

◇ 药理药化 ◇

槟榔提取物体外抗柯萨奇病毒 B3 及单纯疱疹病毒 1型和乙型肝炎病毒的研究

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

(1. 广州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 从槟榔 9种提取物中体外筛选出抗柯萨奇病毒 B3、单纯疱疹病毒 1型活性成分, 从其中 3种提取物中体外筛选出抗乙型肝炎病毒的活性成分。方法 通过观察药物毒性、病毒引起的细胞病变效应、MTT法, 判断药物毒性及药物抗病毒效应。结果 槟榔 9种提取物对 HeLa、Vero细胞具有一定的毒性, 而无抗病毒活性, 3种提取物不能有效地抑制 HepG2 2.15细胞 HBsAg的表达。结论 槟榔 9种提取物体外无抗柯萨奇病毒 B3、单纯疱疹病毒 1型的作用, 3种提取物体外无抗乙型肝炎病毒的作用。

关键词: 槟榔; 柯萨奇病毒; 单纯疱疹病毒 1型; 乙型肝炎病毒

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805(2008)12-2954-02

Investigation on Antiviral Effect of *Arecatechu* L. Extract in vitro

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

(1. *Bio-medicine Research and Development Center, Guangzhou 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 screen nine extracts of *Arecatechu* L. for anti-Coxsackievirus B3, HSV-1 and three extracts of *Arecatechu* L. for anti-HBV in vitro. **Methods** The toxic and antiviral effect was evaluated by observing toxic effect, cytopathic effect (CPE), MTT colorimetric assay for vital cell rate. **Results** Nine extracts had certain toxic effects on HeLa and Vero cells in vitro, but they had no antiviral activities. Three extracts of *Arecatechu* L. could not inhibit the expression of HepG2 2.15 cell's HBsAg. **Conclusion** Nine extracts of *Arecatechu* L. have no effect of anti-Coxsackievirus B3, HSV-1 and three extracts of *Arecatechu* L. have no anti-HBV in vitro.

Key words: *Arecatechu* L.; Coxsackievirus B3 (CVB3); HSV-1; HBV

槟榔为棕榈科植物, 临床常用其干燥成熟种子。长期的临床实践证明, 槟榔具有健胃消食、行气利水、杀虫泻下、利湿除疔的功效^[1]。本实验以柯萨奇病毒 B3 感染 HeLa 细胞, 单纯疱疹病毒 1 型感染 Vero 细胞和 HepG2 2.15 细胞, 以槟榔的鲜花、果实、花苞不同部位的 9 种提取物体外抗柯萨奇病毒 B3、单纯疱疹病毒 1 型和其中花苞的 3 种提取物体外抗乙型肝炎病毒进行了研究。

1 材料与仪器

1.1 药物 槟榔 9 种提取物由中国科学院昆明植物研究所提供。植物样品 (100 g), 粉碎, 醋酸乙酯提取, 甲醇提取, 热水提取, 依次得到醋酸乙酯提取物、甲醇提取物和水提物。醋酸乙酯提取物、甲醇提取物用二甲亚砜 (DMSO) 溶解 1 mg/ml, 水提物用水溶解高压灭菌 1 mg/ml。

1.2 细胞 HeLa 细胞株、Vero 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% 新生小牛血清的 DMEM, 常规加入青霉素 100 U · ml⁻¹, 链霉素 100 U · ml⁻¹。2.2.15 细胞 HBV DNA 经克隆转入肝癌细胞 (HepG2) 的 2.2.15 细胞系, 由武汉大学医学院病毒研究所提供。

收稿日期: 2008-04-19; 修订日期: 2008-07-30

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)

作者简介: 王小燕 (1982-), 女 (汉族), 安徽安庆人, 现为广州暨南大学在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事抗病毒药物研究工作。

*通讯作者简介: 王一飞 (1964-), 男 (汉族), 河南郑州人, 现任广州暨南大学医药研究开发基地教授, 博士学位, 主要从事抗病毒、抗肿瘤创新药物研究工作。

1.3 病毒 柯萨奇 B3 病毒 (CVB3) 由武汉大学医学院病毒研究所提供。病毒在 HepG-2 细胞中活化增殖后, 其滴度为 10⁹ TCID₅₀ · ml⁻¹, 实验用 100 TCID₅₀ · ml⁻¹。单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 由武汉大学医学院病毒研究所提供。病毒在 Vero 细胞中活化增殖后, 其滴度为 10⁹ TCID₅₀ · ml⁻¹, 实验用 100 TCID₅₀ · ml⁻¹。

1.4 试剂及仪器 DMEM 培养基 (Hycorne 公司); 病毒唑 (利巴韦林注射液, Ribavirin injection 广州市市桥药业有限公司); 无环鸟苷 (ACV) 购于湖北科益药业股份有限公司; CO₂ 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 B D - RAD 公司)。MTT (四甲基偶氮唑蓝) 为 Sigma 公司产品。

