

黄芩苷体外抗人巨细胞病毒活性及其对感染人胚肺成纤维细胞凋亡的影响*

刘杨,黄媛,廖毅,秦文卿,刘玲玲,李革,舒赛男,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 观察黄芩苷体外抗人巨细胞病毒(HCMV)的活性;探讨黄芩苷对 HCMV 感染人胚肺成纤维细胞(HEL)凋亡的影响。方法 采用 CCK-8 法测定 HEL 细胞对黄芩苷药物的最大耐受剂量(MTC);标准空斑抑制法测定黄芩苷抗 HCMV 的半数有效浓度(EC₅₀);分别用流式细胞术及 Western blotting 法检测不同浓度黄芩苷对高、低感染复数组不同时间点(感染后 24,48,72,96 h)凋亡率及凋亡关键蛋白 pro-caspase-3 表达的影响。结果 HEL 细胞对黄芩苷的 MTC 为 20.6 μg·mL⁻¹;黄芩苷抗 HCMV 的 EC₅₀ 为 16.13 μg·mL⁻¹;大小剂量黄芩苷处理高低感染复数 HCMV 感染的细胞后,均表现出较强的凋亡抑制效应。大剂量黄芩苷处理高感染复数 HCMV 感染细胞后 pro-caspase-3 表达量较未处理前增多(P<0.05)。结论 黄芩苷体外具有直接抗 HCMV 效应,其抑制感染细胞凋亡和拮抗 pro-caspase-3 活化可能是其机制之一。

关键词 黄芩苷;人巨细胞病毒;人胚肺成纤维细胞;细胞凋亡;pro-caspase-3 表达

中图分类号 R965 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2017)10-1124-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.009

Activity of Baicalin Against Human Cytomegalovirus *In Vitro* and Its Effect on the Apoptosis of Human Embryo Lung Fibroblasts Infected with Human Cytomegalovirus

LIU Yang, HUANG Yuan, LIAO Yi, QIN Wenqing, LIU Lingling, LI Ge, SHU Sainan, FANG Feng (Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To elucidate activity of baicalin against human cytomegalovirus (HCMV) *in vitro*, and explore its effect on apoptosis of human embryo lung fibroblasts (HEL) infected with HCMV. **Methods** CCK-8 kit was used to determine the maximum tolerated dose (MTC) of HEL cell to baicalin while the anti-HCMV median efficacious concentration (EC₅₀) of baicalin was determined by standard plaque reduction method. After treatment with baicalin of different concentrations for 24, 48, 72 and 96 h, cell apoptosis and pro-caspase-3 expression was detected by flow cytometry and Western blotting, respectively. **Results** The MTC of baicalin was 20.6 μg·mL⁻¹; The EC₅₀ of anti-HCMV of baicalin was 16.13 μg·mL⁻¹; The apoptosis rate increased gradually in the groups with low and high multiplicity HCMV infection at early time, showing significant dose-dependent manner. While the ratio of apoptotic cells was going to decrease in high multiplicity infection group 96 h after the infection. The expression of pro-caspase-3 was significantly higher in high-dose baicalin treatment group than in the infection control group (P<0.05). **Conclusion** Baicalin has a direct anti-HCMV effect *in vitro*. One of the mechanisms might be related with it inhibiting cell apoptosis and antagonizing activation of pro-caspase-3.

KEY WORDS Baicalin; Human cytomegalovirus; Human embryo lung fibroblast; Apoptosis; Pro-caspase-3 expression

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是一种世界范围内普遍感染的双链 DNA 病毒,一旦感染

将终身携带。我国是 HCMV 感染的高发地区,人群抗 HCMV-IgG 阳性率高,为 86%~96%^[1]。HCMV 感染对胎儿、婴幼儿、器官移植患者、艾滋病患者等免疫低下人群可造成严重损害,甚至危及生命。但是,一直以来,抗 HCMV 感染药物的研究进展缓慢,能用于临床的抗 HCMV 药物寥寥无几,故寻找和开发安全、副作用小而且疗效佳的抗 HCMV 药物一直是医药学界的努力方向和研究任务。黄芩具有泻火解毒、清热燥湿等功效。国内外学者已经发现,黄芩提取物黄芩苷可以抑制流感病毒、登革热病毒、单纯疱疹病毒-I 型(herpes simplex virus type 1, HSV-I)、HSV-II 等多种

