

基于微量量热法检测板蓝根的红细胞凝集活性的评价研究

任永申^{1,2}, 鄢丹^{1*}, 张萍¹, 李寒冰¹, 冯雪¹, 张雅铭¹, 罗云¹, 肖小河^{1*}

(1. 解放军 302 医院全军中药研究所, 北京 100039; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075)

摘要: 建立红细胞凝集反应过程的微量量热检测方法, 并用于评价不同产地板蓝根的活性差异。采用微量量热法, 检测阳性参照物 (植物凝集素, PHA) 及 8 批不同产地板蓝根对 20% 家兔红细胞凝集反应过程, 记录凝集反应热动力学曲线, 提取反应动力学参数, 计算凝集效价, 对结果进行主成分分析和聚类分析, 并以微量板法对结果进行验证。结果表明, 板蓝根对家兔红细胞凝集反应为放热反应, 反应动力学参数如反应速率常数 (k : $0.039 \sim 73.6 \text{ min}^{-1}$)、最大反应功率 ($P_{\max}$: $-1\ 140.2 \sim 988.2 \text{ }\mu\text{W}$) 及反应焓变 (H_i : $-529.9 \sim 717.9 \text{ }\mu\text{J}$) 等动力学参数与板蓝根浓度 ($0.2 \sim 1.0 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 呈良好的线性关系 ($r > 0.97$); 主成分分析结果显示参数 $P_{\max}$ ($531 \sim 1\ 335 \text{ }\mu\text{W}$) 及 H_i ($585.2 \sim 989.2 \text{ }\mu\text{J}$) 能够客观表征不同产地板蓝根样品凝集活性差异, 与微量板法测定结果 (不同产地板蓝根凝集滴度分别为 3~11) 基本一致。根据效价值可区分 GAP 产区、一般主产区和普通散种区样品, 同时凝集反应曲线具有较好的特征性和产地专属性, 能为板蓝根品质评价提供更加全面的综合信息。所建立的板蓝根红细胞凝集反应的微量量热检测方法灵敏可靠, 可作为凝集反应定量在线检测手段, 并为板蓝根及其他具凝集活性类中药的品质评价提供新的技术参考。

关键词: 板蓝根; 红细胞; 凝集反应; 微量量热法; 生物热动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 08-1028-07

Hemagglutination activity of Radix Isatidis detected by microcalorimetry

REN Yong-shen^{1,2}, YAN Dan^{1*}, ZHANG Ping¹, LI Han-bing¹, FENG Xue¹, ZHANG Ya-ming¹,
LUO Yun¹, XIAO Xiao-he^{1*}

(1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;
2. School of Chinese Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract: In this study, microcalorimetry was adopted to establish a novel method for detecting the hemagglutination process of Radix Isatidis (Banlangen in Chinese, BLG), and to evaluate the hemagglutination activity diversity of BLG from various habitats. The hemagglutination biothermokinetics curves of positive reagent (phytohemagglutinin, PHA) and 8 batches BLG from different regions of the hemagglutination with 20% rabbit erythrocyte were recorded by microcalorimetry, then biothermokinetics parameters were abstracted, the hemagglutination utility of samples were calculated and analyzed by principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA), meanwhile the results were authenticated by micro-plate agglutination. It showed that the hemagglutination was an exothermic reaction, the reaction rate constant (k : $0.039 \sim 73.6 \text{ min}^{-1}$), maximum reaction power ($P_{\max}$: $-1\ 140.2 \sim 988.2 \text{ }\mu\text{W}$) and reaction enthalpy (H_i : $-529.9 \sim 717.9 \text{ }\mu\text{J}$) had good linear correlation with BLG extraction concentration ($0.2 \sim 1.0 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $r > 0.97$), and PCA showed $P_{\max}$ ($531 \sim 1\ 335 \text{ }\mu\text{W}$) and H_i ($585.2 \sim 989.2 \text{ }\mu\text{J}$) could represent the hemagglutination activity diversity of BLG samples, just confirming with the results of micro-plate agglutination (the agglutination dilution was 3 – 11 respectively).

收稿日期: 2009-12-14.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09502-003, 2009ZX09308-005, 2009ZX09502-022); 国家自然科学基金资助项目 (30701109, 30873385).

