

山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用

技术领域

本发明属于医药技术领域，具体涉及山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用。

背景技术

动物感染病毒性疾病会造成动物机体生长缓慢，严重者甚至死亡，往往给养殖业带来巨大的经济损失。伪狂犬病毒（PRV）属于疱疹病毒科， α 疱疹病毒亚科，主要在猪上引起伪狂犬病，又被称为奥耶斯基氏病，是危害世界养猪业发展的重大传染性疾病之一。猪是 PRV 的天然宿主，此外该病毒宿主广泛，能够感染大多数哺乳动物甚至包括一些禽类。除猪外，病毒感染的其他动物最后均死亡。目前主要采用疫苗免疫接种的方式防治伪狂犬病。自 2011 年末开始，在国内疫苗免疫的猪场，PRV 变异株引起的伪狂犬病陆续地在超过 15 个省份内爆发，主要以怀孕母猪流产、高于 50% 的新生仔猪死亡率等为特点。临床使用的基因缺失疫苗已经被证实不能对 PRV 变异株的侵染提供足够保护，且如果将该类活疫苗用于其它易感动物，会导致免疫动物死亡。因此，开发新的防控伪狂犬病药物，不仅对于养猪业，而且对于其他畜牧业的发展是一个需要重点突破的重点问题。

山柰酚，属于黄酮类化合物，主要来源于姜科植物山柰（*Kaempferia galanga* L.）的根茎，广泛存在于各种水果和蔬菜中，目前可以通过全合成得到，来源广泛，临床上证实其具有低毒副作用和多种药理活性，包括抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌、抗糖尿病和缓解心血管疾病等，但现有的研究基本局限于将山柰酚和多

种活性成分混合制备成某种保健药品，也有少部分研究将山柰酚用于骨关节炎、抑郁症等治疗药物，目前还没有将其用于抗 PRV 的报道。为了进一步发掘和拓展山柰酚的应用范围，本发明首次将其用于抗伪狂犬病毒的研究。

发明内容

本发明主要通过体外实验和体内实验同时评价山柰酚抗伪狂犬病毒的活性。体外实验主要包括对病毒半数抑制浓度的测定、以及山柰酚对病毒的作用方式和对病毒复制阶段作用时间点的测定等；体内实验以伪狂犬病毒感染小鼠建立动物模型，测定统计存活率、脑组织和肾组织中的病毒滴度等。本发明旨在解决没有抗伪狂犬病毒药物的问题，提供了山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用。本发明的技术方案为：

第一方面，本发明提供了山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用。

进一步的，在抗伪狂犬病毒药物中，山柰酚通过抑制伪狂犬病毒的复制来抗伪狂犬病毒。

第二方面，本发明提供了一种包含山柰酚的抗伪狂犬病毒药物。

本发明具有以下有益效果：

本发明是对山柰酚提供一种作为抗病毒药物的新用途。实验表明：15 μ g/mL 的山柰酚在体外培养细胞 PK-15 (猪肾细胞) 上能有效抑制 PK-15 细胞中的 PRV 的繁殖；240mg/kg 山柰酚能够显著提高伪狂犬病毒感染小鼠的存活率并降低组织中的病毒滴度。