收稿日期 2016-09-26 修回日期 2016-11-25

基金项目 *中华儿科百利基金资助项目(cjp2012-001)

作者简介 刘杨(1987-),女,河北石家庄人,医师,硕士,研究方向:儿童感染与肝病方向。现在广东省汕头市中心医院儿科工作。电话:0754-88550450, E-mail:liuyang987116@sina.com。

通信作者 方峰(1956-),女,湖北武汉人,主任医师,博士,研究方向:儿童感染与肝病。电话:027-83663579, E-mail:ffang@tjh.tjmu.edu.cn。

病毒的复制^[2-5]。本课题组前期在黄芩苷抗小鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)的整体研究中发现,黄芩苷对 MCMV 具有直接抑制作用,可显著下调 MCMV 感染小鼠唾液腺病毒滴度,减轻 MCMV 感染小鼠的肝脏病变^[6]。因巨细胞病毒具有严格的宿主种属特异性,故考虑黄芩苷是否对 HCMV 也具有同样的抗病毒活性,抗病毒作用机制如何,笔者尚未见研究报道。调控细胞凋亡是 HCMV 致病的重要机制之一。本课题组前期研究发现,HCMV 肝炎患儿,肝组织细胞凋亡率为 53.72%,显著高于正常儿童的肝细胞凋亡率 7.19%^[7]。DOU 等^[8]发现,HCMV 感染造成的血小板减少症也是通过诱导产板巨核细胞祖细胞的过度凋亡造成。本课题以 HCMV 感染的人胚肺成纤维细胞(human embryo lung fibroblast, HEL)为体外模型,检测黄芩苷体外抗 HCMV 的活性,并从细胞凋亡的角度探讨黄芩苷抗 HCMV 可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 本课题组自制 HEL 细胞,第 10~20 代细胞用于本实验。

1.1.2 药物 黄芩苷粉末,四川百利药业公司提供,高效液相色谱法鉴定含量为 90%,以二甲亚砜配制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓缩液, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装包存,用时稀释成相应浓度。根据检测 HEL 细胞对黄芩苷最大耐受浓度,将黄芩苷给药浓度设置为:大剂量($20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),小剂量($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.1.3 病毒 HCMV 标准实验毒株 AD169,由湖北省预防医学科学院病毒所提供。空斑法测定 HCMV AD169 株的感染性毒力为 $5.4 \times 10^6 \text{ PFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.1.4 试剂 达尔伯克改良伊格培养基(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)(Gibco 公司,批号:12800-017)按说明书方法配制。生长液:在配制好 DMEM 液中加入小牛血清(Gibco 公司)至终浓度为 20%(原代培养)、10%(传代培养)。维持液:在配制好 DMEM 液中加入小牛血清至终浓度为 4%。兔抗人 pro-caspase-3 多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:L0104)。小鼠抗人肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号:26618)。Annexin-V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物有限公司,批号:401002)。cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒(日本同仁试剂有限公司,批号:C0037)。

1.1.5 仪器 DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);Mini P-4 垂直电泳槽(北京六一仪器厂);DYCP-40E

型湿转仪槽(北京六一仪器厂);PHOmo 型全自动酶标仪(河南安图有限公司);超净工作台(Hfsafe-760S Class II TYPE A/B3);二氧化碳(CO_2)培养箱(heal force HF90/HF240);倒置显微镜(Olympus IX50 型)。

1.2 HCMV 细胞感染模型的建立 HCMV AD169 感染 HEL 细胞。病毒感染复数(multiply of infection, MOI), $\text{MOI} = \text{感染性病毒量} / \text{细胞数}$, 现国际公认 $\text{MOI} < 1$ 为低感染复数,本实验设低 MOI 组和高 MOI 组,MOI 分别为 0.25 和 2.5。

