



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102266389 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 07

(21) 申请号 201110253106. 9

(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 36/58 (2006. 01)

A61P 31/16 (2006. 01)

A61K 129/00 (2006. 01)

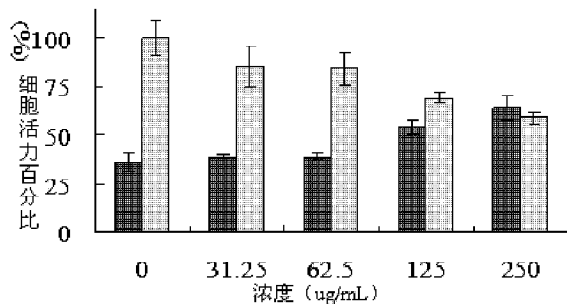
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

苦楝皮在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物  
中的应用

(57) 摘要

苦楝皮在制备抑制甲型 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:首先制备苦楝皮溶液,取神经氨酸酶溶液和苦楝皮溶液在 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。本发明为苦楝皮发掘了新的医疗用途,开拓了一个新的应用领域;本发明以苦楝皮生药材、苦楝皮提取物抑制甲型 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. 苦楝皮在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的苦楝皮在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒的药物中的应用,其特征 在于所述苦楝皮为生药材或苦楝皮提取物中的一种。
3. 根据权利要求 2 所述的苦楝皮在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒的 药物中的应用,其特征 在于,所述的苦楝皮提取物的制备方法为将苦楝皮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苦楝皮,将过滤后的苦楝皮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苦楝皮粉末。
4. 根据权利要求 3 所述的苦楝皮在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒的 药物中的应用,其特征 在于,所述苦楝皮提取物的制备方法中,所述将苦楝皮用蒸馏水浸泡过夜后和将过滤后 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。

## 苦楝皮在制备抑制甲型 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,具体涉及苦楝皮在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 自从 2009 年 3 月 18 日墨西哥发现首例甲型 H1N1 流感病例,2009 年 4 月 27 日美国在一名加利福尼亚州患者身上获得并分离得到的病毒基因序列。研究表明:这种病毒基因组由禽流感、猪流感和人流感病毒基因混合而成,是一种新型的甲型 H1N1 流感病毒,它所引起的流感具有高度传染、传播迅速、易流行的特点

[0003] 甲型流感病毒传染性高、传播迅速、易发生流行、变异速度快,而疫苗研究和生产速度较慢,使得化学药物和流感病毒疫苗难以发挥其最佳治疗和预防效果。中草药具有抑制流感病毒复制、阻止病毒致细胞病变、调节免疫、镇痛抗炎等综合功效,在防治流感病毒方面具有独特的优势。

[0004] 苦楝皮,来源于楝科植物川楝的干燥树皮及根皮,具有如下作用:

[0005] 1、驱虫作用:川楝、苦楝的根皮或干皮中所含的苦楝素有驱蛔作用。其酒精提取物在体外对猪蛔,特别对其头部有麻痹作用。25%~50%苦楝皮药液在体外对小鼠蛲虫也有麻痹作用。苦楝皮提取液尚有一定的抗血吸虫作用。

[0006] 2、抗真菌作用:苦楝子乙醇浸液(1:4)在试管内对黄色毛癣菌、同心性毛癣菌、许兰毛癣菌、奥杜盎小芽胞癣菌、铁锈色小芽胞癣菌、羊毛状小芽胞癣菌、红色皮肤癣菌、星形奴卡菌等常见的致病性真菌,有较明显的抑制作用。

