

基于荧光检测的流感病毒神经氨酸酶中药抑制剂快速筛选方法的建立与应用

谢俊杰^{1,2}, 谭鹏^{2*}, 郑川³, 张定堃³, 尚强^{4,5}, 何淋浣³, 郝露², 赵军宁²

(1. 成都大学食品与生物工程学院, 成都 610106;

2. 四川省中医药科学院国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 成都 610041;

3. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源省部共建国家重点实验室, 成都 611137;

4. 四川光大制药有限公司, 四川彭州 611930;

5. 四川省抗病毒中药产业化工程技术研究中心, 四川彭州 611930)

[摘要] 目的:建立一种基于荧光检测的流感病毒神经氨酸酶(NA)中药抑制剂快速筛选方法。方法:方法的构建原理是供试品和一定数量的NA作用后,部分NA的活性会被供试品抑制,加入底物后仍具有活性的NA与荧光底物结合后在特定波长下可以产生荧光,根据测得的荧光强度计算供试品对NA的抑制率,从而评估供试品对NA的体外抑制活性。利用建立的方法对来源于12味中药的49个化学成分进行体外抗NA活性评价。利用NA蛋白受体与供试品对接后的结合能和抑制常数的理论计算值来证明实测结果的准确性。将建立的方法应用于检测不同批次板蓝根颗粒和抗病毒颗粒在体外抑制NA的活性,以评价不同批次样品间的质量一致性。结果:方法学考察结果表明该方法具有较好的准确性和重复性。49个成分的筛选结果显示,其中22个成分在体外对NA的抑制活性强于帕拉米韦[半抑制浓度(IC_{50}) $131.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$],如夏佛塔昔、异荭草昔、诃子酸、胡薄荷酮、异夏佛塔昔等,其余27个成分在体外对NA的抑制活性弱于帕拉米韦。分子对接结果显示,大部分化合物的结合能和抑制常数理论计算结果和实测结果基本一致。12批板蓝根颗粒对NA的抑制活性检测结果显示,样品A1、A2、B2、C1、C2、E2和F2之间的质量一致性较好。同一厂家生产的9批抗病毒颗粒对NA的抑制活性检测结果显示,样品K1~K9在质量浓度为 $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对NA的抑制率分别为37.68%、36.18%、31.37%、33.98%、40.36%、33.76%、40.69%、41.08%、40.06%,平均值37.24%。结论:该研究成功建立了一种可用于快速评价中药(来源于中药的化学成分或中成药)是否具有体外抗NA活性的分析方法,可作为现有NA抑制剂筛选方法的有力补充。利用该方法从12味中药中筛选得到22个成分对NA具有较好的体外抑制活性,可为研发抗流感小分子药物提供候选化合物。

[关键词] 流感病毒神经氨酸酶; 荧光检测; 中药; 分子对接; 质量一致性; 板蓝根颗粒; 抗病毒颗粒

[中图分类号] R22;R28;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0185-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220758

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220816.1107.004.html>

[网络出版日期] 2022-08-16 16:58:12

Establishment and Application of Rapid Screening Method for Influenza Virus Neuraminidase Inhibitors Sourced from Traditional Chinese Medicine Based on Fluorescence Detection

XIE Junjie^{1,2}, TAN Peng^{2*}, ZHENG Chuan³, ZHANG Dingkun³, SHANG Qiang^{4,5},

HE Linlong³, HAO Lu², ZHAO Junning²

(1. College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Key Laboratory of Biological Evaluation of Traditional Chinese Medicine (TCM) Quality of National Administration of TCM, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

[收稿日期] 2022-06-06

[基金项目] 四川省科技计划资助项目(2021YFS0409,2022YFS0429,2022YFS0431);四川省中医药管理局项目(2021MS501)

