

复方毛冬青颗粒抗流感病毒实验研究

周爱香, 李小芹, 戴柏勇, 蔡润兰, 高英杰, 康旭亮, 李洪梅

(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 探讨复方毛冬青颗粒的抗病毒作用。结果表明, 复方毛冬青颗粒对呼吸道合胞病毒、副流感病毒 I 型、疱疹病毒 I II 型、柯萨奇病毒 4 型均有不同程度的抑制作用; 以 17.6、8.8、4.4g 生药/kg 灌胃给予小鼠, 能明显抑制小鼠病毒性肺炎, 提高病毒性肺炎小鼠的免疫功能和存活时间。

关键词: 复方毛冬青颗粒; 病毒性肺炎; 免疫功能

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)04-0042-04

复方毛冬青颗粒由毛冬青、葛根、柴胡等中药组成, 具有清热解毒、疏风透表等功效, 临床用于风热感冒引起的发热、头疼、咽痛等症。本实验即采用小鼠病毒性肺炎模型, 初步探讨了复方毛冬青颗粒的抗病毒作用及免疫功能。

1 材料和方法

1.1 实验药物 复方毛冬青颗粒, 含 3.87g 生药/ml 浸膏, 由中国中医研究院中药研究所剂型室提供, 批号: 011212。试验时以蒸馏水配制至所需浓度。银翘解毒颗粒, 天津长城医药保健品有限公司, 生产批号为 011015; 唑(三氮唑核苷)为原料药, 湖北省医药工业研究所产品, 批号 981011。

1.2 实验动物 昆明种小鼠 13~15g, 雌雄各半, 由北京生物制品研究所实验动物室提供, 合格证号为京动许字 1999 第 012 号。

1.3 试剂与仪器 流感病毒亚甲型鼠肺适应株 FM₁: 为本实验室传代, -60℃低温保存; 副流感病毒

I 型(HVJ)、呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒 3、7 型(AdV_{3,7})、单纯疱疹病毒 I II 型(HSV-I II)、柯萨奇病毒 4 型(COXB₄) 购自中国预防医学科学院病毒研究所, 本实验室传代后使用, -60℃冰箱保存备用。人喉癌传代细胞 HEP-2 株, 购自卫生部药品生物制品检定所。

细胞培养液: 含 10% 小牛血清、0.29mg 谷氨酰胺/ml、100u/ml 青、链霉素的 Eagle's MEM(日本日水制药株式会社出品)。

CO₂ 培养箱, 日本 Yamato 科学株式会社产品; 倒置显微镜, 德国产 OLYMPUS 牌, ZS-3 半自动生化分析仪, 中国科学院生物物理研究所和中国中生生物工程高技术公司联合制造。

2 实验方法

2.1 抗病毒试验

2.1.1 体外抗病毒试验^[1] 取已长成单层 HEP-2 细胞的培养板, 倒掉培养液, 接种 50 TCID₅₀ 的不同病毒液 100μl 于细胞孔, 每一种病毒接种一块细胞板, 留一行不接种病毒作正常细胞对照。置 37℃5% CO₂ 培养箱中吸附 1h, 倒掉病毒液, 用不含小牛血清

的 Eagle's 维持液清洗细胞面 3 次后,加入倍比稀释 6 个浓度的各个药液(包括对照药)100μl/孔(从 TC₀ 开始稀释,每个浓度加入 3 孔。复方毛冬青颗粒对 Hep-2 细胞的 50% 毒性浓度为 TC₅₀ = 8.93mg/ml, TC₀ = 6.25mg/ml, 银翘解毒颗粒为 TC₅₀ = 1.12mg/ml, TC₀ = 0.78mg/ml)。同时设病毒对照、正常细胞对照、药物对照,补液到 200μl/孔。置 37℃5% CO₂ 培养箱中培养 3d,每日在倒置显微镜下镜检细胞病变进展。

