

引用格式:

曾露芝, 吴春晨, 向蒙, 彭逸斯, 王哲, 汪启明, 刘实, 彭国平. 羧甲基茯苓多糖对肠道病毒 71 型的抗病毒活性及其机制研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(5): 104–111.

ZENG L Z, WU C C, XIANG M, PENG Y S, WANG Z, WANG Q M, LIU S, PENG G P. Study on the antiviral activity of carboxymethyl poria polysaccharide against enterovirus 71 and its mechanism[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(5): 104–111.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



羧甲基茯苓多糖对肠道病毒 71 型的 抗病毒活性及其机制研究

曾露芝¹, 吴春晨², 向蒙¹, 彭逸斯¹, 王哲¹, 汪启明¹, 刘实³, 彭国平^{1*}

(1.湖南农业大学道地药用植物规范化栽培与综合利用湖南省工程实验室, 湖南 长沙 410128; 2.湖北省妇幼保健院检验科, 湖北 武汉 430070; 3.武汉大学病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 为研究羧甲基茯苓多糖(CMP)对肠道病毒 71 型(EV71)的抗病毒活性, 并探讨其作用机制, 采用 CCK-8 法检测 CMP 对人恶性胚胎横纹肌瘤细胞(RD 细胞)增殖的影响; 采用致细胞病变效应(CPE)法观察 CMP 对 EV71 感染引起的 CPE 的抑制作用; 采用致半数细胞病理改变的病毒感染剂量(TCID₅₀)法检测 CMP 对 EV71 感染性病毒颗粒的抑制水平; 采用 RT-qPCR 法检测 EV71 结构蛋白 VP1 的表达; 采用 Western blotting 法分析 VP1、P62、LC3、Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白的表达。结果表明: 不同质量浓度(0、250、500、1 000 μg/mL)CMP 对 RD 细胞无明显的细胞毒性; 与对照组相比, CMP 在无毒性浓度范围内可有效抑制 EV71 的复制, 且能够呈剂量依赖性地降低病毒感染引起的细胞病变效应; CMP 可呈剂量依赖性地降低 EV71 病毒结构蛋白 VP1 的表达和子代感染性病毒颗粒的产生; CMP 可下调 EV71 病毒感染的 RD 细胞中的 LC3-II、cleaved Caspase-3 的表达。

关键词: 羧甲基茯苓多糖; 肠道病毒 71 型; 抗病毒活性

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)05-0104-08

Study on the antiviral activity of carboxymethyl poria polysaccharide against enterovirus 71 and its mechanism

ZENG Luzhi¹, WU Chunchen², XIANG Meng¹, PENG Yisi¹,
WANG Zhe¹, WANG Qiming¹, LIU Shi³, PENG Guoping^{1*}

(1.Hunan Engineering Laboratory of Standardized Cultivation and Comprehensive Utilization of Indigenous Medicinal Plants, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Department of Clinical Laboratory, Hubei Maternal and Child Health Hospital, Wuhan 430070, China; 3.State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: To investigate the antiviral activity and potential mechanism of carboxymethyl pachyman(CMP) against enterovirus 71(EV71), the effect of CMP on the proliferation of RD cells was detected by CCK-8 method. The cytopathic effect(CPE) method was used to observe the inhibitory effect of CMP on the CPE caused by EV71 infection. The median tissue culture infective dose(TCID₅₀) method was used to detect the inhibitory level of CMP on EV71 infectious virus particles. The expression of EV71 VP1 protein was detected by RT-qPCR. The expressions of VP1, P62, LC3, Caspase-3 and cleaved Caspase-3 protein were analyzed by Western blotting. The results showed that different mass concentrations(0, 250, 500, 1 000 μg/mL) of CMP had no significant cytotoxicity on RD cells. Compared with the control group, CMP effectively inhibited the replication of EV71 in the range of non-toxic concentrations of EV71 replication and dose-

收稿日期: 2023-12-24

修回日期: 2024-03-13

基金项目: 湖湘高层次人才聚集工程项目(2021RC5006); 湖北省自然科学基金项目(2022CFB564)

作者简介: 曾露芝(1997—), 女, 湖南益阳人, 硕士研究生, 主要从事中草药资源综合开发与中草药生物技术研究, 570874673@qq.com;

*通信作者, 彭国平, 博士, 副教授, 主要从事中草药资源开发与生物技术、有效成分分离纯化与功能开发、中草药规范化栽培与加工研究, pgphh@163.com

dependently reduced the cytopathic effect caused by viral infection. CMP dose-dependently reduced the expression of EV71 viral structural protein VP1 and decreased the production of infectious viral particles in the offspring. CMP down-regulated the expression of LC3-II and cleaved Caspase-3 after EV71 virus infection of RD cells.

