

三黄制剂抗菌、抗病毒作用的实验研究

杨安平^{1*}, 刘爱平¹, 岑志芳¹, 王宗伟²

(1. 佛山科学技术学院医学院, 广东 佛山 528000; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

[摘要] 目的: 研究三黄制剂的抗菌、抗病毒作用。方法: 通过液体试管法, 观察三黄制剂对引起呼吸道感染的常见病原菌和条件致病菌的抑制作用, 并通过体内与体外抗病毒试验观察三黄制剂对引起呼吸道感染常见病毒的抑制作用。结果: 三黄制剂对八种引起呼吸道感染的常见病原菌和条件致病菌均有不同程度的抑制作用, 并对流感病毒所致小鼠肺脂数升高有显著抑制作用, 体外对鼻病毒、呼吸道合胞病毒、甲 I 型流感病毒均有明显的抑制作用。结论: 三黄制剂有明确的体外抗菌和体内外抗病毒效果。

[关键词] 三黄制剂; 抗菌; 抗病毒

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)07-0050-03

三黄制剂由中药黄连、黄芩、黄芪(3:2:1)经过加水提取、浓缩而成的中药浸膏剂, 每 g 浸膏相当于 5g 原生药, 其质量控制指标为其中有效成分黄连素、黄芩甙和黄芪多糖。我们对三黄制剂进行了抗菌、抗病毒作用的研究。现将结果报告如下:

1 材料

1.1 试剂及药品 三黄制剂, 自配, 临用时以蒸馏

水稀释至所需浓度。双黄连口服液为河南竹林众生制药有限公司产品(未标明生药含量), 批号 0002004。阳性对照药病毒唑由湖北医药工业研究所提供, 批号 0202011。

1.2 动物 NIH 小鼠, 体重 13~15g, 雌雄各半, 由广东省医学实验动物中心提供。动物饲料为广州中医药大学实验动物中心提供的富含多种成分的配方。饲养环境: 室温为 23±2℃, 相对湿度主萎 75±10%。

1.3 菌种 引起呼吸道感染的常见病原菌和条件致病菌共 8 种, 即金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、甲型溶血性链球菌、肺炎链球菌、白喉棒状杆菌、

[收稿日期] 2005-10-24

[通讯作者] 杨安平, Tel: (0757) 82196442; E-mail: foshanyap@163.com

大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌。菌种均来自北京卫生部生物制品研究所。

1.4 病毒种

1.4.1 甲I型流感病毒 FM1 鼠肺适应株，由中国药品生物制品检定所提供。经小鼠增强毒力后，于鸡胚尿囊传代2次。并测定其半数致死量。

1.4.2 鼻病毒 鼻病毒 R14 型，由中国医学科学院病毒所惠赠。在人胚肺细胞中传代，于37℃，5% CO₂ 孵箱中培养。

1.4.3 流感病毒 流感病毒 FM1 株，由中国医学科学院医药生物技术研究所提供，于MDCK 狗肾细胞传代，以病变及鸡红血球血凝法来判断其滴度，在37℃，5% CO₂ 孵箱中培养。

1.4.4 呼吸道合胞病毒 由香港中文大学提供。为RSV-Long 株，于Hep-2 细胞上扩增，并进行测定。

2 方法

2.1 体外抗菌试验^[1] 采用液体试管法。三黄制剂及双黄连口服液均用肉膏汤对倍稀释，从1:2.5起连续对倍稀释至1:320共8个药物浓度，三黄制剂每mL含生药量分别为 4×10^{-1} g, 2×10^{-1} g, 1×10^{-1} g, 5×10^{-2} g, 2.5×10^{-2} g, 1.25×10^{-2} g, 6.25×10^{-3} g, 3.125×10^{-3} g。对链球菌的试验尚需在灭菌药液中另加1%葡萄糖，肺炎链球菌和白喉棒状杆菌加10%灭活新鲜兔血清，对白色念珠菌的试验则应用沙保氏培养液稀释药物。空白对照为不含药物的培养基。

每排药液的各个浓度管分别加入 10^3 个/mL的试验菌液(6~8h培养物)0.1mL, 37℃培养18h观察结果。对白色念珠菌的试验则用24h培养物，室温培养48h观察结果。判定最小抑菌浓度(MIC) MIC是指完全抑制试验菌生长所需的最小药物浓度。

2.2 体内抗流感病毒试验^[2,3]

2.2.1 稀释病毒 试验前，取流感毒种用流水冲浸融化，以无菌盐水稀释成每0.05mL含15个LD₅₀，放冰水中保存。

2.2.2 感染小鼠 小鼠均匀分组，分为阳性药物组、流感病毒对照组及试验药物组，雌雄各半。在乙醚轻度麻醉下，用已滴定的流感病毒液滴鼻感染，每鼠4滴，约0.05mL。同时设正常小鼠对照组。

2.2.3 给药 三黄制剂按比例配制成高(含生药64g/kg)、中(含生药32g/kg)、低(含生药16g/kg)3个剂量组给药，阳性对照药病毒唑腹腔注射，给药前无

