

eration in the subgroups of the first, second and third groups was significantly higher than that in the virus control group ($P < 0.01$). The inhibition ratio of virus proliferation in the subgroups of the second and third groups was significantly lower than that in the first group ($P < 0.05$). The inhibition ratio of virus proliferation in the subgroups of the third group was significantly lower than that in the second group ($P < 0.05$). The median inhibitory concentration of *Folium Isatidis* aqueous extract on IAV in the first, second, third groups was 0.75 , >1.25 and $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The antiviral activity of the three intervention methods from high to low was the first groups, the third groups and the second groups in turn. **Conclusion** *Folium Isatidis* aqueous extract has good anti IAV activity, and the mechanism may be related to the enhancement of immunity.

Key words: *Folium Isatidis*; influenza A virus; antiviral activity

流行性感冒简称流感,是由流感病毒引起的一种人、畜、禽共患的急性呼吸道传染病,它以传播迅速、发病率高、变异快,并可引起季节性大流行和地区性大爆发而成为严重威胁人类健康的疾病^[1-2]。甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)已在历史上造成多次流感大流行,特别是近年来 H1N1、H7N9 等流感的大爆发给社会带来了极大的危害^[3-4]。中草药在流感防治领域一直发挥着重要作用。大青叶是十字花科植物菘蓝的干燥叶,为 2 a 生草本植物,是常用的清热解毒药,临床上用于防治流感、腮腺炎、肝炎和肿瘤等。本实验对大青叶水提取物的抗流感病毒活性进行分析,以期为寻找新的抗流感病毒药物提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 狗肾传代细胞(madin-darby canine kidney, MDCK)购自中国科学院细胞库,人类胚胎肾细胞 293T 取自本实验室。

1.2 主要试剂及仪器 中药大青叶购自重庆市渝中区桐君阁大药房,细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自日本同仁 Dojindo 公司,高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)、 α -基础培养基(α -minimum essential medium, α -MEM)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Life 公司,流感病毒八质粒反向遗传包装系统由美国孟菲斯儿童医院的 WEBSTER R G 惠赠, Maitiskan MK3 酶标仪、倒置显微镜购自美国 Thermo 公司。

1.3 细胞培养 293T 细胞用高糖 DMEM(含 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖)培养, MDCK 用 α -MEM 培养。细胞培养时,所有的培养基均含体积分数 10% FBS、 $100 \times 10^3 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素,置于 37°C 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱,在饱和湿度下培养^[5-6]。

1.4 大青叶水提物的提取 将中药大青叶粉碎,称取 60 g 于圆底烧瓶中,加 600 mL 超纯水 60°C 恒温水浴浸泡 24 h , 然后 90°C 回流提取 2 次,每次回流

2 h , 过滤,浓缩至 5 mL , 除菌,分装后于 -20°C 保存^[7]。

1.5 CCK-8 法检测大青叶水提物的细胞毒性 将 MDCK 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后将各孔培养基更换为 $100 \mu\text{L}$ 由 α -MEM 培养基稀释成不同浓度的大青叶水提物,实验设置 10 个浓度梯度(0.50 、 0.75 、 1.00 、 1.25 、 1.50 、 1.75 、 2.00 、 3.00 、 4.00 、 $5.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),并以此 10 个浓度设置 10 个大青叶水提物处理组、细胞对照组(不加水提物处理细胞)和空白对照组(只含培养基,不培养细胞也不加水提物处理),每组均设置 6 个复孔。继续培养 48 h 后吸出每孔药物溶液,并加入 $100 \mu\text{L}$ 含体积分数 10% CCK-8 的工作液,培养箱孵育 1 h 后在酶标仪上检测各孔在 450 nm 波长处的吸光度值^[8],并计算各组的细胞存活率。细胞存活率 = (大青叶水提物处理组吸光度值 - 空白对照组吸光度值) / (细胞对照组吸光度值 - 空白组吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.6 IAV 的制备 将 293T 细胞和 MDCK 细胞以 $2:1$ 的比例混养于 6 孔板中。培养 24 h 后,采用 Lipofectamine™ 2000 共转染流感病毒八质粒反向遗传包装系统,按照使用说明书进行转染。转染 48 h 后收集培养基,以 $3\,000 \times g$ 离心 10 min ,收集上清液,分装, -80°C 保存^[9]。

