

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2020.04.006

• 实验研究 •

加味神术散雾化剂抗流感病毒的实验研究^{*}

李继庭^{1△} 梁虹宇¹ 苏立芬²

¹广东省第二中医院, 广州 510095

²广州市白云区人民医院, 广州 510500

摘要 目的 探讨加味神术散雾化剂在体外对甲型 H1N1 流感病毒增殖的影响。**方法** 以甲型 H1N1 流感病毒感染狗肾传代细胞(MDCK cell)为载体, 观察加味神术散雾化剂不同药物浓度对流感病毒引起的细胞病变(CPE)的影响。采用 Reed-Muench 法计算流感病毒对 MDCK 细胞的半数细胞感染量(TCID₅₀)。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)测定光密度(OD)值, 计算不同药物对 MDCK 细胞的破坏率, 通过 Probit 回归计算不同药物对 MDCK 细胞的最大无毒浓度(TC₀)及半数中毒浓度(TC₅₀)。计算不同药物对流感病毒增殖的抑制率, 通过 Probit 回归计算半数抑制浓度(IC₅₀)和治疗指数(TI)。**结果** 甲型 H1N1 流感病毒对 MDCK 细胞的 TCID₅₀ 为 10⁻⁸/0.1 mL。加味神术散雾化剂对 MDCK 细胞的 TC₅₀ 为 366.63 μg/mL, TC₀ 为 31.25 μg/mL; 利巴韦林对 MDCK 细胞的 TC₅₀ 为 109.85 μg/mL, TC₀ 为 8.02 μg/mL。加味神术散雾化剂对流感病毒直接抑制作用的 IC₅₀ = 9.79 μg/mL, TI = 37.45; 对预防流感病毒感染的 IC₅₀ = 8.72 μg/mL, TI = 41.04; 对治疗流感病毒感染的 IC₅₀ = 17.40 μg/mL, TI = 21.07。利巴韦林对预防流感病毒感染的 IC₅₀ = 84.30 μg/mL, TI = 1.30。**结论** 加味神术散雾化剂可明显抑制甲型 H1N1 流感病毒在 MDCK 细胞中的增殖, 具有抗甲型 H1N1 流感病毒作用。

关键词 加味神术散雾化剂; H1N1 流感病毒; 狗肾传代细胞

中图分类号 R285.8 **文献标识码** A

Experimental Study on Anti Influenza Virus of Jiawei Shenzhu Powder Atomizer

LI Jiting¹, LIANG Hongyu¹, SU Lifan²

¹Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 510095, China

²People's Hospital of Baiyun District, Guangzhou 510500, China

Abstract Objective To investigate the effect of Jiawei Shenzhu powder atomizer on the proliferation of H1N1 influenza virus in vitro. **Methods** H1N1 influenza virus infected Madin-Darby canine kidney(MDCK) cells were used as carriers. The effect of different concentrations of Jiawei Shenzhu powder atomizer on influenza virus-induced cytopathic changes(CPE) was observed. The Reed-Muench method was used to calculate the 50% tissue culture infectious dose of the MDCK cells(TCID₅₀). The light density(OD) was measured by MTT, and the destruction rate of MDCK cells by different drugs was calculated. The maximum nontoxic concentration(TC₀) and half toxic concentration(TC₅₀) of different drugs was calculated by Probit regression. The inhibition rate of different drugs on influenza virus proliferation was calculated, and the half inhibitory concentration(IC₅₀) and treatment index(TI) were calculated by Probit regression. **Results** The TCID₅₀ of H1N1 influenza virus on MDCK cells was 10⁻⁸/0.1 mL. The TC₅₀ of Jiawei Shenzhu powder atomizer on MDCK cells was 366.63 μg/mL, TC₀ was 31.25 μg/mL. The TC₅₀ of ribavirin on MDCK cells was 109.85 μg/mL, TC₀ was 8.02 μg/mL. The direct inhibitory effect of

^{*} 广东省中医药局基金项目(No. 20182002)

[△] 通信作者, Corresponding author, E-mail: ztting2@163.com

Jiawei Shenzhu powder atomizer on influenza virus, $IC_{50}=9.79 \mu\text{g/mL}$, $TI=37.45$. The preventive effect of Jiawei Shenzhu powder atomizer on influenza virus, $IC_{50}=8.72 \mu\text{g/mL}$, $TI=41.04$. The therapeutic effect of Jiawei Shenzhu powder atomizer on influenza virus, $IC_{50}=17.40 \mu\text{g/mL}$, $TI=21.07$. The preventive effect of ribavirin on influenza virus, $IC_{50}=84.30 \mu\text{g/mL}$, $TI=1.30$. **Conclusion** The Jiawei Shenzhu powder atomizer could significantly inhibit the proliferation of H1N1 influenza virus in MDCK cells, has anti H1N1 influenza virus effect.

