

虎杖蒽醌提取物抗柯萨奇B₃型病毒作用及机制研究李凤新^{1,2}, 孙振国¹, 苏红¹, 王巍巍¹, 王金霞¹, 孙非^{2*}

(1. 吉林省药物研究院, 吉林 长春 130061; 2. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 研究虎杖蒽醌提取物抗柯萨奇B₃型病毒(Coxsackie B₃virus, CoxB₃)的作用。方法 通过对病毒性心肌炎致病有关的CoxB₃型病毒体感染模型,观察虎杖蒽醌提取物对CoxB₃型病毒感染宿主细胞的抑制作用及对病毒性心肌炎小鼠的治疗作用。结果 虎杖蒽醌提取物对感染细胞的治疗指数(TI)分别为6.73(Vero)和4.00(原代培养心肌细胞);对照品抗病毒口服液组TI为4.01(Vero)和3.56(原代培养心肌细胞);虎杖蒽醌提取物对CoxB₃病毒感染细胞的TI高于抗病毒口服液($P < 0.05$)。小鼠感染病毒后,各给药组血清中乳酸脱氢酶(LDH)、天冬氨酸转移酶(ASTase)、肌酸激酶(CK)水平显著降低($P < 0.001$)。结论 虎杖蒽醌提取物对由CoxB₃型病毒引起的病毒性心肌炎具有一定的治疗作用。

关键词:虎杖蒽醌提取物;柯萨奇B₃型病毒(CoxB₃);病毒性心肌炎

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1699-03

现代研究表明,10%虎杖水煎液对1型单纯疱疹病毒(HSV-1)、2型单纯疱疹病毒(HSV-2)、甲型流感病毒京科68-1株、埃可病毒11型有抑制作用;3%虎杖煎剂对3型腺病毒、Ⅰ型脊髓灰质炎病毒、9型埃可病毒、A9及B5型柯萨奇病毒、乙型脑炎病毒也有较高的抑制作用^[1]。柯萨奇病毒(Coxsackie virus)是病毒性心肌炎的主要致病病毒,为了开发虎杖的抗病毒作用,本实验对虎杖蒽醌提取物抗柯萨奇B₃型病毒(CoxB₃)作用及机制进行了研究。

1 材料

1.1 药物:虎杖蒽醌提取物(含大黄素50%),由吉林省药物研究所提取;抗病毒口服液,河北恒利集团制药股份有限公司,批号0303301;盐酸胍,Sigma;荣心丸,上海玉丹药业有限公司产品,批号20030804。

1.2 仪器和试剂:NCPC03100—1多用气体培养箱,美国;G3022型酶标仪,中国;OLYMPUS BHF双筒显微镜,日本。IMDM细胞培养液,Gibco公司,美国;胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT),Sigma,美国;干扰素标准品,国家卫生部药品检定所。

1.3 动物和细胞株:Wistar乳鼠、雄性Balb/C小鼠,长春高新医学动物实验研究中心提供;非洲绿猴肾细胞(Vero)、L929细胞、原代培养Wistar大鼠乳鼠心肌细胞、CoxB₃型病毒、水泡性口腔炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV),由吉林大学再

生医学科学研究所病毒研究室制备。

2 方法与结果

2.1 体外抗CoxB₃试验:设正常细胞对照组、病毒感染组、盐酸胍对照组、抗病毒口服液对照组和给药组。给药组分为5个质量浓度组:75、50、37.5、25、18.75 μg/mL;抗病毒口服液浓度为16倍稀释;盐酸胍质量浓度为250 μg/mL。

