

黄芩水提液体外抗呼吸道合胞病毒实验研究

徐群芳¹, 阎祖炜²

(1 益阳医学高等专科学校病原生物与免疫学教研室, 湖南 益阳 413000; 2 中南大学湘雅医学院检验系临床微生物与免疫学教研室, 湖南 长沙 410013)

[摘要] **目的** 探讨黄芩水提液在体外抗呼吸道合胞病毒(RSV)的作用及其机制, 为治疗 RSV 感染寻找新型药物。**方法** 将中药黄芩制成水提液。运用体外细胞培养技术, 以 MTT 法检测黄芩水提液对 HeLa 细胞的毒性。以利巴韦林(病毒唑)为阳性对照, 对黄芩水提液进行体外抗 RSV 的药效学检测。**结果** 黄芩的 50% 细胞中毒药物浓度(CC₅₀)为 16.32 mg/mL, 对 RSV 的半数有效剂量(EC₅₀)为 2.43 mg/mL。黄芩和病毒唑对 RSV 的抑制作用存在明显的量效关系($P < 0.05$)。**结论** 黄芩在体外实验中对 RSV 有一定抑制作用。

[关键词] 黄芩; 黄芩水提液; 呼吸道合胞病毒; HeLa 细胞; 体外实验

[中图分类号] R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)06-0409-04

In vitro study of Scutellaria Baicalensis Georgi water extraction on anti-respiratory syncytial virus

XU Qun-fang¹, YAN Zu-wei² (1 Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China; 2 Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of anti-respiratory syncytial virus of water extract liquid of Scutellaria Baicalensis Georgi, and to find the new drug for treatment of respiratory syncytial virus(RSV) infection. **Methods** Chinese medicine Scutellaria Baicalensis Georgi was turned into water extract liquid. Using *in vitro* cell culture technique, the cytotoxicity of Scutellaria Baicalensis Georgi water extract was detected by 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. With ribavirin as the positive control drug, antiviral activity of Scutellaria Baicalensis Georgi water extract was detected with cell culture method. **Results** The median cytotoxicity concentration(50% cytotoxicity concentration, CC₅₀) of Scutellaria Baicalensis Georgi was 16.32 mg/mL, the median effective concentration (50% effective concentration, EC₅₀) of the extraction of Scutellaria Baicalensis Georgi was 2.43 mg/mL. Scutellaria Baicalensis Georgi and ribavirin gave a dose-dependent response in inhibiting RSV ($P < 0.05$). **Conclusion** Scutellaria Baicalensis Georgi shows potent inhibition on RSV *in vitro*.

[Key words] Scutellaria Baicalensis Georgi; Scutellaria Baicalensis Georgi water extract; respiratory syncytial virus; HeLa cells; *in vitro* test

[Chin Infect Control, 2011, 10(6):409-411, 415]

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是婴幼儿严重下呼吸道感染的重要病原, 特别是 2~6 个月婴儿, 0.5%~2% 的病例因症状严重需住院治疗^[1-2]。近年来又发现 RSV 也是成人免疫抑制者感染的重要病原, 可在老年人中流行, 严重时可导致呼吸衰竭、心力衰竭等^[3]。现在用于预防和治疗 RSV 感染的药物只有 2 种: RSV 免疫球蛋

白(RSVIG)和利巴韦林(ribavirin, 三氮唑核苷, 又名病毒唑)。我国的中药资源极为丰富, 含有黄芩(Scutellaria Baicalensis Georgi)的很多中药复方都有抗 RSV 作用, 所以我们选择黄芩水提取液进行研究, 为临床应用黄芩及其制剂治疗 RSV 感染提供实验依据。

[收稿日期] 2011-05-24

[作者简介] 徐群芳(1973-), 女(汉族), 湖南省益阳市人, 主管检验师, 主要从事病原生物与免疫学研究。

[通讯作者] 徐群芳 E-mail: 1298467265@qq.com

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 ESPEC-BNA311 型 CO₂ 恒温培养箱(日本 TABAI ESPEC 有限公司),OLYMPUS 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),酶标仪(Sunrise)。

