

甘露消毒丹及其拆方体外抗肠道病毒 71 型作用

艾碧琛¹, 贺又舜^{1*}, 赵国荣¹, 何宜荣¹, 龙玲¹, 李灿², 罗成宇¹

(1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园区象嘴路, 410208; 2. 湖南中医药大学研究生学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173188); 湖南省方剂学重点学科资助项目

摘要 目的 观察甘露消毒丹及其拆方体外抗肠道病毒 71 型 (EV71) 的作用。方法 运用细胞培养技术, 病毒毒力测定采用 Reed-Muench 法计算半数组织培养感染量 (TCID₅₀), 确定实验用为 100 TCID₅₀。将甘全方 (甘露消毒丹全方)、清残方 (甘露消毒丹方中清热解毒药物组成)、利残方 (甘露消毒丹方中化浊利湿药物组成)、病毒唑药液用维持液 1: 8、1: 16、1: 32、1: 64、1: 96、1: 128、1: 256 稀释, 采用 MTT 法测定各浓度药物吸光度 OD 值, 根据各药不同浓度的 OD 值计算其细胞存活率, 以药物浓度为横坐标 (g/ml)、细胞存活率 (%) 为纵坐标绘出非线性回归曲线, 选择各药的 90% 细胞存活率浓度为药效学实验浓度。分别将 90% 细胞存活率浓度的甘全方、清残方、利残方、病毒唑药液和 100 TCID₅₀ 病毒各 50 μl 混合, 加到单层人恶性胚胎横纹肌瘤细胞 (RD 细胞) 上, 各设 4 复孔, 每孔均设正常细胞对照、病毒对照, 采用 MTT 法计算各药物对病毒生长的抑制率。结果 根据 Reed-Muench 法计算得出 TCID₅₀ = 10^{-2.89} /ml, 从回归曲线获得各药 90% 细胞存活率浓度分别为甘全方: 10^{-2.43} = 0.0037 g/ml; 清残方: 10^{-2.7} = 0.0020 g/ml; 利残方: 10^{-2.09} = 0.0081 g/ml; 病毒唑: 10^{-3.19} = 0.64 mg/ml。清残方 EV71 病毒抑制率为 97.4%, 甘全方为 91.74%, 利残方为 75.64%, 病毒唑为 36.99%。结论 甘露消毒丹全方及其拆方具有比病毒唑更强的抗 EV71 作用, 清热解毒法在方中发挥了更强的抗 EV71 作用。

关键词 甘露消毒丹; 肠道病毒 71 型; 病毒抑制率

手足口病是主要由肠道病毒引起的传染性疾病, 婴幼儿常见, 主要由小 RNA 病毒科的肠道病毒引起。目前针对手足口病抗病毒的化学药品种类较少, 常选用抗病毒药物阿昔洛韦、病毒唑、更昔洛韦等治疗, 但其针对性不强, 临床效果也不理想。中医学认为手足口病属“时疫”、“春温”、“湿温”等范畴, 清热解毒、利湿化浊是常用治法。甘露消毒丹由叶天士所创, 王孟英誉之为“治湿温时疫之主方”, 用于治疗手足口病疗效肯定^[1-4]。本研究选择与重症手足口病密切相关的肠道病毒 71 型 (EV71) 为切入点, 采用体外细胞培养技术, 观察甘露消毒丹及其拆方抗 EV71 的作用, 并探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒

人恶性胚胎横纹肌瘤细胞 (RD 细胞), 美国

ATCC 公司产品, 用含 10% 牛血清的 DMEM 培养液培养, 连续传代 3 次后供实验用, 细胞维持液为含 2% 新生牛血清、1% 双抗 (青霉素、链霉素) 的 DMEM, 消化液为 0.25% 胰蛋白酶溶液。EV71 病毒, 购自武汉大学基础医学院医学病毒学研究所, EV71 病毒接种于单层 RD 细胞上, 加维持液置 35℃、5% CO₂ 培养箱培养, 出现 75% 以上的病变时收获, 冻融 3 次后离心 (4000 r/min) 10 min, 取上清, 分装, -80℃ 冻存备用。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基, 美国 HyClone 公司, 批号 SH30243.01B; 甲基偶氮唑蓝 (MTT), 上海生工生物工程公司, 批号 TB0799; 二甲基亚砜 (DMSO), 上海生工生物工程公司, 批号 2924B239; 胎牛血清, 美国 HyClone 公司, 批号 SV30087.02; 胰蛋白酶消化液, 美国 Sigma 公司, 批号 11476232。

