



评述

抗流感病毒中药及抗埃博拉病毒活性化合物的发现策略

邱峰^①, 张晗^①, 刘叔文^②, 张伯礼^{①*}^① 天津中医药大学天津市现代中药重点实验室, 天津 300193;^② 南方医科大学药学院, 广州 510515

* 联系人, E-mail: zhangbolipr@163.com

收稿日期: 2014-09-06; 接受日期: 2014-12-29

doi: 10.1360/N052014-00337

摘要 2014 年在非洲爆发流行的埃博拉病毒严重威胁人类健康和生命安全, 迄今尚未有治疗药物, 目前国内外许多医药机构尝试从不同视角发现抗埃博拉病毒的有效药物. 本文在对抗流感病毒中药及活性成分进行回顾的基础上提出了抗埃博拉病毒活性化合物的发现策略, 为从中药中发现抗埃博拉病毒有效物质提供借鉴和参考.

关键词
中药
流感病毒
埃博拉病毒
药物发现

中药治疗病毒类疾病已有数千年历史, 在抗流感病毒方面有其独特优点, 不良反应相对较低, 不易形成耐药性. 目前有许多单味中药和复方药物应用于临床, 能够清热解毒、消炎镇痛、免疫调节、抑制病毒感染复制、阻止病毒致细胞病变, 并通过多个靶点、多种途径发挥疗效, 在预防和治疗各种流感疾病中发挥着极其重要的作用, 特别是针对流感病毒的基因型变异或病毒间基因重配所导致的强致病性流感病毒, 更具有广谱抑杀的优势. 从 20 世纪 70 年代起, 我国科研工作者筛选出一批对流感病毒有明显抑制作用的中药, 如板蓝根、大青叶、鱼腥草、穿心莲、金银花、黄芩、黄芪、甘草、野菊花等, 并先后对其作用机制及活性成分进行研究, 从中发现了绿原酸、黄芩苷、穿心莲内酯、茶多酚、金丝桃素、甘草酸、牛蒡子苷元、莪术挥发油、黄芪多糖等抗流感病毒有效成分, 基于有效单味中药及复方制剂, 现已

开发成系列抗流感病毒药物, 并具有良好的市场需求.

埃博拉病毒是一种十分罕见的病毒, 1976 年在苏丹南部埃博拉河地区发现它的存在后, 引起医学界的广泛关注和重视, 近 40 年在非洲国家多次爆发流行. 2014 年 4 月起, 该病毒肆虐几内亚、利比里亚、塞拉利昂等西非国家, 蔓延速度惊人. 截至 2014 年 10 月 22 日, 全世界感染人数达 9911 人, 死亡人数 4868 人^[1]. 尽管科学家在发现埃博拉病毒防治药物方面取得了一些进展, 例如, 美国陆军传染病医学研究所和加拿大公共卫生署联合研发的单克隆抗体类药物 Z-Mapp^[2], 加拿大 Tekmira 生物制药公司研制的 RNA 干扰治疗剂 TKM-Ebola^[3], BioCryst 制药公司研制的 RNA 依赖型 RNA 聚合酶抑制剂 BCX4430^[4]等, 但这些药物在人体上是否能达到预期治疗效果尚无确切结论.

引用格式: 邱峰, 张晗, 刘叔文, 等. 抗流感病毒中药及抗埃博拉病毒活性化合物的发现策略. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 247–255

Qiu F, Zhang H, Liu S W, et al. Anti-influenza Chinese herbal medicines and a proposed strategy to search for their active constituents against Ebola virus. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 247–255, doi: 10.1360/N052014-00337

本文基于文献调研, 对抗流感病毒中药及活性成分进行了回顾, 根据埃博拉病毒与常见的流感病毒同属于 RNA 病毒, 两者感染过程和早期症状类似的特点, 提出了从抗流感病毒中药中发现抗埃博拉病毒活性物质的策略. 由于在埃博拉病毒生物学基础研究方面还处在进展中, 病毒的感染机制有待进一步明确, 因此本文提出的发现策略仅供本领域科研人员参考.

1 抗流感病毒中药复方

1.1 连花清瘟胶囊

连花清瘟胶囊主要由连翘、金银花、炙麻黄、绵马贯众、板蓝根、石膏、鱼腥草、炒苦杏仁、甘草等中药组成, 具有清瘟解毒、宣肺泄热功效. 体外实验显示, 连花清瘟胶囊具有多环节抗甲型流感病毒作用, 包括降低病毒感染能力、抑制病毒吸附和吸附后的复制增殖, 并能直接杀伤病毒, 预防给药方式抗流感病毒的作用最强^[5]. 连花清瘟胶囊能够降低流感病毒 FM1 感染小鼠(*Mus musculus*)肺指数、改善肺炎症状并延长平均存活时间. 其作用机制主要是下调病毒感染小鼠肺组织内肿瘤坏死因子 TNF- α (tumor necrosis factor α)、白介素 IL-6(interleukin-6)、IL-1 β 等促炎性因子的表达, 平衡机体免疫状态, 减轻流感病毒引起的肺部炎症损伤^[6]. 同时, 连花清瘟胶囊能够改善流感病毒感染小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD₄⁺和 CD₄⁺/CD₈⁺的下降, 提高小鼠肺组织中 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)含量, 提示该药可能通过调节机体免疫功能从而增强 CTL(cytotoxic T lymphocyte), NK(natural killer)杀伤活性及单核巨噬细胞抗病毒能力而发挥抗流感病毒作用^[7].

