

表没食子儿茶素没食子酸酯对甲型流感病毒
致宿主细胞氧化应激损伤的影响

卫飞^{1,2}, 凌佳馨¹, 李宁¹, 李金林¹, 陈良君¹, 熊海蓉¹, 罗凡¹, 刘媛媛¹, 肖红¹, 杨占秋^{1*}

(1. 武汉大学医学病毒学研究所, 病毒学国家重点实验室, 国家中医药管理局
中药抗病毒与肿瘤实验室, 食品药品评价研究中心, 武汉 430071;
2. 湖北中医药大学, 武汉 430061)

[摘要] **目的:**研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)在体外对甲型流感病毒感染后氧化应激的影响,初步探讨EGCG抗流感病毒的发生机制。**方法:**以 1×10^4 个细胞密度接种96孔板,在体外用MTT法检测不同浓度EGCG对狗肾传代细胞(MDCK)的毒性浓度;病毒感染28 h后,用CPE观察法、血凝法、实时定量荧光PCR法评价EGCG对甲型流感病毒的抑制作用;并通过共聚焦显微技术和流式细胞术,探寻EGCG对甲型流感病毒感染后氧化应激的影响。**结果:**EGCG在体外能有效抑制甲型流感病毒的复制,病毒抑制率与感染后加药时间正相关($P < 0.05$);与病毒对照相比,20 mg·L⁻¹ EGCG处理后流感病毒感染的MDCK细胞中活性氧的水平下降54%,继而有效抑制流感病毒引起的细胞凋亡。**结论:**EGCG主要抑制流感病毒的早期复制,可通过调控氧化应激,抑制流感病毒所致MDCK细胞凋亡。

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯; 流感病毒; 抗病毒作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0212-05

[收稿日期] 20120104(007)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873104)
[第一作者] 卫飞,博士研究生,讲师,从事抗病毒药物研究,E-mail:linjiaxin1986@163.com
[通讯作者] * 杨占秋,教授,博士生导师,从事抗病毒药物研究,Tel:02762596052,E-mail:yangzhanqiu@163.com

胺所致气管痉挛有松弛解痉作用,可抑制支气管平滑肌收缩幅度及收缩频率,并可延长哮喘潜伏期^[8-9]。我们的实验结果与文献报道是一致的,麻杏石甘汤对磷酸组胺所致哮喘可延长哮喘潜伏期、缩短哮喘持续时间,从而减轻哮喘症状。表明生物信号采集分析系统能客观、准确地反映麻杏石甘汤的平喘作用,因此,可广泛运用于其他药物的平喘作用研究。

[参考文献]

[1] Heaney L G, Robinson D S. Severe asthma treatment; need for characterizing patients[J]. Lancet, 2005, 365 (9463): 974.
[2] 黄丰,童晓云,张荣华,等. 麻杏石甘汤调节哮喘模型小鼠Th1/Th2反应的机制初探[J]. 中药材,2008,31 (10):1519.
[3] 黎同明,朱章志,王桂香. 不同配比麻杏石甘汤对哮喘

大鼠Th1/Th2类细胞因子分泌的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(8):200.
[4] 王佑华,曹敏,周端. 生物信号采集处理系统及其在中医药研究中的应用[J]. 中华中医药学刊,2009,27 (9):1905.
[5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘诊断标准、临床分期和严重程度分级[J]. 疑难病杂志, 2006,5(3):180.
[6] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2011:625.
[7] 王北婴. 中药新药研制并开发技术与方法[M]. 上海:上海科学技术出版社. 2001:491.
[8] 陈娜,梁仁. 麻杏石甘汤的现代药理研究及临床应用[J]. 广东药学院学报,2004,20(5):545.
[9] 尉小慧,张兆旺,孙秀梅. 麻杏石甘汤现代研究概况[J]. 山东中医药大学学报,2003,27(1):72.

