

藏茵陈对小鼠冠状病毒性肝炎细胞 caspase-3 影响*

苏丽贤¹, 汤朝晖¹, 罗炳德¹, 林培政², 万为人¹, 郭进强¹

摘要:目的 观察小鼠冠状病毒性肝炎肝细胞中 caspase-3 介导的凋亡机制变化,探讨藏茵陈对其干预作用及相关机制。方法 将 24 只小鼠随机分成对照组、模型组、阳性对照组和藏茵陈组,造模成功后用赖氏法测定小鼠血清肝功能 2 项,苏木素-伊红染色光镜观察小鼠肝脏病理变化,用酶标仪检测肝匀浆 caspase-3 活性,用荧光定量 PCR 检测肝组织中 Fas 和 caspase-3 mRNA 含量。结果 与对照组比较,模型组小鼠 ALT、AST 活力分别为(225.349 ± 9.904)、(180.823 ± 17.34) U/L,明显升高;病理切片显示肝脏损伤明显,caspase-3 活性(0.371 ± 0.051)、Fas 和 caspase-3 mRNA 含量(1.93 ± 0.08、0.867 ± 0.102)均明显升高;藏茵陈干预后 ALT、AST 分别为(181.906 ± 20.164)和(139.824 ± 12.153) U/L,Fas 和 caspase-3 mRNA 含量为(1.673 ± 0.047)和(0.518 ± 0.103),明显低于模型组($P < 0.05$)。病理切片显示,藏茵陈组小鼠肝脏损伤与模型组比较有所改善。结论 Fas 诱导的 caspase-3 细胞凋亡可能是小鼠冠状病毒性肝炎的致病机制之一,藏茵陈可通过抑制细胞凋亡并改善肝脏损伤程度。

关键词:藏茵陈;鼠肝炎冠状病毒;Fas;caspase-3

中图分类号:R 512.6

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2012)01-0056-03

Effect of Tibetan Artemisiae Capillaries on caspase-3 in mice with hepatitis virus infection SU Li-xian, TANG Zhao-hui, LUO Bing-de et al. Department of Child and Adolescent Health School of Tropical Medicine and Public Health Southern Medical University(Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To observe the changes of caspase-3 in liver cells of mice with hepatitis virus infection and to explore the intervening effect and mechanism of Tibetan Artemisiae Capillaries(TAC) on caspase-3. **Methods** Twenty-four mice were randomly divided into four groups: control group, model group, virus group and TAC group. Then serum contents of alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST) were detected with Lai's method and pathological changes of the liver were observed with light microscope after haematoxylin eosin(HE) staining. The activity of caspase-3 was detected by microplate reader. The contents of factor associated suicide(Fas) and caspase-3 mRNA were detected by quantitative PCR. **Results** Compared with the control group all of the indicators of the model group increased. The content of ALT was 225.349 ± 9.904 and that of AST was 180.823 ± 17.34. The activity of caspase-3 was 0.371 ± 0.051. The contents of Fas and caspase-3 mRNA were 1.93 ± 0.08 and 0.867 ± 0.102. The pathological observation revealed obvious damage of the liver. After the treatment of TAC, the contents of ALT(181.906 ± 20.164), AST(139.824 ± 12.153), Fas(1.673 ± 0.047) and caspase-3 mRNA(0.518 ± 0.103) showed obvious decrease and the same as the activity of caspase-3(0.202 ± 0.029). The pathologic damage of the TAC group was alleviated compared with that of the model one. **Conclusion** The apoptosis induced by Fas/FasL may be one of the mechanism of the hepatitis caused by mouse hepatitis virus-A59(MHV-A₅₉). Tibetan Artemisiae Capillaries can suppress the apoptosis and weaken the damage of the liver.

