

五味解毒颗粒剂对呼吸道感染作用的实验研究

何良志¹ 张秋红² 王书臣¹ 闫孝诚¹

摘要 为了探讨五味解毒颗粒剂对呼吸道病毒的作用及镇咳、祛痰、平喘作用,选择常见与呼吸道感染有关的病毒进行体内、外实验研究。选用小白鼠氨水引咳法、毛细管法、药物气雾引喘法分别对五味解毒颗粒剂的镇咳、祛痰、平喘作用的有效性进行评价。体外实验结果,五味解毒颗粒剂对流感病毒甲₃型(A₃)和乙型(B)、科萨奇 B₅型和 B₆型肠道病毒(Coxsackie B₅、B₆简称 COXB₅、B₆)、呼吸道合胞病毒(RS)等有一定的抑制作用。其 50%有效浓度依次为 0.200, 0.336, 0.400, 0.564, 0.400mg 生药/ml, 治疗指数依次为 32、19、16、11、16,而用作阳性对照的感冒清热颗粒(简称感冒颗粒)作用强度低于五味解毒颗粒剂(治疗指数为 2.4~16)。对副流感病毒(HVJ)、疱疹病毒(HSV-1, HSV-2)、腺病毒(ADA₃、ADA₇)均未能显示出抑制活性。体内实验结果,五味解毒颗粒剂显示出对小鼠流感病毒性肺炎有较明显的抑制作用,与病毒对照组比较,五味解毒颗粒剂小剂量组($P<0.05$),大剂量组($P<0.01$)差异有显著性。五味解毒颗粒剂大剂量组抑制率为 14.58%,与阳性对照组感冒颗粒组(13.78%)作用相当($P>0.05$)。小白鼠氨水引咳法、毛细管法、药物气雾引喘法实验证明五味解毒颗粒剂具有镇咳、祛痰和平喘作用。表明五味解毒颗粒剂比感冒清热颗粒抗病毒作用更强并具有镇咳、祛痰和平喘作用。

主题词 呼吸道感染/中药疗法 中成药/药理学 @ 五味解毒颗粒剂

五味解毒颗粒剂为临床使用多年的经验方,临床实践有清热解毒、镇咳、祛痰和平喘的作用,为探明该药物的疗效机理,对主要药效进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒:传系细胞(Hep-2 细胞)及流感病毒甲₃型(A₃)和乙型(B)、流感病毒鼠肺适应株(FM₁)、副流感病毒(HVJ)、腺病毒(ADA₃、ADA₇)、疱疹病毒(HSV-1、HSV-2)、科萨奇病毒 B₅型肠道病毒(COXB₅)、科萨奇病毒 B₆型肠道病毒(COXB₆)、呼吸道合胞病毒(RS)等,均由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。各种病毒经常规传代测定感染滴度(TCID₅₀)后用于实验。

1.2 实验动物:昆明种小鼠,第 1 批:体重 13.5~15.5g,雌雄不拘,由中国中医研究院实验动物中心提供,京动字第 01-3064 号。第 2 批:体重 18~23g,60

只,雌雄各半;Wistar 大白鼠,250~300g,40 只,由中国医学科学院医学实验动物中心饲养场提供,京动字第 9209M13 号。豚鼠 150~200g,由中国药品生物制品检定所实验动物中心提供,京动字 1994 第 073 号。

1.3 实验药物:五味解毒颗粒(干膏粉),其处方由甘草 30g,大黄 3g,马齿苋 15g,金银花 15g,车前草 15g 组成。由中国中医研究院基础理论研究所药化室提供,批号 970605。每克干膏粉含生药 7.14g,配制成 50mg 药粉/ml 水溶液,即 375mg 生药/ml,消毒后作为原液,临用时再以 Eagle's 细胞培养液稀释用于体外实验。

1.4 实验对照药物:空白对照:蒸馏水。阳性药对照:感冒清热颗粒,批号 980219013,北京同仁堂制药厂生产。复方甘草片,批号 9711098,北京双鹤药业股份有限公司生产。鲜竹沥,批号 971095,江西清江制药厂生产。氨茶碱片,批号 970507-2,浙江新昌制药厂生产。

