

金欣口服液含药血清对呼吸道合胞病毒黏附、膜融合影响的实验研究 *

廖辉 汪受传 徐建亚 李华丽
(南京中医药大学 江苏南京 210029)

摘要:目的:研究金欣口服液含药血清对呼吸道合胞病毒(RSV)黏附、膜融合的影响。方法:在病毒和细胞接触期间采用转换温度方法观察金欣口服液含药血清对 RSV 黏附、侵入的影响。结果:温度转换前(黏附阶段)加入金欣口服液含药血清,实验组和对照组 OD 值无差异;温度转换后(侵入阶段)加入金欣口服液含药血清组 OD 值明显升高,与对照组比有显著性差异。结论:金欣口服液含药血清的抗病毒作用在呼吸道合胞病毒黏附后的膜融合及侵入阶段。

关键词:呼吸道合胞病毒;金欣口服液;含药血清;机制;黏附;侵入

Abstract:Objective: To study the mechanism of antiviral activity of serum contained Jin Xin oral liquid inhibited respiratory syncytial virus (RSV) infection of Hep-2 cells.Methods: By a temperature shift experiment, serum contained Jin Xin oral liquid was added during or after the period of contact between the RSV and cells, OD value were measured. Results: The OD value increased significantly when Jin Xin oral liquid was added after virus adsorption. Conclusion: The serum contained Jin Xin oral liquid inhibited the RSV penetration into the Hep-2 cells.

Key words:Respiratory syncytial virus; Jin Xin Oral Liquid; serum contained medicine; mechanism; adsorption; penetration

中图分类号: R 285.5

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2008)01-0003-02

人呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)是导致婴幼儿严重下呼吸道感染的最重要的病毒病原^[1]。其生命周期包括以下几个过程:黏附、膜融合侵入、复制、转录、翻译、装配,继而子代病毒以出芽方式通过被感染细胞的胞膜释放。病毒生命周期中任何一个阶段都是抗病毒措施潜在的干预环节。RSV 在 4℃ 时黏附于细胞但不能通过细胞膜侵入,当已黏附的细胞暴露在 35℃ 条件下时,病毒开始侵入细胞膜^[2-4]。前期实验已证实金欣口服液有拮抗 RSV 作用,为了了解其抗病毒作用发生的具体环节,我们进行了温度转换的实验研究。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料 呼吸道合胞病毒 A 亚型(Long 株)由广州博特生物工程有限责任公司提供。Hep-2(人喉癌上皮细胞),由布克生物技术有限公司提供。DMEM(美国 GIBCO 公司);新生牛血清(杭州四季青公司);0.25%胰酶(美国 GIBCO 公司);MTT(美国 AMRESCO 公司);DMSO 由上海永华特种化学试剂厂生产;酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 Hep-2 细胞培养 Hep-2 细胞采用含 10%小牛血清的 DMEM 培养液,35℃、5% CO₂ 孵箱饱和湿度下常规培养。镜下观察细胞呈不规则多角形,生长状态良好的细胞每 2~3 天传代,0.25%胰酶消化 2min,镜下观察细胞回缩变圆时停止消化,每次分 3~4 瓶。所有实验均采用对数生长期细胞。

1.3 呼吸道合胞病毒液制备及组织培养半数感染量(TCID₅₀)的测定^[5] Hep-2 细胞以 1×10⁵/mL 浓度接种 25mL 培养瓶,每瓶 3mL。将长成单层细胞的培养液倒掉,接种病毒液,吸附 1.5h。加入适量含 2%小牛血清的维持液,继续培养 3~5d。待细胞 80%产生病变后,置 -80℃(至少 2h)和 37℃ 反复冻融三次。离心管离心 10min,2 500 转/min。弃沉淀,收集病毒上清液,分装后于 -80℃ 保存备用。

Hep-2 细胞以 1×10⁵/mL 浓度接种 96 孔培养板,每孔 100μL。病毒液用维持液 10 倍系列稀释 8 个浓度。细胞长成

单层时吸弃培养液,PBS 洗细胞面,接种各稀释度的病毒液,并设正常细胞对照组。置 35℃、5%CO₂ 孵箱中吸附 2h,15min 摇晃一次,使病毒均匀吸附。吸弃病毒液,每孔加维持液 100μL,置培养箱中继续培养,逐日观察病变程度并记录。以最高稀释度不再出现新病变时为终点,用 Reed-Muench 公式计算病毒 TCID₅₀。

