

复方苦芩总生物碱保护 F81 细胞免受 犬细小病毒损伤作用的探究^①

邵秋红, 朱买勋, 朱兆荣, 罗艺晨, 刘娟, 薛新芳

西南大学(荣昌校区) 动物医学系, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为了探讨中药复方苦芩总生物碱(Total Alkaloids in Kuqin Compound, TAKC)保护 F81 细胞免受犬细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)损伤的作用机理, 用 CPV 感染 F81 细胞, 选择不同浓度的 TAKC 进行体外抗 CPV 感染 F81 细胞试验, 采用琥珀酸脱氢酶活力测定法检测 TAKC 对 F81 细胞的保护率, 用 RT-PCR 法检测 TAKC 处理对感染 CPV 的 F81 细胞中 caspase-3 基因 mRNA 表达水平的影响. 结果显示, TAKC 对 F81 细胞有保护作用, 在整个病毒复制过程中(直接灭活作用、阻滞作用、吸附抑制作用、穿入抑制作用和复制抑制作用)均有明显的影响, 其中阻滞作用、穿入抑制作用和复制抑制作用效果最明显, 对细胞的保护率分别能达到 31.19%, 20.54%, 32.28%. 同时使感染 CPV 的 F81 细胞的 caspase-3 基因表达水平显著降低($p < 0.01$), 表达水平与模型组的比值为 1:1.818. 因此, 推测 TAKC 可通过阻滞抑制、穿入抑制和 DNA 复制抑制 CPV 感染 F81 细胞和降低 F81 细胞中 caspase-3 基因表达水平, 起到保护 F81 细胞免受 CPV 损伤的作用.

关键词: 复方苦芩总生物碱; 犬细小病毒; F81 细胞; 抗损伤

中图分类号: S852.65⁺5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)09-0011-08

犬细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)属细小病毒科, 细小病毒属, 是一种自主复制的病毒, 核酸结构为单链 DNA^[1], 可引起犬细小病毒病, 幼犬感染率可达 100%, 死亡率达 10%~50%^[2]. 病毒对宿主细胞的入侵分为黏附、穿入、脱衣壳、复制、衣壳蛋白合成以及释放等环节^[3], 药物可把病毒复制周期中的任何一个环节作为作用的靶位, 如直接接触灭活病毒, 阻滞与细胞的吸附和穿入, 干扰病毒核酸复制及生物合成或抑制病毒的装配、成熟、释放, 从而达到抗病毒效果^[1]. 细胞凋亡是细胞内在有规律的机制引起的, 它可由细胞内部因素和外部刺激所诱导, 凋亡的发生与基因调节有关, 称为程序性细胞死亡^[4]. 资料显示^[5], 体外 CPV 感染猫肾细胞和犬纤维瘤细胞可以引起细胞凋亡, 而大部分感染 CPV 的 F81 细胞(猫肾细胞) caspase-3 活性都远远高于对照细胞. 复方苦芩是根据中兽医理论和临床辩证论治的原则, 选用由苦参、黄芩、白头翁、黄芪、金银花等组成的中药复方, 方中黄芪益卫固表治其本、黄芩清热燥湿, 泻火解毒, 苦参清热燥湿, 全方具有理气健脾、利水渗湿、解毒止痢之功效. 前期研究表明, 复方苦芩能提高动物免疫力^[6-7], 具有保护肠粘膜^[8], 保护心肌等^[9-13]作用; 中药中总生物碱具有明显的生物学活性, 许多生物碱类成分具有抗病毒的成分^[14]. 故本试验通过对 CPV 敏感的 F81 猫肾细胞进行体外试验, 探讨 TAKC 保护 F81 细胞免受犬细小病毒损伤的作用, 为利用 TAKC 防治犬细小病毒病提供理论依据.

① 收稿日期: 2013-11-21

基金项目: 国家自然科学基金资助(31172357); 国家公益(农业)科技专项经费资助(20130304-05).

作者简介: 邵秋红(1988-), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事方向新中兽药及药理毒理学研究.

