第 20 卷第1 期
2005 年 2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

20(1):33-36
February 2005

一氧化氮对猪细小病毒体外增殖的影响研究 *

魏战勇[1] ,崔保安[2] ,黄克和[1**] ,王学斌[2] ,金喜新[2] ,张龙现[2]

(1. 南京农业大学动物医学院 ,江苏南京 210095 ;2. 河南农业大学农业生物技术重点开放实验室 ,河南郑州 450002)

Inhibitory Effects of Nitric Oxide on the Porcine Parvovirus Infection in vitro

WEI Zhan-yong[1] , CUI Bao-an[2] , HUANG Ke-he[1**] , WANG Xue-bin[2] , JIN Xi-xin[2] , ZHANG Long-xian[2]

(1. *College of Veterinary Medicine , Nanjing Argricultural University , Nanjing,* 210095 , *China;* 2. *Key Discipline and Open Laboratory of Agricultural Bioolgical and Engineering Technique , Henan Argricultural University , Zhengzhou,* 450002 , *China*)

Abstract : Inhibitory effects of nitric oxide (NO) on *Porcine parvovirus* (PPV) infection on porcine kidney (PK-15) cells were studied in the paper. The results showed that production of NO was effectively induced in cell cultures treated with S-nitroso-N-acetylpenicllamine (SNAP) or L-arginine and replication of PPV was significantly inhibited by the addition of them in a dose-dependent manner. SNAP produced significantly higher amounts of NO and showed higher level of inhibitory effect on PPV replicaton than L-Arg at 100 and 200 μmol/L. Higher level of inhibition of viral production was also obtained when pretreated with SNAP at 6 h and 3 h before infection than added after infection ,suggesting that the anti-PPV effects of NO occurred at the initial stages of PPV infection. In addition , the anti-PPV effects of L-arginine could be blocked by N^G-nitro-L-Arginine.

Key words : Nitric oxide ; *Porcine parvovirus* ; S-nitroso-N-acetylpenicllamine ; L-Arginine ; N^G-nitro-L-Arginine

摘要:本文研究了来源于不同前体物的一氧化氮(Nitro oxide , NO)对猪细小病毒(*Porcine parvovirus* ,PPV)体外增殖的影响。结果表明 ,NO 前体物 S-硝基-N-乙酰青霉胺(SNAP) 、L-精氨酸(L-Arg)均能够有效地诱导 PK-15 细胞产生 NO ,进而显著地抑制 PPV 在 PK-15 细胞上的复制 ,其效果与前体物的浓度呈正相关 ,在浓度为 100 μmol/L 和 200 μmol/L 时 ,SNAP 产生 NO 的能力与抑制病毒复制的作用要强于 L-Arg。在病毒感染前 6 h 和 3 h 添加 SNAP 或 L-Arg 对病毒复制的抑制作用比在病毒感染后 3 h 和 6 h 添加的作用强 ,表明 NO 的抗病毒作用主要发生在病毒感染的初始阶段。此外 ,添加具有抑制 L-Arg 产生 NO 作用的 N-硝基-L-精氨酸(L-NNA)能抵消 L-Arg 体外抗病毒的作用。

关键词:一氧化氮;猪细小病毒;S-硝基-N-乙酰青霉胺;L-精氨酸;N-硝基-L-精氨酸

中图分类号:S852.65　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1003-5125(2005)01-0033-04

从 1987 年 Furchgott 等发现哺乳动物血管内皮细胞能合成内源性 NO 以来 ,NO 的生理和病理作用日益受到科学界的关注。NO 具有多种重要的生理作用[1] ,不但参与调节血管平滑肌松弛 ,血小板聚集及信号转导 ,而且还是机体免疫系统的调节分子和效应分子 ,在抗微生物和寄生虫感染以及宿主免疫过程中发挥着一定的作用[2,3] 。新近研究发现 ,NO 在体外对痘病毒、腺病毒、柯萨奇病毒以及流感病毒均有着明显的抑制作用[4~6] 。

