

表 6 鄂西素对小鼠腹水型 HCA 的作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of henryin on ascities HCA in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/只		体重/g		存活时间/ d	生命延长率/ %
		始	末	始	末		
模型	—	8	0	20.50 ± 0.70	27.20 ± 2.51	14.85 ± 2.40	—
5-Fu	20.0	8	0	20.25 ± 0.55	25.31 ± 1.70	35.67 ± 6.80**	140.20
鄂西素	12.5	8	1	20.27 ± 0.76	25.38 ± 1.71	28.73 ± 5.20**	93.47
	25.0	8	0	21.95 ± 0.75	26.50 ± 1.76	33.90 ± 6.20**	128.28

与模型组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs model group

表 7 鄂西素对 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 7 Effects of henryin on delayed hypersensitive test in mice induced by DNCB ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	耳肿胀度/ mg	脾指数/ (mg · g ⁻¹)	胸腺指数/ (mg · g ⁻¹)
对照	—	1.54 ± 0.24	84.40 ± 7.92	45.03 ± 4.44
5-Fu	20.0	2.03 ± 0.30*	43.82 ± 8.26*	19.27 ± 3.57*
鄂西素	12.5	1.67 ± 1.06	76.45 ± 8.10	39.45 ± 5.31
	25.0	1.65 ± 2.83	75.65 ± 9.11	43.10 ± 2.14

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

显增加荷腹水型 S₁₈₀ 腹水型和荷 HCA 腹水型小鼠的生命延长率,其抗肿瘤作用的强弱呈剂量依赖性。本实验设有 12.5、25.0 mg/kg 两个剂量组,其中以 25.0 mg/kg 剂量作用为好。鄂西素小剂量有一定的抑瘤作用,而高剂量组则有明显的抗肿瘤作用,与模型组相比差异有显著性,而与阳性对照组相比则差异无显著性。机体免疫功能影响的实验结果证明,鄂西素对小鼠细胞免疫无影响,在 25.0 mg/kg 剂量时溶血素水平有较轻微抑制,表明在该剂量时,本品对

小鼠的体液免疫有轻微影响。但与阳性对照组相比差异显著。5-Fu 作为本实验阳性对照药对小鼠各瘤株有明显的抑制作用,其抑瘤率与模型组相比均有明显差异,但免疫实验结果表明,5-Fu 对机体免疫亦呈明显抑制作用,这样就限制了其在临床上的应用。

鄂西素的抗肿瘤作用虽然稍逊于 5-Fu,但仍显示出较强的抗肿瘤作用,而免疫实验结果又表明,其对机体免疫功能没有明显影响。鄂西素是由鄂西香茶菜中提取分离而得的有效成分,鄂西香茶菜资源丰富,表明鄂西素具有较好的临床应用价值,可作为一种有较好前景的抗肿瘤药物,值得进一步深入研究与开发。

References:

- [1] Li T C, Liu C J, An X Z. The structure of henryin [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1984, 6(4): 453-456.
- [2] Li J C, Yang L J. Study on antitumor effect of Lushan rubesensin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(Suppl): 142-144.
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982.

松针油体外抗腺病毒作用研究

魏凤香, 商 蕾, 曲章义*, 陈 晶, 高 虹, 王 鹏, 张鸿彦

(哈尔滨医科大学公共卫生学院 卫生微生物学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

腺病毒是引起人类呼吸道和消化道感染的重要病原之一。腺病毒感染人类可引起许多疾病,如急性上、下呼吸道感染,暴发性眼结膜炎,急性出血性膀胱炎,风湿性关节炎,免疫缺损疾病,脑炎,脑膜炎以及婴幼儿胃肠炎等,而其中呼吸道疾病的发病率是

最高的。腺病毒以其型别多、致病范围广而越来越受到关注。在 5 岁以下儿童的急性呼吸道疾病中,大约 5% 是由腺病毒引起的^[1],在 3 岁以下儿童还易引起急性肺炎^[2],腺病毒不仅可以引起致命的肺炎,而且还能留下远期肺部损害^[3]。目前尚无有效预防腺

