

· 基础研究 ·

黄芩苷体外抑制柯萨奇病毒B组3型感染的机制研究

金 跃¹, 李 祥¹, 王晓丽¹, 马 莉¹, 程建平¹, 邢 飞¹, 刘媛媛^{2*}¹徐州医科大学附属淮安医院检验科, 江苏 淮安 223301; ²南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, 江苏 淮安 223300

[摘要] 目的:探讨黄芩苷(baicalin, BA)体外抑制柯萨奇病毒B组3型(coxsackie virus B3, CVB3)感染的效用及机制。方法:CellTiter 96® Aqueous 单溶液试剂检测Hela细胞存活率,病毒空斑实验检测病毒滴度,CHOD-PAP法和ACS-ACOD法分别用于检测细胞中游离脂肪酸(free fatty acids, FAA)和胆固醇(cholesterol, CHO)的含量,RT-PCR检测脂类代谢关键分子脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, Fasn)和乙酰-CoA羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的mRNA表达,Western blot检测CVB3病毒衣壳蛋白VP1表达。结果:BA在低于100 μg/mL时对Hela细胞无明显毒性效用,但能呈剂量依赖地抵抗CVB3诱导细胞病变,显著减少病毒滴度和抑制CVB3/VP1的表达;CVB3感染能显著增加细胞中FAA和CHO含量以及Fasn和ACC的mRNA表达,但是经BA处理后,能显著减少这些脂类代谢物质的含量;棕榈酸预处理细胞,能恢复BA处理组中CVB3/VP1的表达。结论:BA能通过调节细胞脂类合成来发挥抗CVB3感染的效用。

[关键词] 黄芩苷;棕榈酸;病毒蛋白;病毒滴度

[中图分类号] R373.23

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)02-196-05

doi:10.7655/NYDXBNS20190207

Study on the mechanism of baicalin against coxsackie virus B3 infection *in vitro*

Jin Yue¹, Li Xiang¹, Wang Xiaoli¹, Ma Li¹, Cheng Jianping¹, Xin Fei¹, Liu Yuanyuan^{2*}¹Department of Clinical Laboratory, Huai'an Hospital Affiliated of Xuzhou Medical University, Xuzhou 223301;²Department of Endocrinology, Huai'an First People's Hospital, NMU, Nanjing 223300, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the efficacy and mechanism of baicalin (BA) inhibiting coxsackie virus B3 (CVB3) infection *in vitro*. **Methods:** Hela cell viability was measured by CellTiter 96® Aqueous single reagent. The virus titer was detected by virus plaque assay. The concentration of cholesterol (CHO) and free fatty acids (FAA) were detected by CHOD-PAP and ACS-ACOD, respectively. The expression levels of fatty acid synthase (Fasn) mRNA and acetyl-CoA carboxylase (ACC) mRNA were detected by RT-PCR. The expression of VP1 protein was detected by Western blot in CVB3 virus. **Results:** BA had no significant toxic effect on Hela cells at less than 100 μg/mL, but was able to against cytopathy by CVB3 in a dose-dependent manner. The viral titers and CVB3/VP1 expression were significantly reduced by BA treatment in CVB3 infected cells. The levels of CHO and FAA, mRNA of Fasn and ACC were all significantly expressed in CVB3 infected cells, but were all significantly reduced by BA treatment. Compared with BA treatment group by BSA pretreatment, palmitic acid pretreatment could increase the expression of CVB3/VP1 in Hela cells. **Conclusion:** BA can against CVB3 infection by regulating cellular lipid synthesis.

