



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103070967 A

(43) 申请公布日 2013.05.01

(21) 申请号 201310028254.X

(22) 申请日 2013.01.25

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号

(72) 发明人 李尔广 陈晓庆 王伟 金玉

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 胡锡瑜

(51) Int. Cl.

A61K 36/78(2006.01)

A61K 31/715(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

C08B 37/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种鱼腥草水提液及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于生物制药技术领域。具体涉及一种鱼腥草水提液及其制备方法和应用。本发明从鱼腥草水提液中获得的总多糖具有直接灭活或抑制手足口病病毒即肠道病毒 71 型(EV71) 和柯萨奇 A16 (CVA16) 复制的活性; 且进一步发现抗病毒活性的多糖主要为分子量大于 100kDa 的多糖。因此, 该多糖可以在制备抗手足口病病毒药物中得到应用。作为一种可食用的水生草本植物鱼腥草来源广泛, 毒副作用小, 价格低廉, 提取工艺简单等特点, 具有重大的开发和应用前景。

1. 一种鱼腥草水提液,其特征是由鱼腥草干植物,用 60℃ 到 90℃ 水浴法浸提 2-5 小时而得到。
2. 根据权利要求 1 所述的鱼腥草水提液的制备方法,其特征是由以下步骤获得:
 - (1). 称取鱼腥草干植物,用去离子水洗净,低温烘干至恒重;
 - (2)按照干植物质量和液体体积比为 1:10 (g/ml)加入去离子水,用 60℃-90℃ 水浴法浸提 2-5 小时;
 - (3). 通过 1000g/min 离心 10min,获得上清,滤渣按步骤(2)浸提 2 次,合并滤液;
 - (4)滤液经过 5000g/min 离心 10min 后,0.45 μ m 滤膜过滤,去除杂质,冷冻干燥。
3. 根据权利要求 1 所述的鱼腥草水提液在制备抗病毒药物中的应用。
4. 根据权利要求 1 所述的鱼腥草水提液在制备治疗手足口病病毒药物中的应用。
5. 根据权利要求 1 所述的鱼腥草水提液单独或与其他药物配伍制备为水剂或颗粒剂或胶囊。
6. 权利要求 1 所述的水提液制备的多糖,其特征是由 80% 乙醇沉淀而得到,产率达 2.4% 以上,分子量大于 100kDa。
7. 根据权利要求 6 所述水提液制备的多糖的制备方法,其特征是由以下步骤获得:
 - (1). 权利要求 2 所获得的鱼腥草水提液,加入 4 倍体积的无水乙醇,于 4℃ 冰箱中静置过夜;
 - (2). 絮状物用 5000g/min 离心 20min 得到沉淀;
 - (3). 沉淀物用无水乙醇、丙酮洗涤 3 次后,真空干燥得到干燥的鱼腥草总多糖。
8. 根据权利要求 6 所述的的水提液制备的多糖在制备抗病毒药物中的应用。
9. 根据权利要求 6 所述的水提液制备的多糖在制备治疗手足口病病毒药物中的应用。
10. 根据权利要求 6 所述的水提液制备的多糖单独或与其他药物配伍制备成水剂或颗粒剂或胶囊。

一种鱼腥草水提液及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药技术领域,具体涉及一种鱼腥草水提液及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb)是三白草科蕺菜属多年生的草本植物。广泛分布于我国中部、东南及西南各省区。鱼腥草营养价值很高,是常用的野生蔬菜之一。同时具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋的功效,属于卫生部确定的既是药品又是食品的植物资源。

[0003] 鱼腥草化学成分主要包括挥发油、生物碱、黄酮类、有机酸、多糖等成分。其中挥发油主要成分为癸酰乙醛(鱼腥草素),月桂醛等。生物碱的成分主要有吡啶类生物碱等。黄酮类物质包括槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷、金丝桃苷、芦丁等成分。另外,水溶性多糖由葡萄糖、果糖、阿拉伯糖等组成。目前国内外对鱼腥草的活性研究主要集中在挥发油和黄酮类化合物上,而对于鱼腥草水溶性成分特别是水溶性多糖成分的生物活性研究较少,对于鱼腥草中多糖类成分抗手足口病病毒活性的研究国内外未见报道。

