

# 清热合剂体外抗呼吸道合胞病毒作用

肇丽梅<sup>1\*</sup>, 张 岩<sup>2</sup>, 韩国柱<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学第二附属医院, 辽宁沈阳 110004; 2. 大连医科大学, 辽宁大连 116027)

[摘要] 目的: 了解清热合剂对呼吸道合胞病毒(RSV)的抑制作用。方法: 采用细胞培养技术, 以双黄连为阳性对照药, 观察清热合剂在非洲绿猴肾细胞(VERO)和咽喉癌上皮细胞(HEP-2)细胞中对 RSV 的抑制作用。结果: 在 VERO 细胞中, 清热合剂半数中毒浓度(TD<sub>50</sub>)为 31.62mg/mL, 抗合胞病毒的半数有效浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.50mg/mL, 治疗指数(TI)为 63.24; 在 HEP-2 细胞中, TD<sub>50</sub>为 32.10mg/mL, 抗合胞病毒的 IC<sub>50</sub>为 0.54mg/mL, TI 为 59.44。且对 RSV 抑制作用存在明显的量效反应关系( $P < 0.01$ )。结论: 清热合剂在 VERO 和 HEP-2 细胞中对 RSV 有明显抑制作用。

[关键词] 呼吸道合胞病毒; 抗病毒作用; 清热合剂

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)01-0053-03

## The Anti-respiratory Syncytial Virus Effect of Qing Re He Ji

ZHAO Li-mei<sup>1\*</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, HAN Guo-zhu<sup>2</sup>

(1. The Second Hospital of Chinese Medical University, Liaoning Shenyang 110004, China;

2. Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116027, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-respiratory syncytial virus(RSV) effect of Qing Re He Ji(QRHJ). **Methods:** The anti-RSV effect of QRHJ was observed by means of the technique of VERO and HEP-2 cell culture using Shuang Huang Lian as a positive control. **Results:** In VERO and HEP-2 cell culture, QRHJ was a potential inhibitor of RSV in concentration-dependent manner( $P < 0.01$ ). The TD<sub>50</sub> was 31.62mg/mL, the IC<sub>50</sub> was 0.50mg/mL and TI was 63.24 in VERO cell culture. The TD<sub>50</sub> was 32.10mg/mL, the IC<sub>50</sub> was 0.54mg/mL and TI was 59.44 in HEP-2 cell culture. **Conclusion:** QRHJ has a significant anti-RSV effect in VERO and HEP-2 cell culture.

[Key words] respiratory syncytial virus; anti-viral effect; Qing Re He Ji

呼吸道合胞病毒属副粘病毒家族, 是引起婴幼儿和老年人严重下呼吸道疾病的主要病毒体, 全球每年有近四百万儿童受其感染, 初次感染的婴儿约有 5% 需要住院治疗, 更严重的问题是 RSV 感染可诱发过敏症和哮喘<sup>[1,2]</sup>。清热合剂为医院制剂, 由黄芩、大青叶、葛根等中药组成, 具有很好的治疗急性呼吸道感染作用, 但作为传统的医院制剂, 其药效学研究尚欠缺, 限制了临床应用。因此, 为研究该药的药理作用及机制, 我们对其体外抗呼吸道合胞病毒

的药效作用进行了试验。

### 1 实验材料

**1.1 试验药物** 清热合剂(处方为黄芩 400g、大青叶 200g、茵陈 200g、葛根 250g、连翘 300g, 以上五味, 加水煎煮两次, 每次 2h, 合并煎液, 静置, 取上清液滤过, 滤液浓缩至 1000mL, 搅匀, 即得。), 本品呈棕色液体, 水溶性, 原生药浓度为 1.35g/mL, 由中国医科大学附属第二医院药剂科配制。该药以君药黄芩中黄芩苷、大青叶中靛蓝、靛玉红的定性鉴别作为质量控制标准。

**1.2 阳性对照药物** 注射用双黄连粉针剂, 为黄棕色粉末, 水溶性, 规格 600mg/支, 批准文号: (94)卫药准字 Z-73 号, 批号: 0402215, 由哈尔滨中药二厂生

[收稿日期] 2004-12-24

[通讯作者] 肇丽梅, Tel/Fax (024) 23925108; E-mail: Lmzhao16

@hotmail.com

产。

**1.3 细胞** 非洲绿猴肾细胞(VERO), 咽喉癌上皮细胞(HEP-2), 由辽宁省疾病预防控制中心感染病研究室提供。

**1.4 病毒株** 呼吸道合胞病毒(RSV) Long 株, 由北京儿童医院提供。

## 2 实验方法

**2.1 药物毒性测定** 用细胞维持液分别将清热合剂和双黄连按 1: 2、1: 4、1: 8、1: 16、1: 32、1: 64、1: 128、1: 256 连续倍比稀释 8 个剂量, 分别加入细胞已长成单层的 96 孔培养板中, 每孔加入 0. 1mL, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养, 倒置显微镜下每日观察细胞形态变化, 连续观察 7d, 每个剂量组设 4 孔细胞, 同时设正常细胞对照。计算药物半数中毒浓度(TD<sub>50</sub>), 确定药物的最大无毒浓度(TD<sub>0</sub>)。