[Key words] baicalin; palmitic acid; virus protein; virus titer

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02): 196-200]

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是指由

病毒感染引起的心肌局限性或弥漫性的急性或慢性炎症病变,重症患者可导致心衰、心源性休克甚至猝死^[1]。VMC可由多种病毒感染所致,如柯萨奇病毒、艾柯病毒、脊髓灰质炎病毒等,其中以柯萨奇病毒B组3型(coxsackie virus B3, CVB3)最为常

[基金项目] 淮安市自然科学基金(HAB201722);南京医科大学校基金面上项目(2016NJMU137)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuyy_suda@163.com

见^[2]。研究表明,VMC的发病原因主要与病毒对心肌组织的直接损伤和随后机体免疫系统的紊乱相关,目前尚无特效抗病毒药物,临床仍然以对症治疗为主^[3]。

中医药在抗病毒感染方面具有一定优越性,可通过直接抑制或灭活病毒,以及通过调节机体免疫系统,起到抗病毒感染的作用^[4]。黄芩苷(baicalin, BA)(7-O-葡萄糖醛酸苷)是从黄芩根中提取分离出来的一种黄酮类化合物,具有调节脂代谢、抗菌、抗炎及抗变态反应等效用^[5]。在先前研究中发现BA可通过调节FasL/Fas和CD40/CD40L信号通路,发挥抑制EV71诱导RD细胞凋亡的作用^[6]。但BA是否具有抗CVB3感染效用尚无文献报道。本研究拟探讨BA体外抗CVB3病毒的效用及其作用机制,为抗CVB3感染药物的研发提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

CVB3 Nancy病毒株GDV015(ATCC ATCCVR-30,中国典型培养物保藏中心);人宫颈癌细胞系Hela(ATCC号CCL-2,中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。BA(HPLC分析纯度≥98%,阿拉丁试剂有限公司);棕榈酸(Sigma Aldrich公司,美国),CellTiter 96® AQueous单溶液试剂盒(Promega公司,美国);FFA和CHO测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)。CVB3病毒VP1蛋白一抗(兔源性,北京博奥森生物有限公司),HRP-Goat Anti-Rabbit IgG、b-Actin Rabbit Poly Ab(Proteintech公司,美国)。

引物由上海生工生物工程股份有限公司合成(表1)。

表1 Real time-PCR引物表		
Table 1 Quantitative real time PCR primer sets		
引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
Fasn	上游:GAAACTGCAGGAGCTGTC	285
	下游:CACGGAGTTGAGGCGGAT	
ACC	上游:GCTGCTCGGATCACTAGTGAA	338
	下游:TTCTGCTATCAGTCTGTCCAG	
β-Actin	上游:GGATTTGTCGTATTGGG	205
	下游:GGAAGATGGTGATGGGATT	

1.2 方法

1.2.1 病毒空斑实验

调整Hela细胞为3×10⁵个/mL,均匀接种于6孔

板中,待细胞平铺80%以上,病毒室温吸附1 h后,弃毒,覆盖37℃预温的含1.5%甲基纤维素的DMEM维持培养基继续培养3 d后,加入4%多聚甲醛固定细胞4 h后,5%结晶紫染色15 min,流水轻轻冲洗染料后,倒置显微镜下计数空斑形成个数。

1.2.2 BA对Hela细胞存活率的影响

含2% FBS细胞维持液将BA连续倍比稀释成为25、50、100、200、400 μg/mL;以100 μL/孔药液加入到已长成单层细胞的96孔板中,每浓度重复3孔。于37℃、5% CO₂环境中培养48 h后,运用CellTiter 96® AQueous单溶液试剂方法检测细胞存活率。细胞存活率(%)=实验孔吸光度值/对照孔吸光度值×100%。

1.2.3 BA对CVB3感染细胞存活率的影响

实验分为3组,分别为细胞对照组, CVB3(MOI=3)感染组,以及在CVB3吸附1 h后的细胞中分别加入25、50、100 μg/mL浓度药物的BA处理组。于病毒感染48 h后,检测各实验组细胞存活率。

1.2.4 BA对CVB3病毒滴度的影响

将无血清DMEM稀释浓度为100 μg/mL的BA加入病毒吸附后的Hela细胞中,然后置于37℃、5% CO₂孵育24 h后,用细胞裂解上清液进行病毒空斑实验,每个实验均重复3次。

