

引用格式:

唐红梅, 朱买勋, 邓小龙, 徐登峰. 黄连生物碱对 TGEV 诱导的 ST 细胞炎症反应的调节作用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(1): 58–62.

TANG H M, ZHU M X, DENG X L, XU D F. The inflammatory response regulating role of alkaloids of *Coptis chinensis* in swine testis cells induced by TGEV[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(1): 58–62.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



黄连生物碱对 TGEV 诱导的 ST 细胞炎症反应的调节作用

唐红梅^{1,2}, 朱买勋^{1,2*}, 邓小龙³, 徐登峰^{1,2}

(1.重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2.国家生猪技术创新中心, 重庆 402460; 3.彭水苗族土家族自治县畜牧发展中心, 重庆 409600)

摘要: 分别用质量浓度为 100、50、25 $\mu\text{g/mL}$ 的黄连生物碱(ACC)处理猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)感染的猪睾丸细胞(ST), 采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞的活力; 采用硝酸还原酶法检测 NO 含量; 采用比色法检测总一氧化氮合成酶(TNOS)和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)活性; 采用荧光定量 PCR 检测 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-10* 等炎症基因的表达。结果表明: 100、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 ACC 可极显著提高 TGEV 感染的 ST 细胞的存活率, 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 ACC 可显著提高 TGEV 感染的 ST 细胞存活率; TGEV 感染后 ST 细胞 NO 含量急剧升高, 100、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 ACC 可极显著降低 ST 细胞 TNOS 和 iNOS 活性, 25 $\mu\text{g/mL}$ ACC 可显著降低 TNOS 和 iNOS 活性; ACC 可极显著下调 ST 细胞 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-10* mRNA 的表达水平。表明黄连生物碱可以降低 TGEV 诱导的 ST 细胞的炎症反应, 缓解病毒对细胞的损伤。

关键词: 黄连生物碱; 猪传染性胃肠炎病毒; 猪睾丸细胞; 炎症相关基因

中图分类号: S853.74

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)01-0058-05

The inflammatory response regulating role of alkaloids of *Coptis chinensis* in swine testis cells induced by TGEV

TANG Hongmei^{1,2}, ZHU Maixun^{1,2*}, DENG Xiaolong³, XU Dengfeng^{1,2}

(1.Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China; 2.National Center of Technology Innovation for Pigs, Chongqing 402460, China; 3.Pengshui Miao & Tujia Autonomous County Livestock Development Center, Chongqing 409600, China)

Abstract: The swine testicular(ST) cells infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) were treated with alkaloids of *Coptis chinensis*(ACC) with mass concentrations of 100, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$ respectively. MTT assay was used to detect the cell viability, the griess method and colorimetric method were used to detect the release of NO, TNOS and iNOS, and Real-time PCR method was used to detect expression changes of inflammatory genes such as *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-10*. The results indicated that ACC at the mass concentration of 100 and 50 $\mu\text{g/mL}$ could extremely significantly increase the survival rate of ST cells, and 25 $\mu\text{g/mL}$ ACC could significantly increase the survival rate of ST cells. The content of NO increased sharply after TGEV infection, and the ACC at the mass concentration of 100 and 50 $\mu\text{g/mL}$ could extremely significantly decrease the activities of TNOS and iNOS, and 25 $\mu\text{g/mL}$ ACC could significantly decrease the activities of enzymes TNOS and iNOS. Meanwhile, ACC could extremely significantly down-regulate the expression levels of *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-10* mRNA. We can conclude that the alkaloids of *Coptis chinensis* could reduce the inflammatory

收稿日期: 2023-03-10

修回日期: 2023-10-09

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0757); 国家重点研发计划项目(2022YFD1601403); 国家生猪技术创新中心先导项目(NCTIP-XD/B12)

作者简介: 唐红梅(1986—), 女, 重庆荣昌人, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药分析检测研究, tanghongmei2005@126.com; *通信作者, 朱买勋, 硕士, 副研究员, 主要从事兽用中药药理毒理学研究, zmxmz0817@163.com

response induced by TGEV and alleviate the damage of virus to cells.

