

DOI: 10.12264/JFSC2022-0070

槲皮素拮抗草鱼呼肠孤病毒感染的药物学研究

付静¹, 吕利群²

1. 上海海洋大学, 国家水生动物病原库, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源与利用重点实验室, 上海 201306

摘要: 前期研究发现槲皮素(Quercetin, Qct)在体外对 I、II、III 型草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)均有抑制效果。为进一步阐明 Qct 在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中拮抗 GCRV 的临床应用潜力, 本研究应用草鱼细胞系测定 Qct 对 I 型 GCRV 的半数有效抑制浓度(EC₅₀), 并利用高效液相色谱法研究 Qct 在草鱼中的药代动力学特征, 在稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)模型中评估 Qct 药效。结果显示, Qct 对 GCRV 的 EC₅₀ 为 4.796 μg/mL; 草鱼单次口服 20、40、60 mg/kg Qct 粗提物, 48 h 后血液中最大峰值浓度(C_{max})分别为 0.129 μg/mL、0.583 μg/mL、0.666 μg/mL; 肝胰脏中 C_{max} 分别为 3.822 μg/g、5.386 μg/g、6.252 μg/g; 肾脏中 C_{max} 分别为 2.437 μg/g、3.140 μg/g、3.447 μg/g。血液中 Qct 的 C_{max} 远低于 EC₅₀, 40 mg/kg 或 60 mg/kg 槲皮素处理组肝胰脏中的 C_{max} 高于 EC₅₀。II 型 GCRV 稀有鮡鲫感染模型中, qRT-PCR 显示 Qct 可以抑制病鱼各组织内病毒的复制; 组织病理切片显示 Qct 能减少炎症反应。综上, Qct 不但抑制 GCRV 复制, 也可能通过降低炎症反应发挥抗病毒作用, 从而降低死亡率, 40 mg/kg 的剂量可以保障 Qct 在草鱼体内的抗病毒活性。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; 槲皮素; 草鱼; 稀有鮡鲫; 药代动力学; 组织病理

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)11-1659-10

草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)的基因组由 11 条分节段的双链 RNA 组成, 无囊膜, 有双层蛋白衣壳。根据其基因组 S6 片段的同源性, 可以将国内已分离出的数十株草鱼呼肠孤病毒分为 3 个基因型, 分别是以 GCRV-873 为代表的 I 型, 以 GCRV-HZ08 为代表的 II 型以及以 GCRV-104 为代表的 III 型^[1]。由草鱼呼肠孤病毒感染引起的草鱼出血病给草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)养殖业带来了严重的经济损失。防治草鱼出血病的手段主要有注射疫苗、使用免疫增强剂等。然而, 我国目前只有针对 I 型 GCRV 的减毒活疫苗实现了商品化生产, 且注射疫苗因操作繁琐面临较大推广难度。现有的免疫增强剂没有抗病毒特异性, 临床治疗效果欠佳。鉴于针对单一

基因型的草鱼呼肠孤病毒开发的药物和疫苗难以取得良好的临床防控效果, 草鱼养殖行业急需价格适中、绿色环保的广谱抗 GCRV 的药物。

槲皮素(quercetin, Qct)是植物界分布最广的生物类黄酮之一^[2]。大量研究表明槲皮素具有很广泛的药理学活性, 特别是在心血管方面, 不仅可以降血压、降血脂, 还具有抗血栓, 抑制心肌肥厚等作用, 此外还有广谱抗菌、消炎和抗病毒效果^[3]。本实验室前期研究发现, 槲皮素可以降低 I 型和 III 型 GCRV 在草鱼细胞中的复制效率^[4], 在以稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)为感染模型的体内实验中可以降低 II 型 GCRV 的复制效率^[5]。但是, 槲皮素在草鱼体内的药代动力学参数尚无研究, 槲皮素的体外半数有效抑制浓度(EC₅₀)还没有测定。

收稿日期: 2022-03-15; 修订日期: 2022-04-26.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900104); 财政部和农业农村部现代农业产业技术体系建设项目(CARS-45-19).

作者简介: 付静(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物病原学. E-mail: 1517067601@qq.com

通信作者: 吕利群, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物病毒学研究. E-mail: lqlv@shou.edu.cn

由于药代动力学参数和基本的药效学数据是确定槲皮素临床使用剂量的前提, 槲皮素相关参数的欠缺影响了其在草鱼养殖过程中的合理应用。

为了评估槲皮素作为广谱抗 GCRV 感染药物的应用前景, 本研究基于 GCRV 的草鱼细胞感染模型测定了槲皮素的 EC_{50} , 利用高效液相色谱法测定了槲皮素在草鱼体内的药代动力学曲线, 确定了药代动力学参数, 并以 II 型 GCRV 感染稀有鮕鲫为体内动物模型评价槲皮素的炎症抑制效应。本研究的结果为槲皮素在草鱼养殖中的抗病毒应用提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞和病毒

健康草鱼购自南浔和孚鸿浩水产东庭农场, 平均体重(30 ± 10) g, 放置于上海海洋大学国家水生动物病原库的鱼房内 50 L 的水族缸内暂养, 暂养期间保证氧气充足, 在(22 ± 2) °C 温度条件下正常投喂, 于试验前 2 d 停止投喂。稀有鮕鲫由中国科学院水生生物研究所提供, 体长为 2.1~2.8 cm, 平均体重为 0.3 g, 安置在鱼房内 30 L 的水族缸中饲养。在(25 ± 2) °C 温度条件下暂养 7 d 后进行实验, 实验期间不喂食。

原始草鱼肾脏细胞系(CIK)购自武汉保藏中心, 由本实验室保存。用于体外感染实验的草鱼 I 型呼肠孤病毒 JX01 株和用于体内感染实验的草鱼 II 型呼肠孤病毒 GCRV-JX02 株于 2011 年分离自江西省南昌市, 由本实验室保藏^[6]。

1.2 实验试剂和仪器

槲皮素标准品($\geq 99\%$)购自上海生工生物工程股份有限公司; 95%槲皮素粗提物由四川恒瑞通达生物科技有限公司提供; 甲醇(质谱级)和正己烷(质谱级)购自国药集团化学试剂有限公司; L-抗坏血酸, 乙二醇四乙酸二钠和 4%多聚甲醛固定液购自上海生工股份有限公司; 逆转录试剂盒 RR036A 和荧光定量试剂 TBgreenRR820A 购于 TaKaRa 公司。