通信作者: 刘娟, 教授.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞和病毒

细胞: F81(中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞所, 编号: KCB2006104YJ); 病毒: 犬细小病毒(CPV, 四川农业大学彭广能教授惠赠, 西南大学荣昌校区中药研究与开发室留存)。

1.1.2 试验药品

复方苦芩和 TAKC 提取液质量浓度均为 1 g/mL 生药(西南大学荣昌校区中药研究与开发室研发, 由黄芩、苦参等中药组成, 重庆天龙牧业科技有限公司试制), 黄芪多糖注射液(重庆天龙牧业科技有限公司, 20120318)。

1.1.3 主要试剂及配制方法

DMEM 营养液(Gibco, c11995500BT)、0.25%胰酶(Gibco, 25200-056)、小牛血清、MTT(上海生工生物工程技术服务有限公司, LJ0901B8011Z)、二甲基亚砜(上海生工生物工程技术服务有限公司, 20110528), Trizol(上海生工生物工程技术服务有限公司), PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(宝生物工程(大连)有限公司), SYBR Premix Ex Taq™ II(宝生物工程(大连)有限公司)。

营养液 A: 配制含 10% 小牛血清的 DMEM 营养液; 营养液 B: 为 2% 小牛血清 DMEM 营养液; 药物营养液: 将试验用药物用含 0.5% 血清 DMEM 营养液分别配制成所需的质量浓度, 超净工作台用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 分装、密封, 于 4 °C 下保存备用。

1.1.3 主要仪器和设备

Model 680 酶标仪(Bio-Rad Laboratories), SE-2000 型 Nikon 倒置显微镜(日本 Nikon 公司), 3111 型隔水式二氧化碳培养箱(Thermo Electron Corporation USA), SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司), MM-I 型微震荡器(上海医用分析仪厂)。

1.2 CPV 半数组织细胞感染量(TCID₅₀)和药物最大无毒质量浓度测定

参考文献[15]的方法测定 TCID₅₀, 采用 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。参考文献[16]方法测定药物最大无毒质量浓度, 各试验组结果与空白对照比较, *t* 检验, 差异不显著的最大药物质量浓度为最大无毒质量浓度。

1.3 TAKC 保护 F81 细胞免受 CPV 损伤作用试验

1.3.1 试验分组

将 96 孔培养板中长满的单层细胞分为空白组(不作任何处理)、病毒组(只感染病毒)、阳性药物组(根据前期预实验结果, 进行感染病毒并用含 10⁻⁵ g/mL 黄芪多糖药物营养液处理)、复方苦芩组(根据前期预实验结果, 进行感染病毒并用药质量浓度为 10⁻⁴ g/mL 复方苦芩药物营养液处理), TAKC 1~5 组(根据 TAKC 对 F81 最大无毒质量浓度测定结果, 进行感染病毒并用药质量浓度为 10⁻⁴~10⁻⁸ g/mL TAKC 药物营养液处理)每组 6 个重复孔, 重复 3 次。

1.3.2 TAKC 对病毒的直接灭活作用

参考文献[17-18]取 100 TCID₅₀ 的 CPV 病毒液与不同质量浓度药液营养液等体积混合, 37 °C 作用 90 min 后超速离心去除中药成分, 沉淀用 PBS 洗涤后再超速离心沉淀病毒颗粒。病毒沉淀以营养液 B 重悬, 接种至单层 F81 细胞的 96 孔板中, 培养 24~72 h, 逐日观察细胞病变(CPE)。

1.3.3 TAKC 预处理细胞对病毒的阻滞作用

参考文献[18]将 F81 单层细胞用含不同质量浓度中药成分的培养液培养 3 d, 弃培养液, PBS 充分洗细胞后加 100 TCID₅₀ 的 CPV 病毒液 100 μL 接种, 37 °C 孵育 1 h, 用 PBS 清洗以去除未吸附的病毒, 加入营养液 B 培养 24~72 h, 逐日观察病变(CPE)。

1.3.4 TAKC 对病毒吸附细胞的抑制作用

参照文献[17—18]不同质量浓度含药培养液分别接入已长满单层细胞的 96 孔板内,每孔 100 μL,37 ℃ 孵育 2 h 后,弃药液,再接入 100 TCID₅₀ 病毒液每孔 100 μL,37 ℃ 孵育 2 h. 用 PBS 洗单层细胞,去除未吸附的病毒和中药成分,加入营养液 B 培养 24~72 h,每日观察病变(CPE).

1.3.5 TAKC 对病毒穿入的抑制作用

参照文献[17—18]将单层的 F81 细胞接种 CPV 病毒液,置 4 ℃ 吸附 1 h,用 PBS 洗单层细胞,去除未吸附的病毒. 吸附病毒的细胞分别用含不同质量浓度中药成分的培养液 37 ℃ 培养 0,15,30,60 min 后加入蛋白酶 K(0.5 mg/mL)反应 20 min,用 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟(PMSF)终止反应,用 PBS 洗单层细胞 2 次,加入营养液 B 培养 24~72 h,逐日观察病变(CPE).

