

大蒜新素降低鼠巨细胞病毒播散性感染 小鼠病毒 DNA 载量研究*

刘兴楼,舒赛男,罗丹,李亚男,王慧,田佳,方峰
(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科学系,武汉 430030)

[摘要] 目的 用大蒜新素治疗鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)播散性感染小鼠至慢性期,检测小鼠唾液腺、肝、脾和肾组织内 MCMV DNA 载量动态变化,在整体水平上观察大蒜新素抗 MCMV 的长期疗效。方法 BALB/c 幼鼠 60 只,腹腔接种 MCMV Smith 株建立 MCMV 播散性感染模型,随机分为大蒜新素治疗组和模拟治疗组各 30 只,接种病毒后 24 h,两组分别腹腔注射大蒜新素 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 0.9% 氯化钠注射液 0.2 mL, qd, 共 120 d。于治疗后 1, 3, 7, 14, 28, 45, 60, 75, 90 和 120 d, 每组随机选择小鼠 3 只, 取唾液腺、肝、脾和肾组织, 采用 real time PCR 法检测组织内 MCMV DNA 载量。结果 模拟治疗组小鼠唾液腺内 MCMV DNA 载量最高, 在治疗后 14 d(感染后 15 d)达高峰; 肝、脾和肾内病毒 DNA 载量治疗后 7 d 达峰值; 治疗 28 d(感染 29 d)后, 各组织内病毒 DNA 载量明显减少, 尤其是肝、脾和肾组织病毒 DNA 呈持续低水平(进入慢性期)。与模拟治疗组比较, 大蒜新素治疗组治疗后 7, 14 和 28 d 唾液腺、脾和肾内 MCMV DNA 载量显著降低; 治疗后 7 和 14 d 肝内病毒 DNA 载量明显降低。进入慢性期后, 两组小鼠各脏器病毒 DNA 载量差异无显著性。结论 大蒜新素长期治疗不能完全清除 CMV, 但在急性感染期(病毒增殖高峰期)能显著降低脏器内病毒 DNA 载量。

[关键词] 大蒜新素; 巨细胞病毒; 感染, 播散性; real time PCR; DNA 载量, 病毒

[中图分类号] R286; R725.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)05-0561-05

Therapeutic Effect of Allitridin on Reducing the Viral DNA Load in Mice with Disseminative Infection of Murine Cytomegalovirus

LIU Xing-lou, SHU Sai-nan, LUO Dan, LI Ya-nan, WANG Hui, TIAN Jia, FANG Feng (Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated with the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate the long-term therapeutic effect of allitridin against cytomegalovirus *in vivo* by measuring the dynamic changes of cytomegalovirus (MCMV) DNA loads in salivary gland, liver, spleen and kidney of mice with disseminative infection of murine cytomegalovirus. **Methods** 60 BALB/c young mice were inoculated peritoneally with stocks of Smith strain MCMV to establish a MCMV disseminative infection model and then randomly and equally allocated into allitridin-treated group and mock-treated group (30 mice in each group). After 24 h of viral infection, the model mice from both allitridin-treated group and mock-treated group were peritoneally injected with allitridin ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 0.2 mL) and normal saline (0.2 mL) respectively, once a day, for totally 120 days. At 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d, 45 d, 60 d, 75 d, 90 d and 120 d after treatment, 3 mice in each group were randomly sacrificed for quantitatively detecting the load of MCMV DNA in their salivary gland, liver, spleen and kidney tissues by using a real time PCR method. **Results** In the mock-treated group, MCMV DNA levels were the highest in salivary glands and reached the peak at 14 d after treatment (15 d post infection), and peaks at 7 d after treatment in liver, spleen and kidney tissues. After 28 d of treatment (29 d post infection), MCMV DNA levels were obviously reduced in each organ of mock-treated group, especially in liver, spleen and kidney, indicating it entered into chronic infection phase. Compared to the mock-treated group, allitridin therapy significantly reduced MCMV DNA levels in salivary gland, spleen and kidney tissues at 7 d, 14 d and 28 d after treatment and in liver tissues at 7 d and 14 d post treatment. During the chronic infection phase (after 45 d of treatment), MCMV DNA levels in each organ of both groups were no significant different. **Conclusion** Allitridin for long-term treatment didn't completely eliminate CMV viruses, but in acute infection phase (viral reproduction peak phase), it could significantly reduce the viral load.

