

10 种中药成分对 CEF 的增殖和抵抗 NDV 感染的影响

胡元亮¹, 孔祥峰¹, 李祥瑞¹, 王德云¹, 刘家国¹, 张宝康¹, 王效田²
(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 南京市浦口区畜牧兽医站, 南京 210001)

摘要: 分别将 5 种浓度的黄芪多糖(APS)、当归多糖(CAPS)、淫羊藿多糖(EPS)、板蓝根多糖(IRPS)、蜂胶多糖(PPS)、黄芪黄酮(AF)、淫羊藿黄酮(EF)、蜂胶黄酮(PF)、黄芪皂甙(AS) 和人参皂甙(GS) 10 种中药成分加入到培养 24 h 的鸡胚成纤维细胞(CEF) 中, 再培养 12 h 后接种新城疫病毒(NDV), 于病毒接种后 72 h 用中性红染料吸收法测定 CEF 活性以评价各中药成分对细胞增殖及其抵抗病毒感染的影响。结果表明, 10 种中药成分均能不同程度地促进细胞增殖和抵抗病毒感染, 前者以 AF、APS、IRPS、PF 和 GS 的作用较强, 后者以 GS 和 IRPS 的作用较强, 部分中药成分在两方面作用中各有所长, 且有一定的量效关系。

关键词: 中药成分; 细胞增殖; 抗病毒作用

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)03-0301-05

中药的治疗作用基于它的化学组成, 多糖、皂甙和黄酮是关键成分, 具有增强免疫、促进细胞生长等多种作用^[1-3]。然而, 对多种中药成分作用的强弱比较未见研究报道。笔者提取了黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)、当归多糖(Chinese angelica polysaccharide, CAPS)、淫羊藿多糖(epimedium polysaccharide, EPS)、板蓝根多糖(isatis root polysaccharide, IRPS)、蜂胶多糖(propolis polysaccharide, PPS)、黄芪黄酮(astragalus flavone, AF)、淫羊藿黄酮(epimedium flavone, EF)、蜂胶黄酮(propolis flavone, PF)、黄芪皂甙(astragalosides, AS) 和人参皂甙(ginsenosides, GS) 10 种中药成分, 并测定了它们对体外培养鸡胚成纤维细胞(chick embryo fibroblast, CEF) 的安全浓度^[4]。本研究进一步运用细胞培养的方法, 测定了这 10 种中药成分对 CEF 增殖及其抵抗 NDV 感染的影响, 旨在探讨中药成分的免疫增强作用和机理, 以筛选出免疫增强作用较好的中药成分, 为研制新型免疫增强剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 中药

APS、CAPS、IRPS、EPS、PPS、AF、EF、PF、AS

和 GS, 由南京农业大学中兽医学研究室提供。根据对 CEF 安全浓度的测定结果^[4], 用细胞维持液分别稀释成高、次高、中、次低、低 5 种浓度(见结果中各表), 常规消毒后备用。

1.2 病毒

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV) IV 系(Lasota 株) 疫苗, 中牧股份南京药械厂生产, 批号为 760-3。用 9 日龄 SPF 鸡胚传代 2 次, 按 Reed-Muench 法^[5] 测定 CEF 半数组织培养感染剂量(TCID₅₀), 用细胞维持液配成 100T CID₅₀ 浓度备用。

1.3 试剂

MEM 培养基, Gibco 公司产品, 按说明书配制, 再加入犊牛血清, 达 5% 为细胞生长液、2% 为细胞维持液, 再按常规量加入谷氨酰胺和双抗。胰蛋白酶, 进口分装, 用 PBS(pH7.4) 配制成 0.25% 的溶液, 0.22 μm 混合纤维素酯微孔滤膜过滤除菌, 分装后 -20℃ 保存备用。中性红, 上海试剂三厂生产, 批号 080525, 用 153 mmol/L 的 NaCl 溶液配制成 0.05% 的溶液, 8 磅高压灭菌, 4℃ 避光保存。脱色液, 用 50% 乙醇溶液配成含 NaH₂PO₄ 0.05 mol/L 的溶液。

