

- 腹泻病轮状病毒、腺病毒感染的流行病学研究[J]. 中国小儿急救医学, 2015, 5(8): 574-575.
- [10] AHMET S E, RECEP K E, DURSUN O D. Identification of respiratory viral infection agents by multiplex real-time PCR among children hospitalized for community-acquired pneumonia in Konya province[J]. Türk Hij Den Biyol

• 短篇论著 •

金银花和鱼腥草抑制甲型流感病毒体外复制研究^{*}

朱琳枫, 鲍欣欣, 姚辉, 李海波[△]

(江苏省南通市妇幼保健院检验科, 江苏南通 226018)

摘要: 目的 研究金银花和鱼腥草乙醇提取物对流感病毒复制的抑制作用, 为阐明药用植物有效抗流感物质基础提供科学依据。方法 以流感病毒感染的 MDCK 细胞为模型, 研究金银花和鱼腥草乙醇提取物对流感病毒复制的抑制作用。结果 金银花和鱼腥草乙醇提取物对流感病毒复制有较强的抑制作用, 对 H3N2 和 H1N1 流感病毒的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 (236.28 ± 15.37) 、 (290.50 ± 34.82) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 (428.97 ± 38.54) 、 (522.28 ± 36.48) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 金银花和鱼腥草乙醇提取物对流感病毒的复制有一定的抑制作用。

关键词: 金银花; 鱼腥草; 流感病毒; 筛选

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.030

文章编号: 1673-4130(2018)04-0485-02

甲型流感病毒是最常见的流感病毒, 且最容易发生变异, 感染后的症状主要表现为高热、咳嗽、流涕、肌肉痛等, 可致重症肺炎, 严重者可导致心脏、肾脏等多种脏器衰竭而死亡, 曾多次引发世界性大流行^[1-2]。药物治疗是控制流感病毒传播的最主要手段, 目前各国药品监管部门已批准多种抗流感病毒药物上市, 包括神经氨酸酶抑制剂、M2 离子通道抑制剂等^[3]。但这些抗流感病毒药物的长期使用, 在体内外诱生出大量的耐药毒株, 加上药物本身产生的不良反应, 使抗流感病毒化合物的使用受到一定的限制。因此, 利用传统中医药开发新型抗流感病毒药物具有重要意义^[4-5]。根据文献^[3-5]报道及临床验方, 本研究以流感病毒感染的 MDCK 细胞为模型, 制备金银花和鱼腥草的乙醇提取物, 对其抑制甲型流感病毒的活性进行分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 药用植物及其提取物制备 根据文献^[3-5]报道及临床验方, 选取已证实对流感病毒具有明显直接抑制作用的金银花和鱼腥草为研究对象。上述药用植物购自新疆百草堂大药房, 由新疆药物研究所研究员鉴定。取上述药用植物粉末 50 g, 置 5 L 圆底烧瓶中, 分别以 1 000 mL 的 95% 乙醇和 70% 乙醇各回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩(0.1 Mpa , 50°C), 真空干燥(0.1 Mpa , 45°C , 12 h), 即得药材乙

Derg, 2013, 69(2): 12-15.

- [11] 李林, 查巍, 金载璇, 等. 腹泻患儿粪便中轮状病毒与肠道腺病毒感染结果分析[J]. 临床输血与检验, 2015, 17(3): 212-214.

(收稿日期: 2017-08-10 修回日期: 2017-10-26)

中图法分类号: R373.2/R254.1

文献标识码: B

醇提取物。

1.2 MDCK 细胞 细胞生长液为含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI1640; 细胞维持液除含 2% 胎牛血清外, 其他同细胞生长液。当细胞用于流感病毒试验时, 维持液内含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶, 不含小牛血清, 其他同细胞生长液。

1.3 方法

1.3.1 病毒制备及病毒半数感染量 ($TCID_{50}$) 的测定 调整 MDCK 细胞浓度至 $10^4/\text{mL}$, 每孔 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中, 5% CO_2 , 37°C 培养, 第 2 天加入连续 10 倍稀释的病毒液, 继续培养 48 h 后显微镜下观察细胞病变, Reed-Muench 法计算病毒的 $TCID_{50}$ 。

1.3.2 金银花和鱼腥草乙醇提取物对 MDCK 的毒性 调整 MDCK 细胞浓度至 $10^4/\text{mL}$, 每孔 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中, 5% CO_2 , 37°C 培养, 第 2 天加入用无血清培养基倍比稀释的乙醇提取物, 继续培养 48 h, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL (5 mg/mL), 继续培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 DMSO 200 μL , 振荡混匀, 用酶标仪 560 nm 比色, 计算金银花和鱼腥草乙醇提取物对 MDCK 的半数抑制浓度 (TC_{50})。

1.3.3 金银花和鱼腥草乙醇提取物抑制流感病毒复制作用 取已长成单层的 MDCK 细胞, 吸弃培养液, 接种 100 $TCID_{50}$ 流感病毒液 50 μL , 置 37°C 、5% CO_2

* 基金项目: 南通市应用基础研究项目 (MS12015020)。

△ 通信作者, E-mail: ntlihai2015@163.com。

本文引用格式: 朱琳枫, 鲍欣欣, 姚辉, 等. 金银花和鱼腥草抑制甲型流感病毒体外复制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(4): 485-486.

