

秦艽抗甲型流感病毒的药效学实验研究*

□李福安** 李永平** 童丽 李文渊 热增才旦
 (青海大学医学院 西宁 810001)
 袁冬平 (南京中医药大学药学院 南京 210046)

摘要:目的:研究秦艽抗甲型流感病毒的药理作用。方法:复制甲型流感病毒感染小鼠肺部感染性疾病动物模型,以利巴韦林为阳性对照,观察秦艽对甲型流感病毒感染小鼠的保护作用。结果:秦艽提取物可明显延长甲型流感病毒感染小鼠存活天数和存活率;对甲型流感病毒感染小鼠肺指数、肺组织形态学都有保护作用,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。结论:秦艽具有较好的抗甲型流感病毒感染的作用,值得开发利用。

关键词:秦艽 甲型流感病毒 药效学 中草药 临床疗效

秦艽(*Gentiana Macrophylla*)是龙胆科龙胆属多年生草本植物,是我国历代常用的中药材,具有很高的药用价值。中医以根入药,藏医以全草入药,有祛风湿、止痹痛、退虚热、清湿热等功效。秦艽中含有龙胆苦苷、当药苦苷、龙胆次碱、挥发油及多糖等成分,现代药理研究发现秦艽具有抗炎、镇痛、调节免疫、保护肝损伤、抗菌、降血压、利尿消肿等作用^[1-4],广泛用于心脑血管疾病,呼吸道疾病,肝胆疾病,风湿、类风湿性关节炎等疾病的治疗^[5,6]。秦艽及其复方临床常用于病毒性疾病的治疗,但在药理方面,文献检索迄今未见秦艽有抗病毒的实验研究报告。为了扩大秦艽的药效

作用,本文通过动物实验研究秦艽的抗病毒作用。

一、材 料

1. 实验动物

ICR 小鼠,体重 13 ~ 16 g,雌雄各半,由南京青龙山动物繁殖厂提供,合格批号:(苏)SCXK2002-0018。给药前后,实验小鼠分笼饲养全价颗粒饲料,由江苏协同医药生物技术有限公司提供,合格证号:苏 A 饲生字 2002(009),批号:051218 自由饮水,室温(20 ± 2)℃,湿度 55% ~ 65%。鸡胚(9 日龄),南京中牧股份药械厂提供。

2. 药品

秦艽采自青海省海北州,药材经青海大学医学院

收稿日期:2007-04-23

修回日期:2007-05-16

* 国家科技部重大科技攻关项目(2001BA701A60-06):创新药物与中药现代化,川牛膝等十五种中药材规范化种植研究—青藏高原特有中藏药材秦艽种植技术研究,负责人:李福安;青海省科技厅“十一五”重大科技攻关项目(2005-N-190):青海秦艽规范化种植技术示范,负责人:李福安。

** 联系人:李福安,教授,青海大学副校长,研究方向:中藏药药理与临床研究;李永平,中西医结合硕士,主要从事中藏药药理与临床研究,Tel:13997071514,Email:liyongping1122@163.com。

中药教研室魏全嘉教授鉴定,为麻花秦艽(*G. straminea. Maxim*)。所有秦艽水提物和醇提物均在青海大学医学院中藏药研究中心自提,最后配制成浓度为1g生药/mL的溶液,4℃冰箱保存。利巴韦林(四川美大康药业股份有限公司,批号050723);氯化钠(江苏太仓化工厂,批号040416)。

秦艽水煎液的制作方法:精密称取干燥的秦艽200g,加水1000mL浸泡30min,然后在电子可调电炉上煮沸,文火煎煮30min,把煎煮液过滤,在药渣里加水1000mL,用同样的方法煎煮3遍,把3次的滤液混合,于40~50℃下常压蒸发浓缩至1g生药/mL,4℃冰箱保存;秦艽醇提液的制作方法:精密称取干燥的秦艽200g,切断装在2000mL圆底烧瓶中,加入1500mL 95%的乙醇浸泡30min,然后用水浴锅加热合冷凝管回流装置提取,将3次滤液混合后在旋转蒸发器上回收乙醇,把最后得到的膏状物用三蒸水溶解成浓度为1g生药/mL的溶液,4℃冰箱保存。