Keywords: alkaloids of *Coptis chinensis*; transmissible gastroenteritis virus; swine testis cells; inflammation-related genes

猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)是引起仔猪腹泻的主要病原之一,具有传播快、对胃肠道菌群和黏膜组织破坏性强的特点,且此种仔猪腹泻的临床防治效果差,无特效治疗药物。猪传染性胃肠炎被世界动物卫生组织(OIE)列为烈性传染病^[1-2]。临床上主要以接种猪传染性胃肠炎与猪流行腹泻二联灭活疫苗进行预防,但由于从接种疫苗到产生抗体需要 7~10 d,难以实现对仔猪的早期免疫保护。寻找能有效抑制病毒增殖和消除炎症的药物是解决临床问题的主要途径。有研究^[3]表明,复方苦苓可以增强 TGEV 感染猪肾细胞 PK-15 的抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达量,增强猪肾细胞的抗病毒能力。香菇多糖可以提高仔猪肠道黏膜免疫,缓解仔猪腹泻,增强对轮状病毒感染的抵抗力^[4]。连梅提取液可以增强湿热泻痢仔猪的抗氧化损伤能力,调节胃肠道蠕动,降低肠黏膜细胞凋亡基因 Caspase-9 mRNA 的表达量,缓解湿热引起的仔猪腹泻^[5]。

黄连提取物可以有效抑制 TGEV 增殖、调节宿主细胞分泌 *IFN- α* 、*IFN- β* 、*IFN- γ* 、*IRF-3* 等抗病毒相关因子的表达^[6]。仔猪感染 TGEV 后,腹泻的同时还伴随大量的炎症反应,消除肠道炎症是治疗仔猪腹泻和促进病后康复的重要手段。为了探索黄连生物碱对 TGEV 感染猪睾丸细胞(ST 细胞)引起的炎症调节作用,笔者通过 TGEV 感染 ST 细胞构建炎症细胞模型,采用黄连生物碱处理感染 TGEV 的 ST 细胞,测定感染细胞的存活率、炎性介质和相关调节酶的活力、炎性相关基因的 mRNA 的表达,分析黄连生物碱对 TGEV 诱导 ST 细胞炎症损伤的抗炎调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

称取重庆石柱黄连 500 g,添加 10 倍体积量的 50%乙醇溶液,80 °C回流提取 2 次,每次提取 1 h,合并滤液后减压真空回收乙醇,离心去除杂质,浓缩至黄连中总生物碱(ACC)的质量浓度为 1 000 mg/mL。

传染性胃肠炎病毒(TGEV)ATCC 编号 VR-763;

猪睾丸细胞(ST)CTCC 编号 GDC007,均由重庆市畜牧科学院兽医兽药研究所扩增并保存。

1.2 方法

1.2.1 黄连生物碱处理 ST 细胞的最大安全浓度的检测

参考文献[6],采用 10 倍稀释法,连续将黄连生物碱稀释 8 个浓度梯度,每个浓度梯度生物碱分别添加 200 μ L 于 96 孔培养的细胞板上,同时以添加不含黄连生物碱的维持液作为空白对照,连续培养 48 h,采用 Nano Drop 2000 超微量分光光度计在 570 nm 处噻唑蓝(MTT)检测细胞的存活率。

1.2.2 黄连生物碱处理感染 TGEV 的 ST 细胞的存活率的测定

依照文献[7],采用 Reed-Muench 法测定病毒的效价 TCID₅₀。

以 96 孔板上生长良好的 ST 细胞接种病毒载量为 1,感染时间为 2 h,弃原病毒液,形成病毒感染的细胞模型。

将病毒感染的模型细胞分为模型组(V)和黄连生物碱高、中、低剂量组(T1、T2、T3),每组 10 孔,另外选择不感染病毒的细胞作为空白对照。T1、T2、T3 组细胞在攻毒完成之后添加 1.00、0.50、0.25 倍的最大安全浓度黄连生物碱药液,空白组和模型组的细胞添加含 0.1%胰酶和 2%血清的维持液作为对照,置 5% CO₂ 培养箱 37 °C培养,持续培养 72 h,采用 MTT 法检测细胞存活率。

1.2.3 黄连生物碱处理感染 TGEV 的 ST 细胞的炎性介质分泌量的测定

采用 6 孔板构建细胞模型并将细胞分为 4 个试验组,选正常细胞作为对照,试验结束后收集细胞培养液,选择 NO、TNOS 和 iNOS 检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司),采用硝酸还原酶法检测 NO 的含量,收集细胞,采用比色法检测细胞的总一氧化氮合成酶(TNOS)和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的活性。

