

DOI:10.13350/j.cjpb.230804

• 论著 •

金丝桃素抗登革病毒活性研究*

黄慧星, 郑学礼**

(南方医科大学公共卫生学院病原生物学系, 广东广州 510515)

【摘要】 目的 研究金丝桃素在细胞水平对 2 型登革病毒复制的抑制效应。方法 使用 MTT 法测定金丝桃素和姜黄素对 BHK-21 细胞的最大无毒剂量;空斑法检测细胞上清液病毒粒子;Western blot 检测登革病毒包膜 E 蛋白的表达情况;实时荧光定量 PCR 检测细胞内病毒 RNA 的复制情况;间接免疫荧光法验证金丝桃素抑制登革病毒包膜 E 蛋白表达的效应。结果 MTT 试验确定 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的金丝桃素和姜黄素对 BHK-21 细胞无毒性作用,所有试验采用最高药物浓度不超过 20 $\mu\text{mol/L}$ 。实时荧光定量 PCR 结果显示金丝桃素和姜黄素均能抑制 DENV-2 RNA 的复制,并且随着药物浓度增加对病毒的抑制作用增强,金丝桃素的半数有效抑制浓度(EC_{50})为 3.544 $\mu\text{mol/L}$ 。空斑试验显示金丝桃素能抑制 DENV-2 病毒粒子的释放;Western blot 显示金丝桃素能够抑制 DENV-2 的包膜 E 蛋白的表达。间接免疫荧光验证药物处理组 DENV-2 的包膜 E 蛋白荧光强度下降。药物预处理试验显示在感染前加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 药物对病毒复制产生抑制作用。不同时间点添加药物对登革病毒复制的早期影响较大,以感染 2~12 h 内添加药物的作用效果更佳;感染后 36h 添加药物组病毒 RNA 的合成与病毒对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 金丝桃素对 2 型登革病毒复制有抑制作用,主要通过影响 RNA 的合成抑制病毒的复制。

【关键词】 金丝桃素;登革病毒;抗病毒药物

【中图分类号】 R373.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)08-0886-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):886-891,898.]

Study on inhibition of the dengue virus by hypericin

HUANG Huixing, ZHENG Xueli (Department of Pathogen Biology, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hypericin on DENV-2 *in vitro*. **Methods** The maximum non-toxic doses of hypericin and curcumin on BHK-21 cells were determined using Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay; The inhibitory effect of hypericin of DENV-2 of cell supernatant viral particles was detected using the plaque assay; Western blot detection of dengue virus envelope E protein expression; The replication of intracellular viral RNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR; Indirect immunofluorescence assay was used to verify the inhibitory effect of hypericin on dengue virus envelope E protein expression. **Results** MTT assay showed that 20 $\mu\text{mol/L}$ hypericin and curcumin had no toxic effect on BHK-21 cells, the maximum drug concentration used in all experiments did not exceed 20 $\mu\text{mol/L}$; Real-time fluorescence quantitative PCR results showed that hypericin and curcumin inhibited DENV-2 RNA replication, with the increase of drug concentration, the inhibitory effect on virus was enhanced. The 50% effective inhibitory concentration (EC_{50}) of Hypericin was 3.544 $\mu\text{mol/L}$; the plaque assay showed that hypericin could inhibit the release of DENV-2 virus particles. Western blot showed that hypericin could inhibit the expression of envelope E protein of DENV-2; indirect immunofluorescence assay showed that the fluorescence intensity of envelope E protein of DENV-2 decreased in the hypericin treatment group. The pretreatment test showed that the addition of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ drugs before infection produced an inhibitory effect on viral replication; The results showed that the addition of hypericin at different times after infection DENV-2 had an effect on RNA synthesis, and the best effect was observed when the drug was added at 2 to 12 hours. When the drug was added at 36 hours after infection, there was no statistical difference in RNA synthesis compared with the virus control group ($P>0.05$). **Conclusion** Hypericin inhibits the replication of dengue virus type 2 *in vitro*.

【Key words】 hypericin and curcumin ; dengue virus; antiviral drug***

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31630011);广州市科技计划项目(No. 201804020084)。

** **【通讯作者】** 郑学礼, E-mail: zhengxueli2001@126.com

【作者简介】 黄慧星(1997-),女,广西桂林人,在读硕士研究生。研究方向:病原生物学。E-mail:19142986332@163.com

DENV 在 1779 年发现于印度尼西亚,1869 年被正式命名为登革热病毒^[1]。登革病毒(Dengue virus, DENV)属于黄病毒科(Flaviviridac)黄病毒属(Flavivirus)^[2]。登革病毒主要由白纹伊蚊或埃及伊蚊叮咬传播,感染可导致登革热(dengue fever, DF),临床症状主要为急性发热和伴有其他亚临床表现,如头痛、全身肌肉酸痛、斑丘疹等,严重者可导致登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF)以及休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)^[3]。DENV 是在全球范围内分布最广、发病率最高的黄病毒,整个赤道沿线范围内的国家和地区全部是 DENV 的流行地带^[4]。研究报道世界上超过五分之二的人口生活在登革热感染的风险中,每年发生 5000 万至 1 亿例感染,同时,感染病例不成比例地分布在地球热带和亚热带地区,如东南亚和拉丁美洲^[5,6]。

