

广西苦丁茶提取物 体外抗单纯疱疹病毒 1 型活性的实验研究

郝静¹,张美英¹,王一飞^{1*},王亚峰¹,王小燕¹,裴赢¹,任哲¹,刘秋英¹,张颖君²,杨崇仁²

(1. 暨南大学生物医药研究开发基地,广东广州 510632;

2. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室,云南昆明 650204)

摘要:目的 探讨不同苦丁茶提取物体外抗单纯疱疹病毒 1 型 (HSV - 1) 的作用。方法 采用细胞病变效应法 (Cytopathogenic effect, CPE) 和空斑减数实验 (Plaque reduction assay) 测定不同苦丁茶提取物抗 HSV - 1 活性, 计算药物对病变的抑制率和半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50})。并从药物对细胞的保护、对病毒增殖的影响及对病毒感染细胞的综合作用 3 个方面初步探索苦丁茶提取物抗 HSV - 1 病毒活性的机理。结果 苦丁茶水提物能明显抑制 HSV - 1 的致病作用, IC_{50} 为 108.24 μ g/ml。药物对细胞的保护及对病毒感染细胞的综合作用中均表现出明显的活性。结论 苦丁茶水提物具有显著的抗 HSV - 1 活性, 且初步推测其抗病毒活性是作用在病毒和受体结合、侵入 Vero 细胞阶段。

关键词:苦丁茶; 细胞病变效应法; 空斑减数实验

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0805(2008)08-1806-02

Study on Anti-HSV-1 Activity of Ilex Kudmcha C. J. T in Vitro

HAO Jing¹, ZHANG Mei-ying¹, WANG Yi-fei^{1*}, WANG Xiao-yan¹, WANG Ya-feng¹, PEI Ying¹, REN Zhe¹, LIU Qiu-ying¹, ZHANG Ying-jun², YANG Chong-ren²

(1. Biomedicine Research and Development Center of Jinan University, Guangzhou, 510632, China; 2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Objective To investigate the activities of anti - HSV - 1 of crude extracts from *Ilex Kudmcha C. J. Tseng*. **Methods** CPE observation and plaque reduction assay were used to test the anti-HSV-1 effect of *Ilex Kudmcha C. J. Tseng* on cell level in three aspects: cell protection, HSV-1 proliferation and synthesis effect on HSV-1 infected cells. **Results** The study results *in vitro* showed that aqueous extract from *Ilex Kudmcha C. J. Tseng* could inhibit HSV - 1 and its IC_{50} was 108.24 μ g/ml. Crude extract had antiviral activities in the drug protective action and the drug synthesis action on virus, however, it had no influence on virus proliferation. **Conclusion** Aqueous extract from *Ilex Kudmcha C. J. Tseng* has anti - HSV - 1 activity, and the activity happens in the stage of HSV - 1 binding and adsorbing with Vero cell.

Key words: *Ilex Kudmcha C. J. Tseng*; CPE; Plaque reduction assay

苦丁茶 *Ilex Kudmcha C. J. Tseng* 是我国南部及西南部民间传统的药用植物,是冬青科冬青属苦丁茶种常绿乔木,在我国民间应用历史悠久。明代医学家李时珍在《本草纲目》中记载其“苦、平、无毒,南人取作茗,煮饮,止渴明目,消炎利便、通肠”。现代医学研究表明苦丁茶能双向调节机体代谢,增强人体免疫功能,明显降低血脂血症患者的血清总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白,具有清咽利喉、清热解毒、护肝解酒、消炎利便等功效;还对高血压病、高血脂、动脉硬化、糖尿病、肥胖症、结肠炎、便秘、痔疮和各类口腔炎症等有明显的防治作用;用其煮水外洗可杀菌、消炎、防治红眼病、粉刺、暗疮、痱子等多种疾患。常年饮用可以保健身体、延年益寿,被誉为“长寿茶”、“美容茶”,是一种纯天然多功能保健珍品^[1-4]。但是对其抗病毒功效的研究相对较少,本实验就由不同溶剂提取物得到的苦丁茶粗提物,以 Vero 细胞作为体外筛选细胞模型检测其对单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes simplex 1 virus, HSV - 1) 的抑制作用,为筛选新型抗病毒药物的研发