1.3 药物细胞毒性实验 将指数生长期的细胞接种入 96 孔板,待细胞长成单层后,加入倍比稀释的黄芩苷,同时设正常细胞作为阴性对照,入细胞培养箱培养 72 h,用 CCK-8 法,测定药物的半数致死浓度(median cytotoxic concentration, IC_{50});同步观察细胞形态学变化,得出 HEL 细胞对黄芩苷的最大耐受浓度(maximum tolerated concentration, MTC)。每组均设复孔 5 个。

1.4 黄芩苷体外抗 HCMV 活性 采用空斑抑制法检测黄芩苷对 HCMV 的半数有效浓度(median efficacious concentration, EC_{50}),得到系列浓度的空斑抑制率,进一步采用对数单位法(Logit 法)求出黄芩苷抗 HCMV 的 EC_{50} 值。黄芩苷抗 HCMV 病毒的药物选择指数(selective index, SI)按如下公式计算: $\text{SI} = \text{IC}_{50} / \text{EC}_{50}$ 。

1.5 分组 根据病毒感染量和药物剂量设置 9 个组,分别为:①模拟感染组;②低感染复数组;③高感染复数组;④大剂量黄芩苷组;⑤小剂量黄芩苷组;⑥低感染+小剂量黄芩苷组;⑦低感染+大剂量黄芩苷组;⑧高感染+小剂量黄芩苷组;⑨高感染+大剂量黄芩苷组。于感染后 24, 48, 72, 96 h 收集细胞。

1.6 流式细胞术检测凋亡细胞比例 按 Annexin-V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书方法处理各组细胞,采用流式细胞术检测。在双变量流式细胞仪的散点图上,左下象限为活细胞;左上象限为坏死细胞;右下象限为凋亡早期细胞;右上象限为凋亡晚期细胞。凋亡细胞比例=右下象限+右上象限之和。

1.7 Western blotting 法检测 pro-caspase-3 蛋白表达 根据流式细胞术检测结果,选择细胞凋亡率最高的时间点,即感染后 72 h 收获细胞。设模拟感染组、高感染复数组、高感染+小剂量黄芩苷组、高感染+大剂量黄芩苷组,共 4 组。常规提取各组细胞总蛋白,测定蛋白浓度,Western blotting 法检测 pro-caspase-3 蛋白表达,其中兔抗人 pro-caspase-3 工作浓度 1:1 000,鼠抗人 β -actin 工作浓度 1:200, ECL 发光试剂进行荧光

显色。

1.8 图像分析及结果处理 图片用 Gel-PRO Analyzer 软件测定各个条带积分吸光度值。校正值 κ = 目的蛋白条带积分吸光度值/ β -actin 条带的积分吸光度值,以校正值 κ 对目的蛋白 pro-caspase-3 表达水平进行半定量分析。

1.9 统计学方法 采用 SPSS18.0 for windows 软件进行统计学分析,计数资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间均数比较采用方差分析法,方差齐性时两组间均数比较采用 *t* 检验,而方差不齐时采用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷抗 HCMV 的选择指数 黄芩苷对 HEL 细胞的 IC₅₀ 为 225.23 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;HEL 对黄芩苷 MTC 为 20.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。加入黄芩苷后,病毒空斑形成数较病毒对照组减少,且随黄芩苷浓度的增大逐渐减少,表现为剂量依赖性。通过 Logit 法分析黄芩苷对 HCMV AD169 的 EC₅₀ 为 16.13 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,故黄芩苷抗 HCMV 的选择指数(SI)为 13.96。

2.2 HCMV 对 HEL 细胞凋亡率的影响 结果见表 1。模拟感染组细胞凋亡率保持相对稳定的低水平,各时相之间差异无统计学意义。低感染复数组与高感染复数组分别于感染 HCMV 48 及 24 h 后凋亡率明显增高,于感染后 96 及 72 h 达峰值,高感染复数组增幅较大。高感染复数组在感染 HCMV 96 h 后凋亡率降低,但仍远高于模拟感染组。

