

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.03.018

清开灵软胶囊制剂前体体外抗 H1N1、H5N1 和 H7N9 流感病毒作用

赵利华, 陈全姣*

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北省武汉市小洪山中区 44 号, 430071)

摘要 目的 观察清开灵软胶囊制剂前体体外抗 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒的作用。方法 通过测定细胞培养液上清血凝滴度 (HA) 和半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀), 评价清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液不同给药方式 (灭活、治疗、中和、预防) 对 H1N1、H5N1 和 H7N9 流感病毒的抑制作用, 并且通过 MTT 法测定清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液不同给药方式体外抗 H1N1 流感病毒作用。结果 清开灵软胶囊制剂前体的最大无毒浓度为 0.391 mg/ml, 利巴韦林注射液的最大无毒浓度为 3.907 μg/ml。清开灵软胶囊制剂前体以预防方式给药可以明显抑制流感病毒增殖, 能显著降低 H1N1、H5N1 和 H7N9 流感病毒的 HA 和 TCID₅₀, 以治疗方式给药能明显降低 H1N1 流感病毒的 HA 和 TCID₅₀ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液抗 H1N1 流感病毒的半数有效浓度分别为 0.25 mg/ml、2.19 μg/ml, 治疗指数分别为 5.32、95.89。结论 清开灵软胶囊制剂前体对 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒具有明显的预防作用, 且对 H1N1 流感病毒具有良好的治疗作用。

关键词 清开灵软胶囊; 流感病毒; 利巴韦林注射液; 抗病毒作用; 体外实验

流感病毒属于正黏病毒科, 依据其外膜血凝素 (H) 和神经氨酸酶 (N) 蛋白抗原性不同, 目前可分为若干个亚型 (H1 ~ H16, N1 ~ N9)^[1]。目前流感疫苗是最受瞩目的流感预防措施, 但流感病毒在不断变异, 存在疫苗的研究和生产跟不上病毒变异速度的可能, 疫苗使用有明显的局限性^[2]。中医药在防治流感病毒方面有独特的作用, 其临床疗效确切, 毒副作用低, 患者接受度高^[3]。本研究在细胞水平上评价中成药清开灵软胶囊制剂前体抗 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒的作用, 为药物的临床使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

清开灵软胶囊制剂前体, 由神威药业集团有限公司提供的浸膏母液, 每克含 8.70 g 生药, 含水量 19%, 批号: 14032111。利巴韦林注射液, 湖北天药药业股份有限公司生产, 批号: 13112011。CellTiter96[®] Aqueous MTS Reagent Powder (Promega 公司, 批号: 189098)、DMEM 培养基 (Gibico 公

司, 批号: 1517566)、胎牛血清 (Gibico 公司, 批号: 1565565)、EDTA-胰酶 (Gibico 公司, 批号: 1234955)。

1.2 主要仪器

电子天平 (Mettler Toledo 集团, 型号 AL204), Steri-Cycle CO₂ Incubator (Thermo Scientific 公司, 型号 MODEL371), 酶标仪 (Bio-Rad 公司, 型号 Model 680), 显微镜 (Nikon 公司, 型号 ECLIPSE TS100), 低温离心机 (Eppendorf 公司, 型号 Centrifuge 5810R), 涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 型号 QL-901)。

1.3 细胞与病毒

狗肾细胞 (MDCK) 和 A/Chicken/Hunan/12/2004 (H5N1)、A/SH/2/2013 (H7N9)、A/PR/8/1934 (H1N1) 标准病毒株均为中国科学院武汉病毒研究所提供。

1.4 药物对细胞的毒性测定

将长成单层状态良好的 MDCK 细胞经消化酶消化成单个细胞, 用生长液调整细胞数至 1×10^5 / ml, 按 100 μl/孔加入 96 孔细胞培养板中, 24 h 后形成单层细胞备用。采用微量细胞培养法, 用维持

