

- tion. P. 154.
- [23] Gwatkin, R.B.L. and Williams, D.T., 1978, *Gamete Res.* 1:19.
- [24] Sacco, A.G. et al., 1981, *Biol. Reprod.* 25: 997.
- [25] Yanagimachi, R. et al., 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 2405.
- [26] Tsunoda, Y. and Chang, M.C., 1976, *Biol. Reprod.* 14:354.
- [27] Sacco, A.G. et al., 1983, *Fert. Steri.* 39:35.
- [28] Shivers, C.A. et al., 1980, *Selected Papers on Planned Parenthood* 21:283.
- [29] Trounson, A.O. et al., 1980, *Arch. Androl.* 4:29.
- [30] Isojima, S. et al., 1984, *J. Reprod. Immunol.* 6:77.

巴豆油对单纯疱疹病毒 诱发小鼠宫颈和/或阴道癌的促进作用*

满廷高 陈敏海

(湖北医学院病毒研究所细胞生物室, 武汉)

自1966年以来, 许多研究表明, 阴部单纯疱疹Ⅱ型病毒(HSV-2)感染与宫颈和阴道癌的发生密切相关。这些研究包括: 细胞病理学观察^[1~2]; 血清流行病学调查^[3~4]; HSV-2感染对体内及体外细胞的转化^[5~10]; 转化细胞和宫颈癌细胞内 HSV-2 痕迹的检测等^[11~12]。

为了进一步研究 HSV-2 感染与宫颈和阴道癌发生的关系及进行实验性治疗和预防, 多年来, 有关工作者一直希望能建立一个完善的、由 HSV-2 诱发的宫颈癌动物模型。

本实验的目的旨在确定: 1. 已知促癌剂巴豆油对 HSV-2 的诱癌潜能是否有促进作用, 借以探讨病毒诱癌过程是否也符合“两阶段学说”的规律; 2. 能否借促癌剂的作用提高肿瘤的诱发率, 以建立更为完善的动物模型; 3. HSV-1 与 HSV-2 在诱发小鼠宫颈和阴道癌的作用上是否存在型的区别。

材料和方法

1. 病毒

HSV-2(333株), 由美国宾夕法尼亚大学 F. Rapp 教授赠给; HSV-1(SM 44株), 由本所病毒室提供。

实验前, 经溴乙烷脱氧尿核苷(BVDU)敏感实验

及细胞选择实验证实, 病毒的株型及生物学活性均无改变。

将病毒接种于原代培养的兔肾单层细胞中, 待75%以上的细胞出现细胞病变时, 冻融3次, 低速离心(1500转/分)15分钟, 取部分上清液测病毒效价, 其余分装于经高压消毒的小瓶中, -20℃保存。接种动物前将效价为 10^5 TCID₅₀/毫升的病毒悬液倒入小平皿中, 紫外灯下照射(46尔格/平方毫米/秒)6分钟, 经照射后的病毒悬液按常规方法接种于兔肾单层细胞后, 72小时内不出现细胞病变。

2. 正常细胞悬液

除培养细胞不接种病毒外, 余同病毒悬液的制备。

3. 巴豆油

由本院化学教研室按 Van Duuren^[13]介绍的方法, 从巴豆种仁中提取并鉴定, 化学纯, 密封避光保存。用前加橄榄油(化学纯)配成2%的溶液。

4. 棉球

医用脱脂药棉捻成绿豆大小的棉球, 高压消毒, 密封保存备用。

5. 动物分组及处理

自本院动物室取得两月龄、昆明种、雌性处女小白鼠330只, 随机分为A~F6个组, A~D组各60只, E与F组各45只, 分组置铁笼中饲养。实验期180

* 中国科学院科学基金资助的课题。

天, 各组处理如下:

A组: 将棉球浸泡于 HSV-2 悬液中, 待棉球完全浸透后(每个棉球含病毒悬液约 0.5 毫升), 用无齿眼科镊将其塞入小鼠阴道内, 直抵宫颈处, 每只小鼠每次塞入 1 个, 每周 1 及周 5 各 1 次, 连续 16 次。末次接种 1 周后, 改用生理盐水棉球按同法塞入, 连续 27 次。末次处理后 20 天处死动物, 完整取出阴道、子宫、输卵管、卵巢、心、肝、脾、肺、肾等组织, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 间断连续切片, H-E 染色, 供镜检。

