

臭灵丹乙醇提取物体外抑制甲 1 型流感病毒实验研究

王玉涛¹, 李菁¹, 夏晓玲², 孙强明³, 王尚文², 杨子峰¹, 王新华⁴, 张荣平²

(1) 广州医科大学附属第一医院呼吸疾病国家重点实验室, 广东广州 510230; 2) 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 3) 中国医学科学院医学生物学研究所, 云南昆明 650031; 4) 广州医科大学, 广东广州 510182)

[摘要] **目的** 研究臭灵丹乙醇提取物体外抑制甲 1 型流感病毒感染药效. **方法** 采用细胞病变抑制法, 在预防和治疗 2 种试验策略下, 探讨臭灵丹乙醇提取物体外对流感病毒的抑制作用及环节. **结果** 臭灵丹乙醇提取物的 TC₅₀ 为 3.07 mg/mL, 在预防模式和治疗模式中, 臭灵丹对甲 1 型流感病毒 PR8 株均有抑制作用, IC₅₀ 分别为 0.31 mg/mL, 0.73 mg/mL, 选择指数 (SI) 分别为 9.90 和 4.21. **结论** 臭灵丹乙醇提取物体外对甲 1 型流感病毒感染具有一定的抑制作用, 在预防模式下效果较好.

[关键词] 臭灵丹; 乙醇提取物; 体外药效

[中图分类号] R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 02-0004-04

The Inhibitory Effects of Ethanol Extract Isolated from *Laggera Pterodonta* against Influenza A Virus in Vitro

WANG Yu-tao¹, LI Jing¹, XIA Xiao-ling², SUN Qiang-ming³, WANG Shang-wen², YANG Zi-feng¹, WANG Xin-hua⁴, ZHANG Rong-ping²

(1) *State Key Laboratory of Respiratory Diseases, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Guangzhou 510230;* 2) *Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650500;* 3) *Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Yunnan Kunming 650031;* 4) *Guangzhou Medical University, Guangdong Guangzhou 510182, China)*

[Abstract] **Objective** To investigate the antiviral effect of ethanol extract from *Laggera Pterodonta* against influenza A virus in vitro. **Methods** The cytopathic effect (CPE) assay were used to explore the antiviral effect of ethanol extract against influenza virus and the possible target in the model of the prevention and treatment. **Results** The 50% cytotoxic concentration of ethanol extract was 3.07 mg/mL. In the model of prevention and treatment, the ethanol extract could inhibit the infection of influenza A virus PR8 strain in MDCK cell, the 50% inhibitory concentrations were 0.31mg/mL and 0.73mg/mL, the selection indexes (SI) were 9.90 and 4.21, respectively. **Conclusion** The ethanol extract from *Laggera Pterodonta* can inhibit the influenza virus infection in vitro, and the effects may be better in the model of prevention.

[Key words] *Laggera Pterodonta*; Ethanol extract; Drug effect in vitro

流感是最为常见的呼吸系统疾病, 其传染性 人群均易感染^[1]. 2009 年源于墨西哥的新甲流以及
强, 传播速度快, 发病率高且具有季节性, 一般 2013 年初源于我国的人感染禽流感病毒 H7N9, 均

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81460593), 广州市教育系统创新学术团队基金资助项目 (13C07), 广州市科技计划项目-科技惠民专项 (2014Y2-00031), 广州市健康医疗协同创新重大专项 (201400000002), 云南省应用基础研究重点资助项目 (2014FA031)

[作者简介] 王玉涛 (1981~), 男, 河南信阳市人, 在读博士研究生, 助理研究员, 主要从事中药抗病毒研究工作.

[通讯作者] 王新华. E-mail: xinhua@gzhmc.edu.cn; 张荣平. E-mail: zhrpkm@163.com

给人类健康和公众社会造成极大危害^[2]。目前常用的抗流感药物根据作用机制分为: M2 离子通道抑制剂(金刚烷胺和金刚乙胺)和神经氨酸酶抑制剂(奥司他韦和扎那米韦)^[3]。金刚烷胺早已有耐药株,且只对甲型流感病毒有作用,因此该类药物临床使用并不广泛^[4]。虽然神经氨酸酶抑制剂对甲、乙型流感病毒均有效,但依然受到耐药性的困扰,2013年我国出现的人感染 H7N9 禽流感病毒也出现了磷酸奥司他韦的耐药株^[5]。

