

# 不同干燥工艺制备的金翘热毒清的抗流感病毒作用比较

罗亚君, 贺帅, 张忠义\*

(南方医科大学珠江医院, 广州 510280)

**[摘要]** 目的:观察金翘热毒清颗粒和金翘热毒清喷雾干燥粉体内、外的抗流感病毒作用,并比较不同干燥工艺制备的金翘热毒清抗病毒作用差异。方法:体外采用四氮唑蓝(MTT)比色法测定样品以不同给药方式(药物直接作用于病毒、药物直接作用于病毒感染的细胞)抑制甲型流感病毒鼠肺适应株(FM1)的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>),并计算治疗指数(TI)。狗肾细胞密度为 $1 \times 10^4$ /孔,金翘热毒清喷雾干燥粉质量浓度为(2.61, 1.31, 0.66, 0.16 g·L<sup>-1</sup>),金翘热毒清颗粒(6.01, 3.05, 1.52, 0.76 g·L<sup>-1</sup>),作用时间为5 d,每组4个样本。将小鼠随机分为对照组,利巴韦林组(0.07 g·kg<sup>-1</sup>),金翘热毒清颗粒(按生药量计)组(11.7 g·kg<sup>-1</sup>),金翘热毒清喷雾干燥粉(按生药量计)组(5.85, 11.7, 23.4 g·kg<sup>-1</sup>),采用流感病毒株FM1滴鼻感染小鼠建立感染模型,感染2 h后连续ig给药5 d,每天2次,以生命延长率和肺指数抑制率为指标,评价二者的保护作用。结果:在药物直接作用于病毒组和药物直接作用于病毒感染的细胞组中,金翘热毒清喷雾干燥粉的IC<sub>50</sub>分别为0.77, 0.80 g·L<sup>-1</sup>, TI分别为11.78, 11.34;金翘热毒清颗粒的IC<sub>50</sub>分别为3.70, 3.60 g·L<sup>-1</sup>, TI分别为6.37, 6.55;金翘热毒清喷雾干燥粉23.4 g·kg<sup>-1</sup>,其生命延长率为60.81%,肺指数抑制率为13.18%,与病毒组比较,差异均有统计学意义(P < 0.05);金翘热毒清颗粒与金翘热毒清喷雾干燥粉相同剂量下的实验结果平行比较,未见显著差异。结论:金翘热毒清颗粒与金翘热毒清喷雾干燥粉都有抗流感病毒作用;体外在相同剂量下金翘热毒清喷雾干燥粉对流感病毒株的抑制作用优于金翘热毒清颗粒。

**[关键词]** 金翘热毒清颗粒;金翘热毒清喷雾干燥粉;流感病毒;抗病毒作用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0104-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120104

**Anti-influenza Virus Activity of Jinqiao Reduqing Prepared by Different Drying Process** LUO Ya-jun, HE Shuai, ZHANG Zhong-yi\* (Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate antiviral activity of Jinqiao Reduqing granules and Jinqiao Reduqing spray drying powder, and compare the difference of antiviral activity between them *in vitro* and *in vivo*. **Method:** *In vitro* experiment, the 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric method was applied to determine the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) against influenza virus FM1 of Jinqiao Reduqing granules and spray drying powder by different administration ways (drug was used directly on the virus or virus-infected cells). Therapy indexes (TI) of them were also calculated. The mice were randomly divided into control group, Ribavirin (0.07 g·kg<sup>-1</sup>), Jinqiao Reduqing granules (11.7 g·kg<sup>-1</sup>), Jinqiao Reduqing spray drying powder (5.85, 11.7, 23.4 g·kg<sup>-1</sup>). *In vivo* experiment, the mice were infected with influenza virus FM1 through nasal inhalation, the mice were intragastric administrated after infection virus. The life-extension rate, lung index of infected mice were observed to investigate the protective function of Jinqiao Reduqing spray drying powder and Jinqiao Reduqing granules against influenza virus. **Result:** For two different administration ways, the IC<sub>50</sub> of Jinqiao Reduqing spray drying powder was 0.77, 0.80 g·L<sup>-1</sup>, and the TI were 11.78, 11.34 respectively. The IC<sub>50</sub> of Jinqiao Reduqing granules were 3.70, 3.60 g·L<sup>-1</sup>, and the TI were 6.37, 6.55 respectively. At the dose of 23.4 g·kg<sup>-1</sup> for Jinqiao Reduqing spray drying powder, its life-extension rate was 60.81%, and the lung index inhibition rate was 13.18%. Compared with the virus control group, the difference were statistically significant (P < 0.05). **Conclusion:** Jinqiao Reduqing spray drying powder and