表 1 HCMV 对 HEL 细胞凋亡率的影响

Tab.1 Effect of HCMV on apoptosis ratio of HEL

| % , $\bar{x}\pm s, n=5$ | | |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 组别 | 24 h | 48 h |
| 模拟感染组 | 7.42 \pm 0.52 | 7.88 \pm 0.29 |
| 低感染复数组 | 11.46 \pm 5.70 | 14.63 \pm 4.26 ^{*1} |
| 高感染复数组 | 15.15 \pm 1.27 ^{*1} | 21.44 \pm 5.54 ^{*2*3} |
| % , $\bar{x}\pm s, n=5$ | | |
| 组别 | 72 h | 96 h |
| 模拟感染组 | 7.31 \pm 0.73 | 7.87 \pm 0.84 |
| 低感染复数组 | 21.13 \pm 4.68 ^{*2} | 28.75 \pm 5.42 ^{*2} |
| 高感染复数组 | 36.36 \pm 3.44 ^{*2*3} | 31.17 \pm 6.99 ^{*2} |

与模拟感染组比较, ^{*1} $P<0.05$, ^{*2} $P<0.01$; 与低感染复数组比较, ^{*3} $P<0.01$

Compared with mimetic infection group, ^{*1} $P<0.05$, ^{*2} $P<0.01$; Compared with low multiplicity infection group, ^{*3} $P<0.01$

2.3 黄芩苷对 HCMV 感染细胞凋亡的影响

2.3.1 黄芩苷对正常 HEL 细胞凋亡比率的影响 两

种剂量黄芩苷处理的 HEL 凋亡细胞比率尽管都增高(表 2),但与模拟感染组比较均差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 2 黄芩苷处理对正常 HEL 细胞凋亡率的影响

Tab.2 Effect of baicalin on apoptosis ratio of HEL

| % , $\bar{x}\pm s, n=5$ | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|
| 组别 | 24 h | 48 h |
| 模拟感染组 | 7.42 \pm 0.52 | 7.88 \pm 0.29 |
| 黄芩苷 | | |
| 小剂量组 | 7.75 \pm 0.48 | 7.95 \pm 0.15 |
| 大剂量组 | 7.96 \pm 0.62 | 7.99 \pm 0.21 |
| % , $\bar{x}\pm s, n=5$ | | |
| 组别 | 72 h | 96 h |
| 模拟感染组 | 7.31 \pm 0.73 | 7.87 \pm 0.84 |
| 黄芩苷 | | |
| 小剂量组 | 7.11 \pm 0.34 | 8.24 \pm 0.87 |
| 大剂量组 | 7.42 \pm 0.57 | 8.45 \pm 0.68 |

2.3.2 黄芩苷对 HCMV 感染 HEL 细胞凋亡比率的影响 低感染+小剂量黄芩苷组和低感染+大剂量黄芩苷组:感染细胞凋亡比率均出现降低。低感染+大剂量黄芩苷组在给药后 24 h 即出现有意义的凋亡率降低,在 72 h 时达到抑制细胞凋亡的最高峰,使细胞凋亡率降低 63.98%;而低感染+小剂量黄芩苷组凋亡抑制效应相对延后,在给药后 48 h 出现有意义的凋亡细胞比率降低。见图 1。

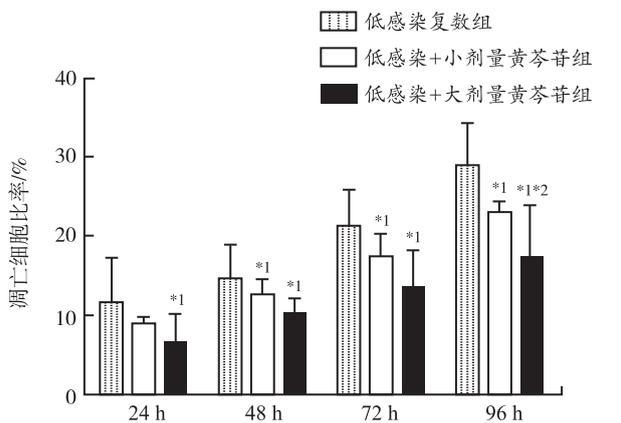
高感染+大剂量黄芩苷组在给药后 24 h 凋亡细胞比率出现有意义降低,此效应一直持续至给药后 72 h;高感染+小剂量黄芩苷组凋亡抑制效应发挥较晚,于处理后 72 h 才出现有意义的凋亡比率下调。与高感染复数组比较,两组在 96 h 均出现凋亡细胞比率增高。见图 2。

