

网络出版时间:2021-11-11 14:58 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.05.003
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20211110.0959.003.html

鬼针草水提物抗伪狂犬病毒作用研究

郭志军¹, 谢慧凡¹, 吴其文², 陈洪博^{1,3}, 邱龙新^{1,3}

(1 龙岩学院 生命科学学院, 福建 龙岩 364012; 2 福建龙岩闽雄生物科技股份有限公司, 福建 龙岩 364012;

3 预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 龙岩 364012)

【摘要】【目的】研究鬼针草水提物(BPE)的体外抗伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PrV)作用。【方法】制备640 mg/mL(以生药计)的BPE,检测其对仓鼠肾上皮细胞(BHK-21)的毒性(半数中毒浓度(TC₅₀))及对PrV体外抗性(半数抑制浓度(EC₅₀))和治疗指数(TI)。采用CCK-8法检测BPE抗PrV的机制。采用间接免疫荧光法检测BPE对gB蛋白表达和PrV所致细胞凋亡的影响,采用实时荧光定量PCR方法检测BPE对PrV gB基因表达的影响。【结果】BPE对BHK-21细胞的TC₅₀为28.7 mg/mL,对PrV的EC₅₀为5.16 mg/mL, TI为5.56。BPE抗PrV的机制为抑制PrV增殖和灭活PrV。BPE可抑制PrV诱导的BHK-21细胞凋亡,抑制PrV gB基因和蛋白的表达。【结论】BPE具有明显的体外抗PrV活性。

【关键词】 鬼针草水提物;伪狂犬病毒;BHK-21细胞

【中图分类号】 S853.7;S852.65⁺9.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2022)05-0018-07

Effect of aqueous extract of *Bidens pilosa* L. on Pseudorabies virus

GUO Zhijun¹, XIE Huifan¹, WU Qiwen², CHEN Hongbo^{1,3}, QIU Longxin^{1,3}

(1 School of Life Science, Longyan University, Longyan, Fujian 364012, China;

2 Fujian Longyan Minxiong Biotechnology Co., Ltd, Longyan, Fujian 364012, China;

3 Fujian Provincial Universities Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine and Biotechnology, Longyan, Fujian 364012, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the protective effect of aqueous extract of *Bidens pilosa* L. (BPE) on Pseudorabies virus (PrV) *in vitro*. 【Method】 The cytotoxicity and anti-PrV activity of BPE at concentration of 640 mg/mL on BHK-21 cells were detected by CCK-8, and the anti-PrV mechanism of BPE was investigated by CCK-8. The TC₅₀, EC₅₀ and TI were determined. The indirect immunofluorescence was used to detect the effect of BPE on PrV-induced apoptosis and expression of PrV gB protein, and the real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of PrV gB gene. 【Result】 The TC₅₀ of BPE in BHK-21 cells was 28.7 mg/mL, the IC₅₀ of PrV was 5.16 mg/mL, and the TI was 5.56. The mechanism of anti-PrV was based on inhibiting PrV proliferation and inactivating PrV. BPE might protect PrV-infected BHK-21 cells through suppressing expression of PrV gB gene and protein ($P < 0.01$) and inhibiting PrV-induced apoptosis of BHK-21 cells. 【Conclusion】 BPE had significant anti-PrV activity *in vitro*.

Key words: aqueous extract of *Bidens pilosa* L.; PrV; BHK-21 cells

【收稿日期】 2021-06-23

【基金项目】 中央引导地方科技发展专项(2019L3011);龙岩市奇迈基金项目(2018LYQM0201);预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室开放课题(2019KF01)

【作者简介】 郭志军(1993—),男,广东蕉岭人,硕士,主要从事中药抗病毒作用研究。E-mail:420838168@qq.com

【通信作者】 邱龙新(1969—),男,福建新罗人,教授,博士,硕士生导师,主要从事天然活性物质开发应用研究。
E-mail:qlongxin@tom.com

鬼针草(*Bidens pilosa* L.)为一年生菊科鬼针草属植物,俗称婆婆针,在我国主要分布于华南、华东及华中地区^[1],为民间常用中草药,主治感冒、高血压、痢疾、肝炎、胃肠炎、胰腺炎等多种疾病^[2-5]。其主要药效成分包括黄酮、多炔、挥发油、有机酸等^[6]。研究表明,鬼针草提取物具有抗炎^[7]、抗氧化^[8]、抗损伤^[9]等多种活性。

伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PrV)属于疱疹病毒科甲型疱疹病毒亚科,其DNA长度约为145 kb,编码的蛋白主要包括gB、gC、gD、gE、gH、gI、gK、gL、gM和gN等10种囊膜结构蛋白和分泌蛋白gG^[10-12]。PrV对外界环境的抵抗力较强,55℃ 50 min或80℃ 3 min才能将其杀灭,100℃可瞬间杀灭;对氯仿、酒精、乙醚等有机溶剂敏感,对福尔马林和紫外线非常敏感;在pH 4.0~12条件下,PrV稳定,甚至在pH 2.0和pH 13.5条件下,需2~4 h才能完全灭活。PrV可使怀孕母猪发生流产、产死胎或木乃伊胎等,引起公猪不育及新生仔猪体温升高、呕吐、腹泻、共济失调、神经症状,严重时大量死亡,是危害全球养猪业的重大传染病之一,当前没有有效的治疗方法,只能通过疫苗免疫和注射高免血清降低死亡率^[13-14]。研究报道,鬼针草提取物具有抑制甲型和乙型流感病毒的作用^[15],目前有关鬼针草抗PrV的研究尚未见报道。本研究从体外细胞水平探讨了鬼针草水提物抗PrV的效果及其作用机制,以期为鬼针草的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鬼针草,由龙岩学院生命科学学院植物教研室鉴定保存;仓鼠肾上皮细胞(BHK-21),来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;伪狂犬病毒,由龙岩学院预防兽医学与生物技术福建省高校重点实验室分离保存;PrV gB多克隆抗体,为北京金诺诊断生物公司的PrV gB检测试剂盒阳性血清;胎牛血清,购自Biological Industries公司;DMEM高糖培养液,购自Hyclone Laboratories, Inc.;Annexin-V(FITC)/PI细胞凋亡试剂盒和增强型CCK-8试剂盒,购自碧云天生物科技有限公司;总RNA提取试剂盒和反转录试剂盒,购自南京诺唯赞生物科技有限公司;Goat anti pig IgG-FITC抗体,购自Abcam公司;FastStart Universal SYBR Green Master(ROX),购自Roche公司。

1.2 鬼针草水提物(BPE)的制备

将鬼针草粉碎后过孔径0.355 mm(50目)的筛,取10 g粉末加入200 g蒸馏水浸泡3 h,大火煮沸10 min后,改小火煎煮2 h后过滤,收集滤液,滤渣加10倍质量的蒸馏水,大火煮沸10 min后改小火煎煮2 h,过滤收集滤液,合并2次滤液,用旋转蒸发仪浓缩至10 mL。向上述鬼针草水提物中加入无水乙醇至其最终体积分数为70%,调整pH值为7.0~7.4,在4℃冰箱浸提48 h,过滤,滤液用旋转蒸发仪回收乙醇,上清液经减压浓缩后真空冷冻干燥,收集冻干粉备用。将冻干粉用DMEM培养液溶解,调整鬼针草质量浓度为640 mg/mL(以生药计),用0.22 μm滤膜过滤除菌,4℃保存备用。

1.3 PrV组织半数感染量(TCID₅₀)的测定

将生长状态良好的BHK-21细胞(密度为 1×10^5 mL⁻¹)接种到96孔细胞培养板,每孔100 μL,12 h后弃培养液加入100 μL 10^{-1} ~ 10^{-8} 稀释的PrV病毒液,每个稀释度做8个重复,以正常的BHK-21细胞作为阴性对照,将细胞培养板放在37℃、体积分数5% CO₂的细胞培养箱中培养,孵育1 h后,弃去培养液,换用含体积分数2%胎牛血清的细胞培养液继续进行培养,逐日观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)情况,统计病变孔数(阳性孔数)和未发生病变孔数(阴性孔数),按照Reed-Muench法^[16]计算病毒的TCID₅₀。

1.4 BPE的细胞毒性检验

调整BHK-21细胞密度为 1×10^5 mL⁻¹,加入96孔培养板中,每孔100 μL,在37℃、体积分数5% CO₂的培养箱中培养12 h,加入640 mg/mL的BPE,作连续2倍稀释至鬼针草生药质量浓度为1.25 mg/mL,并设药物空白孔和细胞对照孔,每个质量浓度做8个重复,培养48 h,加入CCK-8溶液10 μL/孔,置于CO₂培养箱中孵育1 h,用酶标仪于450 nm处测定吸光度值(OD₄₅₀),计算BPE半数中毒浓度(TC₅₀),并确定BPE最大无毒浓度(TC₀)^[17]。

1.5 BPE体外对PrV的半数抑制质量浓度(EC₅₀)

调整BHK-21细胞密度为 1×10^5 mL⁻¹,加入96孔培养板中,每孔100 μL,在37℃体积分数5% CO₂的培养箱中培养12 h,加BPE使其终质量浓度为TC₀(10 mg/mL),2倍倍比稀释至BPE为0.625 mg/mL,每孔接种病毒含量为 $100 \times$ TCID₅₀的PrV病毒液100 μL,吸附1 h后移除上清液,换用含体积分数2%胎牛血清的细胞培养液继续培养。试验同时设药物空白组、细胞对照组、阳性对照组和PrV对照

组。用显微镜观察各组培养物,当 PrV 对照组细胞病变率大于 75% 时停止孵育,每孔加 10 μL CCK-8 染色液,培养箱中作用 1 h,用酶标仪测定 OD_{450} ,计算 BPE 对 PrV 的半数抑制质量浓度(EC_{50})^[17]。

计算治疗指数(therapeutic index, TI): $TI = TC_{50}/EC_{50}$ 。TI 作为评价药物抑制病毒感染的安全性指标,其值越大药物越安全, $TI \geq 2$ 表示有效低毒, $1 < TI < 2$ 表示低效有毒, $TI \leq 1$ 表示无临床使用价值。