1.2 双黄连制剂

双黄连制剂主要由金银花、黄芩和连翘等中药组成, 包括双黄连粉针剂、双黄连注射液、双黄连口服液、双黄连胶囊等, 具有辛凉解表、清热解毒功效. 双黄连制剂具有广谱抗病毒作用, 特别是抗呼吸道病毒、疱疹病毒和肠道病毒效果显著^[8]. 体外细胞实验表明, 双黄连抑制流感病毒诱导的细胞凋亡、降低细胞凋亡的百分率, 提示双黄连制剂抗病毒作用机制不仅包括直接灭活病毒, 而且能够抑制流感病毒诱导的组织细胞凋亡, 起保护细胞作用^[9].

1.3 银翘解毒类制剂

银翘解毒类制剂原方来源于吴鞠通《温病条辨》中的银翘散, 主要由金银花、连翘、薄荷、桔梗、荆芥、淡豆豉等药物组成, 具有辛凉解表、清热解毒功效. 银翘散及其软胶囊制剂能够降低小鼠肺组织流感病毒的病毒载量, 提高流感病毒感染小鼠肺组织中 IFN- γ 含量和 HSP70(heat shock protein 70)蛋白表达, 下调流感病毒 M1(matrix protein 1)蛋白表达, 起到抑制流感病毒复制和感染的作用^[10,11]. 银翘解毒口服液能够抑制流感病毒感染 SCID(severe combined immunodeficiency)小鼠血清中 TNF- α 的分泌, 同时促进 TGF- β 1(transforming growth factor- β 1)的分泌, 使病毒感染小鼠能够维持免疫系统平衡, 纠正病毒造成的免疫偏离现象^[12].

1.4 疏风解毒胶囊

疏风解毒胶囊主要由虎杖、连翘、板蓝根、柴胡、败酱草、芦根等药物组成, 具有疏风清热、解毒利咽功效. 疏风解毒胶囊改善流感病毒 FM1 和 PR8 感染小鼠的肺部炎症, 降低病毒感染小鼠的肺指数和感染动物死亡率, 延长评价存活天数, 显示出对病毒性感冒具有较好的治疗和预防作用^[13].

2 抗流感病毒的单味中药

2.1 板蓝根

研究表明, 板蓝根水提物的主要成分为多糖和呋喃类衍生物, 对不同亚型的流感病毒均有一定抑制作用. 用丙酮脱脂法提取板蓝根生药的凝集素, 分别测定各样品的血凝活性, 并用 45.3 mg/mL 的样品对流感病毒进行了体外抑制实验, 板蓝根凝集素可直接杀灭流感病毒, 具有显著的预防作用及治疗作用^[14]. 实验结果还表明, 抑制流感病毒效果的好坏与板蓝根凝集素血凝活性的高低相关^[15]. Yamada^[16]认为, 板蓝根抗病毒成分包括糖蛋白和多糖.

2.2 鱼腥草

鱼腥草挥发油的主要成分甲基正壬酮、月桂醛和癸醛, 可直接抑制流感病毒活性且无细胞毒性^[17]. 除挥发油外, 鱼腥草中的黄酮类成分 also 具有良好的抗病毒活性: 100 μ g/mL 槲皮素-3-鼠李糖苷可有效抑制

甲型流感病毒的复制^[18]. 采用鸡胚接种和血凝实验测定鱼腥草颗粒对甲型流感病毒的效价, 结果表明, 0.5 mg/mL 药物直接灭活病毒作用和抑制病毒在鸡胚内增殖作用的效价分别为 13.65 和 19.42 ($P<0.01$), 证实鱼腥草颗粒对甲型流感病毒有直接灭活作用, 并且能抑制病毒在鸡胚内的增殖^[19].

2.3 穿心莲

中药穿心莲的主要化学成分是半日花烷型二萜内酯类, 其中穿心莲内酯为其抗病毒的有效成分. 研究表明, 穿心莲内酯抗 H5N1 和 H9N2 流感病毒的活性作用于入胞阶段^[20,21].

2.4 贯叶连翘

贯叶连翘提取物对流感病毒感染小鼠肺组织中 TNF- α , IFN- γ 等细胞因子的影响研究表明, 与模型对照组相比, 在贯叶连翘提取物(100, 50 mg/kg)灌胃组中, 流感病毒感染小鼠肺组织中 TNF- α 显著降低 ($P<0.05$), 而 IFN- γ 显著升高 ($P<0.01$)^[22].

2.5 黄芩

在病毒感染周期的早期, 黄芩中提取的黄酮类化合物通过抑制病毒与核内体/溶酶体膜的融合, 减少流感病毒的复制及释放^[23].

2.6 黄芪

体外细胞实验证实, 黄芪的 A6 组分(6.25~100 g/L)对流感病毒有明显抑制作用; 该组分除可直接抑制流感病毒外, 还可以发挥预防和治疗作用; 黄芪的 A6 组分在一定范围内对流感病毒的抑制作用呈现剂量依赖性^[24].

2.7 金银花

研究发现, 金银花的主要有效成分对呼吸道常见病毒(合胞病毒、柯萨奇 B 组 3 型病毒等)具有明显的抑制作用^[25]. 双花(金银花)喷雾剂体内抗病毒实验表明, 大(11.4 g kg⁻¹ 天⁻¹)、小(5.7 g kg⁻¹ 天⁻¹)剂量对小鼠流感病毒性肺炎均有效; 大剂量(11.4 g kg⁻¹ 天⁻¹)对小鼠肺内流感病毒增殖有显著抑制作用^[26].

