

含桂枝汤大鼠血清对病毒致细胞病变作用的影响*

贺玉琢 高英杰 [富杭育] (中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

摘要 体外抗病毒实验发现,桂枝汤 8mg 生药/ml 对与呼吸道感染有关的 10 株病毒致细胞病变均有不同程度的抑制作用。取口饲给予桂枝汤后的大鼠血清进行体外抗病毒实验,发现该血清(1:4)抑制单纯疱疹病毒 I 型等 4 株病毒对 Hep-2 细胞的增殖;该血清在 -20℃ 保存 3 个月,其抑制作用无明显下降;而正常大鼠血清也具有较弱的延缓病毒致细胞病变作用。

关键词 桂枝汤 含药血清 病毒 细胞病变

Effects of Rats' Serum Containing Guizhi Decoction on Cytopathy Induced by Virus

He Yuzhuo, Gao Yingjie, [Fu Hangyu]

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing, 100700)

Abstract: It was showed from the anti-virus experiment *in vitro* that 8mg crude drug/ml of Guizhi decoction could inhibit cytopathy induced by 10 strains of viruses associated with respiratory infection at the different extents. From the *in vitro* experiment with rats' serum after the oral administration of Guizhi decoction, it was found that the serum(1:4) could inhibit the proliferation of four strains of viruses including herpes simplex virus I type in Hep-2 cells. The serum had no obviously decreased effects after stored at -20℃. Normal rats' serum also could weakly delay the effects on cytopathy induced by the viruses.

Key words: Guizhi decoction, serum containing drugs, virus, cytopathy

根据文献和以往经验,以中药的粗提物在体外细胞培养中做抗病毒活性筛选所得的结果,常难被体内实验所证实。其原因之一可能是粗提物中含有一些非特异性的干扰因子造成的假阳性,或是粗提物中含有活性物质,在体内经过代谢而降解。为了改进体外实验结果的可靠性,我们用喂饲中药后的动物血清(以下简称含药血清)代替药液进行体外抗病毒试验。

1 材料

1.1 药物 桂枝汤煎剂的制备:称取桂枝 10g、芍药 10g、炙甘草 7g、生姜 10g、大枣 10g,经生药学鉴定后,混合加蒸馏水煎煮 2 次,合并滤液,水浴浓缩至 1g 生药/ml, pH6.0, 4℃ 保存备用。临用时以蒸馏水或去

离子水配制成所需浓度。

1.2 动物 Wistar 系大鼠,体重 200g~250g,由中国中医研究院实验动物中心提供。

1.3 病毒 副流感病毒-I 型、呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒 3、7 型(AdV_{3,7})、肠道孤儿病毒 11 型(EC HO₁₁)、柯萨奇病毒 B 族 4、5、6 型(CoxB_{4,5,6})、单纯疱疹病毒 I、II 型(HSV-I、II),购自中国预防医学科学院病毒学研究所,本实验室传代后使用。

1.4 细胞 选用对所用病毒较为敏感的人喉癌传代细胞 Hep-2 株,购于卫生部药品生物制品检定所。经传代后,接种于 96 孔微量培养板后使用。

1.5 细胞培养液 含 10% 小牛血清的 Eagles 液,细胞维持液,含 2% 小牛血清的 Eagles 液。

2 方法与结果

2.1 桂枝汤对病毒致细胞病变作用的影响

按本实验室的方法^[1],将桂枝汤以细胞维持液稀释后,(pH=6.0),进行体外抗病毒实验,观察桂枝汤对病毒致细胞病变作用的影响。表1结果显示,桂枝汤4mg生药/ml对副流感病毒-1、AdV₃、AdV₇以外的7株病毒致细胞病变有不同程度的抑制效果,当浓度增至8mg生药/ml时,对所试10株病毒均有不同程度的抑制作用。

表1 桂枝汤对病毒致细胞病变作用的影响

| 病 毒 | 病 毒 唑 | | 桂 枝 汤 | |
|--------------------|------------|-----------|-----------|--|
| | 0.125mg/ml | 4mg 生药/ml | 8mg 生药/ml | |
| 副流感-1 | ++ | - | + | |
| RSV | ++ | + | + | |
| AdV ₃ | + | - | + | |
| AdV ₇ | + | - | + | |
| ECHO ₁₁ | + | + | ++ | |
| CoxB ₁ | + | + | + | |
| CoxB ₃ | + | + | + | |
| CoxB ₆ | + | + | + | |
| HSV-1 | + | ++ | ++ | |
| HSV-Ⅱ | + | ++ | ++ | |