2 方法

2.1 抗 CVB3 实验

2.1.1 药物毒性实验 在 96 孔培养板上加入 2.0 × 10⁵ / ml 浓度的 HeLa 细胞, 100 μl / 孔, 培养 24 h, 待其生长为单层细胞, 弃去培养液, 将槟榔 9 种不同提取物用维持液配制成不同浓度的药液, 加入到细胞中, 每个浓度设 4 个复孔, 同时设正常细胞对照组、阳性对照组, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱里培养 48 h, 其间置倒置显微镜下观察, 观察药物的最大无毒浓度。

2.1.2 药物药效学实验 (CPE 法) 在 96 孔培养板上加入 2.0 × 10⁵ / ml 浓度的 HeLa 细胞, 100 μl / 孔, 培养 24 h, 待其生长为单层细胞, 弃去培养液, 不同稀释度的药物和病毒各 50 μl 混合后直接加到单层 HeLa 细胞上, 每个浓度设 4 个复孔, 同时设正常细胞对照组、病毒对照组、阳性药物对照组, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱里

培养 24~36 h,其间置倒置显微镜下观察 CPE。待病毒对照组的细胞病变达到 75%及以上时,观察并记录各样品各浓度的细胞病变情况,用 MTT法检测细胞的活性。

2.2 抗 HSV-1 实验

2.2.1 药物毒性实验 在 96孔培养板上加入 2.0×10^5 /ml 浓度的 Vero 细胞,100 μ l 孔,培养 24 h,待其生长为单层细胞,弃去培养液,将槟榔 9种不同提取物用维持液配成的不同的浓度,加入到细胞中,每个浓度设 4个复孔,同时设正常细胞对照组、阳性对照组,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱里培养 48 h,其间置倒置显微镜下观察,观察药物的最大无毒浓度。

2.2.2 药物药效学实验 (CPE法) 在 96孔培养板上加入 2.0×10^5 /ml 浓度的 Vero 细胞,100 μ l 孔,待细胞长成单层后弃去生长液,弃去培养液,不同稀释度的药物和病毒各 50 μ l 混合后直接加到单层 Vero 细胞上,每个稀释度设 4个复孔,同时设病毒对照组、正常细胞对照组、阳性对照组,置 5% CO₂ 孵箱中 37 $^{\circ}$ C 培养,每天观察细胞病变的情况。待病毒对照组的细胞病变达到 75%及以上时,观察并记录各样品各浓度的细胞病变情况,用 MTT法检测细胞的活性。

2.3 抗乙型肝炎病毒实验

2.3.1 细胞毒性检测 将生长良好的 HepG2 2.15 细胞消化后,配制成 2×10^5 /ml 细胞悬液,加入 96孔板中,培养 24 h,待其生长为单层细胞,弃去培养液,将槟榔 3种不同提取物用维持液配成的不同的浓度,加入到细胞中,每个浓度设 4个复孔,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱里培养 48 h,其间置倒置显微镜下观察,观察药物的最大无毒浓度。

2.3.2 HBeAg 的检测 采用 Abbott 试剂进行酶联免疫分析 (暨南大学第一附属医院华侨医院检测)。将生长良好的 2.2.15 细胞消化后,配制成 2×10^5 /ml 细胞悬液,加入 96孔板种,培养 24 h 后弃去原培养液,再加入用维持液配成的各种浓度的药液,槟榔的浓度为 200,100,50 μ g /ml。每两天换合同浓度药物的培养液 1次,同时收集上清液后进行检测,共收集 3次。

3 结果

3.1 细胞毒性测定

3.1.1 HeLa 细胞的毒性结果 见表 1。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。由表 1 可以看出槟榔的鲜花和花苞对 HeLa 细胞的毒性比果实对 HeLa 细胞的毒性要小。

表 1 槟榔提取物对 HeLa 细胞的毒性结果

编号	部位	提取的溶剂	最大无毒浓度 TC ₀ / μ g · ml ⁻¹
SML - P2 - FF - E1	鲜花	EOAc	250
SML - P2 - FF - E2	鲜花	MeOH	250
SML - P2 - FF - E3	鲜花	H ₂ O	250
SML - P2 - FG - E1	果	EOAc	15.625
SML - P2 - FG - E2	果	MeOH	62.5
SML - P2 - FG - E3	果	H ₂ O	250
SML - P2 - HB - E1	花苞	EOAc	>500
SML - P2 - HB - E2	花苞	MeOH	>500
SML - P2 - HB - E3	花苞	H ₂ O	250

