

茶黄素衍生物抗甲型流感病毒的作用研究

李湘澍, 刘叔文, 杨洁*

南方医科大学药学院, 广东 广州 510515

摘要: **目的** 研究茶黄素衍生物的混合物(含茶黄素、茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素-3,3'-双没食子酸酯,简称茶黄素衍生物)抗甲型流感病毒的作用及其机制。**方法** 采用 H5N1 假病毒检测体系,观察茶黄素衍生物对 A/Thailand/Kan353/2004 H5N1 毒株假病毒的抑制作用;采用血凝抑制实验和神经氨酸酶抑制实验进一步分析茶黄素衍生物抗甲型流感病毒的作用机制;采用 H1N1 FM_1 病毒检测体系,观察茶黄素衍生物对甲型流感病毒 FM_1 的抑制作用;采用 MTT 法评价茶黄素衍生物对 MDCK 细胞的毒性。**结果** 茶黄素衍生物能明显的抑制 H5N1 假病毒的感染力, IC_{50} 为 $(151.88 \pm 18.95) \mu\text{g/mL}$;对血凝素 HA1 亚基无抑制作用;对神经氨酸酶具有抑制作用, IC_{50} 为 $(129.09 \pm 1.33) \mu\text{g/mL}$;能明显抑制甲型流感病毒 FM_1 株。此外,茶黄素衍生物对 MDCK 细胞的毒性较小, CC_{50} 为 $(879.89 \pm 4.54) \mu\text{g/mL}$ 。**结论** 茶黄素衍生物可能通过与血凝素 HA2 亚基结合而抑制禽流感病毒的感染,同时能够在一定程度上抑制病毒的神经氨酸酶活性,提示茶黄素衍生物是通过多靶点发挥抗 H5N1 亚型禽流感病毒的作用。

关键词: 茶黄素衍生物;甲型流感病毒;H5N1 亚型;H1N1 亚型;血凝素;神经氨酸酶

中图分类号: R282.710.5; R978.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)17-2437-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.018

Effect of theaflavin derivatives on influenza A virus

LI Xiang-lian, LIU Shu-wen, YANG Jie

School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To study the anti-influenza A virus effect of theaflavin derivatives which contain theaflavin (TF1), theaflavin-3-gallate (TF2A), theaflavin-3'-gallate (TF2B), and theaflavin-3, 3'-digallate (TF3) and to investigate the mechanism. **Methods** The inhibition of theaflavin derivatives on A/Thailand/Kan353/2004 H5N1 pseudovirus was investigated using pseudotype H5N1 virus system. Hemagglutination inhibition assay and neuraminidase (NA) inhibition assay were used to investigate the mechanism for their anti-influenza activities. The inhibition of theaflavin derivatives on influenza A virus FM_1 was observed by H1N1 FM_1 system. Cytotoxicity of theaflavin derivatives on MDCK cells was determined by MTT assay. **Results** Theaflavin derivatives could significantly inhibit the infection of pseudovirus H5N1 with IC_{50} of $(151.88 \pm 18.95) \mu\text{g/mL}$. It had no inhibition on HA1 subunit. Theaflavin derivatives had the inhibition on NA with IC_{50} of $(129.09 \pm 1.33) \mu\text{g/mL}$. Theaflavin derivatives showed a significant inhibitory activity on FM_1 influenza virus strain in MDCK cells. Theaflavin derivatives showed the low cytotoxicity on MDCK cells with CC_{50} of $(879.89 \pm 4.54) \mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Theaflavin derivatives could inhibit the infection of avian influenza virus through the combination with hemagglutinin (HA) HA2 subunit and inhibit the activity of viral NA to some extent, which indicates that the anti-H5N1 avian influenza virus of theaflavin derivatives may be through multi-targets.

