访问法、加、美三国归国后的报告(吴蔚然, 1972)提到这几个国家,特别是美国都在进行这方面的工作。1971年日本肿瘤大会上主要讨论的问题之一是肿瘤的病因学,也涉及病毒病因问题(医学参考消息, 1972.1.20),美国癌肿研究所所长拉乌谢认为人癌肿研究的方向以及公共卫生的某些方面都有深远的意义(参考消息, 1972.4.14),目前据初步了解,国内也有几个单位在进行鼻咽癌、乳腺癌、白血病、食道癌的病毒病因工作。

对人癌肿病毒病因的研究要看到不是轻而易举的一面,但我们相信在毛主席的革命路线指引下,解放思想,破除迷信,从实践中总结经验,提出新的技术方法和实验途径,几种人癌肿如白血病、乳腺癌、鼻咽癌的病毒病因是可以突破的。

参 考 资 料

- [1] Aaronson, S.A. etc (1971) .Proc.Nat.Acad.Sci.68 : 3069
- [2] Allison, A.C. (1972) Brit.J.Cancer 26 : 97
- [3] Baltimore, D. (1970) Nature 226 : 1209
- [4] Barski, GS.etc. (1960) Comptes Rendus Hebdomalaires des Seances de L'Academie des Sciences Serie D (Sci, Naturiles) 251 : 1825
- [5] Cuiff, G (1907) G.ital.Mal.Vener.42 : 12
- [6] Chapman, A.L.etc (1967) Cancer Res.27 : 18
- [7] Ellermann, V.etc. (1908) Centralbl.Bakt.Para Sitank.Abt.1, orig.46 : 595
- [8] Ephrussi, G.S.etc (1967) Develop.Biol.Suppl.1 : 136
- [9] Fenner, F. (1970) In "Med.Biol." P.132, Acad.Press, N.Y.
- [10] Ferrer, F.J.etc. (1971) J.nat.Can.Inst.47 : 613
- [11] Gallo, R.C. (1972) Blood 39 : 177
- [12] Gilden, R.V.etc. (1970) Virol.41 : 187
- [13] Gevendan, P.etc. (1972) Seanes Acad.Sci, Paris, Ser.D.247 : 1989
- [14] Habel, K. (1967) Adv. Immunol.P.229
- [15] Howard, E.B.etc. (1967)
- [16] Huebner, R.J.and G.J.Todora (1969) Proc.nat.Acad.Sci.64 : 1089
- [17] Huebner, R.J.and E.J.Todora (1966) Proc.Nat.Acad.Sci.56 : 1164

- [18] Jarrett, o. (1970) *Adv. Can. Res.* 13 : 59
- [19] Kalter, S.S. etc. (1973) *Sci.* 179 : 1332
- [20] Kement, V. etc. (1971) *nature* 234 : 12
- [21] Klein, G. (1966) *Ann. Rev. Microbiol.* 20 : 223
- [22] Lowy, D.R. etc. (1971) *Sci* 174 : 155
- [23] McGrath, C.M. (1971) *J. nat. can, Inst.* 47 : 455
- [24] McAllister, R.M. etc (1972) *nature* 235 : 3
- [25] Miller, J. etc. (1969) *J. nat. Can. Inst.* 43 : 1297
- [26] Morton, D.L. etc. (1967) *Sci.* 165 : 813
- [27] Okazaki, W. (1970) *Avian Dis.* 14 : 413
- [28] Peebles, P.T. (1973) *Nature New Biol.* 242 : 98
- [29] Rapp, F. and J.S. Butel (1970) In "Genetic Concepts and Neoplasia" P.254, the williams and wilkins, Baltimore
- [30] Rous, P. (1911) *Amer. J. Med. Assoc.* 56 : 741
- [31] Rubin, H. (1964) *Sci. Amer.*, June 1964 P.46—52
- [32] Schafer, W. etc. (1971) In "the Biol. of Oncogenic Viruses" P, 116, north-Holland, Amsterdam.
- [33] Schlom, J. etc. (1972) *J. nat. Can. Inst.* 48 : 1197
- [34] Shah, K.V. etc. (1972) *J. nat. Can. Inst.* 48 : 1035
- [35] Shope, R.E. (1932) *J. Exp Med.* 56 : 803
- [36] Shope, R.E. (1933) *J. Exp. Med.* 58 : 603
- [37] Svoboda, J. (1971) In "the Biol. of Oncogenic Viruses" P.167, North-Holland, Amsterdam.
- [38] Taylor, G.J. etc. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68 : 3190
- [39] Taylor, G.J. etc. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69 : 1007
- [40] Spiegelman, S. etc. (1970) *Nature* 236 : 74
- [41] Todora, G.J. etc. (1971) *Nature* 236 : 74
- [42] Temin, H.M. and S. Mizutani (1970) *Nature* 226 : 1211
- [43] Trentin, J.J. (1962) *Sci.* 137 : 835
- [44] Watson, J.D. (1965) In "The Mol. Biol. of Gene." P.464, Benjamin, N.Y.
- [45] Wood, W.C. and D.L. Morton (1970) *Sci.* 170 : 1318
- [46] Wolfe, L.G. etc. (1971) *J. nat. Can. inst.* 47 : 1115
- [47] Zilber, E.A. and G.E. Abelev (1968) In "the Virol. and Immunol. of Cancer" P.32-38, Pergamon Press, London
- [48] 高尚荫 (1973) "遗传学通讯"第四期 (在印刷中)
- [49] 高尚荫 (1972甲) 武大生物系科技资料选编第一期
- [50] 高尚荫 (1972乙) 武大生物系科技资料单印本

