

空心莲子草抗登革病毒作用的实验研究

蒋文玲, 罗宪玲, 邝素娟 (广东省人民医院医学研究中心, 广东 广州 510080)

摘要:目的 采用中药空心莲子草提取液进行体外抗登革病毒的研究, 寻找新的抗登革病毒药物。方法 利用四甲基偶氮唑盐(MTT)法和细胞病变效应(CPE), 观察检测空心莲子草对 C6/36 传代细胞株的细胞毒性作用和抗登革病毒作用。结果 空心莲子草的 4 种提取物除 >320 $\mu\text{g/ml}$ 组以外, 各浓度组均未见对细胞有明显的毒性作用。用统计软件 SPSS 11.5 的 Probit 回归法计算药物的半数毒性浓度(TD_{50})和半数有效抑制浓度(ED_{50}), 香豆精类提取物对细胞的毒性最小($\text{TD}_{50}=535.91$), 石油醚提取物对病毒的抑制作用大于另 3 种提取物和药物对照($\text{ED}_{50}=47.43$)。结论 空心莲子草在体外有抗登革病毒作用。

关键词:空心莲子草; 登革病毒; 抗病毒作用

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)04-0454-03

Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb against dengue virus *in vitro*

JIANG Wen-ling, LUO Xian-ling, KUANG Su-juan

Medical Research Center of People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510080, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb extracts against dengue virus *in vitro*. **Methods** MTT assay and observation of cytopathic effect (CPE) were carried out to determine the cytotoxicity of *Alternanthera philoxeroides* Griseb on C6/36 cell lines and its effects on dengue virus. **Results** None of the 4 kinds of *Alternanthera philoxeroides* Griseb extracts exhibited obvious cytotoxicity on the cells at different concentrations with the exception of that over 320 $\mu\text{g/ml}$. The 4 extracts all showed inhibitory effects on dengue virus. Statistical analysis of TD_{50} and ED_{50} by Probit regression method suggested that extracts from coumarin had the lowest toxicity on the cells ($\text{TD}_{50}=535.91$), whereas extracts from petroleum ether showed the strongest inhibitory effects on dengue virus ($\text{ED}_{50}=47.43$) among the 4 extracts. **Conclusion** *Alternanthera philoxeroides* Griseb possesses antiviral effects on dengue virus *in vitro*.

Key words: *Alternanthera philoxeroides* Griseb; dengue virus; antiviral effect

空心莲子草 (*Alternanthera Philoxeroides* Griseb) 又名水花生、螃蜞菊、系苋科莲子草属植物, 具清热、凉血、利尿、解毒的作用。临床上用于感染性疾病的治[1]。本研究利用体外细胞培养对空心莲子草抗登革病毒(Dengue virus, DV)的效果进行观察研究, 以确证空心莲草抗 DV 的作用, 为该药用于 DV 的防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药物制备

空心莲子草提取液采用铅盐沉淀法提取, 其分离提取过程及方法详见文献[2]。主要成分为石油醚、乙醚、醋酸乙酯、香豆精类化合物。

1.2 细胞

C6/36 传代细胞(白纹伊蚊纯系细胞株), 传代繁殖用 RPMI 1640 培养基, 含 10% 小牛血清, 常规加入青霉素、链霉素(C6/36 细胞由广州市防疫站提供)。

1.3 病毒

DV-2 标准株(由中山大学医学院提供), 在白纹伊蚊传代细胞(C6/36)株中传代繁殖, 实验用 100TCID₅₀/0.1 ml。

1.4 空心莲子草对 C6/36 细胞的毒性作用

根据 Mosmann^[3]建立的四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测药物对 C6/36 细胞毒性作用。用胰酶将生长良好的 C6/36 细胞分散成单个细胞悬液, 按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 浓度分种于培养板, 置 37 °C 5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。待细胞长成单层后, 弃培养上清, 换含不同浓度的含药维持液, 每种浓度重复 4 孔, 并设正常细胞对照。继续培养 48 h 后, 弃培养液上清, 每孔加入含 5 mg/ml MTT 的不含血清的 MEM 培养基, 置 CO₂ 培养箱中继续培养 2~3 h 后, 弃 MTT 上清, PBS 洗 3 次, 每孔加溶解液(DMSO:乙醇体积比为 1:1), 振荡 5~10 min, 待结晶完全溶解, 测定 570 nm 波长处的 D(λ) 值, 并根据下式计算细胞存活率, 找出药物对细胞的最大无毒浓度范围:

$$\text{细胞存活率}(\%) = [\text{实验孔 } D(\lambda) / \text{对照孔 } D(\lambda)] \times 100\%$$

