

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号：24520101153381

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

白黎芦醇体外抑制水痘-带状疱疹病毒  
作用机制的研究

Investigation on the *in vitro* inhibitory mechanisms of  
resveratrol on varicella-zoster virus

田雅兰

指导教师姓名：王官清 教授

专业名称：肿 瘤 学

论文提交日期：2013 年 6 月

论文答辩时间：2013 年 6 月

学位授予日期：2013 年 6 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2013 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为( )课题(组)的研究成果，获得( )课题(组)经费或实验室的资助，在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

# 目 录

1	中文摘要 .....	1
2	引文摘要 .....	3
3	英文缩略词表 .....	5
4	引言 .....	7
4.1	水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 感染的流行现状 .....	7
4.2	VZV 感染临床治疗的主要药物 .....	7
4.3	VZV 感染宿主细胞的机制 .....	8
4.4	抗 VZV 药物的研究方法 .....	8
4.5	抗 VZV 新药的研究 .....	9
5	实验材料 .....	11
5.1	细胞 .....	11
5.2	病毒 .....	11
5.3	主要试剂 .....	11
5.4	主要仪器 .....	12
5.5	主要溶液配制 .....	13
5.6	主要实验器具的处理 .....	13
6	实验方法 .....	14
6.1	细胞培养和传代 .....	14
6.2	VZV 培养和传代 .....	14
6.3	无细胞病毒液 (CFVs) 制备 .....	14
6.4	CFVs 滴度测定 .....	14
6.5	三磷酸腺苷 (ATPs) 含量检测 .....	14
6.6	萤火虫荧光素酶检测 .....	15
6.7	VZV 即刻早期蛋白 62 (IE62) 的免疫荧光和免疫组化染色 .....	15
6.8	VZV IE62 mRNA 定量检测 .....	16
6.9	统计学分析 .....	19

6.10 研究内容 .....	19
7 实验结果 .....	22
7.1 白藜芦醇对 MV9G 细胞 ATPs 含量的影响.....	22
7.2 白藜芦醇直接灭活 CFVs 作用 .....	22
7.3 白藜芦醇抑制 CFVs 粘附和穿透 MV9G 细胞.....	23
7.4 白藜芦醇抑制 CAVs 细胞胞内复制 .....	24
7.5 白藜芦醇抑制 CAVs 细胞内复制的 IC50.....	24
7.6 白藜芦醇抑制 CAVs 细胞内复制的时间点.....	25
7.7 白藜芦醇抑制 CAVs 细胞内复制的可逆性.....	26
7.8 白藜芦醇抑制 IE62 基因的转录和表达.....	26
8 讨论 .....	28
8.1 白藜芦醇抑制 VZV 的作用机制.....	28
8.2 白藜芦醇的其它作用 .....	29
8.3 白藜芦醇的副作用及临床应用前景: .....	31
8.4 MV9G 报告细胞分析法研究抗 VZV 药物作用机制的可行性.....	32
9 结论 .....	35
10 参考文献 .....	36
11 附录 .....	40
12 致谢 .....	41
13 文献综述 .....	42

## Table of Contents

<b>1</b>	<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract in English .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Abbreviations and acronyms.....</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Materials.....</b>	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>Methods.....</b>	<b>14</b>
<b>7</b>	<b>Results.....</b>	<b>22</b>
<b>8</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>28</b>
<b>9</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>35</b>
<b>10</b>	<b>Reference .....</b>	<b>36</b>
<b>11</b>	<b>Appendices.....</b>	<b>40</b>
<b>12</b>	<b>Acknowledgement.....</b>	<b>41</b>
<b>13</b>	<b>Literature review .....</b>	<b>42</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库



## 摘要

### 【目的】

- 1、应用构建的水痘-带状疱疹病毒（VZV）报告细胞系 MV9G 进一步研究白藜芦醇体外抑制 VZV 的作用机制。
- 2、进一步验证应用 VZV 报告细胞 MV9G 筛选抗 VZV 药物并研究其作用机制的可行性。

### 【方法】

- 1、将无细胞 VZV 直接感染 MV9G 细胞（CFVs 直接感染）或将带细胞 VZV 与 MV9G 细胞共培养（CAVs 共培养）以激发 MV9G 细胞表达报告基因萤火虫荧光素酶。
- 2、在 CFVs 直接感染前或 CAVs 共培养不同时间点加入白藜芦醇，通过比较药物对 CFVs 或 CAVs 激发荧光素酶的抑制强度分析白藜芦醇直接灭活病毒、抑制病毒粘附和穿透、抑制病毒在细胞内复制及其时间点和可逆性。
- 3、通过比较药物作用前后 VZV 即刻早期蛋白 62（IE62）mRNA 拷贝数和 IE62 表达强度变化分析白藜芦醇对 IE62 转录和表达的抑制作用。