[第一作者] 谢俊杰,在读硕士,从事药食两用中药大健康产品研究,E-mail:552344522@qq.com

[通信作者] * 谭鹏,博士,副研究员,从事中药质量标准和品质评价研究,E-mail:410578772@qq.com

3. State Key Laboratory of Southwestern Specialty Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China;
4. Sichuan Guangda Pharmaceutical Co. Ltd., Pengzhou 611930, China;
5. Sichuan Engineering Research Center of Antiviral TCM Industrialization, Pengzhou 611930, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid screening method for influenza virus neuraminidase (NA) inhibitors sourced from Chinese medicines based on fluorescence detection. **Method:** The method was constructed based on the principle that after the reaction of the test sample and a certain amount of NA, the activity of some NA will be inhibited by the test sample, and the NA that is still active after the addition of the substrate can generate fluorescence at a specific wavelength when combined with the fluorescent substrate, and the inhibition rate of the test sample on NA was calculated according to the measured fluorescence intensity, so as to evaluate the *in vitro* inhibitory activity of the test sample on NA. A total of 49 high-purity chemical components from 12 Chinese medicines were used to evaluate the *in vitro* anti-NA activity by the established method. The theoretical calculated values of binding energy and inhibition constant after docking between the NA protein receptor and the test sample were used to prove the accuracy of the experimental results. The established method was applied to detect the *in vitro* NA inhibitory activity of different batches of Banlangen granules and Kangbingdu granules, so as to evaluate the quality consistency among different batches of samples. **Result:** The methodological examination results showed that the method had good accuracy and repeatability. The screening results of 49 components showed that 22 of them had strong *in vitro* inhibitory activity against NA than peramivir [half inhibitory concentration (IC_{50}) was $131.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], such as schaftoside, isoorientin, chebulinic acid, menthone and isoschaftoside. The inhibitory activity of the remaining 27 components was weaker than that of peramivir. The molecular docking results showed that the theoretical calculation results of binding energies and inhibition constants of most compounds were basically consistent with the experimental results. The test results of the inhibitory activity of 12 batches of Banlangen granules on NA showed that the quality consistency among samples A1, A2, B2, C1, C2, E2 and F2 was good. The analysis results of the inhibitory activity of 9 batches of Kangbingdu granules produced by the same manufacturer on NA showed that the inhibitory rates of samples K1 to K9 were 37.68%, 36.18%, 31.37%, 33.98%, 40.36%, 33.76%, 40.69%, 41.08%, 40.06% when the concentration of $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the average inhibitory rate was 37.24%. **Conclusion:** In this paper, we successfully established an analytical method that can be used to rapidly evaluate whether Chinese medicines (derived from chemical components of traditional Chinese medicine or proprietary Chinese medicines) have *in vitro* anti-NA activity, which can be a powerful supplement to the existing screening methods for influenza virus NA inhibitors. And this method was used to screen 22 compounds from 12 Chinese medicines with good *in vitro* inhibitory activity against NA, which can provide candidate compounds for the development of anti-influenza small molecule drugs.

[Keywords] influenza virus neuraminidase; fluorescence detection; Chinese medicine; molecular docking; quality consistency; Banlangen granules; Kangbingdu granules

流感是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病,发病具有季节性,也可全年流行,人群普遍易感,孕产妇、婴幼儿、老年人及慢性基础疾病患者易发展为重症或危重症病例,存在一定死亡风险,对公共健康构成威胁^[1-5]。流感病毒具有传染性强、变异快等特点^[1,6],仅通过接种疫苗难以有效防控流感^[7],临床仍然需要安全有效的药物作为最终治疗

手段。目前我国上市的抗流感药物主要为神经氨酸酶(NA)抑制剂,帕拉米韦、奥司他韦、扎那米韦等药物虽能通过有效抑制NA发挥抗流感作用,但因存在不良反应多^[8]、价格昂贵^[9],并不是临床用药最优选择,因此迫切需要寻找其他高效低毒的抗流感病毒药物。

中医药在我国已有几千年的临床应用历史,在

历次抗击重大疫病中发挥了重要作用^[10-11],从中药中筛选高效低毒的抗流感病毒药物是一种切实可行的途径。目前,基于NA筛选来源于中药的抗流感病毒NA抑制剂研究已有少量报道。例如,刘畅等^[12]利用分子对接方法从绵马贯众中筛选NA抑制剂,发现间苯三酚类成分有很好的抑制活性。YU等^[13]采用高效液相色谱-毛细管电泳法从黄芩、羌活、栀子、金银花中筛选NA抑制剂,发现黄芩素、黄芩苷、异绿原酸等成分抑制NA活性较强。杨贤英等^[14]采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法对五倍子活性部位化学成分进行分析,发现五倍子具有较强的抑制NA活性。总体而言,目前NA抑制剂筛选技术较为匮乏,仅有分子对接^[15]、超滤质谱^[16-17]、细胞筛选^[18-19]等方法,且存在准确度差、仪器昂贵、筛选效率低等缺陷,严重制约了从中药中筛选NA抑制剂的研究进程。因此,亟需建立一些具备简单、实用、准确度高和成本低等特点的NA抑制剂快速筛选方法,对中药活性成分进行筛选,为研发抗流感小分子药物提供候选化合物。

1 材料

Synergy H1型全功能微孔板检测仪(美国BioTek公司),MX-S型涡旋振荡仪[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司],XPE26型1/100万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Milli-Q型超纯水仪(美国密理博公司)。NA溶液、NA检测缓冲液、荧光底物(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为071420211105、052119210115、071420220117),帕拉米韦氯化钠注射液(广州南新制药有限公司,批号3141756,浓度 $4\ 567.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),12批板蓝根颗粒(厂家A~F,编号A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1、D2、E1、E2、F1、F2),9批抗病毒颗粒(四川光大制药有限公司,编号K1~K9),49个对照品(成都普菲德生物技术有限公司,相关信息见表1)。

