

# 板蓝根粗提液抑制流感病毒的实验研究

胡兴昌, 郑伟强

(上海师范大学 生命与环境学院, 上海 200234)

**摘要:** 对板蓝根凝聚素粗提液的抗流感病毒作用进行了研究. 用丙酮脱脂提取板蓝根生药的凝集素, 并分别测定各样品的血凝活性, 并用 45.3mg/mL 的样品对流感病毒(A<sub>1</sub>/京防/97-53 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>/京防/262/95)进行了体外抑制试验. 结果表明: 板蓝根凝集素对流感病毒具有显著的直接杀灭作用和预防作用及较好的治疗作用, 而且得出抑制流感病毒的效果与板蓝根凝集素血凝活性的高低有关.

**关键词:** 板蓝根粗提液; 流感病毒; 血凝活性

**中图分类号:** R965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2003)01-0062-04

## 0 引言

据《中药大辞典》记载: 板蓝根(*Isatis indigotica Fort*) 具有清热、解毒、凉血等功效<sup>[1]</sup>. 板蓝根丙酮提取物对蜡样短小芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及绿脓杆菌和枯草杆菌均有不同程度的抑制作用<sup>[2]</sup>. 但作为传统中药长期以煎剂或冲剂服用, 其所含的蛋白质在高温下变性失活, 具有生物活性的凝集素并没有被利用. 凝集素是一种非免疫源的蛋白质, 能与糖分子(单糖或寡糖)发生非共价结合, 具有凝集红细胞、细菌、刺激淋巴细胞分裂等特性<sup>[3]</sup>, 多年来, 这种特性已应用于临床识别细胞表面糖外被, 从而选择性结合或排斥特定细胞, 提高细胞免疫水平<sup>[4]</sup>. 本文对板蓝根凝集素的药用价值开展了研究, 如果板蓝根凝集素与抑制流感病毒的作用有关联的话, 那么对板蓝根药用价值的进一步开发和利用则具有非常重要的现实意义.

## 1 材料与方 法

### 1.1 板蓝根生药来源

在四川、湖北、内蒙古、上海等地采购板蓝根样本 4 个, 材料均未经炮制.

### 1.2 板蓝根凝集素提取及血凝活性测定

板蓝根经丙酮脱脂, 并用(Tris-HCl pH7) 缓冲液提取, 样品与缓冲液按(1:5W/V) 浸泡 24h, 浸提液经冷冻离心, 以 10000r/min 离心 10min, 取上清液测定凝集素活性. 在 96 孔板上每孔滴入 25 $\mu$ L 缓冲液, 再取待测样品滴入各行第一孔, 并相继倍比稀释, 最后每孔滴入 25 $\mu$ L 2% 兔红细胞悬浮液(缓冲液

收稿日期: 2002-01-09

基金项目: 上海市教委自然科学基金资助项目(CL98015)

作者简介: 胡兴昌(1953-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授.

配制), 30min 后观察凝集活性, 并计算样品的血凝活性效价。

### 1.3 抗病毒体外测试

将具有血凝活性的板蓝根凝集素样品, 用鸡胚培养法测定其抗流感病毒的效果。

#### (1) 流感病毒血凝集素制备.

选用 10 ~ 11 日龄鸡胚, 消毒后用灭菌刀尖打一小孔, 用灭菌注射器吸取流感病毒悬液 0.2mL, 刺入 0.5cm 后进行注射, 胶布封口. 无菌培养. 接种后 48h 以无菌毛细吸管吸取尿囊液放入无菌试管中, 加入 1/10000 硫柳汞防腐. 用无菌生理盐水做等量稀释, 置 4℃ 备用<sup>[5]</sup>.

#### (2) 血凝素滴定.

将流感病毒血凝素在大孔塑料板内用生理盐水作倍比稀释. 第一孔内加 0.9mL 生理盐水, 第二孔以后每孔加 0.25mL 生理盐水. 第一孔再加 0.1mL 病毒血凝素, 吹匀, 弃去 0.5mL, 吸出 0.25mL 放入第二孔, 吹匀; 第二孔吸出 0.25mL 放入第三孔, 吹匀. 以此类推得到病毒血凝素的稀释度顺序为 1: 10, 1: 20, 1: 40, ..., 1: 320. 再加入 0.25mL 1% 鸡红细胞, 摇匀, 置室温 30 ~ 50min 后观察结果.

