

## 卡介菌多糖核酸体外抗病毒活性试验

乔飞鸿 吕英军 张晓裕 王晓斌 鲍恩东\*

(南京农业大学 动物医学院,南京 210095)

**摘要** 为探讨卡介菌多糖核酸(BCG-PSN)的抗病毒效果,对离体培养的鸡胚成纤维(CEF)细胞进行水疱口炎病毒(VSV)感染,用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测 BCG-PSN 对 CEF 细胞活性的影响;用细胞病变法(CPE)检测 BCG-PSN 对 VSV 的抑制作用,并在安全浓度范围内筛选 BCG-PSN 抑制 VSV 的最佳作用时间和作用剂量。试验结果表明:BCG-PSN 能显著抑制 VSV 在 CEF 细胞上的生长,但抑制作用并非随着其剂量的增加和作用时间的延长而增强,质量浓度为 144.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 BCG-PSN 在 CEF 细胞上作用 24 h 后,产生的抗病毒活性最强;当 BCG-PSN 质量浓度大于 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时则对 CEF 细胞具有明显的毒性作用。BCG-PSN 可诱导 CEF 细胞产生 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ , 研究结果显示,BCG-PSN 的抗病毒作用与其诱导的干扰素有关。

**关键词** 卡介菌多糖核酸; 鸡胚成纤维细胞; 水疱口炎病毒; 抗病毒

中图分类号 S 859.7

文章编号 1007-4333(2011)03-0133-07

文献标志码 A

## Study on anti-virus activity induced by BCG-PSN in chick embryo fibroblast cells *in vitro*

QIAO Fei-hong, LU Ying-jun, ZHANG Xiao-yu, WANG Xiao-bin, BAO En-dong\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** To investigate the anti-viral activity of Bacillus Calmette Guerin (BCG-PSN), vesicular stomatitis virus (VSV), MTT method and CPE method were used to observe the cell viability and to detect the protection of CEF cells from VSV infection *in vitro*. The optimal incubation time and concentration were also determined according to MTT method. The result showed that BCG-PSN had toxicity to CEF cells after treated with more than 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BCG-PSN. BCG-PSN can inhibit VSV growth in CEF cells, however, the anti-viral activity was not changed with concentration induction of BCG-PSN and incubation time. The anti-VSV activity was maximal for 144.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of BCG-PSN treatment at 24 h. The result also showed that the anti-viral activities induced by BCG-PSN in CEF cells were related to the levels of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ .

**Key words** BCG-PSN; CEF; VSV; anti-virus activity

卡介菌多糖核酸(polysaccharide nucleic acid of *Bacillus Calmette Guerin*, BCG-PSN) 又称卡介苗素,是卡介苗经热酚法提取多糖和核酸,配以灭菌生理盐水制成的具有免疫调节作用的生物活性物质<sup>[1]</sup>。BCG-PSN 的主要成分为多糖和核酸,另外含有极少量的蛋白;多糖相对分子质量大,具有一定的免疫原性,经分离纯化后,得到均一组分,其单糖组

成仅为 D-葡萄糖<sup>[2]</sup>。BCG-PSN 中哪种组分起主要作用至今尚不明确。王慧等<sup>[3]</sup>自 20 世纪 70 年代进行了卡介苗有效成分的研究,并形成了 BCG-PSN 的现行生产工艺,在保留了卡介苗免疫作用的同时,降低了使已感染结核菌的致敏机体产生 IV 型变态反应等不良反应<sup>[4]</sup>。

BCG-PSN 可刺激单核-巨噬细胞增生,增强巨

收稿日期: 2010-07-22

基金项目: 国家“863”计划项目资助(2008AA10Z328); 教育部博士点基金项目(博导类)(20100097110007)

第一作者: 乔飞鸿, 硕士研究生, E-mail: qiaofeihong@qq.com

通讯作者: 鲍恩东, 教授, 博士生导师, 主要从事动物免疫病理及分子病理研究, E-mail: b\_endong@njau.edu.cn

噬细胞的吞噬与消化活力,并激活 T 细胞,使之释放多种活性因子<sup>[5]</sup>;它还可增强机体内自然杀伤细胞(NK 细胞)活力、白细胞介素-2 和白细胞介素-2 受体表达,诱导干扰素形成<sup>[6-7]</sup>;亦可持续刺激机体产生大量的 IgG 抗体<sup>[8]</sup>。因此,BCG-PSN 具有提高机体的细胞和体液免疫功能,从而增强机体抗感染、抗过敏、抗肿瘤细胞生长等抗病能力。目前 BCG-PSN 在人类医学临床中应用于预防和治疗哮喘、慢性支气管炎、结核、过敏性鼻炎、皮肤过敏性疾病、白癫风和肿瘤等多种疾病<sup>[8-14]</sup>。然而,由于国内外尚未有可供兽用的 BCG-PSN,BCG-PSN 在畜牧养殖业中应用的相关报道甚少。为此,本试验拟通过 BCG-PSN 对感染水疱口炎病毒(VSV)鸡胚成纤维细胞的病毒抑制作用,旨在探讨 BCG-PSN 对 VSV 的体外抗病毒效果,为兽医临床应用提供理论和试验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

