

优劣环境交替性生物循环选育的理论与技术体系和应用

〔关键词〕 细小病毒 疫苗研制 恶性横纹肌样瘤 交替选育 〔中图分类号〕 Q81 Q89

张德礼¹ 李衍达² 黄高升³ 朱关福⁴ 方福德⁵

(清华大学信息科学技术学院自动化系智能技术与系统国家重点实验室、清华大学生物信息学研究所生物信息学教育部重点实验室, 博士¹; 中科院院士²; 教授⁴ 北京 100084; 第四军医大学基础部病理学教研室、中国癌症研究基金会肿瘤学研究所, 教授³ 西安 710032; 中国医学科学院基础医学研究所/中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室⁵ 北京 710032)

不同环境条件下的交替选育作用^[1-6]虽已有成功的应用,但在恶劣环境下筛选后再回归到同类优越环境下培育,并反复循环选育的优良生物品种,特别是选育强毒高免疫原性的超高增殖病毒株,经体内外环境交替培育获得高变异率肿瘤细胞系并实现异类肿瘤在体实验转化的现象,尚未见报道。

我们在进行水貂肠炎细小病毒(MEV)灭活疫苗研制中,偶然利用敏感与钝感猫肾细胞系交替选育MEV获得超高增殖率毒株^[7-10];在将鸭乙型肝炎病毒(DHBV)正义与反义重组质粒经脂质体包被后转染痘苗病毒感染的人类143细胞系时,无论大大推迟或提前接种重组质粒均收到了良好的转染效果,获得重组病毒蚀斑并使之得以纯化。这一远离最适时机转染的技术策略不同于传统观点:在143细胞培养感染痘苗病毒以在特定时间转染重组质粒为宜;而我们在进行细胞系致癌毒理学安全性评价时^[11-21],意外发现与体外培养相比,动物与人类肿瘤细胞系高变异率株均可在裸鼠体内成功地快速选育,进而证实可发育为极高变异率的恶性横纹肌样瘤(MRT),发现并确认了这种异类肿瘤的在体实验转化现象,并从比较医学角度初步澄清了MRT的组织细胞起源。这是因裸鼠具有轻微体液免疫机能和自然杀伤细胞活性^[22]而去劣存优定向培育的结果。这一动物病毒细胞系体外培养体系规律后来在不同实验体系的基因与染色体水平分别得到验证,特别是在人类病毒细胞系体外培养体系以及动物或人类肿瘤细胞系裸鼠体内成瘤体系得到实际应用,还分别提供了基因和染色体水平的遗传证据。

据此,我们提出了这种优劣环境交替性生物循环选育作用的理论与技术体系和相关机制假说。它正是联系我们自己在不同时期取得相关成果的纽带与桥梁,具有广泛的科学指导意义。同时,本文详细介绍了水貂细小病毒疫苗研制和细胞系致癌毒理研究成果,重点阐述了高效水貂细小病毒疫苗研制、痘苗病毒重组质粒转染技术创新、细胞系致癌毒理学安全性评价、异类肿瘤在体实验转化现象确立与MRT起源之谜初步揭示等创新内容。

一、病毒疫苗制备用细胞系染色体组型分析与致癌安全性评价和横纹肌样瘤起源

1. 国内外发展现状

制备疫苗所用传代细胞系(CCL)的致癌毒理是关系到疫苗安全和人畜生命健康的关键问题之一^[23-29]。制苗用人二倍体细胞系(HDC)的安全性检定国外已有标准,而CCL能否安全用于病毒活疫苗制备已争议了44年,用于制造与检验的专门规程仍未正式出台,致癌安全性检定尚无标准。制苗用细胞系应无传染因子污染、应符合细胞遗传学要求,尤其应缺乏致癌/致瘤性,这已基本为国际同行所公认。为解决犬五联和猫三联疫苗报批国家生产文号所必须解决的这一首要关键问题^[30-48],为我国制苗用CCL的致癌安全性检定规程的制定提供科学依据,特进行了该项毒理实验。本研究是我国生物制品领域,特别是兽医生物制品研制方面亟待解决的空白点,也是难点。

弄清恶性横纹肌样瘤(MRT)的组织细胞起源是进行诊断和攻克防治问题的基础。1978年首例MRT发现于肾脏。近10年来,在女性生殖道出现MRT病例发生的报道。自1978年首例报道以来,有关MRT的报道逐年增多。业已研究发现,MRT广泛存在于不同年龄和性别的人体多种组织器官中,并有同时发现于不同组织器官或其它恶性肿瘤并存的病例报道。肾内外MRT的临床特征和病变特点基本一致,主要是侵袭力极强、恶性程度很高、生长迅速、成瘤巨大、易经血路扩散转移、对多药物综合疗法有抗性,只能采取切除疗法并配合化疗和放疗延长生命,且预后极差、死亡率极高。但迄今为止,所发现的MRT均难以复制成功,MRT的起源问题仍是医学上尚未解决的难题^[49-75]。目前尚无关于高变异率染色体核型和MRT关系的研究报道。

2. 创新点与科学论述

在建立国内首家犬、猫、猴、鼠传代细胞种子库与工作库基础上,我们对研制生产犬五联和猫三联病毒活疫苗所用7种动物肾细胞系(F-81, CRFK, MDCK, Vero, Vero-2, MA-104, BHK-21)在700余只裸鼠上进行了致癌(瘤)试验,并完成染色体变异率、克隆形成率、细胞凝集性与肿瘤形成的相关性研究,取得以下创新性成果。

(1) 恶性横纹肌样瘤(MRT)的起源研究取得突破。研究发现将高变异率细胞系移植于裸鼠皮下多呈MRT细胞形态生长,这是MRT在模型动物体内

的首次发现和成功复制。它使阐明 MRT 的起源问题成为可能。同时, 从比较医学角度发现并证实了 MRT 的肾上皮起源, 子宫颈上皮可能是 MRT 的起源组织之一。

(2) 对 MRT 病因 (高变异率细胞染色体核型)、产生条件、生长规律、临床特点进行了开创性研究, 对建立 MRT 裸鼠模型进行了有效探索。从染色体遗传变异角度初步阐明了 MRT 的发生、发展规律, 初步筛选出可致 MRT 的 BHK- 21、Vero 和 HeLa 细胞株以及可产生 MRT 的裸鼠实验模型, 并掌握了高变异率细胞系皮下接种裸鼠产生 MRT 的实验条件。

(3) 发现异类肿瘤在体内实验转化现象。高变异率上皮细胞系移植于裸鼠皮下, 可在体内快速选育出更高变异率的细胞系, 并可发育为 MRT。肿瘤细胞系高变异率株可在裸鼠体内快速选育成功, 瘤体细胞染色体数目变异显著加快, 染色体条数明显增加。

(4) 筛选出无致癌/ 致瘤、无传染因子、符合遗传学要求的细胞系 (F- 81, CRFK, Vero, Vero- 2) 及极低致癌性的几株 MDCK 犬肾细胞系用于制苗, 建立了国内首家犬五联疫苗制备用犬、猫、猴、鼠传代细胞种子库与工作库。

(5) 发现 BHK- 21 细胞系不论核型如何, 始终具有强致癌性, 不能用作病毒活疫苗培养基质。筛选出替代致癌性 BHK- 21 细胞培养狂犬病弱毒疫苗的多株 Vero 细胞系和 JC 株 Vero- 2 细胞系。

