

琼枝麒麟菜多糖抗呼吸道病毒活性研究

邹沐平^{1,2}, 董 栋¹, 王怀玲¹, 王巧利¹, 蒲含林², 王一飞¹

(1. 暨南大学 生命科学技术学院 生物医药研究开发基地, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学 生命科学技术学院 生物工程研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 为了评价琼枝麒麟菜多糖(EGP)包括粗提物(CEGP)及大于 500 kDa 多糖组分(LEGP)抗呼吸道相关病毒活性。采用 Reed-muench 法计算流感病毒 H1N1、H3N2 和 H5N3, 柯萨奇病毒 CVB3 及呼吸道合胞病毒 RSV-long 株滴度; 采用观察细胞病变效应(CPE)法, 确定 CEGP 和 LEGP 对犬肾细胞(MDCK), 人宫颈癌细胞(HeLa)和人喉癌上皮细胞(HEp-2)的最大无毒浓度; 通过细胞病变观察法(CPE)及四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)测定 CEGP 和 LEGP 抑制各病毒产生细胞病变的作用。结果表明: CEGP 和 LEGP 对 5 种常见的呼吸道病毒 H1N1、H3N2 和 H5N3, CVB3 和 RSV 都有抑制作用, CVB3 和 RSV 对 CEGP 和 LEGP 更敏感; CEGP 和 LEGP 有抗多种呼吸道病毒作用, 为抗呼吸道病毒新药的研发提供理论依据。

关键词: 琼枝麒麟菜多糖; 抗病毒; 呼吸道病毒

中图分类号: Q 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)12-0015-06

doi: 10.11759/hyxx20141128001

呼吸道病毒是一类能侵犯呼吸道或以呼吸道为侵入门户而引起呼吸道及呼吸道外组织器官病变的病毒^[1]。呼吸道病毒包括流感病毒(H1N1, H3N2, H5N3 等)、呼吸道合胞病毒(RSV)和科萨奇病毒(CVB3)等。流感病毒传染性极强且极易变异, 危害性大, 难以控制^[2], 目前广泛使用的抗流感病毒的西药具有一定的毒副作用, 并可引起流感病毒变异, 或产生不同程度的耐药性^[3]。柯萨奇病毒 CVB3 是非常严重的致病病原^[4-5], 目前尚无有效药物^[6]。呼吸道合胞病毒 RSV 可引起婴幼儿严重呼吸道感染, 目前只有病毒唑和 RSV 免疫球蛋白 2 种药物。但病毒唑不良反应较严重, RSV 免疫球蛋白治疗费用很高。综上, 呼吸道病毒对人类危害大, 人类尚无法阻止这些病毒感染或进行有效治疗, 因此, 开发研制药效可靠, 毒副作用小的新药, 仍然是国际新药研发的重要任务。

近年来对海洋资源的开发成为热点, 目前国内对外对海洋生物活性物质的研究都取得一定进展。许多从海洋生物中提取的天然产物具有抗肿瘤, 抗凝血, 抗病毒^[7-8]等的生物活性。从海洋生物中提取的多糖, 尤其是从海藻中提取的硫酸酯多糖, 不仅能提高机体免疫力, 而且具有广泛的抗病毒作用^[9]。

琼枝麒麟菜(*Eucheuma gelatinae*)属于红藻门, 麒麟菜属, 在我国海南岛有大规模的人工养殖, 资

源十分丰富^[10]。麒麟菜中含有丰富的多糖, 约占藻体干重的 60%。迄今为止, 人们对琼枝麒麟菜在抗病毒等生物活性方面的研究较少。本文对琼枝麒麟菜多糖粗提物(CEGP)及大于 500 kDa 多糖组分(LEGP)抗呼吸道相关病毒活性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒

