

败酱草抗病毒有效部位体外抑制 呼吸道合胞病毒作用研究

李珊珊 李洪源 朴英爱 刘电力 田文静 董艳梅

【摘要】 目的 了解败酱草抗病毒有效部位(AP3)体外抑制呼吸道合胞病毒的作用。方法 采用中药煎煮法、乙醇提取法和大孔吸附树脂层析法分离得到抗病毒 AP3。采用细胞病变抑制试验,以病毒唑为阳性对照药,观察不同浓度 AP3 在 HeLa 细胞中对呼吸道合胞病毒的抑制作用,计算药物半数有效浓度(EC_{50})和药物治疗指数(TI)。结果 AP3 半数中毒浓度(TC_{50})为 11.45 mg/ml;抑制呼吸道合胞病毒的 EC_{50} 为 0.0986 mg/ml, TI 为 116.12; AP3 对呼吸道合胞病毒的抑制作用存在量效反应关系; AP3 于感染后 0、2、4 h 加药,有抑制呼吸道合胞病毒活性。结论 败酱草抗病毒 AP3 在 HeLa 细胞中对呼吸道合胞病毒有明显的抑制作用。

【关键词】 败酱草;呼吸道合胞病毒;抗病毒作用;有效成分

The anti-respiratory syncytial virus effect of an active compound (AP3) from a Chinese medicinal herb—*Herba patriniae* in vitro Li Shan-shan*, Li Hong-yuan, PIAO Ying-ai, LIU Dian-li, TIAN Wen-jing, DONG Yan-mei. *College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】 Objective To study the effect on anti-respiratory syncytial virus of an active compound(AP3) from a Chinese medicinal herb—*Herba patriniae* in vitro. **Methods** Active component of *herba patriniae* (AP3) was extracted and its anti-respiratory syncytial virus(RSV) effect was tested. A water soluble substance (AP3) was isolated from a Chinese herb *Herba patriniae*, by hot water extraction, ethol precipitation and gel permeation column chromatography. The cytotoxicity of AP3 was tested by adding it to HeLa cells directly. Its effect against RSV was estimated by CPEI assay while ribavirin was used as positive control. **Results** Chemical test showed that the nature of substance AP3 was polysaccharide. The median cytotoxic concentration (TC_{50}) of AP3 was 11.45 mg/ml by morphological observation and the median effective concentration (50% effective concentration, EC_{50}) of it against replication of the long strain of RSV in HeLa cells was 0.0986 mg/ml. The Therapeutic index ($TI = TC_{50}/EC_{50}$) of AP3 was 116.12, much higher than the TI of *herba patriniae*(AP1) ($TI = 59.26$) and ribavirin ($TI = 53.45$). Moreover, AP3 gave a dose-dependent response in inhibiting RSV. In the assay, the effect of AP3 against RSV growth was also tested. In addition, the effect of AP3 on virus growth, AP3 inhibited replication of RSV in HeLa cells, when added at 0 h, 2 h, 4 h after virus infection, were also tested. **Conclusion** This study suggested that the AP3 exerted an obvious inhibitory effect to RSV in HeLa cell culture. This study furnished a reliable evidence for development of a new antiviral drug.

【Key words】 *Herba patriniae*; Respiratory syncytial virus; Antiviral effect; Active compounds

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是引起婴幼儿呼吸道感染的主要病原^[1],也是导致老年人超额死亡率升高的主要原因^[2]。RSV 感染的防治有两种措施:一是疫苗预防,二是药物防治。尚无预防效果可靠的疫苗。因此,RSV 感染的防治,仍以药物防治为主。目前能有效的治疗 RSV

感染的药物很少,美国食物和药品管理局(FDA)批准治疗 RSV 的药物只有 2 种:病毒唑(ribavirin)和 RSV 免疫球蛋白。但病毒唑的毒性较大和近年来对其疗效的争议^[3],病毒唑在临床上的应用受到极大的限制。而 RSV 免疫球蛋白由于存在治疗费用和血清制品的安全问题,在预防和治疗 RSV 感染时,仍需谨慎考虑^[3]。因此,开发研制药效可靠、毒副作用小的防治 RSV 感染的药物,仍是目前国际上有待解决的重要课题之一。为开发研制防治 RSV 感染的药物,我们用抗病毒活性为导向的化学分离方法从中草药败酱草(*Herba patriniae*)中提取分离到一种

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171137)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学公共卫生学院(李珊珊、李洪源、刘电力、田文静、董艳梅);黑龙江省药品检验所(朴英爱)

