

木犀草素对猪传染性胃肠炎病毒的抑制作用

龚国清¹, 龚国华², 钱之玉^{1*}, 周 曙¹

(¹中国药科大学药理学教研室, 南京 210009; ²上海市畜牧兽医站, 上海 201103)

【摘要】 目的: 建立猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)的体外培养方法, 观察木犀草素对TGEV的抑制作用。

方法: 采用细胞培养法, 通过结晶紫摄入量测定结合细胞病变作用(CPE), 观察木犀草素在不同的加药方式下, 对感染TGEV的猪睾丸(ST)细胞的保护作用。结果: TGEV病毒先吸附ST细胞再加入药液, 先与TGEV病毒孵育再接种于ST细胞, 或药液先与细胞孵育再用病毒感染等不同方式下, 木犀草素在0.84~54.50 μmol/L浓度范围内, 均能明显地提高细胞的存活数。另外发现TGEV感染ST细胞后随着给药时间的推迟, 木犀草素抑制病毒增殖作用越弱。结论: 木犀草素对体外培养系统中TGEV有较好的增殖抑制作用。

【关键词】 木犀草素; 猪传染性胃肠炎病毒; 细胞病变; 体外抗病毒试验

【中图分类号】 R285.5; R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000—5048(2005)05—0453—04

猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)属于冠状病毒属(coronavirus)RNA病毒, 是一种多形性有囊膜的病毒, 它可在猪的呼吸道中增殖, 引起严重腹泻、呕吐和脱水等症状。TGEV由Doyle和Hutchings于1946年在美国首次报道, 日本、英国也先后报道该病, 随后欧洲、北美、亚洲等多个地区相继报道发生了TGEV, 现已成为一种世界性猪传染性疾病^[1]。我国从60年代起开始有此方面报道, 目前该病有进一步流行的趋势, 给畜牧业带来巨大的危害。本文以TGEV病毒作为研究对象, 研究木犀草素对此病毒的抑制作用, 可为畜牧业家畜防病治病提供一种新方法。

1 材 料

1.1 试 剂

DMEM培养液, 美国Gibco公司产品。加水溶解后, 加入8%的胎牛血清、NaHCO₃及常规双抗, 使各自浓度分别为10 mmol/L, 0.37%, 100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素, 调节pH为7.0~7.2后, 定容至1 000 mL, 用0.22 μm的纤维素微孔滤膜过滤除菌, 分装于-20℃保存备用; 胎牛血清(华中理工大学); 胰蛋白酶(Amresco华美公司分装); 结晶紫、分析纯(中国远航化工厂)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

96孔培养板(Becton Dickinson Labware公司); YJ-1450医用净化工作台(苏州净化设备厂); CO₂培养箱(Incubator IF-41, 日本); 倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂); 全自动酶标仪(美国Bio-Rad伯乐公司)。

1.3 病毒株与细胞

猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪睾丸(swine testicle, ST)细胞均由上海畜牧兽医研究所提供。

1.4 受试物

木犀草素(luteolin), 杭州福斯特化学品有限公司, 纯度大于99%。使用前用DMSO溶解, 再用DMEM营养液稀释, 0.22 μm无菌滤膜抽滤后, 冰箱保存。临用时, 以维持液稀释至所需浓度。

2 方 法

2.1 ST细胞复苏和培养^[2]

从-70℃的低温冰箱中取出含ST细胞的冻存管, 立即置37℃水浴中不断振摇, 使冻存管的细胞在30 s内解冻。用75%的酒精擦洗消毒后打开盖子, 吸出细胞悬液, 装入离心管并用含12%胎牛血清的DMEM培养液稀释, 1 500 r/min离心8 min, 弃上清液, 再加上述培养液重新悬浮, 转入100 mL的培养瓶内, 生长于含12%胎牛血清的DMEM培养液中, 在37℃, 饱和湿度, 含5%CO₂的培养箱中静置培养, 次日更换培养液继续培养。4 d后, 用胰

蛋白酶常规消化培养瓶内的 ST 细胞, 用含 12% 胎牛血清的 DMEM 培养液制备 2×10^6 个/mL 的悬液接种于 96 孔培养板上, 每孔 0.4 mL。

2.2 木犀草素对 ST 细胞毒性浓度的测定

将木犀草素储备液按 1:4 比例稀释, 取稀释液 0.1 mL 加入到培养板孔中, 使木犀草素的终浓度为 3.493.57, 873.39, 218.35, 54.50, 13.62, 3.42, 0.84, 0.21 $\mu\text{mol/L}$ 。培养 3 d 后观察各孔细胞病变作用 (cytopathogenic effect, CPE) 情况。无病变为“-”; CPE<25% 病变为“+”; 25%~50% 病变为“++”; 50%~75% 病变为“+++”; CPE>75% 病变为“++++”。