2.8 北柴胡

北柴胡茎叶总黄酮 0.09 g/kg 剂量组对乙型流感

病毒感染小鼠具有明显保护作用 ($P<0.05$), 0.03 和 0.09 g/kg 剂量组能显著降低乙型流感病毒感染小鼠肺指数值 ($P<0.05$, $P<0.01$), 肺指数抑制率分别为 20.5% 和 25.4%; 组织病理学检查结果表明, 北柴胡茎叶总黄酮各剂量组与模型组比较, 肺部病变均明显减轻, 其中以高剂量组肺部总体病变程度最轻, 疗效最好^[27].

2.9 牛蒡子

牛蒡子苷元是牛蒡子中的直接有效成分. 采用 MDCK(Madin-Darby canine kidney)细胞培养法, 通过红细胞凝集实验, 以流感病毒血凝滴度为指标, 观察发现牛蒡子苷元在体外能直接抑制或灭活流感病毒. 牛蒡子提取物(10 mg/kg)给药治疗流感病毒感染小鼠, 能延长其生存时间、提高生存率, 表明牛蒡子具有抗流感病毒作用^[28].

2.10 甘草

甘草粗提物(20 mg/kg)能明显延长流感病毒感染小鼠的生存时间^[29]; 另有研究表明, 甘草抗病毒有效部位(GC3-1-4)抑制副流感病毒的半数有效浓度为 12.82 μ g/mL^[30].

2.11 麻黄

麻黄提取物(400 μ g/mL)可明显抑制流感病毒的增殖. 进一步研究表明, 其主要活性成分为鞣质类成分^[31].

2.12 石芥苳

石芥苳提取物(0.3~30.0 mg/mL)对甲型流感病毒的抑制活性与利巴韦林相当^[32].

2.13 蜂胶

小鼠流感病毒感染模型实验中, 蜂胶的提取物 AF-08 灌胃给药, 每日 3 次, 每次 10 mg/kg, 连续 7 日, 结果显示, AF-08 具有抗流感病毒活性和改善小鼠流感症状的功能^[33].

2.14 野菊花

体内外抗病毒实验表明, 野菊花水提物对甲型流感病毒有较好的抑制作用. 以病毒滴鼻感染小鼠进行体内实验, 结果表明, 野菊花水提物 0.34, 0.17,

0.085 g/kg 3 个剂量组口服给药均能有效降低流感病毒感染小鼠肺指数。与模型组比较, 肺指数抑制率分别达到 28.9%, 28.9%, 23.6%。野菊花水提取物 0.34 g/kg 能延长流感病毒感染小鼠平均生存时间, 降低死亡率。以 H1N1 感染 MDCK 细胞时, 野菊花水提取物在无毒的最大稀释浓度 18.28 $\mu\text{g/mL}$ 下可以完全抑制 H1N1 病毒^[34]。

2.15 大青叶

采用鸡胚法血凝实验考察大青叶对常见甲型流感病毒的抑制作用时, 发现大青叶对流感病毒表现出预防和治疗作用, 但不同药材样品抗病毒活性有明显差异^[35]。

2.16 羌活

采用流感病毒感染的小鼠肺炎模型的实验表明, 不同剂量羌活的超临界- CO_2 提取物对病毒导致的小鼠死亡均有很好的保护作用, 并能显著延长小鼠的平均存活时间, 高剂量羌活能直接杀灭小鼠肺内的流感病毒、降低血凝滴度, 改善由病毒导致的组织病理学变化^[36]。

2.17 射干

小鼠流感病毒性肺炎模型实验中, 射干高、低剂量组肺指数明显低于模型组, 高剂量组肺指数抑制率明显高于低剂量组, 并强于病毒唑。细胞培养抗病毒实验中, 射干对流感病毒有抑制作用^[37]。

2.18 红景天

红景天提取物 gossypetin 抑制神经氨酸酶(neuraminidase, NA) 活性的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为(0.8 $\pm$ 0.1) $\mu\text{mol/L}$, 抑制 H1N1 流感病毒复制的 IC_{50} 为(2.6 $\pm$ 1.1) $\mu\text{mol/L}$ ^[38]。

2.19 阿魏

Lee 等人^[39]从新疆特色草药阿魏中分离得到 30 种单体化合物, 其中有 9 种具有强效抗 H1N1 型流感病毒活性, IC_{50} 为 0.26~0.86 $\mu\text{g/mL}$, 强于金刚烷胺。

此外, 一枝蒿、吴茱萸、淫羊藿、绣球藤、肉桂等提取物的抗流感活性也有报道。

3 抗流感病毒中药的活性成分

3.1 多酚类

多酚类能够抑制 NA 活性, 抑制膜融合, 抑制病毒蛋白及 RNA 的合成, 并有可能直接作用于感染的早期阶段。这些化合物也能抑制病毒吸附^[40]。

(1) 茶叶中茶多酚通过抑制流感病毒的吸附作用来抗流感病毒^[41]。通过流感病毒 MDCK 细胞感染模型和小鼠感染模型评价茶多酚体内外的抗流感病毒效果的研究表明, 表没食子儿茶素没食子酸酯和表儿茶素没食子酸酯可以显著抑制病毒, 二者对 3 种不同亚型流感病毒感染的细胞均有保护作用, 半数有效浓度(half maximal effective concentration, EC_{50})分别为 0.04~0.11 和 0.05~0.07 mmol/L; 对 3 种不同亚型流感病毒 NA 活性抑制浓度 IC_{50} 分别为 0.03~0.14 和 0.34~0.69 mmol/L^[42]。

