

白术内酯 I、II、III 体内外抗轮状病毒作用研究

周若夏, 宋丽军, 施晓莹, 王晓桐, 谈文盼, 卢欢倩, 赵文昌*

广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808

摘要: 目的 研究白术的主要活性成分白术内酯 I、II、III 体内外抗轮状病毒 (RV) 的作用。方法 以 Caco-2 细胞建立体外研究模型, 采用细胞病变效应 (CPE) 法并结合 MTT 染色法, 测定白术内酯 I、II、III 对细胞的毒性以及对 RV 生物合成、吸附的抑制作用, 对 RV 的直接灭活作用, 以利巴韦林为阳性对照药。结合半数有效浓度 (EC₅₀) 和半数细胞毒性浓度 (TC₅₀) 得出治疗指数 (TI) 值, 并且以其作为评价指标。制备 RV 感染的乳鼠腹泻模型进行体内研究, 观察乳鼠体征表现, 根据腹泻分数以及体质量增长情况初步判断白术内酯 III 的体内抗 RV 作用。结果 在体外研究中发现白术内酯 III 具有直接灭活 RV 的作用, TI 值为 8; 体内研究中白术内酯 III 中剂量组抗 RV 效果最佳。结论 白术的主要活性成分白术内酯 III 在体内外均具有一定的抗 RV 作用; 白术内酯 III 主要通过体外直接灭活 RV 而发挥作用。

关键词: 白术内酯 I; 白术内酯 II; 白术内酯 III; 轮状病毒; 腹泻

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)01-0104-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.017

Effects of atractylenolide I, II, and III against rotavirus *in vitro* and *in vivo*

ZHOU Ruo-xia, SONG Li-jun, SHI Xiao-ying, WANG Xiao-tong, TAN Wen-pan, LU Huan-qian, ZHAO Wen-chang

School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

Abstract: Objective To study the effects of atractylenolides I, II, and III against rotavirus *in vitro* and *in vivo*. **Methods** An *in vitro* study model was established using Caco-2 cells. The cytopathic effect (CPE) and MTT staining were used to determine the toxicity of atractylenolide I, II, and III to cells for the inhibition of rotavirus biosynthesis, direct inactivation of rotavirus, and antiviral adsorption, with ribavirin as a positive drug. With half of the therapeutic concentration (EC₅₀) and half of the cytotoxic concentration (TC₅₀), the treatment index TI value was obtained and used as the evaluation index. An RV-infected model of suckling diarrhea was established *in vivo* to observe the signs and symptoms of the suckling mice, and the *in vivo* anti-rotavirus effect was preliminarily determined according to the diarrhea score and the weight gain. **Results** *In vitro* studies found that atractylenolide III had the direct inactivation effect on rotavirus with TI value of 8; atractylenolides III medium-dose group has the best anti-rotavirus effect *in vivo*. **Conclusion** Atractylenolides III, the main active component of *Atractyloides macrocephala*, has significant anti-rotavirus effect *in vitro* and *in vivo*; Atractylenolide III mainly works by directly inactivating rotavirus *in vitro*.

Key words: atractylenolide I; atractylenolide II; atractylenolide III; rotavirus; diarrhea

轮状病毒 (rotavirus, RV) 属于呼肠弧病毒家族 (Reoviridae), 是导致小儿腹泻的重要病原体, 在世界范围内已经导致超过 21.5 万的婴幼儿感染甚至死亡^[1]。RV 引起的腹泻是一种具有高度传染性且难以预防的疾病, 主要通过粪口途径传播, 在体内潜伏期一般为 2~4 d, 病程为 7~14 d。RV 感染的

临床症状包括急性胃肠炎、发热、腹痛、呕吐、腹泻和脱水, 而其中导致死亡的主要原因是患者体内水分和电解质的大量丢失^[2]。近年来研究发现 RV 的感染不仅局限于患者胃肠道, 同时可以侵袭患者其他重要的器官和系统, 并引起一系列严重的并发症, 诸如休克、肝脑病、肝外胆管阻塞和心脏损害

收稿日期: 2018-07-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473401); 广东省科技计划项目重大专项 (2013A022100039); 东莞市社会发展重点项目 (东科[2018]167号, 编号 20185071521658)

作者简介: 周若夏 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药理学。E-mail: 1044101348@qq.com

*通信作者 赵文昌 (1967—), 男, 博士, 教授。Tel: (0769)22896561 E-mail: zhaowenchang@126.com

等^[3]。但目前对于 RV 感染具有明确治疗效果的药物尚未被发现,主要采用补液、给予肠黏膜保护剂以及调节肠道菌群等方法进行干预^[4],因此寻找治疗 RV 的有效药物是亟待解决的热点问题。中药已经在治疗小儿 RV 感染方面积累了丰富的经验,如七味白术散、番泻叶、葛根芩连方等都显示出中药具有抗 RV 的潜力^[5]。

