

抗病毒中药体外筛选噬菌体-细菌模型的初步探索

□ 王海俊^{1*} 宁苏莉² 王家驹³ 赖永贤³

(1. 上海市皮肤病性病医院 上海 200050

2. 上海市第八人民医院 上海 200235

3. 中国科学院上海生理生态研究所 上海 200032)

摘 要 目的：运用噬菌体技术对建立抗病毒中药体外筛选噬菌体-指示菌模型进行初步尝试。方法：采用双层琼脂平板-纸片法，利用枯草杆菌噬菌体-枯草杆菌和大肠杆菌噬菌体-大肠杆菌两种噬菌体-指示菌模型，对三氮唑核苷和氟脲嘧啶进行抗病毒阳性对照物筛选；对板蓝根和大蒜进行中药抗病毒初步试验。结果：氟脲嘧啶筛选结果呈阳性，三氮唑核苷的筛选结果呈阴性；中药受试物为大蒜汁试验结果呈阳性，板蓝根试验结果呈阴性。结论：以噬菌体-指示菌系统为模型进行抗病毒中药的筛选工作，尚需进行大量试验来建立较为完善的对照模型和筛选模型；但作为一种全新的筛选体系，噬菌体-指示菌系统具有一定的良好应用前景。

关键词 抗病毒中药 体外筛选 噬菌体-指示菌

中医药是中国传统文化的宝贵遗产，在数千年的总结和应用中对中国社会的进步产生过重要影响。但是伴随社会的发展、疾病谱的变化和新疾病的不断出现，以往对多数中药的传统认知已很难适应疾病变化的治疗要求，中医药的发展势在必行。现代科技的飞速发展对中医药研究提供了有效的研究方法。我们在以往的工作中，利用噬菌体

及噬菌体-细菌间的特性，运用噬菌体技术对抗病毒中药进行了体外筛选的初步探索，对建立抗病毒中药体外筛选的噬菌体-细菌模型进行了尝试。

1 材 料

1.1 培养基

固体营养琼脂：蛋白胨 1.0 g；肉膏 0.5 g；氯化钠 0.5 g；琼脂

2.0 g；蒸馏水 100ml；pH 7.2 ~ 7.4，高压蒸汽灭菌后备用。

半固体营养琼脂：蛋白胨 1.0 g；肉膏 0.5 g；氯化钠 0.5 g；琼脂 0.7 g；蒸馏水 100ml；pH 7.2 ~ 7.4，高压蒸汽灭菌后备用。

胨-肉膏液：蛋白胨 1.0 g；肉膏 0.5 g；氯化钠 0.5 g；蒸馏水 100ml；pH 7.2 ~ 7.4，高压蒸汽灭菌后备用。

1.2 噬菌体-指示菌系统

枯草杆菌噬菌体-枯草杆菌；大肠杆菌噬菌体-大肠杆菌。噬菌

* 作者简介 王海俊，男，副主任医师。现任上海市皮肤病性病医院皮肤二科主任，上海市中医药学会第一届皮肤病分会委员兼秘书。

体-指示菌系统由中国科学院上海生理生态研究所噬菌体研究室提供。

1.3 受试物

病毒唑注射液(三氮唑核苷注射液), Ribavirin Injection, 规格: 1ml: 100mg, 上海信谊金朱药业有限公司生产。

氟脲嘧啶注射液, Fluorouracil Injection, 规格: 10ml: 0.25 g, 上海旭东海普药业有限公司生产。

板蓝根, 市售干药材, 十字花科二年生草本植物菘蓝 *Isatis tinctoria* L. 或爵床科多年生灌木状草本马蓝 *Baphicacanthus cusia* Bremek. 的根。切碎, 纱布包裹置于烧杯中, 纯净水浸没煎煮沸沸至约 30 分钟, 留取汤液备用。

大蒜, 市售鲜药材, 百合科多年生草本植物大蒜 *Allium sativum* L. 的鳞茎。纱布包裹压碎取汁备用。

2 方法

2.1 对照物初筛试验

采用双层琼脂平板-纸片法。底层固体营养琼脂平板, 上层半固体营养琼脂平板。先将融化的固体营养琼脂倒入玻璃平皿(直径 9cm, 约用 15ml)内做成底层琼脂平板, 凝后待用; 再将半固体营养琼脂(约用 2.5ml)融化置于上层, 待冷至约 45℃时, 分别加入枯草菌噬菌体及大肠杆菌噬菌体, 噬菌体数目各约为 10⁷/ml, 量约 0.1 ml。同时分别对应加入两噬菌体指示菌培养物 0.1 ml: 枯草菌为培养 18 小时得琼脂斜面培养物, 以 5ml 胨-肉膏液洗下得菌悬液;