Key words: theaflavin derivatives; influenza A virus; subtype H5N1; subtype H1N1; hemagglutinin; neuraminidase

全球每年有 15%~20% 的人感染流感病毒,导致至少 50 万人死亡,流感已成为严重威胁人类健康的疾病^[1]。流感病毒属于 RNA 病毒的正粘病毒科,分为甲、乙、丙 3 个类型,其抗原变异迅速,导致对其防治存在很大的困难,现有的药物仅 4 种,且

只作用于 M2 离子通道和神经氨酸酶 2 个靶点,远不能满足临床需求。因此,研发新机制的抗流感病毒药物势在必行。中药抗病毒疗效显著且不良反应少、作用靶点多,从中寻找有效的抗流感病毒药物具有广阔的前景。

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102792); 广东高校国际科技合作创新平台项目(gjhz1105)

作者简介: 李湘澍(1987—),男,硕士研究生,研究方向为抗病毒药物与分子病毒学。Tel: (020)61648590 E-mail: herelxl@163.com

*通信作者 杨洁(1980—) Tel: (020)61648590 E-mail: yjjy20071030@126.com

茶黄素及其衍生物是红茶中的主要成分,具有苯并萘酚酮结构。目前已发现并鉴定的茶黄素类化合物有28个,其中茶黄素(TF1)、茶黄素-3-没食子酸酯(TF2A)、茶黄素-3'-没食子酸酯(TF2B)、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(TF3)是4种最主要的茶黄素类物质^[2]。茶黄素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌及抗增殖等作用,是一类极具开发潜力的天然产物^[3-6]。前期研究显示,茶黄素衍生物具有广谱的抗HIV活性,可通过多种机制抑制HIV复制,为多靶点的HIV抑制剂^[7-8]。流感病毒与HIV类似,均为I型包膜病毒。鉴于茶黄素单体化合物难于纯化且纯化的单体极不稳定,本实验采用茶黄素衍生物,研究其对甲型流感病毒的影响,为挖掘其抗流感活性潜力提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

茶黄素衍生物(TF1、TF2A、TF2B、TF3总质量分数>85%),厦门励健中药植物化学有限公司,批号20050715;CL-385319^[9],本实验室合成,质量分数为99.7%;利巴韦林盐酸盐,广州肇庆星湖生物化学制药厂生产,质量分数为99.5%,批号L090322;H5N1抗原和抗体,哈尔滨兽医研究所;DMEM细胞培养基、新生胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素、链霉素,中国Invitrogen公司;荧光素酶检测试剂盒、细胞裂解液, Promega公司;感受态细胞DH5 α ,香港Dgen公司;转染试剂PEI,起福生物科技有限公司;神经氨酸酶抑制剂筛选试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;其余生化试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞与质粒

293T细胞和狗肾细胞(MDCK细胞),由本实验室保存。细胞培养液为含10%胎牛血清、10 000 U/L青霉素、链霉素的DMEM高糖培养基。

A/Thailand/Kan353/2004-HA、A/Thailand/Kan353/2004-NA质粒,德国乌尔姆大学Frank Kirchhoff教授惠赠;pNL4-3R'E'Luc(系在pNL4-3进行移码突变使其不表达Env蛋白和Vpr蛋白,并插入绿色荧光蛋白基因的一个重组质粒),美国国立卫生研究院艾滋病研究和参考试剂项目部门提供。

1.3 病毒株

甲型流感病毒FM_1株(A/FM/1/47, H1N1)由广州中医药大学张奉学教授惠赠,经本实验室SPF鸡胚传代扩增,-80℃保存。

2 方法

2.1 对H5N1禽流感假病毒感染力的影响

通过共转染HIV-1骨架质粒,HA-质粒和NA-质粒到293T细胞中,48 h后收获上清,进行MDCK细胞感染实验,成功构建A/Thailand/Kan353/2004 H5N1毒株假病毒。以水泡性口炎病毒(VSVG)基因克隆质粒和HIV包膜蛋白基因缺失的骨架质粒构建的VSVG假病毒为阴性对照。