收稿日期: 2006-12-13

基金项目: 哈尔滨医科大学医学基础学科科学基金资助课题; 黑龙江省卫生厅科技项目 (2006-296) 资助

作者简介: 魏凤香 (1974—), 女, 黑龙江省佳木斯市人, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事呼吸道病毒分子生物学研究。

Tel: (0451) 81161590

* 通讯作者 曲章义 E-mail: qurainbow@yahoo.com.cn

病毒感染的疫苗和临床治疗药物,因此,筛选及开发抗腺病毒药物具有重要的社会意义和经济价值。现代研究表明,松针具有镇痛、抗炎、镇咳、祛痰、抗突变、调血脂、降血压、抑菌等作用^[4],其药用价值日益受到重视。松针油抗病毒研究国内外未见报道,本实验初步研究松针油抗人腺病毒 3 型 (Adenovirus type 3, ADV3) 的作用效果。

1 材料

1.1 病毒株和细胞株:ADV 由本教研室保存;HeLa 细胞株为武汉大学典型培养物保藏中心提供,常规方法传代培养。

1.2 药品与试剂:松针叶采于黑龙江省伊春市林场;对照组药物病毒唑注射液,山东益康药业有限公司产品,50 mg/mL,批号 200211061;新生牛血清(杭州四季青生物公司);RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司);MTT (美国 Sigma 公司);二甲基亚砷 (DMSO,上海菲达有限公司)。

1.3 仪器:HP6890GC/5975MSD 气质联用仪(美国),蒸馏装置(自制),CO₂培养箱(北京利康仪器发展有限公司),550 型微孔板酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 松针油提取:采用水蒸气蒸馏法。松树叶在实验室阴干后切成小于 2 cm 的小段,取针叶 100 g 加到 1 000 mL 的圆底烧瓶中,加入 750 mL 蒸馏水,置于水蒸气蒸馏装置中进行提取,蒸馏 4 h,取上层精油,用无水乙醚溶解,无水硫酸钠脱水,得到淡黄色油状液体,冷藏备用。用气相色谱-质谱联用仪分析,测得松针油中含柠檬烯 32.23%、乙酸龙脑酯 24.01%、蒎烯 18.04%、 α -蒎烯 15.88%、 β -蒎烯 3.16%。

2.2 药物配制:用 RPMI-1640 培养液将松针油 (1.05 g/mL) 按 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:512 000、1:1 024 000 比例进行稀释,其药液质量浓度分别为 10.5、5.25、2.625、1.31、0.656、0.328、0.164、0.08、0.04、0.02、0.01 mg/mL。

2.3 病毒毒力测定:以 50% 组织培养感染量 (TCID₅₀) 表示病毒毒力。将病毒培养液做 10 倍系列稀释从 10⁻¹至 10⁻¹⁰。将各稀释度的病毒液接种于单层 HeLa 细胞中,每一稀释度 8 个复孔,同时设阴性对照,37 ℃ 培养 3~5 d,观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE)。用 Reed-Munch 法求出 TCID₅₀。

2.4 松针油细胞毒性测定:将细胞维持液稀释的不同质量浓度松针油分别加入 HeLa 细胞已长成单层的 96 孔细胞培养板中,每个浓度重复 8 个复孔,同时设立正常细胞对照,置于 37 ℃、5% CO₂培养箱内培养,连续观察 3 d,记录细胞形态变化。培养结束前 4 h,吸弃培养板中液体,PBS 冲洗 3 次,每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μ L,于 37 ℃ 培养箱中培养 4 h,去上清后每孔加 DMSO 200 μ L,微量振荡器振荡 5 min,酶标读数仪 (波长 492 nm) 测吸光度 (A) 值。实验重复 3 次。

2.5 松针油在 HeLa 细胞内抗 ADV3 实验

2.5.1 对病毒的直接灭活作用:在药物无毒范围内,不同浓度的含药维持液分别与 100TCID₅₀腺病毒液等量混合,37 ℃ 作用 2 h 后,将其接种在 HeLa 细胞已长成单层的 96 孔细胞培养板中,37 ℃ 吸附 2 h 后,弃上清,加维持液 200 μ L,每一浓度设 8 个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑 (50 μ g/mL) 对照,置于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱培养。每日观察 CPE。当病毒对照 CPE 达 75% 以上,MTT 法检测细胞存活率。实验重复 3 次。

