

· 论著 ·

四种大黄多糖体外抗轮状病毒的实验研究

卫飞 刘婧 杨占秋 李晴

【摘要】目的 研究 4种大黄多糖 (A、B、C、D) 以及其配伍体外抗轮状病毒 (RV) 作用。方法 在体外用 MTT 法检测药物的毒性作用, 从抗吸附、直接杀伤和抑制病毒增殖 3 方面检测 4 种大黄多糖抗 RV 的效果; 并依中效原理, 对大黄多糖 A、C 进行配伍, 研究其体外抗病毒的作用, 并探讨最适配伍比例。结果 4 种大黄多糖体外有预防 RV 感染和抑制病毒增殖作用。A、C 以 1:1 配伍后, 对病毒的直接杀伤的合用效应与合用指数关系: 当 f_a 为 0.68 时, $CI < 1$, 两药作用相加或协同。对病毒的增殖抑制的合用效应与合用指数关系: 当 f_a 为 0.57 时, $CI < 1$, 两药作用相加或协同。结论 4 种大黄多糖体外具有较好地抗 RV 病毒作用, 且大黄多糖 A、C 合用效果对病毒的直接杀伤作用和抑制病毒增殖作用优于其单独使用。

【关键词】大黄多糖; 轮状病毒; 抗病毒; 配伍

【中图分类号】R373 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1006-2483 (2009) 05-0013-04

Anti-Rotavirus activity of four Rhubarb polysaccharides in vitro WEI Fei, LIU Jing, YANG Zhan-qiu State Key Laboratory of Virology, Institute of Medical Virology, Medical School Wuhan University, Wuhan 430071, China; LI Qing Department of Basic Medicine, Xiamen University Medical College, Xiamen 361005, China
Corresponding author: LI Qing, E-mail: sunnymaylq@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the anti-rotavirus activity of four rhubarb polysaccharides and their two compatibility in vitro **Methods** To examine the cytotoxicity of the drugs by MTT method and evaluate the anti-rotavirus effect through the anti-absorption, direct inactivation and propagation inhibition Meanwhile, the antiviral activity of the A and C compatibility were also determined in line with the median effect principle **Results** The four rhubarb polysaccharides effectively inhibited RV propagation and prevented the RV absorption in vitro The combination of A and C had a synergistic effect by direct inactivation of the virus and the combination index was less than 1 when the f_a was less than 0.68 The combination of extracts A and C had a synergistic effect by inhibition of virus propagation when the combination index was less than 1 when the f_a was less than 0.57. The compatibility of A and C showed a better antivirus activity than single usage when compared with the direct inactivation and propagation inhibition **Conclusions** The four Rhubarb polysaccharides is highly effective against Human Rotavirus; the combination use shows a even better antivirus activity.

【Key words】 Rhubarb polysaccharide extract; Rotavirus; Antiviral effect; compatibility

轮状病毒 (Rotavirus, RV) 是呼肠孤病毒科的一个属, 是引起人和动物急性腹泻的主要病原体^[1]。轮状病毒感染每年导致约 1.4 亿腹泻的发生, 2 500 万的门诊病人, 其中 240 万人住院, 以及超过 60 万患儿的死亡^[2]。由于目前尚无治疗轮状病毒腹泻的特效药物, 国内常用病毒唑、阿司匹林、雷尼替丁、思密达等药物治疗, 但疗效并不满意, 且这类药物均有不同程度的毒副作用, 故都未能广泛应用。目前

尚无特效的轮状病毒疫苗^[3]。为寻找有效的抗轮状病毒中药, 选用 4 种大黄多糖 A、B、C、D 以及 A、C 进行配伍抗轮状病毒试验, 以期对轮状病毒感染的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

4 种大黄多糖 A、B、C、D 由华东理工大学周永传教授从大黄中提取; 人轮状病毒 R709 株为武汉市疾病预防控制中心王远虹主任惠赠, 恒河猴胚肾细胞 (MA-104) 为武汉大学医学病毒学研究所保存。细胞生长液分别为含 10% 胎牛血清 (GBCO) 的 RM-PI-1640, 常规加入青霉素和链霉素。细胞维持液除血清浓度为 2% 以外, 其余同细胞生长液。MA-104 细胞维持液加入 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰蛋白酶。病毒使用前

基金项目: 课题由福建省自然科学基金资助 (2007J0292)

