

蜘蛛香不同提取物抗轮状病毒的作用研究

李峰¹, 宋丽军^{1,2,3}, 周玉晶¹, 冯宇璇¹, 袁月¹, 钱余培¹, 杨思雁¹, 易灏森¹, 杨芷胭¹, 余润宇¹, 赵文昌^{1,2,3*} (1. 广东医科大学药学院; 2. 东莞市中药抗炎活性成分筛选与研究重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医科大学天然药物研究开发重点实验室, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 研究蜘蛛香不同提取物抗轮状病毒(Rotavirus, RV)的作用。**方法** 采用RV-Wa株感染MA104细胞模型, MTT染色法测定病毒抑制率, 考察蜘蛛香水提取物、70%乙醇提取物(ZZX-1)及90%乙醇提取后经大孔吸附树脂法纯化所得提取物(ZZX-2)体外抗RV的作用; 采用免疫荧光和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测RV结构蛋白VP6的表达变化, 验证蜘蛛香抗RV作用; 采用RV-Wa株感染Caco-2细胞, qRT-PCR检测蜘蛛香对神经生长因子GDNF、紧密连接蛋白ZO-1和促炎因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)]的影响。**结果** 蜘蛛香水提取物无抗RV的作用; 蜘蛛香醇提取物ZZX-1和ZZX-2具有抗RV生物合成作用。免疫荧光和qRT-PCR实验结果表明, ZZX-1和ZZX-2均能够抑制VP6蛋白的合成以及降低VP6 mRNA的表达, 抑制RV的合成。与RV组相比, ZZX-1和ZZX-2能够显著提高GDNF、ZO-1 mRNA的相对表达量($P < 0.001$ 或 0.01), 降低TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA的相对表达量($P < 0.0001$ 或 0.001)。**结论** 蜘蛛香醇提取物ZZX-1和ZZX-2具有抗RV生物合成作用, 可能通过提高GDNF、ZO-1基因表达, 降低炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的基因表达发挥抗RV感染作用。

关键词: 轮状病毒; 蜘蛛香; 环烯醚萜类; 肠上皮细胞; 紧密连接蛋白

中图分类号: R 284

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2024)04-0356-09

Study on the anti-rotavirus effect of different extracts of *Valeriana jatamansi* Jones

LI Feng¹, SONG Li-jun^{1,2,3}, ZHOU Yu-jing¹, FENG Yu-xuan¹, YUAN Yue¹, QIAN Yu-pei¹, YANG Si-yan¹, YI Hao-sen¹, YANG Zhi-yan¹, YU Run-yu¹, ZHAO Wen-chang^{1,2,3*} (1. School of pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Dongguan Key Laboratory of Screening and Research of Anti-inflammatory Ingredients in Chinese Medicine, Dongguan 523808, China; 3. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** The aim of this study is to examine the anti-rotavirus (RV) effects of different extracts of *Valeriana jatamansi* Jones. **Methods** The RV-Wa strain infected MA104 cell model was used, and the virus inhibition rate was determined by using MTT staining. The in vitro anti-RV activity of spider perfume extract, 70% ethanol extract (ZZX-1) and 90% ethanol extract (ZZX-2) was purified by the macroporous adsorption resin method. Immunofluorescence and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) were used to detect the expression of RV structural protein VP6, and to verify the anti-RV effect of spide. Caco-2 cells were infected with RV-Wa strain and the effects of arachnid on the expressions of neurotrophic factor GDNF, tight junction protein ZO-1 and pro-inflammatory factors (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) were detected by qRT-PCR. **Results** The extract of *Valeriana jatamansi* Jones did not have any anti-RV effect; *Valeriana jatamansi* Jones extracts ZZX-1 and ZZX-2 have anti-RV biosynthesis effects. The results of immunofluorescence and qRT-PCR indicate that both ZZX-1 and ZZX-2 can reduce the fluorescence and mRNA expression of VP6, and inhibit RV synthesis. Compared with the RV group, ZZX-1 and ZZX-2 significantly increased the expression levels of neurotrophic factor GDNF and tight junction protein ZO-1 mRNA ($P < 0.001$ or 0.01), and reduced the relative expression levels of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) mRNA ($P < 0.0001$ or 0.001).

收稿日期: 2023-11-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473401, 81973548), 广东省高校创新团队项目(2022KCXTD011), 广东医科大学学科重点项目(4SG22009G), 湛江市科技计划项目(2021B01139)

作者简介: 李峰, 男, 硕士研究生, E-mail: lffootball@163.com

通信作者: 赵文昌, 男, 博士, 教授, E-mail: zhaowenchang@126.com

Conclusion The alcohol extracts ZZX-1 and ZZX-2 from the traditional Chinese medicine *Valeriana jatamansi* Jones have anti-RV biosynthesis effects, which may exert anti-RV infection effects by increasing the expression of GDNF and ZO-1 and reducing the expression of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α .

Key words: rotavirus; *Valeriana jatamansi* Jones; cyclenyl ether terpenes; intestinal epithelial cells; tight junction protein

轮状病毒(Rotavirus, RV)属呼肠孤病毒科轮状病毒属(*Reoviridae*),是引起婴幼儿腹泻的主要病原体之一,每年因RV感染死亡的病例超过20万人^[1-2]。自2006年以来,已有RotarixTM和Rota Teq两种疫苗上市,但防治范围有限。RV的发病机制十分复杂,目前尚无特效药,临床上一般采用对症支持疗法^[3]。蜘蛛香(*Valeriana jatamansi* Jones)是忍冬科、缬草属植物,又名马蹄香、土细辛、心叶缬草、养心莲、养血莲、臭药等^[4]。作为我国著名的传统中药,其药用历史悠久,以根和根茎入药,可用于治疗脘腹胀痛、食积不化、腹泻痢疾、风湿痹痛、腰膝酸软、睡眠紊乱、神经紊乱、癫痫、精神错乱、蛇中毒、皮肤病和流感等多种疾病^[5]。蜘蛛香主要含有挥发油、环烯醚萜类和黄酮类等多种成分。研究发现,蜘蛛香所含的黄酮类成分(如橙皮苷)和挥发油成分(如百秋李醇)具有抗RV作用^[6-7]。近年研究表明,蜘蛛香中环烯醚萜类含量较高,具有抗抑郁、镇静安神、抗炎、抗肿瘤、抗焦虑、神经保护、抗菌和抗多种病毒等活性^[8-9],但有关抗RV作用的相关报道较少。本实验将制备蜘蛛香的3种不同提取物,考察它们是否具有抗RV作用,并对其抗RV的相关机制进行初步研究,以为蜘蛛香的开发及抗RV药物的研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与试验药物