**[收稿日期]** 20141203(022)

**[基金项目]** 广州市科技计划项目(2012Y2-00018-2);广州市海珠区科技计划项目(2011-YL-02)

**[第一作者]** 罗亚君,在读硕士,从事抗病毒药物的研究, Tel:13268269234, E-mail:luoyajun1990@163.com

**[通讯作者]** \*张忠义,博士生导师,主任药师,从事医院制剂研究与开发, Tel:020-61643499, E-mail:zhang43499@163.com

Jinqiao Reduqing granules have anti-influenza virus activity. But at the same dose, the anti-influenza virus FM1 function of Jinqiao Reduqing spray drying powder was more powerful than that of Jinqiao Reduqing granules *in vitro*.

[Key words] Jinqiao Reduqing granules; Jinqiao Reduqing spray drying powder; influenza virus; antiviral activity

金翘热毒清颗粒(Jinqiao Reduqing granules, JQRDQ granules)为笔者所在医院研制开发的医院制剂,主要成分为金银花、连翘、大青叶等 15 味中药,主要功能为清热解毒,利咽止咳;主治感冒发热、咽喉肿痛等上呼吸道感染<sup>[1]</sup>。该方早在 1986 年便在我院临床应用<sup>[2]</sup>,长期的临床应用经验以及疗效观察表明 JQRDQ granules 在治疗感冒发热、咽喉肿痛等上呼吸道感染方面疗效显著。笔者所在课题组开展了热毒清浓缩液干燥工艺的优化,得到了金翘热毒清喷雾干燥粉(Jinqiao Reduqing spray drying powder, JQRDQ power)<sup>[3]</sup>。本项目在既往临床治疗基础上,比较 JQRDQ granules 和工艺优化后的 JQRDQ power 二者抗流感病毒作用是否存在差异,以为后续金翘热毒清的研发及其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞、病毒株及动物** 狗肾细胞(Madin-darby canine kidney, MDCK,中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),流感病毒 FM1(广州热带生物研究所),昆明种小鼠(湖南斯莱克景达实验动物有限公司) SPF 级,雌雄各半,合格证号 SCXK(粤)2008-0002。

**1.2 药物** JQRDQ power(南方医科大学珠江医院,批号 120417),JQRDQ granules(南方医科大学珠江医院,批号 120924),利巴韦林注射液(杭州民生药业有限公司,批号 1306304)。

**1.2.1 药物的制备和质控指标**<sup>[3]</sup>

**1.2.1.1 JQRDQ 处方** 金银花,连翘,大青叶,生石膏,荆芥,薄荷,钩藤,蝉衣,玄参,芦根,前胡,藿香,六神曲,淡竹叶,甘草。

**1.2.1.2 JQRDQ granules 制备** 以上 15 味药材依次按(10:20:10:40:5:16:5:13:10:33:5:13:5:20:3)的比例投入提取罐中,加入 10 倍量水煎煮 2 次,每次 2 h,收集挥发油备用。煎液减压浓缩至药材与浸膏比 1:2 比例时,离心,收上清液,上清液浓缩至比重 1.35,加辅料,制软材,过 12 目筛制粒,60 ℃ 以下干燥,过筛,喷入挥发油,放置 24 h,即得。

**1.2.1.3 JQRDQ power 制备** 以上 15 味药材按

(8:8:8:15:5:5:5:5:8:11:5:5:5:8:3)的比例制备,连翘碎成粗粉,与金银花加 10 倍水 80 ℃ 浸泡 1 h,滤过,再加 10 倍水煎煮 20 min,滤过,药渣备用,合并药液,减压浓缩至相对密度 1.03 ~ 1.07 (50 ℃);金银花、连翘药渣与其余 13 味加 12 倍,8 倍水煎煮 2 次,第 1 次 1.5 h,第 2 次 1 h,收集挥发油,合并药液,减压浓缩至相对密度 1.08 ~ 1.12 (50 ℃);合并 2 组浓缩液,离心,挥发油用 6 倍量 β-环糊精包合,加入浓缩液,再加 β-环糊精,混匀,喷雾干燥,药粉加蔗糖适量,制粒,即得。

