

大蒜油体外抗流感病毒作用分析*

郑倩倩¹, 林艺², 谢克勤³, 刘佃², 姚萍¹, 李忠², 王显军², 毕振强², 温红玲¹, 宋艳艳¹, 赵丽¹

摘要:目的 观察大蒜油体外抗流感病毒 H1N1 的作用。方法 采用细胞病变法 (CPE) 和四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT), 测定大蒜油对狗肾细胞 (MDCK) 的毒性; 分预防作用组、直接作用组、抗病毒吸附组和抗生物合成组 4 种加药方式观察大蒜油体外抗流感病毒的作用。结果 大蒜油在预防作用组、直接作用组和抗病毒吸附组抗病毒有效率 (ER) 均 > 50%, 预防作用组 ER 值比阳性药利巴韦林对照组高 22.5% ($P < 0.05$), 治疗指数 (TI) 均高于阳性药对照组 ($P < 0.01$)。结论 大蒜油体外有一定抗流感病毒的作用, 安全性较高。

关键词: 大蒜油; 流感病毒; 体外; 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT); 细胞病变法 (CPE)

中图分类号: R 373.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)04-0593-04

Anti-influenza virus (H1N1) effect of garlic oil *in vitro*

ZHENG Qian-qian*, LIN Yi, XIE Ke-qin, et al (* Department of Laboratory Science of Microorganism, School of Public Health, Shandong University, Ji'nan, Shandong Province 250012, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-influenza virus (H1N1) effect of garlic oil *in vitro*. **Methods** Cytopathic effect (CPE) and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay were used to evaluate the toxicity of garlic oil against Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. The anti-influenza virus (H1N1) effect of garlic oil *in vitro* was observed in four experimental groups: precaution group, direct effect group, anti-adsorption group, and anti-biosynthesis group. **Results** The antiviral effective rate (ER) of garlic oil was higher (22.5%) than that of ribavirin positive control in precaution group ($P < 0.05$). Therapeutic index (TI) of garlic oil was higher than that of ribavirin positive control in all groups ($P < 0.01$ for all). **Conclusion** Garlic oil has strong antiviral effect on influenza A virus (H1N1) with high safety.

Key words: garlic oil; influenza virus; *in vitro*; MTT; CPE

流行性感 (简称流感) 是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病, 好发于冬春两季, 发病快、传染性强。目前, 抗流感药物西药主要是达菲、利巴韦林、金刚烷胺等, 但是这些药物在治疗流感的同时, 不仅会引起眩晕、失眠、焦虑等不良反应, 且易产生流感病毒耐药性^[1]。中医药对流感的认识和防治已有上千年的历史, 如果能通过实验证明一些日常食物有防治流感的作用, 将会增加流感防治的安全性和方便性。大蒜是居民日常生活中常见的饮食佐料, 大蒜中的挥发油 (简称大蒜油), 是大蒜的主要活性成分。大蒜油有防治冠心病、杀菌、抗癌、杀虫等多种功效以及预防酒精性脂肪肝的作用, 但大蒜油抗流感病毒的功效还有待研究^[2-3]。为提高流感防治的安全性、有效性和方便性, 更加深入的探究大蒜油抗流感病毒机制, 本研究通过 4 种加药方式, 采用了细胞病变法 (cytopathic effect, CPE) 和四甲基偶氮唑盐比色法 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 方法, 观察大蒜油体外抗流感病毒的作用。

现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 季节性流感病毒 A/山东槐荫/142/2009 (H1N1) 株, 由山东省疾病预防控制中心提供, 于 10 日龄鸡胚尿囊腔连续传代 2 次后, 测血凝滴度为 1:128。-80 °C 保存备用。

