莪术油、苦参碱抗感染作用的实验研究

Experimental Study on the Anti Infection Effect of Curcuma Oil and Matrine

朱少萍 林蒙

Shaoping Zhu Meng Lin

复旦大学中山医院

中国·上海 200037

Zhongshan Hospital of Fudan University,

Shanghai, 200037, China

【摘要】论文研究了莪术、苦参碱的抗感染作用:采用体外病毒实验方法,HPV-6、HPV-16及 HPV-18 三种不同亚型的假病毒感染靶细胞,评价不同浓度的莪术油的抑制作用及结合作用;建立人宫颈鳞状上皮永生细胞株(Ect1/E6E7)体外研究模型,采用不同浓度的苦参碱分别体外作用于细胞 48h,检测细胞生长周期变化及凋亡情况;建立小鼠二倍稀释法、试管二倍稀释法模型,采用菌落计数方法测定苦参碱的体外抗菌活性;采用混合菌液注入划伤的子宫内造成小鼠慢性盆腔炎,造模后采用不同浓度的苦参碱处理小鼠,观察小鼠体内炎症因子水平。结果显示,随着莪术油剂量的增加,病毒抑制率显著提高,体外抑制率最高达到 88.2%,黏附率显著降低,黏附率低至 20.4%。L1 衣壳蛋白结合率显著提高,最高达到 76.5%。苦参碱处理 HPV 感染靶细胞 48h 后,G0/G1 期比率上升,S 期和 G2/M 期细胞比率下降,晚期凋亡细胞及早期凋亡细胞率显著增加,并呈现剂量依赖性。体外抗菌实验显示,苦参碱溶液对解脲支原体、人型支原体、淋病奈瑟菌、衣原体的 MIC₅₀ 分别为 0.5μg/mL、0.5μg/mL、4μg/mL、0.5μg/mL,MIC₉₀ 分别为 1μg/mL、4μg/mL、8μg/mL、2μg/mL。

【Abstract】This paper studies the anti infection effect of curcuma zedoary and matrine: the inhibition and binding of zedoary turmeric oil in different concentrations were evaluated by in vitro virus test, and three different subtypes of pseudovirus, HPV-6, HPV-16 and HPV-18, were used to infect target cells; in vitro study model of human cervical squamous epithelial immortalized cell line (ect1/E6E7) was established, and matrine of different concentrations was used to act on the cells for 48h in vitro to detect the changes of cell growth cycle and apoptosis; in vitro antibacterial activity of matrine was measured by plate double dilution method and tube double dilution method; chronic pelvic inflammation was caused by injecting mixed bacterial solution into the scratched uterus, and rats were treated with Matrine of different concentrations after modeling to observe the level of inflammatory factors in rats. The results show that with the increase of zedoary turmeric oil dosage, the inhibition rate of virus was significantly increased, the highest inhibition rate was 88.2%, the adhesion rate was significantly reduced, and the adhesion rate was as low as 20.4%. The binding rate of L1 capsid protein increased significantly, reaching 76.5%. After treatment with matrine for 48 hours, the ratio of cells in G0/G1 phase increased, the ratio of cells in S phase and G2/M phase decreased, and the ratio of cells in late stage and early stage increased significantly. The results show that the MIC₅₀ and MIC₉₀ of matrine solution to Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae and chlamydia were 0.5μg/mL, 0.5μg/mL, 4μg/mL, 0.5μg/mL and 1μg/mL, 4μg/mL, 8μg/mL, 2μg/mL respectively.

【关键词】莪术油;苦参碱;人类乳头瘤感染;炎症因子

【Keywords】zedoary turmeric oil; matrine; human papilloma infection; inflammatory factors

【DOI】10.36012/pmr.v1i3.948

1 引言

中药中筛选抗感染物是药物治疗研究的热点。莪术油是

经莪术蒸汽蒸馏得到的挥发油,含有多抗有效成分,如β-榄香烯、莪术醇、莪术酮、吉玛酮等,部分研究证实具有一定的抗病毒作用。苦参素为从天然植物中药苦参根或苦豆子

中提取的生物碱,其中氧化苦参碱的含量在 98%以上。小样本实验证实苦参具有抗菌、抗病毒、止痒等功效^[1-2]。但这些研究较为分散且样本量较小^[3],因此,本文通过体外、体内实验结合,系统研究莪术油、苦参碱的抗感染作用。

2 材料和方法

2.1 材料

3个项目实验材料分别为:①宫颈癌Hela细胞,人胚肾293-TX细胞,高糖培养基,胎牛血清,HPV-6、HPV-16及HPV-18三种不同亚型表达质粒;②人宫颈永生鳞状细胞株,人宫颈癌细胞株,10%胎牛血清、青霉素100U/mL、链霉素100μg/mL的RPMI-1640培养基;③2008—2009年从北京地区医院收集的19种674株临床分离菌,多点接种器、自动分装器、二氧化碳培养箱、超低温冰箱、液体涡旋混合器。

