

表 5 大鼠 iv 和 ig 黄蜀葵花提取物后 4 种黄酮类成分整合后的主要药动学参数 (n = 6)

Table 5 Pharmacokinetic parameters of integrated four flavonoids after ig and iv administration of EAM, respectively (n = 6)

参数	单位	iv	ig
房室模型		三室	双室
$t_{1/2\alpha}$	min	0.50	31.00
$t_{1/2\beta}$	min	10.55	69.32
$t_{1/2\gamma}$	min	69.32	
CL	$L \cdot \min^{-1} \cdot kg^{-1}$	4.33	
$AUC_{0-\infty}$	$mg \cdot \min \cdot L^{-1}$	585.02	346.37
Ka	$\min^{-1}$		0.03
t_{max}	min		60.00
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$		1.16

皮素-3'-葡萄糖苷、杨梅黄酮、槲皮素的 SPE-HPLC 法^[9]。本实验采用 HPLC-UV 法,同时测定大鼠血浆中金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-葡萄糖醛酸、槲皮素-3'-葡萄糖苷。该法简便、灵敏、准确,为黄蜀葵花的进一步开发和临床合理用药奠定了理论基础。

4.2 药动学结果探讨:大鼠 iv、ig 给予黄蜀葵花提取物后,4 种黄酮类成分的药动学参数差异较大,说明它们的体内过程不同。金丝桃苷 iv 给药后符合三室模型,与文献报道一致^[10];异槲皮苷 ig 给药后的 t_{max} 为 60 min,从 4 种成分 ig 给药后的 Ka 值:0.06、0.03、0.01、0.04 $\min^{-1}$ 可以看出,棉皮素-8-葡萄糖醛酸的吸收较慢,这可能是因其含有较大的葡萄糖醛酸基团,难以通过细胞膜造成的。

4.3 中药整合药动学探讨:中药的药效作用是多组分多靶点的综合效应结果,某一成分或多成分的孤

立药动学特性不能用于表征中药的整体药动学特性,而整合药动学更能从整体上表征中药药动学行为,此法为黄蜀葵花提取物生物利用度的研究开辟了一条新的道路,也为建立符合中医药特点的中药药动学理论进行了新的尝试。然而,本研究反应整体效应物质在生物体内的存留特性,与整体药效作用的关联上还有不足之处,故以后将试图进行整合药动学与整合药效学相结合的研究,这对进一步完善中药药动学研究体系有着重要意义。

参考文献:

- [1] 谭业华,陈珍,顾种宜. 中草药黄蜀葵的研究现状与展望[J]. 海南师范学院学报:自然科学版, 2006, 19(2): 163-167.
- [2] 李康慧,尹友生. 黄葵胶囊治疗慢性肾炎的临床研究[J]. 华夏医学, 2006, 19(1): 59-60.
- [3] 陈刚,张慧娟,屠爱萍,等. 黄蜀葵花的脂溶性成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 827-828.
- [4] 王先荣,周正华,杜安全,等. 黄蜀葵花黄酮成分的研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(2): 91-93.
- [5] 池玉梅,朱华云,居玲,等. 高效液相-四极杆飞行时间串联质谱分析黄蜀葵花中黄酮醇类化合物[J]. 分析化学, 2009, 37(2): 227-231.
- [6] 李庆林,陈志武,马传庚. 金丝桃苷对原代培养的大鼠心肌细胞缺氧-再给氧损伤的影响[J]. 中草药, 2006, 37(4): 575-577.
- [7] 王卫星,胡新颖,刘鹏,等. 金丝桃苷等 10 个天然黄酮类化合物的抗抑郁活性筛选研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 900-902.
- [8] 郝海平,郑超南,王广基. 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索[J]. 药学报, 2009, 44(3): 270-275.
- [9] Lai X Y, Zhao Y Y, Liang H, et al. SPE-HPLC method for the determination of four flavonols in rat plasma and urine after oral administration of *Abelmoschus manihot* extract[J]. J Chromatog B, 2007, 852: 108-114.
- [10] 王晓剑,郝旭亮,梁泰刚,等. HPLC 测定金丝桃苷的血药浓度及其在药动学研究中的应用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(3): 231-233.