抗病毒有效部位(AP3),有效部位的概念是指 ,尚未提纯成单体化合物的 ,一般称为有效部位或有效部分。现将败酱草抗病毒 AP3 在体外抑制 RSV 作用的实验结果报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 败酱草抗病毒 AP3 的制备 :取败酱草 1.00 kg 加 7000 ml 蒸馏水常温浸泡 12 h ,100℃ 煮沸 90 min 过滤 ,药渣加 5000 ml 蒸馏水重复提取 ,合并两次提取滤液 ,减压浓缩至 1000 ml ,得水煎剂 (AP1)。向败酱草水煎剂 (AP1)中缓慢加入乙醇 ,并不断搅拌 ,直至乙醇体积达到 90% 后 ,置 4℃ 过夜。次日 ,3500 r/min 离心 10 min ,将沉淀用适量双蒸水溶解后过滤 ,滤液经减压浓缩。再经大孔吸附树脂柱层析分离提取 ,获得抗病毒 AP3 ,AP3 进一步经 Molish 反应检测 ,呈阳性 ,可以初步确定 AP3 是一种多糖物质的混合物。

2. 阳性对照药物 病毒唑原料药 ,由黑龙江省药品检验所提供 ,用蒸馏水制成含量为 1.0 mg/ml 的溶液。

3. 细胞 :人宫颈癌传代细胞 HeLa ,由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(病毒所)提供。常规方法传代培养。

4. 病毒株 :RSV Long 株 ,由病毒所提供。在 HeLa 细胞中的组织半数感染量(TCID₅₀)为 10^{-7.7}。

二、实验方法

1. 药物毒性实验 :用细胞维持液将 AP1 连续 0.8 倍稀释成 40.0、32.0、25.0、20.0 mg/ml 4 个剂量组 ;用细胞维持液将 AP3 连续 0.56 倍稀释成 30.00、16.87、9.49、5.34、3.00 mg/ml 5 个剂量组 ;用细胞维持液将病毒唑连续 0.5 倍稀释成 200.00、100.00、50.00、25.00、12.50 μg/ml 5 个剂量组 ,按常量分别加入细胞已长成单层的 96 孔培养板中 ,置 37℃、5% CO₂ 温箱培养 ,每日倒置显微镜下观察细胞形态 ,连续观察 3 天。每个剂量加入四孔细胞 ,同时设立正常细胞对照 ,以病毒唑作为阳性对照。计算药物半数中毒浓度(TC₅₀)。

2. 药物对 RSV 的抑制作用实验^[4] :采用细胞病变抑制实验(CPEI)对药物进行药效学检测。在已长成单层的细胞上 ,接种 50 TCID₅₀ 的病毒后 ,置于 37℃、5% CO₂ 温箱孵育 2 h。弃去含病毒的维持液 ,更换含不同浓度药物的维持液 ,药物浓度如下 :AP1

为 5.00、2.50、1.25、0.62、0.31、0.16、0.08 mg/ml ; AP3 为 2.00、1.00、0.50、0.25、0.12、0.06、0.03、0.02 mg/ml ;病毒唑 10.00、5.00、2.50、1.25、0.62、0.31 μg/ml ,置于 37℃、5% CO₂ 温箱内培养。每天观察细胞形态 ,连续观察 3 天 ,记录细胞病变(CPE)程度。RSV 在 HeLa 细胞中所致 CPE 的特征为 :细胞变圆 折光增强 融合细胞突起 ,HE 染色可见嗜酸性包涵体。同时设立正常细胞对照、病毒对照和阳性药物对照。计算药物半数有效浓度(EC₅₀)和治疗指数(TI)。

3. 不同给药时间对病毒抑制的影响 :在已长成单层的细胞上 ,接种 50 TCID₅₀ 的病毒后 ,置 4℃ 冰箱 60 min。弃去病毒液 ,更换正常维持液 ,于 0、2、4、6、8 h 分别加入 2 mg/ml AP3 ,置于 37℃、5% CO₂ 温箱孵育 ,培养观察 ,记录 CPE 程度。

4. 统计学分析 :Reed-Muench^[5]法计算药物 TC₅₀ 和 EC₅₀、TI = TC₅₀/EC₅₀^[4] ;Kruskal-Wallis^[6] 检验法比较实验组与病毒对照组细胞病变的差异 ;对药物剂量对数和 CPE 抑制率进行相关分析 ,判定是否存在量效反应关系。数据处理运用 SAS 软件完成^[7]。

