

大德牌抗病毒口服液抗病毒药效研究

刘向红 刘建华¹ 袁 野¹(¹ 济南 250011 山东省济南市山东大学齐鲁医院;¹ 义乌 322000 浙江大德制药有限公司)

大德牌抗病毒口服液是由板兰根、石膏、芦根、生地黄、郁生、知母、石菖蒲、广藿香、连翘等经加工制成的口服液。具有清热祛湿、凉血解毒的功效。用于风热感冒、温病发热、及上呼吸道感染、流感、腮腺炎等病毒感染疾患。

1 实验材料

1.1 抗病毒浸膏:含生药 9.697g/ml,由浙江大德药业有限公司提供。

1.2 病毒株:流感甲型标准毒株(A/沪防/1/98),由浙江省疾病预防控制中心病毒研究所提供;

1.3 鸡胚:选用 10 日龄 SPF 鸡胚,由浙江省农科院提供;

1.4 1%豚鼠血球溶液:由浙江省疾病预防控制中心病毒研究所提供;

1.5 含 1%牛血清维持液:由浙江省疾病预防控制中心病毒研究所提供;

1.6 不含牛血清维持液:由浙江省疾病预防控制中心病毒研究所提供。

2 实验方法与结果

2.1 病毒毒力测定:

2.1.1 病毒系列稀释液制备:

取 0.2ml 病毒(Vi)原液加入 1.8ml 含 1%牛血清维持液,混匀得 10⁻¹ 浓度 Vi 稀释液,再从中取 0.2ml,加入 1.8ml 含 1%牛血清维持液,混匀得 10⁻² 浓度 Vi 稀释液,依次类同操作,分别制得 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 系列,10 倍 Vi 稀释液,再将各浓度 Vi 稀释液置 34-35℃ 孵育箱中,中和 1h,备用。

2.1.2 Vi 稀释液的植入及培养:

取 35 个 SPF 鸡胚,分成 7 组,每组 5 个,分别在鸡胚尿囊腔中植入各系列浓度的 Vi 稀释液 0.2ml/胚,蜡封气囊腔上部植入 Vi 时造成的小孔,再将鸡胚置 34-35℃ 孵育箱中培养 48h,取出置 4℃ 冰箱中过夜。

2.1.3 病毒半数感染剂量的确定:

取出置 4℃ 冰箱中过夜后的各鸡胚尿囊液 50ul,置 72 孔 U 板;再取其中 25ul,用无菌生理盐水 2 倍稀释成 2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024 等 10 个不同病毒抗原滴定的稀释液,再用 1%的豚鼠血球溶液 25ul 滴定,进行血球凝集试验(按《医学病毒学基础及实验技术》介绍方法进行),并观察凝集反应,结果见表 1,并计算病毒半数感染剂量(TCID₅₀)。

2.2 药物对鸡胚毒性测定:

将 1/2 浸膏稀释液(浸膏与同体积无牛血清维持液混匀即得) 1/4、1/8、1/16、1/32 稀释液按 0.2ml/胚植入鸡胚尿囊腔中,每组 3 个,共 15 个鸡胚,另设正常对照组,3 胚:在 34-35℃ 孵育箱中培养 48h,期间观察鸡胚生长及存活情况,发现抗病毒浸膏组对鸡胚生长发育情况与正常对照组基本一致,48h 后均存活,未见毒性作用,故可以认为 967.9mg/胚

的浓度低于它的最大无毒剂量(TD₅₀)。

表 1 不同浓度的 Vi 稀释液的凝集情况

组别	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
10 ⁻¹	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10 ⁻²	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
10 ⁻³	1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
10 ⁻⁴	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
10 ⁻⁵	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁶	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁷	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

根据以上结果计算,按经验公式^[1]可计算 TCID₅₀ = 10^{-(3+0.5-4/5)} = 10^{-4.3}

2.3 药物对鸡胚内流感病毒抑制试验

2.3.1 接种鸡胚的各组接种液的制备

(1) 用药组:

取浸膏原液、1/2、1/4、1/8 浸膏稀释液,各 1.0ml,分别加入 1.0ml 100 × 2 TCID₅₀ 浓度的 Vi 稀释液,混匀,置 34-35℃ 孵育箱中,中和 1h,备用。

(2) Vi 对照组:

取 100 × 2 TCID₅₀ 浓度的 Vi 稀释液 1.0ml,加入同体积的含 1%牛血清的维持液,混匀,置 34-35℃ 孵育箱中,中和

1 h,备用。

(3) 药物对照组:

取浸膏原液 1.0 ml 加入同体积无牛血清维持液,混匀,置 34 - 35 °C 孵育箱中,中和 1 h,备用。

(4) 阴性对照组:

取维持液 2 ml,置 34 - 35 °C 孵育箱中,中和 1 h,备用。

2.3.2 抗病毒试验

将上述接种液以 0.2 ml/ 胚的量接种于 10 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔中,其中用药组共 4 组,病毒对照组、药物对照组、阳性对照组、阴性对照组各一组,共 8 组,每组 8 胚。将上述接种完毕的鸡胚,置于 34 - 35 °C 孵育箱中培养 48 h。取出置于 4 °C 冰箱中过夜,再取出各鸡胚的尿囊液,进行血球凝集试验。采用 Fisher 精确概率检验法,比较各药物组与病毒对照组的感染率。结果见表 2。

表 2 抗病毒浸膏对流感病毒的抑制作用

分 组	浓度 (mg/ 胚)	有感染	未感染	感染率 (%)
抗病毒浸膏	967.9	0	8	0***
	483.9	0	8	0***
	241.9	0	8	0***
	120.9	8	0	100
Vi 对照组		8	0	100
药物对照	967.9	0	8	0***
阴性对照	等量维持液	0	8	0***

经 Fisher 精确概率检验 *** $P < 0.001$

结果表明,剂量 ≥ 241.9 mg/ 胚的抗病毒组对流感甲型病毒均有显著的抑制作用。

3 讨论

经过试验说明,抗病毒浸膏对甲型流感病毒有显著的抑制作用,与抗病毒口服液功能相吻合。

参考文献

- 1 常见病毒疾病实验技术.中国医学科学院流行病防治研究所编.北京:科学出版社,1978.
- 2 杨怡姝,等.抗病毒 I 号中药在鸡胚中对流感病毒的抑制作用.哈尔滨医科大学学报,2000,34(5):329.
- 3 黄祯祥.医学病毒学基础及实验技术.北京:科学出版社,1990.
- 4 吕圭源,王一涛.中药新产品开发学.北京:人民卫生出版社,1997.
- 5 徐淑云,等.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,1991.

收稿日期:2002 - 04 - 19