

板蓝根多肽对流感病毒感染小鼠抗病毒作用的研究^Δ

刘西京*, 林素静(深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055)

中图分类号 R285;R373 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0590-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.05

摘要 目的:研究板蓝根多肽对流感病毒感染小鼠的抗病毒作用。方法:以4倍半数致死量的流感病毒H1N1(A/PR8/34)液滴鼻感染以复制小鼠流感病毒感染模型。小鼠均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、利巴韦林(腹腔注射, 40 mg/kg)组与板蓝根多肽高、中、低剂量(灌胃给药, 200、100、50 mg/kg)组,连续给药7 d。测定小鼠死亡率、生存时间、肺指数、病毒滴度与T、B淋巴细胞增殖情况。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠死亡率升高,生存时间缩短,肺指数升高,T、B淋巴细胞减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,板蓝根多肽高、中剂量组小鼠死亡率降低,生存时间延长,感染第5天肺指数降低,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);板蓝根多肽高剂量组小鼠感染第3天病毒滴度降低,差异有统计学意义($P<0.05$);板蓝根多肽高、中、低剂量组小鼠T、B淋巴细胞增加,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:板蓝根多肽具有明显的抗病毒和促进免疫的作用。

关键词 板蓝根;多肽;流感病毒;肺指数

Study on Anti-virus Effect of Peptides from *Isatis indigotica* on the Mice Infected by Influenza Virus

LIU Xi-jing, LIN Su-jing (School of Applied Chemistry&Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Guangdong Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-virus effect of peptides from *Isatis indigotica* on the mice infected with influenza virus. METHODS: Mice models of influenza virus infection were induced by nasal drops of 4LD₅₀ influenza virus H1N1(A/PR8/34). Mice were divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), ribavirin group (i.p., 40 mg/kg, consecutive 7 days) and *I. indigotica* peptides high-dose, medium-dose and low-dose groups (i.g., 200, 100, 50 mg/kg, consecutive 14 days). The mortality, survival time, lung index, virus titer, the proliferation of T and B lymphocyte in mice were determined. RESULTS: Compared with normal control group, the mortality, lung index of mice in model group were increased significantly, while survival time, the proliferation of T and B lymphocyte was decreased significantly; there was statistical significance ($P<0.01$). Compared with model group, the mortality, survival time and lung index on 5th day were decreased significantly in *I. indigotica* peptides high-dose and medium-dose groups; there was statistical significance ($P<0.01$ or $P<0.05$); virus titer of *I. indigotica* peptides high-dose was decreased significantly on 3rd day; there was statistical significance ($P<0.05$); T and B lymphocyte of *I. indigotica* peptides high-dose, medium-dose and low-dose groups were increased significantly; there was statistical significance ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: *I. indigotica* peptides can obviously inhibit influenza virus in vivo and improve immune function.

KEYWORDS *Isatis indigotica*; Peptides; Influenza virus; Lung index

板蓝根为十字花植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,具有清热解毒、凉血消肿之功效,临床上广泛用于治疗流感、腮腺炎、温病发热、流行性乙型脑炎、肝炎等疾病^[1],是公认的有效抗病毒中药之一。然而,其抗病毒的物质基础不明,临床主要应用剂型为颗粒剂,这种制剂服用剂量大,质量控制指标不明确,限制了产品的二次开发。有关板蓝根有效部位的研究已有大量报道,如有机酸^[2]、氨基酸^[3]、总生物碱、表告依春^[4]、核苷^[5]、多糖^[6]等均具有良好的抗病毒作用,均被认为是板蓝根的活性成分。板蓝根成分复杂多样,对其清热解毒物质基础的认识还不统一。本课题组在研究中发现,板蓝根中有较高含量的多肽,在体外具有一定的抗流感病毒作用,现拟对

其进行初步的体内抗流感病毒实验,以为板蓝根的进一步开发和质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

可调式移液器(日本 Nichiryo 公司);1-14 型离心机(德国 Sigma 公司);AL-204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];F200/M200 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Avanti J30I 型大容量冷冻离心机(美国 Beckman 公司);ALPLTA 1-2 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司);SG403TXCE II 级生物安全柜(美国 Baker 公司)。

