

{ 研究简报 }

## 人IFN- $\alpha$ 诱导草鱼肾细胞对草鱼出血 病毒抗性作用的研究 \*

符少辉 陈 韶 汪冬庚 陈立祥 章怀云

(湖南农业大学, 长沙 410128)

### THE STUDY OF HUMAN IFN- $\alpha$ INDUCEING FISH KIDNEY CELLS RESISTANCE TO HEMORRHAGIC VIRUS OF GRASS CARP

Fu Shaohui, Chen Tao, Wang Donggeng, Chen Lixiang and Zhang Huaiyun  
(Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

**关键词** 人IFN- $\alpha$ , 草鱼出血病毒, 草鱼肾细胞

**Key words** Human IFN- $\alpha$ , GCHV, CIK

人 $\alpha$ -干扰素是一种广谱抗病毒的生物活性物质, 对各种病毒性疾病均有较显著的疗效<sup>[1]</sup>。草鱼出血病是由草鱼出血病毒(Hemorrhagic virus of Grass carp, GCHV)引起, 该病流行范围广, 发病季节长, 发病率及死亡率高, 给水产养殖业带来很大的损失。近年来应用干扰素防治草鱼出血病已有研究报道。<sup>[2]</sup>本试验在细胞水平上进一步研究了HumanIFN- $\alpha$ 对GCHV的抗性作用, 为进一步从分子水平上探讨草鱼出血病防治机理累积资料。

#### 1 试验材料

**1.1 干扰素** 基因工程技术制备的 $\alpha$ 1b型干扰素(效价 $1 \times 10^6$ U / mL)。上海生物制品研究所生产, 批号961133。

**1.2 病毒** 草鱼出血病毒 GCHV 由中国科学院水生生物研究所提供, 滴度 TCID<sub>50</sub> 为 3.5。

**1.3 细胞** 草鱼肾细胞(Fish kidney cells, CIK), 由中国科学院水生生物研究所提供。

**1.4 培养液** TC-199培养液(Disco laboratorise, USA)。培养液含 10% 小牛血清和 100U / ml 青霉素, 100ug / mL 链霉素。

#### 2 试验方法

**2.1 测定不同浓度 Human-IFN- $\alpha$ 对 GCHV 感染性草鱼肾细胞病变抑制作用(表 1)。**

\* 中国科学院水生生物研究所张奇亚博士给予指导、李正秋为本研究提供了帮助, 特致谢意  
1998-10-12收到, 1999-03-18修回

表1 不同稀释度Human-IFN- $\alpha$ 对GCHV作用的试验方案Tab.1 The protocol of resistance of different dilution of Human-IFN- $\alpha$  to GCHV

处理方法 Treatment	试验组 (IFN- $\alpha$ -V)				对照组 Control group		
	不同稀释度Human-IFN- $\alpha$				细胞对照 (CIK)	Human-IFN- $\alpha$ 对照 (CIK-IFN)	病毒对照 (CIK-V)
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	...	$10^{-10}$			
Human-IFN- $\alpha$ $\mu$ l/孔	100	100	...	100	—	100	—
Human-IFN- $\alpha$ $\mu$ l/well							
温育时间 (h) Incubation time (h)	6、12	6、12	...	6、12	12	12	12
GCHV $\mu$ l/孔	100	100	...	100	—	—	10
GCHV $\mu$ l/well							

$1 \times 10^6$ U / mL HumanIFN- $\alpha$ 10倍系列稀释成 $10^{-1}$ — $10^{-10}$ 10个稀释度, 分别加入含199细胞悬液的96孔培养板中, 每稀释度加6孔, 于25℃培养箱中分别孵育6h和12h。然后加入100倍稀释的病毒原液(滴度为 $3.5\text{TCID}_{50}$  / mL), 100 $\mu$ l /孔。上述试验分别设立试验组(IFN- $\alpha$ -V)和病毒对照组(V- $\alpha$ )、细胞对照组(CIK)和干扰素对照组(IFN- $\alpha$ -CIK)。25℃培养, 倒置显微镜下观察细胞病变及进展情况。当病毒对照组开始出现细胞病变(CPE)时, 每隔半小时观察1次, 记录各试验组与病毒对照组开始出现细胞病变的时间差异。

## 2.2 测定 Human-IFN- $\alpha$ -CIK细胞不同温育时间对GCHV感染性草鱼肾细胞病变的抑制作用(表2)。

$1 \times 10^6$ U / mL 的Human-IFN- $\alpha$ 按10倍稀释成 $10^{-1}$ — $10^{-4}$ 四个稀释度, Human-IFN- $\alpha$ 与CIK细胞温育时间增至6个梯度, 分别为1、3、6、12、24、36h。其余步骤及方法与上述试验相同。

表2 Human-IFN- $\alpha$  CIK细胞不同温育时间对GCHV作用的试验方案Tab.2 The protocol of the resistance of different incubation time of Human-IFN- $\alpha$ -CIK to GCHV

