维普资讯 http://www.cqvip.com

人集落刺激因子-1（CSF-1）对常见呼吸道病毒的抑制作用

姚堃 周瑶玺 吴筱玲 周锋
（南京医学院微生物学教研究室，南京210002）
朱德煦 陶旭
（南京大学生物化学系，南京210002）

提 要

本文观察集落刺激因子-1（CSF-1）及其诱生剂：内毒素（LPS）、胞壁二肽(MDP)和干扰素（IFN-α）对下列病毒所致细胞病变的抑制，包括不同型别腺病毒5株，单疱病毒Ⅰ型和Ⅱ型，流感病毒A_3型，鼻病毒，ECHO11型各1株，在人胚肺传代细胞株上病变抑制的结果如下：对HSV-1、HSV-2、腺病毒6、11、22型，流感A_3型，鼻病毒。(CSF-1)和IFN-α，一样有明显抑毒效果，LPS+MDP联合使用对以上病毒有明显增强抑毒作用。CSF-1和IFN-α的抑毒作用能分别被CSF-1和IFN-α的抗体所解除。

CSF-1在人胚肺传代细胞和人胚皮肤肌肉传代细胞上对VSV的抑毒效果在人胚肺细胞中效果比人胚皮肤肌肉细胞更明显。LPS 10 ng/ml作用48小时比作用24小时效果更强。LPS+MDP和IFN-α对二种细胞都有同样高效的抑毒作用。

关键词： 集落刺激因子-1　　呼吸道病毒

集落刺激因子（*Colony-Stimulating Factor*，CSF-1）的研究进展迅速，目前已知的CSFs有4种，其中巨噬细胞克隆刺激因子又称（CSF-1）是单核巨噬细胞生长因子。国内南京大学生物化学系最早从人尿中制备纯化的CSF-1。其活性达到2.16×10^7单位/毫克蛋白[1]。Lee1987年曾用CSF-1保护小鼠的巨噬细胞免受VSV的攻击致病效应[2]。本文观察CSF-1在组织培养细胞中对10株常见人类呼吸道病毒的抑制作用，用抗体中和法证明CSF-1的特异性。并比较了CSF-1、IFN-α及CSF-1诱生剂LPS，LPS+MDP在不同细胞上对VSV所致细胞病变的抑制效应。

材 料 与 方 法

一、制剂：

1. CSF-1南京大学生物化学系从人尿中分离提纯，其活性2.16×10^7单位/毫克蛋白。
2. IFN-α，日本JCR天然的纯度1×10^6单位/毫克蛋白。
3. LPS Sigma 公司提供。

本文于1989年9月28日收到。

维普资讯 http://www.cqvip.com

4、MDP（MDP-muramyl dipeptide）胞壁二肽，北京中国军事医学科学院提供。

二、病毒：

流感病毒A_3型、HSV-1、HSV-2鼻病毒、ECHO11病毒．腺病毒3、7．11、6．22型为本室72—78年自病人标本中分离和鉴定株，用人胚肾细胞传代，低温保存。攻击试验中病毒用量为$100TCID_{50}$。

三、细胞：

人胚肺传代细胞株16—18代。人胚皮肤肌肉纤维母细胞20—22代。按常规传代培养法制备细胞单层。

四、细胞病变抑制试验：

待长好的细胞单层，换成维持液，然后用CSF-1．IFN-α、LPS．LPS+MDP临用时稀释成所需浓度，加入细胞单层，37℃静止培养24小时，换新鲜维持液加入$100TCID_{50}$病毒液，37℃继续培养，每日观察细胞病变二次，并记录结果。

五、CSF-1和IFN-α活性的中和试验

兔抗人CSF-1的抗血清由南京大学生化系供给，鼠抗人IFN-α的单克隆抗体由美国纽约大学Vilcek教授赠予。

中和试验中CSF-1溶液(200ng/ml)及IFN-α溶液(1000u/ml)分别和其对应的抗血清(1：80)等体积混合，然后37℃水浴1小时，将混合液分别处理人纤维母细胞单层培养物，18小时后以病毒（MOI=0.5^{-1}）攻击之，攻击病毒加入$1\frac{1}{2}$小时后，用Hanks液洗三次。然后加细胞培养维持液，37℃CO_2孵箱培育，经若干小时后用0.1%结晶紫酒精溶液染色，观察细胞病变。为了观察攻击病毒是否生长，以细胞培养的上清液滴定病毒感染效价。

结　果

一、CSF 1及其诱生物LPS，MDP和IFN-α对VSV感染人胚肺和人胚皮肌纤维母细胞所致病变的保护效应，其结果见表1。

表1　CSF-1及其诱生物和IFN-α对VSV感染二种成纤维细胞病变的保护作用
Tabl. Protective effect of CSF-1, CSF-1 inducing agents and IFN-α on 2 lines of human fibroblast cell against VSV