[0004] 手足口病(Hand, foot and mouth disease, HFMD)是亚太地区近几年来爆发的严重威胁儿童健康的一种传染病,主要感染0-5岁婴幼儿。临床上主要症状包括,手、脚、口唇等黏膜出现水泡性疹子并溃疡;重症患者伴有脑膜炎、脑炎、肺水肿、肺出血等甚至死亡。手足口病自2008年在中国阜阳爆发被卫生部列入丙类传染病以来,手足口病发病率和死亡率一直占丙类传染病首位。另外,临床上还没有针对手足口病病毒的有效疫苗和药物,手足口疾病形势极其严峻,开发研究防治手足口病病毒的疫苗和药物迫在眉睫。肠道病毒71型(Enterovirus71, EV71)和柯萨奇A16(Coxsackievirus A16, CVA16)是导致手足口病的两个主要病原体,属于无包膜的,小RNA肠道病毒。植物特别是可食用的传统中草药,具有来源丰富,价格低廉、安全低毒等特点,因此,开发利用植物资源,分离鉴定抗病毒活性成分,开发抗病毒药物研究具有巨大的应用前景。

发明内容

[0005] 本发明需要解决的问题是提供一种鱼腥草水提液及其制备方法和在防治手足口病病毒药物中的应用。

[0006] 本发明对鱼腥草水提液及水提液中的总多糖进行提取、分离以及抗手足口病病毒活性分别进行了鉴定,确定抗病毒多糖主要为分子量大于100kDa的多糖。因此,可开发制备成一种防治手足口病病毒药物。本发明所述的鱼腥草水提液和总多糖的制备方法具体为,鱼腥草干叶用去离子水洗净,烘干,按照植物质量和液体体积比为1:10(g/ml)加入去离子水,60°C到90°C水浴保温2-5小时,1000g/min离心10min获得滤液,滤渣按同样方法浸提2次,合并滤液。滤液经过5000g/min离心10min,0.45μm滤膜过滤,去除杂质,冷冻干燥。水提液中总多糖的提取采用醇沉的方法进行沉淀。具体为,水提液中加入4倍体

积的无水乙醇沉淀多糖,于4°C冰箱沉淀过夜,絮状沉淀用5000g/min离心20min,保留沉淀,沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤3次后,真空干燥得到干燥的鱼腥草总多糖。采用硫酸苯酚法对多糖含量进行检测。将所得到的水提液和多糖进行体外抗病毒活性检测,发现,水提液和总多糖具有显著地抑制手足口病病毒EV71和CVA16感染的活性,进一步实验表明,活性多糖可以直接灭活EV71病毒颗粒,导致病毒失活无法进一步感染;而活性多糖可以抑制CVA16病毒在宿主细胞内的复制从而抑制其进一步的感染。通过超滤膜超滤离心,分子量大于100kDa的多糖组分被浓缩且抗病毒活性显著提高。相反,分子量小于100kDa的多糖组分抗病毒活性显著下降。说明鱼腥草多糖中抗病毒活性成分为分子量大于100kDa的多糖。

[0007] 本发明的优点在于:

1. 鱼腥草水提液和其中的水溶性多糖具有直接灭活EV71和抑制CVA16复制的特点,可以通过外用手段直接阻断传染源,灭活病毒感染,保护易感人群。

[0008] 2. 鱼腥草水提液及多糖提取工艺简单、方便。鱼腥草中抗病毒多糖组分进一步得到鉴定,为分子量大于100kDa的活性多糖。

[0009] 3. 鱼腥草水提液或总多糖可以单独或与其他药物组分配伍,制备为水剂、颗粒剂、胶囊等作为防治手足口病的药物。

[0010] 4. 鱼腥草来源广泛,为可食用的传统中草药,安全低毒。

附图说明

[0011] 图1. 鱼腥草多糖抑制病毒感染时间曲线

—◆—代表终浓度为30 μg/ml的多糖抑制肠道病毒71型(EV71)的时间曲线; ■■■代表终浓度为30 μg/ml的多糖抑制柯萨奇A16(CVA16)病毒的时间曲线; —▶—代表感染病毒的时间点; →代表加入多糖的时间点。

