

抗病毒滴丸抗病毒作用的实验研究

付萍^{1*}, 杨铭¹, 陈颖丽¹, 李伟¹, 王清¹, 李凡²

(1. 吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 研究抗病毒滴丸体内、体外的抗病毒作用。方法: 采用组织细胞培养法、血凝法和建立流行性感胃动物模型, 对不同浓度的抗病毒滴丸与胶囊进行体内、外抗病毒实验研究。结果: 抗病毒滴丸体外在 0.781 g/L~0.390 g/L 浓度范围内具有明显抑制流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒 3 型、副流感病毒和单纯疱疹病毒 I 型的致细胞病变作用, 但对柯萨奇 B3 病毒作用不明显。抗病毒滴丸内在 10 g/kg~5 g/kg 的剂量范围内亦具有较明显抗流行性感胃病毒的作用。结论: 抗病毒滴丸体内体外均有明显的抗病毒作用。

[关键词] 抗病毒滴丸; 抗病毒作用; 流感动物模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0046-03

The Study of the Antivirus Action by the Antivirus Dripping Pills

FU Ping^{1*}, YANG Ming¹, CHEN Ying-li¹, LI Wei¹, WANG Qing¹, LI Fan²

(1. Jilin Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China;

2. Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the actions of the antivirus dripping pills. **Methods:** The study was carried out by using tissue-cell culture, hemagglutination and establishment of the animal model of epidemic catarrhal fever. **Results:** Antivirus dripping pills can obviously inhibit the action of cell mutation on influenza virus, chimpanzee coryza agent, the third type of adenovirus, parainfluenza virus and N1 type of fever blisters virus in 0.781 g/L~0.390 g/L. Cytopathogenic effect for B₃ Coxsackie virus was not found. The experimental result of in vivo antivirus indicated that the drug can be effective for suppression influenza virus, and the dosage range from 5 g/kg to 10 g/kg. **Conclusion:** The Antivirus dripping pills can obviously inhibit influenza virus.

[Key words] Antivirus Dripping Pills; antivirus action; animal model of epidemic catarrh

1 材料

1.1 药物 抗病毒滴丸, 由吉林省中医中药研究院剂型室提供, 批号: 030315, 主要由板蓝根、石膏、生地、广藿香、连翘、芦根、郁金、石菖蒲、知母等药味组成, 系抗病毒胶囊原方经现代工艺提取精制后改进而成。抗病毒胶囊, 4 g 生药/g, 由吉林省中医中药研究院剂型室提供, 批号: 030301。药物溶解后, 滤过除菌, 调整 pH 为 7.5, 分装后贮于 4℃ 冰箱中备

用, 用于体内外抗病毒试验。

1.2 细胞株 HeLa(宫颈癌细胞)由吉林大学基础医学院病原生物教研室保存。HeP-2(喉癌细胞)购于卫生部药品生物制品检定所。

1.3 病毒株 流感病毒 FM₁ 株, 购于预防医学科学院病毒研究所; 呼吸道合胞病毒(RSV), 来源于预防医学科学院病毒所; 腺病毒 3 型(AdV-3), 来源于吉林大学第一附属医院儿科研究室。柯萨奇病毒 B₃(CVB₃) 株, 来源于美国, 为吉林大学基础医学院病原生物教研室保存; 副流感病毒, 购于吉林大学预防医学科学院病毒研究所; 单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1) SM₄₄ 株, 购于卫生部药品生物制品检定所。

[收稿日期] 2006-08-28

[通讯作者] * 付萍, Tel: (0431) 86816830; E-mail: pingfu1234@163.com

1.4 主要试剂 培养基,IMDM 为美国 Sigma 产品;胎牛血清,长春生物制品研究所产品;胰蛋白酶,日本生产,上海化学试剂厂分装。

1.5 实验动物 Swiss 小鼠,3~4 周龄,体重 18~22 g,雌雄各半,由吉林大学白求恩医学部实验动物中心提供,医动字第 10-5219 号。

2 方法

2.1 细胞准备 Hep-2 Hela 传代细胞培养 3~5 d,用胰酶消化,用培养液稀释至约 $5 \times 10^7/L$ 后,接种于 96 孔培养板内,待细胞长成单层。