高效液相色谱仪购自上海伍丰科学仪器有限公司; 9 mm 螺旋口自动进样瓶、9 mm 自动进样瓶拧盖购自上海安普实验科技股份有限公司;

0.22 μm 针头式过滤器(有机系)购于上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 JX01 感染 CIK 细胞、给药及采样

将草鱼 CIK 细胞传至 96 孔板中, 在 27 °C 培养箱中培养至细胞单层铺满孔板的 80%~90%后, 去除上清, 每孔加入 2 mL 2%的 M199 培养基, 后分别加入浓度为 1、5、10、15、20 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的槲皮素标准品(用 DMSO 溶解)配制溶液进行预处理。密封 6 孔板后, 将细胞放回 27 °C 培养箱培养 8 h。后加入 JX01 病毒(MOI=1)孵育 1 h, 去掉上清。每孔加入 2 mL 2%的 M199 培养基后, 再分别加入槲皮素浓度为 1、5、10、15、20 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液孵育 36 h, 取不同浓度的细胞上清液检测病毒滴度。

1.4 总 RNA 提取、荧光定量 RT-PCR 及 EC_{50} 计算

根据 Trizol 试剂说明书进行总 RNA 提取, 测定总 RNA 浓度后使用 5 \times PrimeScript^{RT} Master Mix 酶试剂盒进行逆转录。逆转录得到的 cDNA 作为模板, 引物序列为 F: 5'-ACCCCTCTGACGACA CCC-3'; R: 5'-GAGCCTGAAGCCAGCACA-3'^[4]。通过比较槲皮素处理后的细胞与对照组细胞感染上清中子代病毒产量的减少来进行病毒抑制效果分析。利用 SPSS 24.0 中的 probit 分析计算 EC_{50} 。

1.5 槲皮素在草鱼体内的药代动力学检测

选取大小合适、活力健康的 90 条草鱼分为 3 组, 在 25 °C 左右下暂养 1 周, 用 95%槲皮素粗提物按高(60 mg/kg)、中(40 mg/kg)、低(20 mg/kg) 3 个剂量口灌草鱼。每组 3 条鱼设置平行组, 在给药 0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 和 84 h 后于草鱼尾静脉取血, 同时取肝胰脏和肾脏组织样品。取出的血液样品立即加入 2%草酸钾抗凝剂($V_{\text{抗凝剂}}:V_{\text{血浆}}=1:10$)并混匀, 4000 r/min 离心 10 min。所有的样品放置于 -80 °C 冰箱保存待用。

样品前处理: 500 μL 血样加入 750 μL 甲醇, 6000 r/min 离心 5 min, 得到上清, 重复两次。合并两次上清后 12000 r/min 下离心 20 min, 收集上清液。用 0.22 μm 针头式过滤器过滤, 然后进行 HPLC 检测。分别取 0.1 g 的肾脏样品及肝胰脏样品于 5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 甲醇后进行匀浆, 重复 4 次, 最终得到 2 mL 组织匀浆液。在其中加入 20%的维生素 C 溶液 40 μL 和 0.05%的

Na₂EDTA 溶液 200 μL, 混匀后, 再准确加入等体积的正己烷, 12000 r/min 下离心 20 min 后吸除去上层正己烷, 取下层澄清溶液用 0.22 μm 针头式过滤器过滤, 保存于进样瓶中待测^[7]。

回收率和精密度: 取未处理样品血液 500 μL 及未处理样品肝肾组织 0.1 g, 分别加入 1 mg/mL 的槲皮素溶液, 之后稀释至 5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL, 按照槲皮素样品前处理方法处理, 测定回收率。每个浓度 3 个平行, 取其平均值为实际测定浓度。

回收率 = $C_r/C_0 \times 100\%$, C_r 为空白样品测定后的浓度, C_0 为加入的槲皮素的已知标准浓度。

精密度: 同一样品 1 d 内不同时间测 3 次, 连续测 3 d, 计算血液和组织中槲皮素的日内和日间变异系数, 以判断该方法的精密度。

数据处理: 标准曲线、药时曲线用 Excel 2010 绘制, 使用药代动力学软件 PKsolver 对各组实验数据进行分析。

1.6 利用稀有鮟鮓模型评价槲皮素的治疗效果检测

选取健康活力好的稀有鮟鮓 16 尾, 分为 2 组, 在 (25±2) °C 条件下暂养 1 周, 两组均腹腔注射 30 μL GCRV-JX02, 2 d 后, 实验组腹腔注射 30 μL 0.5 mg/mL 的槲皮素粗提物, 对照组腹腔注射等体积的 PBS 作对照。实验周期为 12 d, 观察并记录两组稀有鮟鮓的死亡情况。收集死鱼并对其肝、肾、鳃、心、脑、肠和脾组织进行 PCR 检测, 以确认是否为 GCRV-JX02 感染, 采用 5×PrimeScript^{RT} Master Mix 酶和 GCRV-II 的 S6 基因片段引物 (P02-F: 5'-GCTGATGCTGCAGACGGCTAAAC-3' 和 P02-R: 5'-TAATTGCCTGCTGCGCTGACT-3') 逆转录。反应条件为: 95 °C 预变性 1 min 30 s; 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 60 s, 34 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 电泳保温。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 使用引物 Q-vp56-F: 5'-TAGCCACGGGAGAAGGGTTA-3' 和 Q-vp56-R: 5'-GCGACGGCTATAGGTGGAAA-3。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 58 °C 退火 30 s, 共 39 个循环。以计算对照组与实验组病毒基因组的拷贝数变化。

1.7 组织病理学切片观察

挑选体表出血症状明显的新鲜的稀有鮟鮓, 解剖分离出肝、肾、鳃、心、脑、肠和脾组织后立即放入 4% 多聚甲醛中固定 48 h。常温静置 48 h; 乙醇脱水: 用由低到高浓度的乙醇依次浸泡, 首先是 70% 乙醇 40 min, 其次是 80% 乙醇 40 min, 接着是 90% 乙醇和 95% 乙醇各 40 min, 最后用无水乙醇浸泡 40 min 两次; 透明: 组织依次在 3 个二甲苯容器中各浸泡 1 h; 浸蜡: 组织依次在 3 个石蜡容器中各浸泡 1 h; 包埋: 待液态的石蜡完全冷却变硬后, 切成厚度均匀的切片 (4~5 μm); 烘干: 将切片放置 65 °C 烘箱中 6 h; 石蜡切片脱蜡: 依次将切片放入二甲苯 I 20 min→二甲苯 II 20 min→无水乙醇 I 5 min→无水乙醇 II 5 min→75% 乙醇 5 min→50% 乙醇 5 min 梯度脱蜡, 最后自来水洗^[8]; HE 染色: 石蜡切片放入苏木素染液染 3~5 min, 自来水洗, 分化液分化, 自来水冲洗, 1% 氨水水溶液返蓝 1 min, 流水冲洗数秒, 然后切片依次放入 85%、95% 的梯度乙醇脱水各 5 min, 放入伊红染液中染色 5 min; 脱水封片: 石蜡切片依次放入 75% 乙醇 2 min→85% 乙醇 2 min→无水乙醇 5 min→二甲苯 5 min 透明, 将切片从二甲苯中取出用中性树脂胶封片。之后进行显微镜镜检, 图像采集分析^[9]。

