

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.02.05

人参提取液体外抑制 IHN 作用效果研究

茆安婷, 尹玉伟, 代 静, 郭曦尧, 程 义, 李 东, 李月红*

(吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

[收稿日期] 2017-07-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 02-0031-05 [中图分类号] S853.74

[摘 要] 探究人参提取液体外抑制 CCB 细胞感染 IHN 的能力, 构建体外 CCB 细胞模型, 运用 RTCA 技术和 MTT 法测得不同浓度人参提取液对 IHN 抑制作用曲线, 并从阻断病毒复制和杀灭病毒两方面讨论人参提取液作用效果。结果表明, 4% 人参提取液对 IHN 具有明显抑制作用, 能够在 16 h 内保护细胞不受 IHN 病毒的侵染, 其中 2 h 时对病毒灭活抑制率最高达到 51.5%, 1~12 h 内对病毒复制有持续抑制作用。研究可为 IHN 防治药物的研发提供新的思路及参考。

[关键词] 人参提取液; IHN; 抑制

Inhibition Effect Ginseng Extract on IHN *in vitro*

MAO An-ting, YIN Yu-wei, DAI Jing, GUO Xi-yao, CHENG Yi, LI Dong, LI Yue-hong*

(College of Animal Science & Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Corresponding author: LI Yue-hong, E-mail: liyong@sina.com

Abstract: To delve the ability of Panax ginseng extract liquid inhibition IHN infected CCB cells, CCB cell model was constructed in vitro, using RTCA technology and MTT method the inhibitory action curve of ginseng extract on IHN was measured, and discussing the effect of ginseng extra liquid from blocking virus replication and killing two aspects of the virus. The results showed that 4% ginseng extract liquid had obvious inhibitory effect on IHN, it can protect cells from infection by IHN virus for a certain period of time, When 2 h, the inhibition rate of virus inactivation was highest, reaching 51.5%, 1~12 h has a continuous inhibitory effect on viral replication. IHN prevention and treatment of drug research and development to provide new ideas and reference.

Key words: Panax ginseng extract liquid; IHN; inhibition

传染性造血器官坏死病毒 (Infectious haematopoietic necrosis virus, IHN), 弹状病毒科, 诺拉弹状病毒属^[1], 作为传染性造血器官坏死病 (infectious haematopoietic necrosis, IHN) 的病原体, 是一种线性

单链 RNA 病毒, 最早在上世纪 50 年代在北美西部华盛顿及俄勒冈州于红大马哈鱼 (Oncorhynchus nerka) 孵卵期的鱼苗身上首次被发现^[2], 并迅速蔓延到欧洲和亚洲, 在全世界鲑鳟鱼类中流行^[3]。目

基金项目: 国家自然科学基金 (30972191)

作者简介: 茆安婷, 硕士研究生, 从事动物微生物与鱼病防治方向研究。

通讯作者: 李月红。E-mail: liyong@sina.com

前在对 IHNV 的防治措施主要有两个方面,其一是抗病育种^[4],其二是通过对健康鱼体进行早期的免疫接种,使机体免疫系统产生特异性免疫反应从而达到预防病毒的作用。而这两种方法存在一定的不确定性,同时对鱼类自身的健康及相关食品安全存在一定的隐患,虽然目前尚未有相关报道表明 IHNV 会直接影响人类的健康,但随着病毒变异、鱼机体的药物残留导致的食品安全问题可能会对人类的健康造成影响,所以寻找新型药物迫在眉睫,目前我国渔业养殖中,绿色、无公害、无耐药性的新抗病毒中兽药将逐步成为市场的主导。为寻找抗传染性造血器官坏死病病毒(IHNV)的有效药物,有文献表明,习欠云等人^[5]发现人参多糖复合物对对虾肝脏中 SOD 超氧化物歧化酶活力有明显提高效果,对于血清中 PO 和 LSZ 有类似作用;同时人参皂甙 Rb1 在体外细胞试验中能够灭活病毒^[6]。为此试验选取人参提取液对 IHNV 进行体外抑制方面的研究,为 IHNV 防治药物的研发提供新的思路及参考。

