

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0185-06

Ebola 假病毒的构建及其在中药抗病毒活性筛选方面的应用

侯雪雯,田景振,崔清华*

山东中医药大学,济南 250355

摘要:本实验利用细胞水平重组病毒技术,使病毒质粒和 HIV 质粒转染 293T 细胞构建 Ebola、H5N1、Lassa 假病毒,收集假病毒,于 96 孔板内感染 A549 细胞。利用 Luciferase 荧光底物检测感染效力。感染成功后进行抗病毒中药的筛选,筛选得到 32 个药品对 Ebola 假病毒有效。再通过毒性筛选排除药物毒性因素,初筛得到地龙、50% 乙醇矮地茶提取物、75% 乙醇矮地茶冷浸物等 26 个抗 Ebola 病毒中药。下一步可对其进行进一步提取纯化,寻找体外抗 Ebola 病毒的有效组分或成分。

关键词:假病毒;转染;Ebola 病毒;H5N1 病毒;Lassa 病毒

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.028

Construction of Ebola Pseudovirus and Screening of Antiviral Activity of Traditional Chinese Medicine

HOU Xue-wen, TIAN Jing-zhen, CUI Qing-hua*

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: In this study, Ebola, H5N1 and Lassa Pseudoviruses were constructed from 293T cells transfected with virus plasmids and HIV plasmids by cell-level recombinant virus technology. Luciferase fluorescence substrate was used to detect infection efficacy. After screening, 32 drugs were screened for Ebola virus. After eliminating the toxic factors through toxicity screening, 26 anti-Ebola herbal medicines, such as earthworm, 50% ethanol extract and 75% ethanol cold extract, were obtained. The next step is to further extract and purify Ebola, and to find the effective components or components of Ebola virus in vitro.

Key words:pseudovirus; transfection; Ebola virus; H5N1 virus; Lassa virus

Ebola 病毒(Ebola virus)是有包膜的单股负链 RNA 病毒,可以引起 Ebola 出血热。感染 Ebola 病毒后的患者会突然出现高烧、头疼、肌肉疼痛、呕吐、腹泻或出血等症状^[1,2]。Ebola 有五个亚型,不同亚型病毒毒性和致病性有所不同,其中除莱斯顿型的其他几种亚型都对人有致病性,扎伊尔型的致病性最强,死亡率可达 90%^[3]。

假病毒是有外源性病毒囊膜和部分自身基因的一类病毒^[4]。在病毒学研究中,构建假病毒体系进行研究是一种安全且有效的研究手段,对于一些强致病性、强传染性的危险病毒研究发挥了极重要的作用^[5]。目前常用的假病毒体系有两种:一种是以慢病毒如 HIV-1 为基础的假病毒体系;另一种是反

转录病毒如鼠类白血病病毒为基础的假病毒体系^[6]。本实验采用的是 HIV-1 为基础构建假病毒。假病毒的构建基础有两点:一是病毒囊膜能整合到另一种病毒的表面;二是病毒进入细胞的方式仅仅由病毒囊膜决定^[7]。这种假病毒体系因为合成衣壳的基因被荧光素酶报告基因取代,所以具有感染性,却没有复制能力,作为模型使用非常贴近真病毒,但是对于实验室生物安全性要求降低,且更加节省时间。且假病毒的报告基因,定性和定量分析时,检测灵敏度高,甚至可以消除主观性差异^[8]。

由于中药种类繁多,药效和作用机制也比较广泛。中药对于抗病毒作用主要体现在直接抗病毒作用,包括抑制繁殖作用,可以抑制病毒在机体内的自我复制^[9],中药可以杀死入侵细胞前的病毒^[10,11]以及阻挡侵染作用,可以阻止病毒对人体细胞的吸附和穿入过程^[12],有些中药还可以抑制病毒释放^[13,14]、缩短发热时间以及减缓病症扩散速度^[15]等作用。间接抗病毒作用主要包括调节机体主动免疫