[0012] 图2. 鱼腥草多糖直接孵育病毒对病毒感染性颗粒释放的影响

■代表未处理的病毒组

□代表去离子水直接孵育的病毒组

▨代表终浓度为30 μg/ml的鱼腥草多糖直接孵育的病毒组

[0013] 图3. 超滤离心所得各部分多糖的回收率

具体实施方式

[0014] 下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0015] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0016] 非洲绿猴肾细胞Vero细胞购于上海中科院细胞库。柯萨奇A16(CVA16)和肠道病毒71型(EV71)标准株BrCr株购于武汉大学中国典型培养物保藏中心,肠道病毒71型阜阳株从江苏省疾控中心获得标准株。

[0017] 实施例一鱼腥草水提液和多糖的提取和检测

(一) 鱼腥草水提液和多糖的提取

首先将鱼腥草干植物洗净,低温烘干至恒重,等分为两份,一份用于水提液的提取,另

一份用于提取鱼腥草多糖。按照植物质量和液体体积比 1:10 (g/ml) 加入去离子水, 于 60° C 到 90° C 水浴保温 2-5 小时, 1000g/min 离心 10min 获得上清水提液, 沉淀滤渣按同样的方法浸提 2 次之后, 合并滤液, 上清用 5000g/min 离心 10min, 0.45 μm 的滤膜进行过滤。上清液体直接冷冻冻干得到鱼腥草的水提液冻干粉, 或上清水提液加入 4 倍体积的无水乙醇用于沉淀多糖, 于 4° C 冰箱中静置过夜, 有大量的絮状沉淀物析出, 用 5000g/min 离心 20min, 获取沉淀物。沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤 3 次之后, 真空干燥得到干燥的鱼腥草总多糖。

[0018] (二) 鱼腥草多糖含量检测

按上述方法提取所得的干燥的鱼腥草多糖, 称重并计算沉淀物得率为 2.48%-2.75%, 计算方法为: 得率 % = (沉淀物质量 / 原植物质量) × 100%。沉淀用去离子水复溶之后, 以葡萄糖为标准品, 用硫酸苯酚法测定醇沉淀中鱼腥草多糖的含量为 75.3%-83.1%, 多糖含量计算方法为: 多糖含量 % = (C × V × N / W) × 100%, 其中 C 为多糖浓度, V 为液体体积, N 为稀释倍数, W 为沉淀质量。

[0019] 实施例二鱼腥草水提液和多糖抗手足口病病毒活性检测

(一) 鱼腥草水提液和鱼腥草多糖对细胞的毒性测试

于 96 孔板中培养 Vero 细胞, 待细胞长成单层后, 将上述所得水提液冻干粉和醇沉多糖用去离子水复溶后, 用终浓度分别为 1 μg/ml、3 μg/ml、10 μg/ml、30 μg/ml、100 μg/ml、300 μg/ml、1000 μg/ml 的样品处理 Vero 细胞, 设置三个复孔。同时设置无药物处理的正常对照组。于 37° C、5%CO₂ 培养箱中培养观察样品对 Vero 细胞的毒性, 培养 72 小时之后, 采用经典的检测细胞活力的 MTT 方法测定样品对 Vero 细胞的毒性。具体来说, 加入终浓度为 0.5mg/ml 的 MTT 培养细胞 4 小时之后, 由于正常的活细胞能将 MTT 还原成水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中, 所以通过去除培养上清后, 加入 100 μl 的 DMSO 将甲瓚溶解, 用酶标仪在 570nm 处测定吸光值, 将各组细胞的吸光值减去吸光本底值后, 通过处理组细胞的吸光值与正常对照组细胞的吸光值相比, 计算出鱼腥草多糖对 Vero 细胞的半数毒性浓度 CC₅₀ 值, 即加入的样品对 50% 的细胞发生细胞毒性的浓度。CC₅₀ 值越大说明样品对 Vero 细胞毒性越小。结果表明, 鱼腥草水提液的 CC₅₀ 大于 1000 μg/ml, 而鱼腥草多糖对 Vero 细胞的 CC₅₀ 为 548 ± 11 μg/ml。