肝 炎 病 毒 研 究

Ⅱ、家兔腭淋巴结免疫制备抗肝炎缔合抗原血清

第一冶金建设公司职工医院检验科 湖北省微生物研究所肝炎组

肝炎缔合抗原 (Hepatitis—Associated Antigen, 简称HAA) 和乙型肝炎关系的确立〔1, 2〕为乙型肝炎提供了血清学标准。鉴定HAA用的抗血清, 工作初期系由人体获取〔3, 4〕。随着HAA检测在临床和普查中的逐步推广应用和研究工作的需要, 采用免疫动物制备抗体的工作相继开展, 先后在家兔〔5〕、黑猩猩〔6〕、小鼠〔7〕、豚鼠〔8〕、马〔9〕、山羊〔10〕等动物中获得成功。我们制备HAA抗血清时, 选用家兔腭淋巴结作为基础免疫途径, 试验获得了预期结果, 现总结如下:

材 料 和 方 法

实验动物 白色家兔, 体重2公斤以上。

抗原—抗体复合物 按通常方法制备。HAA阳性血清徐徐加入盛有HAA抗血清的试管中, 边加边摇匀, 直至出现最大混浊度为止。该试管置37°C温箱3—5小时(或再放冰箱内过夜), 经离心弃去上清液后, 沉淀物用生理盐水洗涤并悬浮于生理盐水中。复合物于波长280nm时(光程0.5厘米)的光密度为0.4。

部分提纯抗原 试验中用两种方法制备部分提纯抗原, 一法为胃蛋白酶处理, 一法为DEAE—纤维素柱层析。

胃蛋白酶处理制备抗原的方法基本与Kim等〔11〕的方法相同。HAA阳性血清(或血浆)按1:7或1:9与蒸馏水混合, 用盐酸调整pH至2.0—2.3后, 加入胃蛋白酶使其最终浓度为40毫克/100毫升, 放置于37°C温箱4小时, 取出盛入透析袋内, 对含有乙二胺四醋酸二钠的磷酸盐缓冲生理盐水(pH7.4、0.015M磷酸盐缓冲液含有氯化钠0.85%和乙二胺四醋酸二钠0.001%, 简称PBS—EDTA)透析过夜。透析液离心除去不溶物后, 经130000g离心4小时, 沉淀物用原体积1/10—1/15的PBS—EDTA溶解, 最后离心除去不溶物, 取上清液。

DEAE—纤维素柱层析制备抗原的方法是: HAA阳性血清按1:3用蒸馏水稀释, 稀释血清加入DEAE纤维层析柱, 该柱是已用pH8.6、0.01M Tris(三羧甲基甲烷)磷酸缓冲液充分平衡的; 加入后用含有0.03M、0.05M、0.1M和0.2M氯化钠的同一缓冲液洗脱。汇集具有抗原活性的洗脱液, 经130000g离心4小时, 沉淀物用约为原体积1/40的PBS—EDTA溶解, 除去不溶物后留存上清液。

