

干扰素的功能表达机理

X、pppA₂'p₅'A₂'p₅'A抗病毒作用的条件

费云标 宁益华 宋海燕

(中国科学院遗传研究所, 北京)

姚 堃 周瑶奎

(南京医学院微生物教研室, 南京)

姚曼华 刘新垣

(中国科学院生物化学研究所, 上海)

提 要

本工作说明pppA₂'p₅'A₂'p₅'A(2'-5'P₃A₃)能使Lpa小鼠细胞对新城鸡瘟病毒或水泡性口腔炎病毒的攻击起一定的保护作用,进一步支持2'-5'P₃A₃抗病毒作用的普遍性。本文还证明在无Ca⁺⁺存在下,2'-5'P₃A₃于病毒攻击前数小时处理细胞,也能得到抗病毒效果。

干扰素的抗病毒作用可以通过多种途径,如调节免疫系统,抑制蛋白质的生物合成^[1-4],后者又可分几条途径,通过2'-5'寡腺苷酸合成酶(Esi)所合成的2'-5'寡腺苷酸,活化一个核酸内切酶降解病毒mRNA,只是其中的一条途径。pppA₂'P₅'A₂'P₅'A(2'-5'P₃A₃)就是这种2'-5'磷酸二酯键相联接的寡腺苷酸中的主要组份。刘等^[5]首先证明2'-5'P₃A₃对病毒攻击的细胞具有保护作用,并指出这种作用有普遍性的意义^[6,7]。但只限于人体细胞,本文则使用小鼠细胞进一步检查2'-5'P₃A₃抗病毒作用的普遍性,此外Bugang和Main认为2'-5'P₃A₃必须与病毒同时加入,并且使用260 μM这样高的浓度才有抗病毒作用,在病毒感染之前或以后加2'-5'P₃A₃均无效^[8]。过去姚等曾证明在病毒感染之后,加2'-5'P₃A₃也有效,本文则证明在病毒感染之前3小时加2'-5'P₃A₃亦有效。

本稿1986年2月24日收到

材料、方法与结果

材料: 小鼠细胞 (Lpa和L929), 新城鸡瘟病毒 (NDV)-B 株和水泡性口腔炎病毒 (VSV)-Indiana 株均引自中国预防医学科学院病毒研究所。2'-5'P₃A₃由中国科学院生物化学研究所自制。

方法: 2'-5'P₃A₃直接作用于细胞, 未用Ca⁺⁺处理。2'-5'P₃A₃对细胞的抗病毒效果根据细胞病变抑制法检查。具体实验条件见表1-2所得结果如下:

(1) 2'-5'P₃A₃ (不含Ca⁺⁺)提前处理细胞的时间对其抗病毒作用的影响(表1)。

表1 比较2'-5'P₃A₃提前处理的时间对其抗病毒作用的影响*
Table 1. Effect of pre-treatment of 2'-5'P₃A₃ on its antiviral action.

病 毒 种 类 滴 度	病毒攻击前 2'-5'P ₃ A ₃ 作用时间 (小时)	细 胞 病 变 率							
		2'-5'P ₃ A ₃ 浓度 (nM)							
		500	250	125	62	31	15	7.5	0
VSV ~100	26	1	2	3	3	3	3	4	~3
	16	1	2	2	3	3	3	3	~3
	6	1	1	1	2	2	2	2	~3
	3	0	1	1	1	1	1	2	~3
TCID ₅₀	0	1	2	2	2	2	2	3	~3
NDV ~100 HA	26	1	2	3	3	3	3	3	~3
	6	1	1	1	1	1	2	2	~3
	3	1	1	1	1	1	1	1	~3
	0	1	1	1	1	1	1	1	~3

*2'-5'P₃A₃用Hepes缓冲液⁽⁹⁾(但无Ca⁺⁺)配制成一定浓度的贮存液, 使用时用无血清Eagle's培养液或含2%小牛血清的Eagle's培养液稀释后, 按表中所示浓度依次加到已长成单层细胞的微量平板孔内, 在37°C培育, 到预定时间后加入病毒液(细胞未用Ca⁺⁺处理, 病毒攻击时不洗去2'-5'P₃A₃处理液)。

(1)细胞病变率: 0, 1, 2, 3和4分别表示无病变及0-25%, 25-50%, 50-75%和>75%病变;表中数据系二次重复结果, 病毒加入后, 一天左右观察细胞病变率。

(2)2'-5'P₃A₃的浓度系病毒加入前的作用浓度, 但其中病毒与2'-5'P₃A₃同时加入的一组, 实际2'-5'P₃A₃的作用浓度稍微略低于所示浓度。

Lpa 细胞先用不同浓度2'-5'P₃A₃处理, 然后再加病毒攻击(2'-5'P₃A₃也同时存在)观察在病毒感染前用2'-5'P₃A₃处理不同时间对其抗病毒作用的影响。按表1结果, 感染前3小时或同时加入2'-5'P₃A₃所得抗病毒效果较好, 而加入时间过早, 效果降低, 16小时以前加入2'-5'P₃A₃则小剂量无效, 只有大剂量的2'-5'P₃A₃(约500nmol/L

才有效。

(2) 不同病毒滴度与攻击持续时间对 2'-5'P₃A₃ 的抗病毒效果的关系。

为了进一步检查 2'-5'P₃A₃ 的抗病毒效率,使用一定浓度的 2'-5'P₃A₃ 与含有不同滴度的病毒液同时加入后,在 21 小时和 42 小时观察其细胞病变率,结果如表 2。

表 2: 比较不同病毒滴度与攻击持续时间对 2'-5'P₃A₃ 抗病毒效应的关系
Table 2. Effect of different virus titers and durations of Challenge on antiviral action of 2'-5'P₃A₃.

