

## 异荛草苷体内外抗呼吸道合胞病毒活性研究

朱秀珍, 申文伟, 龚翠莹, 王 英, 叶文才, 李药兰, 李满妹\*

(暨南大学中药及天然药物研究所//中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广东 广州 510632)

**摘要:**【目的】研究清热消炎中草药淡竹叶中异荛草苷的体内外抗病毒活性,并初步探讨其作用机制。【方法】采用 MTT 法测定异荛草苷的细胞毒性,并以异荛草苷的最大无毒浓度为起始浓度,采用空斑减数法测定其体外抗 RSV 活性,计算其抗病毒的选择性指数(SI 值);继而采用空斑减数法,研究异荛草苷对 RSV 复制周期不同阶段的影响,采用实时定量 PCR 法,检测异荛草苷对病毒蛋白 mRNA 合成的影响;选取 3 周龄 BALB/c 雄性小鼠研究异荛草苷体内抗 RSV 活性,小鼠灌胃给药 4 d,经鼻腔滴入 RSV 病毒液造模,继续灌胃给药 3 d,取小鼠肺组织称重、切片、HE 染色,显微镜下观察肺组织病理学改变,并用空斑减数法检测小鼠肺组织内病毒含量。【结果】异荛草苷体外抑制 RSV A2 株和 LONG 株的  $IC_{50}$  分别为  $(3.6 \pm 0.8) \mu\text{g/mL}$  和  $(2.4 \pm 0.2) \mu\text{g/mL}$ ,比阳性药利巴韦林的活性略低,因异荛草苷的细胞毒性比利巴韦林小,其抗 RSV 的选择性指数(SI)为利巴韦林 8.3 倍;初步的作用机制研究表明,异荛草苷主要抑制 RSV 在宿主细胞内的复制过程,也可一定程度地抑制病毒进入宿主细胞,实时定量 PCR 结果显示,异荛草苷可以不同程度地降低 RSV 的 L、F 和 P 蛋白对应的 mRNA 的表达;异荛草苷可降低小鼠肺组织的病毒滴度,且可缓解病毒引起的炎症。【结论】清热消炎中药淡竹叶中的异荛草苷,具有较好的体内外抗病毒活性,且能一定程度缓解病毒性炎症;该化合物主要在病毒进入宿主细胞后的复制阶段(复制晚期)起作用,能抑制与病毒复制晚期相关的 L、F 和 P 蛋白的 mRNA 表达。

**关键词:**异荛草苷;体内外;抗 RSV;机制

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2015)03-0352-08

### Antiviral Activity of Isoorientin against Respiratory Syncytial Virus in Vitro and in Vivo

ZHU Xiu-zhen, SHEN Wen-wei, GONG Cui-ying, WANG Ying, YE Wen-cai, LI Yao-lan, LI Man-mei\*

(Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy //Guangdong Province Key Laboratory of Pharmaceutical Constituents of TCM and New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Corresponding to: LI Man-mei, E-mail: limanmei@hotmail.com

**Abstract:**【Objective】To research the in vitro and in vivo anti-RSV activity of isoorientin isolated from the leaves of *Lophatherum gracile* Brongn., a traditional Chinese medicine (TCM) used for the treatment of fever and inflammation, and the preliminary mechanism of isoorientin against RSV infection. 【Methods】MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay was adopted to evaluate the cytotoxicity of isoorientin. The anti-RSV activity of isoorientin against A2 and Long strains was investigated by plaque reduction assay. Plaque reduction assay was also performed to evaluate the inhibitory effect of isoorientin on the extracellular and intracellular stages of RSV replication cycle, as well as the inhibitory effects of isoorientin on viral penetration. Quantitative real-time PCR assay was conducted to determine mRNA expression of RSV proteins relating to RSV intracellular replication. Male BALB/c mice of 3 week old were used to evaluate the anti-RSV activity of isoorientin in vivo. Mice were lightly anesthetized with diethyl ether then intranasally challenged with RSV Long strain at 4th day after isoorientin treatment. Isoorientin was continuously treated by intragastric administration for 3 days. The mice were sacrificed, and its lungs were removed, weighed and fixed with methanol for H&E staining. The viral loads in the lungs were tested by plaque reduction assay. 【Results】Isoorientin could dose-dependently inhibit the RSV-induced plaque formation on HEp-2 cells and the  $IC_{50}$  values against RSV A2 and Long strains were  $(3.6 \pm 0.8) \mu\text{g/mL}$  and  $(2.4 \pm 0.2) \mu\text{g/mL}$ , respectively, which were almost equal to that of ribavirin. But isoorientin showed lower

收稿日期:2015-01-07

基金项目:国家自然科学基金(81202429,81473116);广东省自然科学基金重点项目(S2013020012864);广东省中医药科技项目(20121161);中国博士后科学基金(2014M56225)。

作者简介:朱秀珍,硕士研究生,研究方向:中药有效成分研究,E-mail:614096919@qq.com; \*通信作者:李满妹,高级实验师,E-mail:limanmei@hotmail.com

cytotoxicity with much higher selectivity index (SI) values than that of ribavirin. The preliminary investigation on anti-RSV mechanism showed that isoorientin mainly inhibited replication of RSV at the stage of intracellular, even though it slightly stopped RSV from penetrating into the host infection at the stage of extracellular. Moreover, quantitative real-time PCR showed that the mRNA levels of RSV F, P and L protein were inhibited by isoorientin treatment at different magnitudes. In the RSV infected mice, the levels of viral loads and inflammatory response in lung tissues were reduced in the presence of isoorientin. 【Conclusions】 Isoorientin isolated from the leaves of *Lophatherum gracile* showed significant antiviral activity against RSV in vitro and in vivo. This compound could alleviate the inflammation in the lungs caused by RSV infection. These effects may be attributed to its significant inhibition of mRNA expression of RSV F, P and L at the stages of intracellular.

