

# 桑叶乙醇提取物体外对呼吸道合胞病毒的抑制作用

黄筱钧<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖北民族学院医学院, 湖北 恩施 445000; 2. 四川大学华西基础医学与法医学院, 成都 610041)

**[摘要]** **目的:**研究桑叶体外对呼吸道合胞病毒(RSV)的作用。**方法:**采用细胞培养技术,将 $51.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 桑叶液(70%乙醇提取物)倍比稀释后与密度为 $1.0 \times 10^4/\text{mL}$  Hep-2 细胞作用 72 h,观察细胞病变效应(CPE),通过 MTT 法测定半数中毒浓度( $\text{TC}_{50}$ )。不同浓度桑叶液、Hep-2 细胞与 0.01 mL 100 TCID<sub>50</sub> RSV 作用 1,2 h 后,测定其半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )和抗病毒指数(TI),以利巴韦林为阳性对照,评判桑叶抗 RSV 效果。**结果:**桑叶质量浓度在 $0.01 \sim 12.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对 RSV 的抑制率表现出量效关系, $\text{TC}_{50}$   $6.56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{IC}_{50}$   $1.015 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,TI 6.46。桑叶体外有抗 RSV 作用,比利巴韦林毒性小,抗病毒指数大,安全范围大( $P < 0.05$ )。**结论:**桑叶对 RSV 有明显的抑制作用,既能抑制 RSV 的吸附和生物合成,又能直接杀死病毒。

**[关键词]** 桑叶; 呼吸道合胞病毒; 抗病毒作用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0169-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220169

## Inhibiting Effects of Ethanol Extract of Mori Folium on Respiratory Syncytial Virus *in vitro*

HUANG Xiao-jun<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Medicine, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

2. West Chinese and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of anti-respiratory syncytial virus (RSV) with ethanol extract of Mori Folium *in vitro*. **Method:** The antiviral activity of ethanol extract of Mori Folium was tested by the technique of cell culture, with ribavirin as the positive control. Virus cytopathic effect (CPE) and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method were used to measure half toxic concentration ( $\text{TC}_{50}$ ), half inhibitive concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) and therapeutic index (TI) after Mori Folium extract interaction with Hep-2 and RSV. **Result:** Mori Folium extract inhibited RSV infection in dose-effect relationship with small toxicity, large antiviral index and security range ( $P < 0.05$ ). Its  $\text{TC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$ , TI was 6.56, 1.015  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 6.46 respectively. **Conclusion:** Ethanol extract of Mori Folium has a significant anti-RSV effect *in vitro*.

**[Key words]** Mori Folium; respiratory syncytial virus; antiviral effect

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)因能使病变细胞广泛融合成多核巨细胞,故名,属于副黏病毒科肺炎病毒属,主要通过飞沫传播,也可经接触污染的手或物品传播,传染性强,是引起婴幼儿和儿童下呼吸道感染最主要病原体,在 1 岁以下婴儿的细支气管炎和肺炎中,RSV 位居所有病原体之首。每年约 40% ~ 50% 住院治疗的婴幼儿毛细支气管炎和 25% 的婴幼儿肺炎是 RSV 感

染所致<sup>[1]</sup>。同时,也常引起成人特别是老年人的呼吸道感染。尚无特效的治疗 RSV 的药物,也无上市的疫苗。卧床休息、对症治疗和支持疗法是目前治疗 RSV 感染所致疾病的主要手段。中国中药材资源极其丰富,甘草、龙胆、败酱草、菊花等都具有明显的抗 RSV 作用。桑叶始载于《神农本草经》,是植物桑的干燥叶,味甘苦,性寒,具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目等功效。现代药理学证实桑叶具有降