* 通讯作者: chenqj@wh.iov.cn, (027) 87198167

液倍比稀释清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液, 其中清开灵软胶囊制剂前体初始浓度为 3.125 mg/ml, 稀释为 1.563、0.781、0.391、0.195、0.098 mg/ml; 利巴韦林注射液初始浓度为 31.250 μ g/ml, 稀释为 15.625、7.813、3.907、1.954、0.9776 μ g/ml, 各药物 6 个梯度, 将各稀释度药物分别加入 MDCK 细胞孔中, 每个稀释度 4 个复孔, 每孔 100 μ l, 同时设正常细胞对照孔。37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 每日观察细胞病变并记录。(-), 无细胞病变; (+), 0 ~ 1/4 的细胞病变; (+ +), 1/4 ~ 1/2 的细胞病变; (+ + +), 1/2 ~ 3/4 的细胞病变; (+ + + +), 3/4 ~ 1 的细胞病变^[4]。以不出现细胞病变的药物最小稀释倍数为药物的最大无毒浓度 (TC₀), 并用 Reed-Muench^[4] 计算药物的半数中毒浓度 (TC₅₀)。根据细胞病变结果, 清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液取相应稀释梯度, 分别与细胞作用 48 h 后, 采用 MTT 法用酶标仪测定细胞上清的吸光度值 (A 值, 490 nm)。存活率 (%) = (药物试验组平均 A 值/正常细胞对照组平均 A 值) × 100%^[4]。

1.5 病毒毒力的测定

将 H1N1、H5N1、H7N9 标准病毒株连续 10 倍递次稀释为 10⁻¹ ~ 10⁻⁸ 后, 将各稀释度的病毒接种于 MDCK 细胞中, 每个稀释度 4 孔, 于 37℃ 吸附 1 h 后换用维持液继续培养, 设正常细胞对照孔和病毒对照孔。72 h 后, 取细胞培养液上清测定血凝滴度 (HA), 并用 Reed-Muench 法计算各病毒半数组织细胞感染量 (TCID₅₀)^[4]。

1.6 药物不同给药方式的抗病毒作用

1.6.1 不同给药方式药物对 H1N1、H5N1、H7N9 病毒增殖的影响 用 100 TCID₅₀ 的 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒感染 MDCK 细胞, 各药物以最大无毒浓度 (TC₀) 为单一剂量组, 分别通过 4 种不同方式给药, 灭活组: 室温先将药物与病毒预混 30 min 后再感染细胞, 病毒吸附 1 h 后更换为不含药的维持液; 治疗组: 病毒先感染细胞 1 h 后换含药维持液; 预防组: 细胞与含药维持液 37℃ 孵育 24 h 后, 感染病毒, 病毒吸附 1 h 后更换为不含药维持液; 中和组: 将药物与病毒同时加入细胞中。各组均为 4 个复孔, 设置不加药物的病毒对照组和正常细胞对照组。各组细胞于 37℃ 培养 48 h, 测定培养液上清中流感病毒的 HA, 同时用 Reed-Muench 法计算各病毒的 TCID₅₀。

1.6.2 不同给药方式药物对 H1N1 抗病毒有效率的影响 用 100 TCID₅₀ 的 H1N1 流感病毒感染 MDCK 细胞, 药物以最大无毒浓度 (TC₀) 为初始浓度, 依次进行倍比稀释, 分别通过灭活、治疗、预防和中和四种不同方式给药 (同上), 设病毒对照组和正常细胞对照组, 培养 48 h 后, 采用 MTT 法用酶标仪测定各孔在 490 nm 处吸光度值, 计算药物的抗病毒有效率 (ER) 并用 Reed-Muench 法计算药物的半数有效浓度 (EC₅₀), 进而计算各药物的治疗指数 (TI)。计算公式如下: ER = (药物试验组 A 值 - 病毒对照组 A 值) / (正常细胞对照组 A 值 - 病毒对照组 A 值) × 100%^[4]; TI = 半数中毒浓度 (TC₅₀) / 半数有效浓度 (EC₅₀)^[4,7]。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism5 统计软件进行统计分析, 用 *t* 检验, 置信区间为 95%。

2 结果

2.1 药物对细胞的毒性测定结果

表 1 示, 清开灵软胶囊制剂前体的最大无毒浓度为 0.391 mg/ml, 利巴韦林注射液的最大无毒浓度为 3.907 μ g/ml。Reed-Muench 法计算清开灵软胶囊制剂前体的半数中毒浓度 TC₅₀ 为 1.33 mg/ml, 利巴韦林注射液的半数中毒浓度 TC₅₀ 为 0.21 μ g/ml。

