

给予桂枝汤的大鼠血清对 HSV-1 致 CPE 的影响*

贺玉琢 高英杰 沈 鸿 崔晓兰 郭淑英 姜廷良

(中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

在以往桂枝汤体外抗病毒实验中,观察到桂枝汤药液直接添加到培养体系,对单纯疱疹病毒(HSV-1)等几种与上呼吸道感染有关的病毒致细胞病变(CPE)有抑制或延缓作用^[1],在此基础上,又以桂枝汤 20g/kg 灌胃给予大鼠,取其血清,进行体外抗病毒预试验,发现该血清亦能延缓某些病毒致细胞病变^[2]。但是,用含药血清进行体外实验,在含药血清的制备过程中,存在着许多可变因素,

如动物的给药剂量及次数、采血途径、采血时间、血清处置、保存时间等,这些因素对所采取的动物血清有无影响,是中药复方体外实验方法学研究时需要探讨的问题。本文就给药剂量及给药次数对含药血清药效的影响进行探讨。

1 材料

1.1 受试药物 桂枝汤,按本实验室常规方法^[1]煎成 1g 饮片/ml 药液;对照药病毒唑(三氮唑核苷),湖北省武汉市滨湖制药厂提供的原料药,编号 970512,临用前以蒸馏水

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39630360

配制成所需的浓度;均灌胃给药,给药量为1ml/100g 体重。

1.2 动物 大鼠,Wistar系,体重(200±20)g,雄性,北京医科大学实验动物科学部提供,合格证号医动字01-3056。

1.3 细胞 Hep-2细胞株,卫生部药品生物制品检定所提供,按常规方法进行培养传代。细胞维持液中不含小牛血清。

1.4 病毒 单纯疱疹病毒I型(HSV-I),经在Hep-2细胞传代3次,测定TCID₅₀。后使用。

1.5 试剂 中性红,北京化工厂产品,批号790108。

1.6 仪器 37℃ 5% CO₂ 培养箱,日本Yamato科学株式会社产品。OLYMPUS倒置显微镜,450型酶标仪,日本产。

2 方法

2.1 含桂枝汤大鼠血清的制备 取大鼠若干只,称体重随机分组,每组3~5只。在采血前禁食不禁水12h以上。分单次给药、2次给药。大鼠1次灌胃(单次给药)或分2次灌胃(2次给药,间隔1h)给予桂枝汤5g/kg(相当于临床等效剂量)、10g/kg(相当于临床等效剂量的2倍);末次药后0.5、1、2、3、4、6、8、12h将动物用乙醚麻醉,以无菌方法从腹主动脉采血,置无菌试管内,待凝固后置4℃冰箱过夜,离心,分离血清。同时设正常大鼠血清对照(给予与药液同体积的蒸馏水)、阳性对照药病毒唑血清对照(口饲病毒唑0.07g/kg)。

2.2 含药血清对HSV-1致CPE作用的影响 将长成单层Hep-2细胞的96孔细胞微量培养板的细胞培养液倒掉,每孔添加含100TCID₅₀的HSV-1液50ul,置37℃ 5% CO₂ 培养箱吸附1h,倒掉病毒液,以细胞维持液洗细胞面2次,每孔添加用维持液稀释的不同时间采集的含药血清1:12 100ul,每份血清添加4孔细胞,置37℃ 5% CO₂ 培养箱孵育72h,每日以倒置显微镜观察CPE的

进展情况,以一、±、+、++、+++、++++6级记录CPE程度^[2]。同时设病毒对照、阳性对照药病毒唑药液对照、桂枝汤药液对照、正常细胞对照。待病毒对照孔的CPE达+++~++++时,参照文献^[3]方法进行中性红染色^[4],以酶标仪在570nm下测定各孔的OD值,OD值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行组间t检验。求出各组细胞病变均值(CPE均值)、活细胞率^[4]。

$$\text{细胞病变均值} = \frac{\text{每组各孔细胞病变之和}}{\text{每组孔数}}$$

3 结果

3.1 桂枝汤及病毒唑药液对HSV-1致细胞病变的影响 由表1结果可以看出,桂枝汤药液2~8mg/ml及病毒唑药液32~125μg/ml组的CPE均值明显低于病毒对照组,桂枝汤药液0.5~8mg/ml及病毒唑药液16μg~125μg/ml组的OD值、活细胞率明显高于病毒对照组,表明桂枝汤及病毒唑药液本身对HSV-1的致细胞病变有延缓作用。