DENV 按抗原的不同可分为 DENV-1、DENV-2、DENV-3 和 DENV-4 四个血清型,其中 DENV-2 流行更严重^[7]。病毒核酸为单股正链 RNA,大小在 11kb 左右,5' 端和 3' 端为非编码区,编码区包括一个开放阅读框,编码一个多聚蛋白,包含 3 个结构蛋白(C、prM、E 蛋白)和 7 个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS5)^[8-9]。

蚊媒节肢动物传播的病毒,如 DENV、ZIKV 和基孔肯雅病毒(CHIKV)等人类病原体,在全球传播范围广泛,导致发病率和死亡率升高^[10]。然而,目前尚无高效的广谱抗病毒药物应用于上述病毒感染的治疗。金丝桃素为从天然中草药贯叶连翘植物中提取的萜甙二萜酮化合物,是该植物中最具生物活性的物质^[11]。已有研究报道金丝桃素具有抗病毒、抗炎症、抗肿瘤、抗菌和抗抑郁等生物活性^[12-13]。金丝桃素具有抗多种包膜病毒的作用,而对缺乏膜的病毒无活性^[14]。

本研究通过检测金丝桃素的抗 DENV-2 活性,从细胞层面评价其抗 DENV-2 作用。

材料与方法

1 材料

1.1 化合物和试剂 金丝桃素(Hypericin)和姜黄素(Curcumin)购于美国 MedChemExpress 公司;胎牛血清(FBS)购于上海吉泰依科赛生物有限公司;DENV-2 包膜蛋白 E 抗体(GT643)(cat No. MA5-17291)购于美国 Thermo Fisher 公司;逆转录试剂盒(GoScript™ Reverse Transcription System, cat NO. A5001)购于美国 Promega 公司;荧光定量 PCR 试剂盒(Power Green qPCR Mix((Low ROX+, cat. NO. P2102a)购于广州东盛生物科技有限公司。

1.2 细胞和病毒株 白纹伊蚊细胞系(C6/36 细胞)

和仓鼠肾细胞(BHK-21 细胞)均为本实验室液氮冷冻保存。DENV-2(GenBank:AF038403.1)为本实验室-80 °C 保存。

2 方法

2.1 细胞和病毒的培养 BHK-21 细胞用含 10% 胎牛血清(FBS)、 10^5 U/L 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养;C6/36 细胞用上述培养基于 28 °C 培养箱培养。DENV-2 在 C6/36 细胞内富集扩增,采用空斑法测定病毒滴度。

2.2 MTT 法测定金丝桃素的细胞毒性 将处于对数生长期的 BHK-21 细胞接种至 96 孔板中,调整细胞悬液每孔细胞密度约为 4 000 个。每孔加入 100 μL 含有 10% DMEM FBS 培养基的细胞悬液,四周边缘孔用无菌 PBS 填充。将 96 孔板放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜,待细胞贴壁生长至 80%~90%,弃掉培养基,PBS 清洗。每孔加入用 2% DMEM FBS 培养基稀释至不同浓度(2.5、5、10、20、40、60、80 μmol/L)的金丝桃素 100 μL,每个浓度设 4 个复孔,同时设不加细胞和药物的空白对照组和不加药物的阴性对照组。将 96 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h,每孔加入 90 μL 新鲜不含血清的 DMEM 培养基和 10 μL MTT 溶液,继续培养 4 h,吸去孔内培养液,每孔加入 110 μL Formazan 溶解液,置于摇床上低速震荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪测量各孔 490 nm 处的吸光度 A 值,取 4 孔的均值计算细胞存活率(%). 细胞存活率(%) = $\frac{[A_{490} \text{值(药物处理组)} - A_{490} \text{值(空白对照组)}]}{[A_{490} \text{值(无药物处理组)} - A_{490} \text{值(空白对照组)}]} \times 100\%$ 。对照姜黄素细胞毒性试验的药物浓度和试验方法同金丝桃素。

2.3 观察不同给药金丝桃素时间对 DENV 复制的影响 将 BHK-21 细胞铺与 12 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜,待细胞长至 80% 密度时,弃掉上清,以 MOI=10 的病毒量感染细胞 1 h,用 PBS 清洗各孔 2 次,随后添加浓度为 10 μmol/L 的金丝桃素,在感染完成后的 12、24、48 h 收取细胞总 RNA,分析金丝桃素作用不同时间对 DENV-II RNA 表达的影响。

