

5 种南药的 19 种提取物 体外抗甲型流感病毒活性的实验研究

王巧利¹, 陈振平¹, 曾凡力¹, 刘 格⁴, 巫月生³, 鞠怀强¹, 李 深¹, 向阳飞¹,
北里海雄⁴, 张颖君², 杨崇仁², 王一飞^{1*}

(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;

3. 广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 510632;

4. 长崎大学生物医学研究生院分子微生物和免疫学系传染性病原体分子生物学实验室, 日本 长崎)

摘要:目的 探讨南药提取物体外抗甲型流感病毒的活性。方法 采用细胞病变效应法(CPE法)检测 19 种南药提取物在 MDCK 细胞中的抗甲型流感病毒的活性, 并通过不同的加药方式初步探索具有活性的提取物抗甲型流感病毒活性的机理。结果 在 19 种提取物中, 直杆桉果实水提物和川楝子醇提取物具有抗甲型流感病毒的活性, 初步作用机制研究表明直杆桉果实水提物对甲型流感病毒具有直接灭活的作用, 而川楝子提取物则具有明显的预防效果。总体上直杆桉果实提取物的抗甲型流感病毒的活性更显著。结论 直杆桉果实水提物和川楝子醇提取物具有抗甲型流感病毒的活性, 且直杆桉果实水提物抗 H1N1 的活性更加显著。

关键词: 甲型流感病毒; 南药; 细胞病变效应法

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2011.08.014

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2011)08-1832-03

In vitro Anti - influenza Virus A Activity of 19 Extracts from 5 South China Medicinal Plants

WANG Qiao-li¹, CHEN Zhen-ping¹, ZENG Fan-li¹, LIU Ge⁴, WU Yue-sheng³, LI Shen¹, JU Huai-qiang¹, LI Shen¹,
XIANG Yang-fei¹, BEI Li-hai xiong⁴, ZHANG Ying-jun², YANG Chong-ren², WANG Yi-fei^{1*}

(1. Biomedical Research and Development Center, 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; 3. Biological Pharmaceutical Co. Yongshun, Guangdong 510632, China; 4. Laboratory of Molecular Biology of Infectious Agents, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, Japan)

Abstract: Objective To investigate the *in vitro* anti - influenza virus A activity of 19 extracts from five South China medicinal plants. **Methods** Cytotoxicity and anti - influenza virus A activity of different extracts were determined using cytopathogenic effect assay (CPE). **Results** Of the 19 extracts from south China medicinal plants, aqueous extract from the fruit of *Eucalyptus maidenii* and methanol extract of *Fructus Toosendan* showed significant anti - influenza virus A activity. The mechanism study of anti - influenza virus A of the two extracts showed that the aqueous extract from the fruit of *Eucalyptus maidenii* could directly inactivate influenza virus A while methanol extract of *Fructus Toosendan* possessed preventative activity against influenza virus A infection.

Conclusion Aqueous extract from the fruit of *Eucalyptus maidenii* and methanol extract of *Fructus Toosendan* possess anti - influenza virus A activity *in vitro*, and the anti - influenza virus A activity of aqueous extract from the fruit of *Eucalyptus maidenii* is more obvious than methanol extract of *Fructus Toosendan*.

Key words: Influenza virus A; South China medicinal plants; Cytopathogenic effect assay

流感病毒属于正粘病毒科, 是 RNA 病毒, 典型病毒粒子呈球形, 有囊膜, 囊膜上有血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)两种微粒。

收稿日期: 2010-10-08; 修订日期: 2011-01-15

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);

植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室自主课题(No. 0807E21211)以及开放课题(No. 0807B11211);

中央高校基本科研业务费专项资金(No. 21610606)

作者简介: 王巧利(1984-), 女(汉族), 河北邯郸人, 现为暨南大学生物医药研究开发基地在读硕士研究生, 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教授, 博士研究生导师, 博士学位, 主要从事新药研究工作。

依据其核蛋白(NP)抗原性的差异分成 A、B、C 三型。流感病毒可引起流行性感, 是一种急性病毒性呼吸道传染病。流感发作快、传播迅速, 短时间内可造成局部地区的爆发或全球范围的流行。如 2009 年爆发于墨西哥的甲型 H1N1 流感病毒, 因高发病率和死亡率高引起了广泛重视^[1, 2]。