七味白术散^[6]、参苓白术散^[7]等一直是治疗小儿腹泻的经典方剂,并且也有研究总结出在中医药治疗婴幼儿 RV 感染的方剂中白术是核心配伍^[8]。白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎,为我国中医临床常用药材^[9],性温、气清香、味甘苦,且常用于脾虚食少、腹泻、痰饮眩悸、水肿、自汗等症^[10]。近年来的药理学研究还发现白术具有抗病毒、调节免疫、降血糖等作用。虽然白术作为中医药抗小儿腹泻的核心配伍,但是其自身的成分抗 RV 的效果还未清楚。白术的主要活性成分和特征性成分包括白术内酯 I、II、III,通常用它们作为衡量白术药材质量的参考指标^[11]。对于白术中这 3 个主要成分,有研究表明白术内酯 I 能促进脾虚大鼠肠道吸收,调节肠道功能^[12];白术内酯还能显著抑制炎症介质和炎症因子的产生,其中白术内酯 I、III 抗炎效果更明显^[13];另外研究表明白术内酯在抗肿瘤方面也具有研究价值^[14]。但白术内酯 I、II、III 的抗 RV 作用研究尚未见报道,因此本实验对白术内酯 I、II、III 进行体内外抗 RV 作用研究,为寻找抗 RV 药物提供新方向,为白术临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药物与试剂

白术内酯 I (批号 MUST-17030201)、白术内酯 II (批号 MUST-17030202)、白术内酯 III (批号 MUST-17030203) 购于成都曼斯特有限公司,质量分数 99.99%;胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司);高糖培养基 (美国 Gibco 公司);胰酶 (Solarbio 公司);二甲基亚砷 (DMSO, Solarbio 公司)。

1.2 细胞及病毒株

恒河猴肾细胞 MA104 (购于中山大学细胞库);人结肠癌细胞 Caco-2 (购于武汉大学细胞库);Wa 株和 SA-11 株 2 株 RV 病毒均由第三军医大学免疫研究所的何海洋博士馈赠,保存于-80 °C 冰箱中。

1.3 动物

SPF 昆明种小鼠孕鼠,90~100 日龄,购买于

南方医科大学实验动物中心,许可证号 SCXK (粤) 2016-0041,饲养温度为 20~25 °C,相对湿度 40%~70%,正常饮食,保持饲养环境干燥清洁。

1.4 主要仪器

SIK-202 型洁净操作台 (安徽蚌埠净化设备厂);CKX41 倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司);DG3022A 酶联免疫检测仪 (Gene Company Limited 公司);二氧化碳孵育箱 (美国 Thermo 公司);液氮罐 (Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 MA104 细胞和 Caco-2 细胞从液氮中取出,于 37 °C 的温水中快速溶解使细胞复苏,加入含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液 (含有 1% 的双抗) 混悬离心,弃去冻存液,重新加入含有 1% 双抗、10% FBS 的高糖 DMEM 培养液,水平放置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱进行常规培养。

2.2 RV 的培养与扩增

在 MA104 细胞上进行 Wa 株和 SA-11 株 RV 的培养与扩增。从-80 °C 冰箱取出病毒,4 °C 自然融解后,加入 10 μg/mL 无 EDTA 的胰酶混悬,在 37 °C 下孵育 30 min。从细胞培养箱中取出长至单层的 MA104 细胞,用不含 FBS 的 DMEM 培养液将单层 MA104 细胞润洗 2 遍后加入孵育好的 RV 病毒液 1 mL,然后向单层细胞继续添加 3 mL 的含有 1 μg/mL 胰酶的无血清 DMEM 病毒维持液。接种病毒后的 MA104 细胞培养瓶放置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养。每天使用倒置显微镜观察 MA104 细胞的细胞病变效应 (CPE) 变化,直至在倒置显微镜下观察到接种病毒后的 MA104 细胞出现的 CPE 达到+++ (在光学显微镜下观察,无 CPE,记作“-”;0~25% 的细胞出现 CPE,记作“+”;25%~50% 的细胞出现 CPE,记作“++”;50%~75% 的细胞出现 CPE,记作“+++”;75%~100% 的细胞出现 CPE,记作“++++”) 时,取出细胞培养瓶置于-20 °C 冰箱过夜。次日将细胞培养瓶置于 4 °C 自然融解,以上操作反复冻融 3 次,于超净台内将细胞冻融液收集于离心管中,用低温高速离心机 12 000 r/min 离心 30 min。最后将上清病毒液收集并分装于 1.5 mL 无菌离心管中,标记后-80 °C 保存。