**[收稿日期]** 20140528(012)

**[通讯作者]** \* 黄筱钧,在读博士,讲师,从事分子病毒学和抗病毒中药研究,Tel:0718-8437479,E-mail:huangxiaojun0608@163.com

血压、降血糖、抗菌、改善血脂、延缓衰老和抗肿瘤、抗氧化等功效<sup>[2]</sup>。民间也广泛用于预防和治疗上呼吸道感染。孙经梦等<sup>[3]</sup>研究证实,桑叶的提取物对甲型流感病毒具有治疗作用,推测桑叶对呼吸道感染病毒具有抑制作用。本实验利用细胞培养技术和 MTT 法,以 Hep-2 细胞为细胞模型,在体外细胞水平对桑叶醇提液抗 RSV 作用进行了研究。

## 1 材料

**1.1 细胞** Hep-2(人咽喉癌上皮细胞)为四川大学华西医学中心微生物教研室保存。细胞生长液为 10% FBS MEM 液,细胞维持液为 2% FBS MEM 液。

**1.2 病毒** 呼吸道合胞病毒(RSV) Long 株,由四川大学华西医学中心提供。

**1.3 药物** 称取一定量的桑叶,加 10 倍体积的 70% 乙醇浸提 3 次,合并提取液,减压回收溶剂得乙醇提液  $5.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,冷藏备用。利巴韦林注射液( $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),贵州天地药业责任有限公司生产(批号 H20067579)。

**1.4 仪器**  $\text{CO}_2$  恒温培养箱,超低温冰箱(日本 SANYO 公司),倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂),酶标仪(北京普朗新技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 RSV 半数细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)测定** Hep-2 细胞在 96 孔板上传代 3 次,生长呈单层,调整为  $1.0 \times 10^4/\text{mL}$ 。用细胞维持液将 RSV 作 10 倍系列稀释,将不同稀释度的 RSV 接种于 Hep-2 细胞( $0.1 \text{ mL}/\text{孔}$ ),每一稀释度重复 4 孔,对照组 Hep-2 细胞加维持液,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  孵育 2 h,换细胞维持液。每天观察细胞病变效应(CPE),至 CPE 不再进展。按照 Reed-Muench 法计算病毒的半数细胞培养物感染量(TCID<sub>50</sub>)。

**2.2 桑叶醇提物的细胞毒性测定** 用细胞维持液倍比稀释桑叶提取液( $5.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),质量浓度为 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6,  $51.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.1 \text{ mL}/\text{孔}$ ,分别加入 Hep-2 单层细胞中,每一稀释浓度重复 4 孔,同时用细胞维持液代替桑叶作为阴性对照,用利巴韦林作阳性对照,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  培养 72 h,每天观察 CPE,记录细胞变化,并采用 MTT 法<sup>[4]</sup>测定 570 nm 波长下的吸光度(A)。计算出细胞存活率、桑叶致 Hep-2 细胞半数中毒浓度(TC<sub>50</sub>)。

$$\text{细胞存活率} = (\text{药物组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

**2.3 桑叶体外对 RSV 的抑制作用** 实验分 3 组,抑制生物合成组:  $0.1 \text{ mL}$   $100 \text{ TCID}_{50}$  RSV 液与单层

Hep-2 细胞  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  吸附 2 h,再加入不同浓度的桑叶醇提液;直接杀伤组:不同浓度的桑叶液与  $100 \text{ TCID}_{50}$  RSV 液等量混合  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  作用 1 h,再将混合液接种于 Hep-2 细胞;抑制吸附组:不同浓度的桑叶液与单层 Hep-2 细胞  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  作用 2 h,再加入  $100 \text{ TCID}_{50}$  RSV 液。同时设正常细胞组、病毒组、阳性药物组,每个药物浓度设 4 个重复孔。逐日观察细胞生长情况,连续 5 d,记录 CPE。将病毒对照组 CPE“卅”,细胞对照组 CPE“-”确定为 MTT 法测定的最佳时间。同样采用 MTT 法测定不同浓度桑叶醇提液作用于感染细胞后的病毒抑制率,并计算出桑叶对 RSV 致 Hep-2 CPE 产生 50% 抑制的浓度(IC<sub>50</sub>)和抗病毒指数(TI)。

$$\text{TI} = \text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$$

$$\text{病毒抑制率} = (\text{实验组 } A - \text{病毒组 } A) / (\text{药物组 } A - \text{病毒组 } A) \times 100\%$$