1.1.1 蜘蛛香水提液制备 称取中药材蜘蛛香(亳州亳宏药业,批号:20221116)适量,加10倍双蒸水,每次浸泡1h,煎煮2h,过滤,收集滤液;将滤渣加等量双蒸水再煎煮2h,合并2次滤液,置于旋转蒸发器中,设置65℃并减压浓缩至浓度约为1g/L。使用前,超净台内无菌操作,用0.22 μ m一次性过滤器过滤除菌。

1.1.2 蜘蛛香70%醇提液(ZZX-1)制备 称取适量蜘蛛香药材,按料液比1:10加入70%乙醇浸泡过夜后,80℃提取2h后,用筛网进行过滤,收集醇提液和滤渣,将滤渣再次进行煎煮,合并滤液后,设置旋转蒸发器在55℃以及适宜的转速和压力,浓缩为1g/L的药液。使用前,超净台内无菌操作,用0.22 μ m一次性

过滤器过滤除菌。

1.1.3 蜘蛛香总环烯醚萜部位(ZZX-2)提取 将1kg蜘蛛香药材打成粗粉,加入3L的90%乙醇浸泡提取3次,每次2h,提取液经低温减压浓缩后得浸膏,浸膏重量为169g。将浸膏加入1000mL水溶解(分散),得样品液。将样品液通过D101大孔吸附树脂柱,上样流速为1BV/h,接着用水以6个柱体积洗脱,再选用50%乙醇以2个柱体积进行洗脱,最后用95%乙醇以5个柱体积进行洗脱,收集95%乙醇洗脱液。用旋转蒸发器将洗脱液中的乙醇减压回收,无醇味后减压真空干燥至恒重,得到蜘蛛香醇提物ZZX-2,重量为22.08g。

1.1.4 病毒生长维持液 用DMEM培养基稀释不含有EDTA胰蛋白酶消化液,使胰酶终浓度为1mg/L。

1.1.5 利巴韦林(Ribavirin) 将利巴韦林注射液(宜昌人福药业,批号:01Z04011A2)用PBS稀释成1mg/L。

1.2 病毒株及细胞系

病毒株:RV-Wa株为本实验室所保存。细胞:恒河猴胎肾细胞(MA104细胞)来源于中山大学细胞库。Caco-2(人克隆结肠腺癌细胞,结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞)细胞:由广东医科大学中美肿瘤所赠予。

1.3 试剂

MTT(Biofrox,批号:1334GR005);胎牛血清(FBS,Hyclone公司,批号:FB15015);DMEM-高糖培养基(GIBCO公司,批号:8122799);胰蛋白酶消化液(不含EDTA)(Solarbio公司,批号:NO.T1350);PBS缓冲液(GIBCO公司,批号:NO.P1020);Evo M-MLV反转录试剂盒(湖南艾科瑞有限公司,批号:AG11705);2X SYBR® Green Pro Taq HS Premix II(湖南艾科瑞有限公司,批号:AG11702);Anti-Rotavirus抗体[A2](Abcam公司,批号:ab181695);Goat Anti-Mouse IgG H&L(Abcam公司,批号:ab150113);DAPI染色液(Solarbio公司,批号:C0065)。

1.4 仪器

倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司);高速低温离心机(安君研仪器公司);多功能酶标仪(BioTek);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);超

微量分光光度计[拓赫机电科技(上海)有限公司];热循环仪(T100 Bio-Rad 公司);活细胞成像仪(Thermo Scientific 公司);Roche 荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific 公司);玻璃层析柱(上海昕沪实验设备有限公司)。

1.5 方法

1.5.1 细胞培养 将含有 MA104 细胞或 Caco-2 细胞的冻存管从液氮罐中取出,迅速拿至 37 °C 恒温水浴锅中快速融化使其复苏,全部融化后转移至含有 10% FBS 的 DMEM 培养基(含 1% 的双抗)的离心管中进行混匀,以 1 000 r/min, 5 min 进行离心,离心后倒掉上清液,加入 4 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞后混匀(Caco-2 细胞选用含 20% FBS 的 DMEM 培养基),吸入到细胞培养瓶中,置于 CO₂ 培养箱中培养,待第 2 天贴壁后,进行换液操作,去除漂浮的死细胞。

1.5.2 RV 的培养与扩增 选用 MA104 细胞株用于 RV 的培养扩增。将 RV-Wa 株从液氮罐中取出置于冰箱 4 °C 自然溶解。在超净台内将 RV 液与不含 EDTA 的胰酶(使胰酶终浓度为 10 mg/L)按照 1:1 混合均匀,37 °C 作用 30 min。从培养箱中拿出生长至 90% 左右的 MA104 细胞,接种 RV 前先用 PBS 和 DMEM 培养液分别润洗细胞 2 遍。然后从培养箱中拿出孵育好的 RV 液,加入培养瓶中,体积约为 1 mL,再加入适量的病毒维持液,放入细胞培养箱。间隔约 12 h 观察 MA104 细胞被 RV 感染后细胞病变(CPE)情况。待细胞被 RV 感染病变达 70% 左右,可收集病毒。将细胞培养瓶密闭

封口,放置 -20 °C 冰箱中,间隔 24 h 再把培养瓶放置室温溶解,如此冻融 3 次后,超净台内用 2 mL EP 管收集病毒混合液,置于提前预冷的低温高速离心机下,设置参数 12 000 r/min, 4 °C,离心 30 min,将上清液吸入新的 EP 管内,做好标记,封口后转移至 -80 °C 冰箱,以备下次使用,若长期保存可转移至液氮罐中。