结 果

1. 药物毒性测定结果 :根据 Reed-Muench 法计算 ,败酱草水煎剂(AP1)的 TC₅₀ 为 32 mg/ml ;败酱草抗病毒 AP3 的 TC₅₀ 为 11.45 mg/ml ,病毒唑 TC₅₀ 为 76.43 μg/ml。

2. 药物对 RSV 的抑制作用 :AP1、AP3 和病毒唑对 RSV 的抑制作用结果(表 1)采用 Reed-Muench 法计算 ,败酱草水煎剂(AP1)的 EC₅₀ 为 0.54 mg/ml、TI 为 59.26 ;败酱草抗病毒 AP3 的 EC₅₀ 为 0.0986 mg/ml、TI 为 116.12 ;病毒唑 EC₅₀ 为 1.43 μg/ml、TI 为 53.45。TI 是反映药物使用安全性的指标 ,TI 越大 ,TC₅₀ 就越大 ,药物 EC₅₀ 就越小 ,药物使用安全性越高。AP1 经提取分离后所得的 AP3 的 TI 明显高于 AP1 ,可见 ,经过分离提取 ,使败酱草中的毒性降低 ,抗病毒有效物质浓缩 ,抗病毒作用增强 ,药物使用安全性显著提高。

用 Kruskal-Wallis 检验法比较药物各剂量组与病毒对照组 CPE 程度。结果表明 ,败酱草水煎剂(AP1)的 5.00、2.50、1.25、0.62 mg/ml 剂量组 ,败酱草抗病毒 AP3 的 2.00、1.00、0.50、0.25 mg/ml 剂量组 ,病毒唑 10.00、5.00、2.50 μg/ml 剂量组 ,对 RSV 均有明显抑制作用(P < 0.01)。

表1 败酱草 AP1、AP3 和病毒唑对 RSV 的抑制作用

分组	剂量组 (mg/ml)	CPE 程度			累积		CPE 抑制率 (%)
		每孔	平均	抑制	CPE 抑制	CPE	
AP1	5.00	1011	0.75	3.25	14.50	0.75	95.08
	2.50	1121	1.25	2.75	11.25	2.00	84.90
	1.25	1212	1.50	2.50	8.50	3.50	70.83
	0.62	2112	1.50	2.50	6.00	5.00	54.54
	0.31	3223	2.50	1.50	3.50	7.50	31.82
	0.16	2332	2.50	1.50	2.00	10.00	16.67
	0.08	3434	3.50	0.50	0.50	13.50	3.57
	0.04	4444	4.00	0.00	0.00	14.50	0.00
AP3	2.00	0000	0.00	4.00	19.25	0.00	100.00
	1.00	1010	0.50	3.50	15.25	0.50	96.82
	0.50	1100	0.50	3.50	11.75	1.00	92.16
	0.25	1110	0.75	3.25	8.25	1.75	82.50
	0.12	3211	1.75	2.25	5.00	3.50	58.82
	0.06	1322	2.00	2.00	2.75	5.50	33.33
	0.03	4343	3.50	0.50	0.75	9.00	7.69
	0.02	4344	3.75	0.25	0.25	12.75	1.92
病毒唑 (μg/ml)	10.00	0000	0.00	4.00	13.50	0.00	100.00
	5.00	1010	0.50	3.50	9.50	0.50	95.00
	2.50	1221	1.50	2.50	6.00	2.00	75.00
	1.25	1323	2.25	1.75	3.50	4.25	45.16
	0.62	3233	2.75	1.25	1.75	7.00	20.00
0.31	4433	3.50	0.50	0.50	10.50	4.54	
正常细胞		0000	0.00	4.00			
病毒对照		4434	3.75	0.25			

注 :CPE 程度 "0"表示无 CPE ;"1"表示 CPE 为 1% ~ 25% ;"2"表示 CPE 为 25% ~ 50% ;"3"表示 CPE 为 50% ~ 75% ;"4"表示 CPE 为 75% ~ 100% ;平均 CPE = 每孔 CPE 之和 /4 ;CPE 抑制程度 = 4 - 平均 CPE ;累积 CPE 抑制 = CPE 抑制程度之和 ;累积 CPE = 平均 CPE 之和 ;CPE 抑制率 = 累积 CPE 抑制 / (累积 CPE 抑制 + 累积 CPE) × 100%

