

泽泻提取物中萜类单体 V-54 对小 RNA 病毒增殖的抑制效应

王丽春¹ 廖芸¹ 龙润乡¹ 王晶晶¹ 刘龙丁¹ 陈纪军² 李琦涵¹

【摘要】目的 探讨泽泻提取物中提取的萜类衍生物单体 V-54 对小 RNA 病毒感染增殖的抑制效应及其生物学机理。方法 采用 KMB17 细胞,分别感染 HAV-H、PV- 和 Cox-B2 病毒,经 V-54 处理后检测病毒滴度,分析 PV- 和 Cox-B2 病毒增殖抑制的动力学及 V-54 对 KMB17 细胞凋亡的影响。结果 V-54 可抑制 3 种病毒在 KMB17 细胞上增殖,PV- 和 Cox-B2 病毒感染滴度比未处理组明显降低,V-54 对两种病毒的抑制作用呈剂量依赖性。作用 24 h 内,V-54 可使 KMB17 细胞凋亡率明显增加,随后逐渐恢复正常。结论 V-54 可抑制特定的小 RNA 病毒的感染增殖,其机制可能为 V-54 分子结合到细胞表面的相关受体,导致病毒感染效率降低。

【关键词】泽泻;萜类衍生物;V-54;病毒感染;抗病毒作用

Inhibitory Effect of Terpene Derivative V-54 from *Alisma orientalis* Extract on Replication of Picornaviridae Viruses

WANG Li-chun[△], LIAO Yun, LONG Run-xiang, et al ([△]*Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China*)

【Abstract】 **Objective** To investigate the inhibitory effect of terpene derivative V-54 from *Alisma orientalis* extract on the replication of picornaviridae viruses as well as mechanism of the effect. **Methods** KMB17 cells were infected with hepatitis A virus H strain (HAV-H), poliovirus Sabin (PV-) and coxsackievirus B2 strain (Cox-B2) respectively, then treated with V-54 and determined for virus titers, based on which the dynamics of inhibitory effects on replication of PV- and Cox-B2 as well as influence of V-54 on apoptosis of KMB17 cells were analyzed. **Results** V-54 inhibited the replication of HAV-H, PV- and Cox-B2 in KMB17 cells. The titers of PV- and Cox-B2 in KMB17 cells treated with V-54 decreased significantly as compared with those untreated. The inhibitory effects of V-54 on replications of PV- and Cox-B2 were dose-dependent. The apoptosis rates of KMB17 cells increased significantly within 24 h after treatment with V-54, then decreased to normal level gradually. **Conclusion** V-54 inhibited the infection and replication of picornaviridae viruses by a potential mechanism of binding to the relevant receptors on cell surface and resulting in the decrease of virus infection efficacy.

【Key words】 *Alisma orientalis*; Terpene derivative; V-54; Virus infection; Antiviral effect

在具有抗病毒作用的植物药中,针对多种化合物单体的药效分析为寻找有效抗病毒组分提供了大量的资料^[1-3],并对这些化合物的药理学性质有了进一步认识^[4-6]。随着研究的深入,人们已有可能通过病毒在感染过程中与细胞的相互作用来寻找可能的抗病毒药物^[7,8]。

本研究前期从植物药泽泻中分离到多个单体化合物。这些化合物中的某些单体在不同病毒感染的不同环节上发挥相应的药理作用,其中一种萜类衍生物单体 V-54 能够在小 RNA 病毒吸附细胞受体的过程中发挥相应药理作用,表现出一定的抗病毒增殖效应。尽管这种作用的分子机理尚有待进一步探

索,但其所表现出的药学特性,为认识相关化合物在阻断病毒与受体间相互作用的生物学特点提供了线索。

本文利用 HAV-H、PV- 和 Cox-B2 病毒在细胞感染过程中的变化,分析 V-54 对小 RNA 病毒增殖的抑制作用及可能的作用机制,现将结果报道如下。

1. 材料与方法

1.1 细胞及病毒

人二倍体细胞 KMB17(23 ~ 28 代)、甲型肝炎疫苗病毒 H 株(Hepatitis A virus, HAV-H)、脊髓灰质炎病毒疫苗减毒株 型(Poliiovirus Sabin, PV-)和柯萨奇病毒 B2 株(Coxsackievirus, Cox-B2)均为中国医学科学院北京协和医学院医学微生物学研究所保存。

