

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.03

茶皂素对 PRRSV 感染 Marc-145 细胞受体表达及 Caspase-9 活化的影响

侯震,董蓓蓓,黄剑钢,尹伟,范阔海,孙耀贵,李宏全*

(山西农业大学动物科技学院,山西太谷 030801)

[收稿日期] 2018-05-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0016-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 以茶皂素(Teasaponin, TS)作为候选药物,研究茶皂素对 Marc-145 细胞受体 CD163 和波形蛋白(Vimentin)基因合成和蛋白表达的影响,以及茶皂素是否能够通过细胞凋亡内源性通路影响 PRRSV 感染细胞,探究茶皂素抗 PRRSV 的作用机制。通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 TS 对细胞受体 CD163 和 Vimentin 的基因合成和蛋白表达的影响。运用 Western blot 技术检测 TS 对细胞内源性凋亡通路启动子 caspase-9 活化的影响,初探 TS 的抗 PRRSV 机制。qRT-PCR 结果表明 TS 能显著抑制感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞受体 CD163 和 Vimentin 基因的合成。Western blot 结果表明 TS 能显著抑制细胞受体 CD163 和 Vimentin 的蛋白表达。TS 能够引起细胞内源性凋亡通路启动子 caspase-9 的活化。研究表明,TS 能抑制 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的穿入过程,从而达到抗 PRRSV 的作用;亦可通过激活细胞凋亡内源性通路以早期促进细胞凋亡的方式产生抗 PRRSV 的作用。

[关键词] PRRSV;茶皂素;CD163;波形蛋白 Vimentin;caspase-9

Effects of Tea Saponin on PRRSV Related Cell Receptors and Caspase-9 Activation in Marc145 Cells

HOU Zhen, DONG Qian-qian, HUANG Jian-gang, YIN Wei, FAN Kuo-hai, SUN Yao-gui, LI Hong-quan*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Corresponding author: LI Hong-quan, E-mail: livets@163.com

Abstract: Taking tea saponin (TS) as the candidate drug of anti-PRRSV, the antiviral mechanism of TS was explored through the determination of the effect on the Marc-145 receptor CD163 and Vimentin gene synthesis and protein expression, as well as whether could affect PRRSV infection by cell endogenous apoptotic pathway. qRT-PCR and Western blot technologies were used to detect the influence of TS on cell receptor CD163 and Vimentin gene synthesis and protein expression. In addition, the effect of TS on the caspase-9 activation which is

基金项目: 山西省重点研发计划重点项目 (No.201603D21109-1)

作者简介: 侯震,从事中药调节动物免疫功能及其分子机制。董蓓蓓,与侯震为共同第一作者。

通讯作者: 李宏全。E-mail: livets@163.com

cell endogenous apoptotic pathway promoter was determined by Western blot. qRT-PCR results showed that TS could significantly inhibit the gene synthesis of CD163 and Vimentin in the PRRSV infected Marc-145 cells. Moreover, Western blot results showed that TS could significantly inhibit the expression of CD163 and Vimentin and induce caspase-9 activation. TS could significantly inhibit PRRSV enter into Marc-145 cells and activate the cell endogenous apoptotic pathway to induce the early apoptosis to anti-PRRSV replication.

Key words: PRRSV; Tea saponin; CD163; Vimentin; caspase-9

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是猪的一种病毒性急性传染病,是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)所引起的^[1]。目前,PRRS 已经严重影响了全世界的养猪业,给养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。目前,主要通过接种疫苗来防治本病,但随着不同毒株的出现,对 PRRS 的防控难度日益增加。天然产物在药物研发过程中起着相当重要的作用,市面上的大多数药物都是直接或间接源自于天然产物。研究前期筛选出了多种具有抗病毒作用的天然化合物,例如苦参碱能够抑制 PRRSV^[3]和 PCV2^[4]在细胞上的复制;丹参酮 IIA 磺酸钠可以干扰 PRRSV^[5]和 MDV^[6-7]的增殖。

