热毒宁注射液及其组分对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用研究

孙 兰^{1,2}, 刘艾林³, 王振中^{1,2*}, 毕宇安^{1,2}, 杜冠华³, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究热毒宁注射液及其组分对流感病毒神经氨酸酶 (NA) 抑制活性。**方法** 通过测定流感病毒 NA 的荧光强度值来确定热毒宁注射液及其组分对流感病毒 NA 的抑制活性。**结果** 热毒宁注射液对 H1N1、H3N2、B 流感病毒 NA 抑制活性较高, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 (46.49 ± 2.25) 、 (49.77 ± 1.77) 、 (45.33 ± 5.32) $\mu\text{g/mL}$ 。金银花聚酰胺柱洗脱浓缩液、醋酸乙酯萃取液及残液、柱色谱提取物、隐绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 B 对 H1N1、H3N2、B 流感病毒 NA 酶活性均具有抑制作用。**结论** 热毒宁注射液及其有机酸类成分对流感病毒神经氨酸酶活性均具有一定抑制作用。

关键词: 热毒宁注射液; 流感病毒; 神经氨酸酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2014)01 - 0027 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.01.006

Inhibition of Reduning Injection and its components on neuraminidase in influenza virus

SUN Lan^{1,2}, LIU Ai-lin³, WANG Zheng-zhong^{1,2}, BI Yu-an^{1,2}, DU Guan-hua³, XIAO Wei^{1,2}

1. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Pekin Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To research the inhibitory activity of Reduning Injection and its components on neuraminidases (NA) in influenza virus. **Methods** The inhibition of Reduning Injection and its constituents on NA in influenza virus was determined by measuring the fluorescence intensity. **Results** Reduning Injection had strong inhibition on NA in H1N1, H3N2, and B influenza virus, and their half inhibitory concentration (IC_{50}) values were (46.49 ± 2.25) , (49.77 ± 1.77) , and (45.33 ± 5.32) $\mu\text{g/mL}$. *Lonicerae Japonicae Flos* extract as polyamide column wash off concentrate, ethyl acetate extract and residue, column chromatography extracts, implicit chlorogenic acid, different chlorogenic acid A, and different chlorogenic acid B had inhibitory activities on NA in H1N1, H3N2, and B influenza virus. **Conclusion** Reduning Injection and the organic acid from *Lonicerae Japonicae Flos* have certain inhibitory activities on NA in influenza viruses.

Key words: Reduning Injection; influenza virus; neuraminidase (NA)

流感病毒属于正黏病毒科, 为负链 RNA 病毒。其表面分布着 3 种重要的蛋白刺突, 其中两种是糖蛋白, 分别是神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 和血凝素 (hemagglutinin, HA), 第 3 种是基质蛋白 M2。NA 具有病毒复制所必需的酶活性, 促进新形

成的病毒粒子从感染细胞中分离与扩散, 促进病毒粒子从感染的呼吸道黏膜向周围组织扩散^[1-2]; 此外 NA 还同样具有病毒的致病性, 通过改变表面糖蛋白 - 血凝素 (HA) 的碳水化合物部分, 增强病毒株的毒性; 可直接激活 TGF- β , 升高的活性细胞因子

收稿日期: 2013-11-21

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 孙 兰, 女, 主管中药师, 研究方向为中药新药药效筛选与评价。E-mail: sunlan2012@126.com

*通信作者 萧 伟, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。

王振中, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: wzzhz-nj@163.com

浓度能引起细胞的凋亡,引起流感症状和气道炎症的发生^[3]。另外,NA 活性位点的氨基酸序列在甲乙型流感病毒中高度保守,不因病毒株变异而改变其结构和功能,加之 NA 酶晶体结构已被解析^[4],因此,NA 是抗流感病毒的重要靶点,NA 抑制剂是今后开发抗流感药物的研究热点^[5]。通过抑制 NA 活性,可有效地控制甲型、乙型流感病毒感染引起的流感症状和疾病的传播^[6]。目前已在临床上使用的 NA 酶抑制剂包括扎那米韦和奥司他韦。然而,NA 突变而造成的耐药病毒株的出现和药物的副作用,使得扎那米韦和奥司他韦的使用受到了限制。因此,迫切需要开发新型的 NA 抑制剂^[7]。

