

牛乳铁蛋白对感染轮状病毒树鼯的治疗试验

朱婉萍, 孔繁智(浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要: 目的 观察牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, bLF)对感染轮状病毒树鼯的治疗作用。方法 建立感染轮状病毒动物模型后,用不同剂量 bLF 的对腹泻树鼯进行治疗,各给药组和对照组经过连续给药 10 d 后用电镜法观察粪便中的轮状病毒,并计算轮状病毒的抗原检出率及抗原滴度及动物死亡率、平均死亡日、延长生命率。结果 bLF 高、中、低剂量组的死亡率分别为 10%, 20%, 60%; 平均死亡日分别为 9.3, 8.9, 7.0 d; 延长生命率分别为 93.7%, 85.4%, 45.8%。与模型对照组死亡率 70%、平均死亡日 4.8 d 均有显著差异。治疗后,抗原滴度下降。结论 乳铁蛋白能有效的降低感染轮状病毒动物的死亡率,提高感染轮状病毒动物的延长生命率。同时能降低轮状病毒抗原滴度。

关键词: 牛乳铁蛋白; 轮状病毒; 树鼯

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0397-04

基金项目: 浙江省科技厅资助项目(2004F12023)

作者简介: 朱婉萍, 女, 硕士, 副研究员

Tel: (0571)88849087

E-mail: zhwanp@163.com

Therapeutic Experiment of Bovine Lactoferrin on Rotavirus-infected Tree Shrew

ZHU Wanping, KONG Fanzhi(Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of bovine lactoferrin(bLF) on the treatment of rotavirus-infected tree shrew. **METHODS** After establishment of animal model of tree shrew with rotavirus-infected, the animal model was treated with distinct doses of bLF. **RESULTS** The death rates of rotavirus-infected tree shrew in bLF treatment group with high, middle and low doses were 10%, 20% and 60%.The mean days of death were 9.3, 8.9, 7.0 d. The rate of the prolonged survival time were 93.7%, 85.4%, 45.8%. Compared with infection-control group with no bLF treatment, the death rates and the mean days of death were reduced remarkably. **CONCLUSION** bLF can reduce the mortality rate of rotavirus infections of animals effectively and improve the life-prolonging rate, which can also reduce the rotavirus antigen titer. **KEY WORDS:** bovine lactoferrin; rotavirus-infected tree shrew; treatment

轮状病毒(rotavirus, RV)是导致全球儿童急性重症腹泻的重要病原体,是秋冬季引起小儿死亡的主要原因之一,由其引起的腹泻至今无有效的防治措施。乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是从乳清蛋白中分离得到的一种与铁结合的糖蛋白,具有独特的生物活性,能夺走细菌生长所需的铁质而抑制细菌的生长,可破坏细菌细胞膜而具杀死细菌的效果,且可提升免疫力,抑制病毒所引起的感染。对大量能够感染人和动物的 DNA 和 RNA 病毒具有抗性,有研究表明 LF 对腺病毒和肠道病毒等非包膜病毒均具有抗性^[1]。Saperti 等^[2]曾以 HT-29 细胞为靶细胞,发现 LF 能够抑制 RV 的复制,抑制病毒与敏感细胞结合。但至今尚无 LF 抗轮状病毒感染的整体动物实验研究报道。笔者从牛乳中提取分离得到了牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, bLF),为了解 bLF 对轮状病毒感染的腹泻的整体治疗作用,建立了树鼩感染轮状病毒的模型,用不同剂量 bLF 的对腹泻树鼩进行治疗,用电镜法观察粪便中的轮状病毒,同时计算轮状病毒的抗原检出率及抗原滴度及动物死亡率、平均死亡日、延长生命率。

1 材料

1.1 试验动物

成年树鼩(健康无腹泻),♀♂各半,由昆明医学院动物中心提供,合格证号:SYXK(滇)2005-0021。

1.2 试剂

bLF 由浙江省中医药研究院提供,轮状病毒(RV-Ag)ELISA 试剂盒由上海贝西生物有限公司生产。

1.3 人轮状病毒粪液

昆明市儿童医院收集,经(RV-Ag)检测为轮状

病毒强阳性。

1.4 轮状病毒的处理

收集多例经(RV-Ag)检测为轮状病毒阳性的儿童粪便 600 g,用 PBS 液 1:1 稀释,经 3 000 r·min⁻¹, 30 min 离心收集上清 400 mL 加青霉素 80 万单位,链霉素 800 mg 搅拌均匀置 4℃冰箱。24 h 内送电镜检查,调整病毒含量至 10⁶ mL⁻¹,同时镜检无其它细菌。待用。

1.5 树鼩自制饲料的配方

米粉 20%(200 g)、玉米粉 20%(200 g)、麦夫 10%(100 g)、黄豆粉 10%(100 g)、小牛肉 20%(200 g)、鸡蛋 10%(100 g)、全脂奶粉 0.5%(50 g)、白糖 0.3%(30 g)、食盐 0.05%(5 g)、鱼肝油 0.05%(5 g)、生长素 1 片、复合 VB6 片、VC 600 mg、VE 600 mg、蔬菜少许(白菜 2 片)、水果、凉开水。

