

鸡胚尿囊膜法评价板蓝根提取液 抗H₁N₁流感病毒活性作用

吴彦霖, 张媛, 刘倩, 贺庆, 罗剑, 高华

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要 为探讨板蓝根药材、板蓝根颗粒提取液及板蓝根活性组分对流感病毒活性的影响作用,应用鸡胚尿囊膜法评价了板蓝根药材及板蓝根颗粒提取液对流感病毒的预防、治疗和病毒中和作用;评价了板蓝根活性组分对流感病毒的中和应用。研究结果表明,板蓝根药材、板蓝根颗粒提取液及板蓝根活性组分对流感病毒活性具有良好的抑制作用。板蓝根药材提取液对流感病毒具有预防和中和病毒的作用,板蓝根颗粒提取液和板蓝根活性组分具有中和流感病毒的作用。

关键词 板蓝根;板蓝根颗粒;活性组分;抗病毒;流感病毒;鸡胚法

流感病毒每年造成死亡人数达25万~50万。针对该病毒,世界卫生组织(WHO)的推荐药物为奥司他韦(oseltamivir)和扎那米韦(zanamivir),均为神经氨酸酶抑制剂(neuraminidase inhibitors, NAIs)^[1]。构成流感病毒遗传基因的核糖核酸极易变异,因此复方多靶点多作用机制的中成药相比单靶点的化药在抗病毒,特别是易于产生突变的流感病毒的治疗方面表现了较强的优势^[2-6]。

板蓝根为十字花科植物菘蓝属 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,是常用中药材,具有清热解毒、凉血利咽的功效。板蓝根及相关制剂的临床疗效表现其具有良好的抗病毒作用,是治疗流行性感冒的首选中药之一^[4-9]。2010年版和2015年版《中国药典》(一部)收录的板蓝根相关单方制剂包括板蓝根饮片、板蓝根茶和板蓝根颗粒^[10,11],其中板蓝根颗粒是临床使用最为方便、占市场份额较大的品种。板蓝根质量控制是该研究领域的难点和热点,现行的中药质量标准主要参考化药模式,如板蓝根药材品种项下的鉴别项目中仅为氨基酸鉴定,其含量测定为指标成分(R, S)-告依春测定;板蓝根颗粒品种项下只有鉴别项目,并无含量测定项目^[10,11],仅通过化学成分鉴定难以反映其有效性和安全性。

实验采用鸡胚尿囊膜法^[12-15]评价板蓝根药材和板蓝根颗粒^[16](有糖型、无糖型)提取液,以及板蓝根药材提取液经大孔吸附树脂分离的活性组分对流感病毒活性的影响作用^[17-23]。拟从生物活性测定法角度对板蓝根进行质量研究。

1 实验材料

1.1 药物及试剂

奥司他韦:Roche,标准号 R0-64-0796/002,批号 BS10051049;奥司他韦酸:Toronto Research Chemicals Inc.,货号 O700980,批号 8-MDB-126-2;盐酸金刚烷胺:中国食品药品检定研究院,批号 100426-201002;(R,S)-告依春对照品:中国食品药品检定研究院,批号 111753-201304;氯化钠注射液:石家庄四药有限公司,批号 121030404;磷酸盐缓冲溶液(PBS):天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,批号 20130801-0011;AB-8大孔树脂:天津南开大学树脂有限公司,批号 131009;板蓝根药材提取液:香雪制药,批号 201208047;板蓝根颗粒:北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 1112893;板蓝根颗粒(无糖型):北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 12110265。

1.2 流感病毒

株名 A/California/7/2009(H1N1)NYMC X-179A,上海生物制品研究所有限责任公司,批号 FEWSY201301。

1.3 实验动物

10日龄 SPF 级别鸡胚、鸡血购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司 SPF 禽类单元,SCXK(京):2009-0003;SCXK(京):2014-0002。

收稿日期:2016-01-20;修回日期:2016-07-06

基金项目:国家自然科学基金项目(81303194);国家药典委员会国家药品标准提高研究项目(670);中国食品药品检定研究院中青年研究发展基金项目(2012A12)