大肠杆菌为培养 18 小时胨-肉膏培养物。分别倾注于底层琼脂平板形成均匀的薄上层, 制成枯草杆菌噬菌体-枯草杆菌和大肠杆菌噬菌体-大肠杆菌试验平板, 凝后待用。于两种培养基琼脂上层表面分别加放浸以病毒唑注射液及氟脲嘧啶注射液的滤纸片, 以蒸馏水为阴性对照物, 37℃培养 18 小时后观察结果。以上法重复实验三次, 以选定阳性对照物。

2.2 抗病毒中药初筛试验

采用双层琼脂平板-纸片法同上。于琼脂上层表面分别加放浸以板蓝根煎液及大蒜汁液的滤纸片, 以选定的抗病毒西药阳性对照物作阳性对照, 以蒸馏水作阴性对照。37℃培养 18 小时后观察结果。以上法重复实验三次。

3 结果

3.1 结果评判

阳性结果: 药物有抗噬菌体作用, 培养基中浸以药物的滤纸片周围有细菌生长, 而培养基其它部分背景因指示菌被噬菌体裂解而无细菌生长; 但药物同时具有抗噬菌体作用和对指示菌的抑菌作用, 则出现滤纸片周围无菌生长, 而较远处可出现菌环。

阴性结果: 药物无抗噬菌体作用, 指示菌被噬菌体裂解, 放置浸以药物的滤纸片培养基中无细菌生长。

3.2 对照物初筛试验结果

加放浸以病毒唑注射液滤纸片的枯草杆菌噬菌体-枯草杆菌培养

基和大肠杆菌噬菌体-大肠杆菌培养基结果均呈阴性, 重复实验结果一致; 加放浸以氟脲嘧啶注射液滤纸片的枯草杆菌噬菌体-枯草杆菌培养基和大肠杆菌噬菌体-大肠杆菌培养基结果均呈阳性, 重复实验结果一致。故在抗病毒中药的初筛试验中根据对照物初筛试验的结果选用氟脲嘧啶注射液为阳性对照物。

3.3 抗病毒中药初筛试验结果

加放浸以板蓝根煎液滤纸片的枯草杆菌噬菌体-枯草杆菌培养基和大肠杆菌噬菌体-大肠杆菌培养基结果均呈阴性, 重复实验结果一致; 加放浸以大蒜汁液滤纸片的枯草杆菌噬菌体-枯草杆菌培养基和大肠杆菌噬菌体-大肠杆菌培养基结果均呈阳性, 重复实验结果一致。

4 讨论

长期以来除个别中药的研究外, 中医中药的研究和开发未能在总体上取得有效突破, 近年来我国政府将中药产业作为重大战略产业加以发展, 强化了对中药产业的政策扶持, 给传统中医药的发展带来了空前的机遇^[1]。然而传统医学并非只有中国才有, 中国传统医学也并非只留存于中国。在中药的研究中有学者结合国外经验提出了从天然传统药物出发研究开发创新药物的基本模式(见图 1), 为从中药出发去研究开发创新药物开辟出了一条较为理想的途径^[2], 因此借鉴国际传统药物发展的经验可以有效推动中国中药现代化进程。

中医中药抗病毒治疗是临床常用的有效抗病毒手段之一，在很大程度上与西医的抗病毒治疗方法形成互补。在中药中筛选和开发抗病毒药物已有不少有益的尝试^[3-5]，表明了在传统抗病毒中药和组方的基础上，中药有效抗病毒活性成份的研究存在很大空间。我们借鉴上述开发创新药物的基本模式，试图对抗病毒中药进行体外筛选，但是中药的研究有其复杂性。中药防治疾病的物质基础是其所含的活性成份，中药作用的多样性来源于所含有效成份的多样性。多种活性成份

作用于人体的不同靶点，相互之间还可能起到协同或拮抗作用。但即使单味抗病毒中药，也只有真正代表抗病毒药效的活性成份才是最终有效成份，因此中药的研究费时费力。如能在抗病毒中药的研究中引入一种简单易行的方法，能够敏感、可靠地直接显示某味中药或某一活性成份的抗病毒作用，将大大加快抗病毒中药研究的进展。

噬菌体是广泛存在于自然界中的一类以细菌为宿主的病毒，绝大

多数原核生物中都发现了相应的噬菌体。由于噬菌体可以被改造做基因工程载体，在多年研究的基础上，噬菌体表面展示技术被广泛应用于疾病诊断、特异性抗体及蛋白药物生产等^[6]，但是噬菌体本身作为一种病毒，尚未被应用于抗病毒药物的研究，将噬菌体用于抗病毒中药体外筛选是一种尝试。在此次抗病毒中药体外筛选的初步试验中，我们以三氮唑核苷和氟脲嘧啶作为西药对照，结果显示氟脲嘧啶具有抗枯草杆菌噬菌体和大肠杆菌噬菌体作用，而三氮唑核苷未能取