

# 鱼腥草多糖的制备及其体外抗病毒活性研究

刘苗苗,崔清华,范路路,李忠原,田景振\*

山东中医药大学药学院,济南 250355

**摘要:**以不同方法制备鱼腥草多糖,探究其体外抗 EV71、RSV、CV-B3 三种病毒的活性。分别采用胃蛋白酶解法、胃蛋白酶解-Sevag 结合 pH = 4、胃蛋白酶解-Sevag 结合 pH = 7 试剂法制备多糖,并检测其含量;采用 CPE 法考察不同提取工艺的多糖和鱼腥草水提取物对 EV71、RSV 和 CV-B3 的体外抗病毒作用。鱼腥草不同冻干产物—水提取物、酶法提取多糖、酶法-Sevag pH = 7 提取多糖、酶法-Sevag pH = 4 提取多糖得率分别为 1.87%、1.01%、0.83%、0.88%,多糖含量分别为 18.21%、22.68%、29.03%、23.07%;对 EV71 的治疗指数为 24.05、2.73、12.59、6.39(阳性药利巴韦林的治疗指数为 43.16),治疗效果为水提取物 $\approx$ 酶法-Sevag pH = 7 提取多糖 $>$ 酶法-Sevag pH = 4 提取多糖 $>$ 酶法提取多糖;对 RSV 的治疗指数分别为 2.46、5.43、15.57、9.72(利巴韦林为 19.76),治疗效果为酶法-Sevag pH = 7 提取多糖 $>$ 酶法-Sevag pH = 4 提取多糖 $>$ 酶法提取多糖 $>$ 水提取物,对 CV-B3 的治疗指数为 2.81、5.34、17.86、5.98(利巴韦林为 18.39),治疗效果为酶法-Sevag pH = 7 提取多糖 $>$ 酶法-Sevag pH = 4 提取多糖 $\approx$ 酶法提取多糖 $>$ 水提取物。说明鱼腥草水提取物和 3 种方法制备的多糖对 EV71、RSV 和 CV-B3 均具有一定的体外抗病毒活性。

**关键词:**鱼腥草;多糖;EV71;RSV;CV-B3

中图分类号:R969.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)1-0110-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.1.016

## Preparation of *Houttuynia cordata* polysaccharide and its antiviral activity *in vitro*

LIU Miao-miao, CUI Qing-hua, FAN Lu-lu, LI Zhong-yuan, TIAN Jing-zhen\*

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

**Abstract:** *Houttuynia cordata* polysaccharide was prepared by different methods to investigate its anti-EV71, RSV and CV-B3 activities *in vitro*. Polysaccharides were prepared by pepsin hydrolysis, pepsin hydrolysis-Sevag with pH = 4, and pepsin hydrolysis-Sevag with pH = 7. The antiviral effects of polysaccharides and *houttuynia* *houttuyniae* extracts on EV71, RSV and CV-B3 *in vitro* were investigated by CPE method. Different lyophilized products of *Houttuynia cordata*—water extract, enzymatic extraction of polysaccharide, enzymatic method-Sevag pH = 7 extraction of polysaccharide, enzymatic method-Sevag pH = 4 extraction yield were 1.87%, 1.01%, 0.83%, 0.88, and the polysaccharide content was 18.21%, 22.68%, 29.03%, 23.07%, respectively. The therapeutic index for EV71 was 24.05, 2.73, 12.59, 6.39 (the therapeutic index of positive drug ribavirin was 43.16), and the therapeutic effect was water extract  $\approx$  extraction of polysaccharides by enzyme-Sevag pH = 7  $>$  extraction rate of polysaccharide by enzyme-Sevag pH = 4  $>$  extraction of polysaccharide by enzyme. The therapeutic indexes of RSV were 2.46, 5.43, 15.57, 9.72 (ribavirin was 19.76), and the therapeutic effect was extraction of polysaccharides by enzyme-Sevag pH = 7  $>$  extraction rate of polysaccharide by enzyme-Sevag pH = 4  $>$  extraction of polysaccharide by enzyme  $>$  water extract. The therapeutic indexes of CV-B3 were 2.81, 5.34, 17.86 and 5.98 (ribavirin was 18.39), and the therapeutic effect was as follows: extraction of polysaccharides by enzyme-Sevag pH = 7  $>$  Extraction rate of polysaccharide by enzyme-Sevag pH = 4  $\approx$  extraction of polysaccharide by enzyme  $>$  water extract. These results indicated that the polysaccharides prepared from the water extract of *Houttuynia cordata* and three methods have certain antiviral activity *in vitro* for EV71, RSV and CV-B3.

