

论著

新疆琐琐葡萄提取物抗流感病毒 A(H1N1) 亚型作用研究

何 华¹ 马 龙² 徐良军¹ 谌建新¹ 杨浩峰¹ 卢耀勤¹

(1. 乌鲁木齐市疾病预防控制中心,新疆 乌鲁木齐 830026;

2. 新疆医科大学公共卫生学院,新疆 乌鲁木齐 830026)

摘 要:目的 对新疆琐琐葡萄提取物抗流感病毒 A(H1N1) 亚型作用进行研究。方法 1. 采用狗肾传代细胞培养法和 MTT 法研究新疆琐琐葡萄多糖、琐琐葡萄总黄酮、琐琐葡萄总三萜对抗流感病毒 A(H1N1) 型作用。2. 采用 Read-muench 法计算流感病毒 A(H1N1) 型在狗肾传代细胞中的半数感染量。3. 通过观察细胞病变 (CPE)、计算细胞病变 CPE 抑制率、MTT 法测定药物对细胞的保护率等来评价琐琐葡萄多糖、总黄酮、总三萜的抗流感病毒效果。结果 琐琐葡萄总黄酮的最大无毒作用浓度 (TC₀) 为 20 μg/ml, 琐琐葡萄总三萜的 TC₀ 为 1 500 μg/ml。体外细胞试验中, 琐琐葡萄黄酮、多糖提取物表现出对病毒的直接抑制作用, 但是琐琐葡萄三萜提取物和利巴韦林 (阳性对照) 此作用不明显。体外细胞试验中, 琐琐葡萄黄酮、多糖、三萜提取物均表现出对感染细胞后病毒的抑制作用, 三萜的抑制效果要强于黄酮和多糖, 利巴韦林的抑制作用强于黄酮、多糖、三萜。结论 新疆特色植物资源—琐琐葡萄提取物抗流感病毒 A(H1N1) 亚型的作用是多途径的, 琐琐葡萄总黄酮、琐琐葡萄多酚、琐琐葡萄三萜分别表现出对流感病毒 A(H1N1) 亚型感染细胞前、感染细胞后的抑制作用, 以及直接抑制作用, 可考虑作为抗流感药用资源进行进一步的开发利用。

关键词:黄酮类; 多糖类; 三萜类; 琐琐葡萄; 植物提取物; 抗流感病毒 A(H1N1)

Research on Xinjiang SuoSuo Grape Extract Against Influenza A (H1N1)

HE Hua, MA Long, XU Liang-jun, SHEN Jian-xin, YANG Hao-feng, LU Yao-qin
(Urumqi Municipal Center for Disease Control and Prevention, Xinjiang Wulumuqi 830026, China)

Abstract: **Objective** To research on Xinjiang SuoSuo grape extract against influenza A (H1N1). **Method** 1. Use MDCK cell culture and MTT method on Xinjiang SuoSuo grape polysaccharide, SuoSuo grape flavonoids, total terpene SuoSuo grapes

优选条件满足多种葱蒜类植物中 MSeC 含量测定样品的制备要求。

MCSHEEHY 等曾尝试建立甲醇提取结合 ES/MS/MS 离线鉴定和定量其中 MSeC 的方法^[7], 在样品分离后经过多步纯化和浓缩过程导致 MSeC 损失, 曾被认为是离线方法难以准确定量 MSeC 的主要原因。本研究发现甲醇提取 MSeC 的能力显著低于水, 证明甲醇不能保证最大程度提取 MSeC。此外, 本研究优化的样品处理方法简单可靠, 与灵敏、特异性强的 LC-MS/MS 结合应用, 有望为深入探讨富硒葱蒜类植物硒成分的安全性和应用价值研究提供必要的定量分析检测技术。

参考文献

[1] IP C, LISK DJ. Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium[J]. Carcinogenesis, 1995, 16: 2649-2654.

[2] 杨文婕, 陈竞, 李卫东, 等. 4 种富硒植物预防 MNNG 诱发大鼠胃癌效果研究——二、不同源硒预防大鼠胃癌安全性对比研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(1): 90-92.