细胞病变程度的判断:“0”:细胞生长正常,无病变出现;“1”:细胞病变约占整个单层细胞的 < 25%;“2”:细胞病变约占整个单层细胞的 25% ~ 50%;“3”:细胞病变约占整个单层细胞的 50% ~ 75%;“4”:细胞病变约占整个单层细胞的 75% ~ 100%。

根据以上细胞病变五级标准判断,利用 Reed-Muench 法^[3]计算 50% 有效浓度(EC₅₀),并求出治疗指数(TI = TC₅₀/EC₅₀),TI 值越高,表明药效作用越强。

2.1.2 对小鼠流感病毒性肺炎的作用^[4] 取 13~15g 小鼠,按体重随机分为 7 组,每组 10 只,分别灌胃给予复方毛冬青颗粒高、中、低三个剂量组,阳性对照药病毒唑和银翘解毒颗粒。除正常对照组外,小鼠用乙醚轻度麻醉,以 15 个 LD₅₀ 流感病毒液(FM₁)滴鼻感染,每只 0.05ml。从感染前一天开始给药,每天 2 次,连续 5d。第 6d 称取小鼠体重后固定,放血、解剖,摘取全肺称重,逐个计算肺指数值,并求出肺指数抑制率。

肺指数 = 肺重(g)/体重(g) × 100

肺指数增长值 = 感染组肺指数值 - 正常组肺指数值

肺指数抑制率 % =

$\frac{\text{病毒对照组肺指数增长值} - \text{试验组肺指数增长值}}{\text{病毒对照组肺指数增长值}} \times 100\%$

肺指数值大,表示肺病变程度严重。将各组肺指数值进行 t 检验,比较组间差异性。

2.1.3 对流感病毒感染小鼠死亡的保护作用^[5]

取 13~15g 小鼠,按体重随机分为 6 组,每组 30 只,分别灌胃给药和蒸馏水,每天 2 次,0.2ml/10g,连续 5d,给药第 1d,小鼠用乙醚轻度麻醉,以 10 个 LD₅₀ 流感病毒液(FM₁)滴鼻感染,每只 0.05ml。观察 14d 内小鼠死亡情况。

2.2 复方毛冬青颗粒对感染小鼠免疫功能的影响

2.2.1 对感染小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响^[5] 小鼠分组、给药、感染均同 1.2.1.2。第 6d 小鼠称体重,尾静脉注射印度墨汁稀释液 0.1ml/10g,注射后 1min、5min 用玻璃毛细吸管分别从眶后静脉

丛取血 20μl,溶于 3ml 0.1% NaHCO₃ 溶液中摇匀,置分光光度计在波长 650nm 下比色,测定光密度值(OD)。采血后将小鼠颈椎脱臼处死,分别称取肝、脾重量。按公式计算廓清指数 K 或校正廓清指数 α,进行组间 t 测验。

$$K = \frac{\text{Log} OD_1 - \text{log} OD_2}{t_2 - t_1} \quad \alpha = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt{k}$$

2.2.2 对感染小鼠细胞免疫功能的影响 采用 T 淋巴细胞酯酶染色法^[16]。小鼠分组、给药、感染均同 1.2.1.2。第 6d 末次药后 1h,眶静脉丛取血至载玻片上,酯酶染色,显微镜下计数 100 个淋巴细胞中的酯酶染色率。

2.2.3 对感染小鼠体液免疫功能的影响 采用溶血空斑法^[17]。小鼠分组、给药、感染均同 1.2.1.2。在给药的第 2d,用 2 × 10⁹ SRBC 尾静脉注射致敏。第 6d 眼球放血处死小鼠,取出脾脏 30mg,制备脾细胞悬液,离心,沉淀细胞,加 1640 至 2.0ml,取出 0.5ml 脾细胞,于另一套试管中,加入 0.2% SRBC 液 0.5ml 和新鲜豚鼠补体(1:10) 0.5ml。混匀后温浴 1h,离心,取上清液在 413nm 波长下测定抗体溶血 OD 值,并进行组间 T 检验。