[责任编辑 聂淑琴]

Protection *in vitro* of Epigallocatechin Gallate on Oxidative Stress Induced by Influenza Infection

WEI Fei^{1,2}, LING Jia-xin¹, LI Ning¹, LI Jin-lin¹, CHEN Liang-jun¹, XIONG Hai-rong¹,
LUO Fan¹, LIU Yuan-yuan¹, XIAO Hong¹, YANG Zhan-qiu^{1*}

(1. State Key Laboratory of Virology, National Laboratory of Antiviral and Tumor
of Traditional Chinese Medicine, Institute of Medical Virology, Research Center of Food
and Drug Evaluation, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China;
2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the molecular mechanism of the anti-influenza A virus effects of epigallocatechin gallate (EGCG) derived from green tea *in vitro*. **Method:** The cell viability of EGCG was determined by using MTT assay. And virus inhibitory rate was evaluated based on the observation of cytopathic effect (CPE), hemagglutination assay and Real-time Quantitative PCR (QPCR). The mechanisms of action for the observed sensitivity of influenza A to EGCG at the molecular level was assessed by confocal microscope and flow cytometry. **Result:** Exposing Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells with 20 mg·L⁻¹ EGCG could inhibit influenza A replication in a time-dependent manner, probably by interrupting postbinding step. EGCG treatment could mitigate oxidative stress in influenza-infected cells and reduce the apoptosis induced by influenza infection. **Conclusion:** EGCG inhibits oxidative stress and apoptosis induced by influenza virus infection.

[**Key words**] EGCG; influenza A virus; antiviral effect

流行性感 冒 (简称流感) 是由流感病毒引起的严重危害人类健康的一种急性呼吸道传染病, 每年造成严重的经济以及社会危害^[1]。目前预防流感病毒感染的主要方法有流感疫苗和抗病毒药物两种。但疫苗接种具有一定局限性, 且面临着来自病毒持续突变的挑战。当前批准的抗病毒药物例如扎那米韦和奥司他韦均已产生耐药性, 因此寻找新的有效的抗流感病毒药物势在必行^[2]。我们选用的表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 是绿茶提取物茶多酚的主要成分, 已被证实其在体内体外具有很好的抗病毒疗效, 但是 EGCG 抗流感病毒的分子机制还不甚了解^[3]。流感病毒致病机制的研究中, 氧化应激损伤和病毒诱导的细胞凋亡机制一直都是医学研究的热点。国内外研究显示氧化应激 (oxidative stress) 在包括流感病毒感染在内的多种疾病的致炎过程中发挥着重要的作用, 而流感病毒感染引起的肺组织细胞损伤与氧自由基造成氧化应激态升高密切相关, 且活性氧所致的氧化应激是造成细胞凋亡的重要环节^[4]。对流感病毒感染氧化应激的研究有望找到缓解或消除细胞氧化应激的方法, 因而本文试图探讨 EGCG 的抗氧化作用与流感病毒感染所致氧化应激的影响, 试图为 EGCG 的应

用补充新的理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 EGCG (纯度 ≥ 98%, 阿拉丁公司产品, 批号 989-51-5) 使用前用去离子水配成终浓度为 1 g·L⁻¹ 的母液, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 密封, 避光 4 ℃ 冷藏保存。细胞培养用小牛血清 (产品编号 16170-086) 及 DMEM (产品编号 12800082) 均购自 Gibco 公司。活性氧检测试剂盒 (碧云天, 产品编号 S0033); Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒 (上海炎彬化工科技有限公司, 产品编号 401001); DNA 提取试剂盒 (Axygen 公司产品, 批号 AP-MN-MS-GDNA-50); SYBR Green mix (日本 Toyobo 公司, 产品编号 QPK-201)。

1.2 仪器 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), NanoDrop ND-1000 紫外分光光度仪, EPICS ALTRA II 型流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司), TCS SP5 型激光共聚焦显微镜 (德国莱卡公司)。