Keywords: carboxymethyl porphyra polysaccharide; enterovirus 71; antiviral activity

肠道病毒 71 型(EV71)是一种无包膜的单正链 RNA 病毒,属于小核糖核酸病毒科,是引起手足口病的主要病原体^[1-2]。手足口病常见于 5 岁以下儿童尤其是婴幼儿,可引起多样化的临床症状。患者轻则表现为乏力、低热等,重则引起全身脏器感染、危及生命并可能留下后遗症^[3-5]。目前还没有一种被认可的抗肠道病毒特效药物。临床上使用较多的是干扰素 α 喷剂、雾化或早期使用利巴韦林静脉滴注等。虽然这些治疗方法有一定的疗效^[6-9],但均会产生一定的不良反应和生殖毒性。作为茯苓的主要成分,茯苓多糖具有广泛的生物活性,其水溶性和药理活性可以通过羧甲基化结构修饰得到加强。经研究,羧甲基茯苓多糖具有抗氧化^[10-11]、抗肿瘤^[12-13]、抗病毒^[14-17]作用。为此,本文作者对羧甲基茯苓多糖体外抵抗肠道病毒 71 型的能力进行研究,并对其抗病毒机制进行探讨。

1 材料与试剂

1.1 病毒株及细胞

EV71(BrCr)病毒株由中国科学院武汉病毒研究所郑振华研究员赠予。人恶性胚胎横纹肌瘤细胞(RD 细胞)由中国科学院武汉病毒研究所实验室传代保存。

1.2 羧甲基茯苓多糖

羧甲基茯苓多糖(CMP)由道地药用植物规范化栽培与综合利用湖南省工程实验室制备保存。具体制备方法如下:取茯苓粉 20 g 浸泡于 200 mL 85% 乙醇,加入 6.82 g NaOH 于 50 °C 反应 2 h; 随后再次加入 6.80 g NaOH 和 18.9 g 一氯乙酸于 60 °C 反应 6 h,用乙酸调至 pH 为 7; 加入 80% 乙醇获得沉淀物,将沉淀物置于烘箱 45 °C 烘干; 采用 Sevage 法除蛋白后,用 80% 乙醇沉淀,将沉淀物冻干即得羧甲基茯苓多糖。

1.3 试剂

DMEM 培养基(批号 8122501)购自美国 Gibco

公司; D-Hanks 缓冲液(批号 LH25200)、胰酶(批号 LH124175)购自浙江森瑞生物科技有限公司; CCK-8 试剂(批号 A311)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; TRIzol Reagent(390212)和 TRIzol LS Reagent(95162201) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 5×FastKing-RT SuperMix(批号 X0402)购自天根生化科技有限公司; iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(批号 1725124)购自美国 Bio-Rad 公司; RIPA 裂解液(批号 P0013C)、蛋白酶抑制剂 PMSF(ST505)、一抗稀释液(批号 P0103)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; PVDF 膜(BE6011)购自 Millipore 公司; 超敏 ECL 显色液(BOL1001)购自佰欧乐基生物科技有限公司; 牛血清白蛋白(批号 A116563)、利巴韦林(批号 R101754)购自上海阿拉丁科技生化科技股份有限公司; Caspase-3 抗体(批号 D3R6Y)、LC3 抗体(批号 3868S)购自美国 CST 公司; P62 抗体(批号 18420-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司; EV71 VP1 抗体由中国科学院武汉病毒研究所郑振华组制备。

1.4 仪器

主要试验仪器包括 CO₂ 恒温培养箱(普和希健康医疗器械有限公司)、生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司)、倒置显微镜(奥林巴斯有限公司)、酶标仪(安图实验仪器有限公司)、Real-Time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测 CMP 的细胞毒性

将 RD 细胞接种于 96 孔板中,待细胞融合度为 90% 时,加入用细胞维持液稀释的不同质量浓度(0、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 CMP 或对照药物利巴韦林(RBV, 质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于 37 °C、5%(体积分数) CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,弃培养基,加入含 10%(体积分数) CCK-8 试剂的细胞维

持液于 CO₂ 培养箱中孵育 0.5 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的溶液吸光度。

$$S = [(A_a - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$$

式中: S 为相对细胞活力; A_a 为试验孔中溶液吸光度, 该溶液中含有细胞的培养基、CCK-8、待测物质; A_c 为对照孔中溶液吸光度, 该溶液中含有细胞的培养基和 CCK-8, 没有待测物质; A_b 为空白孔中溶液吸光度, 该溶液中不含细胞的培养基、待测物质和 CCK-8。

2.2 TCID₅₀ 法检测病毒滴度

在 96 孔板中每孔接种 RD 细胞, 过夜培养后, 将病毒液用含 10%(体积分数) FBS 的 DMEM 连续稀释 10^k 倍($k=1, 2, \dots, 7, 8$)后加入 RD 细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 2~3 d; 在显微镜下观察 CPE, 通过 Reed-Muench 法计算组织细胞培养半数感染剂量 TCID₅₀。

