

中草药中抗植物病毒 TMV 活性物质 PZ₁ 作用机理研究

侯玉霞 李重九 马立新 丁群

(中国农业大学基础科技学院)

摘要 以烟草花叶病毒(TMV)/烟草为测试体系,研究了天然物 PZ₁ 抗病毒 TMV 作用机理。在离体及活体条件下, PZ₁ 均可抑制病毒核酸与植物核糖体结合。在活体条件下, PZ₁ 抑制 TMV-RNA 及 TMV 蛋白质合成。实验结果表明 PZ₁ 的主要作用靶标为 TMV-RNA。

关键词 抗病毒活性物质 PZ₁; 烟草花叶病毒(TMV); 抗病毒作用机理

分类号 S481.1

Studies on the Mechanism of Antiviral (TMV) Active Compound PZ₁ Isolated from Chinese Medicine Plant

Hou Yuxia Li Chongjiu Ma Lixin Ding Qun

(College of Basic Sciences and Technology, CAU)

Abstract The antiviral mechanism of natural product PZ₁ was studied by TMV/tobacco system. The antiviral (TMV) active compound PZ₁ was isolated from Chinese medicine plant. PZ₁ inhibited the combination of viral RNA with plant ribosome both *in vitro* and *in vivo*. It also inhibited the synthesis of TMV-RNA and TMV protein *in vivo*. The results assumed that the main target of PZ₁ was TMV-RNA.

Key words antiviral active compound PZ₁; tobacco mosaic virus (TMV); antiviral mechanism

从不同科属的植物中筛选抗植物病毒的天然物,即用不同溶剂提取供试植物材料并对得到的粗提物进行生物测定。对生物活性高的粗提物进一步纯化分离出单一组分。经 IR, NMR, MS 鉴定其分子结构,发现 PZ₁ 活性最强,可抑制烟草花叶病毒(TMV)增殖,故进一步探讨其作用方式。

1 材料及方法

1.1 材料及设备

烟草花叶病毒(TMV)在普通三生烟上繁殖,磷酸缓冲液提取,蔗糖密度梯度离心纯化,电子显微镜检查其纯度。

供试生物材料为普通三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. "Sam sun"),其叶肉细胞原生质体用

收稿日期: 1999-05-04

国家自然科学基金资助项目(39970501)

侯玉霞,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

纤维素酶及离析酶从烟草叶肉细胞中分离^[1]。大麦胚芽, 购于 Sigma 公司。

供试药剂 PZ₁ 从紫草中提取, 经 TLC 纯化后, 用 IR, NMR 及 MS 鉴定分子结构。

同位素标记试剂 ³²P-ATP 购于华美公司, ³H-亮氨酸和 ³H-尿苷购于 Sigma 公司。

实验仪器为 H55 HITACHI 超速离心机, LKB 液闪计数器 (Beckman 公司生产)。

1.2 实验方法

1.2.1 PZ₁ 对核酸与核糖体结合的影响

1.2.1.1 离体实验 从纯化的 TMV 粒子中分离出病毒 RNA^[2], 从烟草叶肉细胞中分离出植物 mRNA, 并且将其末端用 ³²P-ATP 标记。从大麦胚芽中分离出植物核糖体。将病毒 RNA 与植物核糖体混合, 建立 RNA 与核糖体反应体系^[3]。实验分为 2 部分: 各种 RNA 单独存在 (³²P-TMV RNA 或 ³²P-烟草 mRNA); 2 种 RNA 混合存在 (³²P-TMV RNA 和非标记的烟草 mRNA 或非标记的 TMV-RNA 和 ³²P-烟草 mRNA)。在加入核酸的同时, 向处理样品中加入待测药剂, 于 28℃ 保温 10 min, 使核酸与核糖体结合, 而后经 15% ~ 30% 蔗糖密度梯度离心, 分离未与核糖体结合的核酸, 用液闪计数器测定与核糖体结合的 RNA 放射性强度, 计算结合率及药剂抑制率。同时设置对照 (即不加药剂处理)。

1.2.1.2 活体实验 将末端标记的 20 μg·mL⁻¹ ³²P-TMV RNA 导入烟草叶肉细胞原生质体, 在导入缓冲液中向处理样本中加入待测药剂。导入后提取原生质体的核糖体, 由液闪计数器测定核糖体上结合的 RNA 放射性强度, 计算与核糖体结合的 TMV-RNA 含量及药剂抑制率。

1.2.2 PZ₁ 对病毒核酸及蛋白质合成的影响 将烟草叶片用 TMV 感染 6.5 h 后, 取叶盘, 分别在含有 ³H-尿苷及 ³H-亮氨酸的培养液中培养, 向处理样品中加入 0.1% PZ₁, 同时设置对照试验。40 h 后用放射性免疫法^[4]检查病毒核酸及病毒衣壳蛋白的放射性强度, 计算药剂对病毒的抑制作用。