KEY WORDS Allitridin; Cytomegalovirus; Infection, disseminative; Real time PCR; DNA load, viral

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)也称人疱疹病毒 5 型,属疱疹病毒 β 亚科,为线状双链 DNA 病毒。HCMV 是一种弱致病性病毒,健康个体感染后大多表现为无症状性感染^[1],而免疫抑制个体如新生儿、婴儿、器官移植及艾滋病患者感染后可引起脏器

病变,甚至全身播散性感染,导致死亡^[2]。目前临床上有效抗 CMV 药物有限,一线用药更昔洛韦为核苷类似物,具有骨髓毒性等不良反应,并已有耐药毒株出现^[3]。大蒜新素即二烯丙基三硫,化学分子式为 $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$ 。该药除具有直接抗 CMV

作用外^[4],还可通过增强特异性细胞免疫途径发挥抗 CMV 效应^[5]。前期研究发现,大蒜新素可显著减少鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)肝炎小鼠肝组织内病毒载量,并可改善肝细胞功能^[6]。笔者在本实验中建立 MCMV 播散性感染小鼠模型,动态监测大蒜新素对模型鼠在急性和慢性感染期间主要易感脏器唾液腺、肝、脾、肾组织内 MCMV DNA 载量的影响,以进一步了解大蒜新素抗 CMV 的长期效应。

1 材料与方法

1.1 动物 雌性 BALB/c 小鼠,4 周龄,体质量 10 ~ 12 g,购自湖北省医学科学院实验动物中心,同济医院动物室洁净层柜内饲养,每天光照时间 12 h,自由取食饮水,适应性饲养 3.5 d 后用于本实验。

1.2 病毒 MCMV Smith 株由美国德克萨斯大学健康卫生中心惠赠,腹腔接种于使用免疫抑制剂的 BALB/c 小鼠进行体内病毒扩增,直接取其唾液腺制备成病毒悬液用于本实验。经蚀斑实验检测,病毒悬液平均感染性病毒滴度为 1.29×10^6 PFU · mL⁻¹。

1.3 药物 大蒜素注射液(即大蒜新素,allitridin)为上海禾丰制药有限公司生产合成的中药单体,规格:每支 2 mL,15 mg · mL⁻¹,产品批号:第 6E38004 号。

1.4 MCMV 感染小鼠模型的建立 参照文献^[7],将 4.5 周龄 BALB/c 小鼠腹腔接种含病毒 5×10^3 PFU 的病毒液 0.2 mL,建立播散型 MCMV 感染小鼠模型。

1.5 动物分组与标本的收集 将 MCMV 全身播散性感染模型小鼠 60 只随机分成大蒜新素治疗组和模拟治疗组各 30 只,以病毒接种后 24 h 为 0 点开始治疗,大蒜新素治疗组腹腔注射大蒜新素 0.2 mL,一般剂量 25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹;模拟治疗组腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 0.2 mL;均 qd,共 120 d。两组分别于治疗后 1,3,7,14,28,45,60,75,90,120 d 随机处死小鼠 3 只,无菌分离小鼠唾液腺、肝、脾、肾, -70 °C 保存。SDS 法抽提组织 DNA,经蛋白酶 K(美国 Amreso 公司)和 RNase A(上海华舜生物技术有限公司)等处理提取 DNA 后,紫外分光光度计(DU530,美国 BECKMAN 公司)测定 DNA 浓度和纯度。

[收稿日期] 2009-07-30 [修回日期] 2009-11-03

[基金项目] * 国家自然科学基金资助项目(基金编号:30572345)

[作者简介] 刘兴楼(1981-),男,湖北黄冈人,在读博士,主要从事儿科感染性疾病研究。电话:027-63752426, E-mail: liuxinglou@163.com。