作者单位: 430071 武汉大学医学病毒学研究所 病毒学国家重点实验室 (卫飞、刘婧、杨占秋); 厦门大学医学院基础医学部 (李晴)

第一作者简介: 卫飞 (1985 -), 男, 硕士研究生, 主要从事抗病毒药物的研究

通讯作者: 李晴, E-mail: sunnymaylq@hotmail.com



于恒河猴胚肾细胞活化增殖 3~4代,待细胞 CPE 达 75%以上(+++~++++)收获病毒,所有毒种均置 -80 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 药物对 MA-104细胞的毒性作用

根据 Mosmann建立的 MTT比色法检测药物的毒性作用^[4]。在 96孔板上,每孔加入 0.1 ml 2×10^5 浓度的 MA-104细胞,24 h待细胞长成单层后,加入不同浓度的含药维持液继续培养 72 h,MTT法检测细胞存活率。每一药物浓度均重复 4孔。同时设正常细胞对照。每次实验重复 3次。

用 SPSS1 3.0进行统计分析并计算药物的半数细胞毒性浓度(TC₅₀)。

细胞存活率(%) = (实验组平均 A₅₇₀值 / 细胞对照组平均 A₅₇₀值) × 100%

1.2.2 药物体外抗轮状病毒的药效学研究

通过以下 3种方式检测 4种大黄多糖抗轮状病毒(R709)的作用。(药物对病毒感染的预防作用):用不同浓度的药物预先处理单层细胞 24 h,后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2次,每孔加入 100TC_{D50} / 0.1 ml的 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 胰酶预处理的 RV,吸附 2 h,弃病毒上清,加细胞维持液,置于 37、5% CO₂ 孵箱培养,每日于倒置显微镜下观察细胞变化。待病毒对照病变达 +++~++++时,用 MTT法检测病毒抑制率。每一药物浓度均重复 4孔,同时设正常细胞对照和病毒对照。以 Probit 回归方法计算药物半数有效浓度(EC₅₀)。(药物对病毒的直接杀伤作用):分别将等量 100TC_{D50} / 0.1 ml的 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 胰酶预处理的 RV与 4种大黄多糖药液分别以不同浓度混合 2 h后,再将其感染单层细胞,吸附 2h后,弃上清,PBS洗涤 2次,加入细胞维持液同上法继续培养和观察。(药物对病毒增殖的抑制作用):先用 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 胰酶预处理的 100TC_{D50} / 0.1 ml的 RV病毒液感染细胞,于 37 吸附 2 h,弃病毒上清。加入不同浓度的含药维持液,同上法培养和检查。CPE记录方法为:- 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。最后用 MTT法检测病毒抑制率,并计算药物对 RV病毒抑制率。

病毒抑制率 = $\frac{\text{病毒处理组 A 值} - \text{病毒对照组 A 值}}{\text{细胞对照组 A 值} - \text{病毒对照组 A 值}} \times 100\%$

采用治疗指数(treatment index, TI)作为评价指标^[4],衡量药物对轮状病毒的抑制效力, TI = TC₅₀ / EC₅₀。

1.2.3 大黄多糖 A、C不同配伍体外抗轮状病毒作用的研究

具体参照韩锐主编的《肿瘤化学预防及药物治疗》中药物配伍的方法进行^[5],按上述药毒方法计算不同配伍的细胞毒性作用。再根据统计学处理,根据试验结果计算细胞存活率。

实验也是分为 3个组,方法如上所述。根据中效原理,通过体外药效学实验观察哪种为最适比例。将药物浓度与病毒抑制率存活率,进行 $\alpha = 0.05$ 水平的直线关系的检验。并如上计算治疗指数和合用指数(CI)。

1.2.4 统计学处理

所有数据以 Sigma Stat软件汇总并作统计学处理,分别采用线性回归分析、检验和 ² 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 四种大黄多糖体外抗轮状病毒作用

2.1.1 药物对 MA-104细胞的毒性作用

4种大黄多糖对 MA-104细胞的毒性作用表现为:细胞变圆,胞内颗粒增多,折光性减弱等。用 Probit回归计算药物的半数毒性浓度(TC₅₀)。经统计学分析,MTT显示细胞存活率与药液的浓度成正相关, $P < 0.05$ 有统计学意义。4种大黄多糖 A、B、C、D对 MA-104细胞的 TC₅₀分别为 54.85, 60.63, 61.02, 83.93 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.1.2 药物对病毒感染细胞的预防作用