2.1.1 细胞病变(CPE)抑制实验:Vero细胞以 2.0×10^6 /mL接种于96孔板。待培养细胞贴壁后,以100 TCID₅₀的CoxB₃型病毒(Nancy株)感染相应宿主细胞;大鼠乳鼠心肌细胞 2.5×10^5 /mL接种于96孔板,0.1 mL/孔,培养2 d贴壁搏动后,以100 TCID₅₀的CoxB₃病毒感染相应宿主细胞,并按上述分组方法进行实验,显微镜下观察、记录CPE, CPE的破坏程度分为4级,即+---为≤25%, ++--为≤50%, +++-为≤75%, ++++为≤100%。CoxB₃型病毒感染Vero细胞及原代培养大鼠乳鼠心肌细胞的致细胞病变抑制实验结果均表明给药组与病毒感染组有显著性差异($P < 0.05$)。实验结果为:虎杖蒽醌提取物IC₅₀分别为27.86 μg/mL(Vero)和48.46 μg/mL(原代培养心肌细胞);治疗指数(TI)分别为6.73(Vero)和4.00(原代培养心肌细胞)。抗病毒口服液IC₅₀均为32倍稀释;TI为4.01(Vero)和3.56(原代培养心肌细胞)。盐酸胍IC₅₀均为50 μg/mL;TI为8.02(Vero)和8.00(原代培养心肌细胞)。结果表明,虎杖蒽醌提

• 收稿日期:2008-05-09

作者简介:李凤新(1967—),女,副研究员,博士生,研究方向为中药药理。E-mail: li_hw@sina.com.cn

* 通讯作者 孙非

取物对 CoxB₃ 病毒感染细胞的 TI 高于抗病毒口服液。

2.1.2 病毒繁殖抑制实验:感染和加药不同时间收集上述细胞,裂解后离心取上清,以 10 倍系列稀释,在 Vero 细胞上以 MTT 法检测病毒滴度,计算 TCID₅₀。加药组比病毒组 TCID₅₀降低 1 个对数以上示为有效^[3]。根据病毒滴度测定,虎杖蒽醌提取物 5 个质量浓度中 75、50、37.5、25 μg/mL 有效,而 18.75 μg/mL 无明显效果,结果见表 1。

表 1 虎杖蒽醌提取物对 CoxB₃ 繁殖的抑制作用

Table 1 Inhibition of anthraquinone extract from *Rhizoma Polygoni* on multiplication of CoxB₃

组别	p/ (μg · mL ⁻¹)	Vero 细胞		原代培养乳鼠心肌细胞	
		lgTCID ₅₀ 与病毒组差值	lgTCID ₅₀ 与病毒组差值	lgTCID ₅₀ 与病毒组差值	lgTCID ₅₀ 与病毒组差值
病毒感染	—	5.13	0	4.85	0
盐酸胍	250	2.20	2.93	2.68	2.17
抗病毒口服液	16 倍稀释	3.57	1.56	2.70	2.15
虎杖蒽醌提取物	75	2.22	2.91	2.67	2.18
	50	2.79	2.34	2.93	1.92
	37.5	2.91	2.22	3.13	1.72
	25	3.22	1.91	3.50	1.35
	18.75	4.59	0.54	4.17	0.68

2.1.3 干扰素诱生实验:用虎杖蒽醌提取物在 Balb/C 小鼠脾细胞上诱生干扰素,然后在 L929 细胞上以 VSV 测定干扰素效价。实验分为 6 组,每组 10 只,依次为:正常对照组,病毒对照组,阳性药物组(荣心丸 4.68 g/kg),虎杖蒽醌提取物高、中、低(100、50、25 mg/kg)剂量组。除正常组外,各组小鼠 ip 接种 100 LD₅₀ CoxB₃ 病毒液,正常组给同体积生理盐水,3 d 后 ig 给药。给药 7 d 后无菌取脾,于无菌平皿内以 100 目钢网用针芯研磨,移至离心管,静置 10 min 后去块状物,离心洗涤 3 次。用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液调节细胞浓度备用。将脾细胞以 2.5 × 10⁶/mL 接种 24 孔板,1 mL/孔,加入 ConA 10 μg/mL,37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 h,收集上清液,1 500 r/min 离心 10 min,取上清,−20 ℃ 保存待测。用干扰素标准品采用 6、12、24、48、96、192、240 U/mL 7 个浓度,测定吸光度(A)值,建立回归方程,绘制标准曲线。用 L929 细胞接种 96 孔板,0.1 mL/孔,37 ℃ 培养 24 h。弃培养液加入待测样品,每孔 0.2 mL,每个样品设 4 个复孔,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。弃培养液,加入 50 TCID₅₀ VSV 病毒攻击,0.1 mL/孔。同时设正常对照和病毒对照孔。以 MTT 法测定各孔的 A 值,代入回归方程后求出每组的干扰素效价。回归方程为 Y = 0.002 5 X + 0.284 7。各组干扰素效价分别