茶皂素是前期体外筛选抗 PRRSV 天然化合物时,筛选出来的一种从茶树种子中提取出来的一类糖苷化合物。实验室前期结果已经证实了茶皂素的体外抗 PRRSV 作用,并已证实茶皂素能显著抑制 PRRSV N 蛋白的表达,从而影响病毒在细胞内的复制^[8]。但茶皂素的抗 PRRSV 作用是否只局限在直接作用于病毒尚未报到。文献报道清道夫受体 CD163^[9]和波形蛋白(Vimentin)^[10]是 PRRSV 穿入 Marc-145 细胞的重要受体^[11]。细胞受体可能是茶皂素抗病毒作用的靶点之一。此外,PRRSV 可以通过内源性线粒体通路引起细胞凋亡,凋亡亦可作为研究抗病毒机制方向之一^[12]。

前期的细胞毒性试验和抗病毒试验,已经证实茶皂素在 Marc-145 细胞上的最大安全浓度(maximum no-cytotoxic concentration, MNTC)为 30 $\mu\text{g/mL}$,且在该浓度下,TS 对 PRRSV 的复制有抑制作用^[8]。因此,试验在此浓度下,从 PRRSV 感染细胞

的受体入手,在 mRNA 和蛋白水平研究 TS 对感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞上 CD163 和 Vimentin 两种受体的表达量影响,并在蛋白水平上初步研究 TS 对感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞中 caspase-9 活化的影响,以补充 TS 抗 PRRSV 的机制,为茶皂素的后续开发提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂 细胞级 DMSO 及 DMEM 高糖液体培养基购于美国 Sigma 公司; β -actin 单克隆抗体、高灵敏度化学发光检测试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;caspase-9 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司;FITC 标记山羊抗鼠 IgG 购于北京博奥森生物技术有限公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体购于北京全式金生物技术有限公司;脱脂奶粉、兔抗 CD163 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;Vimentin 多克隆抗体购于南京巴傲德生物科技有限公司;SYBR® Premix Ex Taq™ II 及 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购于大连 TaKaRa 公司;蛋白提取试剂盒购于北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 药品 试验所用药物 TS 浓度为 98%,由北京中医药大学中药学院雷海民教授惠赠。阳性药物利巴韦林标准品(批号:140629-200202)购于中国食品药品检定研究所。

1.3 细胞、病毒 Marc-145 细胞购买于中国兽药药品监察所。高致病性 JXAJ-R 株 PRRSV 活疫苗,购于广东大华农动物保健品股份有限公司,其生产批号为 1012001,毒力为 10^{-6} 。

1.4 TS 对 CD163、Vimentin 基因作用的测定

1.4.1 细胞总 RNA 的提取与反转录 根据文献^[13]进行样品制备,分别设细胞对照组、病毒对照

组(100TCID₅₀)、30 μg/mL TS 试验组、0.125 mg/mL 利巴韦林对照组。在 6 孔板中,接种 Marc-145 细胞,待细胞长至 80%左右,与 PRRSV (100TCID₅₀) 在 4 ℃下共孵育 2 h,弃掉病毒液。然后加入 2% DMEM 细胞生长维持液,放入 37 ℃培养箱中(从此时开始计时,即为穿入 0 h),2 h 将 2%DMEM 细胞生长维持液用药液替换,并继续放入 37 ℃培养箱中,到穿入 5 h 时,将 TS 试验组和利巴韦林对照组培养液换为 2% DMEM 细胞生长维持液,仍放入

37 ℃培养箱中继续孵育 24 h。使用 TRIzol ® Reagent 试剂盒,进行 RNA 样品的提取。根据 TaKaRa 反转录试剂盒说明进行 cDNA 合成,普通 PCR 扩增。

1.4.2 qRT-PCR 反应检测 CD163 和 Vimentin mRNA 基因的表达量 根据 NCBI 数据库中猴属 CD163、Vimentin 和 18S 基因核酸 CDS 区序列,运用 Primer3 Plus 软件设计出以下 3 对引物见表 1,由华大基因公司合成。

表 1 引物序列及 PCR 产物大小

Tab 1 Primer sequences and the size of PCR products

基因 Gene	引物基因序列号	引物序列(5'-3') Primer Sequences	产物大小 PCR products
CD163	XM 021921990.1	F:TGTTTCTTGTCGTGGGA R:ATTCGTCAGCCTCATTT	139 bp
18s-rRNA	NR 146166.1	F:ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG R:GACCACATGATGCGTACTGG	217 bp
Vimentin	XM 011752092.2	F:AAATGGCTCGTCACCTTCGT R:CGTTTCGTTGATAACCTGTCC	251 bp

