

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.09.016

黄芩的三种不同炮制品对感染甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺指数及病毒载量的影响

朱广伟¹, 张贵君^{2*}, 孙奕¹, 汪萌²

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 北京中医药大学中药学院)

摘要 目的 研究蒸黄芩、水煮黄芩、酒炒黄芩对流感病毒 H1N1 的抑制作用。方法 将 120 只 ICR 小鼠随机分为正常对照组 (10 只)、模型对照组 (10 只)、利巴韦林组 (10 只)、蒸黄芩组 (30 只)、水煮黄芩组 (30 只)、酒炒黄芩组 (30 只)。蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组又分别设计高、中、低 3 个剂量, 每个剂量 10 只。除正常对照组外, 其余各组小鼠以 $15 \times LD_{50}$ A/PR/8/34 株流感病毒液滴鼻感染, 每只 35 μ l; 正常对照组以等量无菌生理盐水滴鼻。感染当天利巴韦林组给予利巴韦林颗粒 82.5 mg/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次; 蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组高、中、低剂量分别给予相应药物 50、20、10 mg/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次; 正常对照组和模型对照组给予等量蒸馏水灌胃。各组均灌胃 5 天。测定各组小鼠肺指数、肺组织病毒载量, 计算肺指数抑制率和病毒抑制率。结果 模型对照组小鼠肺指数较正常对照组显著增加 ($P < 0.01$); 利巴韦林组和蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组高、中剂量小鼠肺指数均较模型对照组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。利巴韦林组与酒炒黄芩高剂量组肺指数抑制率分别为 62.30% 与 47.54%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组肺指数抑制率随给药剂量的增加而增强。与模型对照组比较, 利巴韦林组和酒黄芩组各剂量均可降低小鼠肺组织中病毒载量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 酒炒黄芩组各剂量病毒抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量 > 中剂量 > 低剂量。结论 蒸黄芩、水煮黄芩、酒炒黄芩均具有不同程度的抗病毒作用, 并且随剂量的增大而增强, 其中酒炒黄芩的抗病毒作用优于蒸黄芩和水煮黄芩。

关键词 黄芩; 酒炒黄芩; 水煮黄芩; 蒸黄芩; 中药炮制; 抗病毒作用

黄芩 [*Radix Scutellariae*] 为唇形科植物, 以根入药, 有清热燥湿、凉血安胎、解毒功效。研究认为, 黄芩的有效成分是黄酮类化合物, 其主要药理作用为抗病毒、抗炎、抗菌、抗变态反应、保肝、抗氧化、抗肿瘤^[1-4]等。本研究观察黄芩的三种不同炮制品蒸黄芩、水煮黄芩、酒炒黄芩对流感病毒 H1N1 的抑制作用是否有差别。

1 材料

1.1 药材、药品

蒸黄芩 (批号: 1403004)、水煮黄芩 (批号: 1403005)、酒炒黄芩 (批号: 1403008) 均购自河北省安国路路通中药饮片有限公司。利巴韦林颗粒 (病毒唑): 四川百利药业有限责任公司, 批号:

101232。乙醚 (无水): 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20131006。

1.2 实验动物、细胞

ICR 小鼠 120 只, 雄性, SPF/VAF 级, 体重 (14 $\pm$ 1) g, 品系 CD-1, 均由北京维通利华试验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2006-0009, 饲养温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (60 $\pm$ 10) %。

1.3 病毒毒种

甲型 H1N1 流感病毒鼠肺适应株 (A/PR/8/34 株): 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所提供。

1.4 主要试剂及仪器

Trizol 试剂 (批号: 15596-026), Invitrogen 公司; TAE 电泳缓冲液 (批号: 20110425)、RNAon 变性上样液 (批号: 20120923) 均为 Solarbio 公司

基金项目: 中国中医科学院中药研究所基本科研业务费自主选题项目 (ZXKT15037)