1.7 半数细胞培养物感染量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)测定 TCID₅₀ 常用于反映病毒感染力。在 96 孔板中将制备的 IAV 原液用含体积分数 2% FBS 的 α -MEM 进行 10 倍梯度($10^{-1} \sim 10^{-10}$)稀释,每个浓度梯度设 8 个复孔。然后将该 96 孔板中稀释好的病毒液对应转移至另一个 96 孔板的相应孔中,每孔接种 $100 \mu\text{L}$ 。在每孔加入 $2.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的 MDCK 细胞悬液 $100 \mu\text{L}$,同时设正常对照细胞($100 \mu\text{L}$ 培养液 + $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液)。逐日用倒置显微镜观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)并记录结果,一般需要观察 $5 \sim 7 \text{ d}$ ^[9]。用 Karber 法计算 TCID₅₀, 公式为: $\lg \text{TCID}_{50} = L - d$ ($s - 0.5$), L = 最高稀释度的对数, d = 稀释对数之间的差, s = 病变孔比率总和。

1.8 大青叶水提物抗 IAV 活性测定 将 $1.5 \times$

10^4 L^{-1} 的 MDCK 细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。培养 24 h 后将实验分为 3 组进行,并在大青叶水提物的最大无毒浓度数值范围内选取 5 个不同浓度(0.25 、 0.50 、 0.75 、 1.00 、 $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)做进一步检测。第 1 组处理:将 30 孔分成 5 个小组,每组 6 个复孔,吸出孔里的培养基,第 1~5 小组的各个复孔分别加入 5 个不同浓度的大青叶水提物,培养 4 h 后吸出药液,每孔再加入 $100\text{ }\mu\text{L } 10\times\text{TCID}_{50}$ 的病毒液作用 2 h 后吸出,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养液继续培养;第 2 组处理:将 30 孔分成 5 个小组,每小组 6 个复孔,吸出孔里培养基,第 1~5 小组的各个复孔分别加入 5 个不同浓度的大青叶水提物,并给每小组各复孔都加入 $100\text{ }\mu\text{L } 10\times\text{TCID}_{50}$ 的病毒液共同作用 4 h 后吸出,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养液继续培养;第 3 组处理:将 30 孔分成 5 个小组,每小组 6 个复孔,吸出孔里培养基,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L } 10\times\text{TCID}_{50}$ 的病毒液,作用 2 h 后吸出,第 1~5 小组的各个复孔分别加入 5 个不同浓度的大青叶水提物,培养 4 h 后吸出药液,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养液继续培养。同时设病毒对照组(只加病毒液吸附 2 h,不加大青叶水提物处理)和细胞对照组(仅培养细胞,不加病毒和大青叶水提物处理)。以上各组在继续培养 48 h 后吸出孔内培养基,并加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含体积分数 10% CCK-8 的工作液,培养箱孵育 1 h 后在酶标仪上检测各孔在 450 nm 波长处的吸光度值,计算大青叶水提物对病毒的增殖抑制率。病毒增殖抑制率=(大青叶水提物处理组吸光度值-病毒对照组吸光度值)/(细胞对照组吸光度值-病毒对照组吸光度值) $\times 100\%$ ^[10]。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析和最小显著差法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大青叶水提物对 MDCK 细胞的毒性 大青叶水提物的细胞对照组、 0.50 、 0.75 、 1.00 、 1.25 、 1.50 、 1.75 、 2.00 、 3.00 、 4.00 、 $5.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的细胞存活率分别为(100.00 ± 0.00)%、(99.97 ± 1.08)%、(99.95 ± 4.34)%、(98.62 ± 1.45)%、(98.81 ± 2.04)%、(74.65 ± 6.29)%、(49.71 ± 2.14)%、(39.86 ± 4.31)%、(19.75 ± 2.26)%、(7.86 ± 3.74)%、(2.77 ± 1.16)%,由以上结果可知,大青叶水提物对 MDCK 细胞的半数细胞毒性浓度为 $1.75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,大青叶水提物对 MDCK 细胞的最大无毒浓度为 $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 大青叶水提物抗 IAV 活性分析 结果见表 1。第 1、2、3 组大青叶水提物各浓度亚组的病毒增殖抑制率均高于病毒对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。第 2、3 组大青叶水提物各浓度亚组的病毒增殖抑制率均显著低于第 1 组对应的大青叶水提物亚组,差异有统计学意义($P<0.05$)。第 3 组大青叶水提物各浓度亚组的病毒增殖抑制率显著高于第 2 组对应的大青叶水提物亚组,差异有统计学意义($P<0.05$)。第 1 组对 IAV 的半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC_{50})约为 $0.75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,第 2 组对 IAV 的 $\text{IC}_{50}>1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;第 3 组对 IAV 的 IC_{50} 约为 $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。3 组不同干预方法的抗病毒活性排序为:第 1 组 $>$ 第 3 组 $>$ 第 2 组。