1 材料与方法

1.1 材料 鲤鱼脑细胞系(common carp brain, CCB)细胞培养液:M199 固体培养基(北京 Solarbio 公司)溶解于蒸馏水中,0.22 μm 过滤,加入 10% 体积胎牛血清和 1% 体积双抗(青霉素-链霉素溶液 100x,长春晶美生物),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

CCB 细胞维持液:M199 固体培养基溶解于蒸馏水中,0.22 μm 过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

噻唑蓝溶液(MTT 溶液):50 mg 噻唑蓝(长春梦怡美生物科技有限公司)溶解于 10 mL 蒸馏水中,0.22 μm 过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

人参提取液:将中药人参片(购于吉林省长春市百草大药房,参照中国药典 2005 版附录 IX 进行质量鉴定)运用水浴加热法提取,再将提取得到的药液通过水浴锅浓缩得到浸膏,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[7-8],使用时用蒸馏水溶解至饱和,0.22 μm 过滤。

其他材料:上述常用试剂均为分析纯,二甲基亚砜(DMSO)、胰酶消化液等购自长春梦怡美生物科技有限公司。CCB 细胞、IHNV 为实验室保藏。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒滴度测定 将 CCB 细胞接种于 96 孔板中,27 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 备用,将病毒悬液按照 10^{-1} – 10^{-10} 做连续稀释后按照 100 μL /孔接种于长成单层细胞的 96 孔板中,每个浓度做 8 孔重复,梯度降温至 15 $^{\circ}\text{C}$,继续培养 72 h,记录每孔细胞病变情况,根据 Reed-Muench 法计算半数组织培养感染量(ICID₅₀)^[9]。

1.2.2 RTCA^[10] 实时监控不同浓度人参提取液对 IHNV 的抑制作用 将 CCB 细胞以 400 个/孔的浓度接种于 16 孔 E-Plate 细胞增殖板内,5% CO_2 、27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后弃去细胞培养液,加入 100 μL /孔病毒液感染 CCB 细胞,对照组加入无血清细胞维持液。5% CO_2 、15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h 后弃去病毒液,细胞维持液洗涤两次后分别加入 100 μL /孔 2%、4%、8% 人参提取液,每个浓度 3 孔重复,细胞对照加入无血清细胞维持液。将 E-Plate 细胞增殖板放回实时细胞分析仪内,设置每间隔 15 min 监测并记录 CI 值,继续监测 72 h。后续实验中所用人参提取液均为本步骤筛选出抑制效果最佳的人参提取液浓度。

1.2.3 人参提取液对 IHNV 的直接灭活作用 将人参提取液与病毒按照 1:1 体积混合,27 $^{\circ}\text{C}$ 环境下分别作用 30 min、1 h、2 h、4 h 和 8 h,加入到长成单层细胞的 96 孔板中,100 μL /孔,每时间点重复 4 孔^[11]。梯度降温至 15 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 继续培养。同时设置细胞对照组和病毒对照组。当病毒对照组 CPE 达 80% 左右时,记录各孔 CPE 情况,MTT 法测 490 nm 处 OD 值,计算人参提取液对 IHNV 的抑制率。

$$\text{药物抑制率(IR)} = \frac{\text{OD 值}_{(\text{实验组})} - \text{OD 值}_{(\text{空白组})}}{\text{OD 值}_{(\text{细胞对照组})} - \text{OD 值}_{(\text{空白组})}}$$

1.2.4 人参提取液对 IHNV 复制的阻断作用 将毒力 100TCID₅₀ 的病毒液 100 μL /孔接入长成单层细胞的 96 孔板中,梯度降温至 15 $^{\circ}\text{C}$ 。培养 30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、16 h,每时间点做 4 孔重复。达到培养时间后弃去病毒液,用细胞维持液洗涤 2 次。加入 100 μL /孔的人参提取液,5% CO_2 、15 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养。同时设置细胞对照和病毒对照。当病毒对