2.5.2 对病毒复制增殖的抑制作用:在长成单层的 HeLa 细胞的 96 孔板上,每孔接种 20 μ L 的 100TCID₅₀腺病毒液,37 ℃ 吸附 2 h,弃病毒液。在药物无毒范围内加入不同浓度的含药维持液,每孔 200 μ L,每一浓度设 8 个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑 (50 μ g/mL) 对照,余方法同 2.5.1 项。

2.5.3 对病毒吸附的作用:在药物无毒范围内,不同浓度的含药维持液分别与 100TICD₅₀腺病毒液等量混合后,立即加到已长成单层 HeLa 细胞的 96 孔细胞培养板中,37 ℃ 吸附 2 h 后,弃去 96 孔板中液体,加维持液 200 μ L,每一浓度设 8 个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑 (50 μ g/mL) 对照,余方法同 2.5.1 项。

2.5.4 对腺病毒侵入细胞的阻断作用:在药物无毒范围内,每孔细胞预先加入不同浓度的含药维持液 200 μ L,作用 4 h 后用 PBS 洗涤 3 次,每孔再加入 100TCID₅₀腺病毒,吸附 2 h,弃病毒上清,加维持液 200 μ L,每一浓度设 8 个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑 (50 μ g/mL) 对照,余方法同 2.5.1 项。

2.6 数据处理:用 SPSS11.5 软件处理。用 Linear-Regression 方法计算药物半数中毒浓度 (TC₅₀)、半数有效浓度 (IC₅₀) 和对药物剂量与其产生的细胞

效应(细胞存活率、抑制率)进行相关性分析,判断是否存在量效关系。组间比较采用方差分析。HeLa 细胞存活率=药物组 A 值/细胞对照组 A 值×100%,抑制率=1-存活率。病毒抑制率=(药物组 A 值-病毒对照组 A 值)/(细胞对照组 A 值-病毒对照组 A 值)×100%。治疗指数(TI)=TC₅₀/IC₅₀。

3 结果

3.1 病毒毒力测定:采用 Reed-Munch 法计算 ADV3 在 HeLa 细胞中的 TCID₅₀为 10^{4.75},实验中病毒攻击量为 100TCID₅₀/100 μL。

3.2 松针油对 HeLa 细胞的毒性作用:松针油对 HeLa 细胞的毒性作用表现为细胞增殖缓慢、颗粒较多、折光性强、形态改变、部分细胞破碎脱落。松针油对细胞的毒性作用随着药物质量浓度的降低而降低,细胞存活率逐渐增加。MTT 结果表明,松针油对 HeLa 细胞的毒性作用 TC₅₀值为 2.3 mg/mL,最大无毒浓度(TC₀)为 0.706 mg/mL。

3.3 松针油在 HeLa 细胞内抗 ADV3 实验结果

3.3.1 对病毒的直接灭活作用:腺病毒感染所致的 HeLa 细胞 CPE 特征为细胞肿胀、变圆、细胞间融合、脱落、碎裂细胞呈典型葡萄串状。在松针油无毒范围内,随质量浓度增加,腺病毒所致的 CPE 程度降低,病毒抑制率与质量浓度呈正相关(见表 1 和 2),抑制效果好于病毒唑(P<0.05)。说明松针油具有直接灭活 ADV3 的作用,其对 ADV3 的 IC₅₀为 0.08 mg/mL, TI 为 26.8。

表 1 松针油对 ADV3 的抑制作用

Table 1 Inhibition of essential oil extracted from pine needles on ADV3

组别	ρ/(mg·mL ⁻¹)	病毒抑制率/%		
		直接灭活	复制增殖	吸附
松针油	0.656	81.4	72.9	67
	0.328	71.7	59.6	49
	0.164	60	58.8	34
	0.08	48.8	58.6	31
	0.04	39.4	52.2	22
	0.02	19.6	48.1	6
	0.01	5	38	2
病毒唑	0.05	43	36	9