1.2 药物 病毒唑注射液(100 mg/mL):湖北天药药业股份有限公司产品,批号:20060214;黄芩水提液(相当于生药的 1 g/mL):选用黄芩最佳水提方法,100 g 黄芩用 10 倍水浸泡 15 h,煎煮 1 h 后再用 8 倍水煎煮 30 min,负压抽滤后合并滤液,以减压蒸发的方法将药液浓缩为 100 mL,分装小瓶,100℃ 30 min 消毒灭菌后于 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 细胞株与病毒株 HeLa 细胞为人宫颈癌细胞传代系,RSV 为 A 亚型 Long 标准株,购自中国科学院武汉病毒所,均由中南大学基础医学院微生物教研室馈赠。

1.4 药物半数中毒浓度的测定 HeLa 细胞,用常规方法传代,以细胞维持液(向 DMEM 培养液中加入胎牛血清,使之终浓度为 2%)将黄芩水提液连续对倍稀释为 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320;将病毒唑连续对倍稀释为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560,分别加入 96 孔板已长成单层的 HeLa 细胞中,每个稀释度接种 4 个复孔,每孔加入 100 μL,置于 37℃、CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,弃培养液上清,每孔加入含 5 mg/mL MTT 的不含血清的 DMEM 50 μL,继续培养 2~3 h 后,弃 MTT 上清,PBS 洗 3 次,每孔加溶解液 DMSO 150 μL,震荡 5~10 min,待结晶完全溶解,酶标仪测 570 nm 处的 OD 值,计算各稀释度的细胞存活率。细胞存活率(%) = 实验孔测定值均值/对照孔测定值均值 × 100%;采用概率单位回归法,计算 50% 细胞中毒时的药物浓度(CC₅₀),选对 HeLa 细胞无毒性的药物最大稀释度(CC₀)供下一步实验。

1.5 药物抗 RSV 作用(改良空斑减数实验)

1.5.1 不同药物浓度对 RSV 抑制作用实验 用病毒维持液将最大无毒性浓度的黄芩提取液按照对倍稀释,配制为 5、2.5、1.25、0.63、0.31 mg/mL 5 个稀释度的溶液;同时用病毒维持液将最大无毒性浓度的病毒唑对倍稀释,配制成 100、50、25、12.5、6.25 μg/mL 5 个稀释度的溶液。

在 24 孔板长满单层的 HeLa 细胞上分别滴加半数培养感染剂量(50% tissue culture infective

dose, TCID₅₀) 病毒悬液 0.2 mL,37℃ 吸附 1 h,弃去多余病毒悬液,用 PBS 洗去未黏附的病毒,分别加配制的 2 种含药病毒维持液,每个浓度 4 个复孔,同时设细胞对照孔、药物对照孔及病毒对照孔各 4 个复孔,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,至病毒对照孔空斑不再增加,取出倒出培养液,用 PBS 液洗细胞 2 遍,10% 中性甲醛室温固定 10 min,0.2% 结晶紫液染 10 min,三蒸水洗 3 次,晾干后计数空斑数。

1.5.2 药物对 RSV 的直接杀灭作用 将含一定浓度黄芩的药物维持液(5 mg/mL)、一定浓度的病毒唑药物维持液(100 μg/mL)以及维持液与病毒悬液在试管内等量混合(药物和病毒均对倍稀释,药物实际浓度为 2.5 mg/mL,病毒唑的实际浓度为 50 μg/mL),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中放置 2 h。将实验管与对照管的病毒悬液分别连续 10 倍比稀释做 8 个稀释度,接种于 96 孔细胞培养板,每个稀释度 4 个复孔。于 37℃、5% CO₂ 培养箱吸附 1 h,每孔补加维持液 100 μL,继续培养。逐日在倒置显微镜下观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),并记录出现 CPE 的孔数,以最高稀释度不再出现病变时为终点,记录各稀释度出现病变的孔数,求出实验组及对照组的 TCID₅₀。