贯叶连翘提取物抗甲 1 型流感病毒活性的研究

蒲秀瑛¹,梁剑平^{2,3*},王学红³,华兰英³,刘宇³

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730050; 2. 中国科学院兰州近代物理研究所,甘肃 兰州 730000; 3. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,甘肃 兰州 730050)

摘要:目的 研究贯叶连翘提取物内外对甲 1 型流感病毒 (IAV) 活性的影响。方法 以细胞存活率和抑制率为指标,采用 MTT 比色法检测贯叶连翘提取物体外抑制 IAV 活性的效应;体内实验以流感病毒滴鼻感染小鼠,分别 ig 给药,观察小鼠死亡率、生命延长率及小鼠病毒性肺炎的改变,判定其抗流感病毒作用。结果 贯叶连翘提取物在体外随药物质量浓度的增加其细胞存活率和病毒抑制率明显升高,与病毒对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$);并可降低流感病毒感染小鼠的死亡率,延长存活时间,明显减轻小鼠病毒性肺炎的症状 ($P < 0.01$)。

结论 贯叶连翘提取物在体内外均有良好的抗 IAV 活性的作用。

关键词:贯叶连翘;甲 1 型流感病毒;达菲;抗病毒活性

中图分类号:R286.87

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0259-06

* 收稿日期:2009-05-28

基金项目:中国科学院“百人计划”资助项目 (2008-287)

作者简介:蒲秀瑛(1968—),女,四川人,副教授,博士,研究方向为抗病毒药物的研制与开发。E-mail: puh102@163.com

* 通讯作者 梁剑平 E-mail: liangjp100@sina.com

Inhibition of *Hypericum perforatum* extract on influenza A virus

PU Xiu-ying¹, LIANG Jian-ping^{2,3}, WANG Xue-hong³, HUA Lai-ying³, LIU Yu³

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 3. Lanzhou Institute of Animal and Veterinary Pharmaceutics Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract : Objective To study the antiviral effect of *Hypericum perforatum* extract (HPE) on influenza A virus (IAV) *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Cell survival rate and inhibition rate were served as target to evaluate antiviral activity of HPE by MTT. Kunming mice infected with intranasal IAV were treated by ig HPE and Oseltamivir *in vivo*, respectively. The major criteria for evaluating the effects of HPE on mortality, life-prolong rate, and viral pneumonia of mice. **Results** The results showed that cell survival rate and inhibitory rate increased with the increasing concentration of HPE *in vitro*. There were significant differences as compared with the virus control group ($P < 0.01$). HPE could decrease the mortality of mice infected with IAV, prolong survival time, and reduce that symptoms of viral pneumonia ($P < 0.01$). **Conclusion** These results indicates that HPE showed an obvious antiviral activity on IAV *in vitro* and *in vivo*.

Key words: influenza A virus (IAV); *Hypericum perforatum* L. extract (HPE); Oseltamivir; antiviral activity

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒(Influenza virus, IFV)引起的一种发病率高、流行广泛、传播迅速的急性病毒性呼吸道传染病,已严重危害人类的身体健康,是人类至今尚未有效控制的世界性传染病之一。历史上几次大规模的流感流行,曾给人类带来深重的灾难,每年有 15%~20% 的人群被流感病毒感染,在世界范围内导致至少 50 万人死亡^[1]。目前预防流感的主要措施是疫苗接种,但由于流感病毒的抗原变异,上一次流感发病期间所用的疫苗对下一次流感暴发会失去预防作用,而且,目前尚缺乏可靠的方法对流感的发生与流行的周期性进行有效预测。因此,即使注射了疫苗,并不能保证不患异型的流感,所以,抗流感病毒药物的研究正受到世界各国的广泛重视。化学药抗流感病毒具有见效快、疗效高、作用准确等特点,但每类药物只是针对某种或某类特定的流感病毒起作用,使得化学药物难以发挥理想的作用。而许多中药具有抑制病毒复制、阻止病毒致细胞病变等功效,通过调节免疫功能、改善肺循环、镇痛抗炎等综合作用,从而抑制或杀灭病毒^[2]。因此,中医药在治疗流感方面具有独特的优势和广阔的发展前景。