1.5 实验方法

1.5.1 药物对实验用细胞毒性界限的测定:将 Hep-2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,37℃,5%CO₂中培养 48 小时长成细胞单层,再将各药用 Eagle's 液作倍比稀释,加入已换过液的细胞板中(每稀释度加 3 孔),设正常细胞对照孔,置相同条件下继续培养,于第 3 天观察结果,以出现“2+”(50%)以及以上细胞病变作为毒性标准,找出亚毒性浓度(SC),采用 Reed-Muench 法计算出药物对细胞的 50%毒性浓度(CC₅₀)。

1.5.2 药物对病毒致细胞病变抑制作用的测定:以同样方法接种 Hep-2 细胞于细胞板中,48 小时后将无毒界限以下不同稀释度的药物加到板孔细胞单层上,每稀释度加 3 孔,同时分别感染适当感染量(TCID₅₀)的各种病毒,同样置于 37℃,5%CO₂中培养,第 3 天观察细胞病变(CPE)。以出现 CPE 在“1+”(25%)及其以下的试验孔认为药物有抑制细胞病变的作用,找出最低抑制浓度(MIC),以 Reed-Muench 法求出 50%有效浓度(EC₅₀),计算治疗指数(TI=CC₅₀/EC₅₀)。将五味解毒颗粒剂和感冒颗粒在无毒界限内倍比稀释平行做抗病毒实验,于感染加药后第 3 日,观察各药每级稀释度各孔的细胞病变(CPE),依病变程度从重到轻分 5 级记录:“4”(75%~100%),“3”(50%~75%),“2”(25%~50%),“1”(<25%),“-”(无病变,

基金项目:国家中医药管理局课题(97Z065)

1 中国中医研究院西苑医院,北京西苑操场 1 号(100091)

2 北京胸科医院

细胞正常)。以“2”以下(即“1”和“-”)作为药物有效界限。以“2”及其以上(即“2~4”)表示药物对病毒所致细胞病变无抑制作用,即药物无效。进行3次重复实验。

1.5.3 对小鼠流感病毒性肺炎的作用:参照文献^[1]方法,将小鼠按体重随机分为4组,每组小鼠12只,分为不给药的病毒对照组(A)、五味解毒颗粒剂小剂量组(B)和大剂量组(C)及阳性对照感冒颗粒组(D)。用药剂量计算:五味解毒颗粒剂临床用量为63g生药/50kg人/日, $63\text{kg}/50 = 1.26\text{g生药/kg人日}$,加倍为 $1.26 \times 2 = 2.52\text{g生药/kg人日}$ 作为大剂量,按不同动物等效剂量折算表^[2]计算: $2.52 \times 11 = 27.72\text{g生药/鼠日}$,每克干膏粉含生药7.14g, $27.72/7.14 = 3.88\text{g药粉/鼠日}$,即为大剂量组给药剂量,稀释1倍给予小剂量组。感冒颗粒临床用量为24g/50kg人日, $24\text{g}/50 = 0.48\text{kg人日}$, $0.48 \times 11 = 5.28\text{g/kg鼠/日}$, $5.28/70 = 0.075\text{g/只鼠/日}$,按此剂量给予阳性对照组。于感染前1天开始,连续给药5天。感染当天,将小鼠经乙醚轻度麻醉,用15LD₅₀得流感病毒鼠肺适应株FM₁进行滴鼻感染。于感染后第4天将小鼠先称体重后解剖取肺称肺重。计算肺指数值($100 \times \text{肺重}/\text{体重}$),进行统计处理,并求出药物对肺炎的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{病毒对照肺指数均值} - \text{给药组肺指数均值}}{\text{病毒对照肺指数均值}}$$