处理方法 Treatment	试验组 (IFN- $\alpha$ -CIK-V)				对照组 Control group		
	不同稀释度Human-IFN- $\alpha$				细胞对照 (CIK)	Human-IFN- $\alpha$ 对照 (CIK-IFN)	病毒对照 (CIK-V)
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$			
Human-IFN- $\alpha$ $\mu$ l/孔	100	100	100	100	—	100	—
Human-IFN- $\alpha$ $\mu$ l/well	*	*	*	*			
温育时间 (h) Incubation time (h)	*	*	*	*	36	36	36
GCHV $\mu$ l/孔	100	100	100	100	—	—	100
GCHV $\mu$ l/well							

注: \*每一稀释度均分为1、3、6、12、24、36h, 6个温育时间。

## 3 结果

### 3.1 GCHV致CIK细胞病变(CPE)

从图1B中可以看出, 病变细胞内颗粒明显增多, 出现细胞间隙和小空洞, 不少地方因细胞大量收缩、脱落形成明显的空斑。

### 3.2 不同浓度Human-IFN- $\alpha$ 与其对GCHV感染性细胞病变抑制时间的关系

从表2可以看出, 各干扰素试验组中, 与 $10^{-1}$ — $10^{-3}$ 稀释度,(即10、1、0.1万U / ml)干扰素共孵



为正常对照细胞



为病变细胞

Fig. The control cell and CPE cell

表3 不同剂量Human-IFN- $\alpha$ 对CIK细胞病害的抑制时间Tab. 3 The relation of different concentration Human-IFN- $\alpha$  and inhibitive time of CPE infected by GCHV

Human-IFN- $\alpha$ 浓度	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
抑制时间	3	3	1	0	0	0	0	0
Inhibitive time								

育的草鱼肾细胞接种 GCHV 后,与病毒对照组比较,(以对照组发病时间为 0)细胞出现病害的时间推迟,其中  $10^{-1}$ — $10^{-2}$  稀释度推迟 3h,  $10^{-3}$  稀释度推迟 1h;而  $10^{-4}$ — $10^{-10}$  稀释度各孔出现 CPE 的时间与病毒对照组无明显差异。干扰素对照组细胞生长良好,结果表明 Human-IFN- $\alpha$  对草鱼 CIK 细胞无毒性。Human-IFN- $\alpha$  浓度  $C > 0.1 \times 10^6$  U/ml 时,其对 GCHV 感染 CIK 细胞有一定的保护作用。

### 3.3 Human-IFN- $\alpha$ -CIK 细胞不同温育时间与其对 GCHV 感染性细胞病害抑制作用时间的关系

表 2 表明:在上述 Human-IFN- $\alpha$  有效浓度 ( $0.1 \times 10^6$ — $0.01 \times 10^6$  U/ml) 范围内,与病毒对照组比较,各试验组 Human-IFN- $\alpha$  与 CIK 细胞温育时间  $T > 1$  h 时,能明显延缓细胞病害出现的时间,  $T < 1$  h 时,试验组与病毒对照组出现细胞病害的时间没有差异。表明 Human-IFN- $\alpha$  与 CIK 的温育时间  $T > 1$  h 时,其具有抑制 GCHV 感染性细胞病害的作用。

## 4 讨论

实验结果显示 Human-IFN- $\alpha$  对草鱼肾细胞系无毒性,并具有一定的干扰草鱼出血病毒作用。

尽管干扰素的抗病毒作用有相对的种属特异性<sup>[3—4]</sup>,但其抗病毒谱还是非常广的。本实验用 Human-IFN- $\alpha$  作用于 CIK 细胞,使该细胞受 GCHV 感染后产生病害的时间明显延迟,表明 Human-IFN- $\alpha$  干扰素抗病毒作用具有种属间的交叉活性。

结果还表明 Human-IFN- $\alpha$  诱导 CIK 细胞产生抗 GCHV 作用受 IFN 的浓度,IFN 与 CIK 细胞作用时间的影响。Human-IFN- $\alpha$  的有效浓度为  $C > 100$  U/ml,有效 IFN-CIK 作用时间为  $T > 1$  h,而且当 IFN 浓度  $C > 10^4$  U/ml,温育时间  $T > 3$  h 时,Human-IFN- $\alpha$  浓度及作用时间对抗病害效果无明显影响。

## 参 考 文 献

- [1] 郭良耀. 干扰素及其临床应用. 福建医药杂志, 1991, 13(1): 39
- [2] 章怀云等. HuIFN- $\alpha$  对草鱼出血病害干扰作用的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 1993, 16: 104—107
- [3] 候云鹤等. 现代分子病毒学选论. 北京: 科学出版社, 182—197, 1994.
- [4] 王秋娟等. 家蚕细胞基因工程 HuIFN- $\alpha$  注射液抗 II 型单纯疱疹病毒作用. 中国药科大学学报, 1996, 27(9): 557—561