2 方法

2.1 NA标准曲线的制备 在黑色96孔荧光酶标板的6个孔内加入NA检测缓冲液70 μL ,每孔再分别加入NA溶液0、1、2、5、7.5、10 μL ,加适量超纯水使每孔中溶液的总体积为90 μL ,在微孔板检测仪中37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 min后每孔加入NA荧光底物10 μL ,使每孔总体积为100 μL 。在微孔板检测仪中震荡1 min,于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 min后在激发波长322 nm、发射波长450 nm的条件下测定荧光强度,每个浓度水平设置3个复孔,结果取平均值。根据NA加入量和对应测得的荧光强度制作标准曲线。

2.2 供试品溶液的制备 将帕拉米韦氯化钠注射液用超纯水稀释10倍后标记为帕拉米韦供试品1($456.8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),将帕拉米韦供试品1分别用超纯水稀释2、10、100、1 000倍,用涡旋振荡仪震荡1 min(转速 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,下同)后超声处理5 min(频率53 kHz,功率250 W),分别标记为帕拉米韦供试品2、3、4、5,备用。分别称取表1中各对照品5~7 mg,先溶解于100 μL 的二甲基亚砜(DMSO)中,超声处理5 min,作为各成分供试品母液。将母液分别用水稀释200、500、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 倍。使用涡旋振荡仪震荡1 min后超声5 min,分别标记为供试品浓度1、2、3、4、5,备用。准确称取各批次板蓝根颗粒1.0 g,置于洁净试管中,分别准确加入超纯水5 mL,震荡1 min后超声5 min,作为板蓝根颗粒供试品母液,准确吸取该母液1 mL,用超纯水稀释10倍,超声5 min,作为板蓝根颗粒供试品溶液,备用;同法制备不同批次抗病毒颗粒供试品溶液。

2.3 供试品的检测 在黑色96孔荧光酶标板内每孔加入NA检测缓冲液70 μL 和NA溶液10 μL ,再分别加入供试品浓度1~5各10 μL ,按2.1项下从“在微孔板检测仪中37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 min”至“结果取平均值”操作。结合NA标准曲线计算不同浓度供试品对NA的抑制率。抑制率计算公式为抑制率= $(10-M)/10\times 100\%$,M表示与样品反应后剩余的NA体积。以供试品测试浓度和抑制率绘制供试品抑制NA的量效曲线,计算半抑制浓度(IC_{50})。

2.4 数据及图像处理 使用OriginPro 2022制作NA标准曲线和供试品抑制NA的量效曲线,使用GraphPad Prism 9计算供试品对NA的 IC_{50} 。使用ChemDraw Ultra 16.0及Chem3D Ultra 16.0进行化合物分子的3D结构处理,使用AutoDock 4.2.6进行供试品和NA的分子对接,使用PyMOL 3.8进行分子对接结果查看和图像处理。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度 精密量取帕拉米韦供试品2(浓度 $228.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,下同)适量,按照2.3项下方法连续检测6次,记录荧光强度,计算帕拉米韦对NA的抑制率及其相对标准偏差(RSD)。