流感病毒 H1N1、H3N2 和 H5N3, 呼吸道合胞病毒 RSV-long 株和柯萨奇病毒 CVB3 均为本实验室保存。

1.1.2 细胞

犬肾细胞(MDCK), 人宫颈癌细胞(HeLa)和人喉癌上皮细胞(HEp-2), 均为本实验室保存。

1.1.3 药物

参考王怀玲等^[11]多糖提取工艺, 通过水提醇沉

收稿日期: 2014-11-28; 修回日期: 2015-06-05

基金项目: 广东省海洋渔业科技推广专项科技攻关与研发(A201301C06)资助

作者简介: 邹沐平(1990), 女, 广东揭阳人, 硕士研究生; 研究方向: 海洋药物, 电话: 15002004602, E-mail: zoumuping@163.com; 王一飞, 通信作者, 教授, 研究方向: 生物医药, 电话: 020-85223426, E-mail: twangyf@jnu.edu.cn; 蒲含林, 通信作者, 男, 副研究员, 研究方向: 天然产物纯化、合成及活性研究, 电话: 13560136797, E-mail: tphl@jnu.edu.cn

法得到琼脂麒麟菜粗多糖(CEGP), 并通过膜分离技术从琼枝麒麟菜粗多糖中分离出大于 500 kDa 的多糖组分(LEGP)。所有样品均没有检测出核酸及蛋白质等杂质。

1.1.4 试剂与器材

胎牛血清, 杭州四季青生物材料工程有限公司; 二甲基亚砜, 广州化学试剂厂; DMEM 培养基, Gibco 公司; MEM 培养基, Gibco 公司; 培养箱, 日本 SANYO 公司; 96 孔培养板, 美国 CORNING 公司; 倒置显微镜, 德国 Leica 公司; 超净工作台, 苏州净化设备公司。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒毒力测定^[12]

选用 MDCK、HeLa 和 HEp-2 细胞进行培养。接种 1.5×10^5 个/mL 细胞于 96 孔细胞培养板, 在恒温培养箱中培养 16~20 h, 待细胞生长成单层后, 吸弃培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入用维持液按 10 倍递减稀释的病毒毒液 100 μ L/孔, 设 8 个复孔, 同时设正常细胞对照。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 温箱中培养 3 d, 在倒置显微镜下观察并记录细胞形态变化(CPE), 细胞无病变为-, 病变 0~25%为+, 病变 25%~50%为++, 病变 50%~75%为+++ , 病变 75%~100%为++++。根据观察结果用 Kärber 公式计算 TCID₅₀。

1.2.2 细胞毒性实验

选用 MDCK、HeLa 和 HEp-2 细胞进行培养。对 CEGP 和 LEGP 的细胞毒性进行测定, 计算最大无毒剂量(TC₀)。细胞长成单层后, 吸弃培养液, 分别加入维持液按 2 倍比稀释成不同浓度的药液, 每孔 100 μ L, 各设 6 个复孔, 同时设正常细胞对照, 其间置倒置显微镜下观察, 采用 CPE 法^[10], 观察药物的最大无毒浓度 TC₀。

1.2.3 抗呼吸道相关病毒活性^[13]

选用 MDCK、HeLa 和 HEp-2 细胞进行培养。在 96 孔培养板中接种细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 16~20 h, 待其生长为单层细胞, 弃去培养液, 用 PBS 洗 3 次, 将不同稀释度的药物(在无毒浓度范围内)和病毒稀释液(100TCID₅₀)各 50 μ L 直接加到单层细胞上, 先加样品液, 再加病毒液。每个浓度设 3 个复孔, 100 μ L/孔, 同时设病毒对照组、正常细胞对照组, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24~72 h, 其间置倒置显微镜下观察细胞病变(CPE)的情况。待病毒对照组的细胞病变达到 75%以上, 而对照组细胞正常时, 观察并记录各