(6) 发现 MDCK 细胞系不论核型如何, 始终具有致癌性, 至少具极低致癌性, 即实际上并不存在非致癌性的 MDCK 株细胞系。这有可能打破学术界长期以来认为存在非致癌性 MDCK 细胞系的观点, 从而对有关生物制品和基因工程产品的安全性提出新的要求和标准。

(7) 证实冻融裂解细胞系的致癌性相应降低, 非致癌性细胞系不会因冻融裂解而增加致癌性。发现 MDCK 细胞系冻融裂解物不致癌, 降低制苗毒液中细胞系基因含量, 完全可以将亚二倍体 MDCK 细胞系用于犬五联苗生产。

(8) 发现猫肾细胞系为亚二倍体核型, 不具致癌性, CRFK 猫肾细胞系 M 株、F- 81 猫肾细胞系 JA 株与 KA 株可安全用于制苗; 发现 Vero- 2 和 MA- 104 猴肾细胞系无致癌性, Vero- 2 细胞 JC 株为亚二倍体核型, 可用作病毒活疫苗培养基质。

(9) 发现高变异率 Vero 非洲绿猴肾细胞系 JA 株与 KA 株具有强致癌性, 不能用作病毒活疫苗培养基质, 但可用作恶性肿瘤阳性对照细胞; 这充分证实亚二倍体 Vero 细胞 YB, JC, M 和 JB 无致癌性, 可用作病毒活疫苗培养基质。

(10) 特别是得到了一些 100% 成瘤和 100% 不成瘤的细胞株, 并从中探讨了与染色体组型的关系。这对于肿瘤的发病机理及实验治疗, 都是非常好的模型, 一些细胞系 (致 MRT 的细胞株) 不仅成瘤而且还转移, 从而建立了很好的肿瘤遗传生物学特性的实验模型。

(11) 发现犬、猫、猴、鼠肾细胞系的染色体变异率、软琼脂中克隆形成率、在植物凝集素作用下的凝集性和在裸鼠体内形成癌肿的潜力之间具有相关性。这为细胞系的致癌性检定提供了科学、简易、

经济的手段。

(12) 通过对 7 种动物肾细胞系进行的大量系统的致癌毒理实验, 揭示了遗传变异率与致癌/ 致瘤性的关系, 为选择病毒活疫苗培养基质的细胞系和国家审批细胞制剂提供了科学依据, 为生物制品生产安全性检定提出了指标。

(13) 发现犬、猫、猴、鼠肾细胞系染色体遗传特征决定致瘤性质并具有种属特异性, 细胞染色体数目变异大小和致癌/ 致瘤性强弱相关, 染色体结构畸变率特别高可能会增加致癌性。鉴于此, 不同生物制品研制单位必须建立自己强大的传代细胞库, 并须经检定合格方可启用。

我们选择了一些源于美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 权威认定的起源清楚的肾上皮传代细胞系 (引自国内外 10 多个单位的 30 多株 7 种动物细胞系), 已在生物医药及其产业广泛应用, 因而本研究实际上是对现代生物制品和生物技术产品制备用传代细胞系的大规模系统深入的致癌安全性评价研究, 特别是经反复多次实验证明高变异率 BHK- 21、Vero 或 HeLa 细胞系移植于裸鼠皮下多呈 MRT 细胞形态生长或致 MRT 样恶性肿瘤, 揭示了肾上皮是 MRT 的重要起源组织, 人类子宫颈上皮可能是 MRT 的起源组织之一, 从而使阐明 MRT 的起源问题成为可能。用起源清楚的细胞系导致 MRT, 自然得出起源的结论, 这一思路简捷的技术路线具有原始创新性, 为 MRT 肿瘤起源研究独辟蹊径。

光镜下 MRT 瘤细胞的特征为胞浆丰富、嗜酸性, 核周常有界限相对清楚的淡染区域。在实验肿瘤的诊断上, 根据 MRT 的典型镜下特征, 在国际上首次采用高变异率的染色体遗传本质和皮下接种裸鼠产生恶性程度极高的肿瘤临床特征相结合的方法, 并以大量模型动物的实验结果为依据, 使诊断结果具有较高的先进性。2002 年 12 月, 澳大利亚 Shannon 等^[76]在“成人横纹肌样肾细胞癌”一文中认为, 成人横纹肌样肾细胞癌在某些情况下来源于常规肾瘤细胞, 这应当被看作肾细胞癌在临床上的一种重要形式, 不同于但类似于肉瘤变化 (sarcomatoid change)。这对我们横纹肌样瘤的肾上皮起源是有力的佐证, 同时又不排斥其他可能的起源。

我们有关 MRT 起源的研究成果有助于 MRT 的实验诊断并能指导对这一高恶性、高死亡率、暂无良策予以根治的肿瘤的临床防治, 因而具有潜在的社会效益和经济效益。

3. 科学价值和应用前景

本课题立项解决重要实际问题, 对人类医学和兽医学具有同等的重要作用。

对起源不明的恶性横纹肌样瘤 (MRT), 采用来源清楚的肾上皮细胞系 [国际典型培养物保藏中心 (ATCC) 提供] 皮下接种裸鼠, 不仅在模型动物体内发现产生了 MRT (种植瘤而不是诱发瘤, 移植细胞系原种动物染色体核型而不是裸鼠核型), 而且反复复制均取得成功。MRT 在模型动物体内的首次发现和成功复制, 使阐明其起源问题成为可能。我们从染色体遗传变异角度初步阐明了 MRT 的发生、发展规律, 从比较医学角度揭示了 MRT 的组织细胞起源。对肿瘤学而言, 揭示遗传变异率与致癌 (瘤) 的关系, 建立 MRT 裸鼠模型的新思路, 不仅对 MRT 本

身的深入研究, 而且对肿瘤防治、发生机理与遗传生物学特性的研究, 均具有重要指导意义。

建立了国内首家犬五联、猫三联疫苗制备用的无传染因子污染、符合细胞遗传学要求、没有致癌/致瘤性的传代细胞种子库与工作库, 解决了犬五联和猫三联疫苗安全制备和报批国家生产文号所必须解决的关键问题, 以及传代细胞致癌毒理实验的难题, 为选择病毒活疫苗培养基质的细胞系和国家审批细胞制剂提供了科学依据, 为生物制品生产安全性检定提出了新指标。有关新发现为国际生物制品和基因工程产品的安全性检定提出了新的要求和标准。制备犬五联活病毒疫苗的细胞系致癌毒理实验研究结果已被国家有关部门认可 (农业部兽药审评委员会办公室和中国兽药监察所) 并通过抽测核实 (农业部指定的上海市肿瘤生物技术研究), 疫苗批号的致癌安检已通过权威部门审核 (农业部兽药审评委员会办公室)。

本项目既是基础理论研究, 又是生物制品应用研究。应用筛选出的传代细胞系制备了军犬五联疫苗及利用免疫关中驴制备的犬猫用浓缩精制抗多病 IgG, 已在全国广泛推广应用, 产生了显著的社会、经济效益。为犬科动物养殖业的发展, 为保护猫科动物大熊猫、虎和雪豹等珍稀资源, 提供了有力的疫病防治技术保障, 同时还拓宽了关中驴的用途。