1.2.3 PZ₁ 对 TMV 增殖的影响 用超声波法将 TMV 导入烟草带壁细胞^[6], 在含有 10 mg·L⁻¹ PZ₁ 的培养基中培养, 培养 48 h 及 96 h 检测病毒浓度及叶绿素含量^[7], 同时设置对照试验。其中, 病毒浓度用 ELISA 法测定^[2], 用酶标仪 (DG-3022A 型) 读 490 nm 波长处的吸光值, 用 A₄₉₀ 表示。

$$\text{药剂对 TMV 破坏叶绿体的抑制率} = [1 - (w_1 - w_2) / (w_1 - w_3)] \times 100\%$$

式中: w 叶绿素含量, w_1 健康对照样品, w_2 药剂处理样品, w_3 感病植株样品。

用 TMV 接种烟草植株, 6.5 h 后喷施 0.1% PZ₁, 30 d 后检测植株病毒浓度。

2 结果及讨论

2.1 PZ₁ 对核酸与核糖体结合的影响

当 TMV-RNA 或烟草 mRNA 单独存在时, PZ₁ 对 TMV-RNA 及对寄主 mRNA 与核糖体结合, 均有一定抑制作用, 但 PZ₁ 对病毒的抑制率大于对寄主的抑制率 (表 1)。在实际侵染过程中, 病毒 RNA 和寄主 RNA 竞争与寄主核糖体相结合, 当使 2 种 RNA 共处于一个反应体系中时, 病毒 RNA 的竞争能力远远超过寄主 RNA 的竞争能力, 两者的结合率分别为 74% 及 26%, 施入药剂后病毒 RNA 的结合率从 74% 下降为 27%, 寄主的 mRNA 结合率从 26% 上升为 38%, 这说明药剂不但可以选择性地抑制病毒 RNA 与寄主核糖体结合, 而且可以加强

mRNA 的竞争能力。为验证实验结果, 向原生质体中导入³²P-TMV-RNA, 同时加入 PZ₁, 观察在药剂存在时 TMV-RNA 导入量及与核糖体结合率的变化(表 2)。

表 1 PZ₁ 对核酸与核糖体结合的影响

| 处 理 | 药剂含量 w/mg·L ⁻¹ | 结合率 Q/% | |
|-----------------------------|------------------------------|---------|--------|
| | | TMV-RNA | 烟草mRNA |
| TMV-RNA 或 烟草mRNA 单独存在 | 0 | 100 | 100 |
| | 1 | 62 | 85 |
| | 10 | 44 | 63 |
| TMV-RNA 和 烟草mRNA 混合存在 | 0 | 74 | 26 |
| | 1 | 27 | 38 |

表 2 PZ₁ 对 TMV-RNA 在原生质体中
与核糖体结合的影响

| 药剂 含量 w/mg·L ⁻¹ | TMV-RNA 导入率 | 导入 抑制率 | 结合率 Q/% | |
|----------------------------------|----------------|-----------|---------|-----------|
| | | | 结合率 | 结合 抑制率 |
| 0 | 95.13 | 0 | 94.85 | 0 |
| 1 | 76.37 | 19.72 | 3.72 | 96.08 |
| 10 | 76.64 | 19.43 | 0 | 100.00 |

对照组用 20 μg·mL⁻¹ TMV-RNA 感染烟草原生质体, 其中 95.13% 的 TMV-RNA 进入原生质体, 绝大部分 TMV-RNA (占总量 94.85%, 占进入原生质体的 TMV-RNA 的 99.71%) 与寄主核糖体结合。烟草原生质体中已存在本身的 mRNA, 这说明 TMV-RNA 与寄主 mRNA 的竞争能力是很强的。当 PZ₁ 存在时, PZ₁ 只抑制 20% 左右的 RNA 进入烟草原生质体, 但却抑制了大部分 TMV-RNA 与寄主核糖体结合。TMV-RNA 与寄主核糖体结合后, 抑制寄主正常的生理活动, 使原生质体死亡加快, 如果在原生质体培养液中加入 PZ₁ 1 mg·L⁻¹ 时, 使感染 TMV 的原生质体存活率上升, 这些都说明 PZ₁ 可以加强寄主 mRNA 与 TMV-RNA 的竞争能力, 从而看出活体实验与离体实验结论相同。

2.2 PZ₁ 对病毒核酸及蛋白质合成的影响

为考察 PZ₁ 对病毒核酸及蛋白质合成的影响, 对已感染病毒的寄主用³H-尿苷及³H-亮氨酸标记。无论感染病毒与否, 原生质体在培养过程中都会有部分死亡, 感染病毒的原生质体死亡更快。为准确分析 PZ₁ 对病毒核酸及蛋白质合成的抑制作用, 用叶盘做为实验材料, 以排除因处理及对对照样本原生质体死亡率不同带来的误差。在被 TMV 感染 6.5 h 后的烟草上取叶盘, 将叶盘分别放在含有³H-亮氨酸及³H-尿苷的培养液中培养, 同时加入药剂, 40 h 后用放射性免疫法测定(表 3)。