[0020] (二) 鱼腥草水提液和多糖抗手足口病病毒活性测试

根据测得的鱼腥草水提液和多糖对 Vero 细胞的 CC₅₀ 值, 我们接下来在 Vero 细胞中用终浓度分别为 0.1 μg/ml、0.3 μg/ml、1 μg/ml、3 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml、300 μg/ml、500 μg/ml 的鱼腥草水提液和多糖检测其抑制手足口病病毒 EV71 (BrCr 株和阜阳株) 和 CVA16 感染活性。Vero 细胞于 96 孔板中长成单层后, 用以上不同浓度的样品处理 Vero 细胞后 2 小时, 分别用感染复数 (MOI) 为 0.3 的 EV71 (BrCr 株和阜阳株) 和 CVA16 感染 Vero 细胞。每个处理组设置三个复孔, 同时设置无药物处理不感染的正常对照组以及无药物处理的感染组。用显微镜直接观察病毒感染引起的宿主细胞形态改变, 细胞变圆, 脱落破碎等细胞病变效应 (CPE), 并结合以上所述的 MTT 方法, 于感染 72 小时后检测细胞活力, 根据公式 (处理组吸光值 - 未处理感染组吸光值) / (正常对照组吸光值 - 未处理感染组吸光值) × 100%, 计算药物对病毒感染的抑制百分比和半数抑制浓度 IC₅₀ 值, IC₅₀ 值越小, 说明药物抑制病毒效果越显著。结果如表 1 所示, 鱼腥草水提液对

药物	IC ₅₀ (μg/ml)		
	EV71(BrCr株)	EV71(阜阳株)	CVA16
鱼腥草水提液	20.6±2.5	8.9±1.6	186.3±20.1
鱼腥草多糖	4.3±0.3	2.8±0.2	13.5±1.3

表 1

EV71(BrCr 株 和 阜 阳 株) 和 CVA16 感 染 的 IC₅₀ 值 分 别 为 20.6±2.5 μ g/ml, 8.9±1.6 μ g/ml, 186.3±20.1 μ g/ml, 而多糖对 EV71(BrCr 株和阜阳株) 和 CVA16 感染的 IC₅₀ 值分别为 4.3±0.3 μ g/ml, 2.8±0.2 μ g/ml, 13.5±1.3 μ g/ml。结果表明,鱼腥草水提液和鱼腥草多糖都能显著地抑制 EV71 和 CVA16 病毒的感染 ;而且,水提液中沉淀的多糖的活性显著高于水提液的抗病毒活性,因此,我们可以推断,鱼腥草水提液中的多糖是抗病毒的主要活性成分。