表 1 大青叶水提物对 IAV 增殖抑制率比较
Tab.1 Comparison of inhibition rate of *Folium Isatidis* aqueous extract on IAV proliferation ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	增殖抑制率/%
病毒对照组		00.00 \pm 0.00
第 1 组		
0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	28.23 \pm 2.13 ^a
0.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	37.43 \pm 3.14 ^a
0.75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	48.13 \pm 2.86 ^a
1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	60.37 \pm 2.24 ^a
1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	65.15 \pm 3.01 ^a
第 2 组		
0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	9.26 \pm 1.87 ^{ab}
0.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	14.01 \pm 2.07 ^{ab}
0.75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	20.14 \pm 1.96 ^{ab}
1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	27.46 \pm 2.54 ^{ab}
1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	32.05 \pm 2.17 ^{ab}
第 3 组		
0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	11.35 \pm 2.31 ^{abc}
0.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	18.03 \pm 1.98 ^{abc}
0.75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	39.23 \pm 2.01 ^{abc}
1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	47.43 \pm 3.24 ^{abc}
1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	51.13 \pm 2.07 ^{abc}

注:与病毒对照组比较^a $P<0.05$;与第 1 组比较^b $P<0.05$;与第 2 组比较^c $P<0.05$ 。

3 讨论

大青叶是十字花科植物菘蓝的干燥叶,为 2 a 生草本植物,有清热、解毒、凉血、止血的功效,历来为清热解毒之要药^[11]。随着老药新用理念的提出,其抗菌、抗癌、抗病毒、抗炎、利胆、抗内毒素及增强免疫力等药理作用也不断被发现,提示大青叶将有更广泛的药用价值。鉴于目前临床使用的抗流感病毒药物对宿主细胞存在毒副作用及耐药性等缺陷^[12],有必要对大青叶的抗流感病毒作用机制进行深入研究。

本研究首先对大青叶水提物的细胞毒性进行分

析,确定了细胞最大无毒浓度为 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,选用最大无毒浓度范围内的 5 个浓度 (0.25 、 0.50 、 0.75 、 1.00 、 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 进一步测定水提物的抗 IAV 活性。CCK-8 检测结果显示,大青叶水提物有较好的抗流感病毒活性。为进一步分析大青叶水提物发挥抗流感病毒活性的机制,本研究将该水提物抗病毒活性检测的实验分为 3 种处理方式:一是先加大青叶水提物对细胞作用一段时间,再加病毒吸附细胞 2 h;二是将大青叶水提物和病毒同时作用细胞一段时间后吸出;三是先加病毒吸附细胞 2 h,再加大青叶水提物作用细胞一段时间。以上 3 种处理方式的设置是基于目前比较认可的 3 种抗流感病毒机制:(1)通过增强机体免疫力,如诱导机体产生干扰素和免疫球蛋白而间接发挥抗病毒作用^[13];(2)通过直接灭活病毒而发挥抗病毒作用;(3)通过作用于流感病毒生活周期的其中一个环节(吸附、侵入、脱壳、病毒核酸复制、病毒蛋白的生物合成、子代病毒颗粒的装配与释放直接抑制流感病毒增殖)^[14]。因此,可以推测,若是第 1 种处理方式的抗病毒效果较好,则可以说明大青叶水提物可能是通过增强机体免疫力的方式去发挥抗流感病毒作用;若是第 2 种处理方式的效果较好,则说明大青叶水提物是通过直接灭活病毒的方式发挥作用;若是第 3 种处理方式的效果较好,则说明大青叶水提物是通过阻断流感病毒生活周期的其中一个环节而发挥抗病毒作用。本研究结果显示,以第 1 种方式处理时,大青叶水提物的抗流感病毒活性显著优于其他 2 种处理方式,同时,另外 2 种处理方式也表现出一定的抗流感病毒活性,表明大青叶水提物主要是通过增强机体免疫力的方式来发挥抗流感病毒效应的。

