

菌毒清颗粒体外抗病毒的药效学研究^Δ

韩艳*, 赵伟国, 李运景[#](中山市人民医院, 广东中山 528400)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3070-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.14

摘要 目的:研究菌毒清颗粒体外抗病毒的药效学。方法:将柯萨奇病毒B族3型(CoxB3)Nancy株、呼吸道合胞病毒(RSV)分别接种于人喉癌上皮Hep2细胞以复制细胞病毒模型。菌毒清颗粒原液(2 mg/ml)与氯原酸原液(2 mg/ml)以1:2~1:256倍比稀释后作用于病毒模型细胞,以Reed-Muench法计算50%细胞毒性浓度(TC₅₀)和最大无毒浓度(TC₀)。以1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 mg/ml菌毒清颗粒溶液与0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/ml绿原酸溶液培养病毒模型细胞,显微镜下评价细胞病变程度。以1.25、0.625、0.312 5、0.156 25、0.078 125 mg/ml菌毒清颗粒溶液与0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/ml绿原酸溶液作用于病毒模型细胞,Reed-Muench法计算对RSV、CoxB3细胞的50%抑制浓度(IC₅₀)和治疗指数(TI)。结果:菌毒清颗粒TC₅₀、TC₀分别为1.79、1.25 mg/ml,绿原酸TC₅₀、TC₀分别为0.71、0.5 mg/ml。当菌毒清颗粒溶液质量浓度为1.25 mg/ml时病毒感染细胞生长正常。菌毒清颗粒IC₅₀均为0.22 mg/ml, TI均为8.14;绿原酸IC₅₀分别为0.18、0.36 mg/ml, TI分别为3.94、1.97。结论:菌毒清颗粒具有体外抗CoxB3和RSV病毒的作用。

关键词 菌毒清颗粒;呼吸道合胞病毒;柯萨奇病毒;人喉癌上皮Hep2细胞

Pharmacodynamic Study on *in vitro* Antiviral Effect of Junduqing Granules

HAN Yan, ZHAO Wei-guo, LI Yun-jing (Zhongshan People's Hospital, Guangdong Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study *in vitro* antiviral effect of Junduqing granules. METHODS: Human laryngeal cancer Hep2 cells were inoculated with the Nancy strain of coxsackievirus B3 (CoxB3) and respiratory syncytial virus (RSV) to establish virus-infected cell models. 2 mg/ml original liquid of Junduqing granules and 2 mg/ml original liquid of chlorogenic acid which were diluted according to the ratio of 1:2-1:256 were used to act on the virus-infected cells. Reed-Muench method was adopted to calculate 50% toxic concentration (TC₅₀) and maximal atoxic concentration (TC₀). Virus-infected cells were cultured with solution of Junduqing granules of 1.25, 0.625, 0.312 5 and 0.156 25 mg/ml and chlorogenic acid solution 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5 mg/ml, and then the degree of cytopathic effect was evaluated with a microscope. Virus-infected cells were cultured with 1.25, 0.625, 0.312 5, 0.156 25, 0.078 125 mg/ml solution of Junduqing granules and 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.031 25 mg/ml of chlorogenic acid solution, and Reed-Muench method was adopted to calculate 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and therapeutic index (TI) on RSV and CoxB3 cells. RESULTS: TC₅₀ of Junduqing granules was 1.79 mg/ml and TC₀ was 1.25 mg/ml, TC₅₀ of chlorogenic acid was 0.71 mg/ml and TC₀ was 0.5 mg/ml. Virus-infected cells grew normally when the mass concentration of solution of Junduqing granules was 1.25 mg/ml. IC₅₀ of Junduqing granules was 0.22 mg/ml and TI was 8.14; IC₅₀ of chlorogenic acid were 0.18 and 0.36 mg/ml, TI were 3.94 and 1.97. CONCLUSIONS: Junduqing granules have *in vitro* anti-CoxB3 and RSV effect.

KEYWORDS Junduqing granules; Respiratory syncytial virus; Coxsackievirus; Human laryngeal cancer Hep2 cells

菌毒清颗粒是中山大学附属中山医院制剂品种,由南板蓝根、穿心莲、金银花等多味药材经现代工艺精制而成,具有清热解毒之功效,在该院长期应用,年均用量超过300万包。前期基础研究表明菌毒清颗粒具有良好的抗炎及解热镇痛作用,安全性好^[1-3];临床研究表明,菌毒清颗粒对风热证感冒具有明显的疗效^[4]。本研究通过体外复制细胞病毒感染模型研究其抗病毒作用,以期为该药的进一步深入研究及临床应用提供参考和数据支持。

1 材料

1.1 仪器

CX-31型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);CO₂培养箱(日本Sanyo公司);MSC1.8型生物安全柜(美国Thermo公司)。