(2) 红花老鹤草的多酚复合物(100 $\mu\text{g/mL}$)可通过减少流感病毒感染细胞血凝素(hemagglutinin, HA)的表达和减少传染性病毒的产生, 来抑制 A/Rostock/34 病毒株的复制^[43]。

(3) 绿原酸能明显降低感染鼠肺适应株病毒 HA 的效价^[44]。

(4) 木瓜中的多酚类成分(50 mg/mL)可通过选择性抑制 NS2 蛋白的合成来抑制病毒增殖^[45]。

3.2 黄酮类

(1) 在甲型流感病毒感染小鼠中, 灌胃给药(芦丁 20, 200 mg/kg)进行体内实验, 以肺指数与肺指数抑制率为评价指标, 结果显示, 芦丁有明显的抗病毒作用, 肺指数抑制率分别为 13.6%和 27.3%^[46]。

(2) 北柴胡茎叶总黄酮是其药用主要有效成分, 包括槲皮素、异鼠李素、芦丁和水仙苷等, 实验证明, 茎叶总黄酮高剂量(0.09 g/kg)组的抗乙型流感病毒效果与利巴韦林胶囊组和抗病毒颗粒组相近^[27]。

(3) 芹菜素和木犀草素也显示较强的抗病毒活性, 其抗流感病毒(H3N2)的 IC_{50} 分别为 1.43 和 2.06 $\mu\text{g/mL}$ ^[47]。

(4) 黄芩茎叶的黄酮类活性部位可抑制流感病毒、副流感病毒的致细胞病变能力, 3 种剂量组(54.3, 108.5, 217.0 mg/kg)均可治疗流感病毒引起的小鼠肺炎, 217 mg/kg 剂量组对流感病毒感染导致小鼠死亡的保护率为 40%^[48]。黄芩苷对甲型流感病毒的神经

氨酸酶有抑制作用, 其 IC_{50} 为 $(49.60 \pm 1.07) \mu\text{g/mL}$ ^[49].

(5) Bill 等人^[50]通过 Direct Binding Assay, 确定了接骨木果中抗流感成分为黄酮类化合物, 其中化合物 1 抑制 H1N1 感染的 IC_{50} 为 $0.13 \mu\text{g/mL}$ ($0.36 \mu\text{mol/L}$), 活性与达菲的 IC_{50} ($0.32 \mu\text{mol/L}$) 相当.

3.3 挥发油

桂枝挥发油、石香薷挥发油、麻叶千里光挥发油、鱼腥草挥发油、莪术油等均有抗流感病毒作用, 其主要成分为单萜、倍半萜及脂肪酸等.

(1) 桂枝挥发油及其主要成分桂皮醛体外明显抑制甲型流感病毒的增殖, 抑制病毒在 MDCK 细胞中增殖的 IC_{50} 分别为 58.0×10^{-5} 和 $53.1 \times 10^{-5} \text{ mg/L}$, 与阳性对照药利巴韦林相近. 桂枝挥发油 0.174 mg/kg 和桂皮醛 0.132 mg/kg 灌胃给药, 对流感病毒株感染小鼠有较好的治疗作用^[51].

(2) 体外实验发现, 石香薷挥发油在浓度大于 4.9 mg/L 时能有效抑制流感病毒的致细胞病变作用; 浓度为 $50 \sim 500 \text{ mg/L}$ 时可使流感 A3 病毒血凝效价明显下降; 给药剂量在 $10 \mu\text{g}/(\text{g} \text{ 天})$ 以上时, 可治疗小鼠流感病毒性肺炎^[52].

(3) 何忠梅等人^[53]利用体外细胞病变效应法研究发现, 麻叶千里光挥发油能不同程度延缓流感病毒、副流感病毒的致细胞病变作用.

(4) 莪术油主要含有莪术醇、莪术二酮等. 其体外抗流感病毒 A/京防/0185 株的 IC_{50} 为 $(1.16 \pm 0.27) \text{ mg/L}$, 治疗指数 (therapeutic index, TI) 能达到 39.72 ± 5.65 . 体内实验表明, 高剂量莪术油溶液给药的动物体内, 治疗效果优于利巴韦林给药组^[54].

3.4 蒽醌类

(1) 流感病毒感染细胞前与浓度为 $1.56 \sim 25 \mu\text{g/mL}$ 的金丝桃素一起孵化后, 病毒丧失其感染性^[55]. 金丝桃素的 4 种给药方式在体外对感染禽流感病毒的细胞的保护率分别为 6.43%, 5.31%, 39.89%, 和 69.04%. 金丝桃素抑制禽流感病毒 NA 活性的 IC_{50} 为 0.58 mg/mL ^[56].

(2) 大黄蒽醌类化合物, 如朱砂七总蒽醌 ($1.0 \sim 4.0 \text{ mg/mL}$) 及朱砂七大黄素 ($2.0 \sim 4.0 \text{ mg/mL}$), 在体外对流感病毒株有直接灭活作用 ($P < 0.05$)^[57].