Key words Jiawei Shenzhu powder atomizer; H1N1 influenza virus; Madin-Darby canine kidney cell

流行性感冒简称流感,是由流感病毒导致的急性呼吸道疾病,具有传染性高、传播速度快、易流行等特点,严重危害人类健康^[1]。疫苗保护作用是目前流感预防的重要举措之一,然而由于病毒的变异速度较快,且疫苗不能对所有人群完成有效免疫,疫苗的有效利用率达不到预期效果。神术散来源于《医方类聚》,主治伤寒伤风,症见头疼身痛、发热恶寒无汗,功能祛风解表止痛^[2]。本研究采用加味神术散雾化剂进行体外抗流感病毒实验,旨在寻找有效且毒副作用小的抗流感病毒药物,为流感的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物

实验组药物为自制加味神术散雾化剂,基本药物组成及剂量为苍术 20 g,羌活、白芷、金银花、野菊花、藿香各 10 g,甘草 5 g,冰片 0.3 g,由上述药物制成的水提剂,取 15 剂水煮蒸馏,经浓缩后得到黄色精油,通过乙醚将油反复溶出,加入无水 Na_2SO_4 脱水干燥,药物浓度为 1 g/mL。对照组药物为利巴韦林注射液(宜昌人福药业有限责任公司,国药准字 H20033945)。

1.2 试剂和仪器

3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(上海江莱生物科技有限公司)5 mg/mL,避光-20℃保存备用;小牛血清培养液(维森特生物技术有限公司); CO_2 培养箱(上海博讯,BC-J160S);倒置荧光电子显微镜(Leica,DMI3000B);酶标仪(Thermo, MULTISKAN MK3);超净工作台(上海博讯,SW-CJ-2FD)。

1.3 病毒株

甲型 H1N1 流感病毒及狗肾传代细胞(MDCK cell)由中国疾病预防控制中心国家流感中心提供,使用前在 9 日龄鸡胚尿囊腔接种传代,每胚接种 0.2 mL,经过 37℃ 恒温培养 72 h 后收集尿囊液,3000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液进行血凝实验,取尿囊液测定病毒血凝滴度为 1:512 且细菌培养阴性的病毒液进行分装,置-80℃冰箱保存备用。

1.4 实验方法

1.4.1 MDCK 细胞的培养 液氮内取出 MDCK 细胞,37℃ 条件下水浴,离心后弃细胞上清液,加入 10% 小牛血清培养液 9 mL,分布均匀后加入细胞培养瓶,37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。将长满单层的 MDCK 细胞以 PBS 液洗,加入 2.5 mL 0.5% 胰酶与 EDTA;当细胞收缩变圆到将要脱落时,加入 1 mL 含血清的细胞培养液,吹落细胞,以离心管收集消化终止液,1500 r/min 离心 5 min;弃上清液,加入含血清的细胞培养液,重新悬浮细胞后分装,于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后备用。

1.4.2 流感病毒液的制备 将鸡胚气室朝上放置于蛋盘,用 75% 酒精消毒气室端,钻孔,吸取病毒液注射到鸡胚尿囊腔。37℃ 培养鸡胚,在收获尿囊液前应放置 4℃ 过夜。吸取鸡胚尿囊液,于 3000 r/min 条件下离心 5 min 收集上清液,-80℃ 冰箱保存。

1.4.3 流感病毒收集液血凝滴度的测定 血凝板待测孔内每孔加入 0.05 mL 生理盐水,吸取等体积含病毒的鸡胚尿囊液于第 1 孔,混匀后依次对倍稀释。依次从左至右每孔加入 1% 鸡红细胞悬液 0.05 mL。将血凝板置于振荡器上振荡,37℃ 恒温培养箱中放置 10 min,出现完全凝集孔内病毒的最高稀释度,即为血凝滴度(HA)。