**Key words:** isoorientin; in vitro and in vivo; anti-RSV; mechanism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(3):352-359]

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)是除甲型流感外最常见的呼吸道感染病毒,是引起婴幼儿下呼吸道及肺部感染的最主要病原体。由于RSV感染不能产生持续的免疫性,可导致宿主再次感染或终生感染,所以RSV也是老年人和免疫功能低下人群呼吸道疾病的重要感染源<sup>[1]</sup>。目前临床上治疗RSV感染的药物主要为广谱抗病毒药利巴韦林,但由于利巴韦林对宿主细胞的毒性较大,其在临床上的使用受到一定的限制<sup>[1-2]</sup>。帕利珠单抗 (palivizumab, RSV F蛋白的中和抗体)临床上可用于早产儿、支气管肺发育不良等高危患儿,治疗RSV感染引起的下呼吸道严重疾病,但其存在使用周期长、费用高等弊端,尚未能普遍推广使用<sup>[3-4]</sup>。服用清热消炎的中药预防和辅助治疗呼吸道疾病是民间常用的方法,因此,我们前期对广东民间常用清热消炎中药进行了抗呼吸道病毒的系统评价和筛选,首次发现广东凉茶中重要的组方药材淡竹叶,具有较好的体外抗RSV活性。进一步的研究表明,淡竹叶的抗病毒活性成分是黄酮碳苷类化合物,其中以异荳草苷的活性最好,在光学显微镜下观察该化合物对RSV导致的细胞病变的抑制作用,显示异荳草苷体外抑制RSV活性与阳性药利巴韦林相近,细胞毒性实验显示,异荳草苷的细胞毒性大大低于利巴韦林<sup>[5]</sup>。为此,本研究拟对异荳草苷的体内抗RSV的活性做进一步评价,并初步探讨其作用机制,为清热消炎中药淡竹叶的开发利用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 病毒毒株与细胞株 人呼吸道合胞病毒LONG株 (RSV LONG Strain)和A2株 (A2 Strain)

由武汉大学医学病毒学研究所提供;宿主细胞为人喉鳞癌细胞 (HEp-2 cell lines, ATCC CCL23)购于美国模式培养物保藏所。

1.1.2 实验动物 SPF级雄性BALB/c小鼠,3周龄50只,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证SCXK(粤)2008-0002。动物饲养于(23±1)℃的P2级饲养室内,相对湿度为40%~70%。照明时间:12 h/d (7:00-19:00)。自由进食和饮水,饲养1周后用于实验。

1.1.3 试剂与仪器 异荳草苷由本实验室分离提取并鉴定结构<sup>[6]</sup>,化合物的结构如图1所示;利巴韦林注射液购自湖北制药有限公司,琼脂糖购自美国Invitrogen公司,结晶紫、多聚甲醛、购自北京鼎国生物科技公司,其他分析纯试剂均从广州东征化玻公司购买。CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱为美国Thermo公司产品,生物安全柜购自新加坡Esco公司,CKX41倒置显微镜购自日本Olympus株式会社,550型酶标自动读数仪为美国BIO-RAD公司,Veriti 96孔热循环PCR仪购自美国ABI公司,Light Cycler 480实时荧光定量PCR仪购自瑞士Roche公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 病毒滴度测定 病毒原液用细胞维持液 (Maintain medium, MM)做10倍稀释,形成9个梯度的稀释液(浓度为10<sup>-1</sup>~10<sup>-9</sup>),分别感染在接种

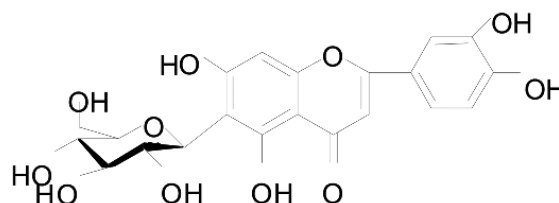


图1 异荳草苷的结构

Fig. 1 The structure of isoorientin

有致密单层 HEp-2 细胞的 96 孔板上, 每组设置 8 个复孔, 置于 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养, 每天观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 情况<sup>[7-8]</sup>, 病毒感染 72 h 时, 采用 Reed-Muench 公式计算半数组织培养感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>)。

1.2.2 细胞毒性实验 HEp-2 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁形成单层细胞后, 弃去原培养基, 分别加入 100 μL 的不同浓度的异荳草苷溶液, 每个浓度设置 4 个复孔, 选用利巴韦林作为阳性对照药。细胞培养板置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 72 h 后, 各孔分别加入 30 μL 5 mg/mL MTT 溶液, 37 °C 避光孵育 4 h。待甲臞结晶充分形成后, 小心吸去孔内液体, 加入 100 μL DMSO 充分溶解, 再用酶标仪检测各孔的 OD 值, 计算出药物的半数毒性浓度 (50% cytotoxic concentration, CC<sub>50</sub>) 和最大无毒浓度 (maximal non-cytotoxic concentration, MNCC)<sup>[9-10]</sup>。

