

298-302

6774(5)

第10卷 第4期
1995年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 10 No. 4
Dec. 1995

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)对常见 呼吸道病毒的抑制作用

姚 莹 吴筱玲 周 峰 周瑶玺

(南京医科大学微生物学教研室, 南京 210029)

R977.6
R373.1

A **提要** 用人重组肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)和人天然 α 干扰素(Interferon- α , IFN- α)在人胚胎肺纤维母细胞(HEL)和 Hep-2 细胞系上对常见呼吸道病毒所致细胞病变抑制进行比较观察。病毒包括不同型别的腺病毒 5 株, 单疱病毒 I 型(HSV- I) 1 株, 鼻病毒 1 株, 仙台病毒 1 株, VSV 1 株。结果提示 TNF- α 和 IFN- α 均具有广谱抗病毒活性。TNF- α 的抑毒作用能被 TNF- α 单抗和 IFN- β 单抗完全去除, 被 IFN- α 单抗部分去除 TNF- α 的抗病毒效应。TNF- α 中和试验的结果提示: TNF 抗病毒活性仍为 IFN- β 诱生所介导。

关键词 肿瘤坏死因子, 抗病毒效应, 呼吸道病毒

1975年 Carswell^[1]等人用 BCG 和 LPS 先后给小鼠注射, 在血清中产生一种物质能使移植的肉瘤发生出血坏死。1985年 Beutler^[2]等人对这一物质作了进一步鉴定, 定名为肿瘤坏死因子, 也称坏死素(Cachectin)。TNF 系由多种细胞产生, 主要由单核巨噬细胞产生的称 TNF- α , 活化的 T 细胞产生的称 TNF- β 。TNF 具有广泛的生物学活性, 它不仅在体内外具有抗肿瘤的活性、免疫调节活性, 而且有广泛的抗病毒活性。TNF 预先处理细胞能保护细胞不感染。不同剂量的 TNF 预先处理的细胞和病毒产量降低呈相关性。本研究用 TNF- α 和 IFN- α 对常见呼吸道病毒 9 株所致细胞病变的抑制进行比较观察。由于 IFN- α 抗病毒活性是 30 年来确认的, 因此 TNF- α 和 IFN- α 对比观察更有利于了解 TNF- α 抗病毒范围和其敏感性。结果发现 TNF- α 和 IFN- α 有相似的广谱抗病毒作用, 并能被相应的单抗所阻断。

材料和方法

1 制剂

- 1.1 rHuTNF- α 活性 1×10^7 单位/毫克蛋白, Sigma 公司产品。
- 1.2 天然的 HuIFN- α 纯度 1×10^6 单位/毫克蛋白, 日本 JCR 产品。
- 1.3 Actinomycin Sigma 公司产品。

2 病毒

腺病毒 5 株: 3 型、7 型、5 型、2 型、11 型和鼻病毒(N₃₃株)均为本室 1972—1978 年分离鉴定株。HSV- I (SM 株) 湖北医学院病毒所提供, 仙台病毒、VSV 由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。病毒感染人胚肾

本文于 1995 年 1 月 3 日收到, 6 月 5 日修回

细胞传代物,超低温保存。攻击试验病毒用 100 TCID₅₀。

3 细胞

3.1 人胚肺纤维母细胞传代株 4—8 代。按常规传代培养制备,本室自建株。

3.2 HeP-2 细胞本室从国外引进,在本室传代,液氮保存,用时复苏。

4 细胞病变抑制试验

TNF- α 对 L₈₀₀ 细胞有很强的细胞毒性,而对本研究所用的 HEL 和 Hep-2 细胞均无毒性作用,预备试验中 TNF- α 浓度到 8000 ng/ml 对上述细胞均无毒性作用。选用的浓度为 10—10000 ng/ml。

取长满的细胞单层,将 TNF- α 用含 2 μ g/ml 放线菌素 D 维持液处理,稀释成各种不同浓度加入细胞单层于 96 孔板置含 5%CO₂ 培养箱 37℃ 培养 24 小时,弃上清换新鲜维持液加入 100 TCID₅₀ 病毒液,37℃ 继续培养,每日观察细胞病变一次,记录结果。当病毒对照组出现“卅”细胞病变时,判读结果。仙台病毒以测血球吸附试验为观察结果指标。

