

朱砂七多糖体外抗猪传染性胃肠炎病毒作用研究

胡蓉 郭浩杰 曹志 盛洁 郭抗抗 宁蓬勃 卿素珠* 张为民*

西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100

* 通讯作者, suzhuqing@163.com; ylzhangwm@163.com

摘要 猪传染性胃肠炎 (swine transmissible gastroenteritis, TGE) 是由猪传染性胃肠炎病毒 (*Swine transmissible gastroenteritis virus*, TGEV) 引起的一种高度传染性的猪病毒性疾病。为探讨朱砂七 (*Polygonum cillinerve*) 多糖对 TGEV 的体外抑制作用, 本研究以猪 (*Sus scrofa*) 睾丸 (swine testis, ST) 细胞为实验材料, 通过先加药后接毒、先接毒后加药及药物与病毒混合感作 3 种给药方式, 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐法 (MTT 法) 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测不同浓度的朱砂七多糖对 TGEV 在 ST 细胞的体外抗吸附、直接杀灭和抑制增殖作用。MTT 法结果显示, 朱砂七多糖对 ST 细胞的最大无毒浓度 (TC_0) 为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 最大安全浓度 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 时, 对 TGEV 的抗吸附作用最好, 抑制率达 85.2%; 对体外增殖的抑制率达 78.4%; 直接灭活作用抑制率达 74.4%, 且抑制率与浓度呈正相关。qRT-PCR 检测结果表明, 朱砂七多糖在 3 种给药方式下均能在转录水平显著降低 TGEV *N* mRNA 相对表达量, 与病毒对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 并存在一定的剂量依赖性。研究结果表明, 朱砂七多糖对 TGEV 在 ST 细胞上增殖有抑制作用, 不同给药方式有所差异, 其中以先加药后接毒给药方式的预防作用效果最佳。本研究初步证实了朱砂七多糖的体外抗 TGEV 作用, 为朱砂七资源的开发和综合利用提供了依据。

关键词 朱砂七多糖, 猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV), 体外抑制, MTT, qRT-PCR

In vitro Inhibition of *Polygonum cillinerve* Polysaccharide on *Swine transmissible gastroenteritis virus* (TGEV)

HU Rong GUO Hao-Jie CAO Zhi SHENG Jie GUO Kang-Kang NING Peng-Bo QING Su-Zhu* ZHANG Wei-Min*

College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

* Corresponding authors, suzhuqing@163.com; ylzhangwm@163.com

Abstract Swine transmissible gastroenteritis (TGE) is a kind of hyperinfected viral disease in pigs (*Sus scrofa*) induced by *Swine transmissible gastroenteritis virus* (TGEV), and leads to death of large numbers of the pigs. The present study aimed to evaluate the effect of *Polygonum cillinerve* polysaccharide (PCP) on inhibition of TGEV. Based on the detection results of $TCID_{50}$ of TGEV and maximum cytotoxic concentration (TC_0) of PCP on *in vitro* growth of swine testicular (ST) cells, the PCP was pre-seeded, co-seeded or post-seeded with TGEV in ST cells, then the anti-virus adsorption, inactivation and inhibition of the proliferation of PCP were analyzed by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method and quantitative Real-time PCR (qRT-PCR). The detection of *in vitro* viral infection indicated that the value of $TCID_{50}$ on TGEV was $10^{-6.25}$. After 72 h *in vitro* culture, ST cells were well-grown without the cytotoxic response when treated them with PCP at concentration of lower than 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ compared with the blank controls, which determined the TC_0 of PCP was 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. According to the results of MTT, under the

maximum safe concentration (20 $\mu\text{g/mL}$) of PCP, the anti-adsorption effect of PCP on TGEV *in vitro* was the best, the inhibition rate was 85.2%, the inhibition rate on *in vitro* virus proliferation was 78.4%, while the inhibition rate of direct inactivation to TGEV was 74.4%, and the inhibition rate was positively correlated with the concentration. Moreover, qRT-PCR detection indicated that 3 administration methods of PCP could significantly reduce relative TGEV *N* mRNA expression at the transcriptional level ($P < 0.01$) compared with the virus control, and with a dose-dependent characteristic. The results suggested that all 3 administration methods of PCP could inhibit the proliferation of TGEV at ST cells *in vitro*, and the prevention effect of PCP was the best. This work demonstrated the *in vitro* anti-virus effect of PCP on TGE, and can provide some basis on resource exploitation and multiple utilization of *Polygonum cillinerve*.

Keywords *Polygonum cillinerve* polysaccharide, *Swine transmissible gastroenteritis virus* (TGEV), *In vitro* inhibition, MTT, qRT-PCR

猪传染性胃肠炎 (swine transmissible gastroenteritis, TGE) 是由猪传染性胃肠炎病毒 (*Swine transmissible gastroenteritis virus*, TGEV) 引起的一种高度传染性的猪病毒性疾病, 以呕吐、腹泻和脱水为临床特征 (王劲等, 2013)。任何年龄和任何品种的猪均可感染, 尤其是 10 日龄以内的仔猪, 病死率高达 100%, 耐过仔猪生长缓慢, 料肉比大大降低, 给养猪业带来严重的经济损失 (吴国平等, 2003)。对该病采用疫苗接种虽可在一定程度上预防该病, 但不能彻底控制疫情的发生 (Gu et al., 2012; Mason, Herbst-Kralovetz, 2012)。近年来中草药因其毒副作用小、无残留及不产生耐药性等优点在抗病毒作用方面的优势已越来越受到重视 (褚秀玲等, 2009)。

