



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110934862 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 202010001767.1

(22)申请日 2020.01.02

(71)申请人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路  
211号

(72)发明人 宋旭 陈旭 殷中琼 贾仁勇

(74)专利代理机构 成都天汇致远知识产权代理  
事务所(普通合伙) 51264

代理人 韩晓银

(51)Int.Cl.

A61K 31/352(2006.01)

A61P 31/22(2006.01)

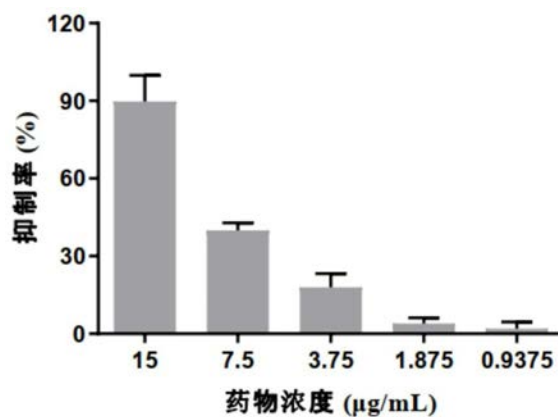
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

### (54)发明名称

山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用

### (57)摘要

本发明提供了一种山柰酚作为抗病毒药物的新用途,即山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用。实验表明:15  $\mu$ 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。因此可用作制备抗伪狂犬病毒药物。



1. 山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于: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。
3. 一种包含山柰酚的抗伪狂犬病毒药物。

## 山柰酚在抗伪狂犬病毒药物中的应用

### 技术领域

[0001] 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

[0002] 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,  $\alpha$  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。

[0003] 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

[0004] 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:

[0005] 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。

[0006] 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。

[0007] 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。

[0008] 本发明具有以下有益效果:

[0009] 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  $\mu$ 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

[0010] 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定。在附图中:

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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

[0018] 本发明实施例中采用的山柰酚购于美仑生物,纯度为98%。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 表1 FQ-PCR所使用的引物及探针序列

| [0024] | 引物及探针        | 序列 (5'→3')             |
|--------|--------------|------------------------|
|        | gB TaqMan 探针 | ACGTCATCGTCACGACC      |
|        | gB 上游引物      | ACAAGTTCAAGGCCACATCTAC |
| [0025] | gB 下游引物      | GTCYGTGAAGCGGTTTCGTGAT |

[0026] 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(TCID<sub>50</sub>)及实验具体要求使用细胞维持培养液进行稀释。

[0027] 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)。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 实施例1

[0031] 山柰酚基础抗病毒活性的研究

[0032] ①山柰酚对PK-15细胞毒性研究

[0033] 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  $\mu\text{g/mL}$ 、30  $\mu\text{g/mL}$ 、15  $\mu\text{g/mL}$ 、7.5  $\mu\text{g/mL}$ 、3.75  $\mu\text{g/mL}$ 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:

[0034] 实验组:将山柰酚梯度稀释液按照100  $\mu\text{L}$ /孔依次加入96孔板中;

[0035] 对照组:将细胞维持培养液按照100  $\mu\text{L}$ /孔加入96孔板中;

[0036] 空白组:不含细胞以及细胞维持培养液。

[0037] 将96孔细胞培养板放置于37 $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 中培养48h。实验组和对照组于避光环境中加入10  $\mu\text{L}$ /孔的CCK-8,空白组不加CCK-8。在37 $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 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:

[0038] 抑制率 =  $[(\text{对照孔} - \text{试验孔}) / (\text{对照孔} - \text{空白孔})] \times 100\%$ , [1]

[0039] 实验重复3次,取平均值。用Reed-Muench法计算药物 $\text{CC}_{50}$ 值,公式如下:

[0040]  $S = N - 1 + (H - R) / (H - L)$ , [2]

[0041]  $\text{CC}_{50} = C \times 2^{-S}$ , [3]

[0042] 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 $\text{CC}_{50}$ 值为36.49  $\mu\text{g/mL}$ 。

[0043] ②山柰酚对PRV的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )的测定

[0044] 将山柰酚稀释为15  $\mu\text{g/mL}$ 、7.5  $\mu\text{g/mL}$ 、3.75  $\mu\text{g/mL}$ 、1.875  $\mu\text{g/mL}$ 、0.9375  $\mu\text{g/mL}$ 。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:

[0045] 实验组:将100 $\text{TCID}_{50}$ 的PRV接种于96孔板中,于37 $^{\circ}\text{C}$ ,5%的 $\text{CO}_2$ 中吸附1h后,弃掉PRV稀释液,用PBS清洗3次,分别加入100  $\mu\text{L}$ 的15  $\mu\text{g/mL}$ 、7.5  $\mu\text{g/mL}$ 、3.75  $\mu\text{g/mL}$ 、1.875  $\mu\text{g/mL}$ 、0.9375  $\mu\text{g/mL}$ 山柰酚稀释液,每个浓度设置8个重复;

[0046] 对照组:将细胞维持培养液按照100  $\mu\text{L}$ /孔加入96孔板中;

[0047] 空白组:不含细胞以及细胞维持培养液。

[0048] 将96孔细胞培养板放置于37 $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 中培养48h。实验组和对照组于避光环境中加入10  $\mu\text{L}$ /孔的CCK-8,空白组不加CCK-8。在37 $^{\circ}\text{C}$ ,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 $\text{IC}_{50}$ (计算方法同 $\text{CC}_{50}$ )。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。 $\text{IC}_{50}$ 为7.81  $\mu\text{g/mL}$ 。

[0049] 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:

[0050]  $\text{TI} = \text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$ , [4]

[0051] 山柰酚的治疗指数为4.67。

[0052] 实施例2

[0053] 山柰酚对大量病毒侵染细胞的保护作用

[0054] 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:

[0055] 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℃中吸附1h,然后移除病毒稀释液,用PBS清洗2-3次,于37℃,5%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0056] 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℃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℃,5%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0057] 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℃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℃,5%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0058] 将上述培养48h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C<sub>q</sub>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15μg/mL时,病毒基因组拷贝数降低了超过50倍。

[0059] 实施例3

[0060] 山柰酚对PRV不同作用阶段的研究

[0061] ①山柰酚对PRV保护作用的研究

[0062] 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:

[0063] 山柰酚组:分别加入1mL 15μg/mL、7.5μg/mL、3.75μg/mL的山柰酚稀释液,于37℃中吸附1h。然后移除上清液,用PBS清洗3次,加入1mL 200TCID<sub>50</sub>的PRV稀释液和1mL细胞维持培养液,37℃吸附1h。再次移除上清液,加入1mL细胞维持培养液,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0064] 病毒对照组:加入1mL细胞维持培养液,于37℃中吸附1h。然后移除上清液,用PBS清洗3次,加入1mL 200TCID<sub>50</sub>的PRV稀释液和1mL细胞维持培养液,37℃吸附1h。再次移除上清液,加入1mL细胞维持培养液,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0065] 溶剂对照组:加入含1%的无水乙醇的细胞维持培养液,于37℃中吸附1h。然后移除上清液,用PBS清洗3次,加入1mL 200TCID<sub>50</sub>的PRV稀释液和1mL细胞维持培养液,37℃吸附1h。再次移除上清液,加入1mL细胞维持培养液,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0066] ②山柰酚对PRV吸附阶段作用的研究

[0067] 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:

[0068] 山柰酚组:同时加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0069] 病毒对照组:同时加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0070] 溶剂对照组:同时加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0071] ③山柰酚对PRV穿入阶段作用的研究

[0072] 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:

[0073] 山柰酚组:加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0074] 病毒对照组:加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0075] 溶剂对照组:加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养。

[0076] ④山柰酚对PRV复制阶段作用的研究

[0077] 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:

[0078] 山柰酚组:加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0079] 病毒对照组:加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0080] 溶剂对照组:加入1mL 200TCID<sub>50</sub>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%CO<sub>2</sub>中培养48h。

[0081] 将上述①、②、③、④中培养48h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。

[0082] 实施例4

[0083] 山柰酚在小鼠体内抑制伪狂犬病毒活性研究

[0084] ①药液:

[0085] 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;

[0086] 山柰酚高剂量组:39mg/mL;

[0087] 山柰酚中剂量组:26mg/mL;

[0088] 山柰酚低剂量组:13mg/mL;

[0089] 阿昔洛韦组:26mg/mL。

[0090] ②病毒稀释液:

[0091] 将病毒原液用生理盐水稀释为 $2 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>。

[0092] 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 $2 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>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、160mg/kg、80mg/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( $P < 0.05$ )。

