

苎麻叶萃取物体外抗甲型流感病毒(H1N1)和抗氧化活性测定[△]

芮莹^{1*}, 徐庆¹, 韦京辰¹, 高恩怡¹, 龚红菲¹, 唐坤^{2#}(1. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541004; 2. 桂林医学院附属医院药学部, 广西桂林 541001)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1061-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.10

摘要 目的: 研究苎麻叶不同溶剂萃取物对甲型流感病毒(H1N1)的体外抑制作用和抗氧化活性, 以扩大苎麻植物的药用部位并开发天然抗病毒、抗氧化药物。方法: 取苎麻叶以95%乙醇提取, 分别用水加热溶解醇提物浸膏, 再以不同溶剂分别萃取, 制得苎麻叶石油醚相、三氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相萃取物。考察50~400 μg/mL的苎麻叶水相萃取物对犬肾细胞(MDCK)的毒性作用; 以利巴韦林为阳性对照, 采用甲型流感病毒(H1N1)攻击MDCK细胞, 并采用Western blotting法检测相同质量浓度的苎麻叶石油醚相、三氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相萃取物溶液(均为100 μg/mL), 不同质量浓度的苎麻叶水相萃取物溶液(50、100、200、400 μg/mL)以及不同质量浓度的利巴韦林溶液(0.31、0.63、1.25 μg/mL)对病毒感染的细胞中核蛋白(NP)表达水平。以维生素C为阳性对照, 采用羟自由基(\cdot OH)清除试验、DPPH自由基清除试验和还原试验考察各相萃取物的体外抗氧化活性。结果: 苎麻叶水相萃取物质量浓度在400 μg/mL以内时对MDCK细胞无毒性; 苎麻叶石油醚相、三氯甲烷相、乙酸乙酯相、水相萃取物质量浓度在100 μg/mL时均能显著降低甲型流感病毒(H1N1)感染的细胞中NP蛋白表达水平($P < 0.01$); 而不同质量浓度(50~400 μg/mL)的水相萃取物均能显著降低NP蛋白表达水平($P < 0.01$), 且呈一定浓度依赖趋势; 其石油醚相和乙酸乙酯相萃取物的抗氧化活性与维生素C较为接近。结论: 苎麻叶水相萃取物具有较好的体外抗甲型流感病毒(H1N1)作用; 其石油醚相和乙酸乙酯相萃取物表现出较好的体外抗氧化活性。

关键词 苎麻叶; 萃取物; 甲型流感病毒(H1N1); 核蛋白; 抗病毒; 抗氧化

Detection of *in vitro* Inhibitory Effects of *Boehmeria nivea* Leaves Extracts on Influenza A Virus (H1N1) and Its Antioxidant Activity

RUI Ying¹, XU Qing¹, WEI Jingchen¹, GAO Enyi¹, GONG Hongfei¹, TANG Kun²(1. School of Pharmacy, Guilin Medical College, Guangxi Guilin 541004, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi Guilin 541001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the *in vitro* inhibitory effects and antioxidant activity of different solvent extracts of *Boehmeria nivea* leaves against influenza A virus (H1N1), and to expand the medicinal parts of *B. nivea* and develop natural antiviral and antioxidant drugs. METHODS: The leaves of *B. nivea* were extracted with 95% ethanol. The ethanol extract was dissolved by water heating, and extracted with different solvents to obtain petroleum ether phase, trichloromethane phase, ethyl acetate phase, *n*-butanol phase and aqueous phase extracts of *B. nivea* leaves. The toxicity of aqueous extract of *B. nivea* leaves (50-400 μg/mL) on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line was investigated. Using ribavirin as positive control, MDCK cells were attacked by influenza A virus (H1N1). Western blotting assay was used to detect the expression of nucleoproteins (NP) in viral infected cells after treated with same concentrations of petroleum ether phase, trichloromethane phase, ethyl acetate phase, *n*-butanol phase and aqueous phase extracts of *B. nivea* leaves (100 μg/mL), different concentrations of aqueous phase extract solution of *B. nivea* leaves (50, 100, 200, 400 μg/mL) and different concentrations of ribavirin solution (0.31, 0.63, 1.25 μg/mL). Using vitamin C as a positive control, hydroxyl radical (\cdot OH) scavenging test, DPPH radical scavenging test and reduction test were used to investigate *in vitro* antioxidant activity of the extracts. RESULTS: Aqueous phase extract of *B. nivea* leaves with concentration less than 400 μg/mL was nontoxic to MDCK cells. The petroleum ether phase, trichloromethane phase, ethyl acetate phase and aqueous phase extracts at 100 g/mL could significantly reduce the expression of NP protein in influenza A virus (H1N1) infected cells ($P < 0.01$). Different concentrations (50-400 μg/mL) of aqueous extract could significantly reduce the protein expression of NP ($P < 0.01$) in concentration-dependent manner. The *in vitro* antioxidant activity of petroleum ether phase and ethyl acetate phase was similar to that of vitamin C. CONCLUSIONS: *B. nivea* leaves extract have better anti-influenza A virus (H1N1)

