

金莲花汤不同提取物对细胞增殖的影响及体外抗病毒活性研究

梁羽茜 刘晓丽 张琳婧 王如峰 胡秀华

摘要 **目的** 探讨不同提取方法的金莲花汤提取物(金莲花汤不同提取物)对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖以及对小鼠 H1N1 流感病毒活性的影响 **方法** 通过 MTT 法观察药物处理后对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 生长增殖情况的影响;利用小鼠 H1N1 流感病毒感染 MDCK 细胞,进行病毒扩增并测定病毒效价;利用小鼠 H1N1 流感病毒感染小鼠巨噬细胞 Raw264.7,采用 MTT 法结合 CPE 方法确定金莲花汤不同提取物的抗病毒效果。 **结果** MTT 结果发现,金莲花汤不同提取物(20%、40%、60%、80%、95%、二次 80%、二次 95% 及粗提取物)均对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖具有明显的抑制作用,IC₅₀ 分别为 0.063、0.064、0.145、0.065、0.064、0.064、0.105、0.2mg/ml;MTT 结果结合 CPE 分析显示,60% 金莲花汤提取物 IC₂₅ 及 IC₅₀ 的药物剂量有轻微的抗病毒效果;80% 金莲花汤提取物 IC₀ 及二次 95% 金莲花汤提取物 IC₂₅ 的药物剂量抗病毒效果较好,差异有统计学意义。 **结论** 不同提取方法的金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖有一定的抑制作用;在体外抗病毒实验中,一定提取纯度的金莲花汤提取物对小鼠 H1N1 流感病毒有抑制作用。

关键词 小鼠巨噬细胞 Raw264.7 MDCK 细胞 金莲花汤提取物 细胞增殖 抗病毒活性

中图分类号 R9 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.025

Experimental Study on the Effect of the Soup of Trollius chinensis from Different Extraction Methods on Cell Proliferation and Anti-virus Activity in Vitro. Liang Yuxi, Liu Xiaoli, Zhang Linjing, et al. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of the soup of Trollius chinensis from different extraction methods on cell proliferation and the influenza virus(H1N1). **Methods** MTT method was used to observe cell proliferation in Raw264.7 treated with the extract of the soup of Trollius chinensis. We infected MDCK cells with the influenza virus(H1N1), and amplified the mice H1N1 virus and detected the virus titer. MTT method combined with CPE was applied to detect the antiviral effect of the soup of Trollius chinensis from different extraction methods by infecting Raw264.7 with the influenza virus(H1N1). **Results** MTT results showed that the soup of Trollius chinensis from different extraction methods had an obvious inhibitory effect on cell proliferation in Raw264.7 cells, and the IC₅₀ was calculated and results were individually 0.063, 0.064, 0.145, 0.065, 0.064, 0.064, 0.105 and 0.2mg/ml. MTT method combined with CPE results showed that 60% of the extract of Trollius chinensis soup had a slight anti-viral infection effect in IC₂₅ and IC₅₀ compared with viral infection group. Moreover, compared with viral infection group, the 80% of the extract of Trollius chinensis soup in IC₀ and the second extraction 95% of the extract of Trollius chinensis soup in IC₂₅ had a much better antiviral role, and there were statistical significance. **Conclusion** The soup of Trollius chinensis from different extraction methods had an important effect on cell proliferation in Raw264.7. The extract of the soup of Trollius chinensis at a certain purity had anti-viral role on Raw264.7 cells infected by the influenza virus(H1N1) in vitro.

Key words Raw264.7 cell; MDCK cell; Extract of the soup of Trollius chinensis; Cell proliferation; Anti-viral activity

金莲花为多年生草本植物毛茛科金莲花属的干燥花及花蕾,又名旱金莲、金梅草、金芙蓉等,始载于清代赵学敏所著《本草纲目拾遗》,谓其:味苦、性寒、无毒,具有清热解毒的功效^[1]。现代药理学研究表

明,金莲花具有抑菌、抗病毒、抗癌及降压等多种功效,可用于治疗上呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎、急性中耳炎、口疮等症^[2]。本实验基于金莲花清热解毒功效及其现代药理学研究,以金莲花为君药,配伍苏叶、葛根、大青叶、蒲公英组成中药复方金莲花汤,采用 MTT 法探讨不同提取方法的金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的影响及其抗小鼠 H1N1 流感病毒活性的作用,为深入研究金莲花汤的不同提

基金项目:北京中医药大学科研基金资助项目(1000061221637)