照组 CPE 达 80%左右时,记录各孔 CPE 情况,MTT 法测 490 nm 处 OD 值,计算人参提取液对 IHNV 复制阻断的抑制率,评估人参提取液对 IHNV 复制的阻断作用。

2 结 果

2.1 病毒滴度测定结果 测定结果见表 1。由公式计算可得,病毒 TCID₅₀ = 10^{-5.6},即当稀释度为 10^{-5.6}时,可使孔内 50%的细胞发生病变。

表 1 病毒滴度测定结果

Tab 1 Results of virus titer test						
病毒稀释度	有 CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计有孔	累计无孔	比率	感染百分率/%
10 ⁻¹	8	0	36	0	36/36	100%
10 ⁻²	8	0	31	0	31/31	100%
10 ⁻³	8	0	23	0	23/23	100%
10 ⁻⁴	8	0	15	0	15/15	100%
10 ⁻⁵	7	1	8	1	7/8	87.5%
10 ⁻⁶	5	3	4	6	4/10	25%
10 ⁻⁷	0	8	0	9	0/9	0
10 ⁻⁸	0	8	0	17	0/17	0

2.2 RTCA 实时监控不同浓度人参提取液对 IHNV 的抑制效果 由图 1 可知,根据 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪检测得到的细胞曲线,细胞接种 24 h 期间各组细胞曲线均值稳定上升,细胞生长状态良好,加样前无明显停滞或下降趋势。加入病毒液后,细胞经温度和病毒的刺激增殖受到抑制,曲线骤降至同一水平。病毒吸附的 4 h 后细胞指数

降低,显示病毒开始明显抑制 CCB 细胞生长,而细胞对照组仍成稳定增长趋势。从人参提取液对 IHNV 的抑制效果上,4%人参提取液对 IHNV 的抑制效果最佳,后期与细胞对照组细胞指数接近。而 8%人参提取液在前期促进了细胞的生长,后期保护效果不佳。

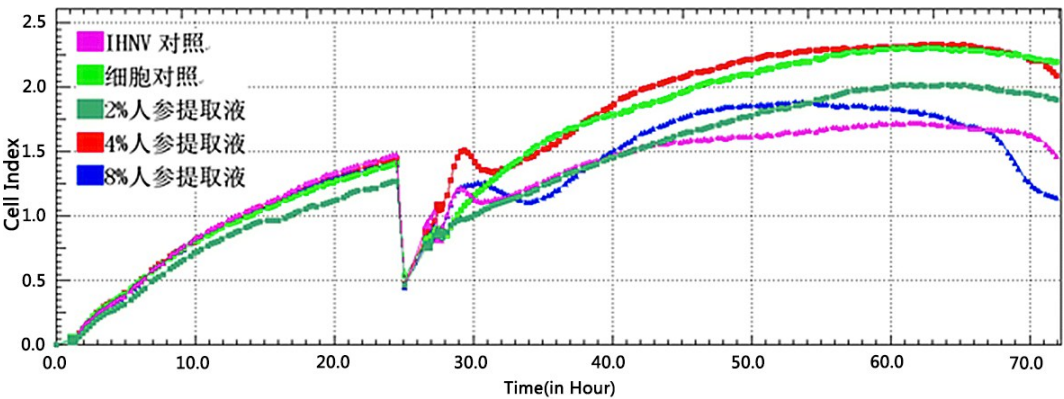


图 1 不同浓度人参提取液对 IHNV 抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of ginseng extract with different concentrations on IHNV

2.3 人参提取液对 IHNV 的直接灭活作用结果

由表 2 可知,人参提取液对 IHNV 有直接灭活作用,5 个时间点检测抑制率最高达 51.5%,但各个时间点间抑制率结果差异不显著($P>0.05$)。

表 2 人参提取液对 IHNV 直接灭活抑制率结果

Tab 2 Inhibitory effect of ginseng extract on direct inactivation of IHNV

时间	重复试验	抑制率/%
30 min	3	50.65±3.3076 ^a
1 h	3	48.80±7.3607 ^a
2 h	3	51.50±3.3735 ^a
4 h	3	45.89±2.6616 ^a
8 h	3	49.67±2.7843 ^a

