

药效组分中药“黄金菊” 对甲型流感病毒的抑制作用*

□张春晖 张贵君** 王晶娟 杨晶凡 郑璐璐

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要:目的:研究“黄金菊”抗甲型流感病毒 PR8(A/PR8/34/H1N1)的活性,为药效组分中药的发现提供科学依据。方法:采用 MTT 掺入比色法测定药效组分中药“黄金菊”对狗肾传代细胞(MD-CK)的毒性及对 PR8 的有效性,同时设定阳性药物对照组及空白对照组;采用生物效价二剂量法对该药物与阳性药物的等效剂量进行比较。结果:该药物对 MDCK 细胞的 TD_{50} 为 $1.9061\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; TD_0 为 $0.625\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 对流感病毒 PR8 的 MIC 为 $312.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, IC_{50} 为 $112.8694\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。双黄连粉针与“黄金菊”等反应剂量比为 184.91%;病毒唑与“黄金菊”等反应剂量比为 46.17%。结论:“黄金菊”具有对甲型流感病毒的直接抑制作用,且存在明显的量效反应关系,作用优于市场应用较广泛的双黄连粉针,开发前景广阔。

关键词:药效组分中药“黄金菊” 甲型(H1N1)流感病毒 直接抑制作用

中药黄金菊来源于临床经方,是由金莲花、黄芩、野菊花三味药组成的现代中药复方制剂,具有清热解毒的功效,临床上治疗上呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎等疗效确切。在药效组分理论指导下,药效组分中药经药理学辅助验证,具有与原方等效或优于原方的新制剂,具备中药疗效及本质特征,具有高度的均匀性、量值的准确性及良好的稳定性^[1],各药效组分之间具有明确的比例关系。药效组分中药“黄金菊”是在黄金菊原方基础上,由本实验室研制的药效组分新药。

许多上呼吸道感染疾病是由病毒所引起的。医用外源性干扰素、白细胞介素-2 等能抑制病毒复制,提高机体细胞免疫功能,治疗前景良好,但费用昂贵,且大量使用尚有一定不良反应^[2]。在病毒感染的治疗方面,中药品种往往具有一定的优势。目前,市场上针对呼吸道病毒开发较成熟的品种双黄连注射剂具有良好的抗病毒作用,然而由于许多化学成分不明确,质量控制不科学等因素,导致其不良反应时有发生^[3],因此,开发新型疗效确切、化学成分明确的抗病毒制剂显得尤为迫切。本文就组分中药“黄金菊”对呼吸道甲型流感病毒(PR8 株)的作用进行了研究,现报道如下。

收稿日期:2009-07-14

修回日期:2009-11-23

* 科技部科技基础性工作专项重点项目(2007KYI130100):道地中药材及标准物质研制与分析方法研究,负责人:张贵君。

** 联系人:张贵君,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中药鉴定方法学;组分中药及中药药效组分质量标准体系研究,Tel:010-84738624, E-mail:guijunzhang@163.com。

一、实验材料

1. 主要仪器

DY-2 型全自动酶标测定仪(瑞士 Fluostar Optima 公司);C320 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Forma 公司)。

2. 主要试剂

RPMI1640 细胞培养基液干粉(批号:20071020RP, Gibco 公司);无支原体新生牛血清(批号 071115, 杭州四季青生物工程材料有限公司);MTT(噻唑蓝)(美国 Sigma);Hank's 平衡盐干粉(批号:20080520HA, 美国 Sigma);pH7.0 PBS 干粉(批号:20070810, 华美生物科技有限公司);DMSO(二甲基亚砷)(Amresco 公司)。

3. 试验药物

黄金菊(冻干粉, 150mg/瓶, 由本课题组研制)。

对照药:双黄连粉针剂(600mg/瓶, 哈药集团中药二厂, 批号 0801251);注射用利巴韦林(又名病毒唑, 浙江康裕制药有限公司, 批号 0804151)。

4. 病毒株及细胞

甲型流感病毒(A/PR8/34/H1N1, 以下简称 PR8, 购自中国预防科学院北京病毒研究所);MDCK(购自中国预防科学院北京病毒研究所)。该病毒在 MDCK 中的 $TICD_{50}$ 为 $10^{-5.3234}/0.1\text{mL}$ 。

