

• 实验研究 •

芦丁对流感病毒的体外抑制作用及其机制研究

丁 玥^{1,2}, 曹泽戩^{1,2}, 柯志鹏^{1,2}, 曹 亮^{1,2}, 李 娜^{1,2}, 丁 岗^{1,2}, 王振中^{1,2}, 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

摘要: **目的** 研究芦丁对流感病毒的体外抑制作用并探讨其机制。 **方法** 利用流感病毒感染 MDCK 细胞模型, 观察芦丁对流感病毒的体外抑制作用; 结合流感病毒感染前、感染同时及感染后加药的不同方式探索芦丁作用于流感病毒生命周期的具体阶段; 采用荧光底物法考察芦丁对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用。 **结果** 芦丁对 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)、A/FM1/1/47(H1N1)、A/Human/Hubei/3/2005(H3N2)、A/Beijing/32/92 (H3N2)4 株流感病毒均具有体外抑制作用, 其中对 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)株的半数有效浓度 (EC₅₀) 最小, 选择指数 (SI) 最大, 体外药效最好。芦丁在流感病毒感染后给药的效果最为明显, 对流感病毒 A/FM1/1/47(H1N1)的 IC₅₀ 最小, 对神经氨酸酶活性抑制作用相对最好。 **结论** 芦丁抑制了流感病毒神经氨酸酶活性, 具有较好的体外抗流感病毒作用。

关键词: 芦丁; 流感病毒; 神经氨酸酶抑制剂; 抗病毒药物

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)12-1431-06

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.12.001

Inhibition of rutin against influenza virus *in vitro* and its mechanismDING Yue^{1,2}, CAO Ze-yu^{1,2}, KE Zhi-peng^{1,2}, CAO Liang^{1,2}, LI Na^{1,2}, DING Gang^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

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

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

Abstract: Objective To study the inhibition of rutin against influenza virus *in vitro* and explore its mechanism. **Methods** To establish the MDCK cell models infected by influenza virus, and inhibition of rutin against influenza virus *in vitro* was observed. The specific stages of influenza virus infection treated by rutin were evaluated before, during and after infection. Inhibition of rutin against neuraminidase activities of influenza virus were studied by fluorescent substrate method. **Results** Rutin exhibited antiviral activity against A/PuertoRico/8/1934(H1N1), A/FM1/1/47(H1N1), A/Human/Hubei/3/2005(H3N2), and A/Beijing/32/92(H3N2), especially on A/PuertoRico/8/1934(H1N1) with minimum EC₅₀, maximum SI, and best efficacy *in vitro*. The effect is the most obvious treated by rutin administration after infected with influenza virus. With IC₅₀ value on A/FM1/1/47(H1N1) influenza virus minimum, rutin inhibited the relatively the best activity of neuraminidase. **Conclusion** Rutin inhibits activity of neuraminidase of influenza virus, and has good anti-influenza effects *in vitro*.

Key words: rutin; influenza virus; neuraminidase inhibitor; antiviral drug

流行性感冒是流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 发病率高, 流行广泛, 传播迅速^[1]。在世界范围内, 每次流行性感冒流行造成 300~500 万例严重疾病患者和 25~50 万例患者死亡^[2]。由于流感病毒有多种亚型, 各亚型抗原容易发生重组和/或变异,

特异性疫苗的研发相对滞后。目前获 FDA 许可的抗流感药物主要有两类: 一类为 M2 离子通道阻断剂 (金刚烷胺和金刚乙胺), 另一类是神经氨酸酶抑制剂 (扎那米韦和奥司他韦)^[3]。但是金刚烷胺类药物存在神经系统毒性, 仅对甲型流感病毒有效,

收稿日期: 2015-09-17

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 丁 玥, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中药新药筛选与药理。Tel: 18651895078 E-mail: neverreturn7@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: kanionlunwen@163.com