1.2.3 空斑减数实验法测定异荳草苷体外抗 RSV 活性 根据 Andries<sup>[11]</sup>、McKimm-Breschkin<sup>[12]</sup> 等的文献并以调整。将 HEp-2 细胞 (4 × 10<sup>5</sup> cells/mL) 接种在 12 孔板上, 37 °C 下培养 24 h, 形成致密单层细胞后, 分别加入 100 μL 不同浓度 (0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00 μg/mL) 的异荳草苷溶液和 100 μL 80 PFU/孔的 RSV LONG 或者 RSV A2 稀释液, 不加化合物溶液的孔作为病毒对照组。于 37 °C 吸附 2 h 后, 弃去病毒液, PBS 洗两次, 每孔加入 1 mL 的琼脂糖凝胶覆盖液, 待覆盖液凝固后, 加入 1 mL 对应浓度的异荳草苷溶液, 细胞对照和病毒对照组加入等体积的维持液, 孵育 5 d, 加入 40 g/L 多聚甲醛溶液室温下固定过夜后, 倒掉孔内溶液, 加入 300 μL 结晶紫染色液, 室温染色 0.5 h。自来水轻缓冲洗, 晾干后计数空斑。根据以下公式计算抑制率, 求出样品的 IC<sub>50</sub>。空斑抑制率 = [(病毒组的空斑数 - 样品组的空斑数) / 病毒组的空斑数] × 100%

1.2.4 不同浓度异荳草苷对 RSV 感染不同阶段的影响 实验方法参照文献报道并作简单优化<sup>[13]</sup>, 采用空斑减数实验法, 将板上的孔分为 2 组: 感染前期 (Early phase, 样品仅作用于病毒感染的前 2 h)、感染后期 (Later phase, 样品作用于病毒感染的 2 h 后)。向感染前期的孔中同时加入不同浓度 (0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00 μg/mL) 的异荳草苷溶液与 100 μL 病毒稀释液, 待药物和病毒

液共同作用 2 h 后, 弃原液, PBS 洗两次, 加入 1 mL 琼脂糖凝胶覆盖液; 而感染后期的孔只加入病毒稀释液, 37 °C 吸附 2 h 后, 弃病毒液, PBS 洗两次, 加入 1 mL 琼脂糖凝胶覆盖液。待覆盖液凝固后, 向感染前期的孔内加入 1 mL MM, 感染后期组孔内加入 1 mL 不同浓度的样品溶液。37 °C 培养 5 d, 固定, 染色, 计数空斑, 计算空斑抑制率。

1.2.5 异荳草苷对 RSV 吸附和穿入细胞的影响<sup>[14-15]</sup> ① 将致密单层细胞于 4 °C 预冷 1 h, 然后加入预冷的不同浓度 (1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 μg/mL) 的异荳草苷溶液和病毒稀释液, 阳性药组加入利巴韦林。4 °C 吸附 2 h 后, 弃异荳草苷溶液和病毒稀释液, PBS 洗两次, 除去未吸附的病毒。然后加入琼脂糖凝胶覆盖液, 待凝固后, 加入维持液 MM。培养 5 d, 固定, 染色, 计数空斑, 计算药物对病毒吸附到宿主细胞的空斑抑制率。② 将致密细胞单层置于 4 °C 预冷 1 h, 加入预冷的 RSV 稀释液感染细胞, 4 °C 吸附 2 h。弃孔内病毒液, 4 °C 的 PBS 洗两次, 加入不同浓度 (1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 μg/mL) 的异荳草苷溶液, 转入 37 °C 培养, 培养 2 h 后, 弃去培养板内液体, 用 pH 3.0 的 PBS 处理细胞 1 min, 以灭活未穿入的 RSV LONG, 再加入 pH = 11.0 的 PBS 立即中和, 用 PBS 洗两次, 其中对照组不加 pH 3.0 PBS 处理。然后加入琼脂糖凝胶覆盖液, 待凝固后, 加入维持液 MM。培养 5 d, 固定, 染色, 计数空斑, 计算药物对病毒穿入到宿主细胞的空斑抑制率。

1.2.6 异荳草苷对 RSV mRNA 合成的影响 参考 Trasino<sup>[16]</sup> 并进行适当调整。用 200 μL MOI 为 1 的 RSV 感染 6 孔板中的 HEp-2 单层细胞, 37 °C 吸附 2 h 后, 弃去病毒液, PBS 洗两次。再分别加入 20 μg/mL 异荳草苷或 10 μg/mL 利巴韦林, 继续培养至 16 h, 弃去样品, PBS 洗两次。然后加入培养基继续培养, 感染后 24 h 终止培养。无样品组作为病毒对照组。然后依次提取总 RNA, 检测浓度, 逆转录成 cDNA, 进行 QPCR 反应, 检测 RSV P、F 和 L 3 个目的基因, 选用 GAPDH 作为内参基因。通过 NCBI 查找相关基因的引物序列, 再根据引物设计原则通过 Vector NTI 设计出合适的引物序列, 委托 Invitrogen 公司合成, 引物序列见表 1。

1.2.7 RSV 感染小鼠模型的建立及给药处理 将 3 周龄 BALB/c 雄性小鼠分为 5 组, 每组 10 只, 分别为正常对照组、模型组、阳性药组 (50 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)