细胞株，处理方法，攻毒时间和观察病毒的天数（日）	人胚肺纤维母细胞										人胚皮肌纤维母细胞									
	刺激剂持续保留					处理1天后换无刺激剂培液					刺激剂持续保留					处理1天后换无刺激剂培液				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
CSF-1 100ng/ml 24小时后攻毒	−	−	−	−	±	−	−	−	±	±	−	−	−	++	++	−	−	−	+++	+++
LPS 1ng/ml 24小时后攻毒	−	−	++	++	+++	−	−	++	++	+++	−	±	++	++	+++	−	+	++	++	+++
LPS 10ng/ml 24小时后攻毒	−	−	±	+	++	−	−	−	+	++	−	+	++	++	+++	−	−	+	++	+++
LPS 10ng/ml 48小时后攻毒	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	−	−	−	+	++	−	−	−	+	++
LPS 10ng/ml+MDP 100μg/ml 24小时后攻毒	−	−	−	−	±	−	−	−	−	+	−	−	−	±	±	−	−	−	±	±
1000u/ml IFN-α 24小时后攻毒	−	−	−	+	+	−	−	−	+	+	−	−	−	±	+	−	−	−	+	+
病毒对照						−	++	+++	+++	+++						−	++	+++	+++	+++
细胞对照	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

维普资讯 http://www.cqvip.com

从表1结果可以看出CSF-1保护人胚肺纤维母细胞免受VSV攻击所致的细胞病变，比在人胚皮肤纤维母细胞更为显著。LPS 10ng/ml 作用48小时比作用24小时更为明显。LPS＋MDP联合使用比LPS单独使用的作用为强。CSF-1处理细胞单层一夜后换液除去CSF-1和保留不换，二者的保护效应几无差别。

二、CSF-1及其诱生剂和IFN-α对常见呼吸道病毒感染人胚肺纤维母细胞的病变抑制效应见表2和表3。

表2 CSF-1及其诱生剂和IFN-α对腺病毒在人胚肺纤维母细胞所致病变的抑制作用

Tab 2. Inhibitory effect of CSF-1, CSF-1 inducing agents and IFN-α on cytopathy in human lung fibroblast cell line induced by viruses

腺病毒型别 观察时间（日） 和细胞处理	腺3型						腺7型						腺6型						腺11型						腺22型					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
病毒对照	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	++	+++	+++	+++	−	−	++	++	+++	+++	−	−	+	++	++	+++
CSF-1 100ng/ml	−	++	+++	+++	+++	+++	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	++	+++	−	−	−	−	+++	+++	−	−	−	−	+	++
IFN-α 1000u/ml	−	++	++	+++	+++	+++	−	−	++	+++	+++	+++	−	−	−	−	++	+++	−	−	−	−	++	++	−	−	−	−	±	++
LPS 10ng/ml	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	+	++	+++	−	−	−	+	++	++	−	−	−	−	++	++
LPS 10ng/ml＋MDP 100μg/ml	−	++	+++	+++	+++	+++	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	+	++	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+
细胞对照	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

表3 CSF-1及其诱生剂和IFN-α对HSV-1.2、流感病毒、鼻病毒、ECHO11型病毒在人胚肺纤维母细胞所致病变的抑制作用

Tab 3. Inhibitive effect of CSF-1, CSF-1 inducing agents and IFN-α on cytopathy in human lung fibroblast cell induced by viruses

病毒种类 观察时间（日） 和细胞处理	HSV-1						HSV-2						流感病毒						鼻病毒						Echo11病毒					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
病毒对照	−	+	+++	+++	+++	+++	−	−	−	++	+++	+++	−	−	+	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
CSF-1 100ng/ml	−	−	−	+	++	+++	−	−	−	−	+	++	−	−	−	−	+	++	−	−	++	+++	+++	+++	+++	−	++	+++	+++	+++	+++
IFN-α 1000u/ml	−	−	−	±	++	++	−	−	−	±	++	++	−	−	−	−	±	±	−	−	−	−	+	++	−	±	+	++	+++	+++
LPS 10ng/ml	−	−	±	+	++	+++	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+	++	++							−	+	+++	+++	+++	+++
LPS 10ng/ml＋MDP 100μg/ml	−	−	±	+	++	+++	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	±	±	−	−	±	±	+	++	−	++	+++	+++	+++	+++
细胞对照	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

根据表2所示：CSF-1及其诱生剂和IFN-α对腺病毒6型、11型、22型都有明显的抑毒作用，对腺病毒3型和7型的作用很微弱。

表3所示：对HSV-1、HSV-2和流感病毒，CSF-1的抑制作用几乎和IFN-α相差无几，对鼻病毒和ECHO11病毒，CSF-1的抑制作用远较IFN-α的作用为弱。