而奥司他韦的生产成本高,因此新的抗病毒药物的研发迫在眉睫。神经氨酸酶抑制剂通过抑制流感病毒神经氨酸酶的活性阻断病毒的进一步感染和扩散,避免病毒颗粒分散而导致的免疫逃逸现象,因此神经氨酸酶抑制剂是抗流感药物研究的热点之一。芦丁(即芸香苷,结构式见图 1)是植物界分布较广的一种黄酮类化合物^[4-6],临床上主要用于脆性增加的毛细血管出血症。王艳芳^[7]研究表明芦丁对流感病毒感染导致的小鼠肺部病变具有保护作用,因此本研究复制了体外模型,围绕芦丁抑制流感病毒药效及其可能的作用机制进行了研究。

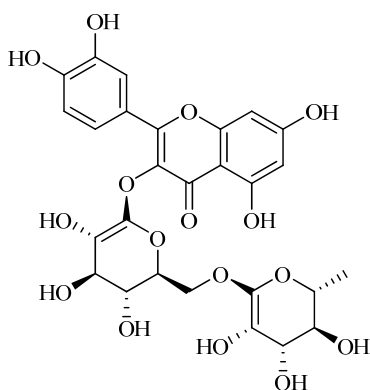


图 1 芦丁的结构式

Fig. 1 Structure of rutin

1 材料

芦丁购于中国食品药品检定研究院,质量分数为 98%,规格 40 mg/支,批号 201409。奥司他韦羧酸盐购自上海佰世凯化学科技有限公司,批号 20130207,质量分数 $\geq 95\%$,规格 500 mg。

狗肾传代细胞(MDCK 细胞株)购于美国 ATCC 细胞库,由江苏康缘现代中药研究院保存。RPMI-1640 培养基购自南京凯基生物科技发展有限公司,批号 20141023,细胞生长液中含 10%胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素。细胞维持液中除 2%胎牛血清外,其他组成同细胞生长液。

流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)、A/FM1/1/47(H1N1)、A/Human/Hubei/3/2005(H3N2)、A/Beijing/32/92 (H3N2)由中国科学院武汉病毒研究所陈绪林研究员惠赠,由江苏康缘现代中药研究院保存。9~11 d 龄鸡胚(SPF 级)尿囊腔中传代培养,3 000 r/min 离心 5 min,经 0.22 μm 滤膜滤过除菌,经血凝试验测定血凝滴度大于 1:512 后分装,置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

MTS 细胞增殖定量检测试剂盒购于 Promega 公司,批号 0000105328。2-吗啉乙磺酸(MES)购于上海沃凯化学试剂有限公司,批号 20140901。MES 缓冲液含 32.5 mmol/L MES、4 mmol/L CaCl_2 、NaOH 调节 pH 6.5。神经氨酸酶荧光底物(4-甲基伞形酮)-*N*-乙酰基- α -*D*-神经氨酸(MUNANA)购于 Sigma 公司,批号 SLBH6262V。

Flex Station 3 多功能微孔板读数仪购自 Molecular Devices 公司;CKX41 倒置显微镜购自 Olympus 公司;FormaSteri-Cycle371 二氧化碳培养箱购自 Thermo Scientific 公司;HFsafe-1200 生物安全柜购自 Heal Force 公司。

2 方法

2.1 MDCK 细胞种板及培养

MDCK 细胞用含 10%胎牛血清的 1640 培养基按 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种到 96 孔板中,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜形成细胞单层,约铺满 96 孔板底 70%^[2,8-9]。

2.2 芦丁对 MDCK 细胞的毒性作用

MDCK 细胞种板培养 24 h 后,弃去上清,PBS 清洗 1 次后给药。芦丁用细胞维持液稀释至 100、200、400、500、1 000、1 500 $\mu\text{mol/L}$,按 100 μL /孔给药。同时设置正常细胞对照组(给予 100 μL 细胞维持液),每组设置 3 个复孔。细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。培养 48 h 后,弃去孔内上清液,避光加入含 10% MTS 的无血清 1640 培养基(100 μL /孔),孵育 2 h 后测定 A_{490} ,取 3 个孔的均值,确定芦丁的最大无毒浓度^[10]。实验重复 3 次,计算芦丁对 MDCK 细胞的半数毒性浓度(CC_{50})。