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81560574); 桂林市科学研究与技术开发计划项目(No.20130120-2)

* 硕士研究生。研究方向: 抗病毒、抗肿瘤药理学。电话: 0773-5891078。E-mail: 2914984285@qq.com

通信作者: 副主任药师。研究方向: 临床药理学。电话: 0773-2824560。E-mail: tangkun9898@163.com

effects *in vitro*, and the extracts of petroleum ether phase and ethyl acetate phase show good antioxidant activity *in vitro*.

KEYWORDS *Boehmeria nivea* leaves; Extract; Influenza A virus (H1N1); Nucleoproteins; Antiviral; Antioxidant

苈麻[*Boehmeria nivea*(Linn.)Gaudich.]是荨麻科苈麻属灌木植物,别称野麻、青麻等,其在我国的产量占世界总产量的90%以上^[1]。苈麻的茎和皮是重要的纺织原料,根则是传统中药^[2]。李时珍在《本草纲目》中对苈麻根的药用功能有着详细记载,认为其具有解毒、清热、止血等功效。因苈麻根中含有黄酮及类黄酮、芸香苷、绿原酸、超氧化物歧化酶(SOD)和多酚等活性成分^[1],故具有抗病毒^[3]、抗菌^[4]、抗氧化^[5]、抗炎^[6]、抗肿瘤^[2]等作用。苈麻叶占植株总重约40%,但却常作为废弃物不用,造成了其植物药用资源的浪费^[1]。为探索苈麻叶是否与苈麻根同样具有广泛的药理活性,本课题组前期研究证实,苈麻叶提取物具有抗乙型肝炎病毒(HBV)的作用,在体外可明显抑制乙肝表面抗原、e抗原的表达并降低HBV的DNA表达水平^[7]。甲型流感病毒(H1N1)近年在全球的蔓延对人类健康造成了极大危害^[8],其高遗传变异性导致宿主对抗病毒药物具有耐药性^[9],使得疫苗的防治效果较差。核蛋白(NP)是病毒基因与宿主细胞蛋白相互作用过程中的重要蛋白,可作为诊断病毒的理想靶蛋白^[10]。因此,本课题组通过考察苈麻叶不同溶剂萃取物对甲型流感病毒(H1N1)的NP蛋白水平表达的影响,进而判断其对该病毒的体外抑制作用。此外,机体代谢会产生自由基,易对机体造成伤害并诱发慢性疾病,如糖尿病、衰老和肿瘤等^[11],因此寻找天然、安全的抗氧化剂变得越来越重要。已有研究发现,苈麻根粗提取物具有清除自由基、抗脂质过氧化等多种生理作用^[12]。因此,本课题组采用经典体外抗氧化试验考察苈麻叶不同溶剂萃取物的抗氧化活性。本研究旨在扩大苈麻植物的药用部位,以期开发出高效安全、副作用小的天然抗病毒、抗氧化药物提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

N2300-2E型CO₂培养箱(美国Shel Lab公司);EX40型倒置显微镜(日本Olympus公司);TDL-5型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);YP202型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);YJ-875型医用净化工作台(苏州净化设备厂);SY11-Ni型电热恒温水浴锅(北京长源实验设备厂);RE-52CS型旋转蒸发仪、RE-52CS型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);JS-780型全自动凝胶成像分析仪(上海迪奥生物科技有限公司);SHZ-D(III)型循环水式真空泵(郑州中天实验仪器有限公司);ELx800型酶联免疫检测仪(美国BioTek公司);电泳系统(美国Bio-Rad公司);AFZ-4001-UT型超纯化水器(美国Aquapro公司)。

1.2 药品与试剂

利巴韦林原料药(广东肇庆鼎湖药业有限公司,批号:20111023,纯度:99%);维生素C原料药(北京索莱宝科技有限公司,批号:20160403,纯度:≥99.0%);二苯代苦味酰基自由基[DPPH,梯希爱(上海)化工工业发展

有限公司,批号:20160407];DMEM高糖培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(杭州四季青工程材料有限公司);双抗(美国Invitrogen公司,批号:15070079);二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶(美国Sigma公司);鼠抗NP单克隆抗体(北京安诺伦生物科技有限公司);GAPDH抗体(南宁市蓝光生物科技有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京康为世纪有限公司);5×SDS-loading buffer、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS裂解液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);ECL发光试剂盒(美国Pierce Protein Biology公司);PVDF膜(美国Millipore公司);苯甲酰磺酰氟(PMSF,上海Sigma公司);其余试剂均为分析纯(上海实验试剂有限公司),水为超纯水。