2 结果

2.1 MTT 法测定黄芩及病毒唑对 HeLa 细胞的毒性 前期实验已测得 RSV 对 HeLa 细胞的 TCID₅₀ 为 10^{-6.87}。MTT 法测定黄芩及病毒唑对 HeLa 细胞的毒性,用 *probit* 回归法计算得出黄芩的 CC₅₀ 为 16.32 mg/mL,CC₀ 为 5 mg/mL;病毒唑的 CC₅₀ 为 0.44 mg/mL,CC₀ 为 0.1 mg/mL,见表 1。

2.2 不同药物浓度对 RSV 抑制实验中各组的空斑数比较 用 DUNNET *t* 检验比较黄芩各剂量组空斑数与病毒对照组空斑数的均值,差异有统计学意义($P < 0.01$);病毒唑除 6.25 μg/mL 剂量组($P > 0.05$)外,其他各剂量组空斑数与病毒对照组空斑数的均值之差异有统计学意义($P < 0.01$),这说明黄芩水提液和病毒唑对 RSV 有一定抑制作用。黄芩的半数有效剂量(EC₅₀) 为 2.43 mg/mL,病毒唑 EC₅₀ 为 35.66 μg/mL。病毒对照组的 TCID₅₀ 为 10^{-6.87},黄芩水提液组的 TCID₅₀ 为 10^{-6.6},病毒唑组的 TCID₅₀ 为 10^{-6.83},统计结果表明黄芩水提液对 RSV 有直接杀伤作用,空斑实验结果见表 2。

2.3 黄芩和病毒唑对 RSV 抑制作用的剂量-效应

关系 以药物剂量的对数为横坐标,以抑制率为纵坐标绘图,可以看出药物对 RSV 的抑制作用随剂量的增加而增强;剂量与 CPE 抑制率的相关分析结果

显示,二者存在明显的正相关关系,黄芩的相关系数 r 为 0.981($P=0.03$),见图 1。

表 1 MTT 法测定黄芩及病毒唑对 Hela 细胞的毒性

Table 1 The cytotoxicity of Scutellaria Baicalensis Georgi water extraction and ribavirin on Hela cells detected by MTT test method

| Group | Dose(mg/mL) | OD value of cells in each well($n=4$) | | | | | Average OD value | Cell survival rate (%) |
|----------------------------------|-------------|---|-------|-------|-------|-------|------------------|------------------------|
| | | | | | | | | |
| Scutellaria Baicalensis Georgi | 100.0 | 0.108 | 0.117 | 0.111 | 0.115 | 0.113 | 14.96 | |
| | 50.0 | 0.211 | 0.209 | 0.200 | 0.198 | 0.204 | 27.01 | |
| | 25.0 | 0.292 | 0.289 | 0.290 | 0.285 | 0.289 | 38.28 | |
| | 12.5 | 0.378 | 0.367 | 0.368 | 0.372 | 0.371 | 50.87 | |
| | 6.25 | 0.597 | 0.587 | 0.582 | 0.593 | 0.589 | 78.01 | |
| | 3.125 | 0.623 | 0.635 | 0.629 | 0.622 | 0.627 | 83.05 | |
| | 1.563 | 0.699 | 0.689 | 0.695 | 0.698 | 0.695 | 92.05 | |
| Ribavirin | 5.0 | 0.103 | 0.097 | 0.102 | 0.098 | 0.100 | 13.24 | |
| | 2.5 | 0.216 | 0.208 | 0.214 | 0.208 | 0.211 | 27.95 | |
| | 1.25 | 0.255 | 0.258 | 0.254 | 0.259 | 0.256 | 33.91 | |
| | 0.63 | 0.373 | 0.370 | 0.365 | 0.374 | 0.371 | 49.14 | |
| | 0.315 | 0.396 | 0.399 | 0.404 | 0.395 | 0.398 | 52.71 | |
| | 0.156 | 0.450 | 0.453 | 0.458 | 0.446 | 0.451 | 59.73 | |
| | 0.08 | 0.589 | 0.586 | 0.588 | 0.585 | 0.587 | 77.74 | |
| | 0.04 | 0.664 | 0.658 | 0.665 | 0.660 | 0.661 | 87.55 | |
| OD number of blank control | | 0.005 | 0.003 | 0.004 | 0.009 | 0.005 | | |
| OD number of normal cell control | | 0.754 | 0.757 | 0.758 | 0.754 | 0.755 | | |