BCG-PSN 由南京农业大学动物医学院病理实验室自行提取和保存(硫酸-苯酚法测定其中多糖的质量分数为 75.8%;紫外分光光度法测定其所含核酸的质量分数为 18.22%);RPMI Medium 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品;胰蛋白酶为美国 Invitrogen 公司产品;10 日龄 SPF 种蛋购自乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂;优级新生牛血清购自中美合资兰州民海生物工程有限公司;鸡胚成纤维细胞(CEF)的制备:用细胞生长液调整 CEF 细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/mL,加入细胞瓶中,置 37 ℃、5%(体积分数)CO<sub>2</sub> 培养箱培养,24 h 左右长成单层后备用;TRNzol Plus 总 RNA 提取试剂为南京铂优生物技术有限公司产品;cDNA 第一链合成酶试剂为天根生化科技(北京)有限公司产品;SYBER Green Realtime PCR Master Mix 为东洋纺(上海)生物科技有限公司产品;IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  检测 ELISA 试剂盒购自上海西诺生物科技有限公司;CO<sub>2</sub> 培养箱为美国 Thermo 公司产品;酶标仪(Synergy 2)为美国 Bio Tek 公司产品;Real Time PCR 扩增仪(Mx3000P)为美国 Stratagene 公司产品。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 MTT 法测定 BCG-PSN 对 CEF 活性的影响

取生长良好的单层 CEF 细胞 1 瓶,用体积分数为 0.025%的胰酶溶液消化后加入细胞生长液,接

种于 96 孔细胞培养板,100  $\mu$ L/孔,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞长满单层后,弃去培养液,用 Hank's 液洗涤 2 次。将 BCG-PSN 用含 2% 体积分数小牛血清的 RPMI Medium 1640 稀释成 100、200、400、625、800、1 000、1 250、1 600、2 500 和 3 200  $\mu$ g/mL 共 10 个质量浓度梯度,然后将 10 个梯度的药物分别加入已长成单层的细胞板中,每孔 100  $\mu$ L,每个质量浓度重复 4 孔,并设正常细胞对照。置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 ℃ 培养 48 h 后,每孔加入 20  $\mu$ L 以维持液配制的 MTT(5 mg/mL)。继续培养 4 h 后中止。弃孔内液体,每孔中分别加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷(DMSO),轻轻震荡 10~15 min,使甲瓖充分溶解。用酶标仪测定其在 570 nm 波长处的吸收值(OD<sub>570 nm</sub>);以下列公式计算细胞活性:

$$\text{细胞活性}/\% = \frac{\text{测定孔的平均吸收值}}{\text{正常对照孔平均吸收值}} \times 100$$

#### 1.2.2 VSV 半数细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)的测定

取长满单层的 CEF 细胞 1 瓶,消化后加入含 10%(体积分数)小牛血清的 RPMI Medium 1640 培养液,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100  $\mu$ L,37 ℃ 培养。待铺满单层后,弃去培养液,用 Hank's 液洗涤 2 次。将病毒液用含 2% 小牛血清的 RPMI Medium 1640 作连续 10 倍的稀释,从  $10^{-1}$  ~  $10^{-11}$  共 11 个体积稀释梯度,分别加入细胞板中,每孔 200  $\mu$ L,每个稀释度重复 4 孔,并设正常细胞对照。CO<sub>2</sub> 培养箱内 37 ℃ 培养 7 d,观察细胞病变(CPE),按照 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。

$$\lg \text{TCID}_{50} = \lg(\text{高于 } 50\% \text{ 病变率的稀释度}) + (\text{距离比} \times \lg \text{稀释系数})$$

$$\text{距离比} = \frac{\text{高于 } 50\% \text{ 的病变率} - 0.5}{\text{高于 } 50\% \text{ 的病变率} - \text{低于 } 50\% \text{ 病变率}}$$