朱砂七 (*Polygonum cillinerve*) 别名朱砂莲, 为蓼科植物毛脉蓼的块根, 味苦微涩, 性凉, 属于“太白七药”的一种, 在秦岭和大巴山区天然资源十分丰富, 其活性成分具有多种药理作用, 能清热解毒、凉血活血及止血止泻, 广泛用于治疗胃肠炎、菌痢和风湿腰疼等症 (詹亚华, 1994)。现代研究表明, 朱砂七中含大黄素、大黄素甲醚和大黄素葡萄糖苷等蒽醌类, 具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤及抗病毒等作用 (全国中草药汇编编写组, 1996; 刘西京等, 2003; 张为民等, 2011)。朱砂七总蒽醌在体外具有明显的保护宿主细胞抵抗 HSV-1 病毒复制的作用 (赵勤等, 2012); 朱砂七中的总蒽醌对流感病毒有一定的抑制作用 (郭慧玲等, 2006)。本课题组的前期研究显示, 朱砂七提取物乙酸乙酯部位 PCEA 和 PCEB 可有效的抑制猪传染性胃肠炎病毒在猪睾丸 (swine testis, ST) 细胞中的增殖, 且与浓度呈正相关 (张为民, 2010)。而有关朱砂七多糖 (*Polygonum cillinerve* polysaccharide, PCP) 的研究报道不多, 本

课题组就 PCP 对奶牛 (*Bos primigenius*) 乳房炎分离菌的体外抑制作用进行研究, 结果显示, PCP 对沙门氏菌 (*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和绿脓杆菌 (*P.aeruginosa*) 均有不同程度的抑制作用, 且抑菌作用具有剂量依赖性 (姬丽娜等, 2013), 崔军见等 (2007) 研究了 PCP 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基、 $\text{O}^{\cdot-}$ 自由基和 DPPH \cdot 自由基的清除能力以及抗脂质过氧化能力, 证明了朱砂七多糖具有一定的体外抗氧化能力和体外抗肿瘤活性。进一步研究还表明, PCP 具有明显的自由基清除和抗氧化活性, 能提高免疫抑制小鼠 (*Mus musculus*) 的总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TOC)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 水平, 在预防免疫系统氧化损伤方面发挥重要作用 (Cui et al., 2010)。王晓梅等 (2010) 的研究也证实了朱砂七多糖的抗氧化活性。而有关朱砂七多糖抗病毒的研究目前还未见报道。本研究以 ST 细胞为模型, 采用 3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐法 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT 法) 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测朱砂七多糖对 TGEV 在 ST 细胞的体外抑制作用, 以了解朱砂七多糖的抗病毒作用, 为朱砂七资源的开发和综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 液体培养基 (购于美国 HyClone 公司) 于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(购于美国 Gibco 公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)均为美国 Sigma 公司产品; RNA 提取试剂 TransZol 和 RT-PCR 反转录试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; Ultra SYBR Mixture 购于北京康为世纪生物科技有限公司。

1.1.2 仪器

TI-DH 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司); 医用净化工作台(苏州净化设备厂); 超纯水仪(美国 Millipore 公司); 全自动酶标仪、CO₂恒温培养箱(美国 Thermo 公司); 细胞培养板(美国 Corning 公司); 八联管(美国 Orcugen 公司); 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 普通 PCR 仪、iQ5 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.3 病毒与细胞

猪传染性胃肠炎病毒(*Swine transmissible gastroenteritis virus*, TGEV) (TH98 株), 猪睾丸细胞 (swine testis, ST) 系, 均由西北农林科技大学动物医学院兽医公共卫生与畜产品安全实验室提供。

1.1.4 实验药物

朱砂七多糖(*Polygonum cillinerve* polysaccharide, PCP)由西北农林科技大学动物医学院中兽医学实验室提供, 采用水煎醇沉法提取, 紫外分光光度法鉴定, 苯酚-硫酸法测定其提取率为 5.452%, 纯度为 90.64%; 利巴韦林(Ribavirin, RBV)注射液购于天津药业集团新郑股份有限公司, 朱砂七多糖用含 2% FBS 的 DMEM 维持液溶解, 0.22 μm 无菌滤膜抽滤后, 4 °C 储存备用。临用前再以维持液稀释至所需浓度。

1.2 方法

1.2.1 ST 细胞复苏和培养

将 ST 细胞从液氮里取出, 置于 37 °C 水浴中, 使细胞快速解冻融化为液体。1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液将沉淀悬浮, 然后转入培养皿内, 于 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 24 h 后换液。待细胞生长为单层, 经 PBS 液清洗后, 培养皿中加入 1 mL 胰蛋白酶, 消化 6 min 左右, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液吹打混匀, 调整细胞浓度至 1.0 × 10⁶ 个/mL, 接种于 96 孔培养板。待细胞生长到一定浓度接种相应