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 属于藤黄科,近年来研究发现,该属植物具有抗病毒^[3,4]、抗菌、抗炎^[5]和增强免疫功能^[6]等药理活性。目前,贯叶连翘提取物作为药物已在德国、英国等国家上市,主要用于治疗抑郁症^[7]和艾滋病^[8]等。贯叶连翘也因此成为世界最畅销草药之一,并成为国际研究开发的热点之一。贯叶连翘中最具有生物活性的物质金丝桃素和伪金丝桃素为其主要的药理活性物

质^[9],本课题组曾经进行过金丝桃素抗禽流感病毒^[10]和口蹄疫病毒^[11]的研究,均取得了良好的效果。为探讨贯叶连翘提取物是否具有体内外抗流感病毒作用,本实验观察贯叶连翘提取物对甲 1 型流感病毒的作用,从而为新型抗病毒药物的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物:贯叶连翘采自甘肃陇南,经甘肃省药品检验所鉴定为藤黄科金丝桃属多年生草本植物贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 的干燥叶。贯叶连翘提取物由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所农业部新兽药工程重点开放实验室制备,含金丝桃素 4.73% (高效液相色谱法测定),溶于极少量的二甲基亚砜中,以细胞维持液稀释成所需浓度用于体外实验;用少量聚山梨酯-80 溶解后以蒸馏水释成体内实验所用药物浓度。达菲(奥司他韦尔)由中国农业大学提供,对狗肾细胞(MDCK)的最大无毒浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 细胞和病毒株:MDCK 细胞,由甘肃省疾病预防控制中心流感病毒实验室提供。细胞生长液为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,维持液为含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基,病毒分离液为含 40 $\mu\text{g/mL}$ 胰蛋白酶的 MEM 培养基。甲 1 型流感病毒鼠肺适应株(A/PR/8/1934, IAV),由中国疾病预防控制中心提供,经 10 日龄鸡胚尿囊腔接种培养传代,微量血凝试验滴定病毒效价,血凝效价测定 1:256 为体外实验用;1:512 的病毒株为体内实验用毒株。正式实验前测定小鼠病毒半数致死量(LD₅₀)。

1.3 实验动物:昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,由兰州大学动物实验中心提供。

1.4 仪器和试剂:DMEM 培养基、MTT (Sigma 公司),L-谷氨酰胺(华绿渊生物技术)、二甲基亚砜(DMSO) (Sigma 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶(绿生源生物技术);座式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安),离心机(Anke TDL80—2B),CO₂ 培养箱(SHEL-LAB),倒置显微镜(奥林巴斯),生物安全柜(上海瑞仰净化装备有限公司),酶标仪(Thermo Multiskan MK3)。

1.5 病毒感染性滴度的测定^[12]:将生长良好的 MDCK 细胞加入 96 孔板,待细胞长成致密单层后,用未含抗生素的维持液将血凝效价为 1/256 甲 1 型流感病毒以 10 倍第次稀释法稀释成 9 种不同浓度(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9}),每个稀释度设 8 个孔,将 9 种不同浓度的病毒液分别接种到长成单层 MDCK 细胞的 96 孔板,每孔 50 μ L,置于 5% CO₂ 恒温培养箱内,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后,弃上清,以 Hank's 液洗 3 次,加维持液每孔 0.1 mL,同时设细胞对照孔 8 孔,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养,每日检查病毒生长情况,在倒置显微镜下观察细胞的形态变化并记录特征性细胞病变(CPE)的孔数,5 d 后记录结果。用 Reed-Muench 法计算病毒的半数感染量(TCID₅₀)。

细胞出现病变(CPE)程度按 6 级标准记录:
- :细胞生长正常,无病变出现;
 $\pm$:细胞病变少于整个单层细胞的 10%;
+ :细胞病变少于整个单层细胞的 25%;
++ :细胞病变少于整个单层细胞的 50%;
+++ :细胞病变少于整个单层细胞的 75%;
++++ :细胞病变占整个单层细胞的 75% 以上。
下同。

