

五虎汤对呼吸道合胞病毒复制的抑制作用研究[△]

湖南中医学院第一附属医院儿科(长沙410007)

贺双腾* 欧正武 伍参荣**

摘要 传统治喘名方五虎汤在体外和活体内均具有抑制呼吸道合胞病毒作用。在Hep-2细胞单层上,五虎汤抑制50%以上病毒空斑的浓度为1:80,在此一浓度,病毒繁殖量下降 10^{-2} TCID₅₀,病毒核酸合成下降率约55%。方中麻黄具有抗RSV活性,其抑制50%以上病毒空斑浓度为1.6mg/ml。在动物体内,本方通过雾化吸入或口服,能降低小鼠肺组织内RSV滴度,促使小鼠肺组织RSV提前消失,并能促进小鼠肺组织炎症吸收。

关键词 五虎汤 呼吸道合胞病毒 抑制作用

呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus, RSV)是引起婴幼儿肺炎,毛细支气管炎^[1],流行性喘憋性肺炎^[2]。感染性喘鸣^[1]的重要病毒病原,目前对RSV感染尚无安全有效的疫苗预防^[4]。国外近年试用病毒唑雾化吸入治疗,能减轻临床症状和减少病毒排出^[5],但治疗费用昂贵,病房设备与护理技术要求高^[6]。国内探寻中医药治疗RSV感染已积累了较多经验与资料^[7~10]。近年来,我们选用五虎汤在培养细胞上和动物体内进行了抗RSV实验研究,结果满意。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒: Hep-2细胞由湖南医科大学病毒研究室提供。RSV Long株, RSV N^J株, RSV GZ株由首都儿科研究所病毒室提供。

1.2 药物:五虎汤按朱丹溪《幼科全书》(见《医部全录》)所载:生麻黄2.1g 生甘草1.2g 细茶叶2.4g 生石膏4.5g杏仁(去皮尖)3g

五药按《中华人民共和国药典》(90年版)规格选购,洗净,加三蒸水100ml,煎成25ml(每毫升相当含生药500mg),4℃保存备用。

1.3 培养细胞上抑病毒实验

1.3.1 空斑抑制试验: Hep-2细胞接种于10ml小方瓶中,培养48h,弃培养液,加入约200 Pfu的RSV, 37℃吸附1h,加入含不同浓度五虎汤药液的EdgLe琼脂培养基, 35℃培养4d, 10%中性甲醛溶液固定, 0.5%结晶紫溶液染色,计数空斑。

1.3.2 病毒繁殖量降低测定: 以0.1 MOI(感染倍数)RSV感染细胞,培养72h,冻融3次,离心,取上清,测定病毒滴度。

1.3.3 病毒RNA合成抑制试验: 以2MOI的RSV感染Hep-2细胞单层,吸附1h,加入含不同浓度五虎汤药液和1μCi/ml(5^{-3} H)尿核苷(中国原子能科学研究院同位素研究所)的维持液,培养10h,破碎细胞, 50%冷三氯乙酸沉淀,玻璃纤维滤膜收集, 5%冷三氯乙酸冲洗, FJ2017G型液体闪烁计数器(西安)测定放射性。

*Address: He Shuangteng, Huhan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha

[△]本文为国家自然科学基金资助项目

*现在单位:湖南省中医研究院(410006) **微生物教研室

1.4 动物体内抗RSV实验

1.4.1 动物及分组: NIH纯系小鼠新生幼仔由湖南省医药工业研究所动物室提供。幼鼠产后无菌饲养, 第5天, 选健康无病幼鼠, 雌雄各半, 随机分为3组: 感染对照组, 五虎汤口服组, 五虎汤雾化组, 每组20只, 各组隔离, 保持室温20℃。

