

山银花水提物体外抗甲型H1N1流感病毒的作用研究^Δ

陈 灵^{1*},周艳萌²,欧水平³,任 丽⁴(1.遵义医学院附属医院药物临床机构,贵州遵义 563000;2.遵义医学院微生物学与免疫实验室,贵州遵义 563006;3.遵义医学院附属医院药剂科,贵州遵义 563000;4.遵义医学院药学院,贵州遵义 563006)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2194-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.09

摘 要 目的:考察山银花水提物(SYHW)体外抗甲型H1N1流感病毒(H1N1病毒)的作用。方法:以H1N1病毒感染体外培养的犬肾小管上皮细胞(MDCK细胞),计算病毒的半数组织培养感染剂量(TCID₅₀);以不同质量浓度SYHW作用MDCK细胞24 h,考察其最大无毒浓度。然后将试验分为正常细胞组、病毒对照组和SYHW预防给药组、治疗给药组和直接杀灭给药组(均给予最大无毒浓度的SYHW,并以100 TCID₅₀ H1N1病毒感染细胞),测定SYHW的抗病毒有效率(ER);将试验分为正常细胞组、病毒对照组和SYHW治疗给药组、直接杀灭给药组(给药及病毒感染方法同上),分别测定细胞增殖指数(PI)和细胞凋亡率的变化。结果:H1N1病毒的100 TCID₅₀为 1.26×10^{-7} ,SYHW对MDCK细胞的最大无毒浓度为50 μg/mL(细胞存活率为91.3%)。SYHW预防给药组、SYHW治疗给药组和SYHW直接杀灭给药组的ER分别为0、80.3%、52.7%。与正常细胞组比较,病毒对照组细胞的PI值显著降低($P < 0.05$),早期、晚期凋亡率显著升高($P < 0.05$);与病毒对照组比较,SYHW直接杀灭给药组细胞的PI值显著升高、早期凋亡率显著降低($P < 0.05$),SYHW治疗给药组细胞的早期凋亡率显著降低($P < 0.05$)。结论:SYHW具有体外抗H1N1病毒的作用,且以治疗给药和直接杀灭给药抗病毒作用较好。

关键词 山银花;水提物;MDCK细胞;甲型H1N1流感病毒;体外

Study on the Anti-influenza A Virus H1N1 Effect of Aqueous Extraction of Lonicerae Flos *in vitro*

CHEN Ling¹, ZHOU Yanmeng², OU Shuiping³, REN Li⁴(1. Drug Clinical Trial Institution of the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563000, China; 2. Microbiology and Immunology Laboratory of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563006, China; 3. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563000, China; 4. School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effect of aqueous extraction of Lonicerae Flos (SYHW) on anti-influenza A virus H1N1 (H1N1 virus) *in vitro*. METHODS: Using Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells cultured *in vitro* by H1N1 virus, half of the tissue culture infection dose (TCID₅₀) was calculated. Culturing MDCK cells for 24 h with different mass concentrations of SYHW, the maximum non-toxic concentration was investigated. And then test was divided into normal cell group, virus control group, SYHW preventive administration group, therapeutic administration group and direct killing group (given SYHW of maximum non-toxic concentration, infecting cells by 100 TCID₅₀ H1N1 virus), and antiviral effective rate (ER) of SYHW was determined. Test was divided into normal cell group, virus control group, SYHW therapeutic group and direct killing group (the same administration and infection as above), changes of cell proliferation index (PI) and cell apoptosis rate were respectively determined. RESULTS: 100 TCID₅₀ of H1N1 virus was 1.26×10^{-7} , and the maximum non-toxic concentration of SYHW on MDCK cells was 50 μg/mL (cell survival rate was 91.3%). ERs of preventive administration group, therapeutic administration group and direct killing group were 0, 80.3% and 52.7%, respectively. Compared with normal cell group, PI value in virus control group was significantly reduced ($P < 0.05$), early and late apoptotic rates were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with virus control group, PI value in directly killing group was significantly increased ($P < 0.05$), and early apoptotic rate was significantly reduced ($P < 0.05$); early apoptotic rates in therapeutic administration group were significantly reduced ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: SYHW shows anti-H1N1 virus effect *in vitro*, therapeutic administration and directly killing are preferred in antiviral effect.

