

硫酸酯化酵母 β -葡聚糖对 H1N1 猪流感病毒血凝作用和 mRNA 转录的影响

孙英峰^{1,2}, 王利丽¹, 路超¹, 李秀丽¹, 张莉¹, 杨春蕾¹, 冯婧¹, 任卫科¹, 田向学¹

(1. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112; 2. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要: 为研究硫酸酯化酵母 β -葡聚糖对流感病毒血凝抑制作用及对 mRNA 转录的影响, 以猪流感病毒 A/tianjin/1/TJ2(H1N1) 感染 MDCK 细胞为模型, 采用血凝抑制试验(HI)及 SYBR Green Real-time PCR 方法, 探索硫酸酯化酵母 β -葡聚糖对流感病毒血凝抑制作用及其对 mRNA 转录影响。结果显示, 硫酸酯化酵母 β -葡聚糖在浓度超过 1.25 mg/mL 时, 能对猪流感病毒血凝产生抑制作用, 且在 5 mg/mL 时对猪流感病毒 mRNA 转录具有抑制作用。因此, 硫酸酯化酵母 β -葡聚糖具有抑制流感病毒在 MDCK 细胞复制的作用, 其作用机制可能与抑制流感病毒 HA 靶点及影响 mRNA 转录有关。

关键词: 硫酸酯化酵母 β -葡聚糖; H1N1; 血凝作用; mRNA 转录

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)01-0015-04

doi: 10.7668/hbnxb.2015.01.003

Effect of Sulfated Yeast β -glucan on Hemagglutination and mRNA Transcription of H1N1 Swine Influenza Virus *in vitro*

SUN Ying-feng^{1,2}, WANG Li-li¹, LU Chao¹, LI Xiu-li¹, ZHANG Li¹,
YANG Chun-lei¹, FENG Jing¹, REN Wei-ke¹, TIAN Xiang-xue¹

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin 300112, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: To study the effect of sulfated yeast β -glucan on mRNA transcription and hemagglutination of H1N1 swine influenza virus *in vitro*, influenza virus infected MDCK was taken as model, SYBR Green Real-time PCR and HI test was replication adopted to measure the effect of sulfated yeast β -glucan on mRNA transcription and hemagglutination. The results showed that the sulfated β -glucan could inhibit the hemagglutination at the concentration of over 1.25 mg/mL, while it could inhibit influenza virus's mRNA transcription at the concentration of 5 mg/mL. Sulfated yeast β -glucan had the ability to inhibit reproduction of H1N1 SIV *in vitro*, and the ability to inhibit hemagglutination and mRNA transcription may be targets of sulfated yeast β -glucan to anti-SIV.

Key words: Sulfated β -glucan; H1N1 SIV; Hemagglutination; mRNA transcription

猪流感(Swine influenza, SI)是由正黏病毒科 A 型流感病毒引起的一种急性、热性和高度接触性呼吸道传染病,临床上以突发高热、咳嗽、呼吸困难、精神沉郁、发病率高及继发混合感染等为特征^[1],给养猪业和人类健康带来严重的危害。2009 年人类甲型流感大流行,其病毒来源于猪 A 型(H1N1)流感病毒,造成了较为严重的社会公共卫生问题。

目前,我国批准上市使用的抗流感病毒药物包

括 M2 蛋白离子通道抑制剂和神经氨酸酶抑制剂 2 种,其中 M2 蛋白离子通道抑制剂会产生神经毒性,主要症状包括头晕、不安、失眠等;神经氨酸酶抑制剂具有头疼、气管炎、恶心呕吐和腹泻等副作用,且该 2 种抗病毒药物易产生耐药性^[2],因此,亟需研究开发一种新型高效且无毒副作用的药物。

近年来,酵母 β -葡聚糖因具有增强免疫活力、抗肿瘤活性、降低胆固醇和血脂等多种药理作用而

收稿日期:2014-10-13

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(12JCYBJC20100)

作者简介:孙英峰(1979-),男,山东新泰人,助理研究员,在读博士,主要从事动物传染病防治研究。

成为当今新药研究与开发的热点^[3-5]。通过化学修饰的方法可以提高其功效,其中经硫酸化修饰后,会使其活性改变,尤其是在抗病毒方面,一些无抗病毒作用的多糖经硫酸化修饰后具有了抗病毒活性^[6-7]。笔者在开展前期研究过程中发现,硫酸酯化酵母 β -葡聚糖具有抗猪流感病毒活性。为进一步阐明其抗病毒机制,本研究采用血凝抑制试验及 SYBR Green Real-time PCR 方法,检测硫酸酯化酵母 β -葡聚糖对流感病毒吸附细胞及 mRNA 转录的影响,为其开发成新型抗病毒药物奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞和毒株

