

复方野马追胶囊抗呼吸道合胞病毒研究

窦洁^{1*}, 彭蕴茹², 黄芳¹, 钱大玮², 周长林¹

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 观察复方野马追胶囊对呼吸道合胞病毒(RSV)感染及炎性因子 IL-8 释放的抑制作用。**方法** 采用细胞病变(CPE)观察和活细胞染色方法, 观察复方野马追胶囊对呼吸道合胞病毒感染细胞的保护。同时, 通过 ELISA 法测定培养上清 IL-8 的变化。**结果** 复方野马追胶囊对呼吸道合胞病毒感染有抑制作用, 其中以治疗法效果最为明显。同时该药对呼吸道合胞病毒感染后引起的 IL-8 释放也有明显抑制作用。**结论** 复方野马追胶囊具有明显的体外抗呼吸道合胞病毒感染、降低感染后气道炎症因子释放的作用。

关键词 复方野马追胶囊; 呼吸道合胞病毒(RSV); 细胞病变(CPE); 活细胞染色; IL-8

中图分类号: R978.7 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)02-0085-04

Study on Fufang Yemazhui Capsula against respiratory syncytial virus

DOU Jie¹, PENG Yun-ru², HUANG Fang¹, QIAN Da-wei², ZHOU Chang-lin¹

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Modern Chinese Pharmaceutical Preparation, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To observe the inhibition of Fufang Yemazhui Capsula on respiratory syncytial virus (RSV) infection and the release of inflammatory factors IL-8. **Methods** Cytopathic effect (CPE) observation and living cells staining were employed to investigate the protection of Fufang Yemazhui Capsula to the infected cells. ELISA was used to detect the concentration of IL-8.

Results Fufang Yemazhui Capsula obviously inhibited the RSV infection, especially after viral infection. And it also could significantly inhibit the release of IL-8 in RSV-infected A549 cells. **Conclusion** Fufang Yemazhui Capsula shows the significant antiviral effect *in vitro* and takes a role in controlling the release of airway inflammatory factors of RSV infection.

Key words: Fufang Yemazhui Capsula; respiratory syncytial virus (RSV); cytopathic effect (CPE); staining of living cells; IL-8

人类呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)属于副粘病毒科肺病毒属,是世界范围内普遍存在的人类呼吸道病原,可在人一生中反复感染^[1]。成人感染后主要引起较温和的上呼吸道疾病,在儿童、老人及免疫缺陷病人中可导致鼻炎、中耳炎、肺炎、毛细支气管炎等严重并发症。近年的研究表明,RSV感染也是引发哮喘的重要原因。

复方野马追胶囊的主药为菊科植物轮叶泽兰 *Eupatorium lindleyanum* DC. 的干燥地上部分,其在抗病毒及抗菌方面已表现出明显活性^[2-3]。本实验对其体外抗 RSV 活性进行了研究,为其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验用药 复方野马追胶囊(干粉),含生药量为 13.67 g/g,批号 060310,江苏省中医药研究院提供,临用前以蒸馏水配制成所需浓度的混悬液。利巴韦林颗粒,阳性对照药,中国药科大学制药有限公司生产,规格 50 mg,批号 070401。临用前以生理盐水配制成 5 mg/mL 溶液,以 0.22 μ m 无菌滤膜滤过除菌。

1.1.2 病毒 RSV Long 株细胞培养液,由南京医科大学微生物与免疫教研室提供。

1.1.3 细胞 人肺癌气道上皮细胞(A549 细胞株),

收稿日期: 2010-11-06

基金项目: 江苏省国际科技合作计划项目(BZ2007063)。

*通讯作者 窦洁(1971—),女,博士,副教授,研究方向为病毒免疫。Tel: (025)83271323 E-mail: dj83271323@gmail.com