附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限

说明书

定。在附图中：

图 1 为本发明实施例 1 中山柰酚在 PK-15 细胞上对 PRV 的抑制率。

图 2 为本发明实施例 2 中山柰酚在感染量为 MOI=1 时对 PRV 的抑制作用。

图 3 为本发明实施例 3 中山柰酚对病毒复制阶段的抑制作用。

图 4 为本发明实施例 4 中山柰酚对感染伪狂犬病毒的小鼠的存活率。

图 5 为本发明实施例 4 中山柰酚对感染伪狂犬病毒小鼠的脑组织中病毒滴度的影响。

图 6 为本发明实施例 4 中山柰酚对感染伪狂犬病毒小鼠的肾脏组织中病毒滴度的影响。

图 7 为本发明实施例 4 中山柰酚对感染伪狂犬病毒小鼠的肺脏组织中病毒滴度的影响。

具体实施方式

本发明实施例中采用的山柰酚购于美仑生物，纯度为 98%。

本发明实施例中采用的伪狂犬病毒容 A 株（PRV）购自中国兽医典藏微生物中心。

本发明实施例中采用的细胞生长培养液组成为：89%的 DMEM 培养基、10%的胎牛血清和 1%的双抗于无菌环境中配置，存于 4℃冰箱中。

本发明实施例中采用的细胞维持培养液组成为：97%的 DMEM 培养基、2%的胎牛血清和 1%的双抗于无菌环境中配置，存于 4℃冰箱中。

本发明实施例中 FQ-PCR 所使用的探针（探针 5'带有一个荧光基团，3'带有一个荧光淬灭基团）及引物如表 1 所示。

表 1 FQ-PCR 所使用的引物及探针序列

引物及探针	序列（5'→3'）
gB TaqMan 探针	ACGTCATCGTCACGACC

说明书

gB 上游引物

ACAAGTTCAAGGCCACATCTAC

gB 下游引物

GTCYGTGAAGCGGTTTCGTGAT

本发明实施例中的 PRV 稀释液根据病毒原液的半数组织感染量 (TCID₅₀) 及实验具体要求使用细胞维持培养液进行稀释。

本发明实施例中采用的仪器：细胞培养箱 (Thermo)、超净工作台 (苏州净化)、酶标仪 (Bio-Rad)、荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad)。

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合具体的实施例对本发明做进一步详细说明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的，不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

实施例 1

山柰酚基础抗病毒活性的研究

① 山柰酚对 PK-15 细胞毒性研究

以含 1% 乙醇的细胞维持培养液作为溶剂，将山柰酚连续二倍稀释，得到浓度为 60 μ g/mL、30 μ g/mL、15 μ g/mL、7.5 μ g/mL、3.75 μ g/mL 的 5 个浓度梯度的山柰酚稀释液。待 PK-15 细胞长至 80%-90% 时，按如下操作加入药物稀释液和 CCK-8，每组设置 8 个重复：

实验组：将山柰酚梯度稀释液按照 100 μ L/孔依次加入 96 孔板中；

对照组：将细胞维持培养液按照 100 μ L/孔加入 96 孔板中；

空白组：不含细胞以及细胞维持培养液。

说明书

将 96 孔细胞培养板放置于 37℃, 5% CO₂ 中培养 48h。实验组和对照组于避光环境中加入 10μL /孔的 CCK-8, 空白组不加 CCK-8。在 37℃, 5%CO₂ 的培养箱中培养 30min。于 450nm 处检测其吸光度值。按照测定的吸光度值计算抑制率:

抑制率=[(对照孔-试验孔)/(对照孔-空白孔)]×100%, [1]

实验重复 3 次, 取平均值。用 Reed-Muench 法计算药物 CC₅₀ 值, 公式如下:

$S=N-1+(H-R)/(H-L)$, [2]

$CC_{50}=C \times 2^{-S}$, [3]

式[2]和[3]中, N 表示高于 50%抑制率的药物浓度序列号, H 表示高于 50%的抑制率, R 为 50%, L 为低于 50%的抑制率, C 代表序号为 1 的药物实验组药物浓度。通过计算得出山柰酚的 CC₅₀ 值为 36.49μg/mL。

② 山柰酚对 PRV 的半数抑制浓度(IC₅₀)的测定

将山柰酚稀释为 15μg/mL、7.5μg/mL、3.75μg/mL、1.875μg/mL、0.9375μg/mL。

将 PK-15 细胞接种至 96 孔板中, 待其长至 80%-90%, 按如下操作进行实验:

实验组: 将 100 TCID₅₀ 的 PRV 接种于 96 孔板中, 于 37℃, 5%的 CO₂ 中吸附 1h 后, 弃掉 PRV 稀释液, 用 PBS 清洗 3 次, 分别加入 100μL 的 15μg/mL、7.5μg/mL、3.75μg/mL、1.875μg/mL、0.9375μg/mL 山柰酚稀释液, 每个浓度设置 8 个重复;