2.2 方法

2.2.1 HPV抑制实验^[4]

将生长状态良好293-TX细胞接种于10mm平皿中,5%CO₂培养箱内培养过夜,将HPV-6、HPV-16及HPV-18三种不同亚型表达质粒加入细胞,16h后更换DMEM培养基,加入裂解液,离心获得HPV病毒包装。将假病毒与不同浓度的莪术油进行合并处理,孵育0.5h,处理后的药物病毒混合液加入细胞板100μL/孔,感染72h后,利用荧光素酶检测,测算IC₅₀。将不同浓度的莪术油与病毒溶液提前培育0.5h,再预冷0.5h,再加入到培养的细胞孔中,再去除细胞表面未黏附的病毒,利用荧光素酶检测,测算细胞黏附率。PCR扩增获得L1蛋白全长基因,挑取高拷贝整合菌株,将不同浓度的莪术油固定于3D芯片上,选择稀释的L1蛋白溶液作为流动相,融合时间5min,解离时间5min,选择三叶苷为对照组,采用荧光素酶检测,计算结合率。

2.2.2 细胞周期与凋亡实验^[5]

实验组Ect1/E6E7细胞用2μmol/L、4μmol/L、8μmol/L的苦参碱作用72h,再用PBS冲洗2次,加入1ml Cell cycle staining buffer培育处理并避光0.5h,使用流式细胞仪检测洗白周期。同时将Ect1/E6E7细胞接种于6孔板中培养,采用2μmol/L、4μmol/L、8μmol/L的苦参碱处理72h,特殊染色1h,再使用流式细胞仪检测凋亡情况。对照组均采用生理盐水对照。

2.2.3 体外抗菌作用实验^[6]

平皿二倍稀释法和多点接种器进行,药物用CAMH肉汤二倍稀释成系列所需浓度,分别加适量到平皿中,MH琼脂培养基熔化后定量注入含药液的平皿内混匀,药物的终浓度不等。在37℃条件下干燥后培养20h,观察菌落生长情况,计算MIC,并测算出MIC₅₀、MIC₉₀。

2.3 观察指标

①HPV病毒抑制率、HPV病毒黏附率、HPV的L1衣壳蛋白结合;②宫颈感染HPV细胞生长周期、细胞凋亡率;③MIC₅₀、MIC₉₀。

2.4 数据处理

用SPSS17.0软件统计计量、计数资料。计量资料采用Mean±SD表示。符合正态分布使用t检验,各组之间采用独立样本t检验,非正态则使用非参数检验。计数资料比较采用χ²检验,等级资料采用秩和检验,P<0.05为检验标准。

3 研究结果

3.1 HPV病毒抑制率、黏附率、L1衣壳蛋白结合率

随着莪术油浓度增加,莪术油处理的靶细胞HPV抑制率、L1衣壳蛋白结合率显著提高,峰浓度为100μg/mL。HPV黏附率逐步下降,峰浓度也为100μg/mL。结果如表1所示。

表1 HPV病毒抑制率、黏附率、L1衣壳蛋白结合率

组别	HPV抑制率(%)	HPV黏附率(%)	衣壳蛋白结合率(%)
0μg/mL	0	0	4.2
1μg/mL	0.4	76.9	11.4
5μg/mL	3.5	74.6	16.8
10μg/mL	11.5	66.8	22.6
20μg/mL	32.4	54.3	44.6
40μg/mL	67.5	33.4	65.8
80μg/mL	84.8	22.1	73.5
100μg/mL	88.2	20.4	76.6
120μg/mL	88.2	20.4	76.5

3.2 HPV 感染细胞周期及凋亡情况

苦参碱作用 72h 后, Ect1/E6E7 细胞 G0/G1 期比率上升, S 期和 G2/M 期细胞比率下降, 实验组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明细胞周期被阻滞于 G0/G1 期。Annexin V-AF488/PI 法检测细胞凋亡, 晚期凋亡细胞(右上象限)及早期凋亡细胞(右下象限)率不断增加, 并呈现剂量依赖性, 具体结果如表 2 和图 1 所示。

表 2 苦参碱对 Ect1/E6E7 细胞周期及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	浓度	G0/G1	S	G2/M
对照组	0 $\mu\text{mol/L}$	60.3 $\pm$ 3.2	27.6 $\pm$ 0.8	11.9 $\pm$ 2.5
实验组	2 $\mu\text{mol/L}$	60.6 $\pm$ 2.2	31.1 $\pm$ 2.2	8.3 $\pm$ 0.5
	4 $\mu\text{mol/L}$	72.5 $\pm$ 3.6	21.4 $\pm$ 4.8	6.1 $\pm$ 1.6
	8 $\mu\text{mol/L}$	79.7 $\pm$ 2.8	12.3 $\pm$ 2.9	7.9 $\pm$ 3.3