提供思路和理论依据。

1 材料

无环鸟苷 (ACV) 购于湖北科益药业股份有限公司;单纯疱疹病毒 1 型 (HSV - 1) F 株购自武汉大学病毒研究所;Vero 细胞购于美国 ATCC 公司,由本室保存。Vero 细胞用含 10% 胎生牛血清的 DMEM 培养基连续传代 3 次保持对数生长期供实验用。

实验样品由昆明植物所通过以下提取流程获得:收集广西苦丁茶样品 (100g) 粉碎 醋酸乙酯提取 甲醇提取 热水提取 得到醋酸乙酯提取物 (F1) 和水提物 (F3)。

2 方法

2.1 病毒滴度测定 将毒株作 10 倍系列稀释,常规方法感染单层 Vero 细胞,37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养 3d, CPE 法观察细胞病变情况,按 Reed Muench^[5] 方法计算 TCD_{50} 。

2.2 细胞毒性测定 Vero 细胞经胰酶消化后,以 1.5×10^5 个孔的密度加入 96 孔培养板中,待细胞长成单层后弃生长液,用维持液分别将 F1, F3 稀释成 7 个系列浓度,每孔加入 100 μ l,每个稀释度设 4 个复孔,同时设正常细胞对照组,置 5% CO_2 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养,每天观察细胞的变化,计算药物的最大无毒浓度 TC_{0} 。

2.3 药物抗病毒的药理学实验 Vero 细胞在 24 孔板上培养至单层,弃液, PBS 洗涤一遍,分别将不同浓度的 F1, F3 和病毒稀释液 (20 万倍稀释) 各 100 μ l 混合后加入细胞中,每个浓度设 3 个复孔,设病毒对照组和正常细胞对照组 (下同), 5% CO_2 培养箱孵育 1.5 h, 弃上清液,加入由 2 倍的 DMEM 维持液和 1% 羧甲基纤维素以 1 : 1 的比例配成的完全覆盖液 1 ml, 观察 72 h 后, 10% 甲

收稿日期: 2007-10-09; 修订日期: 2007-12-20

基金项目: 国家自然科学基金 (广东省人民政府自然科学基金 (No. U0632010);

广州市科技攻关计划项目 (No. 200523 - E0411)

作者简介: 郝静 (1981-), 女 (汉族), 河北定州人, 现为暨南大学医学院硕士研究生, 学士学位, 主要从事抗病毒新药研究工作。

*通讯作者简介: 王一飞 (1963-), 男 (汉族), 河南郑州人, 现任暨南大学医学院药学院博士研究生导师, 博士学位, 主要从事新药研究工作。

醛固定 10 min, 1% 结晶紫染色 30 min, 清水漂洗、晾干, 参照 Nitta^[6]的方法空斑计数, 计算空斑抑制率。空斑抑制率 (%) = (病毒对照组空斑数 - 药物处理组空斑数) / (病毒对照组空斑数) × 100%, 以药物浓度的对数值为横坐标, 以空斑抑制率为纵坐标, 根据空斑抑制率结果做出病毒对药物的敏感性曲线, 由此得出药物的半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC₅₀)。实验重复 3 次。

2.4 抗病毒活性机理

2.4.1 对细胞的保护作用 将不同浓度的 F1, F3 稀释液加到细胞孔中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱孵育 1.5 h, 接种病毒, 继续培养。

2.4.2 对病毒增殖的影响 接种病毒于细胞上, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱孵育 1.5 h, 换上不同浓度的 F1, F3 稀释液, 继续培养。

