

大蒜多糖体外抗柯萨奇病毒 B₃ 作用

郑敏,梅贤臣,鲍翠玉,吴基良,李立中,陈红光(咸宁学院药理教研室,湖北 咸宁 437100)

摘要:目的 研究大蒜多糖体外抗柯萨奇病毒 B₃ (Coxsackievirus group B type 3, CVB₃)作用。方法 观察大蒜多糖 A, B, C 的细胞毒性、对 CVB₃ 直接灭活作用、抗 CVB₃ 吸附作用及对 CVB₃ 生物合成抑制作用。结果 大蒜多糖 A, B, C 对 Hep-2 细胞的半数中毒浓度 (TC₅₀) 分别为 1000, 800, 4000 μg/mL; 均无直接灭活 CVB₃ 及抗 CVB₃ 吸附作用; 除 A 外, B 和 C 均可剂量依赖性抑制 CVB₃ 生物合成。结论 大蒜多糖 B 和 C 在体外通过抑制 CVB₃ 生物合成而发挥抗 CVB₃ 的作用。

关键词:大蒜; 多糖; 柯萨奇病毒 B₃; 抗病毒; 体外研究

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)01-0004-03

Effect of polysaccharide from *Allium sativum* L. on coxsackievirus group B type 3 *in vitro*

ZHENG Min, MEI Xian-chen, BAO Cui-yu, WU Ji-liang, LI Li-zhong, CHENG Hong-guang (Department of Pharmacology, Xianning College, Xianning, 437100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibitory effects of polysaccharide from *Allium sativum* L. on Coxsackievirus group B type 3 (CVB₃) *in vitro*. **METHOD** The following experiments about polysaccharide from *Allium sativum* L. A, B and C were performed: the cytotoxicities test on Hep-2 cell, the direct inactivation of CVB₃, the inhibition of CVB₃ adsorption and biosynthesis. **RESULTS** The 50% toxic concentration (TC₅₀) of polysaccharide from *Allium sativum* L. A, B and C on Hep-2 cell were 1000, 800 and 4000 μg/mL respectively. The above three components showed no direct inactivation of CVB₃ or inhibition of CVB₃ virus adsorption. With the exception of polysaccharide from *Allium sativum* L. A, components B and C could dose-dependently inhibit CVB₃ biosynthesis. **CONCLUSION** polysaccharide from *The Allium sativum* L. B and C can produce obvious inhibitory effects on Coxsack-

基金项目:湖北省教育厅重点项目(2003A004)

作者简介:郑敏,女,副教授,华中科技大学药理学在读博士,主要从事中草药药理及心脑血管药理研究。

ievinus group B type 3 (CVB₃) *in vitro* by prevention of CVB₃ biosynthesis.

KEY WORDS: *Allium sativum* L.; polysaccharide; Coxsackievirus group B type 3; antiviral; studies *in vitro*

柯萨奇 B 组病毒 1~6 型 (Coxsackievirus Group B Type 1~6, CVB1~6) 在人群中感染十分普遍并与多种疾病有着十分密切的关系,如病毒性心肌炎、慢性扩张性心肌病、慢性胰腺炎等; CVB₃ 则是病毒性心肌炎的主要病因,由于缺乏有效的治疗药物,许多患者演变为慢性扩张性心肌病,最后死于心力衰竭。目前,从天然产物中寻找新的药效成分已成为国际上研究的新动向,多糖的研究颇受关注^[1-3]。大蒜多糖是从大蒜球根中提取的活性成分,我们前期研究表明其对实验性肝损伤有保护作用^[4],其他药理活性尚未见报道。为挖掘一种安全、廉价、有效的抗 CVB 药物,本试验探讨了大蒜多糖的体外抗 CVB 活性及其可能机制。

1 材料

1.1 Hep-2 细胞

由武汉大学典型培养物保藏中心提供。细胞生长液为 MEM,加 10% 新生小牛血清 (Gibco 公司), 100 u/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素,细胞维持液除新生小牛血清为 2% 外,其余同细胞生长液。