2.3 芦丁对流感病毒的体外抑制作用

MDCK 细胞种板培养 24 h 后,弃上清,PBS 清洗,加入无血清 1640 培养基稀释的流感病毒 A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) 感染细胞(100 TCID_{50}),每孔 100 μL ,35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,弃去病毒液^[11-12]。分别按 100 μL /孔加入含芦丁 20、50、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 细胞维持液,同时设对照组、模型组及 2 $\mu\text{mol/L}$ 奥司他韦羧酸盐组,每组设置 3 个复孔。细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h,观察细胞病变现象,并于倒置显微镜下拍照记录。48 h 后弃上清,避光加入含 10% MTS 的无血清 1640 培养基,每孔 100 μL ,孵育 2 h 后测定 A_{490} ,取 3 个孔的平均值。实验共重复 3 次。计算芦丁对病毒的抑制率、半数有效浓度(EC_{50})和选择指数(SI)。

$$\text{抑制率} = (A_{490 \text{ 给药}} - A_{490 \text{ 模型}}) / (A_{490 \text{ 正常}} - A_{490 \text{ 模型}})$$

$$\text{SI} = \text{CC}_{50} / \text{EC}_{50}$$

为考察芦丁抗流感病毒的广谱性, 另外分别以 A/FM1/1/47(H1N1)株、A/Beijing/32/92(H3N2)株和 A/Human/Hubei/3/2005(H3N2)株建模, 考察芦丁抗流感病毒作用的体外药效, 方法同上。

2.4 芦丁对不同剂量流感病毒的体外抑制作用

MDCK 细胞种板培养 24 h 后, 弃上清, PBS 清洗, 采用无血清 1640 培养基将病毒稀释至 0.1、0.2、0.5 MOI, 分别感染细胞 (100 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后, 弃去病毒液。分别加入含 100、300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 芦丁的细胞维持液, 同时设置对照组和不同病毒感染剂量的模型组, 每组设置 3 个复孔。细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后, 观察细胞病变现象^[13-14]。48 h 后检测细胞增殖情况, 计算抑制率。

2.5 芦丁加药方式对流感病毒的体外抑制作用

2.5.1 病毒感染前给药 MDCK 细胞种板后, 培养 12 h 后, 弃上清, 按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入含芦丁 20、50、100、200、300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 细胞维持液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 12 h 后弃上清, PBS 清洗后, 加入无血清 1640 培养基稀释的流感病毒感染细胞 (100 TCID_{50}), 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 弃病毒液上清, 换细胞维持液^[2]。

2.5.2 病毒感染同时给药 MDCK 细胞种板后, 培养 24 h 后, 弃上清及 PBS 清洗后, 加入含芦丁和流感病毒的无血清 1640 培养基各 50 μL , 芦丁终浓度为 20、50、100、200、300 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 流感病毒造模剂量为 100 TCID_{50} , 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后弃病毒液上清, 换细胞维持液^[15]。

2.5.3 病毒感染后给药 MDCK 细胞种板后, 培养 24 h 后, 弃上清, PBS 清洗, 加入无血清 1640 培养基稀释的流感病毒 (100 TCID_{50}), 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后, 弃去病毒液^[11-12], 分别按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入含芦丁 20、50、100、200、300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 细胞维持液^[16]。

实验同时设对照组和模型组。以上各组细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 观察细胞病变现象。48 h 后检测细胞增殖情况, 计算抑制率。

