

热毒净在体外对 EB 病毒 抗原表达的抑制作用

刘晓红¹, 叶树清², 张忠浩^{1*}, 刘力戈¹,
杨春霞¹, 郑 杨¹, 王新佳¹,
詹少兵², 王 琦², 周 玲²

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院儿科,
北京 100050;
2. 中国预防医学科学院病毒病研究所
肿瘤研究室, 北京 100052)

传染性单核细胞增多症 (IM) 是儿童期常见 EB 病毒感染所致的传染性疾病, 目前尚无理想的治疗方法。我院儿科长期以来应用中药热毒净 (RDJ) 治疗 EB 引起的小儿传染性单核细胞增多症, 取得了较为满意的疗效^[1,2]。本实验研究了热毒净对 Raji 细胞 EB 病毒早期抗原表达的影响, 为热毒净的抗 EB 病毒作用提供新的依据。

1 材料

1.1 药物 热毒净口服液由北京友谊医院制剂室生产 (批号: 2005110401)。热毒净口服液由黄芪、青黛、丹皮、莪术等组成, 煎制方法: 饮片一起水浸泡后, 煎 2 次, 合并煎液, 浓缩, 酒沉过滤后, 灌封灭菌, 浓度为 $246 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 细胞株 Raji 细胞是携带 EB 病毒基因组的人 Burkitt's 淋巴瘤细胞株, 只表达 EB 病毒核抗原 (EBNA)。在正丁酸钠 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和巴豆油 $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的联合激发下可产生 EB 病毒早期抗原 EA (early antigen, EA), 由中国疾病预防控制中心病毒病所保株。

1.3 试剂 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgA (HRP-抗人 IgA) 购自卫生部北京生物制品研究所, 批号 20010401; RPMI-1640 培养基、台盼蓝购自 sigma 公司; 小牛血清购自北京元亨圣马公司, 批号 050926; 3-3' 二氨基联苯胺盐酸盐, 北京旭东化工厂生产, 批号 0D078-665。

2 方法

2.1 细胞存活率测定 台盼蓝拒染法在显微镜下观察, 测定热毒净对 Raji 细胞的最大无毒浓度。

2.2 Raji 细胞 EA 检测 分组与给药如表 1 所示。将待测的 Raji 细胞悬液 ($5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) 分装入培养试管。每个药物浓度设 2 个平行管, 同时加入正丁酸钠和巴豆油联合激发 EA 表达, 并设立了单纯加正丁酸钠组和单纯加巴豆油组, 不加其他任何试剂。培养 48 h 后收获细胞, 制成细胞涂片, 丙酮固定。加入适当浓度 EA 阳性人血清为一抗, 用辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgA (HRP-抗人 IgA) 为二抗, 3-3' 二氨基联苯胺盐酸盐染色, 每管细胞涂片, 在显微镜下计数 500 个细胞中 EA 阳性的细胞数。实验重复 1 次, 计算抑制率 (IR)。

2.3 统计方法 数据统计用 SPSS 10.0 软件。

3 结果

3.1 台盼蓝拒染法结果 热毒净对 Raji 细胞的最大无毒浓度为 $2.46 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2 热毒净口服液对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用
经正丁酸钠和巴豆油联合激发 EB 病毒抗原 EA 表达率为 11.6%, 热毒净的终浓度为 2.46, 0.492, 0.246, $0.0246 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达有抑制作用, 且抑制作用随浓度的增高而增强, 与激发加 NS 对照组比较有显

[收稿日期] 2006-12-12

[基金项目] 北京中医药科技项目资助 (JJ2005-7)

[通讯作者] * 张忠浩, Tel: (010) 63138407; E-mail: Lxhong50@sina.com

著性差异, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$, 表明热毒净对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达有较强的抑制作用, 见表。

表 热毒净对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	药物终浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	阳性细胞 (%)	IR (%)
正丁酸钠组	—	3.0 ²⁾	—
巴豆油组	—	1.6 ²⁾	—
激发+ NS 对照组	—	11.60 \pm 0.1	0
激发+ RDJ 组	2.46	1.25 \pm 0.5 ²⁾	89.22
	0.492	0.75 \pm 0.5 ²⁾	93.53
	0.246	2.05 \pm 0.6 ¹⁾	82.33
	0.024 6	3.95 \pm 0.8 ¹⁾	65.94

注: Raji 细胞激发: 正丁酸钠 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 巴豆油 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 各组与激发对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

4 讨论

近年来, EB 病毒引起的传染性单核细胞增多症发病率逐年上升, 发病年龄有小龄化趋势, 寻找无毒或低毒的抗 EB 病毒药物对预防和治疗 EB 病毒感染尤其传染性单核细胞增多症至关重要。我院研发的热毒净口服液主要由黄芪、青黛、丹皮、黄芩、莪术等组成, 则为清热解毒、益气养血、活血化瘀, 长期以来应用在小儿病毒感染^[1,2], 取得了一定的疗

效。

方中黄芩、青黛等清热解毒药具有抗感染作用, 黄芩增强白细胞的吞噬功能并促进淋巴细胞转化。清热解毒药与活血化瘀药合用, 还可加强清热解毒药的非特异性抗感染作用, 活血化瘀对机体的免疫功能有双重影响^[3]。黄芪具有补气升阳, 抗病毒作用。体外细胞实验证明黄芪提取液能抑制 B958 细胞 VCA 抗原的表达, 抑制效果好, 细胞毒性小^[4]。

本实验证明热毒净在无毒浓度下能抑制 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达, 表明热毒净对 EB 病毒有杀伤作用, 细胞毒作用较小, 为儿童防治 EB 病毒感染提供了新的途径。

[参考文献]

- [1] 张忠浩, 杨春霞. 热毒净治疗儿童传染性单核细胞增多症 35 例临床观察[J]. 中国临床医生, 2006, 34(4): 34-36.
- [2] 杨春霞, 阎田玉. 热毒净治疗流感病毒上呼吸道感染的临床研究[J]. 北京中医, 2000, (4): 17-18.
- [3] 马继东. 解毒通瘀汤治疗重症传染性单核细胞增多症[J]. 中医药研究, 1991, (3): 44-46.
- [4] 崔英, 邝国乾, 岳惠芬. 黄芪抑制 EB 病毒壳抗原在体外细胞中表达的作用[J]. 广西医科大学学报, 2001, 18(6): 791-793.