药物。

1.2.2 朱砂七多糖对 ST 细胞毒性的测定

病毒感染性测定: 10 倍稀释法将 TGEV 稀释为 10 个不同浓度, 依次将不同浓度的 TGEV 接种于 ST 细胞中, 置 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 1.5 h (使病毒充分吸附并侵入细胞)后, 更换为含 2% FBS 的培养基, 设立相应对照组。每隔 12 h 观察细胞病变(cytopathic effect, CPE), 病毒可引起细胞圆缩、堆聚及脱落的现象。记录病变程度和孔数, 72 h 后观察 CPE 达 50% 的 TGEV 浓度值, 确定为 50% 组织细胞感染量 (tissue culture infective dose, TCID₅₀)。根据 Karber(寇氏)法计算病毒的 TCID₅₀ (殷震等, 刘景华, 1997)。

药物对 ST 细胞最大无毒浓度 TC₀ 测定: 朱砂七多糖用维持液 2 倍稀释法配制成 160、80、40、20、10 和 5 μg/mL, 利巴韦林用维持液配制成 10、5、2.5 和 1.25 μg/mL, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 加入 ST 细胞密度长至 80% 的 96 孔细胞板内, 每孔 100 μL, 各浓度重复 6 孔, 设相应对照及空白调零组。每隔 12 h 在荧光倒置显微镜下观察细胞, 拍照并记录病变情况, 72 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱孵育 4 h 后, 小心弃去孔内液体, 每个 96 孔中加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO), 震荡 10 min 后再静置 10 min, 镜下观察, 与空白组细胞相比, 无退变、变形和脱落的最高药物稀释度为药物对 ST 细胞的最大无毒浓度(maximal atoxic concentration, TC₀) (姜成刚等, 2005)。

1.2.3 MTT 法检测朱砂七多糖对 TGEV 的体外抑制作用

以朱砂七多糖最大无毒浓度为起始浓度, 将药物 2 倍法稀释成 20、10、5 和 2.5 μg/mL, 以最大无毒浓度内 1 μg/mL 利巴韦林作为阳性对照。

参照张为民(2010)方法按以下 3 种不同方式对 ST 细胞进行处理: ①对 TGEV 的吸附保护作用(先给药后接毒): 先将含不同浓度的朱砂七多糖和 1 μg/mL 利巴韦林的维持液分别加入 ST 细胞密度长至 80% 的 96 孔细胞板内, 37 °C 吸附 1.5 h 后洗涤, 加入 100 TCID₅₀ 病毒, 吸附 1.5 h 后洗涤, 加维持液, 重复 6 孔。②对 TGEV 的增殖抑制作用(先接毒后给药): 先将 100 TCID₅₀ 病毒加入 ST 细胞密度长至 80% 的 96 孔细胞板内, 37 °C 吸附 1.5 h 洗涤, 加入含不同浓度的朱砂七多糖和 1 μg/mL 利巴韦林

维持液,隔天换新鲜含药维持液,重复6孔。③对TGEV的直接灭活作用(药毒混合感作):先将不同浓度的朱砂七多糖和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利巴韦林(浓度为实验浓度2倍)与100 TCID_{50} 病毒液37 $^{\circ}\text{C}$ 作用1.5 h后,将混合液加入ST细胞密度长至80%的96孔细胞板内,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附1.5 h后洗涤,加维持液,重复6孔。以上各组均设细胞对照组、病毒对照组、药物对照组和空白调零孔。在37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养,每隔12 h,经荧光倒置显微镜下观察细胞,拍照并记录细胞病变情况。72 h后,每孔加入5 mg/mL MTT 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h后,小心弃去孔内液体,每孔加入100 μL DMSO,震荡10 min后再静置10 min,以 A_{620} 检测OD。

1.2.4 qRT-PCR检测朱砂七对TGEV的抑制作用

TGEV N基因引物的设计和合成:参照董玲娟等(2012)的方法进行引物设计与合成。上、下游引物序列:

P1:5'-GAGCAGTGCCAAGCATTACCC-3';

P2:5'-GACTTCTACTCTGGTCGCCATCTTC-3'。

RNA的提取:将单层生长的ST细胞接种TGEV(100 TCID_{50})于6孔细胞板上,分3种不同的方式接种,6孔分别为正常细胞对照、病毒对照、朱砂七多糖(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、朱砂七多糖(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、朱砂七多糖(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及利巴韦林(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)阳性对照。其他按1.2.3方法进行实验,每隔12 h镜下观察,记录细胞病变情况,等到病毒对照约90%的细胞出现细胞病变时(48 h),分别收集上清液于离心管中,3 000 r/min离心2 min,弃去上清,6孔板中每孔加入1 mL TransZol试剂,按TransZol试剂说明书上的步骤进行RNA提取。

TGEV cDNA的逆转录合成及PCR扩增:按照TransGen一步法反转录试剂盒的说明进行cDNA的合成。反应体系:Total RNA 5 μL ; Anchored Oligo(dT)18 1 μL ; 2 \times ES Reaction Mix 10 μL ; ES Mix 1 μL ; RNase-free Water 3 μL 。所得cDNA于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

PCR反应体系:cDNA模板(5倍稀释后)2 μL , Mix 10 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各0.5 μL , RNase-free Water 7 μL 。PCR反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s,32个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸10 min。

qRT-PCR:采用SYBR Green Mix。PCR反应体系:cDNA模板(5倍稀释后)2 μL , Ultra SYBR Mixture

25 μL ,标准品上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各1.0 μL , RNase-free Water 21 μL 。PCR反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,采集荧光,溶解曲线以55 $^{\circ}\text{C}$ 40个循环进行。以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参对照,每个样品设置3个重复,最后取平均值进行结果分析。