B组 以 2% 的巴豆油代替生理盐水, 余同 A 组。

C组 以 HSV-1 代替 HSV-2, 余同 A 组。

D组 以 HSV-1 代替 HSV-2, 余同 B 组。

E组 先塞入细胞悬液棉球, 连续 16 次, 然后塞入浸透 2% 巴豆油的棉球, 连续 27 次, 方法及取材均同 A 组。

F组 单纯塞入浸透未感染病毒的细胞悬液棉球, 共 43 次, 方法及取材均同 A 组。

6. 病理组织学判断标准

宫颈和阴道的病理检查所见, 按杨简^[14]关于小鼠实验性宫颈及阴道癌的判断标准判定。根据癌的病理组织学特征, 大致可分为两种类型: 1. 分化程度较高的鳞状上皮癌(图 2~5); 2. 分化程度较低的腺样癌(图 7~8)。根据癌组织的浸润范围, 可分为早期癌、浸润癌(图 2, 3, 7)及广泛浸润癌(图 4, 5, 8)。

其他脏器之所见按相应病理标准判定。

7. 统计学处理

除实验初期由于病毒急性感染及肺炎死亡的动物外, 将各组存活四个月以上的死亡动物及实验期满后处死动物的前癌、癌发病率进行统计, 以 u 检验测其显著性。

实验结果

经病理组织学观察发现, 前癌(图版 1, 6)和癌可单独见于宫颈或阴道, 也可同时累及宫颈和阴道(作 1 例计)。其他内脏组织无癌变。主要结果见下表:

各组宫颈和/或阴道癌及前癌的诱发率

组别	处理	存活动物数	生癌动物数(%)	前癌动物数(%)	癌和前癌动物合计数(%)
A	HSV-2 加生理盐水	34	7(20.6)	10(29.4)	17(50.0)
B	HSV-2 加巴豆油	46	25(54.3)	11(23.9)	36(78.2)
C	HSV-1 加生理盐水	43	9(20.9)	7(16.3)	16(37.2)
D	HSV-1 加巴豆油	36	12(33.3)	9(25.0)	21(58.3)
E	细胞悬液加巴豆油	31	0(0)	5(16.1)	5(16.1)
F	细胞悬液	30	0(0)	1(3.3)	1(3.3)

将各组结果互相比较说明:

1. A 组分别与 E 组及 F 组比较, 癌发病率及合计数之间的差别均有高度显著性 ($P < 0.005$), 说明 HSV-2 有诱发小鼠宫颈和/或阴道癌的作用。

2. A 组与 B 组比较, 癌发病率及合计数之间的差别均有高度显著性 ($P < 0.005$), 说明巴豆油对 HSV-2 的诱癌潜能有明显的促进作用。

3. C 组分别与 E 组及 F 组比较, 癌发病率之间的差别有高度显著性 ($P < 0.005$), 合计数之间的差别有显著性 ($P < 0.025$), 说明 HSV-1 有诱发小鼠宫颈和/或阴道癌的作用。

4. C 组与 D 组比较, 癌发病率之间的差别

虽无显著性 ($P > 0.05$), 但合计数之间的差别有显著性 ($P < 0.05$), 且 D 组浸润癌及广泛浸润癌(分别为 50.0% 及 25.0%) 均显著高于 C 组(分别为 22.2% 及 11.1%, $P < 0.01$), 说明巴豆油对 HSV-1 的诱癌潜能也有一定的促进作用。

