

热毒宁注射液体外抑制甲型 H1N1 流感病毒的研究

孙 兰^{1,2}, 段书敏³, 周 军^{1,2}, 王振中^{1,2*}, 毕宇安^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 102206

摘 要: **目的** 研究热毒宁注射液体外抑制甲型 H1N1 流感病毒的作用。**方法** 以奥司他韦为阳性对照, 采用 CPE 和 MTT 法观察热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒的抑制作用。**结果** CPE 法结果表明热毒宁注射液最大无毒浓度 (TC₀) 为 16.2 mg/mL, 半数中毒浓度为 (TC₅₀) 为 (24.5 ± 8.1) mg/mL; MTT 法测定结果表明热毒宁注射液 TC₀ 为 16.2 mg/mL, TC₅₀ 为 (21.7 ± 9.4) mg/mL。热毒宁注射液体外抑制甲型 H1N1 流感病毒结果显示, CPE 法和 MTT 法热毒宁注射液作用感染细胞 1 次组半数有效浓度 (IC₅₀) 为 (900.0 ± 173.2)、(933.3 ± 57.7) μg/mL, 治疗指数 (TI) 为 27.2、23.2; 热毒宁注射液作用感染细胞 3 次组 IC₅₀ 为 (666.7 ± 115.5)、(866.7 ± 208.1) μg/mL, TI 为 36.7、25.0。**结论** 热毒宁注射液具有明显体外抗甲型 H1N1 流感病毒的作用。

关键词: 热毒宁注射液; 流感病毒; 甲型 H1N1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674 - 5515(2014)08 - 0848 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.08.004

In vitro inhibition of Reduning Injection on influenza A/H1N1 influenza virus

SUN Lan^{1,2}, DUAN Shu-min³, ZHOU Jun^{1,2}, WANG Zheng-zhong^{1,2}, BI Yu-an^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

3. Institute of Virus Disease Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of Reduning Injection on influenza A/H1N1 influenza virus *in vitro*. **Methods** With Oseltamivir as positive control, CPE and MTT methods were used to observe inhibitory effects of Reduning Injection on influenza A/H1N1 influenza virus *in vitro*. **Results** The CPE method results showed that maximum of no toxicity concentration (TC₀) of Reduning Injection was 16.2 mg/mL, and median toxic concentration (TC₅₀) was (24.5 ± 8.1) mg/mL. The MTT method results showed that maximum of no toxicity concentration (TC₀) was (16.2 ± 0) mg/mL, and median toxic concentration (TC₅₀) was (21.7 ± 9.4) mg/mL. The *in vitro* inhibition of influenza A/H1N1 influenza virus of Reduning Injection showed the administration of Reduning Injection to infected cells once, median toxic concentration (TC₅₀) of the CPE method and the MTT method were (900.0 ± 173.2) μg/mL, (933.3 ± 57.7) μg/mL, therapeutic indexes (TI) were 27.2 and 23.2, and administration of Reduning Injection to infected cells for three times, median toxic concentration (TC₅₀) of the CPE method and the MTT method were (666.7 ± 115.5) μg/mL, (866.7 ± 208.1) μg/mL, TI were 36.7 and 25.0. **Conclusion** Reduning Injection has obvious resistance to the influenza A/H1N1 influenza virus *in vitro*. Administration of Reduning Injection to infected MDCK cells for three times is superior to the administration of Reduning Injection to infected MDCK cells once.

Key words: Reduning Injection; influenza virus; influenza A/H1N1

热毒宁注射液由青蒿、金银花、栀子组成, 具有清热、解毒、疏风之功效, 临床上用于治疗外感风热所致感冒、咳嗽, 上呼吸道感染所致的高热、微恶风寒、头身痛、咳嗽、痰黄等症。研究表明热

收稿日期: 2014-04-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2010CB735604)

