

抗甲型流感病毒中药活性成分的提取

丁航, 罗芬, 陈潇楷, 马卫列, 张志珍* (广东医科大学生物化学与分子生物学教研室, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 提取中草药中具有抗甲型流感病毒活性的成分。**方法** 采用水提和醇提的方法对15种中草药进行提取, 细胞培养法观察提取物的细胞毒性, 反向遗传8质粒病毒系统制备甲型流感病毒, 感染MDCK细胞(Madin-Darby canine kidney cells), 观察提取物的抗病毒活性。**结果** 根据药物提取方案获得了14种水提物和15种醇提物。与对照组细胞相比, MDCK细胞出现细胞病变。除贝母水提物的最大无毒质量浓度范围为20.00~100.00 g/L, 其他大部分水提物的最大无毒质量浓度小于20.00 g/L。除鱼腥草和防风醇提物外, 其他醇提物的最大无毒质量浓度小于4.00 g/L, 测得的29种提取物中有7种提取物有抗病毒活性, 分别是儿茶水提物、穿心莲水提物、金银花水提物、黄连醇提物、儿茶醇提物、穿心莲醇提物和厚朴醇提物。**结论** 依据文中提取方案, 15种中草药共获得7种具有抗甲型流感病毒的活性成分。

关键词: 中草药; 水提物; 醇提物; 抗甲型流感病毒活性

中图分类号: R 282.71; R 373.1^{†3}

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)06-0664-04

Extraction of active ingredients against influenza A virus from traditional Chinese herbs

DING Hang, LUO Fen, CHEN Xiao-kai, MA Wei-lie, ZHANG Zhi-zhen* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To extract active ingredients against influenza A virus from traditional Chinese herbs. **Methods** Aqueous extraction and alcohol extraction were used to extract 15 traditional Chinese herbs. The cytotoxicity of the extracts was observed with cell culture method. 8-plasmid reverse genetic system was used to prepare influenza A virus, Madin-Darby canine kidney cells (MDCK cells) were infected, and the antiviral activity of the extracts was observed. **Results** A total of 14 kinds of aqueous extracts and 15 kinds of alcohol extracts were obtained according to the drug extraction protocol. Compared with the cells in the Control Group, MDCK cells had cytopathic effect (CPE). The maximum range of non-toxic concentrations of fritillaria aqueous extracts was 20.00-100.00 g/L while that of most of other aqueous extracts was less than 20.00 g/L. Except for cordate houttuynia and saposhnikovia radix alcohol extracts, other alcohol extracts had the maximum range of non-toxic concentrations of less than 4.00 g/L. Among 29 kinds of extracts, 7 showed antiviral activity, namely, acacia catechu aqueous extracts, herba andrographitis aqueous extracts, honeysuckle aqueous extracts, coptis chinensis alcohol extracts, acacia catechu alcohol extracts, herba andrographitis alcohol extracts, and mangnolia officinalis alcohol extracts. **Conclusion** 7 kinds of active ingredients with anti-influenza A virus activity are obtained from 15 traditional Chinese herbs according to the extraction protocol mentioned in the paper.

Key words: traditional Chinese herbs; aqueous extracts; alcohol extracts; anti-influenza A virus activity

流行性感冒(流感)是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病, 它以传播速度快、发病率高, 并伴

随严重并发症而成为严重威胁人类健康的疾病。流感防治主要依靠疫苗和抗病毒药物, 现有的疫苗容易受到病毒重组变异和抗原漂移的影响, 而新疫苗的研发又需要较长时间^[1]。目前临床上使用的针对病毒M2蛋白的离子通道抑制剂金刚烷胺、金刚烷乙胺, 以及针对病毒NA的抑制剂奥司他韦、扎那米韦、佩拉米韦等, 易产生耐药性, 且具有一定的毒副作用^[2-5]。因此, 抗病毒药物的研制对流感的防治尤为重要。中草药治疗流感具有药源丰富、毒副作用小、作用靶点多等优点^[6]。我们前期已对黄连的

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金自然科学基金项目(No.2020A1515010224), 广东省医学科研基金(No.A2018520), 广东省中医药局中医药科研项目(No.20191188)

收稿日期: 2020-05-14; **修订日期:** 2020-08-10

作者简介: 丁航(1968-), 女, 本科, 高级实验师

通信作者: 张志珍(1967-), 女, 博士, 教授, E-mail: zzzhang@gdmu.edu.cn

水溶性物质进行了提取,初步分析发现黄连水提取物具有较强的抗流感病毒活性^[7]。本实验进一步从不同中草药中通过水提和醇提的方式筛选具有抗甲型流感病毒活性的中药组分,为开发新的抗流感病毒药物提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