由南京医科大学微生物与免疫教研室保存提供。以 10% 含胎牛血清（杭州四季青公司）的 1640 培养液（Gibco 公司）传代。

1.2 方法

1.2.1 复方野马追胶囊的细胞毒试验 取生长良好的 A549 细胞（密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ）悬液，加入 96 孔板，每孔 0.1 mL。待细胞贴壁后，弃去上清，用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液将药物连续倍比稀释 7 个浓度（表 1），以每孔 0.2 mL 加入培养板。每个药物浓度设 4 个复孔，同时设细胞对照孔。置培养板于 37°C 、5% CO_2 恒温箱内培养，连续 3 d，逐日观察药液对细胞有无毒性作用，与不加样品的正常细胞组对照。并进行细胞活性染色，染液为 0.1% 结晶紫，在酶标仪上 595 nm 处测定吸光度（ A ），记录试验结果。计算细胞存活率，求出供试品对 A549 的最大无毒浓度（ TC_0 ）。一般认为在药物作用下若细胞存活率 $>95\%$ ，此药物浓度即为 TC_0 ，对培养细胞无毒性，为药物作用的安全浓度^[4]。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{试验孔}} / A_{\text{对照孔}}$$

1.2.2 病毒毒力测定 将 -70°C 保存病毒液以 10 倍梯度稀释 7 个浓度，分别感染在 96 孔板中长成单层的 A549 细胞，每一浓度接种 4 个复孔，同时设正常细胞对照。置 37°C 孵育 2 h 后，上清更换为含 1% 胎牛血清的 1640 细胞维持液，置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养。48 h 后观察并记录细胞病变（CPE）情况，依 Reed-Muench 法计算半数组织培养感染剂量（ TCID_{50} ）。

1.2.3 复方野马追胶囊对 RSV 的抑制作用 将复方野马追胶囊以含 1% 胎牛血清的 1640 细胞维持液稀释成最高为 TC_0 的不同质量浓度的供试品。各浓度供试品，与 100 TCID_{50} 的 RSV，以不同方式处理在 96 孔板中长成单层的 A549 细胞。

预防法：供试品作用细胞 24 h，弃上清，加入 100 TCID_{50} 的 RSV 孵育 1 h。

管外法：供试品与 100 TCID_{50} 的 RSV 在 37°C 处理 1 h，然后共同孵育细胞 1 h。

治疗法：100 TCID_{50} 的 RSV 加入细胞孔， 37°C 孵育 1 h 后，再以供试品作用细胞。

同时设病毒对照组、空白细胞组、阳性药物对照组，置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养 48 h，观察并记录 CPE 情况。随后以 0.1% 结晶紫进行细胞活性染色，在酶标仪（波长 595 nm）测定 A 值。

根据所得 A 值，计算病毒抑制率^[5]。

病毒抑制率 = (试验组 A 值 - 病毒对照组 A 值) / (细胞对照组 A 值 - 病毒对照组 A 值)

1.2.4 IL-8 的测定 A549 细胞培养成单层，感染 100 TCID_{50} 的 RSV。上清更换为含 1% 胎牛血清的 1640 细胞维持液，置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h。采用酶联免疫吸附分析（ELISA）试剂盒（购自 R&D 公司）测定各组细胞上清液中 IL-8 的量，并与 RSV 感染组比较。

2 结果

2.1 复方野马追胶囊细胞毒性测定

由表 1 可知，对 A549 细胞无毒性的复方野马追胶囊最大无毒质量浓度（ TC_0 ）为 31.3 mg/L。故以 31.3 mg/L 为抗病毒试验中复方野马追胶囊（干粉）最高质量浓度。

表 1 复方野马追胶囊对 A549 的细胞毒性
Table 1 Cytotoxicity of Fufang Yemazhui Capsula on A549 cells

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	细胞存活率/%
复方野马追胶囊	500	37.1
	250	65.3
	125	87.9
	62.5	90.8
	31.3	97.1
	15.7	96.1
	7.9	99.5
利巴韦林	50	98.2

2.2 病毒毒力测定

病毒毒力测定结果见表 2，将 -70°C 保存病毒液稀释至约 2 $\text{TCID}_{50}/\mu\text{L}$ ，用于随后的供试品抗病毒试验。

2.3 复方野马追胶囊对 RSV 的抑制作用

通过 CPE 观察，发现复方野马追胶囊对 RSV 感染所引起的细胞病变效应有明显抑制作用，且该抑制作用随着药物质量浓度的升高而增强。图 1 为治疗法处理病毒感染细胞后，31.3、7.9、2.0 mg/L 供试品组的细胞病变抑制情况。

进一步研究表明，不同药物处理方法对 RSV 感染的影响有明显区别（图 2）。预防法对 RSV 感染几乎无效；采用管外法时，细胞病变效应减弱，病毒抑制率可达 30%，治疗法的作用最佳，病毒抑制率可达 60.81%。