2.3.3 黄芩苷对 HCMV 感染 HEL 细胞 pro-caspase-3 表达的影响 如图 3 所示。实验组和模拟感染组在 42 000 处 β -actin 条带,各泳道的显色基本均一,说明各泳道上样量基本一致。在感染后 72 h,小剂量黄芩苷处理,pro-caspase-3 表达与高感染复数组比较,上调差异无统计学意义($P>0.05$),而大剂量黄芩苷处理后 pro-caspase-3 表达量较高感染复数组增多,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$),但仍远低于模拟感染组($P<0.01$)。通过采用 Gel-PRO Analyzer 软件计算出各组的校正值 κ ,结果见图 4。

3 讨论

细胞凋亡是由基因控制的自主有序的生理性死亡,对维持机体发育和内环境稳定发挥重要作用。尽

管病毒感染细胞发生凋亡,实为机体以牺牲少许感染细胞为代价换取整体生存和大环境稳态的重要机制。但近来研究发现,人类许多疾病和病理现象都与细胞凋亡机制的紊乱有关,其中 CMV 的致病作用也与感染细胞凋亡有着密切的关系^[7-11],而若有药物可以调控这一机制或许对于治疗 HCMV 感染性疾病产生重大意义。

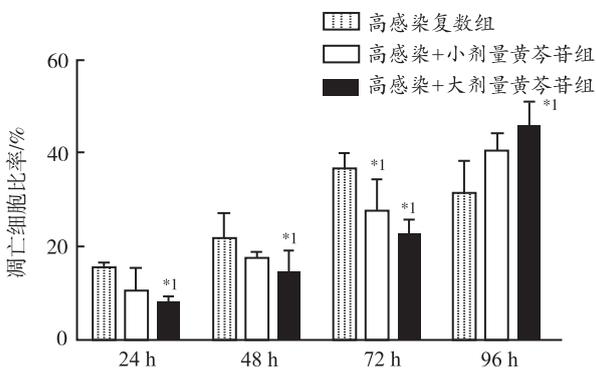


与低感染复数组比较, *¹ $P < 0.05$; 与低感染+小剂量黄芩苷组比较, *² $P < 0.05$

图 1 黄芩苷对低感染复数 HEL 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Compared with low multiplicity infection group, *¹ $P < 0.05$; Compared with low multiplicity infection and low dose baicalin group, *² $P < 0.05$

Fig.1 Effect of baicalin on apoptosis ratio of HEL with low multiplicity infection ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与高感染复数组比较, *¹ $P < 0.05$

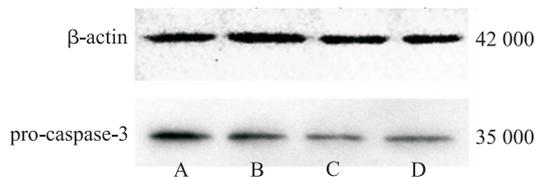
图 2 黄芩苷对高感染复数 HEL 细胞凋亡比率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Compared with high multiplicity infection group, *¹ $P < 0.05$

Fig.2 Effect of baicalin on apoptosis ratio of HEL with high multiplicity infection ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

笔者发现 HEL 予低感染复数的 HCMV 感染时,凋

亡率随感染时间延长逐渐增大,96 h 达峰值,为正常细胞的 4 倍;予高感染复数的 HCMV 感染时,凋亡细胞比率增加更为明显,24 h 就出现有意义的增高,72 h 已经为模拟感染组 5~6 倍,达峰值,96 h 却出现降低。检测结果与文献[12]结果相似。