KEYWORDS Lonicerae Flos; Aqueous extraction; MDCK cell; Influenza A virus H1N1; *in vitro*

流行性感冒(简称“流感”)是由流行性感冒病毒引

Δ 基金项目:遵义市科技计划项目(No.遵市科合社字[2011]26号)

*主任药师,硕士生导师。研究方向:药剂学、药事管理学。电话:0851-8608210。E-mail:1551062041@qq.com

起的急性呼吸道传染病,以急起高热、全身酸痛、乏力并伴轻度呼吸道症状为临床特点。在各型流感病毒中,宿主范围最广、对人类健康影响最大的是甲型流感病毒^[1]。目前,治疗流感的化学药主要有抗病毒药阿昔洛韦、更昔洛韦、利巴韦林(病毒唑)等,这类药通常副作用较

多^[2]。山银花为灰毡毛忍冬(*Lonicerae macranthoides* Hand.-Mazz.)、红腺忍冬(*Lonicera hypoglauca* Miq.)、华南忍冬(*Lonicera confusa* DC.)或黄褐毛忍冬(*Lonicerae fuluotomentosa* Hsu et S.C.Cheng)的干燥花蕾或带初开的花^[3],具有抗炎、抗菌^[4]、抗病毒、抗氧化^[5]、抗动脉粥样硬化^[6]等作用,其因清热解毒、凉散风热之功效而被临床应用广泛。有研究表明,山银花中酚酸类成分及绿原酸类提取物具有抗病毒活性^[7-9],咖啡酰奎宁酸类化合物具有抗呼吸道病毒感染作用^[10],黄酮提取物具有体外抗伪狂犬病毒的作用^[11]。目前,尚未见山银花体外抗甲型H1N1流感病毒(简称“H1N1病毒”)作用的研究报道,故本研究拟对山银花水提物(简称“SYHW”)的体外抗H1N1病毒的作用进行研究,为其抗病毒应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BX43倒置显微镜(日本Olympus公司);CFM-300E荧光显微镜(上海万衡精密仪器有限公司);Multi-skan-FC酶标仪(美国Thermo公司);TDZ4-WS低速离心机(上海卢湘离心机仪器有限公司);Gallios流式细胞仪(美国Beckman公司)。

1.2 药材与试剂

山银花采摘于贵州省绥阳县,经遵义医学院生药学教研室主任杨建文教授鉴定为灰毡毛忍冬(*Lonicerae macranthoides* Hard.-Mazz.)的干燥花蕾;RPMI 1640培养基(上海立菲生物技术有限公司,批号:AAK208935);胰蛋白酶、MTT、Annexin V细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:1030E042、1028D051、2015D420)。

1.3 细胞和病毒

犬肾小管上皮细胞(MDCK细胞)、H1N1病毒及9~10日龄鸡胚均由遵义医学院微生物与免疫学教研室提供。

2 方法

2.1 SYHW的制备

称取山银花500g,加10倍量水煎煮1.5h,过滤;滤渣加8倍量水煎煮1h,过滤;合并2次滤液,浓缩至500mL,得质量浓度为1g/mL(以生药计)的SYHW。

2.2 H1N1病毒的传代增殖

选择9~10日龄健康鸡胚,将0.2mL H1N1病毒液注入尿囊腔内,48h后,收集尿囊液。按照文献[12]中方法,将H1N1病毒液进行倍比稀释,测得其凝血效价为1:1280。

2.3 H1N1病毒对MDCK细胞的毒性作用测定

将生长旺盛的MDCK细胞消化成单个细胞悬液,按 2×10^4 个/孔接种于96孔板中,每孔100 μ L,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养24h。待细胞长满单层后,弃上清,然后将凝血效价为1:1280的病毒液用维持液2(含0.02%胰酶的RPMI 1640培养基)倍比稀释 $10 \sim 10^{10}$ 倍后分别

加入培养孔中,每个浓度重复10孔,每孔100 μ L;同时设正常对照组(不加病毒,只加维持液2)。放入培养箱中感染1.5h后,小心吸弃各孔病毒液,换用维持液1(含2%胎牛血清的RPMI 1640培养基)继续培养72h。倒置显微镜下观察细胞病变情况,并记录病变程度及孔数,计算被感染细胞比例,根据Karber公式计算病毒的半数组织培养感染剂量(TCID₅₀),以病毒的100TCID₅₀来进行后续研究。

2.4 SYHW对MDCK细胞的毒性作用测定

将生长旺盛的MDCK细胞消化成单个细胞悬液后,按 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,每孔100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养24h。弃上清,加入质量浓度分别为6.25、12.5、25、50、100、200、400、800、1600 μ g/mL的SYHW,每个质量浓度重复10孔,每孔100 μ L;并设置正常细胞组(不加药物)。继续培养24h后,弃上清,每孔加2滴维持液1和10 μ L MTT溶液,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中继续培养4h。弃上清,每孔加入150 μ L二甲基亚砷(DMSO),振荡均匀后,在酶标仪上(测定波长为492nm)测定各孔的光密度(OD)值,计算细胞存活率^[13]:细胞存活率(%)=给药组平均OD值/正常细胞组平均OD值 $\times 100\%$,找出SYHW的最大无毒浓度。