对照组: 将细胞维持培养液按照 100μL/孔加入 96 孔板中;

空白组: 不含细胞以及细胞维持培养液。

将 96 孔细胞培养板放置于 37℃, 5% CO₂ 中培养 48h。实验组和对照组于避光环境中加入 10μL /孔的 CCK-8, 空白组不加 CCK-8。在 37℃, 5%的培养箱中培养 30min。于 450nm 处检测其吸光度值。按照测定的吸光度值计算抑制率

(同上) 以及 IC_{50} (计算方法同 CC_{50})。实验重复 3 次, 结果取平均值, 并绘制柱状图进行比对, 如图 1 所示, 山柰酚在浓度为 $15\mu\text{g/mL}$ 下, 对病毒的抑制率达到 90%, 抗病毒活性呈剂量依赖性。 IC_{50} 为 $7.81\mu\text{g/mL}$ 。

治疗指数 (Therapeutic index, TI) 可以评价山柰酚对 PRV 的抑制效果是否安全, 计算公式如下:

$$TI = CC_{50} / IC_{50}, [4]$$

山柰酚的治疗指数为 4.67。

实施例 2

山柰酚对大量病毒侵染细胞的保护作用

将 PK-15 细胞接种于细胞六孔培养板中, 加入细胞生长培养液, 待细胞长至 70-80%, 按如下操作处理:

山柰酚组: 将感染复数 (MOI) =1 的病毒液接种于细胞六孔培养板中, 于 37°C 中吸附 1h, 然后移除病毒稀释液, 用 PBS 清洗 2-3 次, 于 37°C , 5% CO_2 中培养 48h。

病毒对照组: 将 MOI=1 的病毒液接种于细胞六孔培养板中, 于 37°C 中吸附 1h, 然后移除病毒稀释液, 用 PBS 清洗 2-3 次, 加入 1mL 细胞维持培养液, 于 37°C , 5% CO_2 中培养 48h。

溶剂对照组: 将 MOI=1 的病毒液接种于细胞六孔培养板中, 于 37°C 中吸附 1h, 然后移除病毒稀释液, 用 PBS 清洗 2-3 次, 加入 1mL 含 1% 无水乙醇的细胞维持培养液, 于 37°C , 5% CO_2 中培养 48h。

将上述培养 48 h 后的细胞培养板从培养箱中取出, PBS 清洗 3 次, 立即提取 DNA, 将提取的 DNA 样品, 利用 TaqMan 探针荧光定量方法检测各样品的

Cq 值，并计算病毒拷贝数。结果如图 2 所示，山柰酚在大量病毒感染下，同样具有良好的抑制 PRV 增殖活性，呈剂量依赖性。在浓度为 15 μ g/mL 时，病毒基因组拷贝数降低了超过 50 倍。

实施例 3

山柰酚对 PRV 不同作用阶段的研究

①山柰酚对 PRV 保护作用的研究

将 PK-15 细胞接种于六孔细胞培养板中，待细胞长至 70%-80% 时，用 PBS 清洗 3 次，按如下方式处理：

山柰酚组：分别加入 1mL 15 μ g/mL 、 7.5 μ g/mL 、 3.75 μ g/mL 的山柰酚稀释液，于 37 $^{\circ}$ C 中吸附 1h。然后移除上清液，用 PBS 清洗 3 次，加入 1mL 200TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液，37 $^{\circ}$ C 吸附 1h。再次移除上清液，加入 1mL 细胞维持培养液，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中培养 48h。

病毒对照组：加入 1mL 细胞维持培养液，于 37 $^{\circ}$ C 中吸附 1h。然后移除上清液，用 PBS 清洗 3 次，加入 1mL 200TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液，37 $^{\circ}$ C 吸附 1h。再次移除上清液，加入 1mL 细胞维持培养液，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中培养 48h。