作者简介:吴彦霖,助理研究员,研究方向为药检药理,电子信箱:wyljoe@126.com;高华(通信作者),研究员,研究方向为药检药理,电子信箱:huag55@163.com

引用格式:吴彦霖,张媛,刘倩,等.鸡胚尿囊膜法评价板蓝根提取液抗H₁N₁流感病毒活性作用[J].科技导报,2016,34(13):78-82;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2016.13.012

2 实验方法

2.1 样品制备

2.1.1 板蓝根药材提取液制备

参考《中国药典》2010年版和2015年版一部品种项下的制备方法^[10,11],净选板蓝根药材,粉碎,加水煎煮2次,第一次2 h,第二次1 h,煎液过滤,合并滤液,浓缩至相对密度1.20(50℃),加乙醇使含醇量达60%,静置过夜,取上清液,浓缩至相对密度1.30~1.33,质量浓度以生药量计为5.2 g·mL⁻¹。

2.1.2 板蓝根颗粒提取液制备

板蓝根颗粒中的辅料成分为糊精和蔗糖,利用糊精和蔗糖分别不溶于和微溶于乙醇的特性,将研磨后药物粉末与乙醇混合(混合比为1 g:10 mL),室温超声60 min,经滤纸过滤后,取上清液,将滤渣进行二次超声,合并2次滤液,90℃水浴蒸干至恒定。用氯化钠注射液溶解,质量浓度以生药量计为1.0 g·mL⁻¹,0.45 μm微孔滤膜过滤。

2.1.3 板蓝根药材提取液不同活性部位制备

将处理好的大孔树脂装于层析柱,用5个柱体积的(其中1个树脂床体积为1 BV)纯化水平衡,取板蓝根药材提取液(稀释成生药量为2.0 g·mL⁻¹的溶液)按照1:10(体积比)加入层析柱,吸附6 h,以纯化水快速冲洗,弃去水洗液,收集5 BV的洗脱部位;以50%乙醇洗脱,收集5 BV的洗脱部位;以乙醇洗脱,收集5 BV的洗脱部位。将上述溶液分别置90℃水浴蒸干至恒定,水洗脱部位用A标记;50%乙醇洗脱部位用B标记;95%乙醇洗脱部位用C标记。A用氯化钠注射液溶解,B、C用DMSO溶解,后用氯化钠注射液稀释(DMSO体积比5%),0.22 μm微孔滤膜过滤,A质量浓度以生药量计为2.0 g·mL⁻¹,B、C质量浓度以生药量计为1.0 g·mL⁻¹。

2.1.4 分组

将鸡胚分成假手术对照组、病毒模型组、阳性药组(金刚烷胺、奥司他韦、奥司他韦酸)和给药组(以生药量计,板蓝根药材提取液:0.25、0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹;有糖型及无糖型板蓝根颗粒提取液:0.25、0.5、1.0 g·mL⁻¹;板蓝根药材提取液活性组分A:0.25、0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹,B和C:0.25、0.5、1.0 g·mL⁻¹)。

2.2 鸡胚法

2.2.1 药物对鸡胚的毒性评价

中药板蓝根药材及颗粒提取物成分复杂,对鸡胚增殖和存活具有潜在影响作用,为更好地评价药物作用,排除干扰,以鸡胚存活实验对药物最大无毒剂量进行考查。将板蓝根药材提取液用氯化钠注射液配制成生药量0.2、1.0、2.6、5.2 g·mL⁻¹,板蓝根颗粒提取液生药量0.2、0.5、1.0 g·mL⁻¹,分别接种于10日龄SPF鸡胚尿囊腔,每只鸡胚注射0.2 mL,假手术组注射同等剂量的氯化钠注射液,每组10只。35℃孵育96 h,每天观察鸡胚,记录死活只数,以鸡胚可存活96 h的最大质量浓度作为供试品的无毒剂量^[13]。

