

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.08.10

桃金娘鞣质抗猪流行性腹泻病毒作用研究

刘伟¹, 银慧慧¹, 何颖¹, 赵武¹, 冯林川², 孟菲¹,
施文³, 姜源明¹, 覃振华¹, 孙建华¹

(1. 广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 南宁 530001;

2. 广西康普动物保健品股份有限公司, 南宁 530001; 3. 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005)

[收稿日期] 2020-03-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)08-0061-05 [中图分类号] S859.7

[摘要] 为测试桃金娘鞣质对猪流行性腹泻病毒(PEDV)的影响,体外试验以 PEDV 感染 PK 细胞为模型,采用细胞病变(CPE)效应法、MTT 比色法检测细胞存活率,测定桃金娘鞣质抑制 PEDV 增殖的半数有效浓度(EC₅₀)和治疗指数(TI),同时设利巴韦林对照组;体内试验以 PEDV 感染昆明种小鼠为模型,60 只昆明种小鼠随机均分为 6 组,设桃金娘鞣质高剂量组、中剂量组、低剂量组、利巴韦林对照组、病毒对照组、健康对照组,采用实时荧光定量 PCR 法检测肠系膜淋巴结 PEDV 含量,观察桃金娘鞣质抗 PEDV 增殖能力。结果显示,桃金娘鞣质能明显抑制 PEDV 引起的细胞病变,半数有效浓度为 0.021 mg/mL,不如利巴韦林 0.0098 mg/mL ($P < 0.05$);治疗指数为 361.9,优于利巴韦林 214.28 ($P < 0.05$);桃金娘鞣质能影响 PEDV 在小鼠体内的增殖数量,并呈现一定量效关系;桃金娘鞣质各剂量组小鼠肠系膜淋巴结 PEDV 含量均低于病毒对照组 ($P < 0.05$),高、中剂量组小鼠肠系膜淋巴结 PEDV 含量均低于利巴韦林对照组 ($P < 0.05$),小鼠肠系膜淋巴结 PEDV 含量在桃金娘鞣质高、中、低剂量组间也存在显著差异 ($P < 0.05$)。试验表明,桃金娘鞣质具有体外、体内抗 PEDV 药理活性,有进一步开发抗病毒药物的价值。

[关键词] 桃金娘;鞣质;PEDV

Study on the Effects of Myrtle Tannins on Porcine Epidemic Diarrhea Virus

LIU Wei¹, YIN Hui-hui¹, HE Ying¹, ZHAO Wu¹, FENG Lin-chuan²,

MENG Fei¹, SHI Wen³, JIANG Yuan-ming¹, QIN Zhen-hua¹, SUN Jian-hua¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Kangpu Animal Health Products Co., Ltd. Nanning 530001, China;

3. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The experiment was aimed to study the effects of Myrtle tannins on porcine epidemic diarrhea virus. *In vitro* experiment, porcine epidemic diarrhea virus was used to infect competitive cells as a model. The cell survival

基金项目: 广西水产畜牧科技推广应用项目(桂渔牧科 20142044);广西创新驱动发展专项(桂科 AA17204057)

作者简介: 刘伟,高级兽医师,从事兽医药理学研究与新兽药制剂开发。E-mail:496524248@qq.com

rate was observed by cytopathic effect (CPE) method and MTT colorimetric method. The half effective concentration (EC_{50}) and therapeutic index (TI) of Myrtle tannins in inhibiting the proliferation of PEDV were determined and ribavirin was set up as control group at the same time. *In vivo* experiment, Kunming mice infected with PEDV were used as the model. Sixty Kunming mice were randomly divided into 6 groups, namely, the normal control group, the ribavirin group, the virus control group, the high-dose myrtle tannins group, the middle-dose group, and the low-dose group. PEDV content in mesenteric lymph nodes was detected by real-time fluorescence quantitative PCR to evaluate the anti-PEDV proliferation ability of myrtle tannins. *In vitro* experiment results showed that Myrtle tannins can effectively inhibit cytopathic effect induced by PEDV. The EC_{50} was 0.021 mg/mL, which was lower than that of ribavirin 0.0098 mg/mL ($P < 0.05$), and the TI was 361.9, which was better than that of ribavirin 214.28 ($P < 0.05$). *In vivo* experiment results showed that Myrtle tannins could affect the proliferation of PEDV in mice, and showed a certain dose-effect relationship. The content of PEDV in mesenteric lymph nodes of mice in each Myrtle tannins group was lower than that in the virus control group ($P < 0.05$) and the content of PEDV in mesenteric lymph nodes in high and middle tannins groups was lower than that in ribavirin group ($P < 0.05$). There was also a significant difference in PEDV content in mesenteric lymph nodes among high, middle and low tannins groups ($P < 0.05$). In conclusion, Myrtle tannins had anti-PEDV pharmacological activities *in vitro* and *in vivo*, which was value of further development of antiviral drugs.