1.3 毒种 流感病毒 A/Yamagata/120/86 (H₁N₁), 由日本福岛医科大学微生物系锡谷达夫教授惠赠。使用前在 9~11 日龄鸡胚尿囊腔接种传代 3~4 次, 收集尿囊液, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液进行血凝实验, 将血凝滴度大于 1:320 且细菌培养

阴性的病毒液分装。所有毒种均置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 细胞 狗肾传代细胞(MDCK)为本所保存,开始实验时为第 18 代(实验结束细胞不超过 35 代)。细胞生长液分别为含 10% 小牛血清的 DMEM,常规加入青霉素和链霉素。细胞维持液除不含血清外,其余同细胞生长液。病毒维持液加入 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰蛋白酶。

1.4 引物设计 根据 GenBank 上已发表的甲型流感病毒 M 基因保守序列设计,预期扩增片段为 100 bp。M-F: $5'-\text{ACCCAGAAGACTGTGGATGG}-3'$; M-R: $5'-\text{ACACATTGGGGGTAGGAACA}-3'$, GAPDH-F: $5'-\text{GGTGGTCTCTGACTTCAACA}-3'$; GAPDH-R: $5'-\text{GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT}-3'$ 作为内参基因,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2 方法

2.1 EGCG 对 MDCK 细胞的毒性作用 将单层 MDCK 细胞消化,收集细胞,完全培养基稀释后以 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板,每孔 0.1 mL。24 h 待细胞长成单层后,加入不同浓度的含药维持液继续培养。每天于倒置显微镜下观察细胞变化,72 h 后,MTT 法检测细胞存活率^[3]。每一药物浓度均重复 4 孔。同时设正常细胞对照。每次实验重复 3 次。以 Probit 回归方法计算药物半数毒性浓度(TC_{50})。

$$\text{细胞存活率} = (\text{实验组平均 } A - \text{病毒组平均 } A / \text{病毒组平均 } A) \times 100\%$$

2.2 不同加药时间对流感病毒复制的影响 选择药物对病毒穿入细胞后的抑制作用方式^[3],并参照 John 的方法设计不同加药时间对流感病毒的影响^[5]。先用 100 TCID_{50} 的病毒每孔 0.1 mL 感染细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 2 h 后,吸去病毒,PBS 洗涤 2 次以洗去未结合的病毒,于吸附后不同时间点(0,2,4,6,8,10,14,18,22,26 h)加入 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的含药维持液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养,于倒置显微镜下观察细胞变化。待病毒对照孔 CPE 达 80% 以上且细胞对照正常时,用 MTT,血凝法,实时定量荧光 PCR 法分别检测检测细胞存活率,上清以及细胞中病毒滴度,每一时间点均重复 4 孔,同时设正常对照组和病毒对照组。依照文献报道的方法取 50 μL 培养上清做 10 倍梯度稀释,混以 50 μL 1% 豚鼠红细胞悬液,使红细胞与病毒充分混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,观察血凝现象并记录结果^[3]。

2.3 RNA 提取和实时定量荧光 PCR 以 TRIzol

(Invitrogen)按照试剂说明提取所得细胞总 RNA,经 NanoDrop ND-1000 紫外分光光度仪测定 A_{260}/A_{280} ,鉴定 RNA 纯度及定量后,各样本取 1.0 μg 总 RNA 逆转录。提取所得 RNA 以及 cDNA 分别置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱以及 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存储备用。20 μL PCR 反应体系中含 SYBR Green mix 10 μL 、正义和反义 PCR 引物($6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 0.4 μL ,ddH₂O 7.2 μL 和模板 cDNA 2 μL ,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s;55 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,共 40 个循环,反应结束后,使用流感病毒和 GAPDH 双标准曲线进行绝对定量。

2.4 活氧簇(ROS)检测 采用流式细胞术和共聚焦显微镜技术检测 EGCG 对流感病毒致 MDCK 细胞中活性氧的变化^[6]。MDCK 细胞感染流感病毒后 2 h 用含 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 的含药维持液继续培养,待病毒对照孔 CPE 达 80% 以上且细胞对照正常时,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性氧检测探针 500 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,PBS 液漂洗两遍后,用含 EDTA 的胰蛋白酶将细胞消化,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心机进行离心。将调节好的细胞重悬于 500 μL 冷 PBS 中,采用美国贝克曼库尔特 FC 500 流式细胞仪进行检测。并且设置正常组,病毒组以及 EGCG 对照组。