[通讯作者] 方峰,女,教授。E-mail: ffang@tjh.tjmu.edu.cn。

1.6 Real time PCR 标准品的构建 用 PCR 法扩增目的基因片段, MCMV DNA 引物参考文献^[8],为 MCMV gB 基因, GenBank 序列号: U68299.1,上游引物: AAC CCG GCA AGA TTT CTA ACG,下游引物: ATT CTG TGG GTC TGC GAC TCA(由上海生物工程技术服务有限公司合成)。PCR 反应体系:上游引物(10 pmol · μL⁻¹)0.5 μL,下游引物(10 pmol · μL⁻¹)0.5 μL, Taq 酶 0.5 μL,缓冲液 2.5 μL, dNTP 0.5 μL, DNA 模板 0.5 μL, ddH₂O 20 μL,总体积 25 μL。反应条件:95 °C 5 min 预变性;95 °C 15 s 变性,61 °C 60 s 退火延伸,共 40 个循环。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒(上海华舜生物技术有限公司)回收目的基因片段,连接到质粒载体 pMD18-T vector(日本 TaKaRa 生物公司),将该重组质粒转染感受态大肠埃希菌 DH5α,挑选阳性克隆进行扩增,用质粒提取试剂盒(美国 Omega 生物技术公司)抽提质粒 DNA,紫外分光光度计测质粒 DNA 浓度并测序(北京诺赛基因组研究中心有限公司),根据测序结果计算质粒 DNA 分子量,并计算出每微升拷贝数(copy · μL⁻¹)。将质粒 DNA 分别稀释为 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ 和 10⁰ copy · μL⁻¹,并设空白对照。每稀释度标准品、样本 DNA 及对照均设 2 个复孔。

1.7 Real time PCR 检测 MCMV DNA 载量 反应体系:上游引物(10 pmol · μL⁻¹)0.5 μL,下游引物(10 pmol · μL⁻¹)0.5 μL, SYBR premix Ex Taq(日本 TaKaRa 生物公司)12.5 μL, Rox Reference Dye II(日本 TaKaRa 生物公司)0.5 μL, DNA 模板 1 μL,总体积 25 μL。反应条件:95 °C 10 s 预变性;95 °C 5 s 变性,61 °C 20 s 退火延伸,共 45 个循环。

1.8 统计学方法 所有数据用 SPSS13.0 系统软件分析。求出相应指标的平均数,用平均数表示每检测样本的目的 DNA 水平。两组间数据差异用成组 *t* 检验分析, *P* < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 PCR 扩增 MCMV gB 基因片段及质粒 DNA 测序结果 以 MCMV 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增产物长度为 89 bp,与预期片段大小一致,见图 1。重组质粒 DNA 测序结果与 NCBI Blast 比对显示,与 GenBank 结果一致。

2.2 两组小鼠唾液腺、肝脏、脾脏和肾脏组织 MCMV DNA 载量变化 模拟治疗组小鼠唾液腺、肝脏、脾脏和肾脏治疗后 1 d 即可检测到 MCMV DNA,并均现逐渐增高趋势;唾液腺内 MCMV DNA 载量最高,治疗后 14 d 达到高峰,肝脏、脾脏和肾脏治疗后 7 d 达峰值,

随后下降;治疗 28 d(感染 29 d)后,各组织内病毒 DNA 载量明显减少,肝、脾和肾组织病毒 DNA 呈持续低水平(同期主要脏器的病毒分离均为阴性^[9]),提示进入慢性期,但直至治疗 120 d 仍可检测到 MCMV DNA。大蒜新素治疗组唾液腺、肾和脾脏 MCMV DNA 水平在治疗后 7,14,28 d 均明显低于模拟治疗组;肝脏 MCMV DNA 载量在治疗后 7 和 14 d 明显低于模拟治疗组;治疗 45 d 后,两组之间差异无显著性,结果见表 1。

3 讨论

如前所述,大蒜新素可显著减少急性 MCMV 肝炎小鼠肝组织内病毒载量,改善肝细胞功能^[6],显示其在整体水平具有抗 CMV 作用。体外研究表明,大蒜新素具有中效抗 CMV 功效,其抗 CMV 的主要作用环节在于能明显抑制对病毒复制有关键调控作用的 CMV 主要即刻早期基因 IE₁72 和 IE₂86 的转录和表达^[4],提示大蒜新素与抗 CMV 一线用药更昔洛韦抑制病毒 DNA 聚合酶的抗 CMV 机制完全不同。动物实验进一步研究还表明,大蒜新素能诱导机体辅助性 T 淋巴细胞(Th₁)分化,纠正或逆转 CMV 感染所致 Th₁/Th₂