### 【结果】

- 1、白藜芦醇 $>30.0\mu\text{g/mL}$  时 MV9G 细胞三磷酸腺苷（ATPs）含量随药物浓度升高而逐渐降低，ATPs 降低 50% 时白藜芦醇浓度（CD50）约  $60.3\mu\text{g/mL}$ 。
- 2、无细胞 VZV（CFVs）与白藜芦醇（ $25.0\mu\text{g/mL}$ ）预混  $37^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 2h 后直接感染 MV9G 细胞，CFVs 激发荧光素酶下降 50%。
- 3、MV9G 细胞在含白藜芦醇培养基中  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 2h 后直接感染 CFVs，CFVs 激发荧光素酶随药物浓度升高而逐渐降低，但  $4^{\circ}\text{C}$  孵育时无显著变化。
- 4、在带细胞 VZV（CAVs）共培养中加入白藜芦醇时 CAVs 激发荧光素酶显著降低，药物抑制荧光素酶 50% 时浓度（IC50）约  $8.7\mu\text{g/mL}$ 。
- 5、分别在 CAVs 共培养 3、6、9、12、24、30 和 36h 时加入白藜芦醇，3h ~ 24h 加药各组 CAVs 激发荧光素酶均显著高于对照组，但 1h、30h 和 36h 加药组

与对照组间差异无统计学意义。

6、CAVs 共培养时撤除白藜芦醇后 CAVs 激发荧光素酶显著高于撤药前，尤以 24h 和 72h 撤药组明显。VZV IE62 mRNA 拷贝数和 IE62 抗体阳性细胞数随药物作用时间延长而逐渐将低。

### 【 结 论 】

- 1、白藜芦醇细胞毒性较强，MV9G 细胞可耐受最高浓度为 30.0 $\mu$ g/mL。
- 2、白藜芦醇可部分灭活 CFVs。
- 3、白藜芦醇抑制 CFVs 穿透 MV9G 细胞膜但对 CFVs 粘附 MV9G 细胞膜无影响。
- 4、白藜芦醇以浓度依赖方式可逆性抑制 CAVs 在 MV9G 细胞内复制。
- 5、白藜芦醇可能通过抑制 IE62 基因的转录和表达而抑制 VZV 感染的早期阶段。
- 6、应用 VZV 报告细胞系研究抗 VZV 作用机制是可行的。

【 关键词 】 白藜芦醇 抗病毒 水痘-带状疱疹病毒 即刻早期蛋白 62

## Abstract

### ***Objectives***

1. To further investigate the *in vitro* inhibitory mechanism(s) of resveratrol on varicella-zoster virus (VZV) with our previously generated reporter cell line MV9G.
2. To further verify the application of VZV reporter cell line MV9G to screening for anti-VZV drug and investigating its inhibitory mechanisms.

### ***Methods***

1. Cell-free VZVs (CFVs) were directly inoculated onto monolayer of MV9G cells (CFVs direct-infection) or cell-associated VZVs (CAVs) were co-cultured with MV9G cells (CAVs co-culture) to activate expression of the reporter gene firefly luciferase in MV9G cells.
2. Resveratrol was added before or after virus infection, the roles of resveratrol on direct inactivation, on viral attachment to and penetration into MV9G cells, on intracellular viral replication and its IC<sub>50</sub>, inhibitory timepoints and reversibility were assayed by comparing the luciferase activities reduction by resveratrol.
3. The reductions of VZV IE62 mRNA copies and IE62-antibody positive cells by resveratrol were further assayed.

### ***Results***

1. ATPs contents of MV9G cells in the presence of resveratrol over 30.0µg/mL were concentration- dependently reduced, the CD<sub>50</sub> of which was around 60.3µg/mL.
2. CFVs were premixed with 25.0µg/mL resveratrol and incubated at 37°C waterbath for two hours and then directly inoculated onto monolayer of MV9G cells, luciferases activated by resveratrol-treated CFVs were reduced to around half of the untreated controls.
3. MV9G cells were pre-incubated with resveratrol at 37°C for two hours and then directly infected with CFVs at 37°C for another two hours, the CFVs-activated luciferase was concentration-dependently reduced, but no big change was observed in

those pre-incubated at 4°C.