4. 存在的问题与后续研究方向

(1) 就制苗用细胞系致癌毒理研究而言, 在基因型上再多做一些工作, 可能会更有理论深度。此外, 可根据目前的结果, 对应用于牲畜方面的疫苗进行跟踪性或回顾性观察, 以探讨用致瘤细胞株生产的疫苗可能带来的实际危害, 中国农大动物医学院病理学教授余锐萍对此就有切实的体会。

(2) 我们有关 MRT 起源研究成果突破了长期以来该研究领域的停滞状态, 如能进一步系统克隆出几乎可以致 MRT 产生高变异率 BHK-21、Vero、Hela 或其它起源清楚的细胞株, 并建立起良好的 MRT 裸鼠或其它无菌实验动物模型, 对应用于 MRT 的临床诊断、治疗和预防, 特别是对 MRT 细胞株的基因组序列的研究和鉴定以及对瘤苗和恶性肿瘤基因的治疗研究, 必将开辟出新的交叉学科研究领域, 对恶性肿瘤的诊断和防治做出重要贡献。

二、水貂细小病毒超高增殖的交替选育和灭活疫苗的研制与应用

1. 国内外发展现状

20 世纪 80 年代初我国水貂养殖业就出现了集约化、规模化的发展趋势, 1987 年全国已有种兽 500 多万只, 每年可提供出口高档裘皮用貂皮 1 000 多万张。但水貂病毒性肠炎 (MVE)、犬瘟热和阿留申病这三大疫病困扰着水貂养殖业的发展。MVE 系由水貂肠炎细小病毒 (MEV) 所引起的急性、烈性、高度接触性传染病, 其发病率和死亡率可高达 60%~90% 以上。多年来 MVE 广泛流行于世界各养貂业发达国家。由于经常从国外引进种貂而将貂病输入, 80 年代以来水貂病毒性肠炎在养貂业密集地区不断暴发、流行, 造成了巨大的经济损失。我国 1984 年虽然研制出 MVE 同源脏器灭活疫苗, 但因水貂价格昂贵, 只能在取皮期或用淘汰貂来生产脏器苗, 而

不能常年生产疫苗。水貂同源脏器苗应用福尔马林作为灭活剂, 虽然能够灭活 MEV, 但为了保持病毒抗原的高效性, 所用福尔马林的浓度比较低, 对 ADV 和传染性水貂脑病类病毒, 很难达到彻底灭活的目的。我国阿留申病病毒 (ADV) 的污染率很高, 若制苗用水貂带有 ADV 或传染性水貂脑病类病毒, 这些病毒将会因灭活不完全而由接种疫苗散播, 造成严重后果。由于水貂价格昂贵, 疫场往往采用现地死亡水貂的脏器制作疫苗进行紧急预防接种, 更易造成广泛的 ADV 污染。研制水貂病毒性肠炎细胞培养灭活疫苗在当时已成迫切需要。

国外早有猫肾原代细胞 (FKC) 培养的 MEV 弱毒疫苗及其多联疫苗。弱毒疫苗比相应灭活疫苗的免疫期要长。然而, 有的 MEV 弱毒疫苗接种水貂后数天内排毒, 用弱毒疫苗配制的 MEV 三联疫苗免疫过的地方有 MVE 暴发的报道, 一些养貂业发达国家有 MVE 蔓延的趋势, 这可能与弱毒疫苗返祖有关。国外用 FKC 培养 MEV 灭活疫苗, 并未传入我国, 但从有限文献报道看其免疫指标明显比本疫苗的低。

与原代细胞和二倍体细胞相比, 使用传代细胞库可保障安全有效疫苗的标准化、低成本和大规模生产, 特别是能避免细胞来源动物病毒的污染与传播。疫苗制备用细胞系染色体组型分析与致癌毒理实验研究是安全有效疫苗研制与安全性评价标准制定的基础问题。尚未发现国内外有关猫肾细胞系的致癌毒理研究。

2. 创新点与科学论述

基因工程疫苗前景美好, 然而迄今只有乙型肝炎疫苗得到实际应用, 其它疫病目前还是实际依靠安全有效的致弱病毒活疫苗和/或灭活疫苗进行免疫预防。的确, 在水貂病毒性肠炎免疫预防方面, 目前主要还是依靠细胞培养灭活疫苗。创新点如下。(1) 在国内首次研制成功水貂病毒性肠炎 (MVE) 细胞培养灭活疫苗, 能大批量常年生产应用, 具速效、高效和长效等特点。(2) 敏感性差异极显著细胞系交替选育获得超高增殖率 MEV 株, 为最佳制苗用毒株, 提出了有关机制的假说。(3) 从疫场病貂新排出的肉眼观为粉红色肠粘膜圆柱病料中, 直接分离鉴定并获得高增殖率 MEV 株, 为最佳制苗用与攻击用的强毒株。(4) 建立了 MEV 组织培养与灭活的最适方法及高效价无血清 MEV 抗原大批量生产和检验的最新工艺, 研制成功 MVE 特异性快速诊断盒和 MEV 疫苗质量快速检验盒。(5) 实验表明 F-81 和 CRFK 猫肾细胞系为亚二倍体核型, 无致癌性, 可安全用于疫苗生产。

已发现细小病毒超高增殖的交替选育规律, 并在不同实验体系的基因与染色体水平得到验证。

水貂病毒性肠炎疫场的典型发病貂, 排出的新鲜粉红色肠粘膜圆柱病料中, 直接用 F81 株猫肾细胞系分离鉴定, 可获得高增殖率 MEV 株 (L₂), 为最佳制苗用与攻击用 MEV 强毒株。这是该疫苗研制成功后深入疫区貂场的独特收获。这种肠粘膜圆柱病料不是常规套管, 本项目主持人在现场只见到两例。这与已有文献报道排除肠粘膜套管明显不同, 教科书上只有可排除肠粘膜套管的记载。迄今未见文献资料报道水貂病毒性肠炎典型发病貂排出肠粘膜圆柱。

在国内首次研制成功 MVE 细胞培养灭活疫苗,已将其与水貂犬瘟热鸡胚系或绿猴肾细胞培养弱毒疫苗和肉毒梭菌类毒素首次配制成联合疫苗在国内使用。为该疫苗的研制和批量生产找到了一种比氢氧化铝胶理想、经济、效能更佳的新佐剂——矿物油。本研究用自己分离选育的毒株在猫肾细胞系上培养增殖,按自己筛选的最佳条件灭活后制备疫苗。国内后来普遍生产使用或报道的 MVE 细胞培养灭活疫苗,实际都采用了我们公开发表的技术资料或种毒。

通过系统实验证明 HA 是检测水貂肠炎病毒组织培养液中病毒含量及毒力的可靠指标,肠鼠、家兔或水貂接种疫苗后 11~40 天的血清 HI 抗体水平是检定水貂病毒性肠炎疫苗(矿油苗和铝胶苗)对水貂的体液免疫效力和免疫保护率的可靠指标,并确定制苗用 MEV 液的效价达 $HA_{64\times}$ 或 $TCID_{50} \log_{10}^{7.6}$;疫苗免疫水貂、豚鼠、家兔血清 HI 抗体效价达 $32\times$,作为病毒含量和疫苗效力检验的合格标准,这就为大批量生产水貂病毒性肠炎细胞苗提供了经济、简便、可靠的质量检定新手段;