2.3 TGEV 半数感染量 (TCID₅₀) 的测定^[3]

按 CPE 终点稀释法测定。用 DMEM 培养液将 TGEV 按 10 倍逐步稀释从 10^{-1} 到 10^{-10} 各梯度的浓度, 然后加入到长满单层 ST 细胞的 96 孔培养板中, 在 37 °C, 5% CO₂ 及饱和温度下混合培养, 3 d 后观察 CPE 达 50% 的 TGEV 浓度值, 确定为 TCID₅₀。

2.4 木犀草素对 TGEV 的体外抑制试验

2.4.1 木犀草素对 TGEV 感染的 ST 细胞的保护作用^[4] 在 96 孔板上接种 2×10^5 个/mL 的 ST 细胞 0.3 mL, 待其生长成单层后, 每孔加入 TGEV 病毒液 (100 TCID₅₀/mL) 0.1 mL。孵育 2 h 后, 分别加入不同浓度的木犀草素稀释液 0.1 mL, 使其终浓度为 0.21, 0.84, 3.42, 13.62, 54.50 $\mu\text{mol/L}$, 37 °C, 5% CO₂ 培养, 每一浓度做 4 复孔, 实验重复 1 次。3 d 后先进行 ST 细胞的 CPE 观察, 根据出现收缩的细胞数来判定 CPE 等级。接着, 吸弃每孔的上清液, 用 37 °C, pH 7.6 的 PBS 洗涤两次后, 加入 0.2% 的结晶紫溶液 0.1 mL 染色 5 min, 再用 PBS 洗涤 5 次, 加 1% SDS 溶液 0.1 mL, 37 °C 保温 0.5 h, 使细胞彻底裂解, 置全自动酶标仪上, 于 630 nm 下测 A 值。

2.4.2 木犀草素对 TGEV 的直接作用 为了分析木犀草素对 TGEV 是否存在直接作用, 即作用于病毒后, 是否影响病毒毒力或转录能力。将不同浓度的木犀草素 0.1 mL 与 TGEV 病毒液 (100 TCID₅₀/mL) 0.1 mL 混合后于 37 °C 孵育 2 h, 然后再接种于 0.3 mL 的 ST 细胞, 37 °C, 5% CO₂ 培养。3 d 后观

察 CPE 程度并于 630 nm 处测定 A 值。

2.4.3 木犀草素对 TGEV 感染 ST 细胞的预防性保护作用 将不同浓度的木犀草素 0.1 mL 与 ST 细胞液 0.3 mL 在 96 孔培养板, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养 4 h 后, 加入 TGEV 病毒液 (100 TCID₅₀/mL) 0.1 mL, 孵育 2 h, 更换维持液, 继续培养 3 d。同法观察各孔的 CPE 及结晶紫染色下的 630 nm 的 A 值。

2.4.4 木犀草素对 ST 细胞感染 TGEV 后不同阶段的保护作用 在含有 ST 细胞液 0.3 mL 的孔中接种 TGEV 病毒液 (100 TCID₅₀/mL) 0.1 mL, 1, 2, 4, 6 和 8 h 后分别加入木犀草素溶液 0.1 mL, 使其在孔中的终浓度为 54.50 $\mu\text{mol/L}$, 并设病毒感染对照和正常细胞对照, 在 37 °C, 5% CO₂ 继续培养 3 d。观察 3 d 后各孔中细胞的 CPE 及结晶紫染色的活细胞数情况。

2.5 统计分析

实验中数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用组间 t 检验方法进行统计分析。

3 结果

3.1 木犀草素对 ST 细胞的毒性作用

结果表明, 木犀草素终浓度在 873.39, 218.35, 54.50, 13.62, 3.42, 0.84, 0.21 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 对 ST 细胞的作用与培养维持液组无明显差异, ST 细胞的形态均未有明显改变。在 3.493.57 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 部分 ST 细胞出现病变作用, 因此确定为木犀草素对 ST 细胞无毒性浓度范围为 0.21~873.39 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 TCID₅₀ 的测定

当 TGEV 病毒液的稀释度为 10^{-7} 时, 6 孔的 ST 细胞有半数细胞产生病变, 出现萎缩、脱落, 因此 TCID₅₀ 确定为 10^{-7} 。在下列各试验中均采用 100 TCID₅₀/mL 的病毒量。