1.4.4 流感病毒对 MDCK 细胞毒力的测定 MDCK 细胞贴壁长成完整的单层后,弃上清液,PBS 洗细胞 3 次。取病毒生长液按 10 倍梯度稀释为 $10^{-1} \sim 10^{-10}$,以 100 μL /孔将不同浓度的病毒液加入 MDCK 细胞中,每个稀释度平行做 3 个复孔。同时设置正常细胞作为对照组,孔内不加病毒,只添加细胞培养液。置于 37℃、5% CO_2 培养箱中流感病毒吸附 MDCK 细胞 1 h 后取出,弃上清液,PBS 洗涤 3 次,病毒组每孔加病毒生长液 150 μL ,正常细胞对照组加 150 μL 细胞培养液,置于 37℃、5% 的 CO_2 培养箱中继续培养。细胞病变(CPE)分级的判定方法:0% CPE 为“-”,1%~25% CPE 为“+”,25%~50% CPE 为“++”,50%~75% CPE 为“+++”,75%~100% CPE 为“++++”;当最高浓度病毒液孔内 MDCK 细胞

CPE 达到+++~++++时,取各孔上清液作血凝试验,采用 Reed-Muench 法计算流感病毒对 MDCK 细胞的半数细胞感染量(TCID₅₀)。

1.4.5 药物对 MDCK 细胞毒性的测定 依照 MTT 法检测药物对 MDCK 细胞的毒性。MDCK 细胞长成完整的单层后,弃上清液,PBS 洗 3 次,更换含不同浓度的含药细胞培养液,150 μL/孔。以 1000 μg/mL 加味神术散雾化剂作为最大浓度药物组,用培养液按 2 倍梯度稀释药物,测定药物对 MDCK 细胞的毒性范围。每个药物浓度平行做 3 复孔,同时设置正常细胞对照组(不加病毒,只加 150 μL 细胞培养液),37 ℃、5%CO₂培养箱中培养,观察 CPE。当高浓度药物组细胞 CPE 达到+++~++++时,采用 MTT 法在 482 nm 处测定光密度(OD)值,计算细胞破坏率;通过 Probit 回归计算药物半数中毒浓度(TC₅₀)与药物最大无毒浓度(TC₀)。

1.4.6 药物对流感病毒增殖抑制作用的测定 MDCK 细胞长成完整的单层后,弃上清液,PBS 洗 3 次,按照 100 μL/孔加入 10 倍 TCID₅₀ 流感病毒液,置于 37 ℃、5%的 CO₂培养箱中吸附 1 h,弃上清液,PBS 洗 3 次,设置正常细胞对照组、病毒对照组及利巴韦林阳性对照组,每个药物浓度平行做 3 复孔。选择 TC₀作为最高浓度,将病毒生长液作 2 倍稀释,然后按照 150 μL/孔加入药物孔中。正常细胞对照组内不加病毒,只加细胞培养液;病毒对照组加病毒生长液;利巴韦

林阳性对照组先加入不同浓度的利巴韦林,清洗后加入病毒生长液。根据病毒复制周期,设计 3 种不同加药方式观察加味神术散雾化剂的抗病毒效果:直接抑制组同时加入病毒生长液与不同浓度的加味神术散雾化剂;治疗组先加入病毒生长液,清洗后加入不同浓度的加味神术散雾化剂;预防组先加入不同浓度的加味神术散雾化剂,清洗后加入病毒生长液。37 ℃、5%CO₂培养箱中培养,观察 CPE。当高浓度药物组细胞达到+++~++++时,采用 MTT 法在 482 nm 处测定 OD 值,计算病毒增殖抑制率,通过 Probit 回归计算半数抑制浓度(IC₅₀)和治疗指数(TI),TI = TC₅₀/IC₅₀。

2 结果

2.1 病毒毒力测定

由血凝实验结果可见,流感病毒稀释到 10⁻⁸时,开始出现血凝阴性;稀释至 10⁻¹⁰时,未见血凝发生。根据 Reed-Muench 法计算甲型 H1N1 流感病毒对 MDCK 细胞的 TCID₅₀为 10⁻⁸/0.1 mL。见表 1。

2.2 药物毒性测定

通过 Probit 回归法计算加味神术散雾化剂对 MDCK 细胞的 TC₅₀为 366.63 μg/mL,TC₀为 31.25 μg/mL;利巴韦林对 MDCK 细胞的 TC₅₀为 109.85 μg/mL,TC₀为 8.02 μg/mL。见表 2。

表 1 流感病毒对 MDCK 细胞的毒力

病毒稀释度	出现血凝孔数	无血凝孔数	累计血凝孔数	累计无血凝孔数	发生血凝孔所占比例(%)
10 ⁻¹³	0	6	0	30	0
10 ⁻¹²	0	6	0	24	0
10 ⁻¹¹	0	6	0	18	0
10 ⁻¹⁰	0	6	0	12	0
10 ⁻⁹	1	5	1	6	14.3
10 ⁻⁸	5	1	6	1	85.7
10 ⁻⁷	6	0	12	0	100
10 ⁻⁶	6	0	18	0	100
10 ⁻⁵	6	0	24	0	100
10 ⁻⁴	6	0	30	0	100
10 ⁻³	6	0	36	0	100
10 ⁻²	6	0	42	0	100
10 ⁻¹	6	0	48	0	100