菌过滤。以上药物均在病毒攻击前1d开始给药。共给药4d，每d1次。

2.2.4 测定肺指数 感染后4d，杀剖小鼠，杀剖前禁食禁水4h以上，称小鼠体重，处死后取出肺，记录病变程度，将肺放在盛有0.9%生理盐水的平碟中洗涤两次，用吸水纸吸干表面水分后称肺重。按以下公式算出肺指数与抑制率：

$$\text{肺指数} = \frac{\text{小鼠肺重(g)}}{\text{小鼠体重(g)}} \times 100$$

肺指数抑制率=

$$\frac{\text{病毒对照组平均肺指数} - \text{实验组平均肺指数}}{\text{病毒对照组平均肺指数}} \times 100$$

2.2.5 统计学处理 对所得实验数据进行t检验。

2.3 体外抗呼吸道流感病毒试验^[2,3] 病毒试验在96孔微量板上进行，每孔0.1mL，细胞数为 3×10^5 个/mL。待Hep-2细胞长成单层后，将三黄制剂用Eagle's培养液稀释成不同浓度，抛掉原培养液后将不同浓度药物加入细胞孔中，每孔0.1mL，每个稀释度药液做3个复孔。以细胞不出现病变的最小稀释度为该药液对细胞的无毒界限。用此无毒浓度进行药物的抗病毒实验，同时在细胞上测定攻击病毒之TCID₅₀。试验时设病毒对照、细胞对照、药物毒性对照及阳性药对照。将细胞培养板置37℃、5% CO₂ 孵箱中培养，每天在倒置显微镜下观察病变并记录。当病毒对照孔细胞出现+++病变时，继续观察4d则终止。细胞出现病变的程度按6级标准记录：
--：细胞生长正常，无病变出现；±细胞病变少于整个单层细胞的10%；+：细胞病变少于整个单层细胞的25%；++：细胞病变少于整个单层细胞的50%；+++：细胞病变少于整个单层细胞的75%；++++：细胞病变大于整个单层细胞的75%。每项实验均重复两次，取平均值。

3 结果

3.1 体外抗菌作用 试验结果表明，三黄制剂对8种引起呼吸道感染的病原菌和条件致病菌均有不同程度的抗菌作用，其最小抑菌浓度MIC(g/mL)分别为：金黄色葡萄球菌0.025，乙型溶血性链球菌0.025，甲型溶血性链球菌0.20，肺炎链球菌0.025，白喉棒状杆菌0.05，大肠埃氏菌0.20，铜绿假单胞菌0.20，白色念珠菌0.40。即三黄制剂对各菌的MIC介于0.025~0.40g/mL之间，其中对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌和肺炎球菌作用较强；对白喉棒状杆菌的作用次之。双黄连口服液对上述8种细

菌的 MIC 依次为: 0.006, 0.025, 0.40, 0.40, 0.10, 0.40, 0.40 和 0.40。三黄制剂对除金黄色葡萄球菌以外的其它病菌的抑制作用均强于双黄连口服液或与之相当。

3.2 体内抗病毒作用 由表 1 可见, 三黄制剂不同剂量对流感病毒所致小鼠肺指数升高均有显著抑制作用, 其中以中剂量组作用最为显著, 提示该药有良好的抗病毒作用。

表 1 三黄制剂对小鼠实验感染流感病毒的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	(n)	肺指数值	抑制率(%)
正常对照组	-	16	0.82 ± 0.12 ¹⁾	-
病毒对照组	-	15	1.65 ± 0.41	-
三黄制剂高剂量组	64	14	1.17 ± 0.25 ¹⁾	29
三黄制剂中剂量组	32	15	0.93 ± 0.14 ¹⁾	43.6
三黄制剂低剂量组	16	13	1.11 ± 0.22 ¹⁾	32.7
病毒唑阳性对照组	0.07	15	0.94 ± 0.29 ¹⁾	43

注: 与病毒对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 三黄制剂对体外呼吸道病毒作用的影响

病毒株	感染量 TCID ₅₀	病毒完全抑制浓度(mg/mL)	
		病毒唑	三黄制剂
鼻病毒	100	1	0.39
呼吸道合胞病毒	30	0.25	0.71
流感病毒	100	0.0125	0.78

3.3 体外抗病毒作用 结果见表 2, 当用三黄制剂的无毒浓度进行抗病毒试验时, 阳性对照药病毒唑和该药对 3 种病毒均有明显的抑制作用。

4 小结

研究结果表明, 三黄制剂体外对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、甲型溶血性链球菌、肺炎链球菌、白喉棒状杆菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌等 8 种引起呼吸道感染的病原菌和条件致病菌有明显抑制的作用, 同时体内对流感病毒和体外对鼻病毒、呼吸道合胞病毒、甲 I 型流感病毒等引起呼吸道感染的常见病毒均有显著抑制作用。

三黄制剂有明确的体外抗菌和体内外抗病毒效果。

[参考文献]

- [1] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1314.
- [2] 卫生部药政管理局. 中药新药研究指南(药学·药理·毒理学)[S]. 1994. 67, 120.
- [3] 富杭育. 正柴胡饮对流感病毒和致病菌作用的实验研究[J]. 中药通报, 1986, 11(4): 47.