15种中草药(黄连、儿茶、羌活、厚朴、穿心莲、贝母、金银花、甘草、鱼腥草、鸡血藤、桂枝、赤芍、防风、荆子、栀子)购自东莞国药。MDCK细胞、293T细胞、甲型流感病毒反向遗传8质粒病毒系统、pcDNA3.1质粒、pHH-Gluc质粒由本室保存。DMEM高糖培养基和牛血清(FBS)购自Gibco公司;转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司;荧光素酶活性测定底物购自Promega公司;其他试剂均为国产分析纯。CCK-8试剂盒购自Dojindo公司。

1.2 方法

1.2.1 中草药水溶性物质的提取 将儿茶、羌活、厚朴、穿心莲、贝母、金银花、甘草、鱼腥草、鸡血藤、桂枝、赤芍、防风、荆子、栀子14种中草药粉碎,分别称取25 g置于烧杯中,加入500 mL超纯水,60 ℃水浴中浸泡24 h。转入回流装置,90 ℃回流提取2 h,收集滤液,滤渣再次回流提取2 h。合并两次滤液,转入旋转蒸发仪将药液浓缩。浓缩液用80%的醇溶液进行醇沉,3 000 r/min离心10 min,减压抽滤,滤液旋转蒸发浓缩。浓缩液3 000 r/min离心10 min,取上清液用0.22 μm滤膜过滤,-20 ℃保存备用。

1.2.2 中草药醇溶性物质的提取 将黄连、儿茶、羌活、厚朴、穿心莲、贝母、金银花、甘草、鱼腥草、鸡血藤、桂枝、赤芍、防风、荆子、栀子粉碎,分别称取30 g于圆底烧瓶中,加500 mL 95%乙醇,浸泡2 h。装入回流装置,80 ℃回流提取2 h,收集滤液,滤渣再次回流提取2 h。合并两次滤液,转入旋转蒸发仪进行浓缩。将浓缩的药液倒入蒸发皿中,于37 ℃烘箱中蒸干,然后加二甲基亚砜(DMSO)使浸膏完全溶解,用0.22 μm滤膜过滤,-20 ℃保存备用。

1.2.3 水提取和醇提物的毒性 MDCK细胞用含10% FBS DMEM高糖培养基培养于10 cm细胞培养皿中,37 ℃、5% CO₂培养箱培养,2~3 d传代1次。传代时加入1.5 mL含乙二胺四乙酸(EDTA)的0.25%胰酶溶液,消化约3 min,传约3代后可用于实

验。将细胞接种24孔板,1.5×10⁴个细胞/孔,培养24 h后加药。实验分药物组和对照组:药物组加入不同质量浓度的水提物和醇提物,每种提取物分别选择7个质量浓度,每个质量浓度3个复孔;对照组加入含2% FBS的DMEM维持培养基,设置3个复孔。每隔24 h显微镜下观察细胞病变(CPE)。MDCK细胞出现CPE时,细胞内颗粒增多,细胞变圆,并出现脱落。与对照组相比,药物组在镜下未出现CPE即为无毒质量浓度。细胞连续观察96 h,确定水提取和醇提物对细胞的最大无毒质量浓度范围(即细胞出现CPE的最低质量浓度与下一个质量浓度之间的范围)。

1.2.4 制备甲型流感病毒 293T细胞用含10% (体积分数)FBS DMEM高糖培养基培养于10 cm细胞培养皿中,37 ℃、5% CO₂培养箱培养,2~3 d传代1次。首先消化293T细胞,6×10⁵个/mL,再消化MDCK细胞,2×10⁵个/mL,二者混匀后接种6孔板,每孔1 mL,培养24 h后进行转染。实验分转染组和对照组:转染组用Lipofectamine™ 2000共转染甲型流感病毒反向遗传8质粒,每个质粒用量为500 ng,质粒总量为4 μg,对照组转染pcDNA3.1质粒,质粒总量为4 μg。按照Lipofectamine™ 2000使用说明书进行转染。转染6 h后,每孔更换为2 mL完全DMEM培养基。转染24 h后加入胰酶,每孔20 μL。36 h后收病毒,3 000 r/min离心10 min,收集上清,分装1.5 mL EP管,-80 ℃保存。按照常规方法测定病毒的毒力,即半数细胞培养物感染量(TCID₅₀)值。

