

基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质的生物评价

李寒冰^{1,2}, 鄢 丹¹, 王伽伯¹, 王京燕³, 贝祝春³, 魏 丽^{1,2}, 肖小河^{1*}

(1. 中国人民解放军第 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;
3. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要: 采用流感病毒神经氨酸酶 (NA) 体外活性荧光检测法测定板蓝根的 NA 抑制生物活性, 并建立板蓝根抗病毒生物效价检测方法。研究表明板蓝根具有抑制 NA 的活性, $IC_{50} = (0.90 \pm 0.20) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于生药), 其量效曲线形状与阳性对照药磷酸奥司他韦相似, 提示二者对 NA 的抑制可能具有相同的作用方式。采用“质反应平行线”法设计和优化的板蓝根抗病毒生物效价检测方法, 重复性较好 ($RSD = 5.78\%$), 实际样品检测结果均能通过可靠检验 (偏离直线 $P > 0.05$ 、偏离平行 $P > 0.05$)。研究结果表明, 所建立的生物效价检测方法可以作为板蓝根品质生物评价的方法之一。

关键词: 板蓝根; 抗病毒活性; 神经氨酸酶; 生物效价; 品质评价

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0162-05

Biological evaluation of Radix Isatidis based on neuraminidase activity assay

LI Han-bing^{1,2}, YAN Dan¹, WANG Jia-bo¹, WANG Jing-yan³, BEI Zhu-chun³,
WEI Li^{1,2}, XIAO Xiao-he^{1*}

(1. Institute of Chinese Medicine, 302 Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100039, China; 2. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. State Key laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Radix Isatidis (Banlangen in Chinese) is a traditional Chinese medicinal (TCM) herb, and is frequently used for treating influenza. However, the current quality control method for Radix Isatidis should be developed since it has little correlation to the pharmacodynamic action. In this paper, the *in vitro* inhibitory action of Radix Isatidis on neuraminidase (NA) was investigated by fluorometric assay with 4-methylumbelliferyl-D-N-acetylneuraminate (FL-MU-NANA) method. Based on the method, the experimental condition was optimized and a bioassay statistic method was established according to the reaction type and the regularity of “parallel lines of qualitative effect”. Then the bioassay method of Radix Isatidis was established. This study indicated that Radix Isatidis had obvious *in vitro* inhibitory activity on NA with $IC_{50} = (0.90 \pm 0.20) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (herb). The correlation between logarithmic dose and reaction rate showed an “S” shape — is quite similar to Tamiflu's reaction curve, which hinted that Radix Isatidis had the same inhibitory function on NA as Tamiflu. The established bioassay method of “parallel lines of qualitative effect” had a good reproducibility ($RSD = 5.78\%$). The results of potency determination of Radix Isatidis were reliable (reliability test: deviation from straight line $P > 0.05$, deviation from parallel line $P > 0.05$) and well regular. As a conclusion, this bioassay method is suitable to control and evaluate the quality of Radix Isatidis.

收稿日期: 2008-09-02.

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目 (30625042); 国家“十一·五”科技支撑计划课题 (2006BAI08B03).

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

Key words: Radix Isatidis; antiviral activity; neuraminidase; bioassay; quality evaluation

板蓝根(Radix Isatidis)是常用中药,用于治疗感染性疾病,临床疗效确切,尤其是抗流感病毒作用被认为是板蓝根的主要药理活性^[1-6]。由于板蓝根化学成分复杂,药效物质不明确,对其质量控制,现版药典^[7]主要以指标性成分精氨酸的薄层检识为定性依据。但是精氨酸并不是板蓝根的主要药效成分,也不是专属性成分,因此精氨酸的检识对于板蓝根的质量控制并无太大意义。当前,建立与药效相关的中药质量生物控制模式和方法已经成为中药质量控制研究和发展的趋势^[8,9]。优选和建立适宜的抗病毒效价检测方法用于板蓝根质量控制和品质评价,可以体现板蓝根功效特点,补充和完善以指标性成分检测为主的质控模式的不足。

