

金黄 号及组方药味体外抗流感病毒作用

朱丹¹, 刘华钢^{1*}, 黄慧学²

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医学院, 南宁 530001;
3. 百色现代农业技术研究推广中心, 广西 百色 533612)

[摘要] 目的: 观察复方金黄 号及组成该方的各单味药体外对流感病毒(A1, A3)的抑制作用, 比较复方与单味药体外抗病毒效果, 为临床合理用药提供依据。方法: 建立体外病毒感染模型, 采用细胞病变法(CPE)和 MTT 法观察金黄 号及单味药在不同时间给药对流感病毒感染的抑制作用。结果: 对 A1, A3 流感病毒, 金黄 号在治疗、预防以及感染病毒同时加药 3 种条件下细胞存活量较病毒对照组均有显著提高, 抑制率高于部分单味药和利巴韦林对照组; 除金银花、浮小麦在治疗条件下对 A3 流感病毒的抑制作用不明显外, 其余各单味药在 3 种条件下对 2 种病毒均有显著抑制作用。结论: 金黄 号具有体外抗流感病毒作用, 总体而言其抗病毒作用优于组成该方的各单味药。

[关键词] 金黄 1 号; 体外; 流感病毒

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)17-0181-03

金黄 号是由金银花、黄芪、浮小麦、大枣组成, 具扶正祛邪、益气解毒的功效, 作者在已往的研究中发现金黄 号具有体外抗流感病毒的作用^[1]。本试验通过对金黄 号及组成该复方的每味中药进行体外抗流感病毒作用的研究, 进行对比分析, 为金黄 号的开发利用提供一定参考。

1 材料

1.1 药物 金黄 号及单药金银花, 黄芪, 浮小麦, 大枣的配制由广西中医药研究所完成。于试验前配制成为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 再经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后, 置 4°C 冰箱保存备用。病毒唑(Ribavirin)注射液, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 批号 20041023, 湖北天药药业股份有限公司。

1.2 细胞 狗肾传代细胞(MDCK), 广州中医药大学病毒学教研室赠送; DMEM 培养基, 美国 Hyclone 公司; DMEM 生长液含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素; 用于稀释药物的维持液 1 含: 2% 胎牛血清的 DMEM, 其他同生长液; 用于流感病毒试验时的维持液 2 不含胎牛血清, 含 2

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰酶的 DMEM, 其他同生长液。

1.3 病毒株 流感病毒[甲 1 A1/广西/14/2001 (H1N1), 甲 3 A3/广西/194/2003 (H3N2)]: 由广西壮族自治区疾病预防控制中心病毒科提供。病毒按常规接种 9~11 日龄鸡胚的尿囊腔, 35°C 孵育 72 h 后收集尿囊液, 测定红细胞凝集活性, 血凝滴度大于 128 的尿囊液分装, 置 -80°C 冰箱保存待用。

2 方法

2.1 病毒毒力测定 将病毒悬液用维持液 2 作 10 倍稀释为 $1 \times 10^{-1} \sim 10^{-8}$ 共 8 个稀释度, 加入 MDCK 细胞已长成单层的 96 孔板中, 每个稀释度接种 4 孔, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 35°C , 5% CO_2 中孵育 2 h, 弃病毒液, 最后 1 次控干并加入 $100 \mu\text{L}$ 维持液 2, 同时设正常细胞对照组, 倒置显微镜下每天观察细胞病变, 培养液中红细胞凝集活性(HA)按国家流感中心建立的方法^[2]测定红细胞凝集效价: 从试验的各孔取 $25 \mu\text{L}$ 培养液, 加入 96 孔板中, 加入 $25 \mu\text{L}$ 配制好的 1% 豚鼠红细胞悬液, 相混后置 4°C $30 \sim 60 \text{ min}$, 观察 HA。计算半数感染量(TCID₅₀)。

2.2 药物毒性测定 将已过滤除菌的试验药液(金黄 号、各单味药)及阳性对照药利巴韦林用维持液 1 作 2 倍稀释, 加入已长成单层细胞的 96 孔中, 同时设空白组, 将各质量浓度药液加入细胞培养板中, 每个浓度 4 孔, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 。于 37°C , 5% CO_2 温箱中培养 3~5 d, 倒置显微镜下观察细胞形态。计算最大无毒浓度(TC₀)。

2.3 药物对流感病毒的抑制作用(MTT 法)

[收稿日期] 2010-03-25

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0332007)