1.4 含药血清和利巴韦林对细胞最大无毒浓度测定 Hep-2 细胞以 1×10⁵/mL 浓度加入 96 孔细胞板,每孔 100μL,待长成单层后,加入维持液稀释后的金欣口服液含药血清,每孔 100μL,并设正常细胞对照。置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,观察细胞病变至 72h。弃去上清液,用移液器每孔加入 MTT (1mg/mL) 100μL。置孵箱孵育 4h。吸弃孔内上清液,每孔加入 100μL DMSO,振荡,使结晶物充分溶解。选择 490nm 波长,用酶标仪测定各孔光吸收值 OD,确定药物的最大无毒浓度。

1.5 温度转换实验 Hep-2 细胞以 1×10⁵/mL 浓度分种于 96 孔板,100μL/孔,共种两板。待细胞生长至 80%汇合,将板置 4℃ 半小时。其中一板吸弃培养液,加入 TCID₅₀ RSV,细胞对照加冷 DMEM,50μL/孔。4℃ 孵育 2h,每隔 15min 摇晃一次,使病毒均匀吸附。吸弃病毒液,2%维持液洗两遍。加入 2%维持液稀释的金欣口服液含药血清(10mg/mL),细胞对照加 DMEM,100μL/孔,每组设 8 个复孔。置 35℃、5%CO₂ 孵箱孵育 1.5h。吸弃上清,预热的 2%维持液洗两遍,加 2%维持液 150μL/孔,35℃、5%CO₂ 孵箱继续培养。每日观察细胞病变并记录,待病毒对照出现典型病变时测定 OD 值。另一板 4℃ 时将病毒和含药血清同时加入,并设细胞对照。4℃ 吸附 2h。吸弃药物及其中的病毒,2%维持液洗两遍,加 2%维持液 150μL/孔。35℃、5%CO₂ 孵箱继续培养。每日观察细胞病变并记录,待病毒对照出现典型病变时测定 OD 值。病毒抑制率 = (实验组平均 OD 值 - 病毒对照组平均 OD 值) / (细胞对照组平均 OD 值 - 病毒对照组平均 OD 值) × 100%

1.6 统计学处理 数据计量资料采用($\bar{X} \pm S$)表示,两组比

* 江苏省普通高校研究生科研创新计划,国家自然科学基金(编号:30772822)。

• 4 •
较用 t 检验。差异有统计学意义, $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 含药血清对 Hep-2 细胞最大无毒浓度 在 Hep-2 中, 金欣口服液含药血清的最大无毒浓度为 10mg/mL。

2.2 呼吸道合胞病毒 RSV-Long 株 TCID₅₀ 在 Hep-2 中, RSV-long 株 TCID₅₀ 为 10^{-4.625}/50μL。

2.3 温度转换实验 见表 1。

表 1 温度转换实验结果 ($\bar{X} \pm S$)					
加药时间	OD (n=8)			P	病毒抑制率(%)
	病毒对照组	金欣口服液组	细胞对照组		
温度转换前	0.73± 0.05	0.75± 0.06	0.74± 0.04	>0.05	200
温度转换后	1.11± 0.15	2.49± 0.37	1.24± 0.07	<0.05	1062

3 讨论

RSV 属于副黏病毒科, 肺炎病毒属, 为单股负链 RNA 病毒。RSV 表面的三个糖蛋白即黏附蛋白 G、融合蛋白 F 和小疏水蛋白 SH 与病毒感染有关, 病毒依靠 G 蛋白黏附于靶细胞, F 蛋白介导膜融合和颗粒的释放。有研究认为 G 蛋白的缺失不影响 RSV 对细胞的感染, 而 F 蛋白在病毒感染过程是必需的^[6]。与黏附不同, 病毒的膜融合侵入需要能量。本实验在病毒黏附阶段(温度转换前)加入金欣口服液含药血清, 虽然病毒抑制率为 200%, 但平均 OD 值与病毒对照组无显著性差异, 提示该药没有直接影响病毒与靶细胞的黏附。在病毒侵入阶段(温度转换后)加入金欣口服液含药血清, 病毒抑制率为 1062%, 平均 OD 值明显升高, 靶细胞受到保护, 提

实用中西医结合临床 2008 年 2 月第 8 卷第 1 期
示该药可以阻止病毒的膜融合及侵入。由此推测金欣口服液含药血清抗 RSV 的作用机制之一是抑制病毒的膜融合及侵入, 作用位点可能是病毒的 F 蛋白。同时也提示金欣口服液可作为 RSV 感染早期的治疗药物。