NO 是一种难溶于水的脂溶性气体 ,因为它的分子结构中具有不配对的电子 ,所以它是一种自由基。体内的 NO 来源于 L-精氨酸中的胍基氮原子和氧分子 ,催化这一反应的酶为一氧化氮合酶(NOS)[7] 。一氧化氮合酶有三种亚型 ,即神经型一氧

收稿日期:2004-06-28 ,修回日期:2004-08-10
* 基金项目:河南省重大科技攻关项目(0223013800) ,国家自然科学基金项目(30371060)
作者简介:魏战勇(1975-) ,男 ,河南安阳籍 ,在读博士 ,主要从事动物临床病理与分子诊断学研究。
** 通讯作者:黄克和(1958-) ,男 ,江苏籍 ,教授 ,从事动物临床病理与分子诊断学研究。
Corresponding author. Tel :025-84395507 ; E-mail :khhuang @njau. edu. cn

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

化氮合酶(nNOS),内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)。nNOS和eNOS在体内能持续的表达,不受外界的环境的干扰。iNOS在一般情况下并不表达,只有在细胞因子、细菌脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)以及其前体物的诱导下才表达,导致大量的NO生成,后者参与机体免疫反应及细胞对病毒的抵抗力。NO的合成经常受到L-Arg类似物N^G-硝基-L-精氨酸甲酯(N^G-nitro-L-arginine-methylesterr)、N^G-硝基-L-精氨酸(N^G-nitro-L-arginine, L-NNA)等的抑制[8]。

猪细小病毒(*Porcine parvovirus*,PPV)属于细小病毒科细小病毒属,在猪群中检出率甚高。由猪细小病毒引起的猪细小病毒病是猪的主要繁殖障碍性疾病之一,以初产母猪流产、不孕、产死胎、畸形胎、木乃伊胎及弱胎等为特征,给养猪业带来巨大的经济损失[9,10]。对于本病的研究主要集中在对该病发生、流行和疫苗上,而在其它因素如外界环境因子等作用的研究较少。虽然国外有许多文献报道NO与多种病毒感染之间的关系,但尚未见到NO与猪细小病毒之间关系的研究。本文以PK-15细胞为模型,较为系统地研究了NO对PPV体外增殖的抑制作用,以期为猪细小病毒病的致病机理的阐明和防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PPV的NJ-1株由南京农业大学动物医学院陈溥言教授惠赠,分离自患有繁殖障碍的母猪组织中,经PCR检测确认,已经适应PK-15细胞。PK-15细胞购自中国兽药药品监测所,细胞的培养与传代按常规方法进行[11]。胎牛血清购自Hyclone公司;PRMI 1640培养基购自Gibco公司。S-硝基-N-乙酰青霉胺(S-Nitroso-N-acetylpenicllamine, SNAP),L-精氨酸(L-arginine, L-Arg),N^G-硝基-L-精氨酸(N^G-nitro-L-arginine, L-NNA)均购自Sigma公司,使用前配制成5 mmol/L SNAP,5mmol/L L-Arginine,2.5mmol/L L-NNA并过滤除菌。NO测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所(NJBI),MTT、DMSO购自Sigma公司,其它常规试剂由本实验室提供。

1.2 SNAP和L-Arg对细胞产生NO的诱导作用

试验分3组,分别为SNAP组、L-Arg组和L-Arg+L-NNA组。SNAP组和L-Arg组分别用不同浓度SNAP和L-Arg作用于贴壁尚未长满单层的PK-15细胞;L-Arg+L-NNA组分别用上述各浓度的L-Arg,同时分别添加100μmol/L的L-NNA作用于贴壁尚未长满单层的PK-15细胞。每个处理做4孔,37 ℃培养8h后,再次分别加入与上次相同浓度的药物,37 ℃继续培养16h,迅速取细胞上层培养液,用NO测定试剂盒(硝酸还原酶法)测定NO浓度。由于NO化学性质活泼,很快代谢为NO_2^-和NO_3^-,而NO_2^-又进一步转化为NO_3^-,硝酸还原酶法利用硝酸还原酶特异性将NO_3^-还原为NO_2^-,通过显色深浅测定其浓度的高低[12];加显色剂后静置10min,蒸馏水调零,用UNICO UV-2102型紫外可见分光光度计在550nm处测定。取各处理的平均值作图,各药物的工作浓度参照已发表的文献进行[13,14]。

