

清热合剂体外抗腺病毒 III 型作用

何晓静,张岩,肇丽梅^{*} (中国医科大学附属第二医院临床药理研究室,沈阳 110004)

摘要:目的 研究清热合剂对腺病毒 III 型 (adv_3) 的抑制作用。方法 采用细胞培养技术,以双黄连为阳性对照药,观察清热合剂在非洲绿猴肾细胞 (VERO) 和咽喉癌上皮细胞 (HEP-2) 中对 adv_3 的抑制作用。结果 在 VERO 细胞中,清热合剂半数中毒浓度 (TD_{50}) 为 $31.62\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,抗 adv_3 的半数有效浓度 (IC_{50}) 为 $0.45\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,治疗指数 (TI) 为 70.27;在 HEP-2 细胞中, TD_{50} 为 $32.10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,抗 adv_3 的 IC_{50} 为 $0.52\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,TI 为 61.73。清热合剂对 adv_3 抑制作用存在明显的量效关系 ($P < 0.01$)。结论 清热合剂在 VERO 和 HEP-2 细胞中对 adv_3 有明显抑制作用。

关键词:腺病毒 III 型;抗病毒作用;清热合剂

中图分类号: R283.6; R965.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)02-0083-03

The Anti-adenovirus Type 3 Effect of Qing Re He Ji

HE Xiao-jing, ZHANG Yan, ZHAO Li-Mei^{*} (Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the anti-adenovirus type 3 (adv_3) effect of Qing Re He Ji (QRHJ). **METHODS** The anti- adv_3 effect of QRHJ was observed by means of the technique of VERO and HEP-2 cell culture using Shuang Huang Lian as a positive control. **RESULTS** In VERO and HEP-2 cell culture, QRHJ was a potential inhibitor of adv_3 in concentration-dependent manner ($P < 0.01$). The TD_{50} , the IC_{50} and TI were $31.62\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.45\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 70.27 in VERO cell culture and $32.10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.52\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 61.73 in HEP-2 cell culture, respectively. **CONCLUSION** QRHJ has a significant anti- adv_3 effect in VERO and HEP-2 cell culture.

KEY WORDS: Adenovirus type 3; Anti-viral effect; Qing Re He Ji

清热合剂由黄芩、大青叶、葛根、茵陈、贯众五味中药组成,方中黄芩、大青叶清热解暑为主药,辅以葛根发表解脉,清热生津,以助主药清热解暑的同时生津而不伤阴,扶助正气。佐以贯众清热解暑以祛邪,茵陈,以清热,五药合用共奏清热解暑、祛邪扶正之功。在诸多的呼吸道病原体中,腺病毒的感染在我国比较普遍,婴幼儿腺病毒肺炎又是我国发病率最高的一种病毒性肺炎,在北方病情严重,病死率 5% 以内。腺病毒也是引起哮喘的呼吸道病毒之一^[1]。为此,我们对清热合剂抗腺病毒 III 型 (adv_3) 的药效作用进行了体外试验。

1 实验材料

1.1 药物与试剂

试验药物:清热合剂,呈棕色液体、水溶性,含生药量为 $1.35\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,由中国医科大学附属第二医院药剂科研制,批号:20031222;阳性对照药物:注射用双黄连粉针剂,为黄棕色粉末、水溶性,规格每支 600 mg,批号:0402215,由哈尔

滨中药二厂生产;细胞维持液:含 2% 小牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 双抗 (青霉素终浓度 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素终浓度 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)、1% HEPES 的 DMEM。临用前用 7.4% 的 NaHCO_3 将 pH 调至 7.6 ~ 7.7。

1.2 细胞与病毒株

细胞:非洲绿猴肾细胞 (VERO),咽喉癌上皮细胞 (HEP-2),由辽宁省疾病预防控制中心感染病研究室提供;病毒株:腺病毒 III 型 (adv_3),由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法

2.1 药物毒性测定

用细胞维持液将清热合剂和双黄连连续倍比稀释 7 个剂量,按常量分别加入细胞已长成单层的 96 孔培养板中,置 37°C ,5% CO_2 孵箱培养,倒置显微镜下每日观察细胞形态变化,连续观察 7 d,每个剂量组设 4 孔,同时设正常细胞对照。计算药物半数中毒浓度 (TD_{50}),确定药物的最大无毒浓度 (TD_0)。

基金项目:辽宁省教育厅高等学校科学研究项目 (编号 05L455)
作者简介:何晓静,女,硕士,主管药师 * 通讯作者:肇丽梅,女,博士,副主任药师 Tel: (024) 23925108 E-mail: LMZhaol6@hotmail.com