作者单位:100029 北京中医药大学生命科学院

通讯作者:胡秀华,电子信箱:xiuhuahu@126.com

取方法影响其抗病毒作用的机制提供实验基础。

材料与方法

1. 材料:胎牛血清(杭州四季青),DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),生理盐水,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司),二甲基亚砷(DMSO,美国 Sigma 公司),A/FM/1/47 小鼠(H1N1)流感病毒(为本实验室留存),MD-CK 细胞和小鼠巨噬细胞 Raw264.7(均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心)。

2. 仪器:倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司),96 孔细胞培养板、细胞培养瓶(美国 Corning 公司)。

3. 药物制备:金莲花汤组成:金莲花 30g,苏叶 30g,葛根 50g,大青叶 50g,蒲公英 75g。不同纯度的金莲花汤提取物为一次醇提物和二次醇提物,由北京中医药大学生命科学院生物制药系提供。金莲花汤粗提物制备如下:称取金莲花 30g,苏叶 30g,葛根 50g,大青叶 50g,蒲公英 75g 进行水煎,提取 2 次,第 1 次 100℃ 煎煮 45min,无菌纱布过滤,加水重复煎煮,第 2 次 100℃ 煎煮 30min,混合 2 次煎煮药液,过滤,加热浓缩至 62mg/ml。置于超净台内分装,检菌后置于冰箱 4℃ 保存备用。

4. 实验方法:小鼠 H1N1 流感病毒扩增:当 MD-CK 细胞生长为单层时,用 4℃ 生理盐水清洗两次除去死细胞。接种 500ml 小鼠 H1N1 流感病毒到 MD-CK 细胞的培养瓶中,5% CO₂ 恒温培养箱中 37℃ 孵育 2h,加入 7ml 含 2% 胎牛血清的 DMEM 病毒维持液进行培养。每天观察细胞的形态变化,当细胞培养 7 天后,观察细胞状态,有明显细胞病变发生时,收集细胞和细胞上清液,冻融 3 次,获得小鼠 H1N1 流感病毒标准株。分装贮存于 -80℃ 冰箱作为实验用病毒传代接种液。

5. 半数组织培养的感染剂量(TCID₅₀)的测定:取生长较好的 MDCK 单层细胞进行细胞计数,以每孔 1.5×10^5 个细胞接种在 96 孔板,加 100μl DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h 后进行病毒接种。将小鼠 H1N1 流感病毒按 10 倍倍比稀释法,用病毒稀释液稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 依次将各个浓度的病毒液、阳性空白对照组(病毒原液),阴性空白对照(病毒稀释液),按 100 微升/孔加入 96 孔板中置于培养箱中培

养,2h 后每孔加入 100μl 病毒维持液(每个稀释梯度为 8 个孔),置于培养箱。在显微镜下连续观察几天,每天观察细胞发生病变的情况(CPE),当某一个稀释梯度的细胞 8 个孔细胞都出现 50% 的病变,而它下一个效价有 7 个孔出现病变时,记录镜下观察到的各个稀释效价细胞发生病变的孔数。Reed-Muench 方法计算 TCID₅₀,按稀释度之间的距离比例公式计算小鼠 H1N1 流感病毒的效价。距离比例公式 = (高于 50% 感染百分数 - 50%) / (高于 50% 感染百分数 - 低于 50% 感染百分数),TCID₅₀ 的对数 = 高于 50% 感染率的病毒稀释度的对数 + 距离比例 × 稀释因子的对数。

6. MTT 法测定金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 细胞增殖的影响:取生长较好的小鼠巨噬细胞 Raw264.7,以每孔 1×10^4 个/毫升接种于 96 孔细胞培养板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 24h 后弃去培养液,用生理盐水清洗。分空白对照组、加药组进行试验,每个组设 6 个平行孔。空白对照组加生理盐水,加药组分别以 2 倍稀释法稀释药物,选取 0.0125、0.025、0.05、0.1、及 0.2mg/ml 5 个浓度,按不同提取纯度在 100μl 细胞培养液中分别加入不同质量浓度的金莲花汤提取物药液,72h 后将各组上清液吸出并用生理盐水清洗。避光条件下,每孔加入质量浓度为 5g/ml 的 MTT 溶液 10μl,再加入 90μl 无血清培养基混匀,用锡纸包裹在培养箱中继续培养 4h 后弃上清,每孔加入 150μl DMSO,摇床震荡 10min,放入酶标仪上测定 570nm 处的光吸收值(A 值),通过公式计算细胞生长抑制率,抑制率(%) = (1 - 实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值) × 100%。据实验结果最终选取 0.025、0.05、0.1mg/ml 3 个剂量浓度(60% 金莲花汤提取物及金莲花汤粗提取物选取 0.05、0.1、0.2mg/ml 3 个剂量浓度)重复测定金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 细胞增殖的影响,并根据结果计算出各药物的 IC₀、IC₂₅、IC₅₀ 剂量。

