

## 黄芩、柴胡及其配伍提取物体外抗柯萨奇 B3m 病毒及对细胞活性的影响

刘芳<sup>\*</sup>, 王雪峰, 闫丽娟, 南春红  
(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 观察黄芩、柴胡及其配伍提取物体外抗柯萨奇 B3m 病毒 (CVB<sub>3m</sub>) 及对细胞活性的影响。方法: 采用微量细胞培养法, 以细胞病变法和 MTT 法判定细胞活性, 观察黄芩、柴胡及其配伍提取物以及黄芩两种不同提取制剂体外抗 CVB<sub>3m</sub> 病毒和对细胞活性的影响, 确定各组药物的抑制病毒指数和药物对细胞的预防和治疗保护率。结果: 黄芩提取物浓度为 1.563 mg·mL<sup>-1</sup> 时, 抑制病毒指数大于 2, 而柴胡组和配伍组的抑病毒指数均小于 2; 3 组药物都具有不同程度的预防保护作用, 而柴胡组和配伍组的预防保护作用尤为明显, 其预防保护率明显高于黄芩组, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 在病毒感染后, 3 组药物对细胞均具有不同程度的治疗保护作用, 黄芩组和配伍组表现明显高于柴胡组, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。结论: 黄芩提取物具有明显的直接灭活病毒作用; 3 组药物都具有不同程度的预防保护作用和治疗保护作用, 柴胡组和配伍组预防给药保护细胞作用明显; 黄芩提取物和配伍提取物组的治疗保护作用明显; 配伍组具有预防和治疗保护双重作用, 但没有表现出配伍后作用增强的优势。

[关键词] 黄芩; 柴胡; 中药提取; 柯萨奇 B3m 病毒; 抗病毒; 体外

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0173-04

## Effect of Skullcap, *Bupleurum chinense* and Their Compatible Extract on Cell Infected by Coxsackie Virus B3m (CVB3m) *in vitro*

LIU Fang<sup>\*</sup>, WANG Xue-feng, YAN Li-juan, NAN Chun-hong

(Affiliated Hospital, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract] Objective:** To study the therapeutic effects of the skullcap, *Bupleurum chinense* and their compatible extract on cell infected by Coxsackievirus B3m (CVB3m) *in vitro*. **Method:** We used microcell culture method to observe the effect of the skullcap extract, the *B. chinense* extract and their compatible extract on antivirus and cell protection. We detected the restrained indexes of the three kinds of drugs on CVB3m and the cell protection rate by the three kinds of drugs when the cell was infected by CVB3m. **Result:** The skullcap extract could directly kill CVB3m *in vitro* when its concentration was 1.563 g·L<sup>-1</sup>, but the *B. chinense* extract and their compatible extract did not show this effect. The three kinds of drugs could protect cell infected by CVB3m. The effect of the *B. chinense* group and the compatibility group was better than the skullcap groups when the drugs were administered in advance ( $P < 0.05$ ). The effect of the skullcap group and the compatibility group were better than the *B. chinense* group when the drugs were administered after infection ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The three kinds of drugs can inhibit replication of CVB3m and protect cells from CVB3m. The effect of inhibiting virus of the Skullcap extract was better than the others. The effect of protecting cell of the *B. chinense* extract and the compatibility group were better than the Skullcap group.

[收稿日期] 20100306(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30371832)

[通讯作者] \* 刘芳, 医学博士, 副教授, 从事中医药防治病毒性心肌炎研究, Tel: 024-86291169, E-mail: liufng0212@gmail.com

**[Key words]** skullcap; *Bupleurum chinense*; Chinese herbal medicine extract; Coxsackievirus B3m; antiviral; *in vitro*

病毒性心肌炎严重危害人类健康, 其中柯萨奇 B3m 病毒(CVB3m)是导致病毒性心肌炎的最主要病原。黄芩、柴胡是小柴胡汤中的君、臣药, 前期实验研究表明: 小柴胡汤及其分解剂在体外具有保护细胞和直接灭活 CVB3m 的作用, 尤其是以黄芩、柴胡组成的分解 1 号的作用效果最好<sup>[1]</sup>。本研究旨在探讨黄芩、柴胡及其配伍提取物体外抗病毒和保护细胞的不同作用环节和作用靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 病毒** CVB<sub>3m</sub>(Nancy)株由上海中山医院病毒性心脏病重点实验室杨英珍教授惠赠。在 HeLa 细胞上连传 3 代, 细胞病变至 50%~100% 细胞发生病变)后, 反复冻融 3 次, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 取上清。

