

• 实验研究 •

退热解毒灵水煎剂抗甲型 H1N1 流感病毒
体内外实验研究

苏 文 徐辉甫 黄 浩*

武汉市第一医院儿科、中心实验室,湖北省武汉市中山大道 215 号,430022)

基金项目:武汉市科技计划项目(200852199598)

* 通讯作者:whhuanghao10@yahoo.com.cn, (027)85332365

[摘要] 目的 观察退热解毒灵水煎剂对甲型 H1N1 流感病毒的抑制作用。方法 体外抗病毒实验:将 MDCK 细胞悬液以 10^5 /ml 接种于 96 孔板,用细胞维持液连续 2 倍系列稀释退热解毒灵水煎剂成 5000、2500、1250、625、312.5、156.25、78.39、19.5mg/L 9 个稀释度,另将病毒唑注射液稀释成 125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9、2.0、1.0、0.5mg/L 9 个稀释度,观察细胞病变效应,计算病毒抑制率。体内抗病毒实验:将 80 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、达菲组、退热解毒灵组,每组 20 只。除对照组外,其他各组小鼠均以 10 倍半数致死量剂量鼻腔接种甲型 H1N1 流感病毒 $50\mu\text{l}$ 。感染当天开始给药,退热解毒灵组灌胃给予退热解毒灵水煎剂每天 4.133g/kg;达菲组灌胃给予达菲胶囊每天 20mg/kg。每组取 10 只连续观察小鼠存活率;另 10 只于首次给药后 4 天、8 天各处死 5 只,测定鼠肺湿质量及肺内病毒半数组织培养感染量(TCID₅₀)。结果 体外抗病毒实验:退热解毒灵水煎剂浓度为 5000、2500、1250、625、312.5mg/L 组和病毒唑注射液浓度为 125、62.5、31.3、15.6mg/L 组病毒抑制率均在 50% 以上。体内抗病毒实验:模型组小鼠存活率为 0,达菲组与退热解毒灵组存活率分别为 90%、60%。染毒后第 4 天、第 8 天,达菲组、退热解毒灵组肺湿质量及肺内病毒 TCID₅₀ 与模型组比较均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 退热解毒灵水煎剂对体内、体外甲型 H1N1 流感病毒均有一定的抑制作用。

[关键词] 退热解毒灵水煎剂;甲型 H1N1 流感病毒;抑病毒作用;体内实验;体外实验

The Virostatic Action of Tuire Jieduling Decoction on H1N1 Type A Influenza Virus: In Vivo and in Vitro

SU Wen¹, XU Huipu¹, HUANG Hao²

(The First Hospital of Wuhan City, Hubei 430022)

ABSTRACT Objective To observe the virostatic action of Tuire Jieduling Decoction (Decoction for effective defervescence and detoxification) on the H1N1 Type A influenza virus. **Methods** In vitro experiment: the MDCK cell suspension 10^5 /ml was vaccinated onto the 96-hole plate, using the cell maintenance liquid to dilute continuously twice as much the Tuire Jieduling Decoction to 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.39, and 19.5mg/L in concentration in series, and dilute twice as much the virazole injection to 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0, 1.0, and 0.5mg/L in concentration in series. The lesion effect of cells was observed and the virostatic rate was calculated. In vivo experiment: eighty BALB/c mice were randomized into control group, model group, Tamiflu group, and Tuire Jieduling group, with 20 in each. Except for the control group, mice of the other groups were vaccinated nasally with the H1N1 Type A influenza virus $50\mu\text{l}$, a dose ten times of the half lethal dose (LD₅₀). The medication was given since the day of viral vaccination. Tuire Jieduling group was administered Tuire Jieduling Decoction 4.133g/kg each day and the Tamiflu group was applied Tamiflu 20mg/kg each day through intragastric feeding. Ten mice of each group were observed on the survival rate, five were executed on the 4th day, and the other five on the 8th day after the first medication to measure the lung wet weight and intrapulmonary virus TCID₅₀. **Results** In vitro experiment: the inhibiting rate of the 5000, 2500, 1250, 625, and 312.5mg/L Tuire Jieduling Decoction subgroups and the 125, 62.5, 31.3, 15.6mg/L virazole subgroups was all over 50%. In vivo experiment: the survival rate of the model group was 0, and that of the Tamiflu group and Tuire Jieduling Decoction group was 90% and 60% respectively. On the 4th day and 8th day after viral infection, the lung wet weight and intrapulmonary virus TCID₅₀ of the Tamiflu group and Tuire Jieduling Decoction group were all significantly dropped in comparing with the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Tuire Jieduling Decoction is virostatic on the H1N1 Type A influenza virus both in vivo and in vitro.

