

- Biochem Pharmacol*, 1990, 40(10): 2343-2351.
- [8] Ikeda A, Shankar D B, Watanabe M, et al. Molecular targets and the treatment of myeloid leukemia [J]. *Mol Genet Metab*, 2006, 88(3): 216-224.
- [9] Hess C J, Berkhof J, Denkers F, et al. Activated intrinsic apoptosis pathway is a key related prognostic parameter parameter in acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(10): 1209-1215.
- [10] Liu Z, Huang S L, Li M M, et al. Inhibition of thioredoxin reductase by mansonone F analogues: Implications for anti-cancer activity [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 177(1): 48-57.
- [11] Sarkar F H, Li Y. Markers of apoptosis [J]. *Methods Mol Med*, 2006, 120: 147-160.
- [12] Boatright K M, Salvesen G S. Mechanisms of caspase activation [J]. *Curr Opin Cell Bio*, 2003, 15(6): 725-731.
- [13] Zhuang S, Lynch M C, Kochevar I E. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 250: 203-212.
- [14] Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7: 249-257.
- [15] Tsujimoto Y. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7: 249-257.
- [16] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281: 1322-1326.

金振口服液抗甲型 H1N1 流感病毒作用实验研究

萧伟¹, 郑丽舒², 尚强¹, 刘涛¹, 孙兰¹, 王振中^{1*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001; 2. 中国疾病预防控制中心病毒病研究所, 北京 100052)

摘要:目的 观察金振口服液对甲型 H1N1 流感病毒抑制作用。方法 采用体外抗病毒实验, 观察金振口服液对流感病毒的抑制作用; 采用体内实验, 以流感病毒感染小鼠, 观察小鼠生存时间、死亡率及肺组织病变程度。结果 金振口服液体外对甲型 H1N1 流感病毒有一定抑制作用, 体内则能明显延长感染小鼠的生存时间, 显著降低肺湿质量 ($P < 0.05, 0.01$), 减轻肺组织病变程度。结论 金振口服液体内外均有一定的抗甲型 H1N1 流感病毒作用。

关键词:金振口服液; 甲型 H1N1 流感病毒; MDCK 细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)09-1443-04

流感是一种传染性强、传播速度快的疾病。流感所引起的并发症和死亡非常严重。据世界卫生组织 (WHO) 发布的公告, 全球每年流感病例为 6~12 亿例, 死亡 50~100 万人^[1]。目前市场上的抗流感药物主要以化学药为主, 但化学药通常有不同程度的不良反应, 在临床应用上受到一定限制。而中医药临床防治流感具有独特效果, 不良反应少, 药源丰富, 价格低廉, 通过调节整体免疫功能抑制病毒复制, 阻止病毒致细胞病变, 改善临床症状快等, 在治疗流感方面显示了独特的优势^[2]。本实验观察金振口服液对流感病毒 A/PR/8/34 (甲型 H1N1 流感病毒) 抑制作用, 为临床应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 细胞与病毒: MDCK 细胞 (犬肾细胞), 流感病毒 A/PR/8/34 (甲型 H1N1 流感病毒), 均由病毒生物技术国家工程研究中心北京金迪克生物技术研究所提供。

1.2 药物与试剂: 金振口服液, 江苏康缘药业股份有限公司, 规格: 生药 1.84 g/10 mL (用蒸馏水稀

释 50 倍用于体外试验, 生药 3.68 mg/mL), 批号: 080115; 病毒唑注射液, 天津药业集团新郑股份有限公司, 规格: 10 mg/mL, 批号: 080219; 达菲, 上海罗氏制药有限公司, 规格: 75 mg, 批号: 080121; DMEM 培养基, 北京清大天一生物技术有限公司; 小牛血清, 杭州四季青药物试剂有限公司; 胰酶、MTT 均购自 Amresco 公司; DMSO 购自 Sigma 公司。

1.3 受试动物: BALB/c 小鼠, 清洁级, 体质量: 14~16 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 质量合格证: SCXK (京) 2007-0001。

1.4 仪器: 96 孔细胞培养板, Corning 公司; 超净工作台, 北京瑞泽康生物科技有限公司; CO₂ 恒温培养箱, 日本 Sanyo 公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 酶标仪, 美国伯乐公司。

