

番石榴叶中提取的槲皮素和 2 α -羟基熊果酸体外抗人轮状病毒作用

张文举¹, 陈宝田^{1*}, 朱全红¹, 陈国宝¹, 魏练波¹, 熊波²

(1. 南方医科大学南方医院 中医科, 广东 广州 510515; 2. 中山大学 化学系, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 研究番石榴叶中提取的槲皮素和 2 α -羟基熊果酸体外抗人轮状病毒 (HRV) 的作用。方法 溶剂法分离化学成分, 波谱法鉴定其结构; 观察细胞病理变化, 采用半数组织培养感染 (TC₅₀) 微量法、电镜法观察槲皮素和 2 α -羟基熊果酸体外对 HRV 的治疗及预防作用。结果 从番石榴叶中分离得到的槲皮素和 2 α -羟基熊果酸在 125 μ g/mL 剂量下具有较好的体外抗 HRV 作用。结论 番石榴叶较好的抗 HRV 作用源于槲皮素和 2 α -羟基熊果酸等有效成分。

关键词: 番石榴叶; 槲皮素; 2 α -羟基熊果酸; 人轮状病毒 (HRV)

中图分类号: R286.87 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2005)01-0076-04

In vitro antirotaviral effects of quercetin and 2 α -hydroxyursolic acid extracted from *Psidium guajava* leaves

ZHANG Wen-ju¹, CHEN Bao-tian¹, ZHU Quan-hong¹, CHEN Guo-bao¹, WEI Lian-bo¹, XIONG Bo²
(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To study *in vitro* antirotaviral effects of quercetin and 2 α -hydroxyursolic acid extracted from *Psidium guajava* leaves. **Methods** Chemical components of *P. guajava* leaves were separated by chemical solvent and identified by spectrum. The antirotaviral effects of quercetin and 2 α -hydroxyursolic acid were studied *in vitro* by the method of cytopathic effect (CPE), trace median tissue culture infective dose (trace TC₅₀), and transmission electron microscope (TEM). **Results** Quercetin and 2 α -hydroxyursolic acid obtained from *P. guajava* leaves had stronger antiviral activity to human rotavirus (HRV) *in vitro*. **Conclusion** The stronger antiviral activity of *P. guajava* leaves to HRV are due to quercetin and 2 α -hydroxyursolic acid.

Key words: *Psidium guajava* L. leaves; quercetin; 2 α -hydroxyursolic acid; human rotavirus (HRV)

番石榴叶为桃金娘科植物番石榴 *Psidium guajava* L. 的干燥叶, 具有涩肠止泻的作用。本院于 1985 年开始用番石榴叶治疗感染性腹泻^[1], 并在体外实验中发现番石榴叶对人轮状病毒 (HRV) 有较好的抑制效果, 具有抑杀 HRV、缩短腹泻病程、促使 HRV 抗原阴转的作用^[2]。但是, 番石榴叶化学成分复杂, 具体的有效成分还不明确, 本研究从番石榴叶中分离得到槲皮素和 2 α -羟基熊果酸, 研究其体外抗 HRV 作用。

1 材料

1.1 药品与试剂: 番石榴叶采自第一军医大学药圃, 经第一军医大学中药鉴定中心鉴定为番石榴 *P. guajava* L. 的叶。病毒唑 (广东江门制药厂生产, 规格: 100 mg/mL, 每支 1 mL, 批号 021032), 乙酰基

胰酶 RPM F-1640 培养基 (Sigma 公司); 人轮状病毒 (HRV) DS-1 株 恒河猴胚肾细胞 (MA-104 细胞)、轮状病毒 ELISA 检测试剂盒 (A 群) 购自珠江医院生物高科技中心。石油醚 (II, 60~90 $^{\circ}$ C)、95% 乙醇、乙醚、丙酮, 均为 AR (广州化学试剂厂), 槲皮素标准品 (美国 Sigma 公司)。

