

疏风解毒颗粒防治手足口病的体内外药效学研究

郭姗姗¹, 金亚宏¹, 王意忠², 高英杰¹, 时宇静¹, 马荣¹,
刘方舟¹, 钟菊迎¹, 田雪川¹, 崔晓兰^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京大学航天临床医学院, 北京 100049)

[摘要] 目的: 通过观察疏风解毒颗粒在体内对手足口病病毒 EV71 感染 BALB/c 乳鼠模型的保护作用和体外对 EV71 等肠道病毒的抑制作用, 评价疏风解毒颗粒防治手足口病的药效。方法: 采用疏风解毒颗粒 3 岁儿童临床 2 倍、等倍和 1/2 倍剂量 (14.08, 7.04, 3.52 g·kg⁻¹) 分别对手足口病病毒 EV71 H 株感染的 BALB/c 乳鼠手足口病动物模型进行预防性给药 (ig, 3 d) 和治疗性给药 (ig, 5 d), 观察乳鼠感染的严重程度、死亡数, 计算动物死亡率和生命延长率; 采用疏风解毒颗粒在体外对 Vero 细胞无明显毒性的 5 个剂量, 对手足口病病毒 EV71 H 株, 柯萨奇病毒 B3 株, B4 株, B5 株的致 Vero 细胞病变的抑制作用进行观察。结果: 疏风解毒颗粒对手足口病病毒 EV71 感染的乳鼠模型具有明显的预防和治疗作用, 可降低感染程度和死亡率, 具有明显的保护和延长生命的作用; 疏风解毒颗粒在无明显毒性的浓度下, 在体外对手足口病病毒 EV71 H 株、CoxB3 株、CoxB5 株均具有明显的抑制作用。结论: 疏风解毒颗粒在体内外均具有较好的防治手足口病的作用。

[关键词] 疏风解毒颗粒; 手足口病; 手足口病毒 EV71; BALB/c 乳鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0206-04

Pharmacodynamics Research on Preventive and Therapeutic Effects of Shufeng Jiedu Granules on Hand-Foot-Mouth Disease

GUO Shan-shan¹, JIN Ya-hong¹, WANG Yi-zhong², GAO Ying-jie¹, SHI Yu-jing¹,
MA Rong¹, LIU Fang-zhou¹, ZHONG Ju-ying¹, TIAN Xue-chuan¹, CUI Xiao-lan^{1*}

(1. Institute of Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700 China; 2. Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the preventive and therapeutic effects of Shufeng Jiedu granules on hand-foot-mouth disease by observing the death protective effect of the granules on suckling BALB/c mice infected by enterovirus 71 *in vivo* and the inhibition effect on enteric viruses *in vitro*. **Method:** Prophylactic and therapeutic administration of Shufeng Jiedu granules were applied to EV71 H strain infection suckling BALB/c mice at 2, 1 and 1/2 clinical equivalent dose of 3-year-old children respectively. We observed the degree of infection, death number and calculated the death rates and life extension rates. The *in vitro* inhibition of Shufeng Jiedu granules at five non-toxic dosages anti EV71 H strain, CoxB3 strain, CoxB4 strain and CoxB5 strain were determined by CPE method on Vero cells. **Result:** Shufeng Jiedu granules could decrease the degree of infection and death rates, simultaneously increase life extension rates significantly. Shufeng Jiedu granules showed significant preventive and therapeutic effects on suckling BALB/c mice infected by enterovirus 71. At no-toxic dosages, Shufeng Jiedu granules inhibited CoxB3 strain, CoxB4 strain and CoxB5 strain visibly. **Conclusion:** Shufeng Jiedu granules show notable preventive and therapeutic effects on hand-foot-mouth disease *in vivo* and *in vitro*.

[Key words] Shufeng Jiedu granules; hand-foot-mouth disease; enterovirus 71; suckling BALB/c mice

[收稿日期] 2011-09-09

[基金项目] 国家重大新药创制计划 (2009ZX09301-005-007); 中国中医科学院自主选题项目 (ZZ20090103)

[第一作者] 郭姗姗, 助理研究员, Tel: 010-84252805-4102, E-mail: ruochushan@sina.com

[通讯作者] * 崔晓兰, 研究员, Tel: 010-84252805-4102, E-mail: cuixl2812@sina.com

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)是肠道病毒引起的常见传染病之一,多发生于5岁以下的婴幼儿。引发手足口病的肠道病毒均属微小核糖核酸病毒科(Picorna)、人肠道病毒属,主要包括柯萨奇病毒A组的16,4,5,9,10型,B组的2,4,5型,以及肠道病毒71型均为手足口病较常见的病原体^[1,2],其中以柯萨奇病毒A16型(CoxA16)和肠道病毒71型(enterovirus71, EV71)最为常见。手足口病的临床症状常见发热、手足皮疹、口腔溃疡,部分患者病症发展迅速,并发症包括心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜炎等,重症病人大多伴有中枢神经系统症状(CNS),一些病人还有严重的呼吸系统症状,发病死亡的患儿中主要是因为感染了EV71病毒^[3]。本研究采用肠道病毒EV71和柯萨奇病毒B3, B4, B5型分别感染乳鼠或Vero细胞建立手足口病的体内外模型,并对疏风解毒颗粒防治手足口病的体内外药效进行评价。

