

双黄连分散片抗病毒作用实验研究

邬洪波, 李洪梅, 卢长安, 高英杰, 李小芹, 周爱香

(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 目的: 观察双黄连分散片体内、体外抗病毒的药理作用。方法: 通过流感病毒(A_3)、呼吸道合胞病毒(RSV)等 7 种病毒致细胞病变实验观察双黄连分散片体外抗病毒作用, 通过流感病毒感染致小鼠病毒性肺炎及病毒增殖量实验观察双黄连分散片体内抗病毒作用。结果: 体外试验表明: 双黄连分散片对流感病毒(A_3)、副流感病毒(HVJ)、呼吸道合胞病毒(RSV)、单纯疱疹病毒 I、II(HSV- I、HSV- II 型)等 4 种病毒均有不同程度的抑制作用; 体内试验表明, 双黄连分散片在所试剂量范围内对流感病毒感染小鼠引起肺内流感病毒增殖量和病毒性肺炎均有明显的抑制作用, 肺指数值明显降低, 肺组织病变程度明显减轻, 记分明显降低。结论: 双黄连分散片具有明显的抗病毒药理作用。

关键词: 双黄连分散片; 抗病毒; 肺指数; 病毒增殖量

中图分类号: 285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)03-0048-03

双黄连分散片具有辛凉解表, 清热解毒的作用, 主要用于外感风热引起的发热、咳嗽、咽痛等症。本实验从整体动物试验和体外试验观察双黄连分散片的抗病毒作用, 为临床作用提供一定药效学依据。

1 实验材料

1.1 受试药物 双黄连分散片, 金银花、黄芩、连翘等组成, 由国家中药制药工程研究中心提供, 批号: 20010205。病毒唑(三氮唑核苷), 湖北滨湖制药厂提供, 批号: 970512。

1.2 病毒 流感病毒亚甲型鼠肺适应株 FM₁, 流感病毒(A_3)、副流感病毒-1 型(HVJ)、呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒 3、7 型(AdV_{3,7})、柯萨奇 B 族病毒 4 型(CoxB₄)、埃柯病毒 11 型(ECHO₁₁)、单纯疱疹病毒 I、II 型(HSV- I、II)。分别购自中国预防医学科学院病毒研究所。

1.3 细胞 人喉癌传代细胞 HEP-2 株, 购自卫生部药品生物制品检定所。

1.4 细胞培养液 含 10% 小牛血清、0.29mg 谷氨酰胺/ml、10000u/ml 青、链霉素的 Eagle's MEM(日本日水制药株式会社出品); 细胞维持液, 除所含小牛血清为 2% 外, 其他含量均同培养液。

1.5 免疫血清 兔抗 FM₁ 血清, 本实验室制备, -60℃冰箱备用。

1.6 标记抗体 羊抗兔 IgG-FITC, 华美生物工程公司出品。

1.7 仪器 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; SAKURA 自动脱水机, 日本产; Leite 旋转式切片机, 德国生产; SAKURA RSH-100 自动染色机, 日本产; 光学显微镜, 日本尼康; OLYMPUS BH-2 自动显微照相系统。

1.8 实验动物 小鼠(KM)二级, 雌雄各半, 13~15g, 中国医学科学院实验动物研究中心提供, 许可证号: SCXK 11-00-0006。

2 方法和结果

2.1 体外抗病毒试验^[1]

2.1.1 受试药物毒性测定 药液以 Eagl's 培养液作 1:16~1:1024 倍比稀释, 将 96 孔微量培养板已长成 Hep-2 细胞单层的培养液倒掉, 加入 5 倍或 10 倍稀释药液 5~7 个浓度 100μl, 每个稀释度药液各加入四孔, 同时设正常细胞对照。将培养板置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养四天, 每日用倒置显微镜观察药液对细胞的影响, 以细胞不出现病变的最小稀释度判为该药对细胞的无毒界线, 利用 Reed-Muench 法计算最大无毒浓度(TC₀)和 50% 毒性浓度(CC₅₀)。

双黄连分散片的 50% 毒性浓度(CC₅₀)为 22.7mg/ml, 病毒唑为 714.3μg/ml。

2.1.2 对病毒致细胞病变作用的影响 取已长成单层细胞的培养板, 倒掉培养液, 接种 100 TCID₅₀(使半数细胞培养管出现病变的病毒稀释度对数)的不同病毒液 50μl 于细胞孔, 每一种病毒接种 8 孔(每个浓度组 3 个重复样品), 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中吸附 1h, 倒掉病毒液, 用不含小牛血清的 Eagl's 维持液

洗细胞面 3 次后,加入 1: 32、1: 64 稀释度的药液 100μl。同时设病毒、药液、阳性对照药、病毒唑、正常细胞对照组比较。置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养四天,每日在倒置显微镜下镜检一次,观察细胞病变,连续三天。细胞病变程度的判断:

- “—”: 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 法计算 50% 有效浓度(EC₅₀),并求出治疗指数 IT = (CC₅₀/EC₅₀), IT 值越高作用越强。结果见表 1

表 1 双黄连分散片的体外抗病毒作用

病毒	50% 有效浓度(EC ₅₀) μg 生药/ml, (治疗指数 IT)	
	病毒唑 125μg/ml	双黄连分散片
A ₃	+	4700(4. 8)
HVJ	+	3300(6. 8)
RSV	+	4700(4. 8)
HSV- I	+	6670(3. 4)
HSV- II	+	4700(4. 8)
AdV ₃	+	-
AdV ₇	+	-
CoxB ₄	+	-
ECHO ₁₁	+	-