1.2 仪器: Nicolet 5DX 红外光谱仪, 波段为 4 000~400 cm^{-1} (KBr 压片); ¹H-NMR、¹³C-NMR 核磁仪, Varian 公司; XT4 显微熔点仪, 德国 PHNR 公司; R-201 旋转蒸发仪, 上海申科机械研究所; 恒温培养箱; 超净工作台。

2 方法

2.1 槲皮素的分离与鉴定: 番石榴干叶 2.1 kg, 粉碎, 用石油醚渗漉脱脂 (3 次 \times 10 L), 挥去石油醚,

* 收稿日期: 2004-04-16

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (No. 39970912); 广东省中医药管理局资助课题 (No. 970241)

作者简介: 张文举 (1972—), 男, 湖北天门人, 主治医师, 博士, 研究方向为番石榴叶治疗轮状病毒性肠炎的机制研究。

E-mail: zhangwj91@hotmail.com

* 通讯作者 Tel: (020) 61641676

然后用冷乙醇(4次×3L)渗漉,乙醇液减压浓缩至0.7L,加0.5L热水,有深绿色沉淀物析出,滤过。滤饼用热水洗涤数次,合并滤液和洗液,减压浓缩,干燥后得到棕色胶状物50g。胶状物用200mL水溶解,滤过除去不溶性杂质,用乙醚反复提取,醚层减压浓缩后,得到黄色胶状物,用70%乙醇反复重结晶,得到黄色粉末化合物A 370mg。经熔点测定、盐酸-镁粉反应、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR鉴定及斑点显色,证实该化合物为槲皮素。

2.2 2 α -羟基熊果酸的分离与鉴定:番石榴干叶经石油醚脱脂后,95%乙醇回流提取(3次×10L),每次10h,合并乙醇提取液,浓缩得黑色黏稠状物500mL。将其烘干,碾碎,置索式提取器中,用乙醚回流提取9h。蒸去乙醚,得黑色膏状物50mL,用丙酮100mL洗涤,得灰白色固体。用乙醇反复重结晶(活性炭脱色),得少量白色晶体0.95g。以正己烷-醋酸乙酯-氯仿为展开剂,10% H₂SO₄乙酸溶液为显色剂,薄层色谱,发现有2个斑点,经硅胶柱色谱,以石油-醋酸乙酯梯度洗脱,得到白色晶体化合物B 242mg。经熔点测定、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR等鉴定,证实化合物B为2 α -羟基熊果酸。

2.3 MA-104细胞传代与病毒制备:MA-104细胞以RPMI-1640为培养基,37℃、5% CO₂孵箱中培养,2d后换液,2d后单层传代,96孔培养板每孔50 μ L于37℃、5% CO₂孵箱中培养成单层待用。人轮状病毒DS-1株解冻,用乙酰基胰酶预处理病毒悬液30min,将1mL病毒悬液接种于50mL细胞培养瓶中已长成单层的MA-104细胞上,再加入RPMI-1640培养液5mL,37℃、5% CO₂培养箱中培养,每天观察细胞病变,3d后收获病毒。将收获的HRV悬液用40%蔗糖溶液以30000r/min离心3h,得浓缩的HRV悬液,分装后置-20℃冰箱保存。

2.4 组织培养半数感染量(TC₅₀)测定:取新鲜HRV悬液,以10倍递次稀释成10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵5个不同的稀释度,分别接种经Hanks液洗2次的96孔微量板中已长成单层的MA-104细胞,每孔接种50 μ L,每个稀释度接种4孔,37℃、5% CO₂孵箱中吸附1h,用Hanks液洗涤2次,加入0.1mL维持液,37℃、5% CO₂孵箱中培养3d,每天在倒置显微镜下观察细胞病变,3d后判断结果。

2.5 药物对MA-104细胞毒性试验:将槲皮素(10mg/mL)、2 α -羟基熊果酸(10mg/mL)、病毒唑(10

mg/mL)用维持液稀释至1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320等不同稀释度,加入培养24h的MA-104细胞单层管中,每管各0.1mL,维持液0.9mL,每个浓度各4管,并设正常细胞对照5管,置33~37℃孵育,每天观察细胞病理变化(CPE),连续5d。以下出现CPE的最大浓度为最大非毒性浓度。

