

甘露消毒丹对柯萨奇病毒体外抑制作用的实验研究*

贺又舜¹ 伍参荣¹ 赵国荣² 胡建中¹ 黄开颜²

内容提要 目的:观察甘露消毒丹全方、残方及加味方对柯萨奇病毒的体外抑制作用。方法:采用组织培养技术,在培养细胞中观察甘露消毒丹全方、残方及加味方水煎液分别对培养细胞的最高无毒浓度,对柯萨奇病毒增殖产量的影响以及在不同时间内抑毒效果。结果:甘露消毒丹全方、残方及加味方对细胞的最高无毒浓度均为 1:40(即 25g/L),该浓度对柯萨奇病毒 B₂、B₃、B₄ 株在培养细胞内的增殖有明显的抑制作用,抑制指数均 >2;全方对柯萨奇病毒 B₂、B₃、B₄ 株在培养细胞中的增殖产量明显低于对照组($P < 0.05$)。结论:甘露消毒丹全方、残方及加味方水煎液,均能抑制柯萨奇病毒在培养细胞内的复制。

关键词 甘露消毒丹 柯萨奇病毒 组织培养

Experimental Study on Inhibitory Effect of Ganlu Xiaodu Dan on Coxackie Virus in Vitro He Youshun, Wu Canrong, Zhao Guorong, et al *Hunan College of TCM, Changsha (410007)*

Objective: To observe the Coxackie virus inhibitory effect of Ganlu Xiaodu Dan (GLXDD), including complete recipe, incomplete recipe and supplemented recipe of it. **Methods:** Using tissue culture technique, the maximal non-toxic concentration of drug on cultured cells, the influence of drug on proliferation of virus in cultured cells and the virus inhibitory effect in different time of action were observed. **Results:** The maximal non-toxic concentration of GLXDD was 1:40 (25g/L), no matter whether the recipe was complete, incomplete or supplementary. CLXDD in that concentration could inhibit significantly the proliferation of Coxackie virus B₂, B₃ and B₄ strains, the inhibition index being over 2 and the output of these strains treated with complete recipe of GLXDD was lower significantly than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** GLXDD, including its complete recipe, incomplete recipe and supplementary recipe, could inhibit the replication of Coxackie virus in cultured cells.

Key words Ganlu Xiaodu Dan, Coxackie virus, tissue culture

甘露消毒丹是清热解毒、祛湿化浊代表方,引自清代王孟英之《温热经纬》。临床实践证明,该方对多种病毒感染性疾病治疗有效^(1~3)。已有的研究显示:柯萨奇病毒是引起病毒性心肌炎等疾病的主要病毒株,尤其是 B 组病毒所致的心肌病要比通常发现的多得多⁽⁴⁾。我们采用组织培养技术,对该方在培养细胞中抗柯萨奇病毒 B₂、B₃、B₄ 的作用进行了实验研究,现将结果报告如下。

材料与方法

1 细胞和病毒 (1)Hep-2 细胞(人喉癌细胞)由湖南医科大学流行病学教研室提供,用含 5% 牛血清的 RPM1640 培养液培养。(2)柯萨奇病毒(Cox-B₂、B₃、B₄)均由湖南医科大学流行病学教研室提供,按文献⁽⁵⁾方法在 Hep-2 细胞上增殖。

2 药物及制备 (1)甘露消毒丹按高等中医药学教材《方剂学》⁽⁶⁾记载,甘露消毒丹全方(简称甘全方)含:飞滑石 7.5g 淡黄芩 5g 绵茵陈 5.5g 石菖蒲 3g 川贝母 2.5g 木通 2.5g 藿香 2g 连翘 2g 白蔻仁 2g 薄荷 2g 射干 2g。甘露消毒丹残 I 方(简称残 I 方)含:藿香 2g 白蔻 2g 薄荷 2g 石菖蒲 3g;

*国家自然科学基金资助项目(No.3927084)