三、CSF 1抗体的中和作用：以VSV、流感病毒、腺6型病毒为攻击病毒，CSF-1抗体能完全中和而除去CSF-1的抑毒作用，包括细胞病变和病毒增殖的抑制。据此，可以肯定CSF 1的抑毒作用是有特异性的。同样，IFN-α抗体能中和而除去IFN-α的抑毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

作用。

讨 论

从实验的结果看出CSF-1和干扰素一样有较强的和广谱的抗病毒活性，对不同的病毒和不同的细胞系，二者的抗病毒活性也不完全相同LPS和MDP均为CSF-1的诱生剂，两者合用有协同作用。这和国外报导相同[3]。Ralph 等人报导人的所有有核细胞几乎都能产生天然的CSF-1，只是量的大小有极显著的差别。这一点和干扰素相似[4]。

经CSF-1和IFN-α的相应抗体的中和作用，结果说明二者的作用是特异的，既能抑制病变的出现，又能抑制病毒的增殖。关于CSF-1对腺病毒6，11和22型（D组）的抑制作用远比对腺病毒3和7型（B组）更为显著，其原因尚待研究。有人推测这种差异可能由于各组腺病毒穿入宿主细胞的方式有所不同，这可能与宿主细胞表面CSF-1受体的表达有关（Belin，1987）。Lee报道1ng/ml LPS 作用于小鼠巨噬细胞就可使之获得一定的保护力，可免受 VSV 的攻击所致的病变。CSF-1 1000—2000u/ml 则可完全保护。这和我们在人胚肺和人胚皮肤肌肉纤维母细胞上的结果相符。作者用CSF-1对人类常见的10株呼吸道病毒的抑毒效果的观察，发现对HSV-1型、HSV-2型、腺病毒6、11 22型、流感A_3型、鼻病毒 CSF-1 和 IFN-α 一样有明显抑毒效果，但程度有所不同。CSF-1 的诱生剂 LPS和MDP联合处理细胞后对以上病毒有更明显的抑毒效应。CSF-1对人类病毒有抑毒作用，国内外尚未见报道。关于 CSF-1 的抗病毒机理，文献报道尚很少。Lee认为是通过CSF-1诱生内活性 IFN-α/β 达到抗病毒的作用，因为它的抗病毒活性能使IFN-α和β 的抗体所中和。这一论点，尚待进一步证实。我们设想除了产生内源性IFN-α和β外，可能还有其它的抗病毒因子，因为 CSF-1 和 IFN-α对不同的病毒其抑毒效果有相同的方面，也有不同的方面，对CSF-1的抗病毒机理尚待进一步研究。

参 考 文 献

〔1〕 Xu, Guang-Gao., 1989 *Comp. Biochem. Physiol.* 8913(3)：551—555.
〔2〕 Lee, M.T.et al., 1987, *J.Immunol.* 138：3019—3022.
〔3〕 Galelli, A.et al., 1986, J.Immunol.137：3211—3215.
〔4〕 Ralph, P.et al., 1986, *Blood* 68：633—639.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Inhibitory Effect of CSF-1 on Human Common Respiratory Tract Viruses in Vitro

Yao Kun Zhou Yao-xi Wu Xiao-ling Zhou Feng

(Department of Microbiology, Nanjing Medical College, Nanjing 210002)

Zhu De-xi Tao Xu

(Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210002)

This paper reports the protective effect of human CSF-1 on human fibroblast cultures infected by viruses in vitro, that is, before virus challenge, the treatment of cell cultures with CSF-1 may result in the inhibition of virus replication and virus-induced cytopathy. The challenge viruses included 2 strains of HSV, 1 strain of influenza A_3 virus, 1 strain of ECHO-11 virus, 5 strains of different serotypes of adenovirus, 1 strain of rhinovirus and 1 strain of VSV.

The activity of CSF-1 was specific, it was confirmed by antibody-neutralization.

The results of our experiment are as follows: (1)to cell cultures infected by HSV-1, HSV-2, adenovirus type-6, 11, 22, rhinovirus, influenza A3 virus and VSV, the protective effect of CSF-1 was significant and seemed to be comparable with that of IFN-α or some weaker than IFN-α; (2) after stimulation with LPS and MDP, human fibroblast cultures also obtained protection against these challenging viruses. Whether this protective effect is associated with CSF-1 and whether under stimulation of LPS and MDP the cultured fibroblast cells may produce CSF-1 or other antiviral factors, such as interferon, remain to be determined.

Key Words: Colony stimulating factor 1 Respiratory viruses