参考文献

[1]Harris J, Werling D. Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response[J].Cell Microbio,2003,5(10): 671-680
[2]Hosoya M, Balzarini J, Shigeta S, et al. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins [J].Antimicrob Agents Chemother,1991,35 (12): 2 515-2 520
[3]Wyde PR, Moylett EH, Chetty SN, et al. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays[J].Antivir Res,2004,63: 51-59
[4]Kimura K, Mori S, Tomita K, et al. Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo[J]. Antivir Res,2000,47: 41-51
[5]傅继华.病毒学实用实验技术[M].济南: 山东科学技术出版社, 2001.60-64
[6]Karron RA, Buangurio DA, Georgin AF,et al.Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-pas-saged, attenuated RSV subgroup B mutant [J].Proc Natl Acad Sci,1997, 94: 13 961-13 966

(收稿日期: 2007-09-30)

以腰背痛为首发症状的蛛网膜下腔出血 12 例临床分析

刘晓晗

(山东省枣庄市立第四医院 枣庄 277500)

关键词:蛛网膜下腔出血;腰背痛;治疗

中图分类号:R 743.35

文献标识码:B

文献编号: 1671-4040(2008)01-0004-01

2001 年 7 月~2007 年 1 月, 本院收治以腰背痛为首发症状的蛛网膜下腔出血 12 例, 现报道如下:

1 临床资料

1.1 一般资料 12 例中, 男 8 例, 女 4 例; 年龄 56~70 岁, 平均年龄 64 岁; 劳动时发病 2 例, 进餐或散步时发病 6 例, 睡眠中发病 4 例。均于发病 1d 内入院, 既往有高血压病史 5 例, 偏头痛病史 2 例, 有蛛网膜下腔出血史 1 例。

1.2 临床症状 均为急性起病, 突发腰背疼痛, 6 例疼痛难以忍受, 伴轻度头晕、恶心。血压正常者 2 例, 150~190/90~120mmHg 者 4 例, 颅神经及四肢肌力、肌张力正常, 脑膜刺激征(一)6 例, (+)者 6 例人; 腰骶部肌肉有广泛压痛和叩击痛但肌肉和脊柱无明确压痛点, 无病理反射; 骨盆片及腰骶椎片无异常征象。诊断为高血压病 6 例, 急性腰骶部肌筋膜综合征 3 例, 腰椎间盘突出 3 例。

1.3 实验室检查 腰椎穿刺均为均匀性血性脑脊液, 7 例头颅 CT 证实蛛网膜下腔出血, 外周血白细胞均有不同程度升高(10~20× 10⁹/L)。

1.4 治疗 (1)绝对卧床休息; (2)应用脱水剂、止血剂; (3)应用钙拮抗剂如尼莫通解除脑血管痉挛; (4) 应用活化脑细胞药物; (5)对症治疗。

1.5 结果 10 例患者腰背痛逐渐减轻, 症状消失出院; 2 例

患者于入院后短期内病情恶化死亡。

2 讨论

少数蛛网膜下腔出血病例由于出血部位、脑组织损害程度以及对神经功能影响的不同, 可有多种特殊的临床表现。本组 12 例均为老年患者, 老年人蛛网膜下腔出血较多见, 病因主要是先天性脑动脉瘤、高血压、脑动脉硬化、脑血管畸形, 其临床症状常不典型, 以腰背痛为首发症状, 而头痛、脑膜刺激征缺如或不明显者, 极易延误诊断, 值得临床医生引以为戒。因此, 要重视详细询问病史及反复作神经系统检查, 密切观察病情变化, 临床上遇有腰背痛的原因不明确时, 无论是否合并高血压、高血脂的老年患者, 不论有无头痛、脑膜刺激征, 均应想到此病的可能性, 及早腰穿, 有条件者行头颅 CT 协助确诊。

本组患者临床表现不典型原因可能是: (1) 由于老年人高血压动脉硬化的存在, 侧枝循环差, 脑供血相对减少, 神经细胞功能减退, 疼痛阈值增高, 对神经刺激不敏感, 故头痛不明显。 (2) 老年人存在不同程度的脑萎缩, 致颅内腔隙增大, 可缓冲因脑水肿而继发的颅内高压, 故临床症状不明显。 (3) 由于老年人在高血压动脉硬化基础上梭形细胞瘤破裂, 出血速度缓慢, 出血量少, 故脑膜刺激征出现较晚或不出现。

(收稿日期: 2007-06-20)