

## • 实验研究 •

## 防感合剂抗病毒及诱生干扰素的作用观察

南京中医学院(南京 210005) 马 融\* 王建陵 吴 彻 仇裕丰\*

**内容提要** 本文采用空斑法、微量细胞病变抑制法、以及对小鼠进行鼻腔攻击的方法,观察了防感合剂的抗病毒及诱生干扰素作用。结果表明,防感合剂可直接灭活呼吸道合胞病毒(RSV)和对 RSV 感染后有保护作用,并可降低小鼠在副流感病毒攻击下的死亡率。此外,防感合剂还有对新城鸡瘟病毒(NDV)诱生干扰素的协同增强作用。在小鼠腹腔注射防感合剂后的 8、16、24、32h,用微量细胞病变抑制法(CPE)在 L929 细胞上测定干扰素效价,其中 24h 数值最高为 98.23u/ml。所诱生的干扰素符合 I 型干扰素性质。

**关键词** 防感合剂 病毒 干扰素

防感合剂是我院儿科江育仁教授的经验方,其对防治呼吸道复感儿有较好的疗效。笔者根据 1987 年全国小儿呼吸道疾病学术会议制定的诊断标准<sup>(1)</sup>,对 33 例复感儿进行了 3 个月的系统观察,总有效率为 97%,明显高于左旋咪唑(30 例)的疗效( $P < 0.05$ )。为探讨其作用机理,我们进行了防感合剂抗病毒及诱生干扰素的实验研究,报告如下。

## 材料与方 法

## 一、材料

1. 实验动物:ICR 纯种小白鼠,由江苏省实验动物中心提供。

2. 防感合剂的组成及制备:本方由黄芪、桂枝、防风等组成,由本院药剂科制备。

3. 病毒:(1)呼吸道合胞病毒(RSV) TCID<sub>50</sub> 为  $10^{-3}$ ,由南京市儿童医院病毒室惠赠。(2)鼠副流感病毒 LD<sub>50</sub> 为  $10^{-2.75}$ ,由本院中医基础教研室分赠。(3)诱生病毒为新城鸡瘟病毒(NDV—F 系),效价  $\geq 1280$  血凝单位/ml。(4)攻击病毒为滤泡性口腔炎病毒(VSV—Indiana 株),TCID<sub>50</sub> 为  $10^{-6}$ 。后两种病毒均由南京医学院微生物教研室提供。按常规方法传代、增殖。

4. 检测细胞:(1)人喉癌细胞(Hep-2)由南京市儿童医院病毒室惠赠。(2)小鼠成纤维细胞(L929),由解放军第二军医大学微生物教研室提供。

5. 小鼠成纤维细胞干扰素标准参考制剂:由中国军事医学科学院微生物流行病研究所提供,效价 12000IU/ml。

6. 培养液: Eagle's MEM; 每 100ml 生长液中含 10ml 小牛血清,每 100ml 维持液中含 2ml 小牛血清和 2M 的 HEPES。

## 二、方法

1. 小鼠血清干扰素测定方法:采用微量细胞病变抑制法(CPE)<sup>(2)</sup>。

2. 在 Hep-2 细胞上测定拮抗 RSV 方法:采用空斑检测法,参照 Langford 介绍的方法<sup>(3)</sup>。

3. 测定 Hep-2 细胞可耐受防感合剂的最大浓度,并将此浓度作为对 Hep-2 细胞的无毒剂量,结果(见图 1)提示 5% 浓度的防感合剂为 Hep-2 细胞的无毒剂量。