3.5 生物碱类

异喹啉类生物碱在体外通过减少细胞表面病毒糖蛋白 HA 和 NA 的表达、影响病毒诱导的细胞病变效应、以及减少病毒特异性蛋白的表达来抑制流感病毒增殖.

(1) 苦参碱类生物碱. 在鸡胚法血凝实验中, 苦参碱类生物碱对流感病毒的最小抑制浓度为 $1/1280 \text{ g/mL}$, 对副流感毒的最小抑制浓度为 $1/160 \text{ g/mL}$ ^[58].

(2) 鸭跖草总生物碱. 鸭跖草生物碱提取物在体外有明显抑制流感病毒作用, 其抑制作用与病毒唑无显著差异. 鸭跖草总生物碱可抑制流感病毒 A/PR/8/34(H1N1) 在 MDCK 细胞中的复制. 不同剂量 (8, 16, 32 mg/kg) 连续 6 天给流感病毒感染的小鼠口服, 给药组的存活率、平均生存时间、肺部病毒滴度和肺指数等多项指标都优于病毒对照组, 表明鸭跖草总生物碱可抑制甚至杀灭流感病毒, 从而减弱流感病毒对肺部组织的感染, 表现其治疗流感的作用^[59,60].

3.6 多糖

(1) 香菇多糖 ($1000 \sim 3000 \mu\text{g/mL}$) 对流感病毒具有预防作用, 能影响流感病毒吸附和穿入的某些环节, 使细胞得到一定保护, 但对流感病毒无直接杀伤作用. 香菇多糖的抗病毒作用机制可能在于其提高感染细胞免疫力, 增强细胞膜稳定性, 抑制细胞病变, 促进细胞修复等功能^[61].

(2) 黄芪多糖可能通过诱导干扰素、NK 细胞活性来抑制流感病毒增殖; 黄芪多糖溶液 ($100 \sim 200 \text{ g/L}$) 可明显抑制流感病毒引起的小白鼠肺炎实变, 抑制流感病毒增殖 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 给药后流感病毒感染的小鼠生存时间也得到延长^[62].

(3) 板蓝根多糖有直接抗病毒作用, 板蓝根多糖各组分有抑制流感病毒 H1N1, H5N1 神经氨酸酶的活性; 还可参与调节细胞的免疫功能, 促进抗流感病毒 IgG 抗体的生成, 促进小鼠非特异性免疫, 增强体液免疫功能, 从而提高小鼠抵抗流感病毒感染的能力^[63,64].

上述研究表明, 中药复方、单味中药以及中药中的活性成分, 能够通过杀灭病毒、抑制流感病毒吸附、感染和复制, 实现直接的抗病毒作用. 中药复方

还能够调节机体免疫系统(非特异性和特异性免疫),改善炎症反应,增强免疫功能,从而实现拮抗病毒的综合作用。特别是中药复方在改善机体整体状态、维持机体免疫动态平衡等方面具有独特优势,加之几千年临床应用经验,对病毒作用机体所引起的状态有详细描述和独特分类(卫气营血),并有相对应的治疗方药,认真地用现代科学方法进行评价、筛选,则有广阔的研发前景。

4 抗埃博拉病毒中药活性物质的发现策略

埃博拉病毒感染目前尚没有疗效确切的治疗药物,由于埃博拉病毒与流感病毒均属于 RNA 病毒,感染过程和早期症状也类似于流感^[65],因此,自2014 年埃博拉病毒在非洲爆发以来,科学家们寄希望于从抗流感病毒药物中发现防治埃博拉病毒的药物。从抗流感病毒中药中发现抗埃博拉病毒活性化合物可以考虑从以下几个环节入手。

4.1 抑制病毒进入的活性化合物研究

病毒进入细胞是病毒复制周期中的重要环节。抑制病毒进入靶细胞,可在病毒感染的早期抑制病毒复制。病毒进入抑制剂既可以治疗病毒感染,又可以防止新生病毒颗粒感染周围的宿主细胞,起到预防病毒感染的作用。因此,病毒的进入阶段成为筛选抗病毒药物的重要靶点。

目前,埃博拉病毒进入抑制剂的主要研究方向有两个。

(1) 靶向病毒包膜蛋白的进入抑制剂。埃博拉病毒的包膜蛋白 GP(glycoprotein)与病毒进入细胞密切相关^[66],抑制 GP 蛋白功能,可以阻止病毒的感染。已经在数例埃博拉病毒感染病例中证明治疗有效的实验性药物 ZMapp,就是 3 种靶向 GP 蛋白的单克隆抗体混合物,通过抑制病毒的进入,阻止病毒的复制和感染^[67]。

采用表达埃博拉病毒 GP 蛋白的 EBOV-GP 假病毒体系,可高通量筛选抗病毒中药和天然化合物库,发现新的靶向 GP 的小分子埃博拉病毒进入抑制剂或中药组分。该 EBOV-GP 假病毒,以缺失包膜蛋白的 HIV(human immunodeficiency virus)基因为骨架质粒,将此骨架质粒与表达埃博拉病毒 GP 蛋白的质粒共转染 293T 细胞,可以制备表达复制缺陷的表达埃博拉

