

七味白术散对人轮状病毒在培养 细胞内复制的抑制作用*

贺双腾¹ 何飞舟¹ 伍参荣² 欧正武² 李顺祥¹ 王 珊¹

内容提要 七味白术散在 MA₁₀₄ 细胞单层上对人轮状病毒复制具有抑制作用, 其抑制 50% 病毒空斑数目的浓度为 100 mg/ml, 在该浓度下病毒繁殖指数下降 1.86, 病毒 RNA 合成被抑制约 60%。药物对培养细胞毒性低, 并有促进培养细胞生长和增殖, 延长病毒感染细胞存活时间和促进感染细胞新生作用。

关键词 七味白术散 人轮状病毒 组织培养 抑制病毒复制作用

Effects of Qiwei Baizhu San in Inhibiting Replication of Human Rotavirus in Vitro He Shuang-teng, He Fei-zhou, Wu Can-rong, et al *Hunan Academy of TCM, Changsha (410006)*

Qiwei Baizhu San was found to have an inhibitory effect on human rotavirus (HRV) at monolayer of MA₁₀₄ Cells. A 50% reduction in plaque number, a $10^{1.86}$ TCID₅₀ decrease in viral replication index and an around 60% inhibition in viral RNA synthesis were observed at concentration of 100 mg/ml. Furthermore, the cytotoxicity of the decoction was low, while its promoting effect on growth and proliferation of the culture cells was observed at the concentrations of 12.5~50 mg/ml. The decoction was also found to have effects in prolonging the survival time of HRV infected cells and promoting the regeneration of the infected cells.

Keywords Human Rotavirus, Qiwei Baizhu San, tissue culture, antiviral activity

人轮状病毒(Human Rotavirus, HRV)是秋冬季婴幼儿腹泻的主要病原, 无论在发达国家或发展中国家发病率都较高^(1~3)。我们根据中医学对七味白术散治疗小儿“伤风吐泻身热”的记载和近年来多家运用本方治疗秋季腹泻的众多临床报道, 特用本方在培养细胞上进行了抗 HRV 实验研究, 现报道如下。

材料与方法

1 细胞和病毒 MA₁₀₄细胞(恒河猴胎猴肾细胞传代细胞系)由首都儿科研究所病毒室提供, 用含 5% 胎牛血清的 Eagle MEM(最低基础培养液)培养。HRV Wa 株由中国预防医学科学院病毒研究所提供, 按文献方法在 MA₁₀₄细胞上增殖⁽⁴⁾。

2 药物 七味白术散即钱乙《小儿药证直诀》所载白术散方, 由我院中药研究所制剂室按原方药物与剂量制备, 每毫升药液含生药 1 g(批号: 930109, 940106, 940306)。

3 试剂与仪器 Eagle MEM 培养基干粉为美国 Gibco 产品(批号 920725), [³H]尿核苷购自中国

原子能科学研究院同位素研究所(批号: 931102), 液体闪烁计数器(FJ-207 G 型), 西安二六二厂制造。

4 实验方法

4.1 全量法 HRV 空斑抑制试验 MA₁₀₄细胞接种于小方瓶内(底面积 2.5 cm×4 cm), 培养 48 h, 待细胞长成良好单层, 弃培养液, 加入 200 空斑单位(pfu)的 HRV, 37℃ 吸附 1 h, 用 Hank's 液洗涤细胞单层 3 次, 加入含 2% 胎牛血清和 5 μg/ml 胰蛋白酶及不同浓度七味白术散药液的 Eagle MEM 琼脂培养基(45℃ 水浴中), 冷凝后, 35℃ 培养 4 天, 10% 中性福尔马林液固定, 0.5% 甲基紫染色, 计数空斑数目。

4.2 病毒繁殖量降低测定 首先向培养 48 h 的 MA₁₀₄细胞加入感染倍数为 0.1(0.1 MOD)的病毒, 吸附 1 h, 加入含 2% 胎牛血清和不同浓度的七味白术散药液的维持液, 37℃ 培养 48 h, 将细胞冻融 3 次, 进行病毒滴度测定。