国际上预防与治疗流感的主要措施是疫苗接种和抗病毒化学药物治疗。由于流感病毒抗原变异, 常规季节性的流感疫苗目前尚不能有效预防甲型 H1N1 流感的爆发和流行, 抗流感药物研究在流感治疗中具有重要意义。目前已应用于临床的抗流感药物包括流感病毒基质蛋白 M2 离子通道抑制剂及神经氨酸酶抑制剂, M2 离子通道抑制剂金刚烷胺和金刚乙胺对甲型 H1N1 病毒无效, 神经氨酸酶抑制剂奥司他韦(达菲)和扎那米韦(乐感

清)有效^[3]。由于达菲仅在感染早期(72 h内)用药有效,并且有储备限制,患者很难在 72h 内及时用药。我国人口基数大,人群密度大,流感若爆发后果会很严重,因此更需要切实可行的防治措施^[4]。

南药是我国传统中药的重要组成部分,历史上所指的南药是我国不产的外来药材,近代也将产于我国热带地区的中药材通称为南药。本文就已证实具有抗病毒活性的 5 种南药^[5](直杆桉,川楝子,山竹,余甘子,贵州老鹰茶)的不同部位采用不同提取方式获得的 19 种提取物,以 MDCK 细胞为体外筛选细胞模型,以广谱强效的抗病毒药物利巴韦林作为阳性药物对照,检测 19 种提取物样品对甲型流感病毒所致的细胞病变的抑制作用,为筛选新的抗流感药物提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 药物 实验样品由中科院昆明植物研究所提供,5 种南药植物样品的 19 种提取物提取流程如下:植物样品→粉碎→醋酸乙酯提取→甲醇提取→热水提取,分别依次得到醋酸乙酯提取物、甲醇提取物和水提取物。醋酸乙酯提取物和甲醇提取物用 DMSO 溶解备用,水提取物用去离子水溶解,121℃ 高温高压灭菌 10 min。最后稀释成 100 mg/ml 的储备液备用。利巴韦林购自湖北制药有限公司。

1.2 细胞 MDCK (Madin Darby Canine Kidne) 细胞株引自美国 ATCC,本实验室保存。细胞生长液为 MEM 培养基添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素;细胞维持液为 MEM 培养基添加 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素(不含胎牛血清)。

1.3 病毒 Influenza A/WSN/33 (H1N1) 甲型流感病毒由日本长崎大学生物医学研究生院分子微生物和免疫学系传染性病原体分子生物学实验室馈赠,病毒在鸡胚中活化增殖后,其滴度为 10^{-4} TCID₅₀/ml,实验用 100 TCID₅₀/ml。

1.4 仪器 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);胎牛血清(杭州四季青生物材料工程有限公司)。

2 方法

2.1 19 种提取物对细胞的毒性实验 MDCK 细胞经胰酶消化后,以 2×10^5 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,用维持液分别将药物稀释成 6 个系列浓度(500.0, 250.0, 125.0, 62.5, 31.3, 15.6 μg/ml),每个稀释度设 3 个复孔,同时设正常细胞对照组,阳性药物对照组。37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 48h,每天观察细胞的变化,记录药物的最大无毒浓度 TC₀。

2.2 19 种提取物抗 H1N1 的药效学实验(CPE 法) 在无毒浓度范围内将药物稀释成不同浓度的药物稀释液,再和病毒稀释液(100TCID₅₀)等体积混合后直接加到单层 MDCK 细胞上,每个浓度 3 个复孔,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 48 h,光镜下观察细胞病变效应(CPE)。以病毒对照组 CPE 达 75% 以上时,且细胞对照正常时为实验观察终点,记录药物各浓度的细胞病变情况。CPE 的记录方法为:无细胞病变为“-”;1%~25% 细胞出现病变为“+”;26%~50% 细胞病变为“++”;51%~75% 细胞病变为“+++”;76%~100% 的细胞病变为“++++”。