1.4 主要仪器

CO₂ 培养箱, 美国 Revco 公司生产。倒置显微镜, 重庆光学仪器厂生产。酶联免疫检测仪, 华东电子管厂制造。75-2A 型微量振荡器, 上海医用分析仪器厂生产。96 孔细胞培养板和 24 孔细胞培养板, 德国 Nunclon 公司生产。

收稿日期: 2003-06-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070566)

作者简介: 胡元亮(1953-), 男, 江苏邳州人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中兽医学和中西兽医结合研究。E-mail: ylhu@sohu.com

com

1.5 试验方法

根据文献[5]介绍的方法制备 CEF, 将细胞数调整至 5×10^5 个/ml 后加入到 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 倒掉孔内液体, 用细胞维持液洗 3 次, 开始分组加药。每种浓度的中药成分设 8 孔, 每孔加入中药液 100 μ l。再培养 12 h 后, 倒掉孔内液体, 用细胞维持液洗 3 次, 均分为 2 组: 中药-病毒组, 4 孔, 每孔加入病毒液 100 μ l; 中药组, 4 孔, 加入同量细胞维持液。每两种中药成分(用同一块细胞板)同时设细胞对照组, 4 孔, 中药、病毒均不加; 病毒对照组, 4 孔, 不加中药、接种病毒; 另设无细胞对照孔, 只加营养液, 作为测定时的空白调零孔。加样完毕继续培养, 于病毒接种后 72 h 测定 CEF 活性。

1.6 CEF 增殖测定方法

采用中性红染料吸收法^[6], 即测定前 2 h 每孔加入 50 μ l 中性红活染液, 测定时倒掉孔内液体, 用 PBS 洗细胞 3 次, 每孔加入 200 μ l 脱色液, 置微量振荡器上震荡 10 min, 然后在酶联免疫检测仪上测定 570 nm 下的吸光(OD)值。

分别统计比较中药组与细胞对照组、中药-病毒组与病毒对照组、中药-病毒组与同浓度中药组的

OD 值的差异性, 以评价各中药成分对 CEF 增殖及其抵抗 NDV 感染的影响。

2 结果与分析

2.1 APS 和 CAPS 的测定结果

APS, 中药组的 OD 值在前两个高浓度显著大于细胞对照组, 中药-病毒组的 OD 值在次高浓度显著大于病毒对照组($P < 0.01$)、在高、次低、低浓度显著小于相应中药组。说明 APS 在前两个高浓度显著促进 CEF 增殖, 次高浓度显著促进 CEF 抵抗 NDV 的感染(表 1)。

CAPS, 中药组在高浓度显著大于细胞对照组, 中药-病毒组在高浓度显著大于病毒对照组($P < 0.01$)。表明高浓度的 CAPS 能显著促进 CEF 的增殖和抵抗 NDV 的感染(表 1)。

2.2 EPS 和 IRPS 的测定结果

EPS, 中药组在各浓度均与细胞对照组无显著差异, 中药-病毒组在高、低、次低浓度组大于病毒对照组, 其中高、低浓度差异极显著($P < 0.01$)、次低浓度组显著($P < 0.05$), 在低浓度同时显著小于同浓度中药组。说明 EPS 对 CEF 增殖无明显影响, 高浓度显著促进 CEF 抵抗 NDV 的感染(表 2)。