2.5.2 日间精密度 精密量取帕拉米韦供试品2适量,按2.3项下方法检测6次,重复6 d,计算帕拉米韦对NA的抑制率及其RSD。

2.5.3 日内精密度 精密量取帕拉米韦供试品2适量,按照2.3项下方法在同1 d内连续测定6次,计算帕拉米韦供试品2对NA的抑制率及其RSD。

表1 49个对照品的信息

Table 1 Information of 49 reference substances

来源	成分	批号	纯度/%	来源	成分	批号	纯度/%
诃子	柯里拉京	19012602	99.61	连翘	连翘脂素	21080607	98.76
诃子	根皮苷	17112401	99.70	土茯苓	落新妇苷	21022001	99.11
诃子	安石榴苷	19040804	98.01	土茯苓	异落新妇苷	21022401	99.67
诃子	石榴皮鞣素	180802	99.21	土茯苓	黄杞苷	21022007	99.59
诃子	诃子酸	190116	99.68	射干	射干苷	20040302	99.09
诃子	诃子次酸	190220	99.72	射干	鸢尾黄素	20092501	98.54
诃子	诃子鞣酸	190614	99.39	射干	野鸢尾黄素	21052701	99.82
诃子	鞣花酸	18012302	99.93	射干	次野鸢尾黄素	21051705	99.09
诃子	表没食子酸儿茶素没食子酸酯	19022502	98.85	射干	芒果苷	21011202	98.62
诃子	表儿茶素没食子酸酯	19022503	98.74	紫花地丁	夏佛塔苷	21092409	98.02
诃子	没食子酸儿茶素没食子酸酯	18032908	99.87	紫花地丁	异夏佛塔苷	22022302	99.58
诃子	没食子儿茶素	18113004	99.75	紫花地丁	异荭草苷	21060906	99.50
诃子	新河黎勒酸	190705	92.36	马勃	麦角甾醇	21112407	98.12
板蓝根	黑芥子苷钾盐	20081102	99.61	马勃	β -谷甾醇	21090303	97.44
板蓝根	(R,S)-告依春	20083104	99.97	升麻	升麻素苷	20051507	98.12
板蓝根	靛蓝	20091705	98.90	羌活	佛手柑内酯	21031001	99.85
板蓝根	靛玉红	21053111	97.70	羌活	欧前胡素	21070702	98.10
板蓝根	腺苷	21033111	99.90	羌活	异欧前胡素	21091802	98.84
板蓝根	蒙花苷	21061107	98.09	羌活	紫花前胡苷	20070604	98.85
板蓝根	色胺酮	220304	99.81	苍术	白术内酯 I	20090905	99.81
连翘	连翘酯苷 A	21011504	98.25	苍术	苍术素	21111904	99.71
连翘	连翘酯苷 B	21011403	98.34	苍术	苍术酮	21030505	98.03
连翘	连翘苷	21022608	99.70	桂枝	桂皮醛	21102905	98.03
连翘	牛蒡苷	20092903	99.72	荆芥	胡薄荷酮	21111106	98.88
连翘	牛蒡子苷元	20122504	99.89				

2.5.4 重复性考察 准确称取抗病毒颗粒 K1 共 6 份,每份 1.0 g,按 2.2 项下方法制备其供试品溶液,按 2.3 项下方法检测,计算抑制率及其 RSD。

2.5.5 底物对检测体系的影响 为了考察荧光底物对荧光强度的测定是否存在干扰,即验证测得的荧光强度大小是由不同量 NA 与荧光底物结合后产生而得,在荧光板每孔只添加荧光底物 10 μ L,准确加入超纯水 20 μ L,平行测定 6 个孔,按 2.3 项下方法检测荧光强度,计算抑制率。

2.5.6 DMSO 对检测体系的影响 为了考察不同测试浓度 DMSO 对荧光强度的测定是否存在影响,按 2.2 项下方法配制 DMSO 测试溶液,按 2.3 项下方法检测荧光强度,计算抑制率。

2.6 分子对接

2.6.1 受体分子的选取和前处理 选取与拉尼米

韦复合的甲型流感病毒 NAN5 的晶体结构 [NA (PDB: 3TI8)] 为研究对象^[20]。从 RCSB PDB 数据库获取 NA (PDB: 3TI8) 的三维结构,使用 PyMOL 3.8 去除原始配体小分子和水分子,加氢原子,保存为 pdb 格式文件。将该 pdb 格式文件的受体分子置于 ADT 1.5.7 软件中加上电荷和非极性氢,保存为 pdbqt 格式文件。

2.6.2 化合物的准备 从 PubChem 数据库获取化合物的三维结构,对于该数据库中没有三维结构的化合物使用 ChemDraw Ultra 16.0 画出其二维结构,保存为 mol 格式,用 Chem3D Ultra 16.0 转化为三维结构,通过 MM2 力场进行能量最小化,保存为 pdb 格式,在 ADT 1.5.7 进行加氢、加电荷,计算电荷,保存为 pdbqt 文件备用。

2.6.3 分子对接过程 在 ADT 1.5.7 中设置 pdbqt 格式文件的配体分子和受体分子的网格,运行

AutoGrid 4.2.6生成图像文件,运行 AutoDock 4.2.6进行分子对接计算,以抑制常数和结合能为参考指标,获取帕拉米韦以及配体分子与NA(PDB:3TI8)蛋白对接的结合能和抑制常数,并将22个化合物的结合能、抑制常数与帕拉米韦的进行比较。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度及稳定性 日间精密度考察结果显示,帕拉米韦平均抑制率85.24%,RSD 2.5%;日内精密度考察结果显示,帕拉米韦平均抑制率83.89%,RSD 1.0%,表明仪器精密度良好;重复性考察结果显示,抗病毒颗粒K1平均抑制率39.70%,RSD 2.7%,表明该方法重复性良好,可用于评价不同供试品对NA的抑制活性。

3.1.2 底物对检测体系的影响 底物干扰考察结果显示,在测试体系中只添加荧光底物而不添加NA的情况下,在检测波长下能测得微弱荧光强度,但与NA、荧光底物结合作用后的荧光强度相差4个数量级,可以忽略不计,表明实际测得的荧光强度是由一定数量NA和荧光底物结合产生的真实值。