2.3 RT-qPCR 法检测病毒拷贝数

在 12 孔培养板的每个孔中接种 RD 细胞, 待细胞长成单层贴壁细胞后, 用感染复数为 0.01 的 EV71 病毒侵染细胞 1.5 h, 弃病毒液, 将其换成细胞维持液或含药物的细胞维持液于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。用 Trizol 试剂按标准方法提取细胞 RNA。将 RNA 反转录为 cDNA 后, 测定其浓度。

鉴于 EV71 病毒的蛋白 VP1 的基因编码序列保守性高, 在获得 EV71 病毒 cDNA 后, 针对 EV71 的 VP1 区域设计引物序列(正向引物序列为 CCAGAATTCAGGGGACAGAGTGGCAGAGATG TGATTG, 反向引物序列为 AACGGATCCTTAGA GCGTAGTAGTGATTGCCGTTTCG), 扩增得到 VP1 的 cDNA 片段, 切胶回收后将 EV71 VP1 的 cDNA 片段与 T 载体连接构建质粒。转化、获取单克隆质粒后, 测定其浓度, 将获得的质粒以 10 倍梯度稀释, 之后按照 SYBR Green 荧光定量试剂说明书配制反应液进行荧光定量反应。根据荧光信号的变化可以计算出 EV71 VP1 的 cDNA 拷贝数即病毒拷贝数。

2.4 Western Blotting 法检测蛋白的表达

用 RIPA 缓冲液提取细胞总蛋白, 用 SDS 缓冲液使其变性, 100 °C 煮沸 10 min, 蛋白质经 12%(质

量分数) SDS-PAGE 胶分离后, 转移到 PVDF 膜上。用 5%(质量分数)BSA 封闭 1 h, 4 °C—抗孵育过夜。用 TBST 洗涤, 之后结合 1:10 000 稀释的抗兔或抗鼠辣根过氧化物酶抗体孵育 1 h。孵育后, 用 TBST 洗涤 5 次。最后, 采用全自动化学发光图像分析系统分析经 ECL 显色液显色的免疫反应带。

2.5 数据的统计分析

试验数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 以参数平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 2 组样本间的比较采用 t 检验, 多组样本间的比较采用方差分析。

3 结果与分析

3.1 CMP 对 RD 细胞的细胞毒性

将不同质量浓度(0、250、500、1 000 μg/mL)的 CMP 及对照药物 RBV(RBV 对照组中 CMP 质量浓度为 0 μg/mL)处理 RD 细胞 24 h, 通过 CCK-8 法检测不同质量浓度的 CMP 对相对细胞活力(CMP 组、RBV 组细胞相对于正常细胞的活力)的影响, 如图 1 所示。图 1 中, n 为样本数。

结果表明, CMP 在所选用质量浓度范围内无明显细胞毒性。

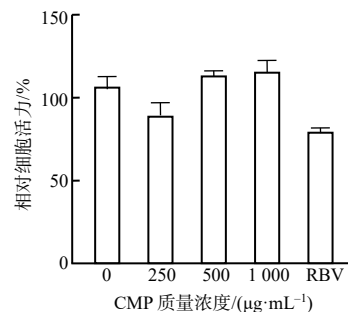
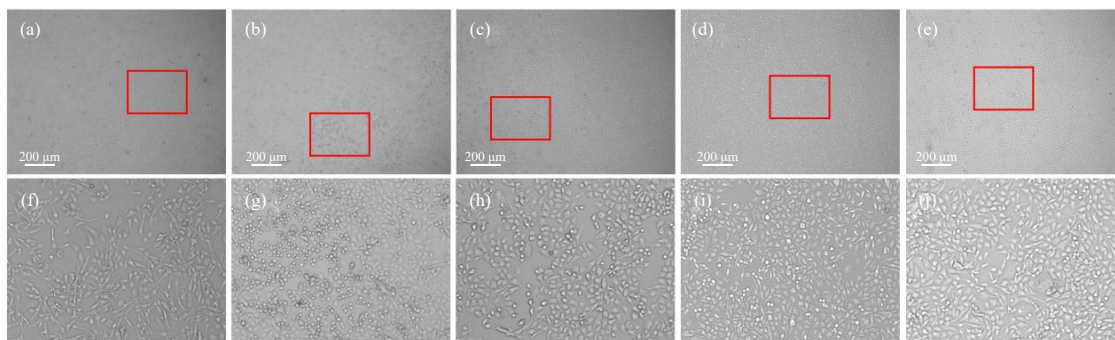


图 1 不同 CMP 质量浓度下的相对细胞活力($n=6$)