二、实验方法

1. 药物对 MDCK 细胞毒性测定

以上试验药物用无菌水及细胞维持液配分别配制成 $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $40\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为测定 TD_{50} 最大浓度样本液(配制后 2h 内使用)。分别进行 2 倍连续梯度稀释, 将各浓度样本液加到已长成单层的 96 孔细胞培养板, 每个浓度平行加 4 孔, $0.1\text{mL}/$ 孔, 同时设置空白对照和细胞对照。 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 培养, 倒置显微镜逐日观察细胞病变(CPE)情况。当大浓度样本培养孔中细胞出现 CPE, 每孔加入 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT $50\mu\text{L}$, $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 继续培养 2h。 1500rpm 离心 10min, 弃去液体。用 PBS 洗 3 次, 每次加入 PBS $0.2\text{mL}/$ 孔, 浸泡 1min, 1500rpm 离心 10min, 弃去液体。每孔加溶解液 0.1mL , 振荡 5~10min, 待结晶完全溶解, 酶标仪 570nm 处, 用空白对照孔调零, 读取各孔 OD 值。

确定各样本对 MDCK 细胞的 TD_0 (细胞存活率大

于 90% 的最大样本浓度)。细胞存活率($\%$)=(实验孔 OD 值 / 细胞对照孔 OD 值) $\times 100\%$

按 Reed Muench 法^[4]计算 TD_{50} :

$TD_{50} = \text{anti-Ig}$ (低于 50% 细胞存活率的样本浓度的对数+距离比值 \times 稀释倍数的对数)

距离比例值=(50%-低于 50% 的存活率) / (高于 50% 存活率-低于 50% 的存活率)

2. 不同浓度供试药物病毒抑制率测定

将各样本用 Hank's 液分别配制成为对 MDCK 的最大无毒浓度。用细胞维持液将各样本液从最大无毒浓度开始做二倍连续梯度稀释共 9 个梯度(原液、1:2、1:4、1:8、……1:256), 每个浓度梯度样本液 2mL 。分别取各稀释度样本液 0.5mL 于无菌离心管。于每管样本液中加入 $50\mu\text{L}$ 100TICD_{50} 病毒液, 使病毒的终浓度为 100TICD_{50} 。 4°C 冰箱作用 2h。将作用液分别加到已经长成单层的 96 孔细胞培养板。每个梯度浓度样本与病毒作用液平行加 4 孔, 每孔 0.1mL 。置 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 吸附 1h。吸去孔中液体, 用无菌 Hank's 液洗板 2 次, 每次加液 $0.1\text{mL}/$ 孔, 浸泡 1min 后吸去孔中液体。加入不含样本的细胞维持液 $0.1\text{mL}/$ 孔, 置 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 培养, 逐日倒置显微镜下观察 CPE 出现情况, 尤其是病毒对照孔 CPE 情况。毒对照 CPE 达 80% 以上时, 每孔加入 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT $50\mu\text{L}$, $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 继续培养 2h, 1500rpm 离心 10min, 弃去上清。用 PBS 洗 3 次, 每次加入 PBS $0.2\text{mL}/$ 孔, 浸泡 1min, 1500rpm 离心 10min, 弃去液体。每孔加溶解液 0.1mL , 振荡 5~10min, 待结晶完全溶解, 酶标仪 570nm 处, 用空白对照孔调零, 读取各孔 OD 值。计算病毒抑制率。

3. 药物对 PR8 抗病毒活性 MIC 及 IC_{50} 的测定

依据不同浓度供试药物对病毒抑制率确定样本对病毒的 MIC, 按 Reed Muench 法计算 IC_{50} , 计算公式为: $IC_{50} = (\text{样本 OD} - \text{病毒 OD}) / (\text{细胞对照 OD} - \text{病毒对照 OD}) \times 100\%$ 。

4. 药物对数浓度-病毒抑制率关系曲线绘制

以不同浓度供试药物对病毒抑制率为纵坐标, 以药物对数浓度为横坐标, 绘制标准曲线。计算线性回归方程及 r 值。

5. “黄金菊”抗病毒药效评价

根据绘制的剂量反应曲线, 以对照药、待测药物在线性范围内高、低浓度抑制病毒率为观察指标(每一浓度平行测定 4 次), 采用生物效价二剂量法^[5],

高、低浓度剂距比为 2:1,照生物检定法中的 2:2 法进行可靠性检测及黄金菊与双黄连、黄金菊与病毒唑的等反应剂量比计算,从而评价黄金菊的抗甲型流感病毒的药效作用。