3. 仪器及试剂

FA1004 电子天平(上海天平厂);超净工作台(苏州净化设备厂);恒温孵箱(上海分析仪器厂);CO₂ 培养箱(德国贺利氏公司);PYX-DHS 隔水电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);YXQ-280 电热式压力蒸汽消毒器(上海医疗器械厂);SB2000 超声波清洗器(上海中能超声有限公司)。乙醚(南京试剂厂,批号050113);苦味酸(上海化学试剂公司供应站,批号000122);鸡红细胞(新鲜公鸡血,用生理盐水洗涤3次备用)。

4. 实验用病毒株

甲型流感病毒 A/PR8/34,由中国预防医学科学院病毒所提供。

5. 统计方法

数据采用 SPSS 11.0 统计软件处理,组间进行 LSD-t 检验和卡方检验。

二、方法和结果

1. 血凝试验

取24孔微孔板,除第1孔加入生理盐水0.9mL外,其余每孔加入生理盐水0.5mL。将增毒3次的病毒尿囊液0.1mL加入第1孔内混匀后加入第2孔0.5mL,稀释至第8孔,第9孔不加病毒尿囊液,作空白对照。每孔加入0.5%鸡红细胞0.25mL,轻轻摇匀后于室温放置2h观察结果。记录结果为1号、2号、6号、8号、10号、11号、14号、15号、19号血凝滴度在640以上,可用于甲型流感病毒感染小鼠半数致死量(LD₅₀)滴定。

2. 甲型流感病毒感染小鼠半数致死量(LD₅₀)滴定

取ICR小鼠56只,体重13~16g,雌雄各半,随机分7组,每组8只,取增毒3次的病毒尿囊液,以10倍稀释,每组滴一个病毒浓度,各组小鼠在乙醚浅麻醉下以血凝滴度为640病毒尿囊液30μl滴鼻感染小鼠,观察14天内死亡数,按Reed-Muench法计算,结果LD₅₀为10^{-2.50}。

3. 秦艽对甲型流感病毒感染小鼠的保护作用

取ICR小鼠100只,体重13~16g,雌雄各半,随机分5组(每组20只):(1)正常对照组:等量(NS);(2)模型对照组:等量NS;(3)利巴韦林组:0.1g/kg;(4)秦艽水提取物组(简称秦艽水提组):10mL/kg;(5)秦艽醇提物组(简称秦艽醇提组):10mL/kg。以上各组小鼠均灌胃给药,给药容量10mL/kg,1次/天×5天,于末次给药当日各组小鼠(除正常对照组外)在乙醚浅麻醉下以血凝滴度640以上的尿囊液给小鼠滴鼻感染,每鼠50μl(80个LD₅₀致死量),观察动物感染后发病及死亡情况,记录14天内死亡数,结果见表1。

表1 对甲型流感病毒感染小鼠死亡的保护作用

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	死亡数(只)	存活率(%)	存活天数($\bar{x} \pm s$)
正常对照组	20	等量 NS	0	100.0	14 ± 0
模型对照组	20	等量 NS	18	10.0	6.20 ± 3.31
利巴韦林组	20	0.1	8	60.0 ^{△△}	10.85 ± 4.00 ^{**}
秦艽水提组	20	10	11	45.0 [△]	9.73 ± 4.17 [*]
秦艽醇提组	20	10	12	40.0 [△]	9.40 ± 4.09 [*]

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01,△P<0.05,△△P<0.01。

实验结果显示:秦艽提取物均可明显延长甲型流感病毒感染小鼠存活天数和存活率,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。提示:秦艽提取物具有抗甲型流感病毒感染的作用。

