

夏枯草酶解水提液分级醇沉及其抗 HSV-1 活性

张群钰¹, 谭红胜^{1,2}, 付文卫¹, 尚宇婧¹, 徐宏喜^{1*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘要: 目的 探究夏枯草酶解水提液分级醇沉部分的成分组成及其抗 HSV-1 活性。方法 利用纤维素酶酶解法选择性提高夏枯草多糖的提取率, 对其酶解水提液进行分级醇沉, 用细胞病变效应 (CPE) 实验对各浓度的乙醇沉淀进行活性测试, 根据细胞试验计算 EC_{50} 。筛选出夏枯草水提液中抗 HSV 活性最优的部分, 采用大孔树脂 D301 对夏枯草酶解水提液分级醇沉中具有抗 HSV-1 活性的部分进行分离纯化, 除去多酚及蛋白质类成分, 得到多糖含量较高的部分, 并测试该部分的抗 HSV 活性。结果 夏枯草粉未经纤维素酶酶解后的水提液分级醇沉沉淀中, 20%、30% 乙醇的沉淀具有良好的抗 HSV-1 活性, 其 ED_{50} 分别为 60.79、42.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40% 乙醇以上的分级沉淀无活性或活性较弱。经大孔树脂 D301 纯化后的夏枯草多糖纯度可达 77.78%, 但其抗 HSV 活性反而丧失。结论 夏枯草多糖含量高低与其抗 HSV 活性强弱并不呈正相关, 可为进一步研究其有效部位及构效关系提供参考。

关键词: 夏枯草; 酶解; 分级醇沉; 抗 HSV-1

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)07-1947-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.07.050

单纯性疱疹是单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 所引起的一种急性疱疹性皮肤病, 此病毒终生感染宿主, 可引起从简单的口腔和外生殖器溃疡到非常严重的肿瘤和脑炎等一系列疾病^[1]。目前临床上的治疗药物以阿昔洛韦等核苷类抗病毒药物为主, 但由于长期大量的使用, 临床已产生耐药病毒株^[2]。因此, 开发具有新型抗病毒作用机制的药物来取代或者辅助洛韦类药物迫在眉睫。

徐宏喜等^[3-5]对 300 多种中药进行了系统的抗病毒筛选, 首次报道夏枯草水提物具有体外抗 HSV-1 活性, 继而夏枯草多糖进行了抗 HSV 活性的导向分离, 获得了分子量分别 3 500 和 8 500 的 2 个多糖组分, 初步化学研究显示为木质素多糖复合物; 用夏枯草提取物制备的凝胶制剂, 体内豚鼠动物模型 (HSV-1) 及小鼠动物模型 (HSV-2) 均有活性, 且无细胞毒性; 进一步研究发现, 夏枯草多糖通过阻止病毒吸附和穿透进入宿主细胞而发挥作用, 作用机制与阿昔洛韦的直接杀灭病毒不同^[6-12]。

目前, 多数文献将夏枯草水提醇沉部分默认为夏枯草多糖, 其分离方法也多以提高多糖纯度为目标。本实验将夏枯草酶解提取液用乙醇梯度沉淀分段, 以抗 HSV 活性为导向, 尝试寻找夏枯草抗 HSV 活性组分, 分析各部分成分组成, 以期为进一步探寻夏枯草抗 HSV 复合多糖构效关系提供研究基础。

1 材料

夏枯草 (批号 2018052102) 购自上海华鹰药业有限公司

司, 经上海中医药大学中药学院生药教研室张红梅副教授鉴定为正品。纤维素酶 (批号 64001136)、D-葡萄糖 (批号 101330576)、没食子酸 (批号 20180710)、考马斯亮蓝 G-250、无水碳酸钠、95% 乙醇、苯酚、浓硫酸、磷酸, 均购自上海国药试剂有限公司; 牛血清蛋白 (批号 Exp2019103) 购自上海泰坦科技股份有限公司; 磷钼钨酸试液 (上海化科实验器材有限公司); 细胞活力检测试剂盒 CCK8 (上海李记生物科技有限公司)。

Vero 非洲绿猴肾细胞购自美国模式培养物集存库, 货号 CCL-81; 10% 胎牛血清 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素 (美国 Hyclone 公司); 2 mM L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、1% 丙酮酸钠、DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司)。

