

鸡骨草冷浸提取物抗病毒活性研究

刘相文 侯 林 张成华 李雅群 刘金安 田景振

摘 要 **目的** 研究中药鸡骨草冷浸提取物的抗病毒活性。**方法** 采用细胞体外抗病毒实验法,结合 CPE 法及 CCK-8 试剂盒,以 TI 值(治疗指数)为研究指标,以利巴韦林、阿昔洛韦为阳性对照药,研究鸡骨草冷浸提取物对呼吸道合胞病毒(RSV)、单纯疱疹病毒(HSV-1)、柯萨奇病毒(COX-B5)和手足口病毒(EV71)的抑制作用。**结果** 甲醇冷浸提取物抗病毒效果较好,对 COX-B5 的 TI 值为 16.476,最大抑制率为 88%,与阳性对照药利巴韦林(TI 值为 17.482,最大抑制率为 85%)相差不大。**结论** 鸡骨草冷浸提取物具有体外抗 RSV、HSV-1、COX-B5 的活性。

关键词 鸡骨草 抗病毒 RSV HSV-1 COX-B5

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.016

Antiviral Activity of Cold-soak Extraction of *Abrus cantoniensis* Hance. Liu Xiangwen, Hou Lin, Zhang Chenghua, et al. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong 250355, China

Abstract Objective To investigate the antiviral activity of cold-soak extraction of *Abrus cantoniensis* Hance. **Methods** Four different strains of viruses, including RSV, HSV-1, COX-B5 and EV71 were used for in-vitro antiviral experiment, and the antiviral activity of *Abrus cantoniensis* Hance were evaluated by the cytopathic effect (CPE) method and CCK-8. The therapeutic indexes were calculated by the Reed-Muench method. Antiviral stability experiments of *Abrus cantoniensis* Hance were carried out at the same time. **Results** The TI of Methanol cold-soak extraction and Ribavirin were 16.476 and 17.482. It showed Methanol cold-soak extraction was as effective as the Ribavirin. **Conclusion** It indicated that cold-soak extraction of *Abrus cantoniensis* Hance have antiviral activity against RSV, HSV-1 and COX-B5.

Key words *Abrus cantoniensis* Hance ; Antiviral ; RSV ; HSV-1 ; COX-B5

鸡骨草为豆科植物广州相思子(*Abrus cantoniensis* Hance)的干燥全株,具有利湿退黄,清热解毒,舒肝止痛的功效,是一种常用的中草药^[1]。现代研究表明鸡骨草具有抗氧化、护肝降脂、抗病毒等药理作用^[2-13]。陈晓白等^[11-13]进行了鸡骨草抗乙肝病毒的研究,结果表明其对乙肝病毒具有抑制作用,但其在抗病毒领域的研究尚处于起步阶段,本研究选取了呼吸道合胞病毒(RSV)、单纯疱疹病毒(HSV)、柯萨奇病毒(COX-B5)、手足口病毒(EV71)进行鸡骨草冷浸提取物体外抗病毒研究,为抗病毒体内实验的研究奠定基础,为鸡骨草资源的综合开发利用提供依据。

材料与方 法

1. 实验材料:(1)药品:鸡骨草药材(购买于济南

建联中药店,经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为豆科相思子属植物鸡骨草的干燥全草);利巴韦林注射液(山东鲁抗辰欣药业有限公司,批号:1410206811);阿昔洛韦注射液(亚宝药业制药有限公司,批号:15062005)。(2)宿主细胞及病毒毒种:Hep2(人喉癌细胞)、RD(人横纹肌肉瘤细胞)、RSV、COX-B5、HSV-1、EV71 由山东省医学科学院基础医学研究所提供,本研究室保存提供,本研究室保存。(3)主要试剂:细胞培养液(美国 HyClone 公司,批号 AAJ207653),含 10% 新生牛血清及 100U/ml 青霉素和链霉素,过滤除菌,分装置 4℃ 备用;新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号 141013);PBS 磷酸盐缓冲液(美国 HyClone 公司,批号 AAK2-8442);EDTA-0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司,批号 1737903);Cell Counting Kit-8(上海碧云天生物技术有限公司,编号 C0039);甲醇等化学试剂均为分析纯。(4)实验仪器:CO₂ 恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司,HF90);倒置显微镜(日本 Olympus 公司,CKX-31);生物安全柜(上海力申科学仪器有限

