

失配双链核糖核酸抑制柯萨奇 B3 病毒感染细胞的研究^{*}

胡冬琴^{1**} 聂实践¹ 刘哲伟² 孙红妹²

(1 北京市营养源研究所 北京 100054 2 首都儿科研究所 北京 100020)

摘要 通过药物抑制病毒致细胞病变效应实验和药物对病毒空斑形成抑制实验,研究低毒性失配双链核糖核酸(Poly I:C₁₂U)和已知的抗病毒药物双链核糖核酸聚肌胞(Poly I:C)在细胞水平对柯萨奇病毒感染的抑制作用比较,证明 Poly I:C₁₂U 的抗病毒作用。实验结果表明 Poly I:C₁₂U 和 Poly I:C 均可有效地抑制病毒空斑的形成,且量效关系已确定。

关键词 失配双链核糖核酸 柯萨奇 B3 病毒

作为抗病毒物质,双链核糖核酸聚肌胞(PolyI:C)的作用已经被人们接受^[1],但 PolyI:C 作为化学治疗剂用于治疗人类病毒性疾病,会产生很大的毒副作用^[2-4,6]。因而引发了新型的低毒性抗病毒药物的开发研制。

八十年代,美国人 Willim A. Carter 和 POP TS'O 作了大量的基础研究后,提出降低 PolyI:C 毒性的理论和方法,并对 PolyI:C 进行了结构修饰。证明结构为 Poly I:C₁₂U 的新型材料抗病毒效果最好,毒性最低^[7,9],它保留了 PolyI:C 原有的干扰素的诱导能力和其它生物学特性,而毒副作用却大大降低^[5,10]。

失配双链核糖核酸已成为近几年国际上广泛研究的一种新型低毒性抗病毒药物原料。美国对 Poly I:C₁₂U (AMPLIGENTM) 的研究已进入 III 期临床试验阶段,在治疗脑脊髓炎、疱疹病毒^[15]、慢性疲劳综合症、肝炎病毒感染^[11,16]、人类免疫缺陷症^[13,14] 等病毒病方面已取得较好进展^[8,12],有望近期被美国 FDA 正式批准。我国是世界上最早使用双链核糖核酸对病毒性疾病进行治疗的国家,自 1982 年批准 Poly I:C 产品在全国试用之后,由于 Poly I:C 的毒副作用,对它的研究工作几乎停止,限制了其广泛应用。因此,研究低毒性的双链核糖核酸,特别是 Poly I:C₁₂U,对该类药物在我国的研究

发展具有重要的意义。

柯萨奇病毒属于小 RNA 病毒科肠道病毒属,它的感染在人群中很常见,由此引起的病症多种多样,常见的有急性或慢性心肌炎、流行性胸痛、肝炎、脑炎及呼吸道感染等,孕妇感染后可通过胎盘传播给胎儿,可引起胎儿畸形甚至死胎。在新生儿和婴儿中可引起病情危重的广泛性脑炎,常伴心肌炎和肝炎,一旦心脑受到该病毒严重侵害,极易引起死亡。目前,对由柯萨奇病毒引起的疾病的治疗缺乏有效的抑制药物,而传统的化学药物治疗又存在特异性差、且疗效不佳的缺陷。本研究通过药物抑制病毒致细胞病变效应实验和药物对病毒空斑形成抑制实验,对 Poly I:C₁₂U 和已知的抗病毒材料 Poly I:C 的抑制柯萨奇病毒作用进行比较,研究 Poly I:C₁₂U 的抗病毒能力。

1 材料与方法

1.1 材料

柯萨奇病毒 B3 (coxsackievirus B3, CVB3): 由 CVB3 感染性克隆转染 HeLa 细胞后获得,由首都儿科研究所提供。HeLa 细胞: 由首都儿科研究所提供。S1: Poly I:C₁₂U 样品: 由北京市营养源研究所制备。S2: Poly I:C 样品: 由北京市营养源研究所制备。Control 1: S1 空白。Control 2: S2 空白