MDCK 细胞由天津市畜牧兽医研究所实验室传代保存; H1N1 猪流感病毒 A/tianjin/1/TJ2 株由天津市畜牧兽医研究所猪病研究室分离并鉴定。

1.2 药物和试剂

硫酸酯化酵母 β -葡聚糖由天津市畜牧兽医研究所猪病研究室前期制备。阳性对照药物利巴韦林(100 mg/mL)为天津药业焦作有限公司产品,工作浓度为 10 mg/mL。

1.3 药物细胞毒性试验

试验参照 Zhong 等^[8]建立的方法,具体步骤如下:96 孔细胞板加入 MDCK 细胞(4×10^3 细胞/孔),100 μ L/孔,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 至单层细胞。用 EMEM 将药物及利巴韦林进行 2 倍系列稀释后,加入培养板中,100 μ L/孔,重复 6 孔,同时设空白对照,5% CO_2 培养 48 h 后,弃培养液上清,加入 5 mg/mL MTT 溶液 50 μ L/孔,继续培养 2~3 h 后,弃上清,PBS 洗 3 次,加入 MDSO 150 μ L/孔,振荡 5~10 min,待结晶完全溶解,测 OD 值。计算细胞存活率。细胞存活率 = 试验组 OD 值 / 细胞对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。采用 SPSS 软件的 Probit 回归法计算药物最大无毒浓度(TC_0)和半数毒性浓度(TC_{50})。

1.4 抗病毒作用试验分组

具体试验分组参照 Pourianfar 等^[9]的方法,分组加样步骤如下:

1.4.1 先加药物再加病毒组 96 孔细胞板加入 MDCK 细胞(4×10^3 细胞/孔),100 μ L/孔,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 至单层细胞。在接种病毒前,先将最大无毒浓度下系列稀释的药物加入 MDCK 细胞中孵育 12 h,然后将上清弃掉,用 PBS (pH 值 7.4)溶液洗涤 2 次,接种 100 TCID_{50} 猪流感病毒液,孵育 1 h。然后弃掉上清,加入 EMEM (含

2 μ g/mL 胰酶)。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 72 h,MTT 法测 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 值。

1.4.2 药物病毒混合同时加入细胞组 将等量 2 倍系列稀释的药物与 100 TCID_{50} 猪流感病毒液共同在 4 $^{\circ}$ C 作用 1 h,然后取上述作用后液体,接种融合单层 MDCK 细胞培养板(1×10^5 细胞/孔),置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中作用 1 h,然后弃掉上清,加入 EMEM (含 2 μ g/mL 胰酶)。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 72 h,MTT 法测 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 值。

1.4.3 先加病毒再加药物组 将 100 TCID_{50} 猪流感病毒液,接种融合单层 MDCK 细胞培养板(1×10^5 细胞/孔),37 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后,弃上清,加入 EMEM (含 2 μ g/mL 胰酶)和系列稀释药物,然后放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 72 h,MTT 法测 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 值。

1.5 血凝抑制试验(HI)

本研究采用血凝抑制试验来评估药物对流感病毒吸附细胞的影响。参照 WHO 手册(2002)制备 1% 标准鸡红细胞。将 25 μ L 四单位流感病毒液与等量倍比系列稀释药物(PBS,pH 值 7.4)混合,4 $^{\circ}$ C 作用 1 h,然后将 50 μ L 上述液体与等量 1% 鸡红细胞悬液混合,在室温下作用 1 h,观察试验各组血凝抑制效价。

1.6 SYBR Green Real-time PCR 试验

MDCK 细胞(1×10^5 细胞/孔)感染 100 TCID_{50} 流感病毒 1 h 后,弃掉上清,分别加入硫酸多糖药物(5 mg/mL)、DMSO (0.5%) (对照),在试验的 3, 18 h,弃掉 EMEM 培养基,刮下底层细胞,用 PBS 洗涤 2 次,然后离心(600 r/min,3 min)收集细胞。按照 RNA 抽提试剂盒步骤,提取样品总 RNA,依此用作分析药物对流感病毒 mRNA 转录的影响的试验材料。

参照 Chidlow 等^[10]的方法,设计并合成 SYBR Green Real-time PCR 引物。*M* 基因上游引物序列为 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3',*M* 基因下游引物序列为 5'-GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA-3';以及内参引物:*GAPDH* 上游引物 5'-CAACGG ATTTGGCCGTATTGG-3',*GAPDH* 下游引物:5'-TGA AGGGGTCATTGATGGCG-3'。