2.3 RV 的滴度测定

RV 的滴度测定在 MA104 细胞上进行。对长至单层状态良好的 MA104 细胞进行常规的胰酶消化,

把细胞悬液显微镜下计数后接种于 96 孔板上(使用微量滴定法),每孔 8 000 个细胞。在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 12 h,直至细胞全部贴壁。从 -80 °C 冰箱取出 RV 病毒株,4 °C 进行融解,在 37 °C 条件下与 10 μg/mL 的胰酶混合作用 30 min。将 RV 病毒液以 1:10 的比例用无 FBS 的 DMEM 培养液分别稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 系列浓度。从细胞培养箱中取出已经完全贴壁的单层 MA104 细胞,用预热的 PBS 清洗 1 遍,无 FBS 的 DMEM 培养液清洗 1 遍,接着将预先配制好的不同浓度梯度 RV 病毒液加入到含有单层细胞的 96 孔板中。每孔加入 100 μL,每个浓度梯度设置 9 个复孔。同时设置正常对照组(同样设置 9 个复孔,对照组采取同样的处理,加入 100 μL 的无血清的 DMEM 培养液)。将含有 RV 病毒液的 96 孔板在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育,2 h 后吸出病毒液,继续向孔里加入 100 μL 新鲜的无血清 DMEM 培养液。置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。在不同的时间点用倒置显微镜观察 RV 感染后 MA104 细胞的 CPE 变化。当观察到最低稀释度的 RV 病毒液的孔内不再出现 CPE 时,记录下每一个稀释度出现 CPE 的孔数。同时,在避光条件下往孔内加入 10 μL 的 MTT 试剂后在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 4 h。最后吸走混合培养液,加入 150 μL 的 DMSO 震荡混匀,在 490 nm 波长条件下,用酶标免疫检测仪检测样品的吸光度(A)值。按照 Reed-Muench 方法计算出病毒的半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)。

2.4 白术内酯 I、II、III 的细胞毒性实验

2.4.1 白术内酯 I、II、III 供试品的配制 称取白术内酯 I、II、III 样品各 2 mg,先用 DMSO 溶解后加入适量 DMEM 溶解,以 DMSO 终体积分数不超过 0.5% 为标准。洁净台内无菌操作用一次性滤头滤过除菌。计算初始浓度,并大致在各种药物终浓度 5~640 μmol/L 内进行细胞毒性初步筛选。

2.4.2 细胞毒性实验 将 Caco-2 细胞以 6×10⁴ 个/mL 的细胞密度,加入 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL。37 °C、5% CO₂ 孵育至细胞生长成单层。吸出生长液,先按照 1:1、1:10、1:100、1:1 000 的比例用不含血清的 DMEM 培养液进行稀释得到一系列浓度的药液,然后每孔 100 μL 加入到 96 孔板内,每个浓度重复 6 孔。正常对照只加入等体积不含血清的 DMEM 维持液。37 °C、5% CO₂ 孵育,光学显微镜连续观察,72 h 之内若药物的第 1、2

梯度浓度之间有细胞毒性变化,其余 3 个药物浓度的细胞均正常。这表明有效浓度在 1:1~1:100。按照 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128 的比例得到一系列浓度药液,重复上述操作,光学显微镜下发现 48 h 以内高于 1:64 的药物浓度出现细胞毒性变化。37 °C、5% CO₂ 孵育,光学显微镜连续观察 2 d 后,将药液吸出,避光,加入 5 mg/mL 的 MTT 每孔 10 μL(用不含血清的 DMEM 培养基配制,避光放置),37 °C、5% CO₂ 孵育 4 h 后,800 r/min 离心,弃上清,加入 DMSO 每孔 50 μL,室温下振荡约 10 min,待结晶溶解后,混匀,在酶标仪上检测 490 nm 波长下每孔的 A 值。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{药物组平均 } A \text{ 值}}{\text{正常对照组平均 } A \text{ 值}}$$

2.5 白术内酯 I、II、III 体外抗 RV 实验

选择使细胞存活率达到 95% 以上的药物浓度进行抗 RV 实验。

2.5.1 药物抗 RV 吸附作用 在生长至单层的 Caco-2 细胞的 96 孔培养板内加入药液,每个药液重复 6 孔,每孔 100 μL。正常细胞对照组、病毒对照组均只加入等体积 DMEM 培养液(不含血清)。37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h。将药液吸出,除正常细胞对照组以外加入 100 TCID₅₀ 的病毒(病毒与 10 μg/mL 胰酶 37 °C 作用 30 min),每孔 100 μL,37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h,将病毒吸出,加入细胞维持液,每孔 200 μL,37 °C、5% CO₂ 孵育连续观察。待细胞出现 CPE 在 ++~+++ 时将维持液吸出,加入 5 mg/mL 的 MTT,每孔 10 μL,孵育 2 h 后弃上清。加入 DMSO,每孔 150 μL,室温下震荡混匀约 10 min。随后 490 nm 下酶联免疫检测仪读取 A 值。计算药物的病毒抑制率,计算药物的半数细胞毒性浓度(TC₅₀)和半数有效浓度(EC₅₀),以及治疗指数(TI)。重复实验 3 次。

$$\text{病毒抑制率} = \frac{\text{药物组平均 } A \text{ 值} - \text{病毒对照组平均 } A \text{ 值}}{\text{正常细胞对照组平均 } A \text{ 值} - \text{病毒对照组平均 } A \text{ 值}}$$

$$\text{TI} = \text{TC}_{50} / \text{EC}_{50}$$

2.5.2 药物对 RV 的直接灭活作用 将药物与 100 TCID₅₀ 的病毒液(病毒与 10 μg/mL 胰酶作用 30 min)等体积混合作用 2 h。将其加入到生长至单层 Caco-2 细胞的 96 孔培养板内,之前用 PBS 将细胞冲洗 2 次。正常细胞对照组、病毒对照组均只加入等体积 DMEM。37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h,然后将混合液吸出,加入细胞维持液,每孔 200 μL,37 °C、5% CO₂ 孵育连续观察,待细胞出现 CPE 在 ++~+++