部分提纯抗原的滴价用不连续对流免疫电泳[12]呈阳性反应最大稀释度的倒数为 $>20^\circ$

佐剂 由石蜡油40毫升,羊毛脂10毫升,卡介苗50毫克组成。免疫用抗原除注明外均为抗原与等量佐剂乳化液。

结果和讨论

在初步试验中,用抗原-抗体复合物免疫家兔5只,其中有3只产生了抗体。在此基础上进行了另一次试验,免疫过程及结果见表1。

表1 抗原-抗体复合物免疫家兔试验结果

试验动物号	基础免疫		第一次加强免疫			试 血		第二次加强免疫			试 血	
	部位	剂量(毫升)	时间	部位	剂量(毫升)	时间	抗体反应	时间	部位	剂量(毫升)	时间	抗体反应
一	两腮淋巴结	各0.2	基础免疫后18天	两鼠蹊皮下	各0.5	基础免疫后25天	-	基础免疫后25天	臀部肌肉	0.5	基础免疫后30天	+
二	"	"	"	"	"	"	-	"	"	"	基础免疫后38天	+
三	"	"	"	"	"	"	-	"	"	"	基础免疫后34天	+
四	"	"	"	"	"	"	-	"	"	"	基础免疫后30天	+
五	"	"	"	"	"	"	-	"	"	"	基础免疫后34天	+

抗原-抗体复合物免疫家兔的试验结果,在用胃蛋白酶处理和DEAE柱层析制备的部分提纯抗原免疫家兔的试验中得到了重复,结果见表2。从表2可以看出:大多数试验动物在第一次加强免疫后就产生了抗体,为试验动物总数的87.5%;未产生抗体的3只家兔中,对其中两只进行了第二次加强免疫后也产生了抗体,这就使成功率达95%以上。可以预料,另一只家兔如果进行第二次加强免疫,产生抗体是有充分可能的。部分提纯抗原免疫动物的血清用不连续对流免疫电泳测定其滴价时,部分动物的抗体滴价达32。

试验组2原为5只家兔,开始时耳静脉注射不加佐剂抗原0.2毫升后,隔日注射同一抗原一次,共四次,剂量分别为0.3、0.5、0.6和0.7毫升。因第二次免疫时过敏死亡1只,以后各次免疫前均用药物脱敏。此试验组与试验组1相伴进行,但于第一次免疫后18天和21天试血时,存活的4只家兔全未产生抗体,与试验组1形成了明显的对照,如果不是由其它原因(如佐剂)引起的差异,那么,免疫途径则是具有重要意义的重要因素。

另一与试验组4同时进行的试验组,仅腮淋巴结免疫一次不再另行加强免疫。15天后试血时发现1只家兔产生了抗体,虽21天后试血时其余4只仍未产生抗体,就成功率而论,显较试验组4为低,然而试验却提示了腮淋巴结一次免疫于短期内产生抗体的可能性。

制备抗血清,用抗原-抗体形成的沉淀弧经腮淋巴结免疫的方法具有一系列优点[13],缺点是当抗体不足或缺乏时此方法将受到限制或不能进行。本试验采用抗原-抗体复合物在原理上与该方法相同,因而同样也存在着这种局限性。为此,我们的试验中同时试用另一类材料免疫制备抗血清,以便视实际情况决定取舍。

表2 部分提纯抗原免疫家兔试验结果

免疫抗原		胃蛋白酶处理		DEAE柱层析		
试验组		1	2*	3	4	5
试验动物数		5	4	5	5	5
基础免疫	部位	两腮淋巴结	两腮淋巴结	两腮淋巴结	两腮淋巴结	两腮淋巴结
	剂量 (毫升)	各0.2	各0.2	各0.2	各0.2	各0.2
第一次加强免疫	时间	基础免疫后15天	基础免疫后15天	基础免疫后14天	基础免疫后15天	基础免疫后14天
	部位	两鼠蹊皮下	两鼠蹊皮下	两鼠蹊皮下	两鼠蹊皮下	两鼠蹊皮下
	剂量 (毫升)	各0.4	各0.4	各0.4	各0.4	各0.5
试血	时间	基础免疫后21天	基础免疫后21天	基础免疫后21天	基础免疫后21天	基础免疫后23天29天
	产生抗体动物数	4	4	4	5	4
第二次加强免疫	时间			基础免疫后21天		基础免疫后29天
	部位			臀部肌肉(两侧)		腹腔
	剂量 (毫升)			各0.3		0.5
试血	时间					基础免疫后39天
	产生抗体动物累计数	4	4	5	5	5