**1.2.1.4 质控指标** 本品以绿原酸和连翘酯苷 A 为含量测定指标,每袋含金银花钩藤以绿原酸计不少于 9.0 mg,含连翘以连翘酯苷 A 计不少于 1.2 mg。

**1.3 仪器和试剂** ELx800 型酶标仪(美国 BioTek 公司),IX51 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),BSG-6EX 型生物洁净安全柜(珠海市再鑫仪器有限公司)。MTT(美国 Sigma 公司,批号 705B0513),MEM(美国 Gibco 公司,批号 951594),牛血清白蛋白(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 SLBG8239V),细胞培养液为含 10% 牛血清的 MEM 培养基;细胞维持液为含 2% 牛血清的 MEM 培养基。

## 2 方法

**2.1 药物体外抗病毒试验**<sup>[4-6]</sup>

**2.1.1 病毒滴度及药液对细胞的最大无毒浓度测定** 将流感病毒稀释为  $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-7}$ ,各接种于 MDCK 中,按文献方法测定病毒半数组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)。取 MDCK 加入 96 孔板中(约  $1 \times 10^4$ /孔),待细胞长成单层后,加含不同浓度的含药维持液 100 μL/孔,同时设细胞对照组,每组 4 孔,置 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5 d,在倒置显微镜下每日检查细胞生长情况,以细胞病变法(CPE)观察记录药物对 MDCK 细胞的毒性结果后,每孔加入 MTT 染液 20 μL ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),37 ℃ 培养 4 h,弃染色液,加入 DMSO 150 μL/孔,振荡 10 min,测定吸光度  $A_{490 \text{ nm}}$ 。通过计算细胞存活率,推算半数中毒浓度(TC<sub>50</sub>)和最大无毒浓度(TC<sub>0</sub>)。

**2.1.2 细胞病变抑制实验** 按 2.1.1 方式进行细

胞铺板。根据药物细胞毒性的实验结果,分别加入不同质量浓度的含药维持液,同时设正常细胞组(加维持液)、病毒组和药物毒性组。病毒攻击量为 100 TCID<sub>50</sub>。试验以 2 种方式进行:①药物直接作用于病毒组,药液与病毒液混合,置 4 ℃ 作用 24 h 后,加入 MDCK 单层细胞中;②药物直接作用于病毒感染的细胞组,病毒作用 MDCK 单层细胞 2 h 后给予药物。连续观察 5 d,记录各孔细胞病变效应(CPE),进行 MTT 比色,测定 A<sub>490 nm</sub>。

### 2.2 体内抗病毒试验<sup>[7-8]</sup>

**2.2.1 分组与剂量设计** 试验设正常组,病毒组, JQRDQ power 高、中、低剂量组, JQRDQ granules 组和利巴韦林注射液组。JQRDQ power 的给药剂量(按生药量计)分别为 5.85, 11.7, 23.4 g·kg<sup>-1</sup>(相当于成人临床日拟用量的 1, 2, 4 倍), JQRDQ granules 的给药剂量(按生药量计)为 11.7 g·kg<sup>-1</sup>(相当于成人临床日拟用量的 2 倍),利巴韦林注射液的给药剂量为 0.07 g·kg<sup>-1</sup>。

**2.2.2 半数致死量的测定** 将病毒用生理盐水稀释成 1 × 10<sup>-1</sup>, 1 × 10<sup>-2</sup>, 1 × 10<sup>-3</sup>, 1 × 10<sup>-4</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup>/mL 5 个不同密度,每个稀释度 10 只小鼠,0.05 mL/只,滴鼻感染。连续观察 14 d 记录其死亡数,并且对死亡动物进行解剖,观察肺病变,确定其因流感致肺感染而死者方可计数,采用 Reed-Meuch 法计算病毒引起的半数致死量 LD<sub>50</sub>,最终得到肺指数试验中所用流感病毒毒力为 15 LD<sub>50</sub>。

**2.2.3 药物对流感病毒感染小鼠死亡的保护作用** 小鼠共设 7 组,20 只/组。除正常组外,经滴鼻感染 5 LD<sub>50</sub> 的流感病毒 30 μL,2 h 后开始 ig 给药,每日 2 次,连续给药 5 d。正常组和病毒组均给予等体积的生理盐水。连续观察 15 d,记录死亡数,计算死亡保护率和生命延长率。

死亡保护率 = 对照组死亡率(%) - 实验组死亡率(%)