2.2 病毒对细胞半数感染浓度的测定

用维持液将病毒稀释成 $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}$ 倍 14 个浓度,按常量分别加入细胞已长成单层的 96 孔培养板中,置 37°C , 5% CO_2 孵箱内吸附 2.0 h,弃掉病毒液,更换正常细胞维持液,温箱内继续培养,倒置显微镜下每日观察细胞病变 (CPE) 程度并记录,连续观察 7 d,每个剂量组设 4 孔,同时设正常细胞对照,计算组织半数感染量 (TCID_{50})。

2.3 药物对 adv_3 病毒的抑制作用

根据试验结果采用细胞病变抑制实验 (CPEI) 对清热合剂进行药效测定。以 100TCID_{50} 的病毒量接种细胞,置 37°C , 5% CO_2 孵箱内吸附 2.0 h,弃掉病毒液,更换含不同浓度清热合剂和双黄连的维持液,温箱内继续培养。同时设正常对照、药物对照及病毒对照。每日倒置显微镜下观察病毒对细胞的作用结果并记录,直至病毒对照细胞 CPE 出现 + + + + 时结束试验。计算药物的半数有效浓度 IC_{50} 和治疗指数 TI。

2.4 统计方法

Reed-Muench 法^[2] 计算药物半数中毒浓度 (TD_{50}), 半数有效浓度 (IC_{50}) 和病毒的组织半数感染量 (TCID_{50}); 治疗指数 (TI)^[3] = $\text{TD}_{50} / \text{IC}_{50}$; Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 检验法比较药物各剂量组与病毒对照组细胞病变程度的差异^[4]; 对药物剂量对数和 CPE 抑制率进行回归分析^[4], 判定是否存在量效关系。数据处理采用 SPSS 11.0 软件完成。

表 2 清热合剂对 adv_3 病毒的抑制作用

Tab 2 Antiadenovirus type 3 effect of Qing Re He Ji

分组	药物 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	VERO					HEP-2				
		每孔 CPE 程度 ¹⁾					CPE 抑制率 / %				
清热合剂	3.37	0	0	0	0	100 ²⁾	0	0	0	0	100 ²⁾
	1.69	0	0	0	0	100 ²⁾	0	0	0	0	100 ²⁾
	0.84	1	1	1	1	85.18 ²⁾	1	2	2	1	76.92 ²⁾
	0.42	2	2	2	3	45.83 ²⁾	2	2	3	3	38.46 ²⁾
	0.21	3	3	3	3	13.79	3	3	3	3	12.5
双黄连	0.11	4	4	4	4	0.00	4	4	4	4	0.00
	1.00	4	4	4	4	0.00	4	4	4	4	0.00
	0.50	4	4	4	4	0.00	4	4	4	4	0.00
	0.25	4	4	4	4	0.00	4	4	4	4	0.00
	0.13	4	4	4	4	0.00	4	4	4	4	0.00
正常对照	0.06	4	4	4	4	0.00	4	4	4	4	0.00
	0.03	4	4	4	4	0.00	4	4	4	4	0.00
病毒对照		0	0	0	0		0	0	0	0	
		4	4	4	4		4	4	4	4	

注: 1) CPE 程度: 0 表示无明显 CPE, 1 表示 CPE 为 0 ~ 25%, 2 表示 CPE 为 25 ~ 50%, 3 表示 CPE 为 50% ~ 75%, 4 表示 CPE 为 75% ~ 100%;
2) 表示药物对 adv_3 病毒有显著抑制作用 ($P < 0.05$)
Note: 1) Degree of CPE: 0, no CPE; 1, 0 ~ 25% of CPE; 2, 25% ~ 50% of CPE; 3, 50% ~ 75% of CPE; 4, 75% ~ 100% of CPE; 2) Drug has significant inhibition on adv_3 virus ($P < 0.05$)

清热合剂在 VERO 和 HEP-2 细胞中抑制 adv_3 病毒致细胞病变的作用随着药物剂量的增加而增强, 呈明显的量效关系; 对药物剂量对数和 CPE 抑制率进行回归分析, 清热合剂在 VERO 和 HEP-2 细胞中回归系数 b 分别为 0.988 ($P = 0.002$), 0.990 ($P = 0.001$)。

3 结果

3.1 药物毒性测定

根据所得数据, 采用 Reed-Muench 法计算清热合剂及双黄连对 VERO 及 HEP-2 细胞的 TD_{50} , 确定 TD_0 , 结果见表 1。

3.2 病毒对细胞半数感染浓度的测定

根据所得数据, 采用 Reed-Muench 法计算 adv_3 病毒在 VERO 及 HEP-2 细胞中的 TCID_{50} 为 10^{-11} , 试验中病毒攻击量为 100TCID_{50} , 即 10^{-9} 。