1.5 空心莲子草对 DV-2 增殖的抑制作用

于已长成单层的 C6/36 细胞培养板上, 每孔接种

收稿日期: 2004-09-11

作者简介: 蒋文玲 (1955-), 女, 副研究员, 电话: 020-83827812-42934, E-mail: jwenling@126.com

100 TCID₅₀ 的 DV-2 病毒液,于 37 °C 吸附 90 min,弃病毒上清。根据细胞毒性实验的结果,在药物无毒浓度范围内,加入不同浓度的含药维持液,然后将 DV-2 培养板置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中,每日观察 CPE。隔天换新鲜含药维持液。实验同时设正常细胞对照组和病毒对照组。

CPE 记录方法为^[3]:- 为无 CPE,+ 为 25% 细胞出现 CPE; ++ 为 50% 细胞出现 CPE; +++ 为 75% 细胞出现 CPE; ++++ 为 100% 细胞出现 CPE。约在病毒对照 +++~++++ 时弃培养液上清,每孔加入含 5 mg/ml MTT 的培养液,继续培养 2~3 h 后洗去 MTT 上清,加 DMSO 溶解液混匀,5~10 min 后,用酶标仪测 570 nm 波长处的 D(λ) 值。并按下述公式计算药物对病毒抑制率。

$$\text{病毒抑制率} = \frac{\text{药物处理组 } D(\lambda)\text{值} - \text{病毒对照组 } D(\lambda)\text{值}}{\text{细胞对照组 } D(\lambda)\text{值} - \text{病毒对照组 } D(\lambda)\text{值}} \times 100\%$$

1.6 空心莲子草对 DV-2 的直接灭活作用

将药物 (160 μg/ml) 与病毒等量混合,37 °C 作用 2 h,接种于长成单层的 C6/36 细胞中,37 °C 吸附 1 h

后加细胞维持液,37 °C 静置培养,根据细胞病变情况判断药物是否对病毒有直接灭活作用。

1.7 统计方法

采用统计软件 SPSS11.5 的 Probit 回归法计算药物的半数毒性浓度 (TD₅₀) 和半数有效抑制浓度 (ED₅₀)。

2 结果

2.1 空心莲子草提取物对 C6/36 细胞的毒性作用实验结果

采用 MTT 法检测空心莲子草提取物对细胞的毒性作用,分 20、40、80、160、320 和 640 μg/ml 5 个药物浓度组。除 >320 μg/ml 组以外,其余各浓度组均未见对细胞明显的毒性作用。细胞无融合、脱落、缩小现象,生长良好,与对照组相比无差异,在 >320 μg/ml 浓度组处理的细胞,72 h 后细胞形态有所改变,颗粒增多,折光性较差,细胞存活率下降。4 种提取物以香豆精类提取物的半数毒性浓度值最大 (TD₅₀=535.91),表明该提取物对细胞的毒性作用最小,见表 1。

表 1 不同浓度空心莲子草提取物对 C6/36 细胞的毒性作用

Tab.1 Cytotoxic effect of *Alternanthera philoxeroides* Griseb extracts at different concentrations on C6/36 cells

Extract	Cell survival rate (%) at different concentrations (μg/ml)						TD ₅₀
	20	40	80	160	320	640	
Petroleum ether	91.4	91.4	85.7	68.6	60.0	25.7	407.99
Ethyl ether	94.3	91.4	88.6	71.4	54.3	37.1	457.66
Ethyl acetate	91.4	94.3	80.0	68.6	60.0	34.3	448.07
Coumarin	97.1	97.1	82.9	77.1	68.6	42.9	535.91

2.2 空心莲子草提取物抗 DV-2 实验结果

对空心莲子草 4 种提取物抗 DV-2 的实验结果显示发现,4 种提取物均对 DV-2 有抑制作用。其中石油醚提取物的半数有效抑制浓度值最小 (ED₅₀=47.43),表明石油醚提取物对 DV-2 的抑制作用大于乙醚、醋

酸乙酯和香豆精类提取物和对照药物病毒唑。且药物浓度增加,病毒抑制率增加,抗病毒作用增强,结果见表 2。空心莲子草对 DV-2 的直接灭活作用结果显示,药物对 DV-2 的直接灭活作用不明显(即未观察到明显的细胞病变)。

表 2 空心莲子草提取物抗对登革热抗毒性作用

Tab.2 Antiviral effects of different *Alternanthera philoxeroides* Griseb extracts on dengue virus

Extract	Cell survival rate (%) at different concentrations (μg/ml)						TD ₅₀
	20	40	80	160	320	640	
Petroleum ether	4.3	17.4	26.1	56.5	69.6	78.3	47.43
Ethyl ether	8.7	26.1	17.4	60.1	56.5	65.2	86.67
Ethyl acetate	4.3	13.0	17.4	43.5	47.8	69.6	97.63
Coumarin	0.0	4.3	13.0	34.8	43.5	69.6	106.06
Control drug (ribavirin)	4.3	13.0	26.1	43.5	56.5	78.3	81.23