以 cDNA 为模板,加入各检测基因的对应引物,进行 SYBP Green RT-PCR 反应,反应条件依次为:90 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,退火温度 56 ℃,退火 30 s,整个过程设 40 个循环数。以 18sRNA 作为内参,所得数据采用 2^{-ΔΔC_t}法对目的基因的表达量进行比较分析。

1.5 TS 对 CD163 和 Vimentin 蛋白作用的测定 根据 1.4.1 项样品,使用蛋白提取试剂盒提取蛋白。使用 NanoDrop 核酸蛋白分析仪进行蛋白浓度测定。分别以兔抗 CD163 单克隆抗体、兔抗 Vimentin (I444)单克隆抗体和鼠抗 β-actin 单克隆抗体为一抗,山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(1:10000)或山羊抗鼠 IgG 二抗(1:5000)为二抗进行 Western blot 检测。

1.6 TS 对 caspase-9 蛋白活化作用的测定 设细胞对照组,病毒对照组(100TCID₅₀),TS 对照组,30 μg/mL TS 加毒试验组(先加 100TCID₅₀ PRRSV 6 h,用 PBS 洗 2 遍,再加 TS),利巴韦林 125 μg/mL 加毒对照组,30 μg/mL TS 加毒试验组(先加 100TCID₅₀ PRRSV 12 h,用 PBS 洗 2 遍,再加 TS),

在 24 h 后使用蛋白提取试剂盒提取蛋白,收集 caspase-9 蛋白样品。使用 NanoDrop 核酸蛋白分析仪进行蛋白浓度测定。分别以兔抗 caspase-9 单克隆抗体和鼠抗 β-actin 单克隆抗体为一抗,山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(1:10000)或山羊抗鼠 IgG 二抗(1:5000)为二抗进行 Western blot 检测。

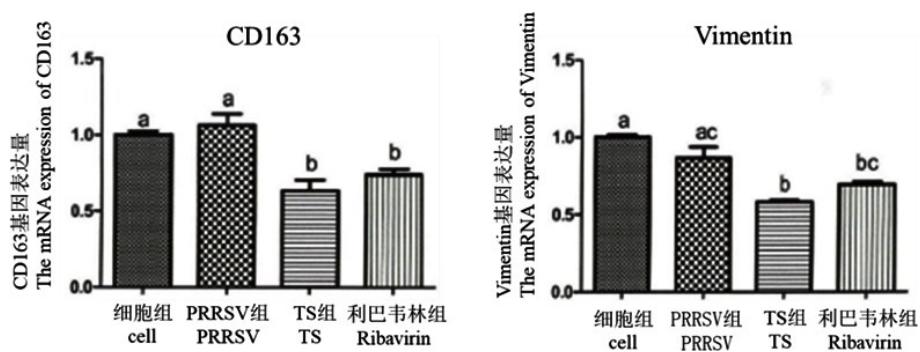
1.7 数据分析 本试验均通过(GraphPad Software,Inc.California,USA)软件计算处理而得到所有相关数据以及方差分析,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。所有实验均经过 3 次独立重复试验,且每次试验设有 4 个重复。

2 结果与分析

2.1 TS 对 CD163 和 Vimentin 基因表达量的测定 如图 1 所示,与细胞对照组相比,病毒组 CD163 和 Vimentin 基因表达量差异不显著(P>0.05);TS 试验组及利巴韦林对照组 CD163 和 Vimentin 基因表达量显著降低(P<0.05)。与病毒组相比,TS 试验组 CD163 和 Vimentin 基因表达量显著降低(P<0.05);利巴韦林对照组 CD163 基因表达量显著降