[3] GE HH, CAI XJ, TYSON JF, et al. Identification of selenium species in selenium-enriched garlic, onion and broccoli using high-performance ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection[J]. Anal Commun, 1996, 33: 279-281.

[4] 陈晓滨, 林少彬, 杨文婕. 环境和生物体有机含硒化合物形态测定的研究进展[J]. 卫生研究, 2005, 34(3): 371-374.

[5] UDEN PC, BOAKYE HT, KAHAKACHCHI C, Tyson JF. Selective Detection and Identification of Se Containing Compounds——review and recent Developments[J]. J Chromatogr A, 2004, 1050(1): 85-93.

[6] 张明, 杜业刚, 杨文婕. 液相色谱串联法定量检测青花菜中硒[J]. 分析化学, 2007, 35(2): 244-246.

[7] MCSHEEHY S, YANG WENJIE, PANNIER F, et al. Speciation analysis of selenium in garlic by two-dimensional high-performance liquid chromatography with parallel inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray tandem mass spectrometric detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 421: 147-153.

[收稿日期: 2008-12-26]

中图分类号: R15; TS207.5; TS207.3; Q503 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2009)05-0389-04

作者简介: 何 华 女 副主任医师



against influenza virus A (H1N1) -type role. 2. Use read-muench method to calculate the $TICD_{50}$ in influenza virus A (H1N1) -type MDCK cells. 3. By observing cytopathic effect (CPE), the calculation CPE cytopathic effect inhibition rate, MTT determination of drugs on cells, such as the protection rate to evaluate the Suo Suo grape polysaccharide, total flavonoids, total triterpenoid the effect of anti-influenza virus. **Results** Determine the total flavonoids of grape Suo Suo largest concentration of non-toxic (TC_0) to 20 $\mu\text{g/ml}$, Suo Suo total triterpenoid grape TC_0 for the 1 500 $\mu\text{g/ml}$. Flavonoids, polysaccharides extract directly inactivated with relatively good, but this triterpenoid, and the role of ribavirin was not obvious. Flavonoids, polysaccharides, triterpenes have therapeutic effects, and the triterpenoid and flavonoids's effect of therapeutic than the polysaccharide, the therapeutic effect of ribavirin than flavonoids, polysaccharides, triterpene. **Conclusion** After studying the characteristics of plant resources in Xinjiang Suo Suo grape extract of anti-influenza virus A (H1N1) subtype of the role is a multi-passing, In vitro studies have shown by the different active ingredients of total flavonoids of suo suo grape, suo suo grape polyphenols, Suo Suo grape triterpenoid have a better treatment results to prevention of the influenza virus A (H1N1) subtype, directly inactivated treatment, can be regarded as anti-influenza medicine resources for further development and utilization.

Key word: Flavones; Polysaccharides; Triterpenes; Vitis; Plant Extracts; Anti-influenza Virus (H1N1)

流感的药物治疗已经成为人类亟待解决的问题之一。虽然疫苗接种是预防流感的主要措施,但是当一种疫苗定型以后,如果出现大的抗原性漂移,就会造成流感的暴发流行,特别是住院治疗的高危人群更容易感染^[1],有资料显示住院治疗人群的流感疫苗接种率(5%~10%)和保护率(40%~60%)都不高^[2],特别是在高危人群(儿童和老年人)中的保护水平更低^[3]。疫苗对不同时期流感暴发可能会失去预防作用。因此,开发具有预防和治疗流感的药物对完善流感防控工作意义重大。

本研究依托的项目组前期在国家自然科学基金资助项目《新疆维吾尔族食药兼用植物抗衰老的研究》中对葡萄的保健功效已做过初步研究,继而又在新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目《葡萄及其果皮中保健性功效成分的开发应用研究》的研究中,对新疆地产主要葡萄品种的生物活性物质作了系统分析,发现葡萄中含有齐墩果酸(oleanolic acid, OA)等多种生物活性成分^[4,5];并建立了葡萄皮籽中 OA^[6]和原花青素(proanthocyanidin, OPC)的提取工艺。