从表 3 可以看出, PZ₁ 可以抑制病毒核酸及蛋白质的合成。TMV 感染寄主, 其 RNA 与寄主核糖体结合后, 合成初期蛋白质, 而后合成间期 RNA (RF, RI), 继而合成模板 RNA, 最后合成移动蛋白质(30 kD)及衣壳蛋白质(17.5 kD), 组成新的病毒粒子^[5]。虽然用放射性免疫法测定的只是衣壳蛋白质及 RNA 的量, 但实验结果与间期 RNA 及其他蛋白质有关。值得注意的是, PZ₁ 对两者的抑制率相近。可能 PZ₁ 直接作用于抑制 TMV-RNA 合成, 间接影响了蛋白质的合成, 至于 PZ₁ 如何影响 RNA 及蛋白质合成, 还需进一步探讨。

2.3 PZ₁ 对烟草细胞 TMV 增殖的影响

将 TMV 导入带壁烟草细胞(图 1), 在含有药剂的培养基中培养, 于 48 h 及 96 h 取部分细胞, 检测药剂对病毒增殖的抑制率, 同时检测药剂对植物叶绿体的保护作用(表 4)。

从表 4 中可以看出, PZ₁ 可以抑制 TMV 在烟草细胞中增殖, 由此也抑制了 TMV 对寄主叶绿体的破坏作用。将感病细胞在固体培养基上培养, 感病细胞未能分化产生再生植株, 而药剂处理的感病细胞像健康细胞一样, 能正常地分化产生愈伤组织, 再生为正常植株(图 2)。

表3 PZ₁对TMV的RNA
及蛋白质合成的影响

| 项目 | 放射性强度(CPM) | | 抑制率 Q/% |
|-----|------------|---------|------------|
| | 对照 | 药剂处理 | |
| RNA | 2 260 3 | 422 6 | 81.30 |
| 蛋白质 | 8 427.0 | 1 563.3 | 81.45 |

表4 PZ₁对烟草细胞中TMV增殖的影响

| 项目 | 48 h | | 96 h | |
|---------|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|
| | A ₄₉₀ | 叶绿素含量 w/mg·g ⁻¹ | A ₄₉₀ | 叶绿素含量 w/mg·g ⁻¹ |
| 健康细胞对照 | 0.02 | 18.26 | 0.02 | 17.15 |
| 感病细胞对照 | 0.90 | 15.72 | 0.96 | 14.96 |
| 药剂处理 | 0.21 | 18.01 | 0.19 | 16.98 |
| 抑制率 Q/% | 78.41 | 90.15 | 81.91 | 92.24 |

在整株植物上喷施 PZ₁ 同样抑制了 TMV 的增殖。用 TMV 接种烟草叶片, 6 h 后喷施 0.1% PZ₁, 30 d 后检测植株 TMV 含量, ELISA 值下降 48%。

以上试验表明, PZ₁ 可抑制 TMV 增殖, 其药剂作用方式主要是抑制 TMV-RNA 与核糖体结合, 并抑制 TMV-RNA 合成, 从而抑制了病毒蛋白质的合成。用细胞生物测定体系进行实验时, PZ₁ 作用效果高于整株试验, 这说明 PZ₁ 的内吸传导作用较差, 有待进一步改进。

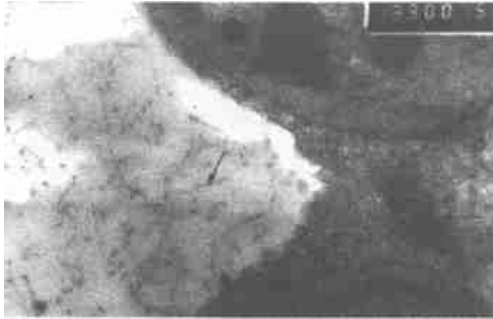


图1 用超声波法把 TMV 粒子
导入带壁烟草细胞

(箭头表示电镜下观察到的子代病毒粒子)



图2 药剂使被病毒感染的带壁烟草
细胞分化为再生植株

参 考 文 献

- 1 Takebe I. Protoplasts in the Study of Plant Virus Replication, Come from "Comprehensive Virology: II. Regulation and Genetics". Plant Viruses Plenum Press, 1977
- 2 Doullard J Y. Enzyme-linked immunosorbent assay. Methods in Enzymology, 1983, 92: 168~ 169
- 3 李重九, 马立新, 侯玉霞, 等. 植物病毒病选择性治疗药剂的筛选研究. 植物病理学报, 1997, 27(4): 343~ 384
- 4 陈新建, 陈梅英, 赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用. 北京: 中国农业大学出版社, 1998
- 5 平井笃造. 植物ウイルス学. 东京: 养贤堂出版, 1998
- 6 李重九, 侯玉霞, 汤青, 等. 用超声波法使烟草花叶病毒侵染烟草细胞的研究. 植物病理学报, 1999, 29(1): 86~ 90
- 7 彭运生. 关于提取叶绿素方法的比较研究. 北京农业大学学报, 1992, 18(3): 247~ 250