1.2 主要仪器与试剂 10 日龄 SPF 级尼克白种鸡胚 (山东昊泰实验动物繁育有限公司), 批号为 SCXX (鲁) 20080003; 狗肾细胞株 (Madin Darby canine kidney cells, MDCK) (山东省疾病预防控制中心提供, 山东大学公共卫生学院微生物检验所实验室传代); 达尔伯克改良伊格尔 Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基, 0.25% 胰酶 - EDTA (美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 (山东银香伟业生物工程公司); MTT、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Amresco 公司)。细胞生长液: 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。细胞维持液: 含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。利巴韦林 (山东鲁抗辰欣药业有限公司), 规格为 0.1 g/2 mL, 批号为 H20003176; 大蒜油 (许昌元化生物科技有限公司) 密度为 1.080 g/mL。酶标仪: Multiskan MK3 型号 (美国 Thermo labsystems 公司)。

* 基金项目: 山东省科技计划项目 (2008GG2NS02012; 2009GG10002054)

作者单位: 1. 山东大学公共卫生学院微生物检验所, 山东 济南 250012; 2. 山东省疾病预防控制中心; 3. 山东大学公共卫生学院毒理所

作者简介: 郑倩倩 (1984 -), 女, 山东德州人, 硕士在读, 研究方向: 病毒学检验。

通讯作者: 赵丽, E-mail: dlzhl@sdu.edu.cn

1.3 方法

1.3.1 流感病毒感染性测定 将单层 MDCK 细胞用 0.25% 胰酶 - EDTA 消化,调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL 接种到 96 孔培养板,每孔 0.1 mL,37 °C,5% CO₂ 孵箱培养,待细胞铺满 90% 单层后进行实验^[4]。用维持液将流感病毒连续 5 倍递次稀释,每浓度 8 个复孔,同时设细胞对照。显微镜下观察细胞病变,于 24、36、48 h 分别记录细胞病变情况。75% ~ 100% 为 + + + +,50% ~ 74% 为 + + +,25% ~ 49% 为 + +,1% ~ 24% 为 +,无病变为 -。待到细胞对照组无明显病变,实验组病变不再进展时结束实验,按 Reed-Muench 法计算流感病毒对 MDCK 细胞的半数感染浓度 (tissue culture infectious dose 50%, TCID₅₀)^[5]。

1.3.2 大蒜油和利巴韦林对 MDCK 细胞的毒性试验 将大蒜油和 DMSO 按 1:4 的比例混合,用 DMEM 配成 1 mg/mL 母液,-4 °C 保存备用^[6-7]。细胞培养同 1.3.1,用维持液将浓度为 100 mg/L 的大蒜油 5 倍递次稀释。分别于加药后 48 和 60 h,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,培养 4 h 后,吸掉培养上清液,加入 150 μL DMSO,避光振荡 10 min,用酶标仪测定吸光度值 A₅₇₀。计算细胞死亡率 (%) = (细胞对照 A - 实验组 A) / 细胞对照 A。计算大蒜油对 MDCK 细胞的半数中毒浓度 (50% toxicity concentration, TC₅₀) 和最大无毒浓度 (0% toxicity concentration, TC₀)^[8]。同时设 DMSO 溶剂对照。用同样的方法测定阳性药利巴韦林对 MDCK 细胞的毒性试验,利巴韦林浓度从 50 mg/L 开始 5 倍递次稀释。

1.3.3 大蒜油体外抗流感病毒作用 根据病毒复制周期,设计 4 组加药方式。用维持液将 DMSO 乳化的大蒜油从 TC₀ 开始,以 5 倍递次稀释 (预防作用组以 0.13 mg/L 开始稀释,后 3 组以 0.1 mg/L 开始稀释)。每个浓度设 8 个复孔,同时设阳性对照 (利巴韦林)、DMSO 溶剂对照、细胞对照、病毒对照和空白对照^[9]。加入流感病毒为 30 TCID₅₀ / 0.1 mL,每孔 0.1 mL。加药方式分别为:预防作用组、直接作用组、抗病毒吸附作用组和抗病毒生物合成作