#### (3) 血凝抑制试验.

校对 4 个单位的血凝素用于实验, 将板蓝根凝集素从 1: 10 起做一系列倍比稀释(方法同上), 每管 0.25mL. 每管中再加入 4 单位的血凝素 0.25mL, 随即加入 0.25mL 1% 鸡红细胞, 摇匀, 置室温 30 ~ 50min 后观察结果<sup>[6]</sup>, 将血凝板倾斜数 10s, 待阴性孔内红细胞自由下滑呈泪滴状时读取结果. 以出现完全抑制的血清最高稀释度的倒数为抗体的效价.

## 2 结 果

### 2.1 板蓝根凝集素活性测定

凝集素的生物活性的高低, 通常以该凝集素的血凝效价表示, 即用能引起红细胞凝集现象凝集素的最高稀释倍数的  $2n$  表示( $n$  为板蓝根凝集素样品的稀释倍数, 稀释倍数越大即该凝集素的生物活性就越高). 本次实验选用 4 个不同产地的板蓝根样品, 经测定后采用 10#-1, 10#-2(湖北), 5#(内蒙古), 14#(上海) 产的板蓝根凝集素样品为实验对象.

表 1 板蓝根凝集素血凝活性比较

样品编号	产地	所属省份	Tris-HCl 缓冲液 pH7
1#	金堂	四川省	2 <sup>5</sup>
10#-1	-	湖北省	2 <sup>5</sup>
10#-2	-	湖北省	2 <sup>2</sup>
5#	赤峰	内蒙古	2 <sup>0</sup>
14#	上海	上海市	2 <sup>1</sup>

注: 10#-1, 10#-2 为同一样品, 10#-2 在 4℃ 放置一年

### 2.2 板蓝根凝集素的抗流感病毒效果

用含量为 45.3mg/mL 的板蓝根粗提液样品对流感病毒进行体外抑制试验, 以血凝抑制方法检测样品的抗流感病毒能力, 实验时采用 4 个血凝单位, 血凝素稀释度为 1: 320(或 1: 200) 时出现 ++ 结果, 则血凝素效价为 1: 320(或 1: 200) 为 1 个血凝单位, 血凝素稀释度为 1: 80(或 1: 50) 时出现 + 结果, 则血凝素效价为 1: 80(或 1: 50) 为 4 个血凝单位. 观察结果时将血凝板倾斜数十秒钟, 待阴性孔内红细胞自由下滑呈现泪滴状时读取结果, 以出现完全抑制的血清最高稀释度的倒数为抗体的效价, 其结果列表如下:

表2 板蓝根凝集素抗病毒作用(1)(流感病毒 A<sub>1</sub>/京防/97-53H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>)

样品编号	尿囊液平均血凝滴度		
	直接作用	治疗作用	预防作用
10#-	<1: 10	1: 160	1: 80
病毒对照	1: 320	1: 320	1: 320
盐水对照	-	-	-

表3 板蓝根凝集素抗病毒作用(2)(流感病毒 A<sub>1</sub>/京防/262/95)

样品编号	尿囊液平均血凝滴度		
	直接作用	治疗作用	预防作用
5#	1: 150	1: 240	1: 140
10#-2	<1: 10	1: 160	1: 210
14#	1: 110	1: 100	1: 160
病毒对照	1: 200	1: 200	1: 200
盐水对照	-	-	-

