

牛黄羚贝消炎片的抗病毒作用

韩 杨¹, 李宜平^{2*}

(1. 长春中医学院 药理学教研室, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医学院 药剂学教研室, 吉林 长春 130117)

牛黄羚贝消炎片系由牛黄、川贝、金银花、人参、大青叶等民间方药研制而成的中药复方制剂, 具有清热、解毒、清肺祛痰、止咳平喘之功效, 主要用于感冒风热证。本实验对其动物体内及组织培养中的抗病毒作用进行了研究, 为其临床用药提供药理依据。

1 材料与方法

1.1 药物: 牛黄羚贝消炎片(每片含绿原酸不得少于1.3 mg)由长春中医学院药剂教研室提供, 批号0301050以片剂制成100%混悬液, 用时以蒸馏水配成30%质量浓度, 以0.45 μm 微孔滤器滤过除菌备用, 贮于4 $^{\circ}\text{C}$ 。病毒唑注射液(100 mg/mL)由河南焦作市第二制药厂生产, 批号990728-2, 实验前配制成0.8%溶液, 滤过除菌备用。

1.2 细胞: Hep-2 传代细胞, 购于中国药品生物制品检定所。FL 细胞, 由白求恩医科大学微生物教研室保存。

1.3 培养液: IMDM 购于 Sigma 公司; 胎牛血清, 购于长春生物制品研究所; 胰蛋白酶, 日本产上海分装。

1.4 病毒株: 流感病毒 FM₁ 株、肠道病毒 CoxB₃ 均由吉林大学医学部微生物教研室保存; 单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1), 购于中国药品生物制品检定所; 腺病毒 III 型, 来源于吉林大学第一临床医院儿科研究室。

1.5 动物: 昆明种小鼠, (20 $\pm$ 2) g, 雌雄各半, 购自吉林大学实验动物中心。

1.6 牛黄羚贝消炎片对小鼠流感病毒性肺炎的作用^[1]: 取健康小鼠, 雌雄各半, 随机分为5组; 病毒唑(0.07 g/kg)组, 牛黄羚贝消炎片高、低剂量(6.0、3.0 g/kg)组, 正常对照组与模型组(蒸馏水), 每组10只, 于感染(正常组除外)前一天开始 ig 给药, 连续5 d。在乙醚浅度麻醉下滴鼻感染流感病毒 FM₁ 株 10 LD₅₀, 感染后 96 h 解剖, 取肺称质量, 计算肺指数和抑制率。

肺指数 = 肺质量/体重 $\times$ 100%

肺指数抑制率 = (模型组平均肺指数 - 实验组平均肺指数)/模型组平均肺指数 $\times$ 100%

1.7 牛黄羚贝消炎片对病毒致细胞病变的作用^[1~4]: ①细胞准备: 分别将 Hep-2 传代细胞和 FL 细胞培养 5 d, 使之成片, 用胰蛋白酶消化, 待细胞面出现针尖样小孔, 吸尽消化液, 取数毫升培养液吹散细胞计数, 至约 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 后, 接种于 96 孔塑料组织培养板内, 待细胞长成单层。②药物的无毒界限及病毒效价测定: 将牛黄羚贝消炎片 30% 药液, 病毒唑注射液分别稀释至 1:2、1:3、1:4、1:8、1:16 药液, 并分别加入 Hep-2、FL 单层细胞上, 每孔 0.2 mL, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵箱培养, 求出药物对细胞的无毒界限。牛黄羚贝消炎片药液在 1:8 (37.5 mg/mL) 以下稀释时对细胞无毒性作用, 实验时选用 1:8 (37.5 mg/mL) 稀释。病毒唑在 1:2 (10 mg/mL) 以下稀释时对细胞无毒性作用, 实验时选用 1:2 (2 mg/mL) 稀释。将流感病毒 FM₁、肠道病毒 CoxB₃、腺病毒 III 型、HSV-I 病毒进行 10 倍稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 不同稀释度, 并将各种稀释度的病毒感染 Hep-2 和 FL 细胞, 吸附 0.5 h 后洗去病毒液, 每一病毒稀释度各加 4 孔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内, 每天在倒置显微镜下观察病变, 连续 3 d, 记录各孔病变情况, 用改进寇氏法 (Karber 法) 分别求出流感病毒 FM₁、肠道病毒 CoxB₃、腺病毒 III 型、HSV-I 病毒滴度 (TCID₅₀)。③抗病毒作用: 在 96 孔塑料组织培养板上已培养成的单层 Hep-2 传代细胞和 FL 细胞内分别加入 1:8 稀释度的药液 (37.5 mg/mL)、2 mg/mL 的病毒唑药液及 30 TCID₅₀ 的病毒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育培养后于显微镜下观察细胞病变, 病变程度可分为无病变、有病变, 于孵育的不同时间 (第 1、2、3 天) 观察细胞病变, 以判断药物能否延迟病毒的致细胞病变作用。

$$\text{TCID}_{50} = \lg^{-1}(X_m + 1/2i - \sum P_i/100)$$

X_m : 最大病毒浓度病毒量的对数值; i : 相邻两组病毒浓度病毒量的对数值; $\sum P$: 各组病毒稀释度病毒致细胞病变的总和

1.8 统计学处理: 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验进行显著性分析。

收稿日期: 2005-02-15

基金项目: 吉林省科技厅资助课题 (吉科合字第 962903 号)