*此组为耳静脉途径注射不加佐剂抗原未产生抗体存活之家兔(详见正文)。

结 论

试验用肝炎缔合抗原(HAA)一抗体复合物和部分提纯肝炎缔合抗原免疫家兔,以腮淋巴结作为基础免疫途径,成功地制备出肝炎缔合抗原的抗血清。

参 考 资 料

- [1] Prince, A. M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 60, 814(1968)。
- [2] Giles, J. P., McCollum, R. W., Berndtson, L. W., Jr. and Krugman, S., New Eng. J. Med. 281, 119(1969)。
- [3] Blumberg, B. S., Alter, H. J., Visnich, S., J.A.M.A., 191, 541(1965)
- [4] Millman, I., Zavatone, V., Gerstleg, B.J.S., Blumberg, B.S., Nature, 222, 181(1969)。

- [5] Melartin, L., Blumberg, B. S., Nature, 210, 1340 (1966)。
- [6] Lichter, E. A., Nature, 224, 810 (1969)。
- [7] Millman, I., Ziegenfuss, I. F., Raunio, V., London, W. T., Sutnick, A. I., Blumberg, B. S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 1426 (1970)。
- [8] Purcell, R. H., Gerin, J. L., Holland, P. V., Cline, W. L., Chanock, R. M., J. Infect. Dis., 121, 222 (1970)。
- [9] Cabasso, V. J., Nieman, R., Schroeder, D. D., Hok, K. A., Louie, R. E., Mozen, M. M., Appl. Microbiol., 21, 1017 (1971)。
- [10] Dreesman, G. R., Hollinger, F. B., McCombs, R. M., Melnick, J. L., Infect Immun., 5, 213 (1972)。
- [11] Kim, C. Y., Spano, J., Clark, G. E., J. Infect. Dis., 124, 411 (1971)。
- [12] 湖北省微生物研究所《应用微生物与病毒》第一集, 35页 (1972)。
- [13] Goudie, R. B., Horne, C. H. W., Wilkinson, P. C., Lancet, II 1224 (1966)。

肝炎缔合抗原的电子显微镜初步观察*

湖北省微生物研究所电镜组

1964年Blumberg发现在一名澳大利亚居民的血液中含有一种异性物质，并称其为澳大利亚抗原(Au-Ag)，1968年Prince在患有乙型肝炎病人的血清中也观察到类似的物质，即血清性肝炎抗原(SH-Ag)，不久就确认这两种物质是相同的。1970年国际肝炎会议决定统一称此物质为肝炎缔合抗原，简写为HAA。

为了防治肝炎疾病，弄清乙型肝炎病原，近两年来我国在HAA的研究方面已取得一定的成效，对于血库工作和医院门诊的应用，减少发病率均具有重要的实际意义。

肝炎缔合抗原的检查方法较多，例如琼脂扩散、对流免疫电泳、补体结合试验、放射免疫技术等，电子显微镜技术也是其中之一。此外电子显微技术还能为病原的探讨提供科学依据。1969年Almeida和Waterson在电子显微镜下观察到与乙型肝炎临床症状有关的，似病毒样的三种颗粒，随后，在这些颗粒的形态学和结构等方面亦有所报道。我们应用电子显微镜对肝炎缔合抗原、抗原-抗体复合物进行了观察，现将所采用的方法与初步结果报告如下：

样品的制备 分别将HAA与肝炎抗原-抗体复合物滴加在盖有聚乙烯甲醛-碳膜的铜网上，用双蒸水适当冲洗，吸干后用1%磷钨酸(pH7.0)染色数分钟，吸去多余的染液，待干，在Hu-11A型电子显微镜下观察。

观察结果 通过电子显微镜检查HAA及其复合物，可以看到样品中有三种类型的颗粒(图1)。第一种近似球形的颗粒数目较多，直径约16-23nm，这些颗粒的表层由致密的相同的“亚单位”所组成，在平面上看呈不规则的六角形(图2, 3)。第二种长形颗粒为数少一些，长度变化的差异较大，其宽度约20nm(图1)。第三种颗粒好像“油炸圈饼”样的大颗粒，为数极少，这种大颗粒由明显的外壳包围一个中心核所组成，直径约42nm(如图1箭头所示)。此外，还有许多小颗粒的中部有被染料渗透的中心核，在这种小颗粒的外表，紧围着一层由若干微小粒子组合的晕圈(图4)，此晕圈与抗体或其它有何关系？有待进一步研究。