收稿日期:2018-11-01 接受日期:2018-11-27

基金项目:国家科技重大专项(2017ZX09301031-005);山东省医药卫生科技发展项目(2016WSB22003);山东省重点研发计划(2017CXGC1309)

*通信作者 Tel:86-018660171818;E-mail:user753951@163.com

功能,促使其发挥主动免疫机制^[16];再者细胞因子如白细胞介素、肿瘤坏死因子、干扰素等细胞因子等可以参与机体的免疫反应,发挥抗感染和免疫监视作用^[17]。许多中药具有抗病毒作用,虽然目前不能被全部研究出来,但是未来发展潜力广阔。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

293T 细胞、A549 细胞(美国伊利诺伊大学芝加哥分校荣立军教授馈赠)。

1.1.2 质粒

HIV 质粒,Ebola 质粒,H5 质粒,N1 质粒,Lassa 质粒(美国伊利诺伊大学芝加哥分校荣立军教授馈赠)。

1.1.3 试剂和仪器

青霉素(VWR 公司,批号:17J175302), MH 肉汤(Basebio 公司,批号:20151206001), Hispeed Plasmid Midi Kit(QIAGEN 公司,批号:157018045), PEI (Polysciences 公司,批号:690141), Neotile Reporter (Perkin Elmer 公司,批号:112-17453), Opti-MEM(美国 Gibco 公司,批号 1894141), 无酚红 DMEM(美国 Gibco 公司,批号:1897086), CO₂ 恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司,400Y), Quawell (DNA/Protein Analyzer)。

1.2 方法

1.2.1 固体培养基的配制

3.3 g 营养琼脂加入 100 mL 蒸馏水加热溶解至澄清, 锡纸封口, 121 ℃ 蒸汽灭菌 20 min, 冷却至室温, 加入青霉素使其终浓度为 10%, 分装, 敞口照紫外 15 min 灭菌, 4 ℃ 保存。

1.2.2 细菌(含质粒)的培养

取-80 ℃ 保存的大肠杆菌包壳的 Ebola, H5, N1,

表 1 转染时质粒用量

Table 1 Plasmid usage at the time of transfection

病毒种类 Virus type	HIV (μg)	Plasmid1 (μg)	Plasmid2 (μg)	PEI (μL)
Ebola	42	3		170
H5N1	42	H5-6	N1-6	170
Lassa	42	6		170

1.2.6 提取物的准备

300 多种中药通过水提或醇提等方法得到提取物, 进一步浓缩成浸膏, 干燥备用。将干燥好的药物

Lassa, HIV 质粒, 在固体培养基中划线接种, 37 ℃, 70% 湿度条件下培养 30 h。称取两份 2.1 g MH 肉汤至三角瓶中, 加入 100 mL 蒸馏水, 加热溶解至澄清, 121 ℃ 灭菌 20 min, 培养细菌前加入青霉素。分别从两个液体培养基中各取 1 mL 培养液至摇菌管中, 选取单菌落接种培养, 放至恒温培养振荡器中孵育 4~6 h 后将 1 mL 培养液转移回原瓶培养 12~16 h。

1.2.3 提取质粒

菌液于 4 ℃ 8 000 rpm 离心, 按照 HiSpeed 质粒 DNA 纯化试剂盒内的说明书操作, 重悬沉淀后裂解大肠杆菌, 选取相应的试剂提取 DNA, 用 Quawell 检测器检测 DNA 浓度, 记录浓度纯度大于 1.70 且浓度大于 100 ng/ μL 的数据。

1.2.4 转染试剂 PEI 的制备

PEI 用无菌水(无毒素)加热至 80 ℃ 溶解后冷却直至室温。调节 pH 至 7.0, 过 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 分装后-20 ℃ 保存。

