

藏药青鹏胶囊抗病毒作用的实验研究

杨全余¹,李洪海²,李军梅²,周小梅¹,陈秋红³,多杰¹,多杰拉旦¹(1.青海省藏医药研究所,西宁 810007;2.中国中医科学院西苑医院,北京 100091;3.青海高原医学科学研究所,西宁 810012)

摘要:目的 观察青鹏胶囊对流行性感冒病毒的抑制作用。方法 应用细胞培养技术,在传代细胞上进行青鹏胶囊抗流感甲₃和乙型病毒的抑制试验。结果 该药对甲₃型病毒有明显的中和、治疗作用,对乙型病毒中和、治疗作用不明显。结论 青鹏胶囊对流行性感冒病毒-甲₃型具有明显的抑制作用。

关键词:藏药;青鹏胶囊;体外抗病毒

中图分类号:R 965.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2009)04-0264-04

The Antiviral Effect of the Tibetan Medicine Qingpeng Capsule

YANG Quanyu¹, LI Honghai², LI Junmei², ZHOU Xiaomei¹, CHEN QiuHong³, DUO Jie¹, DUO Jieladan¹ (1. Qinghai Tibetan Medicine Institute, Xining 810007, China; 2. Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091 China; 3. Qinghai Plateau Scientific Institute of Medicine, Xining 810012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the antiviral effect of Qingpeng capsule. **METHODS** Applied cell culture technique to study the antiviral (influenza virus A₃ and B) effect of Qingpeng capsule *in vitro* on passage cell. **RESULTS** Qingpeng capsule was effective in neutralize and treatment for influenza virus A₃, but no effect for influenza virus B. **CONCLUSION** Qingpeng capsule is effective in neutralize and treatment for influenza virus A₃.

KEY WORDS: Tibetan medicine; Qingpeng capsule; *in vitro* antiviral

青鹏胶囊是由细叶草乌、高山辣根菜、肾瓣棘豆、麝香等十五味药材组成的藏药复方制剂,为藏医古验方,藏文译音“那宝格交”,最早收载于藏医南派创始人苏喀·年木多杰的经典著作《藏医千万舍

利》,具有防瘟疫、清肺热的功效,主要用于瘟疫所致的胸腔脏器热症、瘟疫侵肺、流行性感冒及其引起的头痛、胸肋热痛、发烧、久咳咯血等,至今已有 500 多年的历史,是藏医防治瘟疫及传染性疾病的的首选

基金项目:青海省科技型中小企业技术创新补助资金项目(2005-J-C16)

作者简介:杨全余,男,助理研究员 Tel:(0971)5319809

药物之一。

1 材料与方法

1.1 药物

青鹏胶囊(0.3 g·粒⁻¹,青海省藏医药研究所,批号:051117);双黄连口服液(哈药集团三精制药有限公司,批号:06011832);利巴韦林注射液(山东新华制药股份有限公司,批号:0504005)。

1.2 细胞

MDCK 传代细胞,中国中医科学院西苑医院基础研究室提供。

1.3 病毒

流感甲₃、乙型,由中国预防医学科学院病毒所提供,TCID₅₀(使半数细胞培养管出现病变的病毒稀释度对数)分别为 10^{-3.8}、10^{-4.5},试验时用 100 个 TCID₅₀/0.1 mL。

1.4 试剂

DMEM 干粉,美国 GIBCO 产品,批号:12100-038。胎牛血清,HyClone,批号:AJM11171。胰蛋白酶,Tryptong 1:250,批号:20020705。青霉素、链霉素用蒸馏水配制成浓度为 1 万单位·mL⁻¹。

2 实验方法

2.1 青鹏胶囊水提液制备

将青鹏胶囊干粉 5 g 加蒸馏水至 50 mL,水浴煮沸 20 min,离心 2 000 r·min⁻¹,10 min,无菌取上清液 29.4 mL(0.17 g 生药·mL⁻¹),4 °C 保存备用。

2.2 药物对 MDCK 细胞的毒性作用

将稀释好的药物接入长成单层细胞的 96 培养孔中,0.1 mL·孔⁻¹,5% CO₂ 的 37 °C 培养箱培养,每日观察细胞变化,计算半数有毒浓度和最大无毒浓度^[1]。半数毒性浓度(LD₅₀) = Antilog(log > 50% 药物浓度) +

$$\frac{>50\% \text{ 死亡浓度百分率} - 50}{>50\% \text{ 死亡浓度百分率} - <50\% \text{ 死亡浓度百分率}} \times \log \text{ 稀释倍数}。$$