*通讯作者 Tel: 86-10-66933322, Fax: 86-10-63879915, E-mail: pharmacy302@126.com

According to the hemagglutination utility, the BLG samples from Good Agriculture Practice (GAP) regions, main producing area and general regions could be clustered correctly; meanwhile, the biothermokinetics curves with perfect distinctive fingerprint and specificity could give out more information for the quality control and evaluation for BLG. In conclusion, the microcalorimetry method established for detecting the hemagglutination activity of BLG samples on rabbit erythrocyte is sensitive and reliable, and could be adopted as an effective technique in detection agglutination precisely, quantitatively and consecutively; and provide a novel approach for examining and evaluating quality for Chinese herbal medicine with agglutinative activity such as BLG.

Key words: Radix Isatidis; erythrocyte; agglutination; microcalorimeter; biothermokinetics

板蓝根是植物菰蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 的干燥根, 具有清热解毒、凉血利咽的功效, 主要用于各型流感的防治^[1]。板蓝根分布广泛, 质量差异较大, 而现行药典仅以板蓝根中精氨酸的薄层鉴别为质量标准^[2], 指标缺乏专属性, 且难以反映其临床有效性和安全性。因而, 亟需建立一种直接关联板蓝根药效的生物活性的评价方法。近年来, 本课题组以板蓝根为例, 从抗菌、抗病毒等生物活性的角度入手, 初步建立了板蓝根生物测定方法, 并对中药质量生物控制体系进行了相关探讨^[3-7]。

抗病毒活性作为板蓝根的主要药效作用, 其目前的测定方法有鸡胚感染-血凝滴度法^[8]、神经氨酸酶活性测定法等^[9-11], 但此类方法需要用病毒做载体, 而根据抗病毒血凝滴度法改进的药物血红细胞凝集活性微量板检测法^[12, 13], 方法简便、安全, 但该方法仅为抗病毒活性的终点限值检查, 以目测判定结果易引起误差, 且不能反映抗病毒活性的过程差异, 因而需要建立更为灵敏、可定量的过程检测方法。

根据凝集反应原理, 红细胞凝集反应是红细胞表面颗粒型凝集原与外源凝集素结合并凝集成团的现象^[14]。凝集素是自然界广泛存在的一类糖蛋白, 能与细胞表面的糖分子专一结合, 因而具有凝集细胞作用^[15]。凝集素凝集细胞的过程中, 由于范德华耳斯引力的释放、分子表面氢键、疏水键的断裂, 使反应过程伴随能量的释放^[16]。在凝集的过程中, 红细胞和凝集素分子由高能级的无序混乱状态向低能级的有序状态转变, 这个转变的过程是熵减小的过程, 伴随着来自于“配体-受体”相互作用时蛋白质的构象变化(特别是表面上原有的疏水性基团向蛋白质内部的转移)所导致的能量释放^[17]; 同时, 释放的能量可由微量热检测仪测定^[18]。

微量量热技术特别是混合安瓿法, 立足于研究反应过程中的热量变化, 具有灵敏、定量、多通道在线检测等特点^[19-21], 在生物领域得到了广泛的应用^[22, 23],

特别是在生命过程、受体配体结合反应等生化反应的检测方面具有独到优势^[24, 25]; 但对于抗病毒类中药的红细胞凝集反应过程的热量变化却未见报道。由此, 本文尝试采用微量量热技术, 以植物凝集素为阳性对照, 检测不同产地板蓝根与家兔血红细胞凝集反应过程中的热变化, 并以反应速率常数 (k)、最大反应功率 ($P_{\max}$) 和反应总焓变 (H_t) 等热反应动力学参数为指标, 客观定量评价凝集反应过程的动力学特征及不同产地板蓝根凝集活性的差异, 建立抗病毒类中药活性效价的生物评价新方法。

材料与方法

药品与试剂 板蓝根药材分别采自安徽元寨 (GAP)、浙江杭州、黑龙江佳木斯、甘肃陇西、山东临沂、内蒙古赤峰、河南清丰和河北玉田 (GAP) 等地, 经解放军中药研究所肖小河研究员鉴定为菰蓝的干燥根, 样品保存于解放军中药研究所。植物血球凝集素 (phytohemagglutinin, PHA), 规格为 5 mg, 批号: 048K1887, 美国 Sigma 公司; 相对分子质量为 128 000, 对 2% 人血红细胞的凝集活性低于 $62.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。临用前以无菌生理盐水溶解, 并稀释至适当浓度, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 收集续滤液, 作为阳性反应物。