[0021] (三) 鱼腥草多糖能直接灭活 EV71 病毒颗粒,而通过抑制 CVA16 胞内复制抑制 CVA16 的感染

根据以上测定的 IC₅₀ 和 CC₅₀ 值,我们选取终浓度为 30 μ g/ml 的鱼腥草多糖检测药物抑制病毒感染的时间曲线。于 96 孔板中培养 Vero 细胞,待细胞长成单层后,用终浓度为 30 μ g/ml 的鱼腥草多糖按图 1 所示时间加入到细胞中,即在病毒感染前 2 小时,与病毒同时加入,以及病毒感染后 2 小时、4 小时、8 小时、10 小时、12 小时、24 小时(-2、0、2、4、8、10、12、24hr) 加入到细胞中,待病毒感染 72 小时之后,用上述 MTT 方法检测药物抑制病毒感染的抑制率。结果显示,30 μ g/ml 的鱼腥草多糖预处理细胞 2 小时对 EV71 阜阳株和 CVA16 的感染的抑制率为 100%。但是,EV71 感染 Vero 细胞 2 小时后加入药物抑制效果越来越差,而相反 CVA16 感染细胞 8 小时后加入药物抑制效果仍然显著,说明鱼腥草多糖能在 EV71 进入宿主细胞之前就能抑制 EV71 的感染,而其抑制 CVA16 感染可能是通过抑制病毒在宿主细胞内的复制等过程发挥作用。为了进一步确定鱼腥草多糖的是否能直接灭活病毒,我们将终浓度为 30 μ g/ml 的鱼腥草多糖与 1x10⁵TCID₅₀ 的 EV71 或 1x10⁵PFU 的 CVA16 于 100 μ l 的无血清培养基中混合,37° C 中孵育 60min 后,取混合液 10 μ l 感染 24 孔板的 Vero 细胞,重复 3 个复孔,同时设置无处理的正常病毒组和去离子水处理的病毒组。待病毒吸附细胞 2 小时候之后,将培养基去掉,用无血清洗三次,以去除未吸附的病毒和残留的药物。病毒感染 48 小时之后,收集感染的细胞和上清,用液氮反复冻融 3 次以释放出病毒颗粒,通过梯度稀释病毒液二次感染 Vero 细胞,计数 CVA16 感染引起的空斑(PFU) 计算病毒的滴度,用 Reed-Muench 法计算 EV71 病毒滴度,取对数后作图,结果如图 2 所示,鱼腥草多糖孵育的 EV71 病毒的滴度显著低于未处理组或去离子水处理的病毒组。具体来说,药物处理的 EV71 组的感染性病毒颗粒与未处理的 EV71 感染组对比,药物能抑制病毒感染达 5 个 log 以上,即 10⁵ 倍以上,说明鱼腥草多糖能直接灭活 EV71 病毒颗粒。相反,与鱼腥草多糖孵育的 CVA16 病毒的滴度与不处理组或去离子水处理的病毒组滴度没有显著差别,说明鱼腥草多糖不是通过直接灭活 CVA16 病毒颗粒发挥抗病毒作用。综上实验结果表明,鱼腥草多糖主要通过直接灭活 EV71 病毒,导致病毒失活不能继续感染,而其通过抑制 CVA16 在宿主细胞内的复制等过程发挥抑制病毒感染作用。

[0022] 由于多糖的组成复杂,分子量变化巨大,其生物活性与分子量有很大的关系。为了

进一步确定鱼腥草多糖中抗病毒活性多糖的分子量,我们将多糖用去离子水复溶后依次用 100kDa 和 10kDa 的超滤膜超滤离心,所得截留液分别收集,浓缩,冻干,得到不同分子量范围的鱼腥草多糖,按照公式(截留后多糖质量 / 截留前总多糖的质量)×100%,计算各部分多糖的回收率,并进一步用 MTT 方法检测抗

分子量范围	IC ₅₀ (μg/ml)		
	EV71(BrCr株)	EV71(阜阳株)	CVA16
<10 kDa	-	-	-
10-100 kDa	146.2±2.5	205.7±3.2	-
>100 kDa	0.59±0.05	0.31±0.03	1.58±0.21

表 2

手足口病病毒活性,计算各部分抗手足口病病毒的 IC₅₀ 值。结果如图 3 所示,分子量大于 100kDa 的多糖回收率为 25.3%,分子量在 10-100kDa 之间的多糖回收率为 45.2%,小于 10kDa 多糖回收率为 28.2%。其中约有 1.3% 的损失。各部分抗病毒 IC₅₀ 值如表 2 所示,“-”表示没有检测到抗病毒活性,由表 2 可见分子量小于 10kDa 的多糖基本没有抗病毒活性,分子量介于 10-100kDa 之间的多糖相对总多糖来讲,抗病毒活性一般,而分子量大于 100kDa 的多糖相对于总多糖其抗病毒活性显著增加。由此可以得出,鱼腥草水提液中的多糖具有显著的抗手足口病病毒活性,且其具有抗病毒活性的为分子量大于 100kDa 的多糖。