本研究结果表明,大青叶水提物有较强的抗流感病毒活性,其作用机制可能与增强机体免疫力有关,其确切机制和活性成分有待进一步研究。有研究表明,大青叶中 4(3H)吡唑酮具有明显的体外抗 H1N1 型流感病毒活性^[15],但通常一味中草药里面包含很多药用成分,各成分可能通过多个途径起抗流感病毒作用。现代研究证明,大青叶药效涵盖了多种化学成分,以多环节、多靶点作用于机体而发挥综合效应^[16],但目前对于大青叶的研究,无论是药理学还是药效学,都过于分散而缺乏系统性,仍不能明确其活性物质、阐明其作用机制,因此,关于大青叶抗流感病毒的活性成分和作用机制的研究还有很广阔的空间。

参考文献:

- [1] 张华. 不同病原体感染肺炎患儿支气管肺泡灌洗液中肺表面活性物质相关蛋白的表达[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(6): 510-512.
- [2] WENDEL I, MATROSOVICH M, KLENK H D, *et al.* Evolution of human influenza A viruses[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(3): 411-416.
- [3] WANG X, TAN J Y, ZHAO J Q, *et al.* Pandemic influenza A (H1N1) virus infection increases apoptosis and HIV-1 replication in HIV-1 infected jurkat cells[J]. *Viruses*, 2016, 8(2): 33-44.
- [4] ALEXANDER J, FIONA A, DANIELLE LULIANO C, *et al.* Detecting spread of avian influenza A(H7N9) virus beyond China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(5): 741-749.
- [5] LUWANKA M, JENNIFER L, DANIELLE K, *et al.* Transcriptome analysis reveals a signature profile for tick-borne flavivirus persistence in HEK 293T cells[J]. *MBio*, 2016, 7(3): 314-316.
- [6] YAO Q, LIU Z H, XU M C, *et al.* Mechanism for ginkgolic acid (15:1)-induced MDCK cell necrosis: mitochondria and lysosomes damages and cell cycle arrest[J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(5): 375-383.
- [7] 魏恒. 大青叶中生物碱 4(3H)吡唑酮的提取和纯化工艺研究[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2008.
- [8] 李娜, 曹娟, 郁继国. miR-26a 对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及机制研究[J]. 眼科新进展, 2017, 37(7): 619-622.
- [9] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 109-119.
- [10] 刘媛媛, 杨占秋, 何静. MTT 分析法、空斑减数法及 CPE 观察法评估药物体外抗病毒效果的比较与分析[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(2): 199-202.
- [11] JIANG L L, LU Y L, JIN J H, *et al.* n-Butanol extract from Folium isatidis inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production in macrophages and protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 5601-5609.
- [12] OROZOVIC G, OROZOVIC K, JÄRHULT J D, *et al.* Study of oseltamivir and zanamivir resistance-related mutations in influenza viruses isolated from wild mallards in Sweden[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89306.
- [13] 王林林, 史玉柱, 王雪. 中药抗流感病毒研究进展[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(6): 600-604.
- [14] RIVAS H G, SCHMALING S K, GAGLIA M M. Shutoff of host gene expression in influenza A virus and herpesviruses: similar mechanisms and common themes[J]. *Viruses*, 2016, 8(4): 102.
- [15] 许涛, 梁剑平, 余四九, 等. 大青叶中 4(3H)吡唑酮体外抗 H1N1 型流感病毒的作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2008, 27(3): 7-9.
- [16] 罗芬, 马卫列, 张志珍. 甲型流感病毒 RNA 聚合酶—抗病毒药物靶点[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(5): 434-440.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)