**2.2 病毒对细胞半数感染浓度的测定** 用维持液将病毒稀释成 10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup>、10<sup>10</sup>、10<sup>11</sup>、10<sup>12</sup>、10<sup>13</sup>、10<sup>14</sup> 倍 14 个浓度, 分别加入细胞已长成单层的 96 孔培养板中, 每孔加入 0. 1mL, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内吸附 2. 0h, 弃掉病毒液, 更换正常细胞维持液, 温箱内继续培养, 倒置显微镜下每日观察细胞病变(CPE) 程度并记录, 连续观察 7d, 每个剂量组设 4 孔细胞, 同时设正常细胞对照。计算组织半数感染量(TCID<sub>50</sub>)。

**2.3 药物对 RSV 病毒的抑制作用** 根据预试验结果采用细胞病变抑制实验(CPEI) 对清热合剂进行药效测定。以 100TCID<sub>50</sub> 的病毒量攻击细胞, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内吸附 2. 0h, 弃掉病毒液, 更换含不同浓度清热合剂和双黄连的维持液, 温箱内继续培养。同时设正常细胞对照、药物对照及病毒对照。每日倒置显微镜下观察病毒对细胞的作用结果并记录, 直至病毒对照细胞 CPE 出现++++ 时结束试验。计算药物的半数有效浓度 IC<sub>50</sub> 和治疗指数 TI。以上各实验重复 3 次。

**2.4 统计方法** Reed-Muench<sup>[3]</sup> 法计算药物半数中毒浓度(TD<sub>50</sub>), 半数有效浓度(IC<sub>50</sub>) 和病毒的组织半数感染量(TCID<sub>50</sub>), 治疗指数(TI) = TD<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub><sup>[4]</sup>; Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 检验法<sup>[5]</sup> 比较药物各剂量组与病毒对照组细胞病变程度的差异, 对药物剂量对数和 CPE 抑制率进行回归分析<sup>[5]</sup>, 判定是否存在量效反应关系。数据处理运用 SPSS11.0 软件完成。

## 3 结果

**3.1 药物毒性测定** 根据所得数据, 采用 Reed-Muench 法计算清热合剂及双黄连对 VERO 及 HEP-2 细胞的 TD<sub>50</sub>, 确定 TD<sub>0</sub>, 结果见表 1。

**3.2 病毒对细胞半数感染浓度的测定** 根据所得数据, 采用 Reed-Muench 法计算 RSV 病毒在 VERO 及 HEP-2 细胞中的 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-4</sup>, 试验中病毒攻击量为 100 TCID<sub>50</sub>, 即 10<sup>-2</sup>。

**3.3 药物对 RSV 病毒的抑制作用** 采用 Reed-Muench 法计算清热合剂及双黄连在 VERO 及 HEP-2 细胞中的 IC<sub>50</sub>, TI, 结果见表 1; Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 检验法比较药物各剂量组与病毒对照组细胞病变程度。结果表明, 清热合剂的 3.37, 1.69, 0.84, 0.42mg/mL 剂量组在 VERO 和 HEP-2 细胞中对 RSV 病毒均有明显的抑制作用(P < 0.05), 双黄连的 1.0, 0.5, 0.25, 0.13mg/mL 剂量组在 VERO 和 HEP-2 细胞中对 RSV 病毒均有明显抑制作用(P < 0.05)。结果见表 2。

表 1 清热合剂及双黄连体外抗 RSV 病毒药效结果

药物 (mg/mL)	VERO				HEP-2			
	TD <sub>50</sub>	TD <sub>0</sub>	IC <sub>50</sub>	TI	TD <sub>50</sub>	TD <sub>0</sub>	IC <sub>50</sub>	TI
清热合剂	31.62	13.5	0.50	63.24	32.10	13.5	0.54	59.44
双黄连	1.25	1	0.145	8.62	1.25	1	0.14	8.93

表中清热合剂药物终浓度是按原生药浓度计算。

表 2 清热合剂对 RSV 病毒的抑制作用

分组	药物剂量 (mg/mL)	VERO		HEP-2	
		每孔 CPE 程度 1)	CPE 抑制率 (%)	每孔 CPE 程度 1)	CPE 抑制率 (%)
		清热合剂	3.37	0 0 0 0	100.00 <sup>2)</sup>
	1.69	0 0 0 0	100.00 <sup>2)</sup>	0 0 0 0	100.00 <sup>2)</sup>
	0.84	1 1 1 2	80.77 <sup>2)</sup>	1 2 1 2	76.00 <sup>2)</sup>
	0.42	2 3 3 2	40.00 <sup>2)</sup>	2 4 3 2	34.62 <sup>2)</sup>
	0.21	3 3 3 3	12.90	3 3 3 3	12.12
	0.11	4 4 4 4	0.00	4 4 4 4	0.00
	1.00	0 0 0 0	100.00 <sup>2)</sup>	0 0 0 0	100.00 <sup>2)</sup>
	0.50	0 0 0 0	100.00 <sup>2)</sup>	0 0 0 0	100.00 <sup>2)</sup>
双黄连	0.25	1 1 2 1	80.77 <sup>2)</sup>	1 2 1 1	81.48 <sup>2)</sup>
	0.13	2 2 2 3	41.67 <sup>2)</sup>	2 2 2 3	44.00 <sup>2)</sup>
	0.06	4 3 3 3	10.00	3 3 2 4	13.33
	0.03	4 4 4 4	0.00	4 4 4 4	0.00
细胞对照		0 0 0 0		0 0 0 0	
病毒对照		4 4 4 4		4 4 4 4	