1.2.4 黄连生物碱处理感染 TGEV 的 ST 细胞的炎症相关基因相对表达量的测定

收集 6 孔板上的细胞,低温提取细胞 RNA,电泳检测总 RNA 完整性,采用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 的 OD 值,确定 RNA 浓度且 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 的比值在 1.8~2.0。以提取的 RNA 为模板,参照反转录试剂盒说明书进行操作,反转录为 cDNA。根据 NCBI 和猪炎症相关的基因序列^[9],设计内参基因 *GAPDH*,目的基因 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-10* 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物信息见表 1。采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行检测,反应体系为 25 μL : cDNA 2.0 μL , SYBR Primer Ex *Taq* TM 12.5 μL , 上游和下游引物各 1.0 μL , RNase free dH_2O 8.5 μL , 涡旋混匀。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s; 共 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。

表 1 猪炎症相关基因序列

Table 1 The sequences of inflammation-related genes in pig			
基因	引物系列(5'-3')	退火 产物	
		温度/ $^{\circ}\text{C}$	大小/bp
<i>GAPDH</i>	GTGAACGGGTGAGTTAGGGG CGATGCGGCCAAATCTTGAG	61	153
<i>TNF-α</i>	GCCCAAGGACTCAGATCATCG ATTGGCATAACCACTCTGCC	60	108
<i>IL-1β</i>	TCCAGCCAGTCTTCATTGTTCA CAGGTCATTATTGTGTACCCGT	59	104
<i>IL-6</i>	CCCTGAGGCAAAAAGGAAAGA AGGAAATCCTCAAGGCTGCG	59	148
<i>IL-10</i>	CCACAAGTCCGACTCAACGA CTGCCAGGAAGATCAGGCAA	60	174

1.3 数据分析

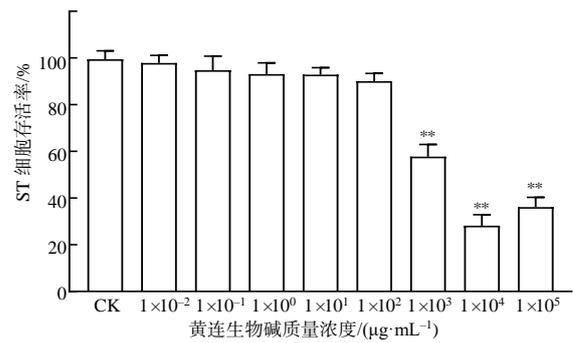
采用 Excel 2010 收集试验数据;运用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析和显著性比较,选用 Duncan 法进行多重比较;荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析;目的基因表达强度分别以绝对拷贝数/内参基因绝对拷贝数表示,并将空白组细胞基因的表达量设置为 1 \times ,计算目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 黄连生物碱处理 ST 细胞的安全浓度

图 1 结果表明,ACC 质量浓度为 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,ST 细胞的存活率极显著低于空白组($P<0.01$);ACC 质量浓度低于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,药物组细胞的存活率与空白组的差异不显著($P>0.05$),从而确定 ACC 对 ST 细胞的最大安全浓度为 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



***表示处理组与空白组的差异有统计学意义($P<0.01$)。

图 1 不同浓度黄连生物碱处理的 ST 细胞的存活率

Fig.1 The survival rate of ST cells tested with different concentrations of ACC

2.2 黄连生物碱对感染 TGEV 的 ST 细胞的存活率的影响

经检测并计算, TGEV 半数细胞感染量 TCID_{50} 为 $1\times 10^{-3.6}/100$ μL 。表 2 结果表明,采用该滴度的病毒接种后,模型组细胞存活率极显著低于空白组和 3 个黄连生物碱组; T1、T2 组的细胞存活率提高,与模型组相比较差异极显著($P<0.01$),低剂量组与模型组相比较差异显著($P<0.05$),且细胞的存活率与黄连生物碱的质量浓度呈正相关。

表 2 黄连生物碱处理的感染 TGEV 的 ST 细胞的存活率

Table 2 Survival rate of ST cells treated by ACC which infected with TGEV

组别	$\text{OD}_{570\text{ nm}}$	细胞存活率/%
CK	0.63 ± 0.02	99.80 ± 3.76
V	$(0.24\pm 0.04)**$	$(38.74\pm 4.78)**$
T1	$(0.58\pm 0.03)##$	$(92.04\pm 4.46)##$
T2	$(0.51\pm 0.03)##$	$(81.43\pm 4.17)**##$
T3	$(0.41\pm 0.06)*#$	$(64.97\pm 8.75)**#$

***表示处理组与空白组的差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$); #表示与病毒组的差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