1.2 药材

板蓝根,2011年10月购自甘肃,经湖南中医研究院刘春海副研究员鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

利巴韦林注射液(山东鲁抗辰欣药业有限公司,批号:11033015,规格:50 mg/ml);732 型强酸性阳离子树脂(南开大

^Δ 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No.S2011010004460);深圳市战略性新兴产业发展专项资金项目(No.JCYJ20120617141750876);深圳职业技术学院校级青年创新项目

* 高级工程师。研究方向:中药化学和活性。E-mail: liuxijing@szpt.edu.cn

学化工厂);伴刀豆球蛋白(Con A)、脂多糖(LPS)均购自美国Sigma公司。

1.4 动物与流感病毒

SPF级KM小鼠,♀♂兼半,体质量14~16g,由青岛市实验动物和动物实验中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(鲁)2009-011]。甲型流感病毒鼠肺适应株H1N1(A/PR8/34)由中国科学院武汉病毒研究所提供,在9~10d龄的SPF鸡胚中传代增殖后,测定其对小鼠半数致死量(LD₅₀)为10⁻⁵,分装,于-80℃贮藏,备用。

2 方法

2.1 板蓝根总肽的制备

取板蓝根药材5kg,粉碎后过40目筛,加15倍量的水浸渍24h(4℃),用纱布粗滤,以离心半径为8cm、6000r/min离心10min,经截留分子质量为1kDa的超滤膜超滤浓缩,用盐酸调pH4,过732型强酸性阳离子树脂,用蒸馏水洗脱4个体积,用氨水(pH8)洗脱5~8个体积,再经截留分子质量为1kDa的超滤膜超滤浓缩,冷冻干燥,即得。经SDS-PAGE电泳鉴定分子质量主要分布15~35kDa,采用BCA法测定含量为91.06%^[7]。

2.2 板蓝根多肽对模型小鼠死亡率、生存时间的影响

60只小鼠随机均分为6组,即正常对照(ig,等容生理盐水)组、模型(ig,等容生理盐水)组、利巴韦林(ip,40mg/kg)组与板蓝根多肽高、中、低剂量(ig,200、100、50mg/kg)组。乙醚轻度麻醉小鼠,以4LD₅₀的流感病毒H1N1(A/PR8/34)液滴鼻(0.05ml/只)以复制小鼠流感病毒模型。复制模型当日给药,每天1次,连续7d。自复制模型当日起连续观察14d,计算各组小鼠死亡率及平均生存时间。

2.3 板蓝根多肽对模型小鼠不同时相肺损伤及病毒增殖的影响

复制模型与分组、给药同“2.2”项下方法。于给药24、72、120h分别处死1/3小鼠,摘取肺脏称量,计算肺指数[肺指数(%)=(肺质量/小鼠体质量)×100%],将肺组织置匀浆器中加生理盐水[肺质量(g):生理盐水(ml)=1:9]研磨制成匀浆,4℃下以离心半径为8cm、2500r/min离心20min后取上清液,用微量血凝实验检测小鼠肺组织中病毒滴度。

2.4 板蓝根多肽对模型小鼠机体免疫功能的影响

复制模型与分组、给药同“2.2”项下方法。给药5d后断头处死小鼠,无菌摘取脾脏,常规制备脾细胞悬液,MTT法测定T、B淋巴细胞的增殖情况^[8]。

2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0统计软件处理实验数据。多组间比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。不同时间点测定同一数据采用重复测量方差分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 板蓝根多肽对模型小鼠死亡率、生存时间的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠死亡率升高,生存时间缩短,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,板蓝根多肽高、中剂量组小鼠死亡率降低,生存时间延长,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明,板蓝根多肽对流感病毒感染小鼠的死亡具有保护作用,能明显延长小鼠的存活时间。板蓝根多肽对模型小鼠死亡率、生存时间的影响见表1。