3.3 木犀草素对 TGEV 的体外抑制试验

3.3.1 木犀草素对 TGEV 感染的 ST 细胞的保护作用 结果表明: 病毒吸附细胞 2 h 后加入木犀草素药液, 在 0.84~54.50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 木犀草素能明显地提高 ST 细胞的存活数, 显示出抗 TGEV 作用, 并呈良好的相关性。CPE 观察也显示同样的结果, 在 54.50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 对 ST 细胞几乎是完全保护 (见表 1)。

Tab. 1 Effect of luteolin (Lut) on swine testicle (ST) cells infected by transmissible gastroenteritis virus (TGEV) ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Group	<i>c</i> ($\mu\text{mol/L}$)	A_{630}	CPE
Control	—	1.257 \pm 0.145	—
TGEV	—	0.073 \pm 0.016	++++
Lut+TGEV	0.21	0.081 \pm 0.07	++++
Lut+TGEV	0.84	0.133 \pm 0.013 **	+++
Lut+TGEV	3.42	0.538 \pm 0.047 **	++
Lut+TGEV	13.62	0.727 \pm 0.073 **	+
Lut+TGEV	54.50	1.06 \pm 0.139 **	—

** $P < 0.01$ vs TGEV

3.3.2 木犀草素对TGEV的直接作用 不同浓度的木犀草素与TGEV等体积混合, 在37℃孵育2 h后, 再接种于ST细胞。结果显示, 在0.84~54.50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 各孔的ST细胞存活数明显增多, 表明木犀草素与TGEV混合培养下, 可降低其病毒毒力; 同时发现, 木犀草素先作用于TGEV, 可使ST细胞的存活数有一定的提高, 效果更好(见表2)。

Tab. 2 Inhibition effect of luteolin (Lut) on TGEV ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Group	<i>c</i> ($\mu\text{mol/L}$)	A_{630}	CPE
Control	—	1.397 \pm 0.057	—
TGEV	—	0.232 \pm 0.005	++++
Lut+TGEV	0.21	0.227 \pm 0.063	++++
Lut+TGEV	0.84	0.600 \pm 0.075 **	+++
Lut+TGEV	3.42	0.882 \pm 0.078 **	++
Lut+TGEV	13.62	1.299 \pm 0.091 **	—
Lut+TGEV	54.50	1.444 \pm 0.038 **	—

* $P < 0.01$ vs TGEV

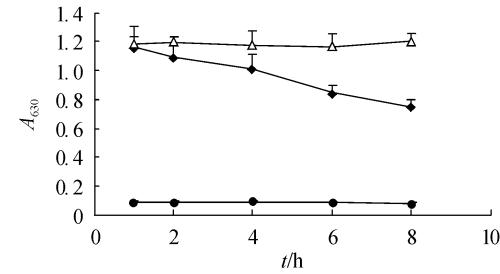
3.3.3 木犀草素对TGEV感染ST细胞的预防性保护作用 结果(表3)表明: 木犀草素在先与ST细胞培养4 h, 再接种TGEV病毒, 在0.84~54.50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 同样可使各孔的ST细胞存活数明显增多, 尤其在13.62~54.50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内未见CPE的发生, 表明木犀草素可使ST细胞免于TGEV病毒的攻击, 抑制病毒的繁殖。

3.3.4 木犀草素对ST细胞感染TGEV后不同阶段的保护作用 由图1可见, 在TGEV感染ST细胞后1~8 h内给药, 木犀草素均可明显抑制病毒的繁殖, 与模型对照组比较, 有显著性差异。但随着给药时间的推迟, 细胞存活数有所降低, 6~8 h时的*A*值与1 h相比, 有显著的减少, 说明病毒与细胞结合的时间越长, 木犀草素抗病毒作用越弱。

Tab. 3 Protective effect of luteolin (Lut) on ST cells with TGEV inoculation ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Group	<i>c</i> ($\mu\text{mol/L}$)	A_{630}	CPE
Control	—	1.151 \pm 0.054	—
TGEV	—	0.208 \pm 0.019	++++
Lut+TGEV	0.21	0.203 \pm 0.025	++++
Lut+TGEV	0.84	0.509 \pm 0.038 **	+++
Lut+TGEV	3.42	0.549 \pm 0.052 **	++
Lut+TGEV	13.62	0.818 \pm 0.043 **	—
Lut+TGEV	54.50	0.919 \pm 0.040 **	—

** $P < 0.01$ vs TGEV

Fig. 1 Protective effect of luteolin (54.5 $\mu\text{mol/L}$) on ST cells infected by TGEV (100 TCID₅₀/mL) at different stages ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