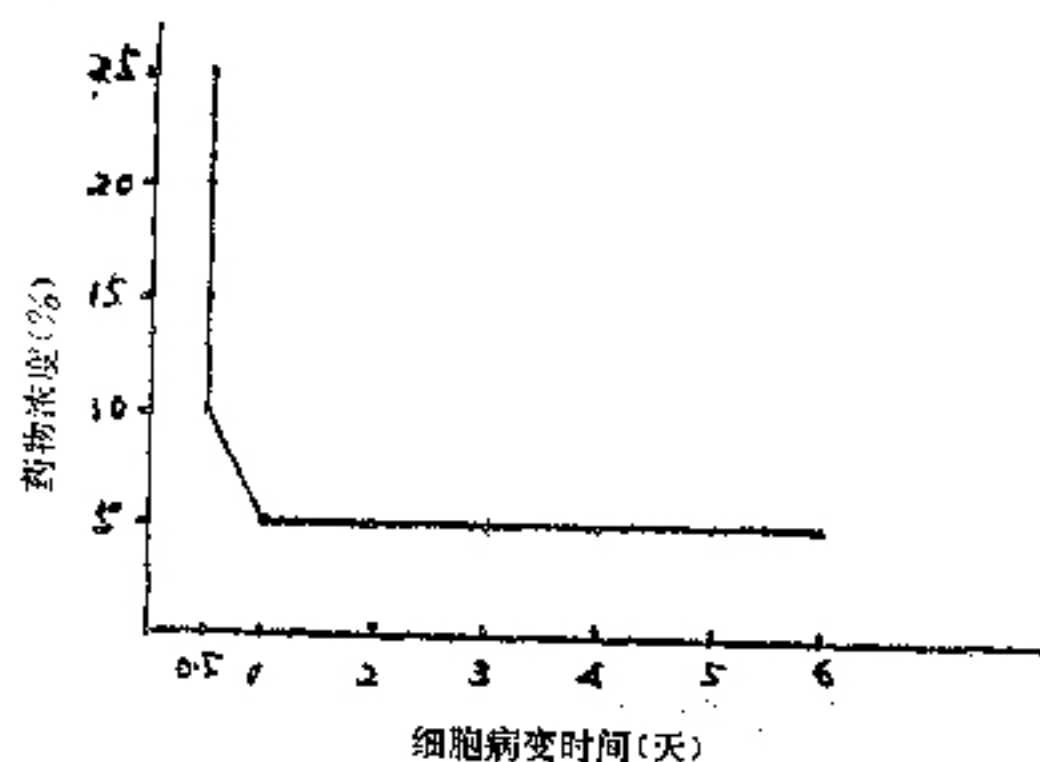


图 1 防感合剂的无毒限量

4. 直接灭活 RSV 的方法:用维持液将防感合剂稀释成 10%、5%、2.5%、1.25% 四个不同浓度,各取 1ml 与等体积 100TCID<sub>50</sub> RSV 混合,37°C 作用 1h,滴于 16 孔板 Hep-2 单层细胞上,以维持液与 100TCID<sub>50</sub> RSV 混合,37°C 作用 1h 作为对照。24h 后统计各孔形成的空斑数目。

\* 博士研究生

5. 对RSV感染后的治疗方法: 先将100TCID<sub>50</sub> RSV滴于24孔板Hep-2单层细胞上, 每孔0.1ml, 置于CO<sub>2</sub>孵箱中1h(其中每15min摇动1次), 取出后用吸管小心吸出RSV液, 分别加入2.5%、1.25%、0.625%、0.318%不同浓度的防感合剂1ml, 对照孔只加等量维持液, 再次放置CO<sub>2</sub>孵箱中, 19h后观察细胞上形成的空斑数目。

6. 对小鼠感染鼠副流感病毒的保护方法: 取ICR纯种小白鼠40只, 体重18~22g, 雄雌各半, 随机分为两组, 每组20只。实验组每日灌服防感合剂1次, 每次0.4ml/只, 连续5天。对照组以蒸馏水代替防感合剂。第5天灌药10h后, 在乙醚轻度麻醉下用20LD<sub>50</sub>的鼠副流感病毒鼻腔攻击。在攻击当天和随后5天继续服用防感合剂, 剂量同前。然后每12h观察1次小鼠的死亡情况, 共观察2周。

7. 对NDV诱生小白鼠干扰素的促进作用: 取18~22g ICR纯种小白鼠12只, 雄雌不拘, 随机分为两组, 每组6只。实验组以防感合剂灌胃, 每日1次, 每次0.4ml/只, 对照组以蒸馏水代药, 连续6天。第6天每鼠腹腔注射1280HAU/ml NDV 0.5ml, 6h放血致死, 分离血清, 4倍稀释, 用CPE法在VSV-L929细胞系统上检测干扰素效价, 并与标准小鼠成纤维细胞干扰素校正。

8. 在小鼠体内诱生干扰素的方法: 取18~22g ICR纯种小白鼠48只, 随机分为两组, 每组24只。实验组腹腔注射防感合剂0.6ml/只, 对照组腹腔注射等体积生理盐水。然后每组6只分别于8、16、24、32h放血致死, 分离血清, 并用细胞维持液将其作双倍稀释, CPE法检测干扰素效价。

9. 对所诱生干扰素的定性实验方法: 将腹腔注射防感合剂24h的小鼠血清, 用1N HCl将pH调至2.0, 1h后再用10%Na调至7.0; 或用56°C水浴处理1h, 对照组不作任何处理, 用上述方法测定干扰素效价。

