

白组比较,胃排空功能显著降低,提示用STZ造模的糖尿病大鼠确实存在胃肠运动功能减弱现象;实验组与模型组比较,胃肠推进率显著升高( $P < 0.05$ ),胃排空功能明显增强,提示壮医药线点灸有明显的促胃肠运动作用;实验组大鼠血糖下降明显,提示壮医药线点灸治疗对降低DGP大鼠血糖浓度有较明显的改善作用,其机理可能由于壮医药线点灸治疗后胃肠蠕动加快,食物均匀的排入小肠,餐后对营养物质的吸收较模型组提前而降低血糖水平,或者壮医药物和穴位刺激直接调整血糖<sup>[7]</sup>,其尚有待进一步研究。然本实验不能证明壮医药线点灸治疗能直接作用于糖尿病。

### [参考文献]

[1] 邢丽,张勇. 糖尿病性胃轻瘫辨证论治探析[J]. 新中医, 2013, 45(5): 9-11.

[2] Gojka R. 糖尿病的流行情况[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 2002, 22(6): 347.

[3] 张琴,刘文全. STZ联合饮食失节法诱导糖尿病胃轻瘫大鼠模型方法探讨[J]. 中国中医急症, 2005, 14(7): 672-673.

[4] 张亚萍,张宽学. 糖尿病大鼠肠道Cajal间质细胞结构变化的研究[J]. 中华内科杂志, 2002, 41: 310-312.

[5] 黄瑾明. 壮医药线点灸疗法[M]. 南宁: 广西人民出版社, 1986: 47-50.

[6] 林辰. 壮医针刺与中医针刺的异同[J]. 中医杂志, 2012, 53(24): 2155-2156.

[7] 邹卓成. 电针治疗糖尿病性胃轻瘫的疗效及胃动力作用研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.

(责任编辑: 骆欢欢)

## 白藜芦醇对常见肠道病毒抑制作用的实验研究

王玉涛<sup>1</sup>, 招穗珊<sup>2</sup>, 关文达<sup>1</sup>, 李润峰<sup>1</sup>, 杨子峰<sup>1</sup>, 王新华<sup>2</sup>

1. 广州医科大学附属第一医院呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510230

2. 广州医科大学, 广东 广州 510182

**[摘要]** 目的: 观察白藜芦醇体外对多种肠道病毒的抑制药效, 为进一步探讨其抗肠道病毒谱提供依据。方法: 采用细胞病变抑制法(Cytopathic effect inhibition Assay, CPE)和四甲基偶氮唑蓝(MTT)法, 通过计算病毒抑制率、药物半数有效浓度(IC<sub>50</sub>)及选择指数(selection index, SI), 研究白藜芦醇体外对抗多种肠道病毒的作用效果。结果: 肠道病毒属(EV)11、EV71、EV84、柯萨奇病毒(COX)B3和COX A10等5种病毒的TCID<sub>50</sub>分别为:  $2.13 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $2.13 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ 及 $4.67 \times 10^{-4}$ 。白藜芦醇在Vero E6细胞的半数毒性浓度TC<sub>50</sub>为50 μg/mL。白藜芦醇最大无毒浓度为25 μg/mL, 以此为抗病毒活性检测的起始浓度。在最大无毒浓度下, 白藜芦醇与阳性对照药对5种肠道病毒均有抑制作用。除EV84病毒外, 白藜芦醇的抑制率均高于阳性药物利巴韦林。结论: 白藜芦醇体外具有抗多种肠道病毒作用, 对于病毒性肠道传染病防治具有一定应用前景。

**[关键词]** 白藜芦醇; 肠道病毒; 体外试验

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 02-0222-03

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2015.02.104

肠道病毒属于小RNA病毒科(Picornaviridae)中的肠道病毒属(Enterovirus, EV), 人类是肠道病毒唯一的天然宿主, 主要通过粪口途径传播<sup>[1-2]</sup>。临床症状轻者表现为倦怠、乏力、低热等, 重者可全身感染, 脑、脊髓、心、肝等重要器官受损, 预后较差, 并可遗留后遗症或造成死亡, 特别是婴幼儿患者可以爆发严重的脑炎、心肌炎或重症肺炎<sup>[3-5]</sup>。目前临床尚