Key words: Tibetan Artemisiae Capillaries; MHV-A59; Fas; caspase-3

小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)属于冠状病毒的一种,其感染的主要致病机制之一是引起急性慢性肝炎。目前有研究表明,病毒性肝炎可引起肝细胞凋亡,其发生与 caspase 家族有关^[1]。而在 caspase 家族中,caspase-3 是在凋亡途径上直接作用细胞引发凋亡效应的关键终端因子。由于 MHV 病毒目前已被用作严重呼吸系统综合症冠状病毒的良好替代品^[2],因此,本研究以 MHV 感染作为模型,探讨冠状病毒作用机制,同时运用具有抗病毒、护肝、清热祛湿等作用的藏茵陈进行干预处理,为岭南特有气候环境下冠状病毒感染机制研究提供理论基础。

1 材料与方

1.1 动物与病毒 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠(南方医科大学实验动物中心)24 只,9~10 周龄,合格证号: NO. 0057680; 肥甘饲料,由 80% 普通饲料 + 8% 蜂蜜 + 12% 猪油组成(广东省

医学实验动物中心)合格证号: NO. 0055535。

1.2 试剂与仪器 病毒为 MHV-A59 株原液(南方医科大学公共卫生与热带医学学院病毒研究所);藏茵陈为川西獐牙菜品种(成都市荷花池药材市场),含生药 30 g/剂,参考《中医方剂学大辞典》^[3]煎煮方法,浓缩成 0.5 g/kg,于 4℃ 冰箱保存备用;病毒唑(利巴韦林片,阳性对照)(广东省华南药业集团有限公司),批号:090201;ELX808 酶标分析仪(美国宝特公司);显微镜成像装置(郑州南北仪器设备有限公司);人工气候模拟舱(南方医科大学公共卫生与热带医学学院);7500 型实时荧光定量仪和 9700 型普通 PCR 仪(美国 ABI 公司);BG-Power600i 型电泳仪(北京百晶公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、Perfect Real-time PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);胶回收试剂盒(德国 Qiagen 公司);caspase-3 活性检测试剂盒(上海贝博生物试剂公司);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模^[4] 将小鼠分为对照组、模型组(高脂饮食 + 湿热环境 + 病毒)、病毒唑组(阳性对照)和藏茵陈组,每组 6 只,

* 基金项目:国家自然科学基金-广东省联合基金(U0632009)

作者单位:1. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院儿少卫生学系,广东广州 510515; 2. 广州中医药大学

作者简介:苏丽贤(1985-),女,广东人,硕士在读,研究方向:发热的病理生理学。

通讯作者:罗炳德,E-mail: gw@fimmu.com; 林培政,E-mail: lin-peizheng@hotmail.com

适应性饲养 1 d。造模开始,常温下饲养 9 d,对照组用普通饲料喂养,其余各组均用肥甘饲料喂养;于 10 d 将 MHV 病毒原液稀释至 $10^{5.5}$ 倍后,给予模型组小鼠腹腔注射 0.5 mL。分别于病毒感染后第 1、3、5 d 放入气候模拟舱,温度 (32 ± 0.5) °C,湿度 (60 ± 5) %,暴露 3 h,其余时间放置常温环境和肥甘饲料喂养,于造模最后 1 d (第 15 d) 取小鼠血样和肝脏进行检测。

1.3.2 干预方案 藏茵陈根据《中药药理研究方法学》^[5],用量为 12.77 g/kg,病毒唑为 0.05 g/kg。于病毒感染后 2 h 内通过灌胃给药,每次 0.3 mL,藏茵陈组每天 2 次,病毒唑组每天 1 次。自造模第 10 d 起至第 15 d 连续灌胃给药 5 d。正常组与模型组每日灌胃等量生理盐水。

1.3.3 指标测定 小鼠进行眼球采血约 1 mL 并离心后取上清,ALT、AST 试剂盒说明书步骤进行操作;取肝组织石蜡切片行常规苏木素-伊红染色,光镜下观察组织损伤情况; caspase-3 活性测定:取小鼠部分肝脏并用液氮研磨,后按 1:9 比例加入裂解缓冲液,冰浴 10 min,4 °C、15 000 r/min,离心 10 min,收集上清,按说明书进行检测,反应温度 37 °C。取样本 100 μ L, Caspase23 四肽荧光底物 10 μ L 加到含有羧乙基呱嗪乙硫磺酸的缓冲液中,在 37 °C 下作用 1 h,应用酶标仪 405 nm 处测吸光度 (A) 值; Fas 和 caspase-3 mRNA 检测采用荧光定量 PCR 方法。用 Trizol 试剂提取总 RNA,逆转录为 cDNA。引物由广州盈信南方生物技术公司合成,用 SYBR Green I 荧光染料标记。Fas: 5'-AAACAACTGCACCCT-GACC-3', 5'-CAGTGTTTCACAGCCAGGAGA-3', 长度: 84bp; Caspase3: 5'-TTCAGCTATCAGTATTCGAAGC-3', 5'-GTCCGACAGCGGTATCCACATC-3', 长度: 88bp。取样本 cDNA 0.8 μ L, 引物 1.6 μ L, 加入 PCR 试剂盒其他成分,样品在 94 °C 退火 5 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s 和 72 °C 90 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min, 用荧光定量 PCR 检测仪自动进行分析。