根据细胞病变结果, 清开灵软胶囊制剂前体取 1.563、0.781、0.391、0.195、0.098 mg/ml 5 个稀释梯度和利巴韦林注射液取 15.625、7.813、3.907、1.954、0.9776 μ g/ml 5 个稀释梯度, 分别与细胞作用 48 h 后, 细胞存活率见表 2。

表 1 不同浓度药物干预 MDCK 细胞后细胞病变情况

清开灵软胶囊 制剂前体 (mg/ml)	样本数	细胞病变 情况	利巴韦林 注射液 (μ g/ml)	样本数	细胞病变 情况
3.125	4	++++	31.250	4	++
1.563	4	++	15.625	4	++
0.781	4	+	7.813	4	++
0.391	4	-	3.907	4	-
0.195	4	-	1.954	4	-
0.098	4	-	0.977	4	-

表 2 不同药浓度物干预细胞后存活率及上清 A 值

清开灵软胶 囊制剂前 体(mg/ml)	A 值	存活率 (%)	利巴韦林 注射液 (μ g/ml)	A 值	存活率 (%)
1.563	0.7465 ± 0.10	25.27	15.625	1.5228 ± 0.11	51.54
0.781	1.4188 ± 0.18	48.02	7.813	1.6868 ± 0.07	57.09
0.391	2.8628 ± 0.11	96.90	3.907	2.6663 ± 0.08	90.24
0.195	2.8575 ± 0.16	96.70	1.954	2.7443 ± 0.12	92.88
0.098	2.8775 ± 0.06	97.40	0.977	2.7578 ± 0.18	93.34

2.2 病毒毒力测定结果

根据实验结果,用 Reed-Muench 法计算 H1N1、H5N1、H7N9 标准病毒株的 TCID₅₀ 值分别为 10^{7.4}/ml、10^{8.0}/ml 和 10^{3.5}/ml,本实验采用病毒量为 100 TCID₅₀。

2.3 清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液不同给药方式对 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒增殖的影响

表 3 示,与 H1N1、H5N1 病毒对照组比较,清开灵软胶囊制剂前体灭活组、治疗组和预防组 HA 明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 H7N9 病毒对照组比较,清开灵软胶囊制剂前体预防组 HA 明显降低 ($P < 0.05$)。与 H1N1 病毒对照组比较,利巴韦林注射液中和组、治疗组 HA 明显降低 ($P < 0.01$);与 H5N1 病毒对照组比较,利巴韦林注射液中和组、治疗组、预防组 HA 明显降低 ($P < 0.01$),利巴韦林注射液各组对 H7N9 流感病毒无明显影响 ($P > 0.05$)。

表 3 清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液不同给药方式抗 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒血凝滴度比较 ($2^n, \bar{x} \pm s$)

组别	样本数	H1N1	H5N1	H7N9
病毒对照组	4	2 ^{5.5±0.6}	2 ^{7.3±0.5}	2 ^{7.0±0.0}
清开灵软胶囊制剂前体				
灭活组	4	2 ^{4.3±0.5*}	2 ^{6.0±0.8*}	2 ^{6.0±0.0}
中和组	4	2 ^{5.3±0.5}	2 ^{6.8±0.5}	2 ^{8.0±0.0}
治疗组	4	2 ^{3.5±1.0*}	2 ^{5.8±0.5**}	2 ^{7.3±0.5}
预防组	4	2 ^{2.0±1.4**}	2 ^{0.0±0.0**}	2 ^{5.0±0.0*}
利巴韦林注射液				
灭活组	4	2 ^{5.0±0.0}	2 ^{6.5±0.58}	2 ^{6.0±0.0}
中和组	4	2 ^{3.8±0.5**}	2 ^{4.3±1.0**}	2 ^{8.0±0.0}
治疗组	4	2 ^{2.5±0.6**}	2 ^{0.5±1.0**}	2 ^{6.0±0.0}
预防组	4	2 ^{4.0±1.4}	2 ^{0.0±0.0**}	2 ^{6.5±0.6}