3.3.2 对病毒复制增殖的抑制作用:实验结果表明,松针油能明显抑制腺病毒生物合成,表现在随着松针油质量浓度的增加,细胞肿胀、变圆等典型 CPE 特征逐渐减弱,细胞存活率明显升高,松针油抑制 CPE 的作用随着质量浓度的增加而增强,抑制效果优于病毒唑(P<0.05)。其对腺病毒的 IC₅₀为 0.52 mg/mL, TI 为 4.3。

表 2 松针油对 ADV3 CPE 的影响

Table 2 Effect of essential oil extracted from pine needles on CPE of ADV3

组别	ρ/(mg·mL ⁻¹)	CPE			
		直接灭活	复制增殖	吸附	阻断
松针油	0.656	±	±	±	++++
	0.328	±	±	+	++++
	0.164	+	+	+++	++++
	0.08	++	++	+++	++++
	0.04	+++	++	+++	++++
	0.02	++++	++	++++	++++
	0.01	++++	+++	++++	++++
病毒唑	0.05	++	+++	++++	++++
病毒对照	—	++++	++++	++++	++++
细胞对照	—	—	—	—	—

“—”表示无细胞病变;“+”表示有 25%细胞发生病变;“++”表示有 50%细胞发生病变;“+++”表示有 75%细胞发生病变;“++++”表示有 100%细胞发生病变

“—” indicates no cell lesion; “+” indicates 25% cell lesion; “++” indicates 50% cell lesion; “+++” indicates 75% cell lesion; “++++” indicates 100% cell lesion

3.3.3 对病毒吸附的作用:每日观察 CPE 情况,随着松针油质量浓度的增加,典型的 CPE 表现逐渐下降,MTT 结果显示抑制病毒增殖,抑制效果优于病毒唑(P<0.01),其对腺病毒的 IC₅₀为 0.23 mg/mL, TI 为 9.7。

3.3.4 对腺病毒侵入细胞的阻断作用:松针油不同质量浓度组均出现典型的 CPE,MTT 结果显示病毒抑制率与病毒对照组差异无显著性(P>0.05),说明松针油对病毒侵入细胞均无阻断作用,对腺病毒感染无预防作用。

4 讨论

腺病毒是双链 DNA 病毒,感染十分普遍,引起多种疾病,是儿童呼吸道感染的主要病原之一,个别型别的腺病毒还会引起细胞转化,甚至致癌^[5]。腺病毒的传染性很强,尤其是在人口密集的地方,对免疫力低下的患者(如老年人、骨髓移植患者、白血病、艾滋病患者等)通过飞沫和接触传染,在同一时期可造成区域性流行或暴发流行^[6]。虽然人工自动免疫是一种很好的预防措施,由于用作疫苗的某些常用腺病毒能使动物转化,对人有致癌的潜在危险^[7],所以推广减毒活疫苗受到很大的限制。病毒唑作为广谱抗病毒药,被用于治疗腺病毒感染,但临床实际应用中效果并不理想,由于目前尚无有效疫苗用于预防,针对抗腺病毒的特异性药物还有待开发^[8]。寻找一种高效、安全、副作用少的抗病毒药物的研究势在必行。目前的抗病毒化学合成药物由于在体内的毒性和长期应用耐药性而限制了其临床应用。传统中药

具有不良反应小、药源丰富、价格低廉、多靶点作用机制、能调节机体免疫功能、抑制病毒复制、阻止病毒致细胞病变、改善临床症状,在治疗病毒感染性疾病上应用广泛,显示出了独特的优势和较好的应用前景,筛选高效低毒的抗病毒中药是当前抗病毒研究热点之一^[9]。

松针为松科松属植物的叶,用药历史悠久,在古代我国就已利用松针来治疗疾病。中医认为松针味苦,性温,无毒,有祛风、活血、明目、安神、解毒、止痒、去疲劳等功效。主治流行性感冒、风湿关节痛、跌打肿痛、夜盲症、高血压、神经衰弱、冻疮、慢性支气管炎等疾病。