1.3 SNAP、L-Arg及PPV对细胞生长的影响

为排除SNAP、L-Arg抗病毒作用不是药物对细胞的毒性作用所引起,进行了本试验。试验按5×3因子设计,将SNAP、L-Arg设置不同浓度,分别添加到含0、100、200 PFU个病毒的细胞液中,然后添加到96孔板中,0.2mL/孔,每个处理做4孔。37 ℃培养8h后,再次加入与上次相同浓度的药物,过16h后测定OD_{570}值;测定前4h在96孔培养板(Coring, Inc)的每孔中加入30μL MTT(0.01 mol/L PBS配制成5mg/mL)溶液,测定时快速翻转培养板、甩去孔内培养液,每孔加入150μL裂解液DMSO,室温震荡10min使结晶物溶解,然后在酶联免疫检测仪(Thermo)570nm波长处测定*OD*值,所测*OD*值作为衡量细胞生长的指标。

1.4 NO对PPV体外增殖的抑制作用

将PK-15细胞消化后,稀释成10^5个/mL,加入24孔培养板上,1mL/孔,每孔添加100 PFU猪细小病毒。然后分3组,分别添加不同浓度的SNAP和L-Arg;L-Arg+L-NNA组分别添加终浓度为上述各浓度的L-Arg,同时分别添加100μmol/L的L-NNA。每个处理做4孔,37 ℃培养8h后,再次加入与上面相同浓度的药物。37 ℃再培养40h后,根据文献介绍的方法测定PFU[11]。

1.5 SNAP及L-Arg抑制PPV感染的动力学

用100 PFU的PPV感染PK-15细胞,分别在感染前6h、3h和感染同时、感染后3h及6h添加100μmol/L SNAP和L-Arg,在感染后48h收获细胞上清液,按文献所述方法测定PFU[11]。

1.6 数据统计分析

使用SPSS 10.0统计软件中One-Way ANOVA对各项数据进行分析,以0.05为差异显著性评价水平。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

2 结果和分析

2.1 SNAP和L-Arg对细胞产生NO的诱导作用

从图1可以看出,NO产生浓度与SNAP、L-Arg浓度呈正相关,当药物浓度升高时NO的浓度也随着升高,在无SNAP、L-Arg时PK-15细胞产生极微量或者几乎不产生NO;在SNAP、L-Arg达到100μmol/L时PK-15细胞产生的NO浓度显著增高,分别达到110μmol/L、25μmol/L;SNAP诱导产生NO的能力高于L-Arg。L-NNA是L-Arg结构类似物,试验表明,在低浓度时其抑制L-Arg产生NO的作用不明显,随着L-Arg浓度的升高其抑制作用逐渐增强。

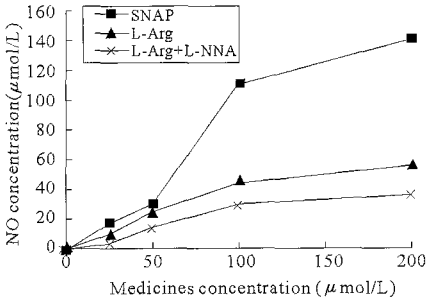

图1 不同药物浓度诱导NO产生的效果

Fig.1 Production of NO in cell cultures treated with different concentrations of medicines

2.2 SNAP、L-Arg及PPV对细胞生长的影响

通过图2可知,SNAP、L-Arg即使在200μmol/L时,OD_{570}值与0、25、50、100μmol/L相近,没有显著差异($P > 0.05$),说明SNAP、L-Arg即使在高浓度时,也不影响细胞的生长,不产生毒性作用,表明此浓度安全可靠。在同时用100 PFU和200 PFU的PPV感染PK-15细胞时发现,100 PFU的细胞OD_{570} nm值在0.6～0.8之间,比0 PFU时OD值有所下降,而200 PFU时OD值下降更多,在0.4～0.6之间。通过这一结果可知,药物对细胞的生长不