**Key words:** *Houttuynia cordata*; polysaccharide; EV71; RSV; CV-B3

收稿日期:2019-05-28 接受日期:2019-12-13

基金项目:国家重大新药创制专项(2017ZX09301030);山东省自然科学基金(ZR2019MH078)

\* 通信作者 E-mail:Tianjingzhen@163.com

鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)原产于东南部和东南部东北亚国家开花植物,为三白草科植物蕺菜的新鲜全草或干燥地上部分。鱼腥草在我国医

学体系中有悠久的历史,有清热解毒的功效,可治疗肺痈吐脓、痰热喘咳、热淋、热痢、痈肿疮毒等症<sup>[1]</sup>。

现代研究表明,鱼腥草具有抗病毒、抗菌、抗炎、抗氧化、解热、镇痛、抑制血小板聚集等作用<sup>[2-5]</sup>。在抗病毒方面,鱼腥草对于多种病毒(如 HSV-1、HIV、H1N1 等)<sup>[6,7]</sup>均有很好的抑制效果,并且在已经应用于临床的抗病毒药物(如莲花清瘟胶囊、四季抗病毒合剂、鱼腥草抗病毒合剂等)的组方中均可见鱼腥草。

据报道,鱼腥草水提取物能够抑制单纯疱疹病毒 1 型(HSV),甲型流感病毒,人类免疫缺陷病毒(HIV)<sup>[6]</sup>和重症病毒急性呼吸综合征病毒(SARS-CoV)<sup>[8]</sup>等病毒的活性。在鱼腥草水提物的活性成分中,芦丁、金丝桃苷、绿原酸等<sup>[8]</sup>都被证明有着不同程度的抗病毒效果。在水提物中,多糖占据着很大的比例,而天然药物中所含的多糖类成分通常有着很好的抗病毒作用,如金银花多糖<sup>[9]</sup>、香菇多糖<sup>[10]</sup>、黄芪多糖<sup>[11]</sup>等。目前鱼腥草多糖已经被证实有着多种药理活性,包括抗氧化<sup>[2]</sup>、抗补体活性<sup>[12]</sup>、抑菌<sup>[13]</sup>、免疫调节<sup>[14]</sup>以及抑制癌细胞<sup>[15]</sup>等作用,此外,鱼腥草多糖还能够有效地改善由流感病毒引起的肺炎以及肠道损伤<sup>[16]</sup>,同时,鱼腥草多糖对小鼠诺如病毒也显示出了良好的抑制能力<sup>[17]</sup>。然而,鱼腥草多糖是否对病毒本身有着直接的抑制作用却很少有人研究。我们在前期预实验中发现水提醇沉法处理鱼腥草所得沉淀物抗病毒活性高于水提物,而沉淀物中以多糖类成分为主。因此,本实验以体外抗病毒为指标,提高鱼腥草多糖纯度,以期为进一步研究提供理论依据。

## 1 实验材料

### 1.1 药品及主要试剂

鱼腥草饮片,购买于安国市祁澳中药饮片有限公司(产地:湖南,批号:1805368121);利巴韦林注射液(rebavirin injection,山东鲁抗辰欣药业有限公司,批号:1511196821);Sevage 试剂(氯仿:正丁醇 = 5:1);胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:20220110);1640 培养基(HyClone 公司,产品批号:AAJ207653);青链霉素混合液(美国 Gibco 公司,批号:15140-122);磷酸盐缓冲液(PBS,美国 Gibco 公司 Lot:8118102);胰酶消化液(0.25% Trypsin-EDTA,美国 Gibco 公司, Lot:1859509);二甲基亚砜(DMSO,美国 Amresco 公司,批号:

520C0322);噻唑蓝染液(MTT,百赛生物技术有限公司,批号:1636c097)。

### 1.2 宿主细胞及病毒毒种

人恶性胚胎横纹肌肉瘤细胞(RD 细胞)、人喉癌上皮细胞(Hep2 细胞)购自上海生博生物医药科技有限公司;柯萨奇病毒 B3(Coxsackievirus B3, CV-B3)、肠道病毒 71 型(Human Enterovirus 71, EV71)、呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus, RSV)由山东省医学科学院基础医学研究所提供,本实验室保存。

### 1.3 仪器

MK3 酶标仪(labsystems);电热恒温培养箱;超净工作台(苏州净化);生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司,HFsafe-1200TE);全自动高压灭菌锅(YMS-280B 型,宁波镇海金鑫);TDD5M 台式平衡离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);CKX-31 倒置显微镜(Olympus 公司);CO<sub>2</sub> 细胞恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司,HF90);冷冻干燥机(德国 Christ 公司,ALPHA 1-4 LD plus)。

## 2 实验方法

### 2.1 鱼腥草水提物的制备

取干燥鱼腥草药材,粉碎,过 40 目筛。称取鱼腥草粉末 200 g 置于圆底烧瓶,加入 10 倍量蒸馏水,加热回流提取,重复提取 3 次,每次 2 h。药液过滤,离心(3 000 rpm, 5 min),取离心所得上清液,抽滤,旋转蒸发器减压浓缩(70 °C, -0.085 MPa)至 1 g/mL(原药材比例),得鱼腥草水提浓缩液。取浓缩液 400 mL, -20 °C 预冻 2 h, -80 °C 冷冻干燥 12 h,得到水提物(S1)。其余备用,制备鱼腥草多糖。