1.2 病毒

CVB₃ Nancy 株为武汉大学医学院病毒研究所保存。病毒经 Hep-2 细胞活化增殖,细胞病变效应 (cytopathogenic effect; CPE) 达 75% 以上 (++++~+++++) 时收获,滴定其滴度为 10⁶ TCID₅₀/0.1 mL。

1.3 药物

大蒜多糖 A, B, C, 参照文献^[4]方法提取及纯化,以 DMSO (上海菲达有限公司,批号 638,纯度 ≥ 99.9%,等级 AR) 配成 10, 20, 80 mg/mL 的溶液。病毒唑,武汉滨湖制药厂生产,批号 980619-1 每种药物使用前都经过 8 pound 15 min 消毒,分装备用。

2 方法与结果

2.1 大蒜多糖 A, B, C 细胞毒性测定

在 24 孔板上,加 0.8 × 10⁵ /mL 浓度的 Hep-2 细胞 1 mL/孔,培养 24 h,加含药维持液。药物浓度为 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 μg/mL; 37℃, 5% CO₂ 培养,观察细胞病变效应 (cytopathogenic effect; CPE), - : 无细胞病变; + : 25% 以下的细胞有病变; ++ : 25% ~ 50% 的细胞有病变; +++ : 50% ~ 75% 的细胞有病变; ++++ : 75% ~ 100% 的细胞有病变; 每一药物浓度均重复 4 孔; 同时设正常细胞对照及病毒唑对照 (阳性抗病毒药物); 用直线回归法计算出药物对 Hep-2 细胞的半数中毒浓度 (TC₅₀)。见表 1 大蒜多糖对 CVB₃ 生物合成的影响

Tab 1 Effects of polysaccharide from *Allium sativum* L. A, B and C on CVB₃ biosynthesis

| 药物剂量 (μg/mL) | 观察指标 | | | | | |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 细胞病变效应 | | | 病毒滴度 | | |
| | 大蒜多糖 A | 大蒜多糖 B | 大蒜多糖 C | 大蒜多糖 A | 大蒜多糖 B | 大蒜多糖 C |
| 100 | ++++ | ++++ | ++++ | 5.6 | 5.1 | 5.3 |

果: 药物对细胞的毒性表现为细胞增殖缓慢, 颗粒增多, 形态改变, 折光性增强, 但仍可贴壁。大蒜多糖 A, B, C TC₅₀ 分别为 1000, 1800, 4000 μg/mL, 病毒唑 TC₅₀ 为 289.60 μg/mL。

2.2 大蒜多糖 A, B, C 对 CVB₃ 直接灭活作用

将 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 CVB₃ 与药物等量混合, 药物终浓度 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 μg/mL。加到 Hep-2 单层细胞中, 37℃, 吸附 90 min, 加细胞维持液, 37℃ 5% CO₂ 培养 33 h, 观察 CPE。同时设正常细胞对照及病毒对照。结果: 大蒜多糖 A, B, C 不同浓度组均出现典型 CVB₃ 感染所致 CPE, 以细胞皱缩、变圆、碎裂为特征, 且与病毒对照孔无显著区别, 说明各组均不能直接杀灭 CVB₃。

2.3 大蒜多糖 A, B, C 抗 CVB₃ 吸附作用

药物 0.1 mL 孔加到 Hep-2 单层细胞中, 37℃, 作用 90 min。其中药物浓度为 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 μg/mL。加 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 CVB₃ 0.1 mL 孔, 37℃ 吸附 90 min, 加细胞维持液, 37℃ 5% CO₂ 培养 33 h, 观察 CPE, 同时设正常细胞对照及病毒对照。结果: 大蒜多糖 A, B, C 不同浓度组均出现典型 CPE, 说明三者均无阻断 CVB₃ 吸附作用。