7. 计算金莲花汤提取物的 IC₀、IC₂₅ 及 IC₅₀ 剂量:对金莲花汤提取物浓度和小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的抑制率进行线性拟合,根据所得方程式计算出药物 IC₀、IC₂₅ 及 IC₅₀ 剂量。

8. MTT 法测定金莲花汤提取物的抗病毒活性作用:取小鼠巨噬细胞 Raw264.7 以每孔 1×10^4 个/毫升接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100μl,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养 24h 后弃去培养液,用

生理盐水清洗。分为病毒加药物试验组(病毒+药物)、空白对照组(生理盐水+细胞培养液)、病毒对照组(病毒+细胞培养液)进行试验,每个组设4个平行孔。72h后取出各组上清液,并移入MDCK细胞96孔板中,将MDCK细胞96孔板置于细胞培养箱继续培养,以检测抗病毒活性。用生理盐水清洗小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的96孔板,余方法同“MTT法测定金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 细胞增殖的影响”项,计算细胞生长抑制率。

9. 抗病毒活性评价:将“MTT法测定金莲花汤提取物的抗病毒活性作用”项中药物作用72h后的小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的96孔板在进行MTT方法处理前,先置于光学显微镜(目镜10倍,物镜40倍)下观察细胞状态,之后将其各组上清液吸出移入MDCK细胞96孔板中,并将MDCK 96孔板置于37℃、5% CO₂的培养箱内培养,在显微镜下进行连续观察,每天观察细胞发生病变的情况(CPE),当某一个稀释梯

度的细胞4个孔细胞都出现50%的病变,而它下一个效价有3个孔出现病变时,记录镜下观察到的各个稀释效价细胞发生病变的情况。

10. 统计学方法:数据采用SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,2个独立样本组间均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠 H1N1 流感病毒 TCID₅₀ 的测定:观察小鼠 H1N1 流感病毒所致的 MDCK 细胞病变情况,如表 1 所示,按 Reed - Muench 方法计算小鼠 H1N1 流感病毒的效价。距离比例 = (高于 50% 感染百分数 - 50%) / (高于 50% 感染百分数 - 低于 50% 感染百分数) = (82 - 50) / (82 - 30) = 0.62。TCID₅₀ 的对数 = 高于 50% 感染率的病毒稀释度的对数 + 距离比例 × 稀释因子的对数 = -3 + 0.62 × (-1) = -3.62。则小鼠 H1N1 流感病毒的 TCID₅₀ = 10^{-3.62} / 0.1ml。

表 1 小鼠 H1N1 流感病毒所致的 MDCK 细胞病变情况

稀释度	阳性孔数	阴性孔数	阳性总孔数	阴性总孔数	比率	阳性孔数百分比(%)
10 ⁻¹	8	0	25	0	25/25 + 0	100
10 ⁻²	8	0	17	0	17/17 + 0	100
10 ⁻³	6	2	9	2	9/9 + 2	82
10 ⁻⁴	3	5	3	7	3/3 + 7	30
10 ⁻⁵	0	8	0	15	0/0 + 15	0
10 ⁻⁶	0	8	0	23	0/0 + 23	0
10 ⁻⁷	0	8	0	31	0/0 + 31	0
10 ⁻⁸	0	8	0	39	0/0 + 39	0
10 ⁻⁹	0	8	0	47	0/0 + 47	0

2. 金莲花汤不同提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的影响:利用不同提取方法的不同质量浓度的金莲花汤提取物处理小鼠巨噬细胞 Raw264.7, MTT 结果如表 2 所示,与空白对照组相比,除 40% 金莲花汤提取物 0.025mg/ml 浓度、60% 金莲花汤提取物 0.05mg/ml 浓度、80% 金莲花汤提取物 0.025mg/ml 浓度及 95% 金莲花汤提取物 0.025mg/ml 浓度外,其余不同提取方法的不同质量浓度金莲花汤提取物处理细胞 72h 后,小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的增殖均受到不同程度的抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3. 金莲花汤不同提取物的 IC₀、IC₂₅、IC₅₀:根据表 2 的数据,利用金莲花汤提取物浓度和对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的抑制率进行线性拟合,根据所得线性

