

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.03.09

鱼腥草多糖对 MA104 和 MARC145 细胞活力影响的比较研究

朱琪,李秀丽,任卫科,江珊,张莉,王建国,鄢明华*

(天津市农业科学院畜牧兽医研究所,天津 300381)

[收稿日期] 2021-08-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 03-0069-06 [中图分类号] S853.76

[摘要] 研究鱼腥草多糖(houttuynia cordata polysaccharide, HCP)对 MA104 和 MARC145 细胞活力的影响,筛选梯度浓度的鱼腥草多糖对 MA104 和 MARC145 细胞促生长最佳浓度剂量范围和毒性剂量。通过水提醇沉法提取 HCP,得糖率为 8.18%;分别采用 MTT 法和细胞平板计数法绘制 MA104 和 MARC145 细胞的生长曲线;应用 MTT 法检测梯度浓度 HCP 对 MA104 和 MARC145 细胞活力的影响。结果表明,50 mg/mL HCP 对细胞活力有抑制作用($P < 0.05$),0.05 ~ 5 mg/mL HCP 对细胞活力有促进作用($P < 0.05$),0 ~ 0.005 mg/mL HCP 对细胞活力无显著影响($P > 0.05$)。结果表明,HCP(0 ~ 5 mg/mL)对 MA104 和 MARC145 细胞无毒性作用。

[关键词] 鱼腥草多糖;MA104 细胞;MARC145 细胞;细胞活力;MTT 法

Effects of Houttuynia Cordata Polysaccharides on Viability of MA104 and MARC145 Cells

ZHU Qi, LI Xiu-li, REN Wei-ke, JIANG Shan, ZHANG Li, WANG Jian-guo, YAN Ming-hua*

(Tianjin Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Tianjin 300381, China)

Corresponding author: YAN Ming-hua, E-mail: yanmh81971@163.com

Abstract: The effects of houttuynia cordata polysaccharide(HCP) on viability of MA104 and MARC145 cells were studied in this experiment. The sugar yield of HCP was 8.18% by water extraction and alcohol precipitation. The growth curves of MA104 and MARC145 cells were plotted by MTT method and cell counting method, respectively. MTT assay was used to detect the effects of gradient concentration of HCP on viability of MA104 and MARC145 cells. The results showed that viability of MA104 and MARC145 cells were inhibited by 50 mg/mL HCP, these were promoted by 0.05 ~ 5 mg/mL HCP, and these were no significant effect by 0 ~ 0.005 mg/mL HCP. Below 5 mg/mL HCP had no toxic effect on MA104 and MARC145 cells.

基金项目: 天津市生猪产业技术体系创新团队猪病毒病岗位项目(ITTPRS2021003)

作者简介: 朱琪,博士,从事中兽药饲料添加剂的研究。

通讯作者: 鄢明华, E-mail: yanmh81971@163.com

Key words: houttuynia cordata polysaccharide; MA104 cells; MARC145 cells; cell viability; MTT assay

鱼腥草(houttuynia cordata)作为传统中兽药在畜禽生产中应用广泛,前期研究表明,饲料中添加鱼腥草有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、提高生产性能等多重功效,从而达到抗病提高畜禽生产力的目的^[1-3]。鱼腥草多糖(houttuynia cordata polysaccharide, HCP)是鱼腥草中提取的天热有效成分,其中单糖组成主要为木糖、果糖、阿拉伯糖、半乳糖^[4-5],研究表明其具有广谱的抗病毒作用,对多种病毒均有不同程度的抑制作用^[6-7]。非洲绿猴肾细胞 MA104 及其单克隆得到的 MARC145 细胞是多种病毒的宿主,在体外研究中可以作为病毒复制的载体,尤其对猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV),牛/猪轮状病毒(bovine/porcine rotavirus, RV)和禽传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)等有很好的适应性^[8-10]。探明 HCP 对 MA104 和 MARC145 细胞的毒性作用,以期作为 HCP 体外药理研究提供试验支撑,为进一步研究其药理作用机理提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 鱼腥草多糖的提取与配制 鱼腥草购自安国市友鑫中药材销售有限公司。