1.2 方法

1.2.1 病毒空斑形成实验 稀释 CVB3 病毒为 10^{-4} 至 10^{-8} , 分别加入 6 孔细胞培养板(细胞数 2×10^6 /

收稿日期: 2004-07-23 修回日期: 2005-01-07

^{*} 北京市 248 工程项目(H010210140111)

^{**} 电子信箱: hudq63@sohu.com

孔,病毒量 $200\mu\text{l}/\text{孔}$),同时设 1 孔正常细胞对照。 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 孵育 1h,加入 0.7% 琼脂($1\text{ml}/\text{孔}$),再孵育 72h。 1% 结晶紫染色,观察空斑形成数量。

1.2.2 药物对病毒致细胞病变效应的抑制 HeLa 细胞($5 \times 10^5/\text{孔}$) 在 6 孔板中培养, CVB₃/T₇ 原液进行 10^{-2} 倍稀释,使最后细胞的感染量为 0.1MOI 病毒稀释滴度,当细胞贴壁生长近 60% 时,将病毒加入细胞孔中,每孔 $200\mu\text{l}$,感染病毒 1h,每孔中分别加入 S1、S2、Control 1 和 Control 2,同时设正常细胞对照孔和病毒感染对照孔, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 孵育 72 小时。观察细胞病变结果。

1.2.3 药物对空斑形成的抑制 用不同稀释度的药物分别处理染毒前和染毒后的细胞,于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 孵育。观察细胞病变结果。

1.2.4 药物作用量效关系实验 用不同稀释度的药物处理病毒感染细胞, 37°C 及 $5\% \text{CO}_2$ 条件下孵育,固定、染色后观察结果。以药物浓度为横坐标,以病毒空斑数量为纵坐标做药物作用量效曲线。

