

了鸡红细胞免疫后的小鼠的特异性体液免疫。血溶素实验结果表明:AR(20,40,80 mg/kg)对鸡红细胞诱导的小鼠血清溶血素生成具有促进作用,提示能够促进小鼠的特异性体液免疫功能。体外实验也证明 AR(160,320,640 $\mu\text{g}/\text{ml}$)对 B 淋巴细胞据有明显的增殖作用。巨噬细胞具有强大的吞噬能力是细胞免疫应答中不可缺少的一部分,参与免疫应答的反馈和调节作用,能非特异性的吞噬多种抗原,从而提高机体的免疫力,实验中可见 AR 显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,表明该药对机体非特异性免疫功能具有一定的增强作用。

本实验结果表明,AR 对小鼠的细胞免疫与体液免疫均有促进作用。能够增强吞噬细胞的吞噬功能,这一作用对解释 AR 的

多种药理作用有重要意义。但其调节免疫的作用机制还有待进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 易沙克江·马合穆德,阿不都热伊木·卡地尔,阿布拉克·热木都拉,等.中国医学百科全书(维吾尔医学)[M].上海:上海科学技术出版社,2005:287.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学试验方法,第3版[M].北京:人民出版社,2002:1430.
- [3] 李仪奎.中药药理学试验方法学,第2版[M].上海:上海科学技术出版社,2006:725.

19 种南药提取物体外抗单纯疱疹病毒 I 型活性研究

李 深¹,赖志才¹,瞿 畅¹,张美英¹,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)

摘要:目的 从 19 种南药提取物中筛选具有抗单纯疱疹病毒 I 型活性的成分。方法 采用细胞病变效应法(Cytopathogenic effect, CPE)测定不同提取物的细胞毒性及抗 HSV-I 活性。结果 从 19 种南药提取物中找到了 5 种含有抗单纯疱疹病毒 I 型的活性成分。结论 对这 5 种提取物及其相关化合物的进一步研究,有望开发出抗单纯疱疹病毒 I 型的新药。

关键词:南药; 单纯疱疹病毒 I 型; 细胞病变效应法; 活性

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2011.03.007

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1008-0805(2011)03-0539-02

Investigation on Anti-herpes Simplex Virus Type I Activity of Extracts from Southern Chinese Herbs *in vitro*

LI Shen¹, LAI Chi-chai¹, QU Chang¹, ZHANG Mei-ying¹, ZHANG Ying-jun², YANG Chong-ren², WANG Yi-fei^{1*}

(1. Biomedical Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou, Guangdong, 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 the active extracts of anti-herpes simplex virus type I activity from nineteen southern Chinese herbs. Methods The method of Cytopathogenic effect assay was adopted to measure cytotoxicity and anti-HSV-1 activity of different extracts. Results Five active extracts of anti-herpes simplex virus type I activity were found in the nineteen southern Chinese herbs. Conclusion The five extracts and related compounds should be studied furtherly.

Key words: Southern Chinese herbs; Herpes simplex virus type I; Cytopathogenic effect; Antiviral activity

南药是指长江以南,南岭以北地区,包括云南、湖南、广东、福建、台湾等省区的全部或大部分地区所产的地道药材。本文选取了四川老鹰茶、山樱桃、余甘子、顶杯衣、金丝刷、白雪茶、石耳和金丝带 8 种植物的 19 种提取物,以单纯疱疹病毒 I 型感染 Vero 细胞为模型研究这 19 种南药提取物体外抑制单纯疱疹病毒 I 型导致细胞病变作用。

1 材料与仪器

1.1 试剂与仪器 DMEM 培养基(GIBCOBRL 公司),除菌过滤后用碳酸氢钠调 pH 至 7.0~7.2;新生牛血清,杭州四季青,经

56℃,30 min 灭活补体,除菌分装;维持液为含 2% 小牛血清的 DMEM 培养基;96 孔培养板(美国 CORNING 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)。