1.5.4 药物对呼吸道的镇咳作用:小白鼠氨水引咳法^[2],取5L真空玻璃干燥器,盖上的活塞打开,通空气,容器底部放一培养皿,存放浓氨水。称取实验用小白鼠按体重随机分为4组,对照组(A)和五味解毒颗粒剂大剂量组(C)每组小白鼠14只,复方甘草片(D)组和五味解毒颗粒剂小剂量组(B)每组小白鼠13只。给药组口服4%五味解毒颗粒剂1ml,小剂量组为大剂量组的1/2,阳性对照组口服4%的复方甘草片混悬液1ml,对照组口服等体积的蒸馏水,服药1小时后,每组小白鼠取1只,放入已存有0.5ml氨水容器中,观察记录各组小白鼠咳嗽潜伏期。

1.5.5 药物的祛痰作用:用毛细管排痰量法^[3],大白鼠随机分为4组,每组10只。分为对照组、五味解毒颗粒剂小剂量组、五味解毒颗粒剂大剂量组和鲜竹沥水组。均用乌拉坦1g/kg,腹腔麻醉,仰位固定,剪开颈中部皮肤,分离出气管,与甲状软骨下缘正中两软骨环之间,用尖锐针头扎1个小孔,插入毛细管,使毛细管接触气管底部表面,借以吸取痰液,当毛细管内衬痰液充满时,立即另换1根,以毛细管吸取痰液长度位评价药物的化痰效果,记录给药前2小时的正常分泌量,分别灌药,灌药后继续观察2小时的分泌量,比较给药前后平均每小时分泌量,给药后是否有增加。给药剂量:对

照组不给药,五味解毒颗粒剂小剂量组2g/kg,五味解毒颗粒剂大剂量组4g/kg,鲜竹沥水组给予鲜竹沥水20ml/kg。

1.5.6 药物的平喘作用:用气雾引喘法^[2],将幼年豚鼠分别放入玻璃钟罩(容积约4L)中以400mmHg的压力喷入2%氯化乙酰胆碱和0.1%磷酸组织胺等容积的混合液15s,观察豚鼠的引喘潜伏期(即喷雾开始到哮喘发作,呼吸极度困难,直至抽搐跌倒时间),挑选120s以内产生哮喘作用的豚鼠供实验用。将豚鼠按体重随机分为4组:空白对照组、阳性对照组、五味解毒颗粒剂大剂量组和五味解毒颗粒剂小剂量组,前3组每组豚鼠10只,五味解毒颗粒小剂量组豚鼠9只。给药剂量:空白对照组口服蒸馏水,阳性对照组口服氨茶碱片0.24g/kg,五味解毒颗粒剂大、小剂量组均口服五味解毒颗粒剂,小剂量组给药2.5g/kg,大剂量组为5g/kg。给药1.5小时后,重新测定其引喘潜伏期。

2 结果

2.1 药物对细胞的毒性作用:以上述方法,测得五味解毒颗粒剂无毒界限(即亚毒性浓度SC)为4.463mg生药/ml,CC₅₀=6.376mg生药/ml,感冒颗粒的无毒界限为4.167mg/ml,CC₅₀=5.953mg/ml。

2.2 药物对病毒致细胞病变的抑制作用:经3次重复实验,五味解毒颗粒剂和感冒颗粒对常见呼吸道各种病毒作用的实验结果如下:其感染量(TCID₅₀)均为100,五味解毒颗粒剂无毒界限即亚毒性浓度SC为4.463mg生药/ml,CC₅₀=6.376mg生药/ml,对呼吸道常见病毒A₃、B、RS、COXB₅、COXB₆的最低抑制浓度即MIC分别为0.279、0.558、0.558、0.558、0.558mg/ml,对呼吸道常见病毒HVJ、ADA₃、ADA₇、HSV-1、HSV-2无抑制作用。五味解毒颗粒剂对呼吸道常见病毒A₃、B、RS、COXB₅、COXB₆的50%有效浓度即EC₅₀分别为0.200、0.336、0.400、0.400、0.565mg/ml。五味解毒颗粒剂对呼吸道常见病毒A₃、B、RS、COXB₅、COXB₆的治疗指数TI=CC₅₀/EC₅₀分别为32、19、16、16、11。感冒颗粒的无毒界限为4.167mg/ml,CC₅₀=5.953mg/ml。对呼吸道常见病毒A₃、B、RS、COXB₅、COXB₆的MIC分别为0.521、2.083、1.042、4.167、4.167mg/ml,对呼吸道常见病毒HVJ、ADA₃、ADA₇、HSV-1、HSV-2无抑制作用。对呼吸道常见病毒A₃、B、RS、COXB₅、COXB₆的50%有效浓度即EC₅₀分别为0.373、1.773、0.620、2.488、2.488mg/ml,对呼吸道常见病毒A₃、B、RS、COXB₅、COXB₆的治疗指数TI=CC₅₀/EC₅₀分别为16、3.4、10、2.4、2.4。