溶剂对照组：加入含 1% 的无水乙醇的细胞维持培养液，于 37 $^{\circ}$ C 中吸附 1h。然后移除上清液，用 PBS 清洗 3 次，加入 1mL 200 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液，37 $^{\circ}$ C 吸附 1h。再次移除上清液，加入 1mL 细胞维持培养液，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中培养 48h。

② 山柰酚对 PRV 吸附阶段作用的研究

将 PK-15 细胞接种于六孔细胞培养板中，待细胞长至 70%-80% 时，用 PBS

清洗3次，按如下方式处理：

山柰酚组：同时加入 1mL 200 TCID₅₀ 的病毒稀释液和 1mL 相应浓度（30μg/mL、15μg/mL、7.5μg/mL）的山柰酚稀释液，于 4℃ 吸附 1h。然后用预冷的 PBS 清洗 3 次，加入 2mL 细胞维持培养液置于 37℃，5% CO₂ 中培养 48h。

病毒对照组：同时加入 1mL 200 TCID₅₀ 的病毒稀释液和 1mL 细胞维持培养液，于 4℃ 吸附 1h。然后用预冷的 PBS 清洗 3 次，加入 2mL 细胞维持培养液置于 37℃，5% CO₂ 中培养 48h。

溶剂对照组：同时加入 1mL 200 TCID₅₀ 的病毒稀释液和 1mL 含 1% 的无水乙醇的细胞维持培养液于 4℃ 吸附 1h。然后用预冷的 PBS 清洗 3 次，加入 2mL 细胞维持培养液置于 37℃，5% CO₂ 中培养 48h。

③山柰酚对 PRV 穿入阶段作用的研究

将 PK-15 细胞接种于六孔细胞培养板中，待细胞长至 70%-80% 时，用 PBS 清洗 3 次，按如下方式处理：

山柰酚组：加入 1mL 200 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液于 4℃ 吸附 1h，然后用预冷的 PBS 清洗 2-3 次，加入 2mL 相应浓度的山柰酚（15μg/mL、7.5μg/mL、3.75μg/mL），于 37℃，5% CO₂ 中培养 1h。然后弃去药液并用 PH=3 的柠檬酸钠缓冲溶液清洗 2-3 次，加入 2mL 细胞维持培养液，置于 37℃，5% CO₂ 中培养 48h。

病毒对照组：加入 1mL 200 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液于 4℃ 吸附 1h，然后用预冷的 PBS 清洗 2-3 次，加入 2mL 细胞维持培养液，于 37℃，5% CO₂ 中培养 1h。然后弃去药液用 PH=3 的柠檬酸钠缓冲溶液清洗 2-3 次，加入 2mL 细胞维持培养液，置于 37℃，5% CO₂ 中培养 48h。

溶剂对照组：加入 1mL 200 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液

于 4℃ 吸附 1h，然后用预冷的 PBS 清洗 2-3 次，加入 2mL 含 1% 无水乙醇的细胞维持培养液，于 37℃，5% CO₂ 中培养 1h。然后弃去药液用 PH=3 的柠檬酸钠缓冲溶液清洗 2-3 次，加入 2mL 细胞维持培养液，置于 37℃，5% CO₂ 中培养。

④ 山柰酚对 PRV 复制阶段作用的研究

将 PK-15 细胞接种于六孔细胞培养板中，待细胞长至 70%-80% 时，用 PBS 清洗 3 次，按如下方式处理：

山柰酚组：加入 1mL 200 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液于 37℃ 吸附 1h 后移除病毒液，用 PBS 清洗 3 次，加入相应浓度的山柰酚稀释液（15μg/mL、7.5μg/mL、3.75μg/mL），置于 37℃，5%CO₂ 中培养 48h。

病毒对照组：加入 1mL 200 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液于 37℃ 吸附 1h 后移除病毒液，用 PBS 清洗 3 次，加入 2mL 细胞维持培养液，置于 37℃，5%CO₂ 中培养 48h。