4 讨 论

木犀草素对多种病毒(如单纯疱疹病毒^[3]、脊髓灰质炎病毒^[6]、HIV-1病毒^[7]、柯萨奇B₃病毒^[8]等)有不同程度的抑制作用。研究发现, 这种作用可能与其所具有的黄酮类结构有关, 在黄酮类的化学结构上, C₃位上是否有羟基或C_{3'}、C_{4'}或C₅、C₇上同时存在羟基与抗病毒活性密切相关。有研究表明, 黄酮骨架上的3-OCH₃和5-OH是抗病毒活性必需的基团。木犀草素的化学结构中具有3'、4'-OH和5-OH, 表现出较好的抗病毒活性。其对HIV-1的整合酶和蛋白酶均有一定程度的抑制作用^[9]。

本实验采用在不同阶段进行药物与病毒或细胞孵育的方法, 分别分析了木犀草素对感染TGEV的ST细胞的预防和保护作用、对TGEV的直接作用, 以及对细胞感染病毒后不同阶段的保护试验。结果证实木犀草素除对TGEV感染的ST细胞有明显的预防和保护作用外, 对TGEV的活性还具有直接的抑制作用。研究发现不同时间加入木犀草素均可对病毒致细胞病变产生明显的抑制, 但随着给药时间的推延, 其保护作用逐渐减弱, 说明早期给

药能够抑制病毒在细胞内的增殖。而木犀草素对TGEV抑制作用的机制有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Srinamumitr T, Siddell S, Grahame F, et al. Porcine transmissible gastroenteritis virus induced apoptosis in swine testicle cell cultures[J]. *Arch Virol*, 1998, **143**(12): 2 471—2 485.
- [2] 王树成(Wang SC), 赵祥平(Zhao XP), 刘宏(Liu H), 等. 猪传染性胃肠炎病毒在组织细胞上增殖的研究[J]. 中国畜禽传染病(*Chin J Anim & Poul Infect Dis*), 1998, **20**(1): 21—22.
- [3] Gibson W. Structural and nonstructural proteins of strain Colburn cytomegalovirus[J]. *Virol*, 1981, **111**(2): 516—537.
- [4] 刘辉(Liu H). β -胡萝卜素对病毒转化细胞的影响[J]. 第四军医大学学报(*J Fourth Mil Med Univ*), 2002, **23**(6): 514—516.
- [5] Wleklik M, Luczak M, Panasiak W, et al. Structural basis for antiviral activity of flavonoids naturally occurring compounds[J]. *Acta Virol*, 1988, **32**(6): 522—525.
- [6] Vrijen R, Everaert L, Boeye A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate[J]. *J Gen Virol*, 1988, **69**(7): 1 749—1 751.
- [7] Tewtrakul S, Miyashiro H, Nakamura N, et al. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*[J]. *Phytother Res*, 2003, **17**(3): 232—239.
- [8] 何丽娜(He LN), 何素冰(He SB), 杨军(Yang J). 木犀草素体外抗柯萨奇B₃病毒的作用[J]. 中国现代应用药学(*Chin J Mod Appl Pharm*), 2000, **17**(5): 362—365.
- [9] Xu HX, Wan M, Dong H, et al. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease[J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, **23**(9): 1 072—1 076.

Inhibitory Activity of Luteolin against Transmissible Gastroenteritis Virus

GONG Guo-Qing¹, GONG Guo-Hua², QIAN Zhi-Yu¹, ZHOU Shu¹

(¹Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Shanghai Pasturage-Veterinary Station, Shanghai 201103, China)

【ABSTRACT】 AIM: To establish *in vitro* culture method for growth of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and to perform *in vitro* inhibition studies of luteolin on TGEV. METHODS: Using tissue culture technique, the maximal non-toxic concentration of luteolin in swine testicle (ST) cell culture was measured, and the inhibitory effect of luteolin on TGEV was measured by cytopathogenic effect (CPE) observation and crystal violet measurement. In addition, the degrees of inhibition of the luteolin on CPE of virus in cell culture were observed by changing sequence of adding the virus and the drug. RESULTS: The maximal non-toxic concentration of luteolin was 873.39 μ mol/L. In the range of 0.84~54.50 μ mol/L, luteolin could protect ST cells and inhibit CPE significantly under the different conditions of administration, luteolin was added to culture medium before and after infection, and incubated with virus at the same time. CONCLUSION: Luteolin possesses the effect of anti-TGEV *in vitro*.

【KEY WORDS】 Luteolin; Transmissible gastroenteritis virus; Cytopathogenic effect; *In vitro* antibacterial test