

# 中药矮地茶不同洗脱部位抗病毒活性研究

刘相文, 侯林, 张晓平, 王剑, 田景振\*

山东中医药大学药学院, 济南 250355

**摘要:**采用细胞体外抗病毒实验 CPE 法结合 CCK-8 试剂盒, 以 TI 值(治疗指数)为研究指标, 研究矮地茶及其不同洗脱部位对呼吸道合胞病毒(RSV)、单纯疱疹病毒(HSV-1)、柯萨奇病毒(COX-B5)和手足口病毒(EV71)的抑制作用。结果表明矮地茶对 RSV、HSV-1、COX-B5 有显著杀灭作用。70% 乙醇部位对 COX-B5 直接杀灭效果较好, TI 值为 16.709, 较阳性对照药利巴韦林(TI 值为 17.482)作用效果相差不大。说明矮地茶提取物具有抗 RSV、HSV-1、COX-B5 的活性。

**关键词:**矮地茶; 抗病毒; RSV; HSV-1; COX-B5

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.020

## Antiviral Activity of Different Parts of *Ardisia japonica* (Thunb.) Blume

LIU Xiang-wen, HOU Lin, ZHANG Xiao-ping, WANG Jian, TIAN Jing-zhen\*

College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

**Abstract:** In this study, the *in vitro* antiviral activity of *Ardisia japonica* (Thunb.) Blume were evaluated by cytopathic effect (CPE) method and CCK-8 kit with 4 different strains of viruses, including RSV, HSV-1, COX-B5 and EV71. The therapeutic indexes were calculated by Reed-Muench method. Antivirus stability experiments of *A. japonica* were carried out at the same time. The results showed the cytopathic effect caused by RSV, HSV-1 and COX-B5 were significantly inhibited, the TI of 70% ethanol parts and ribavirin were 16.709 and 17.482, respectively. It showed that 70% ethanol parts was as effective as the ribavirin. All the results indicated that *A. japonica* had antiviral activity against RSV, HSV-1 and COX-B5.

**Key words:** *Ardisia japonica* (Thunb.) Blume; antiviral; RSV; HSV-1; COX-B5

矮地茶始载于《图经本草》,为紫金牛科植物紫金牛 *Ardisia japonica* (Thunb.) Blume 的干燥全草,味辛、微苦,平。归肺、肝经。具有化痰止咳,清利湿热,活血化淤的功效,用于新久咳嗽,喘满痰多,湿热黄疸,经闭瘀阻,风湿痹痛,跌打损伤<sup>[1]</sup>。《本草纲目》记载其有解毒破血的功效,是我国多个民族常用的化痰止咳传统药物。现代研究表明,矮地茶具有香豆素类、黄酮类、醌类<sup>[2]</sup>、三萜类<sup>[3]</sup>、挥发油<sup>[4]</sup>等化合物和 Ca、Fe、Zn、Mn、Cu、Pb、Cd 等微量元素<sup>[5]</sup>,具有抑癌<sup>[6,7]</sup>、降血糖<sup>[8,9]</sup>、抗菌驱虫<sup>[10]</sup>、抗 HIV 病毒<sup>[11,12]</sup>、抗炎镇痛<sup>[13]</sup>等药理作用。矮地茶在抗病毒领域研究较少,尚处于起步阶段,本实验研究选取了呼吸道合胞病毒(RSV)、单纯疱疹病毒

(HSV-1)、柯萨奇病毒(COX-B5)和手足口病毒(EV71)进行矮地茶提取物体外抗病毒研究,为建立矮地茶抗病毒谱-效模型提供科学依据和数据支撑,为抗病毒体内实验的研究奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品

矮地茶药材(购买于济南建联中药店,经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为紫金牛科植物紫金牛的干燥全草)。利巴韦林(山东鲁抗辰欣药业有限公司,批号:1410206811),阿昔洛韦(亚宝药业制药有限公司,批号:15062005)。