1.2.5 计算与分析处理

按照以下公式计算抑制率和病毒的 TCID_{50} :

抑制率=(药物处理组平均 OD_{620} -病毒对照组平均 OD_{620})/(细胞对照组平均 OD_{620} -病毒对照组平均 OD_{620}) $\times 100\%$ 。

$\lg\text{TCID}_{50}=L-d(s-0.5)$ (L :最高稀释度的对数; d :稀释度对数之间的差; s :阳性孔比率总和)。

利用SPSS18.0软件对组间的对病毒的抑制率、病毒相对mRNA水平的差异性进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 朱砂七多糖对ST细胞毒性的测定

2.1.1 TCID_{50} 的测定结果

根据公式 $\lg\text{TCID}_{50}=L-d(s-0.5)$,其中 L 为-1, d 为1, s 为 $1+1+1+1+5/8+3/8+3/8+2/8+1/8=5.75$,得到病毒的 TCID_{50} 为 $10^{-6.25}$ 。

2.1.2 朱砂七多糖对ST细胞的最大无毒浓度

将加了药的细胞培养72 h后,镜下观察细胞形态变化,与空白对照组相比无退变、变形和脱落的最高药物稀释度为药物对ST细胞的最大无毒浓度,结果朱砂七多糖最大无毒浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,利巴韦林1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

添加不同浓度PCP经培养72 h后各组ST细胞的形态如图1所示。对照组ST细胞贴壁后,在显微镜下多为多角形或短梭形,当铺满皿底时,呈铺路石状,大小均匀(图1A);20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 朱砂七多糖处理72 h后,细胞结构完整,大小均一,形态饱满,形成完整单层,无空隙,细胞折光性良好,无破碎死亡现象(图1B);病毒对照组的细胞以病毒侵染72 h后发生严重的病变,细胞失去正常形态,极少贴壁,细胞基本全部脱离单层(图1C)。先加质量浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 朱砂七多糖后接毒组,细胞相对于病毒对照组得到了一定程度的保护,细胞仍比较饱满,数量较多,折光性较好(图1D)。先接毒后加质量浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 朱砂七多糖组,细胞形态不够饱满,细胞间有空隙,数量减少,折光性略差(图1E);质量

浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 朱砂七多糖与病毒混合感作组, 细胞形态发生相应改变, 部分脱离单层, 数量明显减少(图 1F)。可以看出, 图 1D 中的细胞形态最好, 因此初步得出先加药后接毒的给药方式效果最好, 即朱砂七多糖的预防效果最好。

2.2 不同浓度朱砂七多糖对 TGEV 的抑制结果

不同浓度朱砂七多糖对 TGEV 的体外抑制作用如表 1 所示。不同浓度的朱砂七多糖均能在一定程度对 TGEV 有抗吸附、抑制增殖和直接杀灭作用。朱砂七多糖最大安全浓度(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时, 以对 TGEV 的抗吸附作用最好, 抑制率达 85.2%, 其次是对体外增殖的抑制率达 78.4%, 再次是直接灭活作用, 抑制率达 74.4%, 且抑制率与浓度呈正相关。其中朱砂七多糖 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 TGEV 的预防作用比利巴韦林的要好, 而体外增殖抑制作用和直接灭活作用相对利巴韦林的较弱。

2.3 qRT-PCR 检测朱砂七对 TGEV 的抑制作用

2.3.1 N 基因的 PCR 扩增结果

PCR 结果如图 2 所示, 条带大小与设计的 TGEV N 基因产物(109 bp)基本一致, 且无非特异性条带和引物二聚体, 因此, 引物可用于后续实验。

2.3.2 qRT-PCR 结果

qRT-PCR 结果如图 3 和图 4 所示。由图 3 可知, 细胞样品经 qRT-PCR 检测后得到的溶解曲线中目标基因(TGEV N 基因)与内参基因(β -actin)均为单一峰, 说明引物特异性较好, 没有出现非特异性扩增。

由图 4 可知, 3 种给药方式下朱砂七多糖均能在转录水平显著降低 TGEV N mRNA 相对表达水平, 与病毒对照组相比差异极显著($P < 0.01$), 其中朱砂七多糖 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在各实验组有最好的预防作