1. 湖南中医学院(长沙 410007);2. 湖南中医学院第一附属医院

甘露消毒丹残Ⅱ方(简称残Ⅱ方)含:黄芩 5g 连翘 2g 射干 2g 川贝母 2.5g 茵陈 5.5g 滑石 7.5g 木通 2.5g;甘露消毒丹加味方(简称甘加方):即甘全方加板蓝根 5g 大青叶 5g。药物按剂量从湖南中医学院第一附属医院药房一次性购回,经三蒸水 3 次漂洗后,于玻璃烧瓶中加入三蒸水煎煮 10min 去渣, G4 过滤,浓缩,每毫升药液含生药 1g,将药液 pH 调至 7.0,分装、消毒后于 4℃ 保存,供实验用。(2)病毒唑:100mg/ml,湖北省汉川县红旗制药厂生产,批号:940716。

3 主要试剂 RPM1640 干粉培养基(美国 GIBCO 公司产品),胎牛血清(杭州四季青生物制品厂产品),胰蛋白酶(DEFECO)、谷胺酰胺均由上海生化试剂公司进口分装。上述试剂分别用三蒸水配制,经 G4 抽滤除菌后,供实验用。

4 实验方法

4.1 细胞对药液的最高耐受浓度测定 将实验药甘全方、残方及甘加方水煎液用细胞生长维持液分别稀释成 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 等浓度加入到培养 24h 的 Hep-2 细胞中,每一浓度 3 瓶,每瓶 1ml。37℃ 培养 24h 后,观察细胞生长情况,连续观察 7 天(每 24h 换相同剂量的药物维持液 1 次),制成细胞悬液,0.4% 台盼蓝染色,镜下观察细胞总数及被染细胞数,按公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{实验组细胞总数}}{\text{对照组细胞总数}}) \times 100\%$$

以细胞生长抑制率 < 10% 为细胞对药液的最高耐受浓度作为实验浓度。

4.2 分步抗柯萨奇病毒实验 A:甘露消毒丹水煎液(25g/L)加入培养细胞内,37℃ 孵育 24h,再加病毒;B:病毒与甘露消毒丹水煎液(25g/L)混合,37℃ 孵育 2h 后才加入细胞单层;C:甘露消毒丹水煎液(25g/L)与病毒同时加入培养细胞中;D:病毒加入细胞单层,37℃ 吸附 1h 再加甘露消毒丹水煎液(25g/L)。实验时药物取 4 个浓度(1:40、1:80、1:160、1:320),各药(指甘全方、甘残方、甘加方)重复 4 次,每一浓度做 4 瓶,加入含药维持液 1ml 和感染倍数为 0.1(0.1mol/L)的病毒,并设病毒对照组,37℃ 培养,逐日观察细胞病变。7~8 天细胞病变不再进展时,分别计算出各实验组(TCID₅₀)值,然后计算出抑制指数。

$$\text{抑制指数} = \text{对照组 log TCID}_{50} - \text{实验组 log TCID}_{50}$$

以抑制指数 ≥ 2 者,判断为药物有抑毒作用。

4.3 药物对柯萨奇病毒增殖量的测定 将 3 × 10⁵/ml 1ml 的 Hep-2 细胞接种于小方瓶内(底面积

2.5cm × 4cm),37℃ 培养 48h,待细胞长成良好单层,弃培养液,加感染倍数 0.1(0.1mol/L)的病毒,37℃ 吸附 1h,实验组加入细胞维持液和含 25g/L 的甘露消毒丹全方维持液,病毒对照组不加任何药液,抗病毒阳性药物对照组加含 100μg/ml 病毒唑细胞维持液,37℃ 培养,于感染后不同时间分次收获培养物。将收获的细胞病毒培养物于 -30℃ 反复冻融 3 次,离心(2000r/min 10min)取上清液于 Hep-2 细胞上进行病毒滴度测定(每浓度做 5 瓶,共做 8 个浓度)。

5 观测指标 观察不同时间甘全方、甘残方、甘加方水煎液对柯萨奇病毒的抑制指数及对 TCID₅₀ 的影响。

6 统计学方法 采用 *t* 检验,分别检验甘全方、甘残方及甘加方对柯萨奇病毒的抑制指数。采用方差分析对甘全方、甘残方及甘加味方在不同浓度时对柯萨奇 B₂、B₃、B₄ 的抑制效果。采用直线相关回归分析法并进行相关系数(*r*)显著性检验。