RV所致 MA-104细胞的 CPE表现为:细胞大量聚集为菜花状,形态皱缩,变长,细胞拉网,折光性减弱,胞核圆缩和破裂。与病毒对照组相比,药物处理组的 CPE程度比病毒对照组轻。4种大黄多糖 A、B、C、D的 EC₅₀值分别为 6.95, 16.48, 17.05 和 14.05 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, TI值分别为 7.89, 3.68, 3.58 和 5.98,并呈一定的剂量依赖性关系, $P < 0.05$ 。表明 4种大黄多糖体外对轮状病毒具有良好的预防作用。

2.1.3 药物对病毒的直接杀伤作用

结合病毒抑制率,大黄多糖 A、B的 EC₅₀分别为 23.87和 32.86 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, TI值分别为 2.29和 1.84,表明这两种多糖对轮状病毒的直接杀伤作用微弱,MTT结果显示两实验组的病毒抑制率与病毒对照组之间无统计学差异($P > 0.05$),提示两种多糖不能十分有效的杀灭病毒。而大黄多糖 C、D对轮状病毒的直接灭活作用优于 A、B, TI值分别为 3.50和 4.13。

2.1.4 药物对病毒增殖的抑制作用

4种大黄多糖对 RV的抑制作用,用统计软件 Sigma Stat的 One Way ANOVA 进行分析表明,大黄

多糖 A、B、C在不同药物浓度下对的病毒抑制率与病毒对照相比 $P < 0.05$, 差异有显著性。A、B、C、D 对 MA-104 细胞的 EC_{50} 分别为 $17.62 \mu g \cdot ml^{-1}$, $18.69 \mu g \cdot ml^{-1}$, $12.92 \mu g \cdot ml^{-1}$ 和 $17.96 \mu g \cdot ml^{-1}$,

用统计软件分析, 4种大黄多糖间对 RV 增殖的抑制作用无统计学差异, $P > 0.05$ 。同时未见大面积的细胞病变, 表明 4种大黄多糖对轮状病毒增殖有良好的抑制作用。

表 1 大黄多糖 A、B、C、D 的 3种给药方式对轮状病毒的作用

药物 作用方式	不同浓度下病毒抑制率 (%)						TI
	$1 \mu g \cdot ml^{-1}$	$2 \mu g \cdot ml^{-1}$	$4 \mu g \cdot ml^{-1}$	$8 \mu g \cdot ml^{-1}$	$16 \mu g \cdot ml^{-1}$	$EC_{50} / \mu g \cdot ml^{-1}$	
感染阻断							
A	23.5	38.9	41.03	54.00	70.1	6.95	7.89
B	5.63	7.03	32.14	39.59	40.88	16.48	3.68
C	7.03	17.79	21.83	36.89	42.15	17.05	3.58
D	1.52	5.59	28.51	41.49	48.78	14.05	5.98
直接杀伤							
A	5.9	7.7	15.17	26.64	27.7	23.87	2.29
B	2.94	4.54	5.06	7.03	14.9	32.86	1.84
C	15.15	21.24	23.95	32.58	45.38	17.39	3.50
D	2.95	8.55	16.24	30.38	32.07	20.28	4.13
增殖抑制							
A	5.06	8.83	9.77	14.75	45.28	17.62	3.11
B	2.14	14.75	21.18	29.93	37.99	18.69	3.24
C	10.63	28.30	34.48	40.31	54.89	12.92	4.72
D	0.94	13.72	16.21	30.87	38.77	17.96	4.67

2.2 大黄多糖 A、C配伍体外抗轮状病毒的作用

2.2.1 大黄多糖 A、C配伍对细胞的毒性作用

在证明了大黄多糖的抗病毒效果后, 对其中两种活性较好的进行了配伍研究, 当 1 (Dm) 大黄多糖 A / 1 (Dm) 大黄多糖 C 合用时, 对 MA-104 细胞的细胞毒 EC_{50} 为 $55.72 \mu g \cdot ml^{-1}$ 。当 1 (Dm) 大黄多糖 A / 2 (Dm) 大黄多糖 C 合用时, 对 MA-104 细胞的细胞毒 EC_{50} 为 $58.15 \mu g \cdot ml^{-1}$ 。当 2 (Dm) 大黄多糖提取物 A / 1 (Dm) 大黄多糖 C 合用时, 对 MA-104 细胞的细胞毒 EC_{50} 为 $68.87 \mu g \cdot ml^{-1}$ 。经直线回归分析, 药物浓度与细胞存活率之间存在线性关系 ($P < 0.05$)。