2.4.3 对 HSV-1 感染细胞的综合作用 不同浓度苦丁茶稀释液和病毒等体积混合后加到单层 Vero 细胞上, 5% CO₂ 培养箱培养。

以上不同的加药方式, 每个浓度设 4 个复孔, 同时设正常细胞对照和病毒对照, 待病毒对照孔 CPE 呈 “++++” 且细胞对照组正常时, CPE 法观察记录结果。

3 结果

3.1 病毒滴度 按 Reed - Muench 法计算病毒的 TC₅₀ 为 10^{-5.5}, 即接种滴度为 10^{-5.5} 的病毒每孔 0.1 ml, 可使 50% 细胞发生明显病变。实验用病毒浓度为 100 TC₅₀。

3.2 细胞毒性测定 以正常细胞无自然脱皮, 不引起细胞病变的药物稀释度为其对 Vero 细胞的最大无毒浓度 TC₀, F1 的 TC₀ 为 31.25 μg/ml; 而 F3 在 500 μg/ml 以上对细胞的增殖及形态仍然没有影响。光镜下观察会发现, F1 对细胞的毒性表现为可引起细胞破碎, 溶解死亡, 而 F3 对细胞无明显的毒性作用, 与正常细胞组相差无几。

3.3 药物抗病毒的药效学实验 结果见表 1~2。

表 1 F₃ 对 HSV-1 的空斑减数实验结果

| 浓度 C/μg·ml ⁻¹ | 平均空斑数 个 | 空斑抑制率 (%) | IC ₅₀ /μg·ml ⁻¹ |
|--------------------------|---------|-----------|---------------------------------------|
| 250 | 13 | 73.47 | 108.2415 |
| 125 | 17.5 | 64.29 | |
| 62.5 | 38 | 22.45 | |
| 31.25 | 42 | 14.29 | |
| 15.63 | 55 | -12.24 | |
| 0.00 | 49 | | |

表 2 F₁ 对 HSV-1 的空斑减数实验结果

| 浓度 C/μg·ml ⁻¹ | 平均空斑数 个 | 空斑抑制率 (%) |
|--------------------------|---------|-----------|
| 31.25 | 37 | 24.49 |
| 15.63 | 42 | 14.29 |
| 7.82 | 42.5 | 13.27 |
| 3.91 | 53 | -8.16 |
| 1.96 | 51 | -4.08 |
| 0.00 | 49 | |

从表 1~2 中可以看出, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 μg/ml 的 F3 稀释液和 20 万倍稀释的病毒液同时加入细胞, 可发现 F3 对 HSV-1 引起的空斑数明显减少; 而 F1 在最大无毒范围内对 HSV-1 所致的空斑数无明显作用, 其空斑抑制率最大为 24.49%, 尚达不到 50%。

3.4 抗病毒活性的机理 采用先加药物后加病毒, 先加病毒后加药物, 药物和病毒同时加入细胞 3 种方式从药物对细胞的保护作用, 对病毒增殖的影响及综合作用 3 个方面对其抗病毒活性的机理进行初步的探讨。结果发现, F1 在最大无毒范围内, 对细胞具有很好的保护作用, 而对病毒的增殖没有影响, 综合作用时只有些许的抑制细胞病变作用。F3 亦是对细胞的保护作用效果优于综合作用的效果, 优于对病毒增殖的影响, 但是, 不论哪种作用方式 F3 的抗病毒效果都要优于 F1。结果见表 3~4。

4 讨论

人类单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes simplex 1 virus, HSV-1) 主要感染口、眼、唇的皮肤和黏膜以及中枢神经系统, 偶见于外生殖器, 可造成口炎、脑炎、角膜结膜炎、生殖器等疾病, 尤其孕妇感染 HSV-1 后, 易发生流产, 造成胎儿先天畸形和智力低下。艾滋病、癌症和器官移植等免疫低下者感染 HSV-1 的危险性大大增加。HSV-1 感染所导致的单纯疱疹病毒性角膜炎, 已成为发达国家眼科疾病致盲的主要原因。