3. 败酱草 AP3 和病毒唑对 RSV 抑制作用量效关系 :由图 1、2 可见 ,败酱草抗病毒 AP3、病毒唑抑制 RSV 致 CPE 的作用都随着药物剂量的增加而增强 ;对药物剂量对数和 CPE 抑制率进行相关分析 ,均呈现出明显的正相关关系。败酱草 AP3 的相关系数 r 为 0.983 ($P = 0.0004$) ,病毒唑的 r 为 0.986 ($P = 0.0003$)。

4. 不同给药时间对 RSV 抑制作用的影响 :由于在 4℃ 时病毒只吸附于细胞表面 ,而不会穿入细胞内。在 37℃ 培养时吸附在细胞表面的病毒开始进入细胞内进行复制。为了进一步研究 AP3 抑制 RSV 的作用机制 ,寻找适宜给药时间 ,采用不同时间加药的方法来观察药物对病毒的抑制作用(表 2)。采用 Kruskal-Wallis 检验法比较不同给药时间各药物组与病毒对照组 CPE 程度。结果表明 ,在病毒感染后 0、2、4 h 加药 ,AP3 对 RSV 有抑制作用 ($P < 0.01$) ,病毒

唑组于感染后 0、2、4 h 加药 ,也有抑制活性 ($P < 0.01$)。这证明 AP3 和病毒唑均可以影响病毒穿入 ,而且也可能影响病毒复制 ,但是 ,对其作用机制还需要进一步研究。

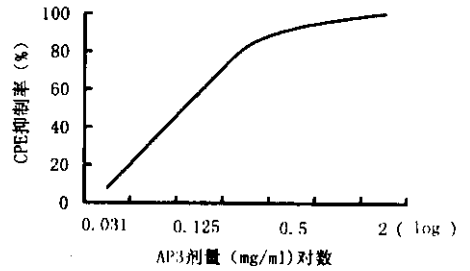


图1 败酱草 AP3 对 RSV 抑制作用的量效关系

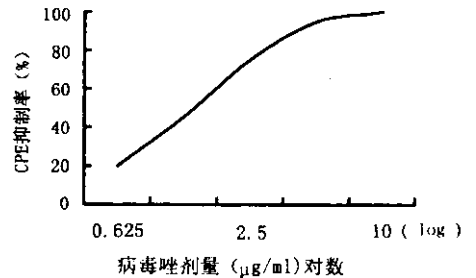


图2 病毒唑对 RSV 抑制作用的量效关系

表2 败酱草 AP3 和病毒唑不同给药时间对病毒抑制的影响

加药时间 (h)	CPE 病变程度	
	AP3 (2 mg/ml)	病毒唑 (10 μg/ml)
0	0000	0000
2	0000	1101
4	1111	1321
6	1223	2334
8	4334	4443
病毒对照	4444	4444
正常细胞	0000	0000

讨 论

因为许多具有特殊防治效果的药物是以天然活性化合物为先导物研制出来的 ,近年来有关抗病毒中草药的研究日益增多。中国的中医药已有几千年的历史 ,具有丰富的用中草药治疗病毒性疾病的临床经验。中草药是开发研制新的抗病毒药物的宝库。特别是单味中草药化学成分相对简单 ,已成为研究的重点。本课题中败酱草全草经 100℃ 水浴提取两次 ,浓缩后制成水提液 (AP1)。AP1 经乙醇沉淀法提取后 ,得到的沉淀物经大孔吸附树脂柱分离提纯后 ,得到 AP3 ;AP3 经抗病毒试验检测 ,对呼吸道合胞病毒有明显的抑制作用 ;而且 ,AP3 经 Molish 反应检测呈阳性 ,可知 ,AP3 是一种多糖类物质 ,综合

所述,可以确定 AP3 为败酱草抗呼吸道合胞病毒的有效部位。

本研究在制备败酱草抗病毒有效部位工艺中,使用了中药煎煮法和乙醇沉淀法。其中,煎煮法是中国中药的传统炮制方法,容易为人所接受;乙醇沉淀法使用了大量乙醇,乙醇无毒,价格低廉,减少了生产过程中有毒物质污染的机会,降低了生产成本。适于制药企业大规模生产。