将 MDCK 细胞接种于激光共聚焦培养皿上。同上法培养和处理,待病毒对照孔 CPE 达 80% 以上且细胞对照正常时,加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性氧检测探针 500 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。4% 多聚甲醛固定后用激光扫描共聚焦显微镜检测。

2.5 早期凋亡与晚期凋亡检测 以标记的 Annexin-V/PI 试剂盒,利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。取对数生长期的 MDCK 细胞接种于 6 孔培养板,同上法处理后收集细胞,离心、预冷 PBS 漂洗,缓冲液重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后,加入 5 μL 碘化丙啶(PI),混匀,室温避光反应 5 min,流式细胞仪分析细胞的凋亡情况。早期凋亡细胞为 Annexin(+)/PI(-),坏死或凋亡晚期细胞为 Annexin(+)/PI(+),正常的活细胞为 Annexin(-)/PI(-)。待测细胞使用 Axygen 公司总 DNA 提取试剂盒按照说明书提取细胞内总 DNA,质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳于 $1\times\text{TBE}$ 缓冲液中电泳 1 h,凝胶图像分析系统观察实验结果。

2.6 统计学处理 所有数据以 SPSS 17.0 软件汇总并作统计学处理,Probit 回归方法计算药物半数中毒浓度(TC_{50}),用 Linear Regression 对药物剂量与

其产生的细胞效应(细胞存活率、抑制率)进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 EGCG 对 MDCK 细胞的药物毒性 EGCG 对 MDCK 细胞的毒性表现为细胞变圆,脱落且吸光度(A)下降。EGCG 对 MDCK 细胞的毒性作用在一定范围内随着药物浓度的增加,细胞存活率降低。EGCG 的药物毒性如图 1 所示。通过显微镜观察细胞形态和 MTT 法测定 A,确定 EGCG 的 TC_{50} 为 $(80.84 \pm 11.11) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

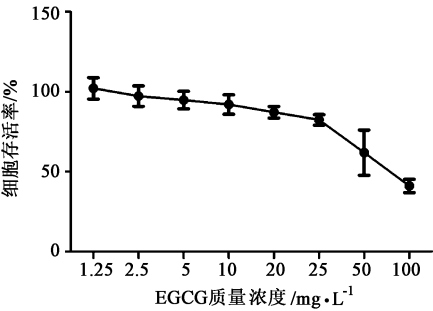
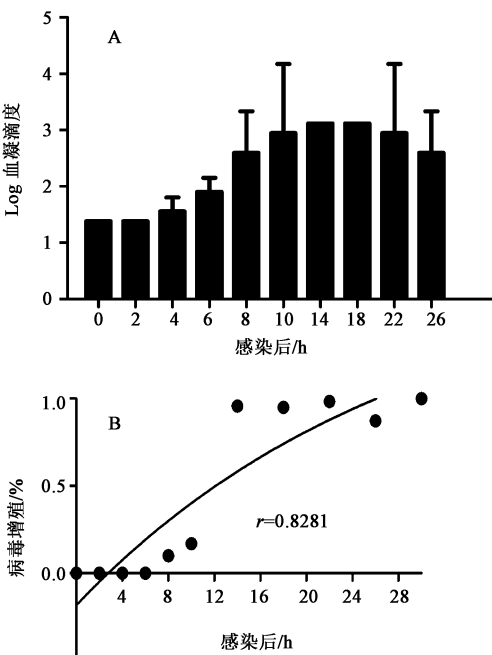