表1 桂枝汤、病毒唑药液对HSV-1致CPE的影响

组别	药物浓度 (/ml)	OD值 ($\bar{x} \pm s$)	活细胞率 (%)	CPE (均值)
HSV-1		0.0679±0.014	27.42	4.0
细胞对照		0.2476±0.048	100.00	0.0
桂枝汤	8mg	0.2683±0.191 ^{##}	108.36	0.0
	4mg	0.3570±0.014 ^{##}	144.18	0.5
	2mg	0.2758±0.037 ^{##}	111.39	2.0
	1mg	0.1303±0.024 ^{##}	52.63	3.25
	0.5mg	0.1675±0.064 ^{##}	67.65	4.0
病毒唑	125μg	0.1815±0.049 ^{##}	73.30	0.5
	63μg	0.2070±0.048 ^{##}	83.60	1.0
	32μg	0.1678±0.022 ^{##}	67.77	2.0
	16μg	0.1165±0.011 ^{##}	47.05	4.0

注:与HSV-1相比^{##}P<0.01

3.2 单次给予桂枝汤后大鼠血清对HSV-1致CPE的影响 结果如表2所示,正常血清以及给予2个剂量桂枝汤后0.5~12h 8个时间点采集的血清,其CPE均值均显著低于病毒对照组,OD值明显高于病毒对照组;与

正常血清相比,除 5g/kg 剂量组的 0.5h 外,其余各组的 OD 值均明显高于正常血清组;给予 2 个剂量桂枝汤 4 h 采集的血清 OD 值最高。阳性对照药病毒唑给大鼠口饲后 1h、2h 采集的血清,其 CPE 均值均显著低于病毒对照组,OD 值显著高于病毒对照组,并且 1h 采集的血清与正常血清相比亦有显著差异。

表 2 单次给予桂枝汤后的大鼠血清对 HSV-1 致 CPE 的影响

组别	药后采 n 血时间 (h)	O.D 值 ($\bar{x} \pm s$)	活细胞 率(%)	CPE 均值
HSV-1 对照		0.0679±0.014	27.4	4.00
正常细胞对照		0.2476±0.048 ^{##}	100.0	0.00
正常血清对照	2	0.1994±0.028 ^{##}	80.5	2.00
桂枝汤血清	4 0.5	0.181±0.033 ^{##}	73.1	2.2
5g/kg	3 1.0	0.234±0.035 ^{##*}	94.3	2.4
	3 2.0	0.293±0.061 ^{##**}	118.2	2.2
	4 3.0	0.255±0.046 ^{##**}	103.0	2.7
	3 4.0	0.311±0.043 ^{##**}	125.6	2.2
	4 6.0	0.298±0.054 ^{##**}	120.5	2.0
	4 8.0	0.306±0.029 ^{##**}	123.5	2.0
	4 12.0	0.273±0.035 ^{##**}	110.4	2.0
桂枝汤血清	4 0.5	0.232±0.046 ^{##*}	93.5	2.1
10g/kg	4 1.0	0.241±0.027 ^{##**}	97.2	2.5
	4 2.0	0.287±0.053 ^{##**}	115.9	2.2
	4 3.0	0.254±0.039 ^{##**}	102.7	2.3
	3 4.0	0.331±0.034 ^{##**}	133.6	2.3
	3 6.0	0.300±0.049 ^{##**}	121.4	2.0
	4 8.0	0.285±0.034 ^{##**}	115.1	2.0
	4 12.0	0.286±0.052 ^{##**}	115.6	2.0
病毒唑血清	4 1.0	0.287±0.050 ^{##**}	116.0	2.0
0.07g/kg	3 2.0	0.206±0.046 ^{##}	83.0	2.0

注:与 HSV-1 相比[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与正常血清组相比* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;下表均同

3.3 两次给予桂枝汤后的大鼠血清对 HSV-1 致 CPE 的影响 表 3 结果显示,大鼠连续 2 次(间隔 1h)灌胃给予桂枝汤 5、

10g/kg 后,2 个剂量各 8 个时间点血清组的 OD 值均明显高于病毒对照组,0.5h 的 OD 值最高;桂枝汤 5g/kg 的 0.5、1、4、8h 及 10g/kg 的 0.5、1、3h 的 OD 值亦高于正常血清对照组。正常大鼠血清的 OD 值亦高于病毒对照组,阳性对照药病毒唑 1h 组的 OD 值与病毒对照组相比有显著差异。