1.6 BPE 体外抗 PrV 机制检测

1.6.1 对 PrV 的阻断作用 调整 BHK-21 细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,加入 96 孔培养板中,每孔 100 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养 12 h 后,分为 10, 5, 2.5 mg/mL BPE 组和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦组,各组先用相应的药物处理细胞 4 h,弃上清液,然后均接种 $100 \times \text{TCID}_{50}$ 的 PrV 病毒液, 100 μL /孔,吸附 1 h 后移除上清液,换为含体积分数 2% 胎牛血清的细胞培养液继续培养,每个质量浓度 6 个重复,试验同时设细胞对照组和 PrV 对照组,待 PrV 对照组细胞 80% 出现病变时用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。

1.6.2 对 PrV 的抑制作用 将 $100 \times \text{TCID}_{50}$ 的 PrV 病毒液加入到长满单层 BHK-21 细胞的 96 孔培养板中,100 μL /孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中吸附 1 h,移除病毒液,用 PBS 清洗 3 次,分为 10, 5, 2.5 mg/mL BPE 和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦组,各组分别加入相应药物 100 μL 继续培养,每个质量浓度 6 个重复,试验同时设细胞对照组和 PrV 对照组,待 PrV 对照组细胞 80% 出现病变时用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。

1.6.3 对 PrV 的直接灭活作用 将 1 mL $100 \times \text{TCID}_{50}$ 的 PrV 病毒液分别与 1 mL 10, 5, 2.5 mg/mL BPE 或 0.5 mg/mL 伐昔洛韦混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 2 h。将上述处理后的 PrV 病毒液加入到长满单层 BHK-21 细胞的 96 孔培养板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中吸附 1 h 后,移除病毒液,用 PBS 清洗 3 次,加入含体积分数 2% 胎牛血清的细胞培养液 100 μL 继续培养,每个质量浓度 6 个重复,试验同时设细胞对照组和 PrV 对照组,待 PrV 对照组细胞 80% 出现病变时,用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。

1.7 BPE 对 PrV 所致细胞凋亡的影响

采用间接免疫荧光试验检测 BPE 对 PrV 所致细胞凋亡的影响。调整 BHK-21 细胞密度为 $1 \times$

10^5 mL^{-1} ,加入 24 孔细胞培养板中,每孔 1 mL,分为细胞对照组、10 mg/mL BPE、0.5 mg/mL 伐昔洛韦组、PrV 对照组、10 mg/mL BPE+PrV 组和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦+PrV 组,每组 4 个重复。待细胞长满单层时,10 mg/mL BPE 和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦组分别加入相应的药物;PrV 对照组、10 mg/mL BPE+PrV 组和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦+PrV 组均先加入 $100 \times \text{TCID}_{50}$ 的 PrV 毒液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中孵育 1 h,移除病毒液,PBS 洗 3 遍,换成含体积分数 2% 胎牛血清的细胞培养液,后两组分别加入相应的药物,培养 48 h。各组细胞弃培养液,用冷 PBS 洗涤 3 次,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液,再加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,加入 10 μL PI 染色液,轻轻混匀,室温下避光孵育 30 min,荧光显微镜下观察。

1.8 BPE 对 PrV gB 基因表达的影响

采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 BPE 对 PrV gB 基因表达的影响。调整 BHK-21 细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,加入六孔细胞培养板中,每孔 3 mL,分为 PrV 对照组、10 mg/mL BPE 组和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦组,待细胞长满单层时,3 组均加入 $100 \times \text{TCID}_{50}$ 的 PrV 毒液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 1 h,PBS 洗 3 遍,换用含体积分数 2% 胎牛血清的细胞培养液培养,后两组分别加入相应的药物,培养 48 h 后提取总 RNA,按照反转录试剂盒说明书操作制备 cDNA,备用。以 βactin 为内参基因,采用实时荧光定量 PCR 试剂盒测定 PrV 病毒 gB 基因的表达水平。 βactin 基因引物为: $\beta\text{-actin-F}$ 是 5'-ATGGATGATGATATCGCCGC-3', $\beta\text{-actin-R}$ 是 5'-GTGTGGTGCCAGATTTCC-3';PrV gB 基因引物为:gB-F 是 5'-CGGCATCGC-CAACTTCTTC-3',gB-R 是 5'-GTCCTCCTT-GAGCGTCTTTCGT-3'。2 对引物均由生工生物合成。RT-qPCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目的基因的相对表达量^[18-20]。

1.9 BPE 对 PrV gB 蛋白表达的影响

用间接免疫荧光试验检测 BPE 对 PrV gB 蛋白表达的影响。调整 BHK-21 细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,加入六孔培养板,每孔 3 mL,分为细胞对照组、PrV 对照组、0.5 mg/mL 伐昔洛韦组及 2.5, 5, 10 mg/mL BPE 组,待细胞长满单层时,除细胞对照组外的其他组加入 $100 \times \text{TCID}_{50}$ PrV 病毒液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 1 h,PBS 洗 3 遍,换成含

体积分数 2%胎牛血清细胞培养液培养,0.5 mg/mL 伐昔洛韦组和 2.5,5,10 mg/mL BPE 组分别加入相应药物,培养 48 h 收集样品,PBS 洗涤 3 次,用丙酮甲醇(V(丙酮):V(甲醇)=3:2)溶液固定,在 37℃培养箱中用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 PrV gB 多克隆抗体(1:50 倍稀释)4℃孵育过夜,PBST 洗涤后用羊抗猪 IgG-FITC 抗体(1:100 倍稀释)室温孵育 2 h,于荧光显微镜下观察拍照。