2.4 观察不同浓度金丝桃素处理对 DENV 复制的影响 将 BHK-21 细胞铺于 12 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜,待细胞长至 80% 密度时,弃掉上清,以 MOI=10 的病毒量感染细胞 1 h,在感染完成后用 PBS 清洗各孔 2 次,随后添加不同浓度(5、10、15、20 μmol/L)的金丝桃素并同时设置仅含细胞的空白对照组(BC)和含有细胞和病毒的阳性对照组(PC),每个组设置 3 个复孔,试验重复 3 次。在感染完成后的 24 h 收取细胞上清和细胞总

RNA 以及细胞总蛋白,按照方法 2.5-2.8 检测金丝桃素对 DENV-II RNA 复制和包膜 E 蛋白表达以及病毒粒子形成的影响。

2.5 观察不同时间点添加药物对病毒复制的影响

为了探索金丝桃素抗病毒作用阶段,用 2 种不同的药物处理方式观察金丝桃素的抗病毒作用效果。(1)感染前处理: BHK-21 细胞先用金丝桃素处理后再感染病毒。将处于对数生长期的 BHK-21 细胞接种到 12 孔板中,待细胞贴壁生长至 80%~90%后弃掉原培养基, PBS 润洗。每孔更换 1 mL 含有不同金丝桃素药物浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 的含双抗 2% FBS DMEM 培养基,并设置加病毒无药物的阳性对照组及不含病毒和药物的阴性对照组,每个处理组设置 3 个复孔。12 孔板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 2 h。用 MOI=10 的 DENV-2 感染 BHK-21 细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 1 h 后, PBS 润洗 2 次。每孔加入 1 mL 新鲜的含双抗 2% FBS DMEM 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱继续培养 24 h, 收样。(2)感染后处理: 将 BHK-21 细胞接种到 12 孔板生长至 80%~90% 时用 MOI=10 的 DENV-2 进行感染, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 1 h。分别在 0、2、4、8、12、24、36 h 添加浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的金丝桃素, 并设置加病毒无药物的阳性对照组和不含病毒和药物的阴性对照组, 每个处理组设置 3 个复孔, 处理完成后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 48 h, 收取样品, 检测病毒复制情况。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测金丝桃素对 DENV-2 RNA 复制的影响

使用 Trizol 法提取细胞 RNA, 逆转录后进行 qRT-PCR 检测。反应体系 (20 μL): 2 \times Power Green Qpcr Mix 10 μL , 上、下游引物各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), cDNA 2 μL , ddH₂O 7.2 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。扩增的目的基因片段为 DENV-2 病毒的 3'-UTR 区域。上游引物: 5'-CCTTACAAATCG-CAGCAAC', 下游引物: 5'-TGGTCTTTC-CCAGCGTCAAT-3'。引物由广州擎科公司合成。根据扩增结果绘制剂量反应曲线, 计算半数有效抑制浓度 (50% effective concentration, EC₅₀)。

2.7 Western blot 检测金丝桃素对 DENV-2E 蛋白表达的抑制作用

提取细胞总蛋白, 使用 10% SDS-PAGE 电泳凝胶分离目的蛋白和内参蛋白并转移至 PVDF 膜, 5% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2h。分别加入 DENV-2E 蛋白抗体 (1 : 5 000) 和 GAPDH 抗体 (1 : 1 000) 一抗, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, PBST 洗膜 3 次。加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 5 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次, 用 ECL 发光液显影。使用 Image-J 软件分析反应条带的灰度值, 计算 E 蛋白的相对表达

量。

2.8 空斑法测定细胞上清液病毒滴度

将 BHK-21 细胞接种于 12 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养过夜, 待细胞长满; 取出冻存的药物处理后细胞上清, 将其梯度稀释后每孔加入 400 μL , 每个浓度设置 2 个复孔, 并设置仅加入 2% DMEM 培养基的阴性对照组, 摇床摇匀 15 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 2 h, 弃上清, PBS 清洗 2 次。每孔加入 1 mL 1.5% 甲基纤维素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养至第 6 d。每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 1 h, 弃掉甲基纤维素和多聚甲醛并清洗。每孔加入 200 μL 0.1% 结晶紫染色, 室温孵育 15 min, 用清水清洗后对空斑进行计数并拍照。