无有效抗肠道病毒药物, 进行临床研究的普来可那立是代谢稳定的病毒衣壳功能抑制剂, 具有广谱的抗肠道病毒和鼻病毒活性, 并且口服效果较好, 但由于不良反应, 尚未获得批准<sup>[6]</sup>。

白藜芦醇(resveratrol), 化学名称为3, 4', 5-三羟基-二苯乙烯, 是一种植物抗毒素, 目前至少已经在21个科、31个属的72种植物中发现了白藜芦醇, 包括决明、葡萄, 花

**[收稿日期]** 2014-09-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金-广东联合基金项目(U1201227); 广州市教育系统创新学术团队项目(13C07); 广州市科技计划项目-科技惠民专项项目(2014Y2-00031); 广州市健康医疗协同创新重大专项项目(201400000002)

**[作者简介]** 王玉涛(1981-), 男, 助理研究员, 研究方向: 中药抗病毒。

**[通讯作者]** 王新华, E-mail: xinhuaw@gzhmu.edu.cn.

生、虎杖等<sup>[6-8]</sup>。近年研究发现,白藜芦醇具有多种生物学活性,包括抗炎、抗细菌和真菌、抗血小板凝集、调节脂质代谢、保护心血管、抗肿瘤、抗肝炎病毒、单纯疱疹病毒和EB病毒等作用<sup>[9-10]</sup>,尤其是,白藜芦醇的抗病毒作用受到广泛关注,一直是其生物活性研究的热点之一。本课题组前期已发现白藜芦醇对于可引起呼吸道和消化道感染的腺病毒具有较好效果<sup>[11]</sup>,为了进一步探讨其对肠道病毒的抑制作用,本研究选择了EV11、EV71、EV84、柯萨奇病毒(Coxsackievirus, COX) B3和A10为观察对象,研究白藜芦醇的体外抗肠道病毒作用,为该类病毒的临床用药提供依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 药品与试剂** 白藜芦醇(粉末状,纯度为98.55%,购自西安冠宇生物技术有限公司)。利巴韦林,购自广州肇庆星湖医药有限公司,批号:L071015。

**1.2 毒株与细胞** 肠道病毒(EV11、EV71、EV84、COX B3、COX A10)均为呼吸疾病国家重点实验室病毒室临床分离株,经特异性引物扩增测序鉴定。上述毒株于Vero E6细胞传代,在37℃,5% CO<sub>2</sub>条件下培养,以细胞病变法计算半数感染量(TCID<sub>50</sub>)。常规CPE法测定5种肠道病毒EV11、EV71、EV84、COX B3和COX A10病毒对Vero E6细胞的病毒半数感染剂量(TCID<sub>50</sub>)<sup>[12]</sup>。

**1.3 白藜芦醇的细胞毒性试验** 按每孔约 $2.5 \times 10^4$  Vero E6细胞接种到96孔板,24~36 h后待细胞长成单层,弃去培养液,加入不同稀释度(2倍)的药物100 μL/孔,空白对照和正常细胞对照孔加入100 μL/孔MEM,37℃,5% CO<sub>2</sub>继续培养48 h,每孔加MTT溶液(5 mg/mL)20 μL,置37℃,5% CO<sub>2</sub>温箱中继续孵育4 h。吸弃上清液,每孔加100 μL二甲亚砜(DMSO),低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。按照用Reed-Muench法<sup>[12]</sup>计算药物半数有毒浓度(TC<sub>50</sub>)。