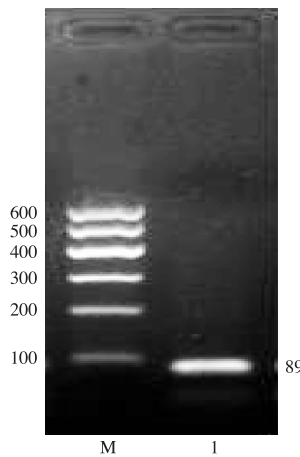


图 1 MCMV gB 基因片段 PCR 扩增结果(M:marker I,1:目的基因)

Fig. 1 PCR amplification result of MCMV gB gene fragment (M: marker I, 1: target gene)

细胞与调节性 T 细胞/效应性 T 细胞平衡失调,增强特异性细胞免疫功能而有利于机体清除病毒^[5, 10, 11]。大蒜新素具备多效性抗 CMV 作用,其不良反应小,被认为可作为 CMV 疾病抗病毒治疗的新选择,尤其适用于对更昔洛韦耐药和不能耐受的患者。

表 1 两组小鼠不同时间唾液腺 MCMV DNA 检测结果

组别与时间	唾液腺	肝脏	脾脏	肾脏
大蒜新素治疗组				
1 d	$(3.70 \pm 1.46) \times 10^3$	$(1.78 \pm 0.59) \times 10^2$	$(8.50 \pm 0.70) \times 10$	$(5.52 \pm 2.92) \times 10^2$
3 d	$(3.20 \pm 2.60) \times 10^4$	$(1.61 \pm 0.16) \times 10^3$	$(2.48 \pm 0.62) \times 10^2$	$(3.05 \pm 0.71) \times 10^3$
7 d	$(4.22 \pm 3.25) \times 10^{5*1}$	$(2.80 \pm 0.51) \times 10^{4*2}$	$(2.79 \pm 0.91) \times 10^{5*1}$	$(3.13 \pm 0.65) \times 10^{4*1}$
14 d	$(4.55 \pm 4.55) \times 10^{5*1}$	$(8.59 \pm 1.00) \times 10^{3*1}$	$(2.69 \pm 0.42) \times 10^{3*1}$	$(2.79 \pm 0.79) \times 10^{3*1}$
28 d	$(3.33 \pm 0.67) \times 10^{5*1}$	$(5.07 \pm 3.76) \times 10^3$	$(2.95 \pm 0.80) \times 10^{3*1}$	$(2.79 \pm 0.79) \times 10^{3*2}$
45 d	$(2.41 \pm 1.30) \times 10^4$	$(4.85 \pm 0.71) \times 10^2$	$(7.47 \pm 1.60) \times 10^2$	$(1.05 \pm 0.37) \times 10^3$
60 d	$(5.20 \pm 1.40) \times 10^4$	$(3.99 \pm 0.97) \times 10^2$	$(3.92 \pm 0.97) \times 10^2$	$(8.78 \pm 0.41) \times 10^2$
75 d	$(4.73 \pm 4.30) \times 10^4$	$(3.10 \pm 0.10) \times 10^2$	$(2.55 \pm 0.53) \times 10^2$	$(5.49 \pm 1.73) \times 10^2$
90 d	$(2.69 \pm 1.84) \times 10^3$	$(2.01 \pm 0.30) \times 10^2$	$(1.99 \pm 0.50) \times 10^2$	$(3.83 \pm 1.78) \times 10^2$
120 d	$(3.47 \pm 1.95) \times 10^3$	$(1.77 \pm 0.45) \times 10^2$	$(1.31 \pm 0.15) \times 10^2$	$(2.86 \pm 0.89) \times 10^2$
模拟治疗组				
1 d	$(2.16 \pm 1.61) \times 10^3$	$(4.92 \pm 2.92) \times 10^2$	$(9.70 \pm 0.80) \times 10$	$(6.69 \pm 2.53) \times 10^2$
3 d	$(2.26 \pm 1.26) \times 10^4$	$(3.28 \pm 1.70) \times 10^3$	$(4.23 \pm 1.46) \times 10^2$	$(4.95 \pm 1.51) \times 10^3$
7 d	$(3.97 \pm 1.28) \times 10^6$	$(2.72 \pm 1.05) \times 10^5$	$(6.53 \pm 2.99) \times 10^{4*1}$	$(3.13 \pm 0.90) \times 10^5$
14 d	$(3.50 \pm 2.22) \times 10^7$	$(7.96 \pm 0.90) \times 10^4$	$(4.64 \pm 0.76) \times 10^4$	$(93.54 \pm 0.91) \times 10^4$
28 d	$(2.70 \pm 0.85) \times 10^6$	$(6.36 \pm 0.72) \times 10^3$	$(2.31 \pm 1.14) \times 10^4$	$(1.05 \pm 0.20) \times 10^4$
45 d	$(2.78 \pm 0.95) \times 10^4$	$(5.40 \pm 1.43) \times 10^2$	$(7.01 \pm 1.54) \times 10^2$	$(1.46 \pm 0.43) \times 10^3$
60 d	$(2.44 \pm 1.27) \times 10^4$	$(4.71 \pm 1.43) \times 10^2$	$(5.11 \pm 0.78) \times 10^2$	$(9.25 \pm 0.36) \times 10^2$
75 d	$(5.65 \pm 4.07) \times 10^4$	$(2.80 \pm 0.48) \times 10^2$	$(2.81 \pm 0.27) \times 10^2$	$(5.27 \pm 1.06) \times 10^2$
90 d	$(2.04 \pm 0.41) \times 10^3$	$(2.20 \pm 0.16) \times 10^2$	$(1.93 \pm 0.14) \times 10^2$	$(4.77 \pm 1.52) \times 10^2$
120 d	$(4.02 \pm 2.87) \times 10^3$	$(1.63 \pm 0.44) \times 10^2$	$(1.61 \pm 0.31) \times 10^2$	$(2.60 \pm 1.22) \times 10^2$

