

苦瓜提取物抗病毒作用及其有效成份的研究*

黄天民 许兆祥 王燕平 曲凤珍 童玲莉

(中国预防医学科学院病毒研究所, 北京100052)

提 要

本实验发现, 小鼠皮下感染乙型脑炎病毒前腹腔注射苦瓜提取物(简称 E. M. c.) 有显著的保护作用, 其保护率平均为66%; 以 E. M. c. 静脉注射家兔后 2 小时, 血清中的干扰素达高峰, 其干扰素为 I 型干扰素; E. M. c. 对小鼠 NK 细胞有明显的激活作用; 经鉴定, E. M. c. 中的有效成份主要是 dsRNA, 此外, 还含有多糖类物质。

关键词: 抗病毒活性 苦瓜提取物 乙型脑炎病毒 干扰素诱生剂 双链核糖核酸 自然杀伤细胞

许兆祥等发现葫芦科一系列植物组织提取物具有抗病毒感染作用, 这些植物组织包括丝瓜、蛇瓜、瓠瓜、生瓜、葫芦的果实或其种籽芽^[1,2,4,5,8]。本实验对葫芦科的另一植物—苦瓜 (*Monordica charantia*) 提取物的抗病毒作用和作用机理, 及其有效成份进行了研究。现报道如下。

材料和方法

一、苦瓜提取物的制备

新鲜苦瓜, 去籽, 加 STE (0.1mol/L NaCl 0.01mol/L Tris 0.001mol/L EDTA, pH7.2) 缓冲液, 捣碎, 按文献^[1]提取和定量。苦瓜提取物简称 E. M. c.

二、保护率测定

按文献^[1]进行, 三周龄小白鼠 (7~9g) 经腹腔注射 E. M. c., 对照组注射 STE 缓冲液, 用乙脑病毒京卫研 1 号, 由皮下途径攻击, 动物观察 20 天, 计算保护率 (实验组小鼠存活率减对照组小鼠存活率)。

三、在家兔体内诱生干扰素及其滴度测定

E. M. c. 经静脉注射家兔, 剂量为 8mg/kg 注射后不同时间内用注射器心脏穿刺采血, 分离血清, -20℃ 保存。干扰素滴定按文献^[7]进行

四、对小鼠 NK 细胞的激活作用的测定

用 5~6 周龄非注小鼠, 制备 NK 效应细胞 18、12 小时分别每鼠尾静脉注射 E. M. c. 0.4mg/0.2ml STE, 对照组注射 STE 0.2ml。按文献^[2]测定小鼠 NK 细胞活性, 每标记 100 万靶细胞 (YAC-1 细胞, 购自中国医学科学院肿瘤研究所), 加入 100μci $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (中国科学院原子能研究所产品), 标记时间为 1 小时, 效靶细胞比例为 100:1, 作用时间 4 小时, ^{51}Cr 自然释放率

本文于 1989 年 11 月 8 日收到。

* 国家自然科学基金资助的课题

小于20%。

五、E.M.c. -dsRNA 的纯化

参照文献^[9]进行。取10mg E.M.c. 溶解于50ml 15%乙醇-STE中, 加入1.5g CF11纤维素(Whatman 产品), 振荡15分钟, 装柱, 先后分别以15%乙醇-STE和100%STE分部洗脱, 相应分部I(ssRNA)和分部II(dsRNA), 各洗脱分部加两体积无水乙醇沉淀。

六、E.M.c. -dsRNA的鉴定

将CF11层析得到的分部I溶于1xssc溶液中, 加RNase(4μg/ml)处理。分部II分成三份, 将其中两份溶解1xssc溶液中, 分别加RNase至4μg/ml和20μg/ml, 另一份溶解于50mol/LMgCl₂溶液中, 加DNaseI(20μg/ml)。上述各样品37℃作用30分钟, 然后进行琼脂糖电泳。

七、E.M.c. -dsRNA 在细胞培养上抑制 VSV 病毒特异性病变试验

按文献^[10]进行。

结 果

一、E.M.c. 对乙脑病毒感染小白鼠的保护作用

乙脑病毒皮下感染小白鼠前18、12、4小时腹腔注射 E.M.c. 0.4mg/鼠/次。实验共进行5次, 计算不同天数的累积死亡率, 结果表明有显著的保护作用, 保护率平均为66%(图1), E.M.c. 和萝卜提取物 E.R.s.r. 分别经100℃处理1小时后, 前者对乙脑病毒感染小白鼠的保护作用明显降低, 但仍有轻度保护作用, 而后者, 其保护作用基本消失(表1)。