底物荧光检测法(FL-MU-NANA method)是流感病毒神经氨酸酶(NA)活性体外检测方法之一。由于NA是影响流感病毒复制、感染和致病的关键酶,NA抑制剂可以通过抑制NA活性而有效地控制流感症状和疾病的传播^[10,11],因此近年来NA活性荧光检测法已发展为抗流感病毒药物(包括植物药)的筛选和活性评价的重要方法^[12]。本文采用底物荧光法检测了板蓝根体外抑制NA的生物活性,并按照生物效价检测的要求设计和优化试验条件,建立了基于流感病毒神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质生物评价方法。

材料与方法

药材及试剂 板蓝根药材共10批(上述样品按产地分别采自河北玉田、河北祈新、河南原阳、甘肃陇西各1批,安徽阜阳某GAP基地产品4批以及安徽亳州市市场购得过期变质样品2批),经解放军中药研究所肖小河研究员鉴定均为十字花科(Cruciferae)植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的干燥根。阳性对照药:磷酸奥司他韦(Tamiflu)胶囊,批号:B1212, Roche Pharma (Schweiz)公司。

工作对照品:取板蓝根对照药材(中国药品生物制品检定所),采用乙醇提取法制成提取物(收率7.70%)作为工作对照品。

NA底物:4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- α -D-neuraminic acid(MUNANA, Sigma公司)。

乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40, NP-40, Fluka公司);DMEM培养基(GIBCO公司);MES缓冲剂(2-morpholinoethanesulfonic acid, Sigma公司);其余

为分析纯。

主要仪器 荧光酶标检测仪, FLUOstar OPTIMA, 德国BMG公司; II型生物安全柜, NUAIRE公司; 恒温CO₂细胞培养箱, MCO-15AC, 日本SANYO公司; 倒置显微镜, CK40-F200, 日本OLYMPUS公司; 96孔荧光酶标板, 美国COSTAR公司。

细胞系、病毒株及NA MDCK细胞由军事医学科学院微生物传染病研究所冻存; 流感病毒(A/PR8/34)由军事医学科学院微生物传染病研究所保存。

NA的制备:进行细胞传代培养并接种病毒,待细胞完全被感染病变后取滤除细胞的病毒液,加NP-40灭活,0.22 μ m滤器滤过后分装,作为NA的原酶液,于-70℃冻存备用^[13]。

NA荧光检测原理 化合物MUNANA是NA的特异性底物,在NA作用下的产物4MU(7-hydroxy-4-methylcoumarin, C₁₀H₈O₃) 在355 nm入射波长激发下,可以产生460 nm荧光,通过检测荧光强度的变化,可以灵敏地反应出NA活性^[14];同样,如果反应体系中加入能够干扰NA活性的药物,则荧光值会相应减弱,从而该物质的NA抑制活性就能通过荧光值的强弱变化被检测出来。

反应条件和参数设定 参考已广泛应用的NA抑制剂筛选方法^[13-15],反应在96孔板中进行,首先加入稀释的原酶液25 μ L和样品溶液25 μ L,室温下作用30 min后加MUNANA 50 μ L,37℃孵育60 min后加入终止液(0.1 mol·L⁻¹甘氨酸,以25%乙醇配制,1% NaOH调pH 10.7)200 μ L终止反应。测定荧光强度值,设置激发波长:355 nm,发射波长:460 nm,检测温度37℃。

供试品溶液的制备 取板蓝根药材粗粉加乙醇超声处理1 h,滤过,取续滤液,回收乙醇并干燥,加水适量使溶解,微孔滤膜(0.22 μ m)滤过,取续滤液按1:0.6倍剂距等比稀释成一定浓度的供试品溶液。另取工作对照品制成50 mg·mL⁻¹的对照品溶液,与供试品相同的剂距稀释成工作对照品溶液。

样品浓度设置及加样分组 根据预试验,通过比较对照品(S)与被检样品(T)的反应率估算被检品的效价(A_T),在线性范围内调整被检样品浓度使与对照品活性接近,用概率单位法在50%反应率上下设相同的浓度梯度。为便于活性比较,同时设样品