Key Words Tuire Jieduling Decoction (Decoction for effective defervescence and detoxification); H1N1 Type A influenza virus; virostatic action; test in vivo; test in vitro

呼吸道感染是世界范围内导致 5 岁以下儿童死亡的主要原因之一^[1]。全球每年约有 190 万儿童死于急性下呼吸道感染,其中发展中国家死亡率尤高^[2]。随着抗生素的广泛使用,呼吸道感染的病原谱已发生变化,细菌感染逐渐减少,病毒感染明显上升^[3-4]。流行性感冒(简称流感)是由呼吸道流感病毒引起的一种传染性极强的病毒感染性疾病,在呼吸系统中发病率占首位,我国是流感高发地区。抗甲型 H1N1 流感病毒的有效药物为达菲,但达菲价格高,国内储备量少,且在发达国家还出现了达菲耐药现象^[5]。中国多次发生流感,中医药在治疗呼吸道病毒感染有很多优势,且不论这些疾病的病原体有何变化,其临床上的表现总与中医的温热病有许多相似之处,同时还能够根据不同体质特点辨证论治^[6]。本实验观察武汉市第一医院经验方退热解毒灵对小鼠呼吸道甲型 H1N1 流感病毒的抑制作用,旨在为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 BALB/c 小鼠 80 只,清洁级,体重 14~16g。由湖北省动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(鄂)2009-0018。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);新生牛血清(杭州四季青公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,美国 Sigma 公司)。病毒唑注射液(江苏涟水制药有限公司,批号:1502033);达菲胶囊(上海罗氏制药有限公司,规格:75mg,批号:011018)。酶标仪(Thermo Forma 公司);96 孔细胞培养板(Costar 公司)。

1.3 药物制备

退热解毒灵由柴胡、连翘、板蓝根、野菊花、甘草各 15g 组成,用单蒸水洗 3 次,双蒸水洗 3 次,加三蒸水浸泡过夜(1g 原药与 10ml 三蒸水比例浸泡),煮沸 20min,滤出药液再加适量的三蒸水煮沸 10min,滤出药液。两次滤出药液混匀后于 70℃ 水浴箱中浓缩至 1kg/L, C4 型垂熔玻璃滤器过滤后,分装隔水煮沸灭菌,4℃ 保存。

1.4 细胞培养

选形态良好的 MDCK 传代细胞长满单层,取形态良好的细胞,供实验用。生长液用 DMEM 培养液,加 10% 灭活小牛血清(维持液加 5% 灭活小牛血清),按常规加双抗。

1.5 半数组织培养感染量(TCID₅₀)测定

甲型 H1N1 病毒标准株,由武汉大学医学院医学病毒所提供;取 2.5×10^9 PFU/ml 病毒悬液按 10 倍稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 的 10 个不同稀释度,每个稀释度接种 4 管 MDCK 细胞,每管接种 0.1ml 病毒悬液,加细胞维持液(除 FBS 含量为 2% 外,其他成分同细胞生长液)于 37℃ 静置培养,连续观察 7 天,按 Reed 及 Muench 的方法^[7]计算 TCID₅₀ 的量。