1.6 药物细胞毒性试验^[13]:取生长良好的 MDCK 细胞,将细胞加入 96 孔板,每孔 100 μ L (约 1×10^4 /孔),待细胞长成单层后,用维持液将贯叶连翘提取物稀释为 1.0、0.50、0.25、0.125、0.063、0.032、0.016、0.008 g/L,将各质量浓度药物以每孔 200 μ L 加入培养板,每个质量浓度设 4 孔,同时设正常细胞对照组 4 孔,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养,倒置显微镜下每日检查细胞生长情况,观察细胞的形态变化,以 CPE 法观察记录药物对 MDCK 细胞的毒性结果后,进行细胞 MTT 比色法:每孔加入 MTT 染液 20 μ L (5 g/L),置 5% CO₂ 培养箱中,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,弃染色液,每孔加入 DMSO 150

μ L,振荡 10 min,在酶标仪 490 nm 波长处测吸光度值,推算半数中毒浓度(TC₅₀)和最大无毒浓度(TC₀)。实验重复 3 次,取 3 次平均值作为结果。

1.7 贯叶连翘提取物体外抗病毒试验^[14]:将 MDCK 细胞按照 2×10^5 /mL 接种于 96 孔板中,0.1 mL/孔,培养 2 d 形成单层细胞后进行体外抗病毒试验。分正常细胞对照组(加维持液);病毒对照组;药物对照组为 100 μ mol/L 的达菲(奥司他韦尔);贯叶连翘提取物质量浓度分别为 0.016、0.032、0.063、0.125 g/L。试验以 3 种方式进行:
药物对 IAV 的直接灭活作用:病毒悬液与含药培养液在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 1 h 后感染细胞。

药物对 IAV 吸附、侵入细胞的阻断作用:以含药培养液预先与细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 1 h 后感染 IAV。药物对 IAV 增殖的抑制作用:细胞先感染 IAV 1 h,再加入含药培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温箱培养。采用 96 孔细胞培养板,每 1 组加 8 孔,待病毒对照孔病变达 + + +,细胞对照组正常时,进行 MTT 染色,在酶标仪 490 nm 波长处测吸光度(A)值,并计算细胞存活率和药物对 IAV 的抑制率。实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物组}} / A_{\text{细胞对照组}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = (A_{\text{药物组}} - A_{\text{病毒对照组}}) / A_{\text{病毒对照组}} \times 100\%$$

1.8 对流感病毒株致小鼠肺炎的作用:将 50 只体质量 18~22 g 的昆明种小鼠随机分为模型对照组、正常对照组、达菲组(3 mg/kg)及贯叶连翘提取物高、低剂量(100、50 mg/kg)组,雌雄各半,每组 10 只。除正常对照组外,各组在乙醚轻度麻醉下感染 1/3 LD₅₀ 甲 1 型流感病毒鼠肺适应株 50 μ L,于感染后 4 h 开始 ig 给药,0.2 mL/次,连续 5 d;正常对照组给予同体积无菌蒸馏水。治疗 5 d 后称体质量后摘眼球放血处死动物,打开胸腔摘出全肺,以生理盐水洗涤两次,用滤纸吸干表面水分,用电子天平称肺质量,计算肺指数[肺指数 = 肺质量/体质量 $\times 100\%$]、肺指数抑制率[肺指数抑制率 = (病毒对照组平均肺指数 - 实验组平均肺指数)/病毒对照组平均肺指数 $\times 100\%$]。低温条件下,将各组肺置匀浆器中加生理盐水(1:9),研磨制成匀浆,4 $^{\circ}$ C、2 500 r/min 离心 30 min 后取上清,按常规方法作微量血凝试验^[15]。

1.9 对体内感染流感病毒小鼠的死亡保护和延长生命的作用:将小鼠随机分为模型对照组、达菲组(3 mg/kg)、贯叶连翘提取物高、低剂量(100、50 mg/kg)组,每组 10 只,各组在乙醚轻度麻醉下感

染 25 LD₅₀ 甲 1 型流感病毒鼠肺适应株 50 μL, 感染后 4 h 开始 ig 给药, 0.2 mL/次, 每天 2 次, 连续 5 d, 另设正常对照组给予同容积无菌蒸馏水。观察、记录动物发病和死亡数, 共观察 14 d, 计算死亡保护率 [死亡保护率 = (病毒对照组死亡数 - 给药组死亡数) / 病毒对照组死亡数 × 100 %]、生命延长率 [生命延长率 = (给药组平均存活时间 - 病毒对照组平均存活时间) / 病毒对照组平均存活时间 × 100 %]。