1.2 药品与试剂

菌毒清颗粒原液(中山大学附属中山医院,批号:20140401,质量浓度:40 mg/ml);绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-201314,纯度:96.6%);胎牛血清、

DMEM(高糖)培养基(美国Gibco公司)。

1.3 细胞与病毒

人喉癌上皮Hep2细胞,购自中国协和医科大学基础所细胞中心,细胞培养实验室常规传代培养;柯萨奇病毒B族3型(CoxB3)Nancy株、呼吸道合胞病毒(RSV)由中国中医科学院中药研究所生物安全实验室常规传代培养,病毒滴定度(TCID₅₀)分别为10^{-5.5}、10⁻⁶,-80℃贮藏。

2 方法

2.1 菌毒清颗粒50%细胞毒性浓度和最大无毒浓度的测定

将菌毒清颗粒原液(2 mg/ml)与绿原酸原液(以去离子水溶解配制绿原酸对照品,2 mg/ml)以1:2~1:256倍比稀释后,加至已长成单层的Hep2细胞培养板中,100 μl/孔,每个稀释度药液做4个复孔,同时设细胞对照。将培养板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,倒置显微镜下观察细胞病变情况,确定细胞不出现明显病变的最低稀释倍数,按Reed-Muench法计算50%细胞毒性浓度(TC₅₀)和最大无毒浓度(TC₀)。

2.2 细胞病变程度的评价

取已长成单层细胞的培养板,倒掉培养液,用细胞维持液冲洗细胞3遍后,接种100倍TCID₅₀的病毒液,100 μl/孔,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养1 h后,弃去病毒液,再分别加入

Δ 基金项目:广东省中医药强省科研课题(No.2010337)

* 硕士研究生。研究方向:药理学。E-mail:569076364@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:药理学、临床药理学。E-mail:zspylyj@163.com

相应浓度溶液(从最大无毒浓度开始往下对倍稀释4个质量浓度,即菌毒清颗粒原液1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 mg/ml,绿原酸0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/ml,即为质量浓度①、②、③、④),100 μ l/孔,同时设细胞对照和病毒对照。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,倒置显微镜下观察细胞病变情况,当病毒对照细胞病变为“++++”时记录结果^[5]。采用6级标准判断细胞病变程度:“-”,细胞生长正常,无病变出现;“±”,细胞病变少于整个单层的10%;“+”,细胞病变约占整个单层细胞的25%以下;“++”,细胞病变约占整个单层细胞的50%以下;“+++”,细胞病变约占整个单层细胞的75%以下;“++++”,细胞病变约占整个单层细胞的75%以上。

2.3 菌毒清颗粒50%抑制浓度和治疗指数的测定

取已长成单层细胞的培养板,倒掉培养液,用细胞维持液冲洗细胞3遍后,接种100倍TCID₅₀的各种病毒液,100 μ l/孔,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中吸附1 h后,弃去病毒液,再分别加入相应稀释度的筛选样本(从TC₀开始往下对倍稀释5个质量浓度),100 μ l/孔,同时设细胞对照和病毒对照。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,每日在倒置显微镜下观察细胞病变情况,当病毒对照病变为“++++”时记录结果^[9]。按Reed-Muench计算50%抑制浓度(IC₅₀)和治疗指数(TI),TI=TC₅₀/IC₅₀。

3 结果

3.1 菌毒清颗粒TC₀和TC₅₀的测定结果

菌毒清颗粒TC₅₀为1.79 mg/ml,TC₀为1.25 mg/ml;而绿原酸TC₅₀为0.71 mg/ml,TC₀为0.5 mg/ml。菌毒清颗粒TC₀、TC₅₀的测定结果见表1。

表1 菌毒清颗粒和绿原酸TC₀、TC₅₀的测定结果(mg/ml)

药物	TC ₀	TC ₅₀
菌毒清颗粒	1.25	1.79
绿原酸	0.5	0.71

3.2 细胞病变程度的评价结果

当1.25 mg/ml菌毒清颗粒作用于RSV、CoxB3模型细胞时,细胞无病变;当0.625 mg/ml菌毒清颗粒、0.5 mg/ml绿原酸作用于RSV、CoxB3模型细胞时,细胞病变少于整个单层的10%;其他药物质量浓度下,病毒模型细胞病变程度较高。细胞病变程度评价结果见表2(表中1、2、3、4分别代表“+”“++”“+++”“++++”)。

表2 细胞病变程度评价结果

质量浓度	RSV细胞		CoxB3细胞	
	菌毒清颗粒	绿原酸	菌毒清颗粒	绿原酸
①	----	1111	----	1111
②	±±±±	1111	±±±±	1122
③	1111	2233	1111	3333
④	2222	4444	2233	4444
细胞对照	----	----	----	----
病毒对照	4444	4444	4444	4444