方程式计算出 IC₀、IC₂₅、IC₅₀ 的结果,如表 3 所示,分别选取这些浓度进行体外抗病毒活性研究。

4. 金莲花汤不同提取物的抗病毒活性检测:(1) 20%、40% 和 60% 金莲花汤提取物的抗病毒活性:与空白对照组相比,病毒对照组、20% 金莲花汤提取物(IC₀、IC₂₅及 IC₅₀)、40% 金莲花汤提取物(IC₀、IC₂₅及 IC₅₀)、60% 金莲花汤提取物(IC₀、IC₂₅及 IC₅₀)均可抑制小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的增殖,各组差异有统计学意义($P < 0.05$);与病毒对照组相比,20% 金莲花汤提取物(IC₅₀)和 40% 金莲花汤提取物(IC₀及 IC₂₅),差异有统计学意义($P < 0.05$),说明感染病毒后结合药物的毒性,可使细胞死亡增加,药物未见抗病毒效果(表 4)。(2) 80%、95%、二次 80% 和二次 95% 金莲花汤提取物的抗病毒活性:与空白对照组相

表 2 MTT 测定不同提取方法金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)				
组别	提取纯度	药物浓度 (mg/ml)	A 值	抑制率 (%)
空白对照组		0	0.6703 $\pm$ 0.0824	0
加药组	20%	0.025	0.5810 $\pm$ 0.0716 *	13.3
		0.05	0.4422 $\pm$ 0.1114 *	34.0
		0.1	0.0766 $\pm$ 0.0021 *	88.6
	40%	0.025	0.6929 $\pm$ 0.0371	-3.0
		0.05	0.3602 $\pm$ 0.0684 *	46.3
		0.1	0.0757 $\pm$ 0.0029 *	88.7
	60%	0.05	0.7911 $\pm$ 0.0945 *	-18.0
		0.1	0.5156 $\pm$ 0.1388 *	23.1
		0.2	0.0919 $\pm$ 0.0051 *	86.3
	80%	0.025	0.7419 $\pm$ 0.1684	-10.7
		0.05	0.3594 $\pm$ 0.0113 *	46.4
		0.1	0.0746 $\pm$ 0.0088 *	88.9
	95%	0.025	0.6556 $\pm$ 0.0887	2.2
		0.05	0.4102 $\pm$ 0.0582 *	38.8
		0.1	0.0777 $\pm$ 0.0096 *	88.4
	二次 80%	0.025	0.4934 $\pm$ 0.1153 *	25.8
		0.05	0.4409 $\pm$ 0.0864 *	34.2
		0.1	0.1484 $\pm$ 0.1354 *	77.9
	二次 95%	0.025	0.5628 $\pm$ 0.1007 *	16.0
		0.05	0.4982 $\pm$ 0.0187 *	25.7
		0.1	0.3493 $\pm$ 0.0299 *	47.9
	粗提物	0.05	0.5138 $\pm$ 0.1400 *	23.3
		0.1	0.4907 $\pm$ 0.0432 *	26.8
		0.2	0.3142 $\pm$ 0.1085 *	53.1

与空白对照组比较, * $P < 0.05$

比,病毒对照组可导致小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖抑制,抑制率为 24.79%;与病毒对照组相比,病毒加 80% 金莲花汤提取物 (IC₀、IC₂₅ 及 IC₅₀)、95% 金莲花汤提取物 (IC₀、IC₂₅ 及 IC₅₀)、二次 80% 金莲花汤提取

表 3 不同提取方法金莲花汤提取物 IC ₀ 、IC ₂₅ 、IC ₅₀ 剂量浓度		
组别	抑制浓度	对应剂量 (mg/ml)
20%	IC ₀	0.014
	IC ₂₅	0.038
	IC ₅₀	0.063
40%	IC ₀	0.021
	IC ₂₅	0.042
	IC ₅₀	0.064
60%	IC ₀	0.072
	IC ₂₅	0.109
	IC ₅₀	0.145
80%	IC ₀	0.025
	IC ₂₅	0.045
	IC ₅₀	0.065
95%	IC ₀	0.02
	IC ₂₅	0.042
	IC ₅₀	0.064
二次 80%	IC ₀	0
	IC ₂₅	0.029
	IC ₅₀	0.064
二次 95%	IC ₀	0
	IC ₂₅	0.047
	IC ₅₀	0.105
粗提取	IC ₀	0
	IC ₂₅	0.1
	IC ₅₀	0.2