### 2.2 鱼腥草多糖的不同制备工艺

#### 2.2.1 酶法除蛋白

取 2.1 项下鱼腥草水提浓缩液 200 mL,盐酸调至 pH = 2,加 1.8% 胃蛋白酶,40 °C 水浴 10 h,离心(3 000 rpm, 5 min),抽滤,取滤液;加 0.5% 活性炭,80 °C 水浴 1 h 除色素,抽滤,取滤液;放置至室温,80% 醇沉 48 h,离心,取沉淀,沉淀转移至蒸发皿中,60 °C 挥干 2 h, -20 °C 预冻 2 h, -80 °C 冷冻干燥 12h,得到干燥产物(S2),计算得率,同法重复三次。

#### 2.2.2 酶法-Sevage(pH = 7)法除蛋白

取浓缩鱼腥草水提浓缩液 200 mL,盐酸调 pH 至 2,加 1.8% 胃蛋白酶,40 °C 水浴 5 h,离心(3 000 rpm, 5 min),上清液抽滤,取滤液,NaOH 溶液调至 pH = 7,分 5 次加入 Sevage 试剂(每次加入量为药液

的 1/5), 每次加完后离心取上清液再次加入 Sevag 试剂。第五次上清液加 0.5% 活性炭, 80 °C 水浴 1 h 除色素, 放冷至室温, 80% 醇沉 48 h, 离心, 取沉淀, 沉淀转移至蒸发皿中, 60 °C 挥干 2 h, -20 °C 预冻 2 h, -80 °C 冷冻干燥 12 h, 得干燥产物(S3), 重复三次。

### 2.2.3 酶法-Sevag(pH = 4)法除蛋白

取浓缩鱼腥草水提浓缩液 200 mL, 盐酸调至 pH = 2, 加 1.8% 胃蛋白酶, 40 °C 水浴 5 h, 离心(3 000 rpm, 5 min), 抽滤, NaOH 调至 pH = 4, 分 5 次加入 Sevag 试剂(每次加入量为药液的 1/5), 每次加完后离心取上清液再次加入 Sevag 试剂。第五次上清液加 0.5% 活性炭, 80 °C 水浴 1 h 除色素, 放冷至室温, 80% 醇沉 48 h, 离心, 取沉淀, 沉淀转移至蒸发皿中, 60 °C 挥干 2 h, -20 °C 预冻 2 h, -80 °C 冷冻干燥 12 h, 得干燥产物(S4), 重复三次。

## 2.3 鱼腥草多糖含量的测定(苯酚-浓硫酸法)

### 2.3.1 标准曲线的建立

取分析纯无水葡萄糖适量, 干燥至恒重。精密称取干燥的葡萄糖 60 mg, 置于 100 mL 容量瓶, 加水定容, 超声混匀, 得葡萄糖对照品溶液。用移液枪取葡萄糖对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 分别置于 50 mL 的容量瓶中, 加水定容并超声混匀, 得对照品梯度溶液 M1、M2、M3、M4、M5, 备用。取对照品梯度溶液 M1、M2、M3、M4、M5 各 2 mL 于试管中, 各加 4% 苯酚溶液 1 mL 混匀再迅速加入硫酸 7 mL, 摇匀。40 °C 水浴 30 min, 取出再冰水浴 5 min。

以蒸馏水调零并于 490 nm 处测定吸光度值, 每组平行测定三次, 取均值。以吸光度 A 为纵坐标, 浓度 C 为横坐标, 建立标准曲线。

### 2.3.2 多糖含量的测定

分别称取 S1、S2、S3、S4 粉末适量, 精密称定, 置于 50 mL 容量瓶中, 加水定容得样品溶液 Z1、Z2、Z3、Z4。取样品溶液 Z1、Z2、Z3、Z4 各 2 mL 于试管中, 各加 4% 苯酚溶液 1 mL 混匀再迅速加入硫酸 7 mL, 摇匀。40 °C 水浴 30 min, 取出再冰水浴 5 min。

以蒸馏水调零并于 490 nm 处测定吸光度值, 每组平行测定三次, 取均值。代入得出的标准曲线方程中, 计算相应的浓度, 以及各干燥产物的多糖含量。

## 2.4 鱼腥草抗病毒活性实验

### 2.4.1 不同供试液的制备

分别称取适量 S1、S2、S3、S4、2% DMSO 的细胞维持液配制为 20 mg/mL 的溶液, 涡旋、超声 10 min 以充分溶解。0.22 μm 微孔滤膜除菌过滤, 分装至