1.5.3 RV 毒力的测定 将 MA104 细胞按每孔 8 000 个/100 μL 接种于 96 孔培养板中,每个浓度设置 8 个副孔。待细胞贴壁生长至 90% 左右时,进行实验。取出 1 管扩增好的 RV 株,计算实验所需的病毒量,与不含 EDTA 的胰酶按照 1:1 混匀后(胰酶终浓度为 10 mg/L),置细胞培养箱作用 30 min。按设置好的浓度梯度进行稀释(稀释倍数为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵),用 DMEM 培养液稀释 RV 原液成对应浓度。将 96 孔板取出,吸弃旧培养液后,先用 PBS 润洗每孔 1 遍,再将已稀释好的 RV 液贴壁的加入 96 孔板孔中,每孔 100 μL。待 RV 与细胞作用 2 h 后取出培养板,弃每孔中旧的病毒液,将各孔用 PBS 润洗 1 次,再往里加入 100 μL 病毒维持液,正常细胞组只加 DMEM 培养液。将 96 孔板置于细胞培养箱中培养,观察 MA104 细胞被 RV 感染后的状态,记录病变时间及对应的 CPE 变化。当发现最低浓度孔中细胞不再进行病变时,先对所有出现病变的孔进行计数,之后再往每孔内加入含量占 10% 的 MTT 溶液,在酶标仪上测定各孔对应的吸收光度值(OD 值)。根据国际计算公式 Reedand Muench 计算 RV 的 TCID₅₀,得到病毒滴度。公式如下:

$$\lg \text{TCID}_{50} = \text{距离比例} \times \text{稀释度对数之差} + \text{高于 50\% 病变率的稀释度的对数}$$

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于 50\% 病变率百分数} - 50\%}{\text{高于 50\% 病变率百分数} - \text{低于 50\% 病变率的百分数}}$$

1.5.4 药物的细胞毒性实验 以 8 000 个/100 μL 每孔的细胞密度,将 MA104 细胞接种于 96 孔细胞培养板上。在培养箱中培养,待细胞贴壁生长至 90% 左右用于后续实验。首先进行浓度初筛,按设置好的浓度梯度(1:1、1:10、1:100、1:1 000)用 DMEM 进行稀释,然后吸出旧培养液,将配置好的药液贴壁加入到 96 孔板内。每个药液浓度 6 个副孔,每孔 100 μL。Normal 组只加 DMEM。每天观察 CPE 变化,若 1:1 浓度出现细胞毒性变化,其他组别细胞生长形态正常,说明有毒浓度在 1:1~1:10 稀释范围内,应进一步稀释。根据初次筛选结果,按照合适的比例设置好浓度滴度,再用 DMEM 进一步稀释,给药。在光学显微镜下连续观察 CPE 变化,72 h 后,加入 MTT,用酶标仪检测每孔的 OD 值,计算各浓度的平均值,从而得出细胞

存活率,确定无毒浓度范围。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{药物组平均 OD 值}}{\text{正常对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

1.5.5 药物体外抗 RV 实验 (1) 药物抗 RV 的吸附作用。将 MA104 细胞以 8 000 个/100 μL 每孔的细胞密度,接种于 96 孔细胞培养板。细胞长至单层时吸去旧培养液,加入配制好的无毒浓度药液 100 μL 和 1 mg/L 的 Ribavirin 溶液 100 μL,每个药液浓度重复 4 孔,Normal 组和 RV 组只加入无 FBS 的 DMEM 培养液。细胞培养箱孵育 2 h 后将所有孔里面的液体吸出,再往 RV 组和药物组加入 100 μL 稀释 100 倍的 RV 液,Normal 组加 100 μL 无 FBS 的 DMEM 培养液。放入培养箱作用 2 h 后,将药物组与 RV 组的 RV 液全部吸出,再往每孔中加入 100 μL 的病毒维持液进行培养。一般

在 24 h 内细胞会发生病变,待 CPE 达到 75% 时,便可加入 MTT 溶液测定其 OD 值。计算每个药物抗 RV 吸附的抑制率,药物的半数细胞毒性浓度 (IC_{50})、半数有效浓度 (EC_{50}) 及治疗指数 (TI)。TI 值 ≥ 2 说明药物有抗病毒活性; TI 值 ≥ 4 说明药物抗病毒成分有研究价值^[10]。

病毒抑制率 = (药物组 OD 值 - 病毒对照组 OD 值) / (正常细胞对照组 OD 值 / 病毒对照组 OD 值) $\times 100\%$

$$TI = IC_{50} / EC_{50}$$

(2) 药物直接抑制 RV 作用。按所需剂量配制好 100 TCID₅₀ 的 RV 液,再配制好无毒浓度药液,取 RV 液与各浓度药液和 Ribavirin 溶液 1:1 在 EP 管中混匀, RV 组为 RV 液与 DMEM 等体积混匀,置于培养箱中作用 2 h。之后拿出长满 MA104 细胞的培养板,吸弃旧培养液,用 PBS 润洗 2 遍,再加入混合好的 RV 与药物混合液。Normal 组只加入 100 μ L 的 DMEM。再次作用 2 h 后,将药液吸出,每孔加入配制好的病毒维持液 100 μ L,置于细胞培养箱中培养。待细胞 CPE 达到 75% 时,加入 MTT 进行常规检测,测量 OD 值后,计算药物对病毒的直接抑制率和 TI 值。

(3) 药物抗 RV 生物合成作用。按所需剂量配制 100 TCID₅₀ 的 RV 液。设计好组别,加入到 96 孔板内。Normal 组加入等体积 DMEM 培养液。在培养箱中作用 2 h 后吸出,加入配置好的各浓度药液和 Ribavirin 溶液每孔 100 μ L, RV 组加入等体积的病毒维持液。在培养中培养 48 h,待细胞 CPE 达到 75% 时进行 MTT 检测,并计算药物对病毒的抑制率和 TI 值。

1.5.6 免疫荧光染色 采用免疫荧光检测 RV 的结构蛋白 VP6 的表达变化。将 MA104 细胞消化后按照 5×10^4 孔种植于 24 孔板,感染 RV 进行给药处理。观察细胞 CPE 变化,按照免疫荧光染色步骤进行处理,用倒置荧光显微镜观察拍照各组荧光情况。

1.5.7 免疫荧光和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检

测相关基因变化 采用 qRT-PCR 用检测 VP6、神经生长因子 GDNF、紧密连接蛋白 ZO-1 和促炎因子 [肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)] mRNA 的影响。首先对总 RNA 进行提取及定量,按照 Evo M-MLV 反转录试剂盒进行 mRNA 的逆转录反应,然后参照 SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒说明检测相关基因的变化。