5 TNF- α 和 IFN- α 活性的中和试验

鼠抗人 TNF- α 单抗, Sigma 公司产品。鼠抗人 IFN- α , IFN- β 的单抗,美国纽约大学 Vilcek 教授赠予。

中和试验中 TNF- α 1000 ng/ml; IFN- α 1000 μ /ml。TNF- α 单抗 1 : 80; IFN- α 和 IFN- β 单抗 1 : 200。分别将 TNF- α 和抗 TNF- α 单抗等体积混合, TNF- α 和抗 TNF- α 单抗等体积混合; TNF- α 和 IFN- β 单抗等体积混合,放 37℃ 水浴 90 分钟,将混合液分别处理 HEL 细胞单层,24 小时后以 HSV-1 和 Ad₅ 为攻击病毒(MOI=0.5),攻击病毒加入细胞单层后 3 小时,用 RPMI1640 洗三次。然后加细胞培养维持液,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,病毒中和试验按常规宜观察 7 天以上。而细胞因子中和试验按常规一般观察 4—5 天,待病毒对照出现“卅”,即可判定结果。

结 果

1 rTNF- α 和 IFN- α 在 HEL 和 Hep-2 细胞上对腺病毒感染所致病变的保护效应 结果见表 1 和表 2。

表 1 rTNF- α 和 IFN- α 在 HEL 对腺病毒感染所致细胞病变的保护效应
Tab 1 Protective effect of rTNF- α and IFN- α on HEL cells against adenoviruses

腺病毒型别/观察时间(日)/细胞处理 Types of adenoviruses observation period (day) and cell treatment		Ad ₃				Ad ₇				Ad ₂				Ad ₅				Ad ₁₁			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
细胞对照	Cell control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病毒对照	Viruses control	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
TNF- α	1000ng/ml	-	+	卅	卅	-	+	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
	500ng/ml	+	卅	卅	卅	-	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	-	-
	250ng/ml	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	-	-
	125ng/ml	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	-	-
	100ng/ml	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	-	-
	50ng/ml	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	-	-
	25ng/ml	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	-	-
12.5ng/ml	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	-	-	
IFN- α	1000u/ml	-	-	+	卅	-	-	+	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500u/ml	-	±	卅	卅	-	-	+	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	250u/ml	-	卅	卅	卅	-	-	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	-
	125u/ml	+	卅	卅	卅	-	+	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	62.5u/ml	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卅	卅	-

从表 1 结果看出 TNF- α 对 Ad₃ 型 Ad₇ 型无效,对 Ad₁₁ 型、Ad₂ 型 25 ng/ml、Ad₅ 型 125

ng/ml都有抑制病毒作用。IFN- α 500 u/ml使 Ad₃型 Ad₇型推迟病变出现,而对 Ad₂型、Ad₆型、Ad₁₁型 62.5 u/ml—250 u/ml 都有抑制病毒的效应。

表2 rTNF- α 和 IFN- α 在 HEP-2 细胞上对腺病毒感染所致细胞病变的保护效应
Tab 2 Protective effect of rTNF- α and IFN- α on HEP-2 cells against adenoviruses

腺病毒型别/观察时间(日)/细胞处理 Types of adenoviruses observation period (day) and cell treatment	Ad ₂					Ad ₅					Ad ₁₁				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
细胞对照 Cell control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病毒对照 Viruses control	-	+	++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+	++	++	+++	+++
TNF- α	1000ng/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100ng/ml	-	-	-	-	-	-	±	+	++	-	-	-	+	+
	10ng/ml	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	+	++
IFN- α	1000u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500u/ml	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	250u/ml	-	-	-	++	-	-	±	+	++	-	-	-	+	+
	125u/ml	-	-	-	++	-	-	+	++	+++	-	-	-	++	++
62.5u/ml	-	-	-	+	-	-	++	++	+++	-	-	-	++	++	

从表2结果看出 TNF- α 对 Ad₂型在 HEP-2 细胞上 ≥ 10 ng/ml, Ad₅型、Ad₁₁型 100 ng/ml 都有保护效应。IFN- α 对 Ad₂型、Ad₅型、Ad₁₁型在 Hep-2 细胞上 500 u/ml 有完全保护效应。

2 rTNF- α 和 IFN- α 在 HEL 和 HEP-2 细胞上对鼻病毒、HSV-1、仙台病毒和 VSV 感染所致细胞病变的保护效应 结果见表3和表4。

表3 rTNF- α 和 IFN- α 在 HEL 细胞上对鼻病毒、HSV-1、仙台病毒和 VSV 感染所致细胞病变的保护效应
Tab 3 Protective effect of rTNF- α and IFN- α on HEL cells against rhinovirus, HSV-1 Sendavirus VSV