2 方法

2.1 药物对 MDCK 细胞毒性实验: 96 孔细胞板中每孔接种约 5×10^4 个 MDCK 细胞, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 弃去细胞培养液, 加入金振口服液 20 μL (生药 3.68 mg/mL) 于 37 ℃、5%

* 收稿日期: 2009-05-14

作者简介: 萧伟 (1959—), 男, 山东昌乐人, 高级工程师, 博士, 研究方向为中药新型制剂的研究与开发。

CO₂培养箱中培养 5 d,光学显微镜下观察细胞形态,同时设立病毒唑(40 μg/mL)和无药物的阴性对照。于第 5 天每孔中加入 10 μL 5 mg/mL MTT 溶液,继续培养 4 h,弃去培养液后加入 100 μL DMSO,37 ℃ 振荡 10 min,测定 570 nm 处吸光度(A)值。设立 4 孔平行,取 4 个孔的吸光度平均值进行计算,观察金振口服液对细胞的毒性。试验重复 3 次。

2.2 体外抗病毒实验

2.2.1 抗病毒病变观察:在 24 孔板中培养的 MDCK 细胞上加入流感病毒(A/PR/8/34) 5 TCID₅₀^[3,4],在 33 ℃、5% CO₂温箱内孵育 1 h, Hanks 液洗去病毒液,加入细胞维持液(金振口服液:3.68 mg/mL,100 μL;病毒唑:40 μg/mL,100 μL),同时设病毒对照、细胞对照,置 33 ℃、5% CO₂培养箱内培养,连续观察 5 d。

2.2.2 空斑形成抑制实验:在 6 孔板中刚长满的单层 MDCK 细胞,弃去生长液,用 Hanks 液洗涤两遍,根据流感病毒 A/PR/8/34 的预实验空斑滴定结果,每孔加入 10⁻⁶倍稀释的流感病毒 0.5 mL,于 33 ℃、5% CO₂温箱内孵育 1 h,洗去病毒液,加入适量病毒唑(终质量浓度 40、20、10、5、2.5 μg/mL,一孔为空白对照),金振口服液(终质量浓度 368、184、92、46、23 μg/mL,一孔为空白对照),加入含 1% 琼脂糖、5 μg/mL L-苯甲磺酰苯丙氨酰甲酮处理的胰酶、2.5% Herps 缓冲液、pH 7.2~7.4 的 DMEM 琼脂糖第一层覆盖液覆盖细胞,继续在 33 ℃、5% CO₂温箱内孵育。培养 72 h 后,加入含 3.33% 中性红的第 2 层覆盖液过夜染色,直接观察空斑。根据空斑数目计算每一浓度相对于阴性对照的抑制率,计算其 IC₅₀。以病毒唑作为空斑形成抑制活性的阳性参照。

2.3 体内抗病毒实验:首先通过预实验测定流感病毒(A/PR/8/34)的 LD₅₀ 80 只小鼠随机分为 4 组,每组 20 只,即对照组 ig 给予蒸馏水;模型组 ig 给予蒸馏水;阳性组 ig 给予达菲水溶液,剂量为 20 mg/kg;金振口服液组 ig 给予金振口服液,剂量为 3.22 g/kg,给药体积均为 10 mL/kg。分别于攻毒前 4 h 给药 1 次及攻毒后连续给药 5 d,每天 1 次。造模时小鼠乙醚麻醉后,10 LD₅₀ 剂量鼻腔接种流感病毒 50 μL。每组取 10 只连续观察 14 d,记录小鼠死亡情况(计算死亡率及平均生存时间),另外 10 只分别于首次给药后 4、8 d 将小鼠处死,无菌取肺测定鼠肺湿质量 鼠肺研磨成肺悬液后测定肺内

病毒滴定(TCID₅₀),肺经甲醛固定后制作组织切片,HE 染色,光镜下观察肺组织形态学变化。

2.4 统计学处理:结果用 SPSS 统计学软件处理,计数资料用 χ^2 检验,计量资料采用 *t* 检验进行组间比较,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 药物对 MDCK 细胞毒性实验:3 次试验结果显示,在本实验条件下,金振口服液 20 μL(生药 3.68 mg/mL)时,细胞状态和阴性对照组一致,没有细胞毒性;阳性对照药物病毒唑 40 μg/mL 对细胞无任何毒性,选此质量浓度进行体外试验。