臭灵丹(*Laggera pterodonta* (DC.) Benth)为菊科六棱菊属植物,别名狮子草、臭叶子、六棱菊等,味辛、苦,性凉,归肺、胃经,分布于云南、四川、西藏等地,主产于我国云南省,药源丰富^[6,7]。《云南中草药》、《昆明民间常用草药》以及《滇南本草》等大量载了云南民间使用臭灵丹的经验,该药具有良好的抗菌消炎、清热解毒的作用,被广泛用于治疗感冒、咽喉炎、支气管炎、疟疾等病症,目前市场上已有多种臭灵丹制剂或以臭灵丹为主要成分的中成药。

但是关于臭灵丹抗流感病毒的基础研究还比较少,因此,本实验研究了臭灵丹乙醇提取物体外对甲1型流感病毒的药效,为其临床研究提供基础数据支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

药材:臭灵丹药材乙醇提取物由昆明医科大学制备。阳性对照药物利巴韦林购自广东肇庆星湖生物科技股份有限公司,批号:L071051。

细胞狗肾上皮细胞(MDCK)购自美国经典培养物收藏中心(ATCC)。

病毒株甲型 H1N1 流感病毒 PR8 株(A/PR/8/34, H1N1)购自美国经典培养物收藏中心(ATCC)。病毒以9~11日龄鸡胚扩增,收获尿囊

液,测定其相应血凝效价。以 Reed-Muench 法测定其半数感染量(TCID₅₀)作为病毒滴度,用于细胞病变抑制法。

1.2 实验方法

1.2.1 臭灵丹乙醇提取物制备 臭灵丹药材经乙醇回流提取,过滤,浓缩具体流程,见图1。

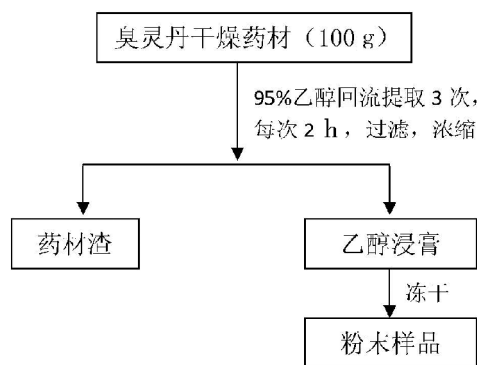


图1 臭灵丹药材乙醇提取流程图

Fig. 1 The procedure of isolating ethanol extract from *Laggera Pterodonta*

1.2.2 臭灵丹乙醇提取物体外抑制甲1型流感病毒PR8株药效试验 (1) 药物毒性试验(MTT法)^[8]按每孔约 2.5×10^4 细胞浓度接种到96孔板,48 h后待细胞长成单层,弃去培养液,加入不同稀释度的药物100 μ L/孔,同时设置阳性药物(利巴韦林),正常细胞对照孔加入100 μ L/孔MEM,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂继续培养2 d,每孔加MTT溶液(5 mg/mL)20 μ L,置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂温箱中继续孵育4 h。吸弃上清液,每孔加100 μ L二甲基亚砷(DMSO),低速振荡10 min,使结晶物充分融解。选择490 nm波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值。按照下列公式计算抑制率,并用Reed-Muench法^[9]计算50%毒性浓度为药物半数有毒浓度(TC₅₀)。

$$\text{计算抑制率} = \frac{(\text{正常} - \text{空白}) - (\text{给药} - \text{空白})}{\text{正常} - \text{空白}} \times 100\%$$

(2) 药物体外抗流感病毒药效^[10]以细胞病变抑制法(Cytopathic effect reduction method)在预防和治疗2种试验策略下研究臭灵丹乙醇提取物对甲1型流感病毒PR8株的抑制作用。①预防模式:长满单层的96孔细胞培养板内的MDCK细胞,加入含不同浓度药物的培养液,孵育2 h,弃去上清,吸附病毒(100TCID₅₀)2 h,然后吸弃上清,

加入病毒维持液,置34 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境下培养2 d。②治疗模式:长满单层的96孔细胞培养板内的MDCK细胞吸附病毒2 h,同时设定阳性药物(利巴韦林)和细胞对照,然后加入含不同浓度药物的培养液,置34 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境下培养2 d。