图 1 不同浓度苦参碱体外作用 48h 对 Ect1/E6E7 细胞凋亡率的影响

3.3 苦参碱抗微生物体外 MIC

苦参碱体外抗菌活性测定显示, 对解脲支原体、人型支原体、淋病奈瑟菌、衣原体的 MIC₅₀ 分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$, MIC₉₀ 分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$, 如表 3 所示。

表 3 苦参碱对抗微生物体外 MIC 情况

组别	MIC 分布	解脲支原体	人型支原体	淋病奈瑟菌	衣原体
苦参碱 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC Range	<0.03–4	<0.03–16	<2–16	<0.06–2
	MIC ₅₀	0.5	0.5	4	0.5
	MIC ₉₀	1	4	8	2

4 讨论

莪术属姜科植物的干燥根茎, 经莪术蒸馏得到的挥发油-莪术油。含有多重抗癌有效成分, 如 β -榄香烯、莪术醇、莪

术酮、吉玛酮等, 部分研究证实其具有一定的抗病毒作用, 同时在体外抑制宫颈癌细胞系 CaSki 和宫颈永生化细胞 H8 增殖^[7]。苦参碱是从苦参、山豆根、苦豆子等槐属植物中提取出来的主要生物碱之一, 苦参性寒、味苦, 具有清热解毒, 利湿退黄, 杀虫、止痒、安神之功效, 现代临床药理研究表明苦参有抗病原体、抗肿瘤、调节免疫、抑制变态反应、镇静、利尿等作用^[8]。另外, 既往研究发现苦参碱能够有效抑制结肠癌和乳腺癌

细胞的侵袭、转移, 同时有效降低癌细胞的黏附能力^[9]。本研究的结果显示, 莪术油具有显著的抑制 HPV 病毒, 抑制 HPV 病毒黏附靶细胞, 随着剂量增加病毒抑制率显著提高, 体外抑制率最高达到 88.2%, 黏附率显著降低, 黏附率低至 20.4%。另

外, 莪术油被证实能与 L1 衣壳蛋白结合, 结合率随着剂量提升显著提高, 结合率最高达到 76.5%。苦参碱溶液与 HPV 感染的靶细胞处理后, 发现苦参碱可显著改变感染细胞的生长周期, 处理 48h 后, G0/G1 期比率上升, S 期和 G2/M 期细胞比率

下降,表明苦参碱可将细胞周期被阻滞于 G0/G1 期。另外,苦参碱溶液处理后,晚期凋亡细胞及早期凋亡细胞率不断增加,并呈现剂量依赖性。体外抗菌实验显示,苦参碱溶液对解脲支原体、人型支原体、淋病奈瑟菌、衣原体的 MIC₅₀ 分别为 0.5μg/mL、0.5μg/mL、4μg/mL、0.5μg/mL, MIC₉₀ 分别为 1μg/mL、4μg/mL、8μg/mL、2μg/mL,说明苦参碱对支原体等非典型病原体有较好的抑制作用。综上,莪术油对 HPV 具有良好的抑制作用,苦参碱对 HPV 感染的细胞,具有抑制细胞周期、促进细胞凋亡的作用,且同时发现苦参碱具有良好的抑制非典型病原体作用。因此,莪术油、苦参碱复方可能成为一种治疗 HPV 感染或宫颈感染的药物。

参考文献

- [1]尹定聪,杨华升.莪术油抗肿瘤作用的研究进展[J].中医药导报,2018,24(3):62-63.
- [2]程熠,郭秋云,于世英,等.苦参碱对人体外培养宫颈癌 HeLa 细

胞增殖的抑制作用[J].医药导报,2019,38(10):1255-1259.

- [3]丁永桢,温嘉泳,赖宝龙,等.咖啡酸抗人乳头瘤病毒感染的研究[J].病毒学报,2018,34(3):287-295.

[4]潘镭镭,郑飞云,诸海燕,等.鸦胆子素 D 对 HPV16 感染细胞株的作用及其可能机制[J].温州医科大学学报,2015,45(2):89-94.

- [5]胡云建,陈东科,陶凤蓉,等.西他沙星的体外抗菌作用研究[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(1):52-58.

[6]王宇,宋淑芳,刘凤.我国宫颈癌流行病学特征和发病高危因素的研究进展[J].中国妇幼保健,2019,34(5):1207-1209.

- [7]张小燕,丁晓萍,叶梅,等.莪术油对人乳头状瘤病毒的抑制作用[J].武警医学,2014,25(1):19-23.

[8]张明发,沈雅琴.苦参碱类生物碱抗病毒的临床药理作用研究进展[J].抗感染药学,2018,15(2):185-191.

- [9]高庆,高美,屈萍,等.氧化苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭转移的抑制作用[J].西安交通大学学报(医学版),2016,37(3):447-450.