



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102293807 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 201110253084. 6

(22) 申请日 2011. 08. 30

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130022 吉林省长春市朝阳区人民大街
5625 号

(72) 发明人 徐经纬 杨艳琴 杨卫 房学迅
田莉 肖延蒙 王晨旭

(74) 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务
所 22210

代理人 南小平

(51) Int. Cl.

A61K 36/30 (2006. 01)

A61P 31/16 (2006. 01)

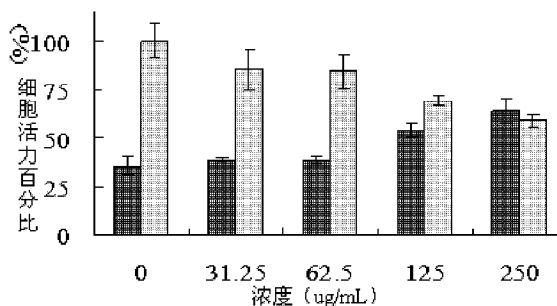
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用

(57) 摘要

紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用,属于中药应用领域。本发明是通过以下技术方案实施的:首先制备紫草溶液,取神经氨酸酶溶液和紫草溶液在 37℃ 培养箱中孵育 30 分钟,然后加入 MUNANA 的缓冲溶液,用 Bio-Red FLx-800 荧光酶标仪进行检测。本发明为紫草发掘了新的医疗用途,开拓了一个新的应用领域;本发明以紫草生药材、紫草提取物抑制甲型 H1N1 病毒,效果显著,为今后开发出一种新的抑制甲型 H1N1 流感病毒的药物奠定基础。



1. 紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒的药物中的应用,其特征
在于所述紫草为生药材或紫草提取物中的一种。
3. 根据权利要求 2 所述的紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒的药物中的应用,其特征
在于,所述的紫草提取物的制备方法为:将紫草用蒸馏水浸泡过夜后,过滤,得第一次浸泡
过滤后所得液体和过滤后的紫草,将过滤后的紫草再加入蒸馏水浸泡过夜后,以文火加热
煮中药 3-5 小时,过滤,得熬煮过滤后的液体,将第一次浸泡过滤后所得液体和熬煮过滤后
所得液体混合,得到混合溶液,冻干混合溶液后得到紫草粉末。
4. 根据权利要求 3 所述的紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒的药物中的应用,其特征
在于,所述紫草提取物的制备方法中,所述将紫草用蒸馏水浸泡过夜后和将过滤后的紫草
再加入蒸馏水浸泡过夜后的步骤中的蒸馏水替换为甲醇或乙醇中的一种。

紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于中药应用领域,具体涉及紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用。

背景技术

[0002] 流感是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病,具有流行面广,传染性高,发病率高等特点。流感可通过呼吸道、消化道、眼结膜等多种途径传播。迄今为止,爆发过 5 次流感的大流行和若干流感小流行。严重危害人类的健康和生命。1918 年爆发的西班牙流感造成全球 30% 人感染,而将近 2000 万人死于这次大流感。最近全球爆发的甲型 H1N1 流感即是人、禽、猪三种不同来源流感病毒的杂合体,其特点是突然出现,传播迅速。虽然其致死率不高,但未来发展变化难以预料。09 年 6 月 11 日,世界卫生组织正式宣布把甲型 H1N1 流感警戒级别升至 6 级,世卫组织认为疫情已经发展为全球性“流感大流行”。

[0003] 紫草,为紫草科紫草属植物,又名山紫草,紫丹,紫草根。紫草的药理作用如下:

[0004] 1、抗病原微生物作用:紫草煎剂、紫草素、 β -二甲基丙烯酰紫草素对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌等具有抑制作用。紫草素对大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌均有明显抑菌作用。

[0005] 2、抗炎作用:紫草的乙醚、水、乙醇提取物均有一定的抗炎作用。

[0006] 3、对心血管系统的作用:紫草煎剂对心脏的作用为小量兴奋,大量则抑制,最后停止于舒张期。

[0007] 4、避孕作用:国外所产路边紫草 *Lithospermum ruderales* 50% 的醇浸出液,能降低小白鼠的生育率,使正常小白鼠的动情间期延长,对未成熟的雄性或雌性小鼠,可引起性器官、胸腺、垂体重量减轻,生长发育延缓,。

[0008] 5、抗肿瘤作用:有报道指出,紫草素对肝癌和 Lewis 肺癌有一定的放射增敏作用。紫草素加放射可能增强 Lewis 肺癌小鼠巨噬细胞对瘤细胞的直接杀伤力。带瘤小鼠生存期的延长间接增加了放疗效果。据报道,紫草根对绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎有一定的疗效。用美蓝试管法初筛,紫草根对急性淋巴细胞性白血病有极轻度的抑制作用。紫草可减少(鼠)自发性乳癌的发病率。

