

# 穿心莲水提取物体外抗柯萨奇病毒 B3 作用的研究

王小燕<sup>1</sup> 张美英<sup>1</sup> 王亚峰<sup>1</sup> 郝静<sup>1</sup> 杨珂<sup>1</sup> 王一飞<sup>1</sup> 张颖君<sup>2</sup> 杨崇仁<sup>2</sup>

(1.暨南大学医药研究开发基地,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:研究穿心莲水提取物对 HeLa 细胞的毒性与抗柯萨奇病毒 B3(CVB3)的作用及其机理。方法:通过观察药物毒性和病毒引起的细胞病变效应,用 MTT 法检测细胞活性,判断药物毒性及药物抗病毒效应。结果:穿心莲水提取物的半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)为 23093.4μg/mL,半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 23.2μg/mL,治疗指数(TI)为 995.4。结论:穿心莲水提取物通过保护细胞,抑制病毒的增殖,直接杀灭病毒等途径发挥抗 CVB3 的作用。

**关键词** 柯萨奇病毒 穿心莲水提取物 细胞病变效应 细胞活性

中图分类号 R282.71 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2009)05-0071-02

柯萨奇病毒 B(coxsackievirus B, CVB)是引起病毒性心肌炎最常见和主要的病原体,其中以 CVB3 对心肌的亲合力最强,可导致心律失常、急慢性心功能不全、扩张性心肌病甚至猝死。柯萨奇病毒 B3 属典型的溶细胞病毒,目前对于 CVB3 尚无理想有效的化学药物,因此筛选研制新的抗柯萨奇病毒药物就显得尤为重要。穿心莲(*Andrographis paniculata*, *Burm. f.*, *Nees*)又名一见喜、苦草、四方草、印度草等,为爵床科穿心莲植物,主要含有内酯、甾醇、黄酮类化合物、生物碱等成分,具有抗炎、解热、抗癌、提高机体免疫力、降压等作用<sup>[1]</sup>,是一种来源广、毒副作用少的常用中草药。本研究以 CVB3 感染 HeLa 细胞,通过不同的给药方法,研究穿心莲水提取物抗 CVB3 的作用机理。

## 1 实验材料

1.1 药物 穿心莲水提取物由中国科学院昆明植物研究所提供。将植物样品 100g,粉碎,用热水提取,得到水提物,用水溶解高压灭菌制成 1mg/mL 的供试液。

1.2 细胞 HeLa 细胞株引自美国 ATCC。细胞生长液为含 10%新生小牛血清的 DMEM,细胞维持液为含 2%新生牛血清的 DMEM,常规加入青霉素 100U/mL,链霉素 100U/mL。

1.3 病毒 柯萨奇 B3 病毒(CVB3)由武汉大学医学院病毒研究所引进。病毒在 HepG2 细胞中活化增殖后,其滴度为 10<sup>-9</sup>TCID<sub>50</sub>/mL,实验用 100 TCID<sub>50</sub>/mL。

1.4 仪器与试剂 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 Sanyo 公司),超净工作台(苏州净化设备公司),相差显微镜(德国 Laica 公司),酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)。DMEM 培养基(Hyclone 公司),病毒唑(利巴韦林注射液,广州市市桥药业有限公司),MTT(四甲基偶氮唑蓝)为 Sigma 公司产品。

## 2 实验方法

2.1 药物毒性实验 在 96 孔培养板上按 100μL/孔的量加入 2.0×10<sup>5</sup>/mL 浓度的 HeLa 细胞,培养 24h,待其生长为单层细胞,弃去培养液,加入用维持液配成的各种浓度的药液,每个浓度设 4 个复孔,同时设正常细胞对照组,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培

养箱里培养 48h。其间置倒置显微镜下观察细胞毒性情况。48h 后用 MTT 法检测细胞的存活率。

2.2 细胞活性测定(MTT 染色法) 在 96 孔培养板上按 100μL/孔的量加入 2.0×10<sup>5</sup>/mL 浓度的 HeLa 细胞,培养 24h,待其生长为单层细胞,弃去培养液,将不同稀释度的药物和病毒各 50μL 混合后直接加到单层 HeLa 细胞上,每个浓度设 3 个复孔,继续培养 24~36h,待病毒对照组细胞病变达到“+++”以上时,每孔加入 5mg/mL 的 MTT 10μL,继续培养 4~6h,黄色的 MTT 被活细胞的线粒体脱氢酶还原成蓝色的甲萘结晶。小心吸出 MTT,每孔加入 DMSO(二甲基亚砷)100μL,振荡混匀,15min 后甲萘结晶被溶解,在波长 570nm 下测定吸光度 OD 值。OD 值与活细胞的数量呈正相关<sup>[2-3]</sup>。