用组^[9]。在感染流感病毒 48 h 后,倒置显微镜下观察细胞病变情况,用 MTT 法测定细胞活性。每组实验重复 3 次。计算药物抗病毒的有效率 (effective rate, ER)、药物半数抗病毒有效率的浓度 (50% inhibitor concentration, IC₅₀) 和治疗指数 (therapeutic index, TI)^[10]。

$$ER = \frac{\text{药物处理组平均 A 值} - \text{病毒对照组平均 A 值}}{\text{细胞对照组平均 A 值} - \text{病毒对照组平均 A 值}} \times 100\% ; TI = TC_{50} / IC_{50}。$$

1.4 统计分析 采用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 软件,同组间用线性回归法分析数据,不同组间比较用 *t* 检验,检验水准 α = 0.05。流感病毒 TCID₅₀ 的测定用 Reed-Muench 法。

2 结果

2.1 流感病毒的 TCID₅₀ 流感病毒感染 MDCK 细胞后的 CPE 主要表现为细胞折光性增加,变圆脱落,少数畸形。48 h 后,按 Reed-Muench 法计算流感病毒对 MDCK 细胞的 TCID₅₀ 为 10⁻³ / 0.1 mL。

2.2 大蒜油对 MDCK 细胞的毒性作用 加入大蒜油后,MDCK 细胞折光性增加,细胞变圆、脱落。加药 48 h 后,MTT 法测定细胞活性。在一定浓度范围内,大蒜油的浓度和吸光度 A 有较好的线性关系。大蒜油对 MDCK 细胞的 TC₅₀ 为 5.87 mg/L,加药 48 h 后的 TC₀ 为 0.13 mg/L,60 h 后的 TC₀ 为 0.1 mg/L。利巴韦林对 MDCK 细胞的 TC₅₀ 为 50 mg/L,TC₀ 为 20 mg/L。DMSO 实验组与细胞对照比较,A 值差异无统计学意义。

2.3 大蒜油在 MDCK 细胞上的抗流感病毒作用 (表 1、图 1~4) 光学显微镜可见,加入大蒜油后,细胞表现为折光性增加,细胞变圆、脱落、稀疏。大蒜油预防作用组中,大蒜油浓度为 0.10 mg/L 时,病变细胞最少,随大蒜油浓度减少,病变细胞增多。大蒜油直接作用加药方式中,阳性药对照组细胞形态要好于大蒜油组,大蒜油浓度为 0.13 mg/L 时,细胞形态最好,病变最少。在大蒜油抗病毒吸附加药方式中,阳性药对照组随药物浓度减少,细胞病变

表 1 大蒜油 4 种加药方式的 ER 值和 TI 值

分组	最大 ER (% , $\bar{x} \pm s$)		最佳浓度 (mg/L)		TI ($\bar{x} \pm s$)	
	大蒜油	利巴韦林	大蒜油	利巴韦林	大蒜油	利巴韦林
预防作用组	72.5 ± 12.5 ^a	50.0 ± 11.8	0.100	20	592.90 ± 59.30 ^b	6.25 ± 0.02
直接作用组	51.4 ± 12.7 ^a	76.0 ± 12.6	0.130	16	90.33 ± 1.39 ^b	28.25 ± 0.82
抗病毒吸附组	50.1 ± 11.6 ^a	73.4 ± 11.8	0.001	16	7 159.60 ± 87.30 ^b	7.58 ± 0.03
抗病毒生物合成组	15.8 ± 9.1 ^a	41.1 ± 18.3	0.026	16		

注:与利巴韦林比较,a P < 0.05; b P < 0.01; 抗病毒生物合成组中大蒜油和利巴韦林抗流感病毒的最大有效率均未达到 50%,无法计算 TI 值。