1.4.2 感染: 3组均按Graham法^[11]将滴度为 5.2×10^5 Pfu/ml的RSV悬液0.1ml点鼻感染。

1.4.3 治疗: 口服组以五虎汤煎液灌胃, 每鼠0.20ml/次, 3次/d(剂量为120ml/kg·d)。雾化组以CW-2A型晶体管超声雾化器将五虎汤煎液稀释3倍给药, 3次/d, 2h/次, 雾化液量为0.5ml/min, 每天雾化液量180ml(相当药量6ml/鼠·d, 剂量1200ml/kg·d)。雾化在容积60L的特制薄膜罩内进行。治疗于感染24h后开始, 疗程3d。

1.4.4 观察指标: 于感染后第5天和第10天分2批处死小鼠, 无菌取肺。右肺捣碎, 冻融3次, 离心, 取上清, 测定肺组织病毒滴度。左肺以10%中性甲醛溶液固定, 切片, 观察肺组织病变。

2 结果

2.1 对RSV空斑和病毒繁殖量的降低作用。药物组比病毒对照组出斑迟5~10h, 空斑数目明显少于对照组, 蚀斑范围亦明显缩小。药物浓度越高, 空斑数目越少, 两者呈明显负相关($r_s = -1$, $P < 0.05$), 病毒繁殖量亦随药物浓度增高而降低, 见表1。当五虎汤浓度为1:80时, 被抑制空斑数超过50%, 病毒繁殖量降低 $10^{-2.4}$ TCID₅₀。经对3株RSV重复实验, 结果一致, 见表2。

表1 五虎汤对RSV(Long株)空斑数目和病毒繁殖量的影响

组别	药物浓度	空斑数目 (n=4)	子代病毒滴度 (LgTCID ₅₀)
五虎汤组	1:10	17.5 ± 10.5 ^Δ	1.86 ± 0.32 ^Δ
	1:80	51.3 ± 9.6 ^Δ	2.13 ± 0.44 ^Δ
	1:160	91.5 ± 8.4 ^Δ	2.85 ± 0.37 ^Δ
	1:320	133.8 ± 9.8 ^Δ	3.52 ± 0.41 ^Δ
	1:640	176.3 ± 8.2*	4.02 ± 0.43*
病毒对照组	—	181.3 ± 10.2	4.53 ± 0.53

表2 五虎汤对3株RSV的抑制效果

药物浓度	空斑数目($\bar{x} \pm S$, n=3×4)		
	RSV Long株	RSV NJ株	RSV GZ
1:40	12.3 ± 8.4 ^Δ	9.1 ± 8.2 ^Δ	9.8 ± 7.3 ^Δ
1:80	56.5 ± 9.6 ^Δ	50.5 ± 9.4 ^Δ	45.5 ± 9.6 ^Δ
1:160	103.8 ± 10.3 ^Δ	91.3 ± 10.6 ^Δ	87.3 ± 10.3 ^Δ
1:320	144.5 ± 8.7 ^Δ	123.6 ± 8.9 ^Δ	121.8 ± 11.6 ^Δ
1:640	172.3 ± 10.6*	167.4 ± 10.7*	169.5 ± 10.2*
0	180.8 ± 10.4	173.8 ± 9.2	177.1 ± 10.1

$P < 0.05$, * $P > 0.05$ (t检验, 与病毒对照组比较)

$\Delta P < 0.05$, * $P > 0.05$ (t检验, 与病毒对照组比较)

2.2 对药毒RNA合成的抑制效果: 如图所示, 药物浓度越高, RSV感染组细胞破碎物的放射性越低, 当药物浓度为1:80时, 放射性降低约55%, 而非感染组细胞破碎物的放射性强度低于感染组, 且不受药物浓度影响。表明五虎汤对RSV核酸合成具有抑制作用。