三、实验结果

1. 药物对 MDCK 细胞毒性作用

测定结果(见表 1)

2. 不同浓度供试药物病毒抑制率测定(见表 2)

率测定(见表 2)

3. 药物对 PR8 的 MIC 和 IC50 测定结果(见表 3)

测定结果(见表 3)

4. 药物对数浓度-病毒抑制率关系曲线

关系曲线

直线方程及计算值见表 4,量效关系标准曲线见图 1。

由图 1 及表 4 可见,在 3 个供试药物的对数浓度与病毒抑制率存在线性关系,并且存在共有线性范围(39.0625~156.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),故可以在此范围内进一步进行等效剂量比计算。

5. “黄金菊”抗病毒药效评价

在线性范围内,选取高浓度 156.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,低浓度 78.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,每浓度平行测定 4 次,病毒抑制率结果,见表 5。

黄连粉针与黄金菊等反应剂量比值 $R=184.91\%$,可靠性检测结果,见表 6。

病毒唑与黄金菊等反应剂量比值 $R=46.17\%$,可靠性检测结果,见表 7。

表 1 药物对 MDCK 细胞的 TD₀ 和 TD₅₀

样本名称	TD ₅₀ (mg·mL ⁻¹)	TD ₀ (mg·mL ⁻¹)
“黄金菊”冻干粉	1.9061	0.625
双黄连粉针剂	2.5862	0.625
病毒唑	6.5224	1.250

表 2 不同浓度样本对 PR8 病毒抑制率

样本及稀释度	浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	对数浓度	病毒抑制率(%)		
			“黄金菊”冻干粉	双黄连粉针	病毒唑
空白对照	-	-	-	-	-
病毒对照	100TICD ₅₀	0	0	0	0
细胞对照	-	100	100	100	100
样本原液	625	2.79588	101.504	79.4783	97.3435
1:02	312.5	2.49485	94.8665	63.5054	99.0909
1:04	156.25	2.19382	68.7359	32.3715	91.9185
1:08	78.125	1.89279	28.8	8.7792	71.9851
1:16	39.0625	1.59176	3.2028	-0.4218	45.7535
1:32	19.53125	1.29073	-0.3353	-0.0266	28.4224
1:64	9.765625	0.98970	-1.6165	-0.2267	7.5155
1:128	4.8828	0.68867	-0.6255	0.0404	-0.5371
1:256	2.4414	0.38763	-0.9629	0.6248	-

表 3. 样本对 PR8 的 MIC 和 IC₅₀

样品名称	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MIC($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
“黄金菊”冻干粉	112.8694	312.5
双黄连	231.3401	>625
病毒唑	43.7006	156.25

注:“>”表示大于本样本最大无毒浓度。

表 4 各药物抗 PR8 病毒量-效关系的直线方程及计算值

样品名称	方程	r	n
“黄金菊”冻干粉	$y=87.257x-132.00$	0.9566	5
双黄连粉针	$y=71.264x-119.61$	0.974	5
病毒唑	$y=64.027x-54.106$	0.9841	6