1 mL 无菌 EP 管中, 即得 Y1、Y2、Y3、Y4。

### 2.4.2 阳性对照药的制备

利巴韦林注射液采用原液, 浓度为 50 mg/mL。

### 2.4.3 细胞的复苏与培养

-80 °C 冰箱中取出保存有宿主细胞的冻存管, 室温融化。超净工作台内, 将细胞悬液转移到无菌离心管中, 离心(800 rpm, 5 min), 弃去上清液, 加入 0.5 mL 细胞培养液(10% FBS), 吹打细胞, 吸取新得到的细胞悬液转移至培养瓶内, 置于 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 75%) 中培养即可。

### 2.4.4 病毒的扩增

将 0.5 mL 病毒液接种于生长状态良好的宿主细胞上, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 病毒培养箱中培养, 另设细胞对照, 加入 0.5 mL 细胞维持液(2% FBS), 同法培养 1 h 后, 将病毒瓶和对照瓶加入 4.5 mL 细胞维持液, 继续培养 24 h。待 90% 的细胞发生病变时, 反复冻融 3~4 次, 离心(1 000 rpm, 5 min), 取上清液定量分装, 置于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

### 2.4.5 病毒毒力的测定

取处于指数生长期、生长状态良好的宿主细胞, 将其消化并稀释浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h, 待其长成单层细胞后, 弃掉培养液。以 10 倍比稀释待测病毒液, 共稀释 10 个浓度梯度, 依次加入到长满单层细胞的 96 孔板中, 设置 4 个复孔, 另设细胞对照孔。置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培箱中培养, 用倒置显微镜观察, 至 90% 的细胞发生病变时停止培养。每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL 染色, 于病毒培养箱中培养 4 h, 吸弃染液, 加入 100 μL DMSO, 室温脱色 10 min, 用 MK3 酶标仪(labsystems)测定其在 490 nm 波长的吸光度(OD 值), 并计算病毒液的半数感染浓度(TCID<sub>50</sub>)。

$$\text{细胞存活率} = \text{各组 OD 值} /$$

$$\text{正常细胞 OD 值} \times 100\%$$

$$\text{细胞比距} = (\text{高于 50\% 病变率} - 50\%) /$$

$$(\text{高于 50\% 病变率} - \text{低于 50\% 病变率}) \times 100\%$$

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

### 2.4.6 药物对细胞毒性的测定

将处于指数生长期、生长状态良好的宿主细胞, 消化并稀释浓度至  $1 \times 10^5$  个/mL, 每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h, 待其长成单层细

胞,弃掉培养液。鱼腥草水提液用细胞维持液按 2 倍比稀释 10 个浓度梯度,依次接种于长满宿主细胞的 96 孔板中,设 3 个复孔、空白对照孔及细胞对照孔,于病毒培养箱中培养并观察细胞病变情况。

2.4.7 抗病毒活性测定实验

分别将供试液 Y1、Y2、Y3、Y4 和利巴韦林阳性药二倍比稀释 10 个浓度梯度,取 100 μL 药液与等体积 100 倍 TCID<sub>50</sub> 浓度的病毒液相互作用 2 h 后,接种于单层宿主细胞上,设 3 个复孔,设为各药物组和利巴韦林阳性对照组;加入 100 μL 维持液和 100 μL 病毒液设为病毒对照组;加入 200 μL 维持液设为细胞对照组;加入 100 μL 药液和 100 μL 病毒液,

另设为无细胞的空白对照组。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。待病毒对照组细胞出现 90% 及以上病变时停止培养,采用 CPE 法记录药物抑毒情况,并用 MTT 法测定每孔在 490 nm 波长下的 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> 及治疗指数(TI),C 为供试品初始浓度。

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

$$治疗指数(TI) = 半数毒性浓度(TC_{50}) / 半数有效浓度(EC_{50})$$

3 实验结果

3.1 鱼腥草提取结果

表 1 鱼腥草不同干燥产物得率 (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ )

Table 1 Yield of different dry products of *Houttuynia cordata* (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ )

干燥产物 Dry product	浓缩液体积 The volume of concentrate (mL)	质量 Wight (g)	得率 Yield (%)	处理方法 Method
S1	400	7.487 8 ± 0.151 517	1.87 ± 0.037 879	水提 Water extract
S2	200	2.027 0 ± 0.080 885	1.01 ± 0.040 443	酶法 Enzyme treatment
S3	200	1.663 0 ± 0.121 045	0.83 ± 0.060 522	酶法 Enzyme treatment (Sevag pH = 7)
S4	200	1.754 6 ± 0.107 611	0.88 ± 0.053 805	酶法 Enzyme treatment (Sevag pH = 4)

对鱼腥草不同干燥产物的质量与得率进行了测定:水提物取 400 mL 浓缩液直接冻干获得 7.487 8 g 冻干粉 S1,得率为 1.87%;其余三种酶处理水提液各取 200 mL 浓缩液进行处理并冻干,分别获得冻干粉 S2 为 2.027 0 g、S3 为 1.663 0 g、S4 为 1.754 6 g,得率分别是 1.01%、0.83%、0.88%。