### 1.2 宿主细胞及病毒毒种

RSV、COX-B5、HSV-1、EV71、Hep-2(人喉癌细胞)、RD(人横纹肌肉瘤细胞):由山东省医学科学院基础医学研究所提供,本研究室保存。

### 1.3 主要试剂

细胞培养液:1640 细胞培养液(美国 HyClone

收稿日期:2016-09-22 接受日期:2016-11-14

基金项目:国家重大新药创制专项(2014ZX09509001);山东省高等学校中医药抗病毒协同创新中心课题(XTCX2014C01-01)

\* 通讯作者 Tel:86-531-89628080; E-mail: tianjingzhen@163.com

公司,批号 AAJ207653),含 10% 新生牛血清及 100 U/mL 青霉素和链霉素,过滤除菌,分装置 4 ℃ 备用。细胞维持液:1640 细胞培养液(美国 HyClone 公司,批号 AAJ207653),含 2% 新生牛血清牛血清及 100U/mL 青霉素和链霉素。新生牛血清:浙江天杭生物科技有限公司,批号 141013。清洗液:PBS 磷酸盐缓冲液(美国 HyClone 公司,批号 AAK2-8442)。细胞消化液:EDTA-0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司,批号 1737903)。试剂盒:Cell Counting Kit-8(上海碧云天生物技术有限公司,编号 C0039)。提取试剂:乙醇等化学试剂均为分析纯。

### 1.4 实验仪器

CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司, HF90);倒置显微镜(Olympus 公司,CKX-31);生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司, HFsafe-1200TE);酶标仪(Molecular Device, Spectra Max M5)。

## 2 实验方法

### 2.1 矮地茶供试品的制备

称取矮地茶粉末(过 40 目筛)100 g,用 10 倍量水回流提取 2 h,过滤,滤渣再加 8 倍量水回流提取 2 h,过滤,合并滤液,3000 rpm 离心 15 min,取上清液抽滤减压浓缩成浸膏,真空干燥,得产物 15 g,取 50 mg 用 2% 的 DMSO 溶液配成 16 mg/mL 的溶液,即为矮地茶水提物供试品溶液。

### 2.2 大孔树脂预处理及装柱

取 200 g D101 大孔树脂,加入 2 倍柱体积的 5% 氢氧化钠乙醇溶液作为浸泡溶剂,浸泡 3 h 后,滤取树脂装柱,用 4 倍柱体积 95% 的乙醇洗脱,洗脱速度为<sup>[14]</sup>,然后用水冲洗,直至与数倍量的水混合不显浑浊为止,再以湿法装柱。

### 2.3 上样及洗脱

将矮地茶水提物用水溶解,以一定的流速通过 D101 大孔树脂进行动态吸附,依次用 4 倍柱体积的蒸馏水、10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇进行洗脱,分别收集洗脱液,减压浓缩干燥,用 2% 的 DMSO 溶液配成 16 mg/mL 的溶液,即为供试品溶液。

### 2.4 阳性对照药供试品的制备

利巴韦林和阿昔洛韦用 2% 的 DMSO 溶液配成 50 mg/mL 的溶液作为阳性对照药供试品。

### 2.5 病毒的扩增

将病毒株(RSV、HSV-1、COX-B5、EV71)200 μL 接种于已经长成单层的 Hep-2 和 RD 细胞上,吸附 30 min 后加入 10 mL 2% 1640 和 DMEM 维持液置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 病毒培养箱中培养并设细胞对照,其中细胞对照相同操作将毒株换成维持液,每隔 4 h 观察一次,当细胞出现 90% 以上的病变时,取出,反复冻融 3 次,吹打离心(1000 rpm,20 min),取上清液定量分装于小青瓶中,胶布封口,放于-80 ℃ 超低温冰箱内保存待用。

### 2.6 病毒毒力的测定

#### 2.6.1 制备多孔板内单层细胞

将细胞培养瓶内 Hep-2、RD 细胞消化,以 10<sup>5</sup> 个/mL 细胞浓度接种 96 孔板,每孔 100 μL,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 h 后使用。