结 果

1 细胞对甘全方、残方及加味方水煎液的耐受浓度 见表 1。

表 1 细胞对甘全方、残方及加味方水煎液的耐受浓度

药液	浓度	细胞生长抑制率(%)
甘全方	1:5	89.3
	1:10	69.7
	1:20	69.7
	1:40	5.2
	1:80	3.4
残Ⅰ方	1:10	69.4
	1:20	34.2
	1:40	10.0
	1:80	7.3
残Ⅱ方	1:10	70.8
	1:20	20.4
	1:40	6.8
	1:80	5.2
甘加方	1:5	78.2
	1:10	54.4
	1:20	30.8
	1:40	6.3
	1:80	1.5

甘全方、残Ⅰ方、残Ⅱ方、甘加方的 1:40(即 25g/L)的浓度是细胞的最高无毒浓度。

2 不同时间甘全方对柯萨奇病毒的抑制作用 见表 2。

表 2 不同时间甘全方水煎液对柯萨奇病毒抑制指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别		Cox - B ₂		Cox - B ₃		Cox - B ₄	
		TCID ₅₀	抑制指数	TCID ₅₀	抑制指数	TCID ₅₀	抑制指数
病毒对照		4.28	—	4.67	—	4.60	—
实验	A	0.87 **	3.41 ± 0.81	1.67 **	3.00 ± 0.28	1.14 **	3.46 ± 0.30
	B	1.21 **	3.07 ± 0.34	1.84 **	2.83 ± 0.53	1.32 **	3.28 ± 0.28
	C	1.43 *	2.85 ± 0.12	2.10 *	2.57 ± 0.34	1.41 *	3.19 ± 0.73
	D	2.20 *	2.08 ± 0.21	2.25 *	2.29 ± 0.11	1.95 *	2.65 ± 0.37

注:与病毒对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;各组样本数为 16

表 3 不同稀释度的甘全方、残方以及甘加方对柯萨奇病毒抑制作用的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	抑制指数		
		Cox-B ₂	Cox-B ₃	Cox-B ₄
甘全方				
1:40	48	3.12±0.12	3.91±0.23	3.28±0.31
1:80	48	2.12±0.08	2.72±0.14	2.40±0.12
1:160	48	1.76±0.08*△	1.92±0.58*△	1.83±0.17*△
1:320	48	1.68±0.43*△	1.71±0.61*△	1.65±0.40*△
残Ⅰ方				
1:40	48	3.08±0.14	3.41±0.11	3.12±0.07
1:80	48	2.01±0.34	2.15±0.34	2.00±0.34
1:160	48	1.23±0.21*△	1.12±0.42*△	1.02±0.23*△
1:320	48	0.84±0.42*△	0.86±0.66*△	0.78±0.66*△
残Ⅱ方				
1:40	48	3.60±0.51	3.46±0.55	3.15±0.76
1:80	48	2.36±0.43	3.01±0.73	2.20±0.82
1:160	48	1.98±0.80*△	1.88±0.67*△	1.61±0.14*△
1:320	48	1.71±0.74*△	0.98±0.54*△	1.13±0.62*△
甘加方				
1:40	48	2.94±0.76	3.41±0.24	3.08±0.18
1:80	48	2.24±0.65	2.24±0.18	2.07±0.61
1:160	48	0.94±0.08*△	1.96±0.54*△	1.12±0.25*△
1:320	48	0.84±0.24*△	0.96±0.39*△	0.72±0.15*△

注:与本组 1:40 浓度比较,* $P < 0.01$;与本组 1:80 浓度比较,[△] $P < 0.05$

甘露消毒丹全方水煎液对三株不同柯萨奇病毒在不同时间内均有抑制作用,其抑制指数 >2 ,特别是甘全方水煎液先加入细胞单层 24h 后再加病毒,抑毒效果最佳,抑制指数均 ≥ 3 。不同时间内实验组与病毒对照组的 $\log \text{TCID}_{50}$ 比较有显著性差异($t = 2.01, P < 0.05$)。

3 甘全方、甘残方及甘加方对三株不同柯萨奇病毒抑制效果的比较 各药液均稀释成 4 种对细胞无毒浓度,观察不同浓度对病毒的抑制作用(见表 3)。结果表明:不同浓度的抑毒作用有别,当药液浓度为 1:40、1:80 时,未发现明显的细胞感染病毒后的病变,与病毒对照组比较抑制指数均 ≥ 2 。当药液浓度为 1:160、1:320 时,细胞出现病毒感染后的病变,细胞变