Fig.1 Relative cell viability at different mass concentrations of CMP($n=6$)

3.2 CMP 减弱 EV71 感染导致的细胞病变效应

EV71 感染 RD 细胞后, 加入不同质量浓度 CMP, 于感染后 24 h 利用倒置光学显微镜观察 CMP 对 EV71 致 CPE 效应的影响, 见图 2。结果显示, 与未感染病毒的对照组相比, EV71 感染 24 h 后, 细胞开始出现皱缩变圆, 部分脱落、死亡, 呈碎片状漂浮于维持液中(图 2(b)、图 2(g)); CMP 组能明显降低病毒感染导致的 CPE 效应, 且随着 CMP 质量浓度的增加, 对细胞病变效应的缓解呈剂量依赖效果(图 2(c)~图 2(e)、图 2(h)~图 2(j))。



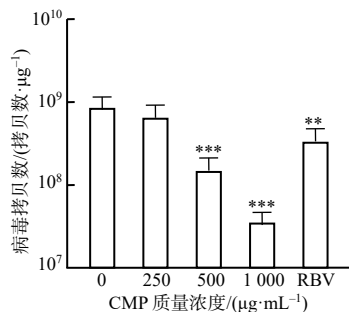
(a) 未感染病毒的对照组; (b) 感染病毒的对照组; (c) 感染病毒、同时用 250 µg/mL CMP 孵育的试验组; (d) 感染病毒、同时用 500 µg/mL CMP 孵育的试验组; (e) 感染病毒、同时用 1 000 µg/mL CMP 孵育的试验组; (f) 图(a)的局部放大图; (g) 图(b)的局部放大图; (h) 图(c)的局部放大图; (i) 图(d)的局部放大图; (j) 图(e)的局部放大图。

图 2 CMP 对 EV71 致细胞病变效应的影响

Fig.2 Effects of CMP on the cytopathic effect of enterovirus 71

3.3 CMP 抑制 EV71 的复制

将感染复数为 0.01 的 EV71 感染 RD 后, 加入药物培养 24 h。收集 RBV 对照组及不同质量浓度 CMP 组(其中, 0 µg/mL CMP 组即为病毒对照组)细胞样品, 提取 RNA, 反转录后进行荧光定量检测, 结果见图 3。由图 3 可见: CMP 对 RD 细胞内 EV71 病毒的复制起抑制作用, 抑制作用强度随着 CMP 质量浓度呈剂量依赖性效应; 且 500 µg/mL、1 000 µg/mL CMP 组病毒拷贝数极显著低于病毒对照组的($P < 0.001$), 其抑制作用强度均大于 RBV 对照组的。



“***”和“****”分别表示与病毒对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)。

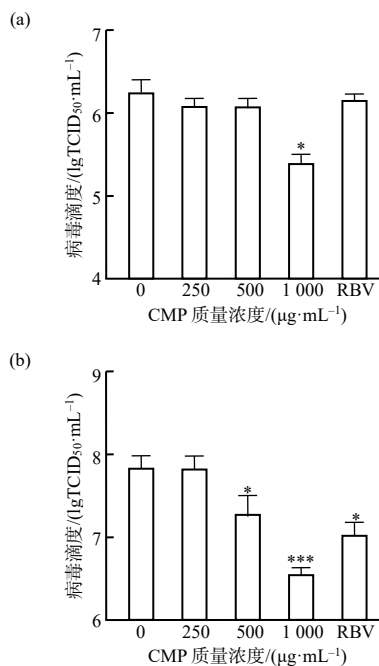
图 3 CMP 对病毒拷贝数的影响($n=3$)

Fig.3 Influence of CMP on virus copy number($n=3$)

3.4 CMP 抑制 EV71 感染性病毒颗粒的产生

用感染复数为 0.01 的 EV71 感染 RD 细胞, 加入不同质量浓度的 CMP 培养 24 h 后收取上清和胞内样品, 分析 CMP 对感染性病毒颗粒的产生的影响, 见图 4。图 4 结果表明, 在一定的质量浓度范围内, 随着 CMP 质量浓度逐渐升高, 病毒滴度逐渐下降, 显示 CMP 呈剂量依赖地抑制 EV71

感染性病毒颗粒的产生。CMP 能有效降低细胞中 EV71 活病毒颗粒的合成, 提示 CMP 可能影响 EV71 在细胞中的装配和合成; 上清液中低质量浓度 CMP 组病毒滴度与病毒对照组的差异不大, 高质量浓度 CMP (1 000 µg/mL)组中病毒滴度相较于病毒对照组的极显著降低($P < 0.001$), 提示 CMP 影响 EV71 的释放阶段。