作者简介: 韩 杨 (1959—), 女, 吉林长春人, 副教授, 主要从事药理学研究。Tel: (0431) 6172352 E-mail: hanyang369@yahoo.com.cn

2 结果

2.1 流感病毒性肺炎小鼠肺指数值和抑制率:牛黄羚贝消炎片高、低剂量组肺指数值明显低于模型组 ($P<0.001$),且高剂量组作用强于病毒唑组。表明该药物对小鼠流感病毒所致肺炎具有抑制发生、发展,使其炎症减轻的作用。结果见表 1。

表 1 牛黄羚贝消炎片对流感病毒性肺炎小鼠肺脂数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Niu Huang Lingbei Xiaoyanpian on lung index of mice with influenza virus pneumonia ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肺指数/%	抑制率/%
正常	—	0.94±0.06	—
模型	—	1.47±0.06 $\Delta\Delta\Delta$	—
病毒唑	0.07	1.24±0.04***	15.64
牛黄羚贝消炎片	6.00	1.20±0.05***	18.00
	3.00	1.21±0.03***	17.00

与正常组比较: $\Delta\Delta\Delta P<0.001$

与模型组比较: *** $P<0.001$

$\Delta\Delta\Delta P<0.001$ vs normal group

*** $P<0.001$ vs model group

2.2 病毒致细胞病变:在感染的 4 种病毒的 30 TCID₅₀ 剂量下,牛黄羚贝消炎片 (37.5 mg/mL) 对流感病毒 FM₁ 株,腺病毒 III 型的致细胞病变有抑制作用,于第 2 天出现抑制作用;牛黄羚贝消炎片 (37.5 mg/mL) 对 HSV-1 病毒有一定的延缓作用。结果见表 2。

3 讨论

小鼠流感病毒性肺炎是用流感病毒小鼠适应株所致的出血性肺炎的模型,是最常用的病毒致整体动物感染模型。小鼠感染病毒后引起肺炎,导致肺组织内炎症细胞渗出增多,形成肝样实变,使全部肺质量增加,肺质量增加和肺炎的严重程度相关。该模型用于观察药物对流感病毒所致肺炎的预防和治疗作用。本实验于感染流感病毒 96 h 解剖称取肺质量,

表 2 牛黄羚贝消炎片对病毒致细胞病变活性的影响 ($n=4$)

Table 2 Effect of Niu Huang Lingbei Xiaoyanpian on cytopathogenic activity induced by virus ($n=4$)

药 物	$\rho/$ (mg·mL ⁻¹)	流感病毒 FM ₁	肠道病毒 CoxB ₃	腺病毒 III 型	HSV-1
病毒唑	2	+	+	+	+
牛黄羚贝消炎片	37.5	+	—	+	±

“+”:抑制作用;“—”:无抑制作用;“±”:有延缓作用

“+”: inhibition; “—”: non-inhibition; “±”: delay-action

计算肺指数值及肺指数抑制率,牛黄羚贝消炎片高、低剂量组肺指数值明显低于模型组,表明该药物对小鼠流感病毒所致肺炎具有抑制发生、发展,使其炎症减轻的作用。

细胞培养抗病毒试验常用抑制病毒致细胞病变 (CPE) 法,是因为许多病毒对感染细胞可产生明显的病变,在光学显微镜下可见细胞变圆,折光增加,空泡形成,细胞融合和细胞溶解。这些变化很容易与药物毒性所造成的细胞损害相区别,所以 CPE 法是最常用于研究药物的抗病毒试验的方法。牛黄羚贝消炎片 (37.5 mg/mL) 对流感病毒 FM₁ 株,腺病毒 III 型的致细胞病变作用有抑制作用。对 HSV-1 的致细胞病变作用有一定延缓作用。本实验结果表明牛黄羚贝消炎片具有较好的体内、体外抗病毒作用,在防治病毒性疾病方面具有较大的临床应用价值。

References:

- [1] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: Beijing People's Medical Publishing House, 2002.
- [2] Yang Z W, Zhou Y, Chao X Q. Antiviral effect of *Sophora alopecuroides* alkaloids on Cocksackie virus B₃ in vitro [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med* (四川中医), 2003, 21(3): 14-16.
- [3] Wang C H, Yang Z Q, Xiao H. Research of antiviral activity of Penciclovir to herpes virus in vitro [J]. *Virol Sin* (中国病毒学), 2002, 17(2): 102-105.
- [4] Heim A, Grumbach I P, Akerblom P, et al. Inhibition of coxsackievirus B₃ carrier state infection of cultured human by ribaririn and myocardial fibroblasts natural interferon alpha [J]. *Alpha Antiviral Res*, 1997, 34(1): 101-111.

《中国医院药学杂志》2006 年征订启事

《中国医院药学杂志》系中国科协主管、中国药学会主办的综合性医院药学专业性学术核心期刊。栏目有研究论文(制剂研究、新药研究、治疗药物监测、药动学、药品质量、药物配伍和相互作用、药物应用再评价)、药物与临床(临床疗效观察、临床用药分析、临床合理用药、药物不良反应及其防治)、综述、药事管理、科研简报、药物不良反应、读者园地、信息动态、医药企业及产品介绍等。

本刊为月刊,大 16 开,从 2006 年起每期 120 页,每期待定 12.50 元,全年 150 元。每月 18 日出版,国内邮发代号 38-50,国外代号:M65-38。

编辑部地址:武汉市胜利街 155 号 邮政编码:430014 电话:027-82836596

传真:(027) 82856411 E-mail: pharmacy@vip. 163.com