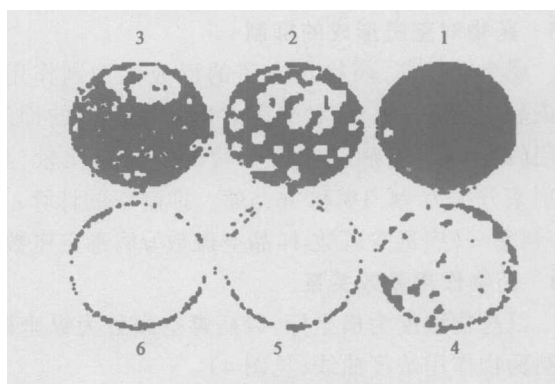


图 1 病毒空斑实验

1 孔:正常细胞对照;2-6 孔:病毒稀释 10^{-8} 至 10^{-4}

2.2 药物对病毒致细胞病变效应的抑制

病毒对照在培养 72h 后,细胞完全被破坏而呈现无染色状态,感染病毒后加药细胞生长良好,药物的空白溶液细胞均将近 90% 死亡(见图 2)。

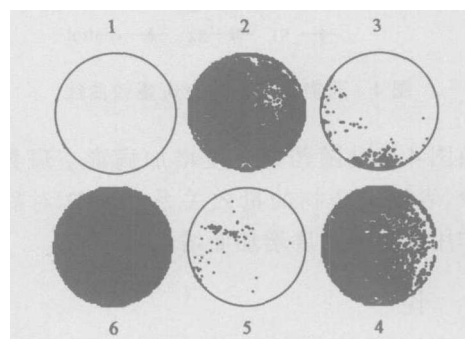


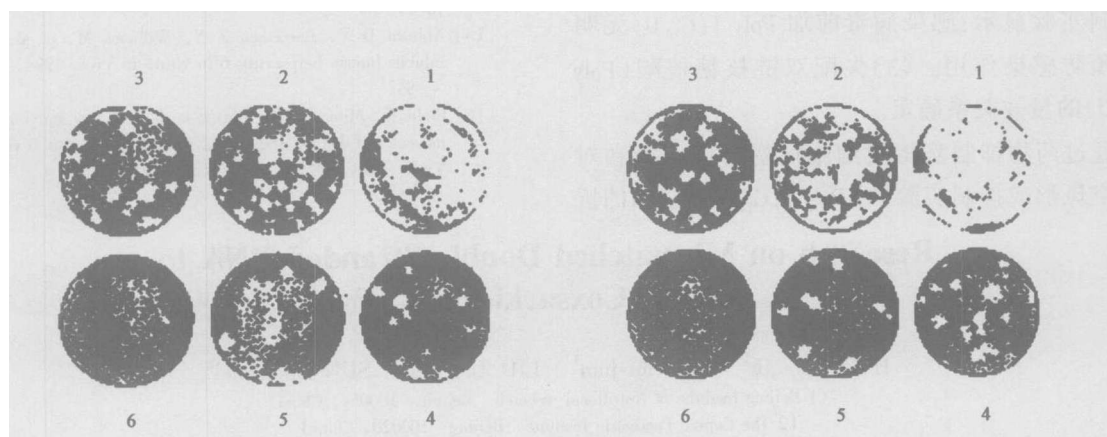
图 2 药物对病毒致细胞病变作用的抑制

1 孔:病毒感染对照;2 孔:S1;3 孔:control 1;4 孔:S2;
5 孔:control 2;6 孔:正常细胞对照

2 结果与计算

2.1 病毒空斑形成实验

不同稀释度的病毒在培养 72h 后,随病毒浓度增加形成空斑数逐渐增多,至细胞全部死亡、脱落(见图 1)。根据病毒稀释度和空斑形成数,可计算出此病毒空斑形成单位为 4×10^{10} pfu/ml。根据每孔细胞数,可推算出,原病毒感染复数为 10MOI。



S1 对空斑形成的抑制

S2 对空斑形成的抑制

图 3 样品对空斑形成的抑制实验

1,2 孔:不同剂量的样品在病毒感染前用药的空斑图;3,4,5 孔:不同剂量的样品在病毒感染后用药的空斑图;6 孔:正常细胞对照

2.3 药物对空斑形成的抑制

感染前用药,药物对空斑的形成无抑制作用;感染后用药,S1和S2对空斑的形成有明显的抑制作用(见图3),与病毒空斑实验的结果相比较,其抑制率分别为74.3%和76.5%。抑制率的计算:

抑制率 = (病毒空斑数 - 样品空斑数) / 病毒空斑数

2.4 药物作用量效关系

以药物浓度为横坐标,以病毒空斑数为纵坐标绘制药物作用浓度曲线(见图4)。

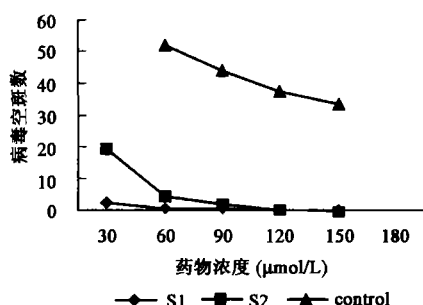


图4 药物抑制病毒空斑量效曲线

由图4可见随药物浓度增加病毒空斑数量逐渐减少,表明了药物的量效关系,S1、S2对病毒的抑制作用随药物浓度增加而增加。

3 讨论

(1)药物对病毒致细胞病变效应的抑制实验显示 CVB3 感染细胞后加入 Poly I:C₁₂U 和 Poly I:C 均有明显的抑制病毒感染作用。(2)药物对空斑形成的抑制实验显示:感染病毒前加 Poly I:C₁₂U,无明显的预防感染作用。(3)失配双链核糖核酸(Poly I:C₁₂U)的量效关系确定。