### 3 讨论

流感病毒的血凝素能作用于红细胞表面的受体,导致病毒附着于细胞而发生凝集现象.这种红细胞凝集现象可被在病毒(或病毒血凝素)悬液中加入特异性免疫血清所抑制,该试验即为红细胞凝集抑制试验.本实验用板蓝根凝集素作为特异性抗体与流感病毒结合,抑制流感病毒血凝素对血细胞的凝集作用,从而检测板蓝根凝集素对流感病毒的抑制作用.用定量血凝素与不同稀释度的板蓝根凝集素作用后,观察结果,能完全抑制血凝的最高稀释度,即为血凝抑制抗体效价.血凝素滴定结果以“++”为终点,即一个凝集单位.血清抗体效价升高至4倍或4倍以上时为阳性反应.正式实验前经校对取4个血凝单位用于实验<sup>[6]</sup>.与病毒对照组和生理盐水对照组相比,表二数据显示10#-1板蓝根活性蛋白血凝滴度的效价在直接作用、治疗作用、预防作用中分别为大于4个单位(4个血凝单位以上)、3个单位(3个血凝单位)和4个单位(4个血凝单位),即在抗流感病毒的体外试验中,板蓝根活性蛋白具有极强的直接杀灭流感毒的作用和对该流感病毒的预防作用效果显著.两者抗流感病毒作用均呈阳性反应,治疗作用较明显,达3个血凝单位(最高血凝单位为4个单位).从抑毒试验结果分析,10#-1样品具有极强的直接抑制和明显地预防流感病毒的能力,治疗效果较好.表三数据说明样品10#-2的血凝活性为 $2^2$ 时,抑制流感直接作用<1:10,其直接抑制流感病毒的作用不变,但其预防作用仅为1:210(小于1个单位呈阴性),治疗作用为1:160(小于2个单位呈阴性)已丧失了预防流感变毒的功能,而且治疗作用也从3个单位下降至小于2个单位.14#样品的血凝活性为 $2^1$ ,5#样品的血凝活性为 $2^0$ ,它们的抑制病毒的直接作用分别为1:110(小于3个单位)和1:150(2个单位),治疗作用分别为1:100(3个单位)和1:240(小于1单位),预防作用分别为1:160(小于2个单位)和1:140(大于2个单位).两者的直接作用、治疗作用和预防作用均呈阴性,但从血凝单位来看,14#样品除预防作用略低外,其余各项抑毒指标均高于5#样品,与其血凝效价相符.表2,表3数据充分表明:板蓝根凝集素的血凝效价与其抗流感病毒的作用成正比,即血凝效价愈高,抗流感病毒能力就愈强.本实验的前期研究显示,板蓝根凝集素胶囊对上呼吸道感染的治疗的总有效率达85%<sup>[7]</sup>,本次体外实验结果与板蓝根凝集素胶囊临床疗效相一致,证明板蓝根凝集素具有抗流感病毒的作用.

## 参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 1985. 1250-1251.
- [2] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社 1983. 614
- [3] 施炜星, 孙册. 红花菜豆(矮生红花变种)凝集素的生物化学作用[J]. 生物化学杂志, 1995; 11(5): 567-573.
- [4] 孙册. 临床治疗凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 132-133.
- [5] 张卓然. 医学微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 4: 108-109
- [6] 流行性感胃诊断标准及处理原则[S]. (GB15994 - 1995) 北京: 中国标准出版社, 1996. 4-5.
- [7] 郑伟强, 许燕, 余沛涛, 等. 板蓝板凝集素活性的测定及临床观察[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 1999, 28(2): 78-81.

## Resistance to *Isatia indigotica* Fort Lectin Inhibit Influenza Virus

HU Xing-chang, ZHENG Wei-qiang

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Teachers University, Shanghai 200234, China)

**Abstract:** The *Isatia indigotica* Fort lectin is a bioactive nonimmune protein. The lectin extracted from *Isatia indigotica* Fort roots. The lectin's hemagglutination activity was tested to estimate the role of inhibition on influenza virus (A<sub>1</sub>/Jing Fang/97-53H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> and A<sub>1</sub>/Jing Fang /262/95). The results showed that the lectin(45.3mg/mL) had a function of remarkable killing, treatment and prevention influenza virus, and the hemagglutination activity of the lectin in different breeds had a remarkable difference in inhibition on influenza virus, and the hemagglutination activity of the lectin was in proportion to inhibition on influenza virus.

**Key words:** *Isatia indigotica* Fort; Lectin; Influenza virus; Hemagglutination activity