作者简介: 孙 兰, 女, 主管药师, 研究方向为中药新药药效筛选与评价。E-mail: sunlan2012@126.com

*通信作者 萧 伟, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。

王振中, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: wzzhz-nj@163.com

毒宁注射液体外对禽流感病毒 H5N1、人鼻病毒 (N36)、腺病毒 3 (ADV3) 均有一定抑制作用^[1-3]。研究表明热毒宁注射液中 3 味中药均有一定的抑制病毒作用, 如栀子提取物体外对甲型流感病毒、副流感病毒 1 型 (PIV-1)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、柯萨奇 B 族病毒 3 和 5 型 (CoxB3、CoxB5)、单纯疱疹病毒 (HSV-1, HSV-2), 腺病毒 3 和 5 型 (AD3、AD5) 有明显的抑制作用, 其对小鼠流感病毒性肺炎的抑制作用与降低血清中 NO 水平有关^[4]。金银花中主要有效成分绿原酸具有良好的抗人巨细胞病毒 (HCMV) 的作用, 且在不同浓度下可有效地抑制 RSV、CoxB3、CoxB5、腺病毒 1 型和 3 型的生长^[5-6]。金银花对甲 3 型流感病毒及副流感病毒 W 型的增殖具有明显的抑制作用^[7]。金银花提取物还可有效地抑制甲型流感病毒 FM1 株、埃可病毒、禽流感病毒 AIV (H9N2 亚型) 的作用。青蒿水提取物中分离得到一种缩合鞣质在体外具有抗单纯疱疹病毒 (HSV-2) 和乙肝病毒 (HBV) 作用^[8]。本实验观察热毒宁注射液体外对甲型 H1N1 流感病毒的抑制作用, 为临床治疗流感提供依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

热毒宁注射液, 10 mL/支, 批号 090505, 由江苏康缘药业股份有限公司提供; 磷酸奥司他韦胶囊, 75 mg/粒, 批号 090103, 由宜昌长江药业股份有限公司生产; DMEM 培养基 (高糖, 含谷氨酰胺)、胎牛血清、牛血清白蛋白组分 V、青霉素、链霉素、HEPES 缓冲液, TPCK-胰酶 (牛胰腺来源 VIII 型)、Hank's 溶液均由华美公司提供。

1.2 细胞与病毒

狗肾传代细胞 (MDCK-P13), 由中国国家流感中心提供; 甲型 H1N1/BJ/09 流感病毒, 批号 09612, 由中国国家流感中心提供。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱 Nuair Usautoflow、倒置可视显微镜 (Olympus) 由华美公司提供; 生物安全三级实验室 BSL-3, 编号 CNAS/BLA/T003, 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供。

2 方法与结果

2.1 甲型 H1N1 流感病毒效价测定

狗肾传代细胞 MDCK-P13 代, 以 4×10^5 /mL 的浓度接种 96 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养至 MDCK 细胞对数生长期最旺盛 75%~90% 成片细

胞, 弃掉细胞培养液, 采用 Hank's 溶液洗细胞 2 次以去除残留的血清。采用病毒生长液 (DMEM 培养基中含牛血清白蛋白组分 12.5 mL、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL, HEPES 12.5 mL, TPCK-胰酶 0.5 mL), 2 倍稀释 7 个浓度, 每个浓度接种细胞 3 孔, 每孔 100 μL, 同时设正常细胞作为对照组。37 °C、5% CO₂ 孵箱, 吸附 2 h, 弃掉病毒稀释液, 采用 Hank's 溶液洗 2 次去除未吸附的病毒颗粒, 换病毒生长液, 每孔 100 μL, 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养, 每天在倒置显微镜下观察细胞形态 CPE 变化, 以 25% 以下细胞形态 CPE 变化为 “+”, 26%~50% 细胞形态 CPE 变化为 “++”, 51%~75% 细胞形态 CPE 变化为 “+++”, 76%~100% 细胞形态 CPE 变化为 “++++”, 用 Reed-Muench 法, 计算病毒半数感染浓度 (TCID₅₀)^[9]。结果表明, 病毒用 Reed-Muench 法测得甲型 H1N1 流感病毒对 MDCK 细胞 TCID₅₀=ln5.25。