过去我国以“水貂肠炎病毒福尔马林灭活脏器抗原”作为标准诊断液在野外现场进行水貂病毒性肠炎特异性血凝(HA)一血凝抑制(HI)试验诊断。本研究于 1986 年首次发现了水貂肠炎病毒经过福尔马林灭活后血凝(HA)性消失。这一事实说明,“水貂肠炎病毒福尔马林灭活脏器抗原”中的病毒实际上并没有被灭活,这个发现修正了我国原来使用的水貂病毒性肠炎特异性 HA—HI 试验规程,并缩小了其使用范围,结束了我国以 HA—HI 试验在野外貂场进行水貂病毒性肠炎诊断的历史,避免了后来的野外现场诊断时散毒的严重危险性。

3. 科学价值与应用前景

该疫苗于 1998 年 11 月和 1999 年 12 月先后获得国家二类新药证书,能大批量地常年生产应用。所用 F-81 猫肾细胞系已通过中国科学院上海细胞生物所的无致癌性鉴定。实验室和临床试验结果证明,MEV 细胞苗接种貂、貉、狐、犬、猫等珍贵动物后无任何不良反应,消除了水貂病毒性肠炎同源组织灭活疫苗中易于潜在水貂阿留申病毒(ADV)和传染性水貂脑病类病毒的严重危险性等一系列缺点,且作为无血清灭活苗接种动物后不发生“再次注射血清病”。疫苗免疫效力和量效关系试验结果证明,MEV 细胞苗的免疫效力极强,可与强毒感染貂的免疫水平相比。貂、猫、犬、浣熊细小病毒在抗原结构、理化特性、血清学反应、遗传性、致病性、免疫性等方面高度相似。本试验证明安全高效的 MEV 矿油苗和铝胶苗可有效地用于其它珍稀动物(如貉、狐、军警犬、灵猫、波氏猫、狮、虎、豹、熊猫等)细小病毒性肠炎的免疫预防和紧急控制。

该研究各项技术指标齐全,疫苗各项质量和经济技术指标居国际同类产品先进水平。该疫苗免疫产生期 3 天,免疫期和保存期均在 9 个月以上,免疫保护率 100%,作为产品苗的制备可将高效价抗原稀释使用。一般无需制备 MEV 高免血清用于紧急治疗,接种免疫产生期为 3~7 天的特制高效疫苗即可。而在 1986 年秋末该疫苗最初研制成功时,国内一致认为疫苗只有预防作用,无治疗作用。虽然当

时不能明确指出该疫苗的治疗作用,但本研究项目在当时发表文章时仍设法记录该疫苗治疗作用(注释:实际上,接种疫苗后 3 天快速产生免疫力,从生物制品免疫专业角度严格地讲是被动免疫保护作用)的实际数据。90 年代后,特别是现在“治疗性疫苗”与预防性疫苗一样已被普遍接受,尽管机制不同。无论如何,这一具有防治双重作用的高效细小病毒灭活疫苗的广泛临床应用,对严重威胁养貂业的急性病毒性肠炎起到了很好的控制作用。而一般认为灭活疫苗的缺点就是免疫力较差,抗原需浓缩使用。

在我国毛皮动物养殖业发展受到 MVE 毁灭性打击的危急时刻,该疫苗应运而生并迅速广泛应用,16 年来产销单位获纯利润 2 240 万元,创造直接经济效益 4 480 万元,间接经济效益 36.05 亿元,可增收节支外汇 4.574 亿美元。这在我国兽医新疫苗发展史上是不多见的。该疫苗安全可靠、效果确实,既可用于发生疫情时假定健康貂的紧急预防接种,又可接种隐性感染貂和发病水貂以达到治疗病毒性肠炎的目的。该疫苗成本十分低廉(技术含量高、生产工艺先进),非常适于在国内广泛推广应用,历经长期考验仍不用更新换代,一直(至今)广泛用于控制我国水貂、貉子、狐狸等野生经济动物细小病毒性肠炎的广泛流行,已产生并将继续产生巨大的社会效益和经济效益。

三、优劣环境交替性生物循环选育的理论与技术体系的建立和实际应用

1. 细小病毒超高增殖的交替选育获得最佳制苗用水貂肠炎病毒株

(1) 简要说明 本研究用敏感性不同细胞系交替选育获得了超高增殖率的水貂细小病毒株,这是创新性核心技术之一。细小病毒(PV)性肠炎是对珍贵动物养殖业危害和威胁最大的烈性传染病。迄今为止,尚未见国际上有组织培养水貂肠炎病毒(MEV)、猫泛白细胞减少症病毒(FPLV)、 $TCID_{50}$ 高于 $\log_{10}^{7.0}$ 或 MEV 的 HA 高于 $32\times$ 或 CPV 的 HA 高于 $4\,096\times$ 的犬细小病毒(CPV)的报道。又据 Goto(1986)报道, $TCID_{50}$ 为 $\log_{10}^{4.9}$ 的 CPV 比 MEV、FPLV 的 HA 高 20 多倍,故 HA 为 $4\,096\times$ 的 CPV 液比 HA 为 $32\times$ 的 MEV 液中病毒含量还低。由此可见,PV 培养效价低是目前国际上亟待解决的重要问题^[77]。

(2) 技术内容 采用钝感 C-81 株猫肾细胞系和敏感 F-81 株猫肾细胞系交替选育 22 代,从 6 株 MEV(效价仅有 $HA_{2\times}-64\times$)中筛选出增殖滴度高达 $HA_{8\,192\times}-32\,768\times$ 或 $TCID_{50} \log_{10}^{9.7-10.3}$ 的两株 MEV(S_{13} 株, S_{33} 株),美国株 MEV 标准毒的 HA 效价也由 $8\times$ 提高到 $2\,048\times$,流程示意图见图 1。病毒在钝感 C-81 株猫肾细胞系上正常连传 5 代后不再增殖(滴度逐代下降直至最低),此时实施强迫感染传代(即每次盲目传代的同时接种收获有效价的上一代病毒细胞培养物),这样传 3 代后也不再增殖(滴度逐代下降直至最低)。经这样严格选育的增殖滴度接近阴性的 C-81 株猫肾细胞系培养病毒物,再接种于敏感 F-81 株猫肾细胞系传代培养。据 S_{13} 株、

S₃₆株、美国株 MEV 经 C-81 株细胞严格筛选后回归于 F-81 株细胞连传 7 代的 HA 效价, 按照配对资料 t 检验, S₁₈株较 S₃₆株 MEV 的增殖能力强 ($P < 0.01$), S₃₆株较美国株 MEV 的增殖能力强 ($P < 0.01$)。系统试验证明, 新选育的 S₁₈株和 S₃₆株 MEV 的增殖率超高、免疫原性异常强、免疫谱广、生物学性状稳定, S₁₈株 MEV 是最佳制苗用强毒株。6 年来, 以新选育的 S₁₈株和 S₃₆株 MEV 为种毒, 用大立瓶旋转单层培养法批量生产了约 600 万份灭活疫苗, 病毒增殖滴度一直保持在 HA64[×] - 4 096[×] 或 TCID₅₀log₁₀^{7.6-9.4}, 一般稳定在 HA 256[×] - 1 024[×] 或 TCID₅₀log₁₀^{8.2-8.8}, 此滴度大大超过了国内外文献所载组织培养 MEV 的最高效价 HA32[×] 或 TCID₅₀log₁₀^{7.0}。