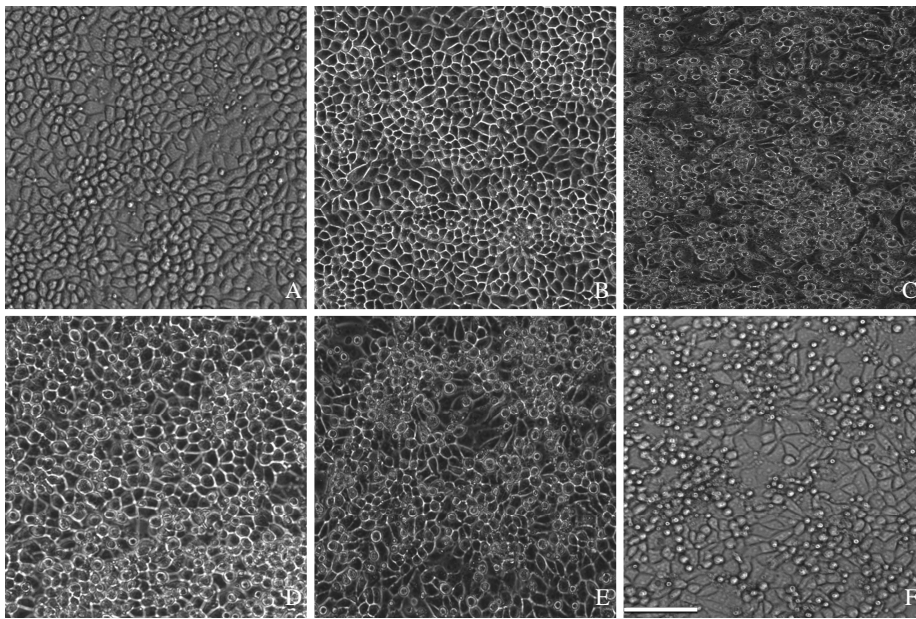


图 1 体外培养 72 h 对 ST 细胞形态学的影响

Figure 1 The influence to ST cell morphology after 72 h *in vitro* culture

A: 细胞对照组, 细胞呈多角形或短梭形, 大小均匀; B: 朱砂七多糖 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组, 细胞结构完整且大小均匀, 细胞折光性良好, 无破碎死亡现象; C: 病毒对照组, 细胞失去正常形态, 基本全部脱离单层; D: 朱砂七多糖 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 先加药后接毒组, 细胞形态比较饱满, 数量较多, 折光性较好; E 朱砂七多糖 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 先接毒后加药组, 细胞形态不够饱满, 数量减少, 折光性略差; F: 朱砂七多糖 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物和病毒混合感作组, 细胞部分脱离单层, 数量明显减少; 标尺: 100 μm

A: Cell control group, cells were polygonal or short spindle with uniform size; B: PCP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, ST cells owned uniform size and good refraction, without cell quassation and death; C: Virus control group, no normal cell morphology and almost all cells departed from the monolayer; D: Virus infection after PCP of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, a great quantity cells could be seen, and they owned good shape and refraction; E: Virus infection before PCP of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, ST cells were not full as before, the number decreased, with bad refraction; F: PCP of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -virus mixed group, some cells departed from the monolayer, cell number decreased obviously; Bar: 100 μm

表1 不同浓度朱砂七多糖对TGEV的抑制结果/%

Table 1 The inhibition results of different concentrations of PCP on TGEV

给药方式 Means of administration	PCP (20 $\mu\text{g/mL}$) (PCP20)	PCP (10 $\mu\text{g/mL}$) (PCP10)	PCP (5 $\mu\text{g/mL}$) (PCP5)	PCP (2.5 $\mu\text{g/mL}$) (PCP2.5)	RBV (1 $\mu\text{g/mL}$) (RBV1)	细胞对照 Cell control	病毒对照 Virus control
先给药后接毒 Virus infection after Adm	85.2	80.1	61.2	52.6	75.8	100.00	0.00
先接毒后给药 Virus infection before Adm	78.4	62.5	47.2	23.5	82.3	100.0	0.00
药毒混合感作 Infected with virus and drug	74.4	53.1	39.2	21.9	91.9	100.0	0.00

PCR: 朱砂七多糖; RBV: 利巴韦林, 下同

PCP: *Polygonum cillinerve* polysaccharide; RBV: Ribavirin, the same below

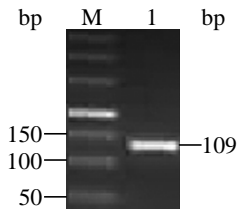


图2 TGEV N基因的PCR结果

Figure 2 Amplification results of PCR of N gene

M: DNA 分子量标准DL500; 1: 扩增产物

M: DNA marker DL500; 1: PCR products

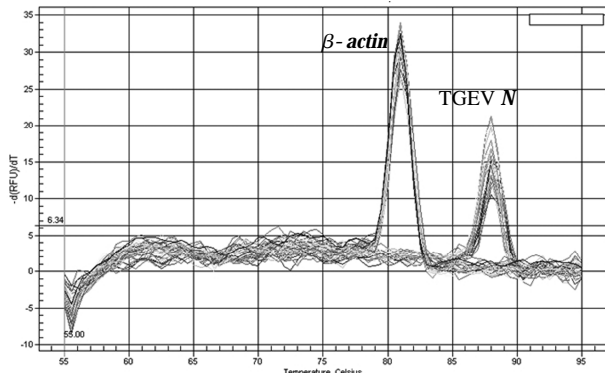


图3 样品检测的qRT-PCR的溶解曲线

Figure 3 qRT-PCR melt curves of samples

用,但直接灭活作用和抑制作用相对利巴韦林较弱。经SPSS软件差异性分析,朱砂七多糖的3个不同浓度20、10和5 $\mu\text{g/mL}$ 实验组间存在显著性差异($P < 0.05$),说明朱砂七多糖作用呈剂量依赖性,浓度越高,抑制作用越强。