2.2 药物对细胞毒性测定

2.2.1 细胞形态变化 CPE 法 MDCK 细胞以 4×10^5 /mL 的浓度接种 96 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养, 至细胞单层, 弃掉培养液, 采用 Hank's 溶液洗细胞 2 次。热毒宁注射液采用 DMEM 培养基 (牛血清白蛋白组分 12.5 mL、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL, HEPES 12.5 mL, TPCK-胰酶 0.5 mL) 2 倍稀释 7 个浓度, 即 260.0~4.1 mg/mL。阳性药物对照磷酸奥司他韦采用 DMEM 培养基, 2 倍稀释 5 个浓度, 即 4 000~250 μg/mL, 每个浓度接种细胞 3 孔, 每孔 100 μL, 同时设 MDCK 细胞对照, 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 3 d, 每天在倒置显微镜下观察细胞形态 CPE 变化, 以 25% 以下细胞形态 CPE 变化为 “+”, 26%~50% 细胞形态 CPE 变化为 “++”, 51%~75% 细胞形态 CPE 变化为 “+++”, 76%~100% 细胞形态 CPE 变化为 “++++”, 用 Reed-Muench 法, 计算药物最大无毒浓度 (TC₀) 和半数中毒浓度 (TC₅₀)。实验重复 3 次。结果表明, 热毒宁注射液对 MDCK 细胞的 TC₀、TC₅₀ 分别为 16.2 mg/mL、(24.5±8.1) mg/mL; 磷酸奥司他韦对 MDCK 细胞的 TC₀、TC₅₀ 分别为 1.0 mg/mL、(1.8±0.3) mg/mL。结果见表 1。

2.2.2 MTT 染色法 观察细胞 CPE 结果后, 加入 MTT (四甲基噻唑蓝: 采用 PBS pH 7.0 配制成 5 mg/mL 的储存液, 0.22 μm 孔滤膜过滤除菌, 4 °C 避光保存) 每孔 10 μL, 置 37 °C 培养 4 h, 然后加

入 100 μL DMSO, 室温 20 min, 充分溶解细胞 (过程中稍加震荡)。然后, 采用酶标仪在 560 nm 波长测定, 记录吸光度值, 计算药物对细胞的 TC_0 和 TC_{50} 。实验重复 3 次。结果表明, 热毒宁注射液对

MDCK 细胞的 TC_0 、 TC_{50} 分别为 16.2 mg/mL、(21.7 $\pm$ 9.4) mg/mL; 磷酸奥司他韦对 MDCK 细胞的 TC_0 、 TC_{50} 分别为 1.0 mg/mL、2.0 mg/mL。结果见表 1。

表 1 热毒宁注射液对 MDCK 细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Cell toxicity of Reduning Injection on MDCK ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	细胞形态 CPE 法		MTT 染色法	
	$\text{TC}_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{TC}_0/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{TC}_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{TC}_0/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
热毒宁注射液	24.5 $\pm$ 8.1	16.2	21.7 $\pm$ 9.4	16.2
磷酸奥司他韦	1.8 $\pm$ 0.3	1.0	2.0	1.0

2.3 热毒宁注射液体外抗甲型 H1N1 流感病毒作用

2.3.1 病毒 CPE 法 MDCK 细胞以 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种 96 孔培养板, 培养基为 L-谷氨酸完全型 DMEM、10% 的进口特级胎牛血清。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养至细胞对数生长期最旺盛 75%~90% 成片细胞, 弃掉细胞培养液, 采用 Hank's 溶液洗细胞 2 次。将甲型 H1N1 流感病毒采用病毒生长液 (DMEM 培养基中含牛血清白蛋白组分 12.5 mL、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、HEPES 12.5 mL、TPCK-胰酶 0.5 mL) 进行稀释, 浓度为 100 TCID_{50} , 接种经处理的 MDCK 细胞 96 孔培养板, 每孔 100 μL , 同时设正常细胞作为对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中吸附 2 h, 弃掉病毒稀释液, 采用 Hank's 溶液洗 2 次。热毒宁注射液选用对细胞的 TC_0 2 倍稀释 9 个浓度即 16 200.0~63.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时设阳性药物对照磷酸奥司他韦, 药物选用对细胞的 TC_0 2 倍稀释 9 个浓度, 即 1 000.0~3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个浓度接种感染细胞 3 孔, 每孔 100 μL 。实验分 1 次用药组 (不同浓度的药液作用被病毒感染的 MDCK 细胞 1 次),