2.9 间接免疫荧光法验证 DENV-2 包膜蛋白 E 的表达情况

将 BHK-21 细胞铺于有细胞爬片的 12 孔板中, 每孔 2×10^6 个细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养过夜, 待细胞长至 80% 密度时, 弃掉上清, 用 MOI=10 的病毒量感染细胞 1 h。感染完成后用 PBS 清洗各孔 2 次, 随后添加浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的金丝桃素, 培 24 h 后弃培养基, 每孔加入 1 mL 的 PBS, 摇床低速润洗细胞, 每次 5 min, 重复 3 次。每孔加入 1 mL 的 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。每孔加入 1 mL 的 PBS, 摇床低速润洗细胞, 每次 5 min, 重复 3 次。每孔加入 300 μL 0.1% 的曲拉通 (Triton) 组织透化液, 室温静置 20 min, 弃液, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。每孔加入 1 mL 的 10% BSA 室温封闭 2 h。加入 DENV-2 的蛋白 E 抗体 (1 : 5 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, PBS 清洗。加入绿色荧光的二抗 (1 : 1 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 清洗。取出爬片, 纯水清洗后放滤纸上避光晾干, 用含 DAPI 的封片剂封片于载玻片上, 采用正置激光共聚焦显微镜进行观察并拍照。

2.10 数据处理

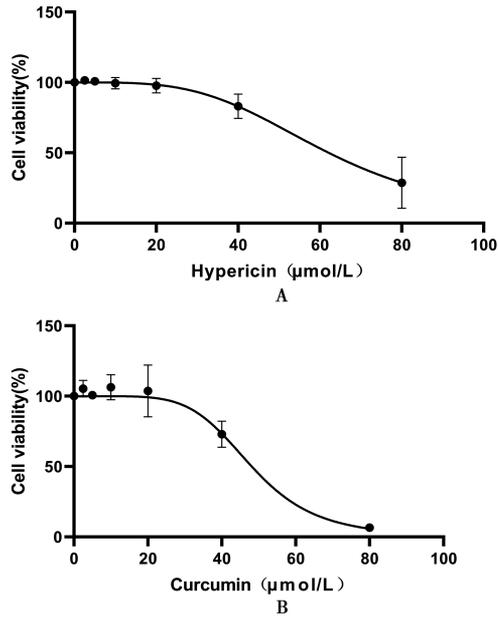
实验数据采用 SPSS21.0 软件进行统计学分析处理, 各处理组均值的比较当方差齐时采用独立样本 *t* 检验或者单因素方差分析, 方差不齐时, 采用 Satterthwaite 近似 *t* 检验或者 Welch 近似方差分析。组间的两两比较进一步采用 Bonferroni 法进行, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义, 图片绘制采用 GraphPad Prism 和 Photoshop。

结 果

1 金丝桃素的细胞毒性

MTT 试验显示, 添加金丝桃素和对照姜黄素 48 h 后, BHK-21 细胞活性均随着药物浓度增加而降低, 其中 20 $\mu\text{mol/L}$ 金丝桃素组的细胞存活率为 (97.70 \pm 5.12)%, 姜黄素组细胞存活率为 (103.75 \pm 18.41)%。所以选取 20 $\mu\text{mol/L}$ 为金丝桃素的最高

试验剂量(图1)。



A 金丝桃素处理组 B 姜黄素处理组对照。

图1 不同浓度金丝桃素对细胞存活率的影响

A Hypericin group B Curcumin group.

Fig. 1 Cell viability of different concentrations of drugs on BHK-21 cell line

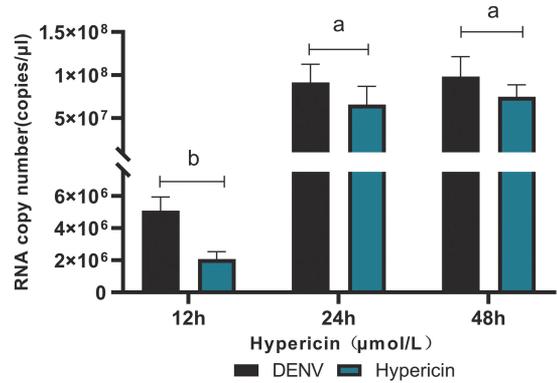
2 不同时间给药金丝桃素对 DENV-2 RNA 复制的影响

在 DENV-2 感染细胞后添加 10 μmol/L 的金丝桃素,分别在添加后的 12、24、48 h 收集 RNA 样品进行检测,观察金丝桃素不同作用时间对登革病毒复制的影响,结果如图 2。金丝桃素作用 12、24、48 h 均能抑制 DENV-2 RNA 复制,与未添加金丝桃素的病毒组相比,差异均具有统计学意义,12 h ($t=9.372, P<0.01$),24 h ($t=2.584, P=0.02$),48 小时 ($t=2.214, P=0.045$)。