3 试验结果

3.1 复方毛冬青颗粒抗病毒作用

3.1.1 复方毛冬青颗粒体外抗病毒作用 试验结果表明(表 1),复方毛冬青颗粒对呼吸道合胞病毒(RSV)、副流感病毒 I 型(HVJ)、疱疹病毒 I、II 型(HSV-I、II)、柯萨奇病毒(CoxB₄)均有不同程度的抑制作用,复方毛冬青颗粒对 RSV、HVJ、HSV-I 抑制作用强于银翘解毒颗粒。

表 1 复方毛冬青颗粒体外抗病毒作用

病毒	复方毛冬青颗粒(mg/ml)		银翘解毒颗粒(mg/ml)		病毒唑 (179μg/ml)
	EC ₅₀	TI	EC ₅₀	TI	
HVJ	1.33	6.7	0.67	1.67	+
RSV	1.33	6.7	-	-	+
ADV ₃	-	-	-	-	+
ADV ₇	-	-	-	-	+
HSV-1	2.23	4.0	0.56	2.0	+
HSV-2	2.23	4.0	0.28	4.0	+
COXB ₄	2.67	3.34	0.28	4.0	+

注:表中 EC₅₀ 为 50% 有效浓度, TI 为治疗指数 = TC₅₀/EC₅₀。

“+”为有抑制作用,“-”为无抑制作用。

3.1.2 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠的影响 试验结果表明(表 2),感染病毒后小鼠体重明显降低,肺指数值明显增大,复方毛冬青颗粒高剂量组

可使小鼠体重明显增加,三个剂量组对流感病毒感染小鼠引起的肺炎均有不同程度的抑制作用,肺指数明显降低。

表 2 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	体重 (g)	肺指数值 (g/100g)	抑制率 (%)
感染对照	-	15.1 ± 1.03	1.65 ± 0.16	
正常对照	-	20.5 ± 0.71**	0.95 ± 0.05**	
病毒唑	0.07	17.5 ± 1.43**	1.20 ± 0.12**	63.51
银翘解毒颗粒	16.5	16.8 ± 2.13*	1.34 ± 0.25**	43.33
复方毛冬青颗粒	17.6	16.6 ± 1.23*	1.33 ± 0.18**	45.96
复方毛冬青颗粒	8.8	16.3 ± 1.62	1.36 ± 0.17**	40.58
复方毛冬青颗粒	4.4	16.0 ± 1.74	1.41 ± 0.21*	33.33

注:与感染对照组相比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (下同)

3.1.3 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠存活时间的影响 试验结果表明(表 3),复方毛冬青颗粒高、中剂量组可使感染流感病毒小鼠的死亡率明显降低,存活时间明显延长,与对照组相比,有显著性差异。

表 3 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠存活时间的影响($n = 30$)

组别	剂量 (g/kg)	死亡数 (只)	保护率 (%)	存活时间 (天)	增加率 (%)
感染对照	-	26		9.1 ± 2.4	-
病毒唑	0.07	3	90.0**	13.7 ± 1.1**	50.2
银翘解毒颗粒	16.5	16	46.7*	11.6 ± 2.4**	27.8
复方毛冬青颗粒	17.6	15	50.0**	11.7 ± 2.5**	28.2
复方毛冬青颗粒	8.8	18	40.0*	11.5 ± 2.6**	26.7
复方毛冬青颗粒	4.4	21	23.3	10.9 ± 2.7*	19.8

3.2 复方毛冬青颗粒病毒性肺炎小鼠免疫功能的影响

3.2.1 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响 试验结果表明(表 4),病毒感染后小鼠网状内皮系统吞噬功能明显下降, K 值和 α 值显著降低,复方毛冬青颗粒高、中剂量的能使 K 值和 α 值明显提高,提示复方毛冬青颗粒对网状内皮系统有一定的激活作用。