表 2 药物对 MDCK 细胞的毒性($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	细胞破坏率(%)
正常细胞对照组	-	0.66 ± 0.03	-
加味神术散雾化剂组	1000	0.13 ± 0.01	80.303 030 30
	500	0.22 ± 0.02	66.666 666 67
	250	0.38 ± 0.01	42.424 242 42
	125	0.41 ± 0.01	37.878 787 88
	62.50	0.59 ± 0.01	10.606 060 61
	31.25	0.63 ± 0.02	4.545 454 55
	15.625	0.64 ± 0.01	3.030 303 03
	7.8125	0.65 ± 0.01	1.515 151 52
利巴韦林组	2000	0.35 ± 0.01	46.969 696 97
	500	0.38 ± 0.01	42.424 242 42
	125	0.39 ± 0.01	40.909 090 91
	31.25	0.47 ± 0.01	28.787 878 79
	7.8125	0.57 ± 0.01	13.636 363 64

表 3 药物对流感病毒增殖的抑制作用($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	病毒增殖抑制率(%)	TI
正常细胞对照组	-	0.67 ± 0.05	-	
病毒对照组	-	0.07 ± 0.03	-	
利巴韦林组	2000	0.51 ± 0.01	80.500 000 00	
	500	0.43 ± 0.01	67.166 66 667	
	125	0.38 ± 0.01	58.833 333 33	
	31.25	0.35 ± 0.01	53.833 333 33	1.30
加味神术散雾化剂直接抑制组	30	0.53 ± 0.01	83.833 333 33	
	15	0.43 ± 0.01	67.166 666 67	
	7.5	0.32 ± 0.01	48.833 333 33	
	3.75	0.27 ± 0.01	40.500 000 00	37.45
加味神术散雾化剂预防组	30	0.57 ± 0.02	90.500 000 00	
	15	0.52 ± 0.00	82.166 666 67	
	7.5	0.33 ± 0.01	50.500 000 00	
	3.75	0.28 ± 0.02	42.166 666 67	42.04
加味神术散雾化剂治疗组	30	0.41 ± 0.01	63.833 333 33	
	15	0.36 ± 0.01	55.500 000 00	
	7.5	0.33 ± 0.01	50.500 000 00	
	3.75	0.28 ± 0.01	42.166 666 67	21.07

2.3 药物对流感病毒增殖的抑制作用

通过 Probit 回归法计算加味神术散雾化剂直接抑制流感病毒的 $\text{IC}_{50}=9.79 \mu\text{g/mL}$, $\text{TI}=37.45$; 预防流感病毒感染的 $\text{IC}_{50}=8.72 \mu\text{g/mL}$, $\text{TI}=42.04$; 治疗流感病毒感染的 $\text{IC}_{50}=17.40 \mu\text{g/mL}$, $\text{TI}=21.07$ 。利巴韦林预防流感病毒感染的 $\text{IC}_{50}=84.30 \mu\text{g/mL}$, $\text{TI}=1.30$ 。见表 3。

3 讨论

流行性感冒临床表现为发热、咽痛、肌痛、咳嗽等呼吸道症状, 以及腹泻、腹痛、恶心等消化道症状, 少数患者甚至出现多脏器功能障碍综合征、急性呼吸窘迫综合征等, 病死率较高, 可发生于任何年龄段, 患病不存在性别差异, 目前以 12 岁以下儿童发病率较

高^[3]。目前治疗流感的常见化学药物包括 4 种类型: M2 离子通道抑制剂例如金刚烷胺,可作用于流感病毒膜蛋白以及血凝素蛋白,有效阻止病毒进入宿主细胞;神经氨酸酶抑制剂例如奥司他韦,可抑制神经氨酸酶活性,阻止病毒颗粒的释放,切断病毒的扩散链;抑制流感病毒核酸合成药物例如利巴韦林,可损害病毒 RNA 和蛋白合成,从而抑制病毒的复制与传播;以及非特异性抗病毒药物例如干扰素,可广谱抑制病毒的繁殖,通过诱导细胞合成抗病毒蛋白体而发挥作用^[4]。以上化学治疗药物虽具有一定的抗病毒作用,但可能导致较为严重的不良反应。