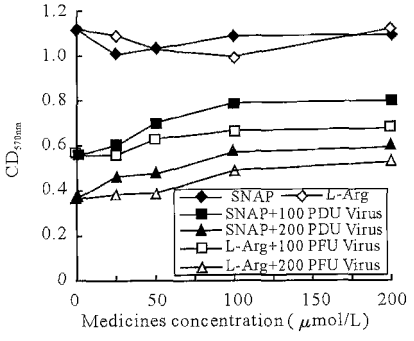

图2 SNAP、L-Arg及PPV对PK-15细胞生长的作用

Fig.2 Effect of SNAP, L-Arg and PPV on PK-15 cell growth

产生毒害影响,而PPV显著影响细胞的生长。

2.3 NO对PPV体外增殖的抑制作用

通过图3可知,SNAP和L-Arg均能够降低PPV的滴度,并与浓度呈正相关,低浓度时两种试剂对病毒PFU影响较小,但随着浓度的升高,SNAP、L-Arg抑制病毒的增殖能力逐渐增强;在高浓度时,SNAP抑制病毒增殖的能力显著强于L-Arg。在L-NNA与L-Arg同时使用时,L-Arg抗病毒感染力降低。

2.4 SNAP及L-Arg抑制PPV感染力的动力学

从图4可知,在感染前6 h添加SNAP或L-Arg时,PPV的PFU最低,对病毒复制的抑制作用最强;感染后6 h添加SNAP或L-Arg时PPV的PFU最高,对病毒复制的抑制作用最弱。表明随着添加SNAP和L-Arg时间的推迟,病毒的PFU逐渐升高,药物对PPV复制的抑制作用逐渐减弱。

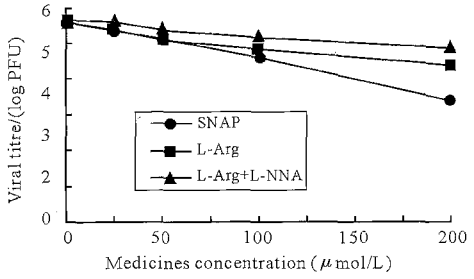

图3 SNAP、L-Arg对PPV复制的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of PPV replication by SNAP or L-Arginine

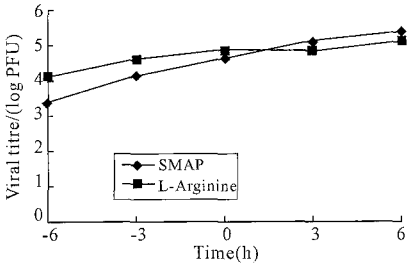

图4 SNAP、L-Arg抑制PPV的感染的动力学

Fig.4 Kinetics of PPV infection with SNAP or L-Arging at different time

3 讨 论

NO是一种重要的抗病毒感染分子,NO能够抑制多种病毒的复制,包括DNA病毒和RNA病毒,如痘病病毒、流感病毒、口腔炎病毒以及鸡马立克病毒等[4,13～15]。在本试验中,首次证实了NO也能够抑制PPV在体外的增殖。结果表明,SNAP诱导PK-15细胞产生NO作用要强于L-Arg,表现的抑制病毒复制作用也比较强,而且NO抑制病毒复制

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

作用随浓度的升高而增强。L-Arg 在 100μmol/L 时能够诱导 PK-15 细胞产生的 NO 浓度约 50μmol/L，在这个浓度下也能够明显抑制 PPV 的复制。Xing 等(2000)在研究 NO 对鸡马立克病毒复制抑制作用时，使用 200μmol/L SNAP 对鸡胚成纤维细胞(chicken embryo fibroblast, CEF)作用时，CEF 产生的 NO 浓度为 30μmol/L [15]；Rimmelzwaan 等(1999)在进行 NO 抑制流感病毒复制试验中利用 MDCK(Mabin Darby canine kidney)产生 NO 的浓度在 75μmol/L 左右[14]，而本试验所测的 NO 浓度达 140μmol/L，在相同的 SNAP 浓度下产生的 NO 浓度也不尽相同，这可能是由于细胞种类和测 NO 浓度使用的方法不同所造成的。