2.4 大蒜多糖 A, B, C 对 CVB₃ 病毒生物合成抑制作用

在 24 孔板上, 加 0.8 × 10⁵ /mL 浓度的 Hep-2 细胞 1 mL/孔, 培养 24 h, 加 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 CVB₃ 0.1 mL 孔, 37℃ 5% CO₂ 吸附 90 min, 加含药维持液。药物浓度为 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 μg/mL。37℃ 5% CO₂ 培养 33 h, 观察 CPE。每一药物浓度均重复 4 孔, 同时设病毒唑对照 (阳性抗病毒药物对照)、病毒对照及正常细胞对照。将上述体外病毒生物合成组细胞培养液冻融 3 次, 并按 10: 1 稀释后接种到 Hep-2 单层细胞孔中, 37℃ 5% CO₂ 培养 36 h, 观察 CPE, 根据 Reed-Muench 法计算病毒滴度, 直线回归法计算出药物对 CVB₃ 生物合成 50% 抑制浓度 (IC₅₀), 并计算药物治疗指数 (TI = TC₅₀ / IC₅₀)。结果: 大蒜多糖 A 对 CVB₃ 抑制作用较弱, 随药物浓度增加, Hep-2 细胞 CPE 变化不明显, 病毒滴度下降不显著, IC₅₀ 为 1580 μg/mL, TI 为 0.633 < 1, 无临床价值; 组分 B 和 C 能抑制 CVB₃ 生物合成, 表现为病毒滴度随药物浓度增加而下降, 对 CVB₃ 所致细胞病变效应抑制率与药物浓度均呈正相关见表 1, 其 IC₅₀ 分别为 600 和 1000 μg/mL; TI 分别为 1.3 和 4; 病毒唑 IC₅₀ 为 7.55 μg/mL, TI 为 38。

| 药物剂量 ($\mu\text{g/mL}$) | 观察指标 | | | | | |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 细胞病变效应 | | | 病毒滴度 | | |
| | 大蒜多糖 A | 大蒜多糖 B | 大蒜多糖 C | 大蒜多糖 A | 大蒜多糖 B | 大蒜多糖 C |
| 200 | ++++ | ++++ | ++++ | 5.6 | 4.7 | 4.8 |
| 400 | ++++ | +++ | +++ | 5.4 | 4.1 | 4.5 |
| 600 | ++++ | ++ | ++ | 4.8 | 3.7 | 4.4 |
| 800 | +++ | ++ | +++ | 4.5 | 2.3 | 2.5 |
| 1000 | +++ | + | ++ | 4.2 | 1.7 | 1.7 |
| 1500 | +++ | +/- | + | 4.2 | <1.0 | 1.0 |
| 2000 | ++ | - | - | 3.8 | <1.0 | <1.0 |
| 正常细胞对照 | - | - | - | - | - | - |
| 病毒对照 | ++++ | ++++ | ++++ | 6 | 6 | 6 |

注: - :无细胞病变; + :25%以下的细胞有病变; ++ :25%~50%的细胞有病变; +++ :50%~75%的细胞有病变; ++++ :75%~100%的细胞有病变

Note: - - + + + + indicate the percentage of CPE in cultured Hep2 cell system infected with CVB₃: - stands for 0, + for <25%, ++ for 25%~50%, +++ for 50%~75% and ++++ for 75%~100%

3 讨论

CVB₃引起的病毒性心肌炎和扩张型心肌病严重威胁人类健康,病毒唑有一定疗效,但不良反应多,而 CVB₃疫苗则成本高难以推广和大量应用,从中草药中筛选和研制抗 CVB₃新药越来越受到关注,中药大黄及桑寄生提取物均有较好的抗 CVB₃作用^[5-7]。大蒜来源丰富,药食同源,作为民间药物历史悠久,近年来大蒜制剂不断研制和开发,广泛用于临床。大蒜有效成分之一大蒜素具有抗菌、抗炎、抗病毒、免疫调节等多方面作用^[8];但对于大蒜有效成分大蒜多糖的药效研究国内外尚无报道。近来我们从大蒜球根中提取分离出新的有效成分大蒜多糖 A、B、C,发现三者均有护肝作用并安全低毒^[4];本实验则进一步观察了三组分的体外细胞毒性及其对 CVB₃的影响,以筛选有效的抗 CVB₃药物。