MDCK细胞按 1×10^4 /孔接种于96孔细胞培养板,培养24 h。不同浓度的茶黄素衍生物(初始质量浓度为2 000 $\mu\text{g/mL}$,倍比稀释)50 μL 与假病毒50 μL ,37℃下孵育30 min,CL-385319作为阳性对照药(终浓度为50 $\mu\text{mol/L}$)。将孵育后的病毒与茶黄素衍生物或CL-385319的混合物加至MDCK细胞中,培养48 h,根据荧光素酶检测试剂盒说明书检测细胞的化学发光值,判断药物抑制病毒侵入细胞的活性。以茶黄素衍生物的半数抑制浓度(IC₅₀)作为其抗流感病毒活性的指标。

$$\text{抑制率} = 1 - (E - N) / (P - N)$$

E为给药组的化学发光值,N为阴性对照组的化学发光值,P为CL-385319组的化学发光值。

2.2 对血凝素的影响

2.2.1 血凝实验 向96孔V型血凝板中的1~12孔加入25 μL 生理盐水,再向第1孔中加入H5N1病毒抗原25 μL ,第2~11孔依次加入倍比稀释的H5N1病毒抗原,第12孔加入1%鸡红细胞25 μL ,静置约30 min,观察鸡红细胞凝集情况,计算凝集单位。

2.2.2 血凝抑制实验 向96孔V型血凝板中加入25 μL 生理盐水,再加入25 μL 不同浓度(药物初始质量浓度10 mg/mL ,倍比稀释)的茶黄素衍生物,充分混合;阳性对照孔加入25 μL 血清,阴性对照孔加入25 μL 生理盐水;最后向除阴性对照孔外的其他孔中加入4个凝集单位的H5N1病毒抗原25 μL ,混匀,室温孵育30 min,观察血凝结果。

2.3 对神经氨酸酶活性的影响

神经氨酸酶(NA)活性检测按照血凝素(HA)抑制剂筛选试剂盒说明书操作。向96孔荧光酶标板内加入70 μL /孔NA检测缓冲液后,依次加入10 μL NA、10 μL 不同质量浓度的茶黄素衍生物(初始质量浓度为1 000 $\mu\text{g/mL}$,倍比稀释),振荡摇匀1 min,37℃孵育2 min,加入10 μL 的NA荧光底物,再振荡1 min,37℃孵育20 min后进行荧光测定。

2.4 对甲型流感病毒 FM₁ 株的影响

取处于指数生长期的 MDCK 细胞铺于 96 孔板上, 细胞密度为 1×10^4 /孔, 24 h 后细胞长成单层后去掉培养基, 每孔加入含有 100 倍半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 的病毒液, 再加入不同浓度 (初始质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$, 倍比稀释) 的茶黄素衍生物 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h, 去掉病毒和茶黄素衍生物的混合物, 加入不同质量浓度 (初浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$, 倍比稀释) 的茶黄素衍生物 200 μL , 培养 3 d。用血凝法测上清滴度。阳性对照孔加入利巴韦林药物和病毒的混合液, 阴性对照孔不加药物只加病毒, 空白对照孔加入不含病毒与药物的细胞上清液, 其他操作同茶黄素衍生物给药组。

2.5 MTT 法检测茶黄素衍生物细胞毒性

取处于指数生长期的 MDCK 细胞铺在 96 孔板上, 细胞密度为 1×10^4 /孔, 待其生长至单层, 加入倍比稀释的茶黄素衍生物 DMEM 培养液 (终质量浓度 2 000 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL /孔, 孵箱培养 48 h 后加 MTT 溶液^[10] (5 mg/mL) 10 μL /孔, 孵育 4 h, 吸去上清, 每孔加 100 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 低速振荡 10 min, 570 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值, 采用 Reed-Muench 法^[11] 计算半数有毒浓度 (CC₅₀)。每一药物质量浓度均重复 3 孔, 同时设对照孔, 实验重复 3 次。

2.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计方法为 t 检验, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 采用 Reed-muench 法计算流感病毒 FM₁ 在 MDCK 细胞中的 TCID₅₀。