1. 10 统计学分析: 应用 SPSS 13.0 统计软件, 对实验数据进行多因素方差分析。

2 结果

2. 1 病毒感染性滴度的测定: 用 Reed-Muench 法计算病毒的半数感染量 TCID₅₀ 为 10^{-4.59} / 0.1 mL,

病毒攻击量为 100 TCID₅₀。

2. 2 贯叶连翘提取物对 MDCK 细胞的毒性: 贯叶连翘提取物在 0.125 g/L 时, 对 MDCK 细胞无不良影响, 与正常细胞对照组无明显区别, 表明贯叶连翘提取物低于 0.125 g/L 质量浓度对 MDCK 细胞无毒性作用。

2. 3 体外抗甲 1 型流感病毒试验

2. 3. 1 药物对 IAV 的直接灭活作用: 4 个质量浓度贯叶连翘提取物组的细胞存活率和病毒抑制率分别是 66.1 %、66.6 %、69.4 %、73.9 % 和 33.6 %、34.6 %、40.3 %、49.1 %, 与病毒对照组比较, 各组的 A 值略有升高 ($P < 0.01$); 与对照药物达菲相比, 各组 A 值有所下降 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 贯叶连翘提取物体外抗病毒作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Anti-virus activity of HPE in vitro ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	$\rho /$ (g · L ⁻¹)	对 IAV 直接灭活作用			对 IAV 吸附、侵入细胞的阻断作用			对 IAV 增殖的抑制作用		
		A 值	细胞存活率/ %	病毒抑制率/ %	A 值	细胞存活率/ %	病毒抑制率/ %	A 值	细胞存活率/ %	病毒抑制率/ %
贯叶连翘提取物	0.016	0.795 ± 0.021 * ▲▲	66.1	33.6	1.004 ± 0.042 * * ▲	83.5	68.2	0.993 ± 0.020 * * ▲	82.5	66.9
	0.032	0.801 ± 0.036 * ▲▲	66.6	34.6	1.010 ± 0.061 * * ▲	84.0	69.7	1.001 ± 0.043 * * ▲	83.2	68.2
	0.063	0.835 ± 0.021 * ▲	69.4	40.3	1.026 ± 0.028 * *	85.3	72.4	1.062 ± 0.021 * *	88.3	78.7
	0.125	0.889 ± 0.043 * ▲	73.9	49.1	1.034 ± 0.045 * *	86.0	73.8	1.075 ± 0.032 * *	89.4	80.7
达菲	100 μmol · L ⁻¹	1.022 ± 0.019 * *	85.0	71.7	1.027 ± 0.039 * *	85.4	72.6	1.153 ± 0.010 * *	95.8	93.8
正常细胞对照	-	1.203 ± 0.091	100.0	-	1.203 ± 0.090	100.0	-	1.203 ± 0.090	100.0	-
病毒对照	-	0.595 ± 0.068	49.4	0	0.595 ± 0.068	49.4	0	0.595 ± 0.068	49.4	0

与正常细胞对照组比较: $P < 0.01$; 与病毒对照组比较: * $P < 0.05$ * * $P < 0.01$; 与达菲组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs normal cell control group; * $P < 0.05$ * * $P < 0.01$ vs virus control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs Oseltamivir group

2. 3. 2 药物对 IAV 吸附、侵入细胞的阻断作用: 4 个质量浓度贯叶连翘提取物组细胞存活率和病毒抑制率分别是 83.5 %、84.0 %、85.3 %、86.0 % 和 68.2 %、69.7 %、72.4 %、73.8 %, 与病毒对照组比较, 各组的 A 值显著升高 ($P < 0.01$); 与对照药物达菲相比, A 值无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

2. 3. 3 对 IAV 增殖的抑制作用: 4 个质量浓度贯叶连翘提取物组细胞存活率和病毒抑制率分别是 82.5 %、83.2 %、88.3 %、89.4 % 和 66.9 %、68.2 %、77.7 %、80.7 %, 与病毒对照组比较, 各组的 A 值显著升高 ($P < 0.01$); 与对照药物达菲相比, 各组 A 值略有下降 ($P < 0.05$)。见表 1。