鱼腥草除杂、干燥、粉碎过 40 目筛,准确称量 8 g,加入 400 mL 纯净水,水浴加热 80 ℃回流提取 6 h,重复三次;合并所得过滤液,旋转蒸发仪浓缩定容至 40 mL(得鱼腥草水提物),取 20 mL 浓缩液加入 100 mL 95% 乙醇进行醇沉过夜,待第 2 天有大量醇析物时,弃去上清液后,将醇析物水浴蒸干得鱼腥草粗多糖;粗多糖蒸馏水定容至 30 mL,加入等量体积的 Sevage 试剂(氯仿:正丁醇=4:1,体积比)混合震荡 30 min,离心取上清液,重复 3 次,多糖含量的测定采用苯酚-硫酸比色法,以葡萄糖绘制标准曲线,比较得出多糖浓度,计算公式如下:多糖得率 = $C \times V \times N / m \times 100\%$ (C 多糖浓度; V 药品测试体积; N 稀释倍数; m 原料药初始质量)。

鱼腥草多糖含量的测定:绘制标准曲线,取分

析纯无水葡萄糖干燥至恒重。精密称量 60 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加水定容,超声混匀,得葡萄糖对照品溶液。用移液枪取葡萄糖对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置于 50 mL 的容量瓶中,加水定容并超声混匀,得对照品梯度溶液 D1、D2、D3、D4、D5,备用。取对照品梯度溶液 D1、D2、D3、D4、D5 各 2 mL 于试管中,各加 4% 苯酚溶液 1 mL 混匀再迅速加入硫酸 7 mL,摇匀。40 ℃水浴 30 min,取出再冰浴 5 min。以蒸馏水调零于 490 nm 处测定吸光度值,每组平行测定三次,取均值。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,建立标准曲线。多糖含量的测定,方法同上,代入得出的标准曲线方程中,计算浓度以及干燥产物的多糖含量。多糖提取流程图如图 1 所示。

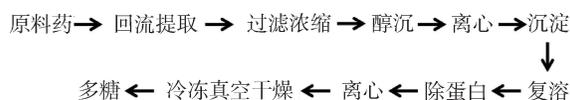


图 1 鱼腥草多糖提取流程图

Fig 1 Extraction flow chart of Houttuynia cordata polysaccharide

1.2 细胞来源及培养 MA104 和 MARC145 细胞购自 ATCC 细胞保藏中心。

复苏细胞:将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管在 37 ℃水浴中迅速摇晃解冻,加入 4 mL 培养基混合均匀。在 1000 RPM 条件下离心 4 min,弃去上清液,补加 2 mL 培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入培养瓶中培养过夜。检查细胞活力计数冻存,检测细胞和相关试剂支原体阴性备用,利用 0.4% 台盼蓝染色法检测活细胞率,进行细胞计数。

细胞生长培养基:DMEM(高糖型,含 4500 mg/L D-葡萄糖、L-谷氨酰胺,和 110 mg/L 丙酮酸钠,不含碳酸氢钠)+8% 胎牛血清+1% 双抗(青霉素和链霉素)的培养液,调 pH 值为 7.4;细胞维持培养基:DMEM+4% 胎牛血清;冻存液:细胞生长培养基+10% 胎牛血清+10% DMSO;消化液:0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA。

细胞培养条件: 温度 37 ℃; 95% 空气; 5% CO₂; 湿度 90% 以上。细胞传代培养, 复苏细胞每管接种 T25 培养瓶一个, 细胞在刚长成细胞单层时记录并及时进行消化传代。按 1:3 传代, 细胞接种密度为 1×10^5 cells/mL, 观察记录长成单层的时间。