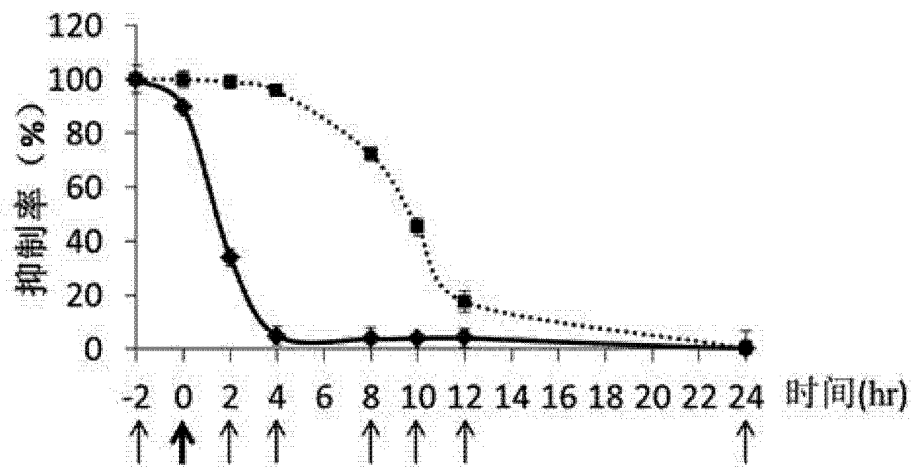


图 1

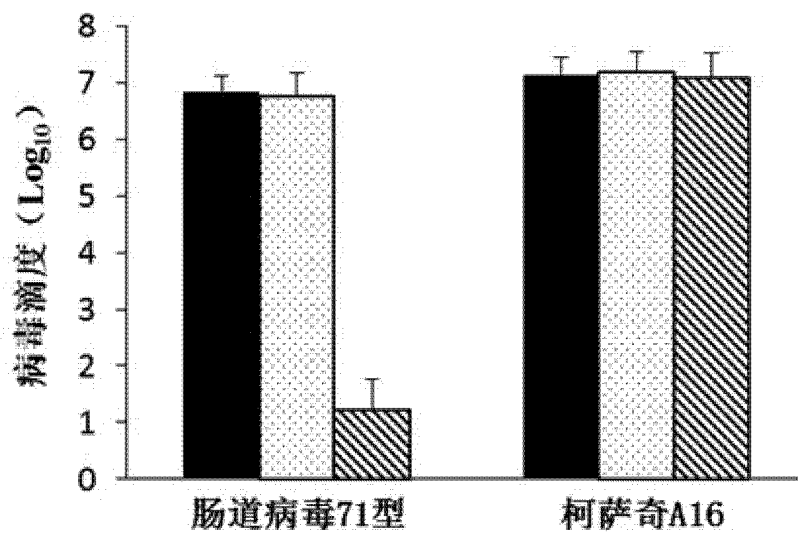


图 2

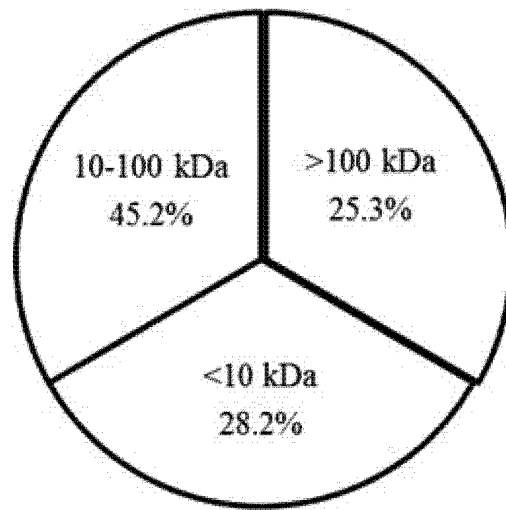


图 3