3 结果

3.1 对 H5N1 禽流感假病毒感染力的影响

由于 pNL4-3R-E-Luc 带有荧光素酶报告基因,

当高致病性禽流感 H5N1 假病毒成功感染 MDCK 细胞后, 荧光素酶在细胞内表达。表征荧光素酶活性的化学发光值与假病毒的感染能力成正比。病毒原液 2 倍稀释后, 细胞裂解液化学发光值达到 1.6×10^7 , 表明 H5N1 假病毒具有很强的感染能力。结果见图 1。茶黄素衍生物对 H5N1 假病毒有明显的抑制作用, IC₅₀ 为 $(151.88 \pm 18.95) \mu\text{g/mL}$ 。由于茶黄素衍生物对 VSVG 假病毒无抑制活性, 表明其靶点为 H5N1 流感病毒包膜上的 HA 或 NA。阳性对照药 CL-385319 能够明显抑制 H5N1 假病毒的活性, 但对 VSVG 假病毒无抑制活性, 结果见图 2。

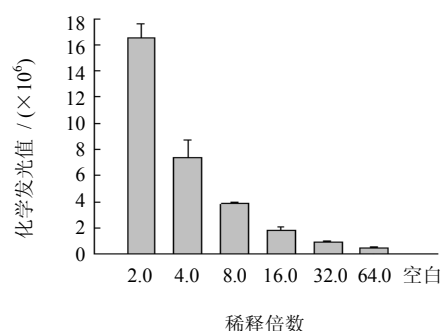


图 1 H5N1 禽流感假病毒对 MDCK 细胞感染力的影响

Fig. 1 Effect of pseudoviruses H5N1 on infectivity activity of MDCK cells

3.2 对血凝素的影响

茶黄素衍生物即便在高浓度, 也不能阻止血凝素引起的血凝抑制现象, 而作为阳性对照物的 H5N1 血凝素抗血清在 1:32 倍稀释时即可阻止 HA 引起的血凝抑制作用, 结果见图 3。

3.3 对神经氨酸酶活性的影响

茶黄素衍生物对神经氨酸酶的活性具有明显的抑制作用, IC₅₀ 为 $(129.09 \pm 1.33) \mu\text{g/mL}$, 见图 4。

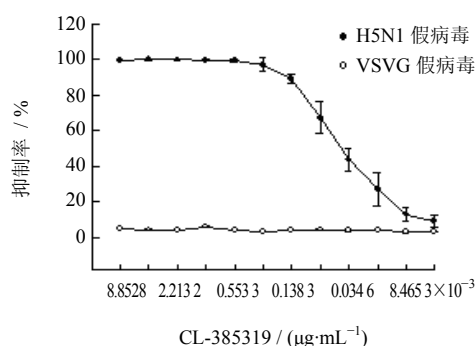
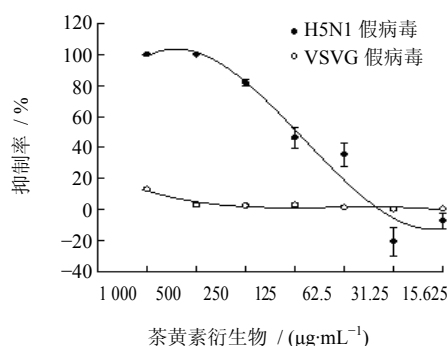


图 2 茶黄素衍生物对禽流感 H5N1 假病毒感染力的影响

Fig. 2 Effect of theaflavin derivatives on infectivity activity of pseudoviruses H5N1

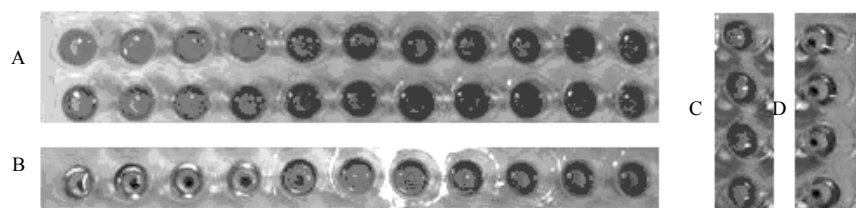


图3 茶黄素衍生物对血凝素血凝抑制的影响
A-茶黄素衍生物(初始质量浓度 10 mg/mL, 从左至右依次倍比稀释); B-阳性对照(从左至右抗体倍比稀释) C-阴性对照 D-空白对照
A-theaflavin derivatives (initial concentration was 10 mg/mL, dilution from left to right); B-positive control (antibody dilution from left to right)
C-negative control D-blank control