#### 1.2.3 微量细胞病变抑制法测定 BCG-PSN 对 VSV 的抑制作用

将细胞悬液 100  $\mu$ L 加入 96 孔细胞板,待细胞铺满单层后,弃培养液,分别加入用维持液配制成 100、200 和 400  $\mu$ g/mL 的 BCG-PSN 溶液,每孔 100  $\mu$ L,每组设 4 个重复。培养 24 h 后弃去药物溶液,加入 100 倍半数细胞感染量(100 TCID<sub>50</sub>)的 VSV,同时设不加药物也不加病毒的阴性对照组、不加药物只加病毒的阳性对照组以及 I 型干扰素对照组。继续培养,倒置显微镜下观察细胞病变。

### 1.2.4 BCG-PSN 抑制 VSV 在 CEF 细胞上生长的最佳作用剂量的测定

将生长良好的单层 CEF 细胞消化成细胞悬液,按每孔 100  $\mu\text{L}$  置于 96 孔细胞培养板中,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h,长满单层后弃去上清液。分别加入用维持液配制的梯度为 18.0、36.0、72.0、144.0、287.5、575.0 和 712.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 BCG-PSN 溶液。每孔各加 100  $\mu\text{L}$ ,每个质量浓度重复 4 孔。培养 24 h 后,弃去含有药物的维持液。用 100  $\text{TCID}_{50}$  的 VSV 感染 CEF 细胞,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养。另设阴性对照组(正常细胞对照组)、阳性对照组(病毒对照组)。每天在倒置显微镜下检查及记录细胞病变,直到阳性对照孔有 75% 以上的细胞发生病变时终止试验。每孔加入 MTT(5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) 20  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h 后小心弃去孔内液体,加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,震荡 10~15 min,使甲瓖充分溶解,在酶标仪上测定吸收值( $\text{OD}_{570\text{nm}}$ )。

### 1.2.5 BCG-PSN 抑制 VSV 在 CEF 细胞上生长最佳作用时间的测定

在 96 孔细胞培养板中加入 CEF 细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ,待长满单层 CEF 细胞后,弃孔内液体。用细胞维持液配制 BCG-PSN 的最佳作用剂量,加入到细胞培养板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。设置 4 个药物组,分别作用 12、24、36 和 48 h,每个时间点重复 5 个孔。孵育相应时间后弃去孔中液体,加入 100  $\text{TCID}_{50}$  的 VSV,同时设置阴性对照组(不加药物不加病毒)及阳性对照组(不加药物只加病毒),于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。每天观察并记录细胞病变,当阳性对照孔中 75% 以上的细胞发生病变时,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT(5  $\text{mg}/\text{mL}$ ),培养 4 h,小心弃去上清,加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,在酶标仪上测定吸收值( $\text{OD}_{570\text{nm}}$ )。

### 1.2.6 ELISA 测定细胞上清液中 IFN- $\alpha$ 和 IFN- $\beta$ 的含量

选取 36.0、72.0、144.0、287.5 和 575.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5 个质量浓度梯度的 BCG-PSN 作用于 CEF 细胞,孵育 24 h 后分别收集药物组和空白对照组细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书的要求进行检测。

### 1.2.7 荧光定量 PCR 检测 IFN- $\alpha$ mRNA 和 IFN- $\beta$ mRNA 的表达量

1) 引物设计。根据 NCBI 上登录的鸡 IFN- $\alpha$  基因序列(GenBank accession number: X92476)、IFN-

$\beta$  的基因序列(GenBank accession number: AY974089)和内参 GAPDH 的基因序列(GenBank accession number: K01458),采用 Primer 5.0 软件设计引物,由上海英骏生物技术有限公司合成。引物及扩增片段如下:

IFN- $\alpha$  上游引物 5'-GTCTTGCTCCTTCAA-CGACA-3',下游引物 5'-GCGCTGTAATCGTT-GTCTTG-3',扩增片段为 303 bp;

IFN- $\beta$  上游引物 5'-TCCAGGTCCTTCAGAA-TACG-3',下游引物 5'-TGCGGTCAATCCA-GTGTT-3',扩增片段为 192 bp;

GAPDH 上游引物 5'-TGAAAGTCGGAGTC-AACGGAT-3',下游引物 5'-ACGCTCCTGG-AAGATAGTGAT-3',扩增片段为 230 bp。

2) TRIZOL 试剂法提取细胞总 RNA 以及 cDNA 的合成。将不同质量浓度 BCG-PSN(36.0、72.0、144.0、287.5 和 575.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用于 CEF 细胞,24 h 后分别收集药物组和空白对照组细胞,一步法提取细胞总 RNA,并测定其浓度。cDNA 合成参照 cDNA 第一链合成酶试剂盒说明书操作。