注:“++”表示有抑制作用,“+”表示有延缓作用,“-”无作用,以下表均同

2.2 大鼠含桂枝汤血清对病毒致细胞病变作用的影响 取大鼠,按体重随机分为3组。分别灌胃给予桂枝汤煎剂20g/kg 1次,同样剂量的桂枝汤连续3d,正常对照组给予同体积的蒸馏水。大鼠于采血前禁食不禁水16h。采血当日,于末次药后1h、2h,在无菌条件下自腹主动脉采血,分离血清,置-20℃冰箱保存备用。将Hep-2细胞单层感染50TC ID₅₀病毒后,加入不同稀释度的大鼠血清,每个稀释度接种4孔,逐日以倒置显微镜观察血清对病毒致细胞病变作用的影响。同时设病毒对照、血清对照、正常细胞对照。

表2结果显示,正常大鼠血清1:4稀释后,对HSV-1、HSV-Ⅱ、CoxB₁、B₃的致细胞病变有延缓作用;当血清稀释到1:8时,这种作用消失。单次或连续3d喂饲桂枝汤后1h的大鼠血清1:4稀释后,对HSV-1、

HSV-Ⅱ、CoxB₁、B₃病毒的致病变作用均有延缓作用。给药后2h的血清对病毒致细胞病变作用似与药后1h的血清无显著差异。

表2 大鼠含桂枝汤血清对病毒致细胞病变作用的影响

| 组别 | 末次药后采血时间 | 血清稀释度 | 病 毒 | | | |
|----------|----------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------|
| | | | CoxB ₁ | CoxB ₃ | HSV-1 | HSV-Ⅱ |
| 正常血清 | | 1:4 | + | + | - | + |
| | | 1:8 | - | - | - | - |
| 单次给药血清 | 1h | 1:4 | + | + | + | + |
| | | 1:8 | + | - | - | - |
| | 2h | 1:4 | + | | + | + |
| | | 1:8 | - | | - | - |
| 连续3d给药血清 | 1h | 1:4 | + | + | + | + |
| | | 1:8 | + | + | - | - |
| | 2h | 1:4 | | | + | |
| | | 1:8 | | | - | |

2.3 大鼠含桂枝汤血清保存时间对HSV-1病毒致细胞病变作用的影响

取同份含药血清,分成2份,均保存在-20℃冰箱,1份保存3d,1份保存3个月,1:4稀释后,添加到已感染HSV-1病毒的Hep-2细胞中,于病毒感染后48h、72h、96h观察细胞病变的进展情况。表3结果表明,正常大鼠血清保存3个月后,其抗病毒作用似有所下降,提示其活性物质在-20℃保存下仍能降解失活。给药血清保存3个月,其抑制病毒致细胞病变作用依旧,提示其活性相对稳定。

表3 血清保存时间对HSV-1病毒致细胞病变作用的影响

| 组 别 | 药后采血时间 | 保存3d | | | 保存3个月 | | |
|----------|--------|------|-----|-----|-------|-----|-----|
| | | 48h | 72h | 96h | 48h | 72h | 96h |
| 正常血清 | | - | + | + | - | - | - |
| 单次给药血清 | 1h | - | + | + | - | + | + |
| | 2h | - | + | + | - | + | + |
| | 3h | - | + | + | - | + | + |
| 连续3d给药血清 | 1h | - | + | + | - | + | + |
| | 2h | - | + | + | - | + | + |

3 小结与讨论

在体外实验中观察到,桂枝汤8mg生药/ml对所试10株病毒致细胞病变均有不同程度的抑制作用。在此基础上,我们将桂枝汤煎剂(相当于人临床用量的20倍)单次或连续3d给予大鼠,于末次药后一定时间采血,分离血清,以此血清进行体外抗病毒实验,从

单次给药或多次给药、不同采血时间、血清保存时间等方面进行了探讨。结果发现,大鼠含桂枝汤血清对所试 HSV-1 等病毒致细胞病变有延缓作用;血清在 -20℃ 保存 3 个月仍有此作用。同时还发现,正常大鼠血清对某些病毒的致细胞病变有延缓作用,这可能与其

含有一定的抗病毒活性物质有关。

参考文献

- 1 贺玉琢,高英杰,富杭育. 正柴胡饮抗病毒作用的实验研究. 中国实验方剂学杂志,1996,2(1): 11 (收稿:1997-04-07)