图3 茶黄素衍生物对血凝素血凝抑制的影响

Fig. 3 Effect of theaflavin derivatives on hemagglutination inhibition induced by HA

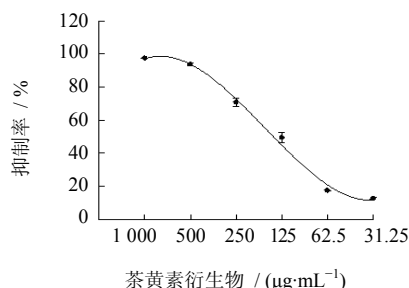


图4 茶黄素衍生物对神经氨酸酶的影响

Fig. 4 Effect of theaflavin derivatives against NA

3.4 对甲型流感病毒 FM_1 活病毒的影响

茶黄素衍生物对甲型流感病毒 FM_1 株活病毒有明显的抑制作用, 并呈明显的量效关系, 当其质量浓度为 250 μg/mL 时, 即能明显抑制甲型流感病毒 FM_1 的活性。结果见图 5。

3.5 对 MDCK 细胞的毒性

茶黄素衍生物对 MDCK 细胞表现出较低毒性, CC₅₀ 为 (879.89±4.54) μg/mL, 表明其在实验条件下是安全的。结果见图 6。



图5 茶黄素衍生物对甲型流感病毒 H1N1 FM_1 的影响
A-茶黄素衍生物(初始质量浓度为 1000 μg/mL, 从左至右依次倍比稀释); B-从左至右依次为阳性对照和阴性对照 C-空白对照
A-theaflavin derivatives (initial concentration was 10 mg/mL, dilution from left to right); B-positive control and negative control (from left to right)
C-blank control

图5 茶黄素衍生物对甲型流感病毒 H1N1 FM_1 的影响

Fig. 5 Effect of theaflavin derivatives on influenza A virus H1N1 FM_1

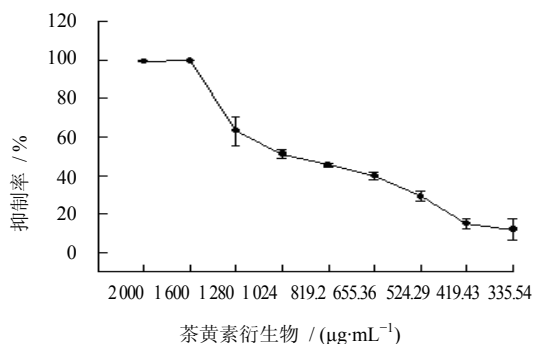


图6 茶黄素衍生物对 MDCK 细胞的毒性

Fig. 6 Cytotoxicity of theaflavin derivatives on MDCK cells

4 讨论

高致病性禽流感(H5N1)是一种人禽共患的正粘病毒科流感病毒属病毒引起的急性接触性传染病, 病毒的毒性很强, 死亡率高。假病毒丧失了病毒的自我复制能力, 只具有单轮感染性, 生物安全性高, 可以在生物安全 2 级实验室完成。H5N1 假病毒检测体系适用于高通量筛选流感病毒的抑制剂, 具有高效、稳定、安全的特点^[9]。流感病毒的包膜蛋白包括 HA 和 NA。病毒进入靶细胞是由病毒包膜上的 HA 介导的。HA 由 HA1 和 HA2 两个亚基组成, 其中 HA1 亚基与靶细胞膜上的唾液酸受

体结合,然后病毒提供胞吞作用进入细胞质,并被包裹在胞内体中;HA2则为跨膜亚基,在病毒进入过程中,介导病毒膜与胞内体膜的融合^[12]。因此,阻断流感病毒进入靶细胞的任一环节,就有可能抑制流感病毒的复制。某些天然产物即通过抑制HIV进入靶细胞而产生预防和治疗的作用^[13]。