2 方法

2.1 轮状病毒动物模型的建立

用轮状病毒抗原(RV-Ag)对 90 只健康树鼩进行抗原检测,在呈阴性的动物中随机抽取♀♂各半的 10 只作为正常对照组待用。另再随机抽取 9 只取粪样作电镜检查轮状病毒。电镜检查结果皆无轮状病毒颗粒(见电镜照片)。用含量 10⁶ 个·mL⁻¹ 的人轮状病毒粪悬液对上述树鼩灌胃,每只 2 mL,当日上午各灌胃 1 次。动物给病毒经 72 h 后,普遍拉稀、精神萎靡、饲料剩余。用轮状病毒抗原(RV-Ag)检测,对呈强阳性(在显色读数时,即刻显深蓝)的树鼩随机分组,分别为高剂量组、中剂量组、低剂量组、模型对照组、阳性对照组、正常对照组,对各组动物取粪样进行抗原检测及抗原滴度测定,检测及测定结果均表明除正常对照组外,其余各组均呈强阳性。同时对造模成型的高、中、低剂量组,模型对照组,阳性对照组分

别随机抽取 1 只动物粪样进行电镜检查轮状病毒颗粒, 检查结果为 5 只动物有可见光滑实心的轮状病毒颗粒。结果见图 1。

2.2 bLF 对感染轮状病毒树鼯的治疗

高、中、低剂量组分别按动物体质量灌胃 5, 1, 0.2 mg·g⁻¹ bLF, 阳性对照组按动物体质量给予 0.75 mg·g⁻¹ 病毒唑, 模型对照组和正常对照组给予生理盐水。以上各组每天给药 1 次, 每次每只动物 2 mL。连续给药 10 d。同时给予充分相同的自制饲料和一般饮用水(自来水煮开冷却)。饲养室的室内温度和相对湿度分别控制在 18~22 ℃, 50%~60%。用电镜法观察粪便中的轮状病毒, 同时计算轮状病毒的抗原检出率及抗原滴度及动物死亡率、平均死亡日、延长生命率。死亡率=死亡动物数/总动物数×100%; 平均死亡日=动物存活天数之和/总动物数×100%(不死亡的动物存活天数以 10 d 计算); 延长生命率=(各组平均死亡日-模型平均死亡日)/模型组平均死亡日×100%。

3 结果

各给药组和对照组经过连续给药 10 d, 死亡率、平均死亡日、延长生命率见表 1。由表可见, bLF 高、中、低剂量组的死亡率分别为 10%, 20%, 60%; 平均死亡日分别为 9.3, 8.9, 7.0 d; 延长生命率分别为 93.7%, 85.4%, 45.8%, 与模型对照组死亡率 70%、平均死亡日 4.8 d 均有显著区别。随着 bLF 剂量的增加, 其抗轮状病毒的作用愈明显。

表 1 bLF 治疗后对各组死亡率、平均死亡日、延长生命率的影响

Tab 1 Effect of bLF on the death rates, the mean days of death and the rate of the prolonged survival time

组 别	死亡率/%	平均死亡日/d	延长生命率/%
bLF 高剂量组	10 ¹⁾	9.3±2.2 ¹⁾	93.7
bLF 中剂量组	20 ¹⁾	8.9±1.9 ¹⁾	85.4
bLF 低剂量组	60	7.5±2.2 ²⁾	45.8
阳性对照组	60	5.9±3.9	22.9
模型对照组	70	4.8±3.8	-

注: 与模型对照组比较, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05
Note: Compare with the model control group, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05

第 11 天所有的试验动物以 RV-Ag 进行轮状病毒抗原检测。检测结果为 bLF 高、中、低剂量组, 阳性对照组、正常对照组的动物均呈阴性, 模型对照组中 3 只动物有 2 只呈阳性, 1 只呈阴性。各组造模后及药物治疗后的抗原滴度比较, 见表 2。

表 2 bLF 治疗前后对抗原滴度的影响

Tab 2 Effect of bLF on antigen drops degrees

组 别	造模后治疗前		治疗后	
	动物数	OD 值	动物数	OD 值
高剂量组	10	0.517±0.219	8	0.039±0.010
中剂量组	10	0.514±0.202	7	0.052±0.036
低剂量组	10	0.498±0.298	4	0.085±0.045
阳性对照组	10	0.524±0.236	4	0.135±0.039
模型对照组	10	0.510±0.218	3	0.155±0.036
正常对照组	10	0.137±0.185	8	0.076±0.033

由表 2 可知, 造模后治疗前, 除正常对照组外, 其余各组 OD 值均>0.449, 即为阳性。治疗后, 抗原滴度下降。

停止给药后一天, 分别从 bLF 高、中、低剂量组, 阳性对照组, 正常对照组, 模型对照组随机抽取 1 只取粪样进行电镜检查。检查结果为: 模型对照组的 1 只样品有模糊的轮状病毒颗粒, 其它 5 组中抽取的 5 只动物无一例可见有轮状病毒颗粒。结果见图 1。