1.6 统计学处理

采用 Graphpad prism 统计软件进行 One-Way ANOVA 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RV 病毒滴度的测定

按照 Reed and Muench 公式计算, RV- Wa 株效价为 $10^{-2.57} / 0.1$ mL TCID₅₀,病毒滴度为 $10^{-3.57}$ TCID₅₀/mL。

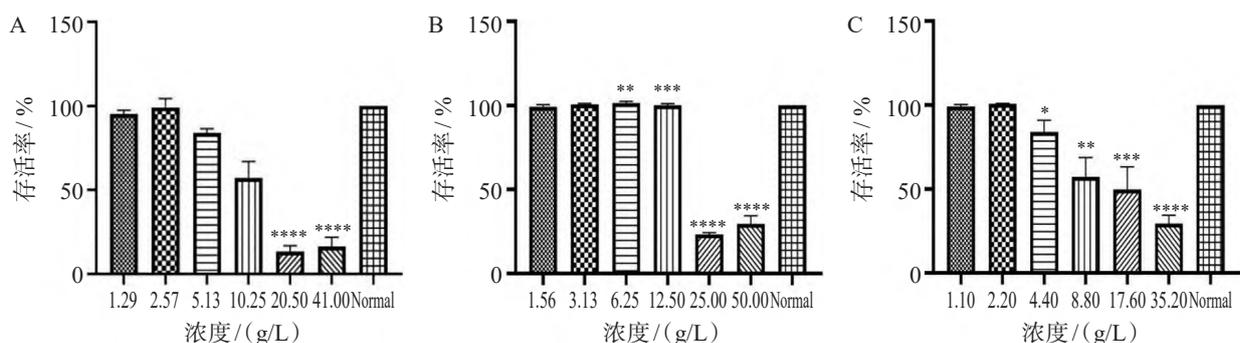
2.2 蜘蛛香水提液、ZZX-1 和 ZZX-2 对 MA104 细胞毒性

各药物组与 Normal 组比较结果见图 1,最终确定本实验蜘蛛香水提液对 MA-104 细胞的无毒浓度范围为 ≤ 10.25 g/L, ZZX-1 对 MA-104 细胞的无毒浓度范围为 ≤ 3.13 g/L, ZZX-2 对 MA-104 细胞的无毒浓度范围为 ≤ 2.20 mg/L。

2.3 蜘蛛香水提液、ZZX-1 和 ZZX-2 抗 RV 作用

2.3.1 蜘蛛香水提液抗 RV 作用 根据细胞毒性实验结果,在无毒范围内设置好浓度梯度,在抗 RV 吸附、直接抑制 RV 及抗 RV 生物合成作用方面:蜘蛛香水提液的最大抑制率分别为 1.56%、2.89% 和 1.22%,效果不明显。抗 RV 3 种作用效果远低于 Ribavirin 组 ($P < 0.0001$ 或 0.05),见图 2。

2.3.2 ZZX-1 抗 RV 作用 根据细胞毒性实验结果,设置 ZZX-1 在无毒范围内进行实验。在抗 RV 吸附和直接抑制 RV 作用中:ZZX-1 的最大抑制率分别为 1.89% 和 10.56%,效果均不太理想,明显低于



($n=3$,与 Normal 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)

图 1 蜘蛛香水提液 (A)、ZZX-1 (B) 和 ZZX-2 (C) 对 MA104 细胞毒性

Ribavirin组 ($P < 0.0001$)；在抗RV生物合成方面：3.13 g/L对RV的抑制率达61.35%，略低于Ribavirin组 ($P < 0.05$)，其 $IC_{50} = 13.82$ g/L， $EC_{50} = 1.54$ g/L， $TI = 9$ ，表明有抗RV生物合成作用，说明药物抗RV成分有研究意义。

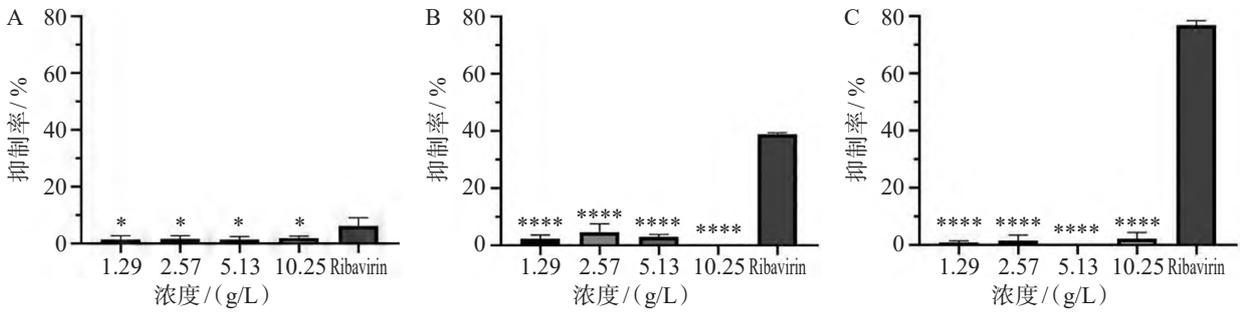
2.3.3 ZZX-2 抗RV作用 根据细胞毒性实验结果，设置ZZX-2在无毒范围内进行实验，结果如图4所示。在抗RV吸附及直接抑制RV作用中，ZZX-2的最大抑制率分别为1.02%和11.26%，效果远低于Ribavirin组 ($P < 0.0001$)；在抗RV生物合成作用方面：2.20 mg/L对RV的抑制率达58.03%，略低于Ribavirin组 ($P < 0.05$)，其 $IC_{50} = 12.83$ mg/L， $EC_{50} = 1.91$ mg/L， $TI = 6.7$ ，说明药物抗RV成分有研究意义。

2.4 免疫荧光染色观察ZZX-1和ZZX-2对RV感染MA104细胞后VP6的影响

如图5所示，图中蓝色荧光为DAPI溶液染的细胞核数量，绿色荧光为RV结构蛋白VP6。RV感染后，细胞量减少，剩余活细胞均被RV感染；ZZX-1给药后，细胞存活量增加，VP6量减少，表明ZZX-1可抑制MA-104细胞中VP6蛋白的合成。ZZX-2给药后，表现出与ZZX-1相同的作用，说明其也能够抑制VP6蛋白的合成。