阿氏液 (Alsever's solution) 的配制: 称取氯化钠 4.2 g、枸橼酸钠 8.0 g、枸橼酸 0.55 g、葡萄糖 20.5 g, 加蒸馏水 1 L, 121°C 高压灭菌 15 min, 置 4°C 冰箱备用。

供试液的制备 取板蓝根药材各 10 g, 分别加入 95%乙醇 10 倍量, 浸泡 30 min, 回流提取 40 min, 过滤, 滤液蒸干, 浸膏用无菌生理盐水 10 mL 溶解, 过滤, 定容至 10 mL, 得 $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 生药样品, 置 4°C 冰箱贮藏备用。临用前以无菌生理盐水稀释至适当浓度, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 收集续滤液, 作为供试品。

仪器 3114/3456 型 TAM air 20 mL 混合安瓿瓶等微量量热仪 (isothermal microcalorimeter with 20 mL admix ampoule, TA Instrument, US)。量热仪主体包括采用帕尔贴 (Peltier) 加热的空气浴恒温系统 (Themostat)、孪生式微量热检测系统 (Calorimeter)、量热单元电势信号采集与转导系统以及工作站 (TAM Assistant), 检测限为 4 μW , 24 h 基线漂移小于 40 μW , 检测量程为 600 mW; 20 mL 混合安瓿包括 2 支 1 mL 注射器、搅拌子及控制系统, 速度在 30~120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 可调^[26]。BH2 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 0.22 μm 针头式微孔滤膜过滤 (美国 Millipore); 96 孔微量板 (V 型、底角呈 90°, 姜堰市新康医疗器械有限公司)。

家兔红细胞的制备 参照文献^[27]方法制备压积红细胞, 用生理盐水稀释至 20%, 混匀, 分装为每支 2 mL, 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h 后使用。一次制备, 72 h 内使用, 临用前按比例配制。红细胞计数结果表明 20% 家兔红细胞的浓度为 $4\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ 。

红细胞凝集反应的微量量热测定 无菌条件下, 取 20% 兔红细胞悬液 2 mL 注于混合安瓿中, 同时在混合安瓿注射器中吸入 2 mL 供试品, 组装并密封混合安瓿系统; 另取无菌生理盐水 4 mL 置于 20 mL 微量量热仪专用安瓿中, 密封, 作为参比; 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵箱中 30 min, 温度平衡后分置于相应通道; 运行工作站, 记录数据。待系统平衡后, 以 60 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度搅拌, 1 min 后以 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度将供试品缓慢注入安瓿中, 继续搅拌 1 min, 待反应完全后停止实验。

供试品制备 ① 空白对照 (control): 2 mL 无菌生理盐水; ② 阳性对照 (PHA): 1 $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$ PHA 生理盐水溶液 2 mL; ③ 板蓝根考察样品 (Qingfeng) 浓度: 1.0、0.8、0.6、0.4 和 0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ④ 不同产地板蓝根提取物 1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别为安徽元寨 (Yuanzhai)、河北玉田 (Yutian)、甘肃陇西 (Longxi)、黑龙江佳木斯 (Jiamusi)、河南清丰 (Qingfeng)、山东临沂 (Linyi)、浙江杭州 (Hangzhou) 和内蒙古赤峰 (Chifeng)。

数据处理 取各样品加样反应段数据导入 OriginLab 软件进行分析, 提取计算红细胞凝集反应动力学参数: 反应速率 (k)、最大反应功率 ($P_{\max}$) 和反应总焓变 (H_t)。将各样品反应曲线减去空白样品曲线 (扣除搅拌热、稀释热) 得到样品与红细胞凝

集反应的总焓变 ($H_t = H_i - H_0$)、总功率 ($P_t = P_{\max} - P_0$) 及反应速率提高率 ($E = (k_i - k_0)/k_0$)。其中, H_0 、 H_i 分别为空白反应曲线和样品凝集反应曲线对应的曲线下面积; P_0 为空白样品稀释热最低值, $P_{\max}$ 为凝集反应功率的最大值。系统焓变 H_t 积分从曲线上升段始高于基线 20 μW 时开始计算, 至曲线回归基线为积分终点。结果采用 SAS8.0 软件进行统计分析。