中医药抗流感在我国有着悠久的历史,抗流感药物方面民间流传着大量的古方、验方、秘方。近些年来,也有不少研究者对中药抗流感效果和机制进行了研究报道。然而,还没有任何报道从中药抑制 NA 活性角度来研究中药抗流感作用。

热毒宁注射液为中药注射液,由青蒿、金银花等组成,临床主要用于呼吸道感染引的高热,对多种呼吸道病毒株致培养细胞病变均有明显抑制作用,对多种细菌菌株的生长亦有一定的抑制作用,另外具有较好的抗炎、增强机体的免疫功能,提高抗病力。热毒宁注射液主要组成药物金银花含挥发油、黄酮类、有机酸、三萜类及无机元素,具有抗菌、抗病毒、增强免疫功能、抗炎解热等作用^[8]。本实验采用经典的 NA 活性检测方法^[9]观察热毒宁注射液、金银花 4 个提取物及热毒宁注射液 HPLC 指纹图谱色谱峰的指认 9 个化合物对流感病毒 NA 的抑制活性。

1 材料

1.1 药物

热毒宁注射液由江苏康缘药业股份有限公司提供,规格:26 g 生药/10 mL,批号 120607;金银花药材购自山东省平邑县,经本课题组鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花;扎那米韦,葛兰素威康制药有限公司,规格:5 mg/片,批号 120121;断氧马钱子苷,江苏康缘药业股份有限公司自制,HPLC 法测定质量分数 $\geq 98\%$,批号 20120316,规格:20 mg/支;绿原酸(批号 110753-201214)、隐绿原酸(批号 MUST-11112203)、新绿原酸(批号 MUST-12112001)、咖啡酸(批号 110885-200102)、栀子苷(批号 110749-201115)、异绿原酸 A(批号 111782-201203)、异绿

原酸 B(批号 MUST-11083102)、异绿原酸 C,(批号 111894-201102)规格均为 20 mg/支,由中国食品药品检定研究院提供。

1.2 试剂与仪器

2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-acetylneuraminic acid (MUNANA)、2-N-吗啡林-乙磺酸(MES)购自 Sigma 公司;氯化钙(CaCl_2)、氢氧化钠(NaOH)和乙醇均为分析纯,购自北京化学试剂公司;Fluostargalary 微板光学测定仪及配套荧光测定 96 孔板购自德国 BMG 公司。

1.3 病毒

流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1)、A/Sydney/5/97 (H3N2), B/Jiangsu/10/2003 (B) 由中国疾病预防控制中心流感病毒中心提供。

2 方法

2.1 样品制备

取金银花药材 200 g,加入 18 倍药材量的沸水,提取 2 次,每次 1 h,收集等倍量药材的蒸馏液待用,提取液浓缩至相对密度为 1.10 (70~80 °C) 后,待用。加入乙醇适量,使乙醇体积分数达到 75%,静置 36 h,滤过,取滤液备用。滤液减压浓缩至无醇味(药材等倍量体积),以 10% NaHCO_3 调节 pH 6.0,药液过 D401 大孔树脂柱(柱体积 2 倍药材量),收集过柱后水液;树脂柱以 2 BV 10%乙醇洗脱,收集洗脱液。将水洗脱液和乙醇洗脱液分别用 10% HCl 调节 pH 3.0,浓缩至药材等倍体积,合并,滤过后上聚酰胺柱吸附(柱体积 2 倍药材量),以水洗脱至药液近无色,再用 2 BV 50%乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇至无醇味,用等倍醋酸乙酯萃取 6 次,浓缩,析出,抽滤,洗涤,减压干燥,得到 4 个样品:水提取浓缩液(金银花 1)、聚酰胺柱洗脱浓缩液(金银花 2)、醋酸乙酯萃取液及残液(金银花 3)、柱色谱提取物(金银花 4),分别冻干后备用。