孔的 CPE, 并做 MTT 定量活细胞数计算病毒抑制率。

病毒抑制率=(药物组吸光度-病毒组吸光度)/(对照组吸光度-病毒组吸光度) \times 100%。

根据病毒抑制率计算药物的半数抑制浓度(IC₅₀)和药物的治疗指数 TI= TC₅₀/ IC₅₀。

1.2.4 麒麟菜多糖样品抗病毒机理初探

LEGP 虽然是 CEGP 进一步精制所得, 但是抗病毒活性与 CEGP 相似, 且没有明显提高, 为以后产业化工艺成本考虑, 选用 CEGP 进行机制研究。根据 1.2.3 的实验结果, 选取 CEGP 抗病毒活性较好的两株病毒进行抗病毒机理的初步探索。按不同给药途径设置三组实验: a. 感染病毒前加药法。将 CEGP 用维持液对倍稀释后加入长成单层的 HeLa 细胞, 每孔 50 μ L。37 $^{\circ}$ C 吸附两小时后加入 50 μ L CVB3 病毒悬液。b. 直接灭活法。将 CEGP 用维持液对倍稀释后与相同体积的 CVB3 病毒悬液混合, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后加入单层 HeLa 细胞。c. 感染病毒后加药法。接种 50 μ L 病毒悬液于单层细胞中, 在 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后加入用维持液对倍稀释的 CEGP 溶液^[11]。所有 96 孔培养板均置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, CPE 观察, 待病毒对照孔达到 75%以上病变程度时, 用 MTT 法定量活细胞数计算病毒抑制率, 方法如 1.2.3。

2 结果

2.1 病毒滴度测定

通过倒置显微镜观察细胞病变情况, Reed-muench 方法计算各毒株 TCID₅₀(表 1)。以 100TCID₅₀ 的浓度进行抗病毒实验。

表 1 实验所用各毒株滴度

Tab.1 Virus titer used in the experiment

病毒株	TCID ₅₀	病毒株	TCID ₅₀
H3N2	10 ^{-5.5}	CVB3	10 ⁻⁷
H5N3	10 ^{-4.5}	RSV	10 ^{-4.2}
H1N1	10 ^{-4.5}		

2.2 CEGP 和 LEGP 对各细胞株的细胞毒性测定

以正常细胞无死亡、不引起细胞病变的最高药物稀释浓度作为对各株细胞的最大无毒浓度 TC₀, CPE 观察结果见表 2。

CPE 观察结果得, CEGP 和 LEGP 在实验所用浓度 (500 μ g/mL)范围对 MDCK, HeLa, HEp-2 细胞均无毒。

表 2 CEGP 和 LEGP 的细胞毒性
Tab.2 Cytotoxicity of CEGP and LEGP

样品	TC ₀ (μg/mL)		
	MDCK	HEp-2	HeLa
CEGP	>500	>500	>500
LEGP	>500	>500	>500

2.3 CEGP 和 LEGP 对呼吸道相关病毒的作用

倒置显微镜下观察, 流感病毒感染使细胞出现破碎、皱缩成团等病变特征(如图 1b); 科萨奇病毒 CVB3 感染使细胞皱缩、变圆死亡(如图 2b); 呼吸道

合胞病毒 RSV 感染导致细胞出现典型的合胞体(如图 3b)。CEGP 及 LEGP 在实验所用浓度(500 μg/mL), 均能不同程度地抑制各株病毒感染所致的细胞病变(如表 3 所示), 且 CEGP 和 LEGP 的作用相似。病毒 RSV 和 CVB3 均比三株流感病毒对 CEGP 和 LEGP 更敏感, 最低浓度 31.25 μg/mL 的 CEGP 和 LEGP 可 100%抑制病毒 RSV 引起的细胞病变, 而最低浓度 62.5 μg/mL 的 CEGP 和 LEGP 可 100%抑制病毒 CVB3 引起的细胞病变。抗病毒活性及治疗指数结果(表 4)显示 CEGP 对科萨奇病毒的半数治疗指数为 0.371 μg/mL, LEGP 对科萨奇病毒的半数治疗指数为 0.263 μg/mL, 治疗指数分别是大于 1347 及 1901。