通过药物抑制病毒致细胞病变效应实验和对病毒空斑形成抑制实验,对 Poly I:C₁₂U 和已知的抗

病毒材料 Poly I:C 的抑制柯萨奇病毒作用进行比较,证明 Poly I:C₁₂U 对 CVB3 有显著的抑制作用,是一很有潜力的抗病毒药物原料。

参考文献

- [1] Beers R F, Braun W. In biological effects of polynucleotides Springer, New York. 1971
- [2] Field A K, Yong C, Krakoff W, et al. Proc Soc Exp Biol Med, 1971, 136: 1180 ~ 1186
- [3] Yong C W. Med Clin North Am, 1971, 55: 721 ~ 728
- [4] Carter W A, De Clercq E. Science, 1994, 186: 1172
- [5] Pop tso, James L A, et al. Molecular Phar, 1975, 12: 229 ~ 312
- [6] Field A. Kin selective inhibitors of viral functions. CEC Press, Cleve Cand, 1973, 149 ~ 176
- [7] Stevend, O'Marro. Antiviral Res, 1992, 17: 169 ~ 177
- [8] Essey R J, McDougall B R, Robinson W E Jr. Mismatched double-stranded RNA (polyI-polyC (12) U) is synergistic with multiple anti-HIV drugs and is active against drug-sensitive and drug-resistant HIV-1 in vitro. Antiviral-Res. 2001, 51(3): 189 ~ 202
- [9] Haines D S, Suhadolnik R J, Hubbell H R, et al. Cellular and enzymatic activities of a synthetic heteropolymer double-stranded RNA of defined size. J Biol Chem, 1992, 267(26): 18315 ~ 18319
- [10] Adams M, Navabi H, Jasani, et al. Vaccine, 2003, 21, (7 ~ 8): 787 ~ 790
- [11] Chelbi Alix MK, Belforte B, Saal F, et al. The effects of polyI:C₁₂U and interferon on the multiplication of a mammalian type C retrovirus in human cells. J Gen Virol, 1992, 73 (9): 2291 ~ 2297
- [12] Armstrong J A, McMahon D, Huang X L, et al. A phase I study of amplitgen in human immunodeficiency virus-infected subjects. J Infect Dis. 1992, 166(4): 717 ~ 722
- [13] Carter W A, Ventura D, Shapiro D E, et al. Amplitgen demonstrates antiviral and immunostimulatory activities in HIV disease. Int J Immunopharmacol, 1991, 13(1): 69 ~ 76
- [14] Bergamini A, Ercoli L, Perno C F. Inhibition of alfa interferon and amplitgen of human immunodeficiency virus (HIV) replication in monocyte-macrophage subpopulations. Medicina-Firenze, 1990, 10(1): 34 ~ 36
- [15] Ablashi D V, Berneman Z N, Williams M, et al. Amplitgen inhibits human herpesvirus-6 in vitro. In Vivo, 1994, 8(4): 587 ~ 591
- [16] Ijichi K, Mitamura K, Ida S, et al. In vivo antiviral effects of mismatched double-stranded RNA on duck hepatitis B virus. J Med Virol, 1994, 43(2): 161 ~ 165

Research on Mismatched Double Stranded RNA to Inhibit Coxsackievirus B3

HU Dong-qin¹ NIE Shi-jian¹ LIU Zhe-wei² SUN Hong-mei²

(1 Beijing Institute of Nutritional research Beijing 100054, China)

(2 The Capital Paediatric Institute Beijing 100020, China)

Abstract The HeLa cells were cultured with or without Mismatched Double Stranded RNA (Poly I:C₁₂U) for 6 h at 37°C before and after *Coxsackievirus B3* (CVB3) attacking. The results showed that Poly I:C₁₂U could protect the cells infected by CVB3, and had no protection to the cells which treated by Poly I:C₁₂U before CVB3 attacking. The result was almost same between the Poly I:C₁₂U and Poly I:U.

Key words Mismatched double stranded RNA *Coxsackievirus B3*