方法精密度考察 采用微量量热混合安瓿法, 在反应体积分别为 2 mL、板蓝根样品 (Qingfeng) 浓度为 1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、红细胞浓度为 20% 时, 分 5 次 (24 h 内) 测定同一批红细胞与板蓝根提取物反应的热动力学曲线, 分别提取各次反应热动力学参数 k 、 $P_{\max}$ 和 H_t 。结果表明, 各参数相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.91%、2.56% 和 2.45%, 提示方法精密度良好。

方法稳定性考察 采用微量量热混合安瓿法, 在反应体积分别为 2 mL、板蓝根样品 (Qingfeng) 浓度为 1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、红细胞浓度为 20% 时, 分别于第 12、24、36、48 和 60 h, 分 5 次测定同一批红细胞与板蓝根提取物反应的热动力学曲线, 分别提取各次反应热动力学参数 k 、 $P_{\max}$ 和 H_t 。结果表明, 各参数 RSD 分别为 4.11%、3.48% 和 3.55%, 提示该方法重复性良好, 且红细胞及测试系统在 60 h 内稳定。

红细胞凝集活性的微量板法测定 在 96 孔微量板上, 分别用生理盐水将供试品溶液做 2 倍系列稀释, 每个剂量设 2 个复孔, 每孔加入 50 μL ; 另设 2 孔, 每孔加入生理盐水 50 μL 作为阴性对照。取 20% 兔红细胞 2 mL, 生理盐水稀释为 2%, 再向每孔加入 2% 红细胞混悬液 50 μL , 轻拍微量板 30 s 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中静置 2 h 后观测结果。按文献^[27]方法判定凝集结果, 计算凝集滴度: $D = n - \log_2 C$; 其中 D 为每单位量供试品含凝集活性, n 表示供试品出现阳性的最高稀释倍数, C 表示供试品溶液的初始浓度。

按上述方法, 分别于红细胞制备第 12、24、36、48、60 和 72 h 以阳性反应物 PHA 标定红细胞凝集滴度, 考察各批次/各时段红细胞凝集状态的一致性, 以确证实验结果的可比性与重现性; 按上述方法, 同时测定 8 批不同产地板蓝根药材提取物的红细胞凝集活性。

结果

1 红细胞凝集反应的生物热力学检测及动力学参数提取

在给定条件下, 分别获取 20% 血细胞与生理盐水混合的阴性反应热动力学图谱及其与 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PHA 反应的阳性图谱, 结果见图 1。结果表明, 红细胞与生理盐水不发生凝集反应, 红细胞结构完整、可随液体自由移动、无凝集成团现象; 而 PHA 与红细胞发生凝集反应, 红细胞结构变形、凝集成团。

凝集反应阴性热动力学图谱先出现一个较小的正峰 (搅拌放热, H_s), 然后出现一个较大的负峰 (稀释吸热, H_d); 凝集反应阳性热动力学图谱上直接出现一个较大的正峰 (反应放热, H_r), 表明凝集反应迅速发生时, 放热量大, 足以掩盖其他非凝集反应峰, 故未出现搅拌放热峰和稀释热峰。

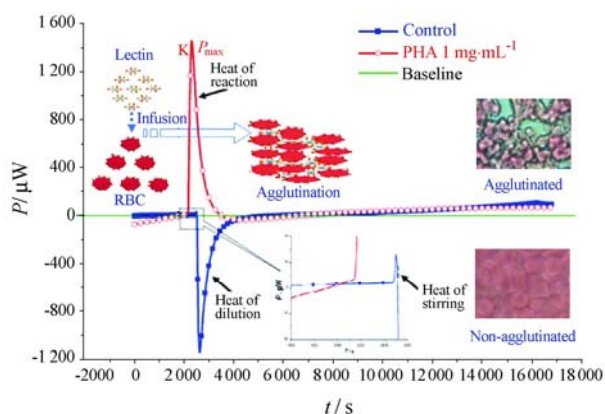


Figure 1 The biothermokinetics curves of hemagglutination and the abstraction of biothermokinetic parameters

2 不同浓度板蓝根红细胞凝集活性的微量量热法测定

采集不同浓度梯度的清丰板蓝根样品(Qingfeng)作用于 20% 兔血红细胞的凝集反应生物热动力学曲线, 见图 2; 提取反应动力学参数见表 1。

结果表明, 板蓝根与血红细胞凝集反应呈剂量

依赖关系, 与反应焓变 (H_r)、最大反应功率 ($P_{\max}$)、反应速率常数变化率 (E) 均具有良好的线性关系。线性关系表达式分别为: $H_r = 1\,295.1C - 52.734$, $r = 0.999\,3$; $P_{\max} = 2\,336C - 97.924$, $r = 0.972\,5$; $\ln E = 0.973C - 0.640\,6$, $r = 0.966\,4$ 。