## 2.3 不同的作用方式

2.3.1 对细胞的保护作用 将穿心莲水提取物稀释成 7 个不同浓度,50μL/孔加到单层 HeLa 细胞孔中,每个浓度设 3 个复孔,培养 2h 后,接种 100 TCID<sub>50</sub> CVB3 病毒稀释液 50μL/孔,继续培养 24~36h,待病毒对照组细胞病变达到“+++”以上时,观察记录药物处理后的 CPE 结果。同时设病毒唑阳性对照组、单用病毒(CVB3)对照组、正常细胞组(下同)。

2.3.2 对 CVB3 增殖的影响 先将 CVB3 接种于单层 HeLa 细胞上,50μL/孔,37℃吸附 2h,再加入含有各种稀释浓度药物的维持液,每个浓度设 3 个复孔,继续培养 24~36h,待病毒对照组细胞病变达到“+++”以上,观察药物对 CVB3 增殖的影响。观察记录药物处理后的 CPE 结果。

2.3.3 对 CVB3 直接杀灭作用 将不同稀释度的药物和病毒各混合后置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2h 后直接加到单层 HeLa 细胞上,每个浓度设 3 个复孔,继续培养 24~36h,待病毒对照组细胞病变达到“+++”以上时,观察药物对 CVB3 感染细胞的综合作用。

每个处理组的浓度设计见表 1,各处理组至少重复实验 3 次。在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养 24~36h,参照正常细胞组与病毒对照组,每日观察细胞生长情况及相应 CPE 程度,24~36h 后病毒

基金项目:国家自然科学基金和广东省人民政府自然科学基金(U0632010)

对照病变达到“+++”以上,MTT 法检测细胞活性。

2.4 分析方法 细胞存活率=(药物组平均 OD 值/细胞对照组平均 OD 值)×100%;病毒抑制率=(实验组平均 OD 值-病毒对照组平均 OD 值)/(正常细胞组平均 OD 值-病毒对照组平均 OD 值)×100%。药物对细胞的半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)及药物对病毒的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)依照 Reed2Muench 法计算<sup>[4]</sup>。治疗指数(TI)=半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)/半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)<sup>[5]</sup>。

### 3 实验结果

3.1 药物的细胞毒性 药物的细胞毒性表现为细胞肿胀,增殖缓慢,胞质颗粒增多,折光性差,边界模糊、破碎,但未见脱落坏死。

48h 后用 MTT 法测细胞的存活率,得到 TC<sub>50</sub> 为 23093.4μg/mL。

3.2 药物的抗病毒作用 实验结果显示 CVB3 抑制率与穿心莲水提取物的浓度呈正相关,穿心莲水提取物对 CVB3 的 IC<sub>50</sub> 为 23.2μg/mL,TI 为 995.4,见表 1。

3.3 药物不同作用方式抗病毒作用 CVB3 病毒对照组在 HeLa 细胞上引起的细胞病变发展迅速,24~36h 后细胞固缩、变圆、破裂,很快脱落。加药组及各对照组的 CPE 如表 2。实验结果显示,穿心莲的水提取物对细胞具有很好的保护作用,能抑制病毒的繁殖和直接杀灭病毒,并且随着药物浓度的增加,CPE 特征逐渐减弱,病毒抑制率(细胞存活率)明显升高。

### 4 讨论

对穿心莲的研究以往多集中在抗菌消炎方面,近年来发现穿心莲有防治心血管疾病、抗肿瘤、保肝利胆、增强免疫等多种功效,实验研究显示穿心莲具有抗艾滋病病毒作用<sup>[6]</sup>,还有实验研究显示穿心莲水提取物体外具有明显的抗型单纯疱疹病毒作用<sup>[7]</sup>。本课题也做了穿心莲水提取物抗型单纯疱疹病毒的实验,但其体外无明显的抗型单纯疱疹病毒的作用。