3) 荧光定量 PCR。按照 SYBR GREEN 说明书建立反应体系,cDNA 2  $\mu\text{L}$ ,引物 1  $\mu\text{L}$ ,SYBR Premix 12.5  $\mu\text{L}$ ,补足 DEPC 水至总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s,62  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 45 个循环。

## 1.3 数据处理

用统计分析软件 SPSS 18.0 进行 LSD 方差分析和差异显著性检验,数据均以  $\bar{x} \pm \text{SD}$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 BCG-PSN 对 CEF 细胞活性的影响

MTT 法测定 BCG-PSN 对 CEF 细胞活性影响的结果如图 1 所示。从图中可以看出,BCG-PSN 对 CEF 细胞生长具有一定的毒性作用。随着 BCG-PSN 质量浓度的增加,反应细胞活性的  $\text{OD}_{570\text{nm}}$  值逐渐减小。当 BCG-PSN 质量浓度在 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,其  $\text{OD}_{570\text{nm}}$  值显著小于细胞对照组( $P < 0.05$ ),当质量浓度达到 3 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,结果与对照组相比差异极其显著( $P < 0.01$ )。在 800~2 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,随着 BCG-PSN 质量浓度增加,其对 CEF 细胞生长的抑制作用没有明显变化( $P > 0.05$ )。

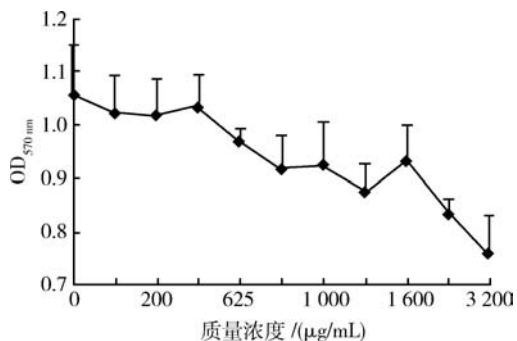


图1 不同质量浓度 BCG-PSN 对 CEF 细胞生长的影响

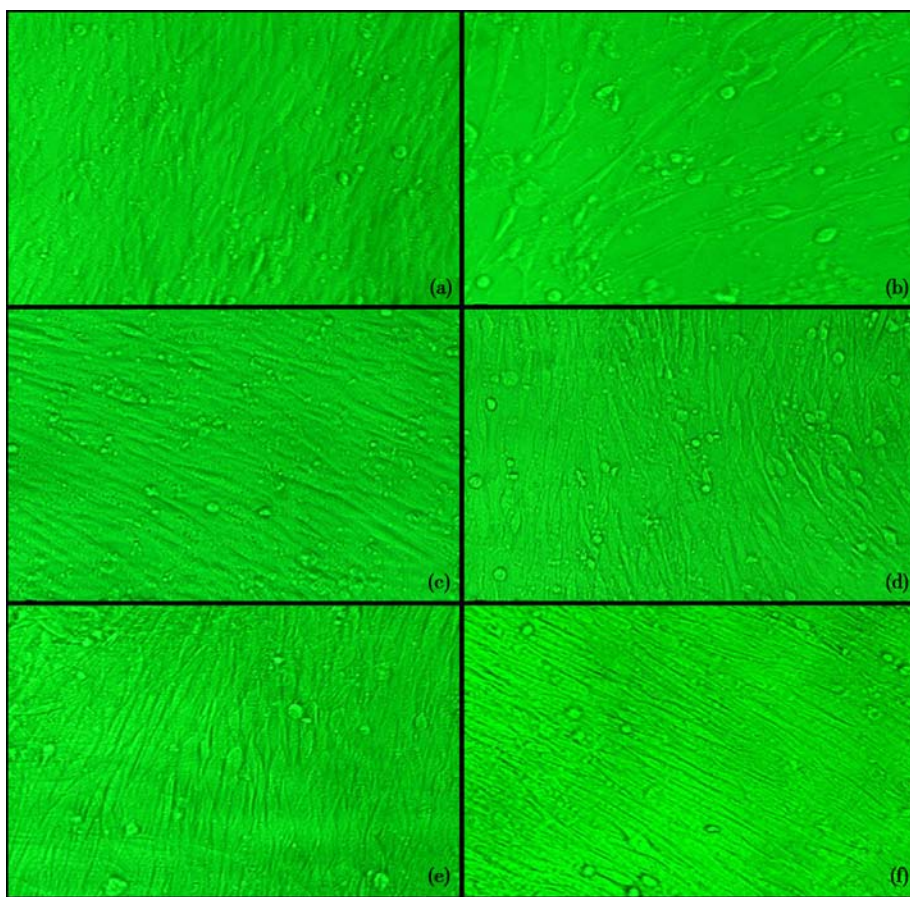
Fig. 1 Growth of CEF cells treated with different concentration of BCG-PSN