3.2 鱼腥草水提物不同处理方法产物多糖含量测定结果

3.2.1 标准曲线的建立

依据 2.3.1 中的方法,计算对照品梯度溶液 M1、M2、M3、M4、M5 葡萄糖溶液的浓度,并测量各自的吸光度,以对照品梯度溶液的葡萄糖浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,得回归方程为:A =

13.889C + 0.062 5 (A-吸光度;C-葡萄糖浓度);R<sup>2</sup> 为 0.999 1。所得回归曲线:

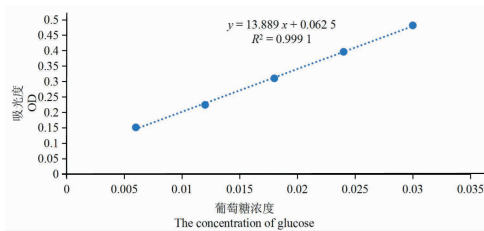


图 1 葡萄糖浓度曲线

Fig. 1 Glucose concentration curve

3.2.2 鱼腥草水提物不同处理方法产物多糖纯度 对样品溶液 Z1、Z2、Z3、Z4 进行吸光度测定并计算其多糖的浓度与纯度,结果如下表。

表 2 不同样品的多糖浓度 (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ )

Table 2 Polysaccharide concentrations of different samples (n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ )

样品编号 Sample No.	A	多糖浓度 Concentration of polysaccharide (按葡萄糖计算 mg/mL) (Measured by glucose mg/mL)	样品取样量 Weight of sample (g)	样品的多糖纯度 Purity (%)
S1	0.366 0 ± 0.000 816	0.021 9 ± 0.000 059	0.003 0	18.209 9 ± 0.048 989
S2	0.478 3 ± 0.000 471	0.029 9 ± 0.000 034	0.003 3	22.681 6 ± 0.025 713
S3	0.465 7 ± 0.000 471	0.029 0 ± 0.000 034	0.002 5	29.027 8 ± 0.033 941
S4	0.447 3 ± 0.000 816	0.027 7 ± 0.000 059	0.003 0	23.069 8 ± 0.048 989

表3 三种病毒的 TCID<sub>50</sub>  
Table 3 TCID<sub>50</sub> of three viruses

病毒类型 Virus	EV71 (RD)	RSV (Hep2)	CV-B3 (Hep2)
TCID <sub>50</sub>	10 <sup>-4.31</sup>	10 <sup>-3.89</sup>	10 <sup>-3.94</sup>

注:表()内为病毒各自的宿主细胞。

Note: Table () is the host cell of each virus.

结果如表2所示,S3的多糖纯度最高。多糖纯度由高到低为S3>S4>S2>S1。

### 3.3 病毒毒力测定结果

按照上文2.4.5测定EV71、RSV以及CV-B3这三种病毒的病毒毒力以半数感染浓度TCID<sub>50</sub>来表示,分别如上表所示。其中EV71病毒的宿主细胞是RD细胞,而RSV和CV-B3病毒的宿主细胞是

Hep2细胞。

### 3.4 鱼腥草水提取物及3种多糖的体外抗病毒结果

鱼腥草水提取物不同处理方法所得四种样品对于这三种病毒则均显示出一定的抑制作用。

不同形态细胞见图2、图3、图4;抗病毒结果见表4。

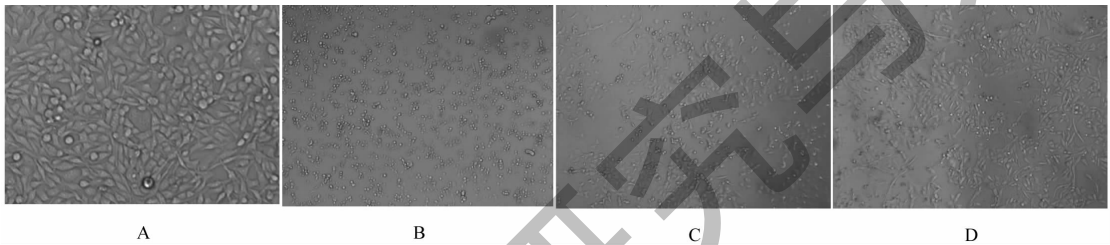


图2 鱼腥草多糖体外抗EV71结果

Fig. 2 Anti-EV71 results of *houuttuynia cordata* polysaccharide *in vitro*

注:A. 正常RD细胞;B. EV71病毒感染对照组细胞;C. 阳性药利巴韦林对照组;D. 鱼腥草有效对照组(鱼腥草水提取物)。Note: A. Normal RD cells; B. Cells infected with EV71 virus; C. Cells treated with ribavirin; D. Cells treated by *houuttuynia cordata* (water extract).