2.6 槲皮素、2 α -羟基熊果酸和病毒唑抑制病毒浓度测定:将培养24h的MA-104细胞管弃掉培养液,加0.9mL维持液,加100TC₅₀HRV悬液0.1mL,33~37℃孵育1h后,弃去液体,加维持液0.9mL,再分别加入0.1mL 1:40、1:80、1:160、1:320等4个浓度的槲皮素、2 α -羟基熊果酸和病毒唑,每个浓度2管,33~37℃孵育。同时设正常细胞、药物和HRV对照组。结果判断:每天观察MA-104细胞的病理变化,连续5d。以正常细胞对照组和药物对照组细胞无病变,HRV对照组细胞病理变化达+++时,实验组无CPE为药的完全抑制HRV剂量。

2.7 药物对HRV感染MA-104细胞的治疗作用:取96孔MA-104细胞培养板,吸去培养液,加100TC₅₀HRV悬液50 μ L于细胞孔,37℃、5% CO₂孵箱中吸附1h,分别加入槲皮素(0.125g/L)、2 α -羟基熊果酸(0.125g/L)、病毒唑(0.125g/L),每组8孔,每孔100 μ L,同时设HRV对照组和正常细胞对照组(每孔加入维持液100 μ L),培养箱中培养3d,每天在倒置显微镜下观察细胞病变,3d后ELISA法检测培养上清液中HRV含量。结果:肉眼观察,根据显蓝色强弱判定阳性(+~+++),不显色判为阴性(-)。

2.8 药物对HRV感染MA-104细胞的预防作用:取96孔MA-104细胞培养板,分别加入槲皮素(0.125g/L)、2 α -羟基熊果酸(0.125g/L)、病毒唑(0.125g/L),每孔100 μ L,每组10孔,37℃、5% CO₂孵箱中吸附1h,加100TC₅₀HRV悬液50 μ L于细胞孔,加入培养液,37℃、5% CO₂孵箱中培养,3d后ELISA法检测培养上清液中HRV含量。

2.9 直接电镜法观察:将槲皮素、2 α -羟基熊果酸和病毒唑用RPMI-1640配置成0.125、1.25、12.5g/L,各取5 μ L与浓缩的HRV悬液5 μ L混合,同时设病毒对照组,37℃作用5min后,每组各取两份标本,直接滴在具有Fomvar支持膜的100目铜网上,1~2min后用滤纸吸走铜网上的液体,用pH7.4的20g/L磷钨酸负染1min,用滤纸吸

去多余染液,干燥后用透射电镜观察,每份标本观察 1~2 个铜网。

2.10 统计方法:用 SPSS10.0 进行数据分析,多样本间两两比较用秩和检验。

3 结果

3.1 TCID₅₀测定结果,发现 10⁻³稀释度病毒组 2 孔细胞出现病变 (50%),10⁻²稀释度病毒组 3 孔细胞出现病变 (75%),10⁻¹稀释度病毒组 1 孔细胞出现病变 (25%)。求得 TCID₅₀为 3.5。

3.2 药物对 MA-104 细胞毒性试验:结果见表 1 (“-”表示细胞没有发生病理变化,“+”表示细胞发生病变的百分数不超过 25%,++ 表示细胞发生病变的百分数不超过 50%)。槲皮素为 500 μg/mL (稀释度为 1/20) 时,2α-羟基熊果酸、病毒唑为 1 000 μg/mL (稀释度为 1/10) 时,MA-104 细胞出现轻微的细胞病变,因此 2α-羟基槲皮素对 MA-104 细胞最大非毒性浓度为 250 μg/mL (稀释度为 1/40),而 2α-羟基熊果酸、病毒唑对 MA-104 细胞最大非毒性浓度为 500 μg/mL (稀释度为 1/20)。