3 讨论

TGEV属于冠状病毒属,为单股正链RNA病

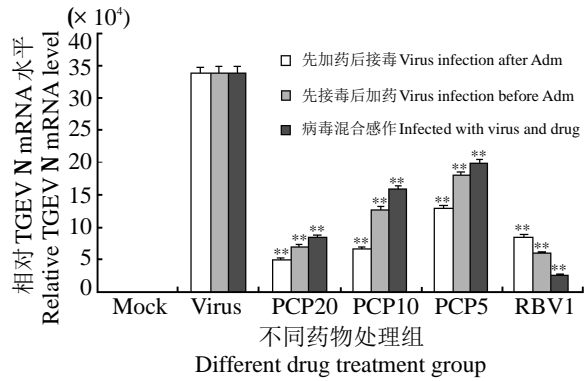


图4 TGEV N基因 qRT-PCR检测结果

Figure 4 N gene detection of TGEV by qRT-PCR

Mock: 细胞对照组; Virus: 病毒对照组; PCP20、PCP10、PCP5和RBV1: 见表1; **: 与病毒对照组相比差异极显著($P < 0.01$); 内参基因: β -actin; n=3

Mock: Control group; Virus: Virus control group; PCP20, PCP10, PCP5 and RBV1: See table 1; **: Very significant difference compared with virus control ($P < 0.01$); Reference gene: β -actin; n=3

毒,是一种多形性有囊膜的病毒(Enjuanes et al., 2003)。近年有关TGEV致病机制的研究多数集中在其结构蛋白的研究方面,如TGEV核壳体蛋白诱导的细胞周期阻滞和细胞凋亡(Ding et al., 2014),通过表达和shRNA干扰发现,TGEV开放阅读框ORF7能调节TGEV的毒力(He et al., 2012)。有研究表明,氯化锂(LiCl)可能成为一种抗TGEV的强有力因子(Ren et al., 2011),使用生化和病毒学方法筛选出的一种特定苯丙噻唑小分子化合物能够抑制TGEV3CL蛋白质的活动,通过抑制病毒蛋白的合成和RNA的复制来发挥抗TGEV作用(Yang et al., 2007)。对猪源益生菌体外抗TGEV作用的研

究表明, 益生菌及其代谢产物均能够抑制 TGEV 感染细胞, 不同菌株不同作用方式对 TGEV 感染细胞的抑制作用也不同, 其中益生菌预防作用效果最好, 而对病毒抑制作用最弱(高长春等, 2013)。近年来中草药因其在抗病毒作用方面的优势已越来越受到重视, 从中草药中寻找具有抗病毒活性成分也具有重要的意义(褚秀玲等, 2009)。目前中草药抗 TGEV 活性也有相应的一些研究。木犀草素(luteolin)对猪传染性胃肠炎病毒具有一定的体外抑制作用, 3 种不同方式给药及给药时间不同都对 TGEV 有较好的增殖抑制作用(龚国清等, 2005)。姜成刚等(2004; 2005)采用体外实验系统地研究并筛选出抗 TGEV 的有效单味中草药, 结果显示, 板蓝根(*Isatis indigotica*)、鱼腥草(*Herby houttuynia*)和败酱草(*Patrinia scabiosaefolia*)有明显的抑制 TGEV 的效果, 优于大青叶和连翘, 其中板蓝根、鱼腥草和败酱草所组成的复方制剂中鱼腥草和败酱草组合具有最佳抗 TGEV 的作用。雷用东等(2012; 2013)研究了接骨木花色苷和紫甘薯花色苷体外抗猪传染性胃肠炎病毒 TGEV 的活性, 发现这两种花色苷对 TGEV 的预防效果比治疗效果更明显, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的接骨木花色苷抗 TGEV 的活性最大, 紫甘薯花色苷在 20~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内对 TGEV 有很好的抗病毒功效, 且抑制程度呈剂量依赖性。

已有研究表明, 中药多糖具有较好的抗病毒作用, 如板蓝根多糖对猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV)具有体外复制的抑制作用(Wei et al., 2011); 经硫酸化修饰后的黄芪多糖可显著抑制传染性法氏囊病毒(*Infectious bursal disease virus*)对鸡胚成纤维细胞(CEF)的感染(Huang et al., 2008); 银耳多糖可抑制新城疫病毒(*Newcastle disease virus*)对鸡胚成纤维细胞的影响(Zhao et al., 2011); 印度楝多糖具有体外抗脊髓灰质炎病毒(*Poliovirus*)的活性(Faccin- Galhardi et al., 2012)。而有关朱砂七多糖体外抗病毒的研究尚未见资料报道, 利巴韦林是人工合成的一种广谱强效抗病毒药物, 能在一定程度上抑制病毒的感染(Rotman et al., 2014; Zeuzem et al., 2014)。因此本研究以利巴韦林为抗病毒药物对照, 采用 MTT 法和 qRT-PCR 通过 3 种给药方式研究朱砂七多糖的体外抗 TGEV 作用。MTT 法结果显示, 朱砂七多糖对 ST 细胞的最大无毒浓度(TC_0)为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 最大安全浓度(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

时, 对 TGEV 的抗吸附作用最好, 抑制率达 85.2%, 其次是对体外增殖的抑制作用, 抑制率达 78.4%, 再次是直接灭活作用, 抑制率达 74.4%, 且抑制率与浓度呈正相关。qRT-PCR 证实, 朱砂七多糖 3 种给药方式均能在转录水平显著降低 TGEV *N* mRNA 相对表达量, 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$), 与 MTT 法结果相吻合。与利巴韦林组相比, 朱砂七多糖 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 TGEV 的预防作用较好, 而体外增殖抑制作用和直接灭活作用效果不及利巴韦林。