细胞出现病变程度按以下6级标准记录:-为细胞生长正常,无病变出现;±为细胞病变少于整

个单层细胞的 10%；+ 为细胞病变约占整个单层细胞的 25%；++ 为细胞病变约占整个单层细胞的 50%；+++ 为细胞病变约占整个单层细胞的 75%；++++ 为细胞病变约占整个单层细胞的 75% 以上。用 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 (IC_{50})，并以选择指数 SI 表示 ($SI=TC_{50}/IC_{50}$)， $SI>2$ 表示低毒高效； $SI: 1\sim 2$ 表示高毒低效； $SI<1$ 表示无效。

1.3 统计学处理

Reed-Muench 法计算。 TC_{50} 与 IC_{50} 实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，应用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 臭灵丹乙醇提取物对细胞毒性作用

使用 MTT 法，臭灵丹乙醇提取物在 MDCK 细胞的半数有毒浓度 (TC_{50}) 为 3.07 mg/mL，见表 1。

2.2 臭灵丹乙醇提取物对甲 1 型流感病毒 PR8 株的抑制作用

臭灵丹乙醇提取物在预防模式和治疗模式中对甲 1 型流感病毒 PR8 株均有抑制作用， IC_{50} 分别为 0.31 mg/mL 和 0.73 mg/mL，SI 分别为 9.90 和 4.21，见表 1。

表 1 臭灵丹乙醇提取物抑制甲 1 型流感病毒 PR8 株药效 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Anti-influenza effect of the ethanol extract isolated from *Laggera Pterodonta* ($\bar{x} \pm s$)

药 物	TC_{50} (mg/mL)	IC_{50} (mg/mL)		选择指数 $SI=TC_{50}/IC_{50}$	
		A	B	A	B
臭灵丹乙醇提取物	3.07	0.31 ± 0.023	0.73 ± 0.05	9.90 ± 0.72	4.21 ± 0.33
利巴韦林	0.644	NT	0.005	NT	128.8

注：A 为预防模式；B 为治疗模式选择指数 (SD)， $SI>2$ 表示低毒高效； $SI: 1\sim 2$ 表示高毒低效； $SI<1$ 表示无效。

3 讨论

针对流感病毒的高变异性，及疫苗研究的滞后性，抗病毒药物研究在防控流感方面具有重要的作用。现有化学药物极易产生耐药性，而传统中药由于其多靶点、多环节及免疫调节作用优势，为抗流感病毒药物研究提供了一个新的选择。

臭灵丹为云南省的特色植物药，民间应用广泛，国内已有较多临床报道，有研究显示臭灵丹口服液治疗急性呼吸道感染伴高热时，具有较好的退热治疗效果^[1]。另有研究使用臭灵丹合剂治疗感冒，临床疗效观察中发现其对风热型和风寒型感冒均有效^[2]。而在 2009 年新甲流流行期间，研究者以臭灵丹为主要成分的“感冒消炎片”治疗甲型流感的临床对照研究发现该药能够迅速缓解流感所致的发热、咽痛等症状，有效降低呼吸道分泌物中甲型 H1N1 流感病毒载量，加快病毒转阴，治疗效果好且安全^[3]。

基于其临床的良好疗效，而有关臭灵丹抗流感病毒的基础研究则较少，本实验探讨了臭灵丹药材乙醇提取物的抗甲 1 型流感病毒药效，结果提示，在预防给药模式下，即先将宿主细胞给予药物作用 2 h，然后再攻击病毒，药物显示了较好的抗流感病毒感染作用， IC_{50} 为 0.31 mg/mL，SI 为 9.90。该结果表明臭灵丹乙醇提取物对宿主细胞可

能有一定的保护作用，在与细胞共孵育 2 h 后，可能对细胞表面流感病毒感染相关受体有“封闭”作用，或者竞争性结合在细胞表面的流感病毒受体，从而阻止病毒感染，而人与禽流感病毒受体存在一定差异，该药物是否具有广谱性，对 2 种受体均有抑制作用有待进一步研究。