2.2.2 抗流感病毒类供试品对流感病毒的抑制作用

每组鸡胚数为10只,每只鸡胚接种病毒0.1 mL,病毒量

为20 EID₅₀·胚⁻¹,板蓝根药材提取液生药量为0.25、0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹,板蓝根颗粒提取液生药量为0.25、0.5、1.0 g·mL⁻¹,给药体积为0.2 mL。阳性对照为金刚烷胺、奥司他韦及奥司他韦酸,药物质量浓度5.0 g·mL⁻¹,给药体积为0.2 mL。预防作用:将药物预先注入每只鸡胚,2 h后接种病毒;治疗作用:将病毒预先接种每只鸡胚,2 h后注入药物;中和作用:药物与病毒按体积比2:1混合,室温孵育30 min,取混合液接种鸡胚,35℃作用48 h后,取尿囊液。金刚烷胺的注射位点为卵黄囊注射,其余均为尿囊腔注射^[13]。板蓝根活性部位参照板蓝根制剂采用中和作用给药方式,A的生药量浓度为0.25、0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹;B和C的生药量浓度为0.25、0.5、1.0 g·mL⁻¹。

判定供试品对流感病毒的抑制作用的标准为:该组鸡胚尿囊液是否具有凝集0.6%鸡红细胞的能力。

2.2.3 0.6%鸡红细胞混悬液配制

取新鲜来亨鸡鸡血,加入适宜的抗凝剂(4.0%质量浓度的抗凝剂:血液为1:16),用PBS洗涤3次,2000 r/min,每次5 min,去除上清及白细胞薄膜。最后用PBS配成0.6%鸡红细胞混悬液备用^[13]。

2.2.4 鸡红细胞吸附实验

取待测尿囊液加入U型板,用PBS进行稀释,按1:2的稀释比例,每孔50 μL,设PBS为阴性对照,加入等体积新鲜配制的0.6%鸡红细胞混悬液,置于室温观察,以阴性孔内红细胞完全沉降为观察的终止点,观察鸡红细胞凝集现象,以1:16孔为最终判断结果。

3 实验结果

3.1 药物对鸡胚的毒性

鸡胚孵育96 h后,板蓝根药材提取液剂量为5.2 g·mL⁻¹时,鸡胚死亡2只,存活的鸡胚活动能力低于假手术组,且解剖时发现该组存活鸡胚的体重平均值低于假手术组。因此,板蓝根药材提取液的鸡胚无毒剂量为2.6 g·mL⁻¹;板蓝根颗粒提取液的鸡胚无毒剂量为1.0 g·mL⁻¹,在该剂量下可进行后续实验。

3.2 预防作用

板蓝根药材提取液的生药量质量浓度为0.25、0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹时,每组均有抑制流感病毒活性的能力,如表1所示。经研究发现,板蓝根颗粒的提取液无预防作用(数据未列出)。金刚烷胺对流感病毒的抗病毒有效率低于80%,因此选用奥司他韦和奥司他韦酸作为阳性药物。奥司他韦是WHO推荐使用的抗流感病毒药物,经临床数据证明该药具有良好的抗甲型及乙型流感病毒的作用。奥司他韦在体内经肝、肠酯酶转化为代谢产物奥司他韦酸。奥司他韦酸自身含有体积较大的烷基,可与神经氨酸(nueraminidase, NA)酶活性口袋中的疏水区相结合,阻断NA酶与细胞膜唾液酸的结合,从而发挥NA酶活抑制的作用。鸡胚法属于半体内实

验,具有将奥司他韦代谢为奥司他韦酸的能力,因此在鸡胚法中可以用奥司他韦作为阳性药物。

表1 预防给药方式评价板蓝根药材提取液的抗病毒作用(n=10)

Table 1 Antiviral effect of *Radix Isatidis* extract by prevention (n=10)

组别	存活数	有效数	抗病毒有效率/%
假手术对照组	10	—	—
病毒模型组	10	—	—
板蓝根 药材 提取液组	0.25 g·mL ⁻¹	10	5
	0.5 g·mL ⁻¹	10	7
	1.0 g·mL ⁻¹	10	10
	2.0 g·mL ⁻¹	10	10
金刚烷胺组	9	7	78
奥司他韦组	10	10	100
奥司他韦酸组	10	10	100