1.3 细胞生长曲线的绘制 分别用细胞平板计数法和 MTT 法绘制细胞生长曲线: 将长成单层的 MA104/MARC145 细胞从培养瓶内消化下来, 吹打均匀后按 0.5×10^4 个细胞/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中。每天取 6 孔细胞, 消化后计数并取平均值, 连续监测 9 d; 同时另铺板用 MTT 法检测各孔 OD 值, 以天数时间为横坐标, 细胞数/OD 值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.4 鱼腥草多糖对细胞活力的影响 根据细胞生长曲线确定对数生长期为试验阶段, 配制梯度浓度的 HCP 溶液(0、0.005、0.05、0.5、5、50 mg/mL), 将梯度浓度的 HCP 溶液孵育细胞 24 h, MTT 法检测细胞活力, 每孔加 MTT 溶液 10 μL, 继续孵育 4 h。终止培养吸出孔内培养液后, 加入 DMSO 液(100 μL/孔), 室温下, 平板置在微孔板震荡器上震荡 10 min, 使结晶物溶解。酶标仪检测各孔 OD 值($\lambda = 570$ nm), 记录结果^[11]。

1.5 数据统计 试验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析, 数据用“平均值 ± 标准差”(x ± s) 表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。图集均由 GraphPad Prism 6.0 绘图软件制作。

2 结果与分析

2.1 鱼腥草多糖提取率 鱼腥草原药提取多糖通过以料液比 1:50, 80 ℃ 热水回流浸提 6 h, 5 倍乙醇沉淀, Sevage 法除蛋白, 真空冷冻干燥获得。经葡萄糖标准曲线检测多糖浓度 C 为 4.36 mg/mL, 根据公式算得 HCP 提取率为 8.18%。

2.2 细胞生长曲线绘制 由图 2 可知, 细胞平板计数法绘制细胞生长曲线图呈 S 型, 有明显的潜伏期、对数生长期和衰退期; MA104 细胞峰值出现在第 7 天, 而 MARC145 细胞峰值为第 8 天, MA104 细胞的对数生长期为第 4 至第 7 天, 而 MARC145 细胞对数

生长期为第 4 至第 8 天。由图 3 所示, MTT 法测得细胞生长曲线结果与图 2 细胞平板计数法相似。

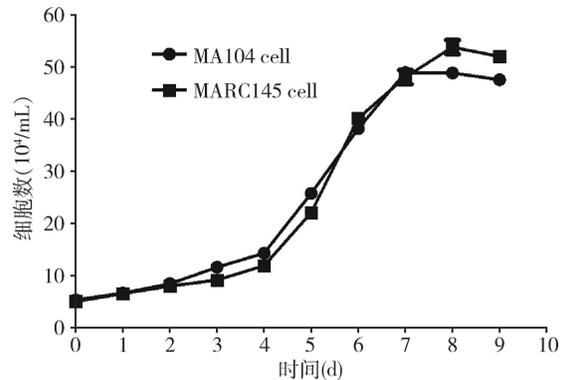


图 2 细胞计数法绘制 MA104 和 MARC145 细胞生长曲线图

Fig 2 Growth curves of MA104 and MARC145 cells were plotted by cell counting method

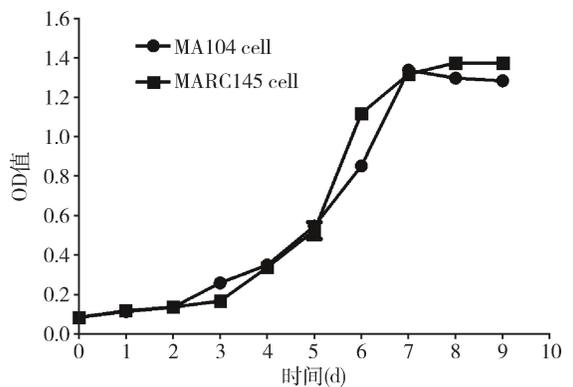


图 3 MTT 法绘制 MA104 和 MARC145 细胞生长曲线图

Fig 3 Growth curves of MA104 and MARC145 cells by MTT assay

2.3 梯度浓度鱼腥草多糖对 MA104 和 MARC145 细胞活力的影响 由图 4 可知, 50 mg/mL 的 HCP 对 MA104 细胞活力有抑制作用, 且 OD 值显著低于对照组 ($P < 0.05$); HCP 浓度为 0.05、0.5、5 mg/mL 组细胞 OD 值显著高于对照组 ($P < 0.05$), 0.005 mg/mL HCP 细胞 OD 值与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