本实验采用H5N1假病毒体系检测茶黄素衍生物对病毒进入靶细胞的抑制作用,结果发现茶黄素衍生物对H5N1泰国株的假病毒有明显抑制作用,但对VSVG假病毒无抑制活性。由于两种假病毒仅是包膜蛋白不同,表明茶黄素衍生物特异性作用于H5N1流感病毒的包膜蛋白,即HA或NA。但本实验发现,茶黄素衍生物不能阻止血凝素HA1亚基的血凝抑制作用,因此其抑制流感病毒的作用位点可能是血凝素HA2。今后将对茶黄素衍生物对血凝素HA2及其与靶穴的结合模式进行深入研究。此外茶黄素衍生物也能抑制NA的活性,表明对神经氨酸酶的抑制可能也是其抗流感病毒机制之一。

根据HA的同源性分型,H1、H5亚型流感属于同一组别。为此,本实验还以流感病毒FM₁株感染MDCK细胞为模型,评价茶黄素衍生物体外抗H1N1作用,结果发现茶黄素衍生物具有明显的抗H1N1的活性,其作用机制可能是其对血凝素和神经氨酸酶的抑制。茶黄素衍生物对MDCK细胞的毒性较小,表明茶黄素衍生物作为抗流感病毒药物是安全的。

茶多酚具有包括抑制流感病毒在内的多种药理活性^[14]。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)为绿茶中的活性成分,占茶多酚制品的40%~50%。茶黄素是红茶中的活性成分,与EGCG结构相似。本研究结果显示茶黄素衍生物可能通过与血凝素HA2亚基结合而抑制禽流感病毒进入靶细胞,同时能够在一定程度上抑制病毒的神经氨酸酶活性,表明茶黄素衍生物是通过多靶点作用而发挥抗H5N1亚型禽流感病毒的作用,这为茶黄素衍生物进一步研究和深入开发提供了实验依据和参考。

参考文献

- [1] Ge Q, Filip L, Bai A, *et al.* Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8676-8681.
- [2] Sang S M, Lambert J D, Tian S Y, *et al.* Enzymatic synthesis of tea theaflavin derivatives and their anti-inflammatory and cytotoxic activities [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(2): 459-467.
- [3] Chung J Y, Huang C, Yang C S, *et al.* Inhibition of activator protein activity on cell growth by purified green tea and black tea polyphenols [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(18): 4610-4617.
- [4] Kundu T, Dey S, Roy M, *et al.* Induction of apoptosis in human leukemia cells by black tea and its polyphenol theaflavin [J]. *Cancer Lett*, 2005; 230(1): 111-121.
- [5] Friedman M, Henika P R, Levin C E, *et al.* Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus* [J]. *J Food Prot*, 2006, 69(2): 354-361.
- [6] Zu M, Yang F, Zhou W. *In vitro* anti-influenza virus and anti-inflammatory activities of theaflavin derivatives [J]. *Antiviral Rev*, 2012, 94(3): 217-224.
- [7] Yang J, Li Lin, Tan S Y, *et al.* A natural theaflavins preparation inhibits HIV-1 infection by targeting the entry step: Potential applications for preventing HIV-1 infection [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(2): 348-355.
- [8] Yang J, Li L, Jin H, *et al.* Vaginal gel formulation based on theaflavin derivatives as a microbicide to prevent HIV sexual transmission [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2012, 28(11): 1498-1508.
- [9] Liu S W, Li R M, Zhang R T, *et al.* CL-385319 inhibits H5N1 avian influenza virus infection by blocking viral entry [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660(2/3): 460-467.
- [10] Marina P, Sonia S, Umberto B, *et al.* Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line [J]. *Anal Biochem*, 2003, 313(2): 338-341.
- [11] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. *Am J Hyg*, 1938, 27(3): 493-497.
- [12] Debra M, Peter S Kim. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70(6): 777-810.
- [13] 杨洁, 孙巍, 刘叔文. 天然来源HIV进入抑制剂的研究进展 [J]. *中草药*, 2009, 40(11): 1837-1840.
- [14] 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.