## 2.2 VSV 半数感染量的检测结果

接种 VSV 7 d 后观察细胞病变, CEF 的半数感染量(TCID<sub>50</sub>)为  $10^{-7.5}$  (0.1 mL)。试验将 BCG-PSN 抵抗 VSV 感染的接种病毒量定为 100 TCID<sub>50</sub>, 即  $10^{-5.5}$  (0.1 mL)。

## 2.3 BCG-PSN 抑制 VSV 在 CEF 细胞上生长的效果

从图 2 可以看出, 只加病毒的阳性对照组明显可见细胞生长密度变稀, 细胞形态由梭形逐渐变得细长, 有些细胞已经发生脱落、死亡。而 100.0、200.0 和 400.0 μg/mL BCG-PSN 和干扰素对照组则能明显抑制 VSV 在 CEF 细胞上的生长, 表明 BCG-PSN 具有明显的抗病毒效果。



(a) 阴性对照; (b) 阳性对照; (c) I 型干扰素对照; (d) 100 μg/mL BCG-PSN;  
(e) 200 μg/mL BCG-PSN; (f) 400 μg/mL BCG-PSN。

图2 不同质量浓度 BCG-PSN 抑制 VSV 在 CEF 细胞上的生长效果(×200)

Fig. 2 Photomicrographs of CEF cells protected by different concentration of BCG-PSN from VSV infection(×200)

## 2.4 BCG-PSN 最佳作用剂量筛选

将不同质量浓度的 BCG-PSN 作用于 CEF 细胞, 孵育一段时间后感染 VSV, 通过 MTT 法测定

OD<sub>570 nm</sub> 值。发现 18 μg/mL BCG-PSN 能明显抑制 VSV 在 CEF 细胞上繁殖, OD<sub>570 nm</sub> 值明显高于阳性对照组( $P < 0.05$ )。而且在一定剂量范围内, 随着

BCG-PSN 药物剂量的增加, 抗病毒能力也逐渐增强, 当 BCG-PSN 用量达到 144.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时其抗病毒能力达到最高。以后随着 BCG-PSN 剂量的增加, 其抗病毒能力没有明显变化 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

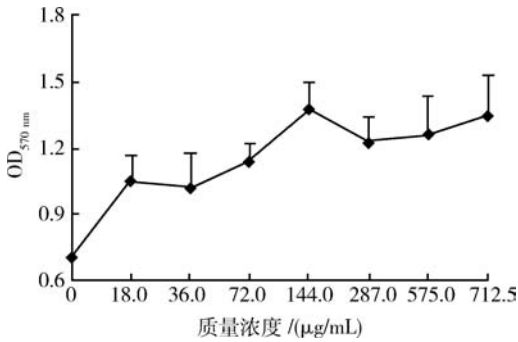
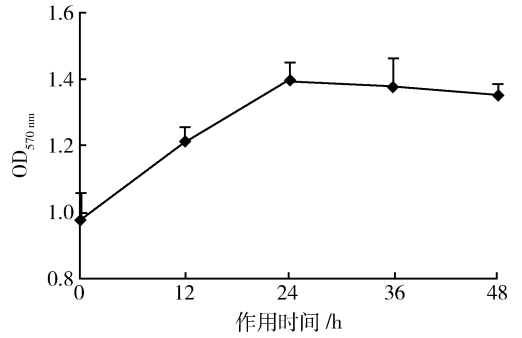


图 3 不同质量浓度 BCG-PSN 对 VSV 的抑制作用

Fig. 3 Dose effect of BCG-PSN in inducing anti-VSV activity

### 2.5 BCG-PSN 的最佳作用时间的筛选

基于最佳作用药物质量浓度的结果, 将作用剂量为 144.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 BCG-PSN 分别作用于 CEF 细胞 12、24、36 和 48 h 后, 感染 100 TCID<sub>50</sub> VSV, 作用 24 h 后, MTT 法测定 OD<sub>570 nm</sub>。试验结果显示, 随着作用时间的延长, BCG-PSN 的抗病毒能力逐渐增强 (图 4), 且明显高于阳性对照组 ( $P < 0.05$ )。然而待药物作用 24 h 达到高峰后, 再延长药物作用时间, BCG-PSN 的抗病毒能力不再有明显变化 ( $P > 0.05$ )。