1.4 统计分析 实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,多组间比较用单因素方差分析,组间比较用最小显著差 *t* (LSD-*t*) 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠血清 ALT、AST 变化 (表 1) 与对照组比较,模型组 ALT、AST 活力明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较,病毒唑和藏茵陈组,ALT、AST 活力明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠血清 ALT、AST 活力变化 ($\bar{x} \pm s$, U/L $n = 5$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照组	10.28 \pm 2.22	29.97 \pm 8.48
模型组	225.35 \pm 9.90 ^a	180.82 \pm 17.34 ^a
病毒唑组	169.20 \pm 20.30 ^b	137.93 \pm 12.19 ^b
藏茵陈组	181.91 \pm 20.16 ^b	139.82 \pm 13.15 ^b

注:与对照组比较 ^a $P < 0.01$;与模型组比较 ^b $P < 0.01$ 。

2.2 小鼠肝脏肉眼及病理改变 通过病理切片观察到对照组小鼠肝脏表面光滑,质软,光镜下可见肝小叶结构清楚,肝细胞排列整齐;模型组小鼠肝脏表面凹凸不平,呈弥漫性出血点,边缘锐,镜下可见有大片出血灶,肝小叶结构塌陷,肝细胞排列紊乱,肿大,呈气球样变,肝小叶及汇管区有大量中性粒细胞浸润;病毒唑组与藏茵陈组肉眼下肝脏比模型组肝脏表面光滑,出血点减少,肝小叶结构相对完整,肝细胞排列相对

整齐,尤以藏茵陈组明显。

2.3 小鼠肝脏 caspase-3 活性改变 对照、模型、病毒唑与藏茵陈组 caspase-3 活性吸光度 (A) 值分别为 (0.148 \pm 0.028)、(0.371 \pm 0.051)、(0.304 \pm 0.067) 和 (0.202 \pm 0.029)。与对照组比较,模型组明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较,病毒唑与藏茵陈均能降低 caspase-3 活性,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 病毒唑与藏茵陈之间差异无统计学意义。

2.4 小鼠肝组织 Fas 和 caspase-3 mRNA 表达 (表 2) 与对照组比较,模型组小鼠肝组织 fas 和 caspase-3 相对拷贝数明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较,病毒唑与藏茵陈组 fas 和 caspase-3 基因表达下调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 小鼠肝组织 Fas 和 caspase-3 基因表达 ($\bar{x} \pm s$ 拷贝数 $n = 6$)

组别	Fas	Caspase3
对照组	1.105 \pm 0.166	0.317 \pm 0.046
模型组	1.930 \pm 0.080 ^a	0.867 \pm 0.102 ^a
病毒唑组	1.620 \pm 0.061 ^b	0.622 \pm 0.110 ^b
藏茵陈组	1.673 \pm 0.047 ^b	0.518 \pm 0.103 ^b

注:与对照组比较 ^a $P < 0.01$;与模型组比较 ^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