物 (IC₀)、二次 95% 金莲花汤提取物 (IC₂₅) 对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的抑制,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),其中病毒加 80% 金莲花汤提取物 (IC₀) 及二次 95% 金莲花汤提取物 (IC₂₅) 的药物剂量组抑制小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的增殖,抑制率分别为 9.55% 和 13.4%,与病毒对照组抑制率 24.79% 比较,可明显减少病毒对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的抑制,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明 0% 金莲花汤提

表 4 MTT 测定病毒加不同剂量浓度金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)					
组别	提取纯度	致死率 (%)	药物浓度 (mg/ml)	A 值	抑制率 (%)
空白对照组		0	0	1.1371 $\pm$ 0.0930	0
病毒对照组		0	0	0.7562 $\pm$ 0.1991 *	33.49
病毒加药组	20%	0	0.014	0.7126 $\pm$ 0.1223 *	37.33
		25	0.038	0.4653 $\pm$ 0.1022 *	59.08
		50	0.063	0.4118 $\pm$ 0.0228 * #	63.79
	40%	0	0.021	0.5216 $\pm$ 0.0495 * #	54.13
		25	0.042	0.5334 $\pm$ 0.0384 * #	53.09
		50	0.064	0.6501 $\pm$ 0.0603 *	42.83
	60%	0	0.072	0.6481 $\pm$ 0.0496 *	43.00
		25	0.109	0.8294 $\pm$ 0.0574 *	27.06
		50	0.145	0.7607 $\pm$ 0.1170 *	33.10

与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与病毒对照组比较, # $P < 0.05$

取物 (IC₀) 及二次 95% 金莲花汤提取物 (IC₂₅) 的药物剂量在病毒感染的情况下,有效改善细胞的死亡情况,具有明显的抗病毒效果 (表 5)。(3) 金莲花汤粗提物的抗病毒活性:与空白对照组相比,病毒对照组可导致小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖抑制,抑制率为

24.93%;与病毒对照组相比,病毒加金莲花汤粗提取物各剂量组均可抑制小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的增殖,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但并未减少病毒对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的增殖的抑制,可见金莲花汤粗提物抗病毒效果不明显 (表 6)。

表 5 MTT 测定病毒加不同剂量浓度金莲花汤提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	提取纯度	致死率 (%)	药物浓度 (mg/ml)	A 值	抑制率 (%)
空白对照组		0	0	1.3198 ± 0.2108	0
病毒对照组		0	0	0.9250 ± 0.1075 *	24.79
病毒加药组	80%	0	0.014	1.1938 ± 0.3136 #	9.55
		25	0.038	0.4593 ± 0.0762 * #	65.20
		50	0.063	0.5553 ± 0.1258 * #	57.93
	95%	0	0.021	0.5734 ± 0.0985 * #	56.55
		25	0.042	0.5157 ± 0.0831 * #	60.93
		50	0.064	0.7073 ± 0.2401 * #	46.41
	二次 80%	0	0.072	0.7491 ± 0.1002 * #	43.24
		25	0.109	0.9389 ± 0.0854 *	28.87
		50	0.145	0.9423 ± 0.1172 *	28.60
	二次 95%	0	0	1.0322 ± 0.1257 *	21.80
		25	0.047	1.1430 ± 0.2610 #	13.40
		50	0.105	0.7408 ± 0.0635 *	43.87

与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与病毒对照组比较, # $P < 0.05$

表 6 MTT 测定病毒加不同剂量浓度金莲花汤粗提取物对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	提取纯度	药物浓度 (mg/ml)	A 值	抑制率 (%)
空白对照组		0	1.7713 ± 0.2430	0
病毒对照组		0	1.3297 ± 0.1665 *	24.93
病毒加药组	粗提物	0	0.7807 ± 0.2191 * #	55.92
		0.1	0.7513 ± 0.1402 * #	57.58
		0.2	0.8213 ± 0.0994 * #	53.63

与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与病毒对照组比较, # $P < 0.05$

5. 金莲花汤不同提取物抗病毒效果评价:根据小鼠 H1N1 流感病毒感染后引起的细胞病变情况,对不同提取方法的金莲花汤提取物抗病毒效果进行评价。金莲花汤粗提物 0.1mg/ml 剂量浓度及二次 95% 金莲花汤提取物 0.047mg/ml 剂量浓度作用于小鼠 H1N1 流感病毒感染的小鼠巨噬细胞 Raw264.7,72h 后置于