表 2 不同药物浓度对 RSV 抑制实验中各组的空斑数(个)

Table 2 The number of plaque in each group with different concentrations of Scutellaria Baicalensis Georgi water extraction and ribavirin detected by inhibition test for RSV

| Serial number | Scutellaria Baicalensis Georgi (mg/mL) | | | | | Ribavirin ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | | | Virus control | Cell control |
|-----------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| | 5.00 | 2.50 | 1.25 | 0.63 | 0.31 | 100.00 | 50.00 | 25.00 | 12.50 | 6.25 | | |
| 1 | 26 | 51 | 67 | 80 | 89 | 16 | 33 | 62 | 82 | 87 | 98 | 0 |
| 2 | 23 | 46 | 66 | 77 | 93 | 19 | 35 | 56 | 81 | 91 | 95 | 0 |
| 3 | 24 | 49 | 69 | 77 | 92 | 15 | 39 | 58 | 77 | 92 | 92 | 0 |
| 4 | 28 | 50 | 71 | 82 | 88 | 18 | 38 | 61 | 77 | 88 | 96 | 0 |
| $\bar{x} \pm s$ | 25.25 \pm 2.22 | 49.00 \pm 2.16 | 68.25 \pm 2.22 | 79.25 \pm 2.18 | 90.50 \pm 2.38 | 17.00 \pm 1.83 | 36.25 \pm 2.75 | 59.25 \pm 2.75 | 79.25 \pm 2.63 | 89.50 \pm 2.38 | 95.25 \pm 2.50 | |

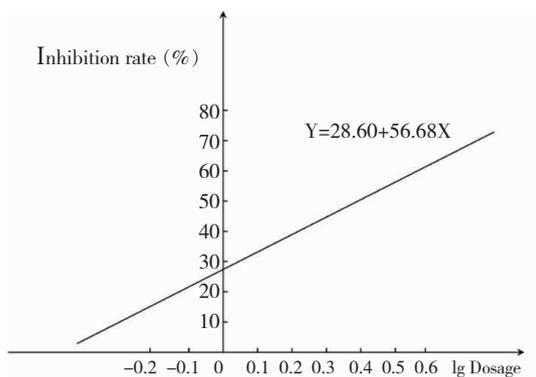


图 1 黄芩的剂量对数值与黄芩对 RSV 抑制率(%)关系曲线
Figure 1 Curve of relationship between dose logarithm value of Scutellaria Baicalensis Georgi and inhibition rate of Scutellaria Baicalensis Georgi on RSV (%)

3 讨论

目前对 RSV 感染缺乏特异性治疗和预防方案,多采取对症处理^[4]。国内外学者都在研究 RSV 感染的治疗药物,寻找中药治疗亦为行之有效的。黄芩是我国常用中药,为唇形科植物黄芩的干燥根,出自《神农本草经》,为草根药中的上品,其主要有效成分是黄酮类化合物。黄芩不仅具有解热、抗菌消炎、解毒、抗氧化作用,有明显抑制糖尿病患者红细胞醛糖还原酶活性及逆转内毒素休克作用,还有抗病毒作用^[5-6]。Nagai 等^[7]报道,黄芩提取物通过抑

国各医院对于血液透析室的医院感染管理水平差异较大^[10-11],在多所医院治疗者更容易遇到感染 HCV 的风险。严格统一的血液透析室医院感染管理规范对于降低 HCV 感染至关重要。