EV71的宿主细胞RD细胞在正常状态下呈现饱满的梭形状,在感染病毒后出现大量细胞死亡现象;在药物毒性实验组中,由于药物自身毒性也使

得RD细胞出现死亡的状况;经过阳性药利巴韦林以及鱼腥草水提取物治疗过的感染病毒RD细胞存活率与细胞形态出现好转。

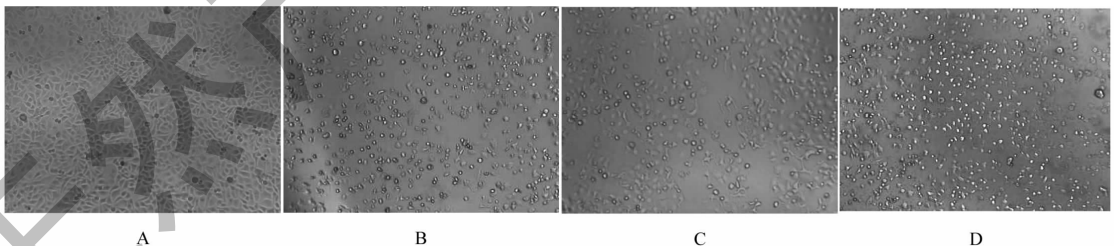


图3 鱼腥草多糖体外抗RSV结果

Fig. 3 Anti-RSV results of *Houuttuynia cordata* polysaccharide *in vitro*

注:A. 正常Hep2细胞;B. RSV病毒感染对照组细胞;C. 阳性药利巴韦林对照组;D. 鱼腥草有效对照组(酶法-Sevage pH = 7)。Note: A. Normal Hep2 cells; B. Cells infected with RSV virus; C. Cells treated with ribavirin; D. Cells treated by *houuttuynia cordata* (Enzyme treatment Sevage pH = 7).

RSV病毒的宿主细胞Hep2细胞正常状态呈现饱满的多边状态,感染病毒后出现大量的细胞破裂、死亡;经过阳性药利巴韦林以及鱼腥草水提取物治疗过的感染病毒Hep2细胞存活率与细胞形态出现好

转。

CV-B3病毒的宿主细胞Hep2细胞正常状态呈现饱满的多边状态,感染病毒后出现大量的细胞破裂、死亡;经过阳性药利巴韦林以及鱼腥草水提取物治

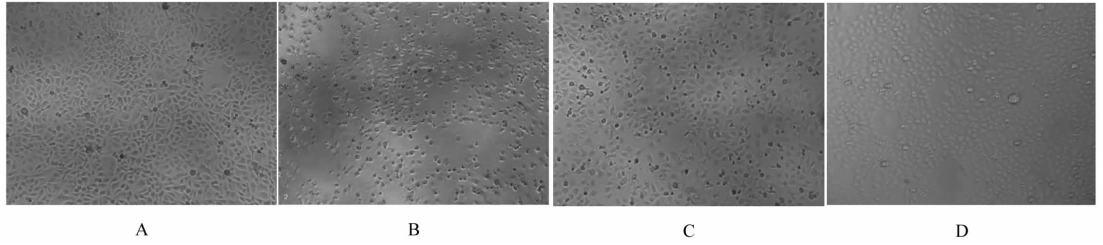


图4 鱼腥草多糖体外抗 CV-B3 结果

Fig. 4 Anti-CV-B3 results of *houuttynia cordata* polysaccharide *in vitro*.

注: A. 正常 Hep2 细胞; B. CV-B3 病毒感染对照组细胞; C. 阳性药利巴韦林对照组; D. 鱼腥草有效对照组 (酶法-Sevage pH = 7)。Note: A. Normal Hep2 cells; B. Cells infected with CV-B3 virus; C. Cells treated with ribavirin; D. Cells treated by *houuttynia cordata* (Enzyme treatment Sevag pH = 7).

疗过的感染病毒 Hep2 细胞存活率与细胞形态出现好转,且最优的鱼腥草水提物组对于病毒的抑制作用较利巴韦林的抑制作用差异较小。

表4 鱼腥草水提物及3种多糖体外抗病毒结果 ( $n = 3, \bar{x} \pm SD$ )

Table 4 *In vitro* antiviral results of water extracts and 3 polysaccharides from *Houttuynia cordata* ( $n = 3, \bar{x} \pm SD$ )

供试品 Sample	TC <sub>50</sub> (mg/mL)			EC <sub>50</sub> (mg/mL)		
	EV71	RSV	CV-B3	EV71	RSV	CV-B3
Y1	1.726 6 ± 0.107 3	1.653 9 ± 0.221 3	1.313 4 ± 0.321 4	0.071 8 ± 0.013 8	0.677 1 ± 0.006 4	0.467 8 ± 0.020 7
Y2	0.791 8 ± 0.149 6	2.132 4 ± 0.116 0	2.282 2 ± 0.007 6	0.289 8 ± 0.069 2	0.392 6 ± 0.001 6	0.427 4 ± 0.008 5
Y3	1.717 1 ± 0.610 0	4.697 6 ± 0.215 3	4.525 0 ± 0.020 4	0.136 4 ± 0.031 9	0.301 8 ± 0.005 1	0.253 3 ± 0.009 4
Y4	2.464 2 ± 0.224 5	3.435 7 ± 0.397 8	2.058 0 ± 0.021 1	0.385 5 ± 0.047 1	0.353 3 ± 0.085 9	0.344 4 ± 0.107 4
利巴韦林 Ribavirin	2.280 2 ± 0.251 4	6.343 0 ± 0.210 9	6.344 6 ± 0.350 9	0.076 0 ± 0.0210 3	0.321 0 ± 0.009 5	0.345 0 ± 0.101 4