光学倒置显微镜下观察。与空白对照组 (生理盐水 + 细胞培养液) 比较,发现病毒对照组 (病毒 + 细胞培养液) 的细胞膜结构不清,细胞质中空泡较多,细胞状态不佳,结果如图 1 箭头所示;与病毒对照组比较,病毒加药组 (病毒 + 金莲花汤粗提物 0.1mg/ml) 细胞质中空泡数量相对减少,但与空白对照组相比,细胞质中空泡数量较多;与病毒对照组相比,病毒加药组 (病毒 + 二次 95% 金莲花汤提取物 0.047mg/ml) 细胞膜结构明显清晰,且细胞质中的空泡数量较少,细胞形态趋于正常。同时,将“抗病毒活性评价”项中经各组上清液作用的 MDCK 细胞 96 孔板置于光学显微镜下观察,发现与病毒对照组比较,80% 金莲花汤提取物中 IC₀ (剂量为 0.014mg/ml) 及二次 95% 金莲花汤提取物中 IC₂₅ (剂量为 0.047mg/ml) 的两组 MDCK 细胞产生的 CPE 孔数减少,病毒感染率降低。

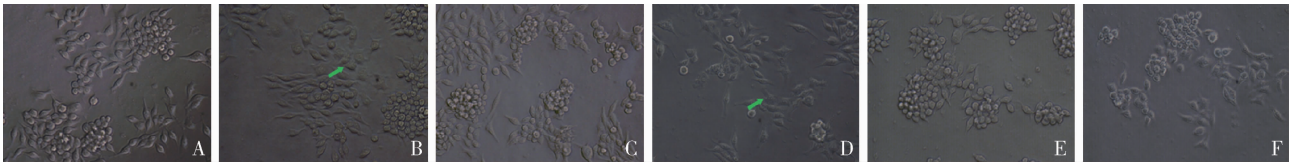


图 1 金莲花汤提取物处理小鼠 H1N1 流感病毒感染后的小鼠巨噬细胞 Raw264.7 病变情况 (×400)
箭头指示为细胞质空泡。A. 正常对照组;B. 病毒对照组;C. 金莲花汤粗提取物组;D. 病毒 + 金莲花汤粗提物组;
E. 二次 95% 金莲花汤提取物组;F. 病毒 + 二次 95% 金莲花汤提取物组

讨 论

流行性感是由流感病毒引起的急性呼吸道感染病,传染性强、发生率高、易行成不同程度流行^[3]。流感病毒是流感的主要病原体,根据其包膜上血凝素 HA 和神经酰胺 NA 抗原性的不同可分为不同的亚型,其中甲型 H1N1 流感病毒易引起季节性流行且具有高致病率及病死率,对人类危害较大^[4-6]。针对流感治疗,西医学采用早期应用抗病毒药物及对症治疗的方法,但流感病毒易变异且产生耐药性的特点往往影响临床疗效^[7]。中医学流感属“温病”“疫病”“时行”“瘟疫”等范畴,与“时行感冒”相似,时行感冒在隋代巢元方所著《诸病源候论·时气诸候》中即已提到其属于“时行病”一类,具有很强的传染性,^[8,9]。

根据历代医家的治疗经验,后世中医逐渐形成完整的治疗体系,总结出多种行之有效的治法与方药。其中金莲花的抗病毒活性是本实验研究的理论基础。研究发现,金莲花提取物对副流感病毒 3 型 (Para3) 及甲型流感病毒均显示出抗病毒活性,且对流感病毒感染小鼠具有保护作用^[10-12]。本课题组曾采用金莲花粗提物灌胃的方法证实金莲花粗提物能改善流感病毒感染小鼠的食欲,提高其抗病毒能力^[13]。据相关文献报道,同一种药物的不同提取方法在抗流感病毒方面差异有统计学意义。例如,黄芩醇提物抗流感病毒作用优于水提物,甲醇超声提取赤芍其抗病毒效果更好,麻杏石甘汤水提液抗病毒作用优于醇提液,银翘散水提物及醇提物的不同剂量浓度显示出不同的抗病毒效果,均提示不同提取方法及质量浓度的提取物效果存在差异性^[14-17]。