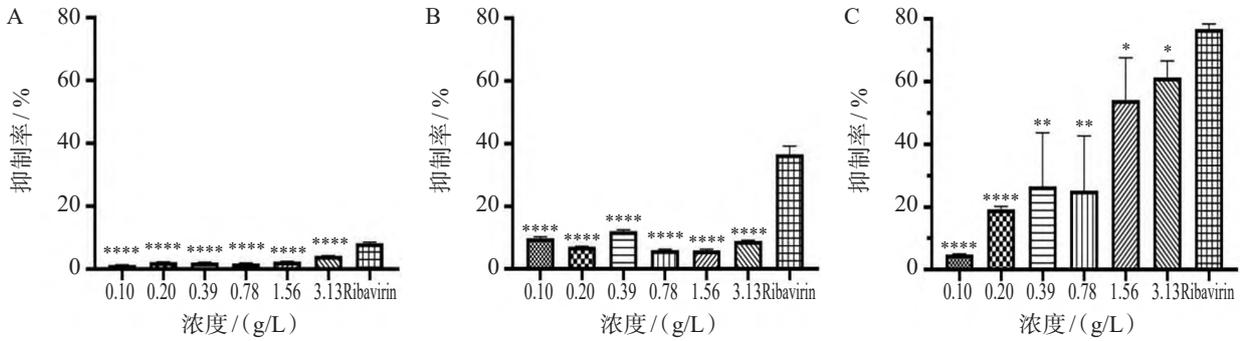
2.5 qRT-PCR测定ZZX-1、ZZX-2给药后VP6的表达量

与RV组相比，ZZX-1 (3.13 g/L)和ZZX-2 (2.20



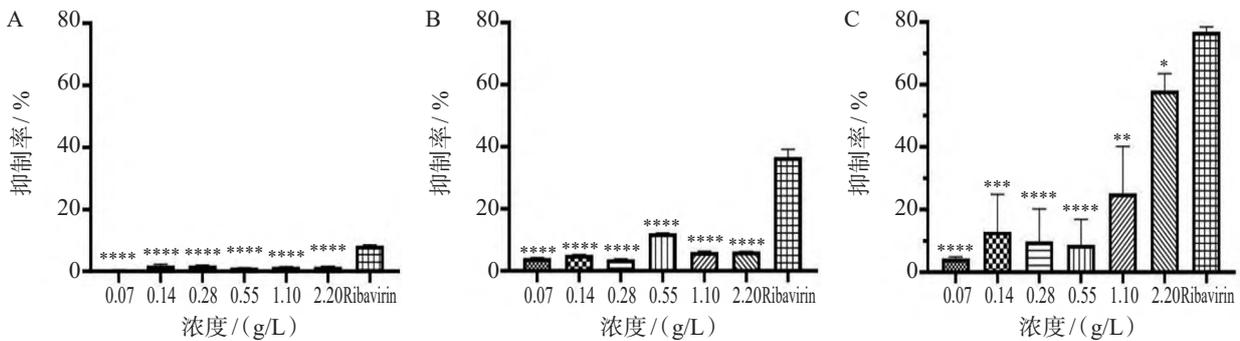
A. 抗RV吸附作用；B. 直接抑制RV作用；C. 抗RV生物合成作用 ($n = 3$ ，与Ribavirin组比较： $*P < 0.05$ ， $****P < 0.0001$)

图2 蜘蛛香水提液抗RV作用



A. 抗RV吸附作用；B. 直接抑制RV作用；C. 抗RV生物合成作用 ($n = 3$ ，与Ribavirin组比较： $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ ， $****P < 0.0001$)

图3 ZZX-1 抗RV作用



A. 抗RV吸附作用；B. 直接抑制RV作用；C. 抗RV生物合成作用 ($n = 3$ ，与Ribavirin组比较： $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ ， $****P < 0.0001$)