2.2 药物毒性测定 细胞毒性试验:将抗病毒滴丸药粉及阳性药抗病毒胶囊用培养液稀释好的不同浓度的药液滴加于 Hep-2 和 Hela 单层细胞上,每孔 0.2 mL,37 °C 5% CO₂ 孵箱培养,每天镜下观察细胞病变(CPE),求出药液致细胞毒性,计算药物对细胞毒性浓度。

2.3 药物对病毒致细胞病变作用的影响 在 Hep-2 Hela 细胞上分别加入 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 不同浓度的 6 种病毒液,吸附 1 h 后洗去病毒液,加入无毒界限药液,每一病毒稀释度各加 3 复孔,同时设病毒对照,细胞对照,阳性药物对照组。置 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养,在不同时间换入同浓度药物,每天在倒置显微镜下观察病变,连续 7 d,记录各孔病变情况。计算出抑制细胞病毒的感染量,细胞病变抑制率,半数有效浓度(IC₅₀) 和治疗指数(TI)。

2.4 各种病毒 TCID₅₀ 的测定 将各种病毒进行 10 倍递减稀释为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 不同稀释度,并将各种不同稀释度的病毒感染 Hep-2 Hela 细胞,用 96 孔板单层培养。观察细胞病变,测定各病毒半数致细胞病变剂量(TCID₅₀)。

2.5 结果判定及计算方法 以能使 50% 细胞孔发生 CPE 的最高稀释度作为终点,用 karber 法计算病毒滴度。

2.6 体内抗病毒试验

2.6.1 病毒毒力测定 乙醚麻醉小鼠,滴鼻感染,每鼻孔不同稀释度病毒 0.03 mL,记录死亡百分数,计算 LD₅₀。

2.6.2 药物毒性测定 小鼠急性毒性和亚急性毒性,计算 LD₅₀ 及 LD₀。

2.6.3 抗病毒试验 小鼠随机分组,10 只/组,于感染前一天开始灌胃给药,连续 5 d,对照组灌服相同体积的蒸馏水。对照组在乙醚浅麻醉下滴鼻感染流

感病毒鼠肺适应株 FM₁15LD₅₀,分别记录,于感染后 96 h 解剖,取肺称重,逐个算出肺指数值,与模型对照组比较,进行组间 *t* 检验,根据统计学意义判断效果。

2.6.4 肺病变组织学和病理学检查 取各试验组鼠肺,固定、包埋、切片染色、镜检。

2.6.5 血凝试验检测鼠肺流感病毒增殖和抗原滴度 动物分组、药物剂量、给药方法、病毒感染同 2.6.3。感染病毒 72 h 后,脱颈处死小鼠,解剖取肺,组织匀浆器研磨,生理盐水制成 10% 的肺组织悬液,离心取上清,倍比稀释,按 0.2 mL/孔滴于滴定板上后,每孔加入 0.2 mL 1% 鸡红细胞悬液,混匀,置室温 30 min,观察记录血凝滴度。以红细胞凝集(++) 时为终点,并以悬液稀释倍数表示其滴度。

3 结果

3.1 各种病毒的 TCID₅₀ 结果见表 1。

表 1 各种病毒的 TCID₅₀

病毒名称	流感病毒 FM ₁	CVB ₃	HSV-1SM ₄₄	AdV-3	RSV	副流感病毒
TCID ₅₀	10^{-4}	10^{-5}	$10^{-4.8}$	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}

3.2 药物毒性的测定

3.2.1 药物对细胞毒性测定结果 抗病毒滴丸对 Hep-2 和 Hela 细胞最大无毒浓度(TC₀) 为 0.785 g/L (相当于生药 17.741 g/L),半数毒性浓度(TC₅₀) 为 8.815 g/L(相当于生药 199.219 g/L)。阳性药抗病毒胶囊对 Hep-2 和 Hela 细胞最大无毒浓度(TC₀) 为 1.603 g/L(相当于生药 6.412 g/L),半数毒性浓度(TC₅₀) 为 20.889 g/L(相当于生药 83.556 g/L)。

3.2.2 动物毒性测定结果 抗病毒滴丸及抗病毒胶囊急性毒性半数致死剂量(LD₅₀) 按最大给药浓度和小鼠的最大灌胃容积无法求出,求得抗病毒滴丸 1 次灌胃给药最大耐受量(MTD) 大于 226 g 生药/kg,抗病毒胶囊 1 次灌胃给药最大耐受量(MTD) 大于 40 g 生药/kg。