2. 4 对小鼠流感病毒性肺炎的影响: 高、低剂量贯叶连翘提取物对流感病毒感染小鼠的肺指数抑制率分别为 23.3 %、19.0 %; 肺组织悬液病毒血凝滴度和肺指数均有所降低, 与模型对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$), 与对照药物组达菲相比, 无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2. 5 对 IAV 感染小鼠生命的保护作用: 高、低剂量贯叶连翘提取物对流感病毒感染小鼠的死亡保护率

和生命延长率分别为 62.5 %、50.0 % 和 37.5 %、28.4 %; 动物平均存活时间均有所延长, 与模型对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$), 高剂量贯叶连翘提取物组与对照药物达菲相比, 无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

3 讨论

近几年来禽流感病毒跨越种属障碍感染人类, 给人类健康和安全带来了更大的威胁, 使人们清楚

表 2 贯叶连翘提取物对 IAV 感染小鼠肺指数和血凝滴度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of HPE on lung index and hemagglutination titer of mice infected IAV ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	血凝滴度 (lnX)	肺指数	肺指数抑 制率/ %
正常对照	-	-	0.72 ± 0.23 * *	-
模型对照	-	2.78 ± 0.17	1.26 ± 0.25	-
达菲	3	1.52 ± 0.91 * *	0.85 ± 0.11 * *	26.7
贯叶连翘提取物	100	1.71 ± 0.22 * *	0.89 ± 0.31 * *	23.3
	50	1.59 ± 0.65 * *	0.94 ± 0.46 * *	19.0

与模型对照组比较: * * $P < 0.01$

* * $P < 0.01$ vs model control group

表 3 贯叶连翘提取物对 IAV 感染小鼠生命的保护作用

Table 3 Protection of HPE on life of mice infected with IAV

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	死亡数/ 只	平均存活 时间/d	死亡保 护率/%	生命延 长率/%
模型对照	-	10	8	8.8	-	-
达菲	3	10	2	12.6 ^{**}	75.0	43.2
贯叶连翘提取物	100	10	3	12.1 ^{**}	62.5	37.5
	50	10	4	11.3 ^{**}	50.0	28.4

与模型对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs model control group

地认识到加强和完善对流感这类经呼吸道传播并有可能来源于动物的传染性疾病的预防、控制和治疗具有重大科学意义和实际应用价值。但流感病毒表面抗原容易变异的特性导致使用疫苗预防流感效果欠佳,因而在不断跟踪抗原变化,加强新疫苗研制的同时,更应加大抗流感病毒药物的研制。

贯叶连翘在民间已有 2 400 年的药用历史,主要有解毒消炎、止血生肌、抗抑郁、镇痛等功效。其抗病毒的作用已被广为认同,美国纽约大学医学中心的 D. Meruelo 在第一次国际贯叶连翘会议上指出:贯叶连翘提取物中最具有代表性的活性物质金丝桃素对 HIV 有独特的作用方式,它可使病毒粒子失活,对 HIV、肝炎病毒和疱疹病毒有明显的效果。

利用合适的病毒-细胞培养体系,采用 MTT 法考察测试物对病毒增殖的影响,是常用体外筛选抗病毒药物的手段之一,而本实验通过上述各种方法和技术得到的结果首次为贯叶连翘提取物体外抗 IAV 活性提供了有力的证据。结果显示:不同质量浓度贯叶连翘提取物对 IAV 有一定的直接灭活作用,但灭活作用弱于对照药物达菲 ($P < 0.01$),这可能与贯叶连翘提取物的活性物质金丝桃素的光敏性和供氧有关^[16,17],因为本实验是在没加氧气和无光照条件下的结果,因此,贯叶连翘提取物直接攻击病毒粒子的作用没能充分发挥,导致其作用的降低。不同质量浓度贯叶连翘提取物能抑制 IAV 与 MDCK 细胞的吸附、融合,以此发挥其抗病毒作用,且呈现出质量浓度依赖关系,与达菲的抑制效果相当 ($P > 0.05$)。这可能是贯叶连翘提取物改变了 IAV 膜,使之结构发生了改变,从而抑制 IAV 吸附于靶细胞^[18];另外,此提取物可能对 MDCK 细胞具有保护作用,有效阻止了 IAV 进入宿主细胞^[19]。不同质量浓度贯叶连翘提取物可抑制进入靶细胞内 IAV 的复制,但抑制流感病毒增殖的作用要弱于对照药物达菲 ($P < 0.05$)。这可能是药物作用于细胞