1.2.5 水提取和醇提物的抗病毒活性 MDCK细胞接种24孔板,1.5×10⁴个细胞/孔,DMEM完全培养基培养24 h进行实验。先配制100 TCID₅₀的病毒稀释:上述方法制备的甲型流感病毒原液的TCID₅₀为10^{-4.6},取病毒原液5 μL+1.995 mL病毒维持培养基(含0.1%的0.25%胰酶的空白DMEM培养基),混匀,即得100TCID₅₀的病毒液。实验分药物组、病毒处理组和细胞对照组,每种处理设3个复孔。药物组:吸出24孔板中的培养基,用空白培养基洗细胞1次,加入不同质量浓度用细胞维持液配制的水提取和醇提物0.5 mL,每种提取物在最大质量无毒浓度范围之间以等距进行稀释,选择5个质量浓度梯度,药物作用3 h,吸出药液,用空白培养基洗细胞1次,每孔加入100 TCID₅₀的病毒液0.5 mL,使病毒吸附3 h,吸出病毒液,用空白培养基洗细胞1次,再加入相应质量浓度的药液继续培养;病毒处理组:吸出24孔板中的培养基,用空白培养基洗细胞1次,加入100 TCID₅₀

的病毒液0.5 mL,使病毒吸附3 h,然后吸出病毒液,用空白培养基洗细胞1次,加入2% FBS的DMEM维持培养基0.5 mL继续培养;细胞对照组:用2% FBS的DMEM维持培养基培养。每隔12 h观察1次,记录细胞生长状况。

2 结果

2.1 中草药的水提和醇提

根据药物提取方案,得到14种水提物和15种醇提物。每种提取物的生药含量和最终得到的体积见表1。

表1 不同中草药提取物的生药含量和体积

中草药	水提物		醇提物	
	质量浓度/	体积/	质量浓度/	体积/
	(g/L)	mL	(g/L)	mL
黄连*	—	—	1 000	30
儿茶	1 500	17	2 000	15
羌活	1 500	17	2 000	15
厚朴	2 500	10	2 000	15
穿心莲	1 000	25	2 000	15
贝母	1 000	25	2 000	15
金银花	1 000	25	2 500	12
甘草	1 000	25	1 000	30
鱼腥草	1 000	25	1 000	30
鸡血藤	1 000	25	1 500	20
桂枝	1 000	25	2 000	15
赤芍	500	50	1 500	20
防风	1 500	17	1 000	30
荆子	1 500	17	2 000	15
栀子	1 000	20	1 500	20

*前期已对黄连的水溶性物质进行了提取

2.2 不同水提物和醇提物的细胞毒性分析

与对照组细胞相比,当药物出现细胞毒性时,MDCK细胞出现CPE(见图1B)。通过CPE观察,不同提取物的最大无毒质量浓度范围见表2。除贝母水提物的最大无毒质量浓度范围为20.00~100.00 g/L,其

他大部分水提物的最大无毒质量浓度小于20.00 g/L。除鱼腥草和防风醇提物外,其他醇提物的最大无毒质量浓度小于4.00 g/L。

表2 不同水提物和醇提物的最大无毒质量浓度范围

中草药	最大无毒质量浓度范围	
	水提物/(g/L)	醇提物/(g/L)
黄连	—	0.40~2.00
儿茶	3.00~15.00	0.80~4.00
羌活	3.00~15.00	0.03~0.16
厚朴	5.00~25.00	0.16~0.80
穿心莲	4.00~20.00	0.80~4.00
贝母	20.00~100.00	0.16~0.80
金银花	0.80~4.00	0.16~0.80
甘草	2.00~10.00	0.02~0.08
鱼腥草	2.00~10.00	2.00~10.00
鸡血藤	0.40~2.00	0.15~0.75
桂枝	0.40~2.00	0.16~0.80
赤芍	0.10~0.50	0.12~0.60
防风	15.00~75.00	4.00~20.00
荆子	3.00~15.00	0.80~4.00
栀子	2.00~10.00	0.60~3.00

2.3 不同水提物和醇提物的抗流感病毒活性分析

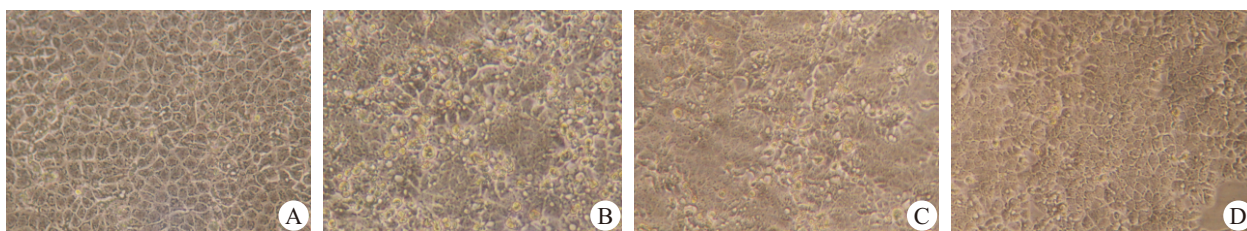
显微镜下观察CPE,结果发现有7种提取物具有抗流感病毒活性,其质量浓度范围见表3。以黄连醇提物为例,与病毒感染的细胞相比,0.80 g/L醇提取物作用的细胞,部分处于贴壁状态,细胞形态基本正常;1.20 g/L醇提取物作用的细胞,大片处于贴壁状态,细胞内颗粒较少,CPE程度轻,见图1。