## 结 果

### 一、防感合剂在细胞培养内对RSV的拮抗作用

1. 直接灭活RSV作用: 防感合剂具有明显的直接灭活RSV作用。其效果随药物浓度的增大而加强(见表1)。

2. 对RSV感染后的治疗作用: 防感合剂可治疗RSV感染, 其效果与其浓度呈正比(见表2)。

二、防感合剂对小鼠感染鼠副流感病毒的保护作用: 防感合剂可显著延长鼠副流感病毒攻击后的小鼠存活时间, 降低死亡率(见表3)。

表1 防感合剂对RSV的直接灭活作用

|     | 防感合剂浓度(%) |     |      |       | RSV<br>对照 | 细胞<br>对照 |
|-----|-----------|-----|------|-------|-----------|----------|
|     | 5         | 2.5 | 1.25 | 0.625 |           |          |
| 空斑数 | 30*       | 46* | 55   | 51    | 77        | 0        |

注: 与RSV对照组相比, \* $P < 0.05$

表2 防感合剂对RSV感染后的治疗作用

|     | 防感合剂浓度(%) |       |       |       | RSV<br>对照 | 细胞<br>对照 |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-----------|----------|
|     | 2.5       | 1.25  | 0.625 | 0.318 |           |          |
| 空斑数 | 60.5*     | 61.5* | 63    | 77    | 91        | 0        |

注: 与RSV对照组比, \* $P < 0.05$

表3 防感合剂对小鼠感染鼠副流感病毒的保护作用

| 组别 | 只数 | 死亡数 | 死亡率(%) | 平均存活时间(天) |
|----|----|-----|--------|-----------|
| 实验 | 20 | 8   | 40     | 11.5      |
| 对照 | 20 | 16* | 80     | 8.2**     |

\*  $P < 0.01$  \*\*  $P < 0.001$

三、防感合剂对NDV诱生小白鼠干扰素的促进作用: 防感合剂具有对NDV诱生干扰素的协同增强作用(见表4)。

表4 防感合剂对NDV诱生小白鼠干扰素的协同增强作用(log<sub>4</sub>u/ml)

| 组别   | 动物数 | 干扰素效价( $\bar{x} \pm S$ ) | P      |
|------|-----|--------------------------|--------|
| 防感合剂 | 6   | 8.015 $\pm$ 0.257        |        |
| 对 照  | 6   | 6.950 $\pm$ 0.495        | <0.001 |

四、防感合剂在小鼠体内诱生干扰素的作用: 实验组腹腔注射防感合剂8h, 血清干扰素效价为65.2u/ml; 16h 36u/ml; 24h达最高峰98.23u/ml; 32h基本测不出。对照组各时相均为5u/ml左右(见图2)。