Caspase-3 属于半胱天冬蛋白酶 (caspase) 家族中一员,是凋亡级联反应的重要执行者,其过量激活可诱发细胞的异常凋亡,引起细胞和组织的功能损害,因此活化的 caspase-3 已被作为细胞凋亡标志^[6]。有研究显示,病毒性肝炎中肝细胞异常凋亡与 caspase-3 有密切关系。MHV-A59 属于冠状病毒中的一种,主要引起小鼠急性慢性肝炎及相关症状。本研究结果显示,模型组小鼠感染 MHV-A59 病毒后肝组织损伤明显,其凋亡蛋白 caspase-3 活性明显增强,肝细胞中 Fas 和 caspase-3 mRNA 表达增加,提示模型组小鼠感染 MHV-A59 后,肝细胞膜上增加的自杀相关因子 (factor associated suicide, Fas) 与体内活化成熟 T 细胞中的 Fas 配体 (FasL) 相结合,从而引起肝细胞中的 caspase-3 增加,最终导致肝细胞凋亡增加,表明由 Fas/FasL 介导和 caspase-3 执行的细胞凋亡系统可能是小鼠冠状病毒性肝炎的机制之一。藏茵陈作为藏药的一种,具有清热解毒、祛湿利胆等作用,对病毒性肝炎有一定疗效^[7]。本研究结果显示,藏茵陈能够改善肝组织病理变化及降低血清 ALT、AST 含量,对 MHV-A59 病毒性肝炎有一定的干预作用。研究显示, MHV-A59 感染后肝细胞的病理损害与核转录因子 B 过量激活有关^[8],由此推测藏茵陈对 MHV-A59 感染病毒性肝炎的干预机制可能通过抑制 NF- κ B 的激活,以减弱其对激活细胞毒 T 细胞表达 FasL 的能力,进而减少 Fas/FasL 结合诱导的肝细胞凋亡,达到对冠状病毒性肝炎的治疗目的。

参考文献

- (1) Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury [J]. Curr Mol Med, 2003, 3(6): 491-508.
- (2) 刘忠华, 刘香梅, 闵凡贵, 等. 小鼠冠状病毒替代 SARS 感染模型的建立 [J]. 中华实用医药杂志, 2006, 6(16): 1441-1442.
- (3) 彭怀仁. 中医方剂大辞典 8 分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.

- (4) 王英 邵伟娟 高俊 等. 小鼠肝炎病毒以不同途径感染 4 个品系小鼠的比较[J]. 上海交通大学学报: 农业版 2005 23(2): 126.
- (5) 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- (6) Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death[J]. Nature Med 2000, (65): 513 - 519.
- (7) 胡西白合提 哈斯也提 陈俊逾. 藏茵陈胶囊治疗病毒性肝炎 80 例[J]. 新疆中医药 2001, 19: 28 - 29.
- (8) 晁漪澜 林培政 罗炳德 等. NF- κ B 对小鼠冠状病毒性肝炎致病作用[J]. 中国公共卫生 2010 26(4): 464 - 465.

收稿日期: 2010-11-24

(解学魁编辑 郑新校对)

【检验技术】

抗黄曲霉毒素 B1 单抗制备及免疫学定量方法建立*

王磊^{1,2}, 胡晓飞¹, 滕蔓¹, 王耀², 孙亚宁¹, 裴亚峰², 张改平¹, 邓瑞广¹

摘要:目的 本研究合成并鉴定了 AFB₁ 人工抗原, 制备 AFB₁ 的单克隆抗体(AFB₁mAb)。方法 采用 NHS 法将 AFB₁ 分别偶联于载体蛋白 BSA 和 OVA 上, 分别合成 W 人工抗原 AFB₁-BSA 和 AFB₁-OVA, 紫外分光光度法和 SDS-PAGE 进行鉴定; AFB₁-BSA 免疫 BALB/C 小鼠, 通过间接 ELISA 和阻断 ELISA 法选择细胞融合备用鼠; 用杂交瘤技术制备 AFB₁mAb, 并对其效价、亲和力、敏感性、特异性、亚型进行鉴定; 体内诱生腹水法大量制备单抗。结果 UV 图谱和 SDS-PAGE 图表明结合抗原 AFB₁ 和载体 BSA 及 OVA 偶联成功; 筛选出 2H5-F6、2H5-C9、2H9-C3 三株杂交瘤细胞; 鉴定单抗亚型均为 IgG1; 细胞上清效价 1: 2.0 × 10² ~ 1: 1.28 × 10³, 2H5-F6 的腹水效价 1: 1.28 × 10⁶, AFB₁mAb 亲和常数 K_a 为 2.65 × 10¹⁰ L/mol, 对 AFB₁ 的 IC₅₀ 为 2.58 ng/mL; 与 AFB₂ 的交叉反应率为 1.61%, 与其他类药物无交叉反应。结论 通过试验获得高效价、敏感、特异的 AFB₁mAb, 可用于各种食品中 AFB₁ 残留的快速免疫学检测试验。

