

剪夏罗鲜汁及黄酮组分 对体外 I 型单纯疱疹病毒的抑制作用*

杭悦宇 吴菊兰 周义峰 王年鹤

季晓辉

(江苏省植物研究所, 南京 210014)
中国科学院

(南京医科大学基础医学院, 南京 210029)

摘要 在人胚肺纤维母细胞体外培养系统中, 以微量单层细胞病变法观察剪夏罗 (*Lychnis coronata* Thunb.) 鲜汁液及其黄酮组分对体外 I 型单纯疱疹病毒增殖性感染的抑制作用。剪夏罗高浓度鲜汁液 (1:50, 1:20 及 1:10 稀释液) 及其高浓度黄酮组分 I、II (>100 $\mu\text{g/ml}$) 对细胞有明显的毒性作用; 剪夏罗鲜汁液 1:100~1:400 稀释液, 可明显抑制病毒复制, 使病毒诱导的细胞病变明显减轻, 培养液中子代病毒感染滴度明显下降, 且培养上清液中病毒感染滴度与鲜汁液和黄酮组分的浓度呈直线负相关; 剪夏罗鲜汁液和黄酮组分 I、II 在 10 $\mu\text{g/ml}$ ~0.1 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内对病毒诱导的细胞病变有明显的抑制作用。

关键词 剪夏罗; 鲜汁液; 黄酮组分; 疱疹病毒

Inhibition activity of fresh leaf juice and flavone components from *Lychnis coronata* to simple herpes virus I culture *in vitro* Hang Yue-Yu, Wu Ju-Lan, Zhou Yi-Feng, Wang Nian-He (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014) and Ji Xiao-Hui (College of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029), *J. Plant Resour. & Environ.* 1998, 7(4): 24~28

From the HEPEB culture *in vitro*, the result showed that the fresh juice and its flavone component I, II from *Lychnis coronata* Thunb. leaves have the inhibition action on multiplication of HSV-I by the method of single layer of trace cells with pathological changes. It also indicated that the fresh juice of high concentration (1:50, 1:20, 1:10 dilution) and flavone components of high concentration (>100 $\mu\text{g/ml}$) have distinct toxicity to cells. Fresh juice has apparent inhibition on virus reproduction in 1:100~1:400 dilute solution, which sharply decreases the cell pathological changes induced by virus. The infection titre of virus in filial generation is lower in culture liquid and that in upper clear culture liquid has straight line negative relation with the concentration of its preparation. The flavone component I, II in fresh juice of 10 $\mu\text{g/ml}$ ~0.1 $\mu\text{g/ml}$ concentration showed distinct inhibition on cells pathological changes by the induction of virus.

Key words Jianxialuo; *Lychnis coronata* Thunb.; fresh juice; flavone component; zoster virus

* 江苏省科研院所技术储备项目

杭悦宇, 女, 1961年6月生, 硕士, 副研究员, 药用植物研究室副主任, 从事药用植物资源学研究及民间药开发研制。

收稿日期 1998-05-25

疱疹病毒中的单纯疱疹病毒(HSV-I、HSV-II)可致单纯疱疹、生殖器疱疹,水痘带状疱疹病毒(VZV)可致带状疱疹和水痘等疾病,其中生殖器疱疹是常见的一种性传播疾病,每年有500万~2000万人发病^[1]。这两种病毒的主要危害是:(1)在神经系统潜伏感染;(2)极少数可感染中枢神经,引起疱疹病毒性脑炎;(3)在皮疹出现的同时伴有疼痛及疹后神经痛、反射交感性营养不良等。目前在临床上治疗疱疹病毒疾病的常见药物为选择性抗疱疹病毒药物阿昔洛韦(acyclovir)、法昔洛韦(famciclovir)、索利夫定(sorivudine)等,其抗疱疹病毒作用明确,但对疼痛作用不明显。

“回归大自然”使得全世界对传统药用植物的研究越来越重视,从民间、传统及民族药中寻找防治由疱疹病毒引起的疾病经验很多。国外近年来筛选得到了甘草、生姜、白芍、苍术、苦艾等几十种植物提取液具有体外抗HSV-I、HSV-II的作用^[2]。我国也有马齿苋、蒲公英、紫草、甘草、木芙蓉、空心莲子草等具有体外抗HSV-I、HSV-II作用的大量报道^[3]。中药和中成药治疗单纯疱疹和带状疱疹也应用于临床^[4,5]。石竹科植物剪夏罗(又名剪春罗 *Lychnis coronata* Thunb.)在民间用作治疗单纯性疱疹和带状疱疹的鲜植物药^[6]。