2 结果与分析

2.1 槲皮素抑制 CIK 细胞中 GCRV-JX01 的复制

为了验证槲皮素在体外的抗病毒效果, 利用不同浓度的槲皮素作用于感染了 GCRV-JX01 的 CIK 细胞。如图 1a 所示, 不同剂量槲皮素处理感染 GCRV-JX01 的 CIK 细胞 36 h 后, 在显微镜下可以看到与对照组相比, 感染组 (JX01) 有大量漂死的细胞及细胞碎片, 细胞病变效应 (CPE) 非常明显。槲皮素处理组与感染组 (JX01) 相比, 随着槲皮素浓度的增加, 漂死细胞及 CPE 减少, CIK 细胞活力呈依赖性增加。如图 1b 所示, 经过 15 μg/mL 以上槲皮素处理的 CIK 细胞对病毒感染的抵抗力增加, 病毒复制水平明显受到槲皮素剂量依赖性抑制。CIK 细胞中槲皮素抗 GCRV-JX01 的 EC₅₀ 为 4.796 μg/mL, 说明槲皮素能够有效抑制 GCRV-JX01 的复制, 具有开发成为小分子药物的潜能。

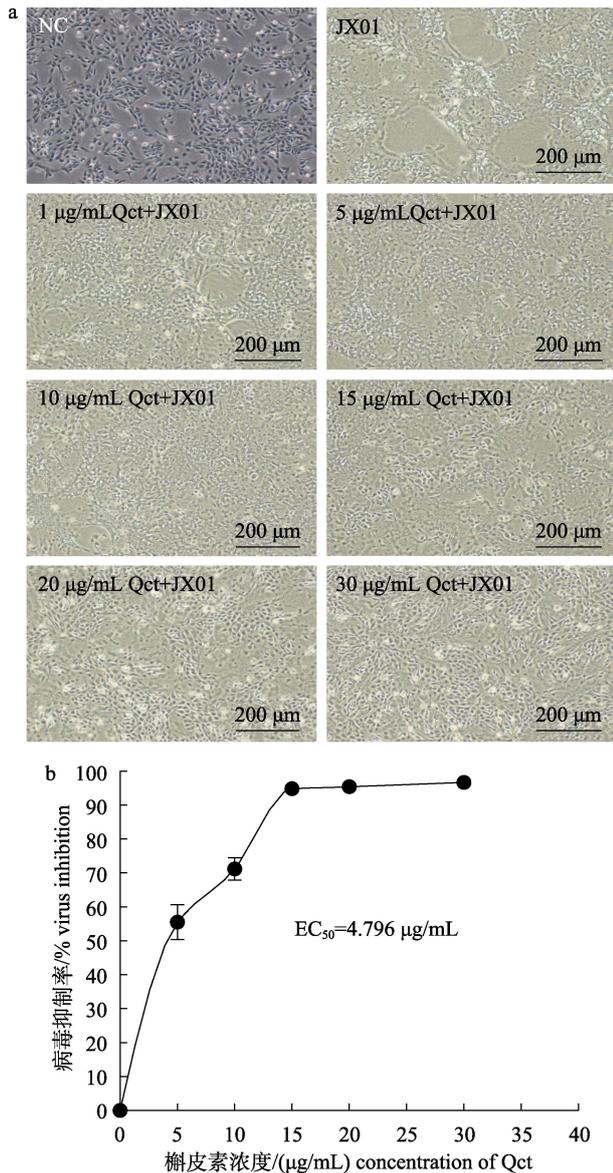


图 1 槲皮素对草鱼肾脏细胞系(CIK)细胞中 GCRV-JX01 复制的抑制作用

- a. 不同剂量槲皮素作用感染了 GXRV-JX01 的 CIK 细胞;
b. 利用 SPSS 24.0 中的 probit 分析计算 EC_{50} .

Fig. 1 Suppress of quercetin (Qct) on GCRV-JX01 replication in CIK cells

- a. Different doses of Qct act on CIK cells infected with GXRV-JX01; b. Calculation of EC_{50} using probit analysis in SPSS 24.0.

2.2 槲皮素在草鱼中的药代动力学

口灌 20、40 和 60 mg/kg 体重 95% 槲皮素粗提取物溶液后, 草鱼存活率如图 2a 所示, 各浓度处理组存活率都为 100%, 表明该浓度下, 槲皮素对草鱼无毒性。由表 1 可知, 含有槲皮素标准品 5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL 的组织样品中, 草鱼血液、肝胰脏和肾脏样品中的回收率分别为

86.36%~94.24%、100.15%~107.41% 和 79.74%~104.49%; 其日内变异系数分别为 5.83%~6.63%、3.74%~7.05% 和 6.61%~13.48%; 日间变异系数为 9.17%~13.36%、8.75%~13.07% 和 4.65%~11.35%, 表明此方法处理样品组织, 可以得到较高的回收率, 重复性良好。

为了确定槲皮素在草鱼体内的代谢情况, 分别单次口灌 20、40、60 mg/kg 体重 95% 槲皮素粗提取物溶液后, 草鱼血液、肾脏和肝胰脏的药时曲线如图 2b~2d 所示。不同质量浓度槲皮素处理组在血液、肝胰脏和肾脏中的含量变化趋势一致, 均呈现先上升后下降再上升后下降的变化趋势, 一共出现了两个峰值。由图 2b 知, 口灌 20、40、60 mg/kg 槲皮素溶液 8 h 后, 草鱼血液中槲皮素的含量分别为 0.072 µg/mL、0.109 µg/mL、0.097 µg/mL; 口灌 48 h 后草鱼体内的槲皮素含量开始呈下降趋势, 48 h 时, 血液中槲皮素的含量分别为 0.129 µg/mL、0.983 µg/mL、1.216 µg/mL。由图 2c 可知, 口灌 20、40、60 mg/kg 槲皮素溶液 8 h 后, 草鱼肾脏中槲皮素的含量分别为 1.321 µg/g、1.693 µg/g、2.095 µg/g; 48 h 时槲皮素的含量分别为 1.830 µg/g、2.674 µg/g、3.709 µg/g; 由图 2d 可知, 口灌 20、40、60 mg/kg 槲皮素溶液 8 h 后, 草鱼肝胰脏中槲皮素的含量分别为 1.363 µg/g、1.453 µg/g、2.413 µg/g; 48 h 时槲皮素的含量分别为 4.643 µg/g、7.377 µg/g、9.288 µg/g。