3.3 治疗作用

板蓝根药材及板蓝根颗粒提取液预先接种至鸡胚,再接种药物,结果表明所取的尿囊液均呈现鸡红细胞凝集现象,提示上述样品不具有抑制流感病毒的能力,均无流感病毒治

疗作用(结果未给出)。

3.4 中和作用

板蓝根药材提取液的质量浓度以生药量计为0.25、0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹时,每组均有抑制流感病毒活性的能力,如表2所示。板蓝根颗粒提取液的生药量质量浓度为0.25、0.5、1.0 g·mL⁻¹时,每组均有抑制流感病毒活性的能力,如表3所示。确定中和作用的研究方法为适合板蓝根药材提取液及板蓝根颗粒提取液抗流感病毒活性的研究方法。

表2 中和作用给药方式评价板蓝根药材提取液的抗病毒作用(n=10)

Table 2 Antiviral effect of *Radix Isatidis* extract by neutralizing (n=10)

组别	存活数	有效数	抗病毒有效率/%
假手术对照组	10	—	—
病毒模型组	10	—	—
板蓝根 药材 提取液组	0.25 g·mL ⁻¹	10	7
	0.5 g·mL ⁻¹	10	10
	1.0 g·mL ⁻¹	10	10
	2.0 g·mL ⁻¹	10	10
金刚烷胺组	9	7	78
奥司他韦组	10	10	100
奥司他韦酸组	10	10	100

表3 中和作用给药方式评价板蓝根颗粒提取液的抗病毒作用(n=10)

Table 3 Antiviral effect of *Radix Isatidis* granula extract by neutralizing (n=10)

组别	有糖型			无糖型		
	存活数	有效数	抗病毒有效率/%	存活数	有效数	抗病毒有效率/%
假手术对照组	10	—	—	10	—	—
病毒模型组	10	—	—	10	—	—
板蓝根 颗粒 提取液组	0.25 g·mL ⁻¹	10	3	10	4	40
	0.5 g·mL ⁻¹	10	8	80	10	5
	1.0 g·mL ⁻¹	10	10	100	10	10
奥司他韦	10	10	100	10	10	100
奥司他韦酸	10	10	100	10	10	100

对板蓝根药材提取液经大孔树脂AB-8分离后的组分A、B、C进行抗病毒活性研究,A的生药量浓度为0.25、0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹,B、C的生药量质量浓度为0.25、0.5、1.0 g·mL⁻¹时,A的1.0、2.0 g·mL⁻¹剂量组有抑制流感病毒的能力,B和C的每组均有抑制流感病毒活性的能力,如表4所示。

4 讨论

中药板蓝根属多组分多作用机制的广谱抗病毒性和细菌性感染疾病治疗中药,成份复杂,药效成分不明确,通过某一个或几个指标成分的测定难以代表其总体生物活性。现

有单一的体外方法(红细胞凝集实验^[24])、NA酶活力测定法^[25]),通过板蓝根抗病毒的某一环节进行评价,不能整体、全面地评价板蓝根的功效。本实验采用经典抗病毒方法——鸡胚尿囊膜法评价板蓝根的抗流感病毒作用,借助病毒能在鸡胚尿囊膜内繁殖的特点给予药物阻断,从而建立清热解毒类中药抗流感病毒的评价方法,为清热解毒类中药的生物活性研究方法研究提供思路。

通过鸡胚尿囊膜法评价了板蓝根药材提取液和板蓝根颗粒提取液的抗病毒活性,半体内实验结果表明板蓝根具有良好的抗流感病毒作用,二者的抗H₁N₁流感病毒作用能力相

表 4 中和作用给药方式评价板蓝根药材提取液活性组分的抗病毒作用($n=10$)

Table 4 Antiviral effect of *Radix Isatidis* extract active components by neutralizing ($n=10$)