2.3 方中单味药抗RSV作用筛选: 采用空斑抑制法对方中五药分别进行抗RSV作用试验, 以麻黄具有较好的抗RSV作用, 其抑制50%空斑浓度为1.6mg/ml(相当含生药量), 抑制90%空斑浓度为25mg/ml。茶叶在病毒吸附前有微弱抑制RSV作用, 但在病毒吸附后无此作用。杏仁、石膏、甘草3药未发现有抗RSV作用。

2.4 对培养细胞的毒性作用: 向培养24h的Hep-2细胞加入含不同浓度的五虎汤药液, 再培养72h, 所得细胞总数、死亡细胞数如表3, 在1:40药物浓度时, 细胞已能较好生长, 细胞总数与正常对照细胞无显著性差异。

2.5 对小鼠肺组织病毒滴度的降低作用: 各组小鼠肺组织病毒滴度测定如表4。在感染后第5天, 两治疗组肺组织RSV滴度均较感染对照组显著下降, 但五虎汤雾化组效果优于口服组($t = 6.11$, $P < 0.05$)。在第10天感染对照组肺组织RSV部分消失, RSV滴度大幅度下降,

这与RSV感染的自然病程相符^[11]。口服组仅余1例RSV未消失，雾化组已全部消失，两组与感染对照组比较，差异显著，见表4。提示五虎汤雾化或口服均能降低小鼠肺组织RSV滴度，促进RSV提前消失。

2.6 对小鼠肺组织炎症的改善作用：感染后第5天切片观察，3组小鼠肺部均有局灶性或大片弥漫性间质性炎症，肺间质增厚，淋巴细胞与单核细胞浸润，支气管粘膜水肿，但肺泡内无渗出物，肺组织炎症与文献报道相一致^[11]。同期作正常对照小鼠肺部切片检查，肺组织清晰，无炎症出现。感染对照

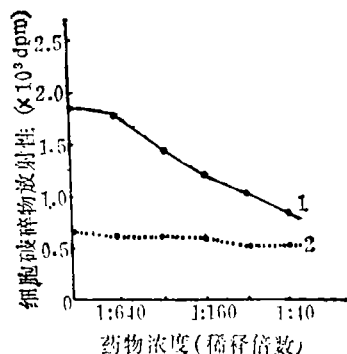


图 五虎汤对RSV核酸合成的抑制作用

1-RSV感染组细胞 2-非感染组细胞

表3 五虎汤对Hep-2细胞增长的影响(细胞数单位×10⁵/ml)

药物浓度	细胞接种量	加药72h 细胞总数	抑制率(%)	死亡细胞	死亡率(%)
1:10	2	3.71 ± 0.33 ^Δ	66.1	0.93 ± 0.23	34.3
1:20	2	5.83 ± 0.54 ^Δ	07.2	0.76 ± 0.24	13.0
1:40	2	6.73 ± 0.65*	15.3	0.42 ± 0.32	6.2
1:80	2	7.90 ± 0.62*	1.4	0.0 ± 0.18	4.2
0	2	7.98 ± 0.49		0.32 ± 0.13	4.0

$\Delta P < 0.05$, * $P < 0.05$ (t检验, 与未加本物细胞比较)

表4 五虎汤对小鼠肺组织增殖的抑制和炎症的改善作用

组 别	第5天 (n=10)		第10天 (n=10)		
	RSV滴度 (×10 ⁵ Pfu/肺)	小鼠肺炎数	RSV阳性数	RSV滴度 (Pfu/肺)	小鼠肺炎数
感染对照组	2.02 ± 0.31	10	6	24.7 ± 6.2	8
五虎汤口服组	1.65 ± 0.29 ^Δ	9*	1	0.5 ± 1.6 ^Δ	1 ^Δ
五虎汤雾化组	0.88 ± 0.27 ^Δ	18*	0	0 ^Δ	1 ^Δ

$\Delta P < 0.05$, * $P > 0.05$ (与感染对照组比较)