表1 板蓝根多肽对模型小鼠死亡率、生存时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Influence of *I. indigotica* peptides on the mortality and survival time of model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	死亡率,%	生存时间,d
正常对照组		0	14.0
模型组		90*	7.24 ± 1.51*
利巴韦林组	40	10 ^{##}	13.45 ± 0.93 ^{##}
板蓝根多肽高剂量组	200	40 ^{##}	11.85 ± 1.12 ^{##}
板蓝根多肽中剂量组	100	50 [#]	10.32 ± 2.09 [#]
板蓝根多肽低剂量组	50	80	9.70 ± 2.14

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.2 板蓝根多肽对模型小鼠不同时相肺损伤及病毒增殖的影响

在感染病毒1d后,各组间肺指数差异无统计学意义($P > 0.05$)。感染病毒3、5d后,与正常对照组比较,模型组小鼠肺指数升高($P < 0.01$),病毒滴度增加,表明小鼠感染病毒后肺部已有明显炎症;与模型组比较,板蓝根多肽高、中剂量组小鼠肺指数降低,病毒滴度减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。板蓝根多肽对模型小鼠肺指数和病毒滴度的影响见表2。

3.3 板蓝根多肽对模型小鼠机体免疫功能的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠T、B淋巴细胞减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明流感病毒感染小鼠后抑制了T、B淋巴细胞的增殖;与模型组比较,板蓝根多肽高、中、低剂量组小鼠T、B淋巴细胞增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明,板蓝根多肽对流感病毒感染小鼠的免疫功能具有促进作用。板蓝根多肽对模型小鼠T、B淋巴细胞的影响见表3。

表2 板蓝根多肽对模型小鼠肺指数和病毒滴度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Influence of *I. indigotica* peptides on lung index and virus titer of model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	1 d		3 d		5 d	
		肺指数,%	病毒滴度(ln)	肺指数,%	病毒滴度(ln)	肺指数,%	病毒滴度(ln)
正常对照组		0.74 ± 0.06		0.74 ± 0.05		0.73 ± 0.09	
模型组		0.96 ± 0.09		1.31 ± 0.25*	1.88 ± 0.59	1.83 ± 0.30*	2.89 ± 0.57
利巴韦林组	40	0.81 ± 0.03		0.88 ± 0.09 ^{##}		1.01 ± 0.37 ^{##}	0.94 ± 0.05 ^{##}
板蓝根多肽高剂量组	200	0.83 ± 0.08		1.03 ± 0.07	1.33 ± 0.52 [#]	1.22 ± 0.24 ^{##}	1.72 ± 0.57 [#]
板蓝根多肽中剂量组	100	0.86 ± 0.05		1.09 ± 0.11	1.57 ± 0.56	1.39 ± 0.25 [#]	2.12 ± 0.77
板蓝根多肽低剂量组	50	0.91 ± 0.06		1.27 ± 0.14	1.69 ± 0.66	1.62 ± 0.16	2.79 ± 0.64

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表3 板蓝根多肽对模型小鼠T、B淋巴细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Influence of *I. indigotica* peptides on T and B lymphocyte of model mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	T淋巴细胞	B淋巴细胞
正常对照组		0.54±0.04	0.33±0.04
模型组		0.24±0.02*	0.19±0.02*
利巴韦林组	40	0.41±0.03 ^{##}	0.21±0.01
板蓝根多肽高剂量组	200	0.37±0.03 ^{##}	0.29±0.03 ^{##}
板蓝根多肽中剂量组	100	0.32±0.02 ^{##}	0.26±0.02 ^{##}
板蓝根多肽低剂量组	50	0.28±0.02 [#]	0.22±0.02 [#]

与正常对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$
vs. normal control group: * $P<0.01$; vs. model group: [#] $P<0.05$,
^{##} $P<0.01$

4 讨论

板蓝根多肽能够显著降低流感病毒H1N1(A/PR8/34)感染小鼠的死亡率,延长小鼠的生存时间,具有抗肺炎和抑制病毒在肺部增殖的作用,同时能够促进脾脏T、B淋巴细胞的增殖,改善感染小鼠细胞免疫功能,这可能是板蓝根多肽能够抗流感病毒的机制之一。研究证实,板蓝根多肽具有较好的抗流感病毒的作用^[8],可能为板蓝根抗病毒的主要活性成分之一,应引起重视。其是否可以作为板蓝根的有效部位和质量控制指标,尚需进一步的研究。

