

4 种茶叶水提物对猪繁殖与呼吸综合征病毒的作用

周洪锐, 汤起武, 余兴龙*, 李润成, 罗维, 蒋大良, 葛猛

(湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 采用小鼠体内试验和体外试验, 利用 Marc-145 细胞体外培养系统, 通过观察细胞病变来评价茶叶水提物对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)繁殖的抑制作用。改变加入茶叶水提取物的方式(茶叶水提物先与病毒感作后接种细胞、茶叶水提物与已感染病毒的细胞作用 2 种方式), 初步探讨茶叶水提物对 PRRSV 的抑制与杀灭作用。体内试验是采用小鼠尾静脉注射的方法, 将茶叶水提物注射到小鼠体内, 测定小鼠血清对 PRRSV 的作用。结果表明, 茶叶水提物对 PRRSV 具有杀灭与抑制作用, 碧螺春茶(不发酵)、生普洱茶(不发酵)、铁观音茶(半发酵)、熟普洱茶(后发酵)的水提物对 PRRSV 的最小抑制质量浓度分别为 31.3、31.3、31.3、125 $\mu\text{g/mL}$, 最小杀灭质量浓度分别为 7.8、7.8、15.6、125 $\mu\text{g/mL}$ 。不发酵型茶叶水提物比发酵型茶叶水提物对 PRRSV 的杀灭与抑制作用明显, 小鼠尾静脉注射茶叶水提物后能正常生长, 注射 1 h 内小鼠血清对 PRRSV 具有一定的杀灭作用。

关 键 词: 茶叶水提物; 猪繁殖与呼吸综合征; Marc-145 细胞

中图分类号: S852.65⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)03-0305-05

Antiviral effect of aqueous extracts of four kinds of tea on porcine reproductive and respiratory syndrome virus

ZHOU Hong-rui, TANG Qi-wu, YU Xing-long*, LI Run-cheng, LUO Wei, JIANG Da-liang, GE Meng

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Based on both the *in vivo* and *in vitro* way and the Marc 145 cell culture system, the effects of aqueous extracts from teas on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) was assessed regarding the cytopathic effect (CPE). First, the antiviral effect of the aqueous extracts was investigated by infecting the cell after the virus reacted with the aqueous extracts and by simultaneously adding the virus and the aqueous extracts to the cells. Then, the *in vivo* experiment was conducted by measuring the anti-PRRSV effect of sera collected from the mice which were previously administered with the aqueous extracts through intravenous (IV) tail vein injection. The results showed that the aqueous extracts of teas had the killing and inhibiting effect on PRRSV. The minimum inhibitory concentration of Biluochun tea (non-fermented), Pu'er raw tea (non-fermented), Tieguanyin tea (half-fermented) and Pu'er ripe tea (post-fermented) were 31.3, 31.3, 31.3, 125 $\mu\text{g/mL}$, respectively; and the corresponding minimum killing concentrations were 7.8, 7.8, 15.6, 125 $\mu\text{g/mL}$. The aqueous extracts of non-fermented tea had more obvious killing and inhibition effect on PRRSV compared to the aqueous extracts of fermented tea. Tail vein injection of tea aqueous extract does not affect the normal growth of mice, and in a short period of time, the sera from the mice injected with tea aqueous extract showed killing effect on PRRS.

Key words: aqueous extracts of tea; porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS); Marc-145; cytopathic effect

收稿日期: 2012-03-06

基金项目: 长沙市科技计划重大专项(K0902007-21)

作者简介: 周洪锐(1986—), 男, 天津塘沽人, 硕士研究生, 主要从事病原分子生物学及免疫学研究, 466839613@qq.com; *通信作者, xlyu999@yahoo.com.cn