(致谢:衷心感谢所有参加本次调查的单位和同仁,由于单位较多,不一一列出。)

[参考文献]

- [1] 陈攸涛,江家骥.丙型肝炎病毒流行现状[J].海峡预防医学杂志,2009,15(5):19-21.
- [2] 许东亚,王利杰.9 646 名常规体检人员抗-HCV 检测结果分析[J].中国输血杂志,2011,24(8):705.
- [3] 吴国友,庄爱周,朱杰,等.维持性血液透析患者丙型肝炎病毒感染的调查与分析[J].中华医院感染学杂志,2008,18(12):1689-1690.
- [4] U. S. Department of Health and Human Services. Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients[J]. MMWR,2001,50(RR-5):1-43.

- [5] Saxena A K, Panhotra B R, Sundaram D S. Impact of dedicated space, dialysis equipment, and nursing staff on the transmission of hepatitis C virus in a hemodialysis unit of the middle east[J]. Am J Infect Control, 2003,31(1):26-33.
- [6] Schneeberger P M, Keur I, van Loon A M. The prevalence and incidence of hepatitis C virus infections among dialysis patients in the Netherlands: a nationwide prospective study[J]. J Infect Dis, 2000,182(5):1291-1299.
- [7] 张智敏,周焕芝,李洋,等.透析患者丙型肝炎感染[J].四川医学,2006,27(10):1204-1205.
- [8] 秦凤仪,宋文华,李平.维持性血透患者乙型、丙型肝炎病毒感染的调查[J].大连医科大学学报,2002,24(3):211-212.
- [9] 曹娅丽,王世相.维持性血液透析患者丙型肝炎病毒感染的研究进展[J].中国血液净化,2005,4(12):674-677.
- [10] 张铁燕,朱小玲,李玉玲.某省 29 所中医医院血液透析室管理现状与对策[J].中国感染控制杂志,2010,9(3):211-212.
- [11] 成瑶,刘丁,陈萍,等.重庆市 8 家三级医院血液透析用水和透析液细菌学横断面调查[J].中国感染控制杂志,2010,9(5):337-338.

(上接第 411 页)

制病毒包涵体/溶酶体膜的融合,能减少流感病毒感染小鼠的病毒复制;当黄芩提取物加至流感病毒感染的 MDCK 细胞中时,能减少病毒的释放。黄芩抗 RSV 的研究目前国内尚少见报道。本研究结果显示,黄芩对 RSV 的 EC_{50} 为 2.43 mg/mL,并且存在明显的量效关系,说明黄芩对 RSV 有抑制作用。笔者认为,本研究为发现治疗 RSV 感染的新型药物提供了依据,但有关黄芩抗 RSV 的作用机制,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 吴成.清热解毒法治疗流行性出血热探讨[J].甘肃中医,1988,

1(1):19-22.

- [2] 江汉珍,卢银平,董继华,等.热毒清抗合胞病毒、流感病毒的实验研究[J].同济医科大学报,1996,25(suppl):5-8.
- [3] 邢玮,闻良珍,董继华,等.热毒抗人巨细胞病毒作用的临床及实验研究[J].中国中西医结合杂志,2000,20(4):245-247.
- [4] 李闻文,施凯.喜树果粗提液体外抗单纯疱疹病毒 2 型试验[J].湖南医学,1993,10(2):74.
- [5] 刘云山,李萍.黄芩对糖尿病患者红细胞醛糖还原酶活性及早期糖尿病肾病的影响[J].中国老年医学,2001,21(5):334.
- [6] 周晓红,翟佳,凌亦凌,等.黄芩抗内毒素休克的实验研究[J].河北中医医学报,2001,16(1):32.
- [7] Nagai T, Morisuchi R, Suzuki Y, *et al.* Mode action of the anti-influenza virus activity of plant flavon, from the roots of *Scutellaria Baicalensis*[J]. Antivirus Res, 1995,26(1):11.