2.6 芦丁对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用

病毒的神经氨酸酶可以特异性地分解荧光底物 MUNANA, 产生的荧光强度与神经氨酸酶的活性呈正相关^[3, 17]。实验在 96 孔黑板中进行, 除背景组外

各孔分别加入 30 μL MES 缓冲液 10 倍稀释的 A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) 病毒尿囊液, 再加入 10 μL 含芦丁 20、50、100、200、300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MES 缓冲液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后避光加入 MUNANA (0.1 mmol/L, 溶于 MES 缓冲液) 20 μL 。实验同时设置对照组 (不加芦丁) 和背景组 (不加芦丁和尿囊液), 反应体系用 MES 缓冲液统一加至 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后, 按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入终止液 (含 14 mmol/L NaOH 和 83% 乙醇), 于 $E_x=360 \text{ nm}$ 、 $E_m=440 \text{ nm}$ 处测定荧光强度 (F) 值^[18-19], 计算芦丁对于神经氨酸酶的抑制率, IC_{50} 定义为神经氨酸酶酶活下降 50% 时芦丁的浓度。

$$\text{抑制率} = (F_{\text{对照}} - F_{\text{加药}}) / (F_{\text{对照}} - F_{\text{背景}})$$

为考察芦丁对不同流感病毒株神经氨酸酶活性的抑制作用, 分别以 A/FM1/1/47(H1N1)、A/Beijing/32/92(H3N2)、A/Human/Hubei/3/2005(H3N2) 株的尿囊液建模, 方法同上。

2.7 统计方法

采用 SPSS 18.0 for Windows 统计分析软件进行统计学分析, 各组间差异比较用方差分析。

3 结果

3.1 芦丁对 MDCK 细胞的毒性作用

0~300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 芦丁对 MDCK 细胞的正常生长没有影响, 细胞形态在镜下未见明显改变。MTS 法测定表明当芦丁浓度小于 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, $A_{490 \text{ nm}}$ 也未出现明显的下降, MDCK 细胞存活率大于 95%; 当芦丁浓度大于 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 细胞活力逐步下降, 呈明显的浓度相关性。见图 2。因此芦丁在 0~300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 对 MDCK 细胞没有细胞毒性, 可用于考察其体外抗病毒药效。根据上述结果可得芦丁对 MDCK 细胞的 CC_{50} 为 1 075.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

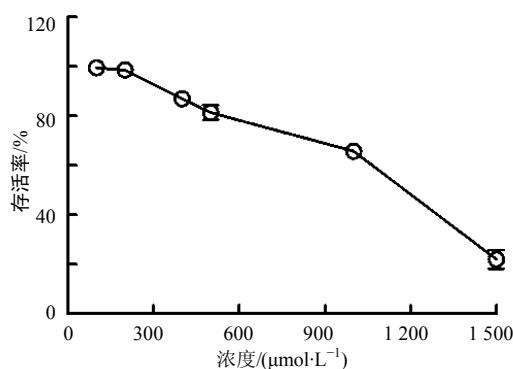


图 2 芦丁对 MDCK 细胞的细胞毒性

Fig. 2 Cellular toxicity of rutin on MDCK cells

3.2 芦丁对流感病毒的体外抑制作用

流感病毒感染 MDCK 细胞后，导致细胞发生明显的病变，致使细胞活力显著下降。芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) 具有明显的体外抑制作用，镜下可见芦丁逐步减轻病毒导致的 MDCK 细胞病变 (图 3)；随着芦丁剂量的增加，对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) 的抑制作

用逐渐增强，其中 300 μmol/L 芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) 的抑制作用显著优于奥司他韦 ($P < 0.05$)，见表 1。

随着流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)感染细胞的剂量增加，MDCK 细胞活力逐步下降，细胞病变程度加剧，芦丁对流感病毒的抑制作用随着病毒感染剂量的增加而逐渐减弱，见表 2。