图4 ZZX-2 抗RV 3种作用

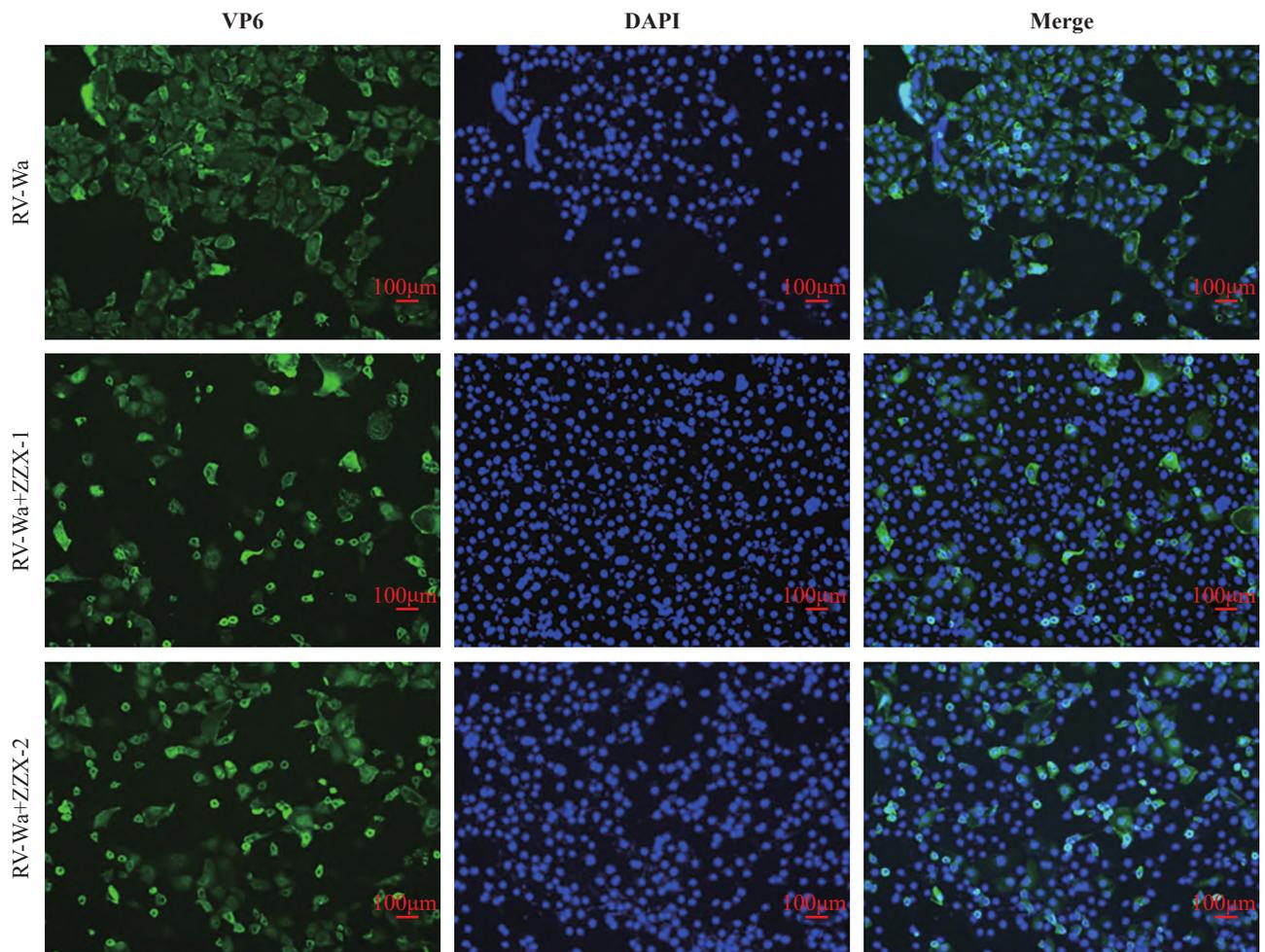


图5 免疫荧光观察ZZX-1和ZZX-2对RV感染MA104细胞后VP6的影响

mg/L) 组的VP6 mRNA的相对表达量均显著降低 ($P < 0.0001$), 表明ZZX-1和ZZX-2均能够降低VP6 mRNA的表达, 见图6。

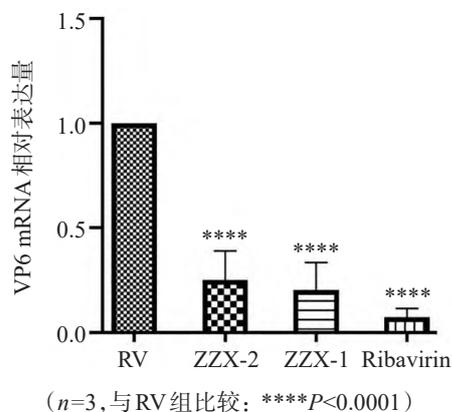


图6 ZZX-1、ZZX-2对RV感染MA104细胞后VP6 mRNA的影响

2.6 ZZX-1和ZZX-2对Caco-2细胞毒性的影响

ZZX-1对Caco-2细胞的无毒浓度范围为 ≤ 0.78 g/L, ZZX-2为 ≤ 0.63 mg/L, 见图7。

2.7 qRT-PCR检测RV感染Caco-2细胞后GDNF、ZO-1 mRNA的表达情况

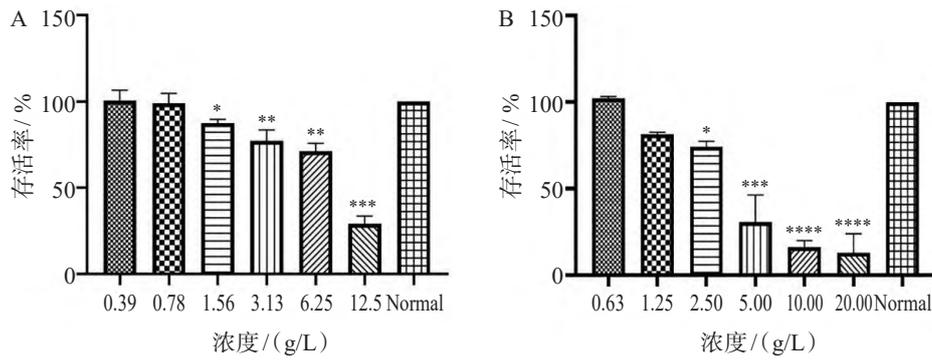
如图8所示, 与Normal相比, RV、ZZX-1、ZZX-2组的GDNF和ZO-1 mRNA相对表达量均明显升高 ($P < 0.05$), 且ZZX-1和ZZX-2组的效果更显著 ($P < 0.001$ 或 0.01)。

2.8 qRT-PCR检测RV感染Caco-2细胞后相关炎症因子表达情况

RV感染后, 促炎因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA相对表达量均显著升高 ($P < 0.0001$ 或 0.001); ZZX-1和ZZX-2给药后, 上述促炎因子的表达均出现不同程度的降低 ($P < 0.05$), 见图9。

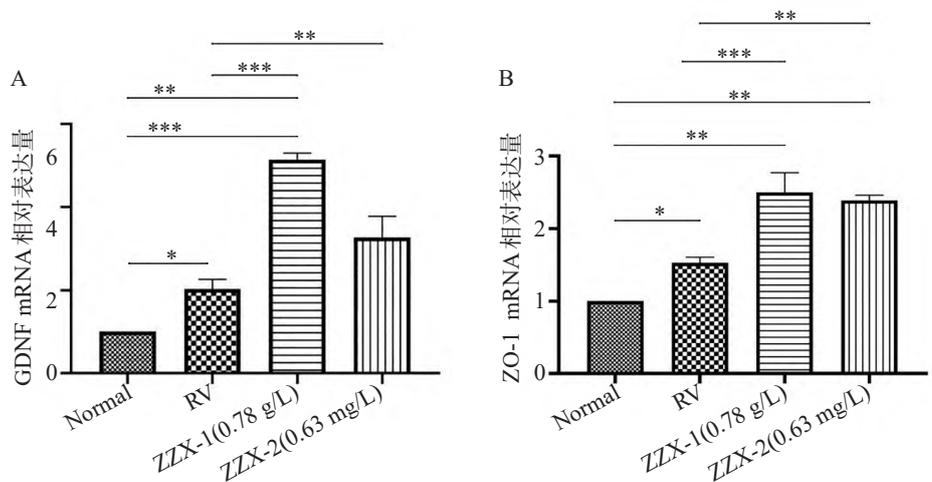
3 讨论

文献报道, 采用90%乙醇提取蜘蛛香, 经D101型大孔吸附树脂洗脱后提取物中总环烯醚萜类纯度可达65%以上^[11]。参照该方法, 本实验制备了蜘蛛香水提液、70%醇提液ZZX-1和90%醇提液ZZX-2, 以蜘蛛