本研究结果显示, 朱砂七多糖对 TGEV 在 ST 细胞上增殖有抑制作用, 其中以先加药后接毒给药的预防作用效果最佳。朱砂七多糖可能是在 TGEV 复制初期通过阻断病毒繁殖过程中的吸附、穿入、复制、成熟中的环节来抑制病毒的复制, 但有关朱砂七多糖体外抑制 TGEV 的具体作用机制尚需进一步研究。

4 结论

朱砂七多糖可抑制 TGEV 在 ST 细胞上的增殖, 不同给药方式下抑制作用有所差异, 以先加药后接毒给药的预防作用效果最佳。本研究结果初步证实了朱砂七多糖具有体外抗猪传染性胃肠炎病毒作用, 为朱砂七资源的开发和综合利用提供了依据。

参考文献

- 褚秀玲, 苏建青, 韦旭斌. 2009. 中药抗病毒最新研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 28(2): 26-28. (Chu X L, Su J Q, Wei X B. 2009. Advances in antiviral effects of traditional Chinese medicines[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 28(2): 26-28.)
- 崔军见, 原江锋, 张志琪. 2007. 朱砂七粗多糖的提取及生物活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 19: 960-964. (Cui J J, Yuan J F, Zhang Z Q. 2007. Extraction and biological activity of crude polysaccharide from *Polygonum ciliinerve*[J]. Natural Product Research and Development, 19: 960-964.)
- 董玲娟, 张彦明, 何雷, 等. 2012. 猪传染性胃肠炎病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 40(20): 13-19. (Dong L J, Zhang Y M, He L, et al. 2012. Establishment of RT-PCR for *Transmissible gastroenteritis virus*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 40(20): 13-19.)

- 高长春, 邓玲玲, 尹鑫, 等. 2013. 猪源益生菌体外抗猪传染性胃肠炎病毒作用的研究[J]. 中国预防兽医学报, 35(9): 715-719. (Gao C C, Deng L L, Yin X, et al. Effect of probiotics from porcine gastrointestinal tract on inhibition of *Transmissible gastroenteritis coronavirus*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 35(9): 715-719.)
- 龚国清, 龚国华, 钱之玉, 等. 2005. 木犀草素对猪传染性胃肠炎病毒的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 36(5): 453-456. (Gong G Q, Gong G H, Qian Z Y, et al. 2005. Inhibitory activity of luteolin against *Transmissible gastroenteritis virus*[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 36(5): 453-456.)
- 郭惠玲, 赵琦, 田小平, 等. 2006. 朱砂七抑制流感病毒A的试验研究[J]. 陕西中医. 27(3): 351-353. (Guo H L, Zhao Q, Tian X P, et al. 2006. Inhibition action of Zhusha qi on *Influenza virus* A[J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 27(3): 351-353.)
- 姬丽娜, 张为民, 卿素珠, 等. 2013. 朱砂七多糖的提取分离及体外抑菌试验[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 04: 117-119. (Ji L N, Zhang W M, Qing S Z, et al. 2013. The extraction and separation of *Polygonum cillinerve* polysaccharide and antibacterial experiment *in vitro*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 04: 117-119.)
- 姜成刚, 张秀英, 龙忠臣. 2004. 中药复方制剂抗猪传染性胃肠炎病毒活性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 35(5): 587-589. (Jiang C G, Zhang X Y, Long Z C. 2004. Study on activity of antiviral and mechanism of action of complex prescription of Chinese herbal medicine on transmissible gastroenteritis of swine[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 35(5): 587-589.)
- 姜成刚, 张秀英, 龙忠臣. 2005. 中药抗猪传染性胃肠炎病毒活性及作用机理观察[J]. 中国兽医杂志, 41(8): 31-32. (Jiang C G, Zhang X Y, Long Z C. 2005. Study of activity of antiviral and mechanism of action of Chinese herbal medicine on transmissible gastroenteritis of swine [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 41(8): 31-32.)
- 雷用东, 陈姗姗, 赵晓燕, 等. 2012. 紫甘薯花色苷制备及其抗猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)活性的初探[J]. 食品工业科技, 33: 349-352. (Lei Y D, Chen S S, Zhao X Y, et al. 2012. Preparation and anti-TGEV activity of anthocyanin from purple sweet potato[J]. Science and Technology of Food Industry, 33(21): 349-352.)
- 雷用东, 王丹, 赵晓燕. 2013. 接骨木花色苷组成及抗猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)活性分析[J]. 农业生物技术学报, 21(10): 1185-119. (Lei Y D, Wang D, Zhao X Y. 2013. The anthocyanin profiles from *Sambucus william-sii* Hance and analysis of its anti-*Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) activity[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 21(10): 1185-1192.)
- 刘西京, 张恩户, 郭惠玲. 2003. 朱砂七研究概况[J]. 陕西中医学院学报, 26(3): 62-63. (Liu X J, Zhang E H, Guo H L. 2003. Review of study on Zhu sha qi[J]. Journal of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, 26(3): 62-63.)
- 全国中草药汇编编写组. 1996. 全国中草药汇编(上册)[G]. 北京: 人民卫生出版社, pp. 383. (Compile Group of Complication of Countrywide Herbal Medicine of China. 1996. Complication of Countrywide Herbal Medicine of China (volume one)[G]. People's Medical Publishing House, Beijing, China, pp. 383.)
- 王劲, 朱小丽, 朱晓琳, 等. 2013. 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)福建分离株核衣壳蛋白基因(N)的克隆与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 21(1): 112-119. (Wang S, Zhu X L, Zhu X L, et al. 2013. Cloning and expression analysis of nucleocapsid protein-encoding gene (N) from porcine *Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) Fujian strain[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 21(1): 112-119.)
- 王晓梅, 李宗孝, 任莉君. 2010. 朱砂七多糖的抗氧化作用研究[J]. 安徽农业科学, 38(34): 19346-19347. (Wang X M, Li Z X, Ren L J. 2010. The antioxidant effect research of *Polygonum cillinerve* polysaccharide[J]. Anhui Agriculture Sciences, 38(34): 19346-19347.)
- 吴国平, 尹燕博, 吴时友. 2003. 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)研究进展[J]. 中国兽医杂志, 39(2): 29-32. (Wu G P, Yin Y B, Wu S Y. 2003. Research progress on porcine *Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 39(2): 29-32.)
- 殷震, 刘景华. 1997. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, pp. 439-440. (Yin Z, Liu J H. 1997. Animal Virology[M]. Science Press, Beijing, China, pp. 439-440.)
- 詹亚华. 1994. 中国神农架中药资源[M]. 武汉: 湖北人民出版社, pp. 410. (Zhan Y H. 1994. Traditional Chinese Medicine Resource of Shennongjia[M]. Hubei Peoples' Publishing House, Wuhan, China, pp. 410.)
- 张为民. 2010. 太白蓼和朱砂七提取物抗病毒及抑菌活性研究[D]. 博士学位论文, 西北农林科技大学, 导师: 张彦明, pp. 66-68. (Zhang W M. 2010. Study on antiviral and antibacterial activity of extract from *Polygonum taibaishanense* and *Polygonum cillinerve*[D]. Dissertation for Ph.D., Northwest A & F University, Supervisor:

- Zhang Y M, pp. 66-68.)
- 张为民, 张彦明, 郭抗抗, 等. 2011. 朱砂七提取物体外抑菌和抗病毒活性部位筛选[J]. 中国兽医学报, 31(5): 710-714. (Zhang W M, Zhang Y M, Guo K K, et al. 2011. Active site selection of *Polygonum taibaishanense* Kung extractives inhibiting bacterial and NDV *in vitro*[J]. Journal of Chinese Veterinary Medicine, 31(5): 710-714.)
- 赵勤, 冯宝平, 朱萱萱, 等. 2012. 朱砂七总蒽醌体外抗单纯疱疹病毒的研究[J]. 西北药学杂志, 27(6): 548-550. (Zhao Q, Feng B P, Zhu X X, et al. 2012. Study on the anti-HSV activity of total anthraquinone from Zhushaqui *in vitro*[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 27(6): 548-550.)
- Cui J J, Yuan J F, Zhang Z Q. 2010. Anti-oxidation activity of the crude polysaccharides isolated from *Polygonum cillinerve* (Nakai) Ohwi in immune suppressed mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 132(2): 512-517.
- Ding L, Huang Y, Qian D, et al. 2014. TGEV nucleocapsid protein induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 signaling[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 445(2): 497-503.
- Enjuanes L, Almazan F, Ortego J. 2003. Virus-based vectors for gene expression in mammalian cells: *Coronavirus*[J]. New Comprehensive Biochemistry, 38: 151-168.
- Faccin-Galhardi L C, Yamamoto K A, Ray S, et al. 2012. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for *Poliovirus*[J]. Journal of Ethnopharmacol, 142(1): 86-90.
- Gu J P, Yue X W, Xing R, et al. 2012. Progress in genetically engineered vaccines for *Porcine transmissible gastroenteritis virus*[J]. Revue de Medecine Veterinaire, 163(3): 107-111.
- He L, Zhang Y M, Dong L J, et al. 2012. *In vitro* inhibition of *Transmissible gastroenteritis corona virus* replication in swine testicular cells by short hairpin RNAs targeting the *ORF7* gene[J]. Virology Journal, 9(1): 1-9.
- Huang X Y, Wang D Y, Hu Y L, et al. 2008. Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infectious bursal disease virus[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 42: 166-171.
- Mason H S, Herbst-Kralovetz M M. 2012. Plant-derived antigens as mucosal vaccines[J]. Mucosal Vaccines, 354: 101-120.
- Ren X F, Meng F D, Yin J C, et al. 2011. Action mechanisms of lithium chloride on cell infection by *Transmissible gastroenteritis coronavirus*[J]. PloS one, 6(5): e18669.
- Rotman Y, Noureddin M, Feld J J, et al. 2014. Effect of ribavirin on viral kinetics and liver gene expression in chronic hepatitis C[J]. Gut Online, 63(1): 161-169.
- Wei Z Y, Wang X B, Zhang H Y, et al. 2011. Inhibitory effects of indigowoad root polysaccharides on *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* replication *in vitro*[J]. Antiviral Therapy, 16(3): 357-63.
- Yang C W, Yang Y N, Liang P H, et al. 2007. Novel small-molecule inhibitors of *Transmissible gastroenteritis virus* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(11): 3924-3931.
- Zeuzem S, Jacobson I M, Baykal T, et al. 2014. Retreatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin[J]. New England Journal of Medicine, 370(17): 1604-1614.
- Zhao X N, Hu Y L, Wang D, et al. 2011. Optimization of sulfated modification conditions of *Tremella* polysaccharide and effects of modifiers on cellular infectivity of NDV[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 49(1): 44-49.