表 1 APS 和 CAPS 各浓度组的 OD 值

Table 1 OD values of every concentration group in APS and CAPS

| 浓度 μ g/ml Concentration | 黄芪多糖(APS) | | 当归多糖(CAPS) | |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | 中药组 APS group | 中药-病毒组 APS-NDV group | 中药组 CAPS group | 中药-病毒组 CAPS-NDV group |
| 1600 | 0.260 \pm 0.066 ^a | 0.173 \pm 0.067 ^{b**} | 0.253 \pm 0.045 ^a | 0.233 \pm 0.055 ^a |
| 1200 | 0.230 \pm 0.036 ^{ba} | 0.263 \pm 0.040 ^a | 0.220 \pm 0.056 ^{ba} | 0.203 \pm 0.068 ^{ba} |
| 600 | 0.173 \pm 0.015 ^c | 0.180 \pm 0.030 ^b | 0.180 \pm 0.014 ^{cb} | 0.145 \pm 0.070 ^b |
| 300 | 0.200 \pm 0.040 ^{cb} | 0.150 \pm 0.010 ^{b*} | 0.180 \pm 0.051 ^{cb} | 0.145 \pm 0.039 ^b |
| 150 | 0.193 \pm 0.015 ^{cb} | 0.153 \pm 0.035 ^{b*} | 0.150 \pm 0.016 ^c | 0.153 \pm 0.042 ^{ba} |
| 0 | 0.172 \pm 0.071 ^{①c} | 0.143 \pm 0.026 ^{②b} | 0.172 \pm 0.071 ^{①cb} | 0.143 \pm 0.026 ^{②b} |

注: 同一列数据标有不同字母者差异显著($P < 0.05$ 或 0.01), 与相应的中药组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ①细胞对照组, ②病毒对照组, 以下表同。

Note: Values in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$ or 0.01). Compared with corresponding CHMI group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ①Cell control group, ②NDV control group, The same is as follows.

IRPS, 中药组在高、次低浓度显著大于细胞对照组, 中药-病毒组在高、低浓度极显著($P < 0.01$)大于病毒对照组, 在次高浓度显著($P < 0.05$)大于病毒对照组但同时极显著小于同浓度中药组。说明 IRPS 在高、次低浓度显著促进 CEF 增殖、在高、低浓度显著促进 CEF 抵抗 NDV 感染(表 2)。

2.3 PPS 和 EF 的测定结果

PPS, 中药组在次低浓度组显著大于细胞对照组, 中药-病毒组在高浓度显著大于病毒对照组、在其余浓度显著小于同浓度中药组。说明 PPS 在次低浓度显著促进 CEF 增殖, 高浓度显著促进 CEF 抵抗 NDV 的感染(表 3)。

EF, 中药组各浓度多稍大于细胞对照组, 中药-病毒组各浓度多稍大于病毒对照组, 但均无显著差

异。说明 EF 对 CEF 增殖及其抵抗病毒感染的作用比较微弱(表 3)。

表 2 EPS 和 IRPS 各浓度组的 OD 值

Table 2 OD values of every concentration group in EPS and IRPS

| 浓度 $\mu\text{g/ml}$ Concentration | 淫羊藿多糖(EPS) | | 浓度 $\mu\text{g/ml}$ Concentration | 板蓝根多糖(IRPS) | |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | 中药组 EPS group | 中药-病毒组 EPS-NDV group | | 中药组 IRPS group | 中药-病毒组 IRPS-NDV group |
| 20 | 0.293±0.022 ^a | 0.285±0.024 ^a | 600 | 0.360±0.034 ^a | 0.318±0.029 ^a |
| 10 | 0.285±0.047 ^a | 0.258±0.030 ^{cb} | 300 | 0.288±0.029 ^b | 0.290±0.061 ^a |
| 5 | 0.268±0.043 ^a | 0.235±0.047 ^{cb} | 150 | 0.335±0.072 ^{ba} | 0.268±0.076 ^{ba*} |
| 2.5 | 0.290±0.026 ^a | 0.270±0.018 ^{ba} | 120 | 0.360±0.026 ^a | 0.270±0.020 ^{ba**} |
| 1.25 | 0.333±0.064 ^a | 0.280±0.030 ^{a*} | 80 | 0.328±0.053 ^{ba} | 0.313±0.022 ^a |
| 0 | 0.282±0.042 ^{①a} | 0.216±0.034 ^{②c} | 0 | 0.282±0.042 ^{①b} | 0.216±0.034 ^{②b} |