1.3 药材

苈麻叶采于广西桂林市灵川县定江乡,经中国科学院广西植物研究所黄定忠工程师鉴定为荨麻科苈麻属植物苈麻[*Boehmeria nivea*(Linn.)Gaudich.]的叶。

1.4 病毒株与细胞株

甲型流感病毒A/PR/8/34(H1N1)病毒株由武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室提供;犬肾细胞(MDCK)为广州医学院呼吸道疾病研究所提供、本实验室冻存保种。

2 方法

2.1 苈麻叶不同溶剂萃取物的制备

取苈麻叶3.5 kg,置于圆底烧瓶中,加95%乙醇浸没,70℃水浴加热回流萃取3次,合并萃取液,旋转蒸发浓缩制得乙醇提取物浸膏(120 g)。将该浸膏以水加热溶解,分别用等体积的石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,合并各自的萃取液,并保留最后的水相。各相萃取液进行旋转蒸发浓缩,分别得到石油醚相(13.5 g)、三氯甲烷相(17.5 g)、乙酸乙酯相(12.5 g)、正丁醇相(37.5 g)及水相(17.0 g)的萃取物浸膏。

2.2 苈麻叶不同溶剂萃取物体外抗甲型流感病毒(H1N1)的作用考察

2.2.1 各相萃取物溶液的制备 取“2.1”项下各相萃取物浸膏适量,分别加入DMSO 100 μL溶解,制成质量浓度均为5 mg/mL的母液(以浸膏计),经0.22 μm微孔滤膜滤过,于4℃保存、备用。后续按试验要求以含双抗的DMEM培养基稀释至适当浓度使用。

2.2.2 阳性药物溶液的制备 精密称取利巴韦林原料药0.50 g,用含2%胎牛血清的DMEM培养基制成10 mg/mL的溶液,经0.22 μm微孔滤膜滤过,除菌,分装后备用。后续按试验要求以含双抗的DMEM培养基稀释至适当浓度使用。

2.2.3 药物对MDCK细胞的毒性考察 参照文献[13]方法改良后进行试验。将MDCK细胞用胰蛋白酶消化后,以1×10⁵个/mL的密度接种于96孔细胞培养板,每孔0.1 mL,于37℃、5%CO₂培养箱中(以下培养条件相同)培养。待细胞长成单层后,吸弃培养基,加入不同质量

浓度的苎麻叶水相萃取物[0(空白)、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$]或利巴韦林溶液(25 $\mu\text{g/mL}$),每孔0.1 mL,各组均设置4个复孔。培养细胞并每日观察其形态,连续4 d。当细胞出现破碎、固缩、脱落等病变现象者判断为有毒性,终止试验。按以下标准划分细胞的病变程度:细胞生长正常、无病变发生(-);病变细胞约占整个单层细胞的比例 $\leq 20\%$ (+);病变细胞约占整个单层细胞的比例 $> 20\% \sim 50\%$ (++);病变细胞约占整个单层细胞的比例 $> 50\%$ (+++)。以细胞不出现病变的最小稀释度为该药物对细胞的无毒界限。

2.2.4 苎麻叶各相萃取物抗甲型流感病毒(H1N1)作用考察 参照文献[14]方法改良后进行试验。将MDCK细胞用胰蛋白酶消化后,以 5×10^5 个/mL的密度接种于6孔培养板,每孔2 mL,进行培养。待细胞贴壁后,分别加入相同质量浓度的苎麻叶石油醚相、三氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相萃取物溶液(均为100 $\mu\text{g/mL}$),不同质量浓度的苎麻叶水相萃取物溶液(50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)以及不同质量浓度的利巴韦林溶液(0.31、0.63、1.25 $\mu\text{g/mL}$),每孔2 mL,培养2 h;弃去上清,加入100倍半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)的甲型流感病毒(H1N1)悬液2 mL攻击细胞2 h后,弃去上清,加入含双抗的DMEM培养基;另均设Mock组(细胞+含双抗的DMEM培养基,不进行病毒攻击或药物处理)和NC组(细胞+含双抗的DMEM培养基,进行病毒攻击,但不作药物处理)作为对照,每组均设4个复孔。