低($P<0.05$),而 Vimentin 基因表达量差异不显著($P>0.05$);与利巴韦林对照组相比,TS 试验组

CD163、Vimentin 基因表达量差异不显著($P>0.05$)。



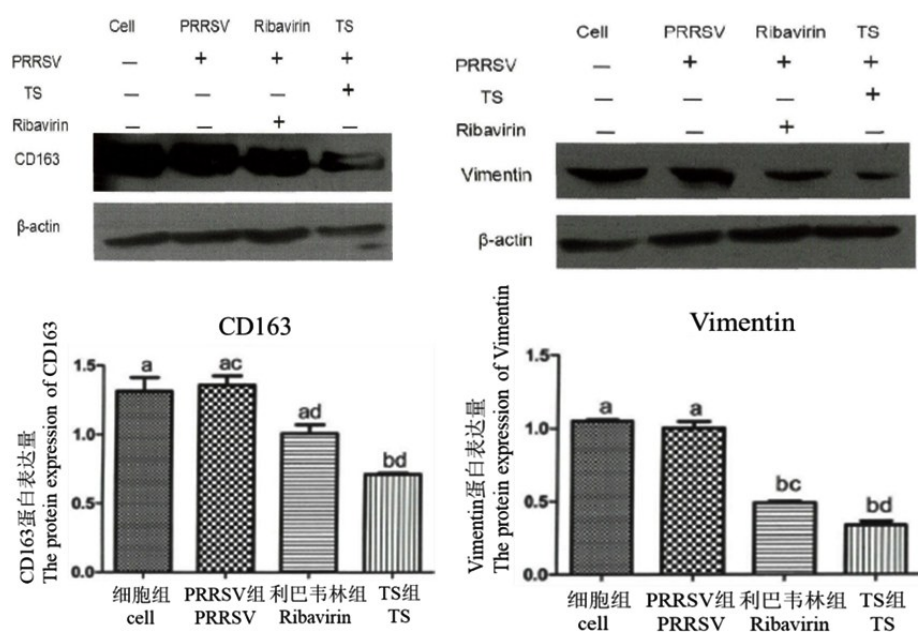
相同字母表示组与组之间差异不显著($P>0.05$),不同字母表示组与组间差异显著($P<0.05$)
The same letters indicate no significant differences between groups($P>0.05$), different letters show significant differences between groups($P<0.05$)

图 1 CD163 和 Vimentin 各组基因的表达式

Fig 1 The mRNA expression of CD163 and Vimentinin in each group

2.2 TS 对 CD163 和 Vimentin 蛋白合成的影响
以 β -actin 作为内参蛋白,采用 Image Pro Plus 软件对各组蛋白条带灰度值进行定量分析。结果如图 2 所示,TS 试验组 CD163、Vimentin 蛋白表达量均显

著少于细胞对照组和病毒对照组($P<0.05$),细胞对照组与病毒对照组两种蛋白的表达量差异不显著($P>0.05$),利巴韦林对照组两种蛋白的表达量高于 TS 试验组,但差异不显著($P>0.05$)。



相同字母表示组与组之间差异不显著($P>0.05$),不同字母表示组与组之间差异显著($P<0.05$)
The same letters indicate no significant differences between groups($P>0.05$), different letters show significant differences between groups($P<0.05$)

图 2 CD163 和 Vimentin 各组蛋白的表达式

Fig 2 The expression of CD163 and Vimentinin in each group

2.3 TS 对 caspase-9 蛋白活化的影响 本试验采用 western blot 对各组 caspase-9 的表达情况进行检测,以 β -actin 作为内参蛋白,结果如图 3 所示。正常细胞对照组、病毒对照组、TS 对照组以及利巴韦林对照组在细胞培养 24 h 时,均不出现 caspase-9 的活化;先加毒 6 h 和 12 h 再加 TS 的两个试验组均能检测到明显的 caspase-9 活化片段;六个组均能检测到以酶原形式存在的 caspase-9。