高速冷冻离心机 Centrifuge5415R, 德国 Eppen-

* 通讯作者: cz_abc0719@163.com, (0731) 88458217

dorf 公司产品;超净工作台,上海生工生物工程公司产品。荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司产品。

1.3 药物及制备

甘露消毒丹(简称甘全方)参照《方剂学》^[4]记载为:滑石 15 g,黄芩 10 g,茵陈 11 g,石菖蒲 6 g,川贝母 5 g,木通 5 g,藿香 4 g,连翘 4 g,豆蔻 4 g,薄荷 4 g,射干 4 g。甘露消毒丹清热解毒残方(简称清残方):黄芩 10 g,连翘 4 g,薄荷 4 g,射干 4 g,川贝母 5 g。甘露消毒丹化浊利湿残方(简称利残方):茵陈 11 g,滑石 15 g,木通 5 g,藿香 4 g,豆蔻 4 g,石菖蒲 6 g。上述药材均购自湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医药大学药学院潘清平教授鉴定,按中药常规煎法进行 2 次煎煮,合并 2 次煎煮药液,制备成含生药 0.25 g/ml 药液,滤纸初步过滤后,0.22 μm 微孔滤膜过滤、灭菌,4℃ 保存备用。病毒唑注射液:江苏苏星制药有限公司生产,100 mg/ml,批号 0110409,用蒸馏水配制成 3 mg/ml,4℃ 保存备用。

1.4 病毒毒力测定

取 RD 细胞接种于无菌 96 孔细胞培养板,100 μl/孔,放置 35℃、5% CO₂ 培养箱 24 h,待细胞长成单层,弃培养液。将备用 EV71 病毒用维持液(含 2% 新生牛血清)稀释,稀释度为 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰,横向依次接种在 96 孔板内的单层 RD 细胞上,每个浓度设 8 个复孔,另设 8 复孔正常细胞对照、空白对照,35℃、5% CO₂ 培养,在摇床上轻摇 15 min,使病毒均匀吸附。倒置显微镜下观察病变效应(CPE:如细胞圆缩、分散、胞浆内颗粒增加,折光增强,自管壁脱落等),连续观察 72 h 并记录,以超过 50% 细胞出现 CPE 为阳性判断标准。采用 Reed-Muench 法^[5]计算半数组织培养感染量(TCID₅₀),实验用 100 TCID₅₀。TCID₅₀ = 10^a, a = 高于 50% 细胞病变率的稀释度的对数 + 距离比例 × 稀释度对数之间的差;距离比例 = (高于 50% 病变率的百分数 - 50%) / (高于 50% 病变率的百分数 - 低于 50% 病变率的百分数)。

1.5 药物细胞毒性测定

采用 MTT 法,取 RD 细胞接种于无菌 96 孔细胞培养板,100 μl/孔,放置 35℃、5% CO₂ 培养箱 24 h,待细胞长成单层,弃培养液。将甘全方、清残方、利残方、病毒唑药液用维持液 1:8、1:16、1:32、1:64、1:96、1:128、1:256 稀释,接种于 96 孔板中已经长成单层 RD 细胞上,每一药物浓度均设 4 个复孔,同时设置正常细胞对

照。24 h 后每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 12 μl,继续培养 4 ~ 6 h,黄色的 MTT 被活细胞的线粒体脱氢酶还原成蓝色的甲臢结晶,小心吸出 MTT,每孔加入 DMSO 100 μl,振荡混匀,15 min 后甲臢结晶被溶解,在波长 490 nm 下测定吸光度 OD 值,OD 值与活细胞的数量呈正相关。根据各药不同浓度的 OD 值计算其细胞存活率,以药物浓度为横坐标(g/ml)、细胞存活率(%)为纵坐标绘出非线性回归曲线,选择各药的 90% 细胞存活率浓度为药效学实验浓度。