由图 5 可知, 50 mg/mL 的 HCP 对 MARC145 细胞活性有抑制作用, 且 OD 值极显著低于对照组

($P < 0.01$) ; HCP 浓度为 0.05、0.5、5 mg/mL 的三组细胞 OD 值与对照组比较显著提高 ($P < 0.05$) ; HCP 浓度为 0.005 mg/mL 的细胞组, OD 值与对照组差异不显著。

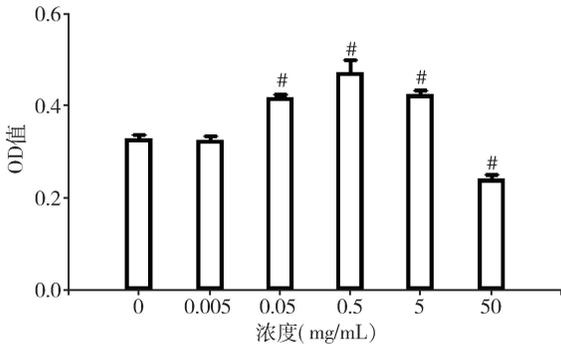


图 4 鱼腥草多糖对 MA104 细胞活力的影响

Fig 4 Effect of HCP on the viability of MA104 cells

图注: 各组与对照组比较, 不标#的表示差异不显著 ($P > 0.05$), #表示差异显著 ($P < 0.05$)。

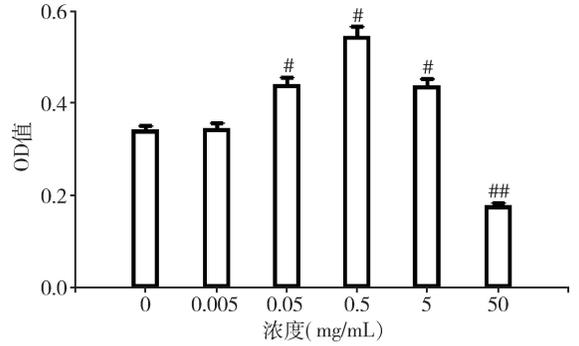


图 5 鱼腥草多糖对 MARC145 细胞活力的影响

Fig 5 Effect of HCP on the viability of MARC145 cells

图注: 各组与对照组比较, 不标#的表示差异不显著 ($P > 0.05$), #表示差异显著 ($P < 0.05$), ##表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.4 鱼腥草多糖对 MA104 和 MARC145 细胞形态的影响 由图 6 可知, 0 mg/mL 的 HCP (正常对照) 处理 24 h 后, MA104 和 MARC145 细胞形态正常,