3 次用药组 (不同浓度的药液作用被病毒感染的 MDCK 细胞, 每 24 小时弃掉旧药液, 换同浓度的药液, 连续 3 次)。同时设药物对照 (细胞不感染病毒, 加入不同浓度的药物)、正常细胞对照、病毒对照 (100 TCID_{50} 病毒液)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养, 每 24 小时在倒置显微镜下观察细胞形态 CPE 变化, 以 25% 以下细胞形态 CPE 变化为 “+”, 26%~50% 细胞形态 CPE 变化为 “++”, 51%~75% 细胞形态 CPE 变化为 “+++”, 76%~100% 细胞形态 CPE 变化为 “++++”, 至病毒对照出现 “++++” 时结束试验, 用 Reed-Muench 法计算药物半数有效浓度 (IC_{50}) 和治疗指数 (TI) 判断药效。试验重复 3 次。热毒宁注射液作用感染细胞 1 次组结果表明, IC_{50} 为 (900.0 $\pm$ 173.2) $\mu\text{g}/\text{mL}$, TI 为 27.2; 热毒宁注射液作用感染细胞 3 次组结果表明, IC_{50} 为 (666.7 $\pm$ 115.5) $\mu\text{g}/\text{mL}$, TI 为 36.7。磷酸奥司他韦作用感染细胞 1 次组结果表明, IC_{50} 为 (13 $\pm$ 2.3) $\mu\text{g}/\text{mL}$, TI 为 138.5; 磷酸奥司他韦作用感染细胞 3 次组结果表明, IC_{50} 为 (10.4 $\pm$ 1.1) $\mu\text{g}/\text{mL}$, TI 为 173.1。结果见表 2。

表 2 热毒宁注射液体外对甲型 H1N1 流感病毒抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Inhibition of Reduning Injection *in vitro* on influenza A/H1N1 influenza virus ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	用药次数/次	病毒 CPE 法		MTT 染色法	
		$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	TI	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	TI
热毒宁注射液	1	900.0 $\pm$ 173.2	27.2	933.3 $\pm$ 57.7	23.2
	3	666.7 $\pm$ 115.5	36.7	866.7 $\pm$ 208.1	25.0
磷酸奥司他韦	1	13.0 $\pm$ 2.3	138.5	14.3 $\pm$ 2.3	139.9
	3	10.4 $\pm$ 1.1	173.1	9.8 $\pm$ 2.0	204.1

2.3.2 病毒 MTT 染色法 观察细胞病变 CPE 结果后, 加入 MTT 5 mg/mL, 每孔 10 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 然后加入 100 μ L DMSO, 室温 20 min, 充分溶解细胞 (过程中稍加震荡)。然后, 采用酶标仪在 570 nm 波长测定, 记录吸光度值, 计算药物 IC_{50} 和 TI, 判断药效。试验重复 3 次。热毒宁注射液作用感染细胞 1 次组结果表明, IC_{50} 为 933.3 ± 57.7 μ g/mL, TI 为 23.2; 热毒宁注射液作用感染细胞 3 次组结果表明, IC_{50} 为 (866.7 ± 208.1) μ g/mL, TI 为 25.0。磷酸奥司他韦作用感染细胞 1 次组结果表明, IC_{50} 为 (14.3 ± 2.3) μ g/mL, TI 为 139.9; 磷酸奥司他韦作用感染细胞 3 次组结果表明, IC_{50} 为 (9.8 ± 2.0) μ g/mL, TI 为 204.1。结果见表 2。