为:正常对照组 17.12 U/mL,病毒对照组 36.12 U/mL,荣心丸组 77.12 U/mL,虎杖蒽醌提取物高、中、低剂量组 83.12、79.12、69.12 U/mL。

2.2 对病毒性心肌炎小鼠的治疗作用:取雄性 Balb/C 小鼠,随机分为 6 组,每组 15 只动物。除正常对照组外,各组动物均 ip 0.1 TCID₅₀ CoxB₃ 病毒 0.2 mL/只,连续 3 d。于第 1 次病毒攻击后 72 h 开始 ig 给药,分组及给药剂量同 2.1.3 项,连续给药 10 d,于给药第 3、6、10 天将小鼠称体质量。于末次给药后次日,摘除小鼠眼球取血,离心,取血清,测定心肌酶乳酸脱氢酶(LDH)、天冬氨酸转移酶(AST)、肌酸激酶(CK)水平(按试剂盒方法测定,试剂盒均为中生北控生物科技股份有限公司生产),并取出心脏,用 4% 多聚甲醛固定,制作心肌切片。给药后第 5 天和第 10 天,每组随机取出 4 只小鼠,无菌取血,离心取血清,采用 ELISA 方法进行中和抗体测定,并按上述小鼠脾细胞干扰素测定方法对血清进行干扰素的动态观察。同时将待测血清以 10⁻¹~10⁻⁶ 进行稀释,在 Vero 细胞上测定病毒的滴度。

2.2.1 对心肌酶的影响:感染病毒后,小鼠血清中 LDH、AST、CK 水平升高,各给药组能明显对抗各酶水平的升高,其中高、中剂量组作用非常显著(P < 0.001),结果见表 2。

表 2 虎杖蒽醌提取物对病毒性心肌炎小鼠血清心肌酶的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 2 Effect of anthraquinone extract from *Rhizoma Polygoni* on cardiac muscle enzyme of viral myocarditis model mice ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	AST/ (U · L ⁻¹)	LDH/ (U · L ⁻¹)	CK/ (U · L ⁻¹)
正常	—	138.7 ± 22.3	1 030.6 ± 290.1	278.7 ± 90.0
病毒感染	—	323.0 ± 67.5	1 474.5 ± 432.6	439.5 ± 159.67
虎杖蒽醌 提取物	100	171.1 ± 84.4**	971.3 ± 308.3*	250.5 ± 115.8*
	50	147.5 ± 58.7**	1 035.8 ± 292.8*	188.9 ± 100.2*
	25	179.8 ± 61.4*	905.8 ± 207.6	240.0 ± 111.5
荣心丸	4 680	161.1 ± 61.9**	1 012.6 ± 348.5	250.7 ± 111.9*

与病毒感染组比较: *P < 0.05 **P < 0.01

*P < 0.05 **P < 0.01 vs virus infected group

2.2.2 对心肌病理结构的影响:给药结束后,取新鲜心肌标本,切片,HE 染色,可见荣心丸和虎杖蒽醌提取物能明显减轻 CoxB₃ 病毒引起的心肌细胞病变,使心肌充血出血、水肿变性及心肌坏死、炎细胞浸润等症状改善,虎杖蒽醌提取物高剂量组优于荣心丸组。