图 1 EGCG 对 MDCK 细胞的药物毒性($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 不同加药时间对流感病毒的复制的影响 如图 2A 所示,EGCG 在感染后 0,2,4,6 h 作用细胞后,0,2,4,6 h EGCG 治疗组的血凝滴度均数与病毒对照组相比显著降低,差异显著(0,2,4 h $P < 0.001$,6 h $P < 0.01$)。RT-PCR 扩增,进行实时定量 PCR 分析($n = 3$),结果显示 0~6 h 给药,病毒 RNA 表达量与病毒对照比较,显著降低,有统计学差异($P < 0.05$),MTT 法测得 EGCG 对病毒抑制作用随着时间的变化而变化,经非线性回归分析(One-phase association),呈明显的时间依赖关系($r = 0.8281$) (图 2B),提示 EGCG 可能主要抑制病毒的早期复制发挥抗病毒的作用。

3.3 EGCG 对流感病毒感染后细胞内活性氧的影响 共聚焦显微观察结果表明:流感病毒感染 MDCK 细胞后,细胞的荧光强度明显增强,20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 处理组可显著降低细胞内活性氧的水平,与病毒对照组相比较有统计学差异($P < 0.05$)。如表 1 所示,20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 处理组细胞内活性氧水平与病毒对照相比显著降低,有统计学差异($P < 0.05$)。

3.4 EGCG 对流感病毒感染致细胞凋亡的影响 病毒感染 28 h 后,收集上清中及贴壁细胞进行细胞凋亡检测,可见正常组细胞中活细胞占 96%,约 1.8% 的细胞死亡或者凋亡;20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 单处理组中,89.6% 为活细胞,约 $(10.43 \pm 1.30) \%$ 为死



A. 不同加药时间上清中病毒滴度;

B. 不同加药时间与病毒增殖之间相关性

图 2 不同加药时间对流感病毒复制的影响

表 1 EGCG 对流感病毒感染氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	平均荧光强度	
	共聚焦	流式细胞术
正常	70.93 ± 6.31	80.1 ± 10.29
EGCG(20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	30.87 ± 7.90 ¹⁾	50.43 ± 9.37 ¹⁾
EGCG(20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 病毒	62.30 ± 8.52	104.2 ± 10.99 ¹⁾
EGCG(10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 病毒	90.76 ± 10.23	143.5 ± 12.34
病毒	120.34 ± 10.30	181.2 ± 14.45

注:与病毒组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

亡或者凋亡的细胞;而 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 处理的病毒感染组中 74.5% 为活细胞,坏死及凋亡的细胞占 $(17.73 \pm 2.38) \%$,远小于病毒对照组中 $(49.77 \pm 4.30) \%$ 的凋亡率。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳结果发现,病毒组出现规则降解的 DNA 片段“梯形”图谱,而此种现象在 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 治疗组中则不明显,进一步证实 EGCG 可以有效抑制流感病毒所致 MDCK 细胞的凋亡。见表 2。

4 讨论

我们的前期工作表明,EGCG 在体内和体外具有很好的抗甲型流感病毒的作用,但是对其抗病毒作用的分子机制还研究不明。为进一步揭示 EGCG 作用机制,本实验评价了 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 分别于感染病毒后 0,2,4,6,8,10,14,18,22,26 h 的不同时间点作用细胞后,分析上清中病毒滴度以及细胞