4.3 病毒 RNA 合成抑制试验 将 MA₁₀₄细胞分为两组, 一组感染 HRV, 感染倍数为 2, 一组不感染病毒。在感染组病毒吸附 1 h 后, Hank's 液洗涤细胞 3 次, 两组同时加入含不同浓度七味白术散药

*国家自然科学基金资助项目部分研究内容(No. 39270861)

1. 湖南省中医药研究院(长沙 410006); 2. 湖南中医学院

液和 $1 \mu\text{Ci/ml}$ ($5\text{-}^3\text{H}$) 尿核苷的维持液, 35°C 培养 10 h, 立即冻融并超声匀化细胞, 50% 冷三氯乙酸沉淀, 玻璃纤维滤膜收集, 5% 冷三氯乙酸冲洗, 液体闪烁计数器测量放射性。

4.4 药物对细胞毒性的测定 小方瓶各接种等量 MA_{104} 细胞, 37°C 培养 24 h, 更换含不同浓度七味白术散药液的生长液, 再培养 48 h, 消化吹散细胞, 苔盼蓝染色, 计数细胞总数和死亡细胞数。

结 果

1 对 HRV 空斑数目和病毒繁殖量的抑制效果 药物处理组 HRV 空斑数目随药物浓度升高而减少, 两者呈明显负相关 ($r_s = -1$, $P < 0.05$)。病毒繁殖量同样随药物浓度升高而降低, 如附表所示。当药物浓度为 100 mg/ml 时, 空斑数目被抑制 50% 以上, 病毒繁殖指数 [子代病毒滴度 (TCID_{50}) 的对数] 下降 1.86。

2 对病毒 RNA 合成的抑制作用 HRV 感染组的放射性强度在药物浓度为每毫升 200 mg、100 mg、50 mg、25 mg、0 mg 时分别为 0.98、1.19、1.36、1.51、2.01 ($\times 10^3 \text{ dpm}$), 非感染组培养物的

放射性强度在上述药物浓度时分别为 0.61、0.67、0.66、0.66、0.64 ($\times 10^3 \text{ dpm}$), 可见 HRV 感染组的药物浓度越高, 放射性越低, 非感染组的放射性强度不受药物浓度的影响。显示七味白术散对 HRV 核酸合成具有抑制作用。当药物浓度为 100 mg/ml 时, HRV 核酸合成被抑制约 60%。

3 对 HRV 感染细胞的保护作用 本实验中, HRV 感染 MA_{104} 细胞后 40~48 h 出斑, 细胞病变广泛时, 细胞单层常成片脱落。在琼脂复盖物或培养液中加入七味白术散药液后, 不但空斑数目减少、空斑蚀圈缩小, 且细胞病变与出斑推迟, 细胞单层维持时间延长 2~3 天, 同时, 在病变细胞脱落的空白瓶壁上或松动的病变细胞层下, 又较快形成新的细胞单层。这一现象表明, 七味白术散对 HRV 感染细胞具有保护和促进细胞新生作用。

4 对细胞的毒性作用 如附表所示, 七味白术散对培养细胞毒性较低, 在 200 mg/ml 的高药物浓度中细胞仍能生长。在 12.5 mg/ml 、 25 mg/ml 、 50 mg/ml 药物浓度中, 细胞数量较未加药物的对照组增多。推测七味白术散可能含有某些促进细胞生长的营养成分。

附表 七味白术散抑制 HRV (Wa 株) 空斑数目和繁殖量的效果及对 MA_{104} 细胞增长的影响 ($\bar{x} \pm S$)