3 不同浓度金丝桃素对 DENV-2 RNA 合成的抑制作用

分别用不同浓度的金丝桃素和对照姜黄素处理感染 DENV-2 病毒的细胞,培养 24 h 后收集细胞,检测金丝桃素和姜黄素对 DENV-2 病毒 RNA 的抑制作用。结果显示,金丝桃素对 DENV-2 RNA 拷贝数的抑制呈剂量依赖关系,差异具有统计学意义 ($F=89.617, P<0.01$)。5、10、15、20 μmol/L 金丝桃素处理组与病毒对照组相比拷贝数分别降低 (58.94 ± 14.71)%、(68.31 ± 13.00)%、(79.64 ± 7.08)% 和 (83.95 ± 6.01)% (图 3A),姜黄素处理组 DENV-2 病毒 RNA 的拷贝数分别降低 (60.76 ± 24.78)%、(73.81 ± 13.60)%、(74.33 ± 29.50)% 和 (87.21 ± 5.50)% (图 3B)。两药物的抑制作用效果相似。其中 5 μmol/L 金丝桃素对 DENV-2 的 EC₅₀ 为 3.544

μmol/L。金丝桃素抑制 DENV-2 病毒 RNA 复制效应曲线见图 3C。

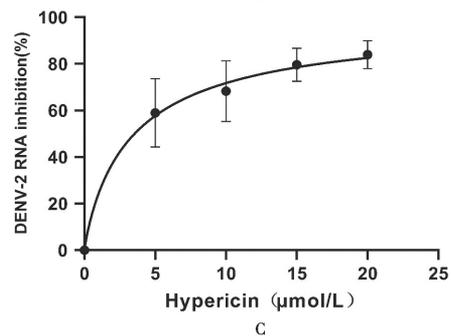
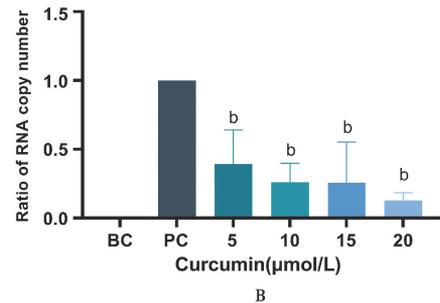
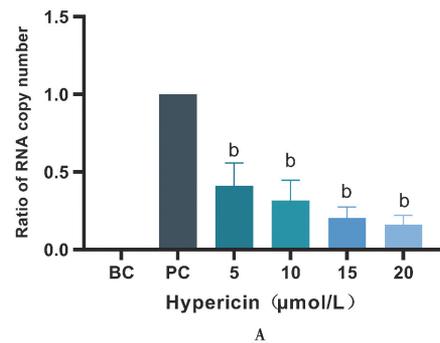


注:组间比较,^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$ 。

图2 金丝桃素作用不同时间对 DENV-2 病毒 RNA 复制的抑制作用

Notes: Comparison with DENV group, ^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$.

Fig. 2 Effect of different time of Hypericin on DENV-2 RNA level



A 金丝桃素处理组 B 姜黄素处理组对照(注:与病毒对照组比较,^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$) C 金丝桃素抑制 DENV-2 病毒 RNA 复制效应曲线。

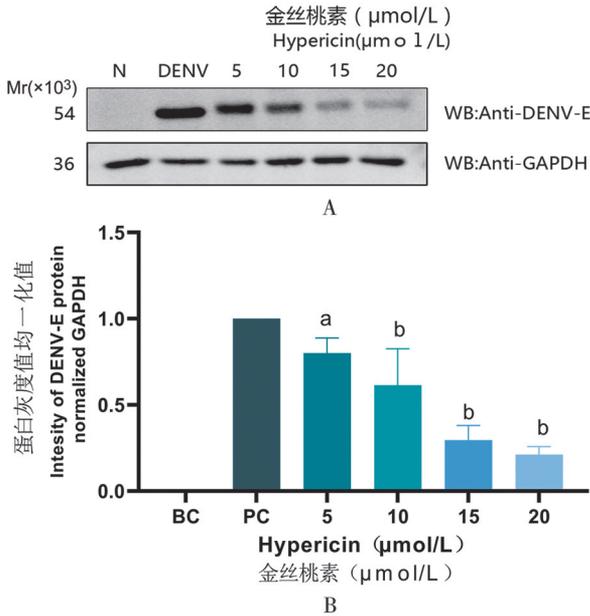
图3 金丝桃素对 DENV-2 病毒拷贝数的抑制作用

A Hypericin group B Curcumin group C Inhibition effect of hypericin of DENV-2 RNA inhibition of hypericin DENV-2 RNA inhibition (Notes: Comparison with DENV group, ^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$)

Fig. 3 Effect of different concentrations of Hypericin and Curcumin on DENV-2 RNA level

4 金丝桃素对 DENV-2 包膜 E 蛋白的抑制作用

感染 DENV-2 的 BHK-21 细胞用不同浓度的金丝桃素处理后提取总蛋白,采用 Western blot 检测 E 蛋白表达量的变化,结果见图 4。金丝桃素能够抑制 DENV-2 E 蛋白的表达,E 蛋白表达量随着药物浓度增加而减弱,金丝桃素各浓度组 E 蛋白表达量与病毒组相比差异均有统计学意义 ($F = 19.079, P < 0.01$) (图 4)。



A DENV-2 E 蛋白 Western blot 检测 B 不同浓度药物组 DENV-2 E 蛋白与相应抗体反应条带的灰度(注:与病毒对照组比较,^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$)。

图 4 金丝桃素对 DENV-2 病毒包膜 E 蛋白表达的抑制作用

A Western blot analysis of hypericin of DENV-2 E protein expression B Intensity analysis of DENV E expression(Notes: Comparison with DENV group, $aP < 0.05$; $bP < 0.01$).