* 通讯作者: guijunzhang@163.com

产品; 反应体系配制按试剂盒 (批号: 2011001010), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司。A2 型二级生物安全柜 MSC-advantage 1.8 (美国 Thermo Scientific 公司); Genesys 10 紫外/可见光分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司); HC-3018R 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳公司); IT820 型 CO₂ 培养箱 (日本 Yamato 科学株式会社); IX71 型倒置相差显微镜 (日本 Olympus 光学工业株式会社)。

2 方法

2.1 黄芩不同炮制品水煎液的制备

分别取蒸黄芩、水煮黄芩、酒炒黄芩各 20 g 置圆底烧瓶中, 分别加 12 倍量水浸泡 30 min, 再煎煮, 保持水煎液沸腾 30 min, 过滤水煎液, 残渣再加入 12 倍量水煎煮 30 min, 过滤, 合并煎煮液, 浓缩成浓度为 0.01 g/ml 的原药材溶液, 静置 20 min, 离心, 分出上清液, 即得浓度为 0.01 g/ml 的原药材溶液, 冰箱冷藏, 备用。不同炮制品按高、中、低量分别有 50、20、10 mg/(kg·d) 3 个剂量。

2.2 利巴韦林溶液、病毒液的制备

取利巴韦林颗粒 100 mg, 加蒸馏水至 24.24 ml, 摇匀, 即得浓度为 4.125 mg/ml 的溶液。取 -80℃ 保存的流感病毒 A/PR/8/34 株, 已测得 LD₅₀ 为 10^{-2.7}/35 μl, 将该病毒以无菌生理盐水稀释 10^{2.7}/15 = 33 倍, 即取病毒 0.1 ml 加无菌生理盐水 3.2 ml 即得 15 × LD₅₀, 冰上保存备用。

2.3 动物分组及处理方法

将小鼠按体重采用抽签法^[4]分为正常对照组 (10 只)、模型对照组 (10 只)、利巴韦林组 (10 只)、蒸黄芩组 (30 只)、水煮黄芩组 (30 只)、酒炒黄芩组 (30 只)。蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组又分别设计高、中、低 3 个剂量, 每个剂量 10 只。除正常对照组外, 其余各组小鼠用乙醚轻度麻醉, 以 15 × LD₅₀ A/PR/8/34 株流感病毒液滴鼻感染, 每只 35 μl; 正常对照组以等量无菌生理盐水滴鼻。感染当天利巴韦林组给予利巴韦林颗粒 82.5 mg/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次; 蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组高、中、低剂量分别给予相应药物 50、20、10 mg/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次; 正常对照组和模型对照组给予等量蒸馏水灌胃。各组均灌胃 5 天。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 小鼠肺指数 各组小鼠第 5 天给药后禁食

禁水 12 h, 称取身体质量, 脱颈椎处死小鼠, 解剖, 摘取全肺, 以生理盐水洗涤干净, 用滤纸吸干表面残余水分, 称取肺质量, 计算肺指数 (每 100 g 身体质量的肺质量) 与肺指数抑制率^[5]。肺指数 = 肺质量 (g) / 身体质量 (g), 肺指数抑制率 = (模型对照组肺指数均值 - 实验组肺指数均值) / (模型对照组肺指数均值 - 正常对照组肺指数均值) × 100%。