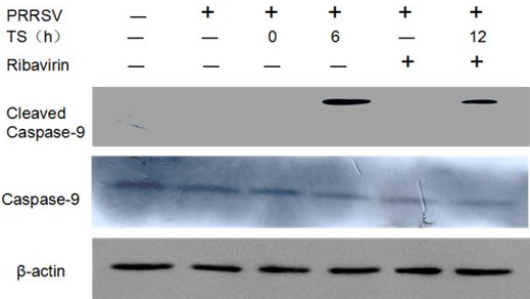


图 3 24h caspase-9 蛋白的表达

Fig 3 The expression of caspase-9 protein at 24h

3 讨论与结论

3.1 TS 对细胞受体 CD163 和 Vimentin 的基因合成和蛋白表达的影响 PRRSV 进入 Marc-145 细胞过程中 CD163 和 Vimentin 具有重要作用^[13]。据研究报道证实,细胞受体 CD163 在 PRRSV 侵入与复制的过程中起着一定作用^[2,14-15]。Kim 等^[10]于 2006 年报道证实 Marc-145 细胞受体 Vimentin 可以与 PRRSV 中的 N 蛋白相互作用介导病毒侵入。目前,常见的抑制 PRRSV 增殖的报道都是以细胞受体 PCBP1 和 PCBP2 为靶点进行抗 PRRSV 研究^[16-17],TS 能否抑制感染 PRRSV 细胞的 CD163 和 Vimentin 表达,可以作为研究其抗病毒活性的途径之一。试验选择以 CD163 和 Vimentin 两种 Marc-145 细胞受体为靶点进行抗 PRRSV 侵入机制的研究。从 qRT-PCR 与 Western blot 结果来看,TS 可显著抑制感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞受体 CD163 和 Vimentin mRNA 和蛋白水平的表达。推测 TS 可通过抑制 PRRSV 入侵细胞的过程来发挥其抗 PRRSV 作用。

3.2 TS 对细胞内源性凋亡通路启动子 caspase-9 活化的影响 药物能够通过促进病毒感染早期宿主细胞的凋亡或者抑制病毒感染晚期细胞的凋亡,是凋亡的一种抗病毒机制^[18]。然而,目前针对抗 PRRSV 凋亡机制的研究并未有报道。中药抗病毒凋亡通路机制可以选用 caspase-8、caspase-9、caspase-3 的活化作为检测指标^[19-21]。在本实验室课题组前期的研究中,已证实在 PRRSV 感染 Marc-145 细胞 24 h 时检测不到活化的 caspase-3,而在第 48 h 和 60 h 均能检测到活化的 caspase-3 片段^[10],因此推测病毒感染细胞 24 h 可能是感染细胞发生凋亡的早期阶段。Roy 等^[22]于 2000 年研究发现,PRRSV 能够激活依赖 caspase-9 的细胞内源性凋亡途径,即当细胞受到死亡受体信号刺激时,通过一系列的信号传导途径,激活 caspase-9,最终导致宿主细胞的凋亡。同样,Sang-Myeong Lee^[19]等于 2007 年研究证实,PRRSV 体外感染 Marc-145 细胞,能够引起细胞内源性凋亡信号通路的关键因子细胞色素 C 从线粒体内释放到细胞质,使得 Bax 的表达上升。因而试验选择 caspase-9 为靶点,进行 TS 作用于 PRRSV 感染 Marc-145 细胞早期时 caspase-9 是否能够活化的研究。Western blot 结果显示,在 PRRSV 感染宿主细胞 24 h 时,细胞自身、病毒感染的细胞、阳性药物利巴韦林与病毒作用的细胞 caspase-9 均不出现活化,而在 TS 作用于病毒感染细胞的两个试验组中,TS 明显促进了内源性凋亡信号 caspase-9 的活化,从而使细胞启动不可逆的凋亡过程。该结果表明,当病毒完全侵入宿主细胞,在进入复制阶段,加入 TS 出现了细胞凋亡现象,表明 TS 有可能在病毒复制早期通过内源性信号途径促进细胞凋亡,从而起到了抗病毒作用,这为 TS 抗病毒机制研究提供了一条新的思路。TS 可通过抑制 CD163 和 Vimentin 的表达,进而抑制 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的侵入过程,从而达到抗 PRRSV 的作用;亦可通过激活细胞凋亡内源性通路以早期促进细胞凋亡的方式,进而抑制 PRRSV 的复制,发挥其抗 PRRSV 的作用。

参考文献:

[1] O'Halloran J, Zwicker J C, Griffiths S. Atlantic Canada-Hitra disease in Atlantic salmon[J]. Can Vet J, 1992, 33(6):406-407.