采用Western blotting法检测细胞中NP蛋白表达水平。各组细胞培养24 h后,弃去培养基,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.6)洗2次,加入适量冰上预冷的SDS裂解液与PMSF混合物(100:1),冰上裂解30 min;轻轻刮取细胞并收集至EP管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 $12\ 000 \times g$ 离心5 min;吸弃上清,加入 $5 \times \text{SDS-loading buffer}$,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min进行蛋白变性,BCA法测定蛋白浓度。所得蛋白以80 V电泳分离,待其进入分离胶后升电压至120 V继续电泳,采用湿转法转移至PVDF膜上,然后于室温下在含5%脱脂奶粉的TBST溶液中摇床封闭1 h;弃去封闭液,TBST溶液清洗5 min $\times 5$ 次,将PVDF膜放入鼠抗NP单克隆抗体稀释液(1:1 000)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST清洗5 min $\times 5$ 次,放入二抗稀释液(1:5 000)中,室温孵育1 h。采用ECL发光试剂显色,采用发光图像分析器检测荧光强弱。以Image J 1.46r软件对蛋白条带进行图像分析,以GADPH为内参计算相对灰度值,用来表示蛋白表达水平。

2.3 苎麻叶各相萃取物体外抗氧化活性的测定

2.3.1 对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力 参照文献[15]的方法改良后进行试验。取“2.1”项下苎麻叶各相萃取物浸膏,加70%乙醇制成0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0 mg/mL(以生药量计)的供试溶液;同法配制等质量浓度梯度的维生素C阳性对照溶液。在EP反应管中加入6 mmol/L水杨酸乙醇溶液50 μL 、6 mmol/L FeSO_4

溶液(新制)50 μL ,再分别加入上述各相萃取物供试溶液或阳性对照溶液50 μL ,最后加入6 mmol/L H_2O_2 溶液50 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min。反应完毕后,4 000 r/min离心3 min,取上清液,在510 nm波长处测定吸光度(A_1)。同时设空白对照,以水50 μL 代替 FeSO_4 溶液同法操作,测定吸光度(A_2)。以70%乙醇作为参比溶液,测定吸光度(A_0)。按公式计算 $\cdot\text{OH}$ 的清除率(P): $P(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)]/A_0 \times 100\%$ 。

2.3.2 对DPPH自由基的清除能力 参照文献[16]的方法改良后进行试验。取“2.1”项下苎麻叶各相萃取物浸膏,加70%乙醇制成0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL(以生药量计)的供试溶液;同法配制等质量浓度梯度的维生素C阳性对照溶液。在EP反应管中分别加入上述各相萃取物供试溶液或阳性对照溶液100 μL 、0.2 mmol/L DPPH溶液100 μL ,摇匀,室温下置于黑暗处反应30 min。以70%乙醇为参比溶液,在517 nm波长处测定各供试品溶液反应后的吸光度(A_1);以70%乙醇100 μL 代替DPPH溶液,同法反应后在517 nm波长处测定吸光度(A_2);以0.2 mmol/L DPPH溶液100 μL 代替供试溶液,同法反应后在517 nm波长处测定吸光度(A_0)。按公式计算DPPH自由基的清除率(K): $K(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$ 。

2.3.3 还原能力 参照文献[17]的方法改良后进行试验。取“2.1”项下苎麻叶各相萃取物浸膏,加70%乙醇制成0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL(以生药量计)的供试溶液;同法配制等质量浓度梯度的维生素C阳性对照溶液。在EP反应管中分别加入上述各相萃取物供试溶液或阳性对照溶液0.5 mL、PBS 2.5 mL、1%铁氰化钾溶液2.5 mL,于50 $^{\circ}\text{C}$ 反应20 min后,加入10%三氯乙酸溶液2.5 mL。3 000 r/min离心10 min,取上清液2.5 mL,加入水2.5 mL、0.1%氯化铁溶液1 mL,混匀后反应10 min。在700 nm波长处测定吸光度,吸光度越高,则表明药物还原能力越强。

2.4 统计学方法

以上试验均重复3次。采用GraphPad Prism 5统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 苎麻叶各相萃取物的体外抗甲型流感病毒(H1N1)作用

3.1.1 药物对MDCK细胞的毒性 当苎麻叶水相萃取物质量浓度为0~400 $\mu\text{g/mL}$ 时,均未对MDCK细胞产生毒性;阳性药物利巴韦林质量浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 时对MDCK细胞也无毒性。苎麻叶水相萃取物和利巴韦林对MDCK细胞的毒性作用见表1。

3.1.2 苎麻叶各相萃取物的抗甲型流感病毒(H1N1)作用 在相同质量浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)时,与苎麻叶其他各相萃取物比较,甲型流感病毒(H1N1)感染的MDCK细胞经水相萃取物处理后NP蛋白表达水平显著降低,差