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是一种严重危害养猪业的病毒性疾病^[1-2]。茶叶提取物的主要成分为茶多酚^[3-4]。茶多酚具有抗病毒的作用。茶多酚的天然低毒和高效抗病毒作用已引起生物医学领域的高度关注^[5]。Song等^[6]研究茶多酚对流感病毒的抑制作用,发现茶多酚的有效成分是表没食子儿茶素没食子酸酯和表儿茶素没食子酸酯;Kunihiro等^[7]发现茶儿茶素衍生物对抗药性流感病毒有抑制作用;Ye等^[8]发现茶多酚对乙型肝炎病毒有抑制作用,且最低抑制浓度可低至2.54 $\mu\text{g/mL}$ 。茶叶按照加工方式主要分为不发酵茶和发酵茶。不同加工方式茶叶的成分略有不同。笔者通过小鼠体内试验与体外试验,初步研究4种茶叶水提取物对猪繁殖与呼吸综合征病毒的杀灭和抑制作用,旨在为用天然提取物生产抗病毒药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料碧螺春茶(不发酵)、生普洱茶(不发酵)、熟普洱茶(后发酵)和铁观音茶(半发酵)均购自湖南恒润茶叶贸易有限公司。

PRRSV-Hun08株、Marc-145传代细胞均由湖南农业大学动物医学院病原分子生物学及免疫学实验室保存。SPF级昆明小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

DMEM培养基为GIBCO公司产品。小牛血清、0.25%胰蛋白酶、双抗为HyClone公司产品。

1.2 方法

1.2.1 茶叶水提取物的制备

选取碧螺春茶、生普洱茶、熟普洱茶、铁观音茶4种不同加工方式的茶叶,于37℃温箱干燥至衡重。各称取2g干燥茶叶至混合型研磨仪,研磨1min。称取1g粉末状茶叶加入到10mL灭菌超纯水中,100℃水浴20min。取上清12000 r/min离心10min。取离心后的上清,用相对分子质量3000规格的超滤管(美国Millipore离心超滤管)超滤。取

超滤后的茶叶水提取物-20℃保存。使用前将茶叶水提取物配制相当于生茶1mg的水提取物1mL。

1.2.2 病毒的培养

按同步接毒方法^[9],将Marc-145细胞进行消化传代,并将细胞数调整至 1×10^6 个/mL,加至细胞培养瓶中,20mL/瓶,同时接种100个TCID₅₀的PRRSV,于5%CO₂培养箱中37℃培养72h收毒,反复冻融3次。将病毒混匀分装,-70℃保存。按照Reed-Muench法计算TCID₅₀^[10-12]。

1.2.3 茶叶水提取物作用于Marc-145细胞安全浓度的确定

将茶叶水提取物配制相当于生茶1mg的水提取物1mL,再作连续倍比稀释,稀释成9个稀释度。将Marc-145细胞进行消化传代,并将细胞数调整至 1×10^6 个/mL后,分别与等体积的茶叶水提取物混匀,加至96孔细胞培养板中,0.2mL/孔。每个稀释度作4个平行对照,另设正常培养细胞对照,于5%CO₂培养箱中37℃培养72h,每天记录CPE法测定结果。

1.2.4 茶叶水提取物对PRRSV抑制作用的确定

将Marc-145细胞进行消化传代,并将细胞数调整至 1×10^6 个/mL,加至96孔细胞培养板中,0.1mL/孔,于5%CO₂培养箱中37℃培养36h后,再将培养液倒掉;加入含有100个TCID₅₀的PRRSV细胞维持液,0.1mL/孔,于5%CO₂培养箱中37℃孵育1h后,再将维持液倒掉;加入不同浓度茶叶水提取物的细胞维持液(在安全浓度的基础上将茶叶水提取物用细胞维持液作连续的倍比稀释,稀释成9个稀释度),0.1mL/孔,每个稀释度作4个平行对照,于5%CO₂培养箱中37℃培养72h。另设正常培养细胞对照与只接种病毒的细胞对照。每天记录CPE法测定结果,其中细胞病变50%的试验孔记为1,细胞病变50%的试验孔不记。

1.2.5 茶叶水提取物对PRRSV杀灭作用的确定

在安全浓度范围内将茶叶水提取物用含有200个TCID₅₀的PRRSV细胞维持液作连续倍比稀释,稀

释成9个稀释度,加至96孔细胞培养板上,0.1 mL/孔。每个稀释度作4个平行对照。于5%CO₂培养箱中37℃感作30 min后,再将Marc-145细胞进行消化传代,并将细胞数调整至 1×10^6 个/mL,加至96孔细胞培养板中,0.1 mL/孔,于5%CO₂培养箱中37℃培养72 h。另设正常培养细胞对照与只接种病毒的细胞对照。每天记录CPE法测定结果,其中细胞病变50%的试验孔记为1,细胞病变50%的试验孔不记。