1.2 病毒和细胞株 单纯疱疹病毒 I 型毒株来源于美国 ATCC(F 株 VR733),Vero 细胞购于美国 ATCC(CCL81),由本室保存。Vero 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基连续传代 3 次保持对数生长期供实验用。

1.3 南药样品 19 种南药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、甲醇提取物和水提取物^[1]。醋酸乙酯提取物、甲醇提取物由 DMSO 溶解为 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 贮存液待用。

2 方法

2.1 病毒滴度测量 将活化好的毒株作 10 倍系列稀释,10⁻¹~10⁻⁹,常规方法感染致密单层 Vero 细胞,设 8 个复孔,同时设正常细胞对照,37℃,5% CO₂ 培养 3 d,观察细胞病变效应(CPE)情

收稿日期:2010-04-17; 修订日期:2010-10-02

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联合基金
(No. U0632010)

作者简介:李 深(1987-),男(汉族),新疆喀什人,现为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,现任暨南大学生物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。

况,CPE 程度可分为从“+”~“++++”,按 Reed Muench^[2]方法计算 TCID₅₀。

2.2 细胞毒性测定 将消化后的 Vero 细胞加入 96 孔板中,每孔 1.5×10⁵ 个细胞。待细胞长成致密单层后,弃去生长液,用维持液将提取物倍比稀释成 8 个浓度,起始浓度为 500 μg/ml,每个浓度 100 μl,设 4 个复孔,同时设立正常细胞对照组,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 48 h,每天观察细胞的变化,计算药物的最大无毒浓度 TC₀。

2.3 药物抗病毒的药效学实验(CPE 法) Vero 细胞在 96 孔板培养至单层,弃生长液,用维持液分别将样品稀释成 8 个系列浓度(从样品的最大无毒浓度开始),每孔加入含样品维持液和病毒稀释液各 50 μl,每个浓度设 4 个复孔,同时设病毒对照组和正常细胞对照组,置 5% CO₂ 孵箱中 37℃ 培养 36~48 h,其间置倒置显微镜下观察细胞病变的情况。待病毒对照组的细胞病变达到 75% 以上而正常细胞对照组正常时,观察并记录各孔的 CPE。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“++++”^[3]。

3 结果

3.1 病毒滴度 按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID₅₀ 为 10^{-7.5},即接种滴度为 10^{-7.5} 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 TCID₅₀。

3.2 细胞毒性测定 倒置显微镜下观察细胞形态,以细胞无死亡,无病变的最高药物稀释浓度为对 Vero 细胞的最大无毒浓度 TC₀,各样品的 TC₀ 见表 1。

3.3 药物抗病毒的药效学实验(CPE 观察法) 倒置显微镜下观察,Vero 细胞被 HSV-I 病毒感染后,呈现典型的细胞皱缩、变圆、碎裂、脱落等细胞病变现象,多数样品在最大无毒浓度范围内对 HSV-I 所导致的细胞病变没有明显的抑制作用,有 7 种提取物具有抑制 HSV-I 病毒导致细胞病变的作用。具体作用见表 2。

4 讨论

单纯疱疹 I 型病毒是广泛存在于人体的一种病毒,发展中国家 90% 以上的人血清 HSV-I 抗体阳性,HSV-I 还具有复制周期短,致细胞病变作用强,在细胞培养中容易扩散,在神经节中常形成潜伏感染等特点。HSV-I 主要感染口、眼、唇的皮肤和黏膜以及中枢神经系统,可造成口唇疱疹、脑炎、角膜结膜炎等疾病。目前临床常用的治疗药物主要是无环鸟苷(ACV)类药物,这些药物的共同特点是抗病毒谱窄,易产生交叉耐药性,毒副作用大且价格高