#### 2.6.2 病毒毒力的测定

将上述扩增好的病毒用 2% 培养液做 10 倍比系列稀释,稀释 10 个梯度,纵向重复 4 孔,依次接种于已长好细胞的 96 孔板中;同时设细胞对照,空白对照,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 病毒培养箱中培养,倒置显微镜逐日观察,细胞出现 90% 以上病变时终止培养,每孔加 10 μL CCK-8 染色,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 病毒培养箱中培养 3 h,用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度 OD 值。根据 Reed-Muench 公式计算病毒液的半数感染浓度 TCID<sub>50</sub>

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{各组 OD 值}}{\text{正常细胞 OD 值}} \times 100\%$$

$$\text{细胞比距} = \frac{(\text{高于 } 50\% \text{ 病变率} - 50\%)}{(\text{高于 } 50\% \text{ 病变率} - \text{低于 } 50\% \text{ 病变率})} \times 100\%$$

$$\text{TCID}_{50} = \text{Antilog} (10 \text{ g 高于 } 50\% \text{ CPE 百分率病毒稀释度} + \text{比距} \times \text{稀释因子对数})$$

### 2.7 药物对细胞毒性的测定

将矮地茶供试品药物用 2% 维持液按二倍比稀释 10 个浓度梯度,依次接种于已经长好细胞的 96 孔板中,并设 4 个复孔、细胞对照孔和空白对照孔,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 病毒培养箱中培养,倒置显微镜下观察,细胞出现 90% 病变时终止培养,每孔加 10 μL CCK-8 染色,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 病毒培养箱中培养 3 h,用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度 OD 值。应用 Reed-Muench 公式计算药物半数中毒浓度 TC<sub>50</sub>,并确定最大无毒浓度 TC<sub>0</sub>。

$$\text{TC}_{50} = [\text{Antilog} (\log \text{ 高于 } 50\% \text{ CPE 百分率病毒稀释度} + \text{比距})] \times C$$

## 2.8 矮地茶抗病毒实验

### 2.8.1 矮地茶对病毒直接杀灭作用

供试品从无毒浓度(见表2)起,用2%维持液按二倍比稀释10个浓度梯度,与等体积100倍TCID<sub>50</sub>浓度的病毒液相互作用2h,每孔100 μL依次接种于已经长好的Hep-2细胞的96孔板中,并设4个复孔、细胞对照孔、阳性对照孔和空白对照孔,置37℃、5% CO<sub>2</sub>病毒培养箱中培养,倒置显微镜下观察,细胞出现90%病变时终止培养,每孔加10 μL CCK-8染色,置37℃、5% CO<sub>2</sub>病毒培养箱中培养3h,用酶标仪在450 nm波长测定吸光度OD值,计算细胞存活率,应用Reed-Muench公式计算药物半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)和治疗指数(TI)。

$EC_{50} = [Antilog(\text{高于 } 50\% \text{ CPE 百分率病毒稀释度的值-比距})] \times C$

治疗指数(TI) = 半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)/半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)

### 2.8.2 矮地茶对病毒预防作用

供试品从无毒浓度(见表2)起,用2%维持液按二倍比稀释10个浓度梯度,每孔100 μL依次接种于已经长好细胞的96孔板中,2h后,用PBS清洗,每孔再加入100 μL 100倍TCID<sub>50</sub>浓度的病毒液,并设4个复孔、细胞对照孔、阳性对照孔和空白对照孔,置37℃、5% CO<sub>2</sub>病毒培养箱中培养,倒置显微镜下观察,细胞出现90%病变时终止培养,每孔加10 μL CCK-8染色,置37℃、5% CO<sub>2</sub>病毒培养箱中培养3h,用酶标仪在450 nm波长测定吸光度OD值,计算细胞存活率,计算药物半数有效浓度