表 2 所示, 口灌 20、40、60 mg/kg 体重的 95% 槲皮素粗提取物溶液后的药代动力学研究表明, 血液中的最大峰值浓度(C_{max})分别为 0.129 µg/mL、0.583 µg/mL、0.666 µg/mL; 肝胰脏中 C_{max} 分别为 3.822 µg/g、5.386 µg/g、6.252 µg/g; 肾脏中 C_{max} 分别为 2.437 µg/g、3.140 µg/g、3.447 µg/g。所有剂量在测试组织中被测到达到最高浓度的时间(T_{max})均为 48 h, 说明槲皮素吸收较慢。血液中槲皮素的药物半衰期为 18.564~19.707 h, 肝胰脏中槲皮素的药物半衰期为 19.048~21.398 h, 肾脏中槲皮素的药物半衰期为 18.601~22.329 h, 表明药物半衰期与药物剂量呈依赖关系。曲线下面积(area under curve, AUC)在槲皮素浓度为 20~60 mg/kg 的范围内随着槲皮素浓度的增加而显著增加。在各时间点, 肝胰脏中槲皮素

表 1 草鱼血液、肝胰脏和肾脏中槲皮素的回收率和精密度

Tab. 1 Recovery and precision of quercetin in blood, hepatopancreas and kidney of *Ctenopharyngodon idella*

组织 tissue	含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$) content	回收率/% recovery	日内变异系数/% intra-day coefficient of variation	日间变异系数/% inter-day coefficient of variation
血液 blood	5	86.36	6.06	9.17
	10	91.69	6.63	13.36
	20	94.24	5.83	11.11
肝胰脏 hepatopancreas	5	102.76	7.05	8.75
	10	107.41	3.74	13.07
	20	100.15	4.64	11.40
肾脏 kidney	5	79.74	13.48	11.35
	10	98.98	6.61	5.76
	20	104.49	12.08	4.65

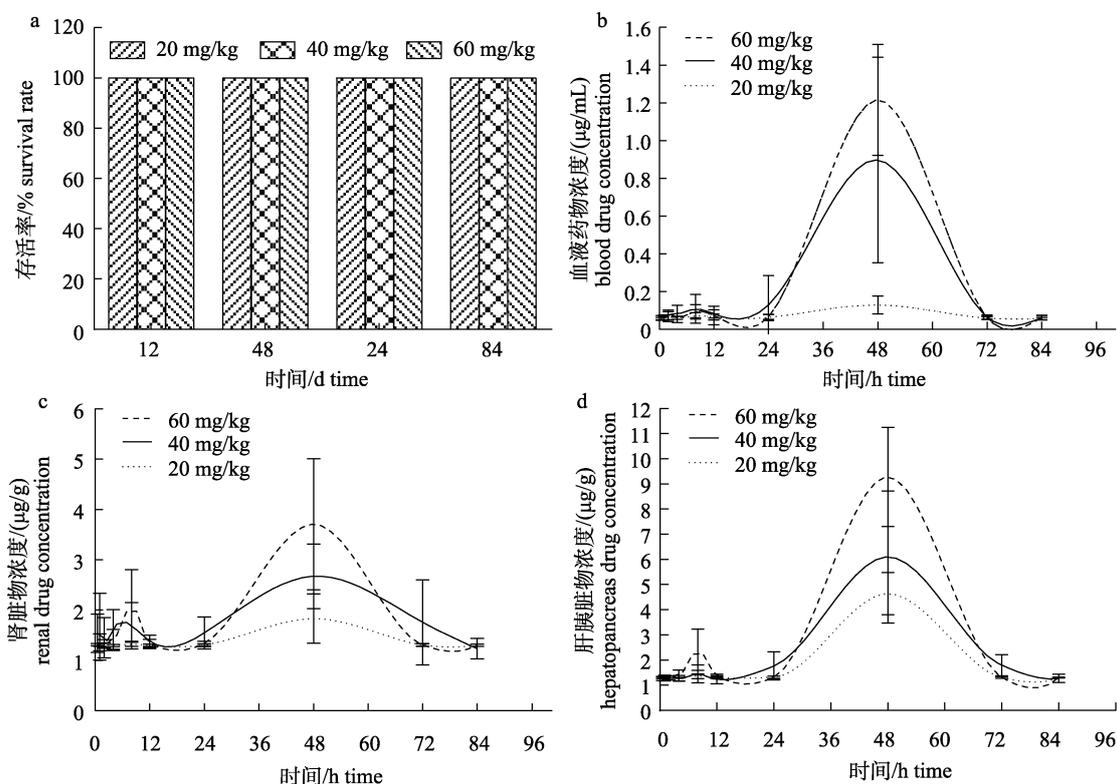


图 2 草鱼的槲皮素安全浓度及口服不同剂量槲皮素下的肝胰脏、肾脏、血液中槲皮素的药-时曲线

Fig. 2 Safety concentration and drug-time curve of quercetin in hepatopancreas, kidney and blood in *Ctenopharyngodon idella*

的浓度明显高于肾脏, 肝胰脏和肾脏中的槲皮素浓度高于血液中的槲皮素浓度。表明槲皮素更富集于肝胰脏中, 肾脏次之; 槲皮素在肝胰脏和肾脏中更长的平均滞留时间(MRT)也表明槲皮素在这些组织中存在的时间更长。

2.3 槲皮素对感染了 GCRV-JX02 的稀有鮡鲫的保护效果

将未经槲皮素注射组和 30 μL 0.5 mg/mL 槲

皮素处理组同时腹腔注射 GCRV-JX02, 分别标记为对照组和治疗组。12 d 实验周期结束后, 立即收集鱼的组织样品, 进行 PCR 检测及病理分析。图 3a PCR 检测结果表明, 在稀有鮡鲫的心脏、肠、肌肉、鳃、肾脏、肝和脑中都能成功检测到 GCRV-JX02, 相比于只感染病毒的对照组, 被槲皮素治疗组的条带更浅, 肠和心脏组织甚至没有条带。图 3b qRT-PCR 结果显示, 槲皮素治疗组的病毒拷贝数