1 材料

1.1 动物 BALB/c乳鼠,3~5日龄,每窝4只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号SCKX(京)2006-0009。

1.2 细胞和病毒 非洲绿猴肾细胞(Vero),购自中国协和医科大学基础所细胞中心,本室常规传代培养;人手足口病病毒(肠道病毒)EV71 H株,购自美国典型菌种保藏中心(ATCC),本室常规传代,TCID₅₀为10^{-3.5};柯萨奇病毒B3株, B4株, B5株,本室常规传代,TCID₅₀分别为10^{-4.5}, 10⁻⁶, 10⁻⁶, -80℃冰箱保存。

1.3 药物和试剂 疏风解毒颗粒(安徽济人药业有限公司提供,生产批号20101102,体内实验根据3岁小儿临床用量(0.64 g·kg⁻¹)折合成小鼠高、中、低剂量分别为14.08, 7.04, 3.52 g·kg⁻¹(相当于等效剂量的2, 1, 0.5倍)按20 mL·kg⁻¹ ig,体外试验前用高纯水配制成50 g·L⁻¹的母液,过滤除菌后备用,试验时按需要做倍比稀释;阳性对照药利巴韦林颗粒,四川百利药业有限公司,生产批号091055,体内实验根据3岁小儿临床用量(0.105 g·kg⁻¹)折合成小鼠等效剂量为1.155 g·kg⁻¹,按20 mL·kg⁻¹ ig;体外试验前用高纯水配成50 g·L⁻¹母液,试验时做倍比稀释;细胞培养液含10%胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司),DMEM(高糖)培养基(美国Gibco公司)。

1.4 仪器 MSC18型A2型生物安全柜(美国Thermo公司),倒置相差显微镜(日本Olympus),

CO₂培养箱(日本Yamato公司)。

2 方法

2.1 预防给药对手足口病病毒感染BALB/c乳鼠的保护作用 BALB/c乳鼠按窝随机分为正常对照组、病毒对照组、利巴韦林对照组、疏风解毒颗粒高、中、低剂量组,每组4只,各给药组按剂量和20 mL·kg⁻¹ ig,1次/d,连续3 d,正常对照组和病毒对照组给予蒸馏水;给药第4天除正常对照组外,其余各组ip手足口病病毒原液进行感染,0.4 mL/只,每次给药或感染后均用75%乙醇喷洒乳鼠包裹垫料后,放回笼中与母鼠共同饲养,感染后每日观察乳鼠的生存状态,共观察14 d,并根据下列标准评分,计算感染的严重程度0分:健康;1分:弓背、竖毛(长出毛后观察)、消瘦、活动减少等;2分:后肢力量减弱;3分:单侧后肢麻痹或瘫痪;4分:双侧后肢麻痹或瘫痪;5分:濒死或死亡。

计算各组死亡率和生命延长率并用SPSS软件进行统计分析。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡数}}{\text{动物总数}} \times 100\%$$

$$\text{生命延长率} = \frac{\text{试验组存活天数} - \text{病毒对照组存活天数}}{\text{病毒对照组存活天数}} \times 100\%$$

2.2 治疗给药对手足口病病毒感染BALB/c乳鼠保护作用 造模方法、分组及给药剂量同2.1。造模当天各给药组按剂量和20 mL·kg⁻¹ ig,1次/d,连续5 d,正常对照组和病毒对照组按体重给予蒸馏水,处理及观察同2.1。

2.3 疏风解毒颗粒对Vero细胞的毒性试验 将药物母液用培养液做1:2~1:256倍比稀释后,加到已长成单层的Vero细胞培养板中,100 μL/孔,每个稀释度药液做4个复孔,同时设正常细胞对照。将培养板置37℃,5% CO₂培养箱中培养,每日倒置显微镜下观察细胞病变情况,确定细胞不出现明显病变的最低稀释倍数(最大无毒浓度),按Reed-Muench法计算50%细胞毒性浓度(TC₅₀)和最大无毒浓度(TC₀)。