本研究发现,不同提取方法显示出不同的抗病毒活性,其中 60% 金莲花汤提取物 IC₂₅ (剂量为 0.109mg/ml) 及 IC₅₀ (剂量为 0.145mg/ml) 处理小鼠 H1N1 流感病毒感染后的小鼠巨噬细胞 Raw264.7,显示出轻微的抗病毒效果;值得一提的是 80% 金莲花汤提取物中 IC₀ (剂量为 0.014mg/ml) 和二次 95% 金莲花汤提取物中 IC₂₅ (剂量为 0.047mg/ml) 处理小鼠 H1N1 流感病毒感染后的小鼠巨噬细胞 Raw264.7,可明显减少病毒感染和药物毒性所致的细胞死亡,显示出良好的抗病毒效果,差异有统计学意义;金莲花汤粗提物即金莲花的水煎剂未见明显的体外抗病毒作用。由此可知,金莲花汤的醇提物体外抗病毒作用明显优于水煎剂的体外抗病毒作用。同时,笔者结合 CPE 方法进行金莲花汤提取物抗病毒效果的评价,也进一步证明 80% 金莲花汤提取物中 IC₀ (剂量为

0.014mg/ml) 及二次 95% 金莲花汤提取物中 IC₂₅ (剂量为 0.047mg/ml) 可以有效保护细胞,降低细胞病死率,具有较好的体外抗病毒效果。

但金莲花汤的抗病毒机制尚不明确。相关研究表明,有些药物可通过减轻炎症损害而发挥的抗病毒作用,有些抗病毒药物如半枝莲总黄酮可通过抑制病毒复制,增加抗病毒细胞因子的表达而发挥抗病毒作用^[18,19]。在病毒感染过程中,TLR3 能识别 dsRNA 后通过 TRIF 依赖型通路激活干扰素调节因子,诱导干扰素分泌,介导机体抗病毒免疫应答^[20]。课题组前期研究发现金莲花提取物可通过下调 TLR3 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达,抑制 IRF3 磷酸化入核,减少 IFN β 的分泌,保护机体免受炎症损害,从而发挥抗病毒作用。那么金莲花汤抗病毒机制是否同样依靠干预 TLR3 信号通路实现,以及金莲花汤是否影响病毒复制是今后研究的方向。金莲花汤的抗病毒作用机制将作为下一步研究的重点。

由上可知,本实验发现金莲花为君药配伍而成的金莲花汤同样具有抗病毒作用,并且药物的提取方法直接影响了药物的抗病毒效果。通过筛选不同提取方法的金莲花汤提取物的抗病毒效果,可提高金莲花制剂的质量,提高临床疗效,达到生物利用度高、疗效满意、毒性不良反应小的治疗效果,从而为金莲花作为抗流感病毒药物带来新的突破。

参考文献

- 葛晓艳. 浅析金莲花的药用研究概况[J]. 黑龙江医药, 2012, 25 (3): 444 - 445
- 雷蓉, 冯丽, 等. 金莲花的研究进展[J]. 中药材, 2015, 38 (5): 1085 - 10911
- 张强, 赵庆杰, 熊瑞生, 等. 抗流感病毒药物研究进展[J]. 药学报, 2010, 45 (3): 289 - 299
- Neumann G, Kawaoka Y. Transmission of influenza A virus[J]. Virology, 2015, 479 - 480: 234
- Short KR, Richard M, Verhagen JH, *et al.* One health, multiple challenges: The inter - species transmission of influenza A virus[J]. One Health, 2015, 1: 1 - 13
- Liu M, Zhao X, Hua S, *et al.* Antigenic patterns and evolution of the human influenza A (H1N1) virus[J]. Sci Rep, 2015, 5: 141 - 171
- 中华人民共和国卫生部. 流行性感冒诊断与治疗指南 (2011 年版)[J]. 社区医学杂志, 2011, 9 (5): 66 - 74
- 茹丽先, 陈宪海, 邱占军, 等. 流行性感冒的中医药研究进展[J]. 河北中医, 2017, 39 (2): 313 - 317
- 岳冬辉, 毕岩, 宋岩, 等. 流行性感冒中医治法研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (12): 4404 - 4407
- Li YL, Ma SC, Yang YT, *et al.* Antiviral activities of flavonoids and organic acid from Trollius chinensis Bge[J]. Journal Ethnopharmacol,