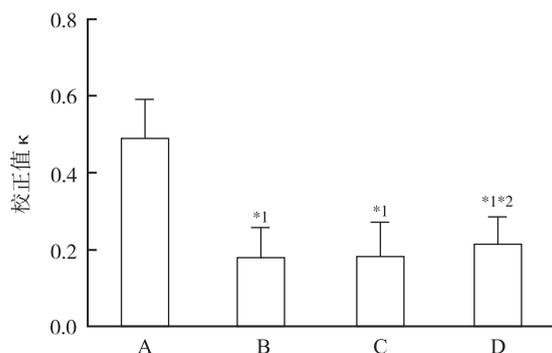


A. 模拟感染组; B. 高感染复数组; C. 高感染+小剂量黄芩苷组; D. 高感染+大剂量黄芩苷组

图 3 4 组 72 h pro-caspase-3 表达量

A. mimetic infection group; B. high multiplicity infection group; C. high multiplicity infection and low dose baicalin group; D. high multiplicity infection and high dose baicalin group

Fig.3 Pro-caspase-3 expression of four groups at 72 h



A. 模拟感染组; B. 高感染复数组; C. 高感染+小剂量黄芩苷组; D. 高感染+大剂量黄芩苷组; 与模拟感染组比较, *¹ $P < 0.01$; 与高感染复数组比较, *² $P < 0.05$

图 4 4 组 pro-caspase-3 表达量的校正值 κ ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A. mimetic infection group; B. high multiplicity infection group; C. high multiplicity infection and low dose baicalin group; D. high multiplicity infection and high dose baicalin group. Compared with mimetic infection group, *¹ $P < 0.01$; Compared with high multiplicity infection group, *² $P < 0.05$

Fig.4 Adjusted value κ of pro-caspase-3 level in four groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

综合分析发现,无论是低感染复数还是高感染复数的 HCMV 感染,均可诱导感染细胞凋亡,随感染时间延长凋亡逐渐增加;其机制可能为受染细胞通过启动凋亡机制以实现清除病毒的一种本能防御反应^[13]。

实验中还观察到尽管高感染复数组病毒剂量是低感染复数组的 10 倍,但处理后细胞并未出现凋亡细胞

比率成倍增长,其原因可能与 HCMV 即刻早期基因 UL36 及 UL37 编码的凋亡抑制物 vICA 和 vMIA 有关,因 vMIA 与 vICA 表达量与病毒滴度呈正相关^[14-15]。

通过显微镜跟踪观察及 CCK-8 法检测,显示黄芩苷的细胞毒性较低,黄芩苷对 HEL 细胞的半数致死浓度为 $225.23 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,适用于抗病毒药物的体外实验研究。通过空斑抑制实验,发现随着药物浓度增大,空斑抑制率逐渐增大。至药物浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,接近 MTC ($20.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 时,空斑抑制率达到 57.95%。通过计算得出黄芩苷体外抗 HCMV 的选择指数为 13.96,其中选择指数大于 1 为有效,指数越大安全范围越大^[16]。综上所述,黄芩苷体外环境下是一种安全有效的抗 HCMV 药物。

既往研究还发现黄芩苷可以通过影响凋亡调节蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达,降低肾脏细胞凋亡水平,延缓糖尿病肾病的发生^[17-18];在流感病毒感染过程中,可通过调控细胞周期分布,抑制 pro-caspase-8 的激活,进一步抑制 pro-caspase-3 激活,降低流感病毒感染细胞凋亡,进而抑制流感病毒复制^[3]。

实验中发现黄芩苷处理可有效降低感染细胞凋亡比率,其抑制功效不仅与处理剂量有关,还与病毒滴度和作用时间密切相关。大小剂量黄芩苷处理正常 HEL 细胞后,凋亡率并未出现显著上调,可见在 MTC 浓度范围内黄芩苷本身并不会诱导细胞凋亡。黄芩苷的抗凋亡作用在低感染复数组表现较为显著,表现出明显剂量依赖性,即处理剂量越大,凋亡细胞比率下降越明显。而在高感染复数组,大、小剂量黄芩苷处理,分别于治疗后 48,72 h 凋亡细胞比率显著下调,然而,96 h 却均出现凋亡细胞比率较感染对照组骤然增加,与低感染复数黄芩苷处理组表现不同。但这并不能武断得出黄芩苷在高感染组处理 96 h 已经丧失抗凋亡作用转为促凋亡的结论,因为存在这种可能性,即虽然黄芩苷依然持续发挥抗凋亡作用,但由于其拮抗高感染组子代病毒即刻早期基因 UL36 及 UL37 编码的凋亡抑制物 vICA 和 vMIA 的大量合成,使得处理组细胞并没有出现感染对照组凋亡细胞比率的下调,造成促凋亡的假象。这是因为有研究发现,黄芩苷的同系物黄芩素(在体内环境下二者可以相互转化^[2,4])具有显著下调 HCMV 即刻早期基因表达水平的作用^[18]。