注:与病毒对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 4 示,与 H1N1、H5N1 和 H7N9 病毒对照组比较,清开灵软胶囊制剂前体预防组 TCID₅₀ 明显较低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 H1N1 病毒对照组比较,清开灵软胶囊制剂前体治疗组 TCID₅₀ 明显较低 ($P < 0.01$),说明清开灵软胶囊制剂前体以预防的方式给药对 H1N1、H5N1 和 H7N9 有较好的抑制作用,以治疗的方式给药对 H1N1 有较好的抑制作用。与 H1N1 病毒对照组比较,利巴韦林注射液治疗组 TCID₅₀ 明显较低 ($P < 0.01$);与 H5N1 病毒对照组比较,利巴韦林注射液中和组、治疗组、预防组 TCID₅₀ 明显较低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);利巴韦林注射液各组对 H7N9 无明显作用。

2.4 清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液不同给药方式对 H1N1 流感病毒 ER、EC₅₀ 和 TI 的影响比较

表 5 示,清开灵软胶囊制剂前体治疗组表现出

较好的抑制 H1N1 流感病毒的作用,利巴韦林注射液中和组、治疗组亦有较好的抑制 H1N1 流感病毒的作用。清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液抗 H1N1 流感病毒的 EC₅₀ 分别为 0.25 mg/ml、2.19 μg/ml, TI 指数分别为 5.32、95.89。一般认为, TI > 2 时,药物具有低毒高活性,结果提示,清开灵软胶囊制剂前体治疗组显示出较好的安全性和有效性,而利巴韦林注射液亦显示出较好的安全性及有效性。

表 4 清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液不同给药方式抗 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒 TCID₅₀ 比较 ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml)

组别	H1N1	H5N1	H7N9
病毒对照组	5.0	7.5	7.5
清开灵软胶囊制剂前体			
灭活组	4.5	7.0	6.5
中和组	5.0	7.3	7.5
治疗组	3.0	7.0	7.0
预防组	4.0	5.0	6.0
利巴韦林注射液			
灭活组	4.7	7.3	6.5
中和组	4.2	6.0	7.5
治疗组	2.7	5.3	6.5
预防组	4.2	5.0	6.8

表 5 清开灵软胶囊制剂前体和利巴韦林注射液不同给药方式对 H1N1 的抗病毒有效率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	样本数	清开灵软胶囊制剂前体	利巴韦林注射液
灭活组	4	9.19 ± 3.87	6.80 ± 5.11
中和组	4	1.70 ± 1.64	50.67 ± 5.84
治疗组	4	53.20 ± 6.75	79.74 ± 6.95
预防组	4	14.17 ± 0.77	1.32 ± 1.30

3 讨论

目前抗病毒类西药品种繁多,但毒副作用高易产生耐药性^[8],而中药在抗流感病毒作用方面有其独特的优越性,不仅毒性低、不良反应少、多靶点、不易产生耐药性,而且能提高机体的免疫力^[9]。胡克杰等^[10]研究表明,在体外金银花能够抑制甲 3 型流感病毒的增殖。初正云等^[11]研究证明了黄芩能够使感染流感病毒的小鼠死亡率降低,且一定程度上对小鼠肺部组织病变起到防治作用。

清开灵软胶囊制剂前体由古方《温病条辨》中安宫牛黄丸改制而来,由胆酸、猪去氧胆酸、黄芩苷、水牛角、金银花等组成,具有清热解毒、镇静安神的功效,用于上呼吸道感染、病毒性感冒、急性化脓性扁桃体炎、急性咽炎、急性气管炎及高热等病症。清开灵软胶囊制剂前体药物组成现代药理学研究显示,主要有抗菌、抗炎、护肝、解热和抗病毒等作用^[12]。本研究探讨了清开灵软胶囊制

剂前体以灭活、中和、治疗、预防四种给药方式对 H1N1、H5N1、H7N9 流感病毒的抑制作用。实验结果表明,清开灵软胶囊制剂前体以预防方式给药对 H1N1、H5N1 和 H7N9 流感病毒均有显著抑制作用,说明清开灵软胶囊制剂前体以预防方式给药有较广泛的抗病毒作用,与 MDCK 细胞作用 24h 后能有效预防 H1N1、H5N1、H7N9 对细胞的吸附。清开灵软胶囊制剂前体以治疗方式给药对 H1N1 病毒有显著抑制作用,说明在病毒吸附细胞后,清开灵软胶囊制剂前体能够抑制 H1N1 的增殖。利巴韦林注射液治疗和预防方式给药对 H1N1、H5N1 均有显著抑制作用,表明清开灵软胶囊制剂前体对 H1N1、H5N1 病毒的预防作用与利巴韦林注射液相当。本研究还测定了清开灵软胶囊制剂前体不同给药方式对 H1N1 流感病毒的 EC_{50} 和 TI 的影响,结果表明,清开灵软胶囊制剂前体的安全范围尚可,作为口服制剂,可以推荐在临床上预防使用。