**1.2 试剂** DMEM, 美国 GIBCO, 批号 1099099; 胎牛血清, TBD0032HYP; 青霉素、链霉素(PS), 沈阳第六制药厂; 谷胺酰氨, 上海康达, 批号 20030112; EDTA, 安徽合肥工业大学试剂厂, 批号 990913; MTT 美国华美试剂公司提供, 用培养液配制成 5 g·L<sup>-1</sup> 的溶液。

**1.3 中药制备** 黄芩、柴胡及其配伍的粗提物由辽宁中医学院临床药理基地实验室制备, 具体流程: 3 组药物黄芩 5 kg, 柴胡 5 kg, 黄芩柴胡各 3 kg 的中药饮片分别加入 8 倍 70% 乙醇中, 置高能提取罐内回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 合并滤液。取剩余药物残渣, 加入 8 倍量水常压提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液。将每组药物的醇提取液和水提取液分别置单放浓缩缸内减压浓缩, 然后分别将醇提和水提的浓缩液混匀, 置高速离心喷雾干燥机中进行喷雾干燥, 收集干燥粉, 保存备用。将粗提物分别用蒸馏水配制成体外实验用溶液, 均为含生药 100 mg·mL<sup>-1</sup>。将溶液离心取上清液, 滤膜过滤, 高压灭菌备用。

**1.4 仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱, nuair-4950E, 美国; 酶标仪, Bio-RAD, Bench mark; 倒置显微镜 LECIA, 德国; CMIAS 医学图像分析管理系统, 北京中山; 超低温冰箱 MDF382E, 日本 SONY; 微量细胞培养板, COSTAR, 美国; 生物安全柜, nuair-美国。

**1.5 药物对 HeLa 细胞毒性的测定** 用培养液将药物按 1:2 倍比稀释成 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391 g·L<sup>-1</sup> 8 个浓度, 加入已制备好的单层

HeLa 细胞上, 每孔 200 μL, 每一稀释度设 4 个复孔。正常细胞组以培养液代替药液, 培养 3 d, 逐日观察细胞生长情况。以正常细胞为对照, 不引起细胞病变的最高药物稀释度为最大无毒浓度(TD<sub>0</sub>)。

**1.6 CVB<sub>3m</sub> 病毒毒力滴定** 采用微量细胞培养法<sup>[3]</sup>测定 TCID<sub>50</sub>。将病毒按 10 倍递次从 1 × 10<sup>-1</sup> 稀释至 1 × 10<sup>-8</sup>, 接种于长满单层细胞的微量培养板上, 放于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 3 d, 24 h 后开始逐日观察细胞病变, 进行记录, 以最后 1 d 细胞病变达 50% (50% 细胞出现病变) 以上病变为阳性孔, 无病变或病变在 50% 或以下作为阴性孔, 按 Reed-Muench 法测定病毒的 TCID<sub>50</sub>。

**1.7 药物体外对 CVB<sub>3m</sub> 毒力的影响** 将各组药液分别与 200 TCID<sub>50</sub> 的 CVB<sub>3m</sub> 病毒液等量混合, 最终浓度分别为 TD<sub>0</sub>, 1/2 TD<sub>0</sub> 和 1/4 TD<sub>0</sub>, 然后置 37 °C 作用 2 h; 同时病毒对照组以培养液代替药液与 200 TCID<sub>50</sub> 的病毒等量混合后置 37 °C 作用 2 h, 而后用微量细胞板分别测定药物组和病毒组的病毒滴度, 计算各组病毒的 TCID<sub>50</sub>, 具体方法同 1.6。然后计算各组药物的抑制病毒指数。

抑制病毒指数 = | 病毒对照组 log TCID<sub>50</sub> - 药物组 log TCID<sub>50</sub> |

**1.8 药物对体外病毒感染细胞的保护作用**

**1.8.1 实验分组** 每种药物分 3 个浓度 TD<sub>0</sub>, 1/2 TD<sub>0</sub>, 1/4 TD<sub>0</sub>。每种浓度分: 药物预防性保护组。每孔以含药物维持液于感染前 24 h 培养, 吸出药液, 用 Hank's 液洗 3 次, 每孔加入 100 TCID<sub>50</sub> CVB<sub>3m</sub> 100 μL 吸附 1 h 后, 加维持液培养。感染后药物保护组。在单层细胞培养板中加入 100 TCID<sub>50</sub> CVB<sub>3m</sub> 100 μL 吸附 1 h, 用 Hank's 液洗去病毒, 加含药维持液培养。同时设正常细胞对照组、病毒对照组。