2002, 79(3):365-368

- 11 赵宏伟,赵玉珍.金莲花醇提物体外抗甲型流感病毒作用研究[J].中国药业,2010,19(1):10-11
- 12 苏连杰,田鹤,马英丽.金莲花醇提物体内抗病毒作用的实验研究[J].中草药,2007,38(7):1062-1064
- 13 刘晓丽,梁羽茜,胡秀华,等.金莲花提取物保护H1N1病毒感染模型小鼠肺脏的实验研究[J].中国药理学通报,2017,33(7):1034-1035
- 14 刘文辉,石军飞,吴晓忠.黄芩提取物体外抗流感病毒的比较研究[J].内蒙古医学杂志,2010,42(1):7-9
- 15 刘相文,侯林,范路路,等.赤芍不同提取物抗病毒活性研究[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(8):1-3
- 16 张仲海,王胜春,王汝娟,等.麻杏石甘汤不同方法提取液对家兔发热模型及抗病毒作用的影响[J].第四军医大学学报,1997,(6):522-524

- 17 陈俏妍,李润峰,杨春光,等.不同银翘散提取物体内抗甲型流感病毒作用的比较[J].新中医,2013,(10):141-142
- 18 Han P, Wei T, Zhang S, *et al.* The therapeutic effects of sodium cromoglycate against influenza A virus H5N1 in mice[J]. Influenza and Other Respiratory Viruses, 2016, 10(1):57-66
- 19 Zhao T H, Deng S H, Yang H S, *et al.* Effect of total flavonoids of *Scutellaria barbata* against influenza A virus H1N1 infection of[J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(1):147-148
- 20 Di Meng, Caiyun Huo, Ming Wang, *et al.* Influenza A viruses replicate productively in mouse mastocytoma Cells (P815) and trigger Pro-inflammatory cytokine and chemokine production through TLR3 signaling pathway[J]. Fron Microbiol, 2017, 1:e34055

(收稿日期:2017-07-31)

(修回日期:2017-09-11)

不同促排卵方案对多囊卵巢综合征不孕症患者治疗效果的临床研究

员相冰 郝娟 胡萌萌 王忠心 王春莲

摘要 **目的** 研究不同促排卵方案对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)不孕症患者的治疗效果,从中寻求一种便捷、有效且并发症少的促排卵方案。**方法** 选取195例PCOS不孕症患者,将其随机分为A(克罗米芬组 $n=48$)、B(来曲唑组 $n=50$)、C(克罗米芬+来曲唑组 $n=47$)、D(来曲唑+来曲唑组 $n=50$)4组,观察4组之间的成熟卵泡数、HCG日子宫内膜厚度、排卵率、妊娠率以及早期流产率等。**结果** A组成熟卵泡个数较B组多,差异有统计学意义($P<0.05$),就排卵率、妊娠率而言,C组和D组分别较A组、B组高,差异均有统计学意义($P<0.05$),C组及D组两者比较差异无统计学意义($P>0.05$),而早期流产率各组之间差异无统计学意义($P=0.73$)。**结论** 来曲唑+来曲唑方案也能够相对提高PCOS不孕症患者的妊娠率及排卵率,为促排卵方案提供了一个新选择。

关键词 多囊卵巢综合征 克罗米芬 来曲唑 促排卵 不孕症

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.026

Clinical Research on the Effect of Different Ovulation Induction Programs on Infertile Women with Polycystic Ovary Syndrome. Yun Xiangbing, Hao Juan, Hu Mengmeng, *et al.* Qingdao University Affiliated Hospital of Department of Gynaecology, Shandong 266003, China

Abstract **Objective** To investigate the safety and efficacy of different ovulation induction protocols on infertile women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Methods** 195 infertile patients with PCOS were randomized into four groups. Group A ($n=48$) received clomiphene (CC), group B ($n=50$) received letrozole (LE), group C ($n=47$) received CC + LE, and group D ($n=50$) received LE + LE. The number of mature follicles, endometrial thickness on HCG day, ovulation rate, pregnancy rate, and early abortion rate were recorded and compared. **Results** The number of mature follicles in group A was higher than that in group B, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). As for ovulation rate and pregnancy rate, the differences between group A and group C, group D, group B and group C, group D all have statistical meanings ($P<0.05$), while the difference between group C and group D don't ($P>0.05$). There was no statistically significant difference in the early abortion rate among all groups ($P=0.73$). **Conclusion** Letrozole + letrozole can improve the ovulation rate and pregnancy rate of infertile patients with PCOS. This may be an alternative option for ovulation induction.

作者单位:266003 青岛大学附属医院妇科

通讯作者:王春莲,电子邮箱:18661809389@163.com