表 3 PPS 和 EF 各浓度组的 OD 值

Table 3 OD values of every concentration group in PPS and EF

| 浓度 $\mu\text{g/ml}$ Concentration | 蜂胶多糖(PPS) | | 淫羊藿黄酮(EF) | |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | 中药组 APS group | 中药组 PPS group | 中药组 EF group | 中药-病毒组 EF-NDV group |
| 20 | 0.203±0.054 ^{ba} | 0.218±0.046 ^a | 0.183±0.075 ^a | 0.193±0.054 ^a |
| 10 | 0.243±0.053 ^{ba} | 0.163±0.055 ^{ba*} | 0.190±0.018 ^a | 0.185±0.050 ^{ba} |
| 5 | 0.187±0.038 ^{ba} | 0.118±0.026 ^{b*} | 0.175±0.033 ^a | 0.195±0.042 ^a |
| 2.5 | 0.255±0.044 ^a | 0.165±0.054 ^{ba*} | 0.215±0.037 ^a | 0.183±0.015 ^{ba} |
| 1.25 | 0.233±0.062 ^{ba} | 0.148±0.078 ^{ba*} | 0.218±0.039 ^a | 0.123±0.061 ^{b**} |
| 0 | 0.178±0.022 ^{①b} | 0.140±0.029 ^{②b} | 0.178±0.022 ^{①a} | 0.140±0.029 ^{②ba} |

2.4 AF 和 PF 的测定结果

AF, 中药组在高、中、次低浓度均显著大于细胞对照组, 中药-病毒组各浓度与病毒对照组均无显著

差异, 且前三剂量组显著小于同浓度中药组。说明 AF 高、中、次低浓度显著促进 CEF 增殖, 但无明显的抗病毒作用(表 4)。

表 4 AF 和 PF 各浓度组的 OD 值

Table 4 OD values of every concentration group in AF and PF

| 浓度 $\mu\text{g/ml}$ Concentration | 黄芪黄酮(AF) | | 浓度 $\mu\text{g/ml}$ Concentration | 蜂胶黄酮(PF) | |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | 中药组 AF group | 中药-病毒组 AF-NDV group | | 中药组 PF group | 中药-病毒组 PF-NDV group |
| 5 | 0.275±0.025 ^a | 0.200±0.034 ^{a*} | 20 | 0.313±0.005 ^a | 0.183±0.053 ^{a**} |
| 2.5 | 0.223±0.024 ^{cb} | 0.160±0.064 ^{ba*} | 10 | 0.333±0.031 ^a | 0.128±0.029 ^{ba*} |
| 1.25 | 0.263±0.035 ^{ba} | 0.115±0.087 ^{b**} | 5 | 0.215±0.021 ^b | 0.113±0.061 ^{b**} |
| 0.625 | 0.250±0.014 ^{ba} | 0.188±0.010 ^{ba} | 2.5 | 0.198±0.015 ^b | 0.140±0.012 ^{ba*} |
| 0.3125 | 0.235±0.034 ^{cb} | 0.210±0.059 ^a | 1.25 | 0.213±0.059 ^b | 0.140±0.046 ^{ba**} |
| 0 | 0.213±0.034 ^{①c} | 0.160±0.025 ^{②ba} | 0 | 0.213±0.034 ^{①b} | 0.160±0.025 ^{②ba} |

PF, 中药组在两个高浓度显著大于细胞对照组, 中药-病毒组各浓度与病毒对照组均无显著差异, 且显著小于同浓度中药组。说明 PF 在高、次高浓度显著促进 CEF 增殖, 抗病毒作用不明显(表 4)。

2.5 AS 和 GS 的测定结果

AS, 中药组多稍大于细胞对照组, 中药-病毒组

多稍大于病毒对照组, 两者的差异均不显著。说明 AS 对 CEF 的增殖及其抵抗病毒感染的作用均较弱(表 5)。

GS, 中药组在中、低浓度显著大于细胞对照组, 中药-病毒组在中浓度极显著($P < 0.01$) 大于病毒对照组, 在高、次高浓度显著($P < 0.05$) 大于病毒对

