

金黄 I 号体外抗流感病毒作用研究

刘华钢*, 冷 静, 朱 丹
(广西医科大学, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的: 探讨中药复方金黄 I 号体外对流感病毒(A1、A3)抑制作用, 为临床合理用药提供科学依据。方法: 建立体外病毒感染模型, 通过三神给药方式, 采用细胞病变法(CPE)和 MTT 法观察金黄 I 号对流感病毒感染细胞的保护作用。结果: 金黄 I 号在先感染病毒后加药、先加药后感染病毒、感染病毒同时加药三种给药方式下对 A1、A3 病毒感染的细胞存活量均高于病毒对照组。结论: 金黄 I 号具有体外抗流感病毒作用, 其作用机制是多途径的。

[关键词] 金黄 I 号; 体外; 抗流感病毒

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)09-0044-04

Effect of JINHUANG-1 on in Vitro Anti-influenza Virus

LIUHua-gang, LENG Jing, ZHU Dan
(Guangxi Medical University, Guangxi Nanning 53021, China)

[Abstract] **Objective:** This study is to investigate the inhibitory effect of JINHUANG-1 against influenza(A1、A3) virus in vitro and provide a basis to clinical application. **Methods:** CPE and MTT were applied to observe the protective

[收稿日期] 2006-01-04

[基金项目] 本课题获广西科学研究与技术开发计划项目资助(桂科攻 0332007)

[通讯作者] * 刘华钢, Tel: (0771) 5350964; E-mail: hgliu@263.net

function of JINHUANG-1 administered in three different ways (administration after infection, administration before infection, administration upon infection) cells infected with influenza virus established in vitro infection model. **Results:** There is a significant difference between the JINHUANG-1 group in all three administered ways and the control group. **Conclusion:** JINHUANG-1 has anti-influenza function in vitro and the mechanism is to be further investigated.

[**Key words**] JINHUANG-1; in vitro; anti-influenza virus

流行性感冒是由流行性感冒病毒 (influenza virus, 简称流感病毒) 引起的急性上呼吸道传染病。流感病毒易引发严重的并发症。由于其表面抗原经常不断发生变异, 使本来有效的流感病毒疫苗很快失效^[1]。常用的防治流感的西药存在着毒副作用的问题^[2,3]。本实验采用细胞培养技术对金黄 I 号体外抗流感病毒 A1 A3 作用进行研究, 为开发中药汤剂金黄 I 号提供实验依据。现报告如下。

1 材料

1.1 实验药物 金黄 I 号的配制由广西中医药研究所完成。处方由金银花、黄芪、浮小麦、大枣组成, 将以上四味中药煎煮二次, 合并煎煮液, 滤过, 滤液浓缩至浸膏。采用 HPLC 法进行有效成份绿原酸的含量测定, 本品每 g 含金银花以绿原酸 (C₁₆H₁₈O₉) 计, 不得少于 5mg。实验前金黄 I 号配制为含生药浓度 1g/mL 的药液, 先经 0.45μm 的微孔滤膜, 再经 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌后, 置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 阳性对照药 利巴韦林 (Ribavirin) 注射液, 含量为 100mg/mL, 批号 20041023, 湖北天药药业股份有限公司。

1.3 细胞 狗肾传代细胞 (MDCK), 广州中医药大学病毒学教研室赠送。培养基 DMEM (Dulbecco's Modifide Eagle's Medium), 美国 Hyclone 公司产品; DMEM 生长液含: 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100μg/mL 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; 用于抗流感病毒实验时的维持液 2: 不含胎牛血清, 含 2μg/mL 胰酶的 DMEM, 其他同生长液。

1.4 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℃ 孵育 72h 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℃ 冰箱保存待用。