HSV-1 GHSV-UL46 株购自美国模式培养物集存库, 货号 VR-1544。

粉碎机、冷冻干燥机 (Alpha 2-4 LDplus CHRTST); 旋转蒸发器 (RV10DS25 IKA); CP225D 分析天平 (德国 Sartorius 公司); centrifuge 5810R 离心机 (德国 Eppendorf 公司); SK7200HP 超声仪 (上海科导超声仪器有限公司); 紫外分光光度计 (Mapapa P3); 酶标仪 SpectraMax M2e (美国 Molecular Device 公司)。

2 方法与结果

2.1 夏枯草酶解水提物分级醇沉 取夏枯草果穗, 粉碎过 2 号筛, 取 100 g 粉末, 加 5 g 纤维素酶混匀, 加 10 倍水于 50 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 3 h, 迅速升温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 灭活, 加 10 倍水煎煮 2

收稿日期: 2020-07-17

基金项目: 广东省重点领域研发计划资助 (2020B1111110003); 上海中医药大学研究生“研究生创新培养”专项科研项目 (Y201904); 浙江中医药大学省重点建设高校优势特色学科 (中药学) 开放基金资助 (ZYAOXZD2019003)

作者简介: 张群钰 (1989—), 女, 博士生, 从事中药药效评价及新药研发研究。Tel: 18627781540, E-mail: zhqunsh@qq.com

* 通信作者: 徐宏喜 (1961—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药学研究。E-mail: xuhongxi88@gmail.com

次, 每次 1.5 h, 所得滤液合并浓缩后, 依次用 20%、30%、40%、50%、60%、70% 乙醇醇沉, 醇沉液于 4 ℃ 静置 12 h 后, 4 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀冷冻干燥得各分级醇沉部分 (依次为 PVLM-1、PVLM-2、PVLM-3、PVLM-4、PVLM-5、PVLM-6)

2.2 抗 HSV-1 活性测试 CPE (cytopathic effect) 指病毒在宿主细胞内大量增殖, 导致细胞病变甚至死亡的现象, 通过检测细胞活力, CPE 实验被广泛用于化合物对可引起细胞病变的病毒的抑制活性测定^[13]。本研究应用该实验, 采用 Vero 细胞、GHSV-UL 46 病毒株、CCK8 检测试剂、Acyclovir 阳性对照, 化合物处理 5 d/终点法, 检测受试样品对 HSV-1 的体外抑制活性。

将 Vero 细胞以每孔 10 000 个细胞的浓度接入 96 孔细胞培养板中, 并于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中培养过夜。第 2 天分别加入受试样品/阳性对照化合物和病毒 (MOI = 0.02)。细胞培养液中的 DMSO 终浓度为 0.5%。细胞在 37 ℃、5% CO₂ 条件下继续培养 5 d 至病毒对照孔 (细胞感染病毒, 无化合物处理) 内细胞病变率达到 80%~95%。细胞毒性实验与抗病毒实验同时进行测试, 实验条件一致, 但无病毒感染。

使用细胞活力检测试剂 CCK8 检测细胞活力。受试样品的抗病毒活性和细胞毒性分别由受试样品对病毒引起的细胞病变效应的抑制率和细胞活率表示。计算公式如下。

$$\text{抑制率} = \left(\frac{\text{样品值} - \text{病毒对照平均值}}{\text{细胞对照平均值} - \text{病毒对照平均值}} \right) \times 100\%$$

$$\text{细胞活率} = \left(\frac{\text{样品值} - \text{培养基对照平均值}}{\text{细胞对照平均值} - \text{培养基对照平均值}} \right) \times 100\%$$

使用 GraphPad Prism (version 5) 软件对受试样品的抑制率和细胞活率进行非线性拟合分析, 得到受试样品的 EC₅₀ 和 CC₅₀ 值。

结果显示, 受试样品 PVLM-1、PVLM-2、PVLM-6 对 HSV-1 具有抑制活性, EC₅₀ 值分别为 60.79、42.45、101.70 μg/mL; 其他受试样品在测试浓度内没有显示出抗病毒活性, EC₅₀ 值为大于最高检测浓度 >250 μg/mL。