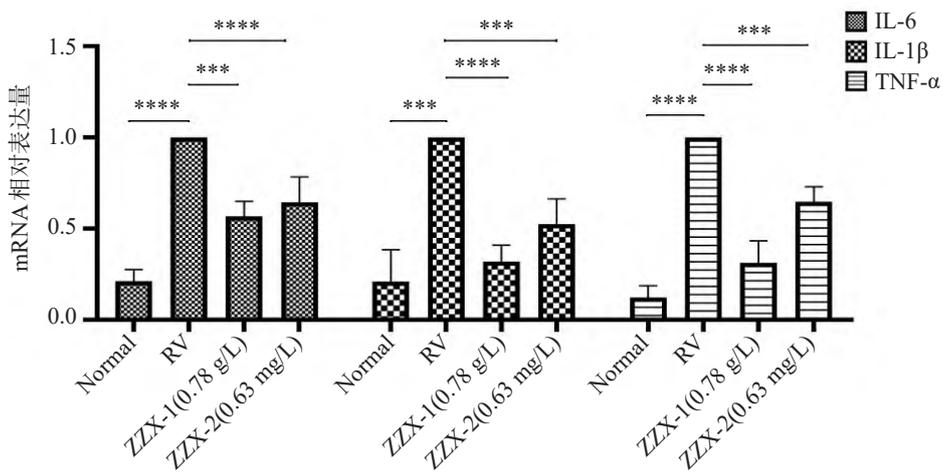
(n=3, 与Normal比较: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001)

图7 ZZX-1 (A)、ZZX-2 (B)对Caco-2细胞毒性的影响



(n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

图8 ZZX-1、ZZX-2对RV感染Caco-2细胞后GDNF mRNA (A)、ZO-1 mRNA (B)的影响



(n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001)

图9 ZZX-1、ZZX-2对RV感染Caco-2细胞后相关炎症因子mRNA的影响

香3种不同提取物进行抗RV实验,并且与阳性药物Ribavirin进行比较。MTT实验结果表明,蜘蛛香水提取物没有抗RV作用,而不同浓度乙醇制备的蜘蛛香提取物ZZX-1和ZZX-2具有抗RV生物合成作用。

在此基础上,我们检测了蜘蛛香提取物ZZX-1、ZZX-2对VP6的影响。RV可以编码6个结构蛋白(VP1~VP4、VP6、VP7)和6个非结构蛋白(NSP1~6)^[12]。其中VP6是RV颗粒的组装蛋白,含量最

丰富,约占病毒总蛋白量的51%,影响RV的合成,是检测抗RV合成作用的重要指标^[13]。本文采用免疫荧光和qRT-PCR实验,检测了蜘蛛香提取物ZZX-1和ZZX-2对VP6蛋白及mRNA表达量的影响,实验结果表明:ZZX-1和ZZX-2组VP6蛋白的绿色荧光减少,且显著降低VP6 mRNA的相对表达,抑制了VP6蛋白的合成,从而抑制了RV在细胞中的复制,发挥了抗RV生物合成作用。

RV感染作用机制较为复杂。已有研究发现RV感染可破坏肠道细胞间的紧密连接,导致肠上皮细胞脱落,损坏肠上皮屏障的完整性。RV的非结构蛋白NSP4可刺激肠嗜铬细胞,大量释放5-羟色胺,激活肠道神经胶质细胞分泌大量的神经营养因子GDNF,增加紧密连接蛋白ZO-1的表达,以维持细胞间紧密连接的完整性,抵制RV感染^[14-15]。此外,RV在影响肠道稳态的同时还会引起一系列肠道炎症反应,导致RV肠炎的发生^[16]。IL-6是一种促炎细胞因子,RV肠炎患儿体内存在感染及组织损伤现象,活化的T细胞和成纤维细胞会大量释放IL-6^[17]。与此同时,IL-1 β 和TNF- α 作为参与先天免疫的重要促炎细胞因子在RV感染后也会被大量释放,加重RV肠炎患儿的病情^[18]。研究表明GDNF可直接作用肠上皮细胞,通过抑制TNF- α 、IL-1 β 及IL-6等多种促炎因子的释放,产生抗炎作用,与ZO-1共同维持肠上皮屏障的完整性^[19]。本文从上述RV感染机制出发,基于与人小肠上皮细胞在形态、功能相似的Caco-2细胞模型,采用qRT-PCR实验检测了GDNF、ZO-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA的变化,对蜘蛛香提取物ZZX-1、ZZX-2抗RV的作用机制进行了初步研究。实验结果表明,与Normal组相比,RV组GDNF、ZO-1的表达上调,这可能是因为NSP4可刺激肠嗜铬细胞,大量释放5-羟色胺,激活肠道神经胶质细胞分泌大量的神经营养因子GDNF,增加紧密连接蛋白ZO-1的表达,以维持细胞间紧密连接的完整性,抵制RV感染,这是RV感染早期机体的代偿性调节,但这种调节还不足以抵制后期RV的进一步感染,TNF- α 、IL-6和IL-1 β mRNA表达上调,这可能是RV感染后导致炎症反应的原因之一;与RV组相比,ZZX-1组和ZZX-2组的GDNF、ZO-1 mRNA表达上调,TNF- α 、IL-6和IL-1 β mRNA表达下调,说明蜘蛛香提取物ZZX-1、ZZX-2可以进一步激活GDNF,促进了ZO-1的表达,增强肠上皮细胞间紧密连接,还可以减少RV感染引起的炎症因子的释放,从维持肠上皮屏障功能和抗炎两方面同时发挥抗RV作用,降

低RV感染造成的损伤。

综上所述,本实验研究结果初步表明,蜘蛛香70%醇提物ZZX-1和90%醇提液经大孔吸附树脂纯化后的提取物ZZX-2可能具有明显的抗RV生物合成作用。ZZX-1和ZZX-2可能通过促进GDNF的释放,增强ZO-1的表达,从而维持肠上皮细胞间紧密连接,防止RV进一步感染;同时还可能减少促炎因子的释放,产生抗炎效应,维持肠上皮屏障完整性,保护肠道稳态。后期可对具体成分进行分离探讨,借助动物模型进行更深层次的机制研究。