表1 QPCR实验涉及RSV基因和GAPDH的引物序列

Table 1 Primers used for the Real-Time PCR analysis of RSV amplicons and GAPDH

gene		Primer sequence	length/bp
L	Forward	5'-CAGCCAAATCCAACCAACTT-3'	219
	Reverse	5'-AATTCCTGCTCCTTCACCT-3'	
P	Forward	5'-AGAGATGCCATGGTTGGTTT-3'	190
	Reverse	5'-TCCCTTCCAACAGGTTGTTC-3'	
F	Forward	5'-ACAACAGCAGCAAACAATCG-3'	236
	Reverse	5'-ACGGCCTTGTITGTGGATAG-3'	
GAPDH	Forward	5'-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'	182
	Reverse	5'-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC-3'	

(intron spanning 286)

利巴韦林)、高剂量给药组(100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 异荭草苷溶液)、低剂量给药组(50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 异荭草苷溶液)。适应性饲养一周后,每天灌胃给药 0.1 mL/只,正常和模型组灌胃给等体积的生理盐水。给药第4天,乙醚麻醉,滴鼻给病毒 100 μL/只(RSV Long 滴度为 5 × 10<sup>6</sup> PFU/mL),正常对照组滴鼻给等体积的对照培养液,然后连续给药 3 d,腹腔注射水合氯醛溶液,再喷洒 750 mL/L 乙醇消毒小鼠,于无菌条件下完整剥离小鼠肺组织,准确称重。

1.2.8 检测 RSV 小鼠肺组织内病毒滴度 在无菌条件下,准确称取 20 mg 的小鼠左上肺组织,以 1 mg:10 μL 的比例加入适量 MM,将肺组织在冰上进行匀浆,使肺组织中的病毒释放出来。随后,将匀浆液放入离心机,4 ℃,1500 r/min(*r* = 90 cm)离心 10 min。取上清液感染 12 孔板内的 HEp-2 单层细胞,进行空斑减数实验,测定对应肺组织中 RSV 的病毒滴度。

1.2.9 RSV 小鼠肺组织病理学检查 取相同位置相同大小的右肺组织,用 40 mL/L 甲醛溶液进行固定。经过脱水及包埋后,切片,然后进行苏木素-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)常规染色,显微镜下观察肺组织病理性改变。

### 1.3 统计学分析

应用 Origin 软件进行统计学分析,实验数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组均数比较采用 ANOVA 及 Newman-Keuls-Student 多重比较 *t* 检验分析。*P* < 0.05 代表差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 异荭草苷体外抗 RSV 活性

通过 MTT 试验以及空斑减数实验法得到异荭草苷对细胞生长 50%抑制的半数毒性浓度(CC<sub>50</sub>)和对病毒复制 50%抑制的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。结果如表 2 和图 2 所示,异荭草苷抑制 RSV A2 株和 LONG 株的 IC<sub>50</sub> 分别为 (3.6 ± 0.8) μg/mL 和 (2.4 ± 0.2) μg/mL,比阳性药利巴韦林的活性略低【其 IC<sub>50</sub> 值分别为 (2.1 ± 1.6) μg/mL 和 (1.4 ± 0.4) μg/mL】;但与利巴韦林相比,异荭草苷的细胞毒性较小,CC<sub>50</sub> 为 (430.0 ± 42.9) μg/mL,因此异荭草苷的选择性系数(SI 值)比利巴韦林高,活性更好。

### 2.2 异荭草苷对 RSV 感染不同阶段的影响

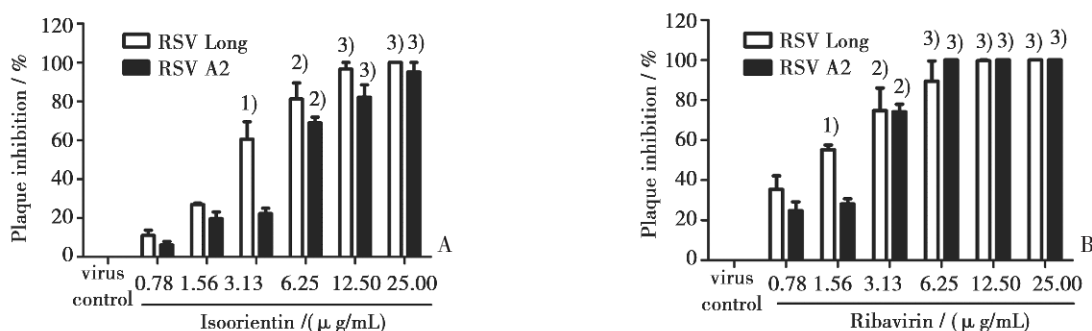
根据 RSV 复制周期可以将其主要分为两个阶段,首先是病毒进入宿主细胞的过程,也就是病毒在宿主细胞外的过程,其次是病毒在细胞内进

表2 异荭草苷对 HEp-2 细胞毒性及抗 RSV 活性结果

Table 2 Cytotoxicity and Anti-RSV Activity of Isoorientin<sup>1)</sup>( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Compounds	Cytotoxicity	RSV LONG strain		RSV A <sub>2</sub> strain	
	CC <sub>50</sub> /(μg/mL)	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	SI	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	SI
Ribavirin	30.3 ± 4.9	1.4 ± 0.1	21.6 ± 1.8	2.1 ± 0.1	14.4 ± 1.3
Isoorientin	430.0 ± 42.9	2.4 ± 0.2	179.2 ± 1.5 <sup>2)</sup>	3.6 ± 0.8	119.4 ± 2.8 <sup>2)</sup>

These values represent the means (μg/mL) ± SD of three independent experiments; CC<sub>50</sub> was evaluated by MTT assay; IC<sub>50</sub> was detected by Plaque reduction assay with RSV strains at 100TCID<sub>50</sub>; SI value equals CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>; Ribavirin, was used as the positive control. 1) *P* < 0.01 vs ribavirin group.