通过检测黄芩苷处理对 pro-caspase-3 的表达影响,发现大剂量黄芩苷处理 72 h 后 pro-caspase-3 表达量较高感染复数组增多,可见黄芩苷不仅在流感病毒感染中可以通过拮抗 pro-caspase-3 的活化发挥抑凋亡作用^[3],而且在 HCMV 感染中也可能通过抑制 pro-

caspase-3 的活化来减少细胞凋亡。高感染+小剂量组可能由于处理剂量较低,而仅出现 pro-caspase-3 表达数值上的上调,但与高感染复数组比较差异无统计学意义。由于本课题并未测定 caspase-3 的活性片段,无法确切判断黄芩苷是通过直接影响 pro-caspase-3 的剪切活化,还是通过促进 pro-caspase-3 的合成来实现上调 pro-caspase-3 表达水平,但结合流式细胞术凋亡细胞比率的检测结果,即大剂量黄芩苷显著下调高感染细胞凋亡比率,推测前一种机制的可能性更大。

综上所述,黄芩苷体外环境下通过拮抗 HCMV 诱导的受染细胞凋亡上调,表现出较强的细胞保护作用,该结果为临床使用黄芩苷治疗巨细胞感染性疾病提供了实验依据。但黄芩苷具体的抗凋亡作用机制,除与 pro-caspase-3 的表达水平相关外,是否也可能与影响其他在 HCMV 感染细胞凋亡过程中发挥重要作用的调控因子,如 Bcl-2、Bax 等表达相关,则需要更加深入的研究探讨。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会感染学组,全国儿科临床病毒感染协作组,《中华儿科杂志》编辑委员会.儿童巨细胞病毒性疾病诊断和防治的建议[J].中华儿科杂志,2012,50(4):290-292.
- [2] XU G, DOU J, ZHANG L, et al. Inhibitory effects of baicalin on the influenza virus *in vivo* is determined by baicalin in the serum[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(2):238-243.
- [3] 张春晶,顾立刚,于海涛.黄芩苷干预甲型 H1N1 流感病毒感染诱导的 A549 细胞周期分布及凋亡[J].病毒学学报,2011,27(2):108-116.
- [4] DOU J, CHEN L, XU G, et al. Effects of baicalin on *Sendai* virus *in vivo* are linked to serum baicalin and its inhibition of hemagglutinin-neuraminidase[J]. Arch Virol, 2011, 156(5):793-801.
- [5] LYU S Y, RHIM J Y, PARK W B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro* [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28(11):1293-1301.
- [6] 黄永建.黄芩苷抗小鼠巨细胞病毒肝炎的治疗作用及其机制研究[D].武汉:华中科技大学,2011:17-21.
- [7] 李红,董永绥,方峰,等.大蒜素和更昔洛韦抑制巨细胞病毒所致细胞凋亡的实验研究[J].中华儿科杂志,1999,37(4):26-30.
- [8] DOU J, LI X, CAI Y, et al. Human cytomegalovirus induces caspase-dependent apoptosis of megakaryocytic CHRF-288-11 cells by activating the JNK pathway[J]. Int J Hematol, 2010, 91(4):620-629.
- [9] 熊建文,肖化,张镇西.MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J].激光生物学报,2007,16(5):559-