3.2.2 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠细胞免疫的影响 试验结果表明(表 5),病毒感染组 T 淋巴细胞染色率较正常对照组显著降低($P < 0.01$),而复方毛冬青颗粒高、中剂量均能不同程度提高 T 淋巴细胞染色率。

3.2.3 复方毛冬青颗粒对感染小鼠体液免疫的影响 试验结果表明(表 6),感染流感病毒的小鼠抗

体溶血值明显降低,给药后大、中剂量组使其明显提高。表明复方毛冬青颗粒对感染小鼠体液免疫有明显的调节作用。

表 4 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响($n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	K 值	α 值
感染对照	-	0.018 ± 0.014	4.17 ± 1.39
正常对照	-	0.059 ± 0.031**	6.62 ± 1.25**
病毒唑	0.07	0.048 ± 0.028*	5.81 ± 1.59*
银翘解毒颗粒	16.5	0.040 ± 0.024*	5.29 ± 1.52
复方毛冬青颗粒	17.6	0.040 ± 0.026*	5.60 ± 1.33*
复方毛冬青颗粒	8.8	0.045 ± 0.017**	5.52 ± 0.93*
复方毛冬青颗粒	4.4	0.033 ± 0.029*	5.05 ± 1.26

表 5 复方毛冬青颗粒对病毒性肺炎小鼠细胞免疫的影响($n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	T 淋巴细胞染色率 (%)	提高率 (%)
感染对照	-	33.9 ± 5.2	
正常对照	-	53.9 ± 3.7**	59.0
病毒唑	0.07	43.4 ± 5.8**	28.0
银翘解毒颗粒	16.5	38.9 ± 6.2	14.7
复方毛冬青颗粒	17.6	42.4 ± 6.5**	25.1
复方毛冬青颗粒	8.8	40.6 ± 6.0*	19.8
复方毛冬青颗粒	4.4	35.8 ± 4.5	5.6

表 6 复方毛冬青颗粒对感染小鼠体液免疫的影响($n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	抗体溶血值 (OD 值 ± SD)	提高率 (%)
感染对照	-	0.33 ± 0.08	
正常对照	-	0.48 ± 0.04	45.5
病毒唑	0.07	0.43 ± 0.05**	31.3
银翘解毒颗粒	16.5	0.40 ± 0.08	22.0
复方毛冬青颗粒	17.6	0.42 ± 0.07*	26.5
复方毛冬青颗粒	8.8	0.42 ± 0.07*	26.5
复方毛冬青颗粒	4.4	0.36 ± 0.08	10.3

4 讨论

感冒的病因很多,但病毒感染是一主要途径,我们试验针对呼吸道常见病毒进行探讨,结果显示本制剂对呼吸道合胞病毒、副流感病毒 I 型、疱疹病毒 I、II 型等均有不同程度的抑制作用。高、中剂量组对流感病毒感染小鼠引起肺炎均有明显的抑制作用,肺指数值明显降低;并能降低小鼠死亡率和延长小鼠存活时间,提示该制剂有明显的抗病毒作用。

网状内皮系统是机体重要的先天性非特异性免

疫屏障,在感染免疫中起着不可忽视的作用,它能吞噬、消化、消除病毒等病原微生物,阻断感染的发生发展或使之局限性,在我们的试验中,小鼠大量感染流感病毒后,特异性免疫和非特异性免疫机能明显降低,体重增长也明显受抑,给药组可见小鼠体重增长,网状内皮系统的吞噬功能,T淋巴细胞染色率及小鼠抗体均明显提高,表明药物对免疫功能有一定的调节作用。以上结果为临床应用提供了一定的药效学基础。

参考文献:

- [1] 富杭育,贺玉琢. 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): 46.
- [2] 卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药学、药理学、毒理学)[S]. 1993. 63.
- [3] 孟庆云. 中西医结合基础理论研究与实验技术[M]. 北京:中国古籍出版社, 1999. 390-420.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991. 350, 157, 161, 159.