条件培养吸附1 h后,吸弃病毒液,以不含胎牛血清的维持液洗细胞表面2次。样品取 TC_{50} 以下的5个倍比稀释度加样,每孔100 μ L,置37 °C、5% CO₂条件培养,逐日观察细胞生长情况。当病毒对照组细胞病变时开始记录结果,计算流感病毒的半数抑制浓度(IC_{50})和选择指数(SI)。实验以利巴韦林为阳性对照药。

1.4 统计学处理 采用SPSS20.0软件进行数据处理及统计学分析。各项实验均重复3次以上,然后分别计算各数据平均值及标准差。

表1 金银花和鱼腥草乙醇提取物对甲型流感病毒的抑制作用

样品	TC_{50} (μ g/mL)	H3N2		H1N1	
		IC_{50} ($\bar{x} \pm s$, μ g/mL)	SI	IC_{50} ($\bar{x} \pm s$, μ g/mL)	SI
金银花提取物	>2 000	236.28±15.37	>8.46	290.50±34.82	>6.88
鱼腥草提取物	>2 000	428.97±38.54	>4.66	522.28±36.48	>3.83
利巴韦林	>2 000	52.54±3.48	>38.07	67.35±7.62	>29.69

3 讨 论

药用植物用于抗病毒病有着悠久的历史,在民间流传着抗病毒中药方面的大量古方、偏方及验方,其不良反应少、价格低廉、来源丰富,能从多方面发挥抗病毒作用,具有不可比拟的优势^[5]。从传统药用植物中筛选具有抗病毒活性的单体化合物,也是新型抗病毒化合物研发的有效途径^[6-7]。

药用植物的化学成分复杂,其生理活性具有多样性,主要通过以下途径实现抗流感的作用:(1)抑制流感病毒对宿主细胞的吸附、侵入,达到抑制病毒复制的目的;(2)通过抑制病毒复制中的关键靶点,如神经氨酸酶等,抑制病毒复制;(3)提高机体的免疫功能,通过促进机体的特异性和非特异性免疫功能而达到抑制病毒作用,通过诱导干扰素作用等达到抗病毒的目的^[8-9]。

药用植物的化学成分复杂,往往含有多种成分,如酚类、多糖、生物碱、皂甙、有机酸类、醇类、脂类、油脂、维生素、色素、酮类等^[10]。对抗流感病毒植物的有效部位进行筛选的研究方兴未艾,但由于许多有效成分未能得到纯化,具体作用机制研究尚显欠缺。已有的研究表明,黄酮、多酚、多糖、生物碱类、挥发油、木脂素等对流感病毒具有直接抑制作用^[11]。

随着抗流感药物的广泛使用,药物的耐药性问题日趋严重。结合中药药源丰富、价格低廉且作用靶点多样等优势,遵从中医辨证施治原则,按照“分子中药学”和“方证组方”理论,以抗流感病毒为主攻方向,兼顾“扶正固本”原则,合理组方,在研制高效低毒的抗流感病毒和防治流行性上呼吸道感染药物中,中药及其有效成分展现出更广泛的适应性和优越性,并具有广阔的研究前景。

金银花和鱼腥草均具有清热、解毒、解表、消炎、杀菌等功能,民间一直有用这两种中草药治疗感冒的

2 结 果

2.1 药用植物对MDCK细胞的毒性作用 采用MTT法测定不同药用植物的乙醇提取物对MDCK的毒性,结果表明在实验浓度下,金银花和鱼腥草对MDCK细胞生长几乎无影响($TC_{50}>2 000 \mu$ g/mL)。因此,在后续的抗病毒实验中,均以2 000 μ g/mL为起始浓度,连续倍比稀释后进行抗病毒研究。

2.2 药物植物对流感病毒复制的抑制作用 金银花和鱼腥草的乙醇提取物对流感病毒的复制均有一定的抑制作用。见表1。

记载。本实验对金银花和鱼腥草进行了一个初步的筛选研究,结果表明,金银花和鱼腥草乙醇提取物对流感病毒的复制有一定的抑制作用,后续研究将进行成分分离及活性筛选,以期获得明确的活性组分,并研究其作用机制,为新型抗流感药物的研发奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 林海,路冰,朱占松.流感病毒分子生物学检测技术研究进展[J].疾病监测与控制杂志,2017,11(1):36-37.
- [2] 张锐沐,邓继岗.流感后肺炎的研究进展[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2017,11(2):328-332.
- [3] 孙家英.抗流感病毒神经氨酸酶抑制剂的种类及活性的研究进展[J].广东化工,2015,42(21):90-92.
- [4] 董伟,王艳秋.磷酸奥司他韦预防甲型H1N1流感时引起不良反应206例报道[J].中国临床药学杂志,2011,20(2):111-113.
- [5] 孟晓丹.分析中药药用植物的药用成分与药理作用[J].中国现代药物应用,2016,10(13):276-277.
- [6] 赵凤柱,韩小敏.抗病毒中药及其活性成分研究进展[J].实用中医药杂志,2009,25(6):428-430.
- [7] 沈珑瑛,杨亚军,潘显道.石蒜碱及其衍生物抗病毒研究进展[J].医学研究杂志,2015,44(4):159-162.
- [8] 唐言利.单味中药抗流感病毒研究进展[J].广东职业技术教育与研究,2016,7(5):202-204.
- [9] 王羽依,金叶智,董莹莹,等.黄芩及其成分抗流感病毒感染的实验研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(27):5365-5369.
- [10] 王旭,周洪雷,容蓉.药用植物化学成分研究[J].药用植物,2016,39(9):2031-2033.
- [11] 章倩云,卞倩,刘丹丹,等.抗流感病毒天然化合物体外筛选模型的建立及应用[J].江苏预防医学,27(5):531-533.