本实验主要研究了穿心莲水提取物体外对细胞的保护作用,对 CVB3 增殖的影响和对 CVB3 感染细胞的综合作用,以评价穿心莲体外抗 CVB3 的作用效果。研究发现,穿心莲水提取物对细胞毒性小,其无毒浓度在 500μg/mL 以上,对 CVB3 所致的细胞病变有具有较好的抑制作用,其半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)为 23093.4μg/mL,半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)23.2μg/mL,治疗

表 1 穿心莲水提取物细胞活性结果

药物	剂量(μg/mL)						
	250	125	62.5	31.25	15.63	7.82	3.91
穿心莲	+	+	++	++	+++	+++	++++
病毒唑	+	++	++	++	+++	+++	++++

注: +表示 CPE 为 0%~25%, ++表示 CPE 为 25%~50%, +++表示 CPE 为 50%~75%。

表 2 穿心莲水提取物对 CVB3 的不同作用方式

	剂量(μg/mL)						
	250	125	62.5	31.25	15.63	7.82	3.91
保护作用	+	+	++	++	++	+++	++++
增殖影响	+	++	++	+++	+++	+++	++++
直接作用	+	+	++	++	+++	+++	++++

注: +表示 CPE 为 0%~25%, ++表示 CPE 为 25%~50%, +++表示 CPE 为 50%~75%。

指数(TI)995.4, 而其阳性对照药病毒唑的治疗指数(TI)是 188。三种不同的加药方式表明穿心莲水提取物对柯萨奇病毒的抑制率随药物浓度的增加而增加, 而其具体的作用机制还有待进一步的研究。

### 5 参考文献

- [1] 王琳,杨静伟,宋凤平.穿心莲的药理作用研究进展.中医药信息, 2003,20(6):27
- [2] 王达理,曾爱萍,南柏松.噻唑蓝代谢比色分析法用于存活心肌细胞的测定.中华实验和临床病毒学杂志,2000,14(1):88
- [3] Histoshi T,Masanori B,Shiro S,et al. An application of tetrazolim (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. J Viral Methods,1991,33:61
- [4] 黄祯祥.医学病毒学基础及实验技术.北京:北京科学技术出版社,1990:661
- [5] 中华人民共和国卫生部药政局.新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学毒理学),1993:166
- [6] 席军,赵晓辉.穿心莲的药理与临床研究近况.实用医技杂志,2003,10(9):1081
- [7] 刘妮,孟以蓉,赵昉.穿心莲水提取物的抗型单纯疱疹病毒作用.热带医学杂志,2006,6(10):1098

第一作者:王小燕(1982-),硕士研究生,主要从事抗病毒药物研究。

通讯作者:王一飞,twangyf@jnu.edu.cn

收稿日期:2008-08-01

编辑:乔婧 吴宁

## 《综合医院中医临床科室基本标准》发布

卫生部、国家中医药管理局于 3 月份印发《综合医院中医临床科室基本标准》。《标准》提出,综合医院中医病床数不低于医院标准床位数的 5%。具备一定规模的医院,可根据实际需要设立独立病区。三级医院门诊开设中医专业不少于 3 个,二级医院不少于 2 个。

《标准》规定,综合医院中医科病床每床至少配备 0.4 名中医类别医师和 0.4 名护士。三级医院中医临床科室主任应当具有中医类别副主任医师以上专业技术职务任职资格,从事中医临床专业 10 年以上。二级医院中医临床科室主任应当具有中医类别主治医师以上专业技术职务任职资格,从事相关专业工作 6 年以上。主管中医病房的护士长应当系统接受过中医药知识技能岗位培训,能够指导护士开展辨证施护和运用中医护理技术。另外,中医科医疗用房门诊室的净使用面积,三级医院不少于 90 平方米,二级医院不少于 60 平方米。中医科应配备诊断床、听诊器、血压计、温度计、治疗推车、脉枕、针灸器具、火罐、电冰箱、计算机等基本设备,并根据专科业务工作需要,配备相应的专科诊疗设备。

(摘自《健康报》)