2.3 对小鼠流感病毒性肺炎的作用:按上法进行实验,结果用统计软件处理,求出各组肺指数均值,并作 t 检验,比较组间差异。肺指数越大,表示肺炎越严重。

实验分组共分为 4 组:即病毒对照组(A 组)、五味解毒颗粒小剂量组(B 组)、五味解毒颗粒剂大剂量组(C 组)和感冒颗粒组(D 组),实验动物数量均为 12 只小鼠;给药剂量:B 组为 1.94g/kg/d, C 组为 3.88g/kg/d, D 组为 5.28g/kg/d;肺指数($\bar{x} \pm s$):A 组 1.3481 $\pm$ 0.132, B 组为 1.2378 $\pm$ 0.113, C 组为 1.1515 $\pm$ 0.123, D 组 1.1623 $\pm$ 0.136;抑制率:B 组为 8.18%, C 组为 14.58%, D 组为 13.78%;各组肺指数($\bar{x} \pm s$)数值与病毒对照组比较结果, B 组 $P < 0.05$, C 组 $P < 0.01$, D 组 $P < 0.01$ 。五味解毒颗粒剂小剂量组、五味解毒颗粒剂大剂量组和感冒颗粒组与对照组相比,差异有显著性($P < 0.05$),五味解毒颗粒剂大、小剂量组与感冒颗粒剂组相比,差异无显著性($P > 0.05$)。提示五味解毒颗粒剂有抗小鼠流感病毒的作用。

2.4 药物的镇咳作用:小白鼠氨水引咳法,实验分为 4 组即对照组(A 组)、五味解毒颗粒剂小剂量组(B 组)、五味解毒颗粒剂大剂量组(C 组)、复方甘草片组(D 组);动物(小白鼠)数:A 组 14 只, B 组 13 只, C 组 14 只, D 组 14 只;给药剂量:A 组不给药, B 组 2g/kg, C 组 1g/kg, D 组 2 片;咳嗽潜伏期:A 组 139.5 $\pm$ 49.5s, B 组 221.3 $\pm$ 75.2s, C 组 154.5 $\pm$ 71.3s, D 组 205 $\pm$ 70.4s;各组咳嗽潜伏期症状值与对照组比较经统计学处理 C 组 $P < 0.01$, D 组 $P < 0.01$ 。五味解毒颗粒剂大剂量组小白鼠咳嗽潜伏期最长,与对照组相比差异有非常显著性,提示五味解毒颗粒剂有镇咳作用。

2.5 祛痰作用:毛细管法,对照组、五味解毒颗粒剂小剂量组、五味解毒颗粒剂大剂量组和鲜竹沥水组给药前排痰量分别为 2.12 $\pm$ 0.59cm、2.1 $\pm$ 0.47cm、2.20 $\pm$ 0.59cm、2.22 $\pm$ 0.36cm,给药后排痰量分别为 2.32 $\pm$ 0.4cm、2.86 $\pm$ 0.86cm、3.70 $\pm$ 0.87cm、3.61 $\pm$ 0.74cm。五味解毒颗粒剂大剂量组和鲜竹沥水组大白鼠与空白对照组给药前后排痰量比较差异有非常显著性(P 均 < 0.01),提示五味解毒颗粒剂有祛痰作用。