板蓝根成分复杂多样,除含多糖、氨基酸(肽或蛋白)等外,还含有生物碱类(如靛玉红、靛蓝)、有机酸类、苯甲酸类、芥子苷类、核苷类、腺苷、尿苷、苯丙素类等。关于板蓝根抗病毒有效部位的研究较多,几乎已涉及到上述所有化合物。目前,板蓝根有效部位的研究模式基本是采用化学法,若不遵循“等剂量不等强度”原则,则容易造成假阳性结果。如2010年版《中国药典》规定药材中含(R,S)表告依春不得少于0.020%(相当2 mg/10 g 药材)^[9],含量如此偏低,以此为控制指标还有待实践检验;又如,有研究认为,有机酸是板蓝根抗内毒素的主要物质,事实上有机酸在板蓝根中含量亦极低,其中含量最高的水杨酸仅为0.001 69%^[10],这也与本课题组的研究结果接近。如此低含量的成分作为板蓝根的抗病毒有效部位或质量控制指标值得探讨和商榷。

目前,板蓝根制剂的生产工艺多为水提醇沉,本课题组对板蓝根的水提醇沉液采用阴、阳离子交换树脂、大孔吸附树脂进行主要成分的分离,结果发现,尽管醇沉除去了大量的蛋白和多糖,但在板蓝根的水提醇沉液中含量最多的仍为多肽,约占整体的50%左右(以固体计),其次为多糖,再次为生物碱、核苷等成分,有机酸含量最低,几乎可以忽略。通过测定,板

蓝根药材中多肽(蛋白)的含量约在6~10%左右,换算到人体剂量,多肽高、中剂量组每天的给药量约相当于板蓝根原药材10~20 g左右。

中药是一种多因素、多变量、多层面、多效应的复杂网络体系,仅用单纯的药理和药化等常规研究思路及方法无法阐释其复杂的科学内涵。研究中药这个复杂体系的有效成分(群),必须要依靠整体动物实验来验证,应把握最基本的两个原则:一是口服后能被机体所吸收(原型或代谢物);二是要有一定的量为基础。

按“2.1”项下方法大量制备板蓝根多肽时,由于水用量过大,2次采用1 kDa超滤膜超滤浓缩。此外,732型强酸性阳离子树脂对多肽吸附性强,解析较难,造成收率偏低,约为20%~30%,故关于板蓝根多肽的分离纯化还需进一步研究和优选。

参考文献

- [1] 安益强,贾晓斌,袁海建,等.板蓝根抗病毒物质基础研究思路[J].中草药,2008,39(4):616.
- [2] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.高效液相色谱法测定板蓝根不同总酸部位中水杨酸的含量[J].中南药学,2008,6(2):137.
- [3] 陈凯,窦月,孟凡刚,等.板蓝根抗炎作用有效部位初步筛选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):200.
- [4] 徐丽华,黄芳,陈婷,等.板蓝根中的抗病毒活性成分[J].中国天然药物,2005,3(6):359.
- [5] 肖慧,刘清飞,王义明,等.正交试验优化提取板蓝根药材中核苷类成分的研究[J].中国新药杂志,2009,18(4):353.
- [6] 陈浩然,李祥,何立巍,等.板蓝根多糖A的分离纯化及结构研究[J].中国药房,2009,20(21):1641.
- [7] 曹玉华.BCA法测神奇灵颗粒剂中蛋白含量[J].中国实用医药,2009,4(7):43.
- [8] 孟明,陈冬志,武变瑛,等.痰热清注射液对流感病毒感染小鼠免疫功能的影响[J].河北大学学报:自然科学版,2006,26(5):529.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:142
- [10] 方建国,万进,汤杰,等.板蓝根防治病毒传染性疾病的研究概况[J].中国中药杂志,2009,34(24):3169.

(收稿日期:2013-07-25 修回日期:2013-09-06)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