与同时点模拟治疗组比较, *¹P < 0.01, *²P < 0.05

Compared with mock - treated group, *¹P < 0.01, *²P < 0.05

笔者选择 MCMV DNA 载量为评估药物抗病毒疗效的主要指标,运用 real time PCR 技术定量检测播散性 CMV 感染的主要受累脏器肝脏、脾脏、肾脏和唾液腺组织内 MCMV DNA 载量的时序性变化。模拟治疗组的检测结果显示,模型鼠唾液腺、肝脏、脾脏和肾脏在治疗后 1 d(即感染后 2 d)即可检测到 MCMV DNA,其水平快速增高。其中,唾液腺内病毒 DNA 载量最高,治疗后 14 d 达高峰,肝脏、脾脏和肾脏内病毒载量治疗后 7 d 达峰值,然后逐渐下降;治疗 28 d(感染 29 d)后,除唾液腺外,肝、肾和脾内病毒 DNA 载量明显减少。采用蚀斑法对同一实验模型的主要脏器进行病毒分离,治疗 28 d 后均为阴性^[11],提示模型鼠已经进入感染慢性期,直至 120 d 各脏器内仍可检测到 MCMV DNA。与模拟治疗组比较,大蒜新素治疗组治疗后 7,14 和 28 d 唾液腺、肾脏和脾脏 MCMV DNA 载量均明显低于模拟治疗组;治疗后 7 和 14 d 肝脏 MCMV DNA 载量均明显低于模拟治疗组;治疗 45 d 后,两组间差异无显著性。结果表明,大蒜新素在播散性 CMV 感染的急性期,即是病毒增殖的高峰期,可显著减少脏器内病毒 DNA 载量,但在慢性期并不能完全清除病毒。本课题组其他研究人员对本模型鼠脏器组织病理改变进行了同期观察,发现肝、肺和心肌组织病理评分在治疗后 7 d 最高,肾组织病理评分在治疗后 14 d 达峰值;大蒜新素治疗 14 d 后,心、肝和肾组织病理损伤开始明显轻于模拟治疗组,肺损伤从治疗 28 d 后开始显著轻于模拟治疗组^[9],这种差异随时间推移逐渐增大,至大蒜新素治疗 120 d 时,大蒜新素治疗组肝和肺组织结构已接近正常,而肾和心肌组织仍有一定程度病理损伤。这些脏器的病理变化规律与大蒜新素抑制脏器内病毒 DNA 载量的时序性变化呈现基本一致趋向,表明大蒜新素在感染急性期主要通过抑制病毒增殖而减轻组织病理损伤,而在感染慢性期,大蒜新素可能通过其抗氧化、抗炎反应和免疫调节等多种药理作用来改善组织病理损伤^[12]。