1.2.5 BA对CVB3病毒蛋白表达的影响

提取细胞总蛋白,运用BCA法测定含量,95℃变性5 min后,进行SDS-PAGE电泳;转膜后用含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h,加一抗过夜(VP1 1:500);TBST洗涤4次,加入HRP标记羊抗兔二抗,室温孵育1 h;TBST洗涤4次,用HRP显色液浸泡PVDF膜1 min后,暗室中进行X线片曝光,经显影和定影后观察条带。

1.2.6 CVB3感染细胞中脂类代谢的变化

于病毒感染24 h后,收集各实验组细胞和细胞上清液,-80℃反复冻融3次裂解细胞,以1 000 r/min离心5 min,留取上清液,按试剂盒操作步骤检测FFA和CHO的含量。每个样品设复孔,重复3次。

1.2.7 CVB3感染细胞中脂类合成代谢关键分子的变化

病毒感染24 h后,运用TRIzol方法提取细胞总RNA并逆转录合成cDNA,使用SYBR Green I 嵌合荧光法进行real time-PCR(RT-PCR),检测脂类合成代谢中关键分子脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, Fasn)、乙酰-CoA羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的表达情况。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR扩增程序为:95℃ 30 s;

95 ℃ 5 s, 60 ℃ 20 s, 72 ℃ 20 s, 循环45次; 片段延伸72 ℃ 5 min 循环1次。根据扩增产物的Ct值计算mRNA的相对表达量。

1.2.8 棕榈酸对CVB3感染的影响

于病毒感染前, 用0.1 mmol/L的棕榈酸(用10% BSA稀释, 用于诱导细胞高脂状态^[7])预处理细胞过夜。Western blot检测病毒感染24 h后CVB3感染组和BA处理组中CVB3/VP1蛋白表达情况。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0进行统计分析, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组比较采用配对t检验, 多组比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。使用GraphPad Prism 5软件做图。

2 结果

2.1 BA对Hela的细胞毒性效应

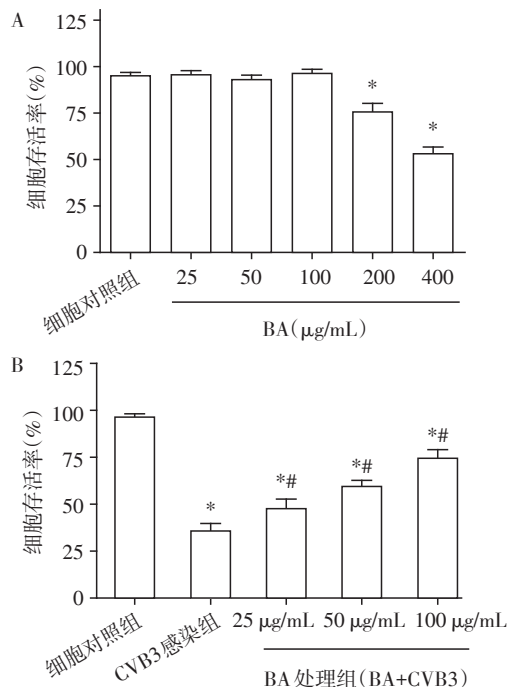
通过检测细胞存活率, 分析BA对Hela细胞的毒性效应, 结果显示25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的BA加入Hela细胞48 h后, 细胞存活率分别为($95.70 \pm 3.45\%$)、($93.20 \pm 5.27\%$)、($96.51 \pm 3.44\%$)、($76.17 \pm 8.51\%$)、($52.43 \pm 7.53\%$)%, 表明BA低于100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时对Hela细胞无明显毒性($P > 0.05$, 图1A)。

2.2 BA对CVB3感染Hela存活率的影响

通过检测细胞存活率, 分析BA对CVB3感染细胞的影响, 结果显示CVB3感染细胞48 h后细胞存活率为($36.02 \pm 7.12\%$)%, 然而经25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ BA处理后细胞存活率分别为($48.21 \pm 8.39\%$)%、($59.33 \pm 5.13\%$)%、($76.23 \pm 8.54\%$)%, 表明BA具有抗CVB3感染诱导细胞病变的效用, 并呈现一定的剂量依赖性($P < 0.05$, 图1B)。