表 2 RSV Long 株毒液毒力测定试验结果
Table 2 Results of virulence test of RSV Long

复孔数	稀释倍数							TCID ₅₀
	100	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
1	+	+	-	-	-	-	-	10 ^{-1.3}
2	+	+	+	-	-	-	-	
3	+	+	+	-	-	-	-	
4	+	+	+	-	-	-	-	

“+” 表示出现明显 CPE, “-” 表示无明显 CPE 出现
“+” refers to significant CPE, “-” refers to no significant CPE

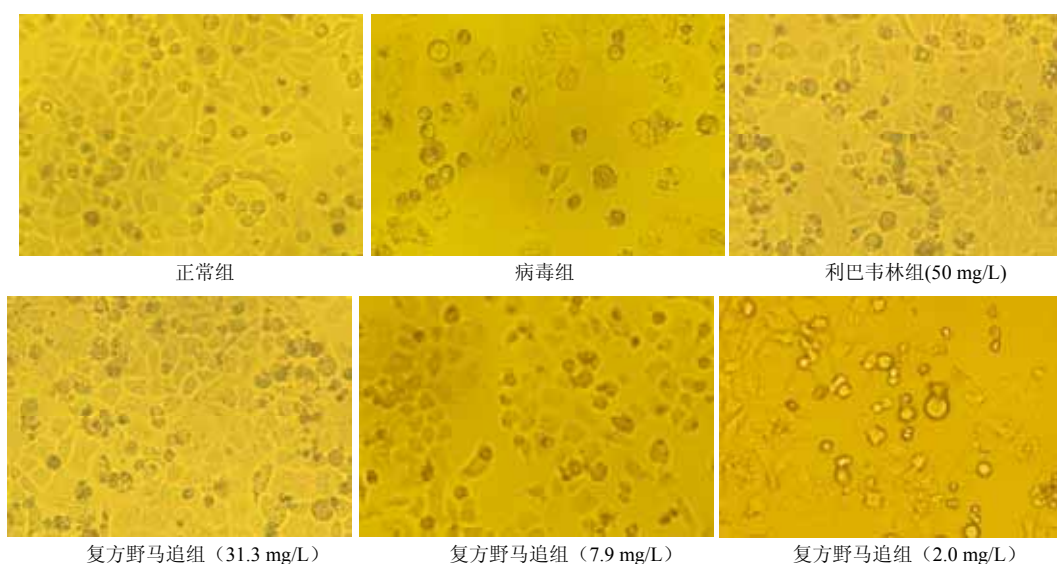


图 1 不同质量浓度复方野马追胶囊抗 RSV 的 CPE 观察结果 (治疗法)

Fig. 1 CPE of Fufang Yemazhui Capsula in different concentrations on RSV infection (after viral infection)

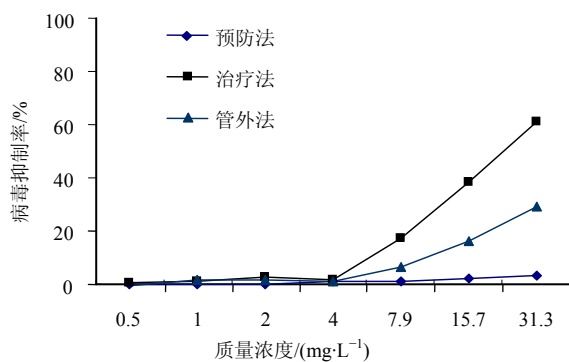
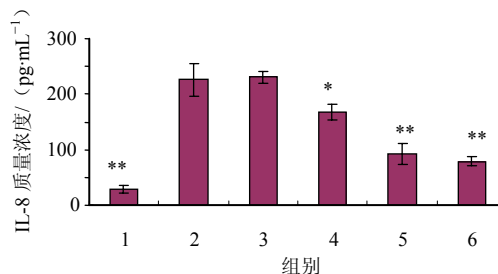


图 2 不同处理方式下复方野马追胶囊对 RSV 抑制率的影响
Fig. 2 Effect of Fufang Yemazhui Capsula on RSV inhibitory percentage with different drug deliveries