**1.4 白藜芦醇的体外抗肠道病毒药效** 96孔细胞培养板内的Vero E6细胞先孵育肠道病毒(EV11、EV71、EV84、COX B3和COX A10)2 h,同时设定阳性药物(利巴韦林)和细胞对照,在最大无毒浓度条件下,加入不同浓度药物(除阳性和阴性对照外)在37℃、5% CO<sub>2</sub>环境下培养。每天在倒置显微镜下观察细胞病变(CPE)并记录。试验时设阳性药物对照、正常细胞对照及病毒对照。细胞出现病变程度按以下6级标准记录: - 为细胞生长正常,无病变出现; ± 为细胞病变少于整个单层细胞的10%; + 为细胞病变约占整个单层细胞的25%; ++ 为细胞病变约占整个单层细胞的50%; +++ 为细胞病变约占整个单层细胞的75%; ++++ 为细胞病变约占整个单层细胞的75%以上<sup>[13]</sup>。当病毒对照组CPE为+++~++++时,用MTT法测定所有组的细胞存活数,试验重复3次,根据公式<sup>[12]</sup>计算白藜芦醇对5种肠道病毒的抑制率。病毒抑制率=(试验组平均OD值-病毒对照组平均OD值)/(细胞对照组平均OD值-病毒对照组平均OD值)×100%<sup>[14]</sup>。

**1.5 统计学方法** 数据分析采用SPSS12.0软件进行数据处理、统计,用药物组吸光度与对照组吸光度作单因素方差分析。

## 2 研究结果

**2.1 病毒TCID<sub>50</sub>测定结果** EV11、EV71、EV84、COX B3和COX A10等5种病毒的TCID<sub>50</sub>分别为: $2.13 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $2.13 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ 及 $4.67 \times 10^{-4}$ 。

**2.2 白藜芦醇的细胞毒性试验结果** 白藜芦醇在Vero E6细胞的半数毒性浓度TC<sub>50</sub>为50 μg/mL。白藜芦醇最大无毒浓度为25 μg/mL,以此为抗病毒活性检测的起始浓度。

**2.3 白藜芦醇体外抗肠道病毒药效比较** 见表1、表2。在最大无毒浓度下,白藜芦醇与阳性对照药对5种肠道病毒均有抑制作用。除EV84病毒外,白藜芦醇的抑制率均高于阳性药物利巴韦林。

表1 白藜芦醇体外抗肠道病毒药效比较

毒株	病毒抑制效果	白藜芦醇浓度(μg/mL)			利巴韦林 (200 μg/mL)	DMSO(0.25%)	病毒对照
		25	12.5	6.25			
EV11	CPE	+	+++	++++	+	++++	++++
	抑制率(%)	81.6±6.4	43.5±4.2	4.3±2.1	60.1±3.3	6.6±2.4	
EV71	CPE	-	++	++++	+	++++	++++
	抑制率(%)	96.2±7.3	43.5±1.6	7.75±3.1	59.9±5.2	2.6±1.1	
EV84	CPE	+++	++++	++++	+	++++	++++
	抑制率(%)	29.8±6.9	0	0	65.4±6.4	4.2±1.9	
COX B3	CPE	-	+	++	-	++++	++++
	抑制率	100	71.8±3.9	39.8±2.6	76.1±6.2	1.0±1.5	
COX A10	CPE	-	+++	++++	-	++++	++++
	抑制率(%)	98.6±5.9	36.4±5.1	4.5±2.1	10%±9.5	4.6±1.2	

表2 白藜芦醇对常见肠道病毒致病半数有效浓度 (IC<sub>50</sub>) 及选择指数 (SI) 比较

毒株	TC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	SI
EV11	50	14.1±1.18	3.5±0.29
EV71	50	13.7±0.35	3.6±0.09
EV84	50	>25	<2
COX B3	50	7.8±0.44	6.3±0.17
COX A10	50	14.5±0.86	3.4±0.2

### 3 讨论

肠道病毒所含血清型众多,是引起手足口病的主要病原体,包括EV71(Enterovirus71),COX A组和B组,其中EV71可引起神经系统方面的并发症,且病情较重<sup>[15]</sup>,而COX可引起急、慢性心肌炎,少数病人有进行性心衰、心率失常等表现<sup>[16]</sup>,对人类健康产生重大影响。由于目前临床并无有效疫苗或药物,研发相关的抗病毒药物极其迫切。