注: 1) CPE 程度: 0 表示无明显 CPE, 1 表示 CPE 为 0~25%, 2 表示 CPE 为 25~50%, 3 表示 CPE 为 50%~75%, 4 表示 CPE 为 75~100%。CPE 抑制率中<sup>2)</sup> 表示药物对 RSV 病毒有抑制作用(P < 0.05)。

清热合剂和双黄连在 VERO 和 HEP-2 细胞中抑制 RSV 病毒致细胞病变的作用随着药物剂量的增加而增强, 呈明显的量效关系, 见图 1, 图 2; 对药物剂量对数和 CPE 抑制率进行回归分析, 清热合剂在 VERO 和 HEP-2 细胞中回归系数  $b$  分别为 0.988 ( $P = 0.002$ ), 0.986 ( $P = 0.002$ ): 双黄连在 VERO 和 HEP-2 细胞中回归系数  $b$  分别为 0.983 ( $P = 0.003$ ), 0.989 ( $P = 0.001$ )。

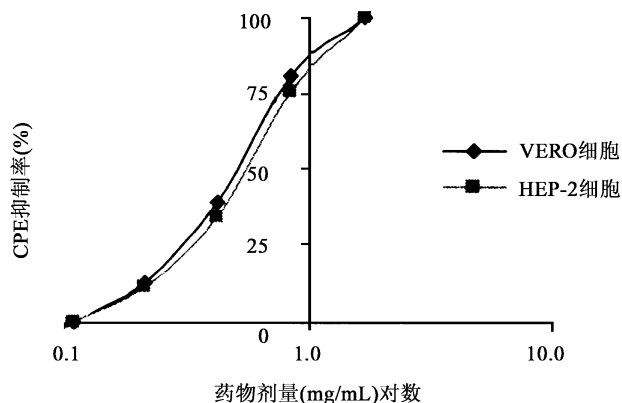


图 1 清热合剂对 RSV 抑制作用剂量效应关系

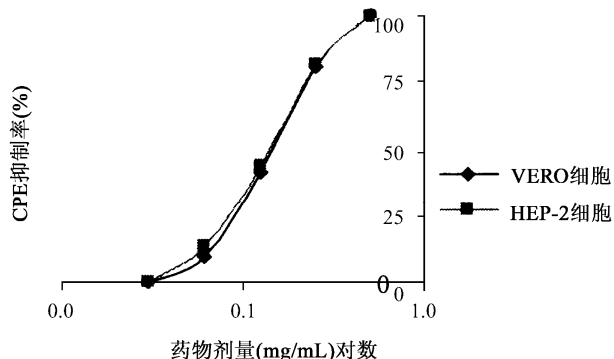


图 2 双黄连对 RSV 抑制作用剂量效应关系

## 4 讨论

清热合剂选用大青叶、黄芩、葛根等中药组方, 方中大青叶、黄芩清热解毒为主药, 辅以葛根发表解肌, 清热生津, 以助主药清热解毒的同时生津而不伤阴, 扶助正气。为确定该复方制剂的体外抗病毒作用, 本实验选用组织细胞培养法, 选择感染率较高的呼吸道合胞病毒作为研究对象, 对清热合剂的体外抗呼吸道病毒作用进行探讨。实验结果显示, 清热合剂且在 VERO 和 HEP-2 两种细胞中对 RSV 病毒均有明显的抑制作用, 毒性很小, 治疗指数(TI) 可达到 63.24 和 59.44, 阳性对照药双黄连的治疗指数(TI) 仅为 8.62 和 8.93。清热合剂和双黄连对 RSV 病毒的抑制作用呈明显的量效关系。

为全面了解清热合剂抗病毒作用, 我们正在进行其抗呼吸道病毒谱的研究, 初步发现该药对腺病毒 II 型具有很好的抑制作用。

## [参考文献]

- [1] Durbin JE, Durbin RK. Respiratory syncytial virus-induced immunoprotection and immunopathology[J]. *Viral Immunol*, 2004, 17(3): 370-380.
- [2] Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus-viral biology and the host response[J]. *J Infect*, 2002, 45: 18-24.
- [3] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997. 112-119.
- [4] 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学毒理学)[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政局, 1993. 166.
- [5] 倪宗瓚. 卫生统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 96-103.