[0093] 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。

[0094] 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。

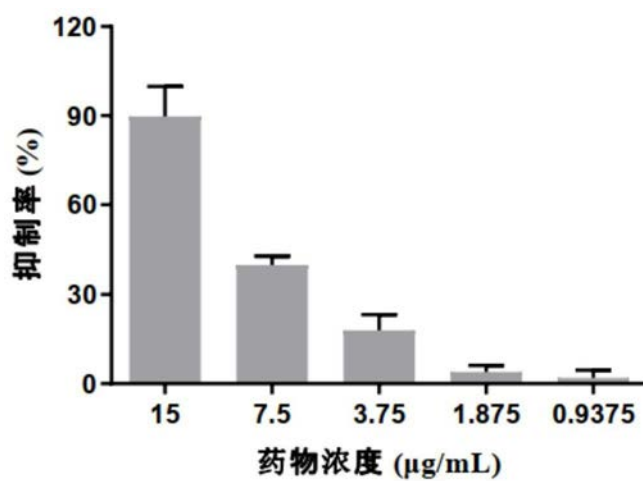


图1

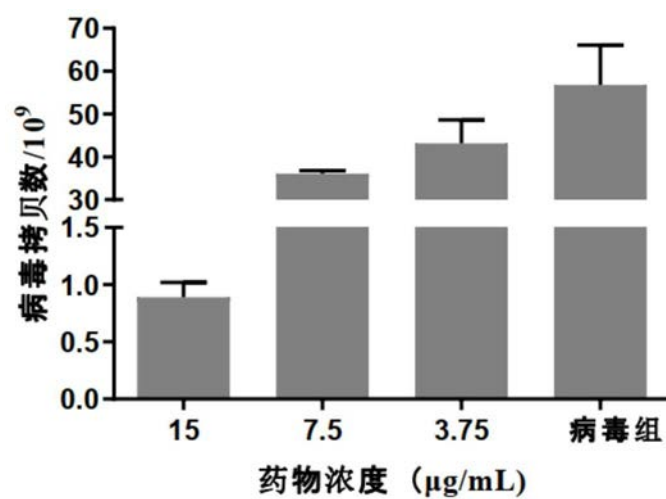


图2