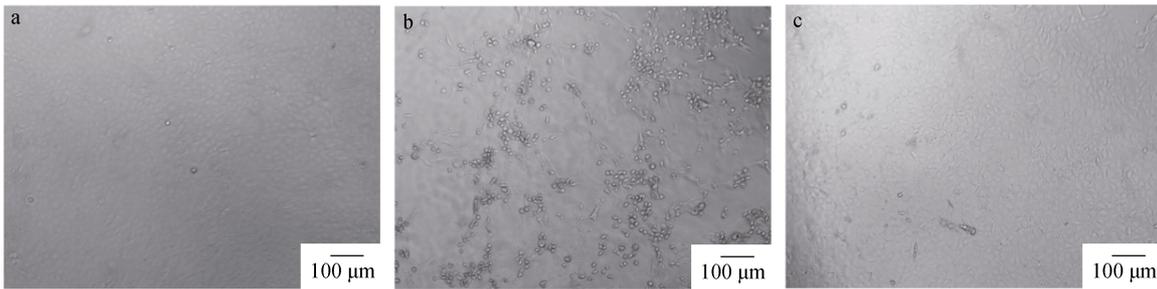


图 1 显微镜下 MDCK 细胞形态: 正常细胞(a), 流感病毒感染后(b)和流感病毒 + CEGP(c)

Fig.1 MDCK cells under the microscope: normal cells (a), cells infected with the influenza virus (b), cells infected with the virus but treated with CEGP (c)

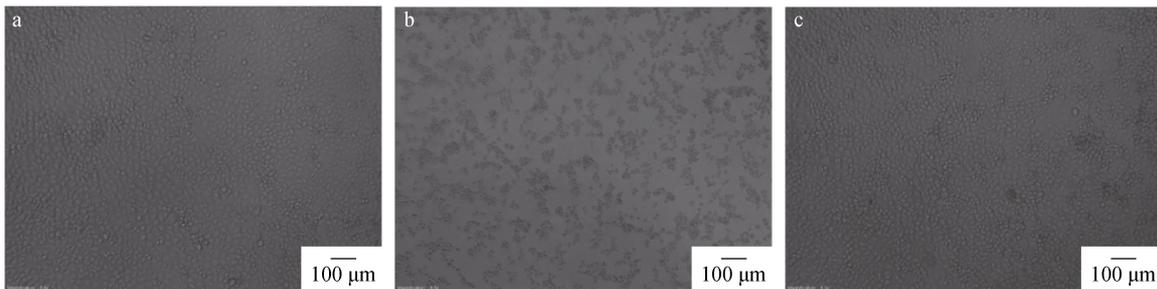


图 2 显微镜下 HeLa 细胞形态: 正常细胞(a), 感染后(b)和+CEGP(c)

Fig.2 HeLa cells under the microscope: normal cells (a), cells infected with CVB3 (b), cells infected with the virus but treated with CEGP (c)

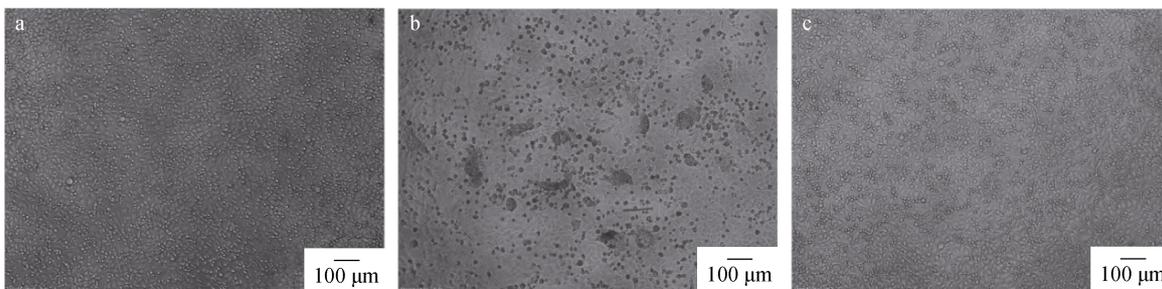


图 3 显微镜下 HEp-2 细胞形态: 正常细胞(a), 感染后(b)和+CEGP(c)