2.2.3 对血清中和抗体及病毒滴度的影响:病毒性

中和抗体检测表明,虎杖蒽醌提取物可以降低小鼠模型抗体的产生,高、中剂量组效价均低于病毒对照

组,也低于荣心丸组(表3、4)。给药 10 d 后,高、中、低剂量组血清病毒滴度明显下降。

表 3 各组小鼠血清 CoxB₃病毒中和抗体的动态变化

Table 3 Dynamic changes of CoxB₃ virus counteracting antibody in mice serum of each groups

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	给药后第 5 天				给药后第 10 天			
		1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
正常对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—
病毒对照	—	++++	+++	++	—	++++	+++	++	+
荣心丸	4 680	++	+	—	—	++	+	+	—
	100	+	—	—	—	+	—	—	—
	50	+	+	—	—	++	+	+	—
	25	++	+	—	—	++	+	—	—

2.2.4 机体干扰素动态观察结果:实验组通过给药,诱导干扰素水平进一步升高,且干扰素水平随着药物剂量的增加而上升,表明虎杖蒽醌提取物具有体内诱导干扰素的作用。小鼠血清干扰素动态变化测试证明了这一机制(表5)。

表 4 各组小鼠血清病毒滴度结果

Table 4 Serum virus titer in each groups of mice

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	lg ^{TCID₅₀}	lg ^{TCID₅₀}
		(给药后第 5 天)	(给药后第 10 天)
病毒感染	—	2.70	2.68
虎杖蒽醌 提取物	100	1.21	—
	50	1.30	—
	25	1.84	1.1

表 5 各组小鼠血清干扰素测定结果

Table 5 Determination of interferon in mice serum of each groups

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	干扰素效价/(U · mL ⁻¹)	
		给药第 5 天	给药第 10 天
正常对照	—	18.12	12.12
病毒对照	—	138.12	89.12
虎杖蒽醌 提取物	100	212.12	96.12
	50	181.12	94.12
	25	159.12	91.12
荣心丸	4 680	189.12	93.12

3 讨论

体内、体外试验结果表明,虎杖蒽醌提取物对CoxB₃型病毒所感染的细胞病变有明显的抑制作用,能够有效抑制CoxB₃型病毒在靶器官中的繁殖;虎杖蒽醌提取物能促进模型小鼠的自身干扰素产生,对病毒的复制具有明显的抑制作用。体内实验结果表明,虎杖蒽醌提取物对CoxB₃型病毒感染的模型小鼠具有一定的保护作用,表明虎杖蒽醌提取物对CoxB₃型病毒引起的病毒性心肌炎具有一定的治疗作用。

实验组通过给药,诱导干扰素水平进一步升高,而且干扰素水平随着药物剂量的增加而上升,表明虎杖蒽醌提取物具有体内诱导干扰素的作用。可以推测这是虎杖蒽醌提取物具有抵抗CoxB₃型病毒感染作用的另一重要机制。

参考文献:

- [1] 薛 岚. 中药虎杖的药理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(11): 651-653.
- [2] 王亚凡. 一种测定细胞增殖和衰减的快速比色分析方法 [J]. 生命的化学, 1994, 14(6): 44-45.
- [3] 新药(西药)临床研究指导原则汇编(药理学 药毒理学) [S]. 1993.

3'-大豆苷元磺酸钠对家兔胸主动脉条收缩的影响

肖 海^{1,2}, 黄志华², 叶和扬², 曾 靖^{2*}

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330006; 2. 赣南医学院, 江西 赣州 341000)

摘 要:目的 研究 3'-大豆苷元磺酸钠(DSS)对家兔胸主动脉条的作用及与Ca²⁺的关系。方法 采用常规动脉条收缩实验方法。结果 DSS可使NE、KCl和CaCl₂引起的家兔胸主动脉条量-效收缩曲线右移,最大效应降低,与

收稿日期:2008-01-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30560173);江西省自然科学基金资助项目(0640003)

作者简介:肖 海(1977—),男,江西萍乡市人,江西中医学院硕士研究生,讲师,主要从事病理学、中草药药理的研究。

Tel: 13576675898 E-mail: xh669168@sina.com

* 通讯作者 曾 靖 E-mail: zengjing61@hotmail.com