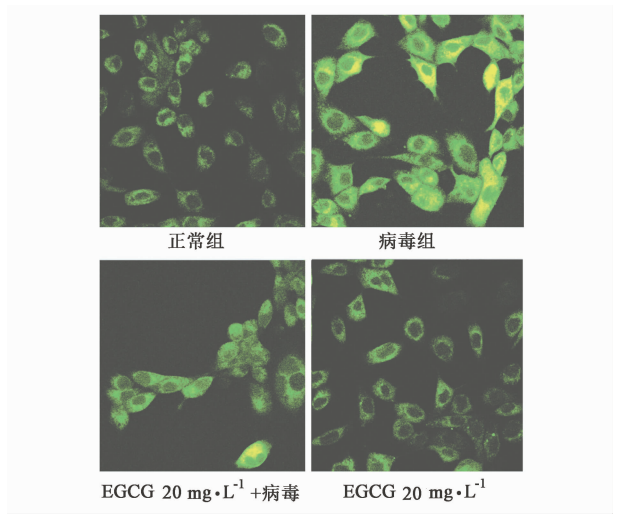


图 3 EGCG 对流感病毒感染 MDCK 细胞的活性氧水平的影响

表 2 EGCG 对流感病毒感染细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %			
组别	早期凋亡率	晚期凋亡及 坏死率	总计
正常	1.93 ± 1.31	0.50 ± 0.20	2.43 ± 1.46
EGCG (20 mg·L ⁻¹)	7.87 ± 1.90 ¹⁾	2.57 ± 0.61	10.43 ± 1.30
EGCG (20 mg·L ⁻¹) + 病毒	12.30 ± 2.52 ¹⁾	5.43 ± 0.99	17.73 ± 2.38
EGCG (10 mg·L ⁻¹) + 病毒	28.67 ± 3.23 ¹⁾	3.71 ± 0.45	31.71 ± 2.96
病毒	49.77 ± 4.30	3.50 ± 0.60	53.27 ± 4.05

注:与病毒组早期凋亡率比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

中病毒核酸的变化。本实验研究表明,EGCG 在感染病毒后 0~6 h 加入可以有效降低病毒滴度以及核酸的复制,与病毒对照组比较,有统计学意义 ($P < 0.05$),而在感染病毒后 8 h 后加入抑制率开始降低,此后随着给药时间的延迟而降低。这说明 EGCG 可能主要通过抑制病毒的早期复制发挥抗病毒的作用。

需氧细胞在代谢过程中产生一系列 ROS,包括:超氧阴离子 $O_2^- \cdot$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 等在病毒的复制以及自由基介导的细胞凋亡之间存在着密切的关联^[7]。有研究表明,流感病毒感染的发病机制与肺脏氧化应激相关,氧化应激和脂质过氧化作用可导

致肺脏细胞发生坏死性炎症和损伤^[7]。而传统的抗氧化剂吡咯烷二硫代氨基酸 (PDTC) 和 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸 (NAC) 在体外具有良好的抗流感病毒的活性^[8]。本研究将 EGCG 的抗氧化作用及流感病毒所致 MDCK 细胞氧化应激之间的关系联系起来,在给予 EGCG 干预后,可显著减低细胞内活性氧水平,减少 MDCK 细胞凋亡数量。而以往的体外研究结果表明,佛波酯等诱导活性氧产生的物质可以有效促进流感病毒的复制,因此推测其作用机制,可能与该药能显著降低活性氧水平,并通过调节氧化应激而抑制 MDCK 细胞凋亡的作用,从而减少流感病毒的复制有关。本研究为 EGCG 的进一步应用提供了新的新的分子药理学依据。

[参考文献]

[1] 周瑞玲,陈玉兴,余惠旻,等. 抗病毒茶治疗流感的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003,9(3):22.

[2] 朱丹,刘华钢,黄慧学. 金黄 I 号及组方药味体外抗流感病毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17):181.

[3] 肖潇,杨占秋,石丽桥,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗流感病毒作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22):2678.

[4] 周爱国,李小兰. 枸杞多糖对大鼠小肠缺血再灌注氧化应激的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):221.

[5] Rossen J W, Bouma J, Raatgeep R H, et al. Inhibition of cyclooxygenase activity reduces rotavirus infection at a postbinding step[J]. J Virol, 2004, 78(18):9721.

[6] Ho H Y, Cheng M L, Weng S F, et al. Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57:6140.

[7] 郎中云,方显明. 安心颗粒对心衰大鼠氧化应激和心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):124.

[8] Uchide N, Ohyama K. Antiviral function of pyrrolidine dithiocarbamate against influenza virus: the inhibition of viral gene replication and transcription[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52(1):8.

[责任编辑 聂淑琴]