抑制率结果—列数据右上角标注相同字母表示结果差异不显著($P>0.05$)

the results of the inhibition rate are shown in the upper right corner of the data. The results of the same letter are not significant ($P>0.05$)

2.4 人参提取液阻断 IHNV 复制结果

由表 3 可知,IHNV 先作用 30 min~16 h 后加入的人参提取液对病毒均具有复制抑制作用,病毒先作用 1~4 h 期间,人参提取液抗病毒作用明显,抑制率接近 60%。实验期间人参提取液均表现出持续抑制作用,但 30 min 和 16 h 时抑制作用较其他时间点不明显。

表 3 人参提取液阻断 IHNV 复制抑制率结果

Tab 3 Ginseng extract was used to block IHNV replication inhibition rate

IHNV 作用时间	重复试验	抑制率/%
30 min	3	37.39±7.087 ^c
1 h	3	56.67±3.497 ^b
2 h	3	57.01±6.385 ^b
4 h	3	55.51±9.114 ^{ab}
8 h	3	47.48±6.368 ^a
12 h	3	50.60±5.258 ^a
16 h	3	42.84±9.117 ^c

抑制率结果—列数据右上角标注相同字母,表示差异不显著($P>0.05$),标注字母不相同表示差异显著($P<0.05$)

the result of inhibition rate is the same in the top right corner of the data, which means that the difference is not significant ($P>0.05$), and the letters are different, which means significant difference ($P<0.05$)

3 讨论与小结

为了探讨人参提取液体外抑制 CCB 细胞感染 IHNV 的能力,构建体外 CCB 细胞模型,运用 RTCA 技术和 MTT 法分别测得 2% 人参提取液、4% 人参提取液和 8% 人参提取液对 IHNV 感染 CCB 细胞后抑制作用曲线,从阻断病毒复制和杀灭病毒两方面讨论人参提取液作用效果。研究表明,4% 人参提取液对 IHNV 具有明显抑制作用,能够在一定时间内保护细胞不受 IHNV 病毒的侵染,2 h 时对病毒灭活抑制率最高达到 51.5%,1~12 h 内对病毒复制有持续抑制作用,而 8% 人参提取液在前期促进了细胞的生长,后期保护效果不佳,对比说明人参提取液对 IHNV 的抑制不与剂量成依赖关系。

人参中含有 Rg1、Rb1 等 30 多种人参皂苷、 α -人参烯等挥发油、人参酸等有机酸、人参黄酮苷等黄酮以及木脂素、甾醇、氨基酸、多糖等多种有益成分,其中人参皂苷及多糖等为主要有效成分^[5]。而人参皂甙 Rb1 具有抗病毒的能力,在体外细胞试验中能够灭活病毒,使 N 蛋白表达下降从而起到抑制病毒复制的作用^[6]。

由于目前 IHNV 增殖、复制和与宿主间相互作用的研究匮乏,试验用 RTCA 实时无标记技术测得 4% 人参提取液对 IHNV 抑制作用明显,较常见病毒 CPE 实验省时省力,结果精确,避免了由于病毒在细胞内复制作用微弱导致空斑形成不明显对试验造成的误差,实时监测形成完整细胞效应图谱,该技术已经应用于多项基于细胞的检测,结果可信度较高^[12-16]。MTT 法在试验过程中需将细胞液吸出,此过程可能导致细胞的流失影响试验结果准确性,故采用加大重复试验来避免误差形成。而体外细胞试验具有操作方面、灵敏、不易受外界因素干扰的优点。