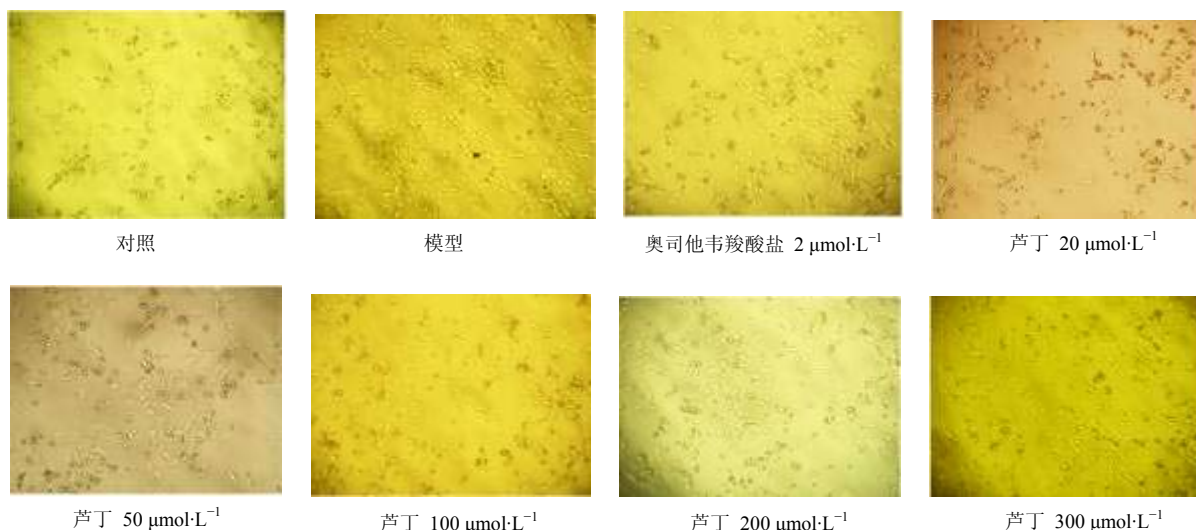


图 3 芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) 感染引起细胞病变的影响

Fig. 3 Effect of rutin against virus infection caused by influenza virus A/PuertoRico/8/1934(H1N1)

表 1 芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)的体外抑制作用

Table 1 Inhibitory effects *in vitro* of rutin against influenza virus A/PuertoRico/8/1934(H1N1)

化合物	浓度/(μmol·L ⁻¹)	抑制率/%
奥司他韦羧酸盐	2	52.15 ± 7.10
芦丁	20	8.61 ± 2.14
	50	26.53 ± 1.48
	100	33.36 ± 1.30
	200	57.54 ± 5.35
	300	67.18 ± 5.21*

与奥司他韦羧酸盐组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs oseltamivir carboxylate group

芦丁对 4 株病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)、A/FM1/1/47(H1N1)、A/Human/Hubei/3/2005(H3N2)、A/Beijing/32/92 (H3N2)的 EC₅₀ 和 SI 见表 3。结果表明芦丁对 4 株流感病毒均具有体外抑制作用，其中对 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)株的 EC₅₀ 最小，SI 最大，提示芦丁对该毒株体外药效最好。

表 2 芦丁对不同剂量流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1)感染的体外抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of rutin against influenza virus A/PuertoRico/8/1934(H1N1) with different MOI

浓度/ (μmol·L ⁻¹)	抑制率/%		
	0.1 MOI	0.2 MOI	0.5 MOI
100	33.35 ± 5.86	23.43 ± 6.49	9.69 ± 5.18
300	61.91 ± 9.98	41.17 ± 2.43	25.72 ± 3.11

表 3 芦丁对不同流感病毒体外药效

Table 3 Antiviral activity of rutin against different strains of influenza virus *in vitro*

流感病毒毒株	EC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	SI
A/PuertoRico/8/1934(H1N1)	158.2	6.8
A/FM1/1/47(H1N1)	160.1	6.7
A/Beijing/32/92(H3N2)	187.2	5.7
A/Human/Hubei/3/2005(H3N2)	161.8	6.6

3.3 芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1) 不同阶段的抑制作用

进一步通过病毒感染前、感染同时和感染后给药研究芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1) 生命周期不同阶段的抑制效应, 见表 4。50~300 $\mu\text{mol/L}$ 芦丁于感染前给药对宿主细胞表面结构没有影响, 感染同时给药对流感病毒入侵宿主细胞无明显阻断作用, 然而于感染后给药对病毒的药效显著优于其他两种给药方式 ($P < 0.01$), 并呈剂量相关性。提示芦丁在流感病毒感染后给药的效果最为明显, 主要抑制流感病毒感染后的阶段, 包括子代病毒颗粒的释放和扩散等, 从而阻断流感病毒的进一步感染。