时同“2.5.1”项方法，进行 MTT 检测，并计算药物对病毒的抑制率和 TI。

2.5.3 药物对 RV 生物合成的作用 将 100 TCID₅₀ 病毒液（病毒与 10 μg/mL 胰酶作用 30 min）加入到生长至单层的 Caco-2 细胞 96 孔培养板内，每孔 100 μL，之前用 PBS 将细胞冲洗 2 次。设细胞正常对照，加入等体积 DMEM 培养液。37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h，然后将病毒液吸出，加入药液，每孔 100 μL，设病毒对照，只加入细胞维持液，每孔 200 μL。37 °C、5% CO₂ 孵育连续观察。待细胞出现 CPE 在 ++~+++ 时同“2.5.1”项方法，进行 MTT 检测，并计算药物对病毒的抑制率和 TI。

2.6 白术内酯 III 体内抗 RV 实验

按照随机数字方案，采用随机区组法将昆明种小鼠（乳鼠 4 日龄）分为对照组，模型组，白术内酯 III 低、中、高剂量（0.1、0.2、0.4 g/kg）组，阳性对照利巴韦林组。对照组乳鼠 ig 给予 DMEM 培养液，每只 200 μL，模型组及各给药组乳鼠 ig 给予 RV 病毒液（100 TCID₅₀），每只 200 μL，病毒接种后，各组乳鼠与母鼠同笼，正常母乳喂养，进行病毒感染 2 d 后，白术内酯 III 各组乳鼠分别 ig 给药 0.1、0.2、0.4 g/kg 的药液，模型组及对照组 ig DMEM 培养液，每只 200 μL，阳性对照组则 ig 给予利巴韦林口服液（辅仁药业集团有限公司，批号 1510011）0.1 g/kg，每天 1 次，连续 5 d。

病毒攻击后，每天观察记录各组动物的临床表现：精神状态、脱水情况、肛门红肿等现象。给予乳鼠腹部按摩，观察其排出的粪便，记录腹泻只数，计算腹泻率（腹泻率=腹泻的乳鼠数目/乳鼠总数）。基于乳鼠粪便的颜色、形态，对腹泻程度进行判断

和对粪便进行评分，评分为 0~4 分^[15]。0 分：没有粪便；1 分：正常的棕色大便；2 分：淡黄色软便；3 分：淡黄色稀便；4 分：水样便。分值 2 分和 2 分以上的记录为腹泻，所有的腹泻判断由 1 个人完成，每组乳鼠的腹泻分数由组内乳鼠的粪便评分总值与乳鼠总数的比值计算。同时记录乳鼠体质量变化情况。

2.7 统计分析

采用 SPSS 13.0 软件，多个样本均数比较采用 One-Way ANOVA 法，选择 PROBIT 回归法，将药物浓度与细胞存活率、药物浓度与药物对病毒的抑制率进行回归分析，得到药物的 TC₅₀ 和 EC₅₀。

3 结果

3.1 病毒滴定测定结果

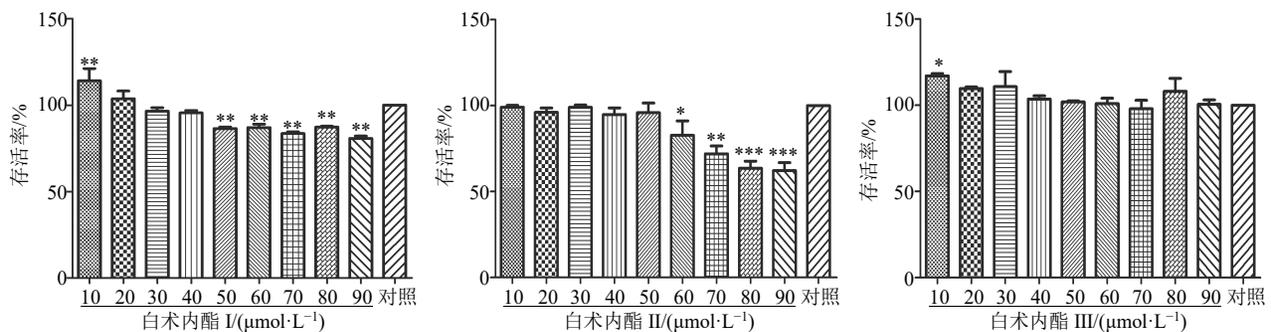
根据 Reed-Muench 公式计算得出 RV 的 TCID₅₀ 为 10^{-4.4}/100 μL。