1.6 体外抗病毒实验

制备 MDCK 细胞悬液,以 10^5 /ml 接种于 96 孔板,每孔 200 μ l。每孔接种 50 μ l 100TCID₅₀ 的甲型 H1N1 病毒液,37℃ 吸附 1h,弃上清。取除菌过的退热解毒灵水煎剂,用细胞维持液连续 2 倍系列稀释成 5000、2500、1250、625、312.5、156.25、78、39、19.5mg/L 等 9 个稀释度。另用细胞维持液 2 倍系列稀释病毒唑注射液成 125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9、2.0、1.0、0.5mg/L 等 9 个稀释度。每孔 200 μ l,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,观察细胞病变效应。病毒抑制率(%)=[药物处理组 D(λ)值-病毒对照组 D(λ)值]/[正常细胞对照组 D(λ)均值-病毒对照组 D(λ)均值]×100%。

1.7 体内抗病毒实验

将 80 只小鼠采用区组随机方法分为对照组、模型组、达菲组、退热解毒灵组,每组 20 只。退热解毒灵组灌胃退热解毒灵水煎剂,每天 4133g/kg;达菲组灌胃达菲胶囊,每天 20mg/kg^[8];对照组、模型组灌胃等量蒸馏水。

除对照组外,其他各组小鼠乙醚麻醉,10 倍半数致死量(LD₅₀)剂量鼻腔接种流感病毒 50 μ l。感染当天开始给药,每天 1 次,连续 5 天。每组取 10 只连续观察 14 天,记录小鼠死亡情况(计算存活率及平均生存时间);另外 10 只于首次给药后 4 天、8 天各处死 5 只,无菌取肺,测定鼠肺湿质量,鼠肺研磨成肺悬液后测定肺内病毒 TCID₅₀。肺经甲醛固定后制作组织切片,HE 染色,光镜下观察肺组织形态学变化。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件处理,计量数据以均数±标准差表示,组间比较用 *t* 检验,多组资料比较采用 ANOVA 检验。

2 结果

2.1 体外抗病毒实验

表 1 示,退热解毒灵水煎剂浓度为 5000、2500、

1250、625、312.5mg/L 组和病毒唑注射液浓度为 125、62.5、31.3、15.6mg/L 组病毒抑制率均在 50% 以上,对 MDCK 细胞保护作用较强。

表 1 不同浓度退热解毒灵水煎剂及病毒唑注射液
对甲型 H1N1 病毒抑制率情况

退热解毒灵 水煎剂	浓度 (mg/L)	病毒抑制 率(%)	病毒唑 注射液	浓度 (mg/L)	病毒抑制 率(%)
1	5000	99.2	1	125	98.5
2	2500	94.1	2	62.5	93.1
3	1250	83.2	3	31.3	81.6
4	625	64.1	4	15.6	58.5
5	312.5	57.3	5	7.8	46.8
6	156.25	49.1	6	3.9	25.6
7	78	29.5	7	2.0	14.7
8	39	21.3	8	1.0	6.8
9	19.5	0.7	9	0.5	0.9

2.2 体内抗病毒实验

2.2.1 各组小鼠存活率及平均生存时间的比较
模型组小鼠在染毒后的第 6 天开始死亡,到第 10 天存活率为 0;退热解毒灵组小鼠在染毒后的第 7 天开始死亡。表 2 示,模型组小鼠平均生存时间为 7.2 天,退热解毒灵组小鼠平均生存时间为 10.2 天,达菲组和对照组小鼠平均生存时间均大于 15

表 2 各组小鼠存活率及平均生存时间的比较

组别	鼠数	存活小鼠数	存活率(%)	平均生存时间(d)
对照组	10	10	100	>15
模型组	10	0	0	7.2
达菲组	10	9	90	>15
退热解毒灵组	10	6	60	10.2

天,各组小鼠存活率与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.2.2 各组小鼠不同时间肺湿质量及肺内病毒 TCID₅₀ 比较
表 3 示,染毒后第 4 天、第 8 天,达菲组、退热解毒灵组肺内病毒 TCID₅₀ 与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。染毒后第 4 天、第 8 天模型组肺湿质量较对照组明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);退热解毒灵组及达菲组肺湿质量较模型组明显下降,差异亦有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2.3 各组小鼠肺病理组织学比较