“***”和“****”分别表示与病毒对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$)。

(a) 上清液; (b) 细胞液。

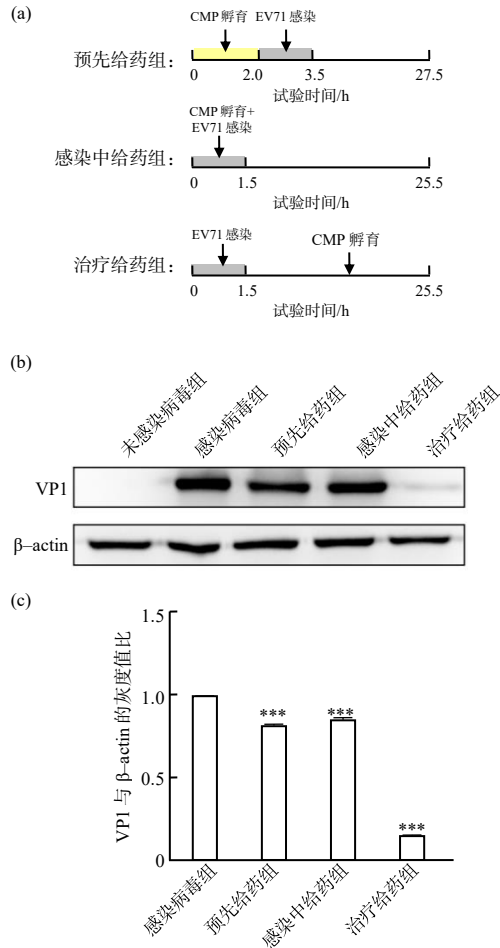
图 4 CMP 对 EV71 感染性病毒颗粒产生的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of CMP on the production of EV71 infectious virus particles($n=3$)

3.5 不同给药方式对 EV71 VP1 合成的影响

为探究最佳的给药方式, 设置不同加药方式,

通过检测 VP1 蛋白的表达研究其对病毒复制情况的影响。设置未感染病毒对照组和感染病毒对照组, 试验组采用预先给药、感染中给药和治疗给药 3 种方式, 具体如图 5(a)所示。图 5 的结果表明, CMP 在预防、感染和治疗阶段均能下调病毒蛋白的表达, 抑制病毒的吸附和复制过程。



****表示与感染病毒组相比差异有统计学意义($P < 0.001$)。

(a) 不同加药方式示意图; (b) Western Blotting 检测不同加药方式对 EV71 VP1 蛋白表达的影响; (c) 图(b)的灰度值分析。

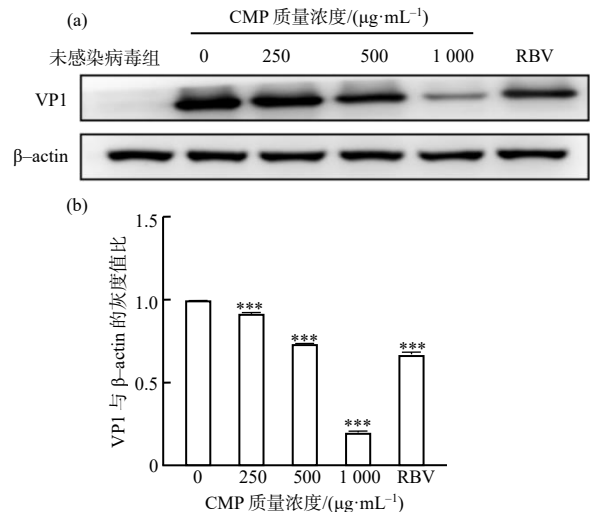
图 5 CMP 对 EV71 病毒的预防、治疗 and 直接杀灭作用分析($n=3$)

Fig.5 Analysis of the prevention, treatment and direct killing effects of CMP on EV71($n=3$)

3.6 CMP 抑制 EV71 VP1 蛋白的合成

为进一步确定 CMP 对 EV71 VP1 蛋白的抑制作用, 在病毒感染 RD 细胞后, 用不同质量浓度

CMP(其中, 0 $\mu\text{g/mL}$ CMP 组即为病毒对照组)孵育细胞 24 h, 结果见图 6。图 6 结果表明, CMP 呈剂量依赖性地显著抑制 EV71 VP1 蛋白的表达, 且高质量浓度 CMP(1 000 $\mu\text{g/mL}$)的抑制效果优于利巴韦林的抑制效果。