1.3.6 TAKC 对病毒复制的抑制作用

参照文献[17—18]以 100 TCID₅₀ 的 CPV 病毒液感染形成单层的 F81 细胞,每孔 100 μL,37 ℃ 孵育 2 h 后弃病毒液,用 PBS 洗单层细胞,将感染细胞在不同的药物质量浓度下培养 24~72 h,逐日观察病变(CPE).

1.3.7 细胞保护率测定

参照文献[19],采用琥珀酸脱氢酶活力测定法(MTT 法)进行测定. 取出 96 孔板,弃营养液,加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h 后取出,将孔内液体吸弃,再加入 100 μL DMSO,置微量振荡器上振荡 10 min,用酶标仪,波长 490 nm,测吸光值(OD),结果用细胞保护率表示.

细胞保护率 = (试验组 OD 值 - 病毒组 OD 值) / (空白组 OD 值 - 病毒组 OD 值) × 100%

细胞损伤率 = (空白组 OD 值 - 病毒组 OD 值) / 空白组 OD 值 × 100%

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 F81 细胞中 caspase-3 mRNA 表达

1.4.1 试验分组及处理

F81 细胞培养于 6 孔板,分组同试验 1.3.1, TAKC 组用药质量浓度为 10⁻⁵ g/mL,每组 3 个重复孔. 不同质量浓度含药培养液分别接入已长满单层细胞的 6 孔板内,37 ℃ 孵育 2 h 后,弃药液,再接入 100 TCID₅₀ 病毒液,37 ℃ 孵育 2 h. 用 PBS 洗单层细胞,将感染细胞在不同的药物质量浓度下继续培养 72 h 后,消化下来,离心收集细胞,存于-80 ℃.

1.4.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

参照 Trizol 试剂盒提取 F81 细胞总 RNA. 通过普通琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性,用紫外分光光度计测定 RNA 的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,检测 RNA 的纯度. 并反转录成 cDNA,于-20 ℃ 保存待测.

1.4.3 目的基因和内参基因引物

登录 GenBank,根据已有猫的 caspase-3 和内参基因 β-actin mRNA 的核苷酸序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计对应引物,由上海生物工程技术服务有限公司合成,引物信息见表 1.

表 1 引物信息

引物名称	引物序列(5' to 3')	产物长度/bp	基因登录号
Caspase-3 F	TTTATGGAACAAACGGACC	182	NM_001009338.1
Caspase-3 R	GTATTTTCTGACAGGCGATG		
β-actin F	CTGGATTTTGAGCAGGAGATG	141	AB051104.1
β-actin R	CAGGAAGGAAGGCTGGAAG		

1.4.4 实时荧光定量标准曲线模板的制备

采用 T-A 载体克隆方案,分别将 caspase-3(182 bp),β-actin(141 bp)扩增片段连接至 pGEM-Teasy 载

体,转导至大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中,克隆培养并挑取阳性菌落进行扩大培养,抽提,纯化重组质粒,并取阳性菌液在上海生工生物工程技术有限公司测序验证.阳性质粒-20 ℃ 保存备用.

1.4.5 实时荧光定量 PCR 方法检测 caspase-3 基因 mRNA 表达水平

在 20 μL 反应体系中,含 SYBR Primix Ex Taq Mix(2×) 10 μL,上、下游引物各 0.5 μL,cDNA 模板 1 μL,灭菌去离子水 8 μL,同时将定量模板 10 倍稀释做标准曲线,在 Bio-Rad MJ mini 荧光定量 PCR 仪上进行扩增,2 个基因的反应条件均为 95 ℃ 3 min,40 个循环 95 ℃ 15 s,57 ℃ 35 s,每个循环后进行读板. caspase-3 和 β-actin 检测结果根据各自的标准曲线由 Bio-Rad CFX Manager 1.6 软件计算统计得出.扩增完毕后,进行熔解曲线分析检测产物的特异性.为纠正 RNA 定量、反转录及 PCR 反应效率的差异对结果的影响, caspase-3 基因表达强度分别以绝对拷贝数/β-actin 绝对拷贝数表示.计算出目的基因与内参基因(β-actin)的 C_t 差值 ΔC_t ($\Delta C_t = C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}}$),然后选取空白组为对照组,以各试验组的 ΔC_t 减去空白组的 ΔC_t ,即为 $\Delta\Delta C_t$ 值,最后将其结果转化成相对差异倍数,即($Q_R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$),结果即为各试验组 F81 细胞中 caspase-3 基因与空白组 F81 细胞中 caspase-3 基因表达的倍数关系.