基金项目:国家重大新药创制专项基金资助项目(2014ZX09509001);山东省高等学校中医药抗病毒协同创新中心基金资助项目(XTCX2014C01-01)

作者单位:250355 济南,山东中医药大学药学院

通讯作者:田景振,教授、山东省泰山学者,电子信箱:Tianjingzhen@163.com

公司, HFsafe - 1200TE); 酶标仪 (Molecular Device 公司, Spectra Max M5)。

2. 实验方法: (1) 供试品的制备: 取干燥的鸡骨草粉末 (过 60 目筛) 20g, 10 倍量甲醇冷浸提取 30 天, 过滤, 滤液浓缩, 干燥, 得干燥产物, 取适量干燥产物用 2% DMSO 溶液配成 16mg/ml 的供试品溶液, 即为鸡骨草甲醇冷浸提取物供试品; 丙酮、75% 乙醇冷浸提取物的制备方法同“鸡骨草甲醇冷浸提取物供试品”制备方法。利巴韦林和阿昔洛韦用 2% 的 DM-SO 溶液配成 50mg/ml 的溶液作为供试品。(2) 病毒的扩增: 将病毒毒株 (RSV、HSV - 1、COX - B5、EV71) 200 μ l 接种于单层细胞上, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 病毒培养箱中培养, 设细胞对照, 当细胞出现 90% 以上的病变时, 反复冻融 3 次, 吹打离心, 取上清液定量分装、备用。(3) 制备多孔板内单层细胞: 将消化好细胞, 以 10⁵ 个/毫升细胞浓度接种 96 孔板, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 长成单层后使用。(4) 病毒毒力的测定: 将上述扩增好的病毒用 10 倍比系列稀释, 稀释 10 个梯度, 设置 4 个复孔, 接种于已长好细胞的 96 孔板中, 并设空白对照, 细胞对照, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 病毒培养箱中培养, 细胞出现 90% 以上病变时终止培养, 按照 CCK - 8 试剂盒的操作, 测定吸光度 A 值。根据 Reed - Muench 公式计算 RSV、HSV - 1、Cox - B5、EV71 病毒液的半数感染浓度 TCID₅₀ 分别为 10^{-5.36}/ml、10^{-4.24}/ml、10^{-4.52}/ml、10^{-4.42}/ml。细胞存活率 (%) = 各组 A 值/正常细胞 A 值 $\times$ 100%; 细胞比距 = ($>$ 50% 病变率 - 50% 病变率)/($>$ 50% 病变率 - $<$ 50% 病变率) $\times$ 100%; TCID₅₀ = Antilg (Ig $>$ 50% CPE 百分率病毒稀释度 + 比距 $\times$ 稀释因子对数)。(5) 药物对细胞毒性的测定: 将供试品药物用 2 倍比稀释 10 个浓度梯度, 接种于已经长好细胞的 96 孔板中, 设 4 个复孔、细胞对照孔和空白对照孔, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 病毒培养箱中培