2.2 流感病毒 NA 的制备

在长满 MDCK 细胞的培养瓶中加入含一定流感病毒的培养上清液(含牛血清清蛋白 1.2 mg/mL、胰酶 5 $\mu\text{g/mL}$ 、无牛血清,其余同细胞培养液),待细胞完全病变后取上清液,1 000 r/min 离心 10 min,以除去细胞碎片。取上清液,加入 NP-40(终浓度 0.1%),作为原酶液。分装,-70 °C 冻存备用。

2.3 热毒宁注射液及金银花提取物对流感病毒神经氨酸酶抑制作用

取热毒宁注射液、4 个金银花提取物的配制溶

液（反应系统中终浓度为 400 μg/mL）10 μL，加入 30 μL 适量稀释的 NA，混匀，置室温中反应，同时设酶液对照、空白对照和扎那米韦阳性药对照（反应系统中终浓度为 0.004 ng/mL）。15 min 后，加 33 mmol/L MES（pH 3.5）缓冲液 10 μL，4 mmol/L 氯化钙 10 μL，20 μmol/L 底物 MUNANA 10 μL，水 30 μL，反应体系总体积为 100 μL，充分混匀，于 37 °C 孵育 60 min，加终止液（150 μL 14 mmol/L NaOH、83%乙醇），测定荧光强度（*A*）值。设定参数：EX=360 nm，EM=450 nm。计算抑制率。如抑制率大于 50%则进行复筛，分 5 个浓度梯度，计算样品对流感病毒 NA 的半数抑制浓度（IC₅₀）。实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_{\text{酶}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{酶}} - A_{\text{空白}}}$$

2.4 热毒宁注射液组分对流感病毒神经氨酸酶抑制作用

取绿原酸、断氧马钱子苷、隐绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、梔子苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C（反应系统中检测浓度为 40 μg/mL）10 μL，加入 30 μL 适量稀释的 NA，混匀，置室温中反应，

同时设酶液对照、空白对照和扎那米韦阳性药对照（反应系统中终浓度为 0.4 ng/mL）。15 min 后，加 33 mmol/L MES（pH 3.5）缓冲液 10 μL，4 mmol/L 氯化钙 10 μL，20 μmol/L 底物 MUNANA 10 μL，水 30 μL，反应体系总体积为 100 μL，充分混匀，于 37 °C 孵育 60 min，加终止液（14 mmol/L NaOH 150 μL、83%乙醇），测定荧光强度值。设定参数：EX=360 nm，EM=450 nm。计算抑制率。如抑制率大于 50%则进行复筛，分 5 个浓度梯度，计算样品对流感病毒 NA 的半数抑制浓度（IC₅₀）。实验重复 3 次。

3 结果

3.1 热毒宁注射液及金银花提取物对流感病毒神经氨酸酶抑制作用

结果表明，热毒宁注射液、金银花水提取浓缩液（金银花 1）、聚酰胺柱洗脱浓缩液（金银花 2）、醋酸乙酯萃取液及残液（金银花 3）、柱色谱提取物（金银花 4）均有抑制 H1N1、B 流感病毒神经氨酸酶作用；热毒宁注射液、金银花 2、金银花 3、金银花 4 均有抑制 H3N2 流感病毒神经氨酸酶作用。结果见表 1~3。

表 1 热毒宁注射液及金银花提取物对 H1N1 流感病毒神经氨酸酶抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Inhibition of Reduning Injection and *Lonicerae Japonicae Flos* extracts on NA in H1N1 influenza virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样 品	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	抑制率/%	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
热毒宁注射液	400	98.34±0.27	46.49±2.25
金银花 1	400	59.14±2.97	317.00±16.28
金银花 2	400	103.92±0.54	15.78±0.24
金银花 3	400	101.93±0.91	73.24±6.91
金银花 4	400	103.77±0.44	46.29±3.63
扎那米韦	0.000 4	96.78±0.64	(4.02±1.81) × 10 ⁻⁵