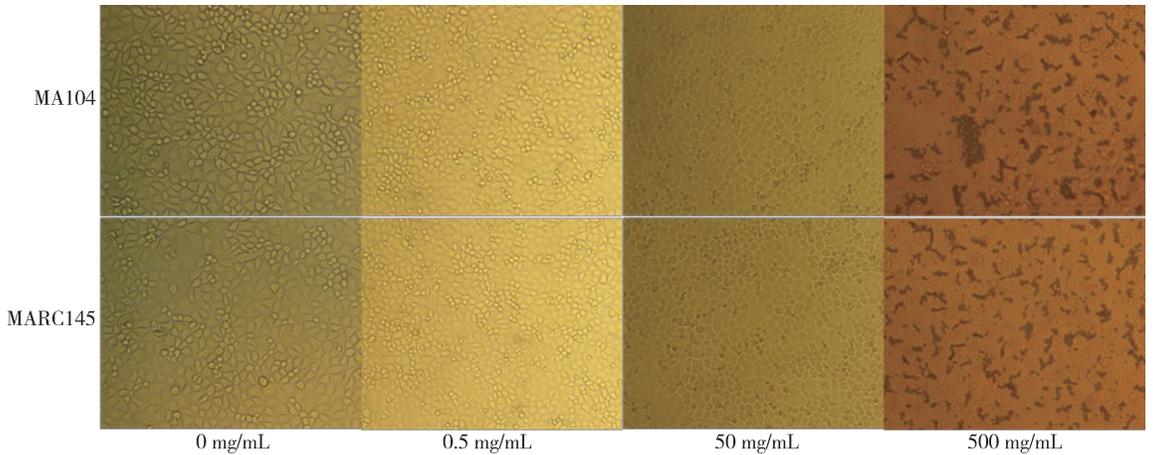


图 6 鱼腥草多糖对 MA104 和 MARC145 细胞形态的影响 (200 ×)

Fig 6 Effect of HCP on the morphology of MARC145 cells and MA104 cells (200 ×)

呈明显的铺路石样; 0.5 mg/mL 的 HCP 处理 24 h 后, MA104 和 MARC145 细胞形态正常, 比正常对照细胞间隙更紧密, 折光率也更高; 50 mg/mL 的 HCP 处理 24 h 后, MA104 和 MARC145 细胞形态出现变圆皱缩, 个别细胞脱壁; 500 mg/mL 的 HCP 处理 24 h 后, MA104 和 MARC145 细胞破裂聚集, 产生大量细胞碎片, 只见个别细胞贴壁, 形态呈煎蛋样坏死。

3 讨论与结论

MTT 法可直接检测活细胞中线粒体酶活性, MTT 结晶形成的量和细胞数成正比, 从而反映细胞数量和活力, 因此, MTT 法检测细胞活力更直接。本试验同时运用细胞平板计数法和 MTT 法检测细胞活力, 结果显示两种方法绘制的细胞生长曲线基本相似, MTT 法更方便直观, 且在临床应用广泛^[12]。因此, 下一步药效学试验选取 MTT 法检测

细胞活力。

本研究表明,高浓度 HCP (50 mg/mL) 对 MA104 和 MARC145 细胞活力有明显抑制作用,本试验观察到细胞形态明显收缩,可能与多糖改变细胞渗透压有关;0 ~ 0.005 mg/mL 的 HCP 对 MA104 和 MARC145 细胞活力无显著影响;0.05 ~ 5 mg/mL 的 HCP 对 MA104 和 MARC145 细胞活力有明显促进作用。前人研究表明,鱼腥草粗提物对 MARC145 细胞最大安全作用质量浓度为 1.563 mg/mL^[13],本研究表明小于等于 5 mg/mL 的 HCP 对 MARC145 细胞安全,说明同浓度的 HCP 比粗提物对 MARC145 细胞更安全,毒副作用更低。不同制备方法配制成 20 mg/mL 的 HCP 对三种病毒均有抑制作用,且对 RD 细胞和 Hep2 细胞无毒副作用^[6],说明 HCP 对多种细胞具有较高的安全性,适用范围更广。300 μg/mL HCP 对人结肠癌细胞 LoVo、人肝癌细胞 HepG2 和小鼠白血病细胞 L1201 的生长均有显著的抑制作用^[14],提示其对细胞的影响具有双向调节作用。因此,本研究表明,梯度浓度的 HCP 对 MA104 和 MARC145 细胞活力的影响,可筛选促生长最佳浓度剂量范围和毒性剂量,为进一步开展后续研究奠定基础。

HCP(0 ~ 5 mg/mL) 对 MA104 和 MARC145 细胞无毒性作用,为深入研究 HCP 的药理机制提供了试验依据。

参考文献:

[1] 阳光远,黎华君,欧国武,等. 添加鱼腥草粉对百宜黑鸡产蛋后期饲喂效果的影响[J]. 饲料研究, 2015, (01): 49 - 50.
Yang G Y, Li H J, Ou G W, *et al.* Effect of adding Houttuynia cordata meal on feeding efficiency of Baiyi black chicken during late laying period[J]. Feed Research, 2015, (01): 49 - 50.

[2] Yan L, Meng Q W, Kim I H. The effects of dietary Houttuynia cordata and Taraxacum officinale extract powder on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and meat quality in finishing pigs[J]. Livestock Science, 2011, 141(2): 188 - 193.