表1 加热处理苦瓜提取物和萝卜提取物的抗病毒活性

Table 1 The Antiviral activity of E.M.c. and E.R.s.r. treated by heating

材 料 Material	实 验 号 Exp. No	保 护 率 Protection rate (%)	
		未 处 理 Untreated	处 理 Treated
苦瓜提取物			
E.M.c.	1	70.2	33.3
	2	68.7	30.0
	3	66.6	28.2
萝卜提取物			
E.R.s.r.	1	70.0	5.2

二、E.M.c. 在家兔体内诱生干扰素水平及其鉴定

E.M.c. (8mg/kg) 静脉注射家兔2、4、6小时血清中干扰素的滴度为560、300、160IU/ml(图2)。诱生的干扰素分别经pH 2.0, 20hr, 56℃ 30min处理后相应滴度为520IU/ml、500IU/ml。未经处理的干扰素滴度为560IU/ml, 说明属于I型干扰素(表2)。

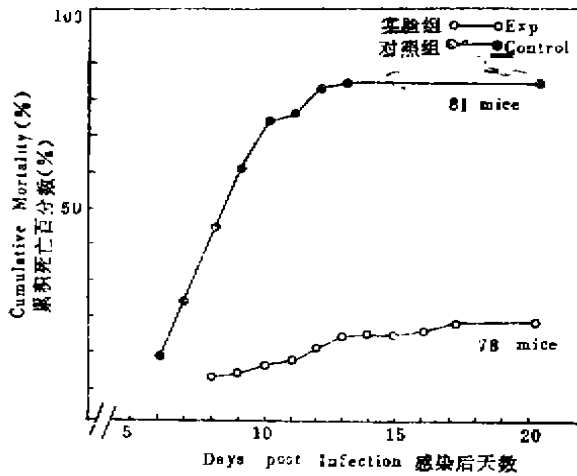


图1 E.M.c. 对小鼠感染乙脑病毒的保护作用
Fig1 Protective effect of E.M.c. on mice challenged with JEV

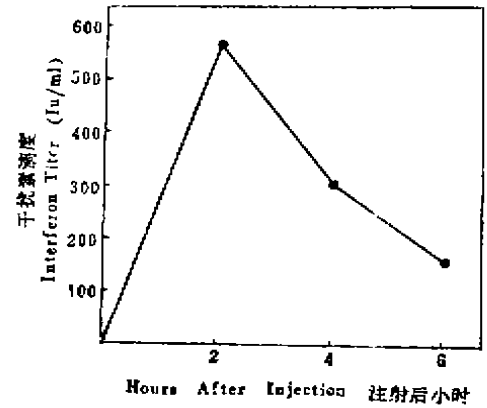


图2 家兔静脉注射 E.M.c. 后不同时间血清中干扰素水平
Fig2 Interferon levels in serum of rabbit at different time after injection with E.M.c. intravenously.

表2 E.M.c. 家兔中诱生干扰素的型别鉴定
Table2 Identification of interferon type in serum of rabbit induced by E.M.c.

处 理 Treatment	干 扰 素 滴 度 Interferon titer (IU/ml)
Control	560
pH2.0 20hr	520
56°C 30min	500

三、E.M.c. 对小鼠 NK 细胞的激活作用

实验组 NK 细胞活性比对照组增加了 69.0~84.4%，说明 E.M.c. 能显著增强 NK 细胞活性（表 3），

表3. E.M.c. 小白鼠 NK 细胞活性的激活作用
Table3 Enhancement of NK cell activity in mice by E.M.c.

Exp. NO.	NK 细胞活性 NK cell activity (%) *		增强NK活细胞活性 Enhanced NK cell activity (%) **	t 检验 t test
	实 验 组 Exp. group	对 照 组 Control group		
1	48.9	28.0	69.3	
2	75.7	20.0	77.6	
3	58.2	34.4	69.0	p<0.05
4	66.0	35.8	84.4	

* $\frac{\text{实验释放} - \text{自然释放}}{\text{最大释放} - \text{自然释放}} \times 100$

$\frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximal release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$

** $\frac{\text{实验组NK细胞活性} - \text{对照组NK细胞活性}}{\text{对照组NK细胞活性}} > 100$

$\frac{\text{NK cell activity of Exp. group} - \text{Control group}}{\text{Control}} \times 100$

四、E.M.c.-dsRNA 的鉴定

E.M.c.-dsRNA (分部 II) 分别用 DNaseI 20 μ g/ml、RNase 4 μ g/ml、20 μ g/ml 处理后作电泳分析, 并以 λ DNA-Hind III 为标准分子量, 证实其分子量略大于 0.37×10^6 daltons, 且能部分耐受 RNase, 而对 DNaseI 有抗性, E.M.c.-ssRNA (分部 I) 不耐受 RNase (图 3)。并通过抑制细胞病毒特异性病变试验, 证明 E.M.c.-dsRNA 具有病毒作用, 而 E.M.c.-ssRNA 却无抗病毒作用 (表 4)。