BCG-PSN 质量浓度为 144.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 4 BCG-PSN 作用于 CEF 不同时间的抗病毒效果

Fig. 4 CEF cells were cultured with BCG-PSN for different time for assaying of their anti-VSV activity

### 2.6 BCG-PSN 诱导 CEF 细胞产生 IFN- $\alpha$ 和 IFN- $\beta$

试验结果显示, 不同质量浓度的 BCG-PSN 作用于 CEF 细胞 24 h 后, 36.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BCG-PSN 能明显诱导 CEF 细胞产生 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ , 含量分别为 9.42 和 8.27 ng/L, 显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。随着药物质量浓度的逐渐升高, BCG-PSN 诱导 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  的能力也逐渐增强 (图 5)。不过, 当药物达到 144.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 上清液中 IFN- $\alpha$  的含量达到最大值 (10.54 ng/L), 但此时 IFN- $\beta$  含量升高不明显; 而当药物达到 287.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 上清液中 IFN- $\alpha$  的含量呈现下降趋势, 但此时 IFN- $\beta$  含量达到最大值 (10.11 ng/L)。

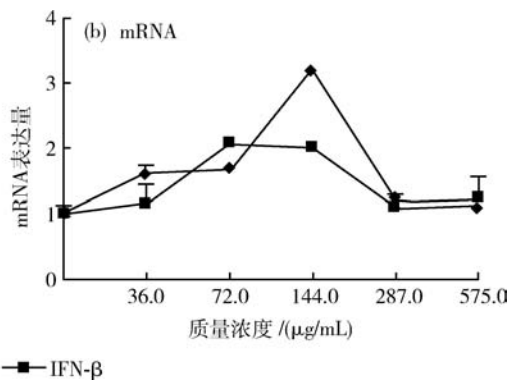
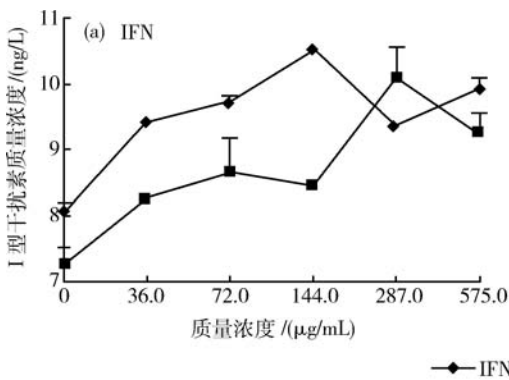


图 5 不同质量浓度 BCG-PSN 诱导 CEF 细胞 IFN(a) 和 mRNA(b) 表达量的变化

Fig. 5 Level of IFN (a) and their corresponding mRNA (b) induced by different dosage of BCG-PSN

### 2.7 实时荧光定量 PCR 测定 CEF 中 I 型 IFN mRNA 表达

将各组样品混合并 5 倍比稀释上样。以样品

质量浓度为横坐标, CT 值为纵坐标, 制作 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  和 GAPDH 标准曲线。GAPDH mRNA 曲线为  $Y = -3.140 \lg(x) + 13.955, r^2 = 0.999$ , 扩增

效率为 108.2%; IFN- $\alpha$  mRNA 曲线为  $Y = -3.157 \lg(x) + 21.210$ ,  $r^2 = 0.998$ , 扩增效率为 107.4%; IFN- $\beta$  mRNA 曲线为  $Y = -3.156 \lg(x) + 25.303$ ,  $r^2 = 0.996$ , 扩增效率为 107.4%。3 个基因有相似的扩增效率, 可用比较阈值法 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )<sup>[15]</sup> 进行结果分析计算。

结果显示, 不同浓度 BCG-PSN 作用于 CEF 细胞 24 h 后, 随着药物质量浓度的升高, IFN- $\alpha$  mRNA 的表达量逐渐增加(图 5), 36.0、72.0 和 144.0  $\mu\text{g/mL}$  BCG-PSN 组与空白对照相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 且当药物质量浓度达到 144.0  $\mu\text{g/mL}$  时, IFN- $\alpha$  mRNA 的表达量达到最大。以后随着 BCG-PSN 质量浓度的增加, IFN- $\alpha$  mRNA 表达量变化变得不显著。IFN- $\beta$  mRNA 表达量在 BCG-PSN 为 72.0  $\mu\text{g/mL}$  时显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而药物质量浓度达到 287.5  $\mu\text{g/mL}$  时呈现下降趋势, 与空白对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