Key words: Myrtle; tannins; porcine epidemic diarrhea virus

鞣质是广泛分布于植物体内的一类结构比较复杂的多元酚类化合物^[1],具有抑菌、抗氧化、抗病毒等多方面的药理活性^[2]。鞣质含有多个酚羟基具有较强极性,遇金属离子生成缩合物而不易提出,遇酸碱不稳定,温度过高发生分解或变性,多数水溶性多酚类化合物能溶于水,但同时发生水解^[2-3]。因此,从植物中提取分离完整的鞣质成分并保存其生物活性,对工艺条件有较高的要求。课题组在前期研究中曾利用超临界 CO_2 萃取技术在低温、非水溶剂状态下从桃金娘 [*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait) Hassk., Myrtle] 根茎中分离得到一种鞣质^[4]。当前,对桃金娘鞣质抗病毒作用的研究还比较少,因此本研究进行了桃金娘鞣质抗猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhoe Virus, PEDV) 试验,以期开发桃金娘新兽药提供试验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物 桃金娘鞣质,由广西兽医研究

所兽药新技术开发中心从野生桃金娘根茎中分离,制成 50 mg/mL 无菌溶液;利巴韦林注射液,江苏鹏鹞药业有限公司,国药准字 H19993415,产品批号:1804292611。

1.1.2 病毒和细胞株 猪流行性腹泻病毒分离株 (PEDV-CH/GX/2015/750A),由广西兽医研究所病毒研究室分离鉴定、保存;PK 细胞株,广西壮族自治区兽医研究所生物技术重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂与设备 胎牛血清、MTT 购自 Gibco 公司;DMEM 培养基、PBS、胰蛋白酶购自 Sigma 公司;猪流行性腹泻病毒实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒购自北京世纪元亨公司;其他试剂均为分析纯;Lightcycler2.0 荧光定量 PCR 仪, Roche 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 PEDV 细胞毒力测定 对数生长期的细胞经胰酶消化,调整浓度为 1×10^5 /mL,按 100 μ L/孔加入 96 孔细胞培养板,培养 24 h 长成单层,弃培养液,依次接种经 10 倍连续稀释的病毒液 100 μ L/孔,

每浓度重复 8 孔, 设细胞对照; 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 倒置显微镜观察细胞病变 (CPE), 并按 MTT 法酶标仪测定各孔在波长 490 nm 处吸光度 A₄₉₀, 根据 Reed - Muench 公式计算 PEDV 半数感染浓度 (TCID₅₀)。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{各组 } A_{490} \text{ 值}}{\text{正常细胞 } A_{490} \text{ 值}} \times 100\%$$

$$\text{比距} = \frac{(\text{高于 } 50\% \text{ 病变率} - 50\%)}{(\text{高于 } 50\% \text{ 病变率} - \text{低于 } 50\% \text{ 病变率})} \times 100\%$$

$$\text{TCID}_{50} = \text{Antilog}(\text{高于 } 50\% \text{ 病变的病毒最高稀释度对数} + \text{比距} \times \text{稀释系数的对数})$$

1.2.2 桃金娘鞣质细胞毒力测定 对数生长期的细胞经胰酶消化, 调整浓度为 1×10^5 /mL, 按 100 μL/孔加入 96 孔细胞培养板, 培养 24 h 长成单层, 弃培养液, 桃金娘鞣质用细胞维持液按 2 倍比稀释 10 个浓度梯度, 按 100 μL/孔依次接种, 每浓度重复 8 孔, 设空白对照组和细胞对照; 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 倒置显微镜观察细胞病变 (CPE), 按 MTT 法, 酶标仪测定各孔在波长 490 nm 处吸光度 A₄₉₀, 根据 Reed - Muench 公式计算药物半数中毒浓度 (TC₅₀), 依靠浓度梯度试验直接测定最大无毒浓度 (TC₀)。

$$\text{TC}_{50} = (\text{Antilog 高于 } 50\% \text{ CPE 百分率病毒稀释度对数} + \text{比距}) \times \text{初始浓度}$$