我国很早就开始研究中药抗流感作用,加味神术散主要由苍术、白芷、川穹、藁本、羌活、细辛、炙甘草 7 味药物组成,其中苍术燥湿健脾、祛风散寒,白芷解表散寒、祛风止痛,川芎活血行气、祛风止痛,藁本祛风散寒、除湿止痛;羌活解表散寒、祛风胜湿止痛,细辛祛风通窍、散寒止痛,炙甘草调和诸药;诸药合用,共奏解表散寒、祛风除湿之效。本课题组前期研究^[5]发现,加味神术散雾化剂可下调甲型流感病毒鼠肺适应柱 FM1 感染小鼠 NLRP3 炎症小体及其下游因子 IL-1 β 、IL-18 的分泌水平,可能对其产生免疫保护机制。本研究通过体外细胞实验探讨加味神术散雾化剂抗流感病毒的效果,由于利巴韦林对流感病毒甲型、乙型均有较为明确的抑制作用,因此本研究选用其作为阳性对照药物。

TCID₅₀是指能引起 50% 细胞出现细胞病变效应的待测病毒量,反映病毒致细胞病变的能力,是检测病毒传染性和毒力的指标。根据 Reed-Muench 法计算甲型 H1N1 流感病毒对 MDCK 细胞的 TCID₅₀ 为 10⁻⁸/0.1 mL。加味神术散雾化剂对 MDCK 细胞的毒性作用表现为细胞颗粒较多,增殖缓慢,形态改变,部分细胞破碎脱落。加味神术散雾化剂对 MDCK 细胞的毒性作用随着药物浓度的升高而升高,细胞破坏率随药物浓度的降低而降低。本研究中加味神术散雾化剂对 MDCK 细胞的 TC₅₀ 为 366.63 μ g/mL, TC₀ 为 31.25 μ g/mL;利巴韦林对 MDCK 细胞的 TC₅₀ 为 109.85 μ g/mL, TC₀ 为 8.02 μ g/mL。说明加味神术

散雾化剂对 MDCK 细胞的毒性低于利巴韦林,达到相同细胞破坏率需要更高的药物浓度。

本研究中利巴韦林预防流感病毒感染的 IC₅₀ = 84.30 μ g/mL, TI = 1.30;加味神术散雾化剂直接抑制流感病毒的 IC₅₀ = 9.79 μ g/mL, TI = 37.45;预防流感病毒感染的 IC₅₀ = 8.72 μ g/mL, TI = 42.04;治疗流感病毒感染的 IC₅₀ = 17.40 μ g/mL, TI = 21.07。TI = TC₅₀/IC₅₀,是反映药物对病毒抑制作用的评价指标。研究结果显示,加味神术散雾化剂预防组 TI 达到 42.04,明显高于利巴韦林组的 1.30;表明加味神术散雾化剂预防流感病毒感染的作用确切。采用不同加药方式给予 MDCK 细胞加味神术散雾化剂处理,其抗流感病毒效率存在差异,在相同药物浓度下,预防组的病毒破坏率显著高于直接抑制组和治疗组;这可能是由于加味神术散雾化剂阻断病毒侵入细胞的作用较强。在药物最大无毒浓度下,加味神术散雾化剂表现出对流感病毒细胞内增殖有明显的抑制作用,且病毒增殖抑制率随着药物浓度的增加而增加;提示加味神术散雾化剂与利巴韦林一样,其抗流感病毒作用效果随着药物剂量的增加而增强。

综上所述,加味神术散雾化剂可明显抑制甲型 H1N1 流感病毒在 MDCK 细胞中的增殖,具有抗甲型 H1N1 流感病毒作用。

参 考 文 献

- [1] 葛均波,徐永健,王辰.内科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018:16-17.
- [2] 浙江省中医研究所,湖州中医院.医方类聚 校点本 第3分册[M].北京:人民卫生出版社,1981:451.
- [3] 刘心悦,蒋荣猛.儿童流行性感胃抗病毒药物研究进展[J].中华儿科杂志,2019,57(4):313-316.
- [4] 李娜,施天昀,何燕超,等.流感的药物治疗新进展[J].国际呼吸杂志,2019(19):1512-1516.
- [5] 李继庭,梁虹宇,苏立芬.加味神术散雾化对 FM1 感染小鼠 NLRP3 炎症小体及下游炎症因子表达的影响[J].实用中医药杂志,2019,35(10):1180-1182.

(收稿日期:2020-06-03)