2.4 疏风解毒颗粒对Vero细胞的体外抗病毒作用(CPE法) 取已长成单层细胞的培养板,倒掉培养液,用细胞维持液冲洗细胞面3遍后,分别接种不同稀释度的肠道病毒液, EV71株10⁻²稀释度、CoxB3株10^{-2.5}稀释度、CoxB4株10⁻⁴稀释度、CoxB5株10⁻⁴稀释度,每种毒株100 μL/孔,置37℃,5% CO₂培养箱中吸附1 h后,再加入相应稀释度(质量浓度为6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 g·L⁻¹)的疏风解毒

颗粒 100 μL/孔,同时设正常细胞对照和病毒对照,并以利巴韦林为阳性对照。置 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每日倒置显微镜下观察细胞病变情况,当病毒对照组细胞病变为卅时记录试验结果。

细胞病变按 6 级标准判断。- :细胞生长正常,无病变出现;± :细胞病变少于整个单层的 10%;+ :细胞病变约占整个单层细胞的 25% 以下;++ :细胞病变约占整个单层细胞的 50% 以下;+++ :细胞病变约占整个单层细胞的 75% 以下;卅 :细胞病变约占整个单层细胞的 75% 以上。按 Reed-Muench 计算 50% 抑制浓度 (IC₅₀) 和治疗指数 (TI)。

$$TI = TC_{50} / IC_{50}$$

3 结果

3.1 预防给药对手足口病病毒感染 BALB/c 乳鼠的保护作用 模型组在观察的 14 d 内,动物均死亡或呈濒死状态,死亡率为 100%,其感染程度积分、死亡率与正常对照组比较均具有显著性差异;利巴韦林进行预防性给药后,动物出现消瘦、活动减少,后肢力量减弱,单侧后肢瘫痪的症状,有 1 只动物死亡,其感染程度积分、死亡率与模型组比较均具有显著性差异;疏风解毒颗粒预防性给药后,其高、中、低剂量的死亡率分别为 25% ,0,25% ,与模型组比较均具有显著性差异;生命延长率分别为 42.86% ,60% ,45.71% ,疏风解毒颗粒 3 个剂量组感染程度明显减轻,与模型组比较均具有显著性差异。见表 1~2。

表 1 疏风解毒颗粒预防给药对手足口病病毒感染 BALB/c 乳鼠感染程度的影响 (n=4)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分	P
正常	-	4	0	0	0	0	0	<0.01
模型	-	0	0	0	0	0	4	
利巴韦林	1.155	0	1	1	1	0	1	<0.05
疏风解毒颗粒	14.08	0	0	0	2	1	1	<0.05
	7.04	0	2	0	2	0	0	<0.05
	3.52	0	0	0	2	1	1	<0.05

注:P 为与模型组比较(表 3 同)。

3.2 治疗给药对手足口病病毒感染 BALB/c 乳鼠保护作用 模型组在观察的 14 d 内,动物均死亡或呈濒死状态,死亡率为 100%,其感染程度积分、死亡率与正常组比较均具有显著性差异;利巴韦林治疗性给药后,动物出现消瘦、活动减少,后肢力量减弱,单侧后肢瘫痪或双侧后肢瘫痪的症状,有 1 只动物死亡,其感染程度积分、死亡率与模型组比较均具

表 2 疏风解毒颗粒预防给药对手足口病病毒感染 BALB/c 乳鼠的保护作用 (n=4)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	死亡数 /只	死亡率 /%	生命延长率 /%
正常	-	0	0 ²⁾	100.00
模型	-	4	100	-
利巴韦林	1.155	1	25 ¹⁾	45.71
疏风解毒颗粒	14.08	1	25 ¹⁾	42.86
	7.04	0	0 ²⁾	60.00
	3.52	1	25 ¹⁾	45.71

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表 4 同)。

有显著性差异;疏风解毒颗粒进行治疗性给药后,其高、中、低剂量的死亡率分别为 0,50% ,50% ,生命延长率分别为 75% ,40.63% ,37.5% ,疏风解毒颗粒 3 个剂量组感染程度均明显减轻,其中高剂量组的感染程度和死亡率与模型组比较具有显著性差异。见表 3~4。

表 3 疏风解毒颗粒治疗给药对手足口病病毒感染 BALB/c 乳鼠感染程度的影响 (n=4)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分	P
正常	-	4	0	0	0	0	0	<0.01
模型	-	0	0	0	0	0	4	
利巴韦林	1.155	0	0	1	1	1	1	<0.05
疏风解毒颗粒	14.08	0	0	0	2	2	0	<0.05
	7.04	0	0	0	2	0	2	<0.05
	3.52	0	0	0	1	1	2	<0.05