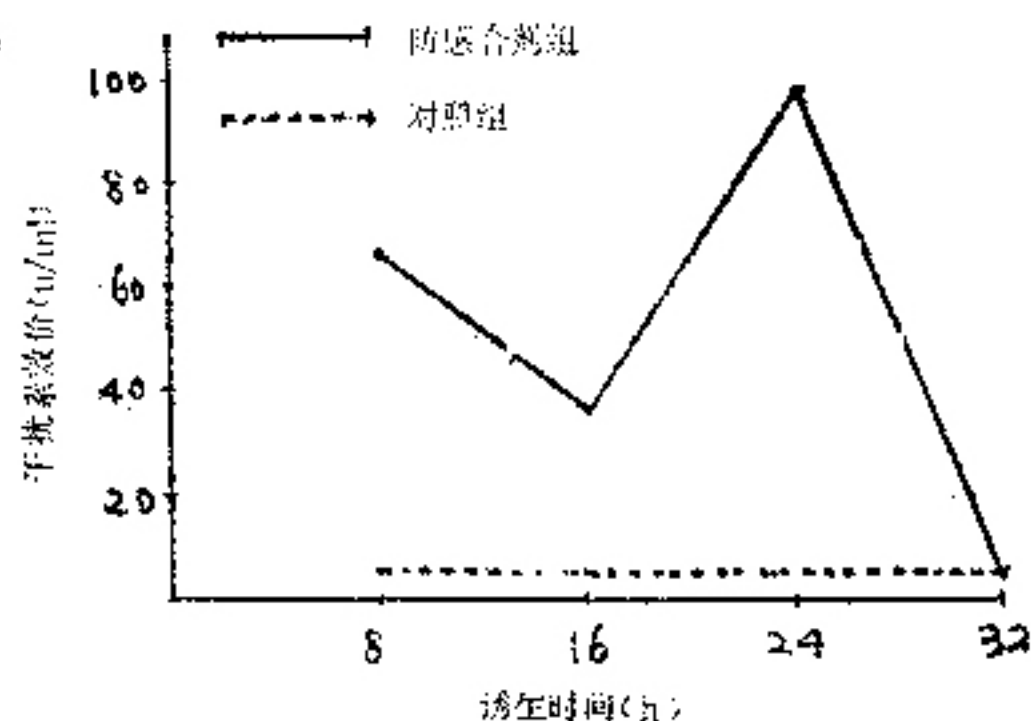


图2 防感合剂诱生干扰素时相曲线

五、干扰素定性实验：防感合剂诱生的干扰素对pH2.0不敏感，但在56°C水浴作用1h后，其效价从86.5u/ml降至38.1u/ml，提示其为I型干扰素。

## 讨 论

小儿的呼吸道感染90%以上是由病毒所引起<sup>(4)</sup>，而在众多的引起小儿呼吸道感染的病毒中，又以呼吸道合胞病毒(RSV)最为常见<sup>(5)</sup>。故此，笔者在实验中观察了防感合剂对RSV的拮抗作用。结果表明，防感合剂在体外与RSV的作用1h，可使RSV在Hep-2细胞上形成的空斑数目减少50%左右。若在RSV感染Hep-2细胞1h后，再加防感合剂，亦获得了大体相同的结果。因此认为，防感合剂可能是通过直接灭活和抑制RSV在细胞内繁殖而起到抗病毒作用。防感合剂的抗RSV作用与药物浓度呈正比，在细胞可耐受的最大剂量时，达到高峰。故而提示我们在临床使用防感合剂时，要注意剂量的充足。

小鼠在鼠副流感病毒鼻腔攻击的前后各5天，给予防感合剂灌胃，可降低小鼠死亡率，明显延长生存时间( $P < 0.001$ )。由此可见，防感合剂具有防治病毒感染的作用，与临床观察结果颇为一致。

防感合剂的抗病毒作用，是通过诱生干扰素来实现的。在喂药6天后，用1280HAU/ml NDV攻击，可促使小鼠产生高价干扰素。因此说明，防感合剂具有明显的协同增强NDV诱生干扰素作用，为在临床上防治病毒性呼吸道感染提供了实验依据。

此外，防感合剂还可在小鼠体内诱生干扰素。从不同时相诱生的干扰素中可以看到，用药24h所诱生干扰素的效价最高。其诱生的干扰素对pH2.0不敏感，但在56°C水浴作用1小时后，其效价可降低50%以上，符合I型干扰素性质。故此，可以认为防感合剂是一种干扰素诱生剂。

## 参 考 文 献

1. 张梓荆, 等. 全国小儿呼吸道疾病学术会议纪要. 中华儿科杂志 1988; 1:40.
2. 侯云德. 干扰素及其临床应用. 第1版. 南京: 江苏科学技术出版社, 1981:190.
3. Langford MP, et al. Method in enzymology. V 78, 1981:Part A:339.
4. 诸福棠, 等. 实用儿科学. 下册. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 1985:31.
5. 陆钟灵译. 病毒性呼吸系病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1981:15.

## · 书 讯 ·

### 《中医药临床科研指南》出版

该书系由成都军区后勤部卫生部组织军内外有关专家、学者编著。全书近四十万字，详细论述了中医药临床科研的内容、特点；中医药临床科研的选题、设计、方案实施、论文撰写等基本程序及其方法。系统介绍了中医药科技文献资料检索、科研统计和“临床医学科研的设计、衡量、评价(DME)”等科研基本知识和方法。同时汇集了国家卫生部、中医药管理局近年颁布的中医药科研的计划课题、成果评定、成果奖励和中药(新药)审批等管理法规，以及中医药临床科研的有关标准、原则。集学术性和科学性、系统性和规范性、实用性和可读性于一书，展现了当代中医药临床科研的风貌。不仅有助于读者对中医药临床科研技能的自我训练和提高，而且能开阔视野、启迪思路，是开展中医药临床科研时极好的工作向导。

该书条理清晰，查找、运用十分方便，是广大中医药、中西医结合临床和科研人员必备的工具书；也对广大中医药、中西医结合的教学、管理工作者和院校学生，以及热心于中医药临床科研的各学科人员，有很大的参考价值。