1.10 数据处理与分析

试验数据用 Graphpad prism 5.0 软件进行分

析,组间差异性采用单因素方差分析确定。

2 结果与分析

2.1 PrV TCID₅₀的测定

由表 1 可知,病毒稀释度为 10⁻⁶时病变孔累积阳性率高于 50%,稀释度为 10⁻⁷时病变孔累积阳性率低于 50%,按 Reed-Muench 法计算得 TCID₅₀ 为 10^{-6.57},即当病毒稀释度为 10^{-6.57}时,以 0.1 mL 接种可使 50%细胞感染。

表 1 PrV 的 TCID₅₀测定结果
Table 1 TCID₅₀ of PrV

病毒稀释度 Virus dilution	接种孔数 Inoculum	阳性孔数 Positive pore	积累孔数 Accumulated number of holes		阳性率/% Lesion ratio
			阳性 Positive	阴性 Negative	
10 ⁻¹	8	8	49	0	100.0
10 ⁻²	8	8	41	0	100.0
10 ⁻³	8	8	33	0	100.0
10 ⁻⁴	8	8	25	0	100.0
10 ⁻⁵	8	8	17	0	100.0
10 ⁻⁶	8	8	9	0	100.0
10 ⁻⁷	8	1	1	7	12.5
10 ⁻⁸	8	0	0	15	0.0

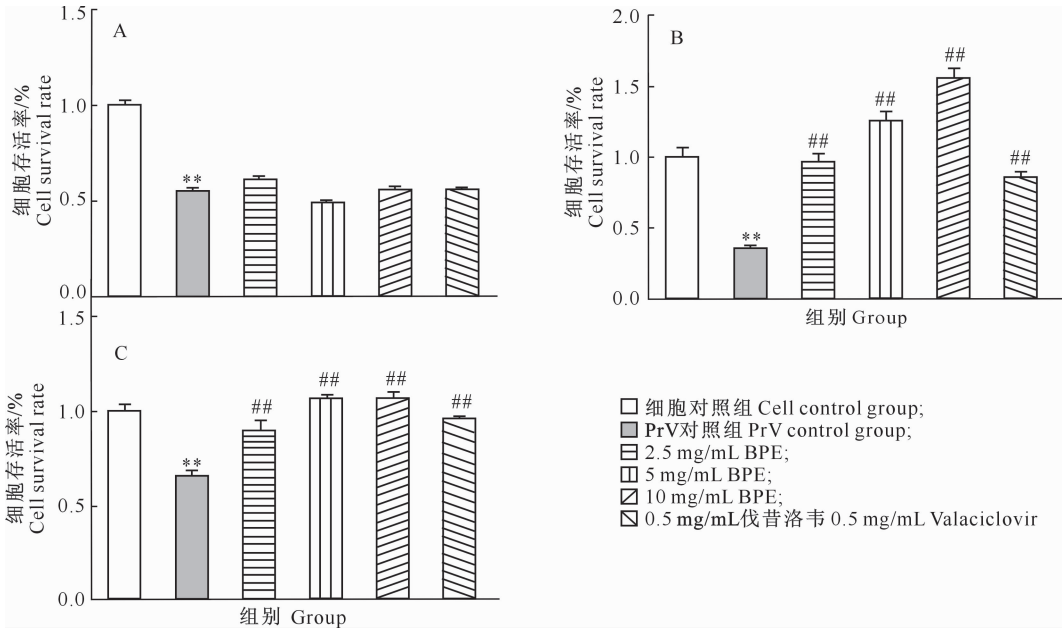
2.2 BPE 的细胞毒性及体外抗 PrV 活性

试验结果显示,BPE 对 BHK-21 细胞的毒性较低,其 TC₅₀ 为 28.7 mg/mL,TC₀ 为 10 mg/mL。BPE 对 PrV 的 EC₅₀ 为 5.16 mg/mL,治疗指数为

5.56。结果表明,BPE 为有效低毒的药物,对 PrV 具有一定的抑制活性,有较高的利用价值。

2.3 BPE 体外抗 PrV 作用方式

试验结果如图 1 所示。



A. 阻断方式;B. 抑制方式;C. 灭活方式。与细胞对照组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$);与 PrV 对照组相比,#表示差异显著($P<0.05$),##表示差异极显著($P<0.01$),图 3 同
A. Blocking mode;B. Inhibition mode;C. Inactivation mode. Compared with cell control group,* indicates significant difference($P<0.05$) and ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$);Compared with PrV control group,# indicates significant difference ($P<0.05$) and ## indicates extremely significant difference ($P<0.01$),the same Fig. 3

图 1 鬼针草水提物(BPE)抗 PrV 的作用方式
Fig.1 Function mechanism of BPE against PrV

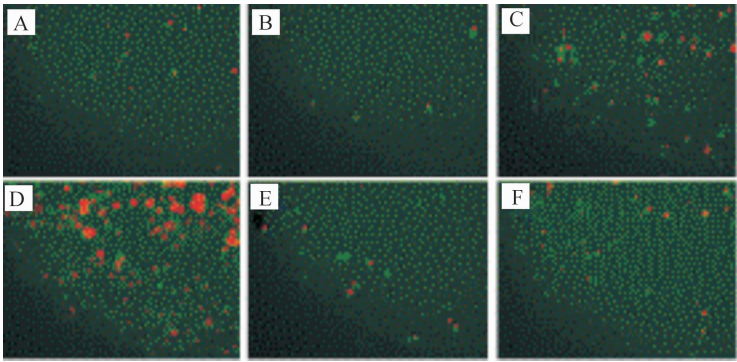
由图 1-A 可知,2.5,5 和 10 mg/mL BPE 和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦处理 BHK-21 细胞后感染 PrV,细胞存活率与 PrV 对照组无显著差异($P>0.05$),表明 BPE 抗 PrV 的机制不是阻断作用。

