

苦豆碱抗病毒作用研究

白求恩医科大学(长春 130021)

李 凡* 石艳春 张绍伦

苦豆碱(aloperine)系豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中的生物碱,具有明显的抗炎作用^[1]、抗变态反应^[2]、清热、止痛、杀虫^[3]、镇痛、镇静、降温^[4]、抗菌、抗癌^[5]等作用,其抗病毒作用未见报道。我们探讨了苦豆碱体外抗病毒作用及其机理。

1 材料

1.1 细胞:人宫颈癌细胞(HeLa)、小鼠成纤维细胞(L₉₂₉)为本室保存。人羊膜细胞(FL)由长春生物制品研究所提供。

1.2 病毒:水泡性口炎病毒(VSV),仙台病毒(SV),柯萨奇B组1~6型(CB_{1~6}V)病毒,风疹病毒(RV),为本室保存。脊髓灰质炎病毒I、II、III型(PV I、II、III)购于北京生物所。腺病毒III型(AdV III)由本校一院儿科提供。埃可病毒6(ECHO₆)型由本校流行病学教研室提供。单纯疱疹病毒I、II型(HSV I、II)、牛痘病毒(VV)来自本校地方病研究所。麻疹病毒(MV)为长春生物所冻干疫苗。新型肠道病毒71型(E₇₁V)、柯萨奇A₁₆病毒(CA₁₆V)由日本仙台国立医院赠。

1.3 苦豆碱:为水溶性白色结晶,含量95%以上,mp 73℃~75℃,易溶于水。由宁夏药物研究所提供。

1.4 培养基:IMDM培养基为美国产品。

1.5 仪器:国产40孔微量培养板,国产特制751型分光光度计等。

2 方法

2.1 细胞的筛选与制备:所用的20种病毒分别种于HeLa、L₉₂₉及FL细胞上测定敏感性,细胞按常规方法传代。同时制成 2×10^5 /mL细胞悬液,每孔0.1 mL,24 h形成单层备用。

2.2 病毒毒力测定:采用TCID₅₀微量法^[6],本实验采用不同病毒的100~200 TCID₅₀/0.1 mL。

2.3 初筛:形成单层的细胞孔弃去培养液,加入对

细胞无毒性浓度的苦豆碱作用24 h,吸出药液加入病毒液,按一般病毒吸附时间,均采用37℃吸附1 h吸出,加入含苦豆碱的维持液,置37℃5%CO₂恒温箱培养48~96 h,待病毒对照孔病变达100%,细胞对照正常时测结果。

2.4 分组实验:初筛有意义的病毒分4组^[7]进行实验,探讨苦豆碱的具体作用环节。I组:感染前24 h给药,吸出药液,用Hank's液洗3遍,加入病毒液。

II组:感染后给药,先加病毒液置37℃吸附1 h洗去病毒加含药维持液。III组:药液与病毒同时加入细胞层。IV组:药液与病毒液混合后置37℃吸附2 h后加入细胞层。以上均设正常对照及相应病毒对照。

2.5 结果测定

2.5.1 光镜观察细胞致病效应(CPE)。

2.5.2 染色摄入法^[6]根据CPE有脱落特征,采用存留细胞结晶紫染色,使用分光光度计从波长540 nm测OD值。

2.5.3 苦豆碱对组织培养细胞保护率计算

保护率(%) = $\frac{\text{加药孔OD值} - \text{病毒对照孔OD值}}{\text{细胞对照孔OD值}} \times 100\%$

3 结果

3.1 苦豆碱对组织培养细胞的毒性测定:实验结果表明1:32以上稀释的苦豆碱对HeLa、L₉₂₉、FL细胞均无毒性作用。

3.2 苦豆碱保护浓度的测定:选用药液与病毒液同时加入细胞层的方法测定了1:32、1:64、1:128、1:256等4个稀释度的苦豆碱抗病毒作用。结果1:32、1:64稀释度的苦豆碱有明显的抗病毒效应($P < 0.01$)。根据毒性测定结果,本实验用1:40稀释苦豆碱,其含量为40 mg/L。

3.3 初筛结果:利用光镜观察CPE,结果表明苦豆碱可以不同程度地抑制E₇₁V、CA₁₆V两种病毒对组织细胞的CPE,而对PV I、II、III和CB_{1~6}V个型等两种病毒的不同型别具有明显的抑制作用,见表1。

* 李 凡 女,1982年白求恩医科大学医疗专业毕业。现任白求恩医大微生物学教研室副教授,医学硕士。曾在1995年获欧共体博士后奖学金,留学于马德里大学分子生物中心。一直从事病毒及免疫学方面的工作,曾获得过国家自然科学基金及国家中医药管理局等课题多项。发表科研论文20余篇,曾获省级奖及校级奖多项。