****表示与病毒对照组相比差异有统计学意义($P < 0.001$)。

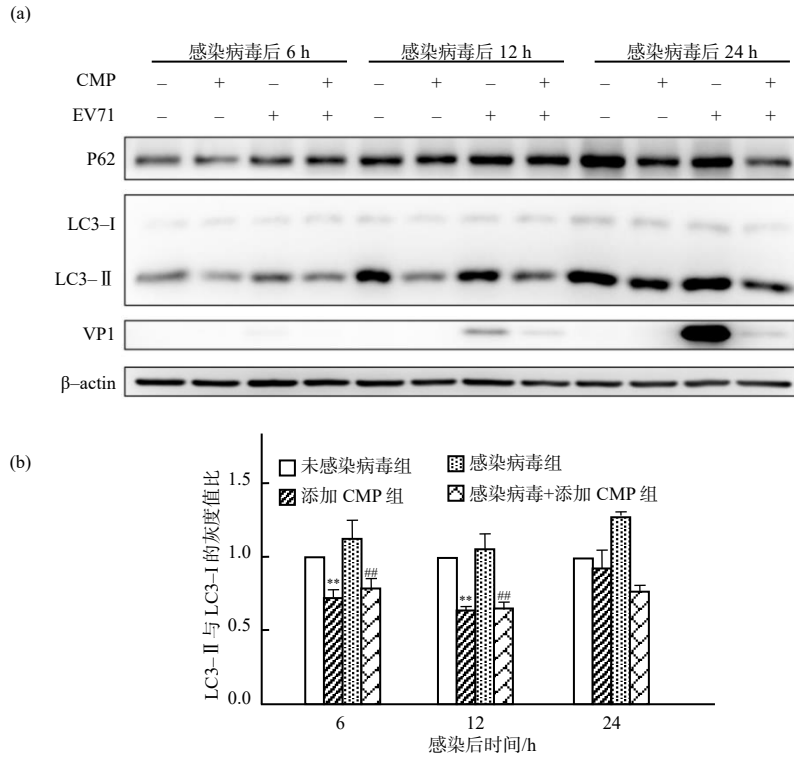
(a) Western Blotting 检测 CMP 和 RBV 对 EV71 VP1 蛋白合成的影响; (b) 图(a)的灰度值分析。

图 6 CMP 和 RBV 对 EV71 VP1 蛋白合成的影响($n=3$)

Fig.6 Influence of CMP and RBV on EV71 VP1 protein production($n=3$)

3.7 CMP 抑制 EV71 感染后细胞的自噬

自噬和凋亡是宿主细胞在遭受病毒感染时的自我防御机制。据报道, EV71 能诱导细胞自噬和凋亡, 并通过诱导自噬从而促进病毒复制^[18-21]。为探究病毒感染的不同阶段细胞自噬的发生情况, 以感染复数为 0.01 的 EV71 感染 RD 细胞, 用 CMP(1 000 $\mu\text{g/mL}$)孵育细胞 24 h, 其间收集不同时间(6 h、12 h、24 h)的细胞蛋白样品, 检测细胞自噬相关蛋白和 EV71 结构蛋白 VP1 的表达, 结果见图 7。由图 7 可见: 在选取的 3 个时间段, 相较于未感染病毒的对照组, CMP 均能够降低 LC3-II 的表达; 相较于病毒对照组, 加入 CMP 后也能降低 LC3-II 的表达。同时, EV71 VP1 蛋白的表达也随之下降, 提示 CMP 可能通过下调细胞自噬程度从而减少病毒的复制。



“***”表示当感染后时间相同时，与未感染病毒组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)；“###”表示当感染后时间相同时，与感染病毒组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

(a) Western Blotting 检测自噬相关蛋白的表达；(b) 感染病毒 24 h 后 LC3-II 与 LC3-I 的灰度值比。

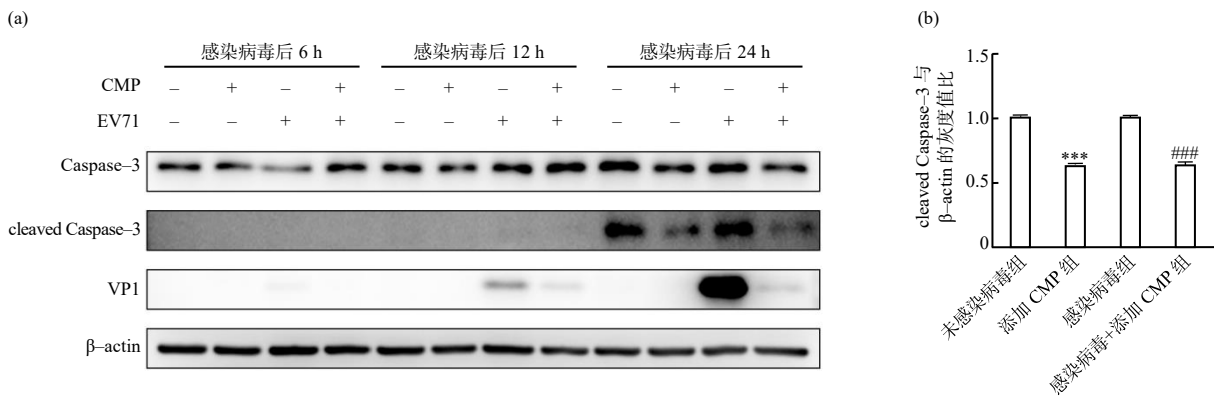
图 7 CMP 影响病毒感染后的细胞自噬($n=3$)