4. 秦艽对甲型流感病毒感染小鼠肺指数的影响

取 ICR 小鼠 50 只,体重 13 ~ 16g,雌雄各半。随机分 5 组,每组 10 只,分组方法同 3。各组小鼠均灌胃给药,给药容量 10mL/kg,1 次/天 × 5 天,于末次给药当天各组小鼠(除正常对照组外),在乙醚浅麻醉下以病毒尿囊液滴鼻感染小鼠,每鼠 30 μ l(15 个 LD₅₀致死量)。实验前禁食不禁水,实验当日各组小鼠称重,脱颈处死,解剖,观察肺部病变,取全肺称重,计算各鼠肺指数值和肺指数抑制率,比较各组间差异,并取鼠肺用 10% 甲醛固定,作病理组织学检查,结果见表 2。

实验结果显示:秦艽提物组可明显抑制甲型流感病毒感染小鼠的肺病变,与病毒模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。提示:秦艽提取物具有较好的抗甲型流感病毒所致肺部感染的作用。

(1) 肺病理学评分。

根据病变轻重程度不同,依次标记为“-”、“+”、“++”、“+++”、“++++”,其中“-”为无明显

改变,“++++”为极严重的病理改变,同时对相应病变程度分别赋值为 0、1、2、3、4,计算病变评分。结果见表 3。

(2) 组织形态学观察。

图 1 为组织形态学照片。正常对照组 10 例肺组织均呈正常形态。甲型流感病毒肺炎模型组大部分肺组织呈重度化脓性支气管炎、小叶性肺炎及肺泡炎,部分为重度间质性肺炎,具体表现为支气管上皮细胞大量变性、坏死,腔内见坏死细胞及脓性渗出物。病变支气管壁及其周围肺组织结构不清,有多量淋巴细胞、巨噬细胞和大量嗜中性粒细胞浸润。部分病变融合实变。部分肺泡腔内充满嗜中性粒细胞及脱落的肺泡上皮细胞,伴有肺不张。部分肺泡扩张,呈代偿肺气肿。利巴韦林组所有肺组织亦呈支气管炎、小叶性肺炎、肺泡炎,但总体病变程度明显轻于模型组,其中以轻度支气管炎及小叶性肺炎为主。秦艽水提物组病变总体病变程度明显轻于模型组,肺脓肿病变已经消退,肺泡炎及小叶性肺炎也基本消退,肺组织病变以轻度支气管炎及间质性肺炎为主。秦艽醇提物组病变总体病变程度轻于模型组,肺脓肿病变已经消退,肺泡炎也基本消退,肺组织病变以轻-中度支气管炎及间质性肺炎为主。

表 2 对甲型流感病毒感染小鼠肺指数的影响

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	肺指数值($\bar{x} \pm s$)	肺指数抑制率(%)
正常对照组	10	等量 NS	0.0954 \pm 0.0064 * *	—
模型对照组	10	等量 NS	0.1533 \pm 0.0464	—
利巴韦林组	10	0.1	0.1084 \pm 0.0201 *	29.29
秦艽水提组	10	10	0.1129 \pm 0.0352 *	26.35
秦艽醇提组	10	10	0.1142 \pm 0.0437 *	25.50

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 3 抗小鼠甲型流感病毒肺组织病理改变评分结果

组别	病变评分						总分
	肺组织充血	支气管炎	小叶性肺炎	肺泡炎	间质性肺炎	肺脓肿	
正常对照组	0	0	0	0	0	0	0
模型对照组	14	23	19	18	18	15	107
利巴韦林组	6	10	6	9	3	10	44
秦艽水提组	7	10	7	6	7	2	39
秦艽醇提组	7	12	9	9	9	4	50

三、讨论

通过实验发现,秦艽水提物、醇提物均可明显延长甲型流感病毒感染小鼠存活天数和存活率,可明显抑制甲型流感病毒感染小鼠的肺病变,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。提示:秦艽提取物具有抗甲型流感病毒感染的作用,对甲型流感病毒感染所致肺部病变具有减轻作用。病理学检查所示,甲型流感病毒感染成功复制小鼠肺炎性病变,主要表现为化脓性支气管炎、小叶性肺炎、肺泡炎及间质性肺炎,个别肺组织伴有明显的肺出血、脓肿。与模型组相比,秦艽提取物组肺部病变均有不同程度的减轻,甚至病变消退,尤以秦艽水提物组减轻明显。