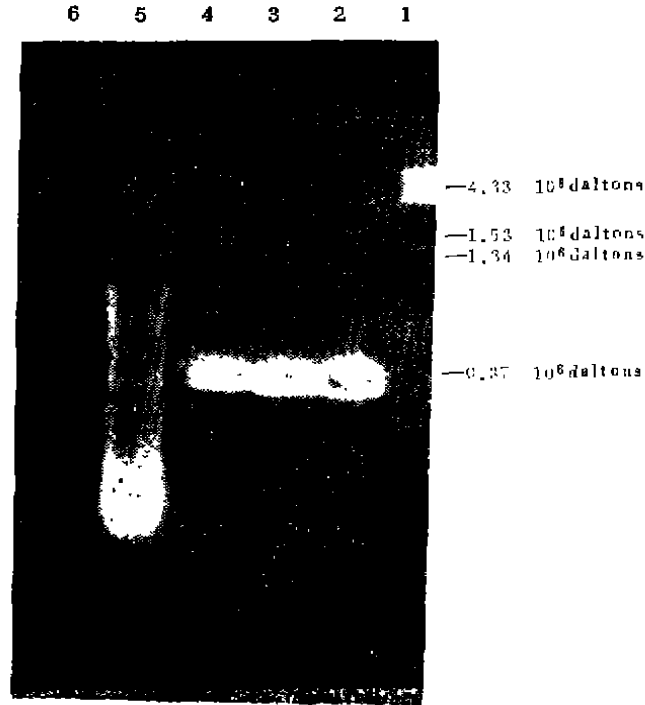


图3 苦瓜-dsRNA经核酸酶处理后的电泳图

- 1 λ DNA-HindIII
- 2 苦瓜双链核糖核酸
- 3 苦瓜双链核糖核酸经核糖核酸酶 (4 μ g/ml) 处理后
- 4 苦瓜双链核糖核酸经脱氧核糖核酸酶 (20 μ g/ml) 处理后
- 5 苦瓜单链核糖核酸
- 6 苦瓜双链核糖核酸经核糖核酸酶 (20 μ g/ml) 处理后

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of E.M.c.-dsRNA digested with RNase or DNase

- 1. DNA—HindIII
- 2. E.M.c.—dsRNA
- 3. E.M.c.—dsRNA digested with RNase (4 μ g/ml)
- 4. E.M.c.—dsRNA digested with DNase (20 μ g/ml)
- 5. E.M.c.—ssRNA
- 6. E.M.c.—dsRNA digested with RNase (20 μ g/ml)

表4. E.M.c.-dsRNA 对 VSV 在乳兔肾细胞上抑制病变作用
Table 4 Inhibition of cytopathic changes of VSV by E.M.c.-dsRNA in primary rabbit kidney cell

Group/Well No	1	2	3	4	5	6
双链核糖核酸 dsRNA ($\mu\text{g/ml}$)	10.0000	1.0000	0.1000	0.0100	0.0010	0.0001
	-	-	-	++	###	###
	-	-	-	++	###	###
	-	-	+	++	###	###
单链核糖核酸 ssRNA ($\mu\text{g/ml}$)	50.0000	5.0000	0.5000	0.0500	0.0050	0.0005
	###	###	###	###	###	###
	###	###	###	###	###	###
	###	###	###	###	###	###

注: 细胞病变 (C.P.E.) ###100%, ##75%, ++50%, +25%, -阴性

讨 论

本实验证明, 苦瓜提取物 (E.M.c.) 对乙型脑炎病毒感染小白鼠有很显著的保护作用; 静脉注射于家兔后能诱生 I 型干扰素, 许北祥等已发现葫芦科多种植物含有干扰素诱生剂^[11], 苦瓜也是属于葫芦科植物, 由此看来, 有可能葫芦科植物含有干扰素诱生剂的机率较多。

国际上公认, dsRNA 是一种很强的干扰素诱生剂, E.M.c. 中含有一种分子量约为 0.37×10^6 的 dsRNA。所以, 很可能 E.M.c. 中的主要有效成份是 dsRNA, 关于外观正常的植物中 dsRNA 的来源问题, 有的认为来源于病毒, 有的认为来源于正常细胞, 有的认为二者也可同时存在^[11]。不久前, 正常细胞中被发现含有反义 RNA 与正义 RNA 互补而引起 dsRNA, 这就为正常细胞中含有 dsRNA 提供了新的证据。当然, 在植物中分离到的 dsRNA 来源于病毒还是来源于正常细胞, 需根据情况才能结论。