2.3 直杆桉果实水提取物(P18-E3)和川楝子醇提取物(P17-E2)抗 H1N1 的作用机制研究

2.3.1 药物对 H1N1 病毒的直接灭活实验 将两种药物的不同浓度稀释液与病毒稀释液等体积混合,置 37℃ 孵育 2 h。同时设正常细胞组和病毒对照组,相同条件处理。然后将各药物与病毒混合液加入单层 MDCK 细胞中,每个浓度设 3 个复孔。37℃、5% CO₂ 培养 48 h,其间置倒置显微镜下观察细胞病变效应(CPE),并记录结果。

2.3.2 药物对 H1N1 病毒的预防实验 将两种药物的不同浓度稀释液加入单层 MDCK 细胞中,每个浓度设 3 个复孔,置 37℃ 继续培养 2 h。然后弃药液,加入病毒稀释液。设病毒对照组,正常细胞对照组和阳性药物对照组。37℃、5% CO₂ 继续培养 48 h,其间置倒置显微镜下观察 CPE,并记录结果。

2.3.3 药物对 H1N1 病毒的综合作用实验 将两种药物的不同浓度稀释液与等体积的病毒稀释液混合,加到单层 MDCK 细胞中,每个浓度 3 个复孔,设病毒对照组,正常细胞对照组和阳性药物对照组。37℃、5% CO₂ 继续培养 48h。其间置倒置显微镜下观察细胞病变效应(CPE),并记录结果。

每种加药方式重复 3 次。

3 结果

3.1 19 种提取物对细胞的毒性实验结果 以正常细胞无自然蜕变,不引起细胞病变的最高药物稀释浓度作为对 MDCK 细胞的最大无毒浓度 TC₀,各样品的 TC₀ 如表 1 所示。

表 1 19 种南药提取物对细胞的最大无毒浓度 TC₀

药物		TC ₀	μg · ml ⁻¹
余甘子(果实) <i>Phyllanthus emblica</i>	P14-E1	62.5	
	P14-E2	125.0	
	P14-E3	125.0	
余甘子(根) <i>Phyllanthus emblica</i>	P29-E1	15.6	
	P29-E2	15.6	
	P29-E3	250.0	
直杆桉(果实) <i>Eucalyptus maideni</i>	P18-E1	15.6	
	P18-E2	62.5	
	P18-E3	250.0	
贵州老鹰茶(叶) <i>Litsea coreana</i>	P24-E1	31.3	
	P24-E2	62.5	
	P24-E3	>500	
山竹(果皮) <i>Garcinia mangostana</i>	P15-E1	15.6	
	P15-E2	31.3	
	P15-E3	62.5	
川楝子 <i>Fructus Toosendan</i>	P17-E2	>500.0	
	P17-E3	>500.0	
直杆桉(叶) <i>Eucalyptus maideni</i>	P19-E1	15.6	
	P19-E2	>500.0	

E1:EtOAc 提取物;E2:MeOH 提取物;E3:H₂O 提取物

3.2 19 种提取物抗 H1N1 病毒的药效学实验结果 在无毒浓度范围内,CPE 法观测 19 种提取物的抗 H1N1 活性,发现只有直杆桉果实水提取物(P18-E3)和川楝子醇提取物(P17-E2)具有抗 H1N1 活性。P18-E3,P17-E2 和阳性对照药物利巴韦林药效学实验 CPE 观察结果见表 2。

在抗病毒活性实验中,MDCK 细胞对照未出现病变,阳性对照药物利巴韦林在 62.5 μg/ml 浓度时即可表现出明显抑制 H1N1 致病变作用;随着 P18-E3 浓度的增大,MDCK 细胞病变(指 H1N1 引起的细胞病变:细胞融合聚集,死亡脱落,形成空斑)的程度逐渐减弱,当药物浓度达到 125.0 μg/ml 时,细胞病变被完全抑制,即 P18-E3 在体外完全抑制 H1N1 病变的有效浓度最低为 125.0 μg/ml;P17-E2 的有效浓度最低为 125.0 μg/ml,但在无毒且有抗 H1N1 活性的浓度范围内不能完全抑制病变的产生(见表 2)。P18-E3 较 P17-E2 的抗 H1N1 的活性明显。