将上述样品总 RNA 反转录成 cDNA,反转录程序为:42 $^{\circ}$ C 1 h,95 $^{\circ}$ C 5 min。cDNA 储存于 -20 $^{\circ}$ C 或者直接用于荧光定量 PCR;荧光定量 PCR 采用 SYBR Green PCR 2 \times mix 试剂盒,循环条件第 1 步 95 $^{\circ}$ C 1 min,第 2 步 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s(40 个循环)。应用 Stepone 软件分析试验结果。

2 结果与分析

2.1 药物对 MDCK 细胞的毒性测定

MTT 法检测硫酸酯化酵母 β-葡聚糖的最大无毒浓度 (TC₀) 为 5.00 mg/mL, 半数毒性浓度 (TC₅₀) 为 10.45 mg/mL, 具体结果见表 1。

表 1 药物对 MDCK 细胞的 TC₀ 和 TC₅₀

Tab. 1 TC ₀ and TC ₅₀ values of medicine on MDCK cells		
	mg/mL	
药物 Medicine	TC ₀	TC ₅₀
硫酸酯化酵母 β-葡聚糖 Sulfated yeast β-glucan	5.00	10.45
利巴韦林 Ribavirin	1.25	2.37

2.2 药物抗 H1N1 猪流感病毒作用试验结果

根据不同加药时间来研究药物对猪流感病毒作用, 结果显示, 在第 2 组 (药物病毒混合共同加入细胞组) 硫酸酯化酵母 β-葡聚糖表现出了较强的抑制猪流感病毒活性作用, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 与治疗指数 (TI) 见表 2。在第 1 组 (先加药物再加病毒组) 和第 3 组 (先加病毒再加药物组), 硫酸酯化酵

母 β-葡聚糖表现出一定的抑制猪流感病毒的活性作用。

表 2 硫酸酯化酵母 β-葡聚糖 IC₅₀ 及 TI 值

Tab. 2 The IC ₅₀ and TI of sulfated yeast β-glucan		
药物 Medicine	IC ₅₀	TI
硫酸酯化酵母 β-葡聚糖 Sulfated yeast β-glucan	0.58	18.0
利巴韦林 Ribavirin	0.05	47.4

注: TI 值大于 1 为有效, 数值越大, 安全范围越大。
Note: TI value greater than one is effective, numerical value is greater, the safe range is wider.

2.3 血凝抑制试验结果

将浓度分别为 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15 mg/mL 的系列稀释药物, 与流感病毒液共同作用, 进行 HI 试验, 结果显示, 在浓度超过 1.25 mg/mL 时, 药物表现出抑制流感病毒凝集的活性 (表 3)。试验结果表明, 在一定浓度下硫酸酯化酵母 β-葡聚糖对猪流感病毒血凝素有明显抑制作用, 可阻止流感病毒对细胞吸附, 提示血凝素可能是其发挥抗病毒作用的靶点之一。

表 3 硫酸酯化酵母 β-葡聚糖对猪流感血凝素抑制结果

Tab. 3 The effect of sulfated yeast β-glucan on SIV hemagglutinin inhibition						
项目 Item	药物浓度/(mg/mL) Concentration					
	5	2.5	1.25	0.6	0.3	0.15
药物凝集结果 Hemagglutinin	-	-	-	+	+	+
病毒对照 Virus control			+			
阳性抗体对照 Positive antibody control			-			
红细胞对照 Red blood control			-			

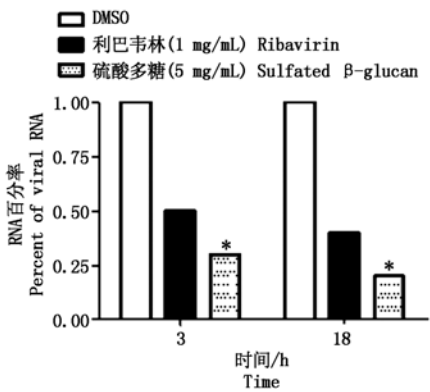
注: “+”表示红细胞凝集, “-”表示红细胞沉积。
Note: “+” stand for hemagglutination; “-” stand for erythro cyte sedimentation.