3 讨论

药物提取是研究中草药的生物活性及其活性成分分析的第一步。本实验应用回流提取法成功获取15种中草药的水溶性物质和醇溶性物质。由于中草药的活性成分如碱类、苷类、酮类、糖类大多都属于细胞内容物,被坚硬的细胞壁包裹,导致这些成分不易被提取出来^[8]。为了提高提取效率,本实验

表3 7种提取物的抗病毒活性质量浓度范围

醇提物	抗病毒活性质量浓度范围/(g/L)	水提物	抗病毒活性质量浓度范围/(g/L)
黄连醇提物	0.80~1.20	金银花水提物	2.40~3.20
儿茶醇提物	3.20~4.00	儿茶水提物	6.00~12.00
穿心莲醇提物	3.20~4.00	穿心莲水提物	8.00~16.00
厚朴醇提物	0.48~0.64		



A: 正常细胞对照; B: 病毒感染的细胞; C: 0.80 g/L醇提取物作用的细胞; D: 1.20 g/L醇提取物作用的细胞

图1 不同质量浓度醇提取物对病毒感染细胞的CPE(100×)

在提取之前先将药材低温烘干,并粉碎成粗粉,这样既提高了难溶性药物的溶出速度,又有利于有效成分的浸出。

利用体外细胞培养法研究药物的作用,通过观察各种药物及其不同剂量对细胞生长的影响,能从细胞水平看到药物对细胞的效应,具有直观、简便的优势。本实验通过直接观察药物对MDCK细胞的CPE,确定不同水提取和醇提物的最大无毒质量浓度范围(表2)以及有无抗病毒活性(表3)。与CCK-8法比较,该方法可在药物初筛时节约成本。

研究发现多种中草药具有抗病毒活性^[9]。本实验筛选了15种中草药,采用水提和醇提法只得到7种具有抗甲型流感病毒活性的组分。其原因可能是在设计实验方案时没有充分考虑到不同药材的特点,采用了相同的方案提取,导致有些药材的活性成分没有被提取出来。后续将进一步改进提取方案,针对不同的中药材设计不同的提取方案、改进提取设备等,以利于中草药更多活性成分的提取。中草药抗流感病毒主要是依赖中医学所阐述的祛邪扶正的原理,能够阻断病毒繁殖过程的吸附、侵入、脱壳、核酸复制、蛋白合成、子代病毒颗粒的装配与释放等步骤的某一环节而直接抑制病毒^[10],同时还通过提高机体的免疫功能以增强机体的抗病能力而间接抑制病毒。本实验后续将采用CCK-8法,对获取的7种具有抗病毒活性的水提物和醇提物进行验证,并进一步分离纯化,以获取活性单体成分,同时从分子水平对其抗病毒作用机制进行研究。

参考文献:

- [1] KRAMMER F, PALESE P. Advances in the development of influenza virus vaccines[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(3): 167-182.
- [2] BRIGHT R A, SHAY D K, SHU B, et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States[J]. *J Am Med Assoc*, 2006, 295(8): 891-894.
- [3] WAN X F, CARREL M, LONG L P, et al. Perspective on emergence and re-emergence of amantadine resistant influenza A viruses in domestic animals in China[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 20: 298-303.
- [4] HURT A C, HOLIEN J K, PARKER M, et al. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation[J]. *J Virol*, 2009, 83(20): 10366-10373.
- [5] MARJUKI H, MISHIN V P, CHESNOKOV A P, et al. Characterization of drug-resistant influenza A(H7N9) variants isolated from an oseltamivir-treated patient in Taiwan[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(2): 249-257.
- [6] KUNG Y Y. H1N1 influenza: Is traditional Chinese medicine effective and safe? [J]. *J Chin Med Assoc*, 2016, 79(5): 237-238.
- [7] 马卫列, 罗芬, 李锦云, 等. 黄连水提物抗甲型流感病毒活性初步研究[J]. *广东医学院学报*, 2014, 32(6): 759-762.
- [8] 刘根凡, 黎小秋, 舒朝晖. 根茎类中药粉碎理论有效功耗的研究[J]. *华中科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(7): 21-24.
- [9] 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.
- [10] 张为民, 扬增岐, 卿素珠. 抗流感病毒的中草药研究进展[J]. *动物医学进*, 2001, 22(4): 41-44.