1.2 主要试剂及仪器

泽泻提取物 V-54 单体由中国科学院昆明植物

基金项目:国家自然科学基金资助(30670094, 30570081)。

作者单位:1 中国医学科学院 北京协和医学院 医学微生物学研究所(昆明 650118) 2 中国科学院昆明植物学研究所(昆明 650204)。

通讯作者:李琦涵, E-mail: qihanli@21cn.com

学研究所陈纪军教授惠赠 ;DMEM 培养基和牛血清均为美国 GIBCO 公司产品 碘化丙啶(PI)和流式细胞仪均为美国 BD 公司产品 ;其他常规化学试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 细胞培养

KMB17 细胞培养于含 10%小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基中 ,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内常规传代培养。

1.4 V-54 对 HAV-H、PV- 及 Cox-B2 病毒增殖影响的检测

将 3 logCCID₅₀/ml HAV-H 和 6 logCCID₅₀/ml 的 PV- 及 6 logCCID₅₀/ml 的 Cox-B2 分别感染 KMB17 细胞 ,置 37℃ 5% CO₂ 温箱内孵育 2 h ;更换含 1 μg/ml V-54 的维持液 ,再置 35℃ 5% CO₂ 温箱内继续培养 12 ~ 96 h ,同时设空白细胞对照和 DMSO 处理对照。ELISA 法检测 HAV 抗原滴度 ,微量滴定法检测 PV- 及 Cox-B2 病毒滴度。

1.5 V-54 对 PV- 和 Cox-B2 病毒增殖抑制的动力学分析

以 6 logCCID₅₀/ml 的 PV- 和 6 logCCID₅₀/ml 的 Cox-B2 分别感染 KMB17 细胞 ,置 37℃ 5% CO₂ 温箱内孵育 2 h ;更换含 1 μg/ml V-54 的维持液 ,再置 35℃ 5% CO₂ 温箱内继续培养 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h ,收集病毒上清 ,微量滴定法检测 PV- 及 Cox-B2 的病毒滴度 ,并绘制病毒增殖动力曲线。

1.6 不同剂量 V-54 对 PV- 和 Cox-B2 病毒抑制效应的分析

以 6 logCCID₅₀/ml 的 PV- 和 Cox-B2 分别感染 KMB17 细胞 ,置 37℃ 5% CO₂ 温箱内孵育 2 h ;分别更换含 0.5、1、5、10、50、100 和 1 000 μg/ml V-54 的维持液 ,同时设空白细胞对照和 DMSO 处理对照。继续培养 96 h ,微量滴定法检测 PV- 及 Cox-B2 的病毒滴度。

1.7 V-54 不同处理方式对 HAV-H 增殖影响的检测

预处理组 :先以 1 μg/ml V-54 处理 KMB17 细胞 ,再以 3 logCCID₅₀/ml HAV-H 进行感染 ;共处理组 :以相同浓度 V-54 与 HAV-H 共同孵育后 ,再感染 KMB17 细胞。同时设空白细胞对照和 DMSO 处理对照。各组分别于 35℃ 5% CO₂ 温箱内培养 96 h ,ELISA 法检测 HAV 的抗原滴度。

1.8 V-54 对 KMB17 细胞凋亡影响的检测

采用流式细胞术。取指数生长期的 KMB17 细胞 ,用 1 μg/ml V-54 作用 4、8、12、24、36、48、72 h 后 ,常规消化收集细胞 ,1 000 r/min 离心 5 min ,PBS 洗涤 2 次 ,重悬细胞于 PBS 中 ,调整细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/ml 加 RNase 及 PI 4℃避光染色 30 min ,上机检测。激发波长 488 nm ,检测 10 000 个细胞 ,用 Flowjo 软件分析。