图 1-B 表明,与 PrV 对照组相比,2.5,5 和 10 mg/mL BPE 处理的细胞存活率极显著提高($P<0.01$),且呈剂量依赖性,0.5 mg/mL 伐昔洛韦组细胞存活率也极显著提高($P<0.01$),但效果较 5 和 10 mg/mL BPE 处理差,表明 BPE 具有抑制 PrV 增殖的作用。图 1-C 表明,与 PrV 对照组相比,2.5,5,10 mg/mL BPE 和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦处理的病毒感染细胞的存活率均极显著提高($P<0.01$),表明 BPE 具有体外灭活 PrV 的作用。综上可知,BPE 具有灭活 PrV 和抑制其增殖的作用,其中抑制

PrV 增殖效果更好。

2.4 BPE 对 PrV 诱导 BHK-21 细胞凋亡的影响

间接免疫荧光试验中,细胞核被 PI 着色,显示出红色荧光,而凋亡细胞被特异地标记上 FITC,显示出黄绿色荧光。BPE 对 PrV 感染诱导 BHK-21 细胞凋亡影响的荧光显微镜观察结果如图 2 所示。由图 2 可知,与细胞对照和 10 mg/mL BPE 相比,0.5 mg/mL 伐昔洛韦组可引起较多的细胞凋亡(图 2-A,B,C);与 PrV 对照组相比,10 mg/mL BPE 和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦可减少因 PrV 感染引起的 BHK-21 细胞凋亡数量(图 2-D,E,F),说明 BPE 可以降低 PrV 诱导的 BHK-21 细胞的凋亡率,且安全性优于伐昔洛韦。



A. 细胞对照组;B. 10 mg/mL BPE 组;C. 0.5 mg/mL 伐昔洛韦组;D. PrV 对照组;E. 10 mg/mL BPE + PrV 组;
F. 0.5 mg/mL 伐昔洛韦 + PrV 组

A. Cell control;B. 10 mg/mL BPE;C. 0.5 mg/mL Valaciclovir;D. PrV control;E. 10 mg/mL BPE + PrV;
F. 0.5 mg/mL Valaciclovir + PrV

图 2 BPE 对 PrV 所致 BHK-21 细胞凋亡的影响(100×)

Fig. 2 Effect of BPE on apoptosis induced by PRV in BHK-21 cells (100×)

2.5 BPE 对 PrV gB 基因表达量的抑制作用

PrV gB 基因实时荧光定量 PCR 检测结果(图 3)显示,与 PrV 对照相比,10 mg/mL BPE 组 gB 基因的表达水平显著降低($P<0.05$),0.5 mg/mL 伐昔洛韦组极显著降低($P<0.01$),而 BPE 和伐昔洛韦两组之间无显著差异。结果表明,10 mg/mL BPE 和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦均能抑制 PrV gB 基因的表达。

2.6 BPE 对 PrV gB 蛋白表达量的抑制作用

BPE 对 PrV gB 蛋白表达的影响如图 4 所示,2.5 mg/mL BPE+PrV 组 gB 蛋白的黄绿色荧光信号强度降低,5,10 mg/mL BPE 和 0.5 mg/mL 伐昔洛韦+PrV 组中均检测不到 gB 蛋白荧光信号,表明 BPE 和伐昔洛韦可明显抑制 PrV 感染的 BHK-21 细胞 gB 蛋白的表达,且呈剂量依赖性。gB 蛋白

在 PrV 复制中起重要作用,BPE 可能通过抑制 gB 蛋白的表达而抑制 PrV 的复制。

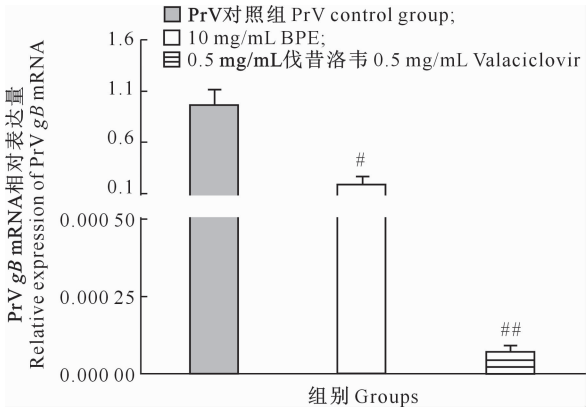
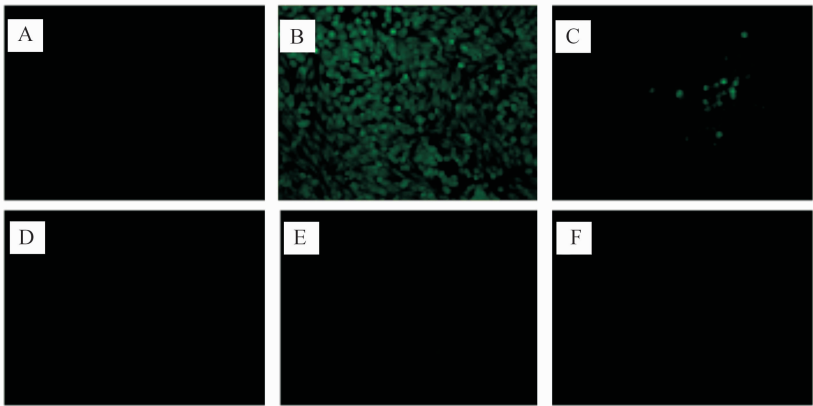