3 不同产地板蓝根血细胞凝集活性微量量热法测定

采集不同产地板蓝根作用于 20% 兔血红细胞的凝集反应生物热动力学曲线, 见图 3; 提取反应动力学参数见表 2。结果表明, 杭州、临沂、赤峰样品峰高显著低于其他样品; 陇西样品反应进行最为迅速, 完全掩盖搅拌热及稀释热的影响, 其他样品均有稀释吸热峰的出现; 热动力学曲线均具有良好的特征性, 能够表征出样品的凝集活性差异。

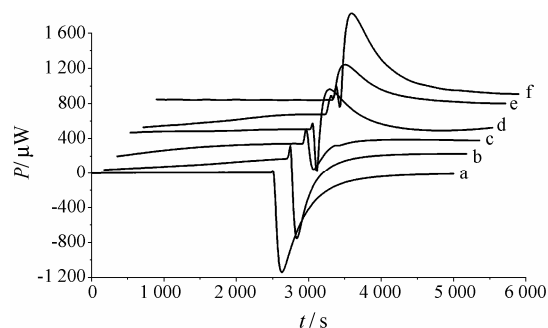


Figure 2 The hemagglutination biothermokinetics curves of different concentration gradients of Banlangen (BLG, Qingfeng) extraction effect on 20% rabbit erythrocyte. a: Control (physiologic saline without any samples); b: $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Qingfeng BLG; c: $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Qingfeng BLG; d: $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Qingfeng BLG; e: $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Qingfeng BLG; f: $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Qingfeng BLG

4 红细胞凝集活性的微量板法测定

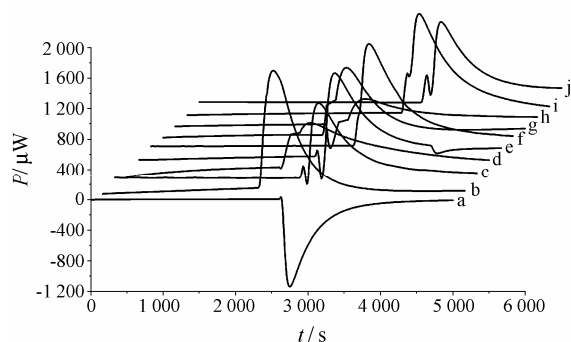
采用微量板法, 以 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PHA 为阳性反应物, 检测其对 2% 红细胞混悬液出现阳性反应最高稀释倍数为 $1:2^5$; 分别在红细胞制备后第 12、24、36、48、60 和 72 h 测定 PHA 对 2% 血红细胞凝集活性, 结果显示最大稀释倍数均为 2^5 , 表明红细胞在 72 h 内稳定。

Table 1 The hemagglutination biothermokinetics parameters of different concentration gradients BLG (Qingfeng) extraction effect on 20% rabbit erythrocyte

Dose/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$H_r / \mu\text{J}$	$P_{\max} / \mu\text{W}$	k / min^{-1}	$H_r / \mu\text{J}$	$P_r / \mu\text{W}$	$\ln E$
0	-529.937	-1 140.244	0.039			
0.2	-321.171	-918.565	0.095	208.765	221.679	0.351
0.4	-52.359	-285.289	1.135	477.578	854.954	3.333
0.6	167.890	459.583	10.539	697.827	1 599.827	5.592
0.8	459.595	573.217	38.913	989.532	1 713.461	6.901
1.0	717.931	988.165	73.635	1 247.868	2 128.409	7.540

Table 2 The hemagglutination biotermokinetics parameters of different BLG extraction effect on 20% rabbit erythrocyte