圆、变暗、脱落,与病毒对照组比较抑制指数均 <2 。表 3 中还可以看出各药物浓度在抗相同病毒株抑制指数比较,有显著性差异($t = 2.315, P < 0.05$)。相同的药物浓度在抗不同的柯萨奇病毒株的抑制指数比较,方差分析无显著性差异($F = 1.08, P > 0.05$)。

4 甘露消毒丹全方水煎液对柯萨奇病毒增殖量的影响 甘露消毒丹全方水煎液对柯萨奇病毒(Cox-B₂、B₃、B₄)在培养细胞中的增殖量均有明显的抑制作用,各病毒增殖量与病毒对照组增殖量比,分别低于 57%、51%、49%(见图 1)。在甘露消毒丹水煎液的作用下 Cox-B₂、B₃、B₄ 在培养细胞中的增殖量不受培养时间的影响,相关系数分别为 $r = 0.312, r = 0.341, r = 0.297$,而病毒对照组的 Cox-B₂、B₃、B₄ 在培养细胞

中的增殖量与培养时间有明显关系,随时间延长,病毒增殖量也明显增加,相关系数分别为 $r = 0.9629$, $r = 0.89762$, $r = 0.9414$,各实验组与病毒对照组相关系数显著性检验有显著性意义($P < 0.05$)。各实验组与病毒唑组相关系数显著性检验,无显著性意义($P > 0.05$)。