图 3 BPE 对 PrV gB 基因相对表达量的影响

Fig. 3 Effect of BPE on relative expression of PrV gB gene



A. 细胞对照组;B. PrV 对照组;C. 2. 5 mg/mL BPE+PrV 组;D. 5 mg/mL BPE+PrV 组;E. 10 mg/mL BPE+PrV 组;
F. 0. 5 mg/mL 伐昔洛韦+PrV 组

A. Cell control;B. PrV control;C. 2. 5 mg/mL BPE+PrV;D. 5 mg/mL BPE+PrV;E. 10 mg/mL BPE+PrV;F. 0. 5 mg/mL Valaciclovir+PrV
图 4 BPE 对 PrV gB 蛋白表达的影响(100×)

Fig. 4 Effect of BPE on expression of PrV gB protein (100×)

3 讨 论

猪伪狂犬病(porcine pseudorabies, PR),是危害全球养猪业的重大传染病之一^[10]。我国目前主要通过疫苗接种防控该病,但近年来,PrV 呈变异趋势,致病力增强的 PrV 导致我国多地 PR 爆发流行,给防控工作带来了挑战。近年来,传统中药因具有经济有效、副作用小的特点而成为兽医临床抗病研究的热点^[21-22]。

研究表明,一些清热药、解表药和补益药具有明显的抗病毒作用,其中的黄酮类、多糖、皂苷、蒽酮、生物碱等是抗病毒活性成分。BPE 中含有多种黄酮类、挥发油和双咖啡酰类化合物,具有清热解毒、散瘀消肿等作用^[2]。鬼针草提取物有抗甲型和乙型流感病毒的作用^[15],与头抱类抗生素有协同作用,可增强动物血清中氨基糖苷类、酰胺醇类以及内酰胺类抗生素联用的体内抗菌作用,体外可抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的增殖^[23-25]。本研究发现,BPE 对 BHK-21 细胞毒性较低,对 PrV 具有一定的抑制活性,表明 BPE 为低毒有效的药物,有较高的利用价值,能开发成一种新型的防控伪狂犬病毒的药物。

中药抗病毒的机制包括两方面,其一是直接灭活病毒,阻止病毒侵入细胞,抑制病毒繁殖和传播;其二是调节机体免疫功能,提高动物体液及细胞免疫水平,从而达到间接抗病毒作用^[26]。本研究结果显示,BPE 不影响 PrV 的吸附侵入细胞过程,可通过抑制 PrV 增殖和直接灭活作用而发挥抗 PrV 功效,其中抑制 PrV 增殖作用效果更好。

PrV gB 蛋白参与病毒与细胞的融合,是病毒传播必需的蛋白质,同时 gB 蛋白又是重要的免疫抗原,可刺激动物机体产生 2 种综合抗体^[27-28],制备相应的 gB 抗体检测试剂盒对 PR 诊断非常重要^[29-30]。目前,与 gB 基因有关的基因工程疫苗和多联苗已研制成功,并运用于临床,但是由于 PrV 进化导致免疫疫苗的猪群并不能获得完全保护。gB 蛋白作为疫苗开发中的抗原之一,在病毒免疫逃避中起一定的作用,所以对于 gB 基因相关工程苗的研制就变得尤为重要^[31]。本研究表明,BPE 可通过抑制 PrV gB 基因和蛋白水平的表达而抑制 PrV 繁殖及在细胞间传播,也可通过直接杀灭 PrV 的作用而达到保护 BHK-21 细胞的目的;BPE 还可缓解 PrV 诱导的 BHK-21 细胞凋亡,且效果及安全性优于伐昔洛韦。本研究结果为将鬼针草开发成抗病毒中药提供了理论依据。

4 结 论

BPE 不能阻断 PrV 对细胞的吸附,但可抑制和灭活 PrV,其抗病毒作用机理是抑制 PrV gB 基因和蛋白的表达及抑制 PrV 引起的细胞凋亡。

[参考文献]

[1] 尚春琼,朱珣之. 外来植物三叶鬼针草的入侵机制及其防治与利用 [J]. 草业科学,2019,36(1):47-60.
Shang C Q,Zhu X Z. Invasion mechanisms, control and utilization of alien plant species *Bidens pilosa* [J]. Pratacultural Science,2019,36(1):47-60.
[2] 王碧晴,赵俊男,张 颖,等. 鬼针草的药理作用研究进展 [J]. 中医药导报,2019,25(18):100-103,107.