3.1.3 DMSO对检测体系的影响 在方法建立过程中,重点考察了DMSO对检测结果的影响,结果表明DMSO浓度在 $1.4 \times 10^{-5} \sim 7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时会产生微弱影响,因此限制了DMSO的初始浓度不能太大,但考虑到尽可能让供试品能有一个较大的初始测试浓度,最终优选将化学成分溶解在100 μL 的DMSO中,再逐级稀释得到系列不同测试浓度,可将DMSO的影响降至可接受范围内。

3.1.4 NA标准曲线及帕拉米韦的量效关系 NA标准曲线的回归方程为 $Y=18\ 183X+16\ 896$ ($r=$

0.992),线性范围0~10 μL ,表明NA在一定范围内不同反应量与产生的荧光强度呈现良好的线性关系。在此基础上,在测试体系中依次准确加入NA 10 μL 、供试品溶液10 μL 及荧光底物10 μL ,经过30 min反应后检测荧光强度,根据实测荧光强度和NA标准曲线计算反应体系中NA的反应量和被供试品溶液抑制的NA用量,结合2.3项下方法计算供试品对NA的抑制率。根据实际测得的不同测试浓度帕拉米韦的抑制率,利用GraphPad Prism 9计算帕拉米韦的 IC_{50} 131.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,见图1。

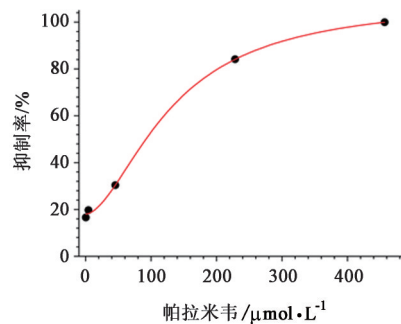


图1 不同测试浓度帕拉米韦对NA抑制率的量效关系

Fig. 1 Inhibition rates of peramivir at different tested concentrations

3.2 49个成分对NA的体外抑制活性分析

3.2.1 22个抑制活性较强的成分 基于新建立的抗流感病毒NA活性检测方法对12种临床治疗流感常用中药中的49个高纯度成分进行了抑制NA活性筛选,结果发现其中22个成分的 IC_{50} 低于帕拉米韦的 IC_{50} ,初步表明这些化学成分对NA有较强的抑制活性。6个代表性成分的实测浓度与抑制率之间的量效关系见图2,上述22个成分在其接近 IC_{50} 时的

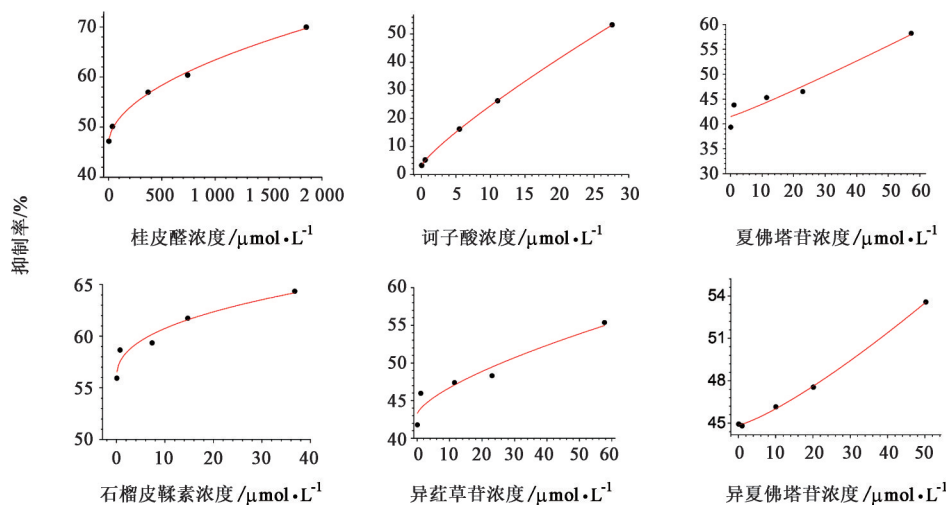


图2 6个代表性成分在不同测试浓度下对NA的抑制率

Fig. 2 Inhibition rates of 6 representative chemical components at different tested concentrations

测试浓度见表2。

表2 22个成分在其接近IC₅₀时的测试浓度

Table 2 Test concentrations of 22 chemical components at their respective inhibition rates near IC₅₀

来源	成分	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%
诃子	安石榴苷	21.69	57.52
	诃子酸	27.61	53.29
	石榴皮鞣素	36.77	64.34
	柯里拉京	51.81	44.80
	根皮苷	54.83	58.54
板蓝根	靛玉红	41.72	58.77
	靛蓝	42.23	56.42
	(<i>R,S</i>)-告依春	43.34	48.22
	腺苷	44.11	59.86
	蒙花苷	46.35	53.49
射干	鸢尾黄素	32.16	47.00
连翘	连翘脂素	31.82	54.01
	连翘酯苷B	32.49	65.12
	牛蒡子苷元	33.26	53.03
	连翘酯苷A	40.11	65.07
	连翘苷	51.29	61.02
紫花地丁	牛蒡苷	58.76	54.87
	异夏佛塔苷	22.92	58.21
	夏佛塔苷	23.07	55.36
桂枝	异荛苳草苷	50.27	53.57
	桂皮醛	37.09	50.12
荆芥	胡薄荷酮	32.40	52.94