表 4 芦丁对流感病毒生命周期不同阶段的抑制作用

Table 4 Inhibitory effects of rutin on different stage of influenza virus infection

浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%		
	感染前给药	感染同时给药	感染后给药
20	0.86±2.47	0.37±0.61	1.19±2.82
50	0.15±0.76	0.00±1.25	19.81±2.13**▲▲
100	0.86±3.51	0.43±1.79	31.22±2.99**▲▲
200	2.07±2.09	0.74±1.07	42.49±10.19**▲▲
300	2.74±2.06	1.05±1.31	60.85±5.02**▲▲

与感染前给药比较: ** $P < 0.01$; 与感染同时给药比较: ▲▲ $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs treatment before infection; ** $P < 0.01$ vs infection

3.4 芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1) 神经氨酸酶的抑制作用

芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1) 的神经氨酸酶活性的抑制作用具有剂量相关性, 见表 5。随着芦丁浓度升高, 荧光强度减弱, 表明神经氨酸酶活性逐步被抑制。

表 5 芦丁对流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1) 神经氨酸酶的抑制作用

Table 5 Inhibition of rutin on neuraminidase of influenza A/PuertoRico/8/1934(H1N1) virus

浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%
20	15.81±5.10
50	28.43±5.41
100	45.07±6.32
200	67.17±7.84
300	80.93±6.36

芦丁对 4 株流感病毒神经氨酸酶的 IC_{50} 见表 6。结果表明芦丁对 4 株流感病毒活性均具有体外抑制作用, 其中对流感病毒 A/FM1/1/47(H1N1) 的 IC_{50} 最小, 提示芦丁对该毒株神经氨酸酶活性抑制作用相对最好。

表 6 芦丁抑制流感病毒神经氨酸酶的 IC_{50}

Table 6 IC_{50} values of rutin against neuraminidase of different strains

流感病毒毒株	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol/L}$
A/PuertoRico/8/1934(H1N1)	119.4
A/FM1/1/47(H1N1)	110.9
A/Beijing/32/92(H3N2)	129.3
A/Human/Hubei/3/2005(H3N2)	120.2

4 讨论

与化学药相比, 中药和天然药物具有更广泛的适应性和优越性。当病毒发生变异、对化学药产生耐药性的情况下, 中药和天然药物仍具有潜在治疗作用。中草药在我国资源丰富, 价格低廉, 为新药研制提供了物质和结构基础, 具备广阔的研究与开发前景。

本研究探讨了芦丁对流感病毒的体外抑制活性, 结果表明, 芦丁对 A/PuertoRico/8/1934(H1N1) 具有显著的体外抑制作用, 且呈现良好的剂量相关性, 同时, 芦丁对流感病毒 A/FM1/1/47(H1N1)、A/Beijing/32/92(H3N2)、A/Human/Hubei/3/2005(H3N2) 毒株也表现出较好的体外抑制作用, 表明其抗流感病毒活性具有一定的广谱性。研究结果表明, 芦丁仅在流感病毒感染后给药后表现出抗流感病毒活性, 说明芦丁可能作用于流感病毒的释放和扩散阶段。在此阶段, 神经氨酸酶主要通过水解唾液酸残基, 切断病毒颗粒与宿主细胞间的联系, 使新生流感病毒颗粒从宿主细胞释放, 造成进一步感染。进一步的研究发现, 芦丁对流感病毒神经氨酸酶具有显著的抑制作用, 解释了芦丁仅在流感病毒感染后加药有效的现象, 提示其抗流感病毒的作用机制可能与对神经氨酸酶的抑制作用有关。有趣的是, 芦丁在酶水平上的抑制浓度及作用趋势与其在细胞水平上对流感病毒的抑制浓度及作用趋势接近, 进一步表明神经氨酸酶可能是芦丁抑制流感病毒的作用靶点之一。