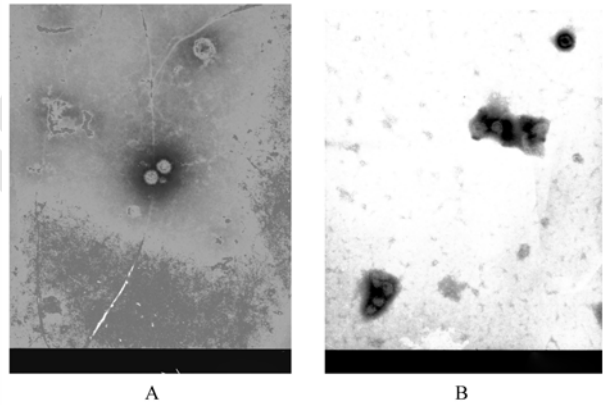


图 1 树鼯粪样电镜照片

A-模型对照组; B-治疗后

Fig 1 Electron micrograph of tree shrew feces

A-model control; B-bLF treatment

4 讨论

人轮状病毒(HRV)是引起全世界婴幼儿严重胃肠炎和脱水的最主要病因, 几乎所有儿童在出生后 3~5 年都感染过 HRV^[3-4]。HRV 感染最容易引起初生婴儿和儿童的非细菌性胃肠炎, 全世界每年平均有一百万儿童死于轮状病毒感染。HRV 的基因组是包裹在 3 层衣壳内的 10 段不同的 RNA 片段。治疗由人轮状病毒引起的腹泻, 现主要采用对症治疗, 纠正脱水, 维持电解平衡等。抗病毒药物利巴韦林的疗效据临床观察也不令人满意。 α -干扰素注射费用昂贵且副作用大。因此研制一种疗效确切, 价格适中又无毒副作用的抗 RV

制剂具有重大的实用意义。LF 是 1960 年首先由 Groves 从牛乳中分离获得, 因与铁结合而呈红色, 故称之为“红蛋白”。在发现之初, LF 被认为是一种与铁的转运和存储有关的蛋白质, 所以又称乳转铁蛋白。进一步研究表明, LF 是一种分子量为 70~80 kD 的糖蛋白, 广泛存在于乳汁、唾液、泪液等外分泌液或血浆、中性粒细胞中。乳汁, 尤其是初乳中 LF 的含量很高, 如牛初乳中的 LF 质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。LF 是一种具有多种生物学功能的蛋白质, 它不仅参与铁的转运, 而且具有抗菌、抑菌、抗病毒、抗氧化、调节机体免疫和提高肠道对铁离子的吸收等作用, 被认为是一种新型的抗菌、抗癌药物和极具开发潜力的食品和饲料添加剂。曾有报道乳铁蛋白具有抗病毒作用, LF 能够阻止病毒在细胞间的传播^[5]。体外实验表明 LF 可阻止轮状病毒吸附于靶细胞上, 从而防止感染, 而且在病毒进入靶细胞后, LF 仍然有抗病毒效果^[2]。树鼯是一种与灵长类亲缘关系较近的哺乳动物。因其体积小易于实验室饲养, 对多种人类病毒如单纯疱疹、RV、HCV、HBV 易感。本研究以与人发病机理相似的树鼯感染轮状病毒模型

来研究 BLF 的抗轮状病毒作用, 结果表明, LF 能有效的降低感染轮状病毒动物的死亡率, 提高感染轮状病毒动物的延长生命率。同时能降低轮状病毒抗原滴度。bLF 治疗 RV 感染, 除本身具有抗病毒活性外, 还能从保护胃肠黏膜, 增强免疫功能方面共同起作用。因此, bLF 作为新型抗轮状病毒制剂, 必定具有广泛的前景。

REFERENCES

- [1] GONZALE-CHAVEZ S A, AREVALO-GALLEGOS S, RASCON-CRUZ Q. Lactoferrin: structure, function and applications [J]. *Int J Antimicrob*, 2009, 33(4): 301.e1-8.
- [2] SUPERTI F, AMMENDOLIA M G, VALENTI P, et al. Antitrotaviral activity of milk proteins: lactoferri prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29 [J]. *Med Microbiol Immunol*, 1997, 186(2/3): 83-91.
- [3] ZHENG L S. Rotavirus vaccine development and the present situation [J]. *Foreign Med Sci(Sect Virol)*(国外医学: 病毒学分册), 2003, 10(1): 1-4.
- [4] ZHOU X F, SUN Y P, OUYANG J P, et al. 42 Cases of rotaviral enteritis adjusted treatment with zinc gluconate [J]. *Med Her(医药导报)*, 2010, 29(9): 1160-1161.
- [5] JENSSEN H, SANDVIK K, ANDERSEN J H, et al. Inhibition of HSV cell-to-cell spread by lactoferrin and lactoferricin [J]. *Antiviral Res*, 2008, 79(3):192-198.

收稿日期: 2011-07-27