参考文献:

- [1]GBD 2016 CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. Lancet, 2017, 390 (10100): 1151-1210.
- [2]MANDOMANDO I, MESSA A J R, BIEY J N, et al. Lessons learned and future perspectives for Rotavirus vaccines switch in the World Health Organization, regional office for Africa[J]. Vaccines (Basel), 2023, 11 (4): 788.
- [3]TROEGER C, KHALIL I A, RAO P C, et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years[J]. JAMA Pediatr, 2018, 172 (10): 958-965.
- [4]胡萍萍,胡静娜.蜘蛛香单帖环烯醚萜类成分及其抗乳腺癌活性[J].中成药,2021,43(11):3057-3061.
- [5]石道群,王云,饶凯瑞,等.蜘蛛香中的倍半萜和环烯醚萜类成分及其抗炎和抗流感病毒活性[J].药学学报,2022,57(2):428-432.
- [6]BAE E A, HAN M J, LEE M, et al. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (9): 1122-1124.
- [7]黄蓉. 马蹄香抗轮状病毒体外活性研究[D].昆明:昆明医科大学,2019.
- [8]刘欢,吴佳慧,刘丹,等.蜘蛛香中的环烯醚萜类成分及其抗流感病毒活性研究[J].中草药,2020,51(11):2886-2894.
- [9]姜明言,饶凯瑞,廖彩岑,等.蜘蛛香中的环烯醚萜类化合物在巨噬细胞中的抗炎活性研究[J].天然产物研究与开发,2021,33(6):913-920.
- [10]陈亚乔,侯林,崔清华,等.海藻不同方法提取物体外抗病毒活性研究[J].西部中医药,2018,31(3):5-8.
- [11]张瑞桐,兰明,林玉,等.蜘蛛香总环烯醚萜类成分纯化工艺优选[J].中华中医药学刊,2014,32(6):1276-1279,1540.
- [12]CRAWFORD S E, RAMANI S, TATE J E, et al. Rotavirus infection[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3:17083.

- [13]尹兴晓. A组人轮状病毒VP6蛋白表达及其免疫学分析[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
- [14]HAGBOM M, D E FARIA F M, WINBERG M E, et al. Neurotrophic factors protect the intestinal barrier from Rotavirus insult in mice[J]. *mBio*, 2020, 11 (1): e02834-19.
- [15]ZHANG D K, HE F Q, LI T K, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis[J]. *J Pathol*, 2010, 222 (2): 213-222.
- [16]盛华西. 酪酸梭菌活菌散联合干扰素治疗轮状病毒感染性腹泻的效果及对患儿乳酸、炎症因子水平的影响[J]. 中国当代医药, 2022, 29 (26): 127-129, 141.
- [17]李玉兰, 张栖, 邓文辉. 复合乳酸菌联合蒙脱石散治疗小儿轮状病毒感染性腹泻的疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14 (19): 147-149.
- [18]布月青, 董胜英. 轮状病毒肠炎IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的变化及意义[J]. 实用预防医学, 2006, 13 (4): 859-861.
- [19]LI Y, LI Y, ZHANG Q, et al. The role of enteric glial cells in intestinal neuroimmunomodulation[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2022, 38 (1): 84-88.

(责任编辑: 李 晓)

高效液相色谱法同时测定化妆品中的多种防腐剂

方田田, 陈玉婷, 唐焕文* (广东医科大学公共卫生学院, 广东东莞 523808)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时测定化妆品中氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸及山梨酸等5种防腐剂含量方法。方法 美白类化妆品样品经甲醇溶剂超声辅助提取, C18色谱柱分离, 以5 mmol/L乙酸铵-1%甲酸/甲醇溶液(30/70, v/v)为流动相等度洗脱, 流速为1 mL/min, 柱温35 $^{\circ}$ C, 进样量为10 μ L。结果 氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸及山梨酸等5种防腐剂在各自线性范围内线性关系良好($r>0.992$), 平均加样回收率为97.82%~111.11%, 相对标准偏差为0.23%~1.64%。采用该方法对采购的美白类化妆品样品24批次进行检测, 该方法能有效检出化妆品中苯酚、儿茶酚、苯甲酸和山梨酸, 氢醌均未检出。结论 该方法操作简单, 灵敏度高, 重现性好, 可用于美白化妆品中氢醌等5种防腐剂的同时检测。

关键词: 高效液相色谱法; 化妆品; 防腐剂

中图分类号: R 115

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 04-0364-04

Simultaneous determination of several preservatives in cosmetics using high performance liquid chromatography

FANG Tian-tian, CHEN Yu-ting, TANG Huan-wen* (School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay for simultaneous detection of 5 preservatives including hydroquinone, phenol, catechol, benzoic acid, and sorbic acid in cosmetics. **Methods** The whitening cosmetics were extracted ultrasonically with methanol solvent, separated on C18 chromatographic column, and eluted with 5 mmol/L ammonium acetate-1% formic acid/methanol solution (30/70) at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 35 $^{\circ}$ C, and injection volume was 10 μ L. **Results** There were good linear relationships among hydroquinone, phenol, catechol, benzoic acid, and sorbic acid ($r>0.992$). The average recovery rates were 97.82%-111.11%, and relative standard deviations were 0.23%-1.64%. Twenty-four batches of whitening cosmetics were detected by this method. Phenol, catechol, benzoic acid, and sorbic acid were effectively determined, but hydroquinone was not. **Conclusion** This method is simple, sensitive, and reproducible, and can be used for simultaneous detection of 5 preservatives such as hydroquinone in whitening cosmetics.

Key words: HPLC; cosmetics; preservatives

收稿日期: 2024-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(82073582), 广东省普通高校特色创新项目(2020KTSCX048), 广东医科大学学科建设项目(4SG23003G)

作者简介: 方田田, 女, 硕士, 实验师, E-mail: fangtiantian@gdmu.edu.cn

通信作者: 唐焕文, 男, 博士, 教授, E-mail: thw@gdmu.edu.cn