根据本研究结果, 笔者提出敏感性差异极显著细胞系交替选育获得超高增殖率 MEV 株的机制是: ①病毒在任何一株细胞上连续传代都是一个筛选和培育的过程, 不适者淘汰, 适者生存, 并得以定向驯化, 直至最适于在此株细胞中增殖; ②病毒在敏感细胞株上培养的头几代, 由于选育的去劣存优作用, 使得增殖滴度逐渐上升; ③病毒在敏感性较差的细胞株中选育初期, 去劣存优, 定向驯化作用比较明显; ④病毒在钝感细胞株中选育, 去劣存优作用最为明显, 在培养效价接近阴性的代次时仍存活并能复制增殖的病毒粒子, 其生物学性状最为优良; ⑤经敏感性较差的细胞株或钝感细胞株严格选育后的病毒, 再回归于敏感细胞株上培养时, 由于增殖条件显著改善, 培养效价大幅度提高, 选育几代后 (如选育至第 21~22 代) 增殖滴度出现跳跃上升; ⑥经钝感细胞株选育若干代的病毒, 冻存较长时间 (如本试验冻存 16~17 个月) 而使其生活能力下降后, 再回归于敏感细胞株上选育, 则增殖滴度上升幅度趋于平缓。此假说有待进一步证实。

国内外研究结果证明, MEV、FPLV、CPV 和浣熊细小病毒 (RPV) 在抗原结构、理化特性、血清学反应、遗传性、致病性、免疫性等方面高度相似。根据有关文献资料推断, MEV、CPV 和 RPV 均可能是 FPLV 的突变株, 且 MEV 和 CPV 可能是在集约化貂、犬养殖业发展的情况下, 由于广泛使用的 FPLV 弱毒疫苗经机体自然传代后变异而来的。笔者优选的 MEV 最佳培养条件、营养液配方、无血清培养方法移植于 CPV、FPLV 的培养已取得成功, 显著提高了 PV 效价。因此, 敏感性差异极显著的细胞系交替选育, 不仅可大幅度提高 MEV 增殖滴度, 也可望选育出超高增殖率的 FPLV、CPV 和 RPV 株。

本研究新选育的 S₁₈株与 S₃₆株 MEV 已在灭活疫苗生产和基础研究中得到广泛应用, 产生了极大的社会、经济效益及巨额利润。于病毒微量 TCID₅₀测定研究时还发现, 将通过 C₁₈株和 F-81 株细胞交替选育 23 代的 S₁₈株、S₃₆株和美国株 MEV 的混合毒按高倍稀释度 (如 10⁻⁸) 接种于 F-81 株细胞培养时, 单层细胞病变 (CPE) 很不明显, 但收获毒效价却达 HA8[×] 以上。可见, MEV 经交替培育可能加快了致弱进程, 从而为弱毒疫苗的选育成功奠定了基础。

敏感与钝感猫肾细胞系交替选育出了超高增殖率 MEV 株, 新选育的 S₁₈株 MEV 是最佳制苗用毒株; 敏感性不同的细胞系的交替选育, 对提高猫泛白细胞减少症病毒 (FPLV)、犬细小病毒 (CPV) 和浣

熊细小病毒 (RPV) 等存在高度抗原交叉性和基因同源性的同一血清型细小病毒的增殖效价有显著效果; 本试验规律的机制很可能与生物学自然选择规律相一致, 可谓自然选择学说的又一佐证。我们的最新发现为大幅度提高细小病毒增殖率开辟了新的选育途径, 为大批量生产高效价的 MEV 细胞培养液提供了新方法, 为高效的细小病毒组织培养疫苗的研制成功奠定了坚实基础。

总之, 我们采用对 MEV 敏感性显著不同的两株猫肾细胞系交替选育的手段, 从 6 株 MEV 中筛选出增殖率超高、免疫原性好、免疫原性广、生物学性状稳定的两株 (S₁₈、S₃₆) MEV 作为最适制苗用种毒, 疫苗病毒含量大大超出了文献所载国外同类产品的水平。这项研究为高增殖率细小病毒株的选育开辟了新的途径, 为高效价水貂肠炎病毒液的大批量培养提供了新方法, 使得制备细胞灭活苗用细小病毒抗原的生产成本降低了数十倍乃至百倍, 从而研制出了免疫保护率达 100% 的高效疫苗, 并能大批量生产。该成果所获 MEV 毒株已经被国内研究人员应用于相关基础理论研究。

2. 此病毒水平规律已在不同实验体系基因与染色体水平上分别得到验证

在病毒选育的手段上, 采用敏感性不同的细胞系交替培育的方法, 经 22 代从 6 株 MEV (HA2[×] - 64[×]) 中筛选出了增殖滴度为 HA8 192[×] - 32 768[×] 或 TCID₅₀log₁₀^{9.7-10.3} 的两株 MEV (S₁₈、S₃₆), 从而为高增殖率 MEV 的选育开辟了新途径。病毒在钝感 C81 株猫肾细胞系上正常连传 5 代后不再增殖 (滴度逐代下降直至最低), 此时实施强迫感染传代 (即每次盲目传代的同时接种收获有效价的上一代病毒细胞培养物), 这样传 3 代后也不再增殖 (滴度逐代下降直至最低)。此外, 我们用 MDCK 株犬肾细胞系完全代替 C81 株猫肾细胞系传代培养 MEV 也取得了一致的结果。经这样严格选育的增殖滴度接近阴性的 C81 株猫肾细胞系培养病毒物, 再接种于敏感 F-81 株猫肾细胞系传代培养。发现敏感性差异极显著细胞系交替选育可大幅度地提高水貂肠炎病毒 (MEV) 增殖率, 从而选育出最佳制苗用毒株, 最终获得了病毒含量大大超出文献记载的国外同类产品的水平, 使疫苗的免疫保护率达到了 100%。《细小病毒超高增殖的交替选育》论文提出了有关该机制的假说。据此假说, 1992~1993 年本项目主持人在病毒基因工程国家重点实验室对痘苗病毒重组质粒转染技术的探索性研究取得良好结果, 首次简化了基因转染技术。一般认为在 143 细胞培养感染痘苗病毒后的特定时间转染重组质粒为宜; 而本项目主持人则逆向思维, 实验中无论大大推迟或提前接种重组质粒均收到了良好的转染效果, 这一远离最适时机转染的成功机制可能同上。这不仅打破了传统方法, 而且在技术上使后来者居上。又据此假说, 1997~1998 年本项目主持人在第四军医大学发现肿瘤细胞系高变异率株可在裸鼠体内快速选育成功, 这无意中成为恶性横纹肌样瘤裸鼠实验模型初步建立的关键技术基础之一。裸鼠虽缺失细胞免疫机能, 但作为活体动物仍具有轻微体液免疫机能或天然抵抗力。高代次细胞系在裸鼠体内成瘤后,