养, 倒置显微镜下观察, 细胞出现 90% 病变时终止培养, 按照 CCK - 8 试剂盒的操作, 测定吸光度 A 值。应用 Reed - Muench 公式计算药物半数中毒浓度 TC₅₀, 并确定最大无毒浓度 TC₀。TC₅₀ = [Antilog (log $>$ 50% CPE 百分率病毒稀释度 + 比距)] $\times$ C。(6) 对病毒直接杀灭作用: 供试品从无毒浓度起, 按二倍比稀释 10 个浓度梯度, 与等体积 100 倍 TCID₅₀ 浓度的病毒液相互作用 2h, 每孔 100 μ l 依次接种于已经长好细胞的 96 孔板中, 并设 4 个复孔、细胞对照孔、阳性对照孔和空白对照孔, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 病毒培养箱中培养, 倒置显微镜下观察, 细胞出现 90% 病变时终止培养, 按照 CCK - 8 试剂盒的操作测定吸光度 A 值, 计算细胞存活率, 应用 Reed - Muench 公式计算药物半数有效浓度 (EC₅₀) 和治疗指数 (TI)。EC₅₀ = [Antilog ($>$ 50% CPE 百分率病毒稀释度的值 - 比距)] $\times$ C; 治疗指数 (TI) = 半数毒性浓度 (TC₅₀)/半数有效浓度 (EC₅₀)。(7) 对病毒预防作用: 供试品从无毒浓度起, 用 2% 维持液按 2 倍比稀释 10 个浓度梯度, 每孔 100 μ l 依次接种于已经长好细胞的 96 孔板中, 2h 后, 用 PBS 清洗, 每孔再加入 100 μ l 100 倍 TCID₅₀ 浓度的病毒液, 接下来的步骤按照“对病毒直接杀死作用”中操作计算 EC₅₀ 和治疗指数 TI。(8) 对病毒穿入细胞后的阻断作用: 已经长好细胞的 96 孔板中每孔加入 100 μ l 100 倍 TCID₅₀ 浓度的病毒液, 2h 后, 用 PBS 清洗, 供试品从无毒浓度起, 按二倍比稀释 10 个浓度梯度, 每孔 100 μ l 接种, 计算 EC₅₀ 和治疗指数 TI。

结 果

实验表明, 鸡骨草对 RSV、HSV - 1、COX - B5、EV71 均无预防作用和穿入后的抑制作用, 对 RSV、HSV - 1、COX - B5 有直接杀灭作用 (表 1), 对 EV71 无直接杀灭作用。甲醇冷浸提取物对 HSV - 1、COX - B5 直接杀灭作用较好, 其 TI 值分别为

表 1 病毒直接杀灭作用结果

供试品	RSV				HSV - 1			COX - B5		
	TC ₀	TC ₅₀	EC ₅₀	TI	TC ₅₀	EC ₅₀	TI	TC ₅₀	EC ₅₀	TI
	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)		(mg/ml)	(mg/ml)		(mg/ml)	(mg/ml)	
甲醇冷浸提取物	1.557	3.114	0.279	11.161	3.114	0.297	10.485	3.114	0.189	16.476
丙酮冷浸提取物	0.639	1.278	0.079	16.177	1.278	-	-	1.278	0.098	13.041
75% 乙醇冷浸提取物	0.834	1.668	0.155	10.761	1.668	-	-	1.668	-	-
利巴韦林	3.317	6.346	0.321	19.760	-	-	-	6.346	0.363	17.482
阿昔洛韦	3.281	-	-	-	6.561	0.180	23.432	-	-	-

HSV - 1、COX - B5 的 TC₀ 值与 RSV 的 TC₀ 值一致

10.485、16.476,最大抑制率分别为89%、88%,对COX-B5直接杀灭作用与阳性对照药利巴韦林(TI值为17.482,最大抑制率为85%)相差不大;丙酮冷浸提取物对RSV作用效果较好,其TI值为16.177,最大抑制率为89%,阳性对照药利巴韦林TI值为19.760,最大抑制率为91%(图1)。鸡骨草75%乙醇冷浸提取物表现出较差的抗病毒效果。

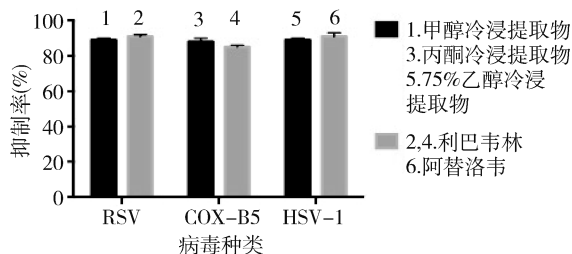


图1 鸡骨草与利巴韦林、阿替洛韦对
不同病毒的最大抑制率比较

讨 论

本实验考察了甲醇、丙酮、75%乙醇3种不同溶剂的鸡骨草冷浸提取物对4种病毒的直接杀灭、预防和穿入后抑制作用,结果表明鸡骨草对4种病毒均无预防和穿入后抑制作用,甲醇冷浸提取物对COX-B5病毒直接杀灭作用较好,与利巴韦林相差不大,但利巴韦林其治疗结果存在不良反应,最显著的是贫血^[14]。这使得寻找不良反应小、安全有效的抗病毒药物尤为重要,我国中医药治疗病毒性疾病已有几千年的历史,与化学药物相比,中药抗病毒具有多组分,毒性不良反应小,多靶点等特点,对各类病毒感染的治疗具有独特的药物作用优势,我国丰富的天然药物在抗病毒方面有着独特的优势与潜力,具有较大的开发价值。