CMV 属疱疹类病毒,与其他疱疹病毒一样,具有潜伏-活化的生物学特性。在 CMV 潜伏阶段,用蚀斑法不能检测到病毒,反映病毒增殖性指标如病毒抗原和病毒 RNA 亦不能被检出。笔者在本实验中采用的 real time-PCR 技术具有更高的敏感性和特异性,在病毒潜伏阶段更易检出潜伏病毒^[13],虽然定量检测可以反映病毒增殖情况,但仍然需要通过检测病毒 RNA 水平来帮助区别病毒持续低水平的感染慢性期和病毒潜伏期^[14],还有待进一步深入研究。

总之,大蒜新素长期治疗虽然不能完全清除 CMV 感染,但可在感染急性期有效降低病毒增殖高峰时的

病毒载量,有利于病变组织修复;在感染慢性期还可能通过其他药理功效促进病变组织损伤恢复,不失为治疗 CMV 疾病的一个新选择。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.05.003

[参考文献]

[1] KERCHER L, MITCHELL B M. Immune transfer protects severely immunosuppressed mice from murine cytomegalovirus retinitis and reduces the viral load in ocular tissue [J]. *J Infect Dis*, 2000, 182(3): 652 - 661.

[2] SCALZO A A, FORBES C A, SMITH L M, et al. Transcriptional analysis of human cytomegalovirus and rat cytomegalovirus homologues of the M73/M73. 5 spliced gene family [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(1): 65 - 75.

[3] ANDREI G, DE C E, SNOECK R. Drug targets in cytomegalovirus infection [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2009, 9(2): 201 - 222.

[4] ZHEN H, FANG F, YE D Y, et al. Experimental study on the action of allitridin against human cytomegalovirus *in vitro*: inhibitory effects on immediate-early genes [J]. *Antiviral Res*, 2006, 72(1): 68 - 74.

[5] XU Y, FANG F, XIANG Z D, et al. The effects of allitridin on the expression of transcription factors T-bet and GATA-3 in mice infected by murine cytomegalovirus [J]. *J Med Food*, 2005, 8(3): 332 - 336.

[6] LIU Z F, FANG F, DONG Y S, et al. Experimental study on the prevention and treatment of murine cytomegalovirus hepatitis by using allitridin [J]. *Antiviral Res*, 2004, 61(2): 125 - 128.

[7] 徐翼, 方峰, 董永绥, 等. 小鼠巨细胞病毒全身播散型感染模型的建立[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(6): 517 - 520.

[8] GARSON J A, GRANT P R, AYLIFFE U, et al. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control [J]. *J Viral Methods*, 2005, 126(1-2): 207 - 213.

[9] 葛海霞, 刘兴楼, 舒赛男, 等. 大蒜新素对全身播散型 MCMV 感染小鼠脏器病变的治疗作用[J]. *医药导报*, 2009, 28(5): 556 - 559.

[10] 李亚男, 方峰, 舒赛男, 等. 鼠巨细胞病毒对小鼠调节性 T 细胞分化和效应性 T 细胞活化的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(7): 587 - 591.

[11] 李亚男, 方峰, 舒赛男, 等. 急慢性 MCMV 感染对小鼠脾细胞调节性 T 细胞比率和 Th₁/Th₂ 转录因子表达的影响[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(42): 2999 - 3002.

[12] 晏莉, 黄起壬. 大蒜素药理作用和作用机制探讨[J]. *实用临床医学*, 2008, 9(1): 134.

[13] VLEIGEN I, HERNGREEN S, GRAULS G, et al. Imp-

roved detection and quantification of mouse cytomegalovirus by real-time PCR [J]. *Virus Research*, 2003, 98 (1): 17-25.

[14] VELZING J, ROTHBARTH P H, KROES A C, et al. Det-

ection of cytomegalovirus mRNA and DNA encoding the immediate early gene in peripheral blood leukocytes from immunocompromised patients [J]. *J Med Virol*, 1994, 42 (2): 164-169.