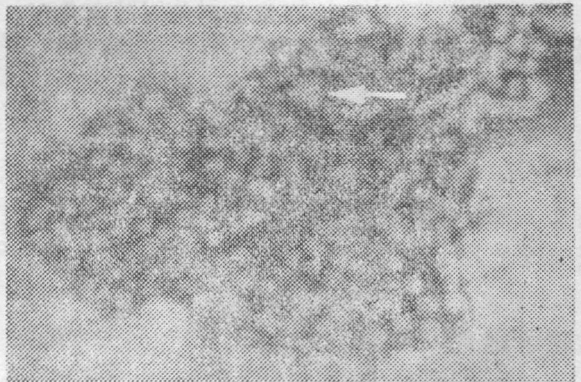


图1 三种不同形状负染色的肝炎缔合抗原-抗体复合物。×150,000

*本工作承上海第一医学院等单位大力协助，特此致谢。

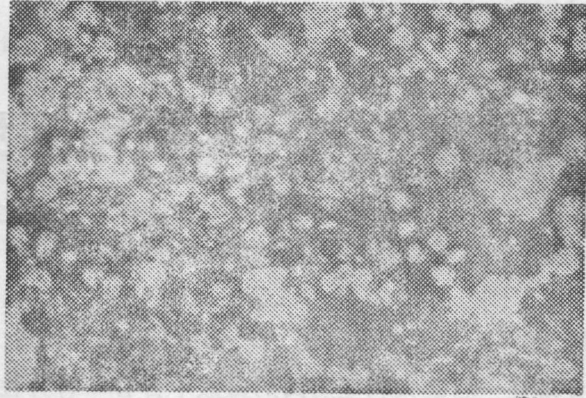


图2 负染色的肝炎缔合抗原。×150,000

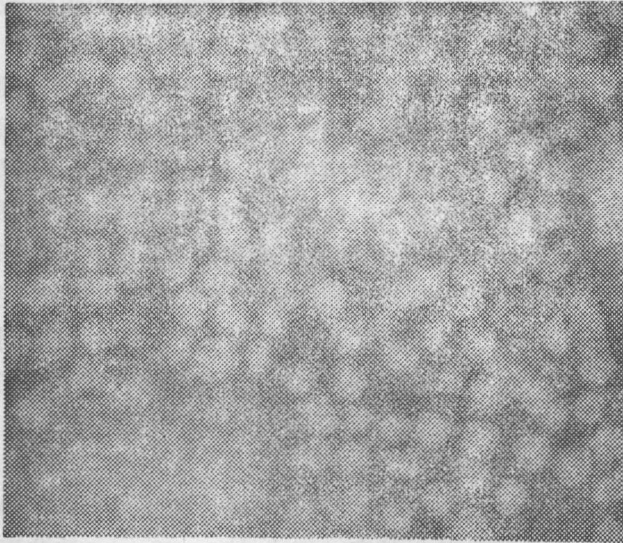


图3 一群负染色的肝炎缔合抗原—抗体复合物，表层有致密的“亚单位”，颗粒呈不规则的六角形。×240,000

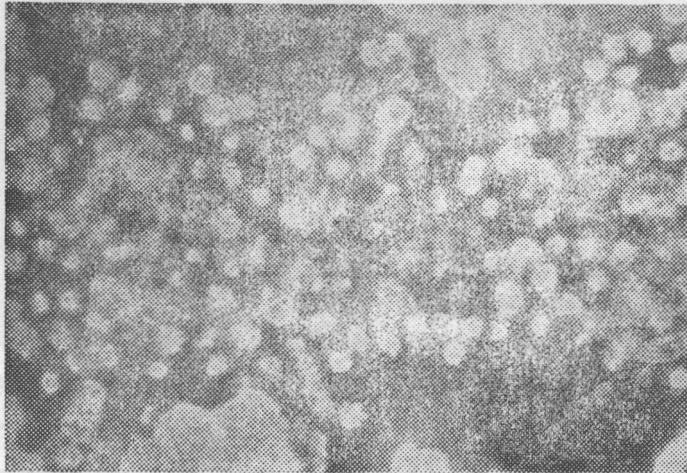


图4 负染色的肝炎缔合抗原—抗体复合物，具显著的中心核，颗粒外圍有一晕圈。×240,000