琐琐葡萄(Vitis vinifera L.)又名 SUOSUO 葡萄、索索葡萄、豆粒葡萄,果粒小如胡椒,来源于葡萄科(vitaceae)葡萄属植物山葡萄,属无核红葡萄品系,主要分布在东亚地区,我国主产于新疆吐鲁番、和田、鄯善等地,是医药文献如《神农本草经》、《维吾尔药志》、《草本纲目拾遗》等所记载的药用葡萄品种之一。其果实味甜微酸、气微、无毒,可内服、煎汤、捣汁或浸酒,有补气血,强筋骨,利小便之功效,主治气血虚弱,肺虚咳嗽,心悸盗汗,风湿痹痛等症^[7],维吾尔医用于治疗脾胃不和、头晕腰酸、神志不安等,民间用于小儿麻疹、肝炎等症;其根与藤可除风湿、利尿,用于风湿骨痛、水肿,外用于骨折;茎叶可利尿、通小肠、消肿满,用于小便淋痛^[8]。传统医学常用作

补气药,有解表透疹、补五脏、退黄等功效^[9]。现代研究发现琐琐葡萄除含有丰富的维生素、氨基酸、果糖、无机盐等营养物质外,还含有 OA、黄酮等生物活性物质^[10,11]。目前,提取琐琐葡萄有效成分进行抗流感药物的筛选工作尚未见报道^[4,12-14,16]。本研究结合新疆地源优势,拟初步探讨琐琐葡萄提取物多糖类、三萜类、黄酮类抗流感病毒的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 狗肾传代细胞(MDCK),由乌鲁木齐市疾病预防控制中心提供。

1.1.2 病毒株 A/乌鲁木齐/139/2005 H1N1,由乌鲁木齐市疾病预防控制中心提供,并经中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家流感中心鉴定。

1.1.3 阳性对照 利巴韦林片,由四川美大康药业股份有限公司生产,批号 070106,药店自购。

1.1.4 琐琐葡萄提取物 琐琐葡萄购自新疆维吾尔自治区吐鲁番维药市场,提取物有总多糖、总三萜、总黄酮三类。用醇提法提取总多糖,苯酚-硫酸法测定琐琐葡萄中多糖的含量为 8.19%;用超声法提取总三萜,比色法测定总三萜的含量为 48.2%;用醇提法提取总黄酮,比色法测定总黄酮含量为 21.0%。

1.1.5 实验试剂 0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司)、L-谷氨酸(GIBCO)、DMEM 培养基(GIBCO)、Trypsin 胰酶(GIBCO)、牛血清白蛋白(BBI)、HEPES 缓冲液(Sigma)、碳酸氢钠注射液(国产)、国家流感中心提供的 A(H1N1)型流感病毒的标准参照抗原与血清、国产 RDE(受体破坏酶)。

1.2 方法

1.2.1 病毒毒力测定 用维持液将病毒稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、

10⁻¹⁰ 倍 10 个浓度,按常量分别加入细胞已长成单层的 96 孔培养板中,倒置显微镜下观察记录细胞病变 (CPE) 程度。计算组织半数感染量 (TCID₅₀),确定最大不感染浓度 (TCID₀)。

1.2.2 琐琐葡萄提取物对 MDCK 细胞的毒性实验

用不含小牛血清的细胞维持液配制琐琐葡萄提取物不同浓度:黄酮 2 500、500、100 和 20 μg/ml,多糖 2 500、500、100 和 20 μg/ml,三萜 7 500、1 500、300 和 60 μg/ml。传代 MDCK 细胞于 96 孔培养板,待长成单层后加入上述浓度的药物,100 μl/孔,每个浓度加入 4 孔,置于 37 ℃、5 %二氧化碳培养箱内培养,每天置显微镜下观察细胞形态,连续观察 3 ~ 5 d。设正常细胞对照和病毒对照。计算药物最大无毒浓度 (TC₀)。阳性对照组:利巴韦林配置成 37 500、7 500、1 500 和 300 μg/ml 4 个浓度,其对细胞的毒性测定按上法进行。