[第一作者] 朱丹, 讲师, 从事药理学及生药学研究, Tel: 0771-5358272, E-mail: englishzhudan030@sina.com

[通讯作者] * 刘华钢, 教授, 博导, 从事药理学及药剂学研究, Tel: 0771-5700208, E-mail: hgliu@263.net

2.3.1 治疗给药(先感染病毒后给药) 用维持液 2 稀释浓度为 100TCID₅₀ 流感病毒, 加入已长成单层细胞的 96 孔中, 每孔 100 μL, 于 35 ℃, 5% CO₂ 孵箱中吸附 1.5 h 感染细胞, 弃病毒液, 控干。各药物均用维持液稀释至最大无毒浓度, 将各药物加入已经感染的细胞板中, 各浓度 4 孔, 每孔 100 μL, 同时设空白组, 病毒对照组, 利巴韦林组。于 37 ℃, 5% CO₂ 中孵育 24 h。将板中的培养液弃去, 控干, 加入维持液 1, 100 μL/孔, 观察细胞病变。当病毒对照孔出现最大程度病变时, 加入 MTT(5 g·L⁻¹) 每孔 20 μL, 37 ℃, 5% CO₂ 中孵育 5 h。将细胞板中的培养液弃去, 控干, 加入 DMSO 150 μL/孔, 振荡, 作用 10 min。酶标仪 570 nm 测 A 值, 空白孔调零。

2.3.2 预防给药(先给药后感染病毒) 所有操作同 2.3.1, 不同为先加入药物后感染病毒。

2.3.3 药物与病毒同时给予 所有操作同 2.3.1, 不同为药物与病毒相混合后立即接种细胞, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{试验组} - \text{病毒对照组}}{\text{空白组} - \text{病毒对照组}} \times 100\%$$

2.3.4 统计学方法 Reed-muench^[3] 法计算病毒 TCID₅₀ 和药物 TC₀。统计学处理采用 SPSS11.0 软件, 数据先行方差齐性检验, 然后进行方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

表 2 不同时间给药对 A1 流感病毒的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=4$)

药物	质量浓度 /g·L ⁻¹	治疗		预防		药物病毒同时	
		A	抑制率 /%	A	抑制率 /%	A	抑制率 /%
病毒对照	-	0.255 ±0.010		0.358 ±0.032		0.871 ±0.002	
空白	-	0.612 ±0.007 ²⁾		0.882 ±0.014 ²⁾		1.513 ±0.032 ²⁾	
金黄 号	5	0.501 ±0.018 ^{2,4)}	68.91	0.700 ±0.010 ^{2,4)}	65.25	1.416 ±0.112 ^{2,4)}	85.03
金银花	3.28	0.468 ±0.031 ^{2,4)}	59.59	0.676 ±0.033 ^{2,4)}	60.58	1.193 ±0.027 ^{2,3)}	50.19
黄芪	0.74	0.397 ±0.028 ^{2,4,6)}	39.78	0.608 ±0.037 ^{2,4,6)}	47.71	1.384 ±0.025 ²⁾	80.31
浮小麦	9.38	0.453 ±0.010 ^{2,4,5)}	55.46	0.685 ±0.076 ^{2,4)}	62.30	1.378 ±0.053 ²⁾	79.11
大枣	16.25	0.372 ±0.054 ^{2,4,6)}	32.70	0.589 ±0.034 ^{2,4,6)}	44.04	1.379 ±0.104 ¹⁾	79.22
利巴韦林	10 ⁻³	0.470 ±0.043 ^{2,4)}	60.08	0.575 ±0.005 ^{2,4,6)}	41.47	1.209 ±0.088 ^{1,3)}	52.80

注: 与病毒对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与空白组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与金黄 号组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3.2 对 A3 流感病毒 在用药条件 下金黄 号、黄芪和大枣与病毒对照组比较有显著差异($P < 0.01$), 而金银花、浮小麦与病毒对照组比较无显著差异; 在用药条件 , 下金黄 号与各单味药及利

3.1 病毒毒力测定 采用 Reed-muench 法计算流感病毒 A1 在 MDCK 细胞中的 TCID₅₀ 为 10⁻⁴, A3 的 TCID₅₀ 为 10^{-4.5}。试验中病毒攻击量为 100 TCID₅₀。

3.2 药物毒性测定 根据细胞病变得出各药最大无毒浓度 TC₀(表 1)。复方、单味药及阳性药利巴韦林均以 TC₀ 做药物抗病毒试验。

表 1 各药最大无毒浓度(TC₀) g·L⁻¹

药物	TC ₀
复方	5.0
金银花	3.28
黄芪	0.74
浮小麦	9.38
大枣	16.25
利巴韦林	1 × 10 ⁴

3.3 药物对流感病毒的抑制作用

3.3.1 对 A1 流感病毒 金黄 号与各单味药及利巴韦林在 3 种用药条件下与病毒对照组比较均有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 金黄 号在 3 种给药条件下对病毒的抑制率均高于各单味药和利巴韦林; 在 I 条件下除金银花外各单味药病毒抑制率均低于金黄 号($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 在 条件下黄芪、大枣的抑制率低于金黄 号($P < 0.01$); 条件下各单味药与金黄 号比较无显著差异(表 2)。