照组,在次低浓度显著大于病毒对照组但同时显著小于同浓度中药组。说明GS在中、低浓度显著促进

CEF增殖,在中、高、次高浓度显著促进CEF抵抗病毒感染(表5)。

表5 AS和GS各浓度组的OD值

Table 5 OD values of every concentration group in AS and GS

| 浓度($\mu\text{g/ml}$) Concentration | 黄芪皂甙(AS) | | 浓度($\mu\text{g/ml}$) Concentration | 人参皂甙(GS) | |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|
| | 中药组 AS group | 中药-病毒组 AS-NDV group | | 中药组 GS group | 中药-病毒组 GS-NDV group |
| 300 | 0.320 \pm 0.058 ^a | 0.298 \pm 0.029 ^a | 120 | 0.300 \pm 0.049 ^{ba} | 0.288 \pm 0.029 ^a |
| 150 | 0.290 \pm 0.014 ^a | 0.278 \pm 0.040 ^a | 80 | 0.308 \pm 0.021 ^{ba} | 0.288 \pm 0.017 ^a |
| 120 | 0.333 \pm 0.046 ^a | 0.288 \pm 0.038 ^a | 40 | 0.348 \pm 0.074 ^a | 0.310 \pm 0.037 ^a |
| 80 | 0.313 \pm 0.013 ^a | 0.250 \pm 0.039 ^a | 20 | 0.343 \pm 0.034 ^{ba} | 0.288 \pm 0.017 ^a |
| 40 | 0.325 \pm 0.041 ^a | 0.295 \pm 0.053 ^a | 10 | 0.348 \pm 0.026 ^a | 0.283 \pm 0.006 ^{ba*} |
| 0 | 0.292 \pm 0.051 ^{①a} | 0.250 \pm 0.062 ^{②a} | 0 | 0.292 \pm 0.051 ^{①b} | 0.250 \pm 0.062 ^{②b} |

3 小结与讨论

3.1 所有中药成分均有不同程度的促增殖作用

中性红染料吸收法的原理是活细胞能够吸收中性红,中性红是一种弱阳离子染料,能与活细胞胞浆中的阴离子结合而浓缩于活细胞中,并不被细胞洗涤液洗脱,渗入活细胞的中性红量与活细胞数量成正比^[7],因此OD值直接反映活细胞的数量,与细胞增殖的程度成正比。试验结果显示,所有中药组的OD值多大于细胞对照组,两组相比,AF有3组、APS、IRPS、PF和GS各有2组、CAPS和PPS各有1组有显著差异,表明它们有显著的促增殖作用,以AF、APS、IRPS、PF和GS的作用较强;而EPS、EF和AS的作用较弱。

3.2 所有中药成分均有不同程度的抗病毒作用

OD值不但反映活细胞的多少,也反映细胞的病变程度,间接地反映病毒增殖的程度。细胞被病毒感染破坏或干扰了功能后可降低对中性红的吸收能力,随着病毒在细胞内不断增殖,细胞受到破坏,病变程度逐渐加重,受损细胞数量逐渐增多,OD值降低^[7]。试验结果显示,所有中药-病毒组的OD值多大于病毒对照组,GS有3组、IRPS有2组、EPS、APS、CAPS和PPS各有1组显著大于病毒对照组且与同浓度中药组无显著差异,表明它们有显著的抗病毒作用,以GS和IRPS的作用较强;而EF、AF、PF和AS的作用较弱。

3.3 少数中药成分在两方面作用中各有所长

比较10种中药成分两方面的作用可以看出,多数中药成分在两方面的作用中是同步的,如GS、IRPS、APS、CAPS和PPS的两种作用均较强、EF

和AS的两种作用均较弱;少数中药成分在两方面作用中各有所长,如AF和PF主要表现促增殖作用,抗病毒作用比较微弱;EPS主要表现抗病毒作用,促增殖作用比较微弱。其机理有待进一步研究。