The plaque inhibition was calculated in this method:  $[(\text{mean number of plaques in virus control}) - (\text{mean number of plaques in sample})] / (\text{mean number of plaques in virus control}) \times 100\%$ , values are the means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ , 3)  $P < 0.001$  vs virus control.

图 2 异荭草苷 (A) 和利巴韦林 (B) 抗 RSV 空斑减数实验结果

Fig.2 The effects of isoorientin (A) and ribavirin (B) against RSV by plaque reduction assay

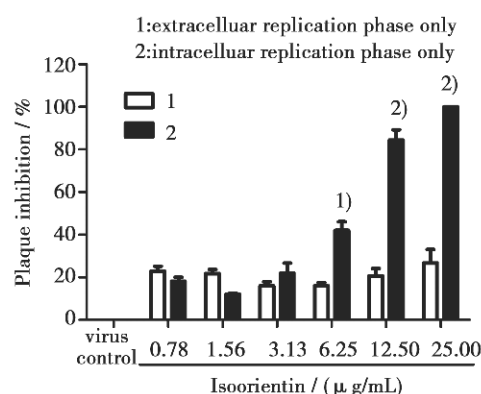
行蛋白质合成和基因组复制过程。RSV 进入宿主细胞包括吸附和穿入过程,完成此过程需要约 2 h<sup>[17]</sup>。实验通过在 RSV 感染的不同时期加入一定浓度的样品,以研究异荭草苷体外抗病毒作用是抑制病毒的吸附和穿入(在细胞外)的过程还是在细胞内的复制过程。结果如图 3 所示,在病毒的感染早期,加入不同浓度的异荭草苷对病毒有微弱的抑制作用,空斑形成的抑制率为  $(16.0 \pm 4.7)\%$ ,随着样品浓度的增大抑制率并无显著变化,说明异荭草苷只一定程度的抑制了 RSV 感染早期的相关过程,但无明显的剂量关系。而在病毒感染后期,加入  $12.5 \mu\text{g/mL}$  的异荭草苷,其空斑形成抑制率为  $(84.4 \pm 8.4)\%$ ,差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),加入  $25.0 \mu\text{g/mL}$  的异荭草苷,病毒空斑形成抑制率为  $100\%$  ( $P < 0.001$ )。且异荭草苷对病毒感染后期的抑制作用呈明显的浓度依赖性,表明异荭草苷对 RSV 的抑制作用主要集中在感染后期,也就是 RSV 进入宿主细胞后的复制过程。

### 2.3 异荭草苷对 RSV 吸附和穿入细胞的影响

RSV 感染的细胞外过程主要包括吸附和穿入,在吸附实验中,异荭草苷几乎不能抑制 RSV 吸附到宿主细胞。而在穿入实验中,加入  $25.0 \mu\text{g/mL}$  异荭草苷时,病毒空斑抑制率为  $(54.4 \pm 9.8)\%$ ,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),而加入  $50.0 \mu\text{g/mL}$  利巴韦林时,其空斑抑制率微弱,仅为  $(25.9 \pm 9.3)\%$ ,说明异荭草苷可以一定程度的抑制 RSV 穿入宿主细胞,且抑制效果优于阳性药利巴韦林(图 4)。

### 2.4 异荭草苷对病毒 mRNA 表达的影响

在以 mRNA 合成为主的 RNA 转录过程中加



The plaque inhibition was calculated in this method:  $[(\text{mean number of plaques in virus control}) - (\text{mean number of plaques in sample})] / (\text{mean number of plaques in virus control}) \times 100\%$ , values are the means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). 1)  $P < 0.01$ , 2)  $P < 0.001$  vs virus control.

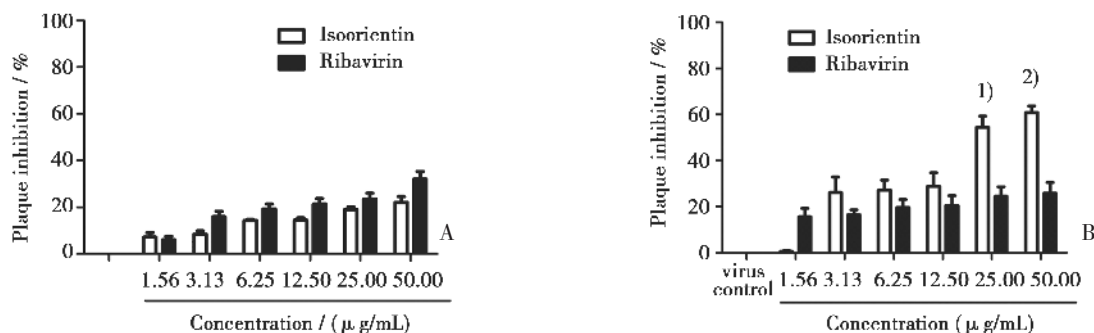
图 3 不同浓度异荭草苷在 RSV 感染不同阶段作用结果

Fig.3 The inhibitory effects of various concentrations of isoorientin against RSV different infection phases