3.3 抗病毒滴丸对病毒致细胞病变保护作用结果

6 种病毒在感染 30~100TCID₅₀ 的情况下,抗病毒滴丸在 0.390~0.781 g/L 的浓度范围,对流感病毒、腺病毒 3 型、副流感病毒、呼吸道合胞病毒和单纯疱疹病毒 I 型有明显的抑制其致细胞病变作用,对柯萨奇病毒 B₃ 作用不明显,其作用结果详见表 2。

表 2 抗病毒滴丸对病毒致细胞病变作用的影响

病毒株	感染量	抗病毒滴丸(g/L)						病毒对照	细胞对照
		1.562	0.781	0.390	0.195	0.098	TCID ₅₀		
流感 FM ₁	100	-	-	±	+	++	++++	-	
CVB ₃	30	±	±	+	++	+++	++++	-	
AdV-3	100	±	-	±	+	++	++++	-	
副流感	100	-	-	-	±	+	++++	-	
RSV	50	-	-	-	±	+	++++	-	
HSV-1	30	-	-	+	+	++	++++	-	

注: - 示无细胞病变; ± 示有延缓细胞病变作用; + 示 1/4 以下的细胞病变; ++ 示 1/4~ 1/2 的细胞有病变; +++ 示 1/2~ 3/4 的细胞有病变; ++++ 示 3/4 以上的细胞有病变。

3.4 对小鼠流感病毒性肺炎的影响

3.4.1 抗病毒滴丸对小鼠肺炎的影响 采用 EXCEL 统计软件, 进行两组均数 *t* 检验, 在生药 5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 及以上剂量, 均有显著的治疗作用, 详见表 3。

表 3 抗病毒滴丸对小鼠流感病毒性肺炎的作用
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g 生药·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	肺指数 (g/g × 100%)	肺病变减轻率 (%)
病毒对照	—	1.423 ± 0.070	0
正常对照	—	1.294 ± 0.073	—
抗病毒胶囊	10	1.358 ± 0.152	4.57
抗病毒滴丸	10	1.254 ± 0.117 ²⁾	11.88
	5	1.260 ± 0.101 ²⁾	11.45
	2.5	1.375 ± 0.073	3.37

注: 与病毒对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。(下同)

3.4.2 肺病变组织学和病理学检测结果 病毒性肺炎模型组镜下可见: 支气管、细支气管壁、肺泡壁等肺间质充血、水肿以及淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺泡壁增宽, 肺泡呈炎症反应。抗病毒滴丸治疗各

组鼠肺病变明显减轻, 部分肺组织形态结构正常, 最佳治疗剂量为 10, 5 g 生药/kg。

3.4.3 小鼠肺组织中病毒抗原滴度测定 血凝试验结果见表 4。

表 4 抗病毒滴丸对流感病毒性肺炎小鼠肺组织血凝滴度的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g 生药·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	血凝滴度	抑制率 (%)
病毒对照	—	32.00 ± 10.33	0
正常对照	—	0.00	—
抗病毒胶囊	10	26.00 ± 9.66	18.75
抗病毒滴丸	10	14.50 ± 4.38 ²⁾	54.69
	5	16.00 ± 4.59 ²⁾	50.00
	2.5	28.40 ± 3.23	11.25

从上表可见, 抗病毒滴丸(10, 5 g 生药/kg) 组, 鼠肺中流感病毒滴度明显低于病毒对照组。

4 结论

抗病毒滴丸在体外有明显的抑制流行性感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒 3 型、单纯疱疹病毒和副流感病毒的作用。对柯萨奇 B₃ 作用不明显。体内抗病毒试验结果显示, 抗病毒滴丸可有效的抑制流行性感病毒所致的病毒性肺炎, 与模型对照组比较, 差异显著, 其作用效果优于抗病毒胶囊。关于该药抗病毒的作用机理有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 李凡. 医学微生物学[M]. 吉林: 高等教育出版社, 2002. 236.
- [2] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编[S]. 北京, 1993. 162.
- [3] 谢鸣. 中药咳宁冲剂抗病毒作用的研究[J]. 中药新药与临床药理, 1997, 8(3): 144.