2.6 平喘作用:药物气雾引喘法,空白对照组、阳性对照组、五味解毒颗粒剂大剂量组和五味解毒颗粒剂小剂量组给药后其引喘潜伏期分别为 28.1 $\pm$ 16.6s、75.0 $\pm$ 33.7s、71.7 $\pm$ 39.6s、56.0 $\pm$ 32.3s。五味解毒颗粒剂大剂量组与阳性对照组(口服氨茶碱片)相比引喘潜伏期相似,差异无显著性($P > 0.05$),阳性对照组、五味解毒颗粒剂大剂量组与空白对照组比较,差异有非常显著性(P 均 < 0.01),五味解毒颗粒剂小剂量组

与空白对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$),提示五味解毒颗粒剂有平喘作用。

3 讨论

五味解毒颗粒剂现代药理研究和临床报道表明,甘草、大黄、马齿苋、金银花、车前草均有抗菌作用。甘草、大黄、金银花有抗炎作用。大黄、马齿苋、金银花有抗病毒作用,甘草有止咳化痰作用,车前草祛痰镇咳作用,在免疫方面,甘草有如下作用:(1)对非特异性免疫功能的影响,它能增强网状内皮系统的活性,双向调节吞噬细胞的功能,增强杀伤细胞的功能。(2)对特异性免疫功能的影响能增强抗体的产生,其另一方面能降低抗原信息量而显示其免疫抑制作用,能对小鼠 NK 细胞的活性显著增强作用。(3)有肾上腺皮质激素样作用。金银花可明显促进炎症细胞的吞噬功能,车前草具有网状内皮系统激活性和淋巴细胞幼稚化活性,同时有抗补体活性。

从以上各味药的作用机理和五味解毒颗粒剂的实验研究表明:五味解毒颗粒剂在体外细胞培养上,对常见多种呼吸道病毒(如 A₃、B、COXB₅、COXB₆、RS 等)有较明显的抑制作用,治疗指数可达到 11~32,明显高于阳性对照组(2.4~16)。动物实验证明其对流感病毒所致小鼠肺炎也具有较强的抑制作用,其抑制率与阳性对照药相当($P > 0.05$)。综合体内实验可见,五味解毒颗粒剂与市售的治疗呼吸道感染的感冒颗粒相比,在抗病毒谱方面二者广度相同,但在抗病毒作用强度方面,五味解毒颗粒剂明显高于感冒清热颗粒。五味解毒颗粒剂经实验证明具有镇咳、祛痰和平喘作用。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南. 1993:118.
- 2 徐叔云编. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社,1982:901,912.
- 3 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海:上海科学技术出版社,1991:432.
- 4 郭兰忠. 现代实用中药学. 北京:人民卫生出版社,1996:174,206,242,359,809.

• 书 讯 •

由风湿病专家杨仓良主编,全国 50 多位医药专家参与撰写的我国第一部动物本草专著——《动物本草》日前由中医古籍出版社出版。该书 200 万字,分上、中、下 3 卷,收录动物药 1700 余种,单验方 2 万多首,重点突出临床应用,是收录品种全、体例新,有很高学术价值和实用性的一本好书。历代医家常将动物药称为“血肉有情之品”,并认为有“愈顽疾起沉痾”之神奇功效。本书对科研及临床工作者研究和临床使用动物药有很好的参考价值。《动物本草》是杨仓良先生的又一力作,是《毒药本草》的姊妹篇,它同《毒剧中药古今用》及《矿物本草》构成系列本草专著。前两书十分畅销,已连印 3 次。现作者尚有第 1 次印刷的《毒药本草》余书(书价 78 元),《动物本草》(书价 120 元),免收邮挂费。地址:宁夏银川市新北路宁夏秦杨风湿病医院杨仓良收,邮编:750002。

(广告编号:200111-22)