2.3 BA对CVB3复制的影响

病毒感染24 h后, 病毒空斑实验结果显示, BA处理组病毒滴度显著低于CVB3感染组(图2A); Western blot检测结果显示, BA处理组病毒衣壳蛋



A: BA对Hela细胞存活率的影响; B: BA对CVB3感染细胞存活率的影响。与细胞对照组比较, $^*P < 0.05$; 与CVB3感染组比较, $^*P < 0.05$ 。

图1 BA对细胞活力的影响

Figure 1 Effect of BA on cell viability

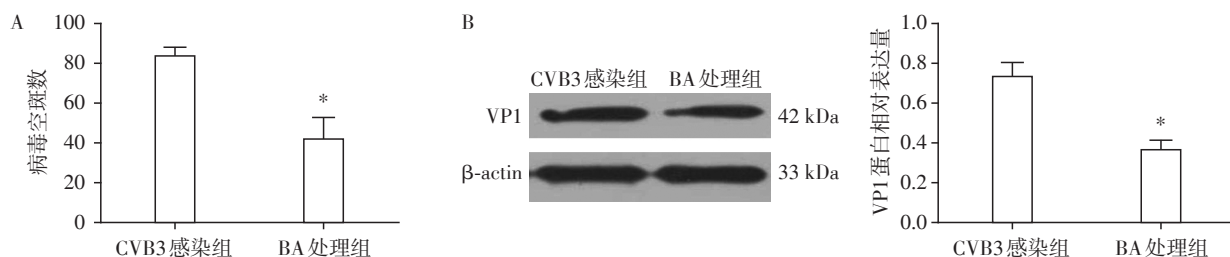
白VP1表达显著低于CVB3感染组, 表明BA具有抑制病毒复制的效用($P < 0.05$, 图2B)。

2.4 BA对CVB3感染Hela细胞中脂类代谢的影响

与细胞对照组(设定比值为1)比较, CVB3感染组中FFA、CHO以及脂类合成代谢关键分子Fasn和ACC的mRNA含量均显著增加; 而BA能显著降低病毒感染和未感染细胞中FFA、CHO以及Fasn和ACC的mRNA含量(图3)。

2.5 棕榈酸盐预处理对BA抗CVB3感染的影响

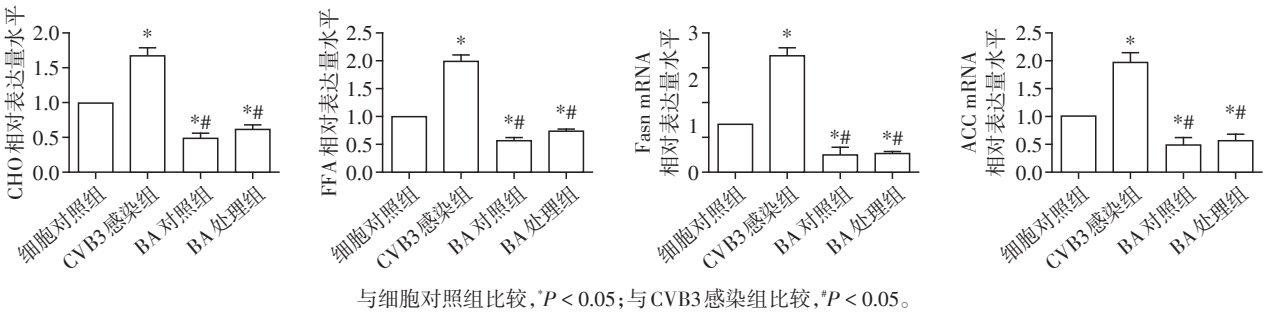
病毒感染24 h后, 与BSA预处理组相比较, 棕榈酸预处理的CVB3感染组中病毒蛋白VP1表达并无显著差异, 但是棕榈酸预处理的BA处理组中VP1表达显著增加(图4)。