而在治疗模式下，即流感病毒感染宿主细胞 2h 后，再加入臭灵丹乙醇提取物，药物依然显示了一定的抗流感病毒作用， IC_{50} 为 0.73 mg/mL，SI 为 4.21，该结果表明臭灵丹乙醇提取物对流感病毒在宿主细胞内复制的特定阶段具有一定的抑制作用，具体作用环节还需利用时间点实验进一步验证。

本实验仅对臭灵丹乙醇提取物进行了一个初筛研究，以期证实臭灵丹确切的抗流感病毒药效。由于其成分复杂，含量不均，因此，结果显示其在预防给药和治疗给药模型下均有效，表明该醇提物中含有不同作用机制的抗流感病毒药效成分，后续研究将进行成分分离及活性筛选，以获得明确的活性成分，及其具体作用机制机理。

[参考文献]

[1] RICHMAN D D, WHITLEY R J, HAYDEN F G. Clinical

(下转第 28 页)

- 752 - 758.
- [7] BEHRENS J, LUSTY B. The Wnt connection to tumor genesis[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5-6):477 - 487.
- [8] HE B, REGULAR N, YOU L, et al. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations [J]. *Onogenesis*, 2005, 24(18):3 054 - 3 058.
- [9] KARIM R, TSE G, PUTTI T, et al. The sign finance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers [J]. *Pathology*, 2004, 36(2):120 - 128.
- [10] 包传恩, 刘升. Wnt-1在非小细胞肺癌中表达的临床意义[J]. *江西医药*, 2009, 44(6):551 - 552.
- [11] BIAO H E. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells [J]. *Neoplasia*, 2004, 6(1):7.
- [12] MIKAMI I, YOU L, HE B. Efficacy of Wnt-1 monoclonal antibody in sarcoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5:53.
- [13] 程万宏, 王艳俊, 隗玉川, 等. 肺腺癌组织中Wnt-1基因表达及临床意义探讨 [J]. *中外健康文摘*, 2010, 17(7):100 - 101.
- [14] NAKASHIMA T, LIU D, NAKANO J. Wnt-1 over expression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. *Once Rep*, 2008, 19(1):203.
- [15] HUANG C L, LIU D, ISHIKAWA S, et al. Wnt-1 over expression promotes tumor progress in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 2008, 44(17):2 680.
- [16] YOU L, KIM J, HE B, et al. Wnt-1 signal as a potential cancer therapeutic target [J]. *Drug News Perspect*, 2006, 19(1):27 - 31.
- (2014 - 12 - 03 收稿)

(上接第6页)

- virology [M]. Washington: ASM Press, 2009:958.
- [2] GAO R, CAO B, HU Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1 888 - 1 897.
- [3] BOLTZ D A, ALDRIDGE J R, WEBSTER R G, et al. Drugs in Development for Influenza [J]. *Drugs*, 2010, 70 (11):1 349 - 1 362.
- [4] DEYDE V M, XU X, BRIGHT R A, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(2):249 - 257.
- [5] YEN H L, MCKIMM-BRESCHKIN J L, CHOY K T, et al. Resistance to neuramidase inhibitors conferred by an R292K mutation in a human influenza virus H7N9 isolate can be masked by a mixed R/K miral population [J]. *MBio*, 2013, 4(4):1 - 8.
- [6] 刘百联, 张婷, 张晓琦, 等. 臭灵丹化学成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(5):602 - 606.
- [7] 杨艳, 陈旭冰, 陈光勇, 等. 民族传统药灵丹草研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(3):173 - 175.
- [8] EHRHARDT C, HRINCIUS E R, KORTE V, et al. CYS-TUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance [J]. *Antiviral Research*, 2007, 76(1):38 - 47.
- [9] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. *Am J Hyg*, 1938, 27(3):493 - 497.
- [10] HSIEDH 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.
- [11] 何红, 蔡瑞锦, 庞永成. 臭灵丹口服液治疗急性呼吸道感染高热95例 [J]. *云南中医中药杂志*, 2000, 21(6):38 - 39.
- [12] 郑秀琴, 李洁, 陈昆昌, 等. 臭灵丹合剂治疗感冒临床疗效观察 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 2000, 47(6):343 - 345.
- [13] 刘兴峰, 尚晓丽, 田云粉, 等. 感冒消炎片治疗儿童甲型H1N1流感临床试验评价 [J]. *昆明医学院学报*, 2011, 32(5):99 - 102.
- (2014 - 11 - 06 收稿)