1.5 统计分析

试验结果用 SPSS19.0 软件进行方差分析和显著性检验,试验数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示.

2 试验结果

2.1 药物安全质量浓度与 TCID₅₀测定结果

药物安全质量浓度测定显示,在 TAKC 质量浓度超过 10⁻³ g/mL 时细胞存活率降低,与空白组比较差异极具统计学意义($p < 0.01$).在药物质量浓度低于 10⁻⁴ g/mL 时细胞存活率与空白组比较差异不具有统计学意义($p > 0.05$),确定最大无毒质量浓度为 10⁻⁴ g/mL;根据 Reed-Muench 法计算 CPV 的 TCID₅₀ 为 0.2 mL 10^{-4.102} PFU.

2.2 TAKC 保护 F81 细胞免受 CPV 损伤作用试验结果

从表 2 可知,TAKC 能减少病毒直接对细胞的损伤并有一定的吸附抑制作用.阻滞试验与穿入抑制作用试验中,TAKC 第 2 组(10⁻⁵ g/mL)效果显著优于复方苦苓组和阳性药物组, $p < 0.01$.复制抑制作用试验中,TAKC 第 1 组(10⁻⁴ g/mL)抑制病毒 DNA 复制效果显著优于复方苦苓组与阳性药物组, $p < 0.01$,TAKC 第 2 组(10⁻⁵ g/mL)效果优于复方苦苓组, $p < 0.01$.

表 2 TAKC 保护 F81 细胞免受 CPV 损伤作用试验结果($n=6$)

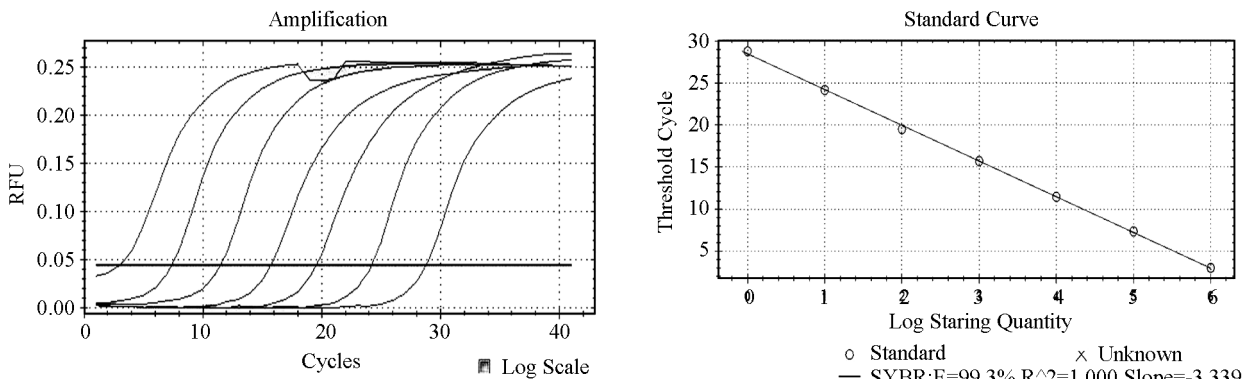
项 目	病毒组细胞 损伤率/%	细胞保护率/%						
		药物 1 组	药物 2 组	药物 3 组	药物 4 组	药物 5 组	复方苦苓组	阳性药物组
直接灭活作用	39.94±0.92	10.79±0.30Ee	19.39±0.09Cc	11.92±0.17Dd	7.33±0.13Ff	7.11±0.36Ff	21.28±0.20Aa	20.60±0.15Bb
阻滞试验	42.27±0.91	23.20±0.25Cc	31.19±0.28Aa	19.69±0.08Ee	8.16±0.15Ff	7.71±0.55Fg	28.53±0.49Bb	20.86±0.22Dd
吸附抑制试验	52.48±1.02	8.16±0.41Ee	14.24±0.15Dd	20.54±0.23Cc	8.11±0.37Ee	7.91±0.13Ee	26.10±0.31Aa	21.76±0.36Bb
穿入抑制试验	36.92±1.08	22.96±0.39Bb	32.28±0.32Aa	19.95±0.37Cc	11.66±0.35Dd	11.08±0.41Ee	23.20±0.23Bb	23.39±0.34Bb
复制抑制试验	43.87±1.31	28.00±0.20Aa	21.87±0.29Cc	15.36±0.21Ee	6.21±0.30Ff	5.74±0.70Fg	20.89±0.35Dd	23.01±0.14Bb

注:同行中,不含相同字母肩注表示差异显著或极显著(小写字母表示 $p < 0.05$,大写字母表示 $p < 0.01$),含相同字母肩注表示差异不显著(小写字母表示 $p > 0.05$,大写字母表示 $p > 0.01$).