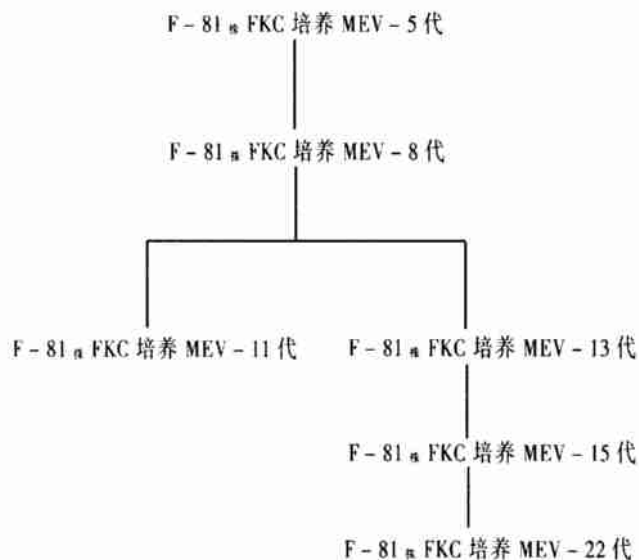


图1 S₁₈株和S₃₀株 MEV 在敏感性差异极显著的 F-81 株和 C-81 株猫肾细胞系(FKC)上交替选育的流程示意图

发现瘤体细胞染色体数目变异大大加快,与体外培养相比,在裸鼠体内快速选育成功了肿瘤细胞系高变异率株。这可能是因为“优胜劣汰”作用导致染色体数目变异较小的细胞在裸鼠体内增殖处于劣势或被淘汰,相反染色体数目变异较大的细胞在裸鼠体内增殖处于优势而明显增多的缘故,而细胞染色体遗传特征则决定着致癌性质。简言之,本项目主持人后来筛选出高变异率上皮细胞系移植于裸鼠皮下,进而在体内环境下快速选育出更高变异率细胞系,从而发现肿瘤细胞系高变异率株可在裸鼠体内快速选育成功,进而证实可发育为恶性横纹肌样瘤(MRT),确立了这种异类肿瘤的在体实验转化现象。这一病毒水平规律后来又在不同实验体系基因与染色体水平上分别得到了验证。因此,这种优劣环境交替性生物循环的选育机制与方法正是联系细小病毒疫苗、重组质粒转染、细胞系统癌毒理、异类肿瘤在体实验转化与横纹肌样瘤起源之谜的纽带与桥梁,具有广泛的科学指导和实用意义。

3. 优劣环境交替性生物循环选育的理论和技术体系的初步建立和实际应用

(1) 理论体系 在历经逆境筛选培育后,由于去劣存优、定向培育自然选择规律的作用,生物群体的整体遗传基础与表现性状可发生根本转变,成为潜在优势群体,再回归优厚环境继续选育,逐渐会表现出明显的目标遗传性状。

(2) 技术体系 要求逆境选育完全彻底,反复回归优厚环境复壮,实现优劣环境交替性生物循环,可选育出具有优势目标遗传性状的生物或组织细胞群体。适用于病毒或细胞群体等复制增殖能力强的生物细胞选育,有客观准确的检测指标,甚至有基因或染色体遗传指标。

(3) 实际应用 ①利用敏感与钝感细胞系交替选育获得超高增殖率细小病毒株,研制成功高效水貂肠炎灭活疫苗,生产应用了17年不曾更新换代,控制了全国疫病的广泛流行,已产生并将继续产生明显的社会效益。②在将重组质粒转染痘病

毒感染人类143细胞系时,无论大大推迟或提前接种重组质粒,即远离最适时机转染,均收到了良好的转染效果,获得重组病毒蚀斑并使之得以纯化。此方法被他人实际采用,证明行之有效。③在进行细胞系致癌毒理学的安全性评价时,发现与体外培养相比,动物与人类肿瘤细胞系高变异率株均可在裸鼠体内快速选育成功,瘤体细胞染色体数目变异显著加快,染色体数目明显增加,进而证实可发育为极高变异率的MRT,确立了这种异类肿瘤的在体实验转化现象。这是裸鼠具有轻微体液免疫机能和自然杀伤细胞活性而去劣存优定向培育的结果。④上述细胞系致癌毒理学的安全性评价研究结果,验证了检测永生性传代细胞系可能具有的轻微致癌性的巨大难度。使我们深刻认识到需要培育比裸鼠更灵敏的癌症监测实验动物模型,或严格控制实验条件、加大细胞系接种数量,延长实验裸鼠观测时间。只有这样,轻微致癌性才可能通过动物体内选育作用而最终显现,取得深入细致的科学观察结果。⑤发现MDCK细胞系不论核型如何,至少具极低致癌性,即实际上并不存在非致癌性的MDCK株细胞系。这有可能打破学术界长期以来认为的存在非致癌性MDCK细胞系的观点,从而对有关生物制品和基因工程产品的安全性提出新的要求和标准。筛出无致癌(瘤)性的几株细胞系(F-81, CRFK, Vero, Vero-2),发现高变异率Vero细胞有强致癌性;不论核型如何, BHK-21亦具有强致癌性。⑥得到100%成瘤和100%不成瘤的细胞株并探讨了与染色体核型的关系,一些细胞株不仅成瘤而且还转移,初步筛出在裸鼠体内导致MRT的细胞株(BHK-21, Vero, Hela),掌握了高变异率细胞系皮下接种建立MRT裸鼠模型的实验条件,用比较医学方法揭示了MRT的组织细胞起源。MRT在模型动物体内的首次发现和成功复制,为阐明其起源提供了机会。⑦发现犬、猫、猴、鼠肾细胞系的染色体遗传特征决定了致癌性质并有种属特异性,细胞染色体数目变异大小和致癌(瘤)强弱相关,染色体结构畸变率高可能会增加致癌性。发现犬、猫、猴、鼠肾细胞系的染色体变异率、软琼脂克隆形成率、植物凝集素作用下的凝集性和裸鼠体内成瘤潜力间的相关性。⑧应用筛出的传代细胞系建立了细胞库,制备了犬五联疫苗及利用免疫关中驴制备的犬猫用浓缩精制抗多病IgG,在全国1600多个应用观察点大范围推广应用,已产生显著的社会经济效益。

参考文献

- [1] Harris JR, Racaniello VR. JVIROL, 2003, 77(8): 4773-4780.
- [2] Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. MEM I OSWALDO CRUZ, 1998, 93(6): 753-760.
- [3] CONTRERAS VT, ARAQUE W, DELGADO VS. MEM I OSWALDO CRUZ, 1994, 89(2): 253-259.
- [4] SCHEFER RW, NAMAZIAN M, KELLY J. AIAA J, 1994, 32(9): 1844-1851.
- [5] Reinhardt CA. ALTEX. 1988, 5(1): 5-14.
- [6] Yamashita M, Egami H, Mannoji H, Ohta M, Kitamura K. Acta Neuropathol (Berl). 1981; 53(1): 35-40.
- [7] Zhang DL. Biologicals, 1997, 25(1): 103-111.