组别	存活数	有效数	抗病毒有效率%
假手术对照组	10	—	—
病毒模型组	10	—	—
5%DMSO 溶媒对照	10	—	—
A	0.25 g·mL ⁻¹	0	0
	0.5 g·mL ⁻¹	2	20
	1.0 g·mL ⁻¹	6	60
	2.0 g·mL ⁻¹	10	100
	0.25 g·mL ⁻¹	10	5
B	0.5 g·mL ⁻¹	10	100
	1.0 g·mL ⁻¹	10	100
	0.25 g·mL ⁻¹	10	8
C	0.5 g·mL ⁻¹	10	100
	1.0 g·mL ⁻¹	10	100
奥司他韦	10	10	100
奥司他韦酸	10	10	100

当,但抗病毒途径有差异,板蓝根药材提取液同时具有预防中和和两种抗病毒途径,但本次实验所使用的板蓝根颗粒仅具有中和流感病毒作用。提示可以通过指纹图谱法比较二者的组分差异筛选出板蓝根具预防作用的有效组分。但是,当预先接种流感病毒后,板蓝根药材及颗粒提取液均无抗流感病毒能力。提示板蓝根的潜在作用机制是:1)有效占据了鸡胚尿囊膜腔上皮细胞膜蛋白上的流感病毒结合位点,使病毒无法侵入;2)与流感病毒外膜蛋白进行结合,阻断流感病毒的侵染过程,从而发挥抗病毒作用。通过大孔树脂分离技术对板蓝根药材提取液进行粗分,根据极性获取3部分洗脱部位,即水洗脱A、醇-水洗脱B、醇洗脱C。A、B和C均具有抑制流感病毒活性的能力,提示板蓝根药材提取液抑制流感病毒作用机制为:多活性组分、多作用靶点。该结论可为板蓝根体外抗病毒实验方法的建立提供数据支持,为同类抗病毒中药的机制研究提供思路。

5 结论

通过鸡胚尿囊膜法系统评价了板蓝根拮抗流感病毒作用的活性,实验结果表明板蓝根具有良好的抗流感病毒作用,板蓝根药材和板蓝根颗粒抗病毒途径有差异,板蓝根药材提取液同时具有预防和中和两种抗病毒途径,但本次实验所使用的板蓝根颗粒仅具有中和流感病毒作用。通过鸡胚尿囊膜法评价了板蓝根药材提取液经大孔树脂分离后的组分拮抗流感病毒作用的活性,结果表明在生药量计为1.0 g·

mL⁻¹时,上述A、B和C组分均有活性。

参考文献(References)