1.2.3 设计与分组 将最大无毒作用浓度稀释 2 倍,按琐琐葡萄提取物对流感病毒的不同作用环节分成 3 组,分别就琐琐葡萄提取物对流感病毒感染细胞前的抑制作用 (1 组)、对流感病毒的直接抑制作用 (2 组)、对流感病毒感染细胞后的抑制作用 (3 组) 进行研究:1 组:先加入含不同浓度药物的细胞维持液,100 μl/孔,24 h,吸出,再吸附病毒 100 TCID₅₀,100 μl/孔,2 h,吸出,再加入细胞维持液;2 组:药物与病毒先作用 2 h 后再加入细胞上,吸附 2 h,吸出,再加入细胞维持液;3 组:先吸附病毒 2 h,吸出,再加入含药物的细胞维持液。每个剂量药物加入 4 孔,置于 37 ℃、5 %二氧化碳培养箱内培养,每天置显微镜下观察细胞形态,连续观察 3 ~ 5 d。当病毒对照 CPE 出现 + + + ~ + + + +,正常细胞对照 CPE 阴性时,进行 MTT 实验。同时设利巴韦林阳性对照组、正常细胞对照组和病毒对照组。

1.2.4 结果测定

1.2.4.1 细胞形态 光镜下观察细胞病变,细胞病变 - (0 %)、+ (1 ~ 25 %)、+ + (25 % ~ 50 %)、+ + + (50 % ~ 75 %)、+ + + + (75 % ~ 100 %) 时,分别计为 0 分、1 分、2 分、3 分、4 分,并对各实验孔积分,按照下列公式计算细胞病变 CPE 抑制率^[16]:CPE 抑制率 = (对照组 CPE 积分 - 实验组 CPE 积分)/对照组 CPE 积分。

1.2.4.2 细胞保护率测定:在 570 nm 处测定 MTT,计算药物对 MDCK 细胞的保护率^[16]:保护率 = (加药孔 A 值 - 病毒对照孔 A 值)/细胞对照孔 A 值。

2 结果

2.1 病毒 TICD₅₀ 的测定

采用 READ-MUENCH^[11] 法计算流感病毒 A (H1N1) 型在 MDCK 细胞中的 TICD₅₀ 为 10⁴/0.1 ml, TICD₀ 为 10⁹/0.1 ml,试验用的病毒攻击量为 100 TICD₅₀/0.1 ml。

2.2 受试物对细胞的毒性实验

给予 MDCK 细胞不同浓度的受试物,观察细胞病变,黄酮的最大无毒浓度 (TC₀) 为 20 μg/ml,连续观察 3 d,未观察到细胞病变;而从 100 μg/ml 开始对细胞有轻微毒性反应,并随着浓度的加大毒性增强。故 20 μg/ml 为实验用的最适稀释浓度。同理,多糖和三萜的最适稀释浓度分别为 20 和 1 500 μg/ml,利巴韦林的最适实验浓度为 300 μg/ml,结果见表 1。

表 1 琐琐葡萄提取物对 MDCK 细胞毒性 (CPE) 观察结果

试验物质	剂量 (μg/ml)	观察时间 (h)		
		24	48	72
黄酮	2500	脱落	脱落	脱落
	500	颗粒增多	脱落	脱落
	100	颗粒增多	颗粒增多	脱落
	20	-	-	-
多糖	2500	脱落	脱落	脱落
	500	颗粒增多	颗粒增多	脱落
	100	±	颗粒增多	脱落
	20	-	-	-
三萜	7500	颗粒增多	脱落	脱落
	1500	-	-	-
	300	-	-	-
	60	-	-	-
利巴韦林	7500	±	±	颗粒增多
	1500	±	颗粒增多	颗粒增多
	300	-	-	-
细胞对照		-	-	-

注:“-”为 MDCK 细胞生长正常。“±”为 MDCK 细胞开始出现病变。

2.3 琐琐葡萄提取物抗流感病毒 A (H1N1) 型作用

2.3.1 光镜下细胞病变 1 组黄酮、多糖提取物对流感病毒均有一定的抑制作用,最高 CPE 抑制率可达 100.00 %,三萜提取物和利巴韦林 CPE 抑制率相对较低,三萜最高抑制率只有 12.50 %;2 组黄酮、多糖提取物对流感病毒的抑制作用较强,CPE 抑制率可达 80.00 % 以上,但是三萜提取物和利巴韦林的 CPE 抑制率均较低;3 组黄酮提取物、多糖提取物、三萜提取物和利巴韦林的 CPE 抑制率均较高,其中利巴韦林的抑制率最高,可达 93.75 %。