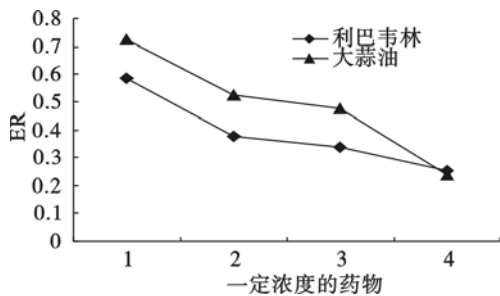


图 1 大蒜油预防流感作用

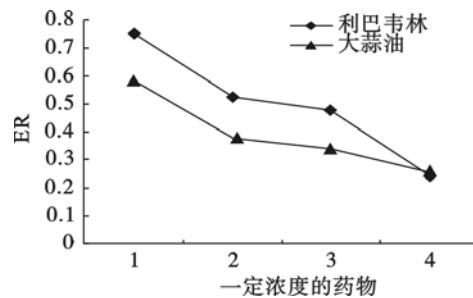


图 2 大蒜油和流感病毒的直接作用

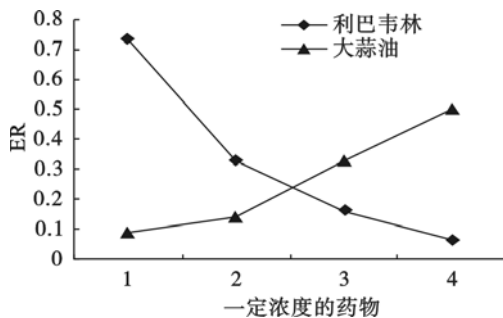


图 3 大蒜油抗病毒吸附的作用

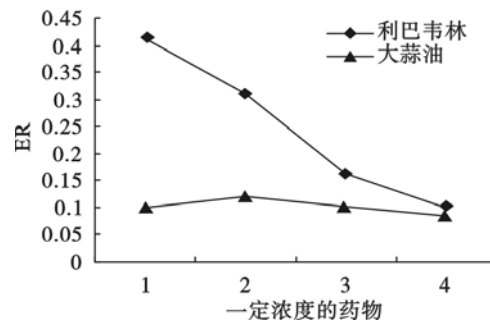


图 4 大蒜油抗病毒生物合成作用

注:图 1,大蒜油和利巴韦林分别从 0.10、16 mg/L 浓度开始以 5 倍递次稀释;图 2~4,大蒜油和利巴韦林分别从 0.13、20 mg/L 浓度开始以 5 倍递次稀释。

加重,大蒜油组随药物浓度减少,细胞病变减轻,当大蒜油浓度为 0.001 mg/L 时,细胞状态最好。而在大蒜油抗病毒生物合成加药方式中,阳性药对照组细胞优于大蒜油组,大蒜油组细胞随浓度变化无明显的梯度变化。大蒜油预防作用组最佳抗流感病毒浓度为 0.1 mg/L,ER 高于阳性药利巴韦林 ($P < 0.05$);在直接作用组,最佳抗流感病毒浓度为 0.13 mg/L,ER 低于利巴韦林 ($P < 0.05$);抗病毒吸附组中,随大蒜油浓度增加,抗病毒 ER 增加,最佳浓度为 0.001 mg/L,但是比利巴韦林低;抗病毒生物合成组,大蒜油和利巴韦林抗病毒 ER 均较低。

3 讨论

大蒜油的抗病毒研究已有初步进展,Liu 等^[11]、孟月生等^[12]证实大蒜中的多种成分有抗巨细胞病毒的作用,大蒜素联合阿昔洛韦能有效减少复发性生殖器疱疹的复发^[13],罗荣等^[14]证明大蒜素有抗肠道病毒作用。易文龙等^[15]证明大蒜新素在体外有抗鼠肝炎病毒 3 型作用。徐翼等^[16]研究发现大蒜新素可增强机体特异性细胞免疫功能而发挥抗小鼠巨细胞病毒作用。

光镜下观察可见大蒜油能有效减轻流感病毒对细胞的 CPE。综合 4 种加药方式,同板的大蒜油组细胞均好于病毒对照组,其中预防作用加药方式抗病毒作用最明显,即抗病毒 ER 最高(高于利巴韦林),直接作用组和抗病毒吸附组(加入大蒜油 48 h)ER 也较高(大约 50%),抗病毒生物合成组 ER