(EC<sub>50</sub>)和治疗指数(TI)。

### 2.8.3 矮地茶对病毒穿入细胞后的阻断作用

已经长好细胞的96孔板中每孔加入100 μL 100倍TCID<sub>50</sub>浓度的病毒液,2h后,用PBS清洗,供试品从无毒浓度(见表2)起,用2%维持液按二倍比稀释10个浓度梯度,每孔100 μL接种,并设4个复孔、细胞对照孔、阳性对照孔和空白对照孔,置37℃、5% CO<sub>2</sub>病毒培养箱中培养,倒置显微镜下观察,细胞出现90%病变时终止培养,每孔加10 μL CCK-8染色,置37℃、5% CO<sub>2</sub>病毒培养箱中培养3h,用酶标仪在450 nm波长测定吸光度OD值,计算细胞存活率,药物半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)和治疗指数(TI)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 矮地茶抗病毒实验结果

实验表明,矮地茶对RSV、HSV-1、COX-B5、EV71均无预防作用和穿入后的抑制作用,对RSV、HSV-1、COX-B5有直接杀灭作用(见表2),对EV71无直接杀灭作用。蒸馏水部位对RSV直接杀灭作用较好, TI值为14.115,最大抑制率为86%,阳性对照药利巴韦林TI值为19.760,最大抑制率为90%。50%乙醇部位对HSV-1效果较好, TI值为11.858,最大抑制率为86%,阳性对照药阿昔洛韦TI值为23.432,最大抑制率为91%;70%乙醇部位对COX-B5效果较好, TI值为16.709,最大抑制率为87%,较阳性对照药利巴韦林(TI值为17.482,最大抑制率为85%)作用效果相差不大。

表1 四种病毒的TCID<sub>50</sub>

Table 1 TCID<sub>50</sub> of four viruses

病毒种类 Virus type	RSV	HSV-1	COX-B5	EV71
TCID <sub>50</sub>	10 <sup>-5.36</sup> /mL	10 <sup>-4.24</sup> /mL	10 <sup>-4.52</sup> /mL	10 <sup>-4.42</sup> /mL

表2 矮地茶对病毒直接杀灭作用结果

Table 2 Antiviral activity against RSV, HSV-1 and COX-B5

供试品 Testing sample	RSV				HSV-1			COX-B5		
	TC <sub>0</sub> (mg/mL)	TC <sub>50</sub> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	TI	TC <sub>50</sub> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	TI	TC <sub>50</sub> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	TI
水提液 Water extract	1.531	3.061	0.297	10.306	3.061	0.379	8.076	3.061	0.188	16.282
蒸馏水部位 Distilled water parts	0.614	1.228	0.087	14.115	1.228	-	-	1.228	0.088	13.955
10%乙醇部位 10% ethanol parts	0.872	1.743	-	-	1.743	-	-	1.743	-	-

供试品 Testing sample	RSV				HSV-1			COX-B5		
	TC <sub>0</sub> (mg/mL)	TC <sub>50</sub> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	TI	TC <sub>50</sub> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	TI	TC <sub>50</sub> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	TI
30% 乙醇部位 30% ethanol parts	0.827	1.653	0.235	7.034	1.653	0.235	7.034	1.653	-	-
50% 乙醇部位 50% ethanol parts	0.836	1.672	0.141	11.858	1.672	0.141	11.858	1.672	-	-
70% 乙醇部位 70% ethanol parts	0.719	1.437	0.103	13.951	1.437	0.125	11.496	1.437	0.086	16.709
95% 乙醇部位 95% ethanol parts	0.333	0.666	-	-	0.666	-	-	0.666	-	-
利巴韦林 Ribavirin	3.317	6.346	0.321	19.760	-	-	-	6.346	0.363	17.482
阿昔洛韦 Acyclovir	3.281	-	-	-	6.561	0.180	23.432	-	-	-