- [1] Lindegårdh N, Hien T T, Farrar J, et al. A simple and rapid liquid chromatographic assay for evaluation of potentially counterfeit Tamiflu® [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 42(4): 430-433.
- [2] 胡楠楠, 王雪峰, 王子, 等. 银翘散精简方、玉屏风散提取物在鸡胚中抗甲型流感病毒FM1株阻断与抑制作用研究[J]. 中国中西医结合儿科学, 2013, 5(6): 514-517.
Hu Nannan, Wang Xuefeng, Wang Zi, et al. Study on the blocking and inhibition effect of streamlined formula of Yinqiao powder and Yupingfeng powder extract on influenza-A FM1 strains in chicken embryo[J]. Chinese Pediatrics of Integrated Traditional and Western Medicine, 2013, 5(6): 514-517.
- [3] 王雪, 杨巧丽, 史玉柱, 等. 中药抗流感病毒作用及机制的研究概况[J]. 中国医药导报, 2012, 9(33): 27-29.
Wang Xue, Yang Qiaoli, Shi Yuzhu, et al. Research progresses of Chinese herbs on anti-influenza virus[J]. China Medical Herald, 2012, 9(33): 27-29.
- [4] 杨海霞, 李晓眠. 板蓝根提取液体内抗流感病毒作用的研究[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(1): 19-22.
Yang Haixia, Li Xiaomian. Effect of extractive of *Radix Isatidis* on influenza virus[J]. Journal of Tianjin Medical University, 2007, 13(1): 19-22.
- [5] 杜德安. 白云山板蓝根具有多靶点抗病毒作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(5): 76.
Du Dean. Antiviral activity of Baiyunshan *Radix Isatidis* with multiple targets[J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2011, 18(5): 76.
- [6] 秦华珍, 时博, 李世阳, 等. 南板蓝根和北板蓝根抗甲型流感病毒作用的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 29(1): 168-169.
Qin Huazhen, Shi Bo, Li Shiyang, et al. Comparing research in antiviral action of *Rhizoma et Radix Baphicacanthis Cusiae* and *Radix Isatidis* against influenza A viruses[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2009, 29(1): 168-169.
- [7] 程妍, 李祥, 陈建伟, 等. 板蓝根有效部位的抗病毒药效研究[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(2): 155.
Cheng Yan, Li Xiang, Chen Jianwei, et al. A study on antiviral effects of the active parts from *Radix Isatidis*[J]. Journal of Nanjing of TCM University, 2011, 27(2): 155.
- [8] 杨子峰, 王玉涛, 秦笙, 等. 板蓝根水提物S-03体外抑制甲、乙型流感病毒感染的实验研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(3): 218-223.
Yang Zifeng, Wang Yutao, Qin Sheng, et al. The effects of a hot water soluble extract (S-03) isolated from isatis indigotica root on influenza A and B viruses *in vitro*[J]. Chinese Journal of Virology, 2011, 27(3): 218-223.
- [9] 陈素珍, 李瑾翡, 曾秋敏, 等. 板蓝根提取液抗病毒活性的生物评价方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(2): 198-201.
Chen Suzhen, Li Jinfei, Zeng Qiumin, et al. Bioassay method for determination of antiviral activity of *Radix Isatidis* Extract[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2015, 26(2): 198-201.
- [10] 国家药典委员会. 中国药典: 2010年版: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
The Chinese Pharmacopoeia Commission. China Pharmacopoeia 2010:

- Vol I[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010.
- [11] 国家药典委员会. 中国药典: 2015年版: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
The Chinese Pharmacopoeia Commission. China Pharmacopoeia 2015: Vol I[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [12] 杨怡妹, 刘电力, 叶宏, 等. 抗病毒1号中药在鸡胚中对流感病毒的抑制作用[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2000, 34(5): 329-331.
Yang Yishu, Liu Dianli, Ye Hong, et al. Anti-influenza effect of a Chinese medicinal herb-No.1 in chick embryo culture[J]. Journal of Harbin Medical University, 2000, 34(5): 329-331.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
Chen Qi. Pharmacology research methodology of TCM[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- [14] 陈智伟, 吴灵威, 刘树滔, 等. 毛细管电泳法研究板蓝根水提物抗流感病毒的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1715-1719.
Chen Zhiwei, Wu Lingwei, Liu Shutao, et al. Mechanism study of anti-influenza effects of *Radix Isatidis* water extract by red blood cells capillary electrophoresis [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006, 31(20): 1715-1719.
- [15] 王玉涛, 杨子峰, 招穗珊, 等. 板蓝根抗甲1型流感病毒活性物质的初筛研究[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(4): 419-422.
Wang Yutao, Yang Zishan, Zhao Huishan, et al. Screening of anti-H1N1 active constituents from *Radix Isatidis*[J]. Journal of Guangzhou University of TCM, 2011, 28(4): 419-422.
- [16] 唐慧英, 鄢丹, 张少锋, 等. 基于凝集活性检测的板蓝根颗粒质量生物测定方法研究[J]. 药学报, 2010, 45(4): 479-483.
Tang Huiying, Yan Dan, Zhang Shaofeng, et al. Agglutinated activity bioassay method for the determination of antiviral potency of Banlangen granula[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2010, 45(4): 479-483.
- [17] 潘以琳, 李进, 李祥, 等. D101大孔树脂富集纯化板蓝根木脂素活性部位的工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26: 579-582.
Pan Yilin, Li Jin, Li Xiang, et al. Enrichment and purification of lignans from *Radix Isatidis* by D101 macroporous resin[J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26: 579-582.
- [18] 年四辉, 刘丽敏, 喻丽珍, 等. 大孔吸附树脂富集板蓝根中(R,S)-告依春工艺研究[J]. 离子交换与吸附, 2012, 28(4): 361-368.
Nian Sihui, Liu Limin, Yu Lizhen, et al. Enrichment technology of (R, S)- Epigotrin from *Radix Isatidis* by macroporous resin[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2012, 28(4): 361-368.
- [19] 宋丹, 张永文. 试谈中药提取工艺中使用大孔吸附树脂纯化的研究要求与评价[J]. 离子交换与吸附, 2015, 24(7): 745-749.
Song Dan, Zhang Yongwen. Requirement and evaluation of studies on using macroporous adsorption resin for further purification of extracts from Chinese herbal medicines[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2015, 24(7): 745-749.
- [20] 何立巍, 吴晓培, 杨婧妍, 等. 板蓝根总生物碱的提取纯化工艺及其抗病毒药理作用研究[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2611-2614.
He Liwei, Wu Xiaopei, Yang Jingyan, et al. Study on the process and antiviral effect and purification of total alkaloids from *Radix Isatidis* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2014, 36(12): 2611-2614.
- [21] 孙东东, 严世海, 陈建伟, 等. 板蓝根有效组分的抗病毒活性研究[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(1): 53-55.
Sun Dongdong, Yan Shihai, Chen Jianwei, et al. Research on antiviral effects of the active components of *Radix Isatidis*[J]. Journal of Nanjing University of TCM, 2013, 29(1): 53-55.
- [22] 陈凯, 窦月, 孟凡刚, 等. 板蓝根抗炎作用有效部位初步筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 200-204.
Chen Kai, Dou Yue, Meng Fangang, et al. Preliminary screening of anti-inflammatory fraction of *Isatidis Radix*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(6): 200-204.
- [23] 王晓良, 陈明华, 王芳, 等. 板蓝根水提取物的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1172-1182.
Wang Xiaoliang, Chen Minghua, Wang Fang, et al. Chemical constituents from root of *Isatis indigotica*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38: 1172-1182.
- [24] 李寒冰, 鄢丹, 武彦舒, 等. 基于抗病毒活性检测的板蓝根质量生物评价方法及优化研究[J]. 中草药, 2011, 42(8): 1560-1565.
Li Hanbing, Yan Dan, Wu Yanshu, et al. Bio-evaluation methods and optimization for *Isatidis Radix* quality control based on antiviral activity detection[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(8): 1560-1565.
- [25] 李寒冰, 鄢丹, 金城, 等. 基于化学荧光测定的板蓝根抗病毒效价检测方法的建立[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4): 908-911.
Li Hanbing, Yan Dan, Jin Cheng, et al. Establishment of bioassay method for antiviral potency of *Radix Isatidis* based on chemical fluorometric determination[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(4): 908-911.

Evaluation of *Radix Isatidis* against H₁N₁ influenza virus by using chicken embryo

WU Yanlin, ZHANG Yuan, LIU Qian, HE Qing, LUO Jian, GAO Hua

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract To study the affection of the H₁N₁ influenza virus activity by extract of *Radix Isatidis* herbs, *Radix Isatidis* granula and *Radix Isatidis* herbs active component. The chicken embryo was used for assaying the antiviral activities of *Radix isatidis* herbs and granula extracts as well as *Radix isatidis* herbs active component, by prevention, treatment, and virus neutralization. *Radix isatidis* herbs and granula extract had good inhibition on influenza virus activity. *Radix isatidis* herbs extract has the effect of prevention and neutralize against influenza virus; *Radix isatidis* granula extract and *Radix isatidis* herbs active component has the effect of neutralizing against influenza virus.

Keywords *Radix isatidis*; *Radix isatidis* granula; active component; antiviral; influenza virus; chicken embryo

(编辑 田恬)