表 2 P18 - E3, P17 - E2 抗 H1N1 药化学实验结果

样品	不同浓度结果					
	250.0 μg · ml ⁻¹	125.0 μg · ml ⁻¹	62.5 μg · ml ⁻¹	31.3 μg · ml ⁻¹	15.6 μg · ml ⁻¹	7.8 μg · ml ⁻¹
P18 - E3	-	-	+	++	++	++++

样品	不同浓度结果					
	500.0 μg · ml ⁻¹	250.0 μg · ml ⁻¹	125.0 μg · ml ⁻¹	62.5 μg · ml ⁻¹	31.3 μg · ml ⁻¹	15.6 μg · ml ⁻¹
P17 - E2	++	++	+++	++++	++++	++++
利巴韦林	-	-	+	++	+++	++++

“-”表示没有病变;1%~25%的细胞病变为“+”;26%~50%细胞病变为“++”;51%~75%的细胞病变为“+++”;76%~100%的细胞病变为“++++”;H1N1 对照组的细胞病变为“++++”;细胞对照组的细胞病变为“-”

3.3 P18 - E3 和 P17 - E2 抗 H1N1 的作用机制实验结果 直杆桉果实水提物 (P18 - E3) 和川楝子醇提取物 (P17 - E2) 抗 H1N1 的作用机制实验 CPE 观察结果见表 3~4。

表 3 P18 - E3 不同给药方式对 H1N1 的抑制作用结果

加药方式	不同浓度结果					
	500.0 μg · ml ⁻¹	250.0 μg · ml ⁻¹	125.0 μg · ml ⁻¹	62.5 μg · ml ⁻¹	31.3 μg · ml ⁻¹	15.6 μg · ml ⁻¹
直接灭活	-	-	-	+	++	+++
预防给药	-	+	++	+++	++++	++++
综合作用	-	-	+	++	+++	++++

“-”表示没有病变;1%~25%的细胞病变为“+”;26%~50%的细胞病变为“++”;51%~75%的细胞病变为“+++”;76%~100%的细胞病变为“++++”;H1N1 对照组的细胞病变为“++++”;细胞对照组的细胞病变为“-”

表 4 P17 - E2 不同给药方式对 H1N1 的抑制作用结果

加药方式	不同浓度结果					
	500.0 μg · ml ⁻¹	250.0 μg · ml ⁻¹	125.0 μg · ml ⁻¹	62.5 μg · ml ⁻¹	31.3 μg · ml ⁻¹	15.6 μg · ml ⁻¹
直接灭活	++	+++	+++	++++	++++	++++
预防给药	+	++	++	+++	++++	++++
综合作用	++	++	+++	++++	++++	++++

“-”表示没有病变;1%~25%的细胞病变为“+”;26%~50%的细胞病变为“++”;51%~75%的细胞病变为“+++”;76%~100%的细胞病变为“++++”;H1N1 对照组的细胞病变为“++++”;细胞对照组的细胞病变为“-”

通过 CPE 观察,初步作用机制研究结果表明,直杆桉果实水提物和川楝子醇提取物都具有抗 H1N1 的活性:直杆桉果实水提物直接灭活的抗病毒效果最好,其最低有效浓度为 15.6 μg/ml,在 62.5 μg/ml 即可完全抑制病变产生,预防给药和综合作用方式的最低有效浓度则分别为 62.5 μg/ml 和 125.0 μg/ml (见表 3);川楝子醇提取物的预防效果显著,其最低有效浓度在 15.6 μg/ml,但综合作用和直接灭活两种作用方式效果较差,其最低有效浓度分别为 250.0 μg/ml 和 500.0 μg/ml。阳性药物利巴韦林在直接灭活和综合作用的加药方式中具有显著的抗病毒效果,其最低有效浓度均为 62.5 μg/ml (见表 5)且在 250.0 μg/ml 浓度即可完全抑制病变的产生。

表 5 利巴韦林不同给药方式对 H1N1 的抑制作用结果

加药方式	不同浓度结果					
	500.0 μg · ml ⁻¹	250.0 μg · ml ⁻¹	125.0 μg · ml ⁻¹	62.5 μg · ml ⁻¹	31.3 μg · ml ⁻¹	15.6 μg · ml ⁻¹
直接灭活	-	-	+	++	+++	+++
预防给药	+	+	++	++	+++	+++
综合作用	-	-	+	++	+++	+++