生命延长率 = (实验组平均生存日数 - 对照组平均生存日数) / 对照组平均生存日数 × 100%

**2.2.4 药物对流感病毒感染小鼠肺脏病变的保护作用** 小鼠共设 7 组,10 只/组。除正常组外,经滴鼻感染 15 LD<sub>50</sub> 的流感病毒 30 μL,给药方式同 2.2.3。于末次给药后 96 h,称小鼠体重,解剖摘取全肺称重。计算肺指数值,并求出肺指数及其抑制率。

肺指数 = 肺重(g) / 体重(g) × 100%

肺指数抑制率 = (病毒组肺指数均值 - 试验组肺指数均值) / 病毒组肺指数均值 × 100%

**2.3 统计处理** 实验所得计量数据均用  $\bar{x} \pm s$  表

示,采用 SPSS 2003 统计软件进行组间 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 病毒滴度及药液对细胞的最大无毒浓度测定** 采用 Reed-Muench 法<sup>[4]</sup>计算出 TCID<sub>50</sub> = 10<sup>-4.5</sup>。通过显微镜观察细胞形态和 MTT 法测定 A,确定 JQRDQ power TC<sub>0</sub> 为 2.61 g·L<sup>-1</sup>, TC<sub>50</sub> 为 9.07 g·L<sup>-1</sup>; JQRDQ granules TC<sub>0</sub> 为 6.01 g·L<sup>-1</sup>, TC<sub>50</sub> 为 23.57 g·L<sup>-1</sup>; 利巴韦林注射液的 TC<sub>0</sub> 为 0.39 g·L<sup>-1</sup>, TC<sub>50</sub> 为 1.036 g·L<sup>-1</sup>。

**3.2 细胞病变抑制试验** JQRDQ power, JQRDQ granules 通过药物直接作用于病毒以及药物直接作用于病毒感染的细胞 2 种给药方式均可抑制流感病毒,且两者用 2 种给药方式对病毒的抑制作用均未见显著差异, JQRDQ power 抑制细胞病变作用呈明显的量效关系; JQRDQ power 为 1.31 g·L<sup>-1</sup> 以及 JQRDQ granules 为 6.01 g·L<sup>-1</sup>, 均能有效抑制流感病毒 CPE 的产生;从 TI 显示, JQRDQ power 的体外抑制流感病毒的作用优于 JQRDQ granules。见表 1。

表 1 药物对流感病毒致细胞病变的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 1 Inhibitory effect of drugs to influenza virus *in vitro* ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	抑制细胞病变 IC <sub>50</sub> /g·L <sup>-1</sup>		TI	
	直接灭活	治疗给药	直接灭活	治疗给药
JQRDQ powder	0.77	0.80	11.78	11.34
JQRDQ granules	3.70	3.60	6.37	6.55
Ribavirin injection	0.043	0.037	24.09	28.00

**3.3 药物对流感病毒感染小鼠死亡的保护作用** JQRDQ power 高剂量组和利巴韦林注射液组的生命延长率分别为 60.81% 和 83.78%,与病毒组比较有统计学差异(*P* < 0.05, *P* < 0.01);与 JQRDQ granules 相同剂量下的结果平行比较,未见明显差别。见表 2。

**3.4 药物对流感病毒感染小鼠肺脏病变的保护作用** JQRDQ power 高、中剂量组和利巴韦林注射液组的肺指数与病毒对照组比较显著降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01);与 JQRDQ granules 相同剂量下的结果平行比较,未见明显差异。见表 3。

### 4 讨论

流感病毒基因具有高突变性,常常使得抗病毒药物治疗失效,目前尚无特效药物治疗,中药复方具有阻止流感病毒致细胞病变、调节免疫功能等综合作用,在防治流感病毒方面具有独特的优势和广阔

表 2 药物对流感病毒致小鼠死亡的保护作用 (n = 20)

Table 2 Comparison of indicator changes for protection of drugs in mice infected with influenza virus (n = 20)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	死亡数 /只	保护率 /%	生命延 长率/%
模型	-	20	-	-
JQRDQ power	23.4	13	35	60.8 <sup>2)</sup>
	11.7	17	15	33.8
	5.85	20	0	0
JQRDQ granules	11.7	16	20	34.5
Ribavirin injection	0.07	3	85	83.8 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01 (表 3 同)。

表 3 药物对流感病毒致小鼠肺脏病变的抑制作用 (n = 10)