Fig.7 The effect of CMP on the autophagy of infected cells($n=3$)

3.8 CMP 抑制 EV71 感染后细胞的凋亡

EV71 感染会触发细胞凋亡过程，这一过程不仅导致机体细胞受损，还会帮助病毒逃避机体免疫系统的监视，进而促进病毒的复制^[22]。Western Blotting 检测结果(图 8(a))发现，EV71 感染引起的细胞凋亡与病毒载量呈正相关，而 CMP 能抑制因

EV71 感染引起的细胞凋亡。从图 8(b)可见，与未感染病毒组相比，CMP 能够显著降低 cleaved Caspase-3 的表达量($P < 0.001$)；与感染病毒组相比，在感染病毒后添加 CMP 也能够显著降低 cleaved Caspase-3 的表达量($P < 0.001$)。



“****”表示与未感染病毒的对照组相比， $P < 0.001$ ；“####”表示与感染 EV71 的对照组相比， $P < 0.001$ 。

(a) Western Blotting 检测细胞凋亡相关蛋白的表达；(b) 感染病毒 24 h 后 cleaved Caspase-3 蛋白表达的灰度值分析。

图 8 CMP 影响病毒感染后的细胞凋亡($n=3$)

Fig.8 The effect of CMP on the apoptosis of infected cells($n=3$)

4 讨论

肠道病毒引发的手足口病是世界各国面临的严重的公共卫生问题。2015年,首个肠道病毒71型的全病毒灭活疫苗获得中国食品药品监督管理局批准,该疫苗的问世对降低儿童手足口病的患病率具有重大意义。尽管如此,肠道病毒各族之间不具有交叉免疫,且疫苗对其他病毒变异株的预防效果犹未可知,因此,开发安全有效的抗肠道病毒药物是具有现实意义的^[23]。

VP1蛋白是肠道病毒71型重要的结构蛋白,VP1区含有大多数病毒中和位点,且具有与肠道病毒血清型完全对应的抗原和遗传多样性,被认为是肠道病毒基因组进化分析和基因分型最适宜区域。VP1的序列保守性有利于疫苗开发,也为其作为检测试剂提供了可能性,故本文作者在检测病毒拷贝数和病毒结构蛋白合成情况时选择VP1作为检测指标。

肠道病毒71型感染后引起的重症多为表达过激的炎症反应,而细胞自噬与细胞凋亡作为维持细胞环境稳态的重要因素,对机体应对病毒感染具有重要意义。病毒多通过调节细胞信号来逃避宿主免疫,Caspase-3是细胞凋亡过程中的关键执行者之一,Caspase-3在接收到凋亡信号并与凋亡受体结合后被激活,生成活化的cleaved Caspase-3^[24-25]。LC3是一种主要参与自噬体的形成的自噬体膜上的标记蛋白,LC3正常情况下在细胞质中以I型形式存在,并在细胞自噬发生时转变为LC3-II。LC3-II被认为是自噬标记物,在一定程度上反映了自噬体的数量^[26]。p62蛋白是选择性自噬受体,其与泛素化蛋白结合进入自噬小体后,进一步与溶酶体结合形成自噬溶酶体从而被降解,p62蛋白的表达水平与自噬水平的发生呈负相关^[27]。本研究表明,CMP在病毒复制的早期和增长期对细胞自噬均有抑制作用;在EV71复制的增长期,随着VP1蛋白的合成的增加,CMP能显著抑制Caspase-3活化成cleaved Caspase-3,但CMP是否通过抑制VP1蛋白的形成影响Caspase-3蛋白的活化,减弱细胞凋亡,从而起到抗病毒作用还需进一步探究。

肠道病毒71型在临床上并无特效药,利巴韦

林作为广谱抗病毒药物也用于肠道病毒的治疗中,对比CMP与RBV对肠道病毒71型的抑制效果发现,高质量浓度CMP可达到与RBV相近的抑制作用。在对加药方式进行探究时发现预先孵育CMP 2 h和在感染病毒后加入CMP均可达到明显抑制病毒蛋白复制的作用,提示羧甲基茯苓多糖或可通过抑制病毒的吸附和释放过程从而起到抗病毒作用。

5 结论

CMP对EV71感染后细胞病变效应的产生、病毒mRNA的生成、病毒结构蛋白VP1的合成、感染性病毒颗粒的合成与释放都具有抑制作用,其可能通过抑制EV71病毒的吸附和释放过程、干扰病毒结构蛋白VP1的表达而发挥抗病毒活性。CMP能显著抑制LC3-II、cleaved Caspase-3蛋白的表达,提示CMP可能通过影响细胞自噬和细胞凋亡来起到抗EV71复制的作用。