病毒 GP 蛋白的 HIV 假病毒颗粒,建立可以在 P2 级别生物安全实验室进行的埃博拉病毒进入抑制剂物的高通量筛选体系^[68]。

GP 蛋白由 GP1 和 GP2 两个亚单位通过二硫键连接组成,GP1 主要识别宿主细胞的受体,而 GP2 亚基在病毒与宿主细胞的膜融合中发挥作用。因此,靶向 GP 的埃博拉病毒进入抑制剂可根据靶点的不同,分为靶向 GP1 的病毒吸附抑制剂和靶向 GP2 的膜融合抑制剂,可分别建立相应的高通量筛选方法,寻找特异性的埃博拉病毒进入抑制剂。这些筛选方法,可从流感病毒进入抑制剂和 HIV 进入抑制剂的筛选方法中衍生得来,用于埃博拉病毒进入抑制剂的筛选^[69,70]。

(2) 靶向宿主细胞蛋白的进入抑制剂。与病毒相互作用的靶细胞膜蛋白在病毒的进入阶段也起到至关重要的作用,因此靶细胞膜蛋白也成为进入抑制剂药物筛选的重要靶点。宿主细胞表面的 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白域-1(T cell immunoglobulin mucin-1, TIM-1), C 型凝集素如 L-SIGN(liver-specific C-type lectin), DC-SIGN(dendritic cell-specific C-type lectin), hMGL(human macrophage lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine), 叶酸受体 α , β 1 整合素, TAM (Tyro-3, Axl and Mer)家族受体 Axl 等能与 GP 蛋白的受体结合区结合。结合后的病毒颗粒通过内吞作用进入胞内体。在胞内体酸性环境下,GP 蛋白被胞内的组织蛋白酶水解成 GP1 和 GP2 亚基^[71]。胞内体表面的尼曼-匹克蛋白 C1(Niemann-Pick C1, NPC1)为胆固醇转移蛋白,被认为是埃博拉病毒的特异性受体,能与 GP1 结合并使 GP1 与 GP2 解离,与病毒的进入密切相关^[72]。因此,宿主细胞的非特异性受体、组织蛋白酶和特异性受体 NPC1 蛋白,可以作为宿主靶点,筛选埃博拉病毒进入抑制剂。

4.2 抑制病毒复制的活性化合物研究

研究表明,靶向埃博拉病毒基因 RNA 多聚酶 L、病毒颗粒蛋白 VP24(viral protein 24)及 VP35 的反式寡核苷酸 EK-1, VP-24-1160 及 VP-35-855,可以抑制灵长类动物感染埃博拉病毒^[73]。因此,特异性靶向埃博拉病毒颗粒蛋白 VP24, VP35 和 RNA 多聚酶 L 的化合物,可抑制病毒的复制。尤其是依赖 RNA 的 RNA 多聚酶 L,是一个很有前景的药物靶点。该蛋白由病毒基因组编码,因此,通过筛选核苷类和非核

苷类化合物,有望发现特异性的埃博拉病毒复制抑制剂。

此外,随着对埃博拉病毒生活周期和宿主-病毒相互作用的深入了解,可以确认更多病毒和宿主的蛋白作为药物靶点。采用计算机辅助药物设计进行虚拟筛选,可以从中药单体数据库中寻找活性化合物;针

对这些新的药物靶点建立高通量筛选方法,可以筛选实体中药单体化合物和中药组分^[74];还可以根据抑杀病毒作用途径和机理不同而选择多种单体或组分进行有序配伍,整合成为多效应的组合物。对筛选到的活性单体化合物、中药组分及组合物应进一步在假病毒体系和活病毒体系确认其抗埃博病毒的活性。