3.2 白术内酯 I、II、III 对 Caco-2 细胞毒性结果

3.2.1 白术内酯 I 的细胞毒性 白术内酯 I 对 Caco-2 的细胞毒性作用见图 1，结果表明白术内酯 I 在 10~40 μmol/L 均未出现细胞毒性，当浓度大于 50 μmol/L 出现明显的细胞毒性。

3.2.2 白术内酯 II 的细胞毒性 白术内酯 II 对 Caco-2 的细胞毒性作用见图 1，结果表明白术内酯 II 在 10~50 μmol/L 均未出现细胞毒性，当浓度大于 70 μmol/L 出现明显的细胞毒性。

3.2.3 白术内酯 III 的细胞毒性 白术内酯 III 对 Caco-2 的细胞毒性作用见图 1，结果表明白术内酯 III 在 10~90 μmol/L 均未出现细胞毒性。在初筛的过程中发现白术内酯 III 在浓度超过 480 μmol/L 时出现明显的细胞毒性。



与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001
*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs control group

图 1 白术内酯 I、II、III 对 Caco-2 细胞的毒性作用 (x̄ ± s, n = 3)

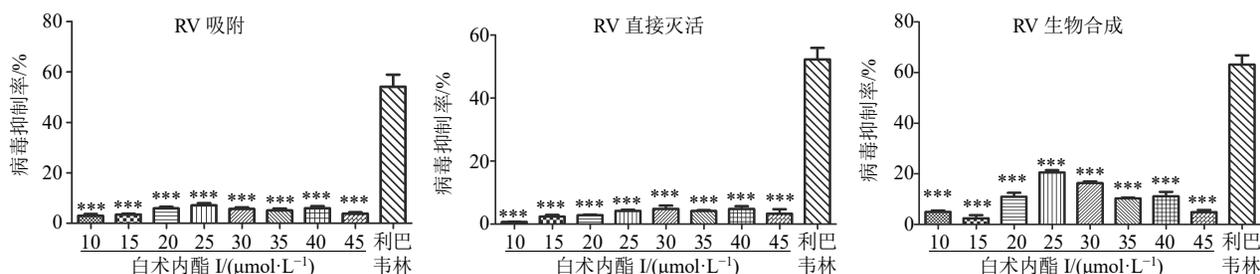
Fig. 1 Cytotoxicity of atractylenolides I, II, and III on Caco-2 cells (x̄ ± s, n = 3)

3.3 白术内酯 I、II、III 体外抗 RV 作用

一般认为 TI 值 ≥ 2 ，证明药物有抗病毒活性，TI 值 ≥ 4 ，其抗病毒成分有研究价值^[16]。

3.3.1 白术内酯 I 体外抗 RV 作用 (1) 白术内酯 I 抗 RV 吸附作用：根据细胞毒性实验结果，设置白术内酯 I 在 10~45 $\mu\text{mol/L}$ 进行抗 RV 吸附作用的实验，结果见图 2。白术内酯 I 对病毒抑制率在 25 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值，但并不明显，与阳性药物利巴韦林比较差异显著 ($P < 0.001$)。(2) 白术内酯

I 对 RV 的直接灭活作用：在白术内酯 I 浓度 10~45 $\mu\text{mol/L}$ 进行实验，结果见图 2。白术内酯 I 对 RV 的直接灭活作用在浓度 30 $\mu\text{mol/L}$ 时最明显，但远不如阳性药物利巴韦林的作用强 ($P < 0.001$)。(3) 白术内酯 I 对 RV 生物合成的作用：在白术内酯 I 浓度 10~45 $\mu\text{mol/L}$ 进行实验，结果见图 2。当白术内酯 I 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时，病毒抑制率最高，相比较前面 2 种作用，白术内酯 I 对 RV 生物合成作用的抑制效果明显，但仍不具有应用的意义。



与利巴韦林组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$, 图 3、4 同
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs ribavirin group, same as figures 3 and 4

图 2 白术内酯 I 体外抗 RV 作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Anti-RV effect of atractylenolides I *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3.2 白术内酯 II 体外抗 RV 作用 (1) 白术内酯 II 抗 RV 吸附作用：根据细胞毒性实验结果，设置白术内酯 II 10~45 $\mu\text{mol/L}$ 进行抗 RV 吸附作用的实验，结果见图 3，白术内酯 II 抗 RV 吸附能力在 35 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最强，且浓度依赖性低，效果不明显。(2) 白术内酯 II 对 RV 的直接灭活作用：结果见图 3，白术内酯 II 在 10~45 $\mu\text{mol/L}$ ，对 RV 的直接灭活作用在 10~25 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐加强，30~45 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐减弱，其达最大病毒抑制率时也不是很理想。(3) 白术内酯 II 对 RV 生物合成的作用：结果见图 3，白术内酯 II 在浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时，病毒抑制率达到最大值，但与前 2 种作用相比，白术内酯 II 对 RV 生物合成作用的抑制效果更弱，表明白术内酯