Sample	Dose	$H_i/\mu J$	$P_{max}/\mu W$	k/min^{-1}	$H_i/\mu J$	$P_i/\mu W$	$\ln E$	D	U
Control	—	-529.937	-1 140.244	0.039					
PHA	1 mg·mL ⁻¹	557.621	1 451.599	203.532	1 087.558	2 591.842	8.557	5	1.00
Yuanzhai	1 g·mL ⁻¹	904.960	1 301.146	63.665	1 434.897	2 441.389	7.394	10	1.01
Yutian	1 g·mL ⁻¹	989.187	1 334.977	73.050	1 519.123	2 475.221	7.532	11	1.06
Longxi	1 g·mL ⁻¹	750.049	1 094.893	79.804	1 279.986	2 235.137	7.620	11	0.87
Jiamusi	1 g·mL ⁻¹	798.763	1 052.483	78.656	1 328.700	2 192.727	7.606	8	0.83
Qingfeng	1 g·mL ⁻¹	717.931	988.165	73.635	1 247.868	2 128.409	7.540	9	0.79
Linyi	1 g·mL ⁻¹	677.441	881.395	20.790	1 207.378	2 021.639	6.274	5	0.68
Hangzhou	1 g·mL ⁻¹	746.942	588.100	23.243	1 276.878	1 728.343	6.385	4	0.51
Chifeng	1 g·mL ⁻¹	582.625	531.470	11.616	1 112.562	1 671.714	5.690	3	0.44

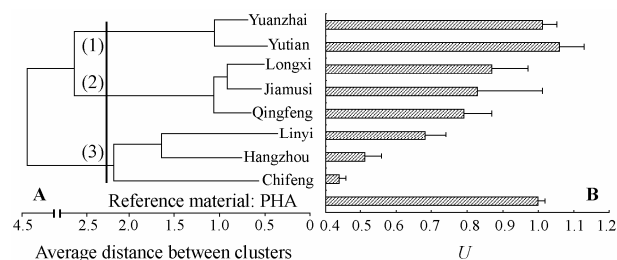
**Figure 3** The hemagglutination biotermokinetics curves of different BLG extractions effect on 20% rabbit erythrocyte. a: Control (physiologic saline without Qingfeng BLG); b: 1.0 mg·mL⁻¹ PHA (phytohemagglutinin); c: 1.0 g·mL⁻¹ Yuanzhai BLG; d: 1.0 g·mL⁻¹ Hangzhou BLG; e: 1.0 g·mL⁻¹ Jiamusi BLG; f: 1.0 g·mL⁻¹ Longxi BLG; g: 1.0 g·mL⁻¹ Linyi BLG; h: 1.0 g·mL⁻¹ Chifeng BLG; i: 1.0 g·mL⁻¹ Qingfeng BLG; j: 1.0 g·mL⁻¹ Yutian BLG

采用微量板,同时测得8批不同产地板蓝根药材提取物引起红细胞凝集的最大稀释倍数分别为: 2¹¹ (河北玉田)、2¹¹ (甘肃陇西)、2¹⁰ (安徽元寨)、2⁹ (河南清丰)、2⁸ (黑龙江佳木斯)、2⁵ (山东临沂)、2⁴ (浙江杭州) 和 2³ (内蒙古赤峰)。计算各样品凝集滴度(D), 结果见表2。

5 不同产地板蓝根凝集活性效价计算

以不同产地板蓝根红细胞凝集反应的动力学参数及微量板凝集法最高稀释度为指标, 采用 SAS8.0 统计软件包进行不同产地板蓝根主成分分析。主成分分析结果表明, P_{max} 、 H_i 及 U 对样品凝集活性的贡献率最大, 分别为 86%、10%和 4% (累积贡献率为 100%)。设定 1 mg·mL⁻¹ PHA 对 2%家兔红细胞的凝集活性为 1 U, 可计算不同产地板蓝根凝集活性:

$$U = \left(\frac{P_i}{P_{PHA}} \times 86\% + \frac{H_i}{H_{PHA}} \times 10\% + \frac{D_i}{D_{PHA}} \times 4\% \right); \text{ 结果见表 2、图 4B。}$$

**Figure 4** The hemagglutination utility and cluster analysis of BLG extractions from different regions. A: The clustering result of BLG extraction from different regions, GAP cultivation region (1), primary cultivation region (2), and general cultivation region (3); B: The hemagglutination utility of BLG extraction from different regions

以不同产地板蓝根红细胞凝集反应的动力学参数及微量板凝集法最高稀释度为指标, 采用 SAS8.0 统计软件包对不同产地板蓝根进行聚类分析, 结果见图 4A。聚类分析结果表明: 当欧式聚类距离大于 2.2 时, 各类样品可聚为 3 类, 分别为 GAP 产区样品 (包括安徽元寨和河北玉田样品)、一般主产区样品 (包括河南清丰、黑龙江佳木斯和甘肃陇西) 和普通散种区样品 (包括山东临沂、浙江杭州和内蒙古赤峰)。