[0007] 3、对肌肉收缩的作用:实验表明,川楝素对骨骼肌由直接刺激引起的收缩反应有增强作用。

[0008] 4、研究表明,川楝素有抗肉毒杆菌毒素的作用。川楝素能显著延长肉毒中毒标本对间接刺激收缩反应的麻痹时间,提示其能在神经肌肉接头处对抗肉毒的阻遏作用。

[0009] 迄今为止,尚未有关于苦楝皮在制备抑制甲型 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苦楝皮在制备抑制甲型 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:苦楝皮在制备抑制甲型 H1N1 流感病毒药物中的应用。所述苦楝皮为生药材或苦楝皮提取物中的一种。所述的苦楝皮提取物的制备方法为:将苦楝皮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苦楝皮,将过滤后的苦楝皮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苦楝皮粉末,所述浸泡苦楝皮的溶液为甲醇或乙醇中的一种。

[0011] 将所述冻干后的苦楝皮粉末溶解用蒸馏水溶解至浓度为 10mg/mL,得苦楝皮溶

液。将神经氨酸酶溶解在 MES 缓冲液 (PH 6.5) 和  $\text{CaCl}_2$  中,得神经氨酸酶溶液,取神经氨酸酶溶液和苦楝皮溶液在  $37^\circ\text{C}$  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苦楝皮溶液浓度为 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、本发明为苦楝皮发掘了新的医疗用途,开拓了一个新的应用领域。

[0016] 2、本发明以苦楝皮生药材、苦楝皮提取物抑制甲型 H1N1 病毒,效果显著,苦楝皮对神经氨酸酶的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) = 184.3 \pm 13.1$  和  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) = 0.76 \pm 0.27$ ,本发明提供了苦楝皮在作为抑制甲型 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 为细胞相对活力与苦楝皮溶液浓度的关系;

[0018] 图 2 为苦楝皮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 粉碎的苦楝皮,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苦楝皮,在过滤后的苦楝皮中再加入 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苦楝皮粉末。将苦楝皮粉末用蒸馏水溶解至浓度为 10mg/mL,得苦楝皮溶液。

[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,  $-70^\circ\text{C}$  保存备用) 溶解在 32.5mmol/L 的 MES 缓冲液 (PH 6.5) 和 4mmol/L  $\text{CaCl}_2$  中,得神经氨酸酶溶液,取 49  $\mu\text{L}$  神经氨酸酶溶液和 1  $\mu\text{L}$  苦楝皮溶液在  $37^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ ,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。检测结果为,苦楝皮对神经氨酸酶的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) = 184.3 \pm 13.1$ 。

[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  $\text{CaCl}_2$  中, 得神经氨酸酶溶液, 取 49  $\mu\text{l}$  神经氨酸酶溶液和 1  $\mu\text{l}$  苦楝皮溶液在 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  $\mu\text{l}$ , 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苦楝皮的初始反应速率来决定检测结果为, 苦楝皮对神经氨酸酶的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) = 0.76 \pm 0.27$ 。

[0026] 实施例 4

[0027] 结合图 1 图 2 说明本实施例。

[0028] 为了检测苦楝皮在细胞水平的抗流感作用, 我们将由实施例 1 得到的苦楝皮溶液按梯度稀释成不同的浓度, 分别为 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$  和 250 $\mu\text{g/mL}$ , 将上述苦楝皮溶液分别与 100TCID<sub>50</sub> 的病毒等体积孵育 2 小时, 总体积为 200  $\mu\text{L}$ , 并且稀释液都用维持液 (即无血清, 含 10 $\mu\text{g/mL}$  胰酶的 DMEM), 然后将上述一系列苦楝皮溶液与 100TCID<sub>50</sub> 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%  $\text{CO}_2$  培养, 对中药苦楝皮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, 细胞活力随着苦楝皮浓度的增加呈现降低趋势, 说明苦楝皮提取物具有细胞毒性; 在同时加入苦楝皮提取物和 H1N1 病毒时, 随着苦楝皮提取物浓度的增加, 细胞活力也随着增加。说明苦楝皮可以抑制流感病毒, 保护 MDCK 细胞免受病毒破坏, 而且保护效应随着苦楝皮提取物浓度的增加而增加即呈现浓度依赖性。