综上所述, 本研究证实了芦丁体外具有直接抑制流感病毒的作用, 阐述了抑制流感病毒神经氨酸

酶是芦丁抗流感病毒活性的主要机制之一,为进一步探索芦丁应用于抗流感药物开发和治疗奠定了基础。本研究仍存在一些需要深入研究的部分,如本实验明确了芦丁对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用,但是对于芦丁与神经氨酸酶的结合方式尚需进一步的探索,这将有助于研究芦丁的广谱性以及预测其对耐药病毒株的敏感性。

参考文献

- [1] Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, *et al.* Anti-influenza viral effects of honey in vitro: potent high activity of manuka honey [J]. *Arch Med Res*, 2014, 45(5): 359-365.
- [2] Ding Y, Dou J, Teng Z, *et al.* Antiviral activity of baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3269-3278.
- [3] Müller P, Downard K M. Catechin inhibition of influenza neuraminidase and its molecular basis with mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 111: 222-230.
- [4] 金越, 吕勇, 韩国柱等. 槲皮素及异槲皮素、芦丁抗自由基活性的比较研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(3): 408-412.
- [5] 周鹏, 吴建章, 仇佩虹等. 芦丁-硒配合物的合成及抗肿瘤活性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2007, 42(24): 1905-1907.
- [6] 周新妹, 姚慧, 夏满莉等. 槲皮素与芦丁对离体大鼠主动脉环的舒张作用及机制 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2006, 35(1): 29-33.
- [7] 王艳芳, 王新华, 朱宇同等. 芦丁对甲型流感病毒抑制作用实验研究 [J]. *中医药学刊*, 2005, 23(5): 827.
- [8] Cai W, Li Y, Chen S, *et al.* 14-Deoxy-11,12-dehydroandrographolide exerts anti-influenza A virus activity and inhibits replication of H5N1 virus by restraining nuclear export of viral ribonucleoprotein complexes [J]. *Antiviral Res*, 2015, 118: 82-92.
- [9] Droebner K, Pleschka S, Ludwig S, *et al.* Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antiviral Res*, 2011, 92(2): 195-203.
- [10] 李长山, 王聚乐, 普珍等. 藏药多刺绿绒蒿提取物体外抗流感病毒作用的初步研究 [J]. *中药药理与临床*, 2012(5): 130-132.
- [11] Kai H, Obuchi M, Yoshida H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08) [J]. *J Funct Foods*, 2014, 8: 214-223.
- [12] 郭姗姗, 高英杰, 马雪萍等. 一叶抗流感胶囊抑制甲型 H1N1 流感病毒感染的体内外研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(18): 123-127.
- [13] 刘蓉, 何婷, 曾南, 等. 桂枝挥发油及桂皮醛抗流感病毒的机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(11): 1460-1464.
- [14] 徐军烈, 蒋维尔. 石香薷水提物抗流感病毒作用研究 [J]. *浙江中医杂志*, 2013, 48(4): 273-274.
- [15] Hsieh C F, Lo C W, Liu C H, *et al.* Mechanism by which ma-xing-shi-gan-tang inhibits the entry of influenza virus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(1): 57-67.
- [16] Saha R K, Takahashi T, Kurebayashi Y, *et al.* Antiviral effect of strictinin on influenza virus replication [J]. *Antiviral Res*, 2010, 88(1): 10-18.
- [17] Couzens L, Gao J, Westgeest K, *et al.* An optimized enzyme-linked lectin assay to measure influenza A virus neuraminidase inhibition antibody titers in human sera [J]. *J Virol Methods*, 2014, 210C: 7-14.
- [18] Wang D, Sleeman K, Huang W, *et al.* Neuraminidase inhibitor susceptibility testing of influenza type B viruses in China during 2010 and 2011 identifies viruses with reduced susceptibility to oseltamivir and zanamivir [J]. *Antiviral Res*, 2013, 97(3): 240-244.
- [19] Tian L, Wang Z, Wu H, *et al.* Evaluation of the anti-neuraminidase activity of the traditional Chinese medicines and determination of the anti-influenza A virus effects of the neuraminidase inhibitory TCMs *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 534-542.
- [20] Takashita E, Meijer A, Lackenby A, *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014 [J]. *Antiviral Res*, 2015, 117: 27-38.