Fig.3 HEp-2 cells under the microscope: normal cells (a), cells infected with RSV (b), cells infected with the virus but treated with CEGP (c)

表 3 CEGP 和 LEGP 抗呼吸道相关病毒活性(CPE)
Tab.3 Anti-respirovirus activity of CEGP and LEGP (CPE)

样品(μg/mL)	CEGP					LEGP				
	H1N1	H3N2	H5N3	CVB	RSV	H1N1	H3N2	H5N3	CVB	RSV
病毒组	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	+++
3.9	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
7.8	+++	++	+++	+++	+	+++	++	+++	+++	+
15.6	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+
31.3	+	+	++	+	-	+	++	++	+	-
62.5	+	+	++	-	-	+	+	++	-	-
125	+	+	++	-	-	+	+	++	-	-
250	+	+	++	-	-	+	+	++	-	-
500	+	+	++	-	-	+	+	++	-	-

表 4 CEGP 和 LEGP 的抗病毒活性及治疗指数
Tab.4 Antiviral activity and the therapeutic index of CEGP and LEGP

样品	IC ₅₀ (μg/mL)					TI				
	H1N1	H3N2	H5N3	CVB	RSV	H1N1	H3N2	H5N3	CVB	RSV
CEGP	485	500	253	0.37	18.3	>1	>1	>1.97	>1347	>27.4
LEGP	312	104	387	0.26	17.7	>1.6	>4.8	>1.3	>1901	>28.2

待病毒对照孔病变达到 75%以上而且病变不再随时间增加而变化时,用 MTT 法检测各孔中细胞存活率。结果如图 4 和图 5, CEGP 和 LEGP 的抗病毒活性都呈浓度依赖性,且高浓度对病毒抑制率更高。

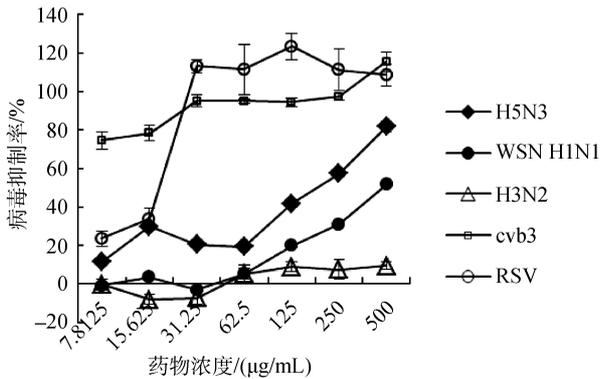


图 4 CEGP 对实验中各株病毒抑制作用的量效关系
Fig.4 Inhibition effect of the virus (CEGP)

2.4 麒麟菜多糖样品抗病毒机理初探

根据 2.3 的实验结果,选取抗病毒活性较好的两株病毒 RSV 和 CVB3 进行抗病毒机理的初步研究。不同给药途径下 CEGP 的抗病毒活性见图 6 及图 7。