入异荭草苷,检测其对病毒 mRNA 合成的抑制作用,结果如图 5 所示, $20.0 \mu\text{g/mL}$  异荭草苷可以一定程度的抑制 RSV 的 F 蛋白和 P 蛋白对应的 mRNA 的合成,抑制率分别为  $(20.4 \pm 7.2)\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $(35.3 \pm 9.3)\%$  ( $P < 0.01$ ),从而降低两者的表达量;同时也可以显著地降低 L 蛋白对应的 mRNA 合成量,抑制率为  $(57.7 \pm 6.7)\%$  ( $P < 0.001$ ),抑制聚合酶 L 的表达。

### 2.5 异荭草苷对 RSV 感染小鼠肺组织病毒滴度的影响

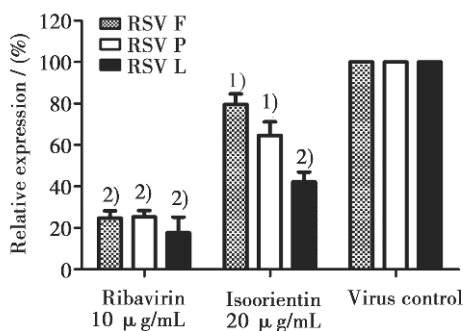
RSV 感染小鼠肺组织病毒滴度能够反映异荭草苷体内抗 RSV 的活性,结果如图 6 所示,与病



The plaque inhibition was calculated in this method: [(mean number of plaques in virus control) (mean number of plaques in sample)/(mean number of plaques in virus control)] × 100%, values are the means ± SD (n = 3). 1) P < 0.01, 2) P < 0.001 vs virus control.

图 4 异荭草苷和利巴韦林抑制病毒吸附(A)和穿入(B)实验

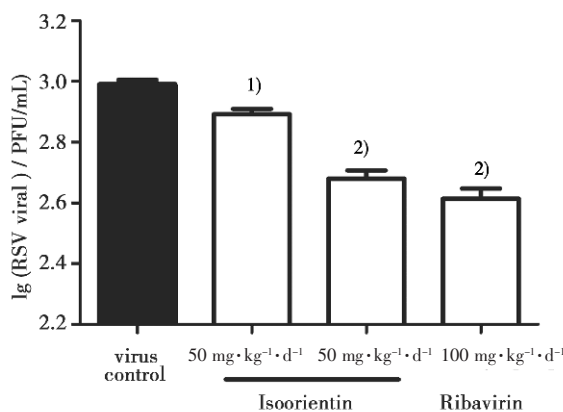
Fig.4 Effect of isoorientin and ribavirin on RSV attachment to host cells (A) or penetration into host cells (B)



Values are the mean ± SD (n = 3). 1) P < 0.05, 2) P < 0.01 vs virus control.

图 5 异荭草苷对 RSV F、P、L mRNA 表达的影响

Fig.5 The effects of isoorientin on the mRNA expression levels of RSV F&P&L proteins



Values are the means ± SD (n = 10). 1) P < 0.01, 2) P < 0.001 vs virus control.

图 6 空斑减数法检测肺组织中病毒滴度

Fig.6 Effects of isoorientin on viral loads in the lung tissues of RSV-infected mice

毒对照组相比,利巴韦林(50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和高剂量异荭草苷(100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)都能显著的降低小鼠肺组织内的 RSV 含量,且差异具有统计学意义(P < 0.001),异荭草苷低剂量组(50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)小鼠肺组织中的病毒滴度也明显的地下降(P < 0.01)。

### 2.6 异荭草苷对 RSV 感染小鼠肺组织病理的影响

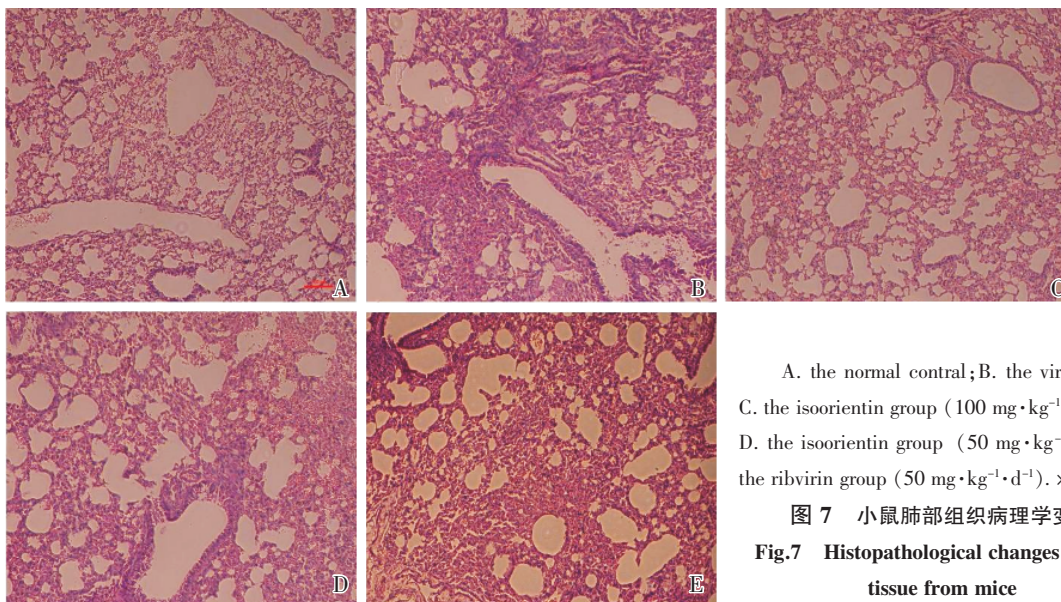
如图 7 所示,与正常小鼠(图 7A)相比,病毒对照组(如图 7B 所示)小鼠经鼻腔吸入的 RSV 悬浮液后,肺部出现了比较严重的组织病理学改变,表现为:肺泡变小,肺泡壁变厚,支气管壁增厚,肺组织炎性浸润。与病毒对照组相比,口服 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 异荭草苷(如图 7C 所示)后,肺组织中的炎性浸润明显改善,肺泡壁变薄,肺泡腔增多。口服给药 50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 异荭草苷(如图 7D 所示),肺组织的肺泡壁亦明显变薄;但与病毒对照组相比,口服给药 50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 利巴韦林(如图 7E 所