- [8] Zhang DL, Yin Z, Wang SZ. *Biologicals*, 1997, 25 (1): 93-101.
- [9] Zhang DL. *Science in China (Scientia Sinica), Series B - Chemistry, Life Sciences & Earth Sciences*, 1991, 34(8): 947-962.
- [10] Zhang DL. 1990, 35(2): 174-176.
- [11] Zhang DL, Liu SG, Yan LF, Li LJ, Huang GS, Fang FD, Xia GT, He XY, Gao BX, Bai XH, Wang W, Ding PG. *Cell Biology International*, 2001, 25(10): 997-1002.
- [12] Zhang DL, Li LJ, Xia GT, He XY, Gao BX, Bai XH, Huang GS, Liu SG, Yan LF, Fang FD. *Agricultural Sciences in China*, 2002, 1(7): 816-827.
- [13] Zhang DL, Li LJ, Xia GT, He XY, Gao BX, Bai XH, Huang GS, Liu SG, Yan LF, Fang FD. *Agricultural Sciences in China*, 2002, 1(9): 1054-1066.
- [14] Zhang DL, Li LJ, Xia GT, He XY, Gao BX, Bai XH, Huang GS, Liu SG, Yan LF, Fang FD. *Agricultural Sciences in China*, 2002, 1(11): 1293-1301.
- [15] 张德礼等 24 人. *遗传学报*, 2001, 28(4): 327-344
- [16] 张德礼等 8 人. *遗传学报*, 2000, 27(12): 1057-1071
- [17] 张德礼等 7 人. *生物工程进展*, 1999, 19(3): 22-39
- [18] 张德礼等 7 人. *生物工程进展*, 1999, 19(4): 52-56
- [19] 张德礼等 6 人. *中国兽医科技*, 1999, 29(6): 16-20
- [20] 张德礼等 10 人. 上皮细胞系染色体组型分析与致癌/致瘤性和恶性横纹肌样瘤起源研究. 陈小章、高杰英主编: *上皮细胞生物学 - 初探 (Epithelial Cell Biology - A Primer)*. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 186-243, 378-404
- [21] 张德礼. *中国高校科技与产业化*, 2002, 1(11): 42-44.
- [22] Klein AS, Plata F, Jackson MJ, Shin S. *Exp Cell Biol*. 1979; 47(6): 430-445.
- [23] Lubiniecki, A. S. *Bioprocess. Technol*. 1990, 10, 495-513.
- [24] Pearson, J. *Dev. Biol. Stand.* 1992, 76, 13-17.
- [25] Petricciani, J. C. & Haraud, F. N. *Dev. Biol. Stand.* 1998, 93, 5-13.
- [26] Lee, C. K. *Dev. Biol. Stand.* 1996, 88, 41-47.
- [27] Petricciani, J. C. *Dev. Biol. Stand.* 1999, 100, 57-63.
- [28] Lower, J. J. *Med. Virol.* 1990, 31, 50-53.
- [29] Krause, P. R. & Lewis, A. M. Jr. *Biologicals* 1998, 26, 317-320.
- [30] Versteeg I, Sevenet N, Lange J, et al. *NATURE*, 1998, 394(6689): 203-206.
- [31] Amar AM, Tomlinson G, Green DM, Breslow NE, de Alarcon PA. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2001, 23(2): 105-8.
- [32] Packer RJ, Biegel JA, Blaney SS, et al. *ANN NEUROL*, 2001, 50(3): S111-S111 Suppl.
- [33] White FV, Dehner LP, Belchis DA, Conard K, Davis MM, Stocker JT, Zuppan CW, Biegel JA, Perlman EJ. *Am J Surg Pathol.*, 1999, 23(3): 249-56
- [34] WICK MR, RITTER JH, DEHNER LP. 1995, 12(3): 233-248
- [35] Ogino S, Ro TY, Redline RW. *Adv Anat Pathol.*, 2000, 7(3): 181-90.
- [36] Yachnis AT, Neubauer D, Muir D. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998, 57(10): 961-71.
- [37] Beckwith J B, Palmer N F. *Cancer*, 1978, 41: 1937-1948
- [38] Roberts CWM, Galusha SA, McMenamin ME, et al. *P NATL ACAD SCI USA*, 2000, 97(25): 13796-13800
- [39] Hoovers JMN, Kalikin LM, Johnson LA, et al. *P NATL ACAD SCI USA*, 1995, 92(26): 12456-12460
- [40] Biegel JA, Fogelgren B, Zhou JY, et al. *CLIN CANCER RES*, 2000, 6(7): 2759-2763
- [41] Biegel JA, Fogelgren B, Wainwright LM, et al. *GENE CHROMOSOME CANC*, 2000, 28(1): 31-37
- [42] Zhou JY, Fogelgren B, Wang ZL, et al. *GENE*, 2000, 241(1): 133-141
- [43] Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, et al. *CANCER RES*, 1999, 59(1): 74-79
- [44] Biegel JA, Allen CS, Kawasaki K, et al. *GENE CHROMOSOME CANC*, 1996, 16(2): 94-105
- [45] Rosty C, Peter M, Zucman J, et al. *GENE CHROMOSOME CANC*, 1998, 21(2): 82-89
- [46] Biegel JA. *J PEDIAT HEMATOL ONC*, 1997, 19(6): 492-501
- [47] Biegel J, Allen C, Bell C, et al. *CYTOGENET CELL GENET*, 1996, 74(4): 308-308
- [48] Kinoshita Y, Shiratsuchi H, Tamiya S, et al. *J CANCER RES CLIN*, 2001, 127(6): 351-358
- [49] Garcia-Bustinduy M, Alvarez-Arguelles H, Guimera F, et al. *J CUTAN PATHOL*, 1999, 26(10): 509-515
- [50] Sugimoto T, Hosoi H, Horii Y, et al. 1999, *INT J CANCER* 82(5): 678-686
- [51] Kent AL, Mahoney DH Jr, Gresik MV, Steuber CP, Fernbach DJ. *Cancer*, 1987, 60(5): 1056-9.
- [52] Rosson GB, Hazen-Martin DJ, Biegel JA, et al. *MODERN PATHOL*, 1998, 11(12): 1228-1237.
- [53] Narita T, Taga T, Sugita K, et al. *JPN J CANCER RES*, 2001, 92(3): 269-278.
- [54] Yachnis AT, Neubauer D, Muir D. *J NEUROPATH EXP NEUR*, 1998, 57(10): 961-971.
- [55] Suzuki A, Ohta S, Shimada M. *DIAGN MOL PATHOL*, 1997, 6(6): 326-332.
- [56] Hirose M, Yamada T, Abe T, et al. *INT J CANCER*, 1996, 67(2): 218-223.
- [57] Van der Maaten MJ, Miller JM. *Am J Vet Res* 1980, 41(11): 1785-1788.
- [58] Inooka S. *Cell Biol Int Rep* 1986; 10(8): 659-665.
- [59] Crandell RA, Fabricant CG, Nelson Rees WA. *IN VITRO (USA)* 1973, 9/3: 176-185.
- [60] U HS, Boerner P, Rindler MJ, Chuman L, Saier MH Jr. *J. Cellular Physiol.* 1985, 122: 299-307.
- [61] Wunsch S, Gekle M, Kersting U, Schuricht B, Oberleithner H. *J. Cell Physiol.* 1995, 164: 164-171.
- [62] Mareel MM, Behrens J, Birchmeier W, De Bruyne GK, Vleminckx K, Hoogewijs A, Fiers WC, Van Roy FM. *Int. J. Cancer*, 1991, 47: 922-928.
- [63] Schroyens W, Schroyens E, Bielunas J. *Anticancer Res.*, 1989, 9: 1665-1668.
- [64] Gauth CR, Hard WL, Smith TF. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (USA)*, 1966, 122: 931-935.
- [65] Bruyneel EA, Debray H, De Mets M, Mareel MM, Montreuil J. *Clin. Exp. Metastasis*, 1990, 8: 241-253.
- [66] Bather R, Becker BC, Contreras G, Furesz J. *J. Biol. Stand.* 1985, 13: 13-22.
- [67] Kahn P, Shin SI. *J. Cell Biol.* 1979, 82: 1-16.
- [68] Levenbook IS, Petricciani JC, Qi Y, Elisberg BL, Rogers JL, Jackson LB, Wierenga DE, Webster BA. *J. Biol. Stand.* 1985, 13: 135-141.
- [69] Nelson WJ. *Mutat Res (Netherlands)*, 1979, 59: 195-201.
- [70] Thomas JA, Fouquet JP, Hollande E, et al. *C R Acad Sci Ser D (French)* 1964, 258(25, Group 14): 6273-6276.
- [71] Schwartz HE, Holmes S, Meiss HK. *J Cell Biol* 1997; 75(2 part 2): 393A.
- [72] Tsareva AA, Isaenko AA, unmanova MA, et al.