由图 6 和图 7 知,不同给药途径下 CEGP 对 CVB3 和 RSV 两种病毒的抑制效果一致,都是先加药后感染病毒>直接灭活>感染病毒后加药。这说明

CEGP 具有良好的抑制病毒吸附或侵入细胞的活性,在细胞外也能有效地直接杀灭病毒。

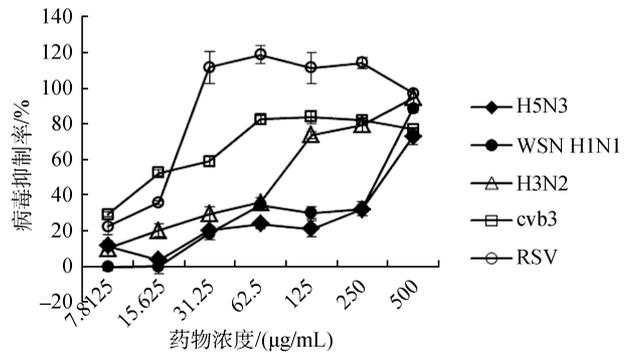


图 5 LEGP 对各病毒株感染细胞抑制作用的量效关系
Fig.5 Inhibition effect of the virus (LEGP)

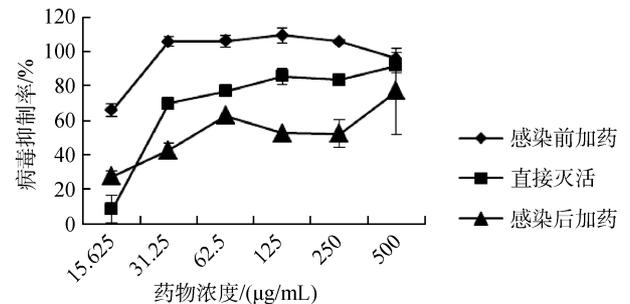


图 6 不同给药途径下 CEGP 的抗 CVB3 活性
Fig.6 Antiviral activity against CVB3 of CEGP based on different dosing

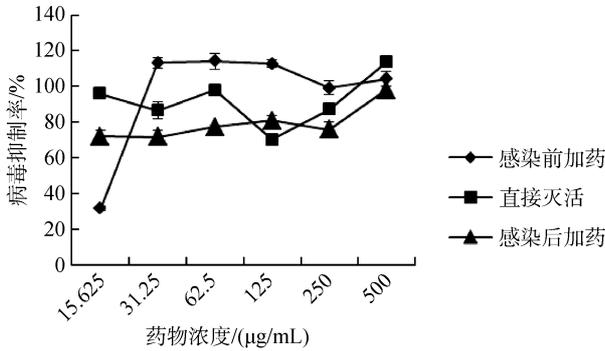


图 7 不同给药途径下 CEGP 的抗 RSV 活性

Fig.7 Antiviral activity against RSV of CEGP based on different dosing

3 讨论

本文初步研究了麒麟菜多糖的抗病毒活性, MTT 及 CPE 结果显示, CEGP 及 LEGP 对常见的呼吸道病毒包括流感病毒(H1N1, H3N2, H5N3), 科萨奇病毒 CVB3 及呼吸道合胞病毒 RSV 都具有一定抗病毒活性, 且活性相似, 证明抗病毒多糖成分为大分子量多糖组分。并且, 随着 CEGP 和 LEGP 浓度增大, 抗病毒活性也随之增强。其中, LEGP 对 CVB3 的作用最好, 治疗指数 TI 高达 1901, 但其抗呼吸道相关病毒活性具体作用机制还有待进一步研究。另外, 在实验所用浓度范围内(<500 µg/mL), CEGP 及 LEGP 对 MDCK、HeLa 和 HEp-2 细胞均无明显毒性。不同给药途径下 CEGP 的抗病毒作用实验证明, CEGP 是通过阻止病毒吸附或侵入细胞以及直接杀灭病毒来保护细胞免受病毒感染。关于 CEGP 是直接抑制病毒吸附于细胞上还是抑制了病毒核酸注入细胞的过程, 以及是通过哪种方式杀伤病毒, 相关机制正在进一步研究中。

本文研究并证明了 CEGP 及 LEGP 具有抗呼吸道相关病毒活性并初步探讨了抗病毒作用机制, 可针对该活性做进一步的体内研究, 开发出可以预防及治疗呼吸道相关疾病的药物或医疗器械等。麒麟菜易于大规模人工培养, 藻体多糖含量高达 60%, 来源十分丰