NK 细胞具有免疫监视作用^[12], 本实验发现 E.M.c. 能显著增强小鼠 NK 细胞活性, 提示 E.M.c. 很可能对肿瘤有抑制作用。

E.M.c. 经 100°C 处理后, 仍保留部分抗病毒活性 (见表 1), 提示除了 dsRNA 不耐热外, 还可能含多糖类干扰素诱生剂。我们用 ECTEOLA 柱层析法^[13], 从 E.M.c. 中分离、纯化了一种物质, 经定性测定, 确证为多糖类物质 (数据未列出), 其抗病毒活性正在研究中。

参 考 文 献

- [1] 许兆祥等, 1984, 中国医学科学报, 6(1):12.
 [2] 许兆祥等, 1985, 中华微生物和免疫学, 5(2):130.
 [3] 许兆祥等, 1985, 微生物学报, 25(1):66.
 [4] 许兆祥等, 1987, 中西医结合杂志, 7(1):421.
 [5] 彭方予等, 1988, 实验和临床病毒学杂志, 2(1):47.
 [6] 许兆祥等, 1980, 病毒学报, 2(2):125.
 [7] 常见病毒病实验技术, 1978, 科学出版社出版139页.
 [8] Kasahra T et al., 1981, *Immunology*, 42:175.
 [9] Franklin R M., 1966, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 55:1504.
 [10] Field A K et al., 1968, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 61:34.
 [11] Massimo Libonati., 1980, *Mol Cell Biochem*, 31:147.
 [12] Kiessling R., 1979, *Imm. Rev.* 44:165.
 [13] Lampson G P et al., 1967, *Proc N.A.S.* 58:782.

Studies on Antiviral Activity of the Extract of *Monordica Charantia* and its Active Principle*

Huang Tian-min Xu Zhao-xiang Wang Yan-ping

Qu Feng-zhen Tong-Ling-li

(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052)

The extract of *Monordica charantia* (E.M.c.) was found to have a significant protective effect on Japanese B encephalitis virus infection in vivo. When mice were administered intraperitoneally with a dose of 0.4 mg E. M. c. at 18 hr, 12 hr, 4 hr before subcutaneous challenge with the virus respectively, the protective rate of treated group is 66%.

E.M.c. was demonstrated as an interferon inducer. Type I IFN was found in rabbit serum and its level peaked at 2hr after intravenous injection of E. M.c.

E.M.c. enhanced the NK cell activity in mice significantly.

Using cellulose fiber(CF-11) chromatography a double stranded RNA (termed as E.M.c.-dsRNA) was purified from E.M.c. E.M.c.-dsRNA was active at nanogram level in inducing resistance to viral infection in vitro. These results indicate that the main active principle in E.M.c. is a kind of dsRNA.

Besides, the preliminary data suggest that a polysaccharide is present in E.M.c. in addition to the dsRNA, its antiviral activity is under study.

Key words: Antiviral activity Extract of *Monordica charantia*
Japanese B encephalitis virus Interferon inducer dsRNA NK cell

*The project supported by National Natural Science Foundation

草鱼出血病病毒研究成果在武汉通过鉴定

The Appraisal of study on Grass Carp Hemorrhage Virus

草鱼出血病是严重危害草鱼的一种病毒性传染病，每年3—10月为发病季节，流行于长江流域及广东、广西、福建等省市。中国科学院武汉病毒研究所分子病毒室在原有病毒病原研究的基础上，于七五计划期间对该病毒的形态结构、基因组和多肽、生物学及血清学特征、理化因素的影响、流行病学等方面进行了深入的研究。

1990年11月2日，由农业部委托中国科学院武汉分院主持召开了草鱼出血病病毒的研究（含国家七五计划科技攻关75-06-03-11子专题1、4项）成果鉴定会，由著名病毒学家向近敏教授、学部委员、著名鱼类学家刘建康研究员等专家组成的鉴定委员会对该项研究提供的资料进行了认真评议，专家们一致认为：根据国际病毒学分类原则，草鱼出血病病毒的主要特性符合呼肠孤病毒科的特征，但有别于业已建立的6个属，如：该病毒的形态结构，凝集人“O”型血球的能力与呼肠孤病毒相似而与轮状病毒不同，但基因组片段数目则与轮状病毒相同，其RNA聚合酶活性的最适温度低于呼、轮两种病毒，其抗原及宿主范围均不相同，因此在呼肠孤病毒科中应建立一个新属，建议暂定属名为呼肠孤轮状病毒属（Reorotavirus），该病毒应为一个新种，其种名为草鱼出血病病毒（Grass carp hemorrhage virus, GCHV）这一成果的取得为草鱼出血病的进一步研究和防治打下了良好的基础，在整体研究水平上达到国际先进水平，而高效价病毒培养、电镜技术研究鱼类病毒基因组体外转录等方面属国际领先地位，为我国鱼类病毒学研究开创了一个新领域。

（中国科学院武汉病毒所 丁清泉）