**1.8.2 检测指标** 观察细胞病变: 每组自接种病毒 24 h 后, 逐日在倒置显微镜下观察细胞病变。 < 25% 细胞病变为 “+”; < 50% 细胞病变为 “ ”; < 75% 细胞病变为 “ ”; < 100% 细胞病变为 “ ”。

MTT 法检测细胞活性: 接种病毒 72 h 后, 吸弃培养上清液, 用 37 °C pH 7.6 的 PBS 洗涤 1 次, 每孔加 180 μL 培养液, 再加入 20 μL MTT 溶液, 37 °C 孵育 4 h。小心吸弃孔内培养上清液 100 μL, 加入等量含

0.04 mmol · L<sup>-1</sup> 盐酸异丙醇溶液, 振荡 5 min, 使结晶物充分溶解, 选择 490 nm 波长酶标检测仪测定各孔吸光度 (A), 记录结果。

药物保护率 = (感染给药 A - 病毒对照 A) / (正常细胞对照 A - 病毒对照组 A) × 100%

**1.9 统计学分析** 采用 SPSS11.5 医学统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 3 组的计量资料采用单因素的方差分析, 两两比较采用 LSD 分析方法,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 药物对细胞的毒性作用** 加入药物 72 h 后观察结果: 黄芩组浓度 3.125 g · L<sup>-1</sup> 时, 细胞有不同程度的胀大, 变圆, 细胞内有粗大颗粒, 部分细胞脱落; 柴胡组浓度 6.25 g · L<sup>-1</sup> 时, 细胞开始出现病变; 配伍组浓度 6.25 g · L<sup>-1</sup> 时, 细胞开始出现不同程度病变。正常细胞对照组细胞生长良好。黄芩提取物对 Hela 细胞的 TD<sub>0</sub> 是 1.563 g · L<sup>-1</sup>, 柴胡提取物的 TD<sub>0</sub> 是 3.125 g · L<sup>-1</sup>, 配伍药物提取物的 TD<sub>0</sub> 是 3.125 g · L<sup>-1</sup>。

**2.2 CVB<sub>3m</sub> 病毒毒力测定结果** 本次实验所用 CVB<sub>3m</sub> 病毒的 TCID<sub>50</sub> 为 3.65 × 10<sup>-4</sup>。

**2.3 药物体外对 CVB<sub>3m</sub> 毒力的影响** 结果见表 1。3 组药物作用后病毒滴度均有所下降, 但从抑制指数来分析, 仅有 TD<sub>0</sub> 的黄芩组抑病毒指数大于 2, 表现出明显的直接灭活病毒作用。而柴胡和配伍组的抑病毒指数均小于 2, 提示其体外直接灭活病毒作用不明显。

表 1 3 组药物体外对 CVB<sub>3m</sub> 毒力的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	药物浓度	LogTCID <sub>50</sub>	抑制病毒指数
黄芩	TD <sub>0</sub>	3.02 ± 0.23	2.57 ± 0.56
	1/2 TD <sub>0</sub>	4.16 ± 0.31	1.43 ± 0.48
	1/4 TD <sub>0</sub>	4.68 ± 0.22	0.91 ± 0.12
柴胡	TD <sub>0</sub>	3.98 ± 0.42	1.61 ± 0.14
	1/2 TD <sub>0</sub>	4.87 ± 0.23	0.72 ± 0.07
	1/4 TD <sub>0</sub>	5.36 ± 0.44	0.23 ± 0.06
配伍	TD <sub>0</sub>	4.22 ± 0.28	1.37 ± 0.98
	1/2 TD <sub>0</sub>	4.68 ± 0.33	0.79 ± 0.18
	1/4 TD <sub>0</sub>	5.15 ± 0.27	0.44 ± 0.02
病毒对照		5.59 ± 0.32	0
正常细胞对照		-	-