组与两治疗组肺炎小鼠数无差别,炎症程度与范围亦相同。在第10天,两治疗组肺炎已吸收,小鼠肺组织清晰。感染对照组小鼠肺炎无明显改善,肺炎小鼠数多于两治疗组,见表4。提示五虎汤无论口服或雾化吸入,均有改善RSV所致小鼠肺组织炎症作用,且两效果相同($\chi^2 = 0$, $P > 0.10$)。

3 讨论

本文结果显示,五虎汤在培养细胞上和动物体内均具有抑制RSV增殖作用,并有改善小鼠实验性RSV肺炎作用。五虎汤为中医学治疗小儿外感喘证的传统名方,出朱丹溪《幼科全书》(见《医部全录》),朱氏谓此方为发散之重剂。《医宗金鉴·幼科杂病心法要诀·喘证门》以此方治马脾风,云:“马脾风乃俗传之名,即暴喘是也,因寒邪容于肺俞,寒化为热,闭于肺经,故胸高气促,肺胀喘满,两肋煽动,陷下作坑,鼻窍煽张,神气闷乱。初遇之,急服五虎汤,继用一捻金下之,倘得气开,其喘自止。”根据临床症状,暴喘,马脾风

与现代医学的毛细支气管炎(或称阵发性喘憋性肺炎)相似。故临床报道,在西医常规治疗毛细支气管炎的基础上加用麻杏石甘汤或射干麻黄汤,疗效明显提高^[7]。五虎汤为麻杏石甘汤加茶叶而成,我们多年的临床经验证实,五虎汤治疗小儿阵发性喘憋性肺炎疗效可靠。已知RSV是小儿肺炎,毛细支气管炎,感染性喘鸣的重要病原,因此,根据本文实验结果,提示五虎汤治疗婴幼儿RSV感染具有抗病原治疗作用。

由于呼吸道RSV感染时,病毒在呼吸道粘膜细胞内增殖并引起粘膜损伤,病毒不进入血流^[1],故文献报道动物实验以雾化吸入抗病毒药物比其他给药途径效果均好^[12],临床亦大多主张用病毒唑连续雾化吸入治疗RSV感染,全身用药效果欠佳^[5,6]。但雾化吸入时,药物大部分消散在空气中,故所需药物用量大,造成一定浪费。本实验表明,五虎汤口服降低小鼠肺组织RSV滴度的效果低于雾化吸入,但改善肺部炎症的效果与雾化吸入相等,而剂量仅为雾化的1/10。说明五虎汤口服亦有其优越性,且不需要其他附加设施。

本实验发现五虎汤中麻黄具有较好的抗RSV作用,其有效成分有待进一步研究分析。

参 考 文 献

- 1 Stolt E J, et al. Arch Virol, 1985, 84: 1
- 2 王阿珏,等.中华儿科杂志, 1988, 26: 2
- 3 Henderson F W et al. J Pediatr, 1979, 95: 183
- 4 黄祯祥主编.医学病毒学基础及实验技术.北京:科学出版社, 1990. 717
- 5 Hall C B, et al. New Eng J Med, 1983, 308: 1443
- 6 Committee on Infectious Diseases, Pediatrics, 1987, 79(3): 475
- 7 首都儿科研究所.中华医学杂志, 1976, 56: 731
- 8 张粹荆.中华儿科杂志, 1988, 26: 43
- 9 贺双麟,等.湖南中医学院学报, 1991 (4): 55
- 10 阎田玉,等.中国中西医结合杂志, 1992, 12: 771
- 11 Graham B S, et al. J Med Virol, 1988, 26: 153
- 12 Hruska L F, et al. Antimicrob Agents Chemother, 1982, 21: 125

(1994-10-10收稿)

(上接第597页)