Fig. 4 Effect of different concentrations of hypericin on DENV-2 E protein expression level

5 金丝桃素对 DENV-2 病毒粒子的抑制作用

采用空斑法检测金丝桃素对 DENV-2 完整病毒粒子合成的影响。3 次重复独立试验结果显示,金丝桃素对完整的 DENV-2 病毒粒子的合成具有抑制作用,药物处理后细胞上清 10^{-1} 稀释时,5~20 μmol/L 浓度金丝桃素处理组均未出现空斑,病毒对照组的病毒滴度为 1.825×10^4 PFU/ml(图 5)。

6 免疫荧光法验证金丝桃素对 DENV-2 E 蛋白表达的抑制作用

为了进一步确定金丝桃素对 DENV-2 E 蛋白的抑制作用,使用间接免疫荧光法 (IFA) 检测金丝桃素对 DENV-2 E 蛋白的抑制效果。BHK-21 细胞感染病毒后用 20 μmol/L 的金丝桃素处理,培养 24 h 后收集 BHK-21 细胞,固定后用 DENV-2 E 蛋白单克隆抗体和相应的荧光二抗孵育,用于 DENV-2 E 蛋白的定位

(绿色),再用 DAPI(蓝色)染色细胞核,结果如图 6。金丝桃素处理后的 BHK-21 细胞中 E 蛋白的绿色荧光强度弱于病毒处理组,即 E 蛋白表达受抑制。

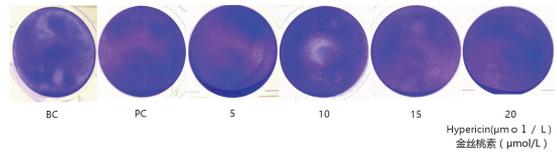


图 5 金丝桃素对 DENV-2 病毒粒子释放的抑制作用
Fig. 5 Effect of different concentrations of Hypericin on DENV-2 virus titer

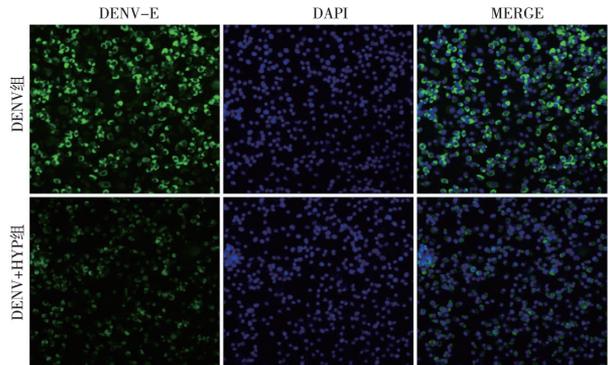


图 6 间接免疫荧光法验证金丝桃素对 DENV-2 E 蛋白表达的抑制作用
Fig. 6 The inhibitory effect of hypericin on E protein expression by indirect immunofluorescence

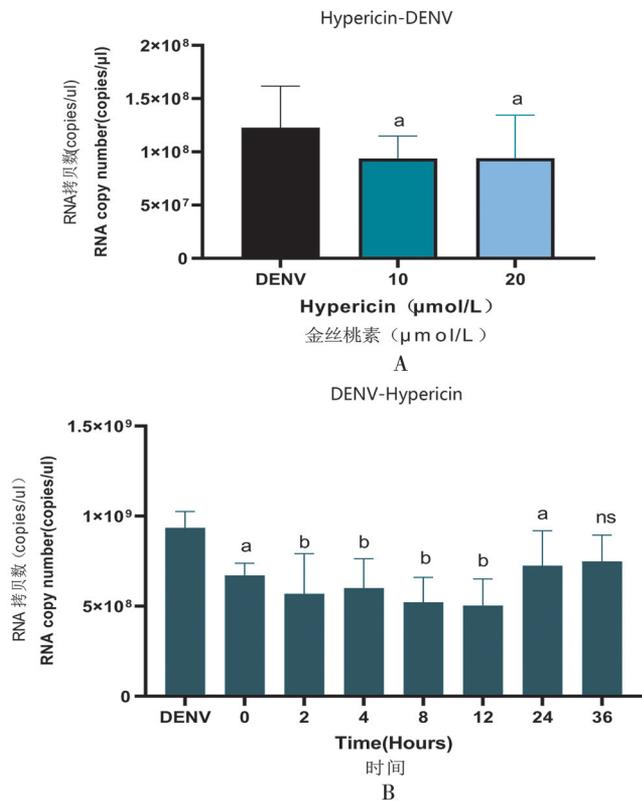
7 不同时间添加金丝桃素对 DENV-2 复制的影响

在 DENV-2 感染前及感染后的不同时间点添加金丝桃素,观察金丝桃素对病毒不同生命周期的影响,结果见图 7。感染前及感染后 0~24 h 添加金丝桃素均能影响病毒 RNA 的合成,以感染后 2~12 h 内添加药物的作用效果较佳。感染后 36h 添加金丝桃素对病毒 RNA 的合成无明显影响。