1.2.3 桃金娘鞣质体外抗 PEDV 测定 将 1×10^5 /mL 对数生长期的细胞按 100 μL/孔加入 96 孔细胞培养板, 培养 24 h 长成单层, 弃培养液; 试验药物组将桃金娘鞣质从最大无毒浓度按 10 倍比稀释 5 个滴度浓度, 50 μL/孔依次加入 96 孔板中, 随后加入 100 TCID₅₀ 的病毒液 50 μL/孔, 混合均匀, 每浓度重复 8 孔; 同步设利巴韦林药物对照组、细胞对照组、病毒对照组和空白对照组。37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 倒置显微镜观察细胞病变 (CPE), 按 MTT 法, 酶标仪测定各孔在波长 490 nm 处吸光度 A₄₉₀, 根据 Reed - Muench 公式计算药物半数有效浓度 (EC₅₀) 及治疗指数 (TI)。

$$\text{EC}_{50} = \text{Antilog}(\text{高于 } 50\% \text{ CPE 百分率病毒稀释度的值} - \text{比距}) \times \text{初始浓度}$$

$$\text{TI} = \frac{\text{半数毒性浓度}(\text{TC}_{50})}{\text{半数有效浓度}(\text{EC}_{50})}$$

1.2.4 桃金娘鞣质体内抗 PEDV 试验 60 只昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机均分为 6 组。第 1 组为药物低剂量组, 给予桃金娘鞣质 25 mg/kg; 第 2 组为药物中剂量组, 给予桃金娘鞣质 50 mg/kg; 第 3 组为药物高剂量组, 给予桃金娘鞣质 100 mg/kg; 第 4 组为阳性药物组, 给予利巴韦林 25 mg/kg; 灌胃给药, 灌服容积为 1 mL/只, 给药 0.5 h 后各组均以 100 TCID₅₀ 剂量 PEDV 灌胃攻毒; 第 5 第 6 组分别为病毒对照组和阴性对照组。攻毒后第 48 h, 处死试验小鼠, 摘取并称量肠系膜淋巴结, 置于研磨器中加入无菌生理盐水或 PBS 缓冲液研磨, 匀浆后转至灭菌离心管中, 反复冻融 3 次, 8000 r/min 离心 2 min, 取上清 -80 °C 保存备用。按照北京世纪元亨公司柱式 RNA 核酸提取试剂盒使用说明书进行 PEDV RNA 提取; 按照世纪元亨猪流行性腹泻病毒实时荧光 RT - PCR 检测试剂盒使用说明书进行 PEDV 的扩增, 主要反应条件为 42 °C 5 min, 95 °C 10 s; 循环 95 °C 5 s, 60 °C 35 s, 共 40 次; 在每次循环第二步 (60 °C 35 s) 收集荧光信号; 每个样品做 3 个重复。按照 $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对病毒载量。

1.3 数据统计与分析 采用 SPSS20.0 统计软件进行方差分析, Duncan's 法进行组间差异性比较, 试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 桃金娘鞣质体外抗病毒作用 经测试, PEDV 对 PK 细胞的 TCID₅₀ 为 $10^{-4.1}$ 。由表 1 可知, 桃金娘鞣质与对照药物利巴韦林对 PK 细胞体系中的 PEDV 都具有一定的抑制作用, 桃金娘鞣质 EC₅₀ 高于利巴韦林 ($P < 0.05$), 表明桃金娘鞣质抑制病毒需要更高的药物浓度; 桃金娘鞣质对 PEDV 的 TI 值显著优于利巴韦林 ($P < 0.05$), 表明桃金娘鞣质及其成分具有较大抗病毒研究价值。

2.2 桃金娘鞣质体内抗病毒作用 由图 1 可知, 桃金娘鞣质高、中、低剂量组和对照药物利巴韦林组小鼠肠系膜淋巴结 PEDV 含量均显著低于病毒对照组 ($P < 0.05$), 显示体内抑制 PEDV 增殖作用; 桃金娘鞣质高、中剂量组体内抑制病毒效果明