表1 苕麻叶水相萃取物和利巴韦林对MDCK细胞的毒性作用

Tab 1 Toxic effects of aqueous extract of *B. nivea* leaves and ribavirine on MDCK cells

细胞	苕麻叶水相萃取物					利巴韦林
	0 μg/mL(空白)	500 μg/mL	100 μg/mL	200 μg/mL	400 μg/mL	
MDCK	-	-	-	-	-	-

异有统计学意义($P < 0.01$),表明水相萃取物对该病毒有较好的抑制作用。进一步考察该萃取物不同质量浓度(0~400 μg/mL)的作用时显示,随着质量浓度的增加,甲型流感病毒(H1N1)感染的MDCK细胞中NP蛋白表达水平呈降低趋势,且50~400 μg/mL作用后NP蛋白水平较0 μg/mL时显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。利巴韦林不同质量浓度(0.31、0.63、1.25 μg/mL)对甲型流感病毒(H1N1)均有明显的抑制作用。不同药物处理后各组细胞中NP蛋白表达电泳图见图1,蛋白表达水平见图2。

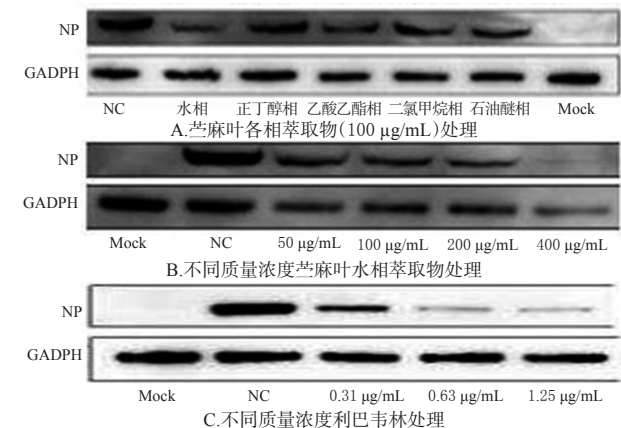


图1 不同药物处理后各组细胞中NP蛋白表达电泳图

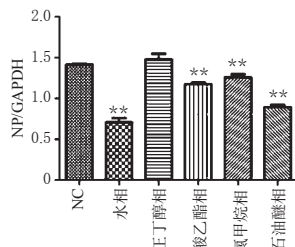
Tab 1 Electrophorograms of protein expression of NP in cells after treated with different medicines

表2 苕麻叶各相萃取物对·OH的清除率($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

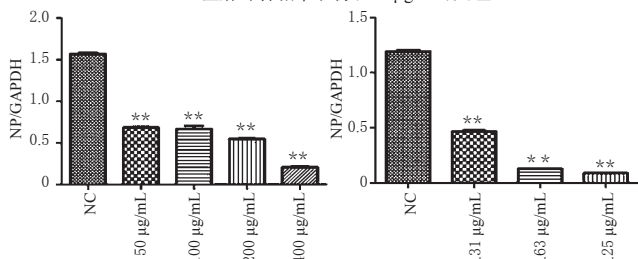
Tab 2 Scavenging rate of ·OH by *B. nivea* leaves extracts($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	药物质量浓度								
	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	1.5 mg/mL	2.0 mg/mL	2.5 mg/mL	3.0 mg/mL	4.0 mg/mL	5.0 mg/mL	
苕麻叶石油醚相组	14.1±0.2	25.4±0.7	34.3±0.7	47.9±0.1	57.6±2.2	64.0±1.0	70.6±0.4	82.2±0.6	
苕麻叶三氯甲烷组	1.6±0.4	2.9±0.6	4.5±0.1	5.3±0.8	6.8±1.5	7.5±0.8	9.5±0.2	17.6±0.5	
苕麻叶乙酸乙酯相组	1.9±0.7	6.8±0.8	7.9±0.5	9.3±0.4	9.9±0.4	10.5±0.3	12.4±0.7	13.4±1.0	
苕麻叶正丁醇相组	4.3±0.5	5.0±0.6	5.9±0.4	6.8±1.0	8.1±0.6	10.4±0.8	11.2±0.6	15.3±2.2	
苕麻叶水相组	5.4±0.6	4.9±1.9	9.8±1.8	11.2±0.5	14.1±0.7	14.7±0.8	19.1±1.0	23.3±1.6	
阳性对照组(维生素C)	19.6±5.2	28.3±2.2	37.6±4.9	59.9±4.3	68.5±2.5	75.1±4.2	86.4±2.2	94.8±0.6	