**2.4 3 组药物对体外病毒感染细胞的保护作用** 结果见表 2。

表 2 MTT 法测定 3 组药物对 Hela 细胞感染 CVB<sub>3m</sub> 的保护率 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	3 种药物浓度下细胞保护率 / %		
	TD <sub>0</sub>	1/2 TD <sub>0</sub>	1/4 TD <sub>0</sub>
预防保护黄芩	50.2 ± 6.81 <sup>2,4)</sup>	37.8 ± 6.12 <sup>2)</sup>	32.6 ± 3.21 <sup>1)</sup>
柴胡	70.1 ± 5.56	60.9 ± 8.02 <sup>3)</sup>	46.0 ± 6.39
配伍	69.1 ± 5.47	41.8 ± 11.51 <sup>1)</sup>	41.1 ± 8.19
感染后保护黄芩	90.5 ± 7.10 <sup>1)</sup>	74.5 ± 7.21 <sup>1)</sup>	59.2 ± 6.73 <sup>1)</sup>
柴胡	73.9 ± 8.64	62.1 ± 7.62	45.8 ± 10.95
配伍	82.2 ± 5.67	69.1 ± 7.32	61.2 ± 6.75 <sup>1)</sup>
病毒对照	0		
正常细胞对照	100		

注: 与柴胡组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与配伍组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

根据细胞病变法和 MTT 法两种检测方法, 发现 3 组药物都具有不同程度的预防保护作用, 3 组药物浓度在 TD<sub>0</sub>, 1/2 TD<sub>0</sub>, 1/4 TD<sub>0</sub> 时的预防保护率表现明显差异 ( $P < 0.05$ ), 柴胡组预防保护作用尤为明显, 药物浓度在 TD<sub>0</sub>, 1/2 TD<sub>0</sub>, 1/4 TD<sub>0</sub> 时柴胡组的预防保护率均明显高于黄芩组, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 在 1/2 TD<sub>0</sub> 浓度时柴胡组的预防保护率明显高于配伍组, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。在 TD<sub>0</sub> 时配伍组预防保护率高于黄芩组, 有显著差异 ( $P < 0.01$ )。因此, 从预防保护率来看, 柴胡表现最明显, 其次为配伍组, 最差为黄芩组。

在病毒感染细胞后, 3 组药物对细胞均具有不同程度的治疗保护作用, 3 组药物的保护率表现明显差异 ( $P < 0.05$ ); 黄芩组药物浓度在 TD<sub>0</sub>, 1/2 TD<sub>0</sub>, 1/4 TD<sub>0</sub> 的保护率均明显高于柴胡组, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ); 药物浓度在 TD<sub>0</sub>, 1/2 TD<sub>0</sub> 时黄芩组的治疗保护率高于配伍组, 但差异不显著; 配伍组治疗保护率在浓度 1/4 TD<sub>0</sub> 时明显优于柴胡组, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。因此, 从感染后对细胞保护率来看, 黄芩组和配伍组作用较好, 而柴胡组较差。

## 3 讨论

柯萨奇 B 病毒是导致病毒性心肌炎最主要的病原<sup>[2-3]</sup>。在急性期和亚急性期, 大量的病毒在心肌组织中复制、繁殖和播散, 直接引起心肌细胞的溶解和坏死。实验研究表明在病毒性心肌炎的炎性细胞浸润前, 心肌细胞已经发生了明显病变, 表现为凝固性坏死和点状分布的单细胞钙化等病变, 提示病毒本身是导致心肌损伤的原因之一<sup>[4]</sup>。目前应用血清学和分子生物学技术对扩张型心肌病病因研究, 更直

接证实了病毒感染与扩张型心肌病的关系。蒋氏<sup>[5]</sup>等发现扩张型心肌病患者血清中肠道病毒抗体阳性率为 65.7%, 而正常人群仅为 25.7%; Bowles<sup>[6]</sup>等报道扩张型心肌病患者肠道病毒特异性 IgM 抗体阳性率(33%) 明显高于对照组(4.8%), 差异显著。李延文<sup>[7]</sup>等采用 RT-PCR 方法检测了 21 例扩张型心肌病患者心肌中的肠道病毒 RNA, 其中 9 例呈阳性, 用原位杂交检测 12 例扩张型心肌病患者心肌中的肠道病毒 RNA, 6 例呈阳性, 而对照组均未见病毒核酸。以上研究均说明病毒在病毒性心肌炎和扩张型心肌病的发病中起到重要作用。目前普遍认为病毒的持续复制及某些病毒蛋白的表达肯定与扩张型心肌病的发展有一定关系。因此, 治疗病毒性心肌炎、预防扩张型心肌病的发生, 进行有效抗病毒、保护心肌细胞的治疗是十分重要的环节。