3.1.2 Vero 细胞的毒性结果 见表 2。由表 2 可以看出槟榔对 Vero 细胞的毒性均很小。

3.1.3 HepG2 2.15 细胞的毒性结果 3种提取物的最大无毒浓度均是 200 μ g /ml。

3.2 抗病毒实验结果

3.2.1 槟榔 9种提取物抗柯萨奇病毒的实验结果 CVB3 病毒对照组在 HeLa 细胞上引起的细胞病变发展迅速,24~36 h 后细胞固缩,变圆,破裂,很快脱落。而药物组各浓度的细胞形态的变化与病毒对照组细胞形态变化一致。

3.2.2 槟榔 9种提取物抗单纯疱疹病毒 1 型的实验结果 HSV

1 病毒对照组在 Vero 细胞上引起的细胞病变也迅速,36~48 h 后细胞被病毒侵袭,拉成网状。而药物组各浓度的细胞形态的变化与病毒对照组细胞形态变化一致。

3.2.3 槟榔花苞 3种不同提取物对 HepG2 2.15 细胞株 HBeAg 表达的抑制作用 见表 3。槟榔花苞 3种不同提取物作用 HepG2 2.15 细胞后,其 HBeAg 表达量与正常细胞中 HBeAg 表达量没有差异。

表 2 槟榔提取物对 Vero 细胞的毒性结果

编号	部位	提取的溶剂	最大无毒浓度 TC ₀ / μ g · ml ⁻¹
SML - P2 - FF - E1	鲜花	EOAc	>500
SML - P2 - FF - E2	鲜花	MeOH	>500
SML - P2 - FF - E3	鲜花	H ₂ O	250
SML - P2 - FG - E1	果	EOAc	250
SML - P2 - FG - E2	果	MeOH	250
SML - P2 - FG - E3	果	H ₂ O	>500
SML - P2 - HB - E1	花苞	EOAc	>500
SML - P2 - HB - E2	花苞	MeOH	>500
SML - P2 - HB - E3	花苞	H ₂ O	>500

表 3 药物作用 36h 后 HepG2 2.15 细胞培养上清中 HBeAg 的测定结果

剂量 C / μ g · ml ⁻¹	SML - P2 - HB - E1	SML - P2 - HB - E2	SML - P2 - HB - E3	正常细胞
200	2.351	2.482	2.632	
100	2.189	2.503	2.45	2.67
50	2.349	2.888	2.464	

SML - P2 - HB - E1, SML - P2 - HB - E2, SML - P2 - HB - E3 为槟榔花苞 3种不同提取物

4 讨论

柯萨奇病毒 (Coxsackievirus, cv) 是小 RNA 病毒科的肠道病毒属,可引起人类严重的胰腺炎和心肌炎,也是心肌衰竭和扩张性心肌病的重要原因。其中以柯萨奇 B3 最为多见,它属典型的溶细胞病毒。单纯疱疹病毒 1 型是 DNA 病毒,属于疱疹病毒 a 亚科,是最早发现的人类疱疹病毒,也是最常见的病毒。它能引起许多疾病,包括急性疱疹性口腔炎、唇疱疹、角膜结膜炎、甲沟炎、皮肤疱疹性损害、生殖器疱疹、疱疹性脑炎等炎症性疾病^[1]。目前临床上对这两种病毒的治疗最有效的药物分别是病毒唑和核苷类药物,但这些药的副作用都很多。因此开发出新的抗病毒药物成为研究病毒药物的热点。而我国是一个中药资源很丰富的国家,本课题的研究目的就是已经从已经证明有抗病毒活性的中药中筛选出具有抗病毒的活性成分。

槟榔在临床上主要是驱杀肠道寄生虫,对皮肤真菌、流感病毒、幽门螺旋杆菌均有抑制作用;槟榔的主要化学成分是槟榔碱,槟榔碱具有拟胆碱的作用,能兴奋胆碱受体,促进唾液、汗腺分泌,增加肠蠕动,减慢心率,降低血压,滴眼可使瞳孔缩小。有临床资料显示槟榔和别的中药一起使用可以用于治疗急性病毒性肝炎的不同时期^[3],而在本实验中槟榔不能有效的抑制 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 的表达,这可能与药物之间的配伍有关,也有可能与调节免疫有关。本实验研究了槟榔 9种提取物体外抗柯萨奇病毒、单纯疱疹病毒 1 型的实验和其中 3种提取物体外抗乙型肝炎病毒的作用。结果发现这 9种提取物体外无抗柯萨奇病毒、单纯疱疹病毒 1 型的作用,且其中 3种提取物体外无抗乙型肝炎病毒的作用。

参考文献:

[1] 梁宁霞 槟榔药理作用研究进展 [J]. 江苏中医药, 2004, 25 (8): 55.
 [2] Shigetani S, Mori S, Watanabe F, et al. Synthesis and anti-hepesvirus activities of 5 - alkyl - 2 - thiopyrimidine nucleoside analogues [J]. Antiviral chemistry & chemotherapy, 2002, 13 (2): 67.
 [3] 马雄飞. 中医分期治疗急性病毒性肝炎 [J]. 河北中医, 2006, 28 (4): 268.