讨论

蚊媒病毒通过蚊虫叮咬宿主,在宿主和蚊虫之间形成循环传播,传播的病毒可引起多种人类疾病,如脑膜炎、出血热等,增加了全球传染病负担^[15]。蚊媒病毒世界范围广泛流行,是重大的公共卫生问题。传播最广泛的是黄病毒科病毒,其中由伊蚊传播的 DENV 和 ZIKV 在全球分布范围广而倍受关注^[16]。当前登革热的流行对全球公共卫生构成威胁,迫切需要针对登革热的防治采取有效可行的对策,但是临床上目前几乎没有针对登革热的特定抗病毒治疗方法。登革热疫苗的开发由于四种不同血清型经常共循环而变得复杂,理想情况下疫苗必须提供对所有血清型的免疫,这使得登革热疫苗的开发具有挑战性^[17]。ZIKV 是分离自非洲乌干达恒河猴的一种罕见病毒,现已成为许多国家迫切关注的公共卫生问题,许多研究报道

ZIKV 与新生儿小头畸形症和成人 Guillain-Barre 综合征有关,但至今尚无针对 ZIKV 的特异性疫苗或抗病毒药物获批上市^[18]。临床上对 ZIKV 感染主要采取对症治疗^[19],各种抗病毒药物的研究也在进行中,如氯喹、洛伐他汀等已进入临床试验,具有潜在治疗作用^[20-21]。近年来,天然药物化学成分因其作为药物或作为开发新型治疗化合物的潜在价值而逐渐受到重视^[22],如已经发现青蒿素的衍生物青蒿琥酯具有抗 DENV 活性^[23]。从姜科植物根茎中提取的姜黄素具有广泛的药理活性,已有研究报道其具有抗 DENV 和抗 ZIKV 活性^[24-25]。



A 药物预处理组 B 药物后处理组(注:与病毒对照组比较, a P < 0.05; b P < 0.01, ns P > 0.05)

图7 不同时间点添加金丝桃素对 DENV-2 病毒 RNA 合成的影响

A Pre-processing group B Post-processing group(Notes: Comparison with DENV-2 group, a = P < 0.05; b = P < 0.01).

Fig. 7 Effect of time-of-addition assay of Hypericin on DENV-2 RNA level

金丝桃素是从贯叶连翘及金丝桃属植物中提取的具有极强生物活性的一类物质,被鉴定为萘并二蒽酮类化合物,其外观呈针状结晶,多为棕黑色或蓝黑紫黑色,有气味清香,味苦,不溶于水,易溶于吡啶和其他有机碱,溶液呈樱红色^[26]。金丝桃素的诸多活性作用如抗抑郁、抗病毒、抗炎、抗肿瘤被认为主要是通过影响人体的免疫系统来实现的。金丝桃属植物在我国资源丰富,分布广泛。金丝桃素作为一种天然药物在抗炎抗肿瘤抗抑郁等方面具有良好的应用前景,通过进一

步研究金丝桃素的抗病毒机制对于蚊媒病毒的防控具有重要价值。本研究初步证明金丝桃素具有抗 DENV-2 活性作用,即能够抑制 DENV-2 的复制。使用不同浓度的金丝桃素处理细胞,qRT-PCR 定量检测病毒 RNA 拷贝数均有所减少,并且呈现剂量依赖关系,药物浓度越大,抑制效果越好。Western blot 检测显示金丝桃素药物处理组 DENV-2 E 蛋白表达量较病毒组减少。进一步采用间接免疫荧光法验证金丝桃素对 DENV-2 的 E 蛋白的表达有抑制作用,观察到金丝桃素处理组细胞 DENV-2 的 E 蛋白荧光强度弱于病毒处理组。在 DENV-2 感染细胞前使用金丝桃素对细胞进行预处理,同样能够抑制病毒 RNA 的复制,但抑制作用较后处理弱。于 DENV-2 感染后的不同时间给予金丝桃素,结果显示在感染早期添加药物作用较强,在感染 36 h 后添加药物作用效果不明显。