2.4.2 小鼠肺病毒载量 1) 小鼠肺组织总 RNA 的提取。取于液氮中 -70℃ 保存的小鼠肺组织, 尽快研磨成粉末状, 按照 Trizol 试剂说明书进行组织总 RNA 提取, 最后用 15 μl DEPC 水溶解沉淀, -70℃ 保存。2) 鼠肺组织总 RNA 完整性的检查及纯度检测。按照 TAE 电泳缓冲液与 RNAon 变性上样液说明书进行总 RNA 完整性检查, 结果显示总 RNA 样品中 28S rRNA 与 18S rRNA 的电泳条带清晰, 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的两倍, 说明所有样品的总 RNA 完整性较好。取 5 μl 总 RNA 样品加 0.5 ml DEPC 水稀释, 置紫外分光光度计中测其在波长 260 nm 与 280 nm 处的吸光度值 A₂₆₀ 与 A₂₈₀。结果所有总 RNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值均为 1.8 ~ 2.0, 说明所有样品的总 RNA 纯度较好。3) 实时荧光定量 RT-PCR 检测。引物 (康贝生化有限公司合成) 工作浓度 (10 μM), 新合成的引物开盖前 12 000 r/min 离心 15 s; 加 95 μl RNase Free dH₂O 溶解, 充分混匀, 引物浓度为 100 μM, 作为贮备液; 将 100 μM 的引物用 RNase Free dH₂O 稀释 10 倍, 得浓度 10 μM, 作为工作浓度。反应体系配制按试剂盒说明书进行。PCR 扩增检测, 将 PCR 反应用混合液分装至每个 PCR 反应管中, 放入荧光 PCR 检测仪内, 每个样品 3 个平行孔, 同时设阴性、阳性与空白对照; 反应及条件设定按照试剂盒说明书进行; 72℃ 时设置采集荧光, 进行核酸的融解曲线分析, 将温度与荧光强度的变化求导, 得出指数图谱, 以鉴定 PCR 产物的特异性。病毒抑制率 = (模型对照组病毒载量 - 实验组病毒载量) / 模型对照组病毒载量 × 100%

2.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用独立样本 *t* 检验, 率的比较采用 Levene 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠肺指数及肺指数抑制率比较

表 1 示, 模型对照组小鼠肺指数较正常对照组

显著增加 ($P < 0.01$); 利巴韦林组和蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组高、中剂量小鼠肺指数均较模型对照组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。利巴韦林组与酒炒黄芩高剂量组肺指数抑制率分别为 62.30% 与 47.54%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示两者疗效相当。同时, 蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组肺指数抑制率随给药剂量的增加而增强, 高剂量 > 中剂量 > 低剂量。

表 1 各组小鼠肺指数及肺指数抑制率比较

组别	剂量	鼠数	肺指数 ($\bar{x} \pm s$)	肺指数抑制率 (%)
正常对照组		10	0.75 ± 0.04	—
模型对照组		10	1.36 ± 0.36*	—
利巴韦林组		10	0.98 ± 0.09 ^{△△}	62.30
蒸黄芩组	高剂量	10	1.19 ± 0.22 [△]	27.87
	中剂量	10	1.29 ± 0.11 [△]	19.48
	低剂量	10	1.36 ± 0.36	15.22
水煮黄芩组	高剂量	10	1.16 ± 0.28 [△]	31.95
	中剂量	10	1.28 ± 0.21 [△]	29.51
	低剂量	10	1.36 ± 0.20	18.52
酒炒黄芩组	高剂量	10	1.07 ± 0.21 ^{△△}	47.54
	中剂量	10	1.22 ± 0.20 [△]	32.95
	低剂量	10	1.32 ± 0.41	29.93

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3.2 各组小鼠肺组织中病毒载量及病毒抑制率比较

表 2 示, 与模型对照组比较, 利巴韦林组和酒黄芩组各剂量均可降低小鼠肺组织中病毒载量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。利巴韦林组小鼠肺组织中病毒载量较蒸黄芩组、水煮黄芩组、酒炒黄芩组各剂量明显降低 ($P < 0.01$)。从各组病毒抑制率来看, 利巴韦林组病毒抑制率最高, 酒炒黄芩组各剂量病毒抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量 > 中剂量 > 低剂量; 而水煮黄芩组、蒸黄芩组并未显示显著抑制病毒的作用。