表 1 槲皮素、2α-羟基熊果酸、病毒唑对 MA-104 细胞最大非毒性浓度

Table 1 Maximum noneytotoxicity concentration of quercetin, 2α-hydroxyursolic acid, and Ribavirin to MA-104 cells

组别	MA-104 细胞病理变化						
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
槲皮素	++	+	-	-	-	-	-
2α-羟基熊果酸	+	-	-	-	-	-	-
病毒唑	+	-	-	-	-	-	-

3.3 槲皮素、2α-羟基熊果酸和病毒唑抑制 HRV 浓度测定:结果表明 125 μg/mL (1/80) 槲皮素和 2α-羟基熊果酸可完全抑制 HRV 在 MA-104 细胞上的 CPE,62.5 μg/mL (1/160) 病毒唑即可完全抑制 HRV 在 MA-104 细胞上的 CPE,说明在体外小剂量的槲皮素、2α-羟基熊果酸和病毒唑有很强的抗 HRV 作用。

3.4 药物对 HRV 感染 MA-104 细胞的治疗作用:见表 2。槲皮素组、2α-羟基熊果酸组、病毒唑组细胞生长较好,上清液 ELISA 检测结果明显优于 HRV 对照组 (P<0.01)。槲皮素组、2α-羟基熊果酸组与病毒唑组相比,差异无显著性 (P>0.05)。

3.5 药物对 HRV 感染 MA-104 细胞的预防作用:结果见表 3。槲皮素组、2α-羟基熊果酸组、病毒唑组细胞生长较好,上清液 ELISA 检测结果明显优于 HRV 对照组 (P<0.01)。槲皮素组、2α-羟基熊果酸

表 2 ELISA 法检测治疗试验中培养上清液中的病毒 (n=10)

Table 2 Viral content in cultured supernatant detected by ELISA in treatment test (n=10)

组别	剂量 (g·L ⁻¹)	ELISA 检测结果				
		-	+	++	+++	++++
槲皮素	0.125	3	3	3	1	0**
2α-羟基熊果酸	0.125	3	2	5	0	0**
病毒唑	0.125	3	2	5	0	0**
HRV 对照	-	0	0	1	6	3
正常细胞	-	10	0	0	0	0**

与 HRV 对照组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs HRV control group

表 3 ELISA 法检测预防试验中培养上清液中的病毒 (n=10)

Table 3 Viral content in cultured supernatant detected by ELISA in preventive test (n=10)

组别	剂量 (g·L ⁻¹)	ELISA 检测结果				
		-	+	++	+++	++++
槲皮素	0.125	2	3	3	2	0**
2α-羟基熊果酸	0.125	2	2	5	1	0**
病毒唑	0.125	0	2	5	3	0**
HRV 对照	-	0	0	0	8	2
正常细胞	-	10	0	0	0	0**

与 HRV 对照组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs HRV control group

组与病毒唑组相比,差异无差异性 (P>0.05)。

3.6 直接电镜法观察结果:病毒在电镜下呈圆球形,为双凹面对称体,病毒颗粒有两层壳体,内层壳体呈放射状排列,状似车轮辐条,外绕的外层壳体,状似轮缘,其颗粒完整,结构清晰。当药物为高浓度时,可见病毒颗粒形态被破坏,外壳完全溶解、碎裂,绝大部分内核溶解、碎裂。当药物为中浓度时,仅见小部分实心颗粒,形态完整,结构清晰,大部分病毒出现空心颗粒,极少部分病毒外壳溶解、碎裂。当药物为低浓度时,绝大部分病毒呈实心颗粒,形态完整,结构清晰,极少部分病毒出现空心颗粒,结构欠清晰。

4 讨论

HRV 是引起急性感染性腹泻的主要病原体,由于疫苗的预防作用和口服补盐液治疗的推广,全球每年死于 HRV 感染的患者从 1986 年的 100 万降到现在的 45 万,但其仍然严重威胁着人类的健康^[3]。在长期的临床实践中,发现番石榴叶对 HRV 性腹泻疗效好,优于其他中草药。