[0009] 迄今为止,尚未有关于紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用的报道。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用。本发明是通过以下技术方案实施的:紫草在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用。所述紫草为生药材或紫草提取物中的一种。所述的紫草提取物的制备方法为:将紫草用蒸馏水浸泡过夜后,过滤,得第一次浸泡过滤后所得液体和过滤后的紫草,将过滤后的紫草再加入蒸馏水浸泡过夜后,以文火加热煮中药 3-5 小时,过滤,得熬煮过滤后的液体,将第一次浸泡过滤后所得液体和熬煮过滤后所得液体混合,得到混合溶液,冻干混合溶液后得到紫草粉

末,所述将苦楝皮用蒸馏水浸泡过夜后将过滤后的苦楝皮再加入蒸馏水浸泡过夜后的步骤中的蒸馏水替换为甲醇或乙醇中的一种。

[0011] 将所述冻干后的紫草粉末溶解用蒸馏水溶解至浓度为 10mg/mL,得紫草溶液。将神经氨酸酶溶解在 MES 缓冲液 (PH 6.5) 和 CaCl_2 中,得神经氨酸酶溶液,取神经氨酸酶溶液和紫草溶液在 37°C 培养箱中孵育 30 分钟,然后加入 MUNANA 的缓冲溶液,立即用 Bio-Red FLx-800 荧光酶标仪进行检测,激发波长 360nm,发射波长 450nm,测定时间为 8min。

[0012] 对 0.001-0.1U 的神经氨酸酶,对其具有抑制作用的紫草溶液浓度为 31.25-250ug/mL。

[0013] 本发明的原理:本发明的效果主要是通过对神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 的抑制能力来验证的。NA 是甲型 H1N1 流感病毒最重要的蛋白之一,在病毒从感染细胞中的释放的过程中,特别是病毒复制周期后期,NA 起主要作用。由于它具有酶功能,能水解细胞膜上各种糖蛋白受体末端的唾液酸,因此,NA 能够清除病毒颗粒表面糖蛋白末端的唾液酸,防止病毒的自我聚积,促使子代病毒释放。另外,NA 是一个重要的抗原,并且是病毒穿透呼吸道上皮黏液所必需的。NA 一旦发生突变,可导致甲型 H1N1 流感病毒对神经氨酸酶抑制剂产生抗性作用。

[0014] 本发明的有益效果:

[0015] 1、本发明为紫草发掘了新的医疗用途,开拓了一个新的应用领域。

[0016] 2、本发明以紫草生药材、紫草提取物抑制甲型 H1N1 病毒,效果显著,紫草对神经氨酸酶的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) = 184.3 \pm 13.1$ 和 $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) = 0.76 \pm 0.27$,本发明提供了紫草在作为抑制甲型 H1N1 流感病毒的药物中活性成分的应用,为今后开发出一种新的抑制甲型 H1N1 流感病毒的药物奠定基础。

附图说明

[0017] 图 1 为细胞相对活力与紫草溶液浓度的关系;

[0018] 图 2 为紫草溶液浓度与病毒产量的 MTT 检测图。

具体实施方式

[0019] 以下通过实例形式的具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0020] 实施例 1

[0021] 称取 10g 粉碎的紫草,100ml 蒸馏水浸泡过夜,过滤,得第一次浸泡过滤后所得液体和过滤后的紫草,在过滤后的紫草中再加入 100ml 蒸馏水,浸泡过夜后,以文火加热煮中药 4 小时,过滤,得熬煮过滤后的液体,将第一次浸泡过滤后所得液体和熬煮过滤后所得液体混合,得到混合溶液,冻干混合溶液后得到紫草粉末。将紫草粉末用蒸馏水溶解至浓度为 10mg/mL,得紫草溶液。

[0022] 实施例 2

[0023] 将神经氨酸酶 (A/California/7/2009(H1N1)NYMC X-179A c 流感病毒株,经鸡胚传代,收尿囊液, -70°C 保存备用) 溶解在 32.5mmol/L 的 MES 缓冲液 (PH 6.5) 和 4mmol/L CaCl_2 中,得神经氨酸酶溶液,取 49 μL 神经氨酸酶溶液和 1 μL 紫草溶液在 37°C 培养箱中孵育 30 分钟,然后加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MUNANA 的缓冲溶液 50 μL ,立即用 Bio-Red

FLx-800 荧光酶标仪进行检测,激发波长 360nm,发射波长 450nm,测定时间为 8min。检测结果为,紫草对神经氨酸酶的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $IC_{50}(\mu g/mL) = 184.3 \pm 13.1$ 。