3.2.2 对DPPH的清除能力 苕麻叶各相萃取物对DPPH的清除率测定结果见表3。由表3可知,苕麻叶各相萃取物对DPPH自由基均有一定的清除效果,但彼此之间差异较大。其中苕麻叶乙酸乙酯相萃取物质量浓度在0.15 mg/mL以上时,对DPPH自由基的清除率与维生素C较为接近,且高于其余各相萃取物;石油醚相萃取物对DPPH自由基的清除率远低于其余各相萃取物;当质量浓度为0.25 mg/mL时,石油醚相、三氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相萃取物和维生素C对DPPH的



A.苕麻叶各相萃取物(100 μg/mL)处理



B.不同质量浓度苕麻叶水相萃取物处理 C.不同质量浓度利巴韦林处理

注:与NC组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. NC group, ** $P < 0.01$

图2 不同药物处理后各组细胞中NP蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 2 Protein expression levels of NP in cells of each group after treated with different medicines ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 苕麻叶各相萃取物的体外抗氧化作用

3.2.1 对·OH的清除能力 苕麻叶各相萃取物对·OH的清除率测定结果见表2。由表2可知,苕麻叶各相萃取物对·OH自由基的清除率随着药物质量浓度的增加而升高,但不同溶剂萃取物的·OH清除率存在较大差异,其中以苕麻叶石油醚萃取物为最高。当苕麻叶石油醚萃取物质量浓度为5.0 mg/mL时,其对·OH的清除率高达82.2%,与维生素C接近。其余各相萃取物对·OH的清除能力相对较弱,清除率均在25%以下。

清除率分别为41.47%、67.30%、93.87%、82.33%、74.79%、96.82%。

3.2.3 苕麻叶各相萃取物的还原能力 苕麻叶各相萃取物的还原能力测定结果见表4。由表4可知,苕麻叶各相萃取物的还原能力均随药物质量浓度的增加而增强,其中乙酸乙酯相萃取物还原能力明显强于其余各相萃取物,并与维生素C最为接近。其还原能力排序为:维生素C>乙酸乙酯相萃取物>正丁醇相萃取物>三氯甲烷相萃取物>石油醚相萃取物>水相萃取物。

表3 苕麻叶各相萃取物对DPPH的清除率($\bar{x} \pm s$, $n=3, \%$)

Tab 3 Scavenging rate of DPPH by *B. nivea* leaves extracts($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	药物质量浓度				
	0.05 mg/mL	0.10 mg/mL	0.15 mg/mL	0.20 mg/mL	0.25 mg/mL
苕麻叶石油醚相组	6.69±0.11	15.97±0.21	24.63±0.12	34.75±0.22	41.47±0.64
苕麻叶三氯甲烷相组	15.50±0.85	34.50±1.14	46.30±0.91	59.10±0.85	67.30±0.86
苕麻叶乙酸乙酯相组	42.30±0.50	68.90±0.30	87.63±0.45	92.70±0.10	93.87±0.06
苕麻叶正丁醇相组	49.63±0.32	55.73±0.12	73.03±0.21	80.00±0.00	82.33±0.25
苕麻叶水相组	64.66±1.54	67.84±1.27	73.50±0.36	73.38±0.89	74.79±1.14
阳性对照组(维生素C)	87.70±2.23	90.52±1.88	97.19±0.28	97.00±0.70	96.82±0.56

表4 苕麻叶各相萃取物的还原能力($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Reducing ability of *B. nivea* leaves extracts($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物质量浓度				
	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	1.5 mg/mL	2.0 mg/mL	2.5 mg/mL
苕麻叶石油醚相组	0.176±0.015	0.211±0.012	0.258±0.010	0.458±0.008	0.496±0.009
苕麻叶三氯甲烷相组	0.158±0.011	0.325±0.011	0.439±0.005	0.497±0.028	0.547±0.063
苕麻叶乙酸乙酯相组	0.361±0.014	0.625±0.073	0.773±0.030	1.326±0.251	1.533±0.004
苕麻叶正丁醇相组	0.255±0.008	0.421±0.008	0.537±0.015	0.547±0.016	0.661±0.069
苕麻叶水相组	0.114±0.002	0.183±0.012	0.250±0.002	0.319±0.002	0.383±0.008
阳性对照组(维生素C)	0.873±0.024	1.291±0.061	2.285±0.107	2.451±0.018	2.471±0.006

4 讨论

苕麻目前主要作为原料用于纺织工业,其茎皮是优良的纺织原料,而苕麻叶作为工业废弃品被丢弃,这不仅浪费了资源,对环境也造成了污染,因此有必要对苕麻叶进行更深入的开发利用。除了本课题组曾证实苕麻叶具有体外抗HBV的作用外^[7],目前对苕麻叶相关药理活性的研究开展较少。