1.2.5 制备假病毒

转染前一天(24 h 左右)用 20 mL poly-L-lysine 覆盖培养皿表面 20 min, 回收 poly-L-lysine, 晾干培养皿表面。293T 细胞铺板, 使其在转染时充分汇合。转染前 1 h, 更换培养液为 Opti-MEM。感染时用 1 mL Opti-MEM 稀释 HIV 和 Ebola 质粒, 涡旋使其混匀, 记为 A 液; 用等体积 Opti-MEM 稀释 PEI, 涡旋使其混匀, 记为 B 液。室温静置 5 min。将 B 液缓慢加到 A 液中, 而后用旋涡振荡器混匀, 室温放置 20 min。DNA-PEI 混合液缓缓加到细胞培养基中, 轻轻混匀, 37 ℃ 孵育 5 h。5 h 后将培养基换成普通无色 DMEM 培养基, 24 h 后收假病毒, 过 0.45 μm 微孔滤膜。

转染时质粒所需用量如下表 1:

各精密称取 0.05 g, 加 1 mL PBS 溶解, 不溶者改用 DMSO 溶解。各从药物溶液中取 5 μL, 用 DMEM 培养液稀释到 100 μL。

1.2.7 抗病毒药物筛选

取对数期的 A549 细胞点板,每孔 10^5 个细胞。设置加药组和对照组。加药组取-20 ℃保存的药液 4.00 μL 和 96 μL 病毒液(即原药液稀释 500 倍),按药品编号对应加入细胞中,对照组加 100 μL 病毒液。48 h 后避光加入 50.00 μL 荧光底物 Neolite Reporter,避光在摇床内孵育 5 min,超微量分光光度计检测荧光底物信号值。记录 RLU 值。

1.2.8 药物毒性筛选

取 1.2.8 项下抑制率大于 90% 的药物,用对数期 A549 细胞点板,每孔 10^5 个细胞。设置加药组和对照组,加药组取-20 ℃保存的药液 4.00 μL 和 96.00 μL 培养液加入 A549 细胞中,对照组加 100 μL 培养液。48 h 后避光加入 50.00 μL 荧光底物 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA) 避光在摇床内孵育 5 min,超微量分光光度计检测荧光底物信号值。记录 RLU 值。

2 结果与分析

2.1 提取质粒

表 2 质粒提取结果

Table 2 Plasmid extraction results

质粒 Plasmid	吸光值 Absorbance value	浓度 Concentration (ng/ μL)
HIV	1.65	203.5
Ebola	1.72	261.0
N1	1.72	270.3
H5	1.63	216.9
Lassa	1.70	121.9

2.2 假病毒信号检测

通过检测, Ebola 假病毒的信号为 123780, H5N1 假病毒信号为 46200, Lassa 假病毒的信号为 13528983。

2.3 抗病毒药物筛选结果

中药对 Ebola 病毒抑制率(%) = 加药组的 RLU/对照组的 RLU。通过测量,对 Ebola 假病毒抑制率大于 90% 的药物共有 101 个,与 H5N1 假病毒和 Lassa 假病毒抑制率结果进行比较,筛掉对三者抑制率均大于 90% 的结果,得到 32 个仅对 Ebola 假病毒抑制率大于 90% 的药物。