“-”表示没有病变;1%~25%的细胞病变为“+”;26%~50%细胞

病变为“++”;51%~75%的细胞病变为“+++”;76%~100%的细胞病变为“++++”;H1N1 对照组的细胞病变为“++++”;细胞对照组的细胞病变为“-”

以上结果表明,直杆桉果实水提取物和川楝子醇提取物可抑制 H1N1 产生的病变,直杆桉果实的抗 H1N1 的活性较川楝子提取物更加显著。初步的作用机制研究说明:两者对病毒的抑制作用可能分别通过不同的途径实现或同时通过多个作用靶点发挥抗 H1N1 病毒的活性。

4 讨论

桉树是桃金娘科 (Myaceae) 桉属 (*Eucalyptus*) 树种的统称,在我国南方种植广泛,品种主要有蓝桉、大叶桉、小叶桉、赤桉和直干桉 (*Eucalyptus maidenii*) 等。桉树中含有挥发油、苦味质、鞣质和树脂等多种成分,是医药、香料和化学工业的重要原料,具有一定的药用价值。川楝子 (*fructus toosendan*) 为楝科植物川楝的果实,广泛分布于四川、湖北、贵州、河南等地。川楝子中主要有效成分为川楝素,此外,还含有挥发油、黄酮及多糖等多种化学成分^[6]。近年来研究表明桉叶和川楝子皆具有消炎、镇痛、抗菌等多种作用。并且已有研究表明桉叶和川楝子具有抗单纯疱疹病毒 1 型的活性^[5,7]。因此桉叶提取物和川楝子具有开发成抗病毒药物的潜力。甲型流感病毒是 RNA 病毒,其分子结构和宿主界限有利于病毒的复发发作及疾病流行。甲型流感病毒基因组间可进行基因重组,其进化的速度较其他类的病毒要快,因此具有多种不同的亚型。然而治疗甲流的药物和疫苗各有缺点,所以开发具有较好防治作用的药物势在必行。筛选具有抗病毒活性的中药是现在药物研究中的一大热点。

本实验在对 19 种南药提取物的抗甲型流感病毒的研究中发现只有:直杆桉果实水提取物和川楝子醇提取物对 MDCK 细胞的毒性很小,且通过 CPE 法观察两者都具有明显的抗 H1N1 活性。初步机制研究显示,直杆桉果实水提取物对病毒具有直接灭活的作用,62.5 μg/ml 即可完全抑制病变产生。同时在药物对病毒的综合作用实验中,该提取物在 125 μg/ml 即可完全抑制病变的产生;而川楝子醇提取物的预防作用显著,125 μg/ml 即可明显的抑制病变的产生。本实验表明两种提取物的抗 H1N1 的主要作用机制可能不同。两种提取物在 3 种作用方式中都可抑制病变,这也符合传统中药多靶点多药效的特点。总之,直杆桉果实提取物的抗 H1N1 活性更加显著。

综上所述,直杆桉果实水提取物和川楝子醇提取物是天然草药制剂,其对细胞的毒性低,具有抗 H1N1 的活性,对于流感病毒引起的流行感冒的预防治疗具有一定的应用前景。本研究结果为进一步分离纯化其中的抗病毒活性物质以开发新的抗流感病毒药物提供了一定的理论基础。

参考文献:

[1] Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, et al. Influenza pandemics: past, present and future [J]. J Formosan Med Assoc, 2006, 105: 1.
 [2] Schnitzler SU, Schnitzler P. An update on swine - origin influenza virus A/H1N1: a review [J]. Virus Genes, 2009, 39: 279.
 [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: drug susceptibility of swine - origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009, 58: 433.
 [4] 何维英,高荣梅. 10 种中成药体外抗流感病毒活性研究 [J]. 药学报, 2010, 45 (3): 395.
 [5] 赖志才,瞿 畅,田立文,等. 桉叶水提取物体外抗单纯疱疹病毒 1 型活性的实验研究 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 20: 7.
 [6] 谢 帆,张 勉,张朝凤,等. 川楝子的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43 (14): 1066.
 [7] 赖志才,瞿 畅,曾恕芬,等. 川楝子提取物体外抗单纯疱疹病毒 1 型活性的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21 (1): 7.