测试组 (NA + 样品 + MUNANA), 背景对照组 (样品 + MUNANA, 缓冲液补足至相同体积), 酶活性对照组 (NA + MUNANA, 反应终止后再加入同体积样品溶液)。根据各组荧光值计算各样品对 NA 活性的抑制率。

结果

1 板蓝根抑制 NA 活性检测和量效关系考察

板蓝根有体外抑制 NA 的药理活性 $IC_{50} = (0.90 \pm 0.20) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药), 并且量效曲线形状与阳性对照药磷酸奥司他韦相同 (图 1~图 3), 提示两者作用趋势和规律相同。反应率与对数剂量之间呈良好的对称“S”形曲线, 反应率转换成概率单位 (Y) 后, 对数剂量与概率单位呈直线关系, 在 $4.88 \times 10^{-2} \sim 25.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量内, 回归方程 $Y = 8.7259 + 1.2169X$ (X 代表对数剂量)。说明此反应类型适合用生物检定中“质反应平行线测定”法进行效价测定^[16]。

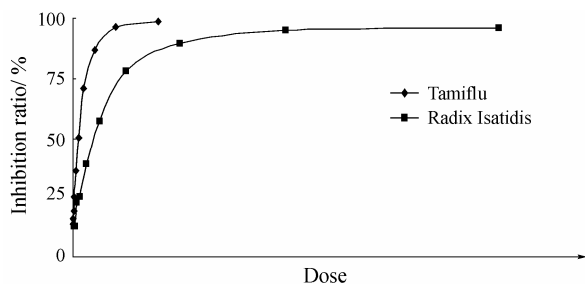


Figure 1 Dose-effect relationship

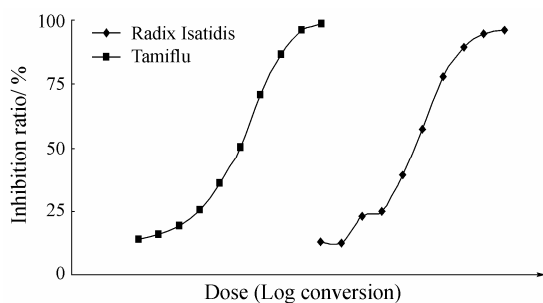


Figure 2 Lgdose-effect relationship

2 数据处理与效价计算

2.1 反应率 反应率 (抑制率) 的几率单位以及半数有效量 IC_{50} (采用正规 Bliss 法) 均由 DAS ver 1.0 软件计算完成。

计算公式:

$$IR = \frac{\text{酶活性对照荧光} - \text{样品作用后荧光}}{\text{酶活性对照荧光} - \text{背景荧光}} \times 100\%$$

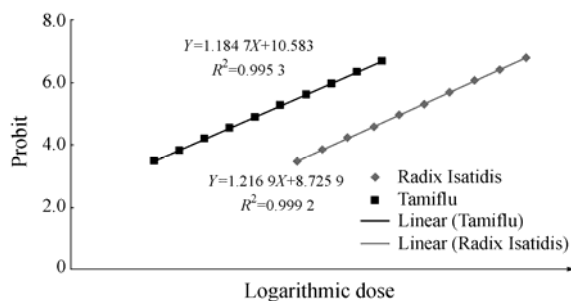


Figure 3 Linear relationship of lgdose-probit

2.2 效价计算 约定工作对照品的效价 (P_s) 为 $0.077 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (生药), 根据平行线测定原理采用质反应的平行线测定法进行样品与对照品效价的对比检定。具体运算过程及结果的表示见下表 (表 1、2)。

表 1 中, 首先将对照品 (S) 和被检样品 (T) 的剂量及反应率输入对应数据栏, 由 DAS ver1.0 软件计算概率单位 (Y_j)、权重 (nW) 等中间结果。S 和 T 校正直线的回归方程由 $Y = \bar{Y} + b(X - \bar{X})$ 求得 (式中 $\bar{X} = \frac{\sum nWX}{\sum nW}$, $\bar{Y} = \frac{\sum nWY}{\sum nW}$, $b = \frac{\sum S_{XY}}{\sum S_{XX}}$)。而后经过连续校正和可靠性检验, 样品效价由公式 $P_T = R \cdot P_s$ 计算求得 ($\lg R = \bar{X}_s - \bar{X}_T - \frac{\bar{Y}_s - \bar{Y}_T}{b}$, P_s 为对照品的效价)。