3.2.2 27个抑制活性较弱的成分 与帕拉米韦对NA的抑制活性比较,除了上述22个成分对NA有较强抑制活性,其余27个成分在体外对NA的抑制活性相对较弱。除表2中成分外,诃子中其他8个成分则呈现较弱的抑制活性,69.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表儿茶素没食子酸酯、71.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表没食子酸儿茶素没食子酸酯、61.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 没食子酸儿茶素没食子酸酯、95.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诃子次酸、28.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诃子鞣酸、15.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 新诃黎勒酸、22.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鞣花酸、91.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 没食子儿茶素的NA抑制率分别为31.24%、29.72%、27.27%、16.72%、15.89%、14.38%、10.48%、8.19%。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中诃子的质量标准尚无指标性成分含量测定,根据诃子中化学成分抗NA活性的结果,推荐可选择安石榴苷和诃子酸作为诃子的指标成分。除表2中成分外,板蓝根中另外2个成分呈现较弱的抑制活性,测得32.58 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黑

芥子苷钾盐、27.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 色胺酮的NA抑制率分别为29.04%、20.38%。2020年版《中国药典》(一部)板蓝根的质量控制标准规定(*R,S*)-告依春的质量分数不得低于0.02%,本文研究结果支撑了(*R,S*)-告依春作为板蓝根指标成分的合理性。除鸢尾黄素外,射干中另外4个成分呈现较弱的抑制活性,即25.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 射干苷、78.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 野鸢尾黄素、64.12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 次野鸢尾黄素、71.22 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒果苷的NA抑制率分别为39.61%、30.95%、29.46%、18.03%。苍术中3个成分呈现较弱的抑制活性,即27.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苍术酮、43.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白术内酯I、0.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苍术素的NA抑制率分别为39.41%、30.10%、12.42%。对羌活中成分进行检测,结果发现43.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异欧前胡素、46.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 佛手柑内酯、42.83 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 欧前胡素、0.14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 紫花前胡苷的NA抑制率分别为33.39%、29.93%、28.66%、23.10%。土茯苓中81.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 落新妇苷、81.88 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异落新妇苷、1.88 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄杞苷的NA抑制率分别为33.88%、33.80%、30.36%,提示落新妇苷可能并非土茯苓的最佳质量控制指标。此外,检测结果还显示,马勃中35.87 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 麦角甾醇、30.54 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -谷甾醇的NA抑制率分别为18.02%、15.21%,升麻中58.65 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 升麻素苷的NA抑制率19.49%。

3.3 抗流感中成药对NA的体外抑制活性分析 将新建立的抗NA活性检测方法用于6个不同厂家生产的12批板蓝根颗粒和同厂家生产的9批抗病毒颗粒体外抗NA活性检测。结果发现样品A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1、D2、E1、E2、F1、F2在质量浓度为0.02 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对NA的抑制率分别为39.00%、41.38%、34.79%、37.04%、38.11%、42.25%、18.92%、19.26%、33.50%、38.18%、45.55%和40.50%,表明样品A1、A2、B2、C1、C2、E2和F2间的质量一致性较好,其他样品与这7个样品存在较大的质量差异;样品K1~K9在质量浓度为0.02 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对NA的抑制率分别为37.68%、36.18%、31.37%、33.98%、40.36%、33.76%、40.69%、41.08%、40.06%,抑制率平均值37.24%,样品K1~K9抑制率与平均值的相对偏差分别为1.2%、2.8%、15.8%、8.8%、8.4%、9.3%、9.3%、10.2%、7.6%,表明样品K1、K2、K4、K5、K9之间的质量一致性较好,而样品K3、K6~K8与上述样品存在一定的质量差异。