通过查阅大量文献设定不同浓度的人参提取液作用于感染 IHNV 的 CCB 细胞,以探究人参提取液对 IHNV 的抑制作用及最适抑制浓度,为今后以人参作为防治 IHNV 的有效药物奠定试验基础,同时为结合我国传统中药开发防治 IHNV 的新型药物提供有效参考。

参考文献:

- [1] Dietzgen R G, Calisher C H, *et al.* Famliy-Rhabdoviridae[J]. Virus Taxonomy, 2012, 686-713.
- [2] Rucker R R, Whipple W J, *et al.* A contagious disease of salmon possibly of virus origin[J]. Fish and Wild life Service,1953, 35-46.
- [3] Winton J.R. Recent advances in detection and control of infectioushemato poietic necrosis virus in aquaculture[J]. Annual Review of Fish Diseases,1991.,Pages 83-93.
- [4] Lapatra S E, Lauda K A, Jones G R, *et al.* Susceptibility and humoral response of Brown trout X lake trout hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus;a model for examining disease resistance mechanisms[J].Aquaculture,1996,146(3):179-188.
- [5] 习欠云,刘小龙,方淑娴,等.人参多糖复合物对南美白对虾免疫增强效果的研究[J].2009,30(6):15-17.
Xi Q Y, Liu X L, Fang S X, *et al.* Study on ginseng polysaccharide on immune effect of *Penaeus vannamei*[J].2009,30(6):15-17.
- [6] 赵 昕.人参皂甙 Rb1 体外抗 PRRSV 的作用及其机制[D].山西农业大学,2013;37-38.
Zhao X ,*et al.* Effect of ginsenoside Rb1 on PRRSV in vitro and its mechanism[D]. Shanxi Agricultural University. 2013;37-38.
- [7] 徐 燕,典灵辉,陆江赢,等.德庆首乌二苯乙烯苷提取的研究[J].辽宁化工,2011,10(1):4-6.
Xu Y, Dian L H, Lu J Y, *et al.* Study on Extraction of two Stilbene Glucoside from Deqin Shouwu [J]. Liaoning Chemical Industry,2011,10(1):4-6.
- [8] 刘 丹,汤海峰,张三奇,等.虎杖中有效成分提取方法的研究[J].中成药,2007,29(4):516-521.
Liu D, Tang H F, Zhang S Q, *et al.* Study on extraction method of effective components in *Polygonum cuspidatum* [J]. Proprietary Chinese Medicine, 2007,29(4):516-521.
- [9] 殷 震,刘景华. 动物病毒学(第 2 版)[M].北京:科学出版社,1997.
Yin Z, Liu J H,*et al.* Animal Virology (Second Edition)[M]. Beijing: Science press,1997.
- [10] Solly K, Wang X, Xu X, *et al.* 2004. Application ofreal-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays[J]. Assay Drug Dev. Technol, 2;363-372.
- [11] Dong C X, Hayaashi K, Mizukoshi Y, *et al.* Structure of acidic polysaccharides from *Basella rubra* L and their antiviral effects [J]. Carbohydr Polym, 2011(84):1084-1092.
- [12] Atienza J M, Zhu J, Wang X, *et al.* 2005. Dynamicmonitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays[J]. Biomol Screen, 10:795-805.
- [13] Ke Y, Wu D, Princen F, *et al.* 2007. Role of Gab2 in mammary tumorigenesisand metastasis[J]. Oncogene, 26:4951-4960.
- [14] Xing J Z, Zhu L, Jackson J A, *et al.* 2005. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors[J]. Chem Res Toxicol, 18:154-161.
- [15] Yu N, Atienza J M, Bernard J, *et al.* 2006. Real-time monitoring of morphological changes in living cellsby electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupledreceptors[J]. Anal Chem, 78;35-43.
- [16] 胡 潜,李 强,张显昱,等.传染性造血器官坏死病毒(IHNV)研究进展[J]. 现代农业科技, 2014, 4:48.
Hu Q, Li Q, Zhang X Y, *et al.* Research progress on dye-associated hematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014, 4:48.

(编辑:陈 希)