2.3 TAKC 对感染 CPV 的 F81 细胞 caspase-3 基因表达的影响

2.3.1 定量标准曲线的建立

图 1 和图 2 分别是 10³,10⁴,10⁵,10⁶,10⁷,10⁸,10⁹ 拷贝的 β-actin 和 caspase-3 基因质粒标准品的实时荧光定量 PCR 标准曲线,回归系数均为 1.000,显示出极好的线性关系.



Amplification 扩增曲线, Cycles 循环数, RFU 荧光强度, Log Scale 对数标尺, Standard Curve 标准曲线, Threshold cycle 循环数, Log starting quantity 起始模板浓度对数值. 下同.

图 1 β-actin 基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线

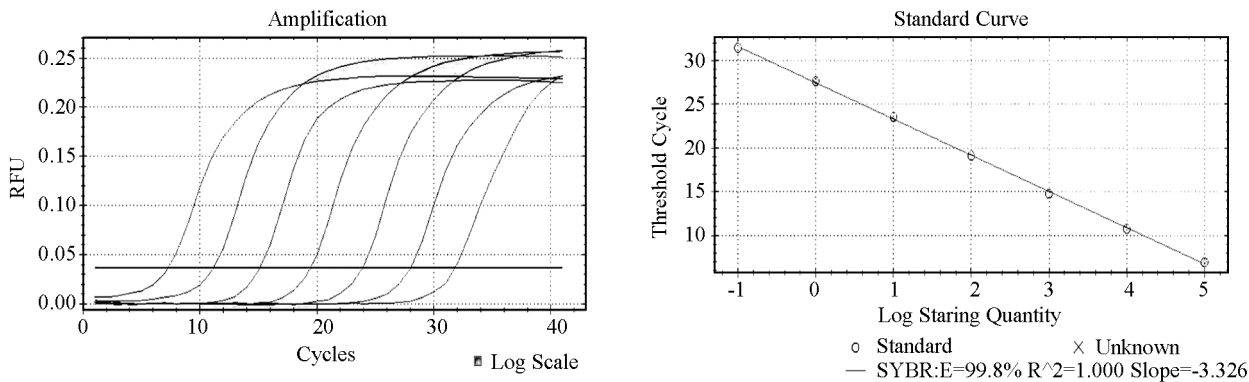


图 2 caspase-3 基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线

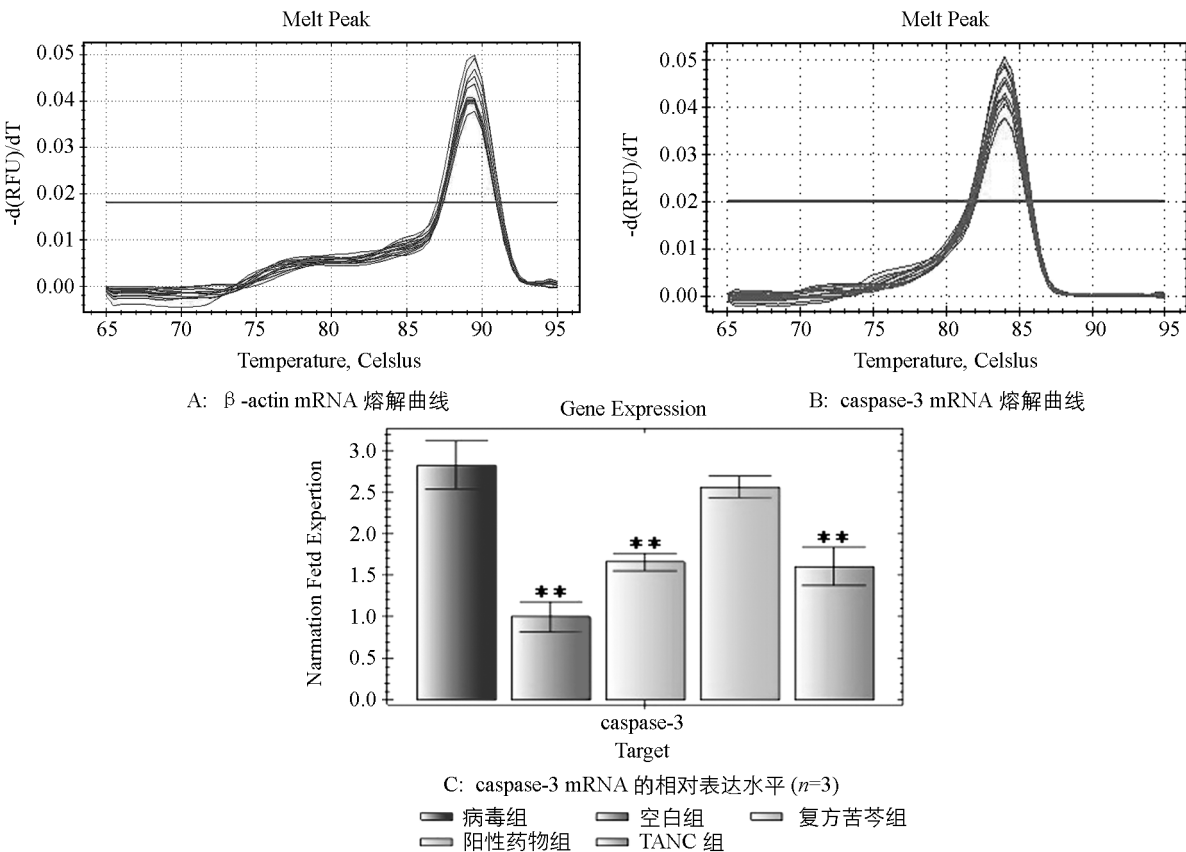
2.3.2 caspase-3 mRNA 表达情况的比较

结果显示, 经系统软件分析熔解曲线, 产物的 T_m 值均一, 有着良好的反应特异性(图 3-A, 3-B); 从图 3-C(由左到右依次为病毒组、空白组、复方苦参组、阳性药物组、TAKC 组)可以看出, 病毒组细胞 caspase-3 mRNA 表达量明显升高, 其表达量分别为空白对照组的 2.800 倍、TAKC 组的 1.818 倍、复方苦参组 1.697 的倍、黄芪多糖组的 1.077 倍. 与病毒组比较, 其中 TAKC 组、复方苦参组细胞 caspase-mRNA 表达量下降, 差异极具统计学意义($p < 0.01$).