表 2 中, A_T 为估计效价, 可靠性检验 (偏离直线 > 0.05 , 偏离平行 > 0.05) 说明 S 与 T 量效线性良好, 且呈平行线关系, 通过可靠性检验, 对比检定所得到的效价结果准确可信。

效价以 P_T 和 FL% 表示 (P_T 为效价中间值, FL% 为结果的可信限率)。

3 方法学考察

3.1 精密度 按上述条件, 取同一份板蓝根样品的供试液, 分 5 次点样于 96 孔板中参与酶促反应, 结束后与工作对照品溶液进行对比检定, 计算效价的变异系数。结果 RSD 为 3.83%。

3.2 重复性 同一批样品分 5 次提取, 制成供试品溶液, 按上法与工作对照品溶液进行对比检定, 计算效价的变异系数。5 次测定的效价 RSD 为 5.78%, 该方法具有较好的重复性。

3.3 稳定性 分别于 0、1、2、3 和 4 h 将保存于 4°C 的同一供试品溶液进行效价检测, 其 RSD 为 4.75%, 表明供试品溶液在 4°C 条件下保存 4 h 是稳定的。

Table 1 Data of inputting and operating

	Dose (D)	Lgdose (X)	Reactin rate (P) %	Experimental probit (Y_e)	Expectant probit (Y)	Work probit (Y_j)	Weight (nW)	Regressive probit (Y_r)	Error ($Y_r - Y$)
Work reference substance (s)	8.75	0.94	65	5.39	5.39	5.39	60.22	5.39	2.97 E-04
	6.12	0.79	55	5.13	5.11	5.12	63.37	5.11	1.01E-04
	4.29	0.63	43	4.82	4.83	4.82	63.03	4.83	-9.52E-05
	3.00	0.48	33	4.56	4.56	4.56	59.26	4.56	-2.91E-04
SUM		2.84				19.89	245.88		
Test sample (T)	10.50	1.02	65	5.39	5.42	5.38	59.64	5.42	-2.85E-06
	7.35	0.87	59	5.23	5.20	5.23	62.69	5.21	-1.43E-06
	5.14	0.71	52	5.05	4.99	5.05	63.66	4.99	-7.33E-09
	3.60	0.56	39	4.72	4.77	4.72	62.45	4.77	1.42E-06
SUM		3.16				20.38	248.44		

Table 2 Form of results

A_T	Deviation from straight line	Deviation from parallel line	R	FL_R	FL_{ave}	FL%	P_T
21	0.99	0.46	0.99	0.77-1.34	0.28	28.43	20.92

Table 3 Determination results of sample

No.	Source	$P_T/U \cdot g^{-1}$	FL/%	^a Reliability test	
				Deviation from straight line	Deviation from parallel line
01	Yutian, Hebei	23.07	32.51	0.98	0.81
02	Qixin, Hebei	22.52	28.05	0.99	0.43
03	Yuanyang, Henan	29.55	27.85	0.99	0.27
04	Longxi, Gansu	30.48	27.81	0.99	0.84
05 ^b	Fuyang, Anhui 1	29.01	31.31	0.98	0.67
06 ^b	Fuyang, Anhui 2	31.02	31.32	0.99	0.83
07 ^b	Fuyang, Anhui 3	29.76	19.06	0.99	0.76
08 ^b	Fuyang, Anhui 4	30.55	28.75	0.98	0.82
09 ^c	Bozhou market 1	8.28	44.83	0.49	0.12
10 ^c	Bozhou market 2	12.32	31.10	0.35	0.62

^aReliability test: deviation from straight line $P > 0.05$, deviation from parallel line $P > 0.05$; ^bFine quality samples, identified by routine method (collected from the same GAP base); ^cInferior quality samples, identified by routine method (expired samples, got from market)