图 1 示,对照组肺泡大小较一致,肺泡壁薄,管上皮完整,管腔内无分泌物,支气管上皮正常,其外周未见炎性细胞浸润;模型组小鼠肺组织有大面积的肺实变,肺泡间隔明显增宽,有大量淋巴细胞浸润,可见肺泡上皮细胞增生和肺泡缩小,肺泡腔有液体渗出与出血灶;退热解毒灵组与达菲组小鼠肺组织病变较模型组减轻,肺泡间隔略有增宽,淋巴细胞浸润显著降低,显示出一定的保护效应。

3 讨论

退热解毒灵是我院张介眉教授结合自己多年的辨证论治临床经验的自拟经验方。多年临床运用表明,在治疗儿童呼吸道感染方面,能有效地缩短病程,缓解发热、头痛等不适。本研究通过体外细胞培养法和体内建立病毒感染动物模型研究了退热解毒灵水煎剂的抗甲型 H1N1 流感病毒作用。结果均显示,退热解毒灵水煎剂具有一定的抗甲型 H1N1 流感病毒作用,体外细胞实验证明退热解毒

表 3 各组小鼠不同时间肺湿质量及肺内病毒 TCID₅₀ 比较

组别	鼠数	染毒后第 4 天		染毒后第 8 天	
		TCID ₅₀	肺湿质量(mg)	TCID ₅₀	肺湿质量(mg)
对照组	10	—	141±31	—	153±24
模型组	10	6178±0124	351±23**	6197±0135	374±44*
达菲组	10	2147±0171△△	173±34△△	2114±0147△△	187±19△△
退热解毒灵组	10	3124±0166△	291±54△	2469±0169△	312±47△

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

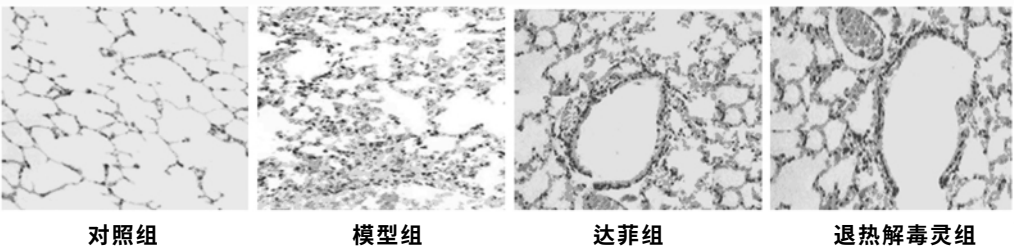


图 1 各组小鼠肺组织病理学比较(×400)

灵水煎剂能直接抑制甲型 H1N1 流感病毒;体内抗病毒实验通过存活率、平均存活时间、鼠肺实变、鼠肺内病毒 TCID₅₀ 及鼠肺病理切片等多个参数评定,显示退热解毒灵水煎剂具有一定的抗甲型 H1N1 流感病毒活性。

流感病毒所致的小鼠肺炎病理改变为典型的间质性肺炎表现,肺泡间隔明显增宽,肺间质内血管充血、水肿及淋巴细胞、单核细胞等炎细胞浸润。退热解毒灵水煎剂能有效控制肺部炎症反应的程度和范围,局限病灶的蔓延,显著减轻小鼠肺部组织的病理损害,从而保护了肺功能,这可能是应用退热解毒灵水煎剂治疗后,小鼠死亡率明显降低、生存时间明显延长的直接原因。

退热解毒灵方中清热解毒之板蓝根为君药,兼以凉血利咽;臣以连翘清热解毒、疏散风热;佐以柴胡疏散外感及少阳之热,加用野菊花增强其清热解毒的功效;以甘草调和诸药。诸药合用,共奏疏风解表、清热解毒之功效。该药除具有抗病毒作用外,还具有提高机体免疫力及良好的解热作用,预防肺炎的发生。本研究结果表明,退热解毒灵水煎剂在抑制体内外甲型 H1N1 流感病毒复制的同时,还有着较高的安全性。应更深层研究其抗病毒作用的分子机制,筛选出其抗病毒成分组合,优化药物剂型,为今后应用退热解毒灵水煎剂治疗由甲型 H1N1 病毒引起的呼吸道及肺部感染性疾病开辟新道路。