受试样品在测试浓度内对 Vero 细胞没有显示出细胞毒性, CC₅₀ 值为大于最高检测浓度 >250 μg/mL。见表 1。

表 1 夏枯草酶解水提物各梯度乙醇沉淀抗 HSV-1 活性 (μg/mL)

受试样品	EC ₅₀	CC ₅₀
PVLM-1	60.79	>250
PVLM-2	42.45	>250
PVLM-3	>250	>250
PVLM-4	>250	>250
PVLM-5	>250	>250
PVLM-6	101.70	>250
acyclovir	0.87	>100

2.3 成分分析 结果见表 2。

2.3.1 多糖含量测定 采用硫酸-苯酚法^[14], 以葡萄糖为对照品, 在 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标

表 2 夏枯草酶解水提物各梯度乙醇沉淀成分组成 (%)

编号	多糖	蛋白质	多酚	浸膏得率
PVLM-1	55.09	10.26	8.38	6.96
PVLM-2	36.08	11.76	10.66	4.32
PVLM-3	53.32	3.42	3.12	2.41
PVLM-4	33.62	5.05	2.83	0.43
PVLM-5	45.44	6.00	3.21	0.65
PVLM-6	21.68	9.26	6.98	0.66

注: 浸膏得率为质量百分比, 即分级沉淀得到的各组分质量与“2.1”项下夏枯草果穗粉末取样量 (100 g) 的比值。

(A), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程 $A = 24.674X - 0.3462$ ($r = 0.9990$), 在 5.034~50.34 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.2 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝法^[15], 以牛血清蛋白为对照品, 于 595 nm 波长处测定其吸光度。以吸光度为纵坐标 (A), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程 $A = 22.611X - 0.2597$ ($r = 0.9974$), 在 1.687~16.867 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.3 多酚含量测定 采用 Folin-Ciocalteu 法^[16], 以没食子酸为对照品, 在 760 nm 的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标 (A), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程 $A = 10.048X - 0.0098$ ($r = 0.9999$), 在 2.08~20.80 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.4 夏枯草酶解水提液 30% 醇沉部分多糖的纯化及其活性测试

2.4.1 夏枯草抗 HSV 活性部位制备 取夏枯草果穗, 粉碎过筛, 取粉末 100 g, 加 5 g 纤维素酶混匀, 加 10 倍水于 50 ℃ 搅拌 3 h, 迅速升温至 100 ℃ 灭活, 加 10 倍水煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 所得滤液合并浓缩后, 加无水乙醇至醇浓度 30%, 于 4 ℃ 静置 12 h 后, 4 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀冷冻干燥, 即得。

2.4.2 柱色谱前处理 大孔树脂 D301 用 95% 乙醇浸泡 12 h 后湿法装柱, 用 95% 乙醇冲洗层析柱 (体积流量 2 BV/h, BV 为树脂体积数, 下同), 至流出液加 2 倍蒸馏水后不产生浑浊为止, 再用大量蒸馏水洗至流出液澄清, 继续洗脱 2~3 BV; HCl 溶液洗层析柱 (体积流量 4~6 BV/h), 并浸泡 2~3 h, 再用蒸馏水以同样的体积流量洗至中性, 用 2~3 BV 4% NaOH 溶液洗层析柱 (体积流量 4~6 BV/h), 浸泡 2~3 h 后, 再用蒸馏水以同样的体积流量洗至中性。

2.4.3 柱色谱纯化过程 取“2.4.1”项下夏枯草抗 HSV 活性部位适量, 制备成质量浓度为 0.3 mg/mL 的上样液, 以料液-填料 1:50 的比例上样, 首先用蒸馏水作流动相, 5 mL 为一流分, 用自动接收器接收, 每一流分用浓硫酸-5% 苯酚进行显色, 收集显色者, 浓缩, 冻干, 进行含量测定及抗 HSV-1 活性检测。再用 1 mol/L NaCl 溶液作流动相, 以 5 mL 为一流分, 用自动接收器接收, 每一流分用浓硫酸-5% 苯酚进行显色, 收集显色者, 3 kD 超滤离心管离心, 1% AgCl 溶液检测, 去除 NaCl 至无沉淀产生, 冻干, 按