3.4 分子对接

3.4.1 结合能 空间匹配是分子间发生相互作用

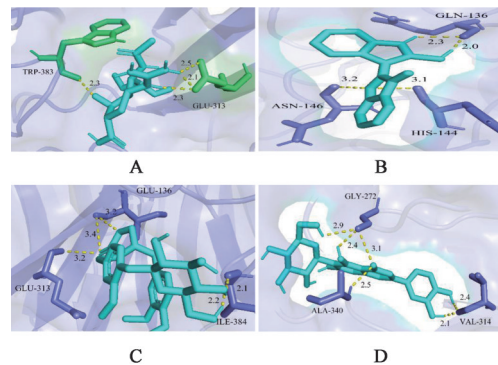
的基础,而能量匹配是分子间保持稳定结合的基础,因此结合能是筛选活性分子的关键。帕拉米韦、安石榴苷等23个配体分子与NA(PDB:3TI8)对接的结合能和抑制常数见表3。结果发现帕拉米韦与NA(PDB:3TI8)对接的结合能和抑制常数均较小,提示帕拉米韦在与NA(PDB:3TI8)进行分子对接时,空间上可相互匹配,结合比较牢固,对NA(PDB:3TI8)蛋白表现出较强的抑制活性,见图3A。靛玉红、靛蓝等8个成分与NA(PDB:3TI8)对接的结合能比帕拉米韦与NA(PDB:3TI8)对接的结合能低,表明这8个成分可能对NA有更强的抑制作用,虚拟计算结果强弱顺序为靛玉红>靛蓝>连翘脂素>桂皮醛>鸢尾黄素>胡薄荷酮>牛蒡子苷元>(R,S)-告依春;较小的抑制常数同样表明这8个成分与NA受体之间有较强的亲和力,表明在较低浓度下即可对NA产生抑制作用,与前期NA抑制活性实验结果基本吻合。牛蒡苷、异夏佛塔苷等4个成分与NA(PDB:3TI8)对接的结合能和抑制常数与帕拉米韦的相关数据接近,表明这4个成分可能对NA具有较强的抑制作用,与前期实验结果基本一致。其余化学成分表现出与NA(PDB:3TI8)较弱的虚拟结合能力,即对NA(PDB:3TI8)的抑制活性较弱,与前期NA抑制活性实验的结果存在一定差异,原因可能是这部分成分通过与NA蛋白中的其他活性位点相互作用而达到抑制NA活性的目的。

3.4.2 成分与氨基酸残基的作用情况分析 选择靛玉红、牛蒡根、异荛草素与受体蛋白的对接部位进行可视化分析,见图3。结果发现这3个成分对蛋白受体有多位点氨基酸残基的结合活性,这些成分可与氨基酸之间形成氢键,通过氢键相互作用与NA(PDB:3TI8)的活性位点进行有效结合,进而具有抑制NA(PDB:3TI8)活性的作用。化学成分与氨基酸残基的结合呈现多靶点作用情况,如帕拉米韦的-OH、-NH₃⁺等基团与色氨酸(TRP)-383、谷氨酸(GLU)-313结合,靛玉红的-OH、-NH₃⁺等基团与谷氨酰胺(GLN)-136、天门冬酰胺(ASN)-146、组氨酸(HIS)-144结合,牛蒡苷的-OH、-COO-等基团与GLU-313、异亮氨酸(ILE)-384、GLU-136结合,异荛草素的-OH、-CO-等基团与甘氨酸(GLY)-272、缬氨酸(VAL)-314、丙氨酸(ALA)-340结合,提示抗流感中药可能是通过多成分作用于多个靶点,从而达到抗NA活性的目的,体现了中药多组分、多靶点、多通路的特点^[21-23]。

表3 配体化合物与NA的分子对接数据

Table 3 Molecular docking data of ligand compounds to NA

No.	化学成分	结合能/kJ·mol ⁻¹	抑制常数/mmol·L ⁻¹
1	帕拉米韦	-15.51	1.91
2	靛玉红	-23.95	0.06
3	靛蓝	-21.99	0.14
4	连翘脂素	-21.69	0.16
5	桂皮醛	-21.61	0.16
6	鸢尾黄素	-20.86	0.22
7	胡薄荷酮	-20.86	0.22
8	牛蒡子苷元	-18.94	0.48
9	(R,S)-告依春	-15.80	1.69
10	牛蒡苷	-15.17	2.19
11	异荛草苷	-14.55	2.82
12	石榴皮鞣素	-14.13	3.31
13	异夏佛塔苷	-13.75	3.89
14	柯里拉京	-12.58	6.19
15	腺苷	-12.37	6.82
16	夏佛塔苷	-12.16	7.41
17	根皮苷	-12.16	7.41
18	蒙花苷	-10.49	14.56
19	安石榴苷	-8.19	36.63
20	连翘酯苷A	-5.60	104.62
21	连翘苷	-5.39	113.32
22	诃子酸	-3.85	212.27
23	连翘酯苷B	5.02	-



注:A.帕拉米韦;B.靛玉红;C.牛蒡苷;D.异荛草苷;黄线为氢键
图3 部分代表性成分与NA(PDB:3TI8)的氢键作用示意

Fig. 3 Schematic diagram of hydrogen bonding interaction between some compounds and NA(PDB:3TI8)

4 讨论

本文成功建立了一种可用于快速评价中药是否具有体外抗NA活性的筛选方法,具有实用、快速、准确度高、成本低等特点,可以对现有流感病毒NA抑制剂筛选方法的有力补充。为了验证新建立