3.3 菌毒清颗粒IC₅₀和TI的测定结果

药物作用于RSV、CoxB3时,菌毒清颗粒IC₅₀均为0.22 mg/ml,绿原酸IC₅₀分别为0.18、0.36 mg/ml,菌毒清颗粒TI均为8.14,绿原酸TI分别为3.94、1.97。这表明菌毒清颗粒与绿原酸均有一定抗病毒作用,且菌毒清颗粒抗病毒效果好于绿原酸。菌毒清颗粒IC₅₀、TI的测定结果见表3。

4 讨论

从“非典”到“禽流感”再到肆虐于非洲的埃博拉病毒,病

表3 菌毒清颗粒IC₅₀、TI的测定结果

Tab 3 Determination results of IC₅₀ and TI of Junduqing Granules

指标	RSV细胞		CoxB3细胞	
	菌毒清颗粒	绿原酸	菌毒清颗粒	绿原酸
IC ₅₀ ,mg/ml	0.22	0.18	0.22	0.36
TI	8.14	3.94	8.14	1.97

毒感染一直都是危害人们健康生命的主要原因之一,目前尚缺乏理想的抗病毒西药。而中医药通过几千年传承积累的大量临床经验,其治疗病毒感染性疾病的研究逐渐成为热点。中药因其“多组分、多靶点、多效应”等特点在治疗中发挥着越来越大的作用。

菌毒清颗粒源于临床经验方,具有清热解暑、滋阴降火、凉血止血、利咽润燥之功效。通过多年的临床应用与研究,笔者发现菌毒清颗粒在治疗及预防上呼吸道感染等疾病方面具有明显的疗效。流行病学表明,上呼吸道感染多数由病毒感染引起,常见的病毒有鼻病毒、冠状病毒、腺病毒、流感和副流感病毒、呼吸道合胞病毒、埃可病毒、柯萨奇病毒等。已有研究表明菌毒清颗粒方中南板蓝根、穿心莲、金银花等均具有明显的抗病毒作用^[6-9],因此推测菌毒清颗粒可能也具有抗病毒作用。本项研究结果表明,菌毒清颗粒在体外对RSV和CoxB3具有明显的抑制作用。同时应用金银花中主要的有效成分绿原酸作为对照,绿原酸已被研究证明具有广泛的抗病毒作用^[10],通过比较发现菌毒清的抗RSV及CoxB3的TI(8.14)均明显大于绿原酸TI(3.94/1.97)。这表明菌毒清颗粒的抗病毒作用明显强于绿原酸,同时也表明中药复方的作用并不是某种单一成分所能完全替代的,复方中仍然存在其他成分发挥作用,这也为进一步的药效物质基础研究提供了方向。结合前期研究,笔者认为菌毒清颗粒不但具有明显抗炎镇痛、解热的作用,同时还有明显的抗病毒作用,符合中药复方的特点,而更深入的作用机制亦有待进一步研究。

(致谢:相关实验在中国中医研究院中药研究所进行,对该所给予的大力支持表示衷心感谢!)

参考文献

- [1] 李运景,彭侠彪,赵伟国.菌毒清颗粒镇痛、抗炎作用研究[J].中国药师,2011,14(9):1 278.
- [2] 赵伟国,李运景,彭侠彪.菌毒清颗粒的解热作用研究[J].中医药信息,2012,29(3):36.
- [3] 彭侠彪,赵伟国,李运景.菌毒清颗粒的急性毒性研究[J].中国现代药物应用,2011,5(13):24.
- [4] 赵伟国,李运景,余元龙,等.菌毒清颗粒治疗风热感冒的临床疗效观察[J].中国现代药物应用,2012,6(21):11.
- [5] 雷湘,陈科力,陈刚,等.大黄素配伍中药活性成分体外抗柯萨奇B3病毒试验[J].中国药房,2009,20(3):173.
- [6] 罗霄山,杜铁良,张丹雁,等.不同产地南板蓝根抗病毒作用的研究[J].中医导报,2011,17(9):66.
- [7] 秦华珍,时博,李世阳,等.南板蓝根和北板蓝根抗甲型流感病毒作用的比较研究[J].中华中医药学刊,2009,27(1):168.
- [8] 邢世华,李晓波.清热解暑类中药抗病毒活性及作用机制研究进展[J].中国药理学通报,2014,30(4):464.
- [9] 季志平,朱莹莹,倪文澎,等.金银花提取物抗病毒的作用研究[J].中国医药导报,2009,11(1):92.
- [10] 胡克杰,王跃红,王栋.金银花中绿原酸在体外抗病毒作用的实验研究[J].中医药信息,2010,27(3):27.

(收稿日期:2015-03-03 修回日期:2015-05-23)

(编辑:张 静)