昂^[4],故筛选有效的抗病毒中药是当前抗病毒研究热点之一。

表 1 南药提取物对 Vero 细胞毒性结果

编号	植物名	拉丁名	提取部位	提取溶剂	TC ₀ /μg·ml ⁻¹
SML-P23-E1	四川老鹰茶	<i>Litsea coreana</i>	叶子	EtOAc 提取物	62.5
SML-P23-E2				MeOH 提取物	15.625
SML-P23-E3				H ₂ O 提取物	62.5
SML-P25-E1	山樱桃	<i>Cerasus serrulata</i>	树皮	EtOAc 提取物	31.25
SML-P25-E2				MeOH 提取物	250
SML-P25-E3				H ₂ O 提取物	500
SML-P26-E1	山樱桃	<i>Cerasus serrulata</i>	叶子	EtOAc 提取物	15.625
SML-P26-E2				MeOH 提取物	62.5
SML-P26-E3				H ₂ O 提取物	500
SML-P28-E1	山樱桃	<i>Cerasus serrulata</i>	小枝叶	EtOAc 提取物	15.625
SML-P28-E2				MeOH 提取物	250
SML-P29-E1	余甘子	<i>Phyllanthus emblica</i> L.	根	EtOAc 提取物	15.625
SML-P29-E2				MeOH 提取物	31.25
SML-P29-E3				H ₂ O 提取物	250
SML-P30	顶杯衣	<i>Acroscyphus sphaerophoroides</i>		甲醇提取物	62.5
SML-P31	金丝刷	<i>Lethariella cladonioides</i>		氯仿提取物	31.25
SML-P32	白雪茶	<i>Thamnoia vermicularis</i> (Ach.) Asa-hina		甲醇提取物	62.5
SML-P33	石耳	<i>Umbilicaria esculenta</i> (Miyoshi) Minks		丙酮提取物	31.25
SML-P34	金丝带	<i>Lethariella zahlbruckneri</i>		氯仿提取物	62.5

表 2 部分南药提取物抑制 HSV-I 病毒所致细胞病变作用结果

样品	不同浓度之结果							
	250	125	62.5	31.25	15.625	7.812	3.906	1.953
	μg·ml ⁻¹	μg·ml ⁻¹	μg·ml ⁻¹	μg·ml ⁻¹	μg·ml ⁻¹	μg·ml ⁻¹	μg·ml ⁻¹	μg·ml ⁻¹
SML-P23-E2	-	-	-	-	+	++++	++++	++++
SML-P25-E2	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
SML-P28-E1	-	-	-	-	+	++++	++++	++++
SML-P29-E1	-	-	-	-	+	++++	++++	++++
SML-P29-E2	-	-	-	++	++++	++++	++++	++++

“-”表示未测

本文在本室已有的抗病毒研究的基础上,对 5 种植物来源的提取物进行了抗单纯疱疹病毒 I 型的筛选,结果显示这 5 种提取物分别来源于四川老鹰茶叶子、山樱桃树皮与小枝叶、余甘子根部,全部为醋酸乙酯提取物和甲醇提取物,没有一种提取物的水提物检测出抗病毒效果。实验结果表明醋酸乙酯提取和甲醇提取的方法明显优于水提取法。

已有文献报道余甘子具有良好的抗乙肝病毒的作用^[5],但尚未有关于四川老鹰茶,山樱桃的抗单纯疱疹病毒 I 型活性的文献介绍,这两种提取物抗单纯疱疹病毒活性的发现,为开发抗单纯疱疹病毒 I 型药物提供了新的可能。

参考文献:

[1] 郝 静,张美英,王一飞,等. 41 种南药提取物抗单纯疱疹病毒 I 型活性的实验研究[J]. 中药材,2008,31(8):1226.
[2] 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.
[3] 赖志才,瞿 畅. 桉叶水提物体外抗单纯疱疹病毒 I 型活性的实验研究[J]. 中国民族民间医药,2009,18(22):7.
[4] White1 DO, Fenner FJ. 医用病毒学[M]. 北京:科学出版社,1990: 3211.
[5] 王瑞国,林久茂,郑良朴,等. 余甘子的研究进展[J]. 福建中医学院学报,2004,14(2):48.