说明:“-”表示所试剂量无效“+”表示所试剂量有效

体外抗病毒试验结果表明,双黄连分散片对五种病毒均有不同程度的体外抗病毒致细胞病变作用。

2.2 体内抗病毒试验

2.2.1 对小鼠流感病毒性肺炎的影响 取小鼠按体重随机分组,灌胃给予不同剂量的样品,病毒感染对照组和正常动物对照组均给相同药液容积的蒸馏水。除正常对照组外,将小鼠用乙醚轻度麻醉,以 15 个 LD₅₀ 流感病毒液滴鼻感染,每只 0.05ml。从感染前一天开始给药或水,每天 2 次,连续 5d,第 6 天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

肺指数抑制率%=

$$\frac{\text{病毒对照组肺指数均值}-\text{试验组肺指数均值}}{\text{病毒对照组肺指数均值}} \times 100\%$$

肺指数值大,表示肺病变程度严重。结果见表 2

显微镜观察^[2]

肺组织用 10% 甲醛固定,乙醇系列脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。切片厚度 4~ 5μm,HE 染色,普通光学显微镜观察肺组织形态学变化。

表 2 双黄连片对流感病毒感染小鼠肺部炎症(肺指数)的影响(n= 10)

组别	剂量 (g/kg)	肺脂数值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
感染对照	—	1. 60 ± 0. 20	
正常对照	—	0. 99 ± 0. 09* *	
病毒唑	0. 07	1. 27 ± 0. 17* *	20. 62
双黄连分散片	33. 0	1. 39 ± 0. 10* *	13. 12
	16. 5	1. 40 ± 0. 19*	12. 50
	8. 25	1. 47 ± 0. 12	8. 12

注:与感染对照组相比* * P< 0. 01,* P< 0. 05

炎症细胞浸润程度分级标准:

- 正常: 基本无炎症细胞,记 0 分。
- 基本正常: 炎症细胞在 10% 以下,记 0. 5 分;
- 轻度: 炎症细胞约占 10% ~ 20%,记 1 分;
- 中度: 炎症细胞约占 30%,记 2 分;
- 重中度: 炎症细胞约占 50%,记 3 分;
- 重度: 炎症细胞呈弥漫性,约占 80%,记 4 分;

将以上记分进行统计学处理,进行组间 t 检验比较。结果见表 3

表 3 双黄连片对流感病毒感染小鼠肺部炎症(病毒观察)的影响(n= 10)

组别	剂量 (g/kg)	肺脂数值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
感染对照	—	2. 70 ± 0. 67	
正常对照	—	0. 05 ± 0. 16* *	
病毒唑	0. 07	1. 55 ± 0. 76* *	42. 59
双黄连分散片	33. 0	1. 80 ± 0. 63* *	33. 33
	16. 5	2. 00 ± 0. 67*	25. 92
	8. 25	2. 10 ± 0. 57*	22. 22

注:与感染对照组相比* * P< 0. 01,* P< 0. 05

表 2、3 结果可见,感染后小鼠肺指数值明显增大,炎症记分值明显增高,双黄连分散片在所试剂量范围内对流感病毒感染小鼠引起的肺炎有明显的抑制作用,肺指数值明显降低,肺组织病变程度明显减轻,记分值明显降低。表明双黄连分散片对流感病毒感染小鼠所致肺病变有抑制作用。

2.2.2 对小鼠肺内流感病毒增殖量的影响^[2] 除病毒感染量为 1000LD₅₀ 外,动物分组、给药方法等均同 2.2.1。感染病毒后 48h 处死小鼠,解剖取肺,摘

取左侧中叶肺固定,按病理切片常规脱水、包埋、制作石蜡切片。以间接免疫荧光法染色,以荧光素标记的抗流感病毒血清作示踪原,通过间接免疫荧光结合,观察感染鼠肺内特异性的病毒抗原,判断药物对病毒增殖的作用,荧光阳性数多,表明病毒颗粒增殖多。结果见表 4

表 4 双黄连分散片对小鼠肺内流感病毒增殖量的影响($n=10$)

组 别	剂量 (g/kg)	阳性率 (%)	抑制率 (%)
感染对照	—	52.41 ± 4.45	
病毒唑	0.07	36.72 ± 4.85* *	29.95
双黄连分散片	33.0	43.03 ± 4.29* *	17.90
	16.5	44.39 ± 3.03* *	15.31
	8.25	45.92 ± 5.70*	12.39

注:与感染对照组相比* $P < 0.01$, * $P < 0.05$

表 4 结果表明,双黄连分散片在所试剂量范围内对小鼠肺内流感病毒增殖量有显著的抑制作用,具有明显的抗流感病毒作用。

3 讨论

感冒主要由病毒引起,作为治疗此病的药,抗病毒药理作用是其病因学防治基础。感冒由多种病毒引起,我们选了最常见的 7 种进行体外抗病毒实验,有属于 RNA 型的 A₃、H₁N₁、RSV、ECHO₁₁、Coxsackie B₄ 等,有属于 DNA 型的 AdV₃、HSV- I、HSV- II 等,结果发现双黄连分散片对其中 4 种病毒 A₃、H₁N₁、RSV、HSV 有抑制作用, RNA、DNA 型各 2 种,说明对两者均有体外抗病毒作用,对病毒结构无针对性要求。在体内实验中,以 8.25、16.5、33g/kg 灌胃小鼠均有抑制流感病毒致肺病变、肺内流感病毒增殖作用,表明其体内抗病毒作用明显。可见双黄连分散片抗病毒作用明显,有治疗感冒的充分药理学基础。

参考文献:

- [1] 贺玉琢,高英杰,富杭育.正柴胡饮抗病毒作用的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,1996,2(1):12.
- [2] 富杭育,卢长安,贺玉琢,等.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.