3种提取物对病毒的作用效果不同,推测有以下几个原因:(1)甲醇冷浸提取物效果较好,甲醇极性比丙酮、乙醇大,甲醇提取物中含有极性较大的成分,因此,可以推测甲醇冷浸提取物抗病毒的物质基础可能是鸡骨草中极性较大的成分,或者甲醇冷浸提取物中抗病毒物质含量较高,达到了对病毒的抑制浓度。(2)丙酮、75%乙醇冷浸提取物作用效果较甲醇冷浸提取物差,可能因为提取物中含抗病毒有效成分较

少,达不到对病毒的抑制浓度。(3)对病毒无效的提取物,作者推测,溶剂不能将有效成分浸出或浸出的有效成分较少,故无抗病毒效果。综上所述,今后的工作应该对鸡骨草甲醇冷浸提取物进行下一步的分析纯化,明确其抗病毒的物质基础及其抗病毒机制,对鸡骨草抗病毒作用进行精准阐述,在此基础上形成严谨科学的中药材抗病毒研究思路,加强对其他传统中药的抗病毒物质基础和作用机制研究,为建立中药材抗病毒平台奠定一定的基础。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 194-195
- 2 谭冰, 严焕宁, 黄锁义, 等. 广西壮药鸡骨草多糖的提取及对羟自由基清除作用的研究[J]. 检验医学教育, 2011, 18(4): 38-39
- 3 王晓波, 黄叠玲, 刘冬英, 等. 鸡骨草总黄酮清除自由基及抑制亚硝化作用研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 942-944
- 4 林明霞, 李涂蓝, 潘冬贵, 等. A015 鸡骨草醇提物体外抗活性氧自由基作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(10): 1047-1050
- 5 黄挺章, 李远辉, 郭圣奇, 等. 鸡骨草乙酸乙酯提取物体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2015, 36(1): 45-46
- 6 黄凯文, 陈剑梅, 苏宁, 等. 鸡骨草醇提物对大鼠非酒精性脂肪肝的保护作用研究[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2898-2899
- 7 梁耿, 韦凯东. 鸡骨草醇提物对四氯化碳诱导肝损伤大鼠的保护作用的研究[J]. 广西医科大学学报, 2012, 29(6): 852-854
- 8 梁耿, 韦凯东. 鸡骨草醇提物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(5): 606-607
- 9 张勤, 蔡红兵, 莫志贤, 等. 鸡骨草防治大鼠脂肪肝的实验研究[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1450-1455
- 10 陈晓白, 甘耀坤, 王晓平, 等. 鸡骨草对SD大鼠血脂及肝脏的影响[J]. 中国医药指南, 2009, 7(23): 28-29
- 11 陈晓白, 韩余健, 许潘, 等. 鸡骨草提取物对体外乙型肝炎病毒的抑制作用[J]. 医药导报, 2009, 28(4): 418-420
- 12 韦敏, 陈晓白. 鸡骨草对HepG2. 2. 15细胞HBeAg和HBsAg的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 972-973
- 13 陈晓白, 王晓平, 韦敏, 等. 毛鸡骨草醇提液对HepG2. 2. 15细胞乙型肝炎表面抗原及乙型肝炎E抗原的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 184-186
- 14 Kamar N, Izopet J, Tripon S, et al. Ribavirin for chronic chepatitis E virus infection in transplant recipients[J]. New Engl J Med, 2014, 370(11): 11-20

(收稿日期: 2016-11-02)

(修回日期: 2016-11-11)

更正启事 本刊在2017年5月第46卷第5期第150~154页发表的论文《瘢痕子宫患者采用药物终止早期妊娠的治疗效果观察》,作者孙业亮、姚丽艳、朱晓玉、赵雷的单位应为: 830028 乌鲁木齐, 新疆医科大学第二附属医院, 通讯作者: 姚丽艳, 电子邮箱: yaoliyangxj@126.com。特此更正。

《医学研究杂志》编辑部