BCG-PSN 作为具有免疫调节作用的生物活性物质, 主要通过调节机体内细胞免疫<sup>[16]</sup>、体液免疫、刺激网状内皮系统以激活单核-巨噬细胞功能、增强 NK 细胞功能等来增强机体的抗病能力<sup>[5-6]</sup>。而 MTT 法是一种广泛应用于抗病毒药物筛选和评价的方法, 其原理是 MTT 被代谢旺盛的活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原为难溶性的蓝紫甲瓞结晶, 而死细胞无此功能, 因此甲瓞被溶解后所测的 OD 值可直接反映活细胞的数量, 从而间接反映药物抗病毒效果<sup>[17]</sup>。

1) 本试验结果显示, BCG-PSN 具有抑制 VSV 在 CEF 细胞上生长的作用, 而且当 BCG-PSN 的质量浓度在 18.0 ~ 144.0  $\mu\text{g/mL}$  范围内以及其作用 12~24 h 时, BCG-PSN 抵抗 VSV 的能力随着剂量的增加和作用时间的延长而增强。但 BCG-PSN 的剂量和作用时间如果超出这个范围, 其抗病毒能力不仅不再增强, 甚至会下降。表明 BCG-PSN 的剂量和作用时间对抵抗 VSV 的能力强弱有较大影响。因此, 在临床使用时应特别注意合理用药, 优化给药方案。

2) 从本试验结果还可以看出, 随着药物质量浓度的逐渐增加, 由 BCG-PSN 诱导产生的 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  的含量也逐渐升高, 表明 BCG-PSN 所显示的抗病毒作用可能与其诱导细胞产生的 I 型 IFN

有关。I 型 IFN 能够促使周围细胞产生抗病毒蛋白, 如 PKR、OAS、RNase L 和 Mx 蛋白来发挥抗病毒作用<sup>[18]</sup>。本试验结果显示, 当药物 BCG-PSN 的质量浓度为 144.0  $\mu\text{g/mL}$  时 IFN- $\alpha$  的含量达到最大值, 虽然此时 IFN- $\beta$  的升高变化并不明显, 但当药物 BCG-PSN 的质量浓度升高到 287.5  $\mu\text{g/mL}$  时, IFN- $\beta$  的含量也渐趋达到最大值。提示 BCG-PSN 的抗病毒作用可能是在 IFN- $\alpha$  与 IFN- $\beta$  的共同作用下所产生的, 但 BCG-PSN 诱导产生 IFN- $\alpha$  与 IFN- $\beta$  含量的升高似乎并不同步, 其详细机理尚待进一步研究。另外, 本试验测得随着药物质量浓度的增加, IFN- $\alpha$  mRNA 表达量的变化趋势与 IFN- $\alpha$  水平变化基本一致, 然而 IFN- $\beta$  水平的改变与其相应 mRNA 表达水平的变化趋势则出现相反的趋势, 提示 IFN- $\alpha$  mRNA 和 IFN- $\beta$  mRNA 转录量增加后在翻译成相应蛋白质的过程中可能存在其他因子的调控或干扰作用, 但其确切原因还有待进一步研究予以证实。

3) 从本试验结果不难看出, 虽然 BCG-PSN 具有明显的抗病毒活性, 即当 144.0  $\mu\text{g/mL}$  的 BCG-PSN 作用于 CEF 细胞 24 h 后显示出抗 VSV 的能力最强, 但同时 BCG-PSN 也表现出一定的细胞毒性反应。BCG-PSN 在超过 800.0  $\mu\text{g/mL}$  时其 OD<sub>570 nm</sub> 值显著小于细胞对照组, 说明在作用剂量超过一定限度 (800.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 时, BCG-PSN 反而会抑制 CEF 的正常生长, 显示出其细胞毒性作用。这一结果显示在将来的兽医临床使用过程中应该注意 BCG-PSN 使用剂量和使用的频度, 以便发挥其最佳的抗病毒效果以降低其对生物机体所致的毒性作用。