5. A 组与 C 组比较, 癌发病率及合计数之间的差别均无显著性 ($P > 0.05$), 说明此两型病毒诱发小鼠宫颈和/或阴道癌的潜能无明显区别。

6. B 组与 D 组比较, 癌发病率及合计数之间的差别均有显著性 ($P < 0.05$), 说明 HSV-2 加巴豆油的诱癌作用强于 HSV-1 加巴豆油。

7. F组前癌动物数与其他组之间均有显著性差异。其中1例前癌可以认为是自发的,或实验性轻微机械刺激所致。

讨 论

40年代初, Berenblum 和 Rous 等^[15,16]报道了涂巴豆油促进化学物质诱癌的结果,并认为癌变过程可分为启动和促进两个阶段。在启动阶段中,正常细胞转变为潜伏的肿瘤细胞;在促进阶段中,细胞受到刺激,分裂增多而生长为真正的肿瘤。这一假说已得到许多实验证据的支持^[17,18]。然而,HSV 诱发宫颈和/或阴道癌发生的过程是否也包含启动和促进两个阶段,至今尚未见报道。本实验先以灭活的 HSV-1 及 HSV-2 作为诱癌剂接种于小鼠阴道,后以巴豆油作为促癌剂多次作用,所得结果亦说明巴豆油对 HSV-1 或 HSV-2 的诱癌有促进作用。此结果提示:在病毒诱发的宫颈和/或阴道癌的发生过程中,可能也存在着启动与促进两个阶段。

近十余年来,国内外许多学者做了大量工作,力图建立完善的 HSV 肿瘤动物模型,以进一步研究 HSV-2 与宫颈癌的关系及进行实验性治疗和预防。然而,实验结果表明:将 HSV-2 接种于兔、豚鼠、狗及猴的阴道中,均未能诱发出宫颈和/或阴道癌^[19,20]。将 HSV-2 接种于小鼠阴道,虽能诱发出宫颈和/或阴道癌,但诱癌率甚低。Munoz 在 140 只接种 HSV-2 后存活 7~9 个月的小鼠中,发现两例宫颈鳞癌,诱癌率为 1.4%^[5];Nahmias 在 50 只接种 HSV-2 后存活两年以上的小鼠中,发现 1 例原位癌,诱癌率为 2%^[6];陈敏海等在 161 只接种 HSV-2 后存活 180~360 天的小鼠中发现早期浸润癌 5 例,诱癌率为 3.1%^[7];陈敏海等还将 HSV-2 多次接种于小鼠阴道,在第 1 次接种后存活 360~390 天的小鼠中,诱癌率为 9.5%^[8];最近陈敏海等将紫外线灭活的 HSV-2 多次接种于小鼠阴道,在为期半年的实验中,诱癌率为 17%^[9];Wentz 等将紫外线灭活的 HSV-2 接

种于小鼠阴道,每周 5 次,在为期 630 天的实验中(共接种病毒 450 次),诱癌率为 60%(其中三分之一为肉瘤)^[10];本实验在 180 天内,HSV-2 加巴豆油组的癌发病率达 54.3%,合计率达 78.2%(未将肉瘤计算在内)。与上述工作相比,本实验无论是在诱癌率的提高方面,还是在缩短实验时间方面,都更为理想。

一般认为,HSV 的感染具有严格的部位特异性:HSV-1 引起唇、眼、脑部感染并与相应部位的肿瘤发生有关;HSV-2 则引起生殖器感染并与该处的肿瘤发生有关^[21,22]。但本实验发现,在不加巴豆油的情况下,此两型病毒的诱癌潜能基本相同。最近,William 等^[23]也报道,约有 15%左右的人类阴部原发性疱疹感染是由 HSV-1 所致。据此,在宫颈和/或阴道癌的病因研究中,我们既要重视 HSV-2 的作用,同时也应考虑到 HSV-1 在这方面的作用。

本实验还发现,HSV-1 加巴豆油组与 HSV-2 加巴豆油组癌发病率及合计率之间的差别均有显著性($P < 0.05$),后者高于前者。这一现象提示,此两型病毒所诱导的转化细胞对于促癌剂的反应性方面,可能存在质或量上的差异。

参 考 文 献

- [1] Naib, Z. M., et al., 1966, *Cancer*, 19: 1026—1031.
- [2] Naib, Z. M., et al., 1969, *Cancer*, 23:940—945.
- [3] Rawls, W. E., et al., 1969, *Am. J. Epidemiol.*, 89:547—554.
- [4] Nahmias A. J., et al., 1974, *Cancer Res*, 34:1111—1117.
- [5] Munoz N., 1973, *Cancer Res*, 33:1504—1508.
- [6] Nahmias A. J., 1971, *Prospective Virol*, 7: 73—79.
- [7] 陈敏海等。1980。中华肿瘤杂志, 2(4):259~269。
- [8] 陈敏海等。1980。实验生物学报, 13(3): 273~279。
- [9] Chen Min-Hui., et al., 1983, *Vaccine*, 1:13—17.
- [10] Wentz W. B., et al., 1981, *Cancer*, 48: 1783—1790.