1.2.6 小鼠血清对PRRSV作用的确定

选取碧螺春茶水提物的最高安全浓度进行小鼠尾静脉注射。注射前一天于每只小鼠采集100 μ L血清。每组6只小鼠,共分4组,每只小鼠注射100 μ L茶叶水提取物,分3个时段(注射后0.5、1、2 h)采集小鼠血清。对照组注射后不做处理,观察小鼠生长情况。将小鼠血清用相对分子质量3 000规格的超滤管超滤,56℃灭活30 min。灭活后的小鼠血清用含有200个TCID₅₀的PRRSV细胞维持液作连续倍比稀释,稀释成4个稀释度,加至96孔细胞培养板上,0.1 mL/孔,于5%CO₂培养箱中37℃感作30 min后,再将Marc-145细胞进行消化传代,并将细胞数调整至 1×10^6 个/mL,加至96孔细胞培养板中,0.1 mL/孔,于5%CO₂培养箱中37℃培养

72 h。设正常培养细胞对照与只接种病毒的细胞对照。每天观察CPE情况,并记录CPE结果。

2 结果与分析

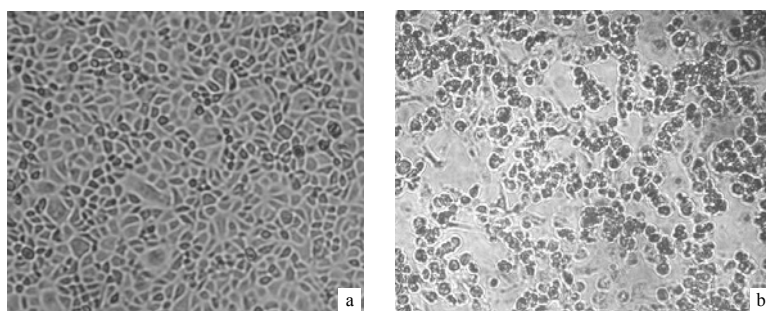
2.1 茶叶水提取物作用于Marc-145细胞的安全浓度

熟普洱茶水提取物质量浓度为1 000 μ g/mL时对Marc-145细胞生长有影响,试验孔细胞全部变圆,最终脱落死亡;熟普洱茶水提取物质量浓度250 μ g/mL时对Marc-145细胞生长没有影响,试验孔细胞形态与正常培养细胞的形态一致,细胞轮廓清晰,可见,熟普洱茶水提取物作用于Marc-145细胞的安全质量浓度250 μ g/mL。

碧螺春茶、生普洱茶、铁观音茶水提取物质量浓度1 000 μ g/mL时对Marc-145细胞生长没有影响,试验孔细胞形态与正常培养细胞的形态一致,可见,这3种茶作用于Marc-145细胞的安全质量浓度均1 000 μ g/mL。

2.2 茶叶水提取物对PRRSV的抑制作用

PRRSV被茶叶水提取物有效抑制的试验孔细胞形态与正常培养细胞的形态一致,细胞轮廓清晰(图1-a);PRRSV没有被茶叶水提取物有效抑制的试验孔细胞形态与只接种病毒的细胞形态一致,细胞变圆,最终脱落(图1-b)。



a PRRSV被茶叶水提取物有效抑制的试验孔细胞;b PRRSV没有被茶叶水提取物有效抑制的试验孔细胞。

图1 茶叶水提取物作用于感染PRRSV的Marc-145细胞的显微结构($\times 40$)

Fig.1 Effect of aqueous extracts from tea on microstructure of Marc-145 infected with PRRSV($\times 40$)

4种茶叶水提取物对PRRSV具有抑制作用,碧螺春茶、生普洱茶、熟普洱茶、铁观音茶对PRRSV引起的CPE最小半数抑制浓度(表1)分别为31.3、31.3、125、31.3 μ g/mL,其中熟普洱茶水提取物对