病毒是一类严重危害人类健康、威胁人类生命的病原体。流行性感病毒(简称流感病毒)、艾滋病病毒、SARS病毒、禽流感(是禽流行性感病毒的简称)病毒引起的疾病一旦感染,传播迅速,较难控制,死亡率高,经济损失惨重。对这些病毒的防治主要是研制抗病毒疫苗,疫苗的出现虽然使某些疾患得到了控制,但疫苗存在以下问题:①接种率低;②保护率低;③有的病毒抗原易发生变异。因此,在研制抗病毒疫苗的同时,抗病毒药物的研究不失为攻克病毒的另一重要方面。近几年来,随着分离纯化技术的发展,天然药物活性成分的研究已成为新药开发的方向,也是21世纪新药研究的“热点”。

中草药自然资源丰富,品种繁多,毒副作用低,价格低廉,是较为理想的抗病毒治疗药物。通过长期的研究和探索,中医药治疗病毒性疾病已取得了很大进

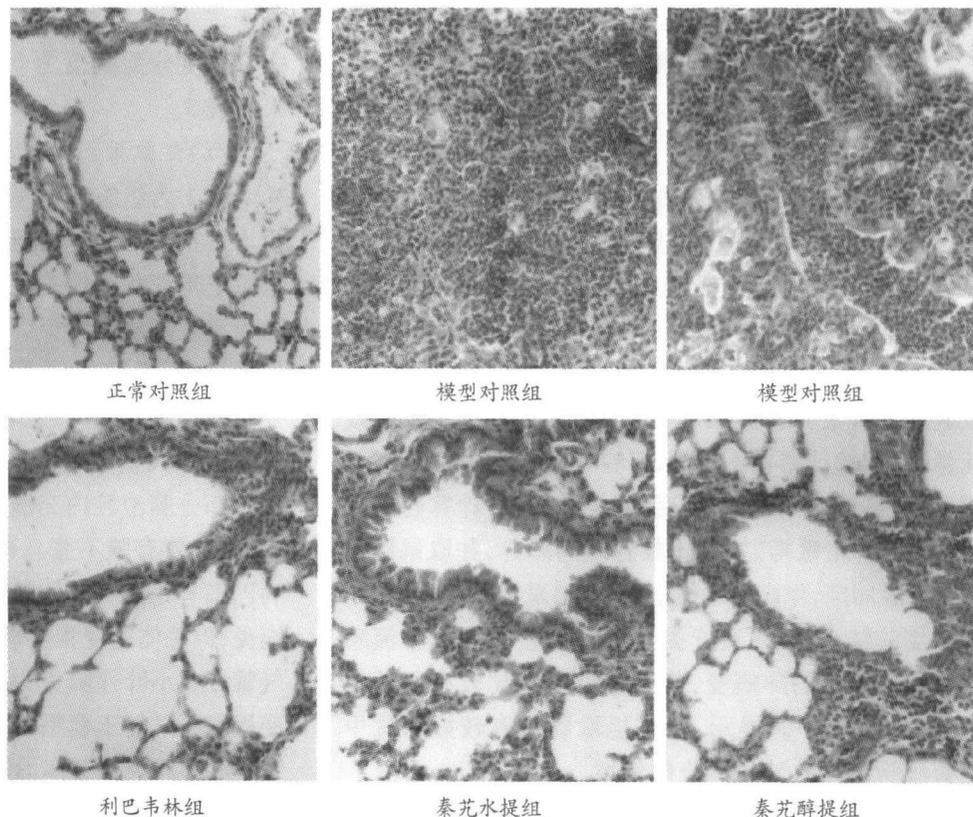


图1 组织形态学照片

展^[7-10],显示了中医药治疗病毒性疾病的独特优势。但仍存在不少问题,如临床疗效不确切或经不起重复,制剂质量不稳定,药物的有效成分和有效部位不确切,临床辨证和疗效判断标准不统一等。

目前大量的实验研究集中在药物筛选,而对药物有效成分、机制方面的研究不多。今后应严格科研设计和标准疗效分析,建立有效而稳定的病毒动物实验模型,不仅应加强中药抗病毒作用机制以及有效成分的研究,同时还应加强中成药抗病毒现代剂型的研制,以及多学科间的合作交流,进一步促进中医药更好地应用于病毒防治。

参考文献

- 1 Qmura T, Sato R. The carbon monoxide - binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization and properties, *Biol Chem*, 1994, 239: 2379 ~ 2385.
- 2 Editorial Board of China Herbal State Administration of Traditional China Medicine. *ChinaHerbal*(中华本草). Shanghai: Science and Technology Publishers, 1998.