有性繁殖便于大面积种植,关键在于适时播种(秋播)及选用当年的新鲜种子;营养繁殖适用于小面积栽培,产量、质量均高于前者,但费工,不适用大田生产。

5.3 间苗对铁筷子并无必要,因为单生株与丛生株的根系重量、质量相差无几,且丛生者可节省耕地。也无需摘蕾,因花期极短,花也小,所耗养分可忽略不计。

5.4 铁筷子田内尚未发现过虫害,可能与其有小毒有关。但真菌易侵入根部,使其腐败,因此应注意排水和疏土。

参 考 文 献

- 1 甘肃省卫生局编.甘肃中草药手册.第3册.兰州:甘肃人民出版社, 1973. 1572
- 2 陕西省中医药研究院.陕西中药名录.西安:陕西省中医药研究院, 1985. 36
- 3 中科院西北植物所.秦岭植物志.第1卷.第2册.北京:科学出版社, 1974. 232
- 4 刘天魁,等.山西植物志.第1卷.北京:中国科学出版社, 1992. 564
- 5 中国人民解放军0276部队后勤部卫生所.新医学, 1971(10), 34
- 6 程绍瑜,等.同济医科大学学报, 1986, 15(3): 204
- 7 郭晓庄主编.有毒中草药大辞典.天津:科技翻译出版公司, 1992. 435

(1994-09-19收稿)

6.91. The result suggested that the stability constant can be improved at decreased temperatures and increased concentrations of MG.

(Original article on page 574)

Effects of Six Effective Components of Chinese Herbal Drugs on Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide phosphodiesterase

Yang Dongli, Gu Xiongfei, et al

Effects of nitidine (Nit), berberine (Ber), sinomenine (Sin), ephedrine (Eph), houttuynin (Hou), quercetin (Que) and trifluoprazine (TFP) on calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (CaM-PDE) were investigated by orthogonal design. Our observation came out that Nit, Que and TFP significantly inhibited the CaM-activated PDE activity ($P < 0.01$) in the order of $Que > TFP > Nit$. Ber, Eph, and Hou had no effects on the enzyme activity ($P > 0.05$). The effect of Sin on CaM-PDE was uncertain. It was also shown that there were cooperativity between Nit and TFP and synergism between Que and TFP. These results suggested that Nit and Que may act as calmodulin antagonists and might have different sites on calmodulin in comparison with those for TFP.

(Original article on page 582)

Inhibition of Respiratory Syncytial Virus by Wuhutang, A Traditional Chinese Prescription Composed of Five Medicinal Herbs

He Shuangteng, Ou Zhengwu, Wu Canrong

Wuhutang, a well known traditional Chinese herbal decoction for the treatment of asthma was found to have an antiviral effect on respiratory syncytial virus (RSV) both in vitro and in vivo. A 50% reduction of plaque formation was observed on Hep-2 cell monolayer at a concentration of 1:80. At such concentration, the value of $\lg TC_{ID50}$ of viral yield was 2.1, and 55% RNA synthesis of RSV was inhibited. It was found that among the five medicinal herbs in prescription *Ephedra sinica* Stapf is responsible for the antiviral activity on RSV. IC_{50} for plaque inhibition was found to be 1.6mg/ml. In animal model, Wuhutang significantly reduced the titre of RSV and accelerated RSV clearance in mice, and alleviated viral pneumonitis by either oral or aerosol route.

(Original article on page 585)

Effect of Common Threewingnut (*Tripterygium wilfordii*) on Blood Rheology in Experimental Arthritis Rats

Liang Wenbo, Jin Zhengnan, Piao Huishun, et al

Ethyl acetate extract of *Tripterygium wilfordii* (20mg/kg, 40mg/kg), given to adjuvant arthritis rats (ig) for 7 consecutive days, markedly decreased both high and low shear whole blood viscosity, plasma viscosity, whole blood reduction viscosity, hematocrit and fibrinogen content, but without effect on blood sedimentation and K value in blood sedimentation equation. These results indicated that the decreasing effect of *T. wilfordii* on blood viscosity may be related to its influence on red blood cells and plasma composition.

(Original article on page 589)