随着药物分析新方法、新技术在抗病毒植物活性成分筛选中的广泛应用,从植物中发现的抗HSV有效成分有丁香宁、PCG、没食子醛等,柴胡黄酮、荭草素等黄酮组分抗病毒作用多已在临床应用。但目前国内还没有一个抗疱疹病毒的新药。本文报道剪夏罗的鲜汁及黄酮组分对疱疹病毒HSV-I和对病毒感染滴度的影响,为研制抗病毒新药提供基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

于4月采集南京中山植物园苗圃种植的剪夏罗生长旺盛叶,榨汁,5000 r/min离心10 min,取上清液,一部分备用,一部分上聚丙烯酰胺柱层析,用梯度乙醇洗脱,收集50%、75%乙醇两个洗脱组分(黄酮组分I和黄酮组分II),回收,浓缩,蒸干,备用。

1.2 病毒材料

HSV-I Syn株10株(1997-10-03)。稀释时以细胞培育营养液为溶剂,如稀释为1:100,即病毒0.1 ml加9.9 ml营养液。

1.3 体外细胞培养系统

人胚肺纤维母细胞,用2 ml含有5%的小牛血清的MEM培养基培养(37℃)。

1.4 抑制病毒致细胞病变实验(CPE)

在26孔细胞培养平板中加入人胚肺母细胞悬浮液1 ml(10^7 个细胞/ml),37℃,5% CO₂培养至形成单层细胞。吸出培养液,换含不同浓度的植物鲜汁、黄酮组分I及II的培养液,使植物鲜汁分别稀释10、20、50、100、200、400、800、1600倍,黄酮组分I及II终浓度均分别为10 mg/ml、1 mg/ml、100 μg/ml、10 μg/ml、1 μg/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml。同时加入攻击病毒,感染量为1000或100 TCID₅₀/ml。置37℃、5% CO₂中继续培养,每天观察细胞生长与病变情况。于病毒接种后第5天记录病毒诱导的细胞病变强度。细胞病变强度判定标准为:“-”无细胞病变;“+”细胞病变达1%~25%;“++”细胞病变达26%~50%;“+++”细胞病变达51%~75%;“++++”细胞病变>75%。之后,吸出培养上清液,-80℃

中冻存, 备作病毒滴度测定。每个药物浓度试验重复数(即每组 n 数)不少于 4。

1.5 在人胚肺纤维母细胞上对 HSV- I 感染滴度的影响

在 96 孔细胞培养平板上, 以人胚肺纤维母细胞采用微量单层细胞病变法检测培养上清液中病毒感染滴度。以 TCID₅₀/ml 表示病毒感染滴度。操作方法与计算按 Reed-Muench 常规方法进行^[7]。

2 结 果

2.1 剪夏罗鲜汁对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV- I 诱导细胞病变的抑制作用

1:50 及 1:20、1:10 的稀释液对细胞有明显的毒性作用, 光镜下可见细胞原长纤维状皱缩, 胞浆中出现空泡, 胞浆内颗粒增多, 折光性减弱, 故弃之, 不包括在分析资料内。1:100~1:1 600 的鲜汁稀释液对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV- I 诱导的细胞病变的影响见表 1。

可以看出, 在一定浓度范围内, 剪夏罗鲜汁对 HSV- I 诱导的细胞病变程度有明显的抑制作用, 其中 1:100 和 1:200 稀释液抑制效果最明显, 1:400 稀释液次之, 稀释度增大至 1:800 和 1:1 600 时抑制作用明显减弱, 表现了 CPE 抑制效应对药物浓度的依赖关系。

2.2 剪夏罗鲜汁对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV- I 感染滴度的影响

不同浓度的剪夏罗鲜汁对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV- I 感染滴度的影响见表 2。

表 2 剪夏罗鲜汁对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV- I 感染滴度的影响
Tab 2 The effect of *Lychnis coronata* fresh juice on HSV- I infected titre in human embryonic lung fibroblast culture

接种病毒量 Inoculate amount of virus	植物药浓度 Concentration	培养上清液中病毒滴度 Titre of virus in upper clear culture liquid				平均 ± SD Average ± SD
		1	2	3	4	
100 TCID ₅₀ /ml	1:100	10 ^{-3.75}	10 ⁻³	10 ^{-2.5}	10 ^{-2.75}	10 ^{-3 ± 0.54} *
1 000 TCID ₅₀ /ml	1:100	10 ^{-5.5}	10 ⁻⁵	10 ^{-4.5}	10 ⁻³	10 ^{-4.5 ± 1.08} **
1 000 TCID ₅₀ /ml	1:200	10 ^{-4.25}	10 ^{-4.25}	10 ^{-4.5}	10 ^{-5.75}	10 ^{-4.69 ± 0.72} **
1 000 TCID ₅₀ /ml	1:400	10 ^{-6.25}	10 ^{-6.75}	10 ^{-5.75}	10 ^{-6.75}	10 ^{-6.38 ± 0.48} **
1 000 TCID ₅₀ /ml	1:800	10 ^{-7.75}	10 ^{-8.25}	10 ^{-7.75}	10 ⁻⁷	10 ^{-7.69 ± 0.52}
1 000 TCID ₅₀ /ml	0(病毒对照)Virus control	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ^{-7.5}	10 ^{-8.13 ± 0.63}