结合各样品凝集活性值可以发现, GAP 基地样品效价值较高, 表明规范化种植可以提高药材质量; 传统主产区样品凝集活性值较稳定, 而普通散种区样品的凝集效价较低且质量波动较大, 表明产区及种植方式对药材质量影响较大。

讨论

流感病毒 (HaNb, a=1~16, b=1~9) 在内层核蛋白抗原的基础上, 表面密布两类糖蛋白类抗原, 分别为能够凝集血细胞的血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 和能够分解神经氨酸的神经氨酸酶 (neuraminidase,

NA)^[28]。HA 可介导病毒颗粒与宿主细胞表面受体结合, 通过胞吞进入宿主细胞并完成复制与组装; 而 NA 则帮助病毒颗粒从宿主细胞释放, 从而完成病毒复制循环^[29]; 二者均是影响流感病毒感染、复制、致病的关键因素, 给予外源性凝集素或者神经氨酸酶抑制剂均可以达到抗病毒治疗的目的; 因而, 对药物抗病毒活性测定的血凝活性法及神经氨酸酶活性检测法具有等效性、关联性和一致性。

板蓝根是临床常用抗病毒中药, 具有凝集素样作用, 能够凝集血红细胞, 且其凝集活性与主要药效作用——抗病毒活性呈良好的正相关关系^[30]。凝集素抗病毒的机制是凝集素与细胞的结合可以阻断病毒分子与宿主靶细胞膜特异受体的结合, 并调动机体通过识别凝集素而识别病毒, 产生相应抗体和免疫反应, 清除病毒, 从而具有广谱高效的抗病毒作用^[31, 32]。

本文采用微量量热混合安瓿法, 建立了板蓝根红细胞凝集活性测定方法。研究过程中对红细胞用量、样品用量、加样方法等进行了考察, 结果表明板蓝根与血红细胞的凝集反应为放热反应。前期研究分别对不同来源 (家兔、大鼠、人) 红细胞进行考察, 结果表明药物对家兔和人血红细胞的凝集反应一致, 不影响实验结果, 且以家兔红细胞较易于获得, 且血源稳定, 有利于保证实验条件的一致性和可比性, 故以家兔红细胞为研究对象。

本文研究结果表明微量量热法测定结果能够提供各样品凝集活性 96% 的参数信息, 并可提供各样品的凝集活性特征图谱, 经聚类分析可显著区分 GAP 产区、一般主产区和普通散种区的样品。较现有的凝集活性检测方法 (微量板法等), 该方法在灵敏性、精确定量性、过程特征性等方面具明显的优势: 首先, k 、 $P_{\max}$ 和 H_t 等热反应动力学参数, 可以实现对凝集反应的客观、精确定量; 其次, 凝集反应的热动力学曲线也可以作为评价样品凝集活性的特征谱, 从而反映凝集反应的过程与动力学特征, 为评价样品凝集活性提供更为全面的综合信息。