小柴胡汤为和解法之主方, 主治病邪居于少阳半表半里之证。因其所主之证“...往来寒热, 胸胁苦满, 嘿嘿不欲饮食, 心烦喜呕, 或胸中烦而不呕, 或渴, 或腹中痛, 或胁下痞硬, 或心下悸, ...”与病毒性心肌炎临床证候十分相似; 少阳证病机为邪在半表半里, 邪正分争, 枢机不利与病毒性心肌炎病毒感染与机体免疫系统相互作用机制也十分相似。黄芩和柴胡是小柴胡汤中的君臣药, 柴胡气质轻清, 苦味最薄, 能疏少阳之郁滞, 为君药; 黄芩苦寒, 气味较重, 能清胸腹蕴热以除烦满, 为臣药。二者合用能解少阳半表半里之邪。现代研究表明: 柴胡-黄芩供试液能抑制鸡胚内流感病毒, 降低小鼠病毒性肺炎所致的死亡率<sup>[8]</sup>。本研究结果发现: 黄芩提取物在体外具有明显的直接灭活病毒的作用, 而柴胡和配伍组在此方面表现不明显。配伍组虽然含有黄芩成分, 但未表现明显灭活病毒作用, 而且黄芩组的  $1/2TD_0$  和  $1/41/2TD_0$  亦未表现明显直接灭活病毒作用, 提示黄芩提取物的直接灭活病毒作用与其浓度可能密切相关, 高浓度的黄芩提取物可表现直接灭活病毒作用; 3 组药物都具有不同程度的预防保护作用, 而柴胡组和配伍组的预防保护作用尤为明显; 在病毒感染后, 3 组药物对细胞均具有不同程度的治疗保护作用, 黄芩组和配伍组的治疗保护率明显高于柴胡组。实验结果提示, 黄芩提取物和柴胡提取物在抗病毒感染和保护细胞方面作用的环节可能有所侧重。柴胡在保护细胞免受病毒感染方面表现明显, 可能通过药物作用细胞后干扰了 CVB<sub>3m</sub> 病毒对细胞

的吸附环节, 从而直接阻断了病毒侵入细胞, 使其失去了其生存繁殖的条件而达到抗病毒作用; 而黄芩提取物具有直接灭活病毒作用, 具体机制尚有待进一步研究。黄芩提取物对病毒吸附后的细胞也具有明显保护作用, 可能作用在病毒侵入后的复制等环节。因此, 在病毒感染细胞后, 黄芩提取物发挥了其直接灭活病毒和保护细胞双重作用, 其保护率明显高于柴胡组。而配伍组给药在体外分别具有黄芩提取物和柴胡提取物两组药物的预防和治疗保护作用, 但没有表现明显的配伍后某方面作用增强的优势。

黄芩提取物具有明显的直接灭活病毒作用, 柴胡提取物和配伍提取物直接灭活病毒作用不明显。3 组药物都具有不同程度的预防保护作用, 柴胡提取物和配伍提取物预防给药保护细胞作用明显。3 组药物都具有不同程度的治疗保护作用, 黄芩提取物和配伍提取物表现明显。配伍组具有预防和治疗保护双重作用, 但没有表现出配伍后作用增强的优势。

#### [参考文献]

- [1] 王雪峰, 刘芳, 魏克伦, 等. 小柴胡汤及其分解剂对柯萨奇 B3m 病毒感染乳鼠心肌保护及细胞免疫调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(8): 599.
- [2] Renes J, Helin M, Vaino P, et al. Clinical outcome and left ventricular function 23 years after acute coxsackie virus myopericarditis[J]. Eur Heart J, 1990(11): 182.
- [3] See D M, Tilless J G. Viral myocarditis[J]. Rev Infect Dis, 1991, 13: 951.
- [4] Mcmanus B M, Chow L H, Wilson J E, et al. Direct myocarditis injury by enterovirus: A central role in the evolution of murine myocarditis[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1993, 68(2): 159.
- [5] 蒋金法, 邓南伟, 杨英珍. 急性病毒性心肌炎与扩张型心肌病关系的探讨[J]. 中华心血管病杂志, 1992, 20(1): 4.
- [6] Bowles N E, Rose M L, Taylor P, et al. End-stage dilated cardiomyopathy persistence of enterovirus RNA in myocardium at cardiac transplantation and lack of immune response[J]. Circulation, 1989(80): 1128.
- [7] 李延文, 杨英珍, 何梅先, 等. 肠道病毒感染与扩张型心肌病发病关系的探讨[J]. 中华内科杂志, 1997, 36(6): 377.
- [8] 王盛春, 党峻英, 贾旭东. 柴胡与黄芩伍用清热与抗病毒作用[J]. 中草药, 1997, 29(1): 27.

[责任编辑 聂淑琴]