2.5 SYHW体外抗H1N1病毒作用测定

将生长旺盛的MDCK细胞消化成单个细胞悬液后,按 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养24h后,将试验分为正常细胞组、病毒对照组和SYHW的预防给药、治疗给药、直接杀灭给药组,每组均重复6孔,再设1个空白孔。正常细胞组(每个给药组均平行设置):不用病毒进行感染也不加入药物。病毒对照组(每个给药组均平行设置):加入100TCID₅₀的H1N1病毒液(100 μ L/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。SYHW预防给药组:先将最大无毒浓度的SYHW加入培养孔中(100 μ L/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养24h后弃去培养液;然后再加入100TCID₅₀的H1N1病毒液(100 μ L/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中感染1.5h;然后再换为相应质量浓度的SYHW,培养至病毒对照组MDCK细胞出现最大程度病变为止^[12-13]。SYHW治疗给药组:先将100TCID₅₀的病毒液加入细胞培养孔中(100 μ L/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中感染1.5h后弃去病毒液;然后再加入最大无毒浓度SYHW(100 μ L/孔),继续培养至病毒对照组MDCK细胞出现最大程度病变为止。SYHW直接杀灭给药组:先将最大无毒浓度SYHW与100TCID₅₀ H1N1病毒液按1:1混合后加入培养孔中(100 μ L/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养1.5h,弃去混合液;然后加入维持液1继续培养至病毒对照组MDCK细胞出现最大程度病变为止。采用MTT法测定各孔OD值(测定波长为492nm),计算SYHW的抗病毒有效率(ER)^[14]:ER(%)=(给药组平均OD值-病毒对

照组平均OD值)/(正常细胞组平均OD值-病毒对照组平均OD值)×100%。

2.6 SYHW对H1N1病毒感染MDCK细胞周期的影响

将生长旺盛的MDCK细胞按 1×10^4 个/孔接种于6孔板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜,分别设置正常细胞组、病毒对照组和SYHW的治疗给药、直接杀灭给药组,每个浓度重复3孔,处理方法同“2.5”项。培养结束后收集上清液,用胰酶(未加乙二胺四乙酸)消化细胞。将细胞悬液及上清液混合,离心,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,然后将细胞滴入70%冷乙醇中固定,-20℃冰箱保存备检。检测前取出样品离心,用冷PBS洗涤3次后,按照 1×10^6 个细胞加1 mL碘化丙啶(PI)染液,避光染色至少30 min,流式细胞仪上机检测。用Mcycle软件检测细胞周期分布,计算细胞增殖指数(PI, %):S期和G₂/M期细胞数占细胞总数的百分比。

2.7 SYHW对H1N1病毒感染MDCK细胞凋亡的影响

将生长旺盛的MDCK细胞按 1×10^4 个/孔接种于6孔板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜,按照“2.6”项下分组、给药。结束培养后收集上清液,并用胰酶(未加乙二胺四乙酸)消化细胞,将细胞悬液及上清液混合,离心,PBS洗2次,根据Annexin V细胞凋亡检测试剂盒操作,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

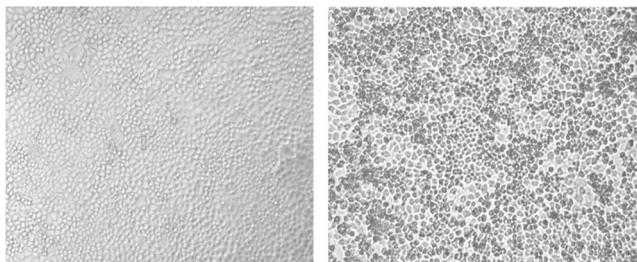
2.8 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 H1N1病毒对MDCK细胞的毒性作用测定结果

H1N1病毒感染MDCK细胞后细胞出现皱缩、变圆、壁增厚、脱落以及折光性增强等细胞病变现象,根据Karber公式计算病毒的TCID₅₀为 1.26×10^{-9} ,100 TCID₅₀为 1.26×10^{-7} 。MDCK细胞感染H1N1病毒后细胞形态的变化见图1。