显优于对照药物利巴韦林组 ($P < 0.05$) ; 桃金娘鞣质高剂量、中剂量、低剂量组间对 PEDV 的抑制

作用具有生物统计学差异 ($P < 0.05$) , 呈现一定量效关系。

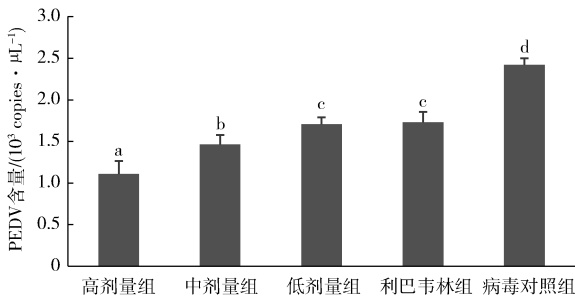
表 1 桃金娘鞣质体外抗 PEDV 作用

Tab 1 Effects of myrtle tannins anti - PEDV *in vitro*

药物	TC ₅₀ /(mg · mL ⁻¹)	TC ₀ /(mg · mL ⁻¹)	EC ₅₀ /(mg · mL ⁻¹)	TI
桃金娘鞣质	7.6	2.3	0.021	361.9*
利巴韦林	2.1	0.59	0.0098*	214.28

* 表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

* indicates that there are significant differences between groups ($P < 0.05$)



标注不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

different letters indicate that there are significant differences between groups ($P < 0.05$)

图 1 桃金娘鞣质对小鼠肠系膜淋巴结 PEDV 含量的影响

Fig 1 Effects of myrtle tannins on PEDV content in mesenteric lymph nodes of mice

3 讨论与结论

PEDV 属于冠状病毒科冠状病毒属病毒, 引起以呕吐、腹泻、脱水为主要临床特征的猪流行性腹泻 (PED)。PED 尤其危害仔猪, 年龄越小越易感, 症状越重, 死亡率越高, 临床上缺乏防治特效药物, PED 每年都给养猪业造成严重损失^[5]。研究中草药抗 PEDV 药理活性, 从传统中草药中发掘抗 PEDV 化学成分或组方, 是研发 PED 临床防治药物的重要途径。桃金娘是中国南方地区特别是壮族地区传统中草药, 民间广泛用于治疗急/慢性肠胃炎、消化不良、痢疾、腹泻、呕吐、肝炎、出血等疾病^[6]。桃金娘富含鞣质类成分, 鞣质是一类结构复杂的酚类化合物, 具有广泛的生物活性^[7]。研究表明, 桃金娘总多酚具有抗氧化活性和自由基清除活

性^[8], 还具有显著的乙酰胆碱酯酶抑制活性^[9], 从桃金娘鞣质中检测到没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇和白藜芦醇 4 种酚类物质^[10]; 鞣花酸能增强拉米夫定 (3TC) 抗乙型肝炎病毒 (HBV) 作用^[11]。

本试验考察了桃金娘鞣质在体外 PK 细胞体系和小鼠体内抗 PEDV 的效果。体外试验结果表明, 桃金娘鞣质达到一定质量浓度时, 对正常 PK 细胞具有一定的毒性作用, 半数中毒浓度 TC₅₀ 为 7.6 mg/mL, 最大无毒浓度 TC₀ 为 2.3 mg/mL; 桃金娘鞣质对 PK 细胞体系中的 PEDV 具有明显抑制作用, 半数有效浓度 EC₅₀ 为 0.021 mg/mL, 对 PEDV 的治疗指数 TI 为 361.9, 高于抗病毒药物利巴韦林 TI 值 214.28。治疗指数 TI 值是药物的安全性指标, 可以用来衡量药物的潜在研究价值, TI 值越大药物的研究价值越大, TI > 2 表示药物作用明显, TI > 4 表示药物具有开发价值。从桃金娘鞣质对 PEDV 的 TI 值分析, 桃金娘鞣质可能具有很好的抗病毒药物开发价值; 并推测桃金娘鞣质对 PED 的治疗作用优于利巴韦林。体内试验采用 PEDV 感染小鼠, 通过检测病毒含量来考察桃金娘鞣质体内抗病毒作用, 结果表明, 与病毒对照组相比, 桃金娘鞣质显著降低肠系膜淋巴结 PEDV 含量, 据此推测桃金娘鞣质具有体内抑制 PEDV 增殖作用。桃金娘鞣质在体外、体内均具有一定抗 PEDV 药理活性, 但具体是哪一种或几种化学成分具有抗病毒作用, 抗病毒作用机制如何, 以及对 PED 临床治疗效果如何, 均有待进一步研究。