- 562.
- [10] 甄宏,方峰,舒赛男,等.大蒜新素抑制人巨细胞病毒即刻早期基因表达在抗人巨细胞病毒机制中的作用[J].中国循证儿科杂志,2006,1(1):26-32.
- [11] YOSHIDA H,SUMICHIKA H,HAMANO S, et al. Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus[J].J Virol,1995,69(8):4769-4775.
- [12] 聂兴草,方峰,李红,等.大蒜新素对人巨细胞病毒感染的人胚肺成纤维细胞凋亡的影响[J].中草药,2004,35(9):60-63.
- [13] BRUNE W. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses [J].Virus Res,2011,157(2):144-150.
- [14] PATTERSON C E, SHENK T. Human cytomegalovirus UL36 protein is dispensable for viral replication in cultured cells [J].J Virol,1999,73(9):7126-7131.
- [15] MAVINAKERE M S, COLBERG-POLEY A M. Dual targeting of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 protein during permissive infection [J].J Gen Virol,2004,85(Pt 2):323-329.
- [16] 魏伟,吴希美,李元建,等.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010.
- [17] 孙洁,田林红,王收宝,等.黄芩苷对糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡及其 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J].实用医学杂志,2011,27(5):757-760.
- [18] EVERS D L, CHAO C F, WANG X, et al. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action [J].Antiviral Res,2005,68(3):124-134.

茶多酚预防吗啡所致便秘的效果及机制

陈陶,刘异

(华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部,武汉 430030)

摘要 **目的** 探讨茶多酚对吗啡所致便秘的预防作用及其作用机制。**方法** 雌性昆明种小鼠按随机数字表法分为空白对照组、模型对照组、茶多酚组、茶多酚+吗啡组,每组 10 只。茶多酚组和茶多酚+吗啡组小鼠灌胃给予茶多酚 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,空白对照组和模型对照组给予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 4 d。给药第 4 天,模型对照组和茶多酚+吗啡组小鼠腹腔注射吗啡 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,茶多酚组和空白对照组腹腔注射 0.9%氯化钠溶液 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,15 min 后小鼠灌胃给予 5%墨汁液 0.2 mL。热板法检测各组小鼠的第 1 次舔足时间,观察茶多酚对吗啡镇痛效果的影响;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测各组小鼠小肠内胃动素、P-物质及生长抑素的含量。**结果** 与空白对照组比较,模型对照组墨汁推进长度和墨汁推进率明显降低($P < 0.01$);茶多酚组墨汁液推进长度和墨汁推进率显著增加($P < 0.05$)。与模型对照组比较,茶多酚+吗啡组墨汁推进长度和墨汁推进率显著升高($P < 0.01$)。空白对照组和茶多酚组小鼠第 1 次舔足时间分别为 (8.64 ± 2.72) , (9.11 ± 2.13) s,模型对照组和茶多酚+吗啡组小鼠第 1 次舔足时间分别为 (18.79 ± 3.58) , (20.10 ± 3.72) s。与空白对照组比较,模型对照组胃动素、P 物质含量减少($P < 0.05$),茶多酚组胃动素、P 物质明显增加($P < 0.05$);与模型对照组比较,茶多酚+吗啡组胃动素、P 物质含量明显增加($P < 0.05$)。与空白对照组比较,模型对照组生长抑素含量增加,而茶多酚组和茶多酚+吗啡组生长抑素含量显著减少($P < 0.05$)。**结论** 茶多酚在不降低疼痛治疗效果的前提下,能有效改善小鼠肠蠕动预防吗啡所致便秘,这一作用与茶多酚对肠道胃动素、P 物质和生长抑素的含量调节有关。

关键词 茶多酚;吗啡;便秘;镇痛

中图分类号 R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1129-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.010

Effect and Mechanism of Tea Polyphenols on Morphine-induced Constipation

CHEN Tao, LIU Yi (Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT **Objective** To explore the preventive effect and mechanism of tea polyphenols on morphine-induced constipation. **Methods** Female Kunming mice were randomly divided into 4 groups (10 mice per group), including blank control group, model control group, tea polyphenols group and tea polyphenols + morphine group. Tea polyphenols group and tea polyphenols + morphine group were pretreated with $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of tea polyphenols for 4 days, meanwhile blank control group and model control group were pretreated with $0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ of 0.5% CMC-Na for 4 days. On the fourth day model control group and tea polyphenols + morphine group were intraperitoneal injected $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ morphine, otherwise blank control group and tea polyphenols group were injected with $0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ of 0.9% sodium chloride solution. Then mice were given 0.2 mL of 5% ink