不同程度细胞病变的分级评分形态如图 1 所示。

2.3.2 琐琐葡萄提取物对流感病毒 A (H1N1) 型的抑制率 1 组和 2 组黄酮提取物和多糖提取物对流感病毒均有一定的抑制作用,最高 CPE 抑制率可达 100.00 %,三萜提取物和利巴韦林 CPE 抑制率相对

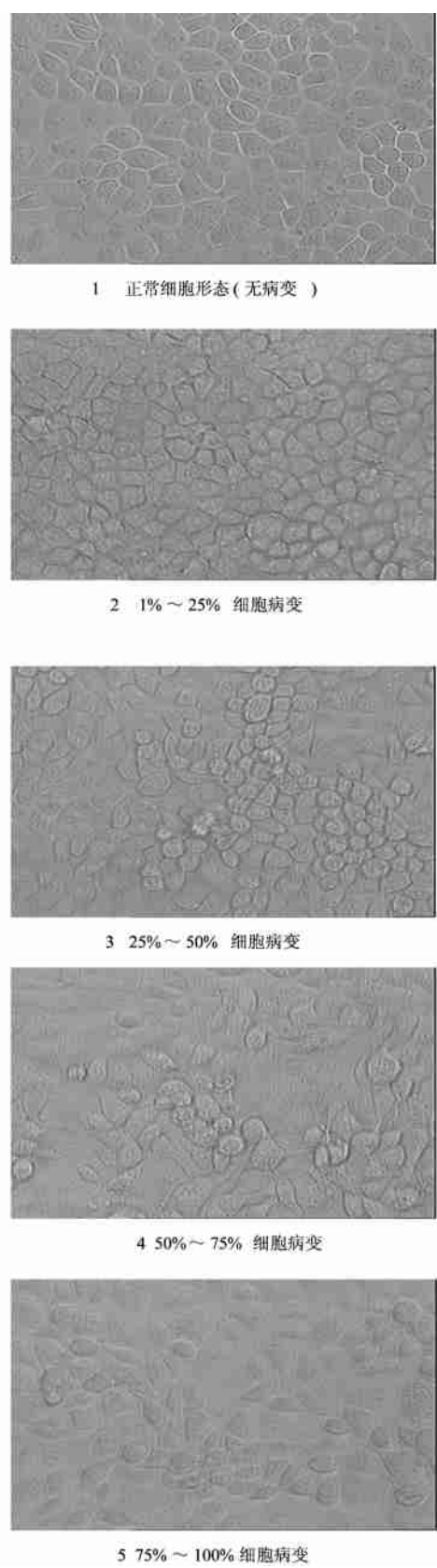


图 1 流感病毒 A(H1N1) 型在 MDCK 细胞中
细胞病变 (CPE) (×400)

较低;3 组三萜提取物和利巴韦林提取物 CPE 抑制率较高,而黄酮提取物和多糖提取物 CPE 抑制率相对较低。结果见表 2。

2.3.3 计算琐琐葡萄提取物对 MDCK 细胞的保护率 镜下观察 CPE 基础上,用 MTT 方法测定 $A_{\lambda=570\text{ nm}}$ 值,以便可以更客观地反应加药与不加药之间的差别。1 组黄酮、多糖提取物对 MDCK 细胞具有较高的保护率,而三萜和利巴韦林的保护率则相对较低;2 组黄酮和多糖对 MDCK 细胞具有较高的保护率,三萜和利巴韦林对 MDCK 细胞保护率相对较低;3 组三萜和利巴韦林对 MDCK 细胞保护率较高,而黄酮、多糖提取物相对较低,结果见表 3。

2.3.4 琐琐葡萄对流感病毒 A(H1N1) 型活性的抑制作用 1 组:以最适给药浓度 2 倍稀释,20 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度黄酮、多糖能使流感病毒滴度下降 1.5 个对数值以上,但三萜和利巴韦林抑制作用不明显。2 组:黄酮和多糖浓度均在 10 $\mu\text{g/ml}$ 时,对流感病毒的作用最强;三萜和利巴韦林作用不明显。3 组:黄酮、多糖、三萜、利巴韦林分别在 20、10、750 和 300 $\mu\text{g/ml}$ 时可以使流感病毒滴度下降 1.5 个对数值以上,抑制流感病毒作用最强,结果见表 4。