表 1 苦豆碱对病毒致 CPE 的影响

	细胞对照	病毒对照	实验		细胞对照	病毒对照	实验
CB ₁ V	—	+++	—	PV I	—	+++	—
CB ₂ V	—	+++	—	PV II	—	+++	—
CB ₃ V	—	+++	—	PV III	—	+++	—
CB ₄ V	—	+++	—	E ₇₁ V	—	+++	+
CB ₅ V	—	+++	—	CA ₁₆ V	—	+++	+
CB ₆ V	—	+++	—	AdV III	—	+++	+++
VSV	—	+++	+++	HSV I	—	+++	+++
SV	—	+++	+++	HSV II	—	+++	+++
RV	—	+++	+++	ECHO ₆ V	—	+++	++
VV	—	+++	+++	MV	—	+++	+++

注：— 表示无细胞病变，++++ 表示不同程度的细胞病变

3.4 分组结果

3.4.1 结晶紫染色测定结果：在镜下观察 CPE 基础上，用结晶紫染色测 OD 值，以便客观地反映加药与不加药之差别。I 组：实验目的是观察药物能否进入细胞或吸附细胞表面以阻止病毒的吸附和进入。结果表明，此法对 PV I、II、III，CB_{1~6}V 型，E₇₁V，CA₁₆V 有意义 ($P < 0.01$)。II 组：实验目的是观察药物能否对细胞内的病毒起作用，抑制其生物合成及成熟释放。此法对 PV I、II、III，CB_{1~6}V 型，E₇₁V，CA₁₆V 均有不同程度的作用 ($P < 0.05$)。III、IV 组：为药物与病毒在不同条件下作用观察药物对病毒的直接灭活作用，结果表明，此法对上述病毒均有作用。说明无论是药物与病毒同时加入细胞层或是药物与病毒先作用 2 h 然后加入细胞层，苦豆碱均能发挥其抗病毒效应。

3.4.2 苦豆碱对细胞的保护率计算：结果表明，苦豆碱对细胞的保护率最高可达 94.1%，见表 2。

表 2 苦豆碱对组织培养细胞的保护率比较 (%)

	I	II	III	IV
CB ₁ V	38.40	60.30	45.10	50.10
CB ₂ V	40.50	57.80	60.20	70.20
CB ₃ V	32.30	83.30	85.50	83.00
CB ₄ V	35.70	80.60	89.30	73.30
CB ₅ V	42.50	86.60	87.50	75.50
CB ₆ V	30.00	62.20	60.00	80.00
PV I	11.30	40.50	60.70	80.50
PV II	23.70	48.80	70.70	60.60
PV III	30.60	60.90	94.10	80.50
E ₇₁ V	12.30	20.20	55.50	50.00
CA ₁₆ V	10.20	16.70	50.20	62.20

3.5 药物对病毒毒力的影响：将苦豆碱与 CB₃V、PV III、E₇₁V、CA₁₆V 分别在 37℃ 下作用 2 h，测定病毒的 TCID₅₀ (滴度以 lgTCID₅₀/0.1 mL 表示)。结果病毒对照组分别为 4.5、5.4、75.4、5，实验组分别为

2.5、2.2、25、2，经此作用病毒滴度明显下降，抑制对数分别为 2.0、3.2、5.2、5，进一步证明了苦豆碱对 CB₃V、PV III、E₇₁V、CA₁₆V 有直接灭活作用。

4 讨论

苦豆碱是近年来从祖国医药宝藏中挖掘出的具有多种功效的有发展前景的新药。为了进一步探讨其抗炎作用机理，我们对其进行了抗病毒研究，结果证明具有明显的抗肠道病毒作用，对 CB₃V、PV III、E₇₁V、CA₁₆V 的抑制对数可达 2.0~3.0，对细胞的保护率最高可达 94.1%。经体外定量实验证明将苦豆碱稀释至 1:64 倍时 (15.62 mg/L) 仍具有抗病毒作用。通过对其抗病毒作用环节的检测，我们发现苦豆碱不仅有直接灭活病毒的作用，而且对吸附于细胞表面和进入细胞内的病毒都有抑制作用。

苦豆子主要产于我国西北地区，分布广产量大，其各种生物碱有多种生理活性。通过我们的研究为进一步开发利用苦豆碱，寻找新的抗病毒中药提供了科学依据。

参考文献

- 1 张宝垣，等．中国药理学编．药理学进展 (抗炎免疫分册)．北京：人民卫生出版社，1983. 141
- 2 周重楚，等．中国药理学报，1989, 10(4): 360
- 3 江苏新医学院编．中药大辞典．上册．上海：上海人民出版社，1977. 1293
- 4 袁惠南，等，宁夏医学杂志，1996, (4): 193
- 5 李炳生，等．中草药通讯，1979, 10(9): 26
- 6 杜平主编．医学实验病毒学．上海：上海人民出版社，1982. 126
- 7 常雅萍，等．中国中药杂志，1989, 14(4): 236

(1997-08-08 收稿)

欢 迎 投 稿 欢 迎 征 订