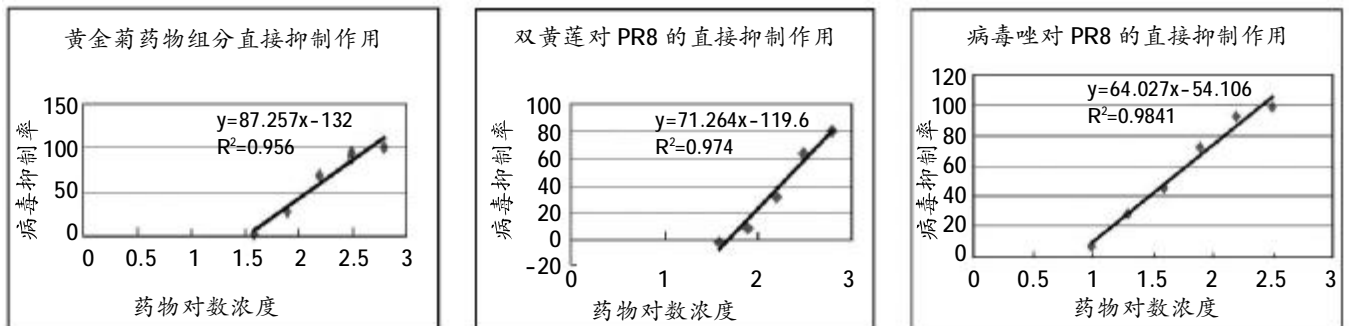


图 1 各药物抗 PR8 病毒量-效关系标准曲线

A:“黄金菊”冻干粉;B:双黄连粉针剂;C:病毒唑

表 5 选取高、低浓度对 PR8 抑制百分率

	“黄金菊”冻干粉		双黄连粉针		病毒唑	
	78.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	156.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	156.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	312.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	78.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	156.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	29.20	69.19	10.17	31.56	74.60	106.88
2	25.57	91.76	6.87	31.64	77.75	82.41
3	34.94	61.58	3.93	33.00	58.59	82.82
4	25.42	53.26	13.87	33.38	78.87	96.92

表 6 “黄金菊”冻干粉与双黄连粉针等效剂量比计算可靠性检验结果

变异来源	自由度	差方和	方差	F 值	P
回归	1	4077.09	4077.09	44.93	<0.01
偏离平行	1	271.56	271.56	2.99	>0.05
剂间	3	755.05	2518.35	27.75	<0.01
孔间	3	121.69	40.56	0.45	>0.05
误差	9	816.69	90.74		
总变异	15				

表 7 “黄金菊”冻干粉与病毒唑等效剂量比计算可靠性检验结果

变异来源	自由度	差方和	方差	F 值	P
回归	1	3602.70	3602.70	25.38	<0.01
偏离平行	1	416.67	416.67	2.94	>0.05
剂间	3	8498.66	2832.89	19.96	<0.01
孔间	3	300.23	100.08	0.71	>0.05
误差	9	1277.57	141.95		
总变异	15				

四、讨 论

根据以上试验结果,可以认为黄金菊药效组分在 MDCK 细胞中对甲型流感病毒具有直接抑制作用,且该药物最小抑制浓度均明显低于最大中毒剂量,优于目前市场上销售的双黄连针粉剂,且组分明确,质量可控性强,具有良好的开发利用价值。

参考文献

- 1 张贵君,罗容,王亦杰.中药药效组分理论与中药组分子学.中药材,2007,39(2):1-2.
- 2 冯本华,马萍,徐燕.中药抗病毒感染的研究近况.现代中西医结合杂志,2005,14(15):2073-2075.
- 3 胡斌,李燕.双黄连粉针剂的不良反应.药品评价,2005,2(5):395-396.
- 4 黄祯祥.医学病毒学基础及实验技术.北京科学出版社,1990:661-693.
- 5 杨汝德.生物药物分析与检验.南华理工大学出版社,2002:125-128.

Anti - influenza Effect of Huangjinju, A Chinese Medicine with Active Components Alignment

Zhang Chunhui, Zhang Guijun, Wang Jingjuan, Yang Jingfan, Zheng Lulu

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: The anti-influenza effect of Huangjinju, a Chinese medicine with active components alignment, was studied to provide scientific evidence for the discovery of new Chinese medicines. The anti-influenza effect of Huangjinju and its toxicity to MDCK were determined by the MTT assay. Meanwhile, the blank control and positive control were established. The equivalent-dose ratio of Huangjinju to positive drugs was estimated by the two-dose method. In MDCK, Huangjinju was found to inhibit influenza H1N1 virus in a concentration-dependent manner, with TD_{50} being $1.9061\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, TD_0 $0.625\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, MIC $312.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and IC_{50} $112.8694\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The equivalent-dose ratio of Shuanghuanglian to Huangjinju was 184.91%, and that of Virazole to Huangjinju was 46.17%. The results showed that, compared with Shuanghuanglian, Huangjinju has direct inhibitory effect on H1N1 influenza virus. With an obvious dose-effect relationship, Huangjinju will have a bright prospect.

Keywords: Active alignment Chinese drug-Huang Jinju; H1N1 of influenza virus; Direct inhibitory effect

(责任编辑:崔建华 李沙沙,责任译审:张立崴)