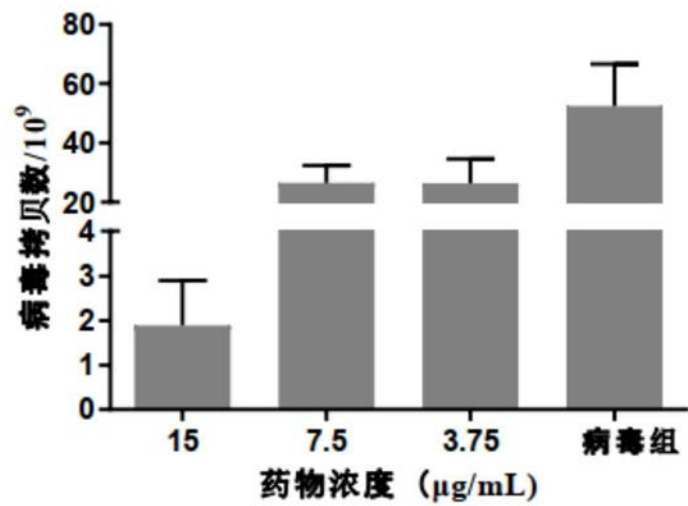


图3

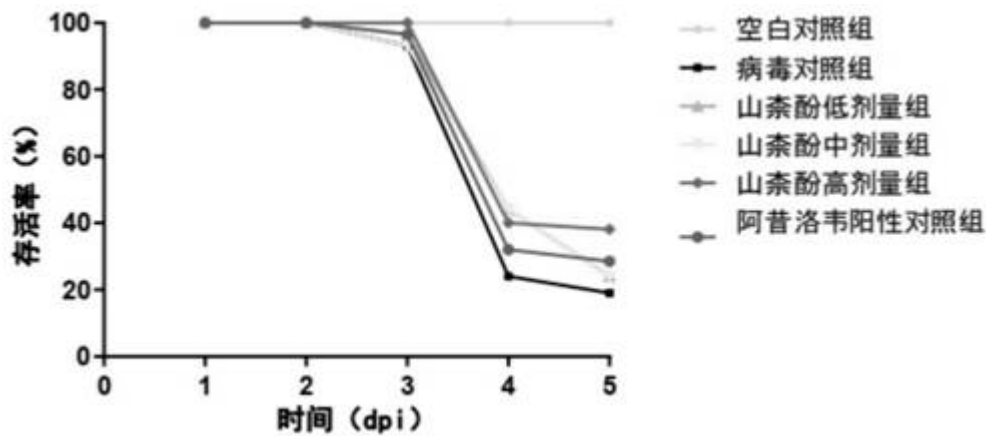


图4

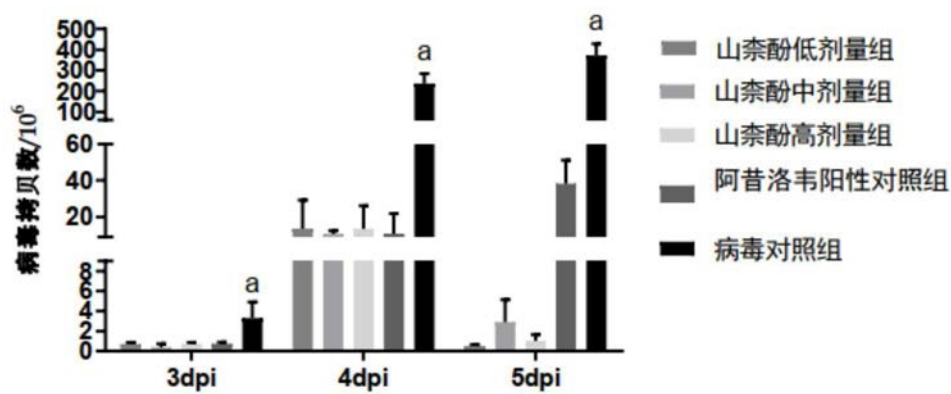


图5

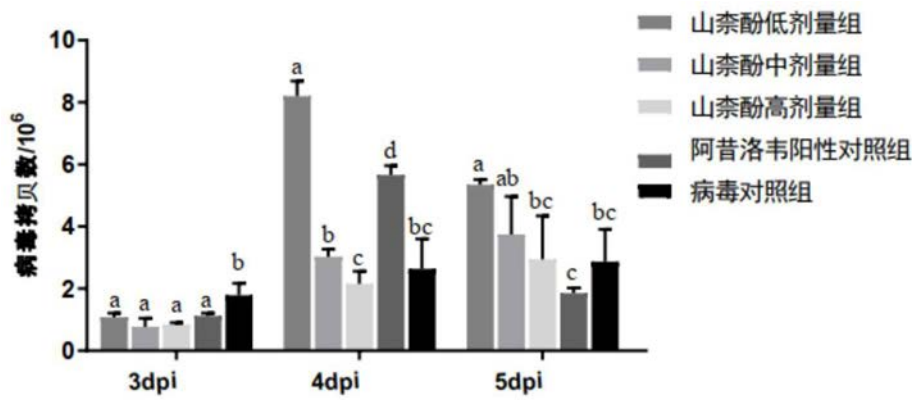


图6

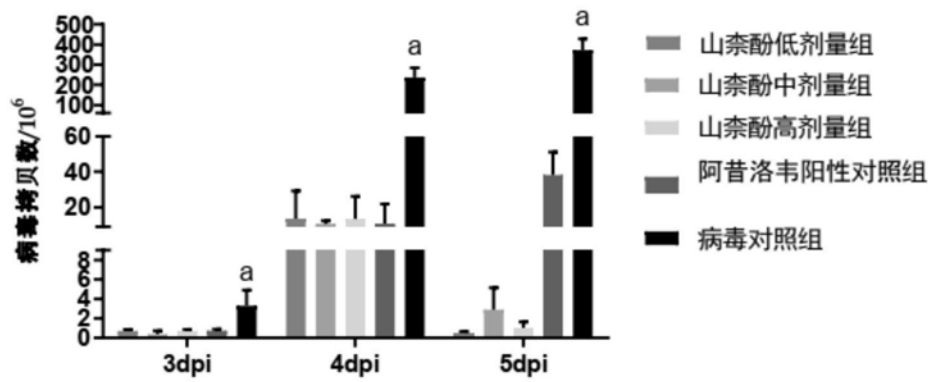


图7