3 分析讨论

CPV 通过网格蛋白介导的细胞内吞作用进入细胞^[20]. CPV 首先结合至宿主细胞的转铁蛋白受体 (Transferrin receptor, TfR), 进而通过网格蛋白介导的内吞途径进入细胞内部, 在细胞内病毒粒子会遭遇一个酸性环境, 病毒脱衣壳, DNA 释放进入细胞核^[21]. 随着宿主细胞的复制和表达, 犬细小病毒也开始进行复制和表达^[22]. CPV 利用细胞核内游离的核酸、酶以及某些蛋白进行合成、装配, 并与病毒蛋白在细胞内逐步成熟形成病毒颗粒, 最后通过细胞死亡、信号介导细胞核输出等方式释放^[1].

目前, 抗病毒药物的抗病毒靶标可以归纳为以病毒吸附作为靶标, 或以病毒受体和辅助受体作为拮抗剂的靶标, 或以病毒反转录酶作为靶标的核苷类反转录酶抑制剂, 或以病毒反转录酶作为靶标的非核苷类反转录酶抑制剂, 或以病毒 DNA 聚合酶作为靶标的无环鸟苷类似物等^[11]. 复方苦参由苦参、广藿香等组成, 富含苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、广藿香吡啶碱等生物碱. 现代药理研究表明, 生物碱的药理作用除了抗肿瘤、抗菌、杀虫外还具有抗病毒作用, 如板蓝根生物碱^[23]、紫花地丁总生物碱^[24]、藏药甘青乌头生物碱^[25]等.



A: β -actin mRNA 熔解曲线; B: caspase-3 mRNA 熔解曲线; C: caspase-3 mRNA 的相对表达水平 ($n=3$).
图 C 中 * * 代表与模型组相比差异极具统计学意义. Melt peak 溶解曲线 $-d(RFU)/dT$ 荧光强度 Temperature, Celsius 溶解温度 Gene expression 基因表达水平 Normalized fold expression 相对表达倍数.