## 3 结果

**3.1 RSV TCID<sub>50</sub>测定** 正常 Hep-2 细胞呈梭形,RSV 接种于 Hep-2 细胞后第 2 天出现 CPE,表现为细胞增殖减慢,形态改变,胞质颗粒增多,折光性增强,但仍可贴壁。按照 Reed-Muench 法计算病毒的半数细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)。本实验使用的 RSV Long 株致 Hep-2 细胞半数感染量  $\text{TCID}_{50} = 10^{-8}/0.1 \text{ mL}$ 。

**3.2 对 Hep-2 细胞的毒性测定** 不同浓度的桑叶醇提物作用于单层 Hep-2 细胞后细胞皱缩,呈圆形或椭圆形,壁增厚,折光性增强,4 d 后 Hep-2 细胞脱落、碎裂,悬浮在培养液表面,吸光度下降。桑叶醇提物质量浓度在  $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  以下时对细胞的毒性不明显,在  $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  约有半数或以上的细胞存活。随着桑叶浓度的增加,对 Hep-2 细胞的毒性增强,死亡细胞数增加,细胞存活率下降。桑叶醇提物对 Hep-2 细胞的  $\text{TC}_{50}$  为  $6.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,实验用利巴韦林注射液的  $\text{TC}_{50}$  为  $0.327 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

**3.3 对 Hep-2 细胞内病毒增殖的抑制作用** 桑叶组 CPE 程度均低于病毒组,说明 RSV 感染后桑叶仍具有抑制 RSV 在 Hep-2 细胞内的增殖作用,主要表现为病毒特异性 CPE 在用药组呈现明显的抑制效应,随着药物浓度的增加,细胞皱缩、变圆、脱落、碎裂等 CPE 特征逐渐减弱,桑叶抗病毒活性增强,病毒的抑制率明显增高。质量浓度在  $0.01 \sim 12.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,随着药物浓度的增加,对 RSV 抑制率明显增高(图 1),并表现出量效关系,桑叶液浓度继续增加,则对 RSV 的抑制率呈下降趋势。经 Probit 回归法计算<sup>[4]</sup>,桑叶抑制 RSV 的  $\text{IC}_{50}$   $1.015 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,比  $\text{TC}_{50}$  值

表1 不同浓度桑叶液和利巴韦林致 Hep-2 细胞病变和细胞存活率( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

桑叶			利巴韦林		
质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	CPE	细胞存活率 /%	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	CPE	细胞存活率 /%
0.01	-	99.0 ± 1.0	0.025	-	100
0.02	-	95.6 ± 1.4	0.05	-	98.8 ± 1.2
0.04	±	90.4 ± 1.4	0.1	±	93.8 ± 1.9
0.08	+	83.6 ± 1.8	0.2	+	78.8 ± 1.7
1.6	+	76.7 ± 2.4	0.4	++	59.3 ± 2.1
3.2	++	68.9 ± 2.4	0.8	++	42.1 ± 2.1
6.4	++	53.8 ± 2.0	1.6	+++	29.8 ± 1.8
12.8	+++	32.3 ± 2.5	3.2	+++	13.8 ± 2.9
25.6	+++	20.1 ± 1.8	6.4	+++	4.1 ± 1.5
51.2	+++	9.2 ± 1.4	12.8	+++	0

注:“-”无细胞病变;“±”10%以下细胞病变;“+”25%以上细胞病变;“++”25%~50%细胞病变;“+++”50%~75%细胞病变;“+++”75%以上的细胞病变。

小,说明桑叶的使用安全系数大,TI为6.46。利巴韦林注射液 IC<sub>50</sub> 0.052 g·L<sup>-1</sup>,TI为6.29,桑叶的安全性比实验用利巴韦林注射液稍高。