3.2 体外抗病毒实验

3.2.1 抗病毒病变观察:结果表明,金振口服液在体外具有一定抑制流感病毒致细胞病变作用。结果见表 1。细胞病变程度判定标准如下:“-”:无细胞病变;“±”:延缓细胞病变;“+”:1/4 以下细胞病变;“++”:1/4~1/2 的细胞有病变;“+++”:1/2~3/4 的细胞有病变;“++++”:3/4 以上的细胞有病变。

表 1 金振口服液对 H1N1 病毒致细胞病变作用的影响

Table 1 Effect of Jinzhen Oral Liquid on H1N1 virus induced cytopathic lesions

组别	病变效应	组别	病变效应
金振口服液	+	细胞对照	-
病毒唑	±	病毒对照	++++

3.2.2 空斑形成抑制实验:在本实验条件下,金振口服液的 IC₅₀ 为 75 μg/mL,说明在体外可以抑制流感病毒生长,具有一定的抗流感病毒作用。病毒唑的 IC₅₀ 为 5.0 μg/mL。

3.3 体内抗病毒实验

3.3.1 对小鼠生存率和平均生存时间的影响:模型组动物在攻毒后的第 5 天开始死亡,到第 10 天存活率为 0,平均生存时间为 7.1 d;金振口服液组在攻毒后的第 6 天开始死亡,到第 8 d 存活率降以最低,存活率为 50%,与模型组比较差异显著($P < 0.01$),平均生存时间为 10.6 d;达菲阳性组及对照组存活率均为 100%,平均生存时间大于 14 d,与模型组比较差异显著($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.3.2 染毒后小鼠肺内病变情况:实验结果表明,与模型组比较,金振口服液组的小鼠肺湿质量及肺内病毒滴度均显著下降($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.3.3 对病毒感染小鼠肺病理变化的影响:病理组织学观察发现:模型组动物肺组织有大面积的肺实变 肺泡间隔明显增宽 有大量淋巴细胞浸润,可见

表 2 金振口服液对 H1N1 染毒小鼠生存率和平均生存时间的影响 (n = 10)

Table 2 Effect of Jinzhen Oral Liquid on mice survival rate and average survival time (n = 10)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	存活动物/只	存活率/%	平均生存时间/d
对照	-	10	100 **	> 14
模型	-	0	0	7.1
达菲	0.02	10	100 **	> 14
金振口服液	3.22	5	50 **	10.6

与模型组比较: ** P < 0.01

** P < 0.01 vs model group

表 3 金振口服液对 10 LD₅₀ H1N1 染毒小鼠肺组织病变的影响 (n = 5)

Table 3 Protective effect of Jinzhen Oral Liquid on lung tissue lesions of mice infected by 10 LD₅₀ H1N1 virus (n = 5)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	染毒后第 4 天		染毒后第 8 天	
		TCID ₅₀	肺湿质量/mg	TCID ₅₀	肺湿质量/mg
对照	-	-	138 ± 22	-	148 ± 19
模型	-	5.75 ± 0.87	340 ± 32 **	5.63 ± 0.75	371 ± 38 **
达菲	0.02	2.94 ± 0.63	182 ± 30	2.75 ± 0.35	192 ± 38
金振口服液	3.22	4.06 ± 0.43	275 ± 33	3.94 ± 0.52	306 ± 32