在本实验中,从番石榴叶中分离并鉴定了槲皮素和 2α-羟基熊果酸。槲皮素能够拮抗钙离子通道^[4],减少钙离子进入细胞内,从而使细胞内钙离子

浓度降低,使肠道蠕动减慢,延长水、电解质、营养物质在肠道内停留时间,促进其吸收,减少腹泻次数和粪便量。而且,病毒与受体复合物进入细胞必须有钙离子的辅助作用,由于槲皮素拮抗钙离子通道,使病毒受体复合物不能进入细胞,中断了其生活周期,从而引起病毒死亡,这也是槲皮素在体外能够较好地抑制 HRV 的机制。熊果酸能够刺激 IFN- γ 的分泌^[5],增强机体的免疫功能,提高机体抵抗病毒的能力,但其在体外以何种机制发挥抗病毒作用,还有待于进一步研究。槲皮素和 2 α -羟基熊果酸在体外显示了较强的抗 HRV 作用,但其在体内是否有较强的抗病毒作用,由于其代谢过程不明,有待于进一步研究。

References:

[1] Wei L B, Li Z J, Chen B T, et al. Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *Guava* leaf [J]. *Chin J Integratd Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2001, 7(2): 86-89.
 [2] Wei L B, Lü R H, Chen B T, et al. Study on the anti-rotavirus effect of *Guava* leaf *in vitro* [J]. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 1999, 7(10): 895-897.
 [3] Georges P, Myers M G. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop [J]. *Pediatrics*, 2002, 110(6): 67-72.
 [4] Wu S N, Chiang H T, Shen A Y, et al. Differential effects of quercetin, a natural polyphenolic flavonoid on L-type calcium current in pituitary tumor (GH3) cells and neuronal NG108-15 cells [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(2): 298-308.
 [5] Chiang L C, Ng L T, Chiang W, et al. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpeneoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species [J]. *Planta Med*, 2003, 69(7): 600-604.

龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸和封闭度的影响

季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 邹翔, 汲晨峰*

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 研究龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸 (SA) 水平和封闭度的影响。方法 建立 H₂₂ 荷瘤小鼠模型, 荷瘤小鼠分别 sc 生理盐水、环磷酰胺、龙葵碱 (9.375, 18.75, 37.5 mg/kg)。采用比色法测定 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平和封闭度。结果 龙葵碱可剂量依赖性降低荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平和肿瘤细胞膜封闭度。结论 龙葵碱通过降低 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平和肿瘤细胞膜封闭度起抗肿瘤作用。

关键词: 龙葵碱; H₂₂ 荷瘤小鼠; 膜封闭度; 唾液酸

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0079-03

Effect of *Solanum nigrum* total alkaloid on sialic acid and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice

Ji Yu-bin, Wang Sheng-hui, Gao Shi-yong, Zou Xiang, Ji Chen-feng

(Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of total alkaloid from *Solanum nigrum* (TA SN) on sialic acid (SA) and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice. **Methods** H₂₂ tumor-bearing mice model was established and H₂₂ tumor-bearing mice were given NS, Cytosan (CTX), and TA SN (9.375, 18.75, and 37.5 mg/kg) by sc, respectively. SA content and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ mice were determined by chromatometry. **Results** TA SN could decrease the SA content and the blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice in a dose-dependent manner. **Conclusion** TA SN shows the antitumor activity through decreasing the SA content and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice.

Key words: total alkaloid of *Solanum nigrum* L. (TA SN); H₂₂ tumor-bearing mice; blocking degree of membrane; sialic acid (SA)

龙葵 *Solanum nigrum* L. 为茄科一年生草本植物, 分布于全国各地, 其主要成分为生物碱。民间使用

龙葵治疗肿瘤效果良好。前期抗肿瘤实验结果表明龙葵碱能够明显延长 H₂₂ 荷瘤小鼠的生存时间。本实验

* 收稿日期: 2004-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400591); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2004-13); 哈尔滨市青年科学基金资助项目 (2004A FQ XJ 035)。

作者简介: 季宇彬(1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理及分子药理学研究。