的方法实际测得结果的准确性,本文还采用目前常用的分子对接方法,通过计算NA蛋白受体与供试品对接后的结合能和抑制常数的理论值来证明实测结果的准确性,结果表明大部分化学成分的理论计算结果和实测结果基本一致,证明该方法测得的不同成分体外NA抑制率具有较高准确性。

基于新建的方法评价了12味中药中共49个化学成分对NA的体外抑制活性,结果发现22个成分对NA具有较好的体外抑制活性,为研发抗流感小分子药物提供了候选化合物,并可为相应中药的质量标志物选择提供参考。同时,本文将新建的方法应用于不同批次抗流感中成药的质量一致性评价,该过程不需要解析药物成分、测定指标性成分含量等,仅通过表征药物的整体抗病毒活性强弱,将药物的整体药理作用以客观数值表征出来,更符合中药质量整体属性的特点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] PAULES C, SUBBARAO K. Influenza [J]. *Lancet*, 2017,390(10095):697-708.

[2] 管树杰,张俊华,吕玲. 张伯礼教授对2017年冬至2018年春流感治疗策略[J]. *天津中医药*, 2019,36(1):3-6.

[3] KWONG J C, SCHWARTZ K L, CAMPITELLI M A, et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(4):345-353.

[4] GANDHI R T, LYNCH J B, DEL-RIO C. Mild or moderate COVID-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(18):1757-1766.

[5] 中国中西医结合学会. 新型冠状病毒肺炎中西医结合防治专家共识[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020,40(12):1413-1423.

[6] MARR L C, TANG J W, VAN-MULLEKOM J, et al. Mechanistic insights into the effect of humidity on airborne influenza virus survival, transmission and incidence [J]. *J R Soc Interface*, 2019, 16(150):20180298.

[7] JACKSON M L, CHUNG J R, JACKSON L A, et al. Influenza vaccine effectiveness in the united states during the 2015—2016 season [J]. *N Engl J Med*, 2017,377(6):534-543.

[8] PENG X Y, XIAO Y C, LI L, et al. Curative efficacy and safety of peramivir in the treatment of children suspected with influenza [J]. *Eur J Inflamm*, 2020, doi: 10.1177/2058739220946139.

[9] 李振华,张华,陈建丽,等. 帕拉米韦与奥司他韦治疗流感病毒性肺炎的效果[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021,31(24):3717-3721.

[10] 石克华,余小萍. 中医治疗传染性非典型肺炎的优势[J]. *上海中医药杂志*, 2003,37(12):3-4.

[11] 孙易娜,吕文亮,李昊,等. 清肺排毒汤治疗轻型/普通型新型冠状病毒肺炎295例多中心临床研究[J]. *中医杂志*, 2021,62(7):599-603.

[12] 刘畅,闫艳韬,王娟,等. 绵马贯众中间苯三酚类化合物抗流感病毒的活性筛选[J]. *中草药*, 2018,49(2):305-312.

[13] YU G Y, FANG D. Evaluation of neuraminidase inhibitory activity of compounds and extracts from traditional medicines by HPLC-FLD [J]. *Int J Anal Chem*, 2021,2021:6694771.

[14] 杨贤英,李金花,段宝忠,等. 五倍子抑制流感病毒神经氨酸酶活性及活性部位的UPLC-Q-TOF-MS分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(16):68-72.

[15] PATEL H, KUKOL A. Integrating molecular modelling methods to advance influenza a virus drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2021,26(2):503-510.

[16] 刘舒,邢俊鹏,闫峻,等. 中药黄芩中神经氨酸酶抑制剂的超滤质谱筛选研究[J]. *化学学报*, 2011, 69(13):1570-1574.

[17] 马丽娜,章从恩,鄢丹,等. 超滤质谱技术筛选板蓝根中抗流感病毒的活性成分[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(5):812-816.

[18] LIU J W, ZU M, CHEN K T, et al. Screening of neuraminidase inhibitory activities of some medicinal plants traditionally used in Lingnan Chinese medicines [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1):102.

[19] ZHANG J J, LIU T, TONG X M, et al. Identification of novel virus inhibitors by influenza a virus specific reporter cell based screening [J]. *Antiviral Res*, 2012, 93(1):48-54.

[20] 张洪江,何立巍,唐敏. 板蓝根中黄酮类化合物抗流感病毒的分子对接研究[J]. *化工时刊*, 2018,32(3):19-21.

[21] 倪雯婷,马大龙,邵骏菁,等. 基于网络药理学和实验验证探索荆防合剂治疗甲型H1N1流感的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022,28(12):200-209.

[22] 中华中医药学会. 2021年度中医药十大学术进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022,28(14):1-12.

[23] 裴科,宁燕,蔡皓,等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS和整合网络药理学的川芎酒制后增强抗脑缺血损伤作用机制分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022,28(12):164-173.

[责任编辑 刘德文]