示),炎症细胞无明显减少,肺泡壁有无明显变薄。

## 3 讨论

异荭草苷(3,4,5,7-四羟基-6-C-吡喃葡萄糖黄酮)是在清热消炎中药淡竹叶中含量较高的一个黄酮碳苷类化合物,其在毛竹、白花败酱草、露松、芥<sup>[18]</sup>等多种植物中也有分布。随着人们对黄酮碳苷类化合物的研究的深入,其药理活性也逐渐被揭示。已有报道表明,黄酮碳苷类化合物具有抗氧化<sup>[19]</sup>、抗病毒<sup>[20-21]</sup>、抗菌抗炎<sup>[22]</sup>以及降血糖和平滑子官肌<sup>[23]</sup>等功效。本研究表明,异荭草苷具有较好的体内外抗 RSV 活性,且对宿主细胞的毒副作用较低。

RSV 与其他病毒一样,感染细胞的过程包括



A. the normal control; B. the virus group; C. the isoorientin group ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ); D. the isoorientin group ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ); E. the ribvirin group ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).  $\times 100$

图 7 小鼠肺部组织病理学变化  
Fig.7 Histopathological changes in lung tissue from mice

了吸附、穿入、脱壳、基因组的转录和翻译、基因组的复制、组装和病毒释放等多个步骤。其中吸附、穿入和脱壳被认为是 RSV 感染细胞的早期,而基因组的转录、翻译以及复制、病毒释放为感染后期<sup>[24]</sup>。在对异荭草苷体外抗 RSV 的机制的研究中,我们发现:异荭草苷与其它结构类似的抗病毒天然活性成分抗病毒活性及作用机理不同,如荭草苷<sup>[25]</sup>,其抗病毒机制是药物吸附在细胞表面或者进入细胞内,以防止病毒吸附和穿入,从而达到保护细胞作用。而异荭草苷对预防细胞被 RSV 感染的作用较弱,它的作用主要表现在病毒感染后期,可调节和影响病毒 mRNA 的合成。RSV 基因组编码 3 种跨膜糖蛋白(粘附蛋白 G、融合蛋白 F 和小疏水蛋白 SH),这 3 种蛋白对病毒吸附和穿入细胞有着极其重要的作用,病毒吸附过程是通过胞膜上的糖蛋白 G 吸附到宿主细胞表面,然后由融合蛋白 F 介导膜融合,完成病毒穿入过程<sup>[26]</sup>。RSV 病毒 RNA 的转录和复制遵循单分子负链 RNA 病毒转录复制的普遍原则,即是聚合酶进入基因组的 3'端,序列按照 3'到 5'的顺序转录,合成 mRNA,RSV 聚合酶复合体在这一过程发挥至关重要的作用<sup>[27]</sup>,RSV 聚合酶复合体是由磷酸蛋白 P 和核壳蛋白 N 以及聚合酶 L 三个蛋白组成,因此磷酸蛋白 P 和聚合酶 L 的表达量直接影响着 RSV 病毒转录和复制的过程。从定量 PCR 的实验结果可以看出,异荭草苷明显下调磷酸蛋白 P 和聚合酶 L 的 mRNA 水平,而对介导病毒穿入的 F 蛋白的 mRNA 表达量影响较小。由此可推断,异荭

草苷主要是作用于 RSV 病毒基因的转录和复制。

在临床上,RSV 感染主要表现为毛细支气管炎和肺炎。RSV 感染呼吸道上皮细胞会使得细胞释放大量的细胞因子、炎症因子和活性氧等活性物质<sup>[28]</sup>,进而引起气道高反应性,从而加重肺部的感染<sup>[29]</sup>。在实验中通过检测肺组织的病毒滴度,我们发现 RSV 感染的小鼠肺组织中有 RSV 病毒的累积,并出现明显的肺泡壁增厚、水肿、充血和炎性细胞增多等病理改变。因此,抑制病毒在体内的复制,将会有效减轻病毒对肺泡细胞的损伤。我们的实验结果表明,异荭草苷能有效抑制病毒在体内的复制,改善病毒引起的肺泡壁增厚和炎性细胞渗出等病理状态。

因此,体内外的实验证明,异荭草苷能够抑制 RSV 病毒的复制,减少 RSV 在小鼠体内的复制,减弱病毒引起的肺部炎症反应。其初步作用机制是抑制与病毒复制晚期相关的 L 和 P 蛋白的 mRNA 表达。