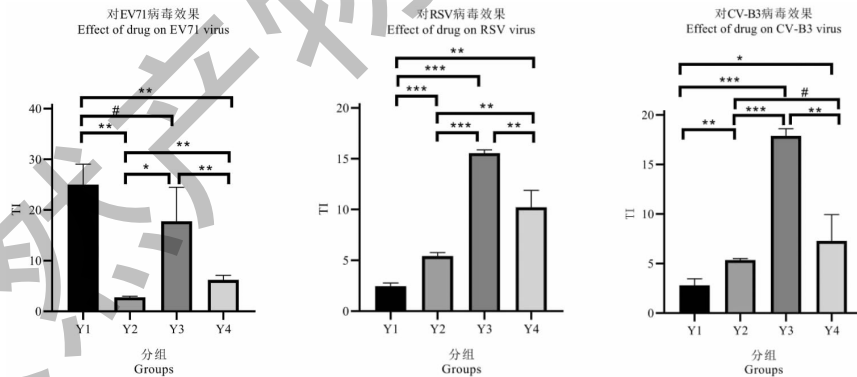


图5 鱼腥草水提物及3种多糖体外抗三种病毒 TI 值比较 (t 检验)

Fig. 5 Comparison of TI virus values of water extracts and 3 polysaccharides from *Houttuynia cordata* *in vitro* (t test)

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , #  $P > 0.05$ 。

对 EV71 的抑制作用,鱼腥草水提物不同处理方法所得样品对其治疗指数分别为: Y1-24.05; Y2-2.732 2; Y3-12.593 3; Y4-6.392 2。通过对各组间进行两两比较的组间 t 检验 (结果如图 5),发现 Y1 与 Y3 之间,虽然 Y1 在均值上占有优势,然而两者

组间比较  $P$  值大于 0.05,没有显著区别,可视为效果大致相同;其他各组两两比较  $P$  值均小于 0.05,具有显著不同。因此可认为这四种产物对 EV71 的抑制效果优劣为  $Y1 \approx Y3 > Y4 > Y2$ 。

对 RSV 的抑制作用,鱼腥草水提物不同处理方

法所得样品对其治疗指数分别为:Y1-2.464 5; Y2-5.431 5; Y3-15.565 3; Y4-9.724 6。对各组间进行两两比较的组间  $t$  检验(结果如图 5),  $P$  值均小于 0.05, 各组两两之间均有显著区别, 可视效果显著不同。因此可认为这四种产物对 RSV 的抑制效果优劣为  $Y3 > Y4 > Y2 > Y1$ 。

对 CV-B3 的抑制作用, 鱼腥草水提物不同处理方法所得样品对其治疗指数分别为: Y1-2.807 6; Y2-5.339 8; Y3-17.86; Y4-5.98。对各组间进行两两比较的组间  $t$  检验(结果如图 5), 发现 Y2 与 Y4 之间, 虽然 Y4 在均值上占有一定优势, 然而两者组间比较  $P$  值大于 0.05, 没有显著区别, 可视为效果大致相同; 其他各组两两比较  $P$  值均小于 0.05, 具有显著不同。因此可认为这四种产物对 CV-B3 的抑制效果优劣为  $Y3 > Y4 \approx Y2 > Y1$ 。

#### 4 讨论

为了探究鱼腥草水提物抗病毒能力与其中所含多糖的关系, 我们采用酶解法、酶解法-Sevag 纯化鱼腥草多糖, 测其多糖含量及体外抗病毒活性, 以期找出鱼腥草多糖与其抗病毒能力的关系。

从鱼腥草经不同制备方法所得提取物的得率及多糖纯度结果看, 得率方面:  $S3 < S4 < S2 < S1$ , 多糖的纯度方面:  $S3 > S4 > S2 > S1$ , 两者成反比关系, 说明酶解和 Sevage 法除蛋白可以提高样品的多糖纯度; 同时, 除去鱼腥草水提液直接冻干产物对 EV71 病毒的抑制效果外, 鱼腥草的不同处理方法所得冻干产物的抗病毒效果趋势与其中多糖纯度趋势基本一致, 由此可推测鱼腥草对 RSV、CV-B3 两种病毒的抑制可能主要是鱼腥草中的多糖在发挥作用。

鱼腥草的水提液冻干产物(Y1)的抗病毒效果在 EV71 和 RSV、CV-B3 病毒的抑制效果方面存在很大的差异, 鱼腥草水提液对于 EV71 病毒有着最佳的抑制效果, 而对于 RSV、CV-B3 两种病毒, 其抑制作用在四种产物中是最差的, 在醇沉的上清液部位可能存在除多糖以外的 EV71 的抑制剂, 其抗病毒的效果及作用机制需进一步研究。