“2.3”项下方法测定多糖、蛋白质、多酚含量,按“2.2”项下方法进行体外抗 HSV-1 活性检测。结果见表3。

表3 夏枯草多糖及其他成分含量、活性测定结果

编号	多糖/%	蛋白质/%	多酚/%	EC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
D301 水	77.78	0.00	0.53	>250
D301 NaCl	66.97	0.00	0.48	>250

3 讨论

纤维素酶解可通过酶水解破碎植物细胞壁的作用,使细胞内多糖物质充分溶出,从而提高药用成分的提取率^[16-17]。纤维素酶水解过程中应注意温度不能过高,酶解后需立即升温灭活。应用CPE试验,对夏枯草酶解水提液各梯度乙醇沉淀进行抗 HSV 活性筛选,发现20%及30%乙醇的沉淀具有良好的抗 HSV-1 活性,其ED₅₀分别为60.79、42.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$,40%乙醇及以上的分级沉淀无活性或有较弱的活性;经大孔树脂D301纯化后的夏枯草多糖,纯度可达77.78%,但其抗 HSV 活性反而丧失。通过对各部分分级醇沉及经大孔树脂D301纯化后的夏枯草多糖进行各类成分分析发现,多糖含量的高低与其抗 HSV 活性强弱并不呈现正相关,反而蛋白质及多酚类成分的去除会消除相应成分的抗 HSV 活性,其构效关系有待进一步探究。

参考文献:

[1] Johnston C, Gottlieb S L, Wald A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus [J]. *Vaccine*, 2016, 34(26): 2948-2952.

[2] 高秋琳,张海萍.阿昔洛韦耐药机制及相关流行病学研究[J].*实用皮肤病学杂志*, 2015, 8(4): 269.

[3] Xu H X, Lee S H S, Song F. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*[J]. *Antiviral Res*, 1999, 44(1): 43-54.

[4] Cheng C L, Xu H X. Antiviral agents from traditional Chinese medicine against herps simplex virus[J]. *J Tradit Med*, 2005, 22(1): 133-137.

[5] Cheng C L, Ng K Y, Xu H X. Recent advances in the discovery of novel anti-herpetic agents from Chinese herbal medicines[J]. *Curr Organic Chem*, 2010, 14(16): 1714-1726.

[6] Xu H X, But P P, Ooi V E, et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*[J]. *Asia Med*, 2000, 11(1): 76-77.

[7] Cheng C, Xu H X. Antiviral and immunomodulatory properties of *Prunella vulgaris*[J]. *Asian J Tradit Med*, 2006(1): 45-48.

[8] Zhang Y, But P P, Ooi V E, et al. Chemical properties, mode of action, and *in vivo* anti-herpes activities of a lignincarbohydrate complex from *Prunella vulgaris*[J]. *Antiviral Res*, 2007, 75(3): 242-249.

[9] 孔思远,吴蓉,蔡双璠,等.夏枯草抗疱疹病毒多糖的提取及纯化工艺研究[J].*世界中医药*, 2016, 11(7): 1145-1149.

[10] Ma F W, Kong S Y, Tan H S, et al. Structural characterization and antiviral effect of a novel polysaccharide PSP-2B from *Prunellae Spica*[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 152: 699-709.

[11] 蔡双璠,杨扬,吴蓉,等.夏枯草多糖及凝胶抗单纯疱疹病毒的药效学研究[J].*世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(2): 247-253.

[12] 姜玲海,冯怡,徐德生,等.夏枯草多糖抗单纯性疱疹病毒及相关免疫活性初步研究[J].*时珍国医国药*, 2007, 18(11): 2622-2623.

[13] 魏伟,吴希美,李元建.药理试验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2010.

[14] 张惟杰.糖复合物生化技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999.

[15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020年版四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.

[16] 王银霞,王宏社.酶在天然产物活性成分提取中的应用[J].*广东化工*, 2020, 47(11): 141; 169.

[17] 金辰光,陈瑞战,谭莉,等.响应面优化复合酶提取夏枯草多糖[J].*长春师范大学学报*, 2016, 35(2): 49-53.