A.正常细胞

B.感染H1N1病毒后细胞

图1 MDCK细胞感染H1N1病毒后细胞形态的变化
Fig 1 Cell morphology changes of MDCK cells after infected by H1N1 virus

3.2 SYHW对MDCK细胞的毒性作用测定结果

当SYHW质量浓度 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 时,SYHW组的OD值与正常细胞组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),

表明当SYHW质量浓度 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 时对细胞有明显毒性。故其最大无毒浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$,此时细胞存活率为91.3%,结果详见表1。

表1 SYHW对MDCK细胞的毒性作用测定结果($n = 10$)

Tab 1 Determination results of toxic effect of SYHW on MDCK cells ($n = 10$)

组别	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	OD值($\bar{x} \pm s$)	细胞存活率, %
SYHW组	6.25	0.686 ± 0.051	99.5
	12.5	0.670 ± 0.057	97.1
	25	0.669 ± 0.037	96.9
	50	0.630 ± 0.055	91.3
	100	0.618 ± 0.017*	91.0
	200	0.577 ± 0.028*	83.6
	400	0.411 ± 0.064*	59.6
	800	0.113 ± 0.026*	16.4
1 600	0.123 ± 0.014*	17.9	
正常细胞组	0	0.690 ± 0.027	100.0

注:与正常细胞组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. normal cell group, * $P < 0.05$

3.3 SYHW抗H1N1病毒作用测定结果

病毒对照组OD值较正常细胞组OD值显著降低($P < 0.05$);SYHW治疗给药后细胞OD值显著升高($P < 0.05$),SYHW治疗给药组、直接杀灭给药组ER分别为80.3%、52.7%,SYHW对H1N1病毒感染无预防作用,结果详见表2。

表2 SYHW抗H1N1病毒作用测定结果($n = 6$)

Tab 2 Determination results of anti-H1N1 virus effect of SYHW ($n = 6$)

组别	用药组OD值($\bar{x} \pm s$)	病毒对照组OD值($\bar{x} \pm s$)	正常细胞组OD值($\bar{x} \pm s$)	ER, %
SYHW预防给药组	2.065 ± 0.033	2.161 ± 0.083*	2.357 ± 0.011	0
SYHW治疗给药组	2.215 ± 0.001*	2.067 ± 0.061*	2.251 ± 0.084	80.3
SYHW直接杀灭给药组	2.157 ± 0.185	2.033 ± 0.138*	2.269 ± 0.086	52.7

注:与正常细胞组比较,* $P < 0.05$;与病毒对照组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. normal cell group, * $P < 0.05$; vs. virus control group, * $P < 0.05$

3.4 SYHW对H1N1病毒感染MDCK细胞周期的影响情况

与正常细胞组比较,病毒对照组细胞PI值显著降低($P < 0.05$);与病毒对照组比较,SYHW直接杀灭给药组细胞PI值显著升高($P < 0.05$),结果详见表3。

3.5 SYHW对H1N1病毒感染MDCK细胞凋亡的影响情况

与正常细胞组比较,病毒对照组细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率均显著升高($P < 0.05$)。与病毒对照组比较,SYHW治疗给药组细胞的早期凋亡率显著降低($P < 0.05$),然而晚期凋亡率继续升高($P < 0.05$);SYHW直接杀灭给药组细胞的早期凋亡率显著降低($P < 0.05$),晚期凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$),结果详见表4。

表3 SYHW对H1N1病毒感染MDCK细胞周期的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of SYHW on cell cycle of MDCK cells after infected by H1N1 virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	细胞比例, %			PI, %
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
正常细胞组	0	39.00 ± 3.00	28.44 ± 3.06	32.41 ± 3.01	60.85 ± 0.03
病毒对照组	0	60.95 ± 2.51	30.57 ± 5.38	8.50 ± 5.69	39.07 ± 0.03*
SYHW治疗给药组	50	54.24 ± 3.07	18.66 ± 6.61	27.11 ± 4.52	45.77 ± 0.03
SYHW直接杀灭给药组	50	49.41 ± 1.83	30.23 ± 0.66	20.37 ± 1.30	50.60 ± 0.02*

注:与正常细胞组比较, * $P < 0.05$;与病毒对照组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. normal cell group, * $P < 0.05$; vs. virus control group,

$P < 0.05$

表4 SYHW对H1N1病毒感染MDCK细胞凋亡的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of SYHW on apoptosis of MDCK cells after infected by H1N1 virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	早期凋亡率, %	晚期凋亡率, %
正常细胞组	0	6.73 ± 1.24	0.23 ± 0.15
病毒对照组	0	41.70 ± 2.21*	0.30 ± 0.26*
SYHW治疗给药组	50	17.37 ± 2.37#	4.30 ± 0.17#
SYHW直接杀灭给药组	50	27.80 ± 6.04#	1.90 ± 2.90