表 2 热毒宁注射液及金银花提取物对 H3N2 流感病毒神经氨酸酶抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Inhibition of Reduning Injection and *Lonicerae Japonicae Flos* extracts on NA in H3N2 influenza virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样 品	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	抑制率/%	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
热毒宁注射液	400	96.61±2.09	49.77±1.77
金银花 1	400	44.96±3.66	—
金银花 2	400	103.88±0.30	38.27±1.07
金银花 3	400	87.15±1.63	135.61±20.09
金银花 4	400	100.25±1.94	58.00±1.50
扎那米韦	0.000 4	93.71±1.54	(6.47±0.52) × 10 ⁻⁵

“—”表示初筛抑制率小于 50%

“—”indicate screening inhibitory rate below 50%

表 3 热毒宁注射液及金银花提取物对 B 流感病毒神经氨酸酶抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Inhibition of Reduning Injection and *Lonicerae Japonicae Flos* extracts on NA in B influenza virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样 品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
热毒宁注射液	400	98.26±3.04	45.33±5.32
金银花 1	400	57.41±2.75	329.15±31.50
金银花 2	400	106.79±0.87	14.95±3.75
金银花 3	400	97.03±2.86	58.94±1.56
金银花 4	400	102.3±1.33	51.18±8.50
扎那米韦	0.000 4	76.36±6.44	(2.29±0.30) × 10 ⁻⁴

3.2 热毒宁注射液组分对流感病毒 NA 酶抑制作用

结果表明, 绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 均有抑制 H1N1、

B 流感病毒神经氨酸酶作用; 隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 均有抑制 H3N2 流感病毒神经氨酸酶作用。结果见表 4~6。

表 4 热毒宁注射液组分对 H1N1 流感病毒神经氨酸酶抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Inhibition of components in Reduning Injection on NA in H1N1 influenza virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样 品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	40	54.54±1.67	36.02±1.63
断氧马钱子苷	40	0.35±0.00	—
隐绿原酸	40	59.18±2.30	31.74±1.23
新绿原酸	40	55.96±4.80	34.58±3.66
咖啡酸	40	32.39±0.00	—
栀子苷	40	6.35±0.00	—
异绿原酸 A	40	60.41±3.64	30.63±2.87
异绿原酸 B	40	49.25±4.54	38.31±1.78
异绿原酸 C	40	54.21±6.56	32.45±1.80
扎那米韦	0.000 4	96.78±0.64	(4.02±1.81) × 10 ⁻⁵

“—”表示没有进行复筛和计算 IC₅₀。下表同

“—”indicate no screening and calculation of IC₅₀. the same as following

表 5 热毒宁注射液组分对 H3N2 流感病毒神经氨酸酶抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Inhibition of components in Reduning Injection on NA in H3N2 influenza virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样 品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	40	44.41±3.45	—
断氧马钱子苷	40	10.65±0.00	—
隐绿原酸	40	51.14±4.59	36.45±3.03
新绿原酸	40	49.41±3.87	—
咖啡酸	40	34.04±0.00	—
栀子苷	40	3.42±0.00	—
异绿原酸 A	40	56.28±3.84	34.90±3.32
异绿原酸 B	40	53.93±6.62	34.29±2.95
异绿原酸 C	40	48.99±5.73	—
扎那米韦	0.000 4	93.71±1.54	(6.47±0.52) × 10 ⁻⁵