病毒型别/观察时间(日)/细胞处理 Kinds of viruses, observation period (day) and cell treatment	鼻病毒(N31)					HSV-1					仙台病毒					VSV				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
细胞对照 Cell control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病毒对照 Viruses control	++	+++	+++	+++	+++	±	+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	
TNF- α	1000ng/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	500ng/ml	-	-	±	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	250ng/ml	-	-	±	++	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100ng/ml	-	-	+	+++	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	++	++	++	
	50ng/ml	-	+	+++	+++	-	-	+	++	++	-	+	++	++	+	+++	+++	+++	+++	
25ng/ml	-	+	+++	+++	-	-	++	++	+++	-	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++		
12.5ng/ml	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	±	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++		
IFN- α	1000u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	500u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	250u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	125u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
62.5u/ml	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	-	-	-	-	+	+	+++	+++		

表3结果可见 TNF- α 1000 ng/ml 能完全抑制鼻病毒感染细胞病变的出现。100—500 ng/ml可推迟细胞病变出现。而 IFN- α 62.5 u/ml 对鼻病毒感染就有完全保护细胞的效果。100 ng/ml TNF- α 和 125 u/ml 的 IFN- α 对 HSV-1 感染能完全抑制细胞病变出现。对 VSV 感染的细胞单层 250 ng/ml 和 125 u/ml IFN- α 能完全抑制细胞病变效应。对仙台病毒感染的细胞单层 100 ng/ml TNF- α 和 62.5 u/ml IFN- α 能完全抑制病毒增殖,血球吸附试验呈阴性。

表 4 rTNF- α 和 IFN- α 在 HEP-2 细胞上对鼻病毒、HSV-1、仙台病毒和 VSV 感染所致细胞病变的保效应
Tab 4 Protective effect of rTNF- α and IFN- α on HEP-2 cells against rhinovirus, HSV-1, Sendavirus, VSV

病毒型别/观察时间(日)/细胞处理 Kinds of viruses, observation period (day) and cell treatment		鼻病毒(N ₃₁)					HSV-1					仙台病毒					VSV									
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5					
细胞对照	Cell control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病毒对照	Viruses control	+	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	-	+	++	+++	+++
TNF- α	1000ng/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100ng/ml	-	-	-	-	+	-	-	-	-	±	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	10ng/ml	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++	±	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	-	+	++	+++	+++
IFN- α	1000u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	250u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	125u/ml	-	-	±	+	++	-	-	±	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
62.5u/ml	-	-	+	++	+++	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	

表 4 结果可见:TNF- α 100 ng/ml 和 IFN- α 250 u/ml 对鼻病毒感染能完全抑制细胞病变出现。对 HSV-1 感染的细胞单层 TNF- α 1000 ng/ml 和 IFN- α 250 u/ml 能完全抑制细胞病变出现。对 VSV 病毒感染的细胞单层 TNF- α 1000 ng/ml 和 IFN- α 500 u/ml 能完全抑制细胞病变的出现。对仙台病毒感染细胞单层 TNF- α 100 ng/ml 和 IFN- α 62.5 u/ml 能完全抑制病毒增殖,血球吸附试验呈阴性。

3 rTNF- α 和 IFN- α 抗体中和作用 采用 HSV-1 和 Ad₅ 型为攻击病毒,HEL 为试验细胞。TNF- α 单抗能完全中和而除去 TNF- α 的抑毒作用(所致的细胞病变),说明 TNF- α 对 Ad₅、Ad₂、Ad₁₁、HSV-1、仙台病毒、VSV 的抑制细胞病变是特异的。IFN- α 单抗能完全中和而除去 IFN- α 的抑毒作用。IFN- α 单抗能部分中和而除去部分 TNF- α 的抑毒作用,IFN- β 单抗能完全中和而除去 TNF- α 的抑毒作用。