2.2.2 大黄多糖 A、C配伍对 RV 侵入细胞的阻断作用

大黄多糖 A、C 分别以 1:1, 1:2, 2:2 比例进行配伍后, EC_{50} 分别为 18.47、14.85 和 $27.60 \mu g \cdot ml^{-1}$, TI 分别为 3.03、3.92 和 2.50。表明大黄多糖 A、C 配伍对轮状病毒感染有一定的预防作用。MTT 结果显示 1:1 配伍实验组与 2:1 配伍实验组的病毒抑制率与病毒对照间存在统计学差异 ($P < 0.05$)。并呈一定的剂量依赖关系。

2.2.3 大黄多糖 A、C 的配伍组合对 RV 直接灭活作用

结合病毒抑制率, 经统计处理可得其半数有效浓度 (EC_{50}) 分别为 12.81、7.91 和 $13.28 \mu g \cdot ml^{-1}$,

TI 分别为 4.35、7.35 和 5.19。表明大黄多糖 A、C 配伍后对轮状病毒有一定的直接杀伤作用, 且灭活作用随浓度变化而变化, 呈明显的量效关系。MTT 结果显示 1:2 配伍实验组与 2:1 配伍实验组的病毒抑制率与病毒对照间存在统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.2.4 大黄多糖 A、C 配伍组合对 RV 增殖的抑制作用

结合病毒抑制率, 经统计处理可得其半数有效浓度 (EC_{50}) 分别为 7.23、6.25 和 $7.84 \mu g \cdot ml^{-1}$, TI 值分别为 7.71、9.30 和 8.78。从 CPE 观察 A、C 不同配伍在浓度为 $8 \mu g \cdot ml^{-1}$ 时即有抑制病毒增殖作用。MTT 结果显示 3 种配伍实验组与病毒对照组病毒抑制率之间存在统计学差异 ($P < 0.05$)。

按中效方程式计算斜率 m、中效浓度 Dm 及相关系数 r (表 2)。大黄多糖 A、C 合用时对病毒直接杀伤作用中, 当 f_a 为 = 0.68 时, $CI=1$, 两药作用相加; $f_a < 0.68$ 时 (即所需较小药物剂量), 两药合用为协同作用 ($CI < 1$); $f_a > 0.68$ 时 (即所需较大药物剂量), 两药合用是拮抗作用 ($CI > 1$)。大黄多糖 A、B 合用时对病毒增殖的抑制作用作用中, 当 f_a 为 = 0.57 时, $CI=1$, 两药作用相加; $f_a < 0.57$ 时 (即所需较小药物剂量), 两药合用为协同作用 ($CI < 1$); $f_a > 0.57$ 时 (即所需较大药物剂量), 两药合用是拮抗作用 ($CI > 1$)。

表 2 大黄多糖 A、C 合用抗 RV 的中效方程参数

药物及用量比例	中效方程参数		
	斜率 (m)	中效浓度 (Dm) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	相关系数 (r)
感染阻断			
A	0.333	6.95	0.956
C	0.390	17.05	0.916
1 1	0.534	18.47	0.937
1 2	0.516	14.85	0.967
2 1	0.677	27.60	0.918
直接杀伤			
A	0.529	23.87	0.892
C	0.514	17.39	0.988
1 1	0.304	12.81	0.834
1 2	0.367	7.91	0.937
2 1	0.285	13.28	0.949
增殖抑制			
A	0.362	17.62	0.968
C	0.342	12.92	0.910
1 1	0.220	7.23	0.895
1 2	0.172	6.25	0.987
2 1	0.157	7.84	0.884

* 所有相关系数 (r), $P < 0.05$

表 3 大黄多糖 A、C 合用在不同效应 (fa) 时的合用指数 (CI)