本研究用细胞培养的方法,以病毒唑为阳性对照,检测了败酱草抗病毒 AP3 的抗 RSV 作用。实验结果表明,AP3 的 TC_{50} 为 11.45 mg/ml;抗 RSV 的 EC_{50} 为 0.0986 mg/ml;TI 为 116.12。TI 是检测药物使用安全性的指标,AP3 的 TI 明显高于 AP1,可见,经过分离提取后,败酱草中的有毒物质得以去除,具有抗病毒作用的物质被浓缩,所以,败酱草的毒性降低,抗病毒作用增强,使用安全性提高了。临床药理学规定临床用药 TI 应该 > 4 ,AP3 的 TI 为 116.12,具有很好的临床应用前景。

AP3 抗 RSV 量效关系曲线中可以看出,AP3 对 RSV 的抑制作用,存在量效反应关系。本研究还发

现,感染病毒 0~4 h 加 AP3,均能明显抑制 RSV 增值,并延缓 CPE 的出现,根据病毒复制周期推测,败酱草抗病毒 AP3 可能作用于 RSV 的 RNA 复制过程而发挥其抗病毒活性,但更详尽的机理还需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 唐得时,翁发旺,张若芳,等. 中药化学. 北京:人民卫生出版社,1986.5.
- 2 Martin AJ, Gardner PS, McQuillin J, et al. Epidemiology of respiratory viral infection among pediatric inpatients over a six year period in northeast England. *Lancet*, 1978 2:1035-1038.
- 3 Michael G, Ison A, John Mills B, et al. Current research on respiratory viral infections. Fourth International Symposium. *Antiviral Research*, 2002 55:227-278.
- 4 刘国荣,申昆玲. 预防和治疗呼吸道合胞病毒感染的研究进展. *中国实用儿科杂志* 2001,16:435-437.
- 5 中华人民共和国卫生部. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学、药理学、毒理学). 北京:中华人民共和国卫生部药政局,1993.166.
- 6 黄祯祥,洪涛,刘崇柏,等. 医学病毒学基础及实验技术. 北京:科学技术出版社,1990.661-693.
- 7 方积乾,徐勇勇,余松林,等. 医学统计学与电脑实验. 上海:科学技术出版社,1997.95-108.

(收稿日期:2003-01-24)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

江西省宜春市一起中学麻疹爆发的调查

徐宜玲 陆大钧 李文斌 周江东 刘名根

2003 年 3~5 月,江西省宜春市的奉新二中发生麻疹爆发。接到疫情报告后,即组织专业人员赴现场开展调查工作,现将调查情况报告如下。

1. 对象与方法 对所有病例进行个案流行病学调查,同时对患者在急性期采静脉血标本,分离血清并用 ELISA 法检测麻疹特异性 IgM 抗体。

2. 结果 奉新二中有学生 2575 人。于 2003 年 3 月 11 日发生首例患者,截至 5 月 4 日末例,共发病 192 例,罹患率 7.46%,无死亡。病例发病年龄最小 11 岁,最大 16 岁,以 12~15 岁为主,占发病人数的 96.35%。192 例患者中男 100 例,女 92 例。初中三个年级分别有 16、17、15 个班。发病 10 例以上有 2 个班,1 例有 7 个班,2~7 例有 35 个班。所有病例均有麻疹基本症状和体征,其临床经过为轻型,表现为发热、流泪、眼结膜充血、皮疹、卡他症状等。其特点有,皮疹多

为斑丘疹、疹程 3 天内出齐,占发病人数的 63.02%,高热(体温 39°C 以上)占 52.60%,麻疹黏膜斑占 44.79%,疹退后留下色素沉着和糠麸状脱屑占 19.27%,无重型和合并症。对 8 例可疑麻疹患者采急性期血标本,检测麻疹特异性 IgM 抗体,结果 7 份阳性,确定为近期感染的麻疹患者。

3. 讨论 经调查本次爆发的主要原因,一是疫情报告不及时,制度不健全。该县一些个体私营医疗机构,甚至一些正规的医疗单位对传染病疫情报告工作不重视,发现疑似麻疹病例未及时向县卫生防疫站报告疫情,延误采取控制措施,导致疫情传播扩散。二是县卫生防疫站计划免疫工作重点抓了基础免疫,忽视了加强免疫,7 周岁儿童麻疹疫苗复种未得到有效落实,免疫屏障出现漏洞。三是基层防疫机构疾病监测手段落后,监测系统不敏感,不能掌握疫情发展趋势,缺乏简单、快速的诊断技术,错过了及早控制疫情的时机。

作者单位 336000 江西省宜春市卫生防疫站(徐宜玲、陆大钧、李文斌),奉新县卫生防疫站(周江东、刘名根)

(收稿日期 2003-07-03)

(本文编辑:尹廉)