A: 两组病毒空斑实验结果; B: Western blot检测BA对CVB3病毒蛋白VP1表达的影响。与CVB3感染组比较, $^*P < 0.05$ 。

图2 BA对CVB3感染细胞病毒复制及VP1蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of BA on virus replication and VP1 protein expression in CVB3 infected cells



与细胞对照组比较,**P* < 0.05;与CVB3感染组比较,**P* < 0.05。

图3 BA对细胞脂类代谢物质的影响
Figure 3 Effect of BA on lipid metabolism in cells

3 讨 论

CVB3属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属的柯萨奇病毒B组,无包膜的单正链RNA病毒,具有嗜心性。感染患者中10%~20%可进展至扩张性心脏病,少数重症患者可发生心力衰竭甚至死亡^[8]。由于无特效抗病毒药物,目前仍然以对症治疗为主^[9]。

BA为一种黄酮类化合物。在以往研究中显示BA具有多种作用,如通过抑制环氧化酶-2活性减少炎症反应^[10];通过抑制HBV核基因启动子活性,抑制HBV子代病毒的产生^[11];通过抑制NA酶活性、调节病毒NS1蛋白功能和细胞因子产生,抗流感病毒H1N1感染^[12]。本研究发现BA在无细胞毒性的浓

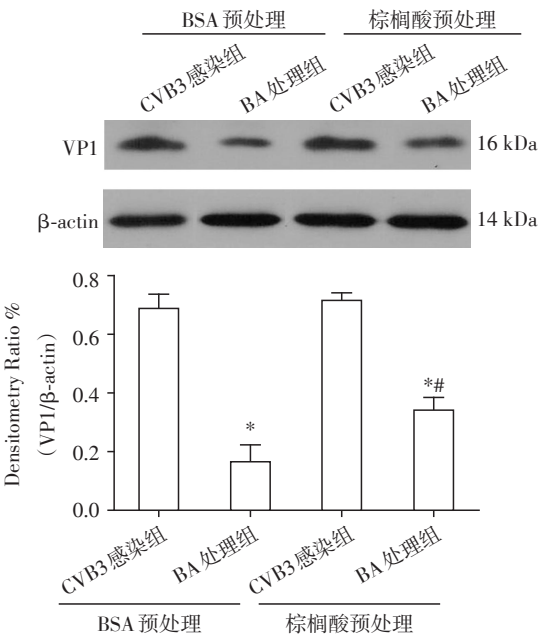
度下,能显著改善CVB3感染细胞的存活率,并呈现出剂量依赖效应;在病毒感染24 h后,BA处理组中的病毒滴度和病毒蛋白VP1表达均显著低于CVB3感染组,表明BA具有抗病毒诱导细胞病变和干扰病毒复制的效用,但具体机制尚不清楚。

病毒具有高度寄生性,完全依赖于宿主细胞的能量和代谢系统来获取生命活动所需的物质和能量。许多RNA病毒可通过操纵宿主膜和细胞脂质来创造一个新的细胞微环境,便于病毒基因组复制、蛋白质合成和新病毒粒子的组装^[13]。已有研究表明,CVB3感染后可诱导宿主细胞形成大量的双膜囊泡结构的自噬体,这些自噬体量与病毒复制效率呈正相关关系^[14];而细胞膜的关键组成部分胆固醇、脂肪酸和磷脂等成分是自噬体形成所必需的^[13,15];表明细胞脂质的积累在病毒感染进程中起着重要作用。在实验中,同样发现CVB3感染可促进Hela细胞中FFA和CHO含量的增加,以及上调Fasn和ACC mRNA的表达;而经BA处理后,可显著减少病毒感染和未感染细胞中这些脂类代谢分子的表达。因此,本研究推测BA抑制CVB3复制的效用可能与其降低脂类代谢作用相关。于是,进一步通过体外棕榈酸预处理来验证这一推测,结果显示棕榈酸预处理对CVB3感染组中病毒复制无明显影响,但是能显著恢复BA处理组中病毒复制的能力。