参考文献

- Gao G F, Feng Y. On the ground in Sierra Leone. *Science*, 2014, 346: 666
- Qiu X, Wong G, Audet J, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 2014, 514: 47–53
- Geisbert T W, Lee A C, Robbins M, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet*, 2010, 375: 1896–1905
- Warren T K, Wells J, Panchal R G, et al. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature*, 2014, 508: 402–405
- 莫红缨, 柯昌文, 郑劲平, 等. 莲花清瘟胶囊体外抗甲型流感病毒的实验研究. *中药新药与临床药理*, 2007, 18: 5–9
- 莫红缨, 杨子峰, 郑劲平, 等. 莲花清瘟胶囊防治流感病毒 FM1 感染小鼠的实验研究. *中药材*, 2008, 31: 1230–1233
- 郭海, 张庆宏, 杨进, 等. 莲花清瘟胶囊对流感病毒感染小鼠免疫功能的影响. *南京中医药大学学报*, 2007, 23: 106–108
- 易世红, 王放, 王丽萍, 等. 双黄连粉针剂体外抗病毒药效学研究. *白求恩医科大学学报*, 2001, 27: 490–492
- 孙坚, 王农荣, 杨斌, 等. 双黄连抑制甲 1 型流感病毒诱导细胞凋亡的机制研究. *中国药房*, 2007, 18: 2086–2088
- Shi Y J, Zhao Y, Jiang J, et al. Effects of Yinqiaosan on influenza virus load and IFN- γ mRNA expression in mice. *Chin Pharm J*, 2008, 43: 1475–1478
- 刘颖, 时宇静, 时瀚, 等. 银翘解毒软胶囊对流感病毒感染小鼠肺炎模型肺组织病毒载量及 M1 蛋白表达的影响. *药学学报*, 2011, 46: 650–655
- 马荣, 邓景岳, 刘东华, 等. 银翘解毒口服液对流感病毒 FM1 感染 SCID 小鼠血清 TNF- α 及 TGF- β 1 含量的影响. *中国中药杂志*, 2010, 35: 2488–2490
- 刘颖, 崔晓兰, 时瀚, 等. 疏风解毒胶囊防治流感体内药效学实验研究. *世界中西医结合杂志*, 2010, 5: 35–39
- 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. *病毒学报*, 2011, 27: 218–223
- 胡兴昌, 郑伟强. 板蓝根粗提液抑制流感病毒的实验研究. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 32: 62–65
- Yamada H. Anti-viral compositions containing new glycoprotein from *Isatis tinctoria*. Japanese Patent, 1160599, 1999 Mar 02.
- Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta Med*, 1995, 61: 237–241
- Choi H J, Song J H, Park K S, et al. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37: 329–333
- 杨静. 鱼腥草颗粒体外抗甲型流感病毒作用的药效学实验. *内蒙古中医药*, 2011, 8: 67
- Ge H, Wang Y F, Xu J, et al. Anti-influenza agents from traditional Chinese medicine. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 1758–1780
- Chen J X, Xue H J, Ye W C, et al. Activity of andrographolide and its derivatives against influenza virus *in vivo* and *in vitro*. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32: 1385–1391
- 王学红, 蒲秀英, 梁剑平, 等. 贯叶连翘提取物对流感病毒感染小鼠肺中 IFN- γ -TNF- α 的影响. *安徽农业科学*, 2009, 37: 6012–6013
- Nagai T, Moriguchi R, Suzuki Y, et al. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*. *Antiviral Res*, 1995, 26: 11–25
- 舒莉萍. 黄芪 A6 组分对流感病毒抑制作用的体外实验研究. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18: 4339–4340
- 胡克杰, 孙考祥, 王璟璐, 等. 氯原酸体外抗病毒作用研究. *哈尔滨医科大学学报*, 2001, 35: 430–432
- 马丙祥, 段晓颖, 王志超, 等. 双花喷雾剂治疗小儿上呼吸道感染临床与实验研究. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20: 653–655
- 冯煦, 王鸣, 赵友谊, 等. 北柴胡茎叶总黄酮抗流感病毒的作用. *植物资源与环境学报*, 2002, 11: 15–18
- Kobayashi M, Davis S M, Utsunomiya T, et al. Antiviral effect of gingyo-san, a traditional Chinese herbal medicine, on influenza A₂ virus infection in mice. *Am J Chin Med*, 1999, 27: 53–62
- 方炳虎, 邱灵才, 陈建新, 等. 甘草主要成分抗 H9N2 亚型流感病毒作用研究. *广东农业科学*, 2007, 3: 66–69
- 谢志平, 李洪源, 岳晓宏, 等. 甘草抗病毒有效部位体外抗副流感病毒(III型)作用的研究. *中医药信息*, 2007, 24: 37–39
- Mantani N, Andoh T, Kawamata H, et al. Inhibitory effect of *Ephedrae herba*, an oriental traditional medicine, on the growth of influenza