传统植物药材应用广泛且历史悠久,为抗病毒药物开发提供了重要资源,从中发现挖掘新型有效的抗病毒药物具有重要意义和价值,同时对于解决化学药物引起的耐药性和副作用提供了新的选择。白藜芦醇,1940年由日本学者从毛叶芦藜的根部提取到<sup>[7]</sup>,是一种含有芪类结构的非黄酮类化合物,目前已在多种植物中发现,有报道其对流感病毒有较好的抑制作用,主要机理是通过干预流感病毒vRNP在细胞核与细胞质之间转移以及抑制宿主细胞protein kinase C(PKC)活性及其依赖的相关通路而发挥抗病毒作用,体内药效显示其可有效改善感染流感病毒小鼠的存活率以及降低肺组织病毒滴度<sup>[17]</sup>。

本实验初步探讨了白藜芦醇体外对多种常见肠道病毒的活性,证实白藜芦醇在Vero细胞中有一定的抗肠道病毒的活性,其中在25 μg/mL浓度下,对EV71、COXB3、COXA10的病变抑制率均达到96%以上,具有一定的广谱性,尤其是在目前缺乏抗肠道病毒药物的条件下,为白藜芦醇作为候选药物用于抗肠道病毒的研究提供一定的理论支持。下一步将继续研究其抗肠道病毒的药理机制,对不同肠道病毒药效差异性及其是否存在相同的机理,以及该药物对宿主细胞是否也有一定的影响,包括各种宿主细胞通路等,从而较完整的阐明白藜芦醇的抗病毒活性和特点。

#### [参考文献]

- [1] 陈敬贤. 诊断病毒学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [2] 陈敬贤, 周荣, 彭涛, 等. 临床病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [3] Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment[J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2002, 13(1):

40-47.

- [4] Ang LW, Koh BK, Chan KP, et al. Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001-2007 [J]. Ann Acad Med Singapore, 2009, 38(2): 106-112.
- [5] Yen FB, Chang LY, Kao CL, et al. Coxsackie viruses infection in northern Taiwan epidemiology and clinical characteristics [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2009, 42(1): 38-46.
- [6] 孟雪莲, 杨静玉, 吴春福. 白藜芦醇的药理学作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(5): 52-54.
- [7] 周福成, 周艳琴, 郭婷婷, 等. 白藜芦醇的研究进展[J]. 中国医药导报, 2009, 6(8): 11-13.
- [8] 王冲, 华子春. 白藜芦醇的免疫调节作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(1): 84-87.
- [9] 张梅, 杨林. 白藜芦醇生物学作用的研究进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2007, 9(3): 333-335.
- [10] Kapadia GJ, Azuine MA, Tokuda H, et al. Chemo-preventive effect of resveratrol, sesamol, sesame oil and sunflower oil in the Epstein-Barr virus early antigen activation assay and the mouse skin two-stage carcinogenesis [J]. Pharmacol Res, 2002, 45(6): 499-505.
- [11] 关文达, 杨子峰, 刘妮, 等. 白藜芦醇对多种呼吸道病毒作用体外实验研究[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1388-1390.
- [12] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. Am J Hyg, 1938, 27(3): 493-497.
- [13] 田新贵, 李翔, 周荣, 等. 利巴韦林对肠道病毒体外抑制作用的研究[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(2): 1388-1390.
- [14] 刘媛媛, 杨占秋, 何静, 等. 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.
- [15] 周伯平, 李成荣. 肠道病毒71型手足口病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [16] 幸建华, 杨占秋. 柯萨奇病毒与病毒性心肌炎[J]. 数理医药学杂志, 2004, 17(3): 260-261.
- [17] Anna T. Palamara, Lucia Nencioni, Katia Aquilano, et al. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2005, 191: 1719-1929.

(责任编辑: 骆欢欢)