综上所述,BA可通过降低细胞脂类代谢,减少病毒感染后自噬体形成,从而干扰病毒复制,继而减少病毒对细胞的破坏。因此,本研究结果也许能为抗CVB3感染药物的研发提供新的实验依据和研究思路。

[参考文献]

[1] Wang T,Zhang J,Xiao A,et al. Melittin ameliorates CVB3-induced myocarditis via activation of the HDAC2-mediated GSK-3beta/Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Biochem

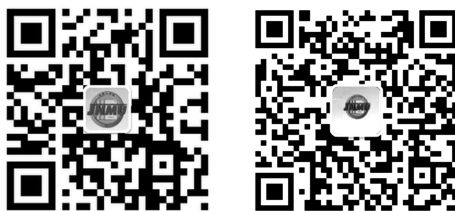


与CVB3感染组比较,**P* < 0.05;棕榈酸预处理的BA处理组与BSA预处理的BA处理组相比较,**P* < 0.05。

图4 棕榈酸对CVB3感染细胞中VP1表达的影响
Figure 4 Effects of palmitic acid on CVB3/VP1 expression in virus infected cells

- Biophys Res Commun, 2016, 480(1):126-131
- [2] Li XQ, Liu XX, Wang XY, et al. Cinnamaldehyde derivatives inhibit coxsackievirus b3-induced viral myocarditis [J]. Biomol Ther(Seoul), 2017, 25(3):279-287
- [3] Lind K, Svedin E, Domsgen E, et al. Coxsackievirus counters the host innate immune response by blocking type III interferon expression[J]. J Gen Virol, 2016, 97(6):1-12
- [4] Li X, Liu YY, Hou XL, et al. Chlorogenic acid inhibits the replication and viability of enterovirus 71 *in vitro* [J]. PLoS One, 2013, 8(9):e76007
- [5] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders[J]. Eur J Med Chem, 2017, 131(4):68-80
- [6] Li X, Liu YY, Wu TT, et al. The Antiviral Effect of Baicalin on Enterovirus 71 *in vitro*[J]. Viruses, 2015, 7(8):4756-4771
- [7] Nazli SA, Loeser RF, Chubinskaya S, et al. High fat-diet and saturated fatty acid palmitate inhibits IGF-1 function in chondrocytes [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(9):1516-1521
- [8] Massilamany C, Gangaplara A, Reddy J. Intricacies of cardiac damage in coxsackievirus B3 infection: implications for therapy[J]. Int J Cardiol, 2014, 177(2):330-339
- [9] Li YH, Tang S, Li YH, et al. Novel 12N-substituted matrixanes as potential anti-coxsackievirus agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27(4):829-833
- [10] Bitto A, Squadrito F, Irrera N, et al. Flavocoxid, a nutraceutical approach to blunt inflammatory conditions [J]. Mediators Inflamm, 2014, 8(24):790851
- [11] Huang H, Zhou W, Zhu H, et al. Baicalin benefits the anti-HBV therapy via inhibiting HBV viral RNAs [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 323(3):36-43
- [12] Nayak MK, Agrawal AS, Bose S, et al. Antiviral activity of baicalin against influenza virus H1N1 - pdm09 is due to modulation of NS1 - mediated cellular innate immune responses [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(5):1298-1310
- [13] Xie W, Wang L, Dai Q, et al. Activation of AMPK restricts coxsackievirus B3 replication by inhibiting lipid accumulation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 85(10):155-167
- [14] Zhai X, Qin Y, Chen Y, et al. Coxsackievirus B3 induces the formation of autophagosomes in cardiac fibroblasts both *in vitro* and *in vivo* [J]. Exp Cell Res, 2016, 349(2):255-263
- [15] Wang J, Wu J, Wu H, et al. Liraglutide protects pancreatic beta-cells against free fatty acids *in vitro* and affects glucolipid metabolism in apolipoprotein E-/- mice by activating autophagy [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3):4210-4218

[收稿日期] 2017-10-27



欢迎关注本刊微博、微信公众号!