II 无抗 RV 生物合成作用。

3.3.3 白术内酯 III 体外抗 RV 作用 (1) 白术内酯 III 抗 RV 吸附作用：根据细胞毒性结果，设置白术内酯 III 在 20~90 $\mu\text{mol/L}$ 进行体外抗病毒实验，结果见图 4，在白术内酯 III 30 $\mu\text{mol/L}$ 时，病毒抑制率达到最大值，但 MTT 显示各药物浓度组 A 值与病毒对照组比较差异无显著性，表明白术内酯 III 无明显预防 RV 入侵细胞的作用。(2) 白术内酯 III 对 RV 的直接灭活作用：结果见图 4，MTT 显示各浓度组 A 值与病毒对照组相比差异显著，白术内酯 III 60 $\mu\text{mol/L}$ 时，其病毒抑制率达到了 52.9%，与利巴韦林组的病毒抑制率接近，并且在 20~70 $\mu\text{mol/L}$ 时效果逐渐增加。结果表明，白术内酯 III

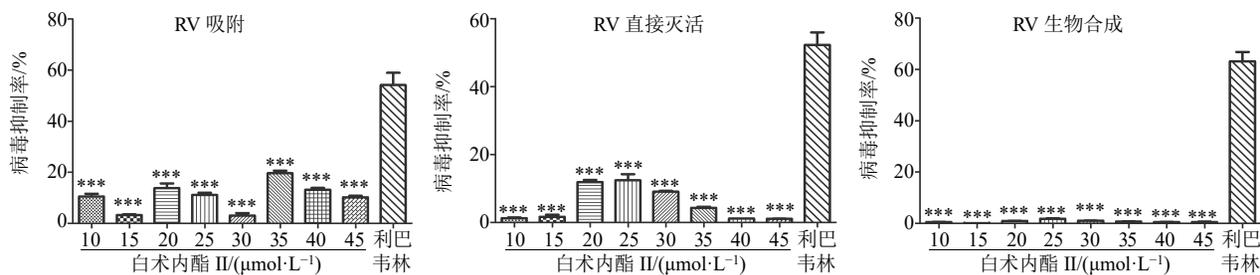


图 3 白术内酯 II 体外抗 RV 作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Anti-RV effect of atractylenolides II *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

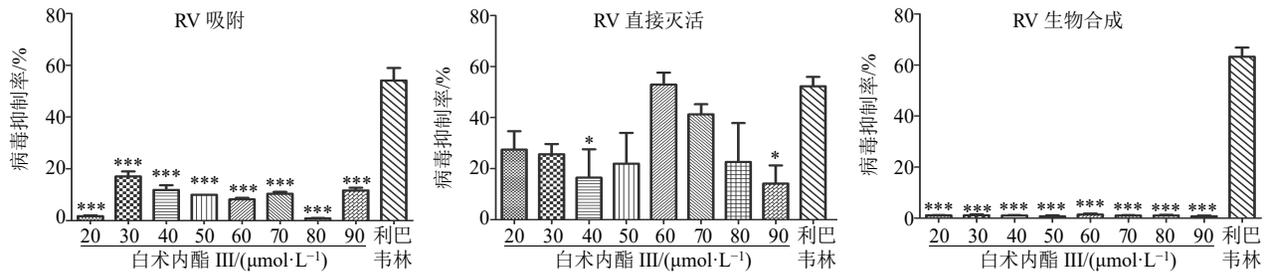


图 4 白术内酯 III 体外抗 RV 作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Anti-RV effect of atractylenolides III *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

具有直接灭活 RV 的作用。白术内酯 III 对 RV 直接灭活作用的 TI 为 8, 具有研究价值。(3) 白术内酯 III 对 RV 生物合成的作用: MTT 结果显示各药物浓度组 A 值与病毒对照组相比较差异无显著性, 结果见图 4, 白术内酯 III 对 RV 生物合成作用效果很弱。结果表明, 白术内酯 III 对病毒合成作用无明显影响。