关键词: 黄曲霉毒素 B1; 单克隆抗体; 免疫学特性

中图分类号: R 114

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0058-03

Development of monoclonal antibody against Aflatoxin B1 and establishment of immunology quantitative ELISA

WANG Lei, HU Xiao-fei, TENG Man, et al. Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences (Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Objective The goal of this study was to synthesize artificial antigen of AFB₁ to prepare monoclonal antibody against AFB₁. **Methods** Immunogen AFB₁-BSA and coating antigen AFB₁-OVA were synthesized using NHS by linking carrier proteins BSA and OVA to AFB₁ and identified by ultraviolet scanning, SDS-PAGE. BALB/C mice were immunized with AFB₁-BSA, The titre and sensitivity of polyclonal antibody was detected by indirect ELISA and blocking ELISA so as to select the mouse used in cell fusion. AFB₁mAb was prepared by hybridoma technology. The titer, affinity, sensitivity, specificity and subtype of the mAb were characterized. Massive AFB₁mAb were induced from in vivo method. **Results** The results showed that the hapten AFB₁ was successfully linked to carrier proteins by the UV scanning spectrum and SDS-PAGE electrophoresis. There hybridoma cell lines of 2H5-F6, 2H5-C9, 2H9-C3 were screened for specificity to AFB₁, all the isotypes of the mAb were IgG1. The indirect ELISA titer of the mAb were 1: 2.0 × 10² ~ 1: 1.28 × 10³ in supernatant, 1: 1.28 × 10⁶ of 2H5-F6 in ascites and the affinity constant (K_a) was 2.65 × 10¹⁰ L/mol, the mAb of 2H5-F6 showed good sensitivity with IC₅₀ of 2.58 ng/mL to AFB₁. The rate of cross reaction of AFB₁mAb with AFB₂ was 1.61%, and there was no cross-reactivity to other compounds. **Conclusion** AFB₁mAb of high-titer, sensitivity and specificity had been generated, it is possible to establish immunoassay of AFB₁ residues in food.

Key words: Aflatoxin B1; Monoclonal antibody; Immunological trait

黄曲霉毒素是黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉菌 (*Aspergillus parasiticus*) 产生的一组结构类似的代谢产物, 是特剧毒生物毒素, 具有致畸、致癌、致诱变作用, 属于 I 类致癌物, 主要诱发肝癌^[1-2]。Aflatoxin B1 (AFB₁) 广泛存在于粮食、畜禽饲料中, 因此对 AFB₁ 残留开展有效的快速检测很

有意义。WHO、FAD、欧盟、美国等均对 AFB₁ 限量制定明确要求, 我国也确定了 AFB₁ 的检测量^[3]。目前已建立的 AFB₁ 检测方法有薄层色谱法 (thin-layer chromatography, TLC)、高效液相色谱、免疫亲和柱荧光光度法、酶联吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、金标法、微柱筛选法等。这些方法要求对样品进行较繁琐前处理, 需要昂贵的仪器并耗费大量人力, 无法进行大范围推广。因此本研究建立免疫学定量分析方法, 为快速检测提供更好的检测方法。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 AFB₁ (德国 Sigma 公司, 纯度 ≥ 98.0%); N-羧基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) [吉尔生化 (上海) 有限公司]; 羊抗鼠酶标二抗 (goat anti-mouse IgG antibody, GaMIgG-

* 基金项目: 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (201203040); 河南省农业科学院科技发展及示范推广专项基金项目; 河南省基础与前沿项目 (92300410028)

作者单位: 1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南科技大学食品与生物工程学院

作者简介: 王磊 (1985-) 男, 河南沈丘人, 硕士在读, 研究方向: 食品质量安全与快速检测。

通讯作者: 邓瑞广, E-mail: rgd999@163.com