2.4 SYBR Green Real-time PCR 试验结果

在试验的 3, 18 h, 分别提取总 RNA, 测定 MDCK 细胞内流感病毒 RNA 含量。由图 1 可知, 试验组 (5 mg/mL) 较空白对照组 (DMSO) 总 RNA 含量减少, 且与试验前期 (3 h) 相比, 在试验的后期 (18 h) 药物表现出更强的抑制流感病毒 mRNA 合成。

3 讨论

猪流感病毒复制可分为 5 个阶段: ①流感病毒血凝素与宿主细胞表面唾液酸受体结合 (吸附阶段); ②受体介导的细胞内吞作用, 病毒进入细胞 (内吞、融合阶段); ③病毒的基因释放到细胞质中 (脱壳阶段); ④病毒 RNA 的复制、转录、翻译、包装新病毒 (复制和包装阶段); ⑤唾液酸酶裂解 SA 受体释放新的病毒 (释放阶段)。笔者在前期研究中



空白对照组病毒 RNA 含量为 1, 药物处理组相对空白对照组差异显著 (* P < 0.05)。
The content of RNA in blank control group acted as one, there were significant differences between drug treatment group and the blank control group (* P < 0.05).

图 1 药物对流感病毒 mRNA 转录影响结果 (3, 18 h)
Fig. 1 The effect of sulfated yeast β-glucan on SIV mRNA transcription (3, 18 h)

发现,硫酸酯化酵母 β -葡聚糖具有抗流感病毒作用,然而其抗病毒的具体机制尚未阐明。因此,本试验选择从阻断流感病毒 HA 靶点和抑制 mRNA 转录 2 个阶段,进一步探讨其抗病毒机理。

根据不同时间加药处理方式,在药物病毒混合同时加入细胞组,硫酸酯化酵母 β -葡聚糖表现出较强的抑制猪流感病毒的活性作用,结果提示药物可能与流感病毒表面蛋白相互作用。因此,本研究采用血凝抑制试验,验证药物是否作用于流感病毒血凝素靶点,结果显示,药物在超过 1.25 mg/mL 浓度下能抑制流感病毒凝集,进一步验证了药物通过阻止流感病毒 HA 靶点发挥抗病毒作用。

为进一步研究硫酸酯化酵母 β -葡聚糖对病毒 mRNA 复制的影响,本试验采用 SYBR Green Real-time PCR 方法研究了药物对病毒复制作用。结果显示,在 5 mg/mL 浓度下,药物能有效降低 mRNA 转录,影响病毒复制。结合在血凝抑制试验中,药物在 1.25 mg/mL 下,就能完全抑制病毒凝集红细胞,综合分析认为,相比抑制病毒 mRNA 转录来说,硫酸酯化酵母 β -葡聚糖主要是依靠抑制病毒吸附来发挥抗流感病毒作用,这为其开发新型抗病毒药物奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 韩庆功,张智勇,崔艳红. 我国猪流感的流行现状与危害[J]. 吉林农业科学,2008,33(5):30-34.
- [2] 黄 兰,周剑芳,韦 红,等. 流感病毒神经氨酸酶抑制剂药物耐药现状及机制研究进展[J]. 病毒学报,2012,28(5):572-576.
- [3] 王艳丽,刘 凌,孙 慧,等. 几种不同来源 β -葡聚糖的体外功能特性[J]. 食品与发酵工业,2013,39(11):68-72.
- [4] 周 恹,刁其玉,屠 焰,等. 酵母 β -葡聚糖和抗生素对早期断奶犊牛生长性能和肠道菌群的影响[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(6):685-691.
- [5] 周 恹,刁其玉,屠 焰,等. 日粮中添加酵母 β -葡聚糖对早期断奶犊牛体内大肠杆菌数量的影响[J]. 现代畜牧兽医,2014(3):15-20.
- [6] 聂 煜,王文轶,周 菲,等. 酵母葡聚糖硫酸酯化修饰及其对小鼠脾淋巴细胞增殖的促进作用[J]. 药学与临床研究,2011,19(3):224-226.
- [7] 李 芳,李八方,董诗竹,等. 低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯的制备及流感病毒神经氨酸酶抑制活性研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2012,42(112):106-112.
- [8] Zhong J, Cui X, Shi Y, *et al.* Antiviral activity of Jinchai capsule against influenza virus[J]. J Tradit Chin Med, 2011,33(2):200-204.
- [9] Pourianfar H R, Poh C L, Fecondo J, *et al.* *In vitro* evaluation of the antiviral activity of heparan sulfate mimetic compounds against Enterovirus 71[J]. Virus Res, 2012, 169(1):22-31.
- [10] Chidlow G, Harnett G, Williams S, *et al.* Duplex real-time reverse transcriptase PCR assays for rapid detection and identification of pandemic (H1N1) 2009 and seasonal influenza A/H1, A/H3, and B viruses[J]. J Clin Microbiol, 2010,48(3):862-866.