1.6 药物抗 EV71 作用

采用 MTT 法,取 RD 细胞接种于无菌 96 孔细胞培养板,100 μl/孔,放置 35℃、5% CO₂ 培养箱 24 h,待细胞长成单层,弃培养液。分别将 90% 细胞存活率浓度的甘全方、清残方、利残方、病毒唑药液和 100 TCID₅₀ 病毒各 50 μl 混合,加到单层 RD 细胞上,各设 4 复孔,每孔均设正常细胞对照、病毒对照。1.5 h 后将各孔药液及病毒液吸弃,正常对照、病毒对照孔内换维持液 100 μl,药液观察各孔内换药液 50 μl、维持液 50 μl,继续培养。其余步骤同上述药物细胞毒性中的 MTT 法。实验重复 3 次,计算药物对病毒生长的抑制率。病毒抑制率(%) = (药物处理组平均 OD 值 - 病毒对照组平均 OD 值) / (正常细胞对照组平均 OD 值 - 病毒对照组平均 OD 值) × 100%。

2 结果

2.1 不同稀释浓度病毒毒力测定结果

不同稀释浓度病毒液病毒毒力测定结果见表 1,根据 Reed-Muench 法计算得出 TCID₅₀ = 10^{-2.89} / ml。

表 1 不同稀释浓度病毒液病毒毒力测定结果

病毒液 稀释度	出现 CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计孔数		出现 CPE 孔 所占的百分比 (%)
			阳性	阴性	
10 ⁻¹	14	0	35	0	100
10 ⁻²	13	1	21	1	95.45
10 ⁻³	5	9	8	10	44.44
10 ⁻⁴	3	11	3	21	12.5
10 ⁻⁵	0	14	0	35	0
10 ⁻⁶	0	14	0	49	0
10 ⁻⁷	0	14	0	63	0
10 ⁻⁸	0	14	0	77	0
10 ⁻⁹	0	14	0	91	0
10 ⁻¹⁰	0	14	0	105	0

2.2 药物细胞毒性测定结果

根据各药不同浓度的 OD 值,以药物浓度为横坐标(g/ml)、细胞存活率(%)为纵坐标绘出非

线性回归曲线, 见图 1。从回归曲线获得各药 90% 细胞存活率浓度分别为: 甘全方: $10^{-2.43} = 0.0037 \text{ g/ml}$; 清残方: $10^{-2.7} = 0.0020 \text{ g/ml}$; 利残方: $10^{-2.09} = 0.0081 \text{ g/ml}$; 病毒唑: $10^{-3.19} = 0.64 \text{ mg/ml}$ 。

2.3 各药物抗 EV71 作用结果

各药物抗 EV71 实验 OD 值见表 2, 根据 OD 值结果计算病毒抑制率得出, 清残方 EV71 病毒抑制率最高, 为 97.4%, 其次为甘全方 91.74%, 利残方 75.64%, 病毒唑 EV71 病毒抑制率最低, 为 36.99%。

表 2 各药物抗 EV71 实验 OD 均值结果

组别	样本数	甘全方	清残方	利残方	病毒唑
正常细胞对照组	12	1.66	1.63	1.67	1.59
药液处理组	12	1.62	1.61	1.48	1.13
病毒对照组	12	0.90	0.86	0.89	0.86

3 讨论

手足口病是儿科较常见的发热发疹性传染病, 具有季节性、流行性。肠道病毒属的柯萨奇病毒、EV71 和个别埃可病毒均可致手足口病, EV71 较其他病毒毒株更易引起严重的并发症, 如脑膜炎、脑炎、脑干脑炎、肺水肿等, 甚至导致死亡^[4]。甘露消毒丹首见于《续名医类案》, 由滑石、黄芩、茵陈、藿香、连翘、石菖蒲、豆蔻、薄荷、木通、射干、川贝母等组成, 以化浊、利湿、清热、解毒等药物配伍为主, 主治湿温、疫毒邪留气分。该方组成可分为 3 个部分: 一则用黄芩、连翘、川贝母、射干、薄荷清热解毒, 黄芩、连翘、薄荷可清可透, 以解身热, 川贝母、射干可解毒利咽; 二则用石菖蒲、藿香、豆蔻辟秽和中, 芳化湿浊毒邪,