参考文献

- [1] Harnden A, Perera R, Brueggemann AB, et al. Respiratory infections for which general practitioners consider prescribing an antibiotic: a prospective study[J]. Arch Dis Child, 2007, 92(7): 594-597.
- [2] Pio A, Kirkwood BR, Gove S. Avoiding hypothermia, an intervention to prevent morbidity and mortality from pneumonia in young children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2010, 29(2): 153-159.
- [3] Rudan I, Campbell H. The deadly toll of S pneumoniae and H influenzae type b[J]. Lancet, 2009, 374(9693): 854-856.
- [4] Mathisen M, Strand TA, Valentiner-Branth P, et al. Respiratory viruses in nepalese children with and without pneumonia: a case-control study[J]. Pediatr Infect Dis J, 2010, 29(8): 731-735.
- [5] Lüscher-Mattli M. Influenza chemotherapy: a review of the present state of art and of new drugs in development [J]. Arch Virol, 2000, 145(11): 2233-2248.
- [6] 张进陶, 王飞, 陈勇. 中医对呼吸道病毒感染的病因病机探析[J]. 四川中医, 2008, 26(11): 15-16.
- [7] Fridholm H, Everitt E. Rapid and reproducible infectivity end-point titration of virulent phage in a microplate system[J]. J Virol Methods, 2005, 128(1-2): 67-71.
- [8] 钟菊迎, 崔晓兰, 时宇静, 等. 金柴抗病毒胶囊对甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株感染免疫低下小鼠肺炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 109-112.

(收稿日期: 2011-04-25; 修回日期: 2011-06-17)

[编辑: 崔京艳]

欢迎订阅 2012 年《中医杂志》

《中医杂志》是由中华中医药学会和中国中医科学院联合主办的、全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级医药期刊, 是中国中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊。2009 年被中国科学技术协会评为中国精品科技期刊。2010 年被中国期刊协会评为新中国 60 年有影响力的期刊。2011 年获国家新闻出版政府奖期刊奖提名奖, 并且是唯一获此荣誉的中医类期刊。被国内外多种检索系统收录。《中医杂志》英文版 2010 年起又被列为美国《科学引文索引(扩展库)》(SCI-E)来源期刊。本刊主要栏目中“当代名医”和“临证心得”分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验;“临床研究”“临床报道”介绍中医药治疗的新方法、新成果;“临床解惑”回答读者遇到的各类疑难问题。此外, 还辟有学术探讨、思路与方法、方法学与临床评价、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目, 可使您掌握最新信息与治疗方法, 成为您学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

2012 年《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版。每期 9.80 元, 为大 16 开本。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64014111 转 3036/3041 国外发行: 中国国际图书贸易总

公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044), 国外发行代号: M140。

本社地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 邮编: 100700, 电话: 010-64035632。网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

旨可平®降脂通络软胶囊 有奖征文通知

神威药业旨可平®降脂通络软胶囊是国家食品药品监督管理局批准用于治疗高脂血症的国家级新药, 也是目前临床上确证具有肝脏保护作用的调脂药。自 2004 年上市以来, 其确切的疗效及良好的完全性, 获得了临床医生和患者的一致认可。为了促进临床用药经验交流, 神威药业于 2011 年 7-12 月面向全国临床医生征集旨可平®临床研究和临床观察的论文, 篇幅 2000 字以上。获奖者名单将刊登于 2012 年第 1 期《中华心血管病杂志》。奖项设定如下: 一等奖: 1 名, 奖金 5000 元; 二等奖: 2 名, 奖金 3000 元; 三等奖: 5 名, 奖金 2000 元; 优秀奖: 50 名, 价值 500 元礼品 1 份; 参与奖: 名额不限, 价值 150 元礼品 1 份(凡投寄论文者均可获此奖)。

请将论文电子版发至: zhikeping@126.com, 有奖征文热线: 010-85860066 转 6230

欢迎广大医生积极参与、踊跃投稿!

Copyright © 2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>