甲型流感病毒基因组为8个节段的单股负链RNA,可分别编码不同的蛋白,其中流感病毒NP蛋白由第5节段编码,是流感病毒的主要结构蛋白^[18]。NP蛋白参与病毒RNA复制和转录,也是病毒基因与宿主细胞蛋白相互作用过程中的重要蛋白;而且其抗原性稳定,不会发生抗原漂移,可作为诊断甲型流感病毒的理想靶蛋白^[10]。本研究结果显示,以100 μg/mL的苕麻叶各相萃取物处理甲型流感病毒(H1N1)感染的MDCK细胞后,水相萃取物组细胞中NP蛋白表达水平最低,说明其对该病毒的体外抑制作用最好,效果与阳性药利巴韦林接近。细胞毒性试验考察结果显示,质量浓度升高至400 μg/mL时,苕麻叶水相萃取物仍未对MDCK细胞产生毒性作用,表明其对MDCK细胞毒性较弱,具有开发为药物的潜力;且随着质量浓度的增加(50~400 μg/mL),病毒感染的细胞中NP蛋白表达水平呈下降趋势,提示水相萃取物对甲型流感病毒(H1N1)的体外抑制作用较好且呈一定的剂量依赖趋势。

机体在生命活动过程中产生的羟基自由基是导致有机大分子如DNA、蛋白质、脂质等氧化损伤的主要原因,且已有研究表明机体内自由基积累过多与癌症、动脉粥样硬化及其他心血管疾病的发生、发展密切相关,而

抗氧化剂可有效清除自由基,对抗上述病理变化过程^[19]。

·OH是活性氧中最活泼、毒性最大的自由基之一,对机体内各种生物大分子如糖类、核酸、脂质及氨基酸等均可产生损害,因而清除·OH对于活细胞体系而言相当重要^[12]。DPPH自由基在有机溶剂中稳定且在517 nm波长处有强吸收峰^[20],因此可通过自由基清除剂加入后吸光度值的降低程度来评价药物对DPPH自由基的清除效果,并以此来评价其抗氧化能力。在还原反应中,铁氰化钾中的Fe³⁺被抗氧化试剂还原为Fe²⁺,在700 nm波长处的吸光度值越高,则药物的还原能力越强,即表示其抗氧化能力越强^[20]。本研究结果显示,在苕麻叶各相萃取物中,以石油醚相萃取物对·OH的清除能力最强,乙酸乙酯相萃取物对DPPH自由基的清除能力及还原能力最强。

中药的物质基础是各种活性成分,其作用靶点多,表现出多重效应,因此苕麻叶萃取物的抗病毒及抗氧化活性是由不同有效功能组分组合作用的结果。但目前尚未分离鉴定出具体的有效成分,尚需进一步对苕麻叶萃取物进行分离、纯化及结构鉴定,以获得明确的活性单体成分,并进一步通过体内实验探索其抗病毒及抗氧化的药效作用及机制,以期将苕麻叶开发为治疗甲型流感病毒(H1N1)感染的候选药物和天然抗氧化剂。

参考文献

- [1] 廖丽萍,肖爱平,冷鹃,等.苕麻根、叶化学成分及药用研究概况[J].中国麻业科学,2013(3):163-166.
- [2] 陈保锋,陈建华,母波,等.苕麻药用研究进展[J].中国麻业科学,2016(5):237-241.
- [3] HUANG KL, LAI YK, LIN CC, et al. Involvement of GRP78 in inhibition of HBV secretion by *Boehmeria nivea* extract in human HepG2.2.15 cells[J]. *J Viral Hepatitis*, 2009, 16(5):367-375.
- [4] 闵勇,张薇,王洪.水苕麻叶挥发性成分分析及其抗菌活性研究[J].食品工业科技,2011,32(7):86-88.
- [5] 张贤,陈悟,周文聪,等.苕麻根抗氧化活性部位研究[J].时珍国医国药,2011,22(4):896-898.
- [6] 张宏琦,邹冲,汪笠植,等.苕麻叶抗炎活性部位研究[J].中国民族医药杂志,2009,15(4):37-39.
- [7] WEI J, LIN L, SU X, et al. Anti-hepatitis B virus activity of *Boehmeria nivea* leaf extracts in human HepG2.2.15 cells[J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(1):147-151.
- [8] ZHANG WQ, SONG SX, WANG TZ. Advances in the structure and function of pandemic A/H1N1/2009 influenza virus HA protein[J]. *Chin J Virol*, 2012, 28(4):444-452.
- [9] SEO YJ, PRITZL CJ, VIJAYAN M, et al. Sphingosine kinase 1 serves as a pro-viral factor by regulating viral RNA synthesis and nuclear export of viral ribonucleoprotein complex upon influenza virus infection[J]. *PLoS One*, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0075005.
- [10] PROKUDINA EN, SEMENOVA N, CHUMAKOV V, et al. An antigenic epitope of influenza virus nucleoprotein