表 3 对 Ebola 假病毒抑制率 $\geq 90\%$ 的药物

Table 3 Drugs with an inhibition rate of Ebola pseudovirus $\geq 90\%$

提取物 Extract	抑制率 Inhibition rate	提取物 Extract	抑制率 Inhibition rate
鸡骨草 10% 乙醇提取物 Chicken bone grass 10% ethanol extract	98.17%	赤芍水提物 Paeonia veitchii Lynch Water extract	96.15%
金樱子 10% 乙醇提取物 Rosa laevigata 10% ethanol extract	98.27%	鸡骨草 30% 乙醇提取物 Chicken bone grass 30% ethanol extract	98.27%
地龙 Rainworm	98.85%	金樱子多糖 Rosa Laevigata Polysaccharide	96.15%
矮地茶 50% 乙醇提取物 Dwarf tea 50% ethanol extract	97.03%	地榆 Sanguisorba officinalis L.	99.53%
金樱子二氯甲烷提取物 Rosa laevigata dichloromethane extract	97.19%	鸡骨草 70% 乙醇提取物 Chicken bone grass 70% ethanol extract	96.42%
海藻水提物 Seaweed water extract	94.86%	灵芝粉末 DMSO 提取物 Ganoderma lucidum powder DMSO extract	90.25%
矮地茶 75% 乙醇冷浸物 Dwarf tea 75% ethanol cold dipping extract	97.57%	鸡骨草水提物 Chicken bone grass water extract	99.01%
木贼 Equisetum hyemale L.	99.08%	矮地茶 75% 乙醇超声提取物 Dwarf tea 75% ethanol ultrasonic extract	97.04%
金钱草 Lysimachia christinae Hance	91.00%	南板蓝根 Baphicacanthus cusia Brem	93.00%
矮地茶多糖 Dwarf tea polysaccharide	97.06%	金银花 30% 醇沉物 Honeysuckle 30% alcohol precipitate	99.35%
乌药 Lindera aggregata (Sims) Kosterm.	92.00%	矮地茶正丁醇提取物 Dwarf tea n-butanol extract	94.27%

续表3(Continued Tab. 3)

提取物 Extract	抑制率 Inhibition rate	提取物 Extract	抑制率 Inhibition rate
金银花 50% 醇沉物 Honeysuckle 50% ethanol precipitate	98.48%	野菊花 Dendranthema indicum	98.00%
薄荷 Mentha haplocalyx Briq	98.00%	金银花萃取后剩水层物 Honeysuckle extract water layer	98.01%
淫羊藿 Epimedium brevicornu Maxim.	95.00%	赤芍多糖 Paeonia veitchii Lynch Polysaccharide	97.61%
金银花石油醚层萃取物 Honeysuckle petroleum ether layer extract	98.88%	自制黄芩苷 Homemade baicalin	96.94%
赤芍水超声提取物 Paeonia veitchii Lynch water ultrasonic extract	94.14%	金银花乙酸乙酯层萃取物 Honeysuckle Ethyl Acetate Extract	98.81%

2.4 药物毒性筛选

对抗病毒药物筛选实验中筛选出的对 Ebola 病毒有效的药物进行毒性筛选, 对 Ebola 病毒抑制率

>90% 且细胞存活率≥80% 的药物, 可初步认为是抗 Ebola 病毒的中药。

表 4 对 Ebola 病毒抑制率≥90% 的提取物的细胞存活率
Table 4 Cell viability of extracts with Ebola virus inhibition rate ≥90%

