

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 韬 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 kidner 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(Difco 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-α对GCHV作用的试验方案  
Tab.1 The protocol of resistance of different dilution of Human-IFN-α to GCHV

| 处理方法<br>Treatment   | 试验组 (IFN-GK-V)   |                  |     |                   | 对照组           |                            |                 |
|---------------------|------------------|------------------|-----|-------------------|---------------|----------------------------|-----------------|
|                     | Test group       |                  |     |                   | Control group |                            |                 |
|                     | 不同稀释度Human-IFN-α |                  |     |                   | 细胞对照<br>(CIK) | Human-IFN-α对照<br>(CIK-IFN) | 病毒对照<br>(CIK-V) |
|                     | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | ... | 10 <sup>-10</sup> |               |                            |                 |
| Human-IFN-α μl/孔    | 100              | 100              | ... | 100               | —             | 100                        | —               |
| Human-IFN-α μl/well |                  |                  |     |                   |               |                            |                 |
| 温育时间(h)             | 6、12             | 6、12             | ... | 6、12              | 12            | 12                         | 12              |
| Incubation time (h) |                  |                  |     |                   |               |                            |                 |
| GCHVμl/孔            | 100              | 100              | ... | 100               | —             | —                          | 10              |
| GCHV μl/well        |                  |                  |     |                   |               |                            |                 |

1 × 10<sup>6</sup>U / mL HumanIFN-α10倍系列稀释成 10<sup>-1</sup>—10<sup>-10</sup>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 3.5TCID<sub>50</sub> / mL),100μl / 孔。上述试验分别设立试验组 (IFN-CIK-V)和病毒对照组 (V-CIK)、细胞对照组 (CIK)和干扰素对照组 (IFN-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- α - 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 × 10<sup>6</sup>U / mL 的 Human-IFN-α按 10 倍稀释成 10<sup>-1</sup>—10<sup>-4</sup>四个稀释度,Human-IFN-α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-α 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-α-CIK to GCHV

| 处理方法<br>Treatment   | 试验组 (IFN-CIK-V)  |                  |                  |                  | 对照组           |                           |                 |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|---------------------------|-----------------|
|                     | Test group       |                  |                  |                  | Control group |                           |                 |
|                     | 不同稀释度Human-IFN-α |                  |                  |                  | 细胞对照<br>(CIK) | Human-IFN-对照<br>(CIK-IFN) | 病毒对照<br>(CIK-V) |
|                     | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> |               |                           |                 |
| Human-IFN-α μl/孔    | 100              | 100              | 100              | 100              | —             | 100                       | —               |
| Human-IFN-α μl/well |                  |                  |                  |                  |               |                           |                 |
| 温育时间(h)             | *                | *                | *                | *                | 36            | 36                        | 36              |
| Incubation time (h) |                  |                  |                  |                  |               |                           |                 |
| GCHVμl/孔            | 100              | 100              | 100              | 100              | —             | —                         | 100             |
| GCHV μl/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-α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<sup>-1</sup>—10<sup>-3</sup>稀释度,(即 10、1、0.1 万 U / ml)干扰素共孵



为正常对照细胞

图1 A. (10×20) B. (CPE) (10×2)

为病变细胞

Fig. The control cell and CPE cell

表3 不同剂量Human-IFN-α对CIK细胞病变的抑制时间

Tab. 3 The relation of different concentration Human-IFN-α and inhibitive time of CPE infected by GCHV

| Human-IFN-α 浓度               |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Concentration of Human-IFN-α | 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                         |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| Inhibitive time              | 3                | 3                | 1                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                |

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)细胞出现病变的时间推迟,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-α 对草鱼 CIK 细胞无毒性, Human-IFN-α 浓度  $C > 0.1 \times 10^4 \text{ U/ml}$  时,其对 GCHV 感染 CIK 细胞有一定的保护作用。

### 3.3 Human-IFN-α-CIK 细胞不同温育时间与其对 GCHV 感染性细胞病变抑制作用时间的关系

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

## 4 讨论

实验结果显示 Human-IFN-α 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>[1-4]</sup>,但其抗病毒谱还是非常广的。本实验用 Human-IFN-α 作用于 CIK 细胞,使该细胞受 GCHV 感染后产生病变的时间明显延迟,表明 Human-IFN-α 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-α 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-α 的有效浓度为  $C > 100 \text{ U/mL}$ , 有效 IFN-CIK 作用时间为  $T > 1\text{h}$ , 而且当 IFN 浓度  $C > 10^4 \text{ U/mL}$ , 温育时间  $T > 3\text{h}$  时, Human-IFN-α 浓度及作用时间对抗病变效果无明显影响。

## 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-α 对草鱼出血病毒干扰作用的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 1993, 16: 104—107
- [3] 侯云德等. 现代分子病毒学总论. 北京, 科学出版社, 182—197, 1994.
- [4] 王秋娟等. 家蚕细胞基因工程 HuIFN-α 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