2 实验方法

2.1 病毒毒力测定 将病毒悬液用维持液 2 做 10

倍稀释为 10⁻¹ 到 10⁻⁸ 共 8 个稀释度, 加入 MDCK 细胞已长成单层的 96 孔板中, 每个病毒稀释度接种 4 孔, 每孔 100μL, 35℃, 5% CO₂ 中孵育 2h, 弃病毒液, 用 Hank's 洗板两次, 最后一次控干并加入 100μL 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 (CPE), 培养液中红细胞凝集活性 (HA) 按国家流感中心建立的方法^[4] 测定红细胞凝集效价: 从实验的各孔取 25μL 培养液, 加入 96 孔塑料孔板中, 加入 25μL 配制好的 1% 豚鼠红细胞悬液, 相混后置 4℃ 30~ 60min, 观察 HA。计算半数感染量 TCID₅₀。

2.2 药物毒性测定 将已过滤除菌的实验药液 (金黄 I 号) 及阳性对照药利巴韦林用维持液 1 做 2 倍稀释, 加入已长成单层细胞的 96 孔中, 同时设空白组, 将各浓度药液加入细胞培养板中, 每个浓度 4 孔, 每孔 100μL。于 37℃, 5% CO₂ 温箱中培养 3~ 5 天, 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^[5] (MTT 法)

2.3.1 I 先感染病毒后给药 (治疗给药方式) 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 100μL, 于 35℃, 5% CO₂ 孵箱中吸附 1.5h 感染细胞, 弃病毒液, 用 Hank's 洗板两次, 控干。各药物均从最大无毒浓度开始用维持液 1 做 2 倍稀释, 各稀释 5 个浓度, 将各浓度药物加入已经感染的细胞板中, 每浓度 4 孔, 每孔 100μL, 同时设空白组, 病毒对照组, 利巴韦林对照组。于 37℃, 5% CO₂ 中孵育 24h。将板中的培养液弃去, 用 Hank's 洗板两次, 控干, 加入维持液 1, 每孔 100μL, 观察细胞病变。当病毒对照孔出现最大程度病变时, 加入 MTT (5g/L) 每孔 20μL, 37℃, 5% CO₂ 中孵育 5h。将细胞板中的培养液弃去, 控干, 加入 DMSO 每孔 150μL, 振荡, 作用 10min。酶标仪测 OD 值 (570nm), 空白孔调零。计算抑制率。

2.3.2 II 先给药后感染病毒 (预防给药方式) 各药物均从最大无毒浓度开始用维持液 1 做 2 倍稀

释,各稀释 5 个浓度,将各浓度药物加入已长成单层细胞的 96 孔中,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 中孵育 24h。将板中的培养液弃去,用 Hank's 洗板两次,控干,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 μ L,于 35 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱中吸附 1.5h 感染细胞,弃病毒液,用 Hank's 洗板两次,控干。加入维持液 1,每孔 100 μ L,观察细胞病变。当病毒对照孔出现最大程度病变时,加入 MTT 每孔 20 μ L,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 中孵育 5h。将细胞板中的培养液弃去,控干,加入 DMSO 每孔 150 μ L,振荡,作用 10min。酶标仪测 OD 值(570nm),空白孔调零。计算抑制率。

2.3.3 III 药物与病毒同时作用 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,药物和病毒浓度与 2.3.1 均保持一致。计算抑制率。

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

2.4 统计方法 Reed-muench^[6] 法计算病毒半数感染量(TCID₅₀)和药物最大无毒浓度(TC₀)。

3 结果

3.1 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 根据细胞病变(CPE)得出最大无毒浓度(TC₀) 金黄 I 号为 5mg/mL,利巴韦林为 10 μ g/mL。各药在 TC₀ 以上细胞有不同程度圆缩、脱落,而在 TC₀ 以下无明显 CPE 出现。复方以 TC₀ 起始向下做 5 个对倍稀释做药物抗病毒实验。阳性药利巴韦林取 TC₀ 做药物抗病毒实验。