后,抑制了转录酶的活性,使 IAV 在 MDCK 细胞内的复制有所降低。由此推测,贯叶连翘提取物抗流感病毒是通过多种途径发挥作用的,对于其明确的作用机制,将有待于在今后工作中进一步研究。

为了进一步证实贯叶连翘提取物抗 IAV 的效果,本实验通过流感病毒感染小鼠模型从整体水平上考察了贯叶连翘提取物抗 IAV 的效果。体内实验结果显示,经高、低剂量贯叶连翘提取物治疗后小鼠肺组织充血、水肿减轻,肺指数降低;肺组织悬液病毒血凝效价也有所降低,提示贯叶连翘提取物可降低流感病毒在肺组织内的增殖,使其病毒量减少,毒力减轻;从实验结果还得知:感染模型组的死亡率达 80%,说明该模型可靠;经过贯叶连翘提取物治疗后,小鼠死亡率分别降至 30%、40%,存活时间均有所延长 ($P < 0.01$)。这可能与贯叶连翘提取物的抗炎、抗菌、抗病毒、增强免疫功能等作用有关,也进一步证实了外国学者的研究结果^[3~6]。贯叶连翘提取物治疗流感病毒感染不单着眼于直接的抗病毒作用,还通过改善机体状态,调动机体免疫功能,注重病毒-机体-药物 3 者的关系,多途径、多环节达到整体综合调节作用。

诸多报道均表明达菲能够明显改善流感病毒所致的各项临床症状,因此它是此模型中较为理想的阳性对照药物,其优异的抗病毒作用在本实验中得以证实。本实验结果证实:贯叶连翘提取物在体外有显著的抗 IAV 活性的作用;对 IAV 感染小鼠的保护作用表现在:有效降低小鼠肺指数、降低肺组织悬液病毒血凝效价,并延长感染小鼠平均存活时间,降低感染病毒小鼠死亡率,且呈现出一定的量-效关系,但其临床治疗流感病毒感染的实际疗效还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘 颂. 抗流感病毒药物的研究进展 [J]. 国外医学:药学分册, 2005, 32(2): 111-114.
- [2] 陈建新, 邱灵才, 方炳虎, 等. 甘草酸单铵盐对 H₉N₂ 禽流感病毒的作用机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 896-899.
- [3] Hudson J B, Bazzocchi L, Towers G H N. Antiviral activity of hypericin [J]. *Antiviral Res*, 1991, 15: 101.
- [4] Meryelo D, Lavie G. The therapeutic agents dramatic antiretroviral activity and life toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5230-5234.
- [5] Avato P, Raffo F, Guglielmi G, et al. Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity [J]. *Phytother Res*, 2004, 18(3): 230-232.
- [6] Evstifeeva V A, Sibiryak S V. Immunotropic properties of biologically active products obtained from *Jonh's wort Hypericum perforatum* [J]. *Eksp Klin Farmakol*, 1996, 59(1):