溶剂对照组：加入 1mL 200 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液和 1mL 细胞维持培养液于 37℃ 吸附 1h 后移除病毒液，用 PBS 清洗 3 次，加入 1mL 含 1% 无水乙醇的细胞维持培养液，置于 37℃，5%CO₂ 中培养 48h。

将上述①、②、③、④中培养 48 h 后的细胞培养板从培养箱中取出，用 PBS 清洗 3 次，按照山柰酚对大量病毒侵染细胞的保护作用中所述方法并计算病毒拷贝数，用以判断不同处理方式下，PRV 在 PK-15 细胞中的生长情况。结果表明，山柰酚仅对病毒感染的复制阶段有明显抑制作用，对病毒感染的吸附和穿入阶段无作用，对细胞没有保护作用。如图 3 所示，当在病毒复制阶段加入山柰酚时，病毒复制被抑制了近 30 倍。

实施例 4

山柰酚在小鼠体内抑制伪狂犬病毒活性研究

① 药液:

山柰酚和阿昔洛韦分别混悬于 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液, 配置成;

山柰酚高剂量组: 39mg/mL;

山柰酚中剂量组: 26mg/mL;

山柰酚低剂量组: 13mg/mL;

阿昔洛韦组: 26mg/mL。

② 病毒稀释液:

将病毒原液用生理盐水稀释为 $2 \times 10^4 \text{TCID}_{50}$ 。

将 120 只 SPF 级小鼠 (体重 $20\text{g} \pm 2\text{g}$, 雌雄各半) 随机分为 6 组, 分别为山柰酚高、中、低剂量组、阳性药物 (阿昔洛韦) 对照组、空白组和模型组。除空白组小鼠以外, 各组小鼠通过腹腔注射 0.1mL 的 $2 \times 10^4 \text{TCID}_{50}$ 的 PRV; 攻毒 2h 后, 药物组 (高剂量、中剂量、低剂量) 小鼠分别按照 240mg/kg、160 mg/kg、80 mg/kg 的规格灌服山柰酚溶液, 空白组和模型组分别给予同体积的生理盐水和 0.5% 羧甲基纤维素钠溶剂。攻毒后, 统计每天的小鼠存活率, 并通过实时荧光定量 PCR 技术检测小鼠脑组织和肾脏中的病毒滴度。结果显示, 存活率见图 4, 在感染病毒后第 5 天, 山柰酚高剂量组小鼠存活率为 38.10%, 阳性药物组小鼠存活率为 28.57%, 模型组小鼠存活率为 19.05%。说明山柰酚能提高病毒感染小鼠的存活率且其抗 PRV 的活性大于阿昔洛韦。脑组织和肾脏组织的病毒滴度的含量分别见图 5 和图 6。由图可知, 与病毒对照组的小鼠脑组织病毒拷贝数相比, 山柰酚组在感染病毒后第 3、4、5 天显著降低 ($P < 0.05$), 在感染后第 5 天时, 山柰酚高剂量组中脑组织病毒滴度拷贝数相对于模型组降低了超过 360 倍; 与阿昔洛韦阳性对照组相比, 山柰酚组的脑组织病毒拷贝数有所下降, 但不显著 ($P > 0.05$)。与病毒对照组相比, 在感染病毒后第 3 天, 山柰酚和阿昔洛

说明书

韦均显著降低肾脏的病毒拷贝数 ($P<0.05$)；在感染病毒后的第 4 天和第 5 天，与病毒对照组相比，山柰酚低剂量组降低了病毒拷贝数 ($P>0.05$)。在感染病毒后的第 3 天、第 4 天和第 5 天，与病毒对照组相比，山柰酚组均降低了小鼠肺脏的病毒拷贝数。在感染病毒后的第 5 天，与病毒组小鼠肺脏病毒拷贝数相比，山柰酚低剂量组的病毒拷贝数下降了近 10 倍 ($P<0.05$)。

综上所述，本发明发掘出山柰酚作为抗伪狂犬病毒药物的一种新用途。因此可用作制备抗伪狂犬病毒药物。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。