与对照组比较: ** P < 0.01

与模型组比较: P < 0.05 P < 0.01

** P < 0.01 vs control group

P < 0.05 P < 0.01 vs model group

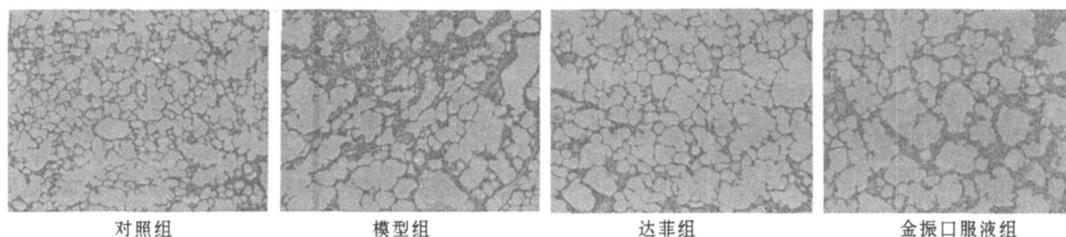


图 1 金振口服液对小鼠肺组织病理改变的影响

Fig. 1 Effect of Jinzhen Oral Liquid on lung pathological changes of infected mice

时,小鼠则因呼吸障碍导致死亡。金振口服液能有效控制肺部炎症反应的程度和范围,局限病灶的蔓延,显著减轻小鼠肺部组织的病理损害,从而保护了肺功能,这可能是应用金振口服液治疗后,小鼠死亡率明显降低、生存时间明显延长的直接原因。

金振口服液为一种中药复方口服液,处方由黄芩、石膏、人工牛黄、大黄等药物组成,具有清热解毒,祛痰止咳的功效。前期研究表明该药对流感病毒 PR3 株型、呼吸道合胞病毒、SARS 等有较好的抑制、杀灭作用^[5]。有研究表明,抗病毒单味中药多为清热解毒药^[6],黄芩、石膏均属于此类中药。其组方中甘草、大黄、黄芩等具有抗多种病毒的作用,并具有调节机体免疫和抗炎作用^[7,8]。因此,推测金振口服液发挥了几种抗病毒中药抗流感病毒的协同

肺泡上皮细胞增生和肺泡缩小,肺组织含气量显著减少,肺泡腔有液体渗出与出血灶;金振口服液组小鼠肺组织病变较模型组减轻,肺泡间隔略有增宽,可见淋巴细胞浸润,显示出一定的保护效应。结果见图 1。

4 讨论

本研究通过体外细胞培养法和体内建立病毒感染动物模型研究了金振口服液的抗甲型 H1N1 流感病毒作用。体内、外实验结果均显示金振口服液具有一定的抗甲型 H1N1 流感病毒作用,体外细胞实验证明金振口服液能直接抑制甲型 H1N1 流感病毒;体内抗病毒实验通过存活率、平均存活时间、鼠肺实变、鼠肺内病毒滴度 (TCID₅₀) 及鼠肺病理切片等多个参数评定显示金振口服液具有一定的抗甲型 H1N1 流感病毒活性。

经病理剖观察,流感病毒所致的小鼠肺炎病理改变为典型的间质性肺炎表现,肺泡间隔明显增宽,肺间质内血管充血、水肿及淋巴细胞、单核细胞等炎细胞浸润。通过肺部病理组织学观察比较分析,流感病毒所致小鼠肺炎的直接致死原因是病毒感染引发的免疫炎症病理损害。病灶处的肺泡由于免疫炎症反应,弹性变差,通气功能减低甚至丧失,当病变累及肺大部,大部分肺泡功能受损,无法代偿

作用,同时通过调控免疫反应及改善微循环,而达到治疗的效果。

参考文献:

- [1] 初正云,王雪峰,程嘉艺. 解毒胶囊抗流感病毒的实验研究 [J]. 中成药, 2007, 29(9): 1281-1284.
- [2] 安益强,贾晓斌,袁海建,等. 板蓝根抗病毒物质基础研究思路 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 616-619.
- [3] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 北京:中国三峡出版社, 1997.
- [4] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京:科学出版社, 1990.
- [5] 萧伟,徐兰兰,霍翠翠. 金振口服液对 SARS 病毒抑制作用的实验研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(5): 343, 443.
- [6] 胡旭,邱全璜,姜良铎. 中药抗呼吸道流感病毒感染实验研究概况 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(2): 180.
- [7] 商亚珍,苏丙凡. 黄芩根及其茎叶成分的药理学研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2005, 22(2): 153.
- [8] 马振亚. 中药抗病毒抗菌作用研究 [M]. 北京:中国医药科技出版社 2005