金丝桃素对 DENV-2 的抑制作用,主要通过影响 RNA 的合成抑制病毒的复制,其具体抗病毒作用机制有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever[J]. Clin Microbiol Rev,1998,11(3):480-496.
- [2] Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses[J]. Adv Virus Res,2003,59:23-61.
- [3] Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts[J]. Science,2013,342(6157):415.
- [4] Chatel-Chaix L, Cortese M, Romero-Brey I, et al. Dengue virus perturbs mitochondrial morphodynamics to dampen innate immune responses[J]. Cell Host Microbe,2016,20(3):342-356.
- [5] Wilder-Smith A, Ooi EE, Horstick O, et al. Dengue[J]. Lancet, 2019,393(10169):350-363.
- [6] Dengue-an infectious disease of staggering proportions[J]. Lancet,2013,381(9884):2136.
- [7] Mishra G, Jain A, Prakash O, et al. Molecular characterization of dengue viruses circulating during 2009-2012 in Uttar Pradesh, India[J]. J Med Virol,2015,87(1):68-75.
- [8] Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity[J]. Cell Mol Life Sci,2010,67(16):2773-2786.
- [9] Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, et al. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses[J]. Chem Rev,2018,118(8):4448-4482.
- [10] Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, et al. Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases[J]. Annu Rev Med,2018,69:395-408.
- [11] 编写组编全国中草药汇编. 全国中草药汇编彩色图谱[M]. 人民卫生出版社,1996.

(下转 898 页)

- Health Organization & World Organisation for Animal Health. (2006). Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. [EB/OL]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43597>
- [36] Bruce D. Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever [J]. *Practitioner*, 1887, 39:161-170.
- [37] Dean AS, Crump L, Greter H, et al. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(10):e1865.
- [38] Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature [J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(6):e469-e478.
- [39] 马牧原, 孙维功, 刘艳玲. 中国人群布鲁氏菌病流行病学史及临床表现的系统评价和 meta 分析[J]. *实用预防医学*, 2020, 27(12):1472-1478.
- [40] 吴清民. 动物布鲁氏菌病防控技术研究对策[J]. *兽医导刊*, 2010(03):21-23.
- [41] Mia MM, Hasan M, Pory FS. Occupational exposure to livestock and risk of tuberculosis and brucellosis: A systematic review and meta-analysis [J]. *One Health*, 2022, 15:100432.
- [42] Lai S, Zhou H, Xiong W, et al. Changing epidemiology of human brucellosis, China, 1955-2014 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(2):184-194.
- [43] Jiang H, O'Callaghan D, Ding JB. Brucellosis in China: history, progress and challenge [J]. *Infect Dis Poverty*, 2020, 9:55.
- [44] 刘平, 刘俐君, 刘丽蓉, 等. 羊群布鲁氏菌病传播风险因素 Meta 分析[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(12):33-38.
- 【收稿日期】 2023-03-27 【修回日期】 2023-06-13

~~~~~  
(上接 891 页)

- [12] Galinari CB, Biachi TP, Gon? alves RS, et al. Photoactivity of hypericin: from natural product to antifungal application [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2023, 49(1):38-56.
- [13] Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(2):562-594.
- [14] Zhang Y, Chen H, Zou M, et al. Hypericin inhibit alpha-coronavirus replication by targeting 3CL protease [J]. *Viruses*, 2021, 13(9).
- [15] Santos SH, Da SAB, Boscardin SB. Early dengue virus interactions; the role of dendritic cells during infection [J]. *Virus Res*, 2016, 223:88-98.
- [16] 余茜, 刘建英, 程功. 蚊媒黄病毒传播机制及疫苗与药物研发进展 [J]. *合成生物学*, 2023, 4(2):347-372.
- [17] Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(2):91-101.
- [18] Chan JF, Choi GK, Yip CC, et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease [J]. *J Infect*, 2016, 72(5):507-524.
- [19] Ferraris P, Yssel H, Misse D. Zika virus infection: an update [J]. *Microbes Infect*, 2019, 21(8-9):353-360.
- [20] Tricou V, Minh NN, Van TP, et al. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(8):e785.
- [21] Whitehorn J, Nguyen C, Khanh LP, et al. Lovastatin for the treatment of adult patients with dengue: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62(4):468-476.
- [22] Cordell GA, Colvard MD. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(3):514-525.
- [23] 范培杨, 宋璋瑶, 郑学礼. 青蒿琥酯在细胞水平抑制登革病毒的研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(6):619-623.
- [24] Padilla SL, Rodriguez A, Gonzales MM, et al. Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(3):573-579.
- [25] Kim M, Choi H, Kim YB. Therapeutic targets and biological mechanisms of action of curcumin against Zika virus: In silico and in vitro analyses [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 904:174144.
- [26] 龚宇, 周蕙祯, 江泓, 等. 金丝桃素药理作用以及制备方法研究概况 [J]. *中国民族民间医药*, 2018, 27(15):37-40.
- 【收稿日期】 2023-03-22 【修回日期】 2023-05-30