表 2 口灌不同剂量槲皮素在草鱼血液、肝胰脏和肾脏中的药代动力学参数
Tab. 2 Pharmacokinetic parameters of different doses of quercetin in blood, hepatopancreas and kidney of grass carp after oral administration

药代动力学参数 pharmacokinetic parameter	血液 blood			肝胰脏 hepatopancreas			肾脏 kidney		
	20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
AUC (0-t)[mg/(L·h)]	7.002	29.78	34.304	195.174	275.972	317.119	125.330	160.520	176.841
AUC (0-∞)[mg/(L·h)]	8.024	33.889	39.709	229.126	327.781	363.477	151.007	189.025	201.353
MRT/h	27.458	26.782	28.431	29.771	30.871	27.481	32.213	30.062	26.836
T _{1/2} /h	19.032	18.564	19.707	20.636	21.398	19.048	22.329	20.837	18.601
T _{max} /h	48	48	48	48	48	48	48	48	48
CLz/F (L/h/kg)	2.493	1.180	1.511	0.087	0.122	0.165	0.132	0.212	0.298
C _{max}	0.129 μg/L	0.583 μg/L	0.666 μg/L	3.822 μg/g	5.386 μg/g	6.252 μg/g	2.437 μg/g	3.140 μg/g	3.447 μg/g

注: AUC (0-t)、AUC (0-∞)分别表示曲线下面积(0-t)和曲线下面积(0-∞); MRT 表示平均驻留时间; T_{1/2}表示消除半衰期; CLz/F 表示总体消除速率; T_{max}和 C_{max}分别表示最大峰值浓度时间和最大峰值浓度。

Note: AUC (0-t) and AUC (0-∞) represent the area under the curve (0-t) and the area under the curve (0-∞), respectively; MRT represents the average residence time; T_{1/2} represents the elimination half-life; CLz/F represents the overall elimination rate; T_{max} and C_{max} indicate the maximum peak time and concentration, respectively.

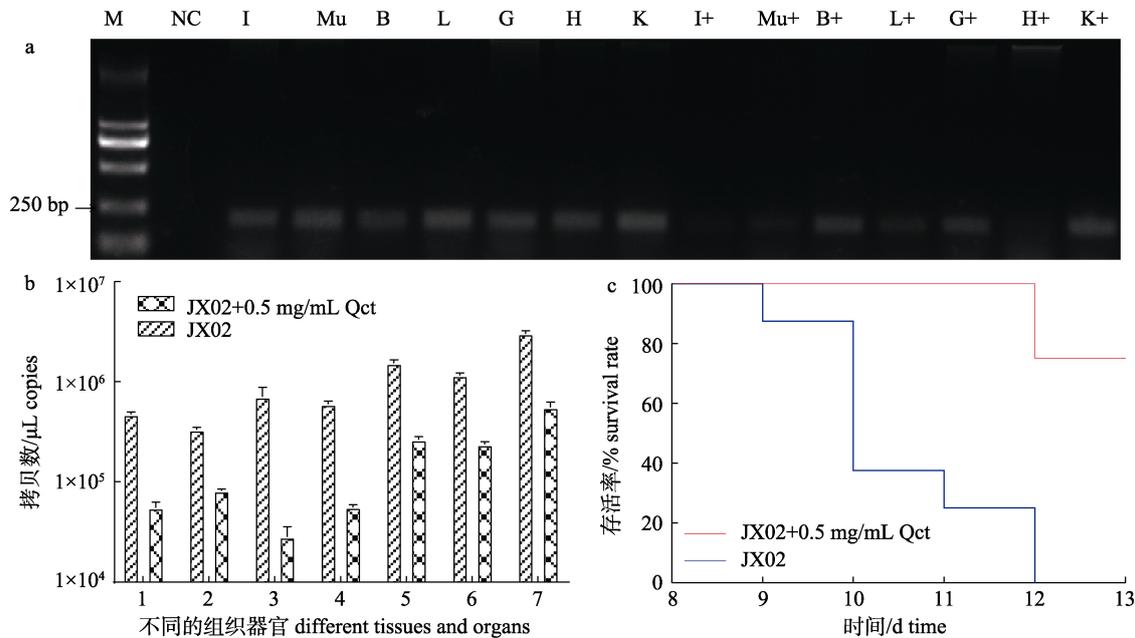


图 3 槲皮素对感染了 GCRV-JX02 的稀有鮡鲫的保护效果

a. 对照组和治疗组稀有鮡鲫各组织电泳图。M: DNA 标准物质 2000; NC: 健康鱼组织; H: 心脏; I: 肠; Mu: 肌肉; G: 鳃; K: 肾; L: 肝胰脏; B: 脑; +表示 Qct 治疗组。b. 稀有鮡鲫感染 GCRV-JX02 后各组织病毒载量变化。
b. 1: 肌肉, 2: 肠, 3: 心, 4: 肾, 5: 鳃, 6: 肝, 7: 脑。c. 对照组和治疗组稀有鮡鲫存活率。

Fig. 3 Suppression effect of quercetin (Qct) on proliferation of GCRV-JX02 in *Gobiocypris rarus*

a. Electrophoresis of *G. rarus* tissues in the control and treated groups. M: 2000 DNA marker; NC: healthy fish tissue; H: heart; I: intestine; Mu: muscle; G: gill; K: kidney; L: liver; B: brain; + indicates Qct treated group. b. Changes in viral load by tissue in rare minnow infected with GCRV-JX02; b. 1: muscle, 2: intestine, 3: heart, 4: kidney, 5: gill, 6: liver, 7: brain. c. Survival rate of *G. rarus* in the control and treated groups.