药物浓度 (mg/ml)	空斑数目 (n=4)	子代病毒滴度 (lgTCID ₅₀ n=12)	加药 48 h 后 细胞总数 (n=4) ^a	死亡细胞数 (n=5)	死亡率 (%)
200	$38.5 \pm 15.4^*$	$1.97 \pm 0.36^*$	7.80 ± 0.76	0.48 ± 0.21	5.1
100	$53.5 \pm 24.2^*$	$2.20 \pm 0.49^*$	8.50 ± 0.89	0.36 ± 0.19	4.2
50	$75.3 \pm 23.4^*$	$2.54 \pm 0.41^*$	$11.50 \pm 0.84^*$	0.44 ± 0.23	3.8
25	$91.5 \pm 28.3^*$	$2.93 \pm 0.57^*$	$12.10 \pm 1.02^*$	0.42 ± 0.18	3.5
12.5	114.8 ± 23.5	$3.37 \pm 0.58^*$	$11.80 \pm 0.97^*$	0.43 ± 0.22	3.6
0	156.3 ± 29.6	4.06 ± 0.62	9.40 ± 0.93	0.38 ± 0.19	4.0

注: a: 细胞数单位: $\times 10^5/\text{ml}$, 接种时细胞量 $3 \times 10^5/\text{ml} \times 1 \text{ ml}$; t 检验, 与未加药物组比较, $*P < 0.05$

讨 论

七味白术散出宋·钱乙《小儿药证直诀》, 为中医治疗小儿泄泻的传统名方。近十多年来, 不少作者报道七味白术散治疗婴幼儿秋季腹泻疗效较好。本项实验结果显示, 七味白术散在体外能减少 HRV 空斑数目和病毒繁殖量, 抑制 HRV 核酸合成, 并能延长 HRV 感染后病变细胞存活, 促进细胞新生。且七味白术散的细胞毒性较低, 在适当浓度能促进培养细胞生长和增殖。七味白术散的这种既抑制病毒增殖又促进细胞生长的作用是一般抗病毒药物所难以具备的。

自 1981 年 Sato 等^[5]报道 HRV 能在 MA_{104} 细胞上增殖并出现细胞病变以来, 不少学者对 HRV 细胞培养和空斑技术作了进一步研究, 因而为实验室筛

选、研制抗 HRV 药物提供了方便与可能。但由于 HRV 细胞培养仍非易事以及 HRV 出斑受多种因素影响^[3, 4, 6]。因此, 在培养细胞上观察实验药物的抑制 HRV 作用应注意到其他因素的影响, 并有待在活体内实验中进一步验证。

虽然目前对抗病毒药物的筛选与研制强调的是化学结构清楚、分离提纯的化合物, 但临床对于病毒感染性疾病大都给予综合治疗, 并非只给抗病毒药物。众所周知, 中医治疗疾病一组方药常包含了几种治疗法则在内。因此, 对于某些治疗病毒性疾病有效的中药与方剂, 我们应当认真探索其机理, 不可因其成分复杂而忽略其可能具有的抗病毒作用。基于这一理由, 本实验结果将为临床应用七味白术散治疗婴幼儿轮状病毒肠炎提供抗病毒作用的实验依据。

参 考 文 献

1. WHO Scientific Working Grop. Rotavirus and other viral diarrheas. Bull WHO 1980; 58: 183.
2. Vaughan VC. Nelson's text book of pediatrics. ed 11. Philadelphia: Saunders, 1979: 1072.
3. 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术. 第1版. 北京: 科学出版社, 1990: 616.
4. 孟继鸿, 朱圣禾, 孙永良. 凝胶添加物对人轮状病毒空斑形成的影响. 浙江医科大学学报 1988; 17(1): 6.
5. Sato K, Inaba Y, Shinzuka T, et al. Isolation of human rotavirus in cell cultures. Arch Virol 1981; 69: 155.
6. 孟继鸿. 刀豆素 A 对人轮状病毒增殖的促进与抑制作用. 中华微生物学和免疫学杂志 1991; 11(5): 331.