讨 论

本研究证明 rTNF- α 和 IFN- α 相似,具有广谱的抗病毒活性。对不同病毒及在不同细胞上抗病毒能力也不相同。

中和试验的结果证实 rTNF- α 和 IFN- α 抗病毒是特异的。都能被对应的单抗所中和。rTNF- α 能被 IFN- β 单抗完全中和而去除 TNF 的抑毒作用。IFN- α 单抗也能部分中和而除去 rTNF- α 的抑毒作用。Mestan 报道 TNF- α 有抗 VSV、EMCV 和 HSV-1 作用,可预防细胞病变的进展和降低病毒的产量。在 HEP-2 细胞上预先用 TNF- α 处理细胞,它可以干扰病毒早期的复制和蛋白质合成^[4]。若干文献报道^[6]IFN- γ 和 TNF- α 二者联合预先处理细胞有很好的协同作用,抑制细胞病变的出现和减少病毒产量,比二者单独使用增强 1000 倍以上。Shun-Hua Chen^[6]报道用人角膜纤维母细胞预先用 IFN- γ 和 TNF- α 联合处理,再感染 HSV 病毒可以得到很强的抗病毒效应。抗病毒活性能完全被 IFN- β 单抗所中和,而不被 IFN- γ 单抗和 IFN- α 单抗所中和。Leeuwenberg^[7]1987 年报道 TNF- α 在某些细胞系提示抗病毒活性是由于诱生 IFN- β ,但不是 IL₆。特别在 HeLa 细胞上 TNF- α 抗病毒活性的建立,其中 IFN- β 诱生可能起了一个决定性的作用。Vilcek^[8]报道 IFN- β_2 介导 TNF- α 的抗病毒效应,但 TNF- α 抗病毒效应不是唯一通过 IFN 介导的。TNF- α 及通过 TNF- α 诱生 IFN- β ,共同建立抗病毒状态^[1]。我们的结果和 Vilcek^[8]的报道相一致。Grace^[5]报道 TNF- α 既有直接抗病毒作用也能通过诱生 IFN- β 而

建立抗病毒状态。IFN- α 和IFN- β 同属I型干扰素,二者之间有29%同源性,能否来解释实验中出现的IFN- α 单抗也能部分中和TNF- α 效应,有待进一步证实。关于TNF- α 的抗病毒机理十分复杂,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Carswell E A, Oid L J, Kassai R I, *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975; 72:3666—3670
- 2 Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediatory of host response. *Ann Rev Immunol*, 1989; 7:625—655
- 3 Mestan J, Digel W D, Mittnachi S, *et al.* Antiviral effect of recombination tumor necrosis factor *in vitro*. *Nature*, 1986; 323:30,816—818
- 4 Choristine W C. The role of tumor necrosis factor in viral disease. *Antiviral research*, 1993; 22:223—258
- 5 Grace H W Wong, David V G, *et al.* Tumor necrosis factor- α and B inhibit virus replication and synergize with IFNs. *Nature*, 1986; 323(30):819—822
- 6 Shun-Hua Chen, M John E, Oakes, *et al.* Synergistic antiHSV effect of TNF- α and IFN- α in human-Corneal fibroblasts is associated with IFN- β induction. *Antiviral research*, 1993; 22(1):15—29
- 7 Leeuwenberg J F K, Vandamme J, Jeunhomme G M A, *et al.* IFN- β : an intermediate in the tumor necrosis factor- α induced increased MHC class I expression and an autocrine regulator of the constitutive MHC class I expression. *J Exp Med*, 1987; 166:1180—1185
- 8 Vitek J, Palombella V J, Dosothy H D, *et al.* Fibroblast growth enhancing activity of TNF- α and its relationship to other polypeptide growth factor. *J Exp Med*, 1986; 162:632—643

Inhibitory Effect of TNF- α on Human Common Respiratory Tract Viruses *in vitro*

Yao Kun Wu Xiaoling Zhou Feng Zhou Yaoxi

(Department of Microbiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

This paper reports the protective effect of human rTNF- α and Human IFN- α on HEL and HEP-2 cell cultures infected by viruses *in vitro*. That is, before virus challenge, the treatment of cell cultures in comparison with TNF- α and IFN- α may result in the inhibition of virus induced cytopathy. The challenge viruses included 5 strains of different type of adenovirus, 1 strain of HSV-1, 1 strain of rhinovirus, 1 strain of Sendai virus, and 1 strain of VSV. The antiviral activity of TNF- α and IFN- α are specific, and with wide spectrum. The specific antiviral activity of both TNF- α and IFN- α is confirmed by antibody neutralization. Role of TNF- α inhibition can be neutralized completely by monoclonal IFN- β antibody and partly by monoclonal IFN- α antibody.

The mechanism of antiviral effect of TNF- α is discussed. According to the experiments of neutralization test the TNF- α antiviral activity may be completely neutralized by monoclonal antibody against IFN- β . It is strongly suggested that the antiviral effect of TNF- α appear to be mediated by induction of IFN- β .

Key words Tumor necrosis factor- α , antiviral effect, Respiratory tract viruses