畅运中焦气机; 三则以滑石、木通、茵陈清热利湿, 导湿热毒邪从小便而去。为深入研究方剂配伍, 尤其是通过对中药复方拆方的研究, 有助于阐明中药复方的配伍原理及作用机制, 可为指导临床用药提供科学依据, 也有助于提高中药复方的临床疗效^[5]。本研究根据功效进行甘露消毒丹的拆方研究, 将全方拆分为“清残方”与“利残方”两部分进行研究。

本实验结果显示, 甘全方、清残方、利残方及病毒唑均有抗 EV71 病毒作用; 而甘全方、清残方、利残方的病毒抑制率高于病毒唑, 显示了甘露消毒丹及其拆方具有比病毒唑更强的抗 EV71 效果。而清残方的病毒抑制率高于甘全方、利残方, 以利残方的抗 EV71 作用为弱, 可见甘露消毒丹中的清热解毒药比利湿化浊药发挥了更强的抗 EV71 作用。清热解毒法对疾病病因具有治疗作用 (抑菌、拮抗内毒素)^[6 1121]。从甘露消毒丹清残方组成药物的药理作用来看, 黄芩、连翘、射干等药均有不同程度不同范围的抗病毒作用^[14], 本研究则证实了清热解毒法具有确切的抗 EV71 病毒作用, 也再一次证明了中医“毒”概念与“病原微生物”的相似性及清热解毒法抗病原微生物的有效性。

利湿化浊药也具有抗 EV71 作用, 只是抗病毒作用弱于清热解毒药。实验结果显示甘全方抗病毒作用弱于清残方, 这可能是因为在抗 EV71 病毒作用方面, 利残方与清残方中的药物有相互拮抗的部分, 只是本实验尚不能对具体的拮抗关系作出准确分析。既往实验研究也表明利湿化浊法及一些利湿化浊药物对病毒感染性疾病的疗效不仅包括对疾病

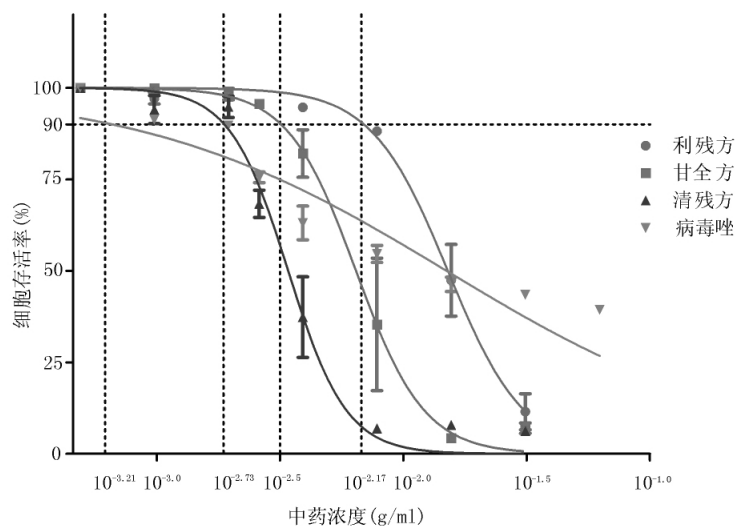


图 1 各药物细胞存活率曲线图

病因的治疗, 也包括对病因引起的一系列机体功能紊乱的矫正 (如清除自由基、提高机体免疫力、保护细胞等) [1122, 1142]。所以, 不能因为利湿化浊法可能影响清热解毒法抗 EV71 的效果而轻易否定利湿化浊法, 在治疗 EV71 所致的手足口病中, 甘露消毒丹中的利湿化浊药物在其他方面发挥了怎样的作用, 值得进一步探讨。