(收稿: 1995-01-23 修回: 1995-05-15)

突发性耳聋与血液粘滞度的相关性探讨

章毓甘 石义生 郑海农

突发性耳聋(下称突聋), 是一病因复杂, 突然发生的感音性神经性耳聋。目前多认为与内耳供血不足有关。为进一步了解突聋与血供相关的机理, 笔者以血液流变学与微循环改变为观察指标, 对 45 例突聋患者与 30 例健康人分别进行观察, 现总结如下。

临床资料 参照日本突聋协会最新修正标准(Nomura Y. Acta Otolaryngol (Suppl) 1988; 456: 7) 诊断。突聋组 45 例, 男 24 例, 女 21 例; 年龄 12~73 岁, 平均 41.7 岁。单耳聋 38 例, 双耳聋 7 例。全部患者均经详细询问病史, 专科检查, 纯音电测听, 内听道 X 线摄片, 部分患者尚经声阻抗、听觉脑干诱发电位等检查而确诊。健康人组 30 例, 男

18 例, 女 12 例; 年龄 20~60 岁, 平均 40 岁。经纯音电测听检查, 听力全部正常。

检测方法 (1) 血液流变学指标检测: 健康人组抽清晨空腹血 5 ml(抗凝), 突聋组于治疗前抽清晨空腹血 5 ml(抗凝), 用无锡产 SDE-III 自动电子计时粘度计检测全血比粘度、血浆比粘度、全血还原粘度。纤维蛋白原(双缩脲法)、红细胞压积(常量法)、血沉(魏氏法)及血沉方程 K 值 7 项粘度指标。(2) 甲皱微循环检查: 观察双侧无名指甲皱血管内血流、血细胞的动态改变及血管周围情况。

结 果 (1) 两组血液流变学测定结果: 见附表。健康人组 7 项指标测定值均属正常。突聋组血浆比粘

附表 两组血液流变学指标比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	例数	全血比粘度	血浆比粘度	全血还原粘度	纤维蛋白原	红细胞压积	血沉	血沉方程
			(mPa·s)		(g/L)	(%)	(mm/h)	K 值
健康人	30	4.80±0.35	1.75±0.06	7.40±0.36	2.91±0.21	42.88±3.54	19.30±11.2	68.33±31.76
突聋	45	4.78±0.59	1.95±0.05 *	9.18±0.96 △	4.76±0.74 △	41.64±5.96	37.90±16.2 △	99.69±36.56 △

注: 与健康人比较, * $P < 0.05$, △ $P < 0.01$

度、全血还原粘度、纤维蛋白原、血沉及血沉方程 K 值均明显高于健康人组($P < 0.05 \sim 0.01$)。(2) 两组微循环观察结果: 健康人组各项观察指标均正常。突聋组 45 例中 33 例血流速度明显减慢, 31 例出现轻至重度红细胞聚集, 28 例出现白色微小血栓, 23 例有轻至重度渗出。

讨 论 突聋的病因迄今未明, 中医学认为因“血瘀”造成“行血失度”, 致使听力突然失聪, 属“血瘀”实证。现代医学则以血管病变学说及病毒学说最受重视。二者均认为与内耳缺血有关。笔者用公认观察血瘀证的血液流变学指标及甲皱微循环功能状态为观察指标。以直接了解血液的粘滞性和全身末梢的血循环状态, 在一定程度上间接地反映出突聋与内耳血

供的关系。从附表所见: 突聋组 5 项血液流变学指标明显异常($P < 0.05 \sim 0.01$)。说明突聋患者血液处于一种高凝状态, 微循环检查结果显示有 2/3 突聋患者有不同程度的微循环改变。附表中突聋组全血比粘度正常, 可能与用毛细管测定法, 在增变速率较高时, 其表面粘度未反映出来有关。而红细胞压积正常, 说明该组患者血液粘度增高与红细胞压积本身无关。文中小部分患者无明显微循环障碍改变, 血液流变学指标也属正常范围, 说明突聋的病因复杂, 血液粘滞性增高仅是突聋的病因之一。

(血液流变学指标检测及微循环检查分别由本院老年病研究所及杭州市红十字会医院微循环室协助完成, 特此致谢)

(收稿: 1995-07-05 修回: 1995-06-28)