- Wang B Q, Zhao J N, Zhang Y, et al. Advances in pharmacological effects of *Bidens pilosa* L. [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 25(18): 100-103, 107.
- [3] 方 媛, 方祝元. 鬼针草及其有效成分治疗高血压肾损害机制研究概况 [J]. 中医杂志, 2018, 59(9): 800-803.
- Fang Y, Fang Z Y. Overview of research on mechanism of *Bidens bipinnata* and its effective components in treating hypertensive renal damage [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 59(9): 800-803.
- [4] 陈银萍, 柯昀琪, 杨志娟, 等. 铅胁迫下三叶鬼针草内源一氧化氮的生成及其对氧化损伤的缓解效应 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(2): 264-272.
- Chen Y P, Ke Y Q, Yang Z J, et al. Generation of endogenous NO and its ameliorating effects on oxidative damage in *Bidens pilosa* L. seedlings under Pb stress [J]. Plant Science Journal, 2018, 36(2): 264-272.
- [5] 王 瑞, 童 玲, 刘彩云, 等. 鬼针草属植物中多烯炔类成分及其活性研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 218-225.
- Wang R, Tong L, Liu C Y, et al. Research progress of polyacetylenes from *Bidens* genus plants and their biological activity [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(17): 218-225.
- [6] 吴婷妮, 余长柱, 李 荣, 等. 鬼针草的研究进展 [J]. 安徽医药, 2014, 18(9): 1614-1616.
- Wu T N, Yu C Z, Li R, et al. Research advances of *Bidens* L. [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2014, 18(9): 1614-1616.
- [7] Bo Y, Yuan L P, Zhang J J, et al. Total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. a traditional Chinese medicine inhibits the production of inflammatory cytokines of vessel endothelial cells stimulated by sera from Henoch-Schönlein purpura patients [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 64(6): 882-887.
- [8] Zhong M M, Chen F H, Yuan L P, et al. Protective effect of total flavonoids from *Bidens bipinnata* L. against carbontetrachloride-induced liver injury in mice. [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2007, 59(7): 1017-1025.
- [9] 程新燕. 鬼针草总黄酮对 D-GalN 致急性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 268-271.
- Cheng X Y. Protective effect of total flavonoids of *Bidens* on acute liver injury induced by D-GalN in mice [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(14): 268-271.
- [10] 杨文琼. 猪伪狂犬病的诊断与综合防控 [J]. 中兽医学杂志, 2019(2): 19-21.
- Yang W Q. Diagnosis and comprehensive control of Porcine Pseudorabies [J]. Chinese Journal of Traditional Veterinary Science, 2019(2): 19-21.
- [11] Klupp B G, Hengartner C J, Mettenleiter T C, et al. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome [J]. Journal of Virology, 2004, 78(1): 424-440.
- [12] Zhao Y, Wang L Q, Zheng H H, et al. Construction and immunogenicity of a gE/gI/TK-deleted PRV based on porcine pseudorabies virus variant [J]. Molecular and Cellular Probes, 2020, 53: 101605.
- [13] Jin W, Xiang C, Wang X B, et al. Efficacy of the Bartha-K61 vaccine and a gE/gI/TK prototype vaccine against variant porcine pseudorabies virus (vPRV) in piglets with sublethal challenge of vPRV [J]. Research in Veterinary Science, 2020, 128: 16-23.
- [14] Hong T Q, Chen P H, Chen B, et al. Diagnosis, control and eradication of pseudorabies in pigs [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 50(3): 131-136.
- [15] 张瑞娇, 张元元, 崔皓月, 等. 鬼针草提取物解热抗菌抗病毒作用的研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(10): 905-911.
- Zhang R J, Zhang Y Y, Cui H Y, et al. Study on the antipyretic, antibiotic and antiviral effects of *Bidens bipinnata* L. [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2017, 34(10): 905-911.
- [16] 曾 强, 黄良宗, 李 丹, 等. 3 种中药体外抗猪繁殖与呼吸综合征病毒的作用 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(4): 459-463.
- Zeng Q, Huang L Z, Li D, et al. Anti-virus activity of three Chinese herbs against porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in vitro* [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2010, 36(4): 459-463.
- [17] 黎文培, 陈 旭, 胡 伟, 等. 山柰提取物的制备及其体外抗伪狂犬病毒活性研究 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(2): 295-301.
- Li W P, Chen X, Hu W, et al. Preparation and antiviral activity of *Kaempferia galanga* L. extract against pseudorabies virus *in vitro* [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2020, 35(2): 295-301.
- [18] Zhang L, Ren J, Shi P, et al. The immunological regulation roles of Porcine β -1,4 Galactosyltransferase V (B4GALT5) in PRRSV infection [J]. Frontiers in Cellular & Infection Microbiology, 2018, 8: 48.
- [19] 隋秀文. 十种药物抗伪狂犬病病毒感染的实验研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- Sui X W. Experimental study on ten drugs against pseudorabies virus infection [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2010.
- [20] 杨红杰, 于长青, 林树伯, 等. 伪狂犬病病毒 gB 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 北京农学院学报, 2015, 30(3): 48-51.
- Yang H J, Yu C Q, Lin S B, et al. Development of a fluorescent quantitative PCR detection method for pseudorabies virus gB gene [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2015, 30(3): 48-51.
- [21] Hosel M, Webb D, Schroer J, et al. Overexpression of the adenovirus type 12 (Ad12) pTP or E1A gene facilitates Ad12 DNA replication in nonpermissive BHK21 hamster cells [J]. Journal of Virology, 2001, 75(21): 10041-10053.