* 经 t 检验, 与病毒接种量为 1 000 TCID₅₀/ml 的相同药物剂量相比较, P < 0.05 t test compare with inoculate amount of virus 1 000 TCID₅₀/ml and same dosage of drug, P < 0.05. ** 经 t 检验, 与病毒对照组相比, P < 0.005 t test compare with virus control, P < 0.005.

表 1 剪夏罗鲜汁对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV- I¹⁾ 诱导细胞病变的抑制作用²⁾

Tab 1 The inhibition of *Lychnis coronata* fresh juice to cell pathological changes by HSV- I¹⁾ induction in human embryonic lung fibroblast culture²⁾

植物药浓度 Concentration	病毒所致 CPE 程度分布 ³⁾ Distribution degree of CPE caused by virus ³⁾			合计 Total
	+	++	+++	
1:100	8	0	0	8
1:200	8	0	0	8
1:400	4	4	0	8
1:800	0	8	0	8
1:1 600	0	8	0	8
0(病毒对照)Virus control	0	0	8	8
合计 Total	20	20	8	48

1) 病毒接种量 1 000 TCID₅₀/ml Inoculate amount of virus 1 000 TCID₅₀/ml;

2) X² = 86.4 (V = 6), P < 0.005;

3) +: 细胞病变 1% ~ 25% 1% ~ 25% Pathological changes occurred in cells; ++: 细胞病变 26% ~ 50% 26% ~ 50% Pathological changes occurred in cells; +++: 细胞病变达 51% ~ 75% 51% ~ 75% Pathological changes occurred in cells.

表 2 显示,剪夏罗鲜汁 1:100、1:200、1:400 稀释液均显著抑制细胞培养上清液中的病毒感染滴度;以表 2 资料作直线回归和相关分析,得直线方程 $\hat{Y} = 1.293 + 0.199X$ (Y 为病毒滴度倒数的 \lg , X 为药液稀释倍数的 \lg), 直线相关系数 $r = 0.865$ ($P < 0.001$), 显示药液系数倍数与细胞培养上清液中病毒滴度呈负相关关系,从而证实药物效应与剂量的依赖关系。

2.3 黄酮组分 I、II 对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV-I 诱导的 CPE 的影响

无论是黄酮组分 I 或 II, 在 10 mg/ml、1 mg/ml、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下, 均对细胞有明显的毒性作用, 毒性作用所导致的细胞形态学改变与高浓度鲜汁相似。这 3 个浓度组的数据弃去, 不包括在分析资料内。

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 1 ng/ml 浓度的黄酮组分 I 对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV-I 诱导的 CPE 的影响见表 3, 相同浓度的黄酮组分 II 的结果与组分 I 完全一致, 故不再赘列。

以上结果显示, 在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 100 ng/ml 浓度范围内, 剪夏罗鲜汁黄酮组分具有与鲜汁相类似的抑制 HSV-I 诱导的细胞病变程度的作用, 以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 效应较明显, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 ng/ml 效应较弱。这一结果证实黄酮组分可能是剪夏罗植物鲜汁中抗 HSV-I 的有效成分。

表 3 剪夏罗鲜汁黄酮组分 I 对人胚肺纤维母细胞培养中 HSV-I¹⁾ 诱导的 CPE 的影响²⁾

Tab 3 The effect of flavones from *Lychnis coronata* fresh juice to CPE induced by HSV-I in human embryonic lung fibroblast culture

药物浓度 Concentration	病毒所致 CPE 程度分布 ³⁾ Distribution degree of CPE caused by virus ³⁾			合计 Total
	+	++	+++	
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4	0	
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0	4	0	4
100 ng/ml	0	4	0	4
10 ng/ml	0	0	4	4
1 ng/ml	0	0	4	4
0(病毒对照) Virus control	0	0	4	4
合计 Total	4	8	12	24

1) 病毒接种量 1 000 TCID₅₀/ml Inoculate amount of virus 1 000 TCID₅₀/ml;

2) $\chi^2 = 48$ ($V = 6$), $P < 0.005$;

3) +: 细胞病变 1% ~ 25% 1% ~ 25% Pathological changes occurred in cells; ++: 细胞病变 26% ~ 50% 26% ~ 50% Pathological changes occurred in cells; +++: 细胞病变达 51% ~ 75% 51% ~ 75% Pathological changes occurred in cells.