参考文献:

- [1] CHEN P, TAO Z X, WANG H Y, et al. Progress in research of new human enterovirus types[J]. Chinese Journal of Virology, 2013, 29(2): 211-217.
- [2] NASRI D, BOUSLAMA L, PILLET S, et al. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics 2007, 7(4): 419-434.
- [3] 褚维, 华哲云, 娄铁群, 等. 常见手足口病肠道病毒病原学及流行病学研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2022, 36(4): 494-498.
- [4] 冯樊. 手足口病流行病学及其防治研究进展探索[J]. 中国社区医师, 2022, 38(23): 4-6.
- [5] 张静, 李秀惠, 李丽, 等. 手足口病病原学和流行病学研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43(5): 771-783.
- [6] 黄欢, 张芳霞, 段森, 等. 《抗病毒药物在儿童病毒感染性呼吸道疾病中的合理应用指南》解读[J]. 中国全科医学, 2021, 24(26): 3276-3280, 3294.
- [7] 丁毅伟, 韦欢欢, 朱俊萍, 等. 中国手足口病血清流行病学研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(6): 1074-1078, 1083.
- [8] 中国医院协会, 国家儿童医学中心(北京), 国家感染性疾病医疗质量控制中心, 等. 抗病毒药物在儿童病毒感染性呼吸道疾病中的合理应用指南[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(19): 1441-1450.

- [9] 国家卫生健康委员会. 手足口病诊疗指南(2018 年版)[J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8(5): 347-352.
- [10] 熊芳琪, 刘欣, 杨岚, 等. 羧甲基茯苓多糖体外抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(7): 39-41.
- [11] 程水明, 刘莹, 梅光明, 等. 羧甲基茯苓多糖的抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(3): 1-5.
- [12] 程金生, 赵进, 黄徽. 羧甲基茯苓多糖的制备及抗肿瘤药效学研究[J]. 右江医学, 2008, 36(4): 386-388.
- [13] 陈春霞, 赵大明, 张秀军, 等. 羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤实验[J]. 福建中医药, 2002, 33(3): 38-40.
- [14] 强华贵, 杨占秋. 羧甲基茯苓多糖体外抗艾滋病病毒作用研究[J]. 医药导报, 2008, 27(10): 1156-1158.
- [15] 陈继岩. 羧甲基茯苓多糖抗乙型肝炎病毒的体内与体外研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(2): 66-70.
- [16] 段会平. 羧甲基茯苓多糖体外抗乙肝病毒作用的实验研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2004.
- [17] 张信岳, 杨根元, 梁丽坚, 等. 羧甲基茯苓多糖钠体外抗单纯疱疹病毒 I 型的作用[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 161-163.
- [18] XI X Y, ZHANG X Y, WANG B, et al. The interplays between autophagy and apoptosis induced by enterovirus 71[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56966.
- [19] LI H, GAO J X, LIU D, et al. Characteristics of autophagy induced by enterovirus71(EV71) viral protein[J]. Journal of Tropical Diseases, 2018, 6(5): 1000286.
- [20] SAVITSKAYA M A, ONISHCHENKO G E. Mechanisms of apoptosis[J]. Biochemistry(Moscow), 2015, 80: 1393-1405.
- [21] LUO W Y, YANG L W, PAN Q J, et al. Enterovirus 71 can induce autophagy and apoptosis of THP-1 macrophages[J]. Journal of Southern Medical University, 2020, 40(6): 828-836.
- [22] BAI Z Z, ZHAO X N, LI C H, et al. EV71 virus reduces Nrf2 activation to promote production of reactive oxygen species in infected cells[J]. Gut Pathogens, 2020, 12: 22.
- [23] MAO Q Y, WANG Y P, BIAN L L, et al. EV71 vaccine, a new tool to control outbreaks of hand, foot and mouth disease(HFMD)[J]. Expert Review of Vaccines, 2016, 15(5): 599-606.
- [24] 叶清华. Caspase-3 与细胞凋亡研究进展[J]. 饮食科学, 2019(10): 270.
- [25] SUEHIRO Y, TSUGE M, KURIHARA M, et al. Hepatitis B virus(HBV) upregulates TRAIL-R3 expression in hepatocytes resulting in escape from both cell apoptosis and suppression of HBV replication by TRAIL[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2023, 227(5): 686-695.
- [26] MENG Y C, LOU X L, YANG L Y, et al. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2020, 146(5): 1103-1113.
- [27] BOYLE K B, RANDOW F. The role of eat-me signals and autophagy cargo receptors in innate immunity[J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(3): 339-348.

责任编辑: 伍锦花
英文编辑: 柳正