3.4 白术内酯 III 体内抗 RV 作用

鉴于药物体外抗 RV 作用结果, 选择白术内酯 III 作为体内研究抗 RV 作用的考察对象。

3.4.1 乳鼠的表现及症状 在感染 RV 12~24 h 后乳鼠腹部出现不同程度膨胀, 呆滞倦缩, 体毛蓬松, 饮食减少, 精神萎靡不振, 活动能力下降, 皮肤皱缩。在被 RV 攻击后, 乳鼠陆续开始出现腹泻, 大便的次数和大便的量比对照组增多, 腹泻严重的乳鼠可以明显观察到肛周有红肿和存在大便的痕迹。RV 感染 48~72 h 后, 乳鼠的腹泻程度最严重, 腹泻的乳鼠数量比例最高, 出现腹泻症状的乳鼠肛门出现红肿溃烂, 皮肤十分干燥, 多褶皱颜色暗沉, 精神萎靡, 形态比对照组瘦弱, 体质量出现增长缓慢甚至不增长的情况。RV 感染后第 8 天, 模型组逐渐康复, 腹泻情况消失, 精神状态逐渐恢复。对照组乳鼠从实验开始到结束都没有出现腹泻, 大便呈黄褐色, 皮肤有光泽红润, 肛门没有出现红肿。利巴韦林组、白术内酯 III 中及高剂量组和模型组相比, 在给药第 2 天腹泻减轻或者没有出现腹泻, 只出现轻微的肛周红肿, 精神状态明显好转, 活动能力上升, 其中, 利巴韦林组和白术内酯 III 中剂量组效果最佳; 白术内酯 III 低剂量组和模型组的表现基本一致, 没有明显减轻的迹象。

3.4.2 乳鼠体质量变化 各组乳鼠体质量变化结果见图 5, 结果表明白术内酯 III 中剂量组乳鼠体质量增加率接近于利巴韦林组, 效果优于白术内酯 III 高及低剂量组。

3.4.3 乳鼠感染 RV 后腹泻评分 结果见图 6, 与体质量

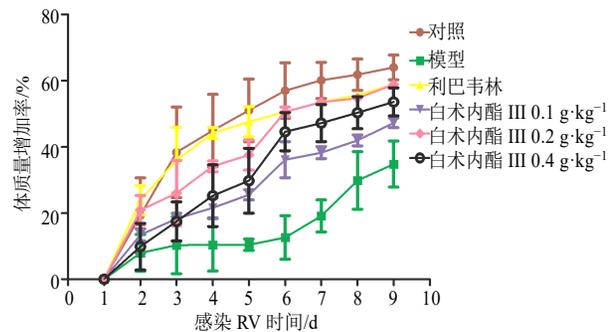


图 5 各组乳鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Body mass changes of suckling mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

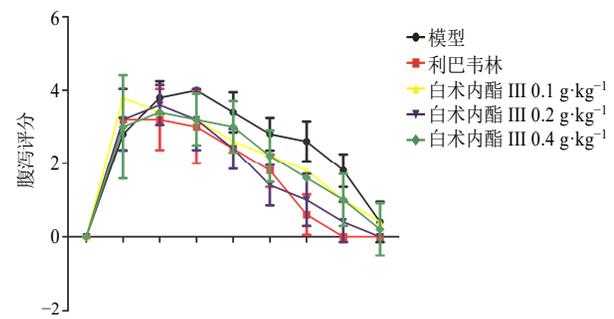


图 6 各组乳鼠的腹泻评分 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Diarrhea score of suckling mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

量变化相对应, 白术内酯 III 中剂量组乳鼠腹泻评分下降明显, 白术内酯 III 低剂量组与模型组相似。进一步表明白术内酯 III 中剂量是体内抗 RV 的最佳剂量。

4 讨论

腹泻是全球 5 岁以下儿童死亡的第 2 大原因^[17], 其中 RV 是婴幼儿腹泻最重要的一种病原体。不管是发达国家还是发展中国家, 婴幼儿 RV 感染都较广泛。从临床病毒学的角度看, 抗 RV 药物的研制是当前亟待解决的实际问题^[18]。迄今人们对抗病毒性相关疾病主要是通过 2 条途径: 一是通过研发灭活的病毒疫苗, 灭活病毒株的致病性保留其抗原性, 注射于健康人体, 激活机体免疫系统从而起到预防

疾病的作用；二是寻找抗病毒药物，即通过药物抑制机体内感染的病毒增殖，从而达到治疗的目的。从古至今，中药及天然产物一直作为筛选药物的重要来源，扮演着先导药物的关键角色，据统计，大约 50% 的药物是由中药及天然产物发展而来^[19]。并且中药作为传统药材，资源丰富多样，毒副作用小，还能调节和增强人体免疫力，起到间接抗病毒作用，显示出了其特有的优势^[20-22]。

在本研究中，对白术中的主要成分白术内酯 I、II、III 分别进行抗 RV 实验。利用 Caco-2 细胞建立体外模型，首先对药物毒性进行了筛选，再进行体外抗 RV 实验。分别对白术内酯 I、II、III 的体外抗 RV 的 3 种作用进行探究，结果表明白术内酯 III 具有对 RV 直接灭活的作用。根据体外实验结果，选取白术内酯 III 作为体内抗 RV 研究的药物。通过乳鼠感染 RV 建立体内模型，观察乳鼠体征表现、腹泻分数以及体质量增长情况，初步判断白术内酯 III 具有较好的体内抗 RV 作用。