[0030] 图 2 为苦楝皮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, 这同时辅证了苦楝皮有较好抗流感病毒作用。

[0031] 实施例 5

[0032] 为了进一步说明苦楝皮具有抗流感病毒的活性, 我们做了动物实验。将六星期大的雌性 BALB/c 小鼠 (由长春生物制品研究所提供) 用 50  $\mu\text{l}$  0.2% 戊巴比妥钠麻醉, 滴鼻吸入 50  $\mu\text{l}$  A/FM/1/47 (H1N1) 流感病毒 (由白求恩医科大学分子生物实验室提供)。将小鼠分成五组, 每组十只, 一、二、三组每十五天分别喂饲 40, 80 和 160 $\text{mg/kg}$  的苦楝皮提取物, 第一次喂饲在小鼠被流感病毒感染之前两天实施。每十五天观察一下小鼠的死亡率。结果如表 3 所示, 从中可以看出喂饲苦楝皮提取物的三组小鼠的死亡之书只数明显小于病毒组, 生存天数也明显长于病毒组, 说明苦楝皮可以增加被流感病毒感染的小鼠的存活率。

[0033] 表 3

	组别	剂量 (mg/kg 每天)	死亡数/总 只数	生存天数 ± SD
[0034]	苦楝皮组	40	8/10	9.5 ± 3.1
	苦楝皮组	80	6/10	11.0 ± 2.6
	苦楝皮组	160	5/10	11.9 ± 2.4
	空白对照组		0/10	>15.0
	病毒组		9/10	7.4 ± 3.0

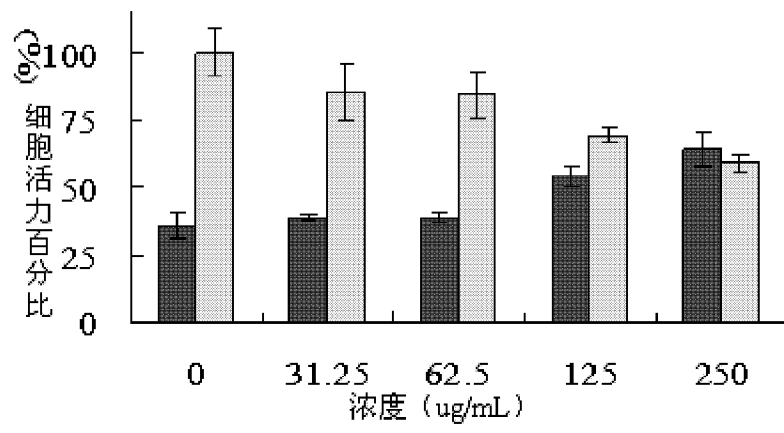


图 1

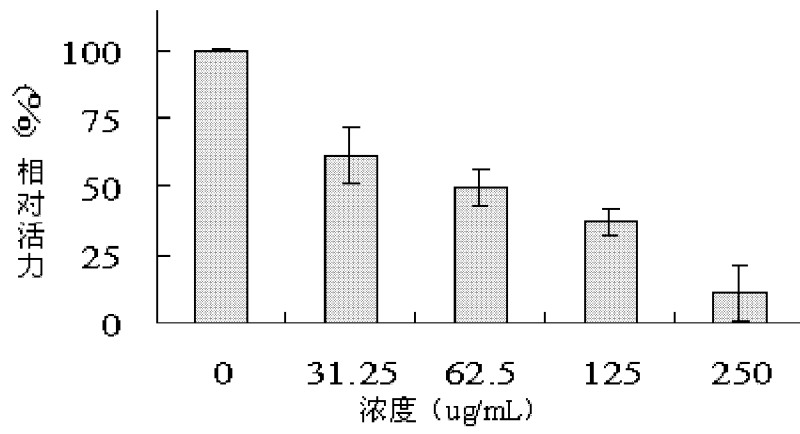


图 2