3.4 不同来源的板蓝根抑制流感病毒神经氨酸酶效价的测定 以本文设定的工作对照品为参比,按照上述方法,测定 10 批板蓝根药材的效价,结果见表 3。

结果表明不同批次药材效价值存在差异,效价中间值范围为 8.28~31.02 $U \cdot g^{-1}$, 高低相差近 4 倍。其中 05~08 号样品是板蓝根道地产区 GAP 基地 4 个批次产品,常规鉴别均为优级品,它们抗病毒效价值最高且差异较小(29.01~31.02 $U \cdot g^{-1}$), 09、10 号样品常规鉴别判为劣药,其抗病毒效价值也最低,分别为 8.28 $U \cdot g^{-1}$ (FL% = 44.83)、12.32 $U \cdot g^{-1}$ (FL% = 31.10)。

讨论

前期研究中,作者在常用的 NA 活性荧光检测法基础上,系统考察了底物用量、酶用量、加样量、反应时间等因素,建立了抑制 NA 活性中药的筛选方法,初步研究表明板蓝根乙醇提取物具有明显的体外抑制 NA 活性。本试验进一步证明了板蓝根的抑制 NA 活性,经过与阳性对照药磷酸奥斯他韦胶囊的对比,表明二者在抑制 NA 活性方面具有相同的作用趋势和规律。在此基础上对荧光检测法进行了优化和方法学考察,并确定了适宜的生物检定统计方法,建立了基于流感病毒神经氨酸酶活性检测的板蓝根生物效价检测方法,用于板蓝根品质评价。

当前,对板蓝根的质量控制方法主要是依托常规性状鉴别和精氨酸的定性检识,该方法既难以做到客观定量,又与板蓝根的药理活性几无关联,也就难以保证它的临床有效性。本文结果提示:生物效价检测方法与常规鉴别方法比较不仅在结果上具有一致性,而且具有灵敏度高、重复性好、操作简单、客观、可定量、快捷等优点。本方法的建立提高了板蓝根的质量控制水平,并且能够为抗病毒类中药质量生物控制的研究提供参考。

References

- [1] Yamada H. Antiviral compositions containing new glycoprotein from *Isatis tinctoria*: JP, 1160, 599 [9960,599] [P]. 1999-03-02.
- [2] Lin CW, Tsai FJ, Tsai CH, et al. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds [J]. *Antiviral Res*, 2005, 68: 36–42.
- [3] Hu XC, Zheng WQ. Resistance to *Isatis indigotica* Fort lectin inhibit influenza virus [J]. *J Shanghai Teachers Univ* (上海师范大学学报), 2003, 32: 62–65.
- [4] He LQ, Li X, Chen JW, et al. Chemical constituents from water extract of *Radix Isatidis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2006, 41: 1193–1196.
- [5] Xiao SS, Jin Y, Sun YQ. Recent progress in the studies of chemical constituents, pharmacological effects and quality control methods on the roots of *Isatis indigotica* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20: 455–459.
- [6] Yang HX, Li XM. Effect of extractive of *Radix Isatidis* on influenza virus [J]. *J Tianjin Med Univ* (天津医科大学学报), 2007, 13: 19–22.
- [7] China Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典) [S]. Vol I. 2005 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 142–143.
- [8] Xiao XX, 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 Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32: 1377–1381.
- [9] Wang P, Qian ZZ. The readable explanation of the editorial outline of Chinese Pharmacopoeia 2010 edition [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28: 337–340.
- [10] Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies and inhibitors [J]. *Protein Sci*, 1994, 3: 1687–1696.
- [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] Peng Y, Li WK. Recent development of studies on antiviral phytochemicals in abroad [J]. *World Phytomed* (国外医药·植物药分册), 1999, 14: 7.
- [13] Deba PN, Udo R. Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus [J]. *J Virol Methods*, 2004, 122: 9–15.
- [14] Potier M, Mameli L. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate [J]. *Anal Biochem*, 1979, 94: 287–296.
- [15] Cann AJ. *Virus Culture A Practical Approach* [M]. New York: Oxford University Press, 1999: 1–60.
- [16] Zhou HJ. *Drug Bioassay* (药品生物检定) [M]. Beijing: People's Medical Press, 2005: 87–88.