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 I 号各浓度及利巴韦林在三种用药方式下与病毒对照组比较均有显著差异($P < 0.01$);在给药方式 I、II、III 时,金黄 I 号在浓度分别大于 2.5mg/mL、0.63mg/mL、0.31mg/mL 时对病毒的抑制率高于利巴韦林对照组;在用药方式 III 下金黄 I 号各浓度与空白对照组比较无显著差异($P > 0.05$);从给药方式看,三种用药方式比较均有显著差异($P < 0.05$),药物与病毒同时作用时抑制率高于其他两种作用方式,提示药物可能通过直接接触抑制病毒发挥作用(见表 1)。

表 1 药物在三种作用方式下对 A1 流感病毒的抑制作用($n = 4$)

药物	浓度	I 先感染病毒后给药		II 先给药后感染病毒		III 药物病毒同时作用	
		OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
空白	—	0.607 \pm 0.004	—	0.882 \pm 0.014	—	1.513 \pm 0.032	—
病毒对照	—	0.255 \pm 0.010	0	0.358 \pm 0.032	0	0.871 \pm 0.002	0
金黄 I 号 (mg/mL)	5	0.501 \pm 0.018 ^{2,4)}	68.91	0.700 \pm 0.010 ^{2,4)}	65.25	1.416 \pm 0.112 ²⁾	85.03
	2.5	0.482 \pm 0.020 ^{2,4)}	63.45	0.687 \pm 0.031 ^{2,4)}	62.77	1.386 \pm 0.073 ²⁾	81.48
	1.25	0.468 \pm 0.035 ^{2,4)}	59.76	0.621 \pm 0.015 ^{2,4)}	50.19	1.297 \pm 0.228 ²⁾	80.31
	0.63	0.452 \pm 0.035 ^{2,4)}	55.18	0.601 \pm 0.009 ^{2,4)}	46.31	1.214 \pm 0.329 ²⁾	68.56
	0.31	0.383 \pm 0.031 ^{2,4)}	35.92	0.561 \pm 0.008 ^{2,4)}	38.69	1.161 \pm 0.332 ²⁾	66.42
利巴韦林 (μ g/mL)	10	0.470 \pm 0.043 ^{2,4)}	60.08	0.575 \pm 0.006 ^{2,4)}	41.33	1.209 \pm 0.088 ^{2,4)}	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⁾ $P < 0.01$ 。

3.3.2 对 A3 流感病毒 金黄 I 号各浓度及利巴韦林在用药方式 I 下与病毒对照组比较有显著差异($P < 0.05$),在用药方式 II、III 下与病毒对照组比较也有显著差异($P < 0.01$);在给药方式 I、II、III 时,金黄 I 号在浓度分别大于 0.31mg/mL、0.31mg/mL、

5mg/mL 时对病毒的抑制率高于利巴韦林对照组;从给药方式看,三种用药方式比较均有显著差异($P < 0.05$),先给药后感染病毒时对病毒的抑制率高于其他两种用药方式,提示药物可能通过预防病毒感染方式发挥作用(见表 2)。

表 2 药物在三种作用方式下对 A3 流感病毒的抑制作用 (n = 4)

药物	浓度	I 先感染病毒后给药		II 先给药后感染病毒		III 药物病毒同时作用	
		OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
空白	—	0.674 ± 0.041	—	0.927 ± 0.022	—	1.374 ± 0.035	—
病毒对照	—	0.347 ± 0.069	0	0.620 ± 0.064	0	0.830 ± 0.045	0
金黄 I (mg/mL)	5	0.599 ± 0.014 ¹⁾	80.66	0.918 ± 0.019 ²⁾	99.89	1.295 ± 0.089 ²⁾	85.32
	2.5	0.559 ± 0.008 ¹⁾	73.81	0.914 ± 0.050 ²⁾	98.35	1.268 ± 0.075 ^{2,3)}	80.29
	1.25	0.544 ± 0.036 ^{1,3)}	66.67	0.910 ± 0.003 ²⁾	98.13	1.246 ± 0.020 ^{2,4)}	76.14
	0.63	0.537 ± 0.015 ^{1,4)}	66.03	0.875 ± 0.021 ²⁾	91.99	1.235 ± 0.044 ^{2,4)}	74.09
	0.31	0.516 ± 0.057 ^{1,4)}	60.83	0.869 ± 0.077 ^{2,3)}	85.46	1.226 ± 0.039 ^{2,4)}	72.46
利巴韦林 (μg/mL)	10	0.510 ± 0.038 ^{2,4)}	52.52	0.830 ± 0.007 ^{2,4)}	70.8	1.288 ± 0.033 ^{2,4)}	83.92