较低,说明大蒜油有一定的抗流感病毒作用。这与 Josling 等^[17]做的大蒜抗普通感冒的流行病学调查研究结果一致。大蒜油的治疗指数都大大高于利巴韦林(因抗病毒生物合成组中,大蒜油和利巴韦林抗流感病毒的最大有效率都未达到 50%,无法计算 TI 值),说明大蒜油的安全性较高^[18]。Song 等^[19]认为中草药可通过多种机制抑制流感病毒活性,作用于细胞膜、下调病毒 RNA 的合成等。绿茶主要是通过酸化细胞内的小区域,如核糖体、溶酶体等来抑制流感病毒的增殖,从而达到抗流感病毒的作用^[20]。大蒜油抗流感病毒的机制尚不明确,体外实验提示,直接作用组和抗病毒吸附组抗流感病毒的 ER 较高,表明大蒜油有一定的杀病毒作用和阻止病毒的吸附作用。

本实验为进一步研究大蒜油体外抗流感病毒的机制和体内抗流感病毒的作用提供了实验基础,为中医研究抗流感作用的药物提供了初步的科学依据。

参考文献

- [1] Fiore AE, Fry A, Shay D, et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2011, 1(60):1-28.
- [2] Singh VK, Singh DK. Pharmacological effects of garlic (*Allium sativum* L.) [J]. ARBS Annual Review of Biomedical Sciences, 2008, 10:6-26.
- [3] 付强强, 曾涛, 李阳, 等. 大蒜油对小鼠酒精性脂肪肝预防作用[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(11):1408-1409.
- [4] Wiesener N, Zimmer C, Jarasch-Althof N, et al. Therapy of experimental influenza virus infection with pyrrolidine dithiocarbamate[J]. Med Microbiol Immunol, 2011, 200:115-126.
- [5] Wirotsangthong M, Nagai T, Yamada H, et al. Effects of *Clina-*

canthus siamensis leaf extract on influenza virus infection [J]. *Microbiol Immunol*, 2009, 53: 66 - 74.

[6] 黄海军, 周迎春, 鄢文, 等. 番石榴叶中皂苷和挥发油抗轮状病毒作用研究 [J]. *Herald of Medicine*, 2008, 27(7): 772 - 775.

[7] 吴迪, 巴哈尔古丽·卡哈尔, 吴桂荣, 等. 溶媒二甲基亚砜对细胞生长与活力的影响研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2010, 33(5): 489 - 491.

[8] 杨芳, 路国华, 刘利兵, 等. 影响 MTT 比色试验的关键环节 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(3): 243.

[9] 张艳丽, 顾立刚, 范新生, 等. 毒热平注射液抗甲型流感病毒的作用研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(10): 684 - 687.

[10] 肖潇, 杨占秋, 石丽桥, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗流感病毒作用的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(22): 2678 - 2681.

[11] Liu ZF, Fang F, Dong YS, et al. Experimental study on the prevention and treatment of murine cytomegalovirus hepatitis by using allitridin [J]. *Antiviral Research*, 2004, 61: 125 - 128.

[12] 孟月生, 陆道培, 郭乃槐, 等. 大蒜中抗人巨细胞病毒成份的筛选 [J]. *中国病毒学*, 1993, 8(2): 147 - 150.

[13] 杜德荣, 刘汝青. 大蒜素联合阿昔洛韦预防复发性生殖器疱疹复发的疗效及对血清 IL22、IFN- γ 的影响 [J]. *广东医学* 院学报, 2009, 27(4): 375 - 376.

[14] 罗荣, 董永绥, 方峰, 等. 药物抗 CBV3 及 ECHO11 的体外实验研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15(2): 135 - 138.

[15] 易文龙, 方峰, 宁琴, 等. 大蒜新素注射液抗鼠肝炎病毒 3 型的体外实验研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(6): 400 - 406.