3 讨论

中医学称流感为“时行感冒”或“重伤风”。其认识素有“伤寒论”和“温病论”两种, 基本病机为卫表不固、肺失宣肃和素体虚弱, 治疗的关键是根据患者的病理状态进行整体调治, 扶正祛邪, 每每配合以化湿、导滞、祛痰、攻结、化瘀等法。热毒宁注射液由青蒿、金银花、栀子组成, 具有清热、解毒、疏风之功效, 用于治疗外感风热所致感冒、咳嗽, 上呼吸道感染所致的高热、微恶风寒、头身痛、咳嗽、疲黄等症。

本实验 CPE 法结果表明热毒宁注射液最大无毒浓度 (TC_0) 为 16.2 mg/mL, 半数中毒浓度为 (TC_{50}) 为 (24.5 ± 8.1) mg/mL, CPE 法观察热毒宁注射液作用感染细胞 1 次及 3 次 IC_{50} 分别为 (900.0 ± 173.2) 、 (666.7 ± 115.5) μ g/mL, 根据公式 $TI = TC_{50}/IC_{50}$ 计算得到热毒宁注射液作用 1 次及 3 次 TI 分别为 27.2、36.7; MTT 法结果表明热毒宁注射液 TC_0 为 16.2 mg/mL, TC_{50} 为 (21.7 ± 9.4) mg/mL, CPE 法观察热毒宁注射液作用感染细胞 1 次及 3 次 IC_{50} 分别为 (933.3 ± 57.7) 、 (866.7 ± 208.1) μ g/mL, 计算得到热毒宁注射液作用 1 次及 3 次 TI 分别为 23.2、25.0。目前国内外实验室一般使用 MTT 法和 CPE 观察法对药物的细胞毒性进行分析^[10], 以前用 CPE 法检测药物毒性是最为常用的,

在显微镜下逐日观察细胞形态变化, 药物浓度高对细胞有毒性时细胞会变圆, 固缩坏死甚至脱落。但此法主观性比较强, 需要一定的经验, 而且耗时。而 MTT 分析法是使用 MTT 对细胞进行染, 通过检测其吸光度的改变可判断细胞的活性, 了解药物对细胞的毒性作用, 从而进行药物毒性的定量分析。热毒宁注射液作用 1 次及 3 次通过 MTT 法计算得到的治疗指数比较接近; 但 CPE 法计算得到的治疗指数差异较大, 主要是两者半数有效浓度相差较大。结果提示, 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒具有一定的抑制作用, 为药物临床用于流感提供试验依据, 但其抗流感病毒作用的分子机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 萧伟, 刘涛, 陈仕兰, 等. 热毒宁注射液对禽流感病毒的抑制作用 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1943-1945.
- [2] 冯肝珠, 周锋, 黄茂, 等. 热毒宁注射液对人鼻病毒(N36)的体外抑制作用 [J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(3): 262-266.
- [3] 冯肝珠, 周锋, 黄茂, 等. 热毒宁注射液对腺病毒 3 体外抑制作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(8): 573-577.
- [4] 王意忠, 崔晓兰, 高英杰, 等. 栀子提取物抗病毒试验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1176-1178.
- [5] 陈娟娟, 方建国, 万进, 等. 绿原酸体外抗人巨细胞病毒的实验研究 [J]. 医药导报, 2009, 28(9): 1138-1141.
- [6] 胡克杰, 王跃红, 王栋, 等. 金银花中氯原酸在体外抗病毒作用的实验研究 [J]. 中医药信息, 2010, 27(3): 27-28.
- [7] 胡克杰, 孙考祥, 王玻璃, 等. 氯原酸体外抗病毒作用研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(6): 430-432.
- [8] 张军峰, 谭健, 蒲蕾, 等. 青蒿鞣质抗病毒活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 307-311.
- [9] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 143-146.
- [10] 阎祖炜, 朱欣, 李闻文. MTT 法、CPE 观察法用于药物细胞毒性实验的比较与分析 [J]. 实用预防医学, 2004, 14(5): 1552-1554.