提取物 Extract	细胞存活率 Cell viability	提取物 Extract	细胞存活率 Cell viability
地龙 Rainworm	92.08%	矮地茶 50% 乙醇提取物 Dwarf tea 50% ethanol extract	85.78%
矮地茶 75% 乙醇冷浸物 Dwarf tea 75% ethanol cold dipping	90.96%	鸡骨草 10% 乙醇提取物 Chicken bone grass 10% ethanol extract	85.53%
野菊花 Dendranthema indicum	89.90%	鸡骨草水提物 Chicken bone grass water extract	85.39%
南板蓝根 Baphicacanthus cusia Brem	89.65%	鸡骨草 70% 乙醇提取物 Chicken bone grass 70% ethanol extract	85.38%
地榆 Sanguisorba officinalis L.	89.23%	金银花石油醚层萃取物 Honeysuckle petroleum ether layer extract	84.59%
金钱草 Lysimachia christinae Hance	89.15%	金银花 50% 醇沉物 Honeysuckle 50% ethanol precipitate	83.17%
金银花乙酸乙酯层萃取物 Honeysuckle Ethyl Acetate Extract	89.15%	乌药 Lindera aggregata (Sims) Kosterm.	82.99%
矮地茶多糖 Dwarf tea polysaccharide	89.09%	金银花 30% 醇沉物 Honeysuckle 30% alcohol precipitate	82.87%
金银花萃取后剩水层物 Honeysuckle extract water layer	89.06%	赤芍水提物 Paeonia veitchii Lynch Water extract	82.57%
鸡骨草 30% 乙醇提取物 Chicken bone grass 30% ethanol extract	88.96%	赤芍多糖 Paeonia veitchii Lynch Polysaccharide	81.21%
木贼 Equisetum hyemale L.	88.68%	赤芍水超声提取物 Paeonia veitchii Lynch water ultrasonic extract	79.56%
薄荷 Mentha haplocalyx Briq	87.48%	矮地茶 75% 乙醇超声提取物 Dwarf tea 75% ethanol ultrasonic extract	79.17%
金樱子二氯甲烷提取物 Rosa laevigata dichloromethane extract	86.95%	海藻水提物 Seaweed water extract	79.06%
金樱子 10% 乙醇提取物 Rosa laevigata 10% ethanol extract	86.63%	灵芝粉末 DMSO 提取物 Ganoderma lucidum powder DMSO extract	78.11%
矮地茶正丁醇提取物 Dwarf tea n-butanol extract	86.44%	自制黄芩苷 Homemade baicalin	77.89%
淫羊藿 Epimedium brevicornu Maxim.	86.34%	金樱子多糖 Rosa Laevigata Polysaccharide	58.03%

通过测量,仅对 Ebola 假病毒抑制率大于 90% 的 32 个提取物中有 26 个提取物的细胞存活率大于 80%,分别为:地龙、矮地茶 75% 乙醇冷浸物、野菊花、南板蓝根、地榆、矮地茶 50% 乙醇提取物、鸡骨草 10% 乙醇提取物、鸡骨草水提物、鸡骨草 70% 乙醇提取物、金银花石油醚层萃取物、金钱草、金银花乙酸乙酯层萃取物、矮地茶多糖、金银花萃取后剩水层物、鸡骨草 30% 乙醇提取物、木贼、薄荷、金樱子二氯甲烷提取物、金樱子 10% 乙醇提取物、矮地茶正丁醇提取物、淫羊藿、金银花 50% 醇沉物、乌药、金银花 30% 醇沉物、赤芍水提物、赤芍多糖、赤芍水超声提取物、矮地茶 75% 乙醇超声提取物、海藻水提物、灵芝粉末 DMSO 提取物、自制黄芩苷和金樱子多糖具有抗 Ebola 病毒活性。但这仅仅是体外实验,不能证明复杂的体内过程这些药物不能发挥作用。而且假病毒的基因组并不完整,也不能证明这些药物对缺失部分抗病毒无效。应用假病毒进行抗病毒筛选仍旧存在局限性:假病毒不能完全贴合真病毒在病人体内的情况,药物可能出现假阳性,需要进一步筛选^[18];单轮感染的病毒可能因为突变造成病毒变异,可能难以达到筛选药物情况^[19]。因为本实验具有一定的假阳性,后期将在这个基础上进一步做第二轮筛选。且假病毒和真病毒还是存在一定区别,后期本实验室和国外实验室有相关合作,将筛选出的药物送至国外在 P4 实验室应用于 Ebola 真病毒观察结果。