(下转第 10 页)

进的钻探船,正式海上活动将从 2004 年开始。

IODP 总的科学目的是:地球、大洋与人类生存。其主要科学目标如下。

(1) 有关地壳与上地幔液体流动深度、拓展以及物理化学生物过程相关的问题,搞清岩石圈与大洋之间热和物质之间的辐射交换,试图通过大量的工作予以量化,以接受未来时空的考验,并带动深部生物圈、天然气水合物的研究与开发。

(2) 其最终目标是了解全球环境变化系统的动力学并探索未来气候变化及其过程,预测极端的与可能的气候变化。

(3) 探讨固体地球旋回与相关地质力学问题。

要通过从地心到地幔的动力学,以及卷流活动、板块活动对环境与生物圈的影响,来重建地球系统的历史,取得迄今从未取得的信息,如深部上地幔和地幔卷流的样品。为此,用隔水管系统钻井船达到以上许多目的是极合适与重要的,因这条船是全世界最新设计的第一艘多功能钻探船。附带还能寻找深海震源带,即所谓“动力带”(Dynamic Zone);对大陆断裂与沉积盆地的形成、洋底大量火山岩聚集等问题,亦将会有重要发现。

目前,已经有 12 个国家参加了这一计划,参加国将有权分享获得的资料。笔者认为这是一次为我国培养地质、航海、海上超深钻探、地球物理、现场化验测试等高科技专门人才的大好机会,并可为解决开发可燃冰的难题培养人才。据了解,目前北京地质大学只派了 1 位女专家参加,这是远远不够的。从长远看,这亦是一次极好的提高我国地质大国科技研究水平的大好机会。

第二项:筹划开发西北太平洋我国专署经济区海底的固体结核矿产资源。

处于西北太平洋水深 6 000 米处的固体结核矿产资源,其矿物丰度极高。国土资源部广州海洋地质局勘探的 15 万平方公里的矿产储量,按合同我国政府已将一半交还给了联合国,余下的 7.5 万平方公里是属于我国的专署经济区,可由我国自行开采,估计可能开采 11 年,经济效益极高。目前,我国国土资源部已经有全套海上采矿技术,如射流反循环法等,中国科学院已研制了适应水深 6 000 米的无缆自治机器人,海洋地质局还测绘了该地区的海底地形图和矿产分布图,我国应积极、尽快地试采与开采,以维护我国海上权益。

射流反循环法和泵吸反循环采矿与钻井,我国已应用多年。若用于水深 6 000 米处,要事先作一些

(上接第 17 页)

Tsitologiya(USSR; Russian with English abstract) 1990, 32(7): 749.

[73] De Sahum SB, Lampa I, Damonte EB, Coto CE. Medicina(B Series) (Argentina), 1978, 38(5): 513-518.

[74] Desatum SB, Larripa I, Damonte EB, et al. Medicina - Buenos Aires(in Spanish language), 1978, 78(5): 519.

基础研究,以求得深水射流与泵吸参数的规律,进一步加强应用。目前我国已经掌握 10 多种海底耙矿设备的设计图纸,可以自行生产应用。

第三项:加速制定开发天然气水合物的技术方针,积极研制有关设备,确定科学的工艺和方法。

国土资源部广州海洋地质调查局在我国南海、东海海域,用海上 BSR 法(海床模拟反射法)勘探出储量非常丰富、面积巨大的天然气水合物资源,这将是我国一种非常宝贵的清洁、可替代性能源,引起全国的关注。中国科学院汪集院士为首的科学家们正在进行其基础研究。但对海上天然气水合物(以下简称水合物)资源的勘探与开发却不能贸然进行,否则可能造成水合物气体大量泄漏,使海水汽化,造成海啸、海底滑坡、钻船翻倾等恶性事故。因此,勘探与开发可燃冰的关键是,根据我国实际情况,积极稳妥地制订勘探与开发的战略方针:第一步,应借助修建青藏铁路之机,快速勘探开发铁路沿线永冻层里的可燃冰,这样一能解决铁路沿线的能源需求、积累开发经验,二是勘探开采技术也比较容易;第二步,在海边钻大位移水平定向井,从海滨开发水合物;第三步,积累陆地开发经验后,再试采海洋中的天然气水合物。“三步走”即是:陆地永冻层—滨海钻大位移井—海洋开发天然气水合物。“三步走”的循序渐进的勘探开发方针,既安全又可靠。

第四项:继续提高我国深部地球科学研究水平,积极筹划青藏高原的科学钻探工程。

应在中国工程院赵文津院士与美国地质界合作完成的“青藏高原深部地震地球物理勘探研究成果”(INDEPTH)的基础上,由中国工程院、中国科学院、国土资源部等单位牵头组成筹备组织,与国内外有关地球科研部门共同筹划、实施青藏高原国际大陆科学钻探计划。

青藏高原隆起、印度板块与珠穆朗玛峰形成的关系等等,是世界地球科学界十分关注的重大地学问题,我国可考虑出面组织一次重大地球科学问题的国际研讨会。

青藏高原科学钻探工程,即国内外所说的“地球科学的奥林匹克”,亦可由我国来组织,吸引国内外来投资,甚至可以委托 ICDP(国际大陆科学钻探计划组织,设在德国波斯坦)来出面组织。我国目前在江苏东海施工的 CCSD 大陆科学钻探工程,就是在该组织从选址、部分设备和管材等方面的支持下进行的。

(责任编辑 王宏章)

[75] Rhim JS, Schell K, Creasy B, et al. Proc Soc Exp Biol Med(USA), 1969, 132: 670-678.

[76] Shannon B, et al. Arch Pathol Lab Med 2002, 126(12): 1506-1510.

[77] 张德礼. 病毒学杂志 (VIROLOGICA SINICA), 1990, 15(2): 221-226. (责任编辑 邱夜明)