表 2 各组小鼠肺组织中病毒载量及病毒抑制率比较

组别	剂量	鼠数	病毒载量 ($\bar{x} \pm s$, copies/ml)	病毒抑制率 (%)
模型对照组		10	761869.85 ± 11756.57	—
利巴韦林组		10	990.43 ± 383.17**	99.87
蒸黄芩组	高剂量	10	624809.46 ± 92439.30 [△]	17.99
	中剂量	10	628390.25 ± 43136.62 [△]	17.52
	低剂量	10	643627.65 ± 43166.60 [△]	15.52
水煮黄芩组	高剂量	10	623971.41 ± 51764.68 [△]	18.10
	中剂量	10	629913.99 ± 58458.55 [△]	17.32
	低剂量	10	655131.88 ± 55358.51 [△]	14.01
酒炒黄芩组	高剂量	10	443255.87 ± 82212.29** ^{△△}	41.82
	中剂量	10	459102.77 ± 11036.64* [△]	39.74
	低剂量	10	542908.46 ± 11216.61* [△]	28.74

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与利巴韦林组比较, $\Delta P < 0.01$

4 讨论

流感病毒感染小鼠后侵袭小鼠肺组织, 导致其肺部炎症渗出, 从而增加肺的质量, 相应增加了肺指数, 肺指数越大表明肺部炎症病变程度越严重^[8]。本研究结果显示, 黄芩不同炮制品均有一定程度的抑制甲型 H1N1 流感病毒引起的肺指数的作用, 有一定的抗甲型 H1N1 流感病毒活性, 并且都随着药物剂量的增大而增强。酒炒黄芩组肺指数抑制能力最强, 其次是水煮黄芩组, 最后是蒸黄芩组。酒炒黄芩组病毒抑制率较蒸黄芩组、水煮黄芩组高, 达到了 41.82%, 而水煮黄芩组和蒸黄芩组的抑制率普遍低于 20%, 说明黄芩的三种炮制品中酒炒黄芩具有显著地抗病毒作用。综合以上结果可以看出, 蒸黄芩、水煮黄芩、酒炒黄芩均具一定抗病毒作用, 并且随剂量的增大而增强, 其中酒炒黄芩的抗病毒作用优于蒸黄芩和水煮黄芩。

研究表明, 黄芩中黄芩苷具有显著的抗病毒作用, 黄芩的抗病毒作用强度与黄芩苷的含量有关^[9]。与黄芩中有效成分黄芩苷共存的有黄芩酶, 其在适宜条件下可酶解黄芩中的苷, 生成性质不稳定的黄芩素, 导致黄芩苷含量下降, 黄芩素容易被氧化成不溶于水的醌类衍生物, 从而间接影响药效。在蒸黄芩、水煮黄芩、酒炒黄芩中, 酒炒黄芩的抗病毒作用最显著, 体现出中药炮制中杀酶保苷、保存药效成分、稳定或提高药效、保证中药质量的特点。另一方面, 酒既能凝固黄芩中的酶, 又是苷类的良好溶剂, 从传统观念讲, 酒有升提作用, 黄芩用酒制后可降低其苦寒之性, 免伤脾胃, 又可增强清肺热之功。

总之, 生黄芩经过不同方法的炮制, 化学成分的溶出率有显著变化, 因此汤剂中药效成分的含量有很大差异, 最终导致功效的不同。推测蒸黄芩、水煮黄芩、酒炒黄芩中的黄芩苷含量可能最高为酒炒黄芩, 其次是水煮黄芩, 最后是蒸黄芩。

参考文献

- [1] 张奉学. 黄芩苷对 HBsAg 和 HBeAg 的体外抑制作用 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13(5): 267-269.
- [2] 张凤英, 高玉峰, 宋鸿儒. 黄芩茎叶提取物与生脉饮抗柯萨奇病毒 B3 的体外研究 [J]. 天津医药, 2005, 33(11): 716-718.
- [3] 张道广, JMIMY KWANG, 潘胜利. 黄芩多糖抗猪生殖和呼吸系统综合征病毒作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 133-134.
- [4] 李敬, 刘云海, 陈新, 等. 黄芩中黄芩苷的抗内毒素作用