表 3 不同浓度 F₁ 抗 HSV-1 活性的 CPE 结果

| 效果 | 250 μg·ml ⁻¹ | 125 μg·ml ⁻¹ | 62.5 μg·ml ⁻¹ | 31.25 μg·ml ⁻¹ | 15.63 μg·ml ⁻¹ | 7.82 μg·ml ⁻¹ | 3.91 μg·ml ⁻¹ |
|------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 保护作用 | - | - | - | + | + | ++ | ++ |
| 增殖影响 | - | - | - | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 综合作用 | - | - | - | + | ++ | +++ | ++++ |

- 表示有毒性未测; 0%~25% 为 +; 26%~50% 为 ++; 51%~75% 为 +++; 76%~100% 为 ++++; HSV-1 对照组为 ++++

表 4 不同浓度 F₃ 抗 HSV-1 活性的 CPE 结果

| 效果 | 250 μg·ml ⁻¹ | 125 μg·ml ⁻¹ | 62.5 μg·ml ⁻¹ | 31.25 μg·ml ⁻¹ | 15.63 μg·ml ⁻¹ | 7.82 μg·ml ⁻¹ | 3.91 μg·ml ⁻¹ |
|------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 保护作用 | - | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 增殖影响 | + | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 综合作用 | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |

0%~25% 为 +; 26%~50% 为 ++; 51%~75% 为 +++; 76%~100% 为 ++++; HSV-1 对照组为 ++++; 细胞对照组为 -

本实验研究发现, 广西产苦丁茶水提取物对细胞毒性小, 其无毒浓度在 500 μg/ml 以上, 对 HSV-1 所致的细胞病变有具有较好的抑制作用, 其 IC₅₀ 为 108.24 μg/ml, 较之醋酸乙酯提取物 F1 具有明显的高效低毒的特性。

3 种不同的加药方式表明, 苦丁茶水提取物对细胞具有明显的保护作用, 也就是推测其抗病毒活性主要是作用在病毒和受体结合, 侵入 Vero 细胞阶段, 有研究认为单纯疱疹病毒要由病毒糖蛋白与细胞上的硫酸乙酰肝素受体结合才能进入细胞^[7], 苦丁茶水提取物可能作为硫酸乙酰肝素的类似物竞争与单纯疱疹病毒吸附的相关蛋白结合, 从而阻止病毒进入细胞, 由此产生抗病毒活性。

目前临床常用的治疗药物主要是无环鸟苷 (ACV) 等核苷类, 其作用靶点是病毒 DNA 聚合酶, 影响病毒的复制, 从而发挥抗病毒作用。这些药物的共同特点是抗病毒谱窄, 易产生耐药性, 毒副作用大且价格高昂, 故筛选研制毒性小作用机理不同的抗病毒药物成为国内外开发抗病毒药物的热点。由于苦丁茶是天然产物, 且在我国岭南地区分布广泛, 资源丰富, 其水提取物具有高效低毒的特点, 主要影响病毒吸附、穿入细胞, 故苦丁茶值得进一步研究和开发。

参考文献:

[1] 贺青蛟, 杜方麓, 田育望. 苦丁茶的药理研究进展 [J]. 湖南中医药导报, 2004, 10 (10): 59.
 [2] 刘 彬, 许宏大. 苦丁茶降血脂的实验及临床研究 [J]. 护理研究, 2005, 19 (1): 21.
 [3] 乔利民. 自拟中药方剂治疗轻中度高血压 400 例 [J]. 2006, 23 (6): 723.
 [4] 黄林芳, 万德光. 川产苦丁茶的减肥作用的实验研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27 (3): 49.
 [5] 傅继华. 病毒学实用实验技术 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 61.
 [6] Nitta K, Shiota H, Nito T, et al. Sensitivities of other antiviral drugs and thymidine kinase activity of aciclovir-resistant herpes simplex virus type 1 [J]. J Jpn Ophthalmol Soc, 1994, 98: 513.
 [7] 朱 雷, 金 奇. 病毒受体的研究进展 [J]. 国外医学·微生物分册, 1998, 21 (1): 5.