参考文献

- [1] 陈灏珠,林果为,王吉耀. 实用内科学第 14 版. 北京:人民卫生出版社,2013:352.
- [2] 曾光. 我国应对禽流感和大流行若干关键问题探讨 [J]. 解放军医学杂志,2006,31(7):643-646.
- [3] 王林林,史玉柱,王雪,等. 中药抗流感病毒研究进展 [J]. 西北药学杂志,2013,27(6):600-604.
- [4] 莫红缨,柯昌文,郑劲平,等. 连花清瘟胶囊体外抗甲型流感病毒的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理,2007,18(1):5-9.
- [5] 王思源,平静,谢宁,等. 穿心莲内酯磺化物体外抗流感病毒药效学研究 [J]. 中南药学,2013,11(5):331-334.
- [6] 戴华生. 新实验病毒学 [M]. 北京:中国学术出版社,1983:182-186.
- [7] 杨怡姝,李洪源,刘密凤,等. 抗病毒 1 号中药对流感病毒 A3 的抑制作用 [J]. 疾病控制杂志,2001,5(2):102-104.
- [8] 刘颂,王京燕. 抗流感病毒药物的研究进展 [J]. 国外医学(药学分册),2005,32(2):111-115.
- [9] 李艳华,闫清波,于康震,等. 复方中药对禽流感病毒的防治研究 [J]. 中国农业科学,2008,41(5):1511-1518.
- [10] 胡克杰,孙考祥. 氯原酸体外抗病毒作用研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报,2001,35(6):430-432.
- [11] 初正云,初明,滕宇. 黄芩苷体内抗流感病毒作用 [J]. 中国中药杂志,2007,32(22):2413-2415.
- [12] 梅全喜. 现代中药药理与临床药理学 [M]. 北京:中国中医药出版社,2008:101-526.

Effect of *Qingkailing* (清开灵) Soft Capsule Precursor on H1N1, H5N1 and H7N9 Influenza Virus in Vitro ZHAO Lihua, CHEN Quanjiao

(Wuhan Institute of Virus, Chinese Academy of Sciences, Hubei Province)

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Qingkailing* soft capsule precursor against H1N1, H5N1, H7N9 influenza virus in vitro. **Methods** Through determination of cell culture supernatant of hemagglutination titer (HA) and median tissue culture infective dose (TCID₅₀), inhibition of influenza virus H1N1, H5N1, and H7N9 would be evaluated of *Qingkailing* soft capsule precursor and Ribavirin injection with different administration way (inactivated, treatment, neutralization and prevention), the antiviral effect of *Qingkailing* soft capsule precursor and Ribavirin injection against the H1N1 influenza virus in different ways of administration in vitro will be determined by MTT method.

Results The maximum non-toxic concentration of *Qingkailing* soft capsule precursor is 0.391 mg/ml and 3.907 μg/ml for Ribavirin injection. *Qingkailing* soft capsule precursor can significantly inhibit the proliferation of influenza virus with drug prevention way, it can significantly reduce HA and TCID₅₀ of H1N1, H5N1 and H7N9 influenza virus, and it can significantly reduce HA and TCID₅₀ of H1N1 influenza virus with drug treatment way ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The median effective concentration of *Qingkailing* soft capsule precursor and Ribavirin injection against H1N1 influenza virus is 0.25 mg/ml, 2.19 g/ml respectively. The therapeutic index is 5.32, 95.89 respectively. **Conclusion** *Qingkailing* soft capsule precursor has significant preventive effect against influenza virus of H1N1, H5N1 and H7N9, and it has a good therapeutic effect for H1N1 influenza virus.

Keywords *Qingkailing* soft capsule; influenza virus; Ribavirin injection; antiviral effect; in vitro study

(收稿日期: 2015-03-30; 修回日期: 2015-05-21)

编辑: 邓 媛