[0024] 实施例 3

[0025] 将神经氨酸酶 (*Clostridium perfringens* (C. welchii), N2876, 购于 Sigma) 溶解在 32.5mmol/L 的 MES 缓冲液 (PH 6.5) 和 4mmol/L $CaCl_2$ 中,得神经氨酸酶溶液,取 49 μ l 神经氨酸酶溶液和 1 μ l 紫草溶液在 37°C 培养箱中孵育 30 分钟,然后加入终浓度为 20 μ mol/L 的 MUNANA 的缓冲溶液 50 μ l,立即用 Bio-Red FLx-800 荧光酶标仪进行检测,激发波长 360nm,发射波长 450nm,测定时间为 8min。抑制程度的强弱可以从加或不加紫草的初始反应速率来决定检测结果为,紫草对神经氨酸酶的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $IC_{50}(\mu g/mL) = 0.76 \pm 0.27$ 。

[0026] 实施例 4

[0027] 结合图 1 图 2 说明本实施例。

[0028] 为了检测紫草在细胞水平的抗流感作用,我们将由实施例 1 得到的紫草溶液按梯度稀释成不同的浓度,分别为 31.25ug/ML、62.5ug/ML、125ug/ML 和 250ug/ML,将上述紫草溶液分别与 100TCID₅₀ 的病毒等体积孵育 2 小时,总体积为 200 μ l,并且稀释液都用维持液 (即无血清,含 10ug/ml 胰酶的 DMEM),然后将上述一系列紫草溶液与 100TCID₅₀ 的病毒的混合物接种到已经长成单层的 MDCK 细胞培养板上,2 小时后,换不含 FBS 的维持液,24 小时后换含 2% FBS 的维持液,连续观察 2-3 天,用 MTT 法检测细胞病变效果。同时设只加维持液、只加同稀释度的病毒液或者只加不同浓度药物稀释液作为对照组,于 37°C、5% CO₂ 培养,对中药紫草进行抗病毒活性研究。

[0029] 结果如图 1 所示,在没有加入 H1N1 病毒时,细胞活力随着紫草浓度的增加呈现降低趋势,说明紫草提取物具有细胞毒性;在同时加入紫草提取物和 H1N1 病毒时,随着紫草提取物浓度的增加,细胞活力也随着增加。说明紫草可以抑制流感病毒,保护 MDCK 细胞免受病毒破坏,而且保护效应随着紫草提取物浓度的增加而增加即呈现浓度依赖性。

[0030] 图 2 为紫草溶液浓度与病毒产量的 MTT 检测图,由图可见,随药物浓度的提高,病毒产量逐渐下降,这同时辅证了紫草有较好抗流感病毒作用。

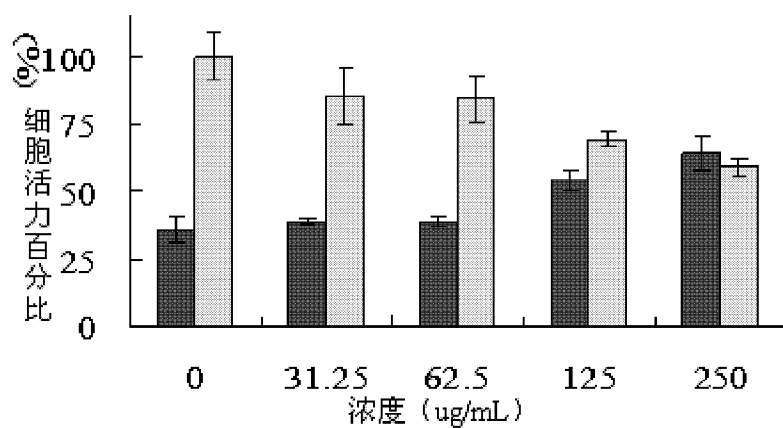


图 1

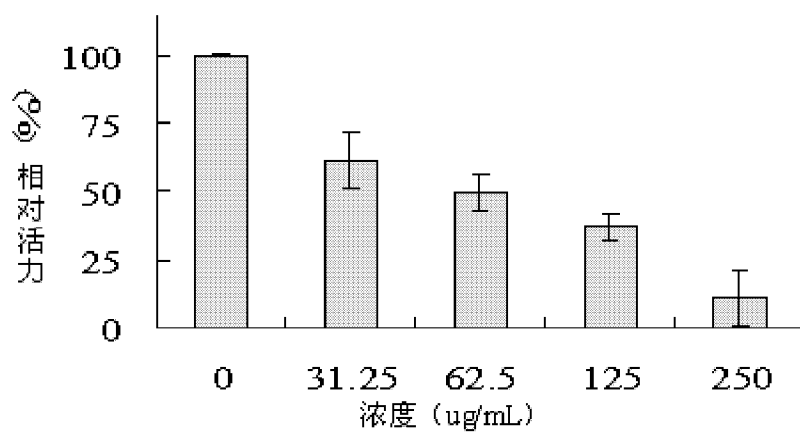


图 2