[2] 王 婧. 稳定表达猪 CD163 蛋白的 HEK-293 细胞系的建立和鉴定[D]. 华中农业大学, 2011.

Wang J. Establishment and identification of HEK-293 cell lines stably expressing porcine CD163 protein[D]. Huazhong Agricultural University, 2011.

[3] Sun N, Wang Z W, Wu C H, *et al.* Antiviral activity and underlying molecular mechanisms of Matrine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro[J]. Res Vet Sci, 2014, 96(2):323-327.

[4] Sun N, Yu T, Zhao J X, *et al.* Antiviral activities of natural compounds derived from traditional chinese medicines against porcine circovirus type 2 (PCV2) [J]. Biotechnol Bioproc E, 2015, 20(1):180-187.

[5] Sun N, Li E, Wang Z, *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus via suppressing N gene expression and blocking virus-induced apoptosis [J]. AntivirTher, 2014, 19(1):89-95.

[6] Sun N, Cong X M, Jiang J B, *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate inhibits the meq, ul49 and VP22 expression of Marek's disease virus [J]. AntivirTher, 2014, 19(8):793-8.

[7] Sun Y, Niu L, Song M, *et al.* Screening compounds of Chinese medicinal herbs anti-Marek's disease virus [J]. Pharm Biol, 2014, 52(7):841-847.

[8] Li E, Sun N, Zhao J X, *et al.* *In vitro* evaluation of antiviral activity of tea seed saponins against porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Antivir Ther, 2015, 20(7):743-752.

[9] Welch S K, Calvert J G. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection[J]. Virus Res, 2010, 154(1-2):98-103.

[10] Kim J K, Fahad A M, Shanmukhappa K, *et al.* Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10[J]. J Virol, 2006, 80(2):689-696.

[11] Katz D. International journal of experimental pathology. [M]. Blackwell Science, 1990.

[12] Gao L, Zhang W, Sun Y, *et al.* Cryptosporidium parvum Extract Inhibits Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) In Vitro and In Vivo[J]. Plos One, 2013, 8(5):e63767.

[13] 李 娥. 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 天然化合物及

其衍生物体外筛选与分子机制研究[D]. 山西农业大学, 2014.

Li E. In vitro screening natural compounds and derivatives with antiviral activities against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and investigating their molecular mechanisms[D]. Shanxi Agricultural University, 2014.

[14] Calvert J G, Slade D E, Shields S L, *et al.* CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses[J]. J Virol, 2007, 81(14):7371-7379.

[15] Das P B, Dinh P X, Ansari I H, *et al.* The Minor Envelope Glycoproteins GP2a and GP4 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interact with the Receptor CD163[J]. J Virol, 2010, 84(4):1731-1740.

[16] Wang X, Bai J, Zhang L, *et al.* Poly(A)-binding protein interacts with the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and participates in viral replication.[J]. Antiviral Res, 2012, 96(3):315-323.

[17] Beura L K, Dinh P X, Osorio F A, *et al.* Cellular poly(c) binding proteins 1 and 2 interact with porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1 β and support viral replication[J]. J Virol, 2011, 85(24):12939-12949.

[18] 任静强. 美洲型、欧洲型 PRRSV 及 PCV2 基因工程疫苗构建及实验免疫研究[D]. 吉林大学, 2014.

Ren J Q. Construction and immunogenicity of genetic engineer vaccines against EU-type/NA-type PRRSV and PCV2[D]. Jilin University, 2014.

[19] Lee S M, Kleiboeker S B. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway[J]. Virology, 2007, 365(2):419-434.

[20] Costers S, Lefebvre D J, Delputte P L, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages[J]. Arch Virol, 2008, 153(8):1453-1465.

[21] 李玉明. HP-PRRSV 感染仔猪胸腺细胞凋亡的鉴定及凋亡相关因子 mRNA 表达水平的检测[D]. 东北农业大学, 2013.

Li Y M. Identification of apoptotic cells and analysis of apoptosis-associated factors in thymus of piglets infected with HP-PRRSV [D]. Northeast Agricultural University, 2013.

[22] Roy S, Nicholson D W. Cross-talk in cell death signaling[J]. J Exp Med, 2000, 192(8):F21-25.