PRRSV的抑制作用较弱,其他3种茶叶水提取物对PRRSV抑制作用较明显。这3种茶均属于不发酵茶或半发酵茶。

表 1 茶叶水提取物对 PRRSV 抑制作用的 CPE 法测定结果

Table 1 Inhibiting effect of tea aqueous extract on PRRSV determined by CPE

茶叶水提取物质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	出现病变的试验孔细胞 CPE 法统计结果					
	碧螺春茶组	生普洱茶组	熟普洱茶组	铁观音茶组	细胞对照组	病毒对照组
250.0	0	0	0	0	0	4
125.0	0	0	2	0	0	4
62.5	0	0	4	0	0	4
31.3	1	0	4	0	0	4
15.6	4	4	4	4	0	4

2.3 茶叶水提取物对 PRRSV 的杀灭作用

PRRSV 被茶叶水提取物有效杀灭的试验孔细胞形态与正常培养细胞的形态一致,细胞轮廓清晰;PRRSV 没有被茶叶水提取物有效杀灭的试验孔细胞形态与只接种病毒的细胞形态一致,细胞变圆,最终脱落。4 种茶叶水提取物对 PRRSV 具有杀灭作用,碧

螺春茶、生普洱茶、熟普洱茶、铁观音茶对 PRRSV 引起的 CPE 最小半数杀灭浓度(表 2)分别为 7.8、7.8、125、15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其中,熟普洱茶水提取物对 PRRSV 的杀灭作用较弱,碧螺春茶和生普洱茶水提取物对 PRRSV 的杀灭作用较明显。

表 2 茶叶水提取物对 PRRSV 杀灭作用的 CPE 法测定结果

Table 2 Killing effect of tea aqueous extract on PRRSV determined by CPE

茶叶水提取物 质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	出现病变的试验孔细胞 CPE 法统计结果					
	碧螺春茶组	生普洱茶组	熟普洱茶组	铁观音茶组	细胞对照组	病毒对照组
250.0	0	0	0	0	0	4
125.0	0	0	2	0	0	4
62.5	0	0	4	0	0	4
31.3	0	0	4	0	0	4
15.6	0	0	4	2	0	4
7.8	1	0	4	4	0	4
3.9	4	4	4	4	0	4

2.4 小鼠血清对 PRRSV 的作用

注射茶叶水提取物的对照组小鼠饲养 2 周,小鼠精神良好,采食正常,体重增加。注射前的小鼠血清对 PRRSV 没有杀灭作用,试验孔细胞形态与接种病毒的细胞形态一致,细胞变圆,最终脱落。注射茶叶水提取物后,30 min 采血组和 1 h 采血组的部分小鼠血清在 10 倍稀释后对 PRRSV 有杀灭作用,对 PRRSV 有杀灭作用的小鼠血清试验孔,细胞形态与正常培养细胞的形态一致,细胞轮廓清晰。对 PRRSV 没有杀灭作用的小鼠血清试验孔,细胞形态与只接种病毒的细胞形态一致,细胞变圆,最终脱落。2 h 采血组的小鼠血清对 PRRSV 没有杀灭作用,试验孔细胞形态与只接种病毒的细胞形态一致。试

验结果表明:在小鼠体内一定浓度的茶叶水提取物可以起到杀灭病毒的作用,但茶叶水提取物在小鼠体内存在的时间比较短(约 1 h)。

3 结论与讨论

试验结果显示,在体外细胞试验中,茶叶水提取物对 PRRSV 具有抑制和杀灭作用。不发酵茶水提取物比发酵茶水提取物对 PRRSV 的抑制和杀灭作用明显。在体内试验中,小鼠尾静脉注射茶叶水提取物后小鼠仍正常生长,而且在短时间内小鼠血清对 PRRSV 具有一定的杀灭作用。