3 讨 论

剪夏罗在民间用于治疗带状疱疹, 本实验表明剪夏罗的鲜汁在体外细胞培养系统中对疱疹病毒 HSV-I 的繁殖有抑制作用, 这种作用与药物的浓度有关, 有效范围在稀释度 1:100 ~ 1:200 之间。目前国内外药用植物有效成分的研究主要为次生代谢物质的研究, 而剪夏罗等植物在临床使用中均为鲜用, 揭示植物的原生代谢物质如蛋白质、氨基酸等也应该作为一种有效成分来考虑, 葫芦科的天花粉蛋白、苦瓜蛋白已证实对病毒有效, 剪夏罗的鲜汁抗病毒实验也说明了原生代谢物质抗病毒的可能性, 当然还有待于有效组分抗病毒的实验依据。

从西方医学理论来看, 药物抗病毒作用主要影响三个环节: (1) 药物直接作用于病毒颗粒, 使其失去感染性; (2) 药物保护宿主细胞膜受体, 阻止病毒的吸附感染; (3) 药物在细胞内干扰病毒某一复制步骤, 中止病毒核酸和蛋白质合成, 而且强调活性化学成分的作用。就剪夏罗在本实验的抗病毒方式来看, 该植物鲜汁液并不能直接杀死病毒, 而是在不同浓度下使病毒的感染滴度产生不同程度的下降。本实验仅仅是进行了第一种可能性的探讨, 虽然得到了较好的结果, 但是, 还需要其他两种可能性的辅助论证, 才能完整地说明问题。

剪夏罗鲜汁在稀释倍数恰当的情况下, 具有良好的抑制疱疹病毒 HSV-I 的效果, 在这个

总前提下,剪夏罗的主要化学成分是否具有独立的抗病毒能力及怎样的抗病毒机制成了本项目研究方向。剪夏罗的主要化学成分除黄酮外,作者还对提取的皂甙、醇溶性氨基酸进行了体外细胞培养系统的抗病毒实验,结果表明,剪夏罗的总皂甙对正常细胞产生细胞毒性,对病毒感染无抑制作用,而醇溶性氨基酸组分的两种浓度对病毒有轻度抑制作用,同时对正常细胞有轻度毒性。至于剪夏罗其他化学成分如蒽立醇、异野甘草素等,特别是水溶性氨基酸、蛋白质等原生代谢物质(鲜用效果良好)是否也具有抑制病毒的作用,有待后续研究。

参 考 文 献

- 1 叶干运. 性传播疾病. 南京:江苏科学技术出版社,1988. 53~57.
- 2 Korokawa K. 传统中药在体外和体内抗 2 型单纯性疱疹病毒和阿昔洛韦耐药的 1 型单纯性疱疹病毒的作用. 和汉医药学杂志,1995,12(3):187~194.
- 3 杨占秋,程 丽. 空心莲子草在体外对单纯疱疹病毒的抑制作用. 华西药学杂志,1989,4(4):217~220.
- 4 徐丽英. 中药治疗带状疱疹及神经痛的疗效观察. 上海医学,1994,17(4):238~239.
- 5 刘国应. 中成药治疗带状疱疹综述. 中成药,1996,16(3):29~30.
- 6 江苏省植物研究所等编. 新华本草纲要 第三册. 上海:上海科学技术出版社,1990. 46~47.
- 7 戴华生. 新实验病毒学(第一版). 北京:中国学术出版社,1983. 30~35.

(责任编辑:许定发)

欢迎订阅 1999 年《江苏林业科技》

《江苏林业科技》为国内外公开发行的综合性林业科学技术刊物。1974 年创刊。现为全国中文核心期刊、《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊、《中国林业文摘》核心期刊、江苏省优秀期刊。1996 年荣获第二届全国优秀科技期刊三等奖。

《江苏林业科技》主要刊登良种选育、育苗造林、园林绿化、林副特产、森林经营、森林保护、调查设计、林业机械、野生动物等方面的学术论文、科研报告、经验总结,以及林业新成果、新技术,有较强的指导性、技术性、实用性。是林业科研、教学工作者、管理部门及广大林业战线职工不可少的参考资料。欢迎订阅,欢迎投稿。

《江苏林业科技》为季刊,中国刊号:CN 32-1236/S。国际标准刊号:ISSN 1001-7380。可发布广告信息,广告经营许可证号 120352。每期定价 4.00 元,全年订费 16.00 元。现已开始办理 1999 年订阅手续,需订阅者请将订款汇至南京中华门外东善桥江苏省林科所内本刊编辑部,邮编 211153。电话:(025)2740362,2890115,2890290。由银行或邮局汇寄均可。

开户银行:南京市农行秦淮办新街口一分,户名:江苏省林业科学研究所,帐号:033151801000122

《江苏林业科技》编辑部