3 讨论

3.1 三萜、黄酮、多糖类物质的药理作用

三萜类存在于许多植物中,具有清热,消炎,利尿,强心等作用。本项目课题组曾对琐琐葡萄三萜类成分总三萜(VTT)和齐墩果酸(OA)进行体外大鼠免疫性肝损伤研究,具有明显的保护作用^[17]。国内外研究表明 OA 具有抗炎、镇静、强心、利尿、增强免疫和抑制 S-180 瘤株生长等作用^[18],但其抗流感病毒作用未见报道。

黄酮类有镇痛,降血脂,抗动脉粥样硬化,抗高血压血管壁扩张,抗心率失常,抗心肌损伤,抗心绞痛,抗凝血,利胆及肝脏保护,抗氧化、清除氧自由基,抗肿瘤,对抗脑血管疾病,抗病毒,延缓衰老等多种作用^[19]。国外研究表明黄酮类可抑制病毒的吸附作用及病毒蛋白质和 RNA 的合成;并具有抑制流感病毒唾液酸酶活性的作用,以及抑制膜融合的作用^[20]。实验研究表明^[21],黄酮类物质是抗流感病毒的活性成分之一,主要机制是抑制流感病毒唾液酸酶的活性及膜融合作用。

多糖(polysaccharides)广泛分布于多种生物体中,尤其是动物细胞膜、植物和微生物细胞壁中,是一类由醛糖或酮糖通过糖苷键连接而成的天然高分子多聚物,是构成生命的分子基础之一,也是一种重要的信号或信息分子的受体,它参与分子识别、细胞粘附及防御等生理过程的调节活动,具有抗病毒、免疫促进、抗肿瘤及降血糖等作用^[22]。多糖成分对病毒的抑制作用已经被国内外许多研究者认可。

表 2 琐琐葡萄提取物对流感病毒 A(H1N1) 型的抑制率

试验物质	剂量 (μg/ml)	1 组				CPE 抑制率(%)	2 组				CPE 抑制率(%)	3 组				CPE 抑制率(%)
		每孔 CPE 程度					每孔 CPE 程度					每孔 CPE 程度				
黄酮	20	1	0	0	1	75.00	1	2	0	0	81.25	0	1	0	1	87.50
	10	1	0	0	0	93.75	1	0	1	0	87.50	1	0	1	2	75.00
	5	1	1	0	0	87.50	1	1	1	1	75.00	1	1	2	2	62.50
多糖	20	1	1	1	0	81.75	1	2	1	1	68.75	2	1	1	2	56.25
	10	0	0	0	0	100.00	0	1	1	0	87.50	0	1	0	2	68.75
	5	0	0	1	0	93.75	0	2	2	0	75.00	1	0	1	1	81.25
三萜	1500	4	4	4	3	6.25	3	4	4	4	6.25	2	1	0	1	75.00
	750	4	3	4	3	12.50	3	3	4	4	12.50	0	0	1	0	81.25
	375	3	4	4	4	6.25	4	3	3	4	18.75	1	2	3	1	56.25
利巴韦林		4	3	2	4	18.75	4	3	3	4	12.50	0	1	0	0	93.75
细胞对照		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
病毒对照		4	4	4	4		4	4	4	4		4	4	4	4	

表 3 琐琐葡萄提取物对 MDCK 细胞的保护率

试验物质	剂量(μg/ml)	1 组(%)	2 组(%)	3 组(%)
黄酮	20	72.5	80.4	85.5
	10	89.6	87.6	78.5
	5	78.8	83.3	63.7
多糖	20	79.3	59.4	68.4
	10	93.3	85.2	83.6
	5	87.9	63.1	70.2
三萜	1500	1.0	1.4	382.6
	750	2.3	2.7	91.9
	375	9.4	6.8	14.0
利巴韦林	300	2.2	7.5	348.8
	750	2.5	3.2	101.1
	375	9.6	7.1	24.2
	300	2.5	7.2	338.4