实验结果发现,大蒜多糖 A、B、C有一定的细胞毒性,对 Hep-2细胞的半数中毒浓度(TC₅₀)分别为1000,1800,4000 $\mu\text{g/mL}$,均低于申元英、杨占秋等^[5]用相同实验方法得到大黄素对 Hep-2细胞的半数中毒浓度(40mg/L即40 $\mu\text{g/mL}$);三组分均无直接灭活 CVB₃及抗 CVB₃吸附作用,但可剂量依赖性抑制 CVB₃生物合成(组分 A除外),其抗 CVB₃作用环节与病毒唑和大黄素相似^[5-7],大蒜多糖 A、B和 C对 CVB₃的50%抑制浓度(IC₅₀)分别为1580,600和1000 $\mu\text{g/mL}$;治疗指数(TI=TC₅₀/IC₅₀)分别为0.633,1.300和4.000根据各组分对 CVB₃的TI值不同,将它们归为4类:①低毒有效:TI>5,无;②有毒有效:5>TI>2,即大蒜多糖 C,其治疗指数与大黄素(TI为10)较为接近^[5];③有毒低效:TI<2,即大蒜多糖 B;④无效:药物浓度与病毒抑制率无明显相关性,即大蒜多糖 A。由此可初步推测:①大蒜多糖中有效抗 CVB₃组分为 B和 C,其中以 C更为安全,但仍具一定细胞毒性;②大蒜多糖 A、B、C不能直接杀灭 CVB₃;③大蒜多糖 A、B、C不能封闭 CVB₃表面的受体,故不能阻止病毒吸附、穿入

易感细胞;④大蒜多糖 B、C通过抑制 CVB₃核酸复制或和以后环节而发挥抗病毒作用。进一步提高大蒜多糖的提取、分离及纯化技术以增加大蒜多糖纯度,并获得单一组分有助于提高大蒜多糖抗 CVB₃效价,并降低毒性,拓宽临床适应症。至于大蒜多糖对 CVB₃所致病毒性心肌炎有无保护作用,尚需作进一步在体实验研究。

参考文献

- [1] 龚晓健,季晖,卢顺高,等.人工虫草多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中国药科大学学报,2000,31(1):53.
- [2] 张群豪,林志彬.灵芝多糖(GL-B)对肿瘤坏死因子 α 和 γ 干扰素产生及其mRNA表达的影响[J].中国医科大学学报,1999,31(2):179.
- [3] 郑敏,徐爱芹,鲍翠玉,等.当归多糖及大蒜素对小鼠四氯化碳肝损伤作用的比较[J].世界华人消化杂志,2003,11(3):348.
- [4] 郑敏,潘世斌,姜友定,等.大蒜多糖对肝损伤小鼠血清和肝组织ALT、AST的影响及其毒性实验[J].咸宁学院学报(医学版),2003,17(2):85.
- [5] 申元英,杨占秋,刘建军,等.大黄提取液抗科萨奇病毒B₃的实验研究[J].北京中医药大学学报,1999,22(5):65-66,69.
- [6] 王志洁.虎杖大黄素抗HSV₂、CVB₃病毒作用初探[J].安徽中医学院学报,1999,18(3):41-44.
- [7] 王志洁,杨占秋,黄铁牛,等.桑寄生乙醇提取物抗科萨奇病毒B₃的实验研究[J].中国中药杂志,2000,25(11):685-687.
- [8] 高玉民.大蒜化学性质及抗肿瘤作用的研究[J].国外医学中医中药分册,1993,15(1):1.

收稿日期:2003-09-02