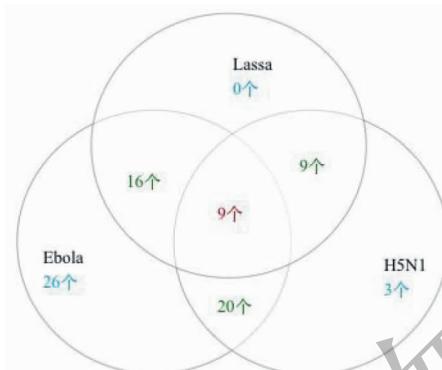


图 1 药物对三种病毒抑制作用关系图

Fig. 1 Diagram of the inhibition of drugs on three viruses

2.5 三种病毒筛选抗病毒药物结果

3 讨论

本实验建立了 EBola、H5N1、Lassa 假病毒体系,进行抗 EBola 病毒中药提取物的筛选。由于本实验为初筛实验,因此设置了较高的筛选标准。通过与 H5N1 和 Lassa 假病毒抗病毒结果的对比,筛选出仅对 Ebola 抑制率大于 90% 且细胞存活率大于 80% 的提取物认定为初次筛选中的有效提取物。结果显示:地龙、矮地茶 75% 乙醇冷浸物、野菊花、南板蓝根、地榆、矮地茶 50% 乙醇提取物、鸡骨草 10% 乙醇提取物、鸡骨草水提物、鸡骨草 70% 乙醇提取物、金银花石油醚层萃取物、金钱草、金银花乙酸乙酯层萃取物、矮地茶多糖、金银花萃取后剩水层物、鸡骨草 30% 乙醇提取物、木贼、薄荷、金樱子二氯甲烷提取物、金樱子 10% 乙醇提取物、矮地茶正丁醇提取物、淫羊藿、金银花 50% 醇沉物、乌药、金银花 30% 醇沉

物、赤芍水提物、赤芍多糖、赤芍水超声提取物、矮地茶 75% 乙醇超声提取物、海藻水提物、灵芝粉末 DMSO 提取物、自制黄芩苷和金樱子多糖具有抗 Ebola 病毒活性。但这仅仅是体外实验,不能证明复杂的体内过程这些药物不能发挥作用。而且假病毒的基因组并不完整,也不能证明这些药物对缺失部分抗病毒无效。应用假病毒进行抗病毒筛选仍旧存在局限性:假病毒不能完全贴合真病毒在病人体内的情况,药物可能出现假阳性,需要进一步筛选^[18];单轮感染的病毒可能因为突变造成病毒变异,可能难以达到筛选药物情况^[19]。因为本实验具有一定的假阳性,后期将在这个基础上进一步做第二轮筛选。且假病毒和真病毒还是存在一定区别,后期本实验室和国外实验室有相关合作,将筛选出的药物送至国外在 P4 实验室应用于 Ebola 真病毒观察结果。

参考文献

- Wang J(王静), Chen SM(陈淑敏), Ma L(马铃), et al. Establishment and application of Ebola virus entry inhibitor screening model [J]. Chn J Med Biot (中国医药生物技术), 2016, 11: 193-199.
- Hoenen T, Groseth A, Falzarano D, et al. Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease [J]. Trends mol med, 2006, 12: 206-215.
- Zeng GC(曾谷城). Progress in Ebola virus research [J]. Jour Sun YS Univ; Med Sci Ed(中山大学学报:医学科学版), 2015, 36: 161-166.
- Sanders DA. No false start for novel pseudotyped vectors [J]. Curr Opin Biotech, 2002, 13: 437-442.
- Lang JS, Yang N, Deng JJ, et al. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. [J]. PLoS One, 2011, 6: e-23710.
- Liu H(刘红), Zhang GL(张国良), Shen L(沈丽), et al. Application and evaluation of pseudovirus technology in screening Chinese herbal medicine against H5N1 avian influenza virus [J]. J Chin Integr Med (中西医结合学报), 2010, 8: 1036-1040.
- Liu HL(刘华雷), Rong LJ, Zhou B(周斌), et al. Characteristics of recombinant murine leukemia virus expressing H5N1 subtype avian influenza virus HA protein [J]. Chin J Biotech(生物工程学报), 2005, 1: 47-51.
- Haas WH, Breuer T, Pfaff G, et al. Imported Lassa Fever in Germany: Surveillance and management of contact persons [J]. Clin Infect Disease, 2003, 36: 1254-1258.

(下转第 172 页)