病毒攻击后的 观察时间 (小时)	2'-5'P ₃ A ₃ 浓度 (nM)	细胞病变率							
		病毒滴度 TCID ₅₀ (VSV) 或 HA (NDV)							
		100	50	25	12	6	3	1.5	0
21 VSV	160	3	1	1	1	0	0	0	0
	0	4	4	3	2	2	2	1	0
42 VSV	160	4	3	2	1	1	1	1	0
	0	4	4	4	4	4	3	3	0
21 NDV	160	2	1	1	1	1	1	1	0
	0	3	3	1	1	1	1	1	0
42 NDV	160	4	4	3	3	3	2	1	0
	0	4	4	4	4	4	3	2	0

1) 2'-5'P₃A₃ 浓度系 2'-5'P₃A₃ 与病毒液同时加入后的最终浓度; 其余同表 1 说明。

160nmol/L 的 2'-5'P₃A₃ 对 3—50 TCID₅₀ VSV 攻击 21 小时, 可观察到抗病毒效应, 而 42 小时后, 仅对 1.5—25 TCID₅₀ VSV 攻击显示其抗病毒作用, 对 100 TCID₅₀ VSV 攻击则无效。用 NDV 攻击时, 50—100 HA (血凝滴度) 攻击 21 小时, 可显示 2'-5'P₃A₃ 的抗病毒活性, 使用更低滴度的 NDV 攻击 21 小时, 它的作用效果尚不能辨认, 而在攻击 42 小时, 已几乎不能观察到它的效应, 只有 1.5—25 HA 攻击时, 显示其活性。可见使用较高滴度的病毒攻击和攻击时间过长或使用太低滴度的病毒攻击和攻击时间太短, 都难于检出 2'-5'P₃A₃ 的效应。所以只有在一定浓度的 2'-5'P₃A₃ 的作用下, 用一定滴度的病毒攻击时, 掌握观察结果的有利时机, 才有可能检出它的抗病毒的作用效果。

讨 论

Williams^[9] 及 Hovanessian 等^[10] 证明 2'-5'P₃A₃ 能抑制病毒复制, 但对病毒感染的细胞未发现保护作用。1981 年刘等首先证明 2'-5'P₃A₃ 对病毒感染的细胞有一定的保护作用^[6], 姚等接着证明这种抗病毒作用有普遍性意义^{[8] [7]}, 但姚等当时工作, 只限于人的细胞, 本文在小鼠细胞中对 VSV, NDV 也得到类似的结果, 进一步支持 2'-5'P₃A₃

抗病毒作用的普遍性。在技术要求上,主要是要适当地选择病毒攻击的剂量及观察细胞病变的时间,如果病毒剂量太大以及感染后的保温时间太长,不易得到正结果(表2)。国外曾有人报道2'-5'P₃A₃的抗病毒作用,关键是2'-5'P₃A₃要与病毒同时作用于细胞,如果2'-5'P₃A₃先于或后于病毒攻击则无效^[8],我们不以为然,病毒攻击先于[文献5.7]或后于2'-5'P₃A₃(表1)处理细胞均有效,只是相差的时间不能太久。甚至于在无Ca⁺⁺存在情况下,2'-5'P₃A₃先于病毒攻击3—6小时处理细胞也有效,2'-5'P₃A₃没有Ca⁺⁺不能进入细胞,它如何发挥作用呢?估计可能是在病毒感染时将它带进了细胞。

参 考 文 献

- [1] 刘新垣等, 1981, 国外医学分子生物学分册(6):251.
- [2] 刘新垣等, 国外医学分子生物学分册(出版中).
- [3] Tan, Y.K. et al., 1984, Interferon and their application, in "handbook of experimental pharmacology" Springer verlage, pp101-135.
- [4] Baglioni, C., 1979, Cell 17:255.
- [5] 刘新垣等, 1981, 科学通报(中文版)503; (英文版)850.
- [6] 姚埴等, 1983, 生物化学与生物物理学报15:183.
- [7] 刘新垣等, 1983, 中国科学B辑, (6):506.
- [8] Bugang, H. et al., 1981, International meeting Rotterdam, 81.
- [9] Williams, B.R.G. et al., 1979, FEBS, Lett, (79):47.
- [10] Hovanessian, A.G. et al., 1980, Virology, 101:81.

MECHANISM OF INTERFERON ACTION

X. Conditioned antiviral effect of pppA2'p5'A2'p5'A

Fei Yun-Piao Song Hai-yan Nin I-hua
(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

Yao Kun Zhou Yao-xi
(Dept. of Microbiol., Nanjing Medical College, Nanjing)

Yao Man-hua Liu Xin-yuan
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

This study showed that the treatment of pppA2'P5'A2'P5'A (2'-5'P₃A₃) on Lpa cells of mice *in vitro* makes them possible to resist the challenge of Newcastle disease virus and vesicular stomatitis virus, giving further evidence for the general antiviral effect of 2'-5'P₃A₃.

Conditions for getting positive antiviral effect of 2'-5'P₃A₃ were the quantity of challenging virus and the time for observing the results. 2'-5'P₃A₃ showed antiviral effect even if 2'-5'P₃A₃ was administrated 3-6 hr prior to virus challenge without the presence of calcium chloride.