3 讨论

登革热是一种重要的人兽共患性病毒病,已有

200 多年的历史,主要在热带、亚热带的 60 个国家和地区流行,尤以东南亚国家最为严重。据报道全世界

每年感染登革热的人数达 1 亿以上,地方性流行区平均每年登革热约为 10%^[4,5]。我国为登革热的新疫区,在南方地区均有大流行。由于 GENV 引起登革热和登革出血热,已成为世界众多国家和地区严重的公共卫生问题^[6]。目前尚无特效的治疗方法,主要采用对症治疗和支持疗法。世界卫生组织对登革疫苗的研究非常重视,但目前还没有安全有效的疫苗,而疫苗也不能治疗已经发生的感染。另一方面,化学合成的抗病毒药物虽有数种,但尚未见有抗登革病毒的作用,并存在毒性较大的问题,因此,寻找安全有效的天然抗 DV 药物已成为当务之急。

中药空心莲子草系苋科莲子草属植物,体内外研究显示,空心莲子草有抑菌和抗病毒的作用。孟茜等^[7]研究表明复方空心莲子草在体外有明显的抗 HSV- II 作用,剂量越大抗病毒作用越明显。申元英等^[8]进行了空心莲子草抗柯萨奇病毒 B3 的实验研究,结果显示空心莲子草在体外有抑制柯萨奇病毒 B3 的作用。肖红等^[9]报道空心莲子草口服治疗乳鼠流行性出血热病毒(EHFV)感染的研究,结果表明经该药治疗的感染鼠体内的 EHFV 抗原表达减少,而未经治疗的感染乳鼠体内的 EHFV 抗原在全病程中都显示出较强的表达。林清华^[10]报道了空心莲子草注射液对 NIH 纯种小鼠免疫功能的影响,认为空心莲子草的抗感染作用与增强机体的细胞免疫功能有关,这都表明空心莲子草有广谱的抗病毒作用。目前国内外均未见该药抗 DV 的作用的报道。本研究结果表明,空心莲子草对细胞的毒性作用低,在体外对 DV 有抑制作用。药物浓度增加,抗 DV 的效果增加。研究结果还显示,空心莲子草提取液不能直接杀灭 DV 使细胞免受病毒的攻击,但它对进入细胞内的病毒有抑制作用,表现在不同浓度下对病毒的抑制率不同(表 2),说明空心莲子草提取液的抗 DV 作用是在

病毒进入细胞后的某个环节产生。作为治疗用药需进一步在动物体内和人体内进行疗效观察,但不宜作为预防用药。上述结果表明,该药可作为抗 DV 感染候选药物。

参考文献:

- [1] 中国药典委员会编. 中华人民共和国药典[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997. 367.
- [2] 杨占秋,刘焱文,朱宝莲,等. 空心莲子草有效部分的分离及抗病毒作用[J]. 中国中药杂志(Chin J Herb), 1989, 14(8): 40-2.
- [3] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55-61.
- [4] Hayes CG, Phillips IA, Callahan JD, et al. The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru [J]. Am J Trop Med Hyg, 1996, 55: 459-63.
- [5] Monath TP. The risk to developed and developing countries from dengue[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 2395-400.
- [6] 杨佩英,秦鄂德. 登革热和登革出血热[M]. 北京:人民军医出版社, 1999. 58-69.
- [7] 孟茜,蒋爱波,刘焱文,等. 复方空心莲子草的抗单纯疱疹病毒[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(12): 33-4.
Meng Q, Jiang AB, Liu YW, et al. Study on anti-HSV-III function of compound *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) griseb [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2002, 9(12): 33-4.
- [8] 申元英,杨占秋,邱雨石,等. 空心莲子草抗柯萨奇病毒 B3 的实验研究[J]. 湖北中医杂志(Hubei Tridit Chin Med), 1999, 21(4): 190-2.
- [9] 肖红,杨占波,文莉. 空心莲子草口服治疗乳鼠流行性出血热病毒感染的研究[J]. 中国病毒学, 1996, 11(4): 348-51.
Xiao H, Yang ZQ, Wen L. Pharmacodynamics studies of *Alternanthera philoxeroides* Griseb in oral for EHFV infection in suckling mice[J]. Virol Sin, 1996, 11(4): 348-51.
- [10] 林清华. 空心莲子草的免疫药理研究 [J]. 中国实验临床免疫学杂志(Chin J Lab Clin Immunol), 1991, 3(3): 39-40.