- Ⅱ. 医药导报, 2006, 25(12): 1237-1240.
- Ⅲ 苏如雄, 林旭文, 庄晓峰. 黄芩素对过氧化氢致 PC12 细胞损伤的保护作用研究 Ⅱ. 药学学报, 2005, 35(3): 161-165.
- Ⅳ 雷芳. 黄芩苷药理作用研究进展 Ⅱ. 中国药业, 2010, 19(15): 87-88.
- Ⅴ 万霞, 刘建平. 临床试验中的随机分组方法 Ⅱ. 中医杂志, 2007, 48(3): 216-219.
- Ⅵ 周坤福, 刘琳琳, 陆平成. 3 种治法对流感病毒感染小鼠肺指数及肺指数抑制率的影响 Ⅱ. 南京中医药大学学报, 2010, 26(4): 315-316.
- Ⅶ 徐娜红, 全金龙. 炮制方法对黄芩中有效成分黄芩苷含量的影响 Ⅱ. 临床合理用药杂志, 2010, 3(16): 100.

Effect of Three Different Processing Products of HuangQin (*Radix Scutellariae*) on Lung Indexes and Viral Load of Mice Infected by Influenza A Virus Subtype H1N1

ZHU Guangwei¹, ZHANG Guijun², SUN Yi¹, WANG Meng²

(1. Institution of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the prohibitive effect of steamed, water boiled and alcohol fried HuangQin (*Radix Scutellariae*) on influenza A virus subtype H1N1. **Methods** Randomly divided 120 ICR mice into normal control group ($n = 10$), model control group ($n = 10$), Ribavirin group ($n = 10$), steamed HuangQin group ($n = 30$), water boiled HuangQin group ($n = 30$) and alcohol fried HuangQin group ($n = 30$). The steamed HuangQin group, water boiled HuangQin group and alcohol fried HuangQin group were also respectively divided into high, middle and low dose subgroups, with 10 mice each. Mice in each group was infected by nasal dropping with $15 \times LD_{50}$ A/PR/8/34 plants of influenza virus bulk, except the normal control group, $35 \mu\text{l}$ per mouse. The normal control group was nasal dripped with equivalent sterile saline. The Ribavirin group was given Ribavirin particle $82.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for gavage the day of being infected, once per day. The high, middle and low dose of the steamed HuangQin group, the water boiled HuangQin group and the alcohol fried HuangQin group were given corresponding medicine 50, 20, and $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for gavage every day respectively, once per day. The normal control group and the model control group was given equivalent stiller water for gavage. All groups were gavaged for five days. Examined lung indexes and virus load of lung tissue of mice in each group. Calculated inhibition rate of lung indexes and virus. **Results** The lung indexes of mice in the model control group remarkably increased compared with the normal control group ($P < 0.01$). The lung indexes of mice in the Ribavirin group, middle and high dose of the steamed HuangQin group, the water boiled HuangQin group and the alcohol fried HuangQin group remarkably decreased compared with the model control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Inhibition rate of lung indexes in the Ribavirin group and in high dose of the alcohol fried HuangQin group were respectively 62.30% and 47.54%, and the difference had no statistical significance ($P > 0.05$). Inhibition rate of lung indexes in the steamed HuangQin group, the water boiled HuangQin group and the alcohol fried HuangQin group increases as dose increases. Compared with the model control group, the Ribavirin group and each dose in the alcohol fried HuangQin group could all decrease virus load of lung tissue of mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The difference in virus inhibition rates of different doses in the alcohol fried HuangQin group had statistical significance ($P < 0.05$), virus inhibition rate in the high dose group is highest, then in the middle dose group, and the lowest is in the low dose group. **Conclusion** Steamed HuangQin, water boiled HuangQin and alcohol fried HuangQin all have various levels of antiviral function. The effect increases as dose increases. The antiviral function of alcohol fried HuangQin was superior to that of the steamed HuangQin and water boiled HuangQin. **Keywords** HuangQin (*Radix Scutellariae*); alcohol fried HuangQin; water boiled HuangQin; steamed HuangQin; Chinese crude drug processing; anti-virus effect

(收稿日期: 2015-06-16; 修回日期: 2015-12-09)

编辑: 邓 媛