天然药物多糖抗病毒机制主要有对病毒的直接抑制与灭杀、抑制病毒进行生物合成与增殖、阻滞病毒的吸附与进入细胞、以及对宿主进行免疫调节等<sup>[18]</sup>。鱼腥草多糖有着很好的抗氧化效果<sup>[2,19]</sup>, 抗氧化与免疫调节有着密切的联系, 同时, 多糖的抗氧化效果对一些病毒的抑制也密切相关<sup>[20]</sup>。鱼腥草多糖在本实验中展现的抗病毒效果可能与其抗氧化

能力相关。

本研究对于鱼腥草多糖的体外抗病毒效果进行了一定的研究, 为鱼腥草多糖的抗病毒能力提供了一定的实验依据与数据。鱼腥草多糖对于 RSV 和 CV-B3 病毒的抗病毒作用总体上随多糖纯度的上升而增强, 而对于 EV71 病毒, 未经处理的鱼腥草水提液的抗病毒作用效果与多糖浓度最高的 Y3 相似, 而其他三种产物的抑制效果依然与多糖纯度呈正相关。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 224.
- 2 Li HM, Du YM, Chen J, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of polysaccharide from *Houttuynia cordata* leaf [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1745-1751.
- 3 Liu M, Jiang YP, Liu S. Advance on alkaloids chemical constituents and bioactivities of *Houttuynia cordata* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 141-145.
- 4 Li RL, Cui YQ, Liu QS. Determination of rutin in different parts of *Houttuynia cordata* Thunb. collected in various areas by HPLC [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 799-801.
- 5 Park E, Kum S, Wang C, et al. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in an activated macrophage-like cell line [J]. Am J Chin Med, 2005, 33: 415-424.
- 6 Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV [J]. Planta Med, 1995, 61: 237-241.
- 7 Chen MY, Li H, Lu XX, et al. *Houttuynia cordata* polysaccharide alleviated intestinal injury and modulated intestinal microbiota in H1N1 virus infected mice [J]. Chin J Nat Med, 2019, 17: 187-197.
- 8 Zhang HF, Guo SY, Ma YH, et al. Inhibitory effect of water extract of *Houttuynia cordata* Thunb and its main ingredients on enterovirus type 71 *in vitro* [J]. Shandong Med J (山东医药), 2018, 58(7): 28-32.
- 9 Jia W, Mao SM, Zhang PP, et al. Study on antiviral effect of *Lonicera Japonica* Thunb polysaccharide *in vivo* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2018, 20(6): 25-27.

- 10 Wang QL, Ren YH, Liu SY. Advances in studies on pharmacological activities of lentinan [J]. Chin Pharm (中国药房), 2018, 29: 1140-1144.
- 11 Han JH. Research progress on astragalus polysaccharides [J]. World Lat Med Info (世界最新医学信息文摘), 2017, 17(20): 93.
- 12 Zhang JJ, Lu Y, Chen DF. Preparation procedures of anti-complementary polysaccharides from *Houttuynia cordata* [J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 2012, 37: 2071-2075.
- 13 Wu HM, Wang XP, Wang L, et al. The antibiotic activity of polysaccharide from *Houttuynia cordata* Thunb [J]. Chin Wild Plant Res (中国野生植物资源), 2012, 31(5): 24-26.
- 14 Cheng BH, Chan JY, Chan BC, et al. Structural characterization and immunomodulatory effect of a polysaccharide HCP-2 from *Houttuynia cordata* [J]. Carbohydr Polym, 2014, 103: 244-249.
- 15 Han K, Jin C, Chen H, et al. Structural characterization and anti-A549 lung cancer cells bioactivity of a polysaccharide from *Houttuynia cordata* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120: 288-296.
- 16 Zhu H, Lu X, Ling L, et al. *Houttuynia cordata* polysaccharides ameliorate pneumonia severity and intestinal injury in mice with influenza virus infection [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 218: 90-99.
- 17 Cheng D, Sun L, Zou S, et al. Antiviral effects of *Houttuynia cordata* polysaccharide extract on murine norovirus-1 (MNV-1)-a human norovirus surrogate [J]. Molecules, 2019, 24(9): 1835.
- 18 Hou ZC, Wang YT, Li TY, et al. Progress on antiviral mechanism of plant polysaccharides [J]. Bio Chem Eng (生物化工), 2019, 5: 157-159.
- 19 Zhao Y. Study on the extraction, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Houttuynia Cordata* Thunb [D]. Mianyang: Southwest University of Science And Technology (西南科技大学), 2013.
- 20 Jiang J. Studies on the HIV-1 inhibitory activity and relative mechanism of natural antioxidant compounds from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizome [D]. Tianjin: Nankai University (南开大学), 2010.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社