本实验初步研究了松针油抗腺病毒 ADV3 的作用效果。松针油对 HeLa 细胞的 TC_{50} 为 2.3 mg/mL, TC_0 为 0.706 mg/mL,表明对细胞无明显的毒性作用。MTT 结果显示,松针油对 ADV3 有直接灭活作用,而且随着质量浓度的升高,灭活作用增强,说明药物可能具有直接杀伤病毒的作用,或者药物中的某一天然化合物在体表能与腺病毒表面的某个特征性部位相结合,使腺病毒很难进入细胞进行复制。同时,松针油对抑制腺病毒在细胞内增殖有明显的作用,而且优于对照组药物病毒唑,其作用机制可能是抑制病毒核酸复制或阻止病毒蛋白合成。松针油在病毒对细胞的吸附阶段也起到一定作用,可能是腺病毒的纤突被破坏,阻止了病毒的吸附,使病毒不能进入细胞内复制。松针油对病毒侵入细胞均无

阻断作用,说明松针油不能与细胞表面受体结合,从而不能预防病毒的感染。松针油抗腺病毒作用机制还有待进一步研究。

References:

- [1] Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections [J]. *Antiviral Res*, 2006, 71: 172-180.
- [2] Zheng H X, Liu Y G, Qu Z Y, et al. Purification and antigenicity detection of recombinant hexon of human type3 adenovirus [J]. *J Haerbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 2005, 39(6): 471-478.
- [3] Castro-Rodriguez J A, Daszenies C, Garcia M, et al. Adenovirus pneumoni in infants and factors for developing bronchiolitis obliterans; a 5-year follow-up [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2006, 41(10): 947-953.
- [4] Li P, Liu Y P. The progress of pine needles [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med* (成都中医药大学学报), 2001, 24(3): 49.
- [5] Akalu A, Liebermann H. The Subgenus-specific C-terminal region of protein κ is located on the surface of the adenovirus capsid [J]. *J Virol*, 1999, 7: 6182-6187.
- [6] Francisci D, Marroni M, Morosi S, et al. Fatal haemolytic uraemic syndrome in an AIDS patient with disseminated adenovirus and cytomegalovirus co-infection [J]. *Infez Med*, 2006, 14(1): 37-40.
- [7] Nevels M, Tauber B, Spruss T, et al. Hit-and-run transformation by adenovirus onco genes [J]. *J Virol*, 2001, 75(3): 89.
- [8] Zarubaev V V, Slita A V, Kriviskaya V Z, et al. Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6 *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 2003, 58(2): 131.
- [9] Fang J G, Tang J. Effect of *Radix Isatidis* against herpes simplex virus type I *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 242-244.

金莲花醇提物体内抗病毒作用的实验研究

苏连杰,田 鹤**,马英丽*

(黑龙江中医药大学药学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 为毛茛科多年生草本植物,以花入药,有清热解毒、抗菌消炎作用。民间用以治疗扁桃体炎、急性中耳炎、急性结膜炎、急性淋巴管炎等。近代药理研究表明,金莲花对绿脓杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌等均有明显的抑制作用。本实验研究金莲花醇提物对流感病毒感染小鼠的保护作用,观察金莲花醇提物的体内抗病毒作用。

1 材料

1.1 动物:NIH 系小鼠,体重为 13~15 g,由黑龙江中医药大学动物室提供。

1.2 药品、试剂及仪器:受试药物为金莲花醇提物,含总黄酮 60% (UV),使用时以蒸馏水配成所需浓度。阳性对照药物为清热消炎宁胶囊[广州敬修堂(药业)股份有限公司产品,批号 010815];病毒唑

收稿日期:2007-01-15

基金项目:黑龙江省科委攻关项目(G00C 202302);哈尔滨市科技攻关计划项目(2004AA3CS170-1)

作者简介:苏连杰(1963—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事中药药理学及质量标准的研究。E-mail: jimozeren@163.com

*通讯作者 马英丽

**黑龙江中医药大学 2004 级硕士研究生