花蕊石煅制后结构变化与元素溶出量差异研究*

赵 晶, 孟宪生, 包永睿, 郭小瑞

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

[摘要] 目的 考察花蕊石煅制前后矿质结构及无机元素溶出量变化情况, 为研究花蕊石功效物质基础及炮制机制提供依据。方法 采用红外光谱法、电感耦合等离子体质谱法对花蕊石煅制前后矿质结构及无机元素溶出量进行分析; 以元素溶出总量、氧化钙(CaO)含量及煅品性状为指标, 考察煅制温度对煅品花蕊石质量的影响。结果 不同煅制温度下花蕊石红外光谱图差异显著, 其中碳酸钙(CaCO₃)逐渐分解, 而蛇纹石转变为镁橄榄石; 镁(Mg)、钙(Ca)、铝(Al)、铁(Fe)、钠(Na)溶出量较高; 煅制后 Ca 溶出量显著增高, 而 Mg 溶出量显著降低, 砷(As)溶出量降低; 实验确定最佳煅制温度为 1 000 ℃。结论 花蕊石炮制前后矿质结构变化与其无机元素溶出量相关。该实验为研究花蕊石化瘀止血的药效物质基础、增效减毒的炮制作用机制提供了依据。

[关键词] 花蕊石; 元素溶出量; 红外光谱; ICP-MS

[中图分类号] R286; R927.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2010)05-0565-04

Changes in Structure and Elements Content Dissolved from *Ophicalciturum* and Calcined *Ophicalciturum*

ZHAO Jing, MENG Xian-sheng, BAO Yong-rui, GUO Xiao-rui (College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

ABSTRACT Objective To investigate the changes in structure and elements content dissolved from *Ophicalciturum* and calcined *Ophicalciturum*, and study active material bases and process mechanism of *Ophicalciturum*. **Methods** The changes in structure and dissolved content of the elements in *Ophicalciturum* and calcined *Ophicalciturum* were analyzed by IR and ICP-MS. Effects of forging temperature on the quality of calcined *Ophicalciturum* was determined by the total elements dissolved, content of CaO and properties. **Results** The IR spectra of *Ophicalciturum* was significantly different at different forging temperatures. CaCO₃ was decomposed gradually, and Serpentine was changed into Forsterite. The dissolved contents of Mg, Ca, Al, Fe, Na were high and Ca was significantly increased, while Mg and As significantly reduced. The optimized temperature was at 1 000 ℃.

Conclusion There is a co-relativity between changes of structure and dissolved elements content before and after calcining. This study could provide basis for investigating the active components of tasis-transforming and bleeding-stanching of *Ophicalciturum* and mechanism of its efficacy enhancement and toxicity reduction

KEY WORDS *Ophicalciturum*; Content of elements dissolved; IR; ICP-MS

花蕊石为《中华人民共和国药典》2005 年版所载常用中药, 原名花乳石, 又名白云石, 始载于宋《嘉佑本草》, 为变质岩类含蛇纹石多少不等的大理岩, 具化

瘀止血之功效, 用于咯血、外伤出血、跌扑伤痛^[1]。现代研究表明, 矿物药的药效可能与微量元素密切相关, 并且微量元素在炮制后会明显变化^[2]。笔者在本实验中利用红外光谱法结合电感耦合等离子体质谱法, 分析花蕊石炮制前后结构变化及其元素溶出量差异, 探讨花蕊石的药效物质基础和炮制机制。

1 仪器与试剂

Thermo Nicolet IR 200 傅立叶变换红外光谱仪, 测定区域 4 000 ~ 400 cm⁻¹, FM-4 型压片机(天津市光学仪器厂), 实验室箱式电阻炉(SX2-2.5-10, 沈阳电炉厂), FM-80 高速万能不锈钢粉碎机(北京市永光明医

[收稿日期] 2009-08-13 **[修回日期]** 2009-10-20

[基金项目] * 科技重大专项“十一五”计划(基金编号: 2009ZX09103-354)

[作者简介] 赵 晶(1984-), 女, 辽宁丹东人, 在读硕士, 主要研究方向: 药物分析。电话: 0411-87406496, E-mail: fendou.2120.le@163.com。

[通讯作者] 孟宪生(1964-), 男, 副教授, 博士, 主要研究方向: 中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析研究。电话: 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com。