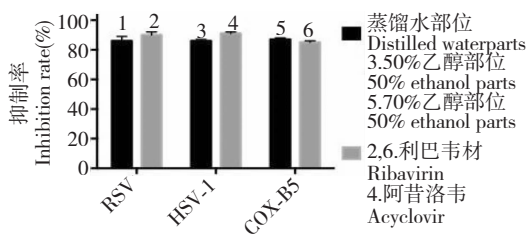


图1 矮地茶与利巴韦林、阿昔洛韦对不同病毒的最大抑制率比较

Fig. 1 Comparison of *A. japonica* with ribavirin and acyclovir on maximum inhibition rate

### 3.2 讨论

中药抗病毒作用具有多组分,多靶点,副作用小等特点,相比化学药和生物疫苗,中药对各类病毒感染的预防和治疗具有独特的药物作用优势,本实验首先考察了矮地茶水提物对 COX-B5、RSV、HSV-1、EV71 的抗病毒作用效果,结果显示其对 RSV、HSV-1、COX-B5 有作用,对 EV71 无效;为了进一步研究其有效成分,对矮地茶水提物进行大孔树脂洗脱分离纯化,并对各洗脱部位分别进行抗病毒实验,发现 70% 乙醇部位对 COX-B5 效果较好,较阳性对照药利巴韦林相差不大,但利巴韦林其治疗结果存在副作用,最显著的是贫血<sup>[15]</sup>,这使得寻找安全有效、副作用少的天然抗病毒药物尤为重要。接下来的研究工作应该对中药矮地茶 70% 乙醇部位进行进一步分离纯化,找到针对 COX-B5 有效的一种或几种成份,对中药矮地茶抗病毒作用进行精准阐述,在此基础上形成严谨科学的中药材抗病毒研究思路,加强对其他传统中药的抗病毒物质基础和作用机制研究,为建立中药材抗病毒平台奠定一定的基础。

### 参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会).

Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 361.

- Li YF, Li J, Shen Q, et al. Benzoquinones from *Ardisia japonica* with Inhibitory Activity towards Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B). *Chem Biodivers*, 2007, 4:961-965.
- Huang J, Ogihara Y, Zhang H, et al. Triterpenoidsaponins from *Ardisiamamillata*. *Phytochemistry*, 2000, 54:817-822
- Lu JQ(卢金清), Hu J(胡俊), Tang YX(唐瑶兴), et al. Analysis of the chemical constituents of essential oil from *Ardisiajaponica* by GC-MS. *Chin Pharm(中国药业)*, 2012, 21(1):10-11.
- Xu QH(许晴涵), Wang LG(王良贵), Wang PH(王品横), et al. Speciation analysis of trace elements in *Japanese ardisia* Herb from different regions. *J Anhui Agric Sci(安徽农业科学)*, 2014, 42:7395-7397.
- LI Q, Li W, Hui LP, et al. 13,28-Epoxy triterpenoidsaponins from *Ardisia japonica* selectively inhibit proliferation of liver cancer cells without affecting normal liver cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22:6120-6125.
- Chang XL, Li W, Jia ZH, et al. Biologically active triterpenoidsaponins from *Ardisiajaponica*. *J Nat Prod*, 2007, 70:179-187.
- Li YF, Hu LH, Lou FC, et al. PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(1):13-18.
- Li YF, Li Jia, Shen Q, et al. Benzoquinones from *Ardisia japonica* with inhibitory activity towards human protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). *Chem Biodiver*, 2007, 4:961-965.
- Mohammad NA, Shimul B, Md I, et al. A study on *Ardisiasolanacea* for evaluation of phytochemical and pharmacological properties. *J Pharm Phytochem*, 2015, 7(1):8-15.
- Nguyen TD, KiHwan B, Antony W, et al. A dimeric lactone from *Ardisia japonica* with inhibitory activity for HIV-1 and HIV-2 ribonuclease H. *J Nat Prod*, 2007, 70:839-841.

(下转第 158 页)