Table 3 Effects on weight loss, lung index and inhibition rate of lung index on mice infected with influenza virus ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	体重 /g	肺指数 /%
正常	-	26.47 ± 2.37 <sup>1)</sup>	0.77 ± 0.13 <sup>1)</sup>
模型	-	16.49 ± 1.12	2.27 ± 0.23
JQRDQ power	23.4	17.86 ± 1.45 <sup>2)</sup>	1.97 ± 0.16 <sup>1)</sup>
	11.7	17.37 ± 0.71 <sup>2)</sup>	2.04 ± 0.21 <sup>2)</sup>
	5.85	16.51 ± 1.28	2.21 ± 0.17
JQRDQ granules	11.7	17.35 ± 0.57 <sup>2)</sup>	2.02 ± 0.23 <sup>2)</sup>
Ribavirin injection	0.07	18.29 ± 1.11 <sup>1)</sup>	1.00 ± 0.18 <sup>1)</sup>

的发展前景<sup>[9-11]</sup>。

JQRDQ power 复方制剂含有金银花、连翘、大青叶等 15 味中药,体外试验表明,JQRDQ power 和 JQRDQ granules 均可抑制流感病毒活性,但相同剂量条件下,JQRDQ power 抑制作用优于 JQRDQ granules,其原因可能与两者的制备工艺相关,JQRDQ power 在制备时,首先将处方中 2 味君药金银花和连翘单独浸泡提取后,再与方中其他药材一同煎煮,这可能对君药中的药效成分活性保护较好,尤其是受热易分解的连翘酯苷,另外,喷雾干燥粉对挥发油采用了环糊精进行包合,以防止挥发油的挥发,提高了药物药效作用的发挥;体内试验表明,JQRDQ power 对流感病毒所致小鼠病毒性肺炎有显著的治疗功效,降低小鼠感染病毒所引起的死亡率,与 JQRDQ granules 相同剂量下的结果平行比较,未见明显差异,其原因有可能是体内造模时,动物的病

情过重,使得药物发生疗效的作用降低,JQRDQ power 和 JQRDQ granules 未能完全发挥疗效,二者的差异在体内未能表现出可供比较的观测结果;也可能与药物进入体内后的吸收、代谢相关,或由于样本量太小、病毒接种量太大或太小,在本实验条件下未能观察到二者的差异。

金翘热毒清抑制流感病毒和对小鼠死亡的保护作用可能是金翘热毒清治疗风热感冒以及呼吸系统感染的作用机制之一,也为金翘热毒清的进一步研究开发及其药理作用机制研究提供了基础。

[参考文献]

[1] 姚育法,周本杰,贺帅,等.钩藤对金银花水提工艺中绿原酸保留率的影响研究[J].时珍国医国药,2013,24(4):838-840.

[2] 祝江迁.热毒清治疗小儿外感热病 200 例[J].四川中医,1986(5):31-32.

[3] 张忠义,季爱民,周本杰,等.一种治疗感冒的热毒清中药组合物及其制备方法,中国,ZL 2011 1 0434186.8[P].2014-06-04.

[4] 刘小玲,梁彬,张勇,等.广枣总黄酮体外抗 CVB<sub>3</sub> 病毒活性[J].中国医院药学杂志,2007,27(12):1637-1642.

[5] 黄海,冯美卿,孙传文,等.银苓胶囊抗流感病毒的活性[J].复旦学报:医学版,2006,33(4):517-521.

[6] 刘跃,唐丽,牟景丽,等.菊黄上清含片体外抗病毒及免疫作用研究[J].中国医院药学杂志,2013,33(20):1673-1677.

[7] 孙东东,严世海,陈建伟,等.板蓝根有效组分的抗病毒活性研究[J].南京中医药大学学报,2013,29(1):53-55.

[8] 苏连杰,田鹤,马英丽,等.金莲花醇提物体内抗病毒作用的实验研究[J].中草药,2007,38(7):1062-1064.

[9] 邢世华,李晓波.清热解毒类中药抗病毒活性及作用机制研究进展[J].中国药理学通报,2014,30(4):464-468.

[10] 史洋,王小平,白吉庆,等.连翘抗菌、抗病毒的药理作用研究[J].中国现代中药,2013,15(11):950-953.

[11] Deng You-ping, Liu Yuan-yuan, Liu Zhao, et al. Antiviral activity of folium isatidis derived extracts *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Chin Med, 2013, 41(4):957-969.

[责任编辑 聂淑琴]