药物及用量比例	合用指数 (Combination Index, CI)					
	0.7	0.6	0.5	0.3	0.2	0.1
直接杀伤						
1 1	1.45	0.79	0.45	0.25	0.14	0.06
1 2	0.81	0.57	0.41	0.29	0.21	0.14
2 1	0.96	0.48	0.25	0.14	0.07	0.03
增殖抑制						
1 1	2.03	0.96	0.48	0.24	0.12	0.05
1 2	5.30	1.44	0.44	0.13	0.04	0.01
2 1	4.23	2.09	0.50	0.11	0.02	0.01

3 讨论

中药大黄味苦寒,有泻实热、破积、解毒、消瘀的功效。研究证实大黄对多种细菌、病毒、螺旋体、支原体和原虫等病原微生物都有一定的抑制作用^[6]。中药来源的多糖作为一种高效、低毒的抗病毒药物,已在 AIDS、肝炎等的治疗方面显示出一定的应用前景^[7]。目前研究的较多的是香菇多糖^[8]、甘草多糖^[9]等,但是对大黄多糖的研究还很不足。

实验通过对不同浓度的药物以 3 种给药方式体外抗轮状病毒研究发现:4 种大黄多糖 A、B、C、D 有明显的预防 RV 对宿主细胞吸附和抑制病毒增殖作用。随药物浓度增加,药物抗病毒活性增强,并呈现一定的量效关系 ($P < 0.05$)。

但是,4 种多糖如果进行配伍进行组合,药物之间有无相互作用? 探讨药物进行配伍后的效果,因此采用了中效原理进行实验。因此选用治疗指数相对较高的 A、C 进行配伍实验。大黄多糖 A、C 以 1 配伍后合用效应(对病毒的直接杀伤)与合用指数关系表明:当 f_a 为 $=0.68$ 时, $CI=1$, 两药作用相加; $f_a < 0.68$ 时(即所需较小药物剂量), 两药合用为协同作用 ($CI < 1$); $f_a > 0.68$ 时, 两药合用是拮抗作用 ($CI > 1$)。而 1 配伍后对病毒增殖抑制作用的合用指数显示:当 f_a 为 $=0.57$ 时, $CI=1$, 两药作用相加; $f_a < 0.57$ 时, 两药合用为协同作用 ($CI < 1$); $f_a > 0.57$ 时, 两药合用是拮抗作用 ($CI > 1$)。

目前对于轮状病毒感染及发病的机制目前还不是很清楚^[10],且对大黄多糖的抗病毒研究也不是很多。实验研究结果表明,4 种大黄多糖体外有抗 RV 病毒作用,而大黄多糖 A、C 合用效果对病毒的直接杀伤作用和抑制病毒增殖作用优于其单独使用。提示中药的作用也不只是一种提取成分发挥作用,在提取的有效成分之间进行配伍组合可以得到药毒降低,药效增加的最佳组合。将在今后的工作中,从分子生物学、分子药理学水平对其抗病毒的作用靶点及有效部位进行深入的研究。

【参考文献】

- [1] 杨占秋,余宏. 临床病毒学 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000. 102 - 109.
- [2] Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott [J] Williams and Wilkins, 2007, 1917 - 94.
- [3] Margaret S Harrison. Rotavirus: an overview from discovery to vaccine [J]. Pediatric Nursing, 1998, 281.
- [4] Itohi Takeuchi, Masanori Baba, et al. An application of Tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-hepes simplex virus compounds [J]. J Viral Methods, 1991, 33: 61 - 71.
- [5] 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗 [M]. 北京:北京医科大学出版社, 1991.
- [6] Tona Antimoebie and PhytochemECal screening of some Congolese medicinal Plants [J]. EthnoPharmaeol, 1998, 61 (1): 57 - 65.
- [7] 李亚芳,张晓华. 多糖类药物的研究概况 [J]. 中国药师, 2002, 233 - 235.
- [8] 张福明,张淑芹,孙非. 香菇多糖对流感病毒的抑制作用 [J]. 长春中医药大学学报, 2006.
- [9] 王岳五,张海波,史玉荣. 甘草多糖 GPS 对病毒的抑制作用 [J]. 南开大学学报 (自然科学), 2001, 34 (2): 126 - 128.
- [10] Simpson E, Bonilla J. Use of formative research in developing a knowledge translation approach to rotavirus vaccine introduction in developing countries [J]. BMC Public Health, 2007, 7: 281.

(收稿日期: 2009-07-13)

(本文编辑: 万美)