- [11] Frenkel N., et al., 1976, *J. Virology*, 18: 885—893.
- [12] 陈敏海, 蒋文俊等。1979。中华肿瘤杂志, 1(4):255~258。
- [13] Van Duuren B. L., 1965, *Cancer Res*, 25: 1871—1875.
- [14] 杨简等。1962。肿瘤研究论文集, 202—203。上海科学技术出版社。
- [15] Berenblum I., 1941, *Cancer Res*, 1: 44—48
- [16] Berenblum I., 1954, *Cancer Res*, 14:471—447.
- [17] Berenblum I., 1957, *Brit. J. Cancer*, 11: 85—87.
- [18] Goerttler K., et al., 1980, *Cancer Res*, 40: 155—161.
- [19] Rapp F., et al., 1976, *Cancer Res*, 36: 800—806.
- [20] Sever J. I., 1973, *Cancer Res*, 33:1509—1510.
- [21] Rapp F., 1977, *Cancer*, 40:419—429.
- [22] 余澍等。1983。医学微生物学, 784—787。人民卫生出版社。
- [23] William C., et al., 1981, *N. Engl. J. Med*, 305:315—319.

酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体的研究*

季永镛

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

检测小鼠 IgE 类抗体的经典方法是被动皮肤过敏试验(PCA)^[1,2], 这是一种生物测定, 因而在应用上受到一定限制, 并且也受动物本身变化的影响。1973年 Hoffman^[3]首次报道了用 ELISA 检测血清 IgE。此后有不少工作者相继报道了应用 ELISA 检测 IgE 或抗原特异的 IgE 类抗体^[4-8]。为研究对天花粉蛋白的免疫应答的性质及其调节机制, 我们建立了一种较为简便的检测小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体的 ELISA, 并对其检测的特异性进行了研究。

材料和方法

一、小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体的诱发

1. 动物 纯种小鼠 C 3 H/He、C 57 BL/6, B 10 和 BALB/C, 体重均为 20 克左右, 由本所动物房提供。

2. 免疫 将精制天花粉蛋白加铝矾制成抗原制剂, 小鼠腹腔注射 0.2 毫升(相当于 5 微克天花粉蛋白和 4 毫克铝矾)进行免疫。10 天后取血, 分离血清, 为小鼠抗天花粉蛋白抗血清。若进行第二次免疫, 则在首次免疫后 4 周进行, 抗原制剂和免疫途径与首次免

疫相同。用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法从上述抗血清中分离免疫球蛋白(Ig), 称为抗天花粉蛋白抗体。以终饱和度为 33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分离得到的抗体不含有 IgE; 若以终饱和度为 55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分离得到的抗体含有 IgE^[9]。

二、被动皮肤过敏试验(PCA)^[2]

将小鼠抗天花粉蛋白抗血清(或抗体)倍比稀释后, 在剃去毛的 Wistar 大鼠背部进行皮内致敏, 每点 0.1 毫升。24—48 小时后, 从尾静脉注射含有 4 毫克天花粉蛋白的 1% Even's 蓝溶液 1 毫升。30 分钟后, 根据致敏部位出现蓝色斑点与否来判定结果。

三、羊抗小鼠 IgE(SAMiGE)的制备

1. 小鼠 IgE(MiGE)的来源 本工作使用的 MiGE 系小鼠抗二硝基苯(DNP)的 IgE 类单克隆抗体^[10], 为美国 Dr. Metzger, H. 所赠。

2. 绵羊的免疫 以 0.6 毫克 MiGE 溶于 1.5 毫升磷酸缓冲生理盐水, 加等体积 Freund 佐剂, 多点注射在绵羊皮下、肌肉和尾部。3 周后以不完全 Freund 佐剂配制的 MiGE 再免疫一次。在第二次免疫后 6 周进行回忆刺激。免疫后 1 周取血, 分离血清为 SAMiGE 抗血清。

* 林国妹同志参加实验工作。精制天花粉蛋白由武汉生物制品研究所提供; 天花粉蛋白包被工作得到我所许河生同志大力帮助, 谨致谢意。