[3] 朱琪. 鱼腥草素钠抗 LPS 诱导的奶牛子宫内膜上皮细胞炎症的分子机制[D]. 中国农业大学, 2015.

Zhu Q. Sodium houttuynifonate inhibits inflammation by blocking the MAPKs/NF - κB signaling pathways in cow endometrial epithelial cells[D]. China Agricultural University 2015.

- [4] 王素萍,杨亚玲,李晚谊,等. 鱼腥草多糖提取工艺及成分分析研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, (04): 396 - 400.
Wang S P, Yang Y L, Li W Y, *et al.* Study on extraction and analysis of polysaccharide in Houttuynia cordata Thunb[J]. Journal of Yunnan University, 2008, (04): 396 - 400.
- [5] 宋也好,李文娟,尹术华,等. 鱼腥草水溶性多糖的理化性质及体外抗氧化活性[J]. 南昌大学学报(理科版), 2020, 44 (05): 444 - 449.
Song Z, Li W J, Yin S H, *et al.* Physicochemical properties and antioxidative activity of water - soluble polysaccharides from Houttuynia cordata Thunb[J]. Journal of Nan chang University (Natural Science), 2020, 44(05): 444 - 449.
- [6] 刘苗苗,崔清华,范路路,等. 鱼腥草多糖的制备及其体外抗病毒活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(01): 110 - 117.
Liu M M, Cui Q H, Fan L L, *et al.* Preparation of Houttuynia cordata polysaccharide and its antiviral activity *in vitro*[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(01): 110 - 117.
- [7] Chen M, Li H, Lu X, *et al.* Houttuynia cordata polysaccharide alleviated intestinal injury and modulated intestinal microbiota in HI N1 virus infected mice[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2019, 17(3): 187 - 197.
- [8] 常艳燕. 猪源唾液酸黏附素介导 PRRS 病毒感染 Marc145 细胞的适应性研究[D]. 甘肃农业大学, 2020.
Chang Y Y. Study on the adaptive capacity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for the infection of Marc145 cells mediated by porcine sialoadhesin[D]. Gansu Agricultural University, 2020.
- [9] 姚四新,李永清,杨国友,等. 鸡肾型传染性支气管炎病毒适应于 Marc145 细胞的观察[J]. 中国兽医杂志, 2002, (04): 9 - 10.
Yao S X, Li Y Q, Yang G Y, *et al.* Observation on adaptation of avian renal infectious bronchitis virus to Marc145 cells [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2002, (04): 9 - 10.
- [10] Morozumi T, Takenouchi T, Wada E, *et al.* Susceptibility of immortalized porcine kidney macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus - 2 infection[J]. Journal of Virological Methods, 2021, 288: 114026.
- [11] 朱琪,路超,韩静,等. 女贞子多糖对 IPEC - J2 细胞活力的

- 影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(19): 126 - 128.
- Zhu Q, Lu C, Han J, *et al.* Effects of fructus ligustri lucidi polysaccharide on IPEC - J2 cell viability[J]. *heilongjiang animal science and veterinary medicine*, 2019(19): 126 - 128.
- [12] Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, *et al.* Efficient water soluble nanostructured ZnO grafted O - carboxymethyl chitosan/curcumin - nanocomposite for cancer therapy[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(4): 678 - 688.
- [13] 曾强, 黄良宗, 李丹, 等. 中药体外对 Marc - 145 细胞的影响及抗 PRRSV 突变株的作用[J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(04): 569 - 574.
- Zeng Q, Huang L Z, Li D, *et al.* Effect of Chinese herbs on the MARC - 145 cells and its antivirus roles against pRRSV mutants *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(04): 569 - 574.
- [14] 田灵敏. 鱼腥草水溶性多糖的组成特征及生物活性研究[D]. 陕西师范大学, 2011.
- Tian L M. Study on the composition and biological activity of water - soluble polysaccharide from *Houttuynia cordata* [D]. Shaanxi Normal University, 2011.

(编辑: 侯向辉)