- A/PR/8 virus in MDCK cells. *Antiviral Res*, 1999, 44: 193–200
- 32 Yu C H, Yan Y L, Wu X N, et al. Anti-influenza virus effects of the aqueous extract from *Mosla scabra*. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127: 280–285
- 33 Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, et al. Anti-influenza virus activity of propolis *in vitro* and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemoth*, 2008, 19: 7–13
- 34 史晨希, 刘妮, 张奉学, 等. 野菊花水提物体外抗甲 1 型流感病毒(H1N1)作用研究. *中药材*, 2010, 33: 1773–1776
- 35 刘盛, 陈万生, 乔传卓, 等. 不同种质板蓝根和大青叶的抗甲型流感病毒作用. *第二军医大学学报*, 2000, 21: 204–206
- 36 郭晏华, 沙明, 孟宪生, 等. 中药羌活的抗病毒研究. *时珍国医国药*, 2005, 16: 198–199
- 37 韩杨, 孔红, 李宜平. 射干的抗病毒实验研究. *中草药*, 2004, 35: 306–308
- 38 Jeong H J, Ryu Y B, Park S J, et al. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their *in vitro* anti-influenza viral activities. *Bioorgan Med Chem*, 2009, 17: 6816–6823
- 39 Lee C L, Chiang L C, Cheng L H, et al. Influenza A (H₁N₁) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *J Nat Prod*, 2009, 72: 1568–1572
- 40 Chon H. Medicinal herbs and plant extracts for influenza: bioactivity, mechanism of anti-influenza effects, and modulation of immune responses. *Stud Nat Prod Chem*, 2012, 38: 305–323
- 41 Nakayama M, Suzuki K, Toda M, et al. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res*, 1993, 21: 289–299
- 42 黄深惠, 汤有志, 周雪梦, 等. 茶多酚体外抗流感病毒作用研究. *茶叶科学*, 2010, 30: 302–308
- 43 Serkedjieva J, Hay A J. *In vitro* anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Antivir Res*, 1998, 37: 121–130
- 44 潘翌翌, 王雪峰, 闫丽娟, 等. 金银花提取物体外抗甲型流感病毒 FM1 株的研究. *中国中医药信息杂志*. 2007, 14: 37–38
- 45 Sawai R, Kuroda K, Shibata T, et al. Anti-influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis*. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118: 108–112
- 46 王艳芳, 王新华, 朱宇同, 等. 芦丁对甲型流感病毒抑制作用实验研究. *中医药学刊*, 2005, 23: 827
- 47 Liu A L, Liu B, Qin H L, et al. Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa*. *Planta Med*, 2008, 74: 847–851
- 48 赵铁华, 陈四平, 杨鹤松, 等. 黄芩茎叶活性部位抗病毒作用的研究. *中国药科大学学报*, 2006, 37: 544–547
- 49 高雷, 章天, 陈鸿珊. 黄芩甙对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用. *中国现代医生*, 2007, 45: 46
- 50 Bill R Jr, Fink R C, McMichael M D, et al. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection *in vitro*. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1255–1261
- 51 刘蓉, 何婷, 陈恬, 等. 桂枝挥发油抗甲型流感病毒作用. *中药药理与临床*, 2012, 28: 75–78
- 52 严银芳, 陈晓, 杨小清, 等. 石香薷挥发油对流感 A3 病毒的抑制作用. *微生物学杂志*, 2002, 22: 32–33
- 53 何忠梅, 孟祥颖, 鲍永利, 等. 麻叶千里光挥发油抗病毒活性及成分分析. *分析化学研究简报*, 2007, 35: 1513–1516
- 54 夏泉, 黄赵刚, 李绍平, 等. 莜术油抗流感病毒和呼吸道合胞病毒作用的实验研究. *中国药理学通报*, 2004, 20: 357–358
- 55 Tang J, Colacino J M, Larsen S H, et al. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antivir Res*, 1990, 13: 313–325
- 56 韦兰萍, 陈建新, 何子华, 等. 金丝桃素体外抗 H9N2 亚型禽流感病毒活性研究. *动物医学进展*, 2010, 12: 68–72
- 57 郭惠玲, 邓亚莉, 楚雍烈. 朱砂七总蒽醌及朱砂七总黄酮体外抗甲型流感病毒实验研究. *陕西中医学院学报*, 2005, 28: 63–64
- 58 樊宏伟, 卢继红, 张蓉. 苦参碱类生物碱的体外抑菌、抑病毒及诱生干扰素的实验研究. *中医药信息*, 2000, 4: 75–76
- 59 Bing F H, Liu J, Li Z, et al. Anti-influenza-virus activity of total alkaloids from *Commelina communis* L. *Arch Virol*, 2009, 154: 1837–1840
- 60 付光发. 鸭跖草提取物抗病毒作用的研究. 硕士学位论文. 武汉: 湖北中医药大学, 2010
- 61 张福明, 张淑芹, 孙非, 等. 香菇多糖对流感病毒的抑制作用. *长春中医药大学学报*, 2006, 22: 11–12
- 62 李丽娅, 凌秋, 崔洪波, 等. 黄芩多糖抗流感病毒的实验研究. *中国中医药科技*, 2002, 9: 354–355
- 63 李娟. 板蓝根多糖的分离纯化及抑制流感病毒神经氨酸酶活性的研究. 硕士学位论文. 吉林: 东北师范大学, 2013
- 64 左娅, 代明, 王志勇, 等. 板蓝根多糖对小鼠抗流感病毒感染的作用. *华西药理学杂志*, 2008, 23: 666–667
- 65 Yang J, Li M M, Shen X T, et al. Influenza A virus entry inhibitors targeting the hemagglutinin. *Viruses*, 2013, 5: 352–373
- 66 Hunt C L, Lennemann N J, Maury W. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world. *Viruses*, 2012, 4: 258–275
- 67 Olinger G G Jr, Pettitt J, Kim D, et al. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 18030–18035
- 68 Basu A, Li B, Mills D M, et al. Identification of a small-molecule entry inhibitor for filoviruses. *J Virol*, 2011, 85: 3106–3119
- 69 Liu S W, Li R M, Zhang R T, et al. CL-385319 inhibits H5N1 avian influenza A virus infection by blocking viral entry. *Eur J Pharmacol*,

- 2011, 660: 460–467
- 70 Liu S W, Jiang S B. High throughput screening and characterization of HIV-1 entry inhibitors targeting gp41: theories and techniques. *Curr Pharm Des*, 2004, 10: 1827–1843
- 71 Choi J H, Croyle M A. Emerging targets and novel approaches to Ebola virus prophylaxis and treatment. *BioDrugs*, 2013, 27: 565–583
- 72 Cote M, Misasi J, Ren T, et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*, 2011, 477: 344–348
- 73 Warren T K, Warfield K L, Wells J, et al. Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections. *Nat Med*, 2010, 16: 991–994
- 74 杨洁, 储平, 熊玉徽, 等. 计算机辅助药物设计在中药现代化中的应用. *世界临床药物*, 2009, 10: 615–619

Anti-influenza Chinese Herbal Medicines and A Proposed Strategy to Search for Their Active Constituents Against Ebola Virus

QIU Feng¹, ZHANG Han¹, LIU ShuWen² & ZHANG BoLi¹

1 Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2 School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

The outbreak of the Ebola virus in Africa in 2014 poses a grave threat to human health and life. In spite of the efforts of many medical institutions at home and abroad to find curative and therapeutic remedies from different perspectives, effective drugs against the Ebola virus currently remain elusive. In this paper, a strategy of finding active compounds against Ebola virus is put forward on the basis of reviewing Chinese herbal medicines and their active ingredients against influenza virus.

traditional Chinese medicine, influenza virus, Ebola virus, drug discovery

doi: 10.1360/N052014-00337