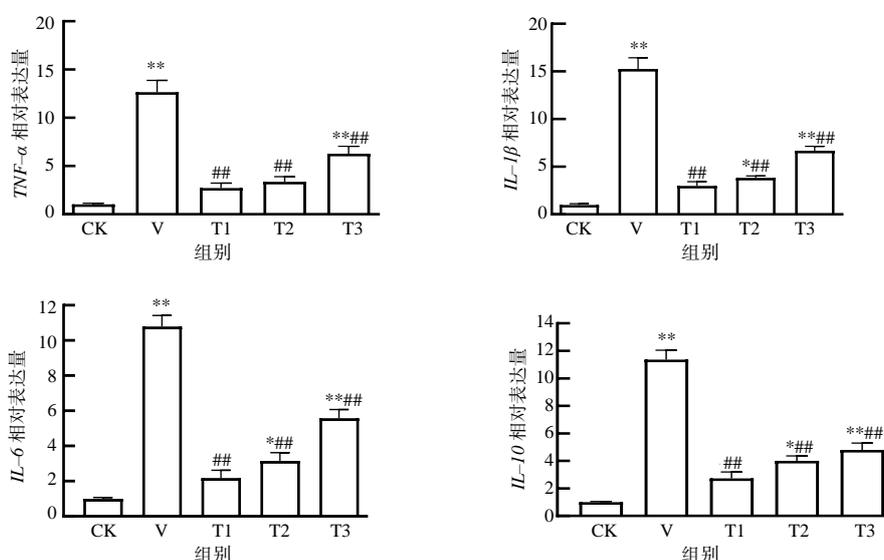
2.3 黄连生物碱对感染 TGEV 的 ST 细胞的 NO 含量及调控酶活性的影响

从表 3 可知,与空白组相比,感染病毒的 ST 细胞的 NO 含量显著或极显著升高, TNOS 和 iNOS 活性显著或极显著增强;经过黄连生物碱处理后,高、中、低剂量组细胞 NO 含量明显下降,与模型组相比差异极显著;高、中剂量组 TNOS 和 iNOS 酶活性降低,与模型组相比较差异极显著,低剂量组 TNOS 和 iNOS 活性与模型组相比较差异显著。

表 3 黄连生物碱处理的感染 TGEV 的 ST 细胞中的 NO 含量及调控酶活性

组别	NO 含量/ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	TNOS 活性/ (U mL^{-1})	iNOS 活性/ (U mL^{-1})
CK	3.46 \pm 2.10	0.31 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02
V	(54.47 \pm 6.06)**	(0.71 \pm 0.03)**	(0.44 \pm 0.04)**
T1	(7.93 \pm 4.06)###	(0.41 \pm 0.08)###	(0.26 \pm 0.03)###
T2	(14.02 \pm 6.49)**##	(0.44 \pm 0.04)###	(0.29 \pm 0.02)###
T3	(30.69 \pm 8.46)###	(0.51 \pm 0.05)###	(0.35 \pm 0.05)###

“**”“***”表示处理组与空白组的差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$)；“#”“##”表示与模型组的差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。



“**”“***”表示处理组与空白组的差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$)；“#”表示与病毒组的差异有统计学意义($P<0.01$)。

图 2 TGEV 感染 ST 细胞的炎症相关基因 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ mRNA 的相对表达量

Fig. 2 The relative expression of mRNA of inflammation related genes $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ and $IL-10$ in ST cells infected by TGEV

3 结论与讨论

本研究结果表明,以活性氮作为细胞炎症调节的重要介质,黄连生物碱可以下调 ST 细胞 NO 含量,降低 TNOS 和 iNOS 的活性,降低 NO 的合成,使细胞的炎症得到明显缓解。ST 细胞感染 TGEV 后, TNOS、iNOS 的活性显著增强, NO 含量急剧升高, NO 可以作为细胞间和细胞内的化学信使^[8],积极参与调控细胞免疫应答反应,对病毒入侵有直接防御作用^[9]。NO 是 L-精氨酸与氧气在一氧化氮合酶的催化作用下产生的, NO 的增强趋向于氧化反应增强,加强了氧化损伤,持续的氧化损伤可能造成非可控的炎症反应^[10]。有研究^[11]表明,黄连生物碱可以抑制 NF- κ B 信号通路的激活,降低 iNOS 的表达和 NO 含量,缓解病毒引起的炎症反应。