[16] 徐翼, 方峰, 董永绥, 等. 大蒜新素治疗小鼠巨细胞病毒性心肌炎作用研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(6): 476 - 480.

[17] Josling P. Preventing the common cold with a garlic supplement; a double-blind, placebo-controlled survey [J]. *Advances In Therapy*, 2001, 4(18): 189 - 193.

[18] 吴莹, 金叶智, 吴瑁, 等. 黄芩主要成分体外抗甲型流感病毒作用的研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(8): 541 - 545.

[19] Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus [J]. *Antiviral Research*, 2005, 68: 66 - 74.

[20] Imanishi N, Tuji Y, Katada Y, et al. Additional inhibitory effect of tea extract on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(7): 491 - 494.

收稿日期: 2012-07-05

(韩仰欢编辑 刘铁校对)

· 检验技术 ·

羊布鲁菌 OMP31 蛋白基因表达及抗原性分析*

吴静波¹, 丘金浪¹, 逯光文², 许翔³, 邱菲¹, 黎诚耀¹, 王文敬¹

摘要:目的 构建布鲁菌 OMP31 蛋白原核表达载体, 获得 OMP31 蛋白。方法 PCR 扩增 OMP31 基因, 连接入 pET-30a(+) 表达载体中, 构建 pET-30a(+)/OMP31 质粒, 双酶切鉴定、测序正确后, 转化入大肠埃希氏菌 BL21(DE3) 中, 以不同浓度的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达, 并通过二十烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析; 蛋白质免疫印迹 (western blot) 初步分析其免疫原性。结果 成功构建 pET-30a(+)/OMP31 表达载体, 并表达出 OMP31 蛋白, 分子量约为 31 kDa, 主要以包涵体形式存在; 通过复性获得 >95% 的高纯度可溶性蛋白; 以布鲁菌虎红平板阳性血清检测, 显示复性后蛋白具有良好的免疫反应性。结论 成功表达出带组氨酸 (HIS) 标签的 OMP31 融合蛋白, 且具有较好的蛋白抗原性。

关键词: 布鲁菌; OMP31; 表达载体构建; 蛋白表达; 抗原性

中图分类号: R 378.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)04-0596-03

Cloning, expression and antigenicity of recombinant protein OMP31 of *Brucella melitensis*

WU Jing-bo*, QIU Jin-lang, LU Guang-wen, et al (* Department of Transfusion Medicine, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510515, China)

Abstract: Objective To construct a prokaryotic vector for the expression of OMP31 protein of *Brucella melitensis*. **Methods** A DNA fragment coding OMP31 of *Brucella melitensis* was amplified by PCR and inserted into the vector of pET-30a(+). The resultant recombinant plasmid, designated as pET-30a(+)/OMP31, was verified by double digestion using restriction endonucleases Nde I and Xho I and direct DNA sequencing. Then the plasmid was transfected into BL21(DE3) competent cells for the expression of the OMP31 protein. After induction with different concentrations of isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), the collected cells were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Results** We successfully constructed an expression vector of pET30a(+)/OMP31. An IPTG-induced expression of the OMP31 protein (31 kDa in molecular weight) was identified with SDS-PAGE. Only appearing in the inclusion bodies, the highly pure OMP31 protein could be obtained by refolding. Western blot assay showed that the refolded protein could be recognized by the anti-serum against *Brucella melitensis*. **Conclusion** The recombinant protein of OMP31 with a C-terminal hexa-His-tag was successfully expressed in *E. coli* BL21 as inclusion

* 基金项目: 国家 973 计划项目 (2010CB530204); 国家自然科学基金 (31100657); 广东省大学生创新实验项目 (1212110032)

作者单位: 1. 南方医科大学生物工程学院输血医学系, 广东 广州 510515; 2. 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室; 3. 安徽农业大学生命科学院

作者简介: 吴静波 (1988 -), 男, 广东梅州人, 硕士在读, 研究方向: 布菌分子免疫机制研究。

通讯作者: 王文敬, E-mail: wenjingking77@126.com