2.4 复方野马追胶囊对 RSV 诱导细胞释放 IL-8 的影响

采用 ELISA 法测定 RSV 诱导下气道上皮细胞 A549 释放炎症介质 IL-8 的能力, 以及复方野马追胶囊对 IL-8 释放的抑制作用。图 3 显示, RSV 诱导

了 IL-8 的释放, 外加复方野马追胶囊 7.9 mg/L 以上能够明显抑制 IL-8 的释放。



1- A549 对照; 2- RSV 感染 A549; 3- RSV 感染 A549+野马追 2.0mg/L; 4- RSV 感染 A549+野马追 7.9 mg/L; 5- RSV 感染 A549+野马追 31.3 mg/L; 6- RSV 感染 A549+利巴韦林 50 mg/L
与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

图 3 复方野马追胶囊对 RSV 感染 A549 细胞释放 IL-8 的影响

Fig. 3 Effect of Fufang Yemazhui Capsula on release of IL-8 in RSV infected A549

3 讨论

野马追具有清热解毒、祛痰定喘等功效,多用于慢性支气管炎、痰多咳喘等的治疗。以其为主药的复方野马追胶囊在体外对流感病毒,在体内对流感病毒和副流感病毒均表现出明显抑制作用^[2-3]。本实验研究了复方野马追胶囊在体外对 RSV 感染的影响。抗 RSV 研究结果表明,复方野马追胶囊对 RSV 感染具有抑制作用,且抑制活性随处理方式不同而有差异。其中治疗法(先感染病毒,后加药物处理)的病毒抑制率最高,预防法无抑制活性。由此推断,复方野马追胶囊抗 RSV 作用位点在病毒感染细胞。其作用的具体靶点有待进一步研究。

RSV 的致病性与其破坏气道上皮细胞有关,更与其感染后引发的机体免疫反应有关。研究表明,RSV 感染能够诱导气道上皮细胞产生多种细胞因子,如 IL-6、IL-8、TNF- α 等,进而引起炎症细胞进入气道,导致气道的高反应性,诱发及参与哮喘等疾病的发生^[6]。因此,对 RSV 感染的治疗,不能仅以抑制 RSV 感染为指标。通过药物调节病毒感染机体的免疫状态,也是治疗的重点^[7]。本研究以 IL-8 释放量的变化为指标,探讨了复方野马追胶囊对免疫系统的调节功能。本研究采用的 A549 细胞是气道上皮细胞。A549 细胞在 RSV 感染后炎症因子 IL-8 的释放量明显增加,而加入复方野马追胶囊能使其 IL-8 释放水平显著下降(图 3)。表明复方野马追胶

囊能够抑制 RSV 诱导的炎症因子 IL-8 释放。

本实验的结果显示复方野马追胶囊的抗 RSV 作用具有双重性,既能抑制 RSV 感染,又能抑制 RSV 感染引发的气道高反应,在 RSV 感染治疗中将发挥重要作用。

参考文献

- [1] Tripp R A, Oshansky C, Alvarez R, *et al.* Cytokines and respiratory syncytial virus infection [J]. *Proc Am Thorac Soc.*, 2005; 2: 147-149.
- [2] 彭蕴茹, 窦洁, 黄芳, 等. 复方野马追胶囊抗流感病毒实验研究 [J]. *中成药*, 2008, 30 (5): 650-654.
- [3] 彭蕴茹, 窦洁, 黄芳, 等. 复方野马追胶囊的体内抑菌抗病毒实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(3): 542-544.
- [4] 湛孝东, 王克霞, 李朝品. 蜗牛多糖体外抗乙型肝炎病毒作用研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(3): 66-68.
- [5] 冯肝珠, 周锋, 黄茂, 等. 热毒宁抗呼吸道合胞病毒 (RSV, Long 株) 作用体外实验研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2007, 27(9): 1009-1012.
- [6] Oshansky C M, Barber J P, Crabtree J, *et al.* Respiratory syncytial virus (RSV) F and G proteins induce IL-1 α , CC and CXCL chemokine responses by normal human bronchoepithelial cells [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(8): 1201-1207.
- [7] 莫红缨, 赖克方, 江永南, 等. 双黄连对呼吸道合胞病毒感染的气道上皮细胞炎症因子释放的影响 [J]. *广州医学院学报*, 2005, 33(2): 16-19.

中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《中草药》、Chinese Herbal Medicines (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com