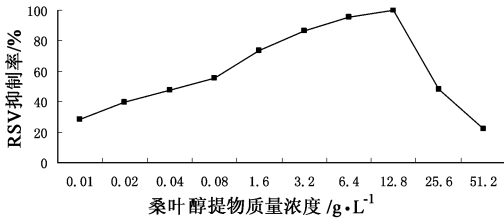


图1 桑叶醇提取物对 RSV 增殖的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

3.4 对 RSV 的直接杀伤作用 在最大无毒浓度范围内,随着桑叶浓度增加,病毒抑制率升高。桑叶醇提取物质量浓度  $\geq 0.08$  g·L<sup>-1</sup> 细胞生长良好,排列规则,仅有少量衰老细胞,说明桑叶对 RSV 具有直接杀伤作用,见图2。

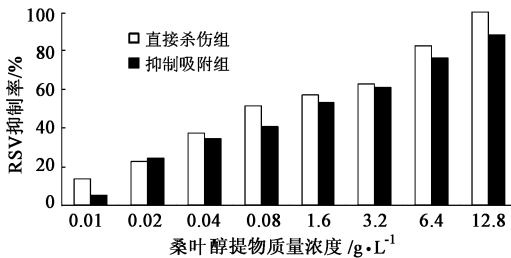


图2 桑叶醇提取物对 RSV 的直接杀伤和抑制吸附作用( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

3.5 对 RSV 感染的阻断作用 桑叶醇提取物质量浓度为 1.6 g·L<sup>-1</sup> 时 Hep-2 细胞 CPE 达到 50%, 0.02 g·L<sup>-1</sup> 时 25% 细胞出现 CPE,说明桑叶能抑制 RSV 的吸附作用,对 RSV 感染具有阻断作用,见图2。

#### 4 讨论

中草药作为新药开发的重要资源,尤其在抗病毒感染性疾病方面显示出明显优势<sup>[5]</sup>。研究发现多种中草药单方和复方对 RSV 有良好的抑制作用。本实验在体外细胞水平研究了桑叶醇提取物抗 RSV 的作用。结果证实桑叶使用安全,对 RSV 有明显的抑制作用,既能抑制 RSV 的吸附和生物合成,影响病毒的增殖,也能直接杀死病毒,达到阻断病毒感染作用。桑叶比利巴韦林的毒性低,抗病毒指数大,安全范围大。质量浓度在 0.01 ~ 12.8 g·L<sup>-1</sup>,随着桑叶浓度的增加,对 RSV 的抑制率明显增高。RSV 感染除了与 RSV 的直接作用外,还与 RSV 造成的免疫病理损伤有关。李俊莲等<sup>[6]</sup>的研究显示,中药能显著提高血清 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  的含量,达到抗 RSV 的作用。桑叶抗 RSV 的具体机制还有待利用现代生物学技术结合中医学理论从细胞因子、基因和蛋白水平进行探索。

#### [参考文献]

- [1] Cramer H. Antisense approaches for inhibiting respiratory syncytial virus [J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(5): 207.
- [2] 卢建峰,闫学红. 桑叶降血糖作用研究[J]. 中国现代医生, 2009, 47(13): 80.
- [3] 孙俊梦,刘骏,李炯,等. 桑叶提取物对小鼠感染甲型流感病毒 FM1 的预防与治疗作用研究[J]. 中药材, 2013, 36(11): 1837
- [4] 刘钊,杨占秋,肖红,等. MTT 法在抗病毒药物筛选中的应用[J]. 武汉大学学报:医学版, 2004, 25(3): 332
- [5] 严园园,施高翔,邵菁,等. 穿心莲内酯及其衍生物抗感染研究近 10 年进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3819.
- [6] 李俊莲,李艳彦,高鹏,等. 麻黄加术汤对呼吸道合胞病毒感染小鼠血清 IL-2, IFN- $\gamma$  的影响[J]. 中国实验方剂学杂志. 2013, 19(13): 196.

[责任编辑 聂淑琴]