桃金娘鞣质能明显抑制 PEDV 引起的细胞病变,半数有效浓度为 0.021 mg/mL,治疗指数为 361.9;能有效降低 PEDV 感染小鼠体内病毒数量;桃金娘鞣质具有体外、体内抗 PEDV 药理活性,具有进一步开发抗病毒药物的价值。

参考文献:

[1] 尹胜利,浦益琼,杨骏,等. 中药鞣质成分的研究进展[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(1): 165-167.

Yin S L, Pu Y Q, Yang J, *et al.* Research progress of tannins in traditional Chinese medicine [J]. Chinese Journal of Medicinal Guide, 2010, 12(1): 165-167.

[2] 石碧,狄莹,何有节,等. 鞣质的药理活性[J]. 中草药, 1998, 25(7): 487-490.

Shi B, Di Y, He Y J, *et al.* Pharmacological activity of enamel [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1998, 25(7): 487-490.

[3] 徐勤. 鞣质的研究进展[J]. 华夏医学, 2004, 17(1): 113-115.

Xu Q. Advances in research on enamel [J]. Huaxia Medical Journal, 2004, 17(1): 113-115.

[4] 孟菲,赵武,刘伟,等. 超临界二氧化碳提取桃金娘根茎中总鞣质的方法[P]. 中国, 201410115154.5. 2016-06-08.

Meng F, Zhao W, Liu W, *et al.* Method for extracting total tannin in *Rhodomyrtus tomentosa* rhizome by using supercritical carbon dioxide [P]. China, 201410115154.5. 2016-06-08.

[5] 刘政龙,王金良,沈志强. 猪流行性腹泻病毒研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(9): 2506-2511.

Liu Z L, Wang J L, Shen X Q. Research progress on porcine epidemic diarrhea virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(9): 2506-2511.

[6] 刘伟,赵武,孟菲,等. 桃金娘化学成分和生物活性的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3): 241-244.

Liu W, Zhao W, Meng F, *et al.* Research progress on chemical components and biological activity of *Rhodomyrtus tomentosa* [J].

China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(3): 241-244.

[7] 肖婷,崔炯漠,李倩,等. 桃金娘的化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5): 800-805.

Xiao T, Cui J M, Li Q, *et al.* Research progress on chemical constituents, pharmacology and clinical application of *Rhodomyrtus tomentosa* [J]. Drugs & Clinic, 2013, 28(5): 800-805.

[8] 银慧慧,刘伟,赵武,等. 桃金娘根总多酚的超声提取及抗氧化活性研究[J]. 中国医药导报, 2019, 16(10): 33-36.

Yin H H, Liu W, Zhao W, *et al.* Ultrasonic extraction and antioxidant activity of total polyphenols from Myrtle root [J]. China Medical Herald, 2019, 16(10): 33-36.

[9] 郑晓燕,郭素霞,臧小平,等. 桃金娘果实多酚抗氧化活性及乙酰胆碱酯酶抑制活性研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(17): 70-74.

Zheng X Y, Guo S X, Zang X P, *et al.* Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Rhodomyrtus tomentosa* fruit polyphenol [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(17): 70-74.

[10] 银慧慧,刘伟,赵武,等. UPLC 法同时测定桃金娘果中 4 种酚类成分[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(8): 44-50.

Yin H H, Liu W, Zhao W, *et al.* Simultaneous determination of four main phenolics in *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. fruit by UPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(8): 44-50.

[11] 韩凤梅,张晓雷,陈勇. 齐墩果酸、鞣花酸与拉米夫定体外联合抗 HBV 作用研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2009, 31(4): 426-429.

Han F M, Zhang X L, Chen Y. The inhibitory action of lamivudine combined with oleanolic acid or ellagic acid against hepatitis B virus *in vitro* [J]. Journal of Hubei University (Natural Science), 2009, 31(4): 426-429.

(编辑:李文平)