参考文献

- [1] 田慧, 马美美, 潘奔前. 甘露消毒丹加减治疗手足口病普通病例 80 例疗效观察 [J]. 新中医, 2011, 43(6): 76-77.
- [2] 梁志宏, 邵振华. 甘露消毒丹治疗小儿手足口病 120 例 [J]. 中国社区医师, 2010, 12(11): 136.
- [3] 曹军连. 甘露消毒丹加减治疗手足口病 41 例临床观察

- [4]. 医学研究杂志, 2009, 38(3): 106-107.
- [5] 徐华娟. 甘露消毒丹加减治疗小儿手足口病 48 例 [J]. 河南中医, 2010, 30(9): 876.
- [6] 段富津. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 245-246.
- [7] 傅继华. 病毒学实用实验技术 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 61.
- [8] 刘映霞, 周伯平. 肠道病毒 71 相关性手足口病新进展 [J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2010, 4(1): 43-45.
- [9] 王阶, 荆鲁. 基于病证结合的中药复方临床拆方研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(1): 16-20.
- [10] 彭胜权. 温病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [11] 韩淑花, 巩昌靖. 甘露消毒丹 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2013: 146-164.

Anti-Enterovirus 71 Effect of Ganlu Xiaodu Micropills and Its Disassembled Formulas In Vitro

Al Bichen, HE Youshun, ZHAO Guorong, HE Yirong, LONG Ling, LI Can, LUO Chengyu

(Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Province 410208)

ABSTRACT **ABSTRACT** Objective To observe the anti-enterovirus 71 (EV71) effect of *Ganlu Xiaodu Micropills* and its disassembled formulas in vitro. **Methods** The cell culture technology was used and the virulence of virus was measured. The Reed-Muench method was used to calculate 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) and 100 TCID₅₀ was determined for the experiment. The drug solutions of *Ganlu Xiaodu Micropills* (whole formula), heat-clearing toxin-resolving formula (heat-clearing and toxin-resolving medicinal ingredients of *Ganlu Xiaodu Micropills*), turbidity-transforming dampness-disinhibiting formula (turbidity-transforming and dampness-disinhibiting medicinal ingredients of *Ganlu Xiaodu Micropills*) and Ribavirin were diluted with maintenance medium at a ratio of 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 96, 1 : 128 and 1 : 256, respectively. The optical density (OD) value was measured by MTT assay and the cell viability was calculated according to the OD values of drugs at different concentrations. The linear regression curve was drawn with drug concentration as the horizontal axis (g/ml) and cell viability (%) as the vertical axis. A concentration of 90% cell viability was selected as the pharmacodynamic experimental concentration. The drug solutions of *Ganlu Xiaodu Micropills*, heat-clearing toxin-resolving formula, turbidity-transforming dampness-disinhibiting formula and Ribavirin at a concentration of 90% cell viability were mixed with 50 μl 100TCID₅₀ virus and added to the monolayer human malignant embryonic rhabdomyosarcoma cells (RD cells). Four duplicate wells were established and equipped with normal cell control and virus control. The viral suppression rates of drugs were calculated by MTT assay. **Results** The TCID₅₀ was 10^{-2.89}/ml. The concentration of 90% cell viability was 10^{-2.43} = 0.0037 g/ml, 10^{-2.7} = 0.0020 g/ml, 10^{-2.09} = 0.0081 g/ml, and 10^{-3.19} = 0.64 mg/ml in *Ganlu Xiaodu Micropills*, heat-clearing toxin-resolving formula, turbidity-transforming dampness-disinhibiting formula, and Ribavirin, respectively. The viral suppression rate of heat-clearing toxin-resolving formula, *Ganlu Xiaodu Micropills*, turbidity-transforming dampness-disinhibiting formula, and Ribavirin was 97.4%, 91.74%, 75.64%, and 36.99%, respectively. **Conclusion** The anti-EV71 effects of *Ganlu Xiaodu Micropills* and its disassembled formulas are superior to that of Ribavirin, and heat-clearing toxin-resolving medicinal plays a stronger role.

Keywords *Ganlu Xiaodu Micropills*; disassembled formulas; enterovirus 71; viral suppression rate

(收稿日期: 2013-08-12; 修回日期: 2013-10-23)

编辑: 邓 媛