2.3 药物对流感甲₃型、乙型病毒的直接杀伤作用

将稀释好的药物与病毒(100 倍 TCID₅₀,下同)等量混合后放 37 °C 温箱作用 1 h。然后接入长成单层细胞的 96 孔培养孔中,每孔 0.2 mL,37 °C 吸附 1 h。用维持液洗 2 次后加入维持液 0.1 mL·孔⁻¹。5% CO₂ 的 37 °C 培养箱培养,每日观察细胞病变(CPE),当病毒对照出现 + + + + 时,终止试验,计算半数中和浓度^[1]和中和指数。

$$\text{半数中和浓度} = \text{Antilog}(\log < 50\% \text{ 药物浓度}) + \frac{50 - <50\% \text{ 抑制百分率}}{>50\% \text{ 抑制百分率} - <50\% \text{ 抑制百分率}} \times \log \text{ 稀释}$$

倍数

$$\text{中和指数(TI)} = \frac{\text{半数毒性浓度}}{\text{半数中和浓度}}$$

2.4 药物对 MDCK 细胞内流感甲₃型、乙型病毒繁殖的抑制作用^[2]

将稀释好的病毒接入细胞孔中,每孔 0.1 mL 放 37 °C 吸附 1 h,用维持液洗 2 次后分别加入含不同药物浓度的维持液 96 孔板 0.1 mL·孔⁻¹,5% CO₂ 37 °C 培养箱培养,每日观察细胞病变(CPE),当病毒对照孔出现 + + + + 时,终止试验,计算半数保护浓度^[1]和治疗指数。

$$\text{半数保护浓度} = \text{Antilog}(\log < 50\% \text{ 药物浓度}) + \frac{50 - <50\% \text{ 抑制百分率}}{>50\% \text{ 抑制百分率} - <50\% \text{ 抑制百分率}} \times \log \text{ 稀释倍数}$$

$$\text{治疗指数(TI)} = \frac{\text{半数毒性浓度}}{\text{半数保护浓度}}$$

注:细胞病变: + 25%、+ + 50%、+ + + 75%、+ + + + 100%。

以上试验同时设药物对照、病毒对照、细胞对照,每试验组 4 孔细胞,重复试验 2 次。

3 结果

3.1 药物对细胞毒性试验

取青鹏胶囊水提取液作 25.0, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.781 mg 生药·mL⁻¹ 6 个递倍稀释浓度、每个浓度作 4 个平行样进行实验。实验测得青鹏胶囊半数毒性浓度为 1.105 mg 生药·mL⁻¹,最大无毒浓度为 0.781 mg 生药·mL⁻¹;重复第 2 次实验,由于第 1 次实验药物浓度偏大,调整药物浓度,以 3.125, 1.562, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098 mg 生药·mL⁻¹ 6 个递倍稀释浓度、每个浓度作 4 个平行样进行实验。第 2 次实验测得青鹏胶囊半数毒性浓度为 1.105 mg 生药·mL⁻¹,最大无毒浓度为 0.781 mg 生药·mL⁻¹。对 2 次实验结果平均得青鹏胶囊平均半数毒性浓度为 1.105 mg 生药·mL⁻¹ 和平均最大无毒浓度为 0.781 mg 生药·mL⁻¹。同法测得:双黄连口服液平均半数毒性浓度为 0.83 mg 生药·mL⁻¹ 和平均最大无毒浓度为 0.586 mg 生药·mL⁻¹;利巴韦林注射液平均半数毒性浓度为 0.58 mg·mL⁻¹ 和平均最大无毒浓度为 0.058 mg·mL⁻¹。

当青鹏胶囊 0.781 mg 生药·mL⁻¹、双黄连 0.59 mg 生药·mL⁻¹、利巴韦林 0.058 mg 生药·mL⁻¹ 浓度时对 MDCK 细胞无毒性,为最

大无毒浓度。

3.2 药物对流感甲₃型、乙型病毒的直接杀伤作用

取青鹏胶囊水提取液作 1.562, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098, 0.049 mg 生药 · mL⁻¹ 6 个递倍稀释浓度、每个浓度作 4 个平行样进行实验。实验测得青鹏胶囊对流感甲₃型病毒半数中和浓度为 0.391 mg 生药 · mL⁻¹, 代入公式求得对流感甲₃型病毒中和指数为 2.83; 以同样浓度同样方法重复第 2 次实验, 第 2 次实验测得青鹏胶囊对流感甲₃型病毒半数中和浓度为 0.552 mg 生药 · mL⁻¹, 代入公式求得对流感甲₃型病毒中和指数为 2.0。对 2 次实验结果平均得青鹏胶囊对流感甲₃型病毒平均半数中和浓度为 0.472 mg 生药 · mL⁻¹ 和平均中和指数为 2.42。同法测得: 双黄连口服液对流感甲₃型病毒平均半数中和浓度为 0.374 mg 生药 · mL⁻¹ 和平均中和指数为 2.88; 利巴韦林注射液对流感甲₃型病毒平均半数中和浓度为 0.069 mg 生药 · mL⁻¹ 和平均中和指数为 13.13。