- 51-54.
- [7] Muldner Von H, Zoller M. Antidepressive wirkung eines auf den wirkst of fkomplex hypercin standardisierten *Hypericum* extractes [J]. *Drug Res*, 1984, 34() (8): 918-920.
- [8] Viletinck A J, DeBruyne T, Apers S, et al. Plant —derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection [J]. *Planta Med*, 1998, 64(2): 97.
- [9] 梁颖华, 王冬梅, 杨得坡, 等. 贯叶金丝桃素及其衍生物的合成与神经药理学研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 789-791.
- [10] 赵晓虹, 梁剑平, 祝艳华, 等. 金丝桃素蛋白络合物体外抗 51 亚型禽流感病毒的活性研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2006, 3: 13-15.
- [11] 王曙阳, 梁剑平, 杨林西, 等. 金丝桃素对口蹄疫病毒的体外抗病毒实验 [J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(6): 6-9.
- [12] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [13] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 75(1-2): 55-63.
- [14] 王向阳, 刘志苏, 姜合作, 等. 金丝桃素体外抗巨细胞病毒效应的实验研究 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2005, 27(3): 304-306.
- [15] 中国医学科学院流行病防治研究所. 常见病毒病实验技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1978.
- [16] Park J, Doug S, Wannemuehler Y, et al. The role oxygen in the antiviral activity of hypericin and hypcrellin [J]. *Phytochem Phytobiol*, 1998, 68(4): 137-143.
- [17] 朱晓薇. 一种金丝桃光敏衍生物的抗病毒活性 [J]. 国外医药: 植物药分册, 1997, 12(6): 273.
- [18] 常雅萍, 杨贵贞. 秘灵王提取物抗 DNA、RNA 病毒效应 [J]. 白求恩医科大学学报, 1996, 22(5): 466-468.
- [19] Prince A M, Pascua I D. Strategier for evaluations of enveloped virus inactivation in red cell ancentres using hypericin [J]. *Phytochem Phytobioc*, 2000, 71: 188-195.

丹皮炭对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响

李 娴, 张 丽, 丁安伟 *

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘 要:目的 研究丹皮炭及其止血活性部位对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响。方法 以 SD 种大鼠为研究对象, 观察丹皮炭及其止血活性部位对 4,5-腺苷二磷酸二钠盐 (ADP) 和胶原诱导的大鼠血小板聚集率、血浆中血栓素 B_2 (TXB₂) 和 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α}) 水平, 以及大鼠组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 及其抑制剂 (PAI-1) 活性的影响。结果 丹皮炭及其止血活性部位均能提高 ADP 和胶原诱导的血小板聚集率; 提高大鼠血浆中 TXB₂ 的量而降低 6-keto-PGF_{1 α} 的量; 对大鼠血浆 t-PA 和 PAI-1 活性无明显影响。结论 丹皮炭及其止血活性部位可能是通过调节 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 的量来增强血小板的聚集功能, 发挥止血、凝血作用; 而其对纤溶活性无显著影响。

关键词:丹皮炭; 血小板聚集; 血栓素 B_2 (TXB₂); 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α}); 纤溶活性

中图分类号:R286.31 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)02-0264-03

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 是中医临床常用中药之一, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 已有两千余年的药用历史。元代始即将牡丹皮制炭后用于临床, 以治疗各种出血性疾病。长期的临床实践证明丹皮炭具有明显的止血作用, 可用于吐血、崩漏及其他多种出血病症, 疗效确切^[1]。然而目前国内外对丹皮炭止血机制的研究尚不深入。前期实验研究中已筛选确定出丹皮炭止血的主要活性部位, 并在此基础上对其止血机制进行了初步研究^[2], 本实验则着重通过 ELISA 法测定大鼠血浆中血栓素 B_2 (TXB₂)、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α}) 水平以及大鼠组

织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 及其抑制剂 (PAI-1) 活性, 探讨丹皮炭及其止血活性部位对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响, 以期进一步揭示丹皮炭止血作用的机制。

1 材料

1.1 动物: SD 大鼠, 雄性, 体质量 (180 ± 20) g, 购自浙江省实验动物中心, 许可证号: SCXK (浙) 2003-0001。

1.2 药品与试剂: 云南白药为云南白药集团股份有限公司产品 (批号 20080209); CMC-Na: 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司; 4,5-腺苷二磷酸二钠盐 (ADP): 北京世帝科学仪器公司; 胶原: Sigma 公司;

* 收稿日期: 2009-08-20

基金项目: 国家“十一五”科技攻关项目 (2006BAI09B006-02); 2008 年江苏省研究生培养创新工程 (CX08B_2002)

作者简介: 李 娴 (1980—), 女, 博士研究生, 主要从事中药炮制与复方研究。Tel: 13611517960 E-mail: lixian0813@126.com

* 通讯作者 丁安伟 Tel: (025) 85811523 E-mail: awding105@163.com