该书为32开本、软精装，每本估价6.50元(已含邮费)。欲购者，可从邮局直接汇款到：四川省成都市天仙前街134号《西南部队医药》编辑部王勇收(邮政编码610061)。也可从银行汇款。户名：《西南部队医药》编辑部，帐号：89012740，开户银行：成都市工商银行芷泉营业室。汇款时请用工整字迹写明订购人或单位的名称、详细通讯地址及邮政编码、书名、订购数量。

### Circadian Rhythm of Immune Adhesion Activity of RBC in the Aged and the Kidney-Deficiency Patients

Liao Pindong(廖品东), Zhang Farong(张发荣), Luo Yongzen(骆永珍)

*Chengdu College of TCM, Chengdu (610072)*

The authors observed the variation of immune adhesion activity of RBC of the healthy aged and the Kidney-deficiency patients in different phases of day and night. The results showed that the C<sub>3</sub>b receptor rosette formation rate of RBC of the aged were in lower level except You(酉) phase, while that of the patients were the highest at Mao(卯) phase and declined step by step from Mao to Zi(子) phase in a day. The peak and valley values of immune complex rosette of formation rate of RBC of the aged appeared at Mao and Zi phases respectively. But in the Kidney-deficiency patients these rhythms were disappeared. On the basis, the authors discussed the difference and connection between physiological aging and pathological aging.

(Original article on page 217)

### Clinical Observation of Relationship Between Pale Tongue, Purplish Tongue and TXA<sub>2</sub>-PGI<sub>2</sub> Regulation System

Dong Guirong(东贵荣), et al

*The First Affiliated Hospital of Heilongjiang College of TCM, Harbin (150040)*

This paper analysed the relationship between pale tongue, purplish tongue and TXB<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> levels in plasma of 70 cases with coronary heart disease (CHD) and 45 normal subjects. The result showed the following characteristics: The pale tongue group ( $217.76 \pm 30.5$  pg/ml) showed no significant difference in TXB<sub>2</sub> level compared with the normal group ( $164.49 \pm 10.85$  pg/ml,  $P > 0.05$ ), while both showed significant difference compared with the purplish tongue group ( $360.1 \pm 31.3$  pg/ml) and that with purple spots ( $485.07 \pm 106.1$  pg/ml,  $P < 0.01$ ). The pale tongue group ( $179.29 \pm 9.08$  pg/ml) showed a significant difference in 6-keto-PGF<sub>1α</sub> level compared with the normal group ( $244 \pm 19.31$  pg/ml,  $P < 0.01$ ), but it showed no significant difference compared with the purplish tongue group ( $185.08 \pm 17.07$  pg/ml) and that with purple spots ( $229.3 \pm 33.2$  pg/ml,  $P > 0.05$ ). The comparison between the groups of purplish tongue and that with purple spots and the normal group showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). The pale tongue group ( $1.33 \pm 0.18$ ) showed a marked difference in TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF<sub>1α</sub> ratio compared with the normal group ( $0.72 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ), the purplish tongue group ( $2.12 \pm 0.22$ ,  $P < 0.01$ ) and that with purple spots ( $2.25 \pm 0.55$ ,  $P < 0.05$ ). The purplish tongue group and that with purple spots showed significant difference compared with the normal group ( $P < 0.01$ ). Finally, the comparison between the purplish tongue group and that with purple spots in TXB<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF<sub>1α</sub> ratio showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). These characteristics may be used for the diagnosis of tongue and the differentiation of Qi (气) and Blood.

(Original article on page 219)

### Observation of the Antiviral and Interferon-Inducing

Effect of Fang-Gan Mixture(防感合剂)

Ma Rong(马融), et al

*Nanjing College of TCM, Nanjing (210005)*

The present study was carried out by using the plaque formation test, microdosage cytopathic effect (CPE) method, and mice nasal-cavity-attacking method to observe the antiviral and interferon-inducing effect of Fang-Gan mixture (FGM). The results showed that FGM has direct respiratory syncytia virus (RSV) inactivation effect, and protection effect after mice infected by RSV. FGM could also decrease mice death rate ( $P < 0.01$ ) in the experimentation of using parainfluenza virus to attack them, and work in coordination with interferon induced by Newcastle disease virus. After 8, 16, 24, 32 hours of injecting FGM into mice abdominal cavity, the authors used CPE method to determine interferon titer of L<sub>929</sub> cells, and found that the highest interferon titer was 98.23 u/m at the 24th hour. The interferon induced by FGM was in keeping with the nature of Type I interferon. The results suggested that FGM might have strong antiviral effect which is achieved by inducing interferon.