与对照组相比明显降低。图 3c 表明被槲皮素治疗后稀有鮡鲫的存活率从对照组的 0%提升到 80%, 进一步表明槲皮素对感染了 GCRV 的稀有鮡鲫具有明显的保护效果。

感染了 GCRV 的稀有鮡鲫组织病理学表现为全器官坏死和局部充血, 取健康鱼及病鱼组织分别进行病理切片, 结果如图 4 所示。与健康鱼相比, 病鱼的肠道组织表现为肠绒毛膜从毛细血管

壁分离, 固有层充血; 健康鱼的肌肉组织纵向排列整齐, 可以清楚的看到横纹的结构, 病鱼的肌肉组织肌纤维水肿甚至断裂^[10]; 与健康鱼相比, 病鱼的脾组织含铁血黄素沉积严重, 并有局部出血的症状, 红血球被严重破坏^[11]; 正常鱼的肝细胞核位于中心位置, 病鱼的肝组织出现细胞质空泡化、细胞变性坏死, 肝细胞肿胀, 肝窦减少; 与对照组相比, 病鱼的脑组织结构变得疏松, 大量脑细胞坏死; 正常鱼的鳃组织结构正常, 鳃丝软骨细胞排列整齐, 可见一级鳃瓣和二级鳃瓣, 病鱼的鳃组织上皮细胞与毛细血管分离, 鳃丝软骨细胞排列紊乱, 次生板层大量弯曲变形; 病鱼的肾脏组织中肾小管上皮细胞坏死脱落, 肾小管扩张与周围组织之间有间隙、边界模糊, 大量炎性细胞浸润, 造血组织变得松散坏死^[12]; 病鱼的心脏组织有明显心肌水肿及心肌溶解, 心肌细胞肌纤维排列紊乱^[13]。被槲皮素治疗后的稀有鮕鲫组织充血减少, 病变组织得到明显改善, 说明槲皮素具有良好的治疗作用, 除了抑制病毒复制外槲皮素在稀有鮕鲫中也展现出典型的炎症抑制效果。

3 讨论

槲皮素是一种植物源的膳食类黄酮, 也是哺乳动物中已知的热休克因子 1 (HSF-1) 的转录抑制因子, 它负责上调热休克蛋白在压力刺激下的转录激活^[14]。前期研究表明, GCRV 感染过程中会诱导草鱼热休克蛋白 Hsp70 升高^[15], 促进 GCRV 的复制, 而槲皮素可以抑制 I 型和 III 型 GCRV 在草鱼细胞系的复制^[4]。为了定量评估槲皮素在草鱼体内的抗病毒药效, 本研究测定了槲皮素在草鱼细胞中拮抗病毒感染的半数有效抑制浓度 EC_{50} 为 $4.796 \mu\text{g/mL}$, 若鱼体组织药物浓度高于 EC_{50} 值, 则药物能发挥治疗效果。

利用药代动力学能够有效地筛选和评价药物的药效, 为临床制定合理的用药方案提供理论支持, 确保临床用药的安全^[16]。了解不同剂量的槲皮素在不同组织部位的分布、吸收情况可以精准制定用药剂量和频率, 更好地发挥药物抗病毒效果。口灌 $20\sim 60 \text{ mg/kg}$ 的槲皮素粗提物后, 槲皮素在草鱼组织中吸收迅速, 消除快, 尤其在 GCRV

的靶向感染组织中富集。槲皮素粗提物在不同组织中的含量由高到低依次为肝脏、肾脏、血液, 这可能是由于肝胰脏作为主要的解毒器官, 相比于其他组织吸收更快。药代动力学研究显示, 20 mg/kg 的剂量下血液中的 C_{max} 为 $0.129 \mu\text{g/mL}$, 肝胰脏中的 C_{max} 为 $3.822 \mu\text{g/g}$, 肾脏中的 C_{max} 为 $2.437 \mu\text{g/g}$, 结合体外抗病毒实验 EC_{50} 值为 $4.796 \mu\text{g/mL}$, 表明 20 mg/kg 槲皮素粗提物并不能有效抑制病毒复制。口灌 40 mg/kg 槲皮素粗提物后, 血液、肝胰脏和肾脏中的 C_{max} 为 $0.583 \mu\text{g/mL}$ 、 $5.386 \mu\text{g/g}$ 和 $3.140 \mu\text{g/g}$ 。该剂量下肝胰腺中药物含量可以达到体外抗病毒实验的 EC_{50} , 表明 40 mg/kg 的剂量下体内药物浓度可以达到一定的抗病毒效果。为了取得更好的临床效果, 可以采取连续两次给药的方法。根据槲皮素微溶于水、肠道吸收差的特点, 临床上可以采用拌饲投喂草鱼的给药方式。

尽管在自然条件下由 GCRV 导致的草鱼出血病对草鱼养殖行业危害很大, 但在实验室环境下尚未找到具有明确遗传背景的无特定病原(specific pathogen free, SPF)的草鱼可供研究。稀有鮕鲫是我国特有的鲤科鮕鲫属的一种小型鱼类^[17], 其具有对环境耐受能力强、繁殖周期短等优点, 被作为一种新的模式物种广泛应用于毒理学、胚胎学和生理生态学等领域^[18]。实验室感染的稀有鮕鲫可模拟了临床上由 GCRV 感染引起的草鱼出血病, 具有明确遗传背景的稀有鮕鲫或被认为是阐明 GCRV 发病机制以及宿主抗 GCRV 反应的潜在模型^[19]。前期的研究中, 本文作者已建立了 II 型 GCRV 感染稀有鮕鲫模型来评估槲皮素的抗病毒活性^[5]。为了更进一步评估槲皮素的炎症抑制效果, 在本研究中作者对感染了 II 型 GCRV 的稀有鮕鲫的各个组织进行 qRT-PCR 检测和病理切片分析。qRT-PCR 结果显示病毒感染成功, 槲皮素可以有效降低病鱼各个组织病毒的复制, 在心脏、肾组织中病毒抑制效果更明显。被 GCRV- JX02 感染后病毒载量最高的组织是脑, 这一点可以解释临床上草鱼感染 GCRV 后出现反应迟钝、游动缓慢、孤僻不合群的现象。心脏组织是病毒载量被抑制最明显的组织, 作者推测由于心脏是机体血液循环的动力中心, 槲皮素经血液循环后在心脏