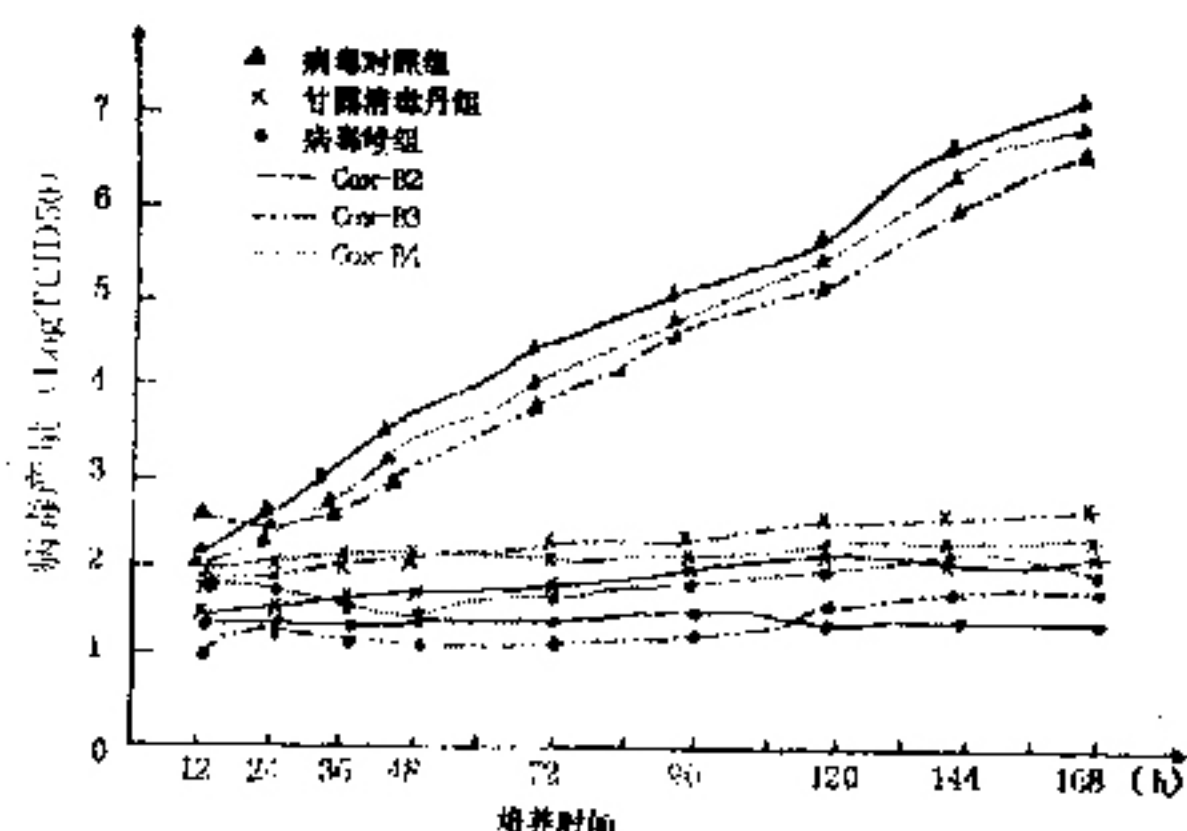


图1 甘露消毒丹全方水煎液对柯萨奇病毒生长曲线的影响

讨 论

柯萨奇病毒为小核糖核酸病毒科中的肠道病毒。目前认为,柯萨奇B组(尤其是B₂、B₃、B₄)是主要引起心肌炎的病毒。新生儿可因感染柯萨奇病毒B而突然呼吸困难和发绀,心动过速,ECG异常,或伴有其他全身感染症状,病死率甚高。以往的研究亦显示,心肌炎是任何年龄人感染柯萨奇B组病毒后十分常见的疾患,虽然病死率除新生儿外都较低,但易留下永久性心肌损伤。且柯萨奇病毒在大便和呼吸道分泌物中排出时间较长,传染性也很强,如果造成疾病流行的话,常在夏末初秋达到高峰⁽⁷⁾。所以,研究抗柯萨奇病毒的药物,对防治心肌疾病是有意义的。我们在临床中观察到,儿童与成年人心肌炎患者,其发病之初,常有发热、咽痛、心悸、胸痛、腕痞、恶心欲呕、舌红苔黄腻等湿热并重的症状,用甘露消毒丹治疗疗效甚佳,故选用该方作本项实验研究。

为弄清该方抗病毒的作用是全方抑或是残方的效

应,我们把甘露消毒丹全方中的药物按其功效分成清热利湿解毒(残Ⅱ方)与芳香化浊(残Ⅰ方)两部分,并根据临床用药习惯,在甘全方基础上加入有较好的抗病毒作用的大青叶、板蓝根(甘加方),从而对比观察它们抗病毒效应的差异。

在本项实验中,我们发现甘露消毒丹全方水煎液,在不同时间内对柯萨奇B₂、B₃、B₄病毒均有较好的抑制作用。当甘全方水煎液加入细胞单层24h后再加病毒,抑毒效果最好,抑毒指数 ≥ 3 ,这表明该方能预防柯萨奇病毒的感染,很可能与该方提高了细胞免疫作用有关。而甘全方水煎液与病毒混合37℃2h后再加入至细胞单层中,其抑制指数 ≥ 3 ,说明该方对柯萨奇病毒有直接灭活作用;甘全方水煎液与病毒混合同时加入至细胞单层,其抑制指数 > 2 而接近3,说明该方可能影响了病毒的吸附;在细胞单层中先加病毒1h后,再加甘全方水煎液,其抑制指数仍 > 2 ,这可能是该方抑制了病毒在细胞内的复制过程。本研究结果还说明该方及其残方、加味方的抗病毒作用呈量效关系。甘露消毒丹全方水煎液还对柯萨奇病毒B₂、B₃、B₄在培养细胞中的增殖量有明显的抑制作用,其抑制病毒的生长曲线与培养时间无显著相关性,很可能是该方抑制了病毒早期增殖过程的缘故。

总之,甘露消毒丹是一首有抗柯萨奇病毒作用的良方,其确切机制,尚待进一步阐明。

参 考 文 献

1. 陈永久. 甘露消毒治疗黄疸型肝炎. 四川中医 1986;3(3): 31—33.
2. 毕可恩. 甘露消毒丹在小儿中枢神经系统疾病中的应用. 四川中医 1987;4(8):19—20.
3. 毕可恩. 甘露消毒丹治疗手足口病10例. 湖南中医杂志 1988;4(3):46—47.
4. 戴自英主编. 实用内科学. 第9版. 北京:人民卫生出版社, 1994:1221.
5. 杜平主编. 医用实验病毒学. 北京:人民军医出版社, 1985: 88—104.
6. 许济群主编. 方剂学. 上海:上海科学技术出版社, 1985:181.
7. White DD, Fenner FF. Medical virology. Academic Press Inc, 1986:500—672.

(收稿:1997-12-01 修回:1998-04-08)