同样方法测 3 种药物对流感乙型病毒的直接杀伤作用。测得 3 种药物对流感乙型病毒均无直接杀伤作用。

3.3 药物对流感甲₃型、乙型病毒的治疗作用

取青鹏胶囊水提取液作 0.781, 0.391, 0.195, 0.098, 0.049, 0.024 mg 生药 · mL⁻¹ 6 个递倍稀释浓度、每个浓度作 4 个平行样进行实验。实验测得青鹏胶囊对流感甲₃型病毒半数保护浓度为 0.078 mg 生药 · mL⁻¹, 代入公式求得对流感甲₃型病毒治疗指数为 14.17; 以同样浓度同样方法重复第 2 次实验, 第 2 次实验测得青鹏胶囊对流感甲₃型病毒半数保护浓度为 0.078 mg 生药 · mL⁻¹, 代入公式求得对流感甲₃型病毒治疗指数为 14.17。对 2 次实验结果平均得青鹏胶囊对流感甲₃型病毒平均半数保护浓度为 0.078 mg 生药 · mL⁻¹ 和平均治疗指数为 14.17。同法测得: 双黄连口服液对流感甲₃型病毒平均半数保护浓度为 0.153 mg 生药 · mL⁻¹ 和平均治疗指数为 5.40; 利巴韦林注射液对流感甲₃型病毒平均半数保护浓度为 0.004 2 mg 生药 · mL⁻¹ 和平均治疗指数为 235.36。

同样方法测 3 种药物对流感乙型病毒的治疗作用。测得青鹏胶囊、双黄连口服液两种药物对流感

乙型病毒无治疗作用; 利巴韦林注射液对流感乙型病毒平均半数保护浓度为 0.004 3 mg 生药 · mL⁻¹ 和平均治疗指数为 212.62。

4 讨论

流行型感冒是由流行型感冒病毒引起。流行型感冒症状影响全身, 包括发热发冷、出汗、全身酸痛、头痛、骨痛、肌肉痛、疲倦乏力、食欲不振、咳嗽、鼻塞等, 严重时会引起肺炎及其他并发症。本实验应用流感病毒在细胞内生长繁殖的生物学特性, 用不同的试验方法, 对青鹏胶囊进行抑制流行性感病毒实验, 实验结果显示, 青鹏胶囊对流感甲₃型病毒的半数保护浓度和半数中和浓度分别为 0.078 mg · mL⁻¹ 和 0.472 mg · mL⁻¹, 平均治疗指数和中和指数分别为 14.17 和 2.42, 但对流感乙型病毒没有抑制作用。

前期研究结果已证实青鹏胶囊具有明显的解热镇痛作用^[3]; 能明显增加由于皮下注射环磷酰胺导致的小鼠白细胞减少以及胸腺和脾脏指数的下降, 并能增强巨噬细胞吞噬功能, 对特异性免疫和非特异性免疫功能均一定的增强作用^[4]; 此外还具有一定的抑菌作用^[4]。结合本次实验研究结果说明青鹏胶囊从解热镇痛、免疫调节、抑菌及抗病毒等多方面对抗流行性感发挥其协同治疗作用。该项研究为青鹏胶囊治疗流行型感冒的临床应用提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] Chinese Academy of Medical Sciences Institute for epidemic prevention. Common virus disease laboratory technicians (常见病毒实验技术) [M]. Beijing: Scientific publishers, 1978: 20.
- [2] FU H Y, LU C A, HE Y Z, et al. The bupleurum chinensis drinks to the influenza virus and the pathogenic bacteria function experiment examines investigates [J]. Bull Chin Mater Med (中药通报), 1986, 11(4): 46-49.
- [3] CHEN Q H, ZHOU X M, DUO J, et al. The antipyretic, analgeize and antiinflammatory effect of the Qingpeng capsule [J]. Shandong J Tradit Chin Med (山东中医杂志), 2006, 25(6): 407-108.
- [4] ZHOU X M, YANG Q Y, CHEN Q H, et al. The immunoregulation and *in vitro* antibacteria effect of the Tibetan medicine Qingpeng capsule [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2006, 28(12): 1821-1822.

收稿日期: 2007-12-11