2.4 黄连生物碱对感染 TGEV 的 ST 细胞的炎症相关基因 mRNA 表达的影响

从图 2 可知,与空白组相比较,感染病毒的细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ mRNA 的表达水平极显著升高,经黄连生物碱处理后,高、中、低剂量组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ mRNA 的表达极显著降低,且高剂量组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ mRNA 的表达与空白组相比差异不显著,中剂量组 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达与空白组相比较差异不显著。

本研究结果表明,黄连生物碱可以下调 TGEV 感染的 ST 细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ mRNA 的表达,降低病毒持续感染引起的炎症反应,缓解病毒对细胞的损伤。感染 TGEV 后,诱导细胞炎性相关因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ mRNA 的表达升高,表明细胞感染病毒之后会通过分泌大量炎症相关因子,参与细胞的炎症免疫调节。炎症减少可以抑制病毒的复制和扩散^[12]。病毒持续感染细胞,为了增强细胞对病毒的适应性免疫反应,过量的炎症因子是导致细胞病理损伤的重要原因,失调和过度的免疫反应产生的细胞因子形成了细胞因子风暴^[13-14]。细胞因子的调节过程中, $IL-10$ 作为抗炎因子,可以抑制 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 等细胞因子的表达。本试验中,黄连生物碱高剂量组细胞炎症明显消失,由病毒持续刺激引起的细胞因子风暴得到

一定程度的缓解,炎症相关基因 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-10* mRNA 的表达均明显降低,而中剂量组和低剂量的细胞仍然处于炎性状态,炎症相关基因的表达量也持续升高,同时为了增强细胞抗炎反应,抗炎因子 *IL-10* mRNA 表达量也持续升高。

综上,黄连生物碱可通过调节 TNOS 和 iNOS 的活性,降低 NO 的合成,使下游炎性相关因子的表达量减少而发挥抗炎作用。

参考文献:

- [1] TURLEWICZ-PODBIELSKA H, POMORSKA-MÓL M. Porcine coronaviruses: overview of the state of the art[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(5): 833–851.
- [2] 朱买勋, 林渝宁, 周雪. 中药防治猪传染性胃肠炎作用研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(6): 1255–1259.
- [3] 邵秋红, 凌榕镔, 朱兆荣, 等. 复方苦苣对感染猪传染性胃肠炎病毒的 PK-15 细胞中 Bcl-2/BAX mRNA 转录的影响[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(11): 2242–2250.
- [4] FAN X Q, HU H Y, CHEN D W, et al. Lentinan administration alleviates diarrhea of rotavirus-infected weaned pigs via regulating intestinal immunity[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12(1): 43.
- [5] 朱买勋, 翟少钦, 郑华, 等. 连梅提取液对湿热泻痢仔猪的血清抗氧化指标、胃肠调节酶及十二指肠凋亡基因表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(1): 166–173.
- [6] 朱买勋, 唐红梅, 陈春林, 等. 黄连提取物对 TGEV 的体外抑制效果[J]. *西北农业学报*, 2020, 29(5): 801–807.
- [7] 殷震, 刘景华. *动物病毒学*[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [8] CHEN T, CHEN C Z, HUANG Y L, et al. Ethanolic extract of Puhuang(Pollen Typhae) modulates lipopolysaccharide induced inflammatory response through inducible nitric oxide synthase/cyclooxygenase-2 signaling in RAW 264.7 macrophages[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 41(6): 836–844.
- [9] 陈耿, 张书霞, 华利忠. PCV2 对仔猪胸腺 *IL-2*、*IL-6* 和 *IL-10* 及其受体 mRNA 的影响及 NO-NOS 系统的调控[J]. *南京农业大学学报*, 2011, 34(3): 101–106.
- [10] MARTINEZ-SANCHEZ G, AL-DALAINI S M, MENENDEZ S, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2005, 523(1/2/3): 151–161.
- [11] 潘晓丽, 向晖, 谢运飞, 等. 黄连碱基于 NF- κ B 信号通道的体外抗炎实验研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(12): 951–954.
- [12] 李萌. PCV3 Cap 和 Rep 诱导相关细胞因子 mRNA 转录及 *IL-10* 表达机制的初步研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- [13] DAVIDSON S, MAINI M K, WACK A. Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2015, 35(4): 252–264.
- [14] WANG C L, XUE M, WU P, et al. Coronavirus transmissible gastroenteritis virus antagonizes the antiviral effect of the microRNA miR-27b via the IRE1 pathway[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(7): 1413–1429.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维