Scientia Horticulturae,2018,227:22-37.

[24] Romero A,Hermoso J F,Tous J. Olive rootstocks to control ‘Arbequina IRTA-I18’ clone vigour-results from a second one comparative trial [J]. Acta Horticulturae, 2014, 1057: 577-584.

[25] Baker R L,Yarkhunova Y,Vidal K,et al. Polyploidy and the relationship between leaf structure and function; implications for correlated evolution of anatomy,morphology,and physiology in *Brassica* [J]. BMC Plant Biology,2017,17(1):3-14.

[26] 秦 玲,康文怀,齐艳玲,等. 盐胁迫对酿酒葡萄叶片细胞结构及光合特性的影响 [J]. 中国农业科学,2012,45(20):4233-4241.

Qin L,Kang W H,Qi Y L,et al. Effect of salt stress on mesophyll cell structures and photosynthetic characteristics in leaves of wine grape (*Vitis* spp.) [J]. Scientia Agricultura Sinica,2012,45(20):4233-4241.

[27] Fernández-Escobar R. Trends in olive nutrition [J]. Acta Horticulturae,2018,1199:215-224.

[28] Desouky I M,Haggag L F,El-Migeed M M M A,et al. Effect of boron and calcium nutrients sprays on fruit set,oil content and oil quality of some olive oil cultivars [J]. World Journal of Agricultural Sciences,2009,5(2):180-185.

[29] Freeman M,Uriu K,Hartmann H T. Diagnosing and correcting nutrient problems [M]// Ferguson L,Sibbett G S,Martin C G. Olive production manual. Oakland:University of California-Agriculture and Natural Resources,1994.

[30] Tubeileh A,Turkelboom F,Al-Ibrahim A,et al. Modelling the effects of soil conditions on olive productivity in Mediterranean hilly areas [J]. International Journal of Agronomy, 2014,2014:1-12.

[31] Riachy M E,Hamade A,Ayoub R,et al. Oil content, fatty acid and phenolic profiles of some olive varieties growing in Lebanon [J]. Frontiers in Nutrition,2019,6:1-13.

[32] Troncoso A,Linan J,Prieeto J,et al. Influence of different olive rootstocks on growth and production of ‘Gordal Sevillana’ [J]. Acta Horticulturae,1990,286:133-136.

[33] Barazani O,Waitz Y,Tugendhaft Y,et al. Testing the potential significance of different scion/rootstock genotype combinations on the ecology of old cultivated olive trees in the southeast Mediterranean area [J]. BMC Ecology,2017,17:1-8.

(上接第 24 页)

[22] 赵凤柱,韩小敏. 抗病毒中药及其活性成分研究进展 [J]. 实用中医药杂志,2009,25(6):428-430.

Zhao F Z,Han X M. Research progress of antiviral traditional Chinese medicine and its active components [J]. Journal of Practical Traditional Chinese medicine,2009,25(6):428-430.

[23] 宋剑武,刘增援,夏 娟,等. 鬼针草血清与抗菌药联合对耐药 *E. coli* 体外抑菌的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2015(9):205-207.

Song J W,Liu Z Y,Xia J,et al. Study on the *in vitro* antibacterial effect of the serum with *Bidens bipinnata* L. in combination with antibacterial drugs on drug-resistant *E. coli* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015 (9):205-207.

[24] Zhu Z X,Jiang X H,Deng S Z,et al. Inhibitory effects of bacillus subtilis on *Staphylococcus aureus* [J]. Agricultural Science & Technology,2015(10):2162-2166.

[25] 滕 蓉,李清禄,张温玲. 鬼针草抑菌物质提取及抑菌活性研究 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2014,43(6):637-641.

Teng R,Li Q L,Zhang W L. Study on the extraction and antimicrobial activity of antibacterial substances of *Bidens bipinnata* [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University(Natural Science Edition),2014,43(6):637-641.

[26] 褚秀玲,韦旭斌. 抗病毒中草药研究进展 [J]. 中兽医学杂志, 2006(1):33-38.

Chu X L,Wei X B. Research progress of antiviral Chinese herbal medicine [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2006(1):33-38.

[27] Zhang P P,Lü L,Sun H F,et al. Identification of linear B cell epitope on gB,gC, and gE proteins of porcine pseudorabies virus using monoclonal antibodies [J]. Veterinary Microbiology,2019,234:83-91.

[28] Schroter C,Vallbracht M,Altenschmidt J,et al. Mutations in pseudorabies virus glycoproteins gB,gD, and gH functionally compensate for the absence of gL [J]. Journal of Virology, 2015,90(5):2264-2272.

[29] Ficinska J,Minnebruggen G V,Nauwynck H J,et al. Pseudorabies virus glycoprotein gD contains a functional endocytosis motif that acts in concert with an endocytosis motif in gB to drive internalization of antibody-antigen complexes from the surface of infected monocytes [J]. Journal of Virology,2005, 79(11):7248-7254.

[30] Shen H C,Xie K X,Huang L P,et al. A novel SERS-based lateral flow assay for differential diagnosis of wild-type pseudorabies virus and gE-deleted vaccine [J]. Sensors and Actuators B:Chemical,2019,282:152-157.

[31] Yuan Z G,Zhang S F,Liu Y,et al. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: safety and immunogenicity in dogs [J]. Vaccine,2008,26(10):1314-1321.