4. MV9G cells were co-cultured with CAVs in the presence of resveratrol for 72 hours, the CAVs-activated luciferases were markedly reduced in a concentration-dependent manner, the IC<sub>50</sub> of which was 8.7µg/mL.

5. Resveratrol was added in CAVs co-culture at 1, 3, 6, 9, 12, 24, 30, and 36 hours post infection, the CAVs-activated luciferase in those resveratrol was added at 3, 6, 9, 12, and 24 hours post infection were significantly higher than those of controls.

6. Resveratrol was withdrawn from CAVs co-culture media, the CAVs-activated luciferases after withdrawal were significantly higher than those before, especially in those withdrawn at 24 and 72 hours post infection.

7. The IE62 mRNA levels shown by cDNA copies detected with SYBR Green RT-PCR and IE62 positive cells shown by monoclonal anti-IE62 antibody of the virus-infected cells treated with resveratrol were significantly reduced with increase of incubation time with resveratrol.

### **Conclusions**

1. Resveratrol was cytotoxic to MV9G cells, and the maximum resistant concentration on MV9G cells was around 30.0µg/mL, the CD<sub>50</sub> of which was around 60.3µg/mL.

2. Non- cytotoxic resveratrol partly inactivated CFVs, inhibited viral penetration into rather than attachment to MV9G cells.

3. Resveratrol inhibited CAVs' intracellular replication strongly but reversibly in a concentration- dependent manner, the IC<sub>50</sub> of which was around 8.7µg/mL.

4. The inhibition of resveratrol on VZV in vitro might be through suppression of IE62 gene transcription and expression in the early stage of infection.

5. The application of VZV reporter cell line MV9G to investigation of inhibitory mechanisms was verified.

**Key words** Resveratrol; Antiviral; Varicella-zoster virus; Immediate early 62

## 英文缩略词表

英文简称	英文全称	中文全称
VZV	Varicella-zoster virus	水痘-带状疱疹病毒
HHV	Human herpesvirus	人类疱疹病毒
PHN	Postherpetic neuralgia	人带状疱疹后遗神经痛
MV9G	Reporter cell line for VZV	VZV 报告细胞系
CFVs	Cell-free virus	无细胞病毒
CAVs	Cell-associated virus	带细胞病毒
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	达尔伯克改良伊格尔培养基
EMEM	Eagle's minimum essential medium	伊格尔基础培养基
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
IE	Immediate early	即刻早期蛋白
DNP	DNA polymerase	DNA 聚合酶
TK	Thymidine kinase	胸苷激酶
ACV	Acyclovir	阿昔洛韦
PFA	Foscarnet	膦甲酸
ACV <sup>r</sup>	Acyclovir-resistance virus	ACV 耐药株
PFA <sup>r</sup>	Foscarnet-resistance virus	PFA 耐药株
PRA	Plaque reduction assay	病毒蚀斑减数法
YRA	Yield reduction assay	病毒产量减数法
PFU	Plaque forming unit	病毒蚀斑形成单位
IC50	Inhibitory concentration of 50%	半数抑制浓度
CD50	Cytotoxicity dose of 50%	半数毒性浓度
vOka	Oka vaccine strain	VZV Oka 疫苗株
CPE	Cytopathic effect	致细胞病变效应

ORF	Open reading frame	开放读码框架
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
Ct	Cycle threshold	循环阈值
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
RLU	Relative light unit	相对光强单位
DDW	Double distilled water	双蒸水
M.O.I	Multiplicity of infection	感染复数

---

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 4 引言

### 4.1 水痘-带状疱疹病毒（VZV）感染的流行现状

水痘-带状疱疹病毒（varicella-zoster virus, VZV）属人类疱疹病毒（HHV） $\alpha$ 亚科，是水痘和带状疱疹的病原体。人类是 VZV 感染的唯一宿主，且对 VZV 普遍易感，皮肤是病毒的主要靶器官。VZV 感染人有两种类型，即原发感染水痘（varicella）和复发感染带状疱疹（zoster）。

VZV 传染性较强，经呼吸道进入人体后形成原发感染，临床表现为水痘，儿童好发，以发热和皮肤水疱为特征。水痘痊愈后，病毒并不能被机体完全清除，它可沿感觉神经上行，在一个或多个脊髓后根神经节或三叉神经节中形成潜伏感染。当机体抵抗力降低时如外伤、发热等因素能激活潜伏在神经节内的病毒，活化的病毒沿神经轴突到达神经支配的相应区域如胸部、腹部或面部皮肤局部增殖，引发周围神经炎和相应区域皮肤炎症，临床表现为带状疱疹。以在相应神经支配区皮肤成簇水疱伴神经痛为特征。带状疱疹患者多为成年人，特别是免疫力低下的人群如癌症患者或免疫功能缺陷者人免疫缺陷病毒（HIV）感染者<sup>[1]</sup>。