临床研究资料显示, II 型 IFN 在体内具有抗病毒、抗肿瘤、激活巨噬细胞使其杀伤肿瘤细胞及杀灭胞内寄生虫、增强 NK 细胞活性、诱导 B 细胞分泌免疫球蛋白并促进 B 细胞成熟和增殖等一系列的生物学效应<sup>[19-20]</sup>。研究证实 BCG-PSN 可明显提高特异性皮炎患者、哮喘患者外周血淋巴细胞内 IFN- $\gamma$  的表达<sup>[21-22]</sup>, 而 BCG-PSN 在体外具有诱导鼠脾淋巴细胞产生 IFN- $\gamma$  的作用<sup>[23]</sup>。由此推测, 本试验中 BCG-PSN 显示出的抑制 VSV 在 CEF 细胞上生长的作用除了与诱导产生的 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  有关外, 还可能与其诱导产生 IFN- $\gamma$  有关, 但确切的机理仍然有待研究证实。

## 参 考 文 献

- [1] 晏子厚,曹慧,何菊,等.卡介菌多糖核酸的试制[J].中国生物制品学杂志,1999,12(4):208-209,224
- [2] 刘煜,盛海林,吴梧桐.卡介苗素抗哮喘有效成分的分离及其药理作用研究[J].药物生物技术,1999,6(4):222-226
- [3] 王慧,钟光明,梁英锐.卡介菌多糖核酸及其对感冒的防治作用[J].中华结核和呼吸杂志,1989,12(1):20-23
- [4] Clavel G, Grados F, Lefaiveau P, et al. Osteoarticular side effects of BCG therapy[J]. Joint Bone, 2006, 73: 24-28
- [5] 江文,刘冬先,陈映玲,等.卡介菌多糖核酸对尖锐湿疣患者外周血 T 细胞受体表达的影响[J].医药导报,2004,23(12):906-908
- [6] 袁孔华,郭实士,王惠.卡介苗多糖核酸对膀胱癌患者细胞免疫功能的影响[J].中华实验外科杂志,1993,10(3):126-127
- [7] Miao Jinfeng, Zhang Yuanshu, Huang Guoqing, et al. Polysaccharide nucleic acid of bacillus calmette guerin modulates Th1/Th2 cytokine gene expression in lipopolysaccharide-induced mastitis in rats [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 8(8): 1010-1018
- [8] 林恩尧.卡介苗提取物调节慢性支气管炎免疫功能效果的观察[J].中华结核和呼吸杂志,1987,10(1):41-42
- [9] 伍伟玲,程涛,罗显荣.卡介菌多糖核酸对哮喘的治疗作用[J].中国急救医学,2003,23(10):688-690
- [10] 丁卫民.卡介菌多糖核酸对耐多药肺结核患者临床疗效及 T 淋巴细胞亚群的影响[J].中国药物与临床,2005,5(5):383-384
- [11] 唐嗣泉,赵冰玲,张国元,等.卡介菌多糖核酸对变应性鼻炎的免疫调节及临床疗效观察[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(8):345-347
- [12] 周秀莲.卡介菌多糖核酸注射液治疗慢性荨麻疹疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2009,18(24):2907-2909
- [13] 佟春光,张秀英,何焱玲,等.卡介菌多糖核酸对白癫风免疫调节作用及疗效的研究[J].中国皮肤性病学杂志,2005,19(11):669-671
- [14] 孙世平,张玉峰,岳晓龙,等.家兔膀胱黏膜下注射卡介菌多糖核酸的免疫效应[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(5):481-486
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression date using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [16] Shen Huahao, Zhang Gensheng, Wang Pingli. Mycobacterium bovis-bacillus calmette-guerin and asthma [J]. Chin Med J, 2005, 118(11): 942-947
- [17] 赵嘉惠,张华屏,王春芳. MTT 法在检测细胞增殖方面的探讨[J].山西医科大学学报,2007,38(3):262-263
- [18] Samuel C E. Antiviral actions of interons [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778-809
- [19] Smith D M, Mayhew E, Reszka R, et al. Antiviral and antiproliferative properties of liposome-associated human interferon- $\gamma$  [J]. J Interferon Res, 1990, 10(2): 153-160
- [20] Leyv D E, Garcia-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12(2-3): 143-156
- [21] 张丽,齐瑞群,孙艳,等.卡介菌多糖核酸对特异性皮炎外周血 CLA+T 细胞表达不同细胞因子的影响[J].中国医科大学学报,2009,38(10):764-766
- [22] 伍伟玲,杨三春,徐华,等.卡介菌多糖核酸对哮喘患者外周血 CD4+T 细胞内 IFN- $\gamma$  和 IL-4 表达的影响[J].华南国防医学杂志,2009,23(2):9-11
- [23] 赵伟强,王慧,谭礼智.卡介菌多糖核酸对干扰素的诱生和促诱生活性[J].湖南医科大学学报,1990,15(1):34-37

(责任编辑:苏燕)