3.4 中药成分的作用强度有一定的量效关系

从作用强度和剂量的关系分析可见,多数中药成分高浓度的作用较好,如CAPS、APS、PF和AF高浓度的促增殖作用显著,GS、EPS、IRPS、CAPS和PPS高浓度的抗病毒作用较强;少数中药成分中、低浓度的促增殖作用显著,如PPS和GS;个别中药成分中高浓度的抗病毒作用较强,如APS和IRPS。这说明中药成分必须有合适的剂量才能发挥最佳效应,不少研究都证明了这一结论^[8,9]。甚至有人发现,中药多糖类化合物的量效关系多呈现出“全或无”现象,即只存在某一最适剂量^[10]。

参考文献:

- [1] Liu J, Henkel T. Traditional Chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? [J]. *Curr Med Chem*, 2002, 9(15): 1483~1485.
- [2] 胡元亮,陈文喜. 中药免疫药理学研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 1997, 13(专刊): 96~98.
- [3] Liu F, Ding G, Li J. Effects of epimedium sagittatum Maxim. Polysaccharides on DNA synthesis of bone marrow cells of "yang deficiency" animal model caused by hydroxyurea [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 1991, 16(10): 620~622.
- [4] 刘家国,胡元亮,陈玉库,等. 几种天然药物成分在体外CEF中最大安全浓度的测定[J]. *动物医学进展*,

- 2002, 23(3): 88~ 91.
- [5] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997. 204~ 246.
- [6] 闻 平, 何 艳, 叶庆林, 等. 中性红比色法检测细胞增殖活性[J]. 镇江医学院学报, 2000, 10(1): 161~ 163.
- [7] 高英杰, 贺玉琢, 沈 鸿, 等. 中性红染料吸收法在抗病毒药物研究中的应用[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 45~ 47.
- [8] 李宏全, 段县平, 马海利, 等. 黄芪多糖对鸡新城疫和传染性腔上囊病疫苗免疫力的影响[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(9): 12~ 14.
- [9] 侯慧英, 秦 荣, 王玉珍. 蒙药广枣总黄酮对小鼠体液免疫功能影响的研究[J]. 中国民族医药杂志, 1998, 4(4): 38~ 39.
- [10] 夏雪雁, 彭 仁, 王智勇. 当归多糖及其分离组分对小鼠免疫功能的调节效应[J]. 武汉大学学报(医学版), 2001, 22(3): 204~ 207.

Effects of Ten Chinese Herbal Medicinal Ingredients on Proliferation and Resisting NDV Infection of CEF

HU Yuan-liang¹, KONG Xiang-feng¹, LI Xiang-rui¹, WANG De-yun¹,
LIU Jia-guo¹, ZHANG Bao-kang¹, WANG Xiao-tian²

(1. *College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;*
2. *Pukou District Animal Husbandry & Veterinary Station, Nanjing 210001, China*)

Abstract: Ten Chinese herbal medicinal ingredients, astragalus polysaccharide (APS), Chinese angelica polysaccharide (CAPS), epimedium polysaccharide (EPS), isatis root polysaccharide (IRPS), propolis polysaccharide (PPS), astragalus flavone (AF), epimedium flavone (EF), propolis flavone (PF), astragalosides (AS) and ginsenosides (GS), were added into chick embryo fibroblast (CEF), which were cultured for 24 hours, at five concentration respectively. After 12 hours, the cell was inoculated with Newcastle disease virus (NDV). At 72 hours after inoculation, the cellular activity was tested by Neutral Red Assay to evaluate the effects of the ten ingredients on proliferation and antiviral infection of the cell. The results showed that all of the ten could promote the cell proliferation and resisting the virus infection in different degrees. The better was AF, APS, IRPS, PF and GS in proliferation-promoting and GS and IRPS in antiviral infection. Some ingredients had their stronger one in two actions. There were certain dose-effect relationships in these actions.

Key words: Chinese herbal medicinal ingredient; Cellular proliferation; Antiviral action