川芎饮片的HPLC指纹图谱建立、聚类分析及偏最小二乘判别分析^Δ

石海培^{1*}, 包贝华¹, 黄胜良², 汪国强², 左武朋², 严辉^{1,3}, 张丽^{1,3#}(1.南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2.江苏融煜药业有限公司, 江苏淮安 223001; 3.江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 南京 210023)

中图分类号 R931.5; R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1066-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.11

摘要 目的:建立川芎饮片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行聚类分析和偏最小二乘判别(PLS-DA)分析。方法:采用HPLC法,色谱柱为Waters Symmetry C₁₈,流动相为乙腈-0.5%醋酸水溶液(梯度洗脱),流速为1 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以藁本内酯为参照,绘制21批样品(S1~S21)的HPLC图谱;采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 A版)进行相似度评价,确定共有峰;采用SPSS 19.0软件进行聚类分析,并结合PLS-DA分析区分样品。结果:21批样品的HPLC图谱有25个共有峰,并指认了其中9个共有峰;相似度为0.769~0.989,其中基地、传统药用部位样品(S1~S10)相似度均大于0.970。21批样品可聚为3类,S1~S10聚为一类,S15~S16、S19~S20聚为一类,其余聚为一类。PLS-DA分析确定了11个分类标志物,并指认了阿魏酸、阿魏酸松柏酯、正丁基苯酚、藁本内酯、洋川芎内酯A等5个色谱峰,这5个色谱峰可有效区分非市售、基地样品(S1~S10)与市售、非基地样品(S11~S21),与聚类分析结果一致。结论:所建指纹图谱、聚类分析及PLS-DA分析结果可为川芎饮片的质量评价提供参考。

关键词 川芎; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析; 偏最小二乘判别分析

Establishment of HPLC Fingerprint, Cluster Analysis and PLS-DA of *Ligusticum chuanxiong* Decoction Pieces

SHI Haipei¹, BAO Beihua¹, HUANG Shengliang², WANG Guoqiang², ZUO Wupeng², YAN Hui^{1,3}, ZHANG Li^{1,3}
(1. School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China. 2. Jiangsu Rongyu Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Huai'an 223001, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China)

- (NP) associated with polymeric forms of NP[J]. *Virology*, 2008. DOI:10.1186/1743-422X-5-37.
- [11] ROVITO HA, OBLONG JE. Nicotinamide preferentially protects glycolysis in dermal fibroblasts under oxidative stress conditions[J]. *Br J Dermatol*, 2013. DOI: 10.1111/bjd.12365.
- [12] LIN CC, YEN MH, LO TS, et al. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activity of *Boehmeria nivea*, var. *nivea*, and *B. nivea*, var. *tenacissima*[J]. *J Ethnopharmacol*, 1998, 60(1): 9-17.
- [13] 关文达, 杨子峰, 刘妮, 等. 白藜芦醇对多种呼吸道病毒作用体外实验研究[J]. *中药材*, 2008, 31(9): 1388-1390.
- [14] NENCIONI L, DE CG, SGARBANTI R, et al. Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus: impact on virally induced apoptosis and viral replication[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(23): 16004-16015.
- [15] 张贤. 苎麻根黄酮类成分分离纯化及抗氧化活性研究[D]. 武汉: 武汉纺织大学, 2011.
- [16] 贺波. 苎麻叶黄酮的提取、分离纯化、结构及抗氧化活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [17] CHEN R, LIU Z, ZHAO J, et al. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 434-440.
- [18] BOULO S, AKARSU H, RUIGROK RW, et al. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes[J]. *Virus Res*, 2007, 124(1/2): 12-21.
- [19] 许本善, 雷宁, 吕亚丽, 等. 雪灵芝醇提物不同极性萃取部分的体外抗氧化活性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(2): 61-64.
- [20] 张彦, 郭增军, 张寒, 等. 八种植物挥发油的抗氧化活性比较研究[J]. *中国食品添加剂*, 2017(8): 49-54.

Δ 基金项目: 国家中药标准化项目(No.ZYBZH-C-JS-34); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(No.CARS-21)

* 硕士研究生。研究方向: 中药炮制与质量控制。电话: 025-85811519。E-mail: 1161059084@qq.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药炮制与质量控制。电话: 025-85811519。E-mail: zhangli@njucm.edu.cn

(收稿日期: 2018-03-01 修回日期: 2019-03-03)

(编辑: 段思怡)