GARIE^[23] 等认为多糖可能作为宿主受体硫酸乙酰肝素的竞争抑制剂,通过与病毒糖蛋白上带正电荷的富精氨酸区域结合来阻止病毒与细胞的结合。国内研究结果^[24] 也显示黄芪多糖、紫菜多糖等均具有抗流感病毒的作用,其中,黄芪多糖对流感病毒引起的小鼠肺炎病变有明显的抑制作用,能延长流感病毒感染的小鼠生存时间。一般认为,多糖抗病毒机制是对病毒复制早期阶段进行抑制,即抑制病毒向细胞表面的吸附^[25]。多糖硫酸基团的负电荷与病毒膜上识别宿主细胞表面受体的糖蛋白的正电荷通过静电作用结合而阻止病毒与细胞的吸附,虽然不同的病毒糖蛋白和细胞受体可能存在差异,但硫酸多

表 4 琐琐葡萄提取物抑制流感病毒 A(H1N1) 型活性(HA) 作用

试验物质	剂量(μg/ml)	1 组	与病毒 log 滴度差	2 组	与病毒 log 滴度差	3 组	与病毒 log 滴度差
黄酮	20	0.226	1.881	0.526	1.581	0.526	1.581
	10	0.075	2.032	0.451	1.656	0.828	1.279
	5	0.150	1.957	0.451	1.581	1.054	1.504
多糖	20	0.150	1.957	0.903	1.204	1.204	0.903
	10	0.000	2.107	0.602	1.505	0.527	1.580
	5	0.075	2.032	0.752	1.355	1.054	1.053
三萜	1500	2.107	0.000	2.107	0.000	0.753	1.354
	750	2.107	0.000	2.107	0.000	0.075	2.032
	375	2.107	0.000	2.107	0.000	1.500	0.607
利巴韦林	300	1.806	0.301	1.806	0.301	0.000	2.107
病毒对照		2.107		2.107		2.107	
细胞对照		-		-		-	

注:“-”表示 HA 测定结果为阴性。

糖可以靠静电作用与囊膜病毒外膜糖蛋白结合,占据囊膜病毒与细胞受体结合的部位,使囊膜病毒不能感染细胞。多糖具有抗流感病毒作用的机制可能是通过抑制病毒向细胞表面的吸附得以实现的。

3.2 新疆琐琐葡萄提取物抗流感病毒效果

本研究在进行 MDCK 细胞培养试验中设定感染细胞前作用组,直接作用组,感染细胞后作用组 3 个

试验组。感染细胞前作用组先加药物的试验目的是观察药物能否进入细胞或吸附于细胞表面,以阻止病毒的吸附与穿入,即预防作用,试验结果表明黄酮、多糖提取物具有明显的预防作用,CPE 抑制率均在 80 % 以上,而三萜和利巴韦林的预防作用不明显;直接作用组同时加入病毒和药物的目的是观察药物对病毒是否具有直接抑制作用,试验结果表明

黄酮、多糖提取物具有一定的直接抑制作用,而三萜和利巴韦林此作用不明显;感染细胞后作用组先加病毒是为了观察药物能否抑制已经进入细胞的病毒的生物合成和成熟释放,即治疗作用,试验结果表明黄酮、多糖、三萜均具有治疗作用,且三萜的治疗效果要强于黄酮和多糖,利巴韦林的治疗作用强于黄酮、多糖、三萜。本研究从光镜下 CPE 变化及 CPE 抑制率、MTT 计算保护率和血凝实验(HA)三个方面对实验结果进行测定,实验结果一致,进一步增强了实验结果的可靠性。

新疆琐琐葡萄提取物抗流感病毒 A(H1N1) 型的量效曲线存在量效关系,但有拐点。可能原因:一是中药本身的复杂性,化学成分复杂,不同于化学纯品(成分单一、结构明确);二是细胞培养实验中细胞本身的特性,任何细胞置于体外培养后,其细胞形态和功能都会发生一定程度的改变;三是试验中细胞代数对病毒毒力和药物毒力可能存在一定影响。因此,对于体外培养的细胞,应该将其视作一种既保持动物体内原细胞一定的形状、结构和功能又具有某些改变的特定的细胞群体,而不能将之与体内的细胞完全等同。在深入探索其抗流感病毒作用机制的同时,还有待于对其抗流感病毒作用进行体内试验研究。

参考文献

[1] HAYDEN FG. Antivirals for pandemic influenza[J]. J Infect Dis, 1997, 176 Supp11: S56-61.