3.3 药物对 adv_3 病毒的抑制作用

采用 Reed-Muench 法计算清热合剂及双黄连在 VERO 及 HEP-2 细胞中的 IC_{50} 和 TI, 结果见表 1; Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 检验法比较药物各剂量组与病毒对照组细胞病变程度。结果表明, 清热合剂的 3, 37, 1.69, 0.84, 0.42 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组在 VERO 和 HEP-2 细胞中对 adv_3 病毒均有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 而双黄连在 VERO 和 HEP-2 细胞中对 adv_3 病毒均无抑制作用, 结果见表 2。

表 1 清热合剂及双黄连体外抗 adv_3 病毒药效结果

Tab 1 Antiadenovirus type 3 pharmacodynamic results of Qing Re He Ji and Shuang Huang Lian

药物 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	VERO				HEP-2			
	TD_{50}	TD_0	IC_{50}	TI	TD_{50}	TD_0	IC_{50}	TI
清热合剂	31.62	13.5	0.45	70.27	32.10	13.5	0.52	61.73
双黄连	1.25	1	无效	—	1.25	1	无效	—

4 讨论

呼吸道感染是一种常见病、多发病, 临床表现多种多样, 其病原相当复杂。但呼吸道感染中 90% 以上是由呼吸道病毒引起, 如腺病毒 III 和腺病毒 VII、合胞病毒、鼻病毒、流感病毒及副流感病毒等^[5]。目前对病毒性疾病尚缺乏有效的防

治措施。实践已证明许多中草药具有较好的抗病毒作用,且中药抗病毒途径较西药是多元的,在抗病毒的同时,尚有预防继发性细菌感染、提高机体免疫力等功效。不良反应小或无,价格便宜。本实验对清热合剂体外抗 adv_3 病毒的研究结果表明,清热合剂在 VERO 和 HEP-2 两种细胞中对 adv_3 病毒均有明显抑制作用,且药物对 adv_3 病毒的抑制作用呈明显的量效关系。

有研究报道双黄连粉针剂对腺病毒 III 型,合胞病毒 (RSV),疱疹病毒 I 和 II 型 (HSV-1, HSV-2) 柯萨奇病毒 B_3 , B_4 (CVB $_3$, CVB $_4$) 等十余种病毒都有抑制作用^[6],在清热合剂抗呼吸道合胞病毒、腺病毒、流感病毒等的研究中,我们选用双黄连为阳性对照药。已经完成的试验结果表明,清热合剂抗呼吸道合胞病毒的作用与双黄连相当,抗流感病毒的作用略逊于双黄连,抗 adv_3 的作用优于双黄连。双黄连对 adv_3 无抑制作用,可能与试验过程中采用的病毒毒性及其他试验条件不同有关。本次试验选用的 adv_3 病毒毒性很强, TCID_{50} 可达到 10^{-11} 。但在相同试验条件下,可以看出清热合剂抗 adv_3 病毒的作用明显优于双黄连。

清热合剂在临床应用多年,对于急性呼吸道感染的疗效确切,具有很好的开发研究价值,为进一步确定其抗呼吸道病毒作用,我们将继续对其体外及体内抗其他呼吸道病毒作用进行研究。

REFERENCES

- [1] AZEVEDO A M, DURIGON E L, OKASIMA V, *et al*. Detection of influenza, parainfluenza, adenovirus and respiratory syncytial virus during asthma attacks in children older than 2 years old[J]. *Allergol Immunopathol*, 2003, 31 (6): 311.
- [2] GUO Y J, CHENG X W. Influenza virus and experimental technology (流行性感冒病毒及其实验技术) [M]. Beijing: China Three Straits Press, 1997: 112.
- [3] Instruction Principle Assemble of New Drug (Western Medicine) 's Pre-clinical Study [新药 (西药) 临床前研究指导原则汇编 (药理学药理学毒理学)] [M]. Beijing: The People's Republic of China Bureau of Drug Administration, 1993: 166.
- [4] NI Z Z. Health Statistics (卫生统计学) [M]. Beijing: The People Public Health Press, 2002: 96.
- [5] ROHDE G, SCHULTZE-WERNINGHAUS G, BAUER T T. Treatment for viral respiratory infections: Principles of action, strategies, and future prospects[J]. *Intemist*, 2004, 45 (4): 468.
- [6] LI F, YI SH, ZHAO CY, *et al*. Studies on antiviral effect of SHUANGHUANGLIAN INJECTION[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 52.

收稿日期: 2007-04-14