L-Arg 诱导产生 NO 作用比 SNAP 要弱，但也能够抑制 PPV 的复制。当浓度达到 100μmol/L 和 200 μmol/L 时产生的 NO 量升高，能够明显抑制病毒的复制。L-NNA 是一种 L-Arg 结构类似物，能够与 L-Arg 竞争 NOS 酶而产生抑制 NOS 对 L-Arg 的作用。研究结果表明，随着 L-Arg 的剂量增加，添加 L-NNA 组(L-Arg + L-NNA)产生的 NO 浓度比不加 L-NNA 的 L-Arg 组低，而且 PPV 的 PFU 比不加 L-NNA 的 L-Arg 组高，从而证实 L-NNA 具有抑制 L-Arg 诱导产生 NO 的作用，这种抑制作用随着 L-Arg 的剂量增加而减弱。

通过对 SNAP 和 L-Arg 抑制 PPV 增殖的动力学研究发现，SNAP 和 L-Arg 添加越早，病毒的 PFU 越低，抑制病毒的复制作用越强。这一结果提示，NO 的抗病毒作用主要发生在病毒感染的初始阶段。在病毒感染前添加时，SNAP 对病毒的抑制作用比 L-Arg 作用强，病毒感染后添加 SNAP 对病毒的抑制比 L-Arg 要略弱，这可能由于 L-Arg 比 SNAP 合成 NO 的速度快的缘故，这进一步表明 NO 的抗病毒作用主要发生在病毒感染的初始阶段。同时，本研究也证实了 PK-15 细胞在没有 NO 前体物存在时几乎不产生 NO，在有前体物的存在下能够随着前体物剂量增加，诱导 iNOS 大量合成 NO，进而产生抗病毒作用。这些结果为猪细小病毒致病机理的研究和防治提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells [J]. FASEB J, 1992, 6:3051-3064.

[2] Karupiah G, Xie Q W, Buller RM, *et al*. Inhibition of viral replication by interferon-γinduced nitric oxide synthase [J]. Science, 1993, 261:1145-1148.

[3] Allen P C, Lillenhojh H S. Genetic influence on nitric oxide production during E. tenella infections in chickens [J]. Avian Dis, 1998, 42:397-403.

[4] Bellows C F, Garry R F, Jaffe B M. Vaccinia virus-induced inhibition of nitric oxide production [J]. J Surg Res, 2003, 111: 127-135.

[5] Cao W, Baniecki M L, McGrath W J, *et al*. Nitric oxide inhibits the adenovirus proteinase in vitro and viral infectivity in vivo [J]. FASEB J, 2003, 17:2345-2346.

[6] Zell R, Markgraf R, Schmidtke M, *et al*. Nitric oxide donors inhibit the coxsackievirus B3 proteinases 2A and 3C in vitro, virus production in cells, and signs of myocarditis in virus-infected mice [J]. Med Microbiol Immunol (Berl), 72004, 193: 91-100.

[7] Marletta M A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis [J]. Cell, 1994, 78:937-930.

[8] Croen K D. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibitition of herpes simplex virus type 1 replication [J]. J Clin Invest, 1993, 91:2446-2452.

[9] Leman A D, Straw B, Galock R D. Diseases of Swine [M]. Sixth Edition. Lowa State University Press, 1986, 411-424.

[10] Harding M J, Molitor T W. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication [J]. Arch Virol, 1992, 123:323-333.

[11] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997.

[12] Nguyen T, Brunson D, Crespi C L, *et al*. DNA damge and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89:3030-3034.

[13] Bi Z, Reiss C S. Inhibition of Vesicular Stomatitis Virus infection by nitric oxide [J]. J Virol, 1995, 4:2208-2213.

[14] Rimmelzwaan G F, BaarsM M, Lijster P, *et al*. Inhibition of Influenza virus replication by nitric oxide [J]. J Virol, 1999, 73:8880-8883.

[15] Xing Z, Schat K A. Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's Disease Virus [J]. J Virol, 2000, 74:3605-3612.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.