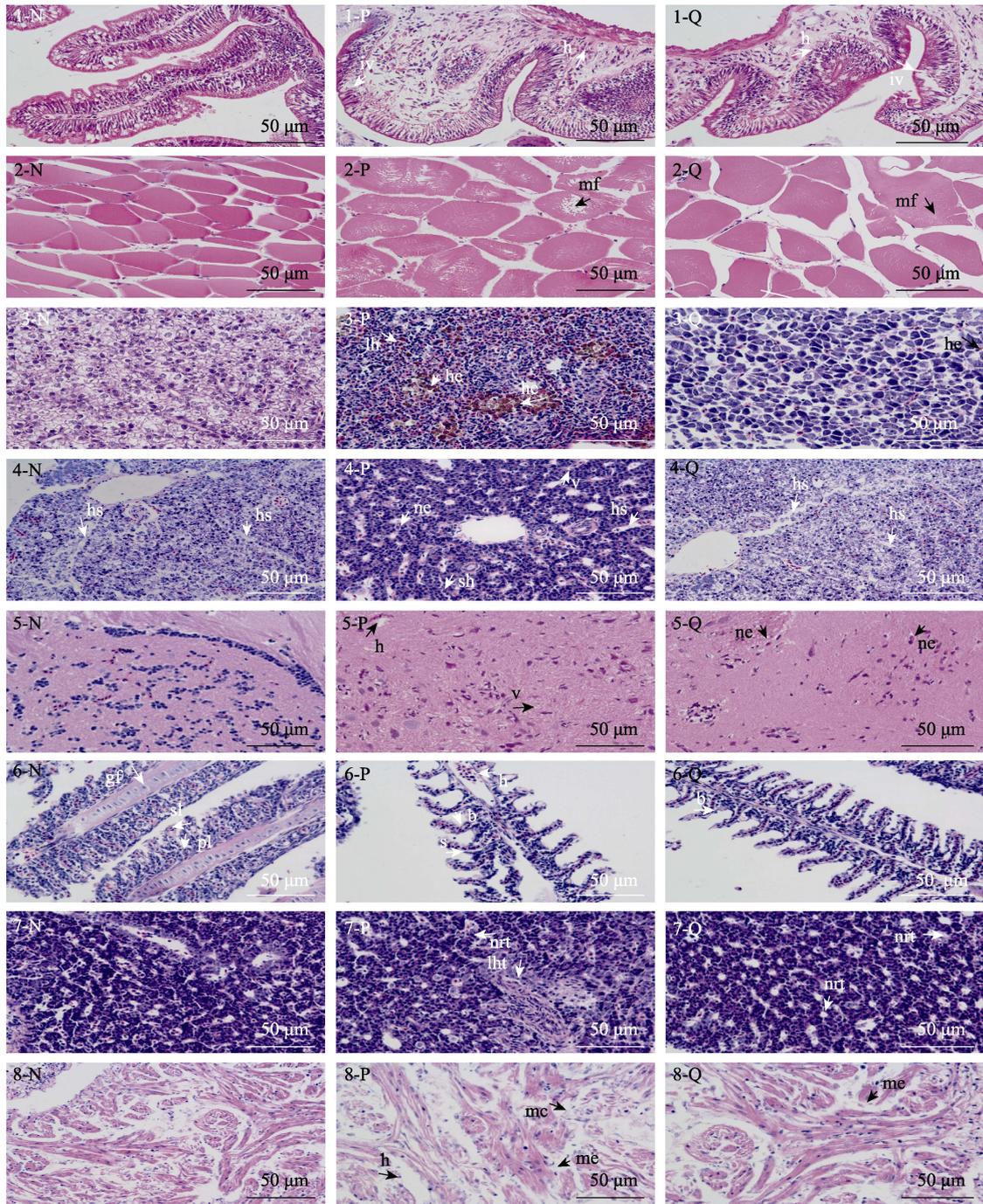


图 4 草鱼呼肠孤病毒 GCRV-JX02 感染的稀有鮡鲫病理切片分析

1-8 分别表示稀有鮡鲫的肠、肌肉、脾、肝、脑、鳃、肾和心脏, N 为健康对照组, P 为感染 GCRV-JX02 的实验组, Q 为 Qct 治疗感染 GCRV-JX02 组。

iv: 肠绒毛脱落; mf: 肌纤维水肿; he: 含铁血黄素沉积; lh: 局部出血; hs: 肝窦; sh: 肝细胞肿胀; ne: 细胞坏死; v: 空泡化; h: 充血; gf: 鳃丝软骨细胞; s: 上皮细胞脱落; pl: 原生板层; sl: 次生板层; b: 次生板层弯曲; nrt: 肾小管上皮细胞坏死; lht: 造血组织松动; me: 心肌水肿; mc: 心肌溶解。

Fig. 4 Pathological section analysis of *Gobiocypris rarus* infected by grass carp reovirus GCRV-JX02
1-8 refer to intestines, muscle, spleen, liver, brain, gills, kidney, and heart of rare minnows, respectively. N is the healthy control group, P is the experimental group infected with GCRV-JX02, and Q is the group treated with Qct after GCRV-JX02 infection.
iv: intestinal villi abscission; mf: muscle fiber edema; he: hemosiderin deposition; lh: local bleeding; hs: hepatic sinus; sh: swelling hepatocytes; ne: cell necrosis; v: cavitation; h: hyperemia; gf: gill filament chondrocyte; s: exfoliation of epithelial cells; pl: native board layer; sl: secondary lamella; b: secondary plate bending; nrt: necrosis of renal tubular epithelial cells; lht: hematopoietic loosening; me: myocardial edema; mc: cardiolysis.

脏中有所蓄积, 因此槲皮素可能最先作用于心脏组织。组织病理切片结果显示被 GXRV-JX02 感染后稀有鮠鲫各个组织均有明显的出血症状, 与临床上草鱼感染 GCRV 后全身性出血症状一致。肌肉和肠道的炎症病变程度最明显, 肠道组织被大量炎症因子浸润, 毛细血管充血扩张, 这也与临床上感染 GCRV 后草鱼出现严重的肠炎症状符合。槲皮素治疗后的稀有鮠鲫各组织病变炎症性症状明显减轻, 显示槲皮素具有减轻机体炎症的作用, 这表明槲皮素可作为抗炎药用于治疗 GCRV 引起的炎症反应, 从而发挥抗病毒作用。其对心脏组织和肠道组织更好的作用效果为后续鉴定槲皮素的作用靶点及研究具体抗病毒机制提供了新的切入点。综上所述, 本研究显示槲皮素对草鱼呼肠孤病毒的半数有效抑制浓度为 4.796 $\mu\text{g/mL}$, 40 mg/kg 或 60 mg/kg 的槲皮素处理组可以保障药物在鱼体组织内的抗病毒活性。槲皮素不但对 GCRV 感染有直接抑制效果, 也可能通过抑制体内炎症反应, 提高草鱼抗病力。本研究为槲皮素在临床上的应用提供了理论支持, 为开发绿色、高效的抗 GCRV 药物提供了新的选择。

参考文献:

- [1] Wang T, Li J L, Lu L Q. Quantitative *in vivo* and *in vitro* characterization of co-infection by two genetically distant grass carp reoviruses[J]. The Journal of General Virology, 2013, 94(Pt 6): 1301-1309.
- [2] Ma N, Li Y J, Fan J P. Research progress on pharmacological action of quercetin[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 20(8): 221-224. [马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.]
- [3] Chen Y F, Tan X, Kang P F. Research progress of quercetin in cardiovascular diseases[J]. Journal of Qiqihar Medical University, 2021, 42(10): 888-892. [陈永锋, 谭鑫, 康品方, 等. 槲皮素在心血管疾病方向研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2021, 42(10): 888-892.]
- [4] Xu N, Fu J, Wang H, et al. Quercetin counteracts the pro-viral effect of heat shock response in grass carp cells with its therapeutic potential against aquareovirus[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(7): 3164-3173.
- [5] Fu J, Xu N, Sun H, et al. Quercetin protects rare minnow *Gobiocypris rarus* from infection of genotype II grass carp reovirus[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(10): 4867-4873.
- [6] Wang T. Study on the Co-infection of grass carp reovirus and proteomic analysis of cytopathic effect[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [王土. 草鱼呼肠孤病毒混合感染及其致细胞病变效应的蛋白组学分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [7] Zhang Y T. Study on EGCG and its metabolite ECG against grass carp reovirus and white spot syndrome virus[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [张祎桐. EGCG 及其代谢产物 ECG 抗草鱼呼肠孤病毒及白斑综合征病毒的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [8] Wei Z Q. Duanteng Yimu Decoction regulate activation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2019. [魏振权. 断藤益母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞活化、迁移和侵袭的调控及其机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.]
- [9] Liu X H. Toxic effects of waterborne cadmium exposure on the liver and the lipid metabolism of rare minnows (*Gobiocypris rarus*)[D]. Chongqing: Southwest University, 2016. [刘小红. 水体镉暴露对稀有鮠鲫肝脏毒性及脂代谢影响的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2016.]
- [10] Chen J M, Chang O Q, Li Y Y, et al. Establishment of a rare minnow (*Gobiocypris rarus*) disease model for grass carp reovirus genotype II[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736133.
- [11] Chen J M. Establishment of a rare minnow (*Gobiocypris rarus*) infection and vaccine evaluation model for grass carp reovirus genotype II[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021. [陈佳明. II 型草鱼呼肠孤病毒稀有鮠鲫感染模型和疫苗评价模型的建立[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.]
- [12] Zhao Y, Zhao D M, Wang J W, et al. Histology section preparation and hematoxylin and eosin staining of *Gobiocypris rarus*[J]. Laboratory Animal Science, 2017, 34(2): 31-34. [赵颖, 赵德明, 王剑伟, 等. 稀有鮠鲫的组织学切片制作和苏木精-伊红染色[J]. 实验动物科学, 2017, 34(2): 31-34.]
- [13] Zhao Y, Zhao D M, Wang J W, et al. Histological observation of skin, respiration and cardiovascular systems of *Gobiocypris*[J]. Laboratory Animal Science, 2018, 35(1): 8-14. [赵颖, 赵德明, 王剑伟, 等. 稀有鮠鲫被皮、呼吸与心血管系统组织学观察[J]. 实验动物科学, 2018, 35(1): 8-14.]
- [14] Cotin S, Calliste C A, Mazon M C, et al. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication[J]. Antiviral Research, 2012, 96(2): 181-186.
- [15] Li W J, Yu F, Wang H, et al. Induction of pro-viral grass carp *Ctenopharyngodon idella* Hsp70 instead of Hsc70

- during infection of grass carp reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 1024-1029.
- [16] Wang F, Liu Y N, Wu X Y, et al. Application of PK-PD model in formulation and optimization of antimicrobial drug dosing regimen[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(7): 110-114. [王芳, 刘亚娜, 吴香云, 等. 药代动力学-药效学模型在制定及优化抗菌药物给药方案中的应用[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(7): 110-114.]
- [17] Fan B, Fan M, Liu Z T, et al. Species sensitivity and application in ecotoxicology and water quality criterion for *Gobiocypris rarus*[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2019, 32(7): 1153-1161. [范博, 樊明, 刘征涛, 等. 稀有鮡鲫物种敏感性及其在生态毒理学与水质基准中的应用[J]. *环境科学研究*, 2019, 32(7): 1153-1161.]
- [18] Wu B L, Luo S, Wang J W. Effects of temperature and feeding frequency on ingestion and growth for rare minnow[J]. *Physiology & Behavior*, 2015, 140: 197-202.
- [19] Chen J M, Wang Q, Wang Y Y, et al. Establishment of aquatic animal model and its application in disease control[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16(2): 119-126. [陈佳明, 王庆, 王英英, 等. 水产动物模型的建立及在病害防控上的研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(2): 119-126.]

Pharmaceutical research of quercetin against infection of *Ctenopharyngodon idella* reovirus

FU Jing¹, LYU Liqun²

1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In previous studies, quercetin (Qct) was found to be effective against grass carp reovirus genotype I, II, and III (GCRV) *in vitro*. To further elucidate the clinical potential of Qct in antagonizing GCRV in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), this study was conducted to determine the half effective inhibitory concentration (EC₅₀) of Qct against genotype I GCRV in a grass carp cell line, investigate the pharmacokinetics of Qct in grass carp, and assess the efficacy of Qct in a rare minnow (*Gobiocypris rarus*) model. The results showed that the EC₅₀ of Qct on GCRV was 4.796 µg/mL; the maximum peak concentrations (C_{max}) in the blood of grass carp were 0.129, 0.583, and 0.666 µg/mL at 48 h after a single oral infusion of 20, 40, and 60 mg/kg of Qct crude extract; the C_{max} in the hepatopancreas were 3.822, 5.386, and 6.252 µg/g, respectively; the C_{max} in the kidney were 2.437, 3.140, and 3.447 µg/g, respectively. The C_{max} of Qct in blood was much lower than the EC₅₀, and the C_{max} in the hepatopancreas of the 40 or 60 mg/kg Qct-treated group was higher than the EC₅₀. qRT-PCR in a rare minnow infection model of genotype II GCRV showed that Qct could inhibit viral replication in all tissues of diseased fish, and histopathological sections showed that Qct could reduce the inflammatory response. In conclusion, Qct not only inhibited GCRV replication, but also exerted antiviral effects and reduced mortality by decreasing the inflammatory response. A dose of 40 mg/kg could guarantee the antiviral activity of Qct in grass carp.

Key words: grass carp reovirus; quercetin; *Ctenopharyngodon idella*; *Gobiocypris rarus*; pharmacokinetics; histopathology

Corresponding author: LYU Liqun. E-mail: lqlv@shou.edu.cn