- 3 Kondo Y, Takano F, Hojo H. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice. *Planta Medica*, 1994, 60(5): 414 ~ 416.
- 4 秦希恩, 贾玉红. 愈风降压汤治疗高血压合并高黏血症 120 例. *陕西中医*, 2001, 22(8): 466.
- 5 孙其伟, 张华敏. 中西医结合治疗中风急性期 42 例临床观察. *中医药学报*, 2002, 30(2): 9 ~ 10.
- 6 吴凤海. 秦艽五藤饮治疗类风湿性关节炎的临床观察. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(8): 622 ~ 623.
- 7 Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. An active component of liquorice roots, and replication of SARS - associated coronavirus. *Lancet*, 2003, 361: 2045 ~ 2046.
- 8 Chen F, Chan KH, Jiang Y, et al. In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *J Clin Virol*, 2004, 31(1): 69 ~ 75.
- 9 Hsiang CY, Hsieh CL, Wu SL, et al. Inhibitory effect of anti - pyretic and antiinflammatory herbs on herpes simplex virus replication. *Am J Chin Med*, 2001, 29(3 - 4): 459 ~ 467.
- 10 Nakayama M, Suzuki K, Toda M, et al. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res*, 1993, 21(4): 289 ~ 299.

Pharmacodynamic Effects of Gentiana against Influenza A Virus

Li Fuan, Li Yongping, Tong Li, Li wenyuan, Rezen Caidan

(Qinghai University Medical College, Qinghai, Xining, 810001 China)

Yuan Dongping

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210046, Jiangsu, China)

Authors investigated the pharmacological effects of gentiana against influenza A virus. In the study, the pneumonia mice were infected with influenza A virus. Authors observed that gentiana protected the mice infected with influenza A virus, using ribavirin as a positive reference drug. It is found that gentiana extracts has obviously prolonged both survival days and survival rate of the mice infected with influenza A virus, and it protected their lung index and lung morphology as well. There is a significant difference compared with the model group. It is concluded that Gentiana has a better effect on mice infected with influenza A virus, and it is worth further study.

Keywords: Gentiana; influenza A virus; pharmacodynamics; traditional Chinese herb/therapy

(责任编辑:张述庆,责任译审:邹春申)

新疆将建药用植物资源信息库

新疆把优势药用植物资源转化提上了议事日程,将着手建立药用植物资源信息库。

8月4日,第七届全国药用植物及植物药学术研讨会暨新疆第二届药用植物学国际学术研讨会在新疆大学召开。会议重点探讨了新疆药用植物资源的经济价值和持续利用、药用植物制品的研制以及建立新疆药用植物资源信息库等内容。

新疆地区药用植物资源十分丰富,目前蕴藏药用植物 2000 多种。新疆的药用植物产量在国内的中草药市场上占有举足轻重的位置,如紫草、麻黄、甘草、贝母、雪莲、枸杞、沙

棘、肉苁蓉等。同时,许多药用植物资源为新疆特有,如阿魏类药材、雪莲等。这些药材不仅具有独特的药用价值,而且在国内市场上具有不可替代性。但目前这些药用植物资源还没有得到充分的开发和利用。

与会专家认为,新疆已成为西部一个亟待开发、保护和利用的植物资源宝库,同时也是利用生物技术进行优势药用植物资源转化的重要研究基地。开展新疆极端环境下生物资源利用的研究,带动新疆特色植物医药的发展,不仅具有重大的理论价值,而且会创造出较好的生态效益和经济效益。

信息来源:中国药材市场