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。

4 讨论

流感病毒是导致流感的主要病原体,它分为甲、乙、丙三型,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^[7]。我们想通过先感染病毒后加药的加药方式观察药物是否具有对病毒的增殖抑制作用;先加药后感染病毒的加药方式观察药物是否能预防病毒感染;通过感染病毒同时加药观察药物是否具有直接接触抑制病毒的作用,因此,金黄 I 号的加药方式分为先感染病毒后加药、先加药后感染病毒、感染病毒同时加药三种来分别观察药物是否对呼吸道病毒有增殖抑制、感染阻断或者直接抑制作用。实验结果提示,对于 A1 病毒,药物可能主要通过直接接触并抑制病毒,发挥直接灭活作用;对于 A3 病毒,药物可能主要通过进入细胞或吸附于细胞表面,以阻止病毒的吸附与穿入,发挥预防病毒感染作用。

本文主要是从流感病毒敏感细胞株 MDCK 细胞体外培养,观察金黄 I 号汤剂对甲型流感病毒抑制作用方面进行探讨。实验中选用的阳性药利巴韦林为广谱抗病毒制剂,常用作抗呼吸道病毒研究的阳性对照药,它不仅作用于病毒复制早期,还可影响病毒晚期功能的表达,具有活性强,毒副作用较小的特点^[8]。

金黄 I 号是由金银花、黄芪、大枣等数味中药组成,本课题组曾有关于复方合剂金黄 I 号对 SARS 患者治疗前后的免疫功能状态的变化的报道^[9],结果显示金黄 I 号能显著提高 SARS 患者 IL-2、IFN-γ 产生水平,促进 T 细胞免疫功能的恢复,从而起到治疗 SARS 的作用。本实验结果显示,金黄 I 号在上述三种给药方式下对 A1、A3 病毒感染的细胞在一

定程度上能提高其存活率,为金黄 I 号的临床应用提供了部分实验室依据。该结果提示,金黄 I 号具有一定的体外抗病毒作用,其抗流感病毒的机制是多途径的。

[参考文献]

- [1] 王敏,安乃莉,李琼,等.中草药福青在狗肾传代细胞中抗流感病毒的活性[J].中华实验和临床病毒学杂志,1996,10(2):177-181.
- [2] James WT, Cohen S, Charles A B, et al. Summary of the III International Consensus Symposium on Combined Antiviral Therapy[J]. Antiviral Research, 1998, 38(1):75-93.
- [3] Christoph S, Robert GW. Long-term stability of the anti-influenza A compounds amantadine and rimantadine[J]. Antiviral Research, 1998, 38(3):213-215.
- [4] 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].实验和临床病毒学杂志,1988,2(3):57-60.
- [5] 张均田.现代药理实验方法(下册)[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998.1425-1430.
- [6] 黄祯祥.医学病毒学基础及实验技术[M].北京:科学出版社,1990.661-693.
- [7] 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].中医药学刊,2003,21(2):217-218.
- [8] 邱海岩,李洪源,韩志刚,等.病毒唑体外抗流感病毒(III型)作用的实验研究[J].黑龙江医学科学,2005,28(2):5-7.
- [9] 刘华钢,韦筱斌,王金科,等.金黄 I 号对 SARS 疑似患者免疫功能的影响[J].广西医科大学学报,2005,22(4):514-516.