[2] WUTZLER P, VOLGE PG. Neuraminidase inhibitors in the treatment of influenza A and B Overview and case report[J]. Infection, 2000, 28 (5): 261-266.

[3] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997: 56.

[4] 刘涛,马龙,张恒,等. HPLC 测定葡萄皮中齐墩果酸的含量[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(2): 213.

[5] 马龙,刘涛,向阳,等. 新疆葡萄中 3 种生物活性物质的含量分析[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(1): 28-31.

[6] 田丽婷,马龙,堵年生. 超临界二氧化碳萃取葡萄皮渣中三萜类总组分[J]. 中国现代应用药学杂志,2004,21(1): 6-8.

[7] 刘勇民. 维吾尔药志[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,

1999:496.

[8] 新疆维吾尔自治区卫生厅编. 维吾尔药材标准[S](上册). 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:41.

[9] 陈可冀. 抗衰老中药学[M]. 北京:中国古籍出版社. 1989:193.

[10] 刘涛,马龙,赵军,等. 超声法提取琐琐葡萄中总三萜的工艺研究[J]. 食品研究与开发. 2007,28(4): 8-11.

[11] 艾克拜尔,买合布白,阿不都拉. 新疆琐琐葡萄及其综合利用价值[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 903-905.

[12] 玛依拉,沙拉买提,李阿峰,等. 新疆产葡萄属植物研究概况[J]. 中国民族民间医药杂志. 2005,75:196-200.

[13] 帕丽达,堵年生,丛媛媛. 比色法测定琐琐葡萄中总三萜类成分[J]. 华西药科学杂志, 2002,17(6): 475.

[14] 胡君萍,杨建华,堵年生. 双波长薄层扫描法测定维吾尔药琐琐葡萄中齐墩果酸的含量[J]. 华西药科学杂志, 2003,18(1): 58-59.

[15] 向阳,张彤,张煊,等. 高效液相法测定葡萄皮和葡萄籽中白藜芦醇的含量[J]. 卫生研究,2003,32(5): 490-491.

[16] SHERMAN MD. The support and family educadon (SAFE) program: mental health facts for families[J]. Psyehiatr Serv, 2003,54(1): 35-37.

[17] 刘涛,马龙,赵军. 琐琐葡萄三萜类成分在体外对大鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 新疆医科大学学报, 2007,30(11): 1222-1225.

[18] 田丽婷,马龙. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志,2002,27(12): 884-886.

[19] 周新,李宏杰. 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展[J]. 中国新药杂志. 2007,16(5): 350-355.

[20] DAI CY, CHUANG WL, CHANG WY, et al. Co-infection of SENV-D among chronic hepatitis C patients treated with combination therapy with high- dose interferon-alfa and Ribavirin[J]. World J Gastroentero, 2005, 11(27): 4241-4245.

[21] 彭勇,李文魁,梁少伟,等. 国外抗流感病毒植物药研究近况[J]. 国外医学-植物药分册,1999,14(1): 7-9.

[22] 邓小云,丁登峰,戴美红,等. 植物多糖药理作用研究进展[J]. 中医药导报,2006, 12(9): 86.

[23] GARIE G, Cavallaro L, Broussalis A, et al. Biological and chemical characterization of the fraction with antihyperpetic activity from Achyroclineflaccida[J]. Planta Mediea, 1999, 65: 343-346.

[24] 李丽娅,凌秋,崔洪波,等. 黄芪多糖抗流感病毒的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2002,9(6): 354-355.

[25] YOSHIDA O, NAKASHIMA H, YOSHIDA T, et al. Sulfation of the immno- modulation polyellentnan[J]. Biochem. Pharmeol, 1988, 37(5): 2887-2891.

[收稿日期:2009 - 05 - 16]

中图分类号:R155;O629. 12;O629. 61 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2009)05 - 0392 - 06