表 3 2 次口饲给药后的大鼠含药血清对 HSV-1 致 CPE 的影响

组别	药后采 n 血时间 (h)	O.D 值 ($\bar{x} \pm s$)	活细胞 率(%)	CPE 均值
HSV-1 对照		0.066±0.013	33.2	4.0
正常细胞对照		0.199±0.030 ^{##}	100.0	0.00
正常血清对照	4	0.098±0.012 ^{##}	49.4	3.6
桂枝汤血清	4 0.5	0.142±0.015 ^{##**}	71.4	3.0
5g/kg	3 1.0	0.127±0.012 ^{##**}	63.6	3.0
	4 2.0	0.099±0.008 ^{##}	49.6	3.5
	4 3.0	0.100±0.013 ^{##**}	50.2	3.4
	4 4.0	0.114±0.020 ^{##**}	57.1	3.3
	4 6.0	0.090±0.011 ^{##}	45.3	3.7
	3 8.0	0.108±0.011 ^{##*}	52.6	3.2
	4 12.0	0.096±0.013 ^{##**}	48.3	3.6
桂枝汤血清	4 0.5	0.137±0.016 ^{##**}	68.6	3.0
10g/kg	5 1.0	0.122±0.022 ^{##**}	60.9	3.0
	4 2.0	0.106±0.016 ^{##}	53.3	3.4
	4 3.0	0.108±0.008 ^{##**}	54.4	3.1
	4 4.0	0.089±0.011 ^{##}	44.5	3.9
	4 6.0	0.097±0.005 ^{##}	48.7	3.7
	2 8.0	0.101±0.011 ^{##}	50.9	3.6
	4 12.0	0.103±0.008 ^{##}	51.7	3.4
病毒唑血清	3 1.0	0.102±0.009 ^{##}	51.0	3.0
0.07g/kg	3 2.0	0.094±0.011	47.0	3.0

4 讨论

由于体外抗病毒试验往往是用培养细胞,用显微镜观察细胞感染病毒后细胞病变的程度,但是此种方法存在着客观性不强、工作量大、具有主观因素等缺点,因此需要摸索一种操作方法简便易行,判断结果客观准确

的方法。出于此目的,本实验室参考文献^[3],运用中性红染料吸收法,测定 O、D 值,发现 CPE、OD 值之间呈显著相关性^[4]。此次将该方法试用到血清药理学实验中,在实验结束日以显微镜观察 CPE 后进行中性红染色,以观察动物含药血清对病毒致细胞病变作用的影响。

本实验观察含药血清对 HSV-1 致 CPE 的影响,同时进行桂枝汤药液抗 HSV-1 实验。经多次实验重复,桂枝汤药液对 HSV-1 致 CPE 有延缓作用。而含药血清单次给药、2 次给药后的各 8 个时间点的 OD 值均明显高于病毒对照组,有明显差异。单次给药,两个剂量组的药后 4h 的血清的 OD 值最高,2 次给药后的 0.5h 血清的 OD 值最高。正常大鼠血清组的 OD 值亦高于病毒对照组,但低于给药组。表明含药血清的作用强于正常血清,给予桂枝汤后的大鼠血清中是否存在着桂枝

汤中的有效成分,还有待于对含药血清进行血清药化学分析后来证实。阳性对照药病毒唑 0.07g/kg 给予大鼠,无论是单次给药,还是 2 次给药,药后 1h 组 OD 值均高于病毒对照组。

参考文献

- 1 贺玉琢,高英杰,富杭育. 正柴胡饮的抗病毒作用的实验研究. 中国实验方剂学杂志,1996,2(1): 12
- 2 贺玉琢,高英杰,富杭育. 含桂枝汤大鼠血清对病毒致细胞病变的影响. 中国实验方剂学杂志,1998,4(4):26
- 3 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术. 北京:科学出版社,1990. 267
- 4 高英杰,贺玉琢,沈 鸿,等. 中性红染料吸收法在抗病毒药物研究中的应用. 中药药理与临床,1998,14(4):45

(收稿:1998-10-19)