注:与正常细胞组比较, * $P < 0.05$;与病毒对照组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. normal cell group, * $P < 0.05$; vs. virus control group,

$P < 0.05$

4 讨论

依据2015年版《中国药典》(一部)规定,山银花临床用量为6~15 g^[3],以人体平均体液50 L计算,得到临床实际用药浓度。以此为参考,设置系列等比浓度筛选SYHW最大无毒浓度进行试验。结果显示,细胞耐受的最大无毒浓度(50 $\mu\text{g/mL}$)远低于人体耐受的最大无毒浓度(300 $\mu\text{g/mL}$)。本研究采用3种给药方式考察SYHW的体外抗病毒作用,其中直接杀灭给药组设置的目的是确定SYHW直接作用于H1N1病毒后是否具有抑制作用,同时设置SYHW预防给药组和SYHW治疗给药组进一步明确SYHW抗H1N1病毒的作用是在细胞内还是细胞外。

抗病毒试验结果显示,SYHW具有直接抑制H1N1病毒活性的作用(ER=52.7%),且SYHW治疗给药组ER较病毒对照组显著降低,这提示SYHW在细胞内抗H1N1病毒疗效较好,预示其可能对H1N1病毒有一定的治疗作用,而无预防作用。故在细胞周期及细胞凋亡试验中也只采用SYHW治疗给药和直接杀灭给药两种给药方式进行试验。结果显示,H1N1病毒感染MDCK细胞后将细胞阻滞于G₀/G₁期,阻碍细胞正常生长,且会引起细胞早期凋亡。SYHW作用于被H1N1病毒感染的

MDCK细胞后,可逆转流感病毒引起的G₀/G₁期细胞阻滞,促进已被H1N1病毒感染的MDCK细胞进入S期,从而促进细胞有丝分裂,提高PI值。

综上所述,SYHW具有体外抗H1N1病毒的作用,且以治疗给药和直接杀灭给药抗病毒作用较好。但山银花化学成分较多,其发挥抗病毒作用的有效成分及作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 邢晓会,王大燕,舒跃龙.流行性感病毒耐药性检测方法研究进展[J].中华预防医学杂志,2013,47(5):463-465.
- [2] 陈新谦,金有豫,汤光,等.新编药理学[M].18版.北京:人民卫生出版社,2011:123-127.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:30-31.
- [4] 李莉,李燕君,王森弘,等.灰毡毛忍冬花蕾抑菌及抗炎作用研究[J].食品工业科技,2013,34(23):65-69.
- [5] 徐望龙,李云贵,孙林军,等.山银花黄酮粗提物抗氧化活性的体外观察[J].中成药,2014,36(6):1292-1294.
- [6] 李荣,周玉生,匡双玉,等.山银花提取物抗动脉粥样硬化成分研究[J].中国现代应用药学,2011,28(2):92-95.
- [7] 刘文娟,陈雨,马鑫,等.灰毡毛忍冬化学成分研究进展[J].中国野生植物资源,2013,32(1):6-10.
- [8] 王林青,张红英,崔保安,等.金银花、山银花绿原酸类提取物体外抗NDV作用研究[J].中国农学通报,2011,27(19):277-282.
- [9] 欧水平,张文志,陈灵.金银花与山银花抗病毒酚酸类和黄酮类成分的差异性研究[J].中国药房,2015,26(33):4750-4752.
- [10] 马双成,毕培曦,黄荣春,等.金银花药材中抗呼吸道感染咖啡酰奎宁酸类成分的定量研究[J].药物分析杂志,2005,25(7):751-755.
- [11] 王林青,崔保安,张红英.金银花、山银花黄酮类提取物体外抗伪狂犬病毒作用研究[J].中国畜牧兽医,2011,38(3):183-188.
- [12] 周艳萌,江吉富.医学微生物学实验教程[M].西安:第四军医大学出版社,2014:43-44.
- [13] 王欢,张能英,孙兴泽,等.八角茴香及其提取物莽草酸抗甲型流感病毒的体外研究[J].遵义医学院学报,2013,36(6):503-506.
- [14] 莫红缨,柯昌文,郑劲平,等.连花清瘟胶囊体外抗甲型流感病毒的实验研究[J].中药新药与临床药理,2007,18(1):5-9.

(收稿日期:2016-09-09 修回日期:2017-04-17)

(编辑:林静)