#### 参考文献

- [1] Lüsebrink J, Schildgen V, Schildgen O. Novel therapies for an old virus: treatment of rsv infections in the 21st century[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009, 7(9): 1125-1129.
- [2] Antonelli G, Turriziani O. Antiviral therapy: old and current issues[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(2): 95-102.
- [3] Beeler JA, Eichelberger MC. Influenza and respiratory syncytial virus ( rsv ) vaccines for infants: safety,

- immunogenicity, and efficacy [J]. *Microb Pathog*, 2013, 55: 9–15.
- [4] Huang K, Incognito L, Cheng X, et al. Respiratory syncytial virus –neutralizing monoclonal antibodies motavizumab and palivizumab inhibit fusion[J]. *J Virol*, 2010, 84(16): 8132–8140.
- [5] Wang Y, Chen M, Zhang J, et al. Flavone c–glycosides from the leaves of *lophatherum gracile* and their in vitro antiviral activity[J]. *Planta Med*, 2012, 78(1): 46–51.
- [6] Zhang J, Wang Y, Zhang XQ, et al. Chemical constituents from the leaves of *lophatherum gracile* [J]. *Chin J Nat Med*, 2009, 7(6): 428–431.
- [7] Douglas JL, Panis ML, Ho E, et al. Small molecules vp–14637 and jnj–2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(6): 2460–2466.
- [8] Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(1): 100–105.
- [9] Carter MC, Alber DG, Baxter RC, et al. 1, 4–benzodiazepines as inhibitors of respiratory syncytial virus[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(7): 2311–2319.
- [10] Wyde PR, Chetty SN, Timmerman P, et al. Short duration aerosols of jnj 2408068 (r170591) administered prophylactically or therapeutically protect cotton rats from experimental respiratory syncytial virus infection[J]. *Antiviral Res*, 2003, 60(3): 221–231.
- [11] Andries K, Moeremans M, Gevers T, et al. substituted benzimidazoles with nanomolar activity against respiratory syncytial virus[J]. *Antiviral Res*, 2003, 60(3): 209–219.
- [12] Mckimm–Breschkin JL. A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus—direct visualization of plaques without immunostaining [J]. *J Virol Methods*, 2004, 120(1): 113–117.
- [13] Ho WS, Xue JY, Sun SS, et al. Antiviral activity of daphnoretin isolated from *wikstroemia indica* [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(5): 657–661.
- [14] Silva IT, Costa GM, Stoco PH, et al. In vitro antiherpes effects of a c –glycosylflavonoid –enriched fraction of *cecropia glaziovii* sneth[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 51(2): 143–148.
- [15] Li Y, But PP, Ooi VE. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *schefflera heptaphylla* (L.) frodin[J]. *Antiviral Res*, 2005, 68(1): 1–9.
- [16] Trasino SE, Kim YS, Wang TT. Ligand, receptor, and cell type–dependent regulation of abca1 and abcg1 mrna in prostate cancer epithelial cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(7): 1934–1945.
- [17] Xu JJ, Wu X, Li MM, et al. Antiviral activity of polymethoxylated flavones from “guangchenpi”, the edible and medicinal pericarps of citrus *reticulata* ‘chachi’ [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(10): 2182–2189.
- [18] Jin Y C, Lin Y, Yuan K. A novel high–performance liquid chromatography fingerprint approach to discriminate *phyllostachys pubescens* from china [J]. *Pharmacogn Magaz*, 2012, 8(29): 42.
- [19] Hasegawa T, Tanaka A, Hosoda A, et al. Antioxidant c –glycosyl flavones from the leaves of *sasa kurilensis* var. *gigantea*[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(6): 1419–1424.
- [20] Cai SQ, Wang R, Yang X, et al. Antiviral flavonoid–type c –glycosides from the flowers of *trollius chinensis* [J]. *Chem Biodivers*, 2006, 3(3): 343–348.
- [21] Li YL, Ma SC, Yang YT, et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *trollius chinensis bunge* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79(3): 365–368.
- [22] Oshima N, Narukawa Y, Takeda T, et al. Collagenase inhibitors from *viola yedoensis*[J]. *J Nat Med*, 2013, 67(1): 240–245.
- [23] Afifi F, Khalil E, Abdalla S. Effect of isoorientin isolated from *arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs[J]. *J Ethnopharmacol*, 1999, 65(2): 173–177.
- [24] Oshansky CM, Zhang W, Moore E, et al. The host response and molecular pathogenesis associated with respiratory syncytial virus infection [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(3), 279–297.
- [25] 张宏坡. 金莲花中荭草苷抗病毒活性及作用机理研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2010:5–49.
- Zhang HP. Study on anti–virus activity and action mechanism of orientin *trollius chinensis* [D]. Herbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2010:5–49.
- [26] Backovic M, Rey FA. Virus entry: old viruses, new receptors[J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(1): 4–13.
- [27] Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years[J]. *Virus Res*, 2011, 162(1): 80–99.
- [28] Van Bleek GM, Osterhaus AD, De Swart RL. Rsv 2010: recent advances in research on respiratory syncytial virus and other pneumoviruses [J]. *Vaccine*, 2011, 29(43): 7285–7291.
- [29] Kruijssen D, Schijf MA, Lukens MV, et al. Local innate and adaptive immune responses regulate inflammatory cell influx into the lungs after vaccination with formalin inactivated rsv [J]. *Vaccine*, 2011, 29(15): 2730–2741.