本实验结果表明白术内酯 I 对 RV 的生物合成作用抑制效果高于直接灭活病毒作用和抗病毒吸附作用；白术内酯 II 抑制 RV 的吸附作用高于直接灭活病毒作用和抑制 RV 生物合成作用；白术内酯 III 直接灭活 RV 作用高于对病毒吸附、合成作用的抑制，并且 TI 达到 8，具有研究价值。在体内初步探究中，白术内酯 III 中剂量组的治疗效果高于低、高剂量组，并且与利巴韦林组类似。白术中的主要成分是白术内酯 I、II、III，而这 3 种成分独立进行抗病毒实验时发现分别具有了一定的抗病毒吸附作用，直接灭活病毒作用以及抑制病毒生物合成作用，这更是从另一个角度表明白术作为七味白术散中的组成药物具有重要的抗 RV 作用。作为中药单体，白术内酯 III 抗 RV 作用环节复杂、靶点多，其抑制病毒感染的详细机制还需要进一步的研究；体内实验也需要更深入的探究。

参考文献

[1] Huang H, Liao D, Liang L, *et al.* Genistein inhibits rotavirus replication and upregulates AQP4 expression in rotavirus-infected Caco-2 cells [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(6): 1421-1433.

[2] Gasparinho C, Ferreira F S, Mayer A C, *et al.* Molecular characterization of *Giardia lamblia* in children less than 5 years of age with diarrhoea attending the Bengo General Hospital, Angola [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2017, 111(11): 497-503.

[3] Ishibashi K, Morishita Y, Tanaka Y. The evolutionary aspects of aquaporin family [J]. *Am J Physiol Regul*

Integr Comp Physiol, 2011, 300(3): 566-576.

- [4] 黄敏, 黄英. 轮状病毒腹泻研究进展 [J]. 华西医学, 2014, 29(4): 780-782.
- [5] 崔莹春, 桂金贵. 中医药治疗小儿轮状病毒肠炎的研究进展 [J]. 中医儿科杂志, 2014, 10(5): 66-69.
- [6] 王艳丽. 七味白术散治疗小儿轮状病毒肠炎 126 例临床观察 [J]. 吉林医学, 2016, 37(8): 2018-2019.
- [7] 梁忠培, 杨力, 邓昌枢, 等. 参苓白术散加减辅助推拿辩证治疗小儿急性轮状病毒感染性腹泻的临床疗效研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(22): 5262-5265.
- [8] 杨秀娟, 祁波. 中医药治疗婴幼儿轮状病毒肠炎的 Meta 分析及用药规律总结 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(6): 1492-1496.
- [9] 段启, 许冬谨, 刘传祥, 等. 白术的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 800-802.
- [10] 李雯, 尹华. 白术化学成分的药理作用研究进展 [J]. 海峡药学, 2012, 24(3): 9-11.
- [11] 赵桂芝, 洪学智, 戴诗文, 等. 白术内酯的药理学研究进展 [J]. 中国药房, 2009, 20(3): 230-231.
- [12] 彭腾, 李鸿翔, 邱建平, 等. 白术内酯类成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3732-3734.
- [13] 陈琴华, 余飞, 王红梅, 等. 白术内酯 I、II、III 对炎性巨噬细胞细胞因子表达的影响 [J]. 中国药师, 2017, 20(12): 2112-2116.
- [14] Li N, Xu Z C, Zhang H, *et al.* New triterpene prosaponin and sapogenin with unsaturated lactone skeleton from *Gynostemma pentaphyllum* and the antitumor activities assay [A] // Proceeding of 2008 International Conference on Ginseng [C]. 长春: 中国药理学会, 2008.
- [15] Alfajaro M M, Rho M C, Kim H J, *et al.* Anti-rotavirus effects by combination therapy of stevioside and *Sophora flavescens* extract [J]. *Res Veterin Sci*, 2014, 96(3): 567-575.
- [16] 陈亚乔, 侯林, 崔清华, 等. 海藻不同方法提取物体外抗病毒活性研究 [J]. 西部中医药, 2018, 31(3): 5-8.
- [17] 杨蒙蒙, 罗佳波, 张琰, 等. 止泻退热片治疗轮状病毒感染性腹泻的机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(1): 35-39.
- [18] Chen H L, Song L J, Li G X, *et al.* Human rotavirus strain Wa downregulates NHE1 and NHE6 expressions in rotavirus-infected Caco-2 cells [J]. *Virus Genes*, 2017, 53(3): 1-10.
- [19] 贺凤兰, 刘强, 卫飞, 等. 大黄提取物和大黄素体外抗轮状病毒的实验研究 [J]. 中国病毒病杂志, 2013, 30(2): 112-116.
- [20] 张梦迪, 王厚伟. 抗人呼吸道合胞病毒中药抑制剂研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3650-3653.
- [21] 常秀娟, 孙晓萍, 胡晗绯, 等. 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞和乳鼠的作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2097-2102.
- [22] 陈亚乔, 侯林, 崔清华, 等. 中药抗病毒活性及作用机制研究进展 [J]. 中医药导报, 2017, 23(22): 103-106.