References

- [1] Xu LH, Huang F, Cheng T, et al. Antivirus constituents of radix of *Isatis indigotica* [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2005, 3: 359–361.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 487–488.
- [3] Xiao XH, Yan D, Wang JB, et al. Some opinions on bioassay for the quality control of Chinese medicines [J]. World Sci Technol / Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术/中医药现代化), 2009, 11: 504–508.
- [4] Xiao XH, Jin C, Zhao ZZ, et al. Probe into innovation and development of pattern of quality control and evaluation for Chinese medicine [J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1377–1381.
- [5] Ma L, Jin C, Li ZL, et al. Bioassay and quality evaluation of Radix Isatidis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 134–136.
- [6] Zhao YL, Shan LM, Jin C, et al. Study on quality evaluation of Radix Isatis based on analysis of biothermic activity [J]. Chin Tradit Herb Med (中药材), 2008, 31: 743–747.
- [7] Wei L, Li Y, Li HB, et al. Techniques used in evaluation the quality of Radix Isatidis [J]. World Sci Technol / Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术/中医药现代化), 2008, 10: 33–36.
- [8] Sun XX, Zhang LL, Sun CL. The anti-virus effect of an active ingredient from a Chinese traditional herb — *Isatis indigotica* Fort [J]. Chin Pharm Bull (中国药理学通报), 2007, 23: 835–836.
- [9] Li HB, Yan D, Wang JB, et al. Study on the biological evaluation of Radix Isatidis based on neuraminidase activity assay [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 162–166.
- [10] Li HB, Yan D, Jin C, et al. Establishment of bioassay method for antiviral potency of Radix Isatidis based on chemical fluorometric determination [J]. Spectrosc Spectral Anal (光谱学与光谱分析), 2009, 29: 908–912.
- [11] Cao HP, Tao PZ, Du GH. Establishment and application of high throughput screening model for influenza virus neuraminidase inhibitors *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 930–933.
- [12] Hu XC, Zheng WQ. Resistance to *Isatis indigotica* Fort lectin inhibit influenza virus [J]. J Shanghai Teach Univ (上海师范大学学报), 2003, 32: 62–65.
- [13] Hu XC, He N, Tang SH. A comparative study on different extraction methods on protein in *Isatis indigotica* Fort [J]. J Shanghai Teach Univ (上海师范大学学报), 2004, 33: 66–69.
- [14] Shu XY, Ruan QP, Hou DB. The review on procession of phytoagglutinin [J]. Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践), 2006, 20: 53–56.
- [15] Hsu KL, Mahal LK. A lectin microarray approach for the rapid analysis of bacterial glycans [J]. Nat Protoc, 2006, 1: 543–549.

- [16] Yu H, Zhang CX. Interaction of antigen-antibody and the research methods [J]. Chem Ind Times (化工时刊), 2004, 18: 17–20.
- [17] Gao WY, Liu Y, Li wei, et al. The application of dissipative structure theory in life science [J]. Coll Chem (大学化学), 2004, 19: 30–34.
- [18] Xiao XH, Jin C, Zhao YL, et al. Biothermodynamics expression for the phamacotendency of traditional Chinese drugs and its applications [J]. J US-China Med Sci (美中医学), 2006, 1: 1–7.
- [19] Yan D, Jin C, Xiao XH, et al. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry [J]. J Biochem Biophys Methods, 2008, 70: 845–849.
- [20] Yan D, Jin C, Xiao XH, et al. Investigation of the effect of berberins alkaloids in *Coptis chinensis* Franch on *Bacillus shigae* growth by microcalorimetry [J]. Sci China Ser B-Chem, 2007, 50: 638–642.
- [21] Luo Y, Yan D, Ren YS, et al. Investigation on the acrasin titration method by biothermoactivity [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 1136–1139.
- [22] Shoghi E, Romero L, Reta M, et al. Enthalpies and constants of dissociation of several neutral and cationic acids in aqueous and methanol / water solutions at various temperatures [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49: 923–930.
- [23] Dai J, Zhang YZ, Liu Y. Microcalorimetric investigation on metabolic activity and effects of La (III) in mitochondria isolated from Indica rice 9311 [J]. Biol Trace Elem Res, 2008, 121: 60–68.
- [24] Lina B, Vilma P, Jurgita M, et al. Titration calorimetry standards and the precision of isothermal titration calorimetry data [J]. Int J Mol Sci, 2009, 10: 2752–2762.
- [25] Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, et al. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen [J]. Genes Dev, 2009, 23: 249–259.
- [26] Gao GL, Fu SL, Kong Z, et al. Study on the oscillating systems of siwu decoction and its single herbs by microcalorimetry [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 2007, 65: 1970–1974.
- [27] Tang HY, Yan D, Zhang SF, et al. Investigate on bioassay method for antivirus potency of Banlangen Keli based on agglutinated activity assay [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 479–483.
- [28] Dias A, Bouvier D, Crepin T, et al. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit [J]. Nature, 2009, 485: 914–918.
- [29] Liu S, Ji K, Chen J, et al. Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza virus [J]. PLoS ONE, 2009, 4: e5022.
- [30] Chen ZZ. Progress on H5N1 avian influenza virus and new antiviral drugs [J]. Food Drug (食品与药品), 2008, 10: 58–61.
- [31] Hu XC, Cheng JW, Liu SZ, et al. Experimental study on relation between titer of *Isatis* agglutinin and inhibition of influenza virus [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai (上海中医药大学学报), 2001, 15: 56–57.
- [32] Shen P. Microbiology (微生物学) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.