巴韦林与病毒对照组比较均有显著差异($P < 0.01$); 在用药条件 下金银花、浮小麦与金黄 号比较抑制作用有显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而黄芪、大枣与金黄 号比较无显著差异; 在用药条

件下各单味药与金黄 号比较均无显著差异;在用药条件下浮小麦、大枣抑制作用低于金黄 号比较无显著差异(见表 3)。

表 3 不同时间给药对 A3 流感病毒的抑制作用 (n=4)

药物	质量浓度 /g·L ⁻¹	治疗		预防		药物病毒同时	
		A	抑制率 /%	A	抑制率 /%	A	抑制率 /%
病毒对照	-	0.347 ±0.069		0.620 ±0.064		0.830 ±0.045	
空白	-	0.674 ±0.041 ²⁾		0.927 ±0.022 ²⁾		1.374 ±0.035 ²⁾	
金黄 号	5	0.599 ±0.014 ¹⁾	80.66	0.918 ±0.019 ²⁾	99.89	1.295 ±0.089 ^{2,3)}	85.32
金银花	3.28	0.469 ±0.026 ^{4,6)}	39.25	0.872 ±0.038 ²⁾	84.63	1.287 ±0.045 ^{2,3)}	83.69
黄芪	0.74	0.571 ±0.020 ^{1,3)}	71.86	0.878 ±0.036 ²⁾	86.61	1.287 ±0.045 ^{2,3)}	83.83
浮小麦	9.38	0.502 ±0.024 ^{4,5)}	49.56	0.910 ±0.037 ²⁾	97.06	1.175 ±0.035 ^{2,4,6)}	62.91
大枣	16.25	0.591 ±0.077 ¹⁾	78.02	0.873 ±0.045 ²⁾	84.96	1.221 ±0.041 ^{2,4,5)}	71.44
利巴韦林	10 ⁻³	0.511 ±0.083 ⁴⁾	52.52	0.830 ±0.007 ^{2,4,6)}	70.8	1.288 ±0.033 ^{2,3)}	83.92

4 讨论

流感病毒是导致流感的主要病原体,它分为甲、乙、丙 3 型,其中甲型流感病毒是几次世界性流感流行的主要病原体,而且目前世界上流行的也多为甲型^[4]。病毒复制是一个连续过程,复制周期主要包括吸附和穿入、脱壳、生物合成、组装成熟和释放多个步骤。在体外试验中,病毒在不同传代细胞系中增殖特点不同,有些细胞不适于病毒的复制增殖,因此,选择适宜病毒增殖的细胞进行培养很重要。MDCK 细胞被认为是培养甲型和乙型流感病毒最合适的细胞系^[5],此细胞系具有感染后迅速产生流感病毒,在短时间内取得高滴度的特点,因此本研究选用 MDCK 细胞作为载体。

本研究通过治疗、预防以及感染病毒同时加药 3 种条件观察金黄 号和各单味药是否对流感病毒有增殖抑制、感染阻断或者直接抑制作用。试验结果提示,对 A1, A3 流感病毒,金黄 号在治疗、预防以及感染病毒同时加药 3 种条件下细胞存活量较病毒对照组均有显著提高,病毒对照组的细胞形态大量变圆,融合,坏死,脱落等,而金黄 号组的细胞形态接近正常组细胞,呈菱形或多边形,边界清晰,其抑制率高于单味药和利巴韦林对照组;除金银花、浮

小麦在治疗条件下对 A3 流感病毒的抑制作用不明显外,其余各单味药在 3 种条件下也表现出不同程度的抑制作用,但总体而言复方作用较单味明显。复方所显示的作用并非复方中 4 味药材的简单加和,这很可能是由于在制备复方的过程中方中的某些成分相互作用、发生了某种程度的化学变化所致,其可能原因还有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 刘华钢,冷静,朱丹. 金黄 1 号体外抗流感病毒作用研究[J]. 广西医科大学学报, 2006, 12(9): 44.
- [2] 郭元吉,王敏,王平,等. 影响花生凝集素对人流感病毒神经氨酸酶活性及其活性抑制测定的一些因素[J]. 试验和临床病毒学杂志, 1988, 2(3): 57.
- [3] 张均田. 现代药理试验方法(下册)[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1425.
- [4] 李际强,张奉学,符林春,等. 升降散在体外抗甲型流感病毒的作用与对病毒血凝滴度的影响[J]. 中医学刊, 2003, 21(2): 217.
- [5] Robertson J S. An overview of host cell selection[J]. Dev Biol Stand, 1999, 98: 7.

[责任编辑 何伟]