2. 结果

2.1 V-54 对不同小 RNA 病毒增殖的抑制效应

检测结果显示 ,1 μg/ml 的 V-54 可抑制 HAV-H、PV- 和 Cox-B2 病毒在 KMB17 细胞上的增殖 ,见图 1。

2.2 V-54 对 PV- 和 Cox-B2 病毒增殖的影响及其抑制动力学分析

PV- 和 Cox-B2 病毒感染 KMB17 细胞后 ,经 V-54 处理不同时间的病毒滴度与未处理组比较 ,明显降低 ,而不同剂量的 V-54 对这两种病毒的抑制效应均呈剂量依赖性 ,见图 2。

2.3 V-54 不同处理方式对 HAV-H 增殖的影响

V-54 两种处理方式均可抑制 HAV-H 在 KMB17 细胞内增殖 ,且抑制效果相当 ,见图 3。

2.4 V-54 对 KMB17 细胞凋亡的影响

1 μg/ml V-54 作用 24 h 内 ,KMB17 细胞凋亡率明显增加 ,随后逐渐恢复正常 ,见图 4。

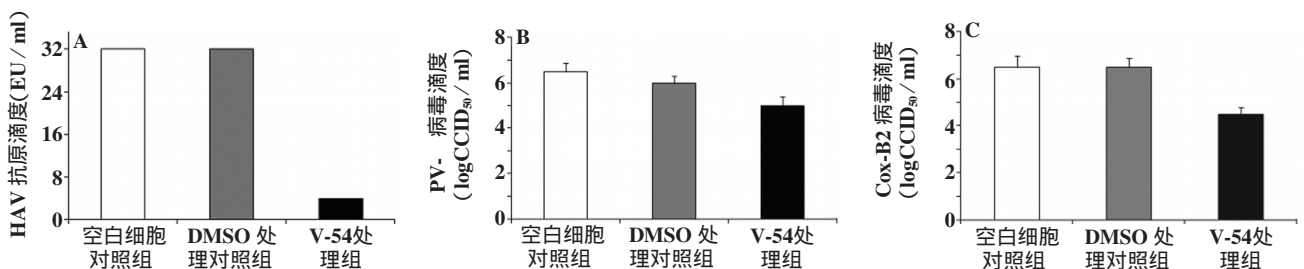


图 1 V-54 对 HAV-H(A)、PV- (B)和 Cox-B2(C)增殖的抑制效应

Fig 1. Inhibitory effects of V-54 on replications of HAV-H (A), PV- (B) and Cox-B2 (C)

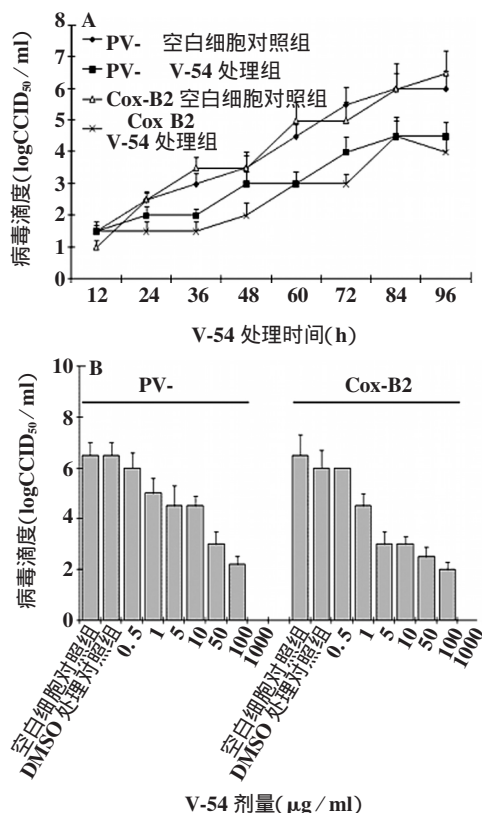


图 2 V-54 对 PV- 和 Cox-B2 病毒抑制动力学 (A) 及量效分析 (B)

Fig 2. Inhibition dynamic (A) and dose-effect analysis (B) of V-54 on PV- and Cox-B2