表6 热毒宁注射液组分对B流感病毒神经氨酸酶抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Inhibition of components in Reduning Injection on NA in B influenza virus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	40	57.44±2.28	32.01±2.13
断氧马钱子苷	40	4.52±0.00	—
隐绿原酸	40	56.78±4.02	33.15±2.96
新绿原酸	40	53.87±4.58	36.23±4.33
咖啡酸	40	34.05±0.00	—
栀子苷	40	6.99±0.00	—
异绿原酸 A	40	62.88±3.98	26.21±2.54
异绿原酸 B	40	55.43±3.51	34.74±3.00
异绿原酸 C	40	59.26±5.84	32.51±5.14
扎那米韦	0.000 4	76.36±6.44	(2.29±0.30) × 10 ⁻⁵

4 讨论

热毒宁注射液及金银花药材4个提取物对3种流感病毒神经氨酸酶的抑制活性结果表明,热毒宁注射液对H1N1、H3N2、B流感病毒神经氨酸酶活性较高,IC₅₀分别为(46.49±2.25)、(49.77±1.77)、(45.33±5.32) $\mu\text{g}/\text{mL}$;金银花水提取浓缩液、聚酰胺柱洗脱浓缩液、醋酸乙酯萃取液及残液、柱色谱提取物对流感病毒神经氨酸酶的均有抑制作用,其中聚酰胺柱洗脱浓缩液对流感病毒神经氨酸酶的抑制活性最高,IC₅₀分别为(15.78±0.24)、(38.27±1.07)、(14.95±3.75) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。热毒宁注射液中9个化合物对3种流感病毒神经氨酸酶的抑制活性结果表明,绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C对流感病毒神经氨酸酶均具有抑制作用。

金银花是热毒宁注射液主要组成药味之一,现代研究证明,金银花中主要含挥发油、黄酮类、有机酸、三萜类等成分,有机酸类化合物是金银花的主要有效成分,包括咖啡酸、绿原酸、新绿原酸和异绿原酸等^[10],热毒宁注射液HPLC指纹图谱下有有机酸主要有绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C等^[11],热毒宁注射液生产工艺中采用聚酰胺柱洗脱浓缩液成分包括绿原酸、咖啡酸等有机酸类。

综上所述,热毒宁注射液及其有机酸类成分均有抑制流感病毒神经氨酸酶的作用。

参考文献

[1] Tuzikov A B, Byramova N E, Bovin N V, et al.

Monovalent and polymeric 5N-thioacetamido sialosides as tightly-bound receptor analogs of influenza viruses [J]. *Antiviral Res*, 1997, 33(2): 129-134.

[2] Laver W G, Bischofberger N, Webster R G. Disarming flu viruses [J]. *Sci Am*, 1999, 280(1): 78-87.

[3] Schultz-Cherry S, Hinshaw V S. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta [J]. *J Virol*, 1996, 70(12): 8624-8629.

[4] Xu X, Zhu X, Dwek R A, et al. Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase [J]. *J Virol*, 2008, 82(21): 10493-10501.

[5] 刘艾林,王海娣,杨帆,等.抗流感神经氨酸酶抑制剂的研究进展[J].*药学学报*,2009,44(9):935.

[6] 曹鸿鹏,陶佩珍,杜冠华.流感病毒神经氨酸酶抑制剂筛选模型的建立和应用[J].*药学学报*,2002,37(12):930-933.

[7] 田野,杨品,尹志东,等.抗流感病毒药物神经氨酸酶抑制剂的研究进展[J].*中国药物化学杂志*,2010,20(6):531-541.

[8] 王振中,鲍琳琳,孙兰,等.热毒宁注射液抗甲型H1N1流感病毒作用机制研究[J].*中草药*,2014,45(1):90-93.

[9] Potier M, Mameli L, Bèlisle M, et al. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-alpha-D-N-acetylneuraminatate) substrate [J]. *Anal Biochem*, 1979, 94(2): 287-296.

[10] 李文龙,张文明,薛东升,等.测定金银花中6种有机酸类化合物含量的一种新方法[J].*浙江大学学报:医学版*,2012,41(1):13-18.

[11] 毕宇安,王振中,宋爱华,等.热毒宁注射液高效液相色谱指纹图谱研究及多成分定量分析[J].*世界科学技术:中医药现代化*,2010,12(2):298-303.