在水痘疫苗被批准用于预防接种前，40 岁以上人群几乎都曾有 VZV 感染经历。水痘疫苗广泛用于预防接种后，儿童水痘和老年人带状疱疹后遗神经痛（postherpetic neuralgia, PHN）的发生率显著降低<sup>[2]</sup>，但器官移植接受者、HIV 感染者、恶性肿瘤患者等免疫低下人群感染 VZV 后仍可导致脑炎、脑膜炎等严重并发症，严重者甚至死亡<sup>[3]</sup>。

### 4.2 VZV 临床治疗的主要药物

以阿昔洛韦（acyclovir, ACV）为代表的选择性核苷抑制剂和以膦甲酸钠（foscarnet, PFA）为代表的非核苷抑制剂可有效抑制病毒复制，已被广泛用于 VZV 感染者治疗。ACV 在病毒自身编码胸苷激酶（thymidine kinase, TK）等酶的作用下磷酸化形成三磷酸 ACV，抑制病毒 DNA 聚合酶（DNA polymerase, DNP）活性进而抑制病毒 DNA 合成；PFA 则通过直接抑制病毒 DNP 和逆转录酶的活性而抑制病毒 DNA 合成<sup>[4]</sup>。VZV 的 TK 基因发生缺失或突变则导致病毒对 ACV 耐药，DNP 基因发生缺失或突变则导致病毒对 ACV、PFA 等多种药

物耐药。随着 HIV 感染者的逐渐增多,近年来关于 ACV 耐药株 (ACV<sup>r</sup>) 和/或 PFA 耐药株 (PFA<sup>r</sup>) 感染的报告越来越多。免疫功能受损者如艾滋病 (AIDS) 患者和器官移植接受者中, VZV 感染后容易形成慢性播散性感染,长期应用大剂量抗 VZV 药物最终可能导致机体内病毒对抗病毒药物耐药,而且,耐药 VZV 感染者症状往往较重,可并发严重肺部感染,重者可导致死亡<sup>[5]</sup>。尽管 ACV<sup>r</sup> 感染者可用 PFA 治疗,但 PFA 的肾脏毒性限制了其临床应用<sup>[4]</sup>。因此,研究针对病毒 TK 和 DNP 以外靶位的新型抗 VZV 药物已成当前 VZV 感染研究的重点和热点之一<sup>[6]</sup>。

### 4.3 VZV 感染宿主细胞的机制

VZV 高度依赖宿主细胞生长,通常以带细胞病毒 (cell-associated virus, CAVs) 形式存在,将病毒所带宿主细胞去除即可得到无细胞病毒 (cell-free virus, CFVs)。以 CFV 感染宿主细胞时,病毒颗粒常需先与宿主细胞膜表面受体<sup>[7]</sup> 结合而黏附在宿主细胞膜表面,进而通过胞饮 (endocytosis)、融合 (fusion) 等方式穿透宿主细胞膜进入细胞内 (简称“入胞”) 进行病毒核酸的复制、转录和翻译,再装配成新的病毒颗粒并释放到感染细胞外 (简称“出胞”) 感染邻近的正常细胞。以 CAV 感染宿主细胞时,病毒颗粒则很容易借助感染与未感染细胞之间的密切接触而直接进入宿主细胞内复制。因此,在病毒感染宿主细胞整个过程中,从病毒颗粒黏附和穿透宿主细胞膜、在宿主细胞内复制到病毒颗粒释放到感染细胞外的任何环节都可能成为抗病毒药物作用的靶位之一<sup>[6]</sup>,尤其是病毒在宿主细胞膜表面黏附和穿透等感染初始阶段更受到重视<sup>[8]</sup>。

VZV 基因组包含 71 个开放读码框 (ORFs),均匀分布在两条链上,一共编码约 69 种蛋白,其中 ORF42 和 ORF45 接合转录成一种蛋白产物。VZV 即刻早期蛋白 62 (immediate early 62, IE62) 是病毒皮层的主要成分,具有高度免疫原性,可激活几乎所有 VZV 基因的启动子,或使其自身基因的转录静止,也可调节其自身在细胞核中的浓度。

### 4.4 抗 VZV 药物的研究方法

研究抗病毒药物时通常采用病毒蚀斑减数法 (plaque reduction assay, PRA) 或病毒产量减数法 (yield reduction assay, YRA),两种方法都需先计数病毒在培



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库