富, 为其进一步的开发提供了有利的基础。

参考文献:

- [1] 李美玉. 金银花体外抗呼吸道合胞病毒的作用研究[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(4): 420-422.
- [2] 张复春, 胡凤玉. 新型甲型 H1N1 流感研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(5): 481-485.
- [3] Liu Ge, Xiong Sheng, Xiang YangFei, et al. Antiviral activity and possible mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus[J]. Arch Virol, 2011. 156(8): 1359-1369.
- [4] 刘石生, 魏东, 王一飞, 等. 紫球藻胞外多糖抗柯萨奇 B₃ 病毒活性研究 I [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 9(1): 16-20.
- [5] 刘石生, 魏东, 朱桂芳, 等. 紫球藻胞外多糖抗柯萨奇 B₃ 病毒活性[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2005, 33(2): 82-85.
- [6] 王亚峰. 余甘根苷 B 抗柯萨奇病毒 B3 作用及机制的初步研究[D]. 广州: 暨南大学, 2009.
- [7] 王长云, 管华诗. 多糖抗病毒作用研究进展 II. 硫酸多糖抗病毒作用[J]. 生物工程进展, 2000, 20(02): 3-8.
- [8] Mayer A M, Hamann M T. Marine pharmacology in 2001—2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2005. 140(3-4): 265-286.
- [9] Yasuhara-Bell J, Lu Y. Marine compounds and their antiviral activities[J]. Antiviral Res, 2010. 86(3): 231-240.
- [10] 叶绍明, 岑颖洲, 张美英, 等. 麒麟菜硫酸酯多糖体外抗病毒作用的研究[J]. 中国海洋药物, 2007, 26(3): 14-19.
- [11] 王怀玲, 董栋, 邹沐平, 等. 琼枝麒麟菜多糖超声提取工艺及皮肤修复活性研究[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(6): 65-70.
- [12] 张颖, 岑颖洲, 黄日明, 等. 南海七种海藻多糖的抗病毒活性初步研究[J]. 病毒学报, 2006, 22(04): 282-285.
- [13] 郝静. 裙带菜茎硫酸多糖抗病毒活性及其作用机理的初步研究[D]. 广州: 暨南大学, 2008.

Anti-respirovirus activity of a *Eucheuma gelatinae* polysaccharide

ZOU Mu-ping^{1, 2}, DONG Dong¹, WANG Huai-ling¹, WANG Qiao-li¹, PU Han-lin², WANG Yi-fei¹

(1. Guangzhou Jinan Biomedicine Research and Development Center, Guangzhou 510632, China; 2. Guangzhou Jinan Bioengineering Institute, Guangzhou 510632, China)

Received: Nov., 28, 2014

Key words: *Eucheuma gelatinae* polysaccharides; antiviral activity; respirovirus

Abstract: Objective: To evaluate the anti-respirovirus effects of crude *Eucheuma gelatinae* polysaccharides (CEGP) and large molecular weight components (MW > 500 kDa, LEGP).

Method: The Reed-Muench method was used to calculate the titer of the influenza virus (H1N1, H5N3, and H3N2), coxsackie virus (CVB3), and the respiratory syncytial virus (RSV-long). The maximum no toxicity concentrations of CEGP and LEGP to each cell line (MDCK, HeLa, and HEp-2) were selected by the cytopathic effect (CPE) method. The antiviral effects of CEGP and LEGP were evaluated by the MTT and CPE methods.

Results: Both CEGP and LEGP showed significant and similar inhibition effects on the influenza virus (H1N1, H5N3, and H3N2), CVB3, and RSV-long. CVB3 and RSV were more sensitive to EGP (CEGP and LEGP) compared with the influenza virus.

Conclusion: CEGP and LEGP showed great potential in respirovirus inhibition.

(本文编辑: 康亦兼)