茶叶的有效成分茶多酚是一类复杂的多酚类物质^[13];茶叶中的单宁^[14]对病毒有一定的抑制作

用^[15],通过抑制DNA聚合酶的活性来抑制病毒的复制^[16-17]。绿茶提取物能有效抑制乙肝病毒DNA的复制^[11],降低复制中间产物和cccDNA的含量,还能干扰病毒mRNA的转录。本试验结果显示,茶水提物对PRRSV具有明显的抑制和杀灭作用,主要原因可能是茶水提取物能有效抑制PRRSV的复制。此外,茶水提取物对PRRSV的作用很可能与茶叶中的茶多酚有关。不发酵茶水提物比发酵茶水提物对PRRSV的抑制和杀灭作用更明显,主要原因可能是茶叶中的有效成分在茶叶发酵过程中发生了化学变化,复杂的发酵工艺减少了茶叶的有效成分含量,或者茶叶中的有效成分与茶叶选取部位或茶叶采摘时间有关。由于受试验数据的限制,此问题有待研究。

小鼠尾静脉注射茶叶水提物后仍正常生长,而且在短时间(约1h)内小鼠血清对PRRSV有一定的杀灭作用,主要原因可能是茶叶水提物进入到小鼠血液循环后被降解,或茶叶水提物进入小鼠血液后与某些物质发生了化学反应,使茶叶水提物的有效成分被消耗,或者是茶叶水提物的注射量不足导致小鼠血清内含有的茶叶有效成分较低。

茶叶水提物具有提取工艺简单、安全低毒、高效抑制和杀灭病毒等特点,可用于生产抗病毒药物,应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似PRRS流产胎儿分离猪生殖和呼吸综合征病毒的研究[J].中国畜禽传染病,1996,22(2):1-5.
- [2] 朱林根,孔先坤,张战峰,等.猪繁殖与呼吸综合征研究进展[J].动物医学进展,2008,29(9):86-90.
- [3] 黄深惠,汤有志,周雪梦,等.茶多酚体内外抗流感病毒作用研究[J].茶叶科学,2010,30(4):302-308.
- [4] Bajaj K L, Devsharma A K. A colorimetric method for the determination of tannins in tea[J]. Microchimica Acta, 1977, 68(3): 249-253.
- [5] 王景梓,王岗,徐贵发,等.茶多酚药理研究[J].食品与药品,2006,8(3):23-26.
- [6] Song Jae-min, Kwang-Hee Lee, Baik-Lin Seong. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus[J]. Antiviral Research, 2005, 68(3): 66-74.
- [7] Kunihiro Kaihatsu, Hiroyo Matsumura, Shuichi Mori. Combating drug-resistant influenza viruses with novel green tea catechin derivatives[J]. Antiviral Research, 2010, 86(23): 57-58.
- [8] Ye Pian, Zhang Shuling, Zhao Lei. Tea polyphenols exerts anti-hepatitis B virus effects in a stably hbv-transfected cell line[J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2009, 29(2): 169-172.
- [9] 吕永钢.不同接毒方法对猪繁殖与呼吸综合征病毒增殖效果比较[J].中国兽药杂志,2010,44(3):34-36.
- [10] 佩克特 D L, 德曼 R D. 细胞实验指南:上册[M].北京:科学出版社,2001:27-31.
- [11] Xu Jun, Wang Jue, Deng Fei. Green tea extract and its major component epigallocatechin gallate inhibits hepatitis B virus *in vitro*[J]. Antiviral Research, 2008, 78(2): 242-249.
- [12] Zhong L, Furne J K, Levitt M D. An extract of black, green, and mulberry teas causes malabsorption of carbohydrate but not of triacylglycerol in healthy volunteers[J]. Am J Clin Nutr, 2006, 84: 551-555.
- [13] 张文明,陈朝银,韩本勇,等.茶多酚的抗病毒活性研究[J].云南中医学院学报,2007,30(6):57-59.
- [14] Srivastava R C, Husain M M, Hasan S K. Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties[J]. Cancer Letters, 2000, 153: 1-5.
- [15] Zhang Xu-fu, Dai Ying-chun, Zhong Wei-ming. Tannic acid inhibited norovirus binding to HBGA receptors, a study of 50 Chinese medicinal herbs[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20(4): 1616-1623.
- [16] Mei-Hsien Lee, Jwo-Farn Chiou, Kun-Ying Yen. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*[J]. Cancer Letters, 2000, 154: 131-136.
- [17] 李薇,罗维,龚平阳,等.3种亚群PCV-2感染性克隆的构建及体内外感染性试验[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2011,37(1):68-72.

责任编辑:王赛群