图 3 caspase-3 mRNA 实时荧光定量 PCR 熔解曲线与相对表达水平 ($n=3$)

本试验结果显示, TAKC 在无毒质量浓度 $1\times 10^{-4}\sim 1\times 10^{-8}$ g/mL 下对 CPV 体外作用 F81 细胞具有一定的保护作用. 从其作用机理研究发现 TAKC 对 CPV 的阻滞、抑制穿入和抑制复制作用明显, 但对 CPV 的复制抑制作用均弱于其对 CPV 的阻滞和穿入抑制作用, 可能总生物碱对于已吸附穿入的病毒, 虽仍能发挥抑制 CPV 在胞内复制增殖的作用, 可通过抑制其核酸复制或影响蛋白合成, 但整体上弱于其阻止病毒穿入作用^[23]. 以上结果证实, 中药成分在适当的加药方式和适宜的质量质量浓度下才能显示出显著的抗病毒作用, 这点与文献研究结果一致^[12].

Caspase-3 是 caspase 家族中最重要的凋亡执行者, 通过降解 DNA 修复酶 PARP (poly ADP-ribose polymerase) 活化 DNA 裂解因子 DFF-45 (DNA fragmentation factor-45), 导致 DNA 修复的抑制并启动 DNA 降解, 从而诱导细胞凋亡. 许多学者研究发现, 细小病毒感染细胞后可引起细胞的凋亡和坏死, 并且证明这一凋亡作用与病毒的 NS1 非结构蛋白有关^[26-27]. 潘红丽^[22] 研究表明 CPV NS1 蛋白可通过上调 caspase-3/7 蛋白酶活性诱导 F81 细胞凋亡. 通过实时荧光定量 PCR 方法能够对细胞组织中相应基因的表达量进行定量测定^[28-29]. 本试验结果表明 F81 细胞感染 CPV 后 caspase-3 基因表达增加. TAKC 可下调 caspase-3 基因表达, 其机理是 TAKC 对 CPV 入侵 F81 细胞前对 NS1 蛋白的表达产生了影响或是 TAKC 能上调 F81 细胞内 caspase-3mRNA 的表达, 具体作用机理有待进一步深入研究.

4 结 论

TAKC 在犬细小病毒侵染 F81 细胞过程中均对该细胞有一定的保护作用, 其机理可能是通过阻滞、抑制 CPV 穿入靶细胞, 抑制 CPV DNA 复制和调节 F81 细胞凋亡执行基因 caspase-3 表达而保护 F81 细胞.

参考文献:

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] DECARO N, CAMPOLO M. Virological and Molecular Characterization of a Mammalian Orthoreovirus Type 3 Strains Isolated from a Dog in Italy [J]. Veterinary Microbiology, 2005, 109(2): 19—27.
- [3] 高淑华, 宋晓东, 孙 凯. 芪红胶囊对柯萨奇病毒黏附和穿入的抑制作用 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(6): 627—629.
- [4] 刘书东, 左文斌, 贺艳艳, 等. 棉酚对多浪羊淋巴细胞凋亡的影响 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(12): 7—10.
- [5] NYKKY J, TUUSA J E, KIRJAVAINEN S, et al. Mechanisms of Cell Death in Canine Parvovirus-Infected Cells Provide Intuitive Insights to Developing Nanotools for Medicine [J]. International Journal of Nanomedicine, 2010, 5(6): 417—428.
- [6] 朱兆荣, 刘 娟, 聂晨睿. 复方苦芩注射液对人工感染犬细小病毒病的防治 [J]. 中兽医医药杂志, 2010, 29(6): 34—37.
- [7] 朱兆荣, 刘 娟, 杜林林, 等. 复方苦芩对小鼠免疫功能及犬 IL-4mRNA 和 IFN- γ mRNA 表达的影响 [J]. 中国兽医学, 2012, 42(8): 875—880.
- [8] 李 梁, 刘 娟. 复方苦芩对细小病毒病犬组织结构影响 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(4): 49—51.
- [9] 刘俊玮, 刘 娟, 杜林林, 等. 复方苦芩对犬细小病毒致心肌组织 Bcl-2 和 Bax mRNA 的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(1): 122—128.
- [10] 杜林林, 刘 娟, 刘 聪, 等. 复方参芩对人工感染心肌炎型细小病毒病犬的疗效试验 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 178—182.
- [11] 杜林林, 李 梁, 刘 娟, 等. 复方苦芩对犬细小病毒致肠粘膜细胞凋亡及相关基因表达的影响 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(10): 1511—1515.
- [12] 封海波, 曾宪垠, 刘 娟, 等. 8 种中药成分体外抗犬细小病毒的研究 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(6): 884—888.
- [13] 桂志胜, 刘 娟, 杜林林, 等. 复方苦芩对防止心肌细胞免受犬细小病毒损伤的保护和抗氧化作用 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(7): 27—31.
- [14] 周长征. 生物碱类成分抗病毒的研究进展 [J]. 健康必读, 2012, 11(5): 254.
- [15] 瞿 畅, 赖志才, 裴 赢, 等. 余甘子提取物体外抗单纯疱疹病毒 1 型和 2 型的初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 784—786.
- [16] 姜成刚, 张秀英, 龙忠臣. 中药复方制剂抗猪传染性胃肠炎病毒活性的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(5): 587—589.
- [17] 马忠兵. 刺粘生物碱抗病毒作用的初步研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2006.
- [18] 周至品. 皱瘤海鞘抗单纯疱疹病毒 II 型活性及作用机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [19] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版社, 2007: 200—201.
- [20] PARKER J S L, PARRISH C R. Cellular Uptake and Infection by Canine Parvovirus Involves Rapid Dynamin-Regulated Clathrin-Mediated Endocytosis, Followed by Slower Intracellular Trafficking [J]. Virol, 2000, 74(4): 1919—1930.
- [21] COTMORE S F, TATTERSALL P. The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates [J]. Adv Virus Res, 1987, 33: 91—174.
- [22] 潘红丽. 犬细小病毒 NS1 非结构蛋白诱导宿主细胞凋亡的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [23] 陈瑞亮, 王林青, 崔保安, 等. 板蓝根生物碱抗猪细小病毒的作用 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 20—23.
- [24] 杨佳冰, 丁大旺, 赵金香, 等. 紫花地丁总生物碱抗病毒与抑菌试验 [J]. 中兽医医药杂志, 2011, 30(4): 8—10.
- [25] 张春江, 李 薇, 孙振鹏, 等. 藏药甘青乌头生物碱抗单纯疱疹病毒 II 型体外作用 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2010, 36(4): 1—6.
- [26] HRISTOV G, KRÄMER M, LI J, et al. Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1induces Apoptosis Via Accumulation of Reactive Oxygen Species [J]. Journal of Virology, 2010, 84(12): 5909—5922.
- [27] MOFFATT S, YAEHASHI N, TADA K, et al. Human Parvovirus B19 Nonstructural (NS1) Proteininduces Apoptosis

in Erythroid Lineage Cells [J]. Journal of Virology, 1998, 72(4): 3018—3028.

[28] 郑双艳, 赵永聚, 许宝华, 等. 山羊 CD4 基因的克隆及组织表达分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(2): 1—8.

[29] 董然然, 李 顺, 蒋曹德. 猪 IFIT1 基因的克隆、生物信息学和组织表达分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(6): 81—83.

Study on the Effect of Total Alkaloids in Kuqin Compound of Protecting F81 Cells Against Canine Parvovirus

SHAO Qiu-hong, ZHU Mai-xun, ZHU Zhao-rong,
LUO Yi-chen, LIU Juan, XUE Xin-fang

Department of Veterinary Medicine (Rongchang Campus), Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: An experiment was conducted to investigate the possible mechanism of total alkaloids in compound kuqin (TACK) protecting F81 cells (feline kidney cells) against canine parvovirus (CPV). In in vitro tests, F81 cells were infected with CPV and treated with TACK at different concentrations. The MTT method was used to detect the protection rate of F81 cells, and RT-PCR was used to test the expression of caspase-3 mRNA. The results showed that TACK had protective effects on F81 cells throughout the process of virus replication, including direct inactivation effect, blocking effect, adsorption inhibition effect, penetration inhibition effect and replication inhibition effect. The protection of the effects of blocking inhibition, penetration inhibition and replication inhibition was 31.19%, 20.54% and 32.28%, respectively. TACK significantly decreased the expression level of caspase-3 mRNA in F81 cells infected with CPV, the ratio being 1 : 1.818, as compared with the model group. It is, therefore, speculated that TACK can protect F81 cells from damage induced by CPV through the blocking inhibition, penetration inhibition and DNA replication inhibition effects of F81 cells against CPV infection and decrease the expression level of caspase-3 mRNA.

Key words: total alkaloids in compound kuqin; canine parvovirus; feline kidney cell; anti-injury

责任编辑 夏 娟