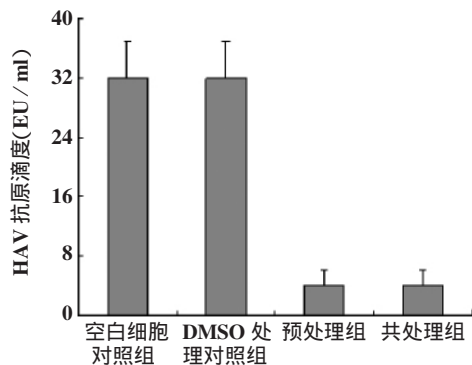


图 3 V-54 不同处理方式对 HAV-H 增殖的影响
Fig 3. Effect of methods for treatment with V-54 on replication of HAV-H

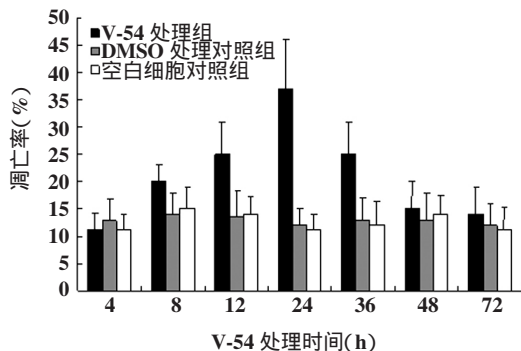


图 4 V-54 对 KMB17 细胞凋亡的影响
Fig 4. Effect of V54 on apoptosis of KMB-17 cells

3. 讨论

在本实验中,经 V-54 在有效浓度下处理细胞后,可明显抑制 HAV-H 株的增殖,提示 V-54 能有效阻断 HAV-H 与相应受体结合,并借此进入细胞,从而阻断其感染。同时,以非毒性浓度 V-54 处理细胞 24 h 内,细胞凋亡比例明显增加,提示 V-54 可能与细胞表面的相关受体结合,并对细胞产生相关的信号刺激。

但在本实验中,V-54 对 PV- 和 Cox-B2 病毒的抑制效应不如对 HAV-H 的抑制效应明显,原因可能是实验使用的 PV- 和 Cox-B2 病毒滴度较高,V-54 的非毒性浓度无法达到完全抑制这一剂量的需要。V-54 是通过阻断病毒与受体结合而发挥作用的,因此可能存在一个作用剂量的平台期。其次,V-54 对 PV- 和 Cox-B2 病毒的作用可能与 HAV-H 不同,V-54 是阻断病毒与受体的结合,而 PV- 和 Cox-B2 所结合的受体与 HAV-H 亦不同。因此,这方面的工作还需进一步探讨。V-54 在本实验中所显现的针对几种小 RNA 病毒的增殖抑制效应,为其抗病毒作用的深入研究提供了依据。

参考文献

- [1] Andersen DO, Weber ND, Wood SG, et al. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res*, 1991, 16 (2): 185-196.
- [2] Jiang ZY, Zhang XM, Zhang FX, et al. A new triterpene and anti-hepatitis B virus active compounds from *Alisma orientalis*. *Planta Med*, 2006, 72 (10): 951-954.
- [3] Lee Ngan H, Ho John W. Celastrol and terpenes as anti-infective agents. *Anti Infect Agents Med Chem*, 2008, 7 (2): 97-100.
- [4] Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, et al. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002, 97 (4): 541-546.
- [5] Lopez A, Hudson JB, Towers GH. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Ethnopharmacol*, 2001, 77(2-3): 189-196.
- [6] Pompei R, Laconi S, Ingiani A. Antiviral properties of glycyrrhizic acid and its semisynthetic derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9 (8): 996-1001.
- [7] Rajbhandari M, Wegner U, Jülich M, et al. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *J Ethnopharmacol*, 2001, 74 (3): 251-255.
- [8] Liu ZM, Yang YS, Wang XL, et al. Recent progress on anti-HIV research of traditional Chinese medicine and components. *Chin J Chin Material Med*, 2006, 31 (21): 1753-1758.