表 4 疏风解毒颗粒治疗给药对手足口病病毒感染 BALB/c 乳鼠的保护作用 (n=4)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	死亡数 /只	死亡率 /%	生命延长率 /%
正常	-	0	0 ²⁾	100.00
模型	-	4	100 ²⁾	-
利巴韦林	1.155	1	25 ¹⁾	56.25
疏风解毒颗粒	14.08	0	0 ²⁾	75.00
	7.04	2	50	40.63
	3.52	2	50	37.50

3.3 对 Vero 细胞的毒性 疏风解毒颗粒对 Vero 细胞的 TC₀ 为 6.25 g·L⁻¹,TC₅₀ 为 8.89 g·L⁻¹;利巴韦林对 Vero 细胞的 TC₀ 为 12.5 g·L⁻¹,TC₅₀ 为 17.74 g·L⁻¹。

3.4 对 Vero 细胞的体外抗病毒作用 疏风解毒颗粒在体外对肠道病毒 EV71 株、CoxB3 株、CoxB5 株致 Vero 细胞病变均具有明显的抑制作用;而对 CoxB4 株没有明显的抑制作用。利巴韦林在体外对肠道病毒 EV71 株、CoxB3 株、CoxB4 株、CoxB5 株致 Vero 细胞病变作用均具有明显的抑制作用,见表 5。

表 5 疏风解毒颗粒与利巴韦林的体外抗肠道病毒作用

组别	病毒株	IC ₅₀ /g·L ⁻¹	TI
疏风解毒颗粒	EV71	1.58	5.63
	CoxB3	1.12	7.94
	CoxB4	-	-
	CoxB5	1.58	5.63
利巴韦林	EV71	2.23	7.96
	CoxB3	1.12	15.84
	CoxB4	1.12	15.84
	CoxB5	0.63	28.16

4 讨论

疏风解毒颗粒的主要成分为虎杖、连翘、板蓝根、败酱草、马鞭草、芦根等,具有疏风清热、解毒利咽等作用,在 2009 年甲型 H1N1 流感病毒流行期间,曾作为推荐用中药被政府储备。

本研究分别采用 EV71 感染的 BALB/c 乳鼠动物模型和 4 株肠道病毒感染的 Vero 细胞模型对疏风解毒颗粒防治手足口病作用进行了评价,研究结果显示:预防性给药时,疏风解毒颗粒 3 个剂量组均能明显降低乳鼠的感染程度,降低死亡率,其中以中剂量组的作用最为显著;治疗性给药时,疏风解毒颗粒 3 个剂量组均能明显降低乳鼠的感染程度,降低死亡率,其中以高剂量组作用最为显著。阳性对照药利巴韦林预防性及治疗给药均能明显降低乳鼠的感染程度和死亡率。研究结果证实疏风解毒颗粒对手足口病病毒 EV71 感染的乳鼠模型有明显的预防和治疗作用,可降低感染程度和死亡率,有明显延长生命的作用。

疏风解毒颗粒在无明显毒性的浓度下,在体外

对肠道病毒 EV71 株、CoxB3 株、CoxB5 株引起的 Vero 细胞病变均具有明显的抑制作用;利巴韦林在体外对所选 4 株肠道病毒引起的 Vero 细胞病变均具有明显的抑制作用。

目前国内外用于评价手足口病的动物模型尚不成熟,评价指标不统一,组织样本中病毒载量检测时间和结果不稳定,这些均制约了治疗手足口病药物的发现和临床前评价。本课题组综合了多种评价方法,建立了模拟临床发病特点和规律的、适用于重症手足口病的乳鼠动物模型,并制定了针对感染程度和死亡率和生命延长率的评价标准。

[参考文献]

- [1] 周伯平,李成荣. 肠道病毒 EV71 型手足口病[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:65.
- [2] Lin T Y, Chang L Y, Hsia S H, et al. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management [J]. Clin Infect Dis, 2002, 2:52.
- [3] Brown B A, Pallansch M A. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus [J]. Virus Res, 1995, 39:195.
- [4] Guo-hui Chang, Yan-jun Luo, Xiao-yan Wu et al. RMonoclonal antibody induced with inactivated EV71-Hn2 virus protects mice against lethal EV71-Hn2 virus infection[J]. Virology, 2010, 7:106.
- [5] Yu-Wen Lin, Kung-Chao Chang, Chia-Min Kao et al. Lymphocyte and antibody responses reduce enterovirus 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads [J]. Virology, 2009, 83(13):6477.
- [6] 甘志高. 手足口病研究进展[J]. 中国热带医学. 2009, 9(2):373.
- [7] 朱建英,王卫,佟巍. 肠道病毒 71 型(EV71)对 ICR 小鼠的感染[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 9(5):41.
- [8] 杨子峰,秦笙,莫自耀,等. 应用空斑形成法检测五种不同细胞对肠道病毒 71 型的敏感性[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(6):573.

[责任编辑 何伟]