



黄芪水煎液抗 I 型单纯疱疹病毒的实验研究

I 型人类单纯疱疹病毒(HSV- I)可引起唇疱疹、疱疹性角膜结膜炎、新生儿脑炎等多种疾病。虽然研制疫苗可预防HSV感染,但是因HSV基因组是双链DNA,易于与宿主细胞DNA发生整合或形成潜伏感染,从而限制了疫苗的发展及应用。临床应用的抗病毒药物毒性大,加之毒株的变异容易产生耐药性,筛选研制新的抗病毒药物就尤为重要。黄芪来源于豆科植物膜荚黄芪干燥根,具有广谱的抗病毒作用。有报道黄芪水煎液对VSV、Sindbis病毒、流感病毒等有一定的抑制作用[1][2][3]。黄芪的主要化学成分是黄芪皂苷、多糖、黄酮、多种微量元素、亚油酸、亚麻酸等。为了顺应中药现代化的发展趋势,开发利用黄芪的抗病毒活性,我们以HSV- I 感染的人胚肺二倍体细胞(2BS)作为实验系统对黄芪水煎液抗HSV- I 活性进行了观察。

1 材料与方 法

1.1 材 料

所用中药黄芪由解放军总医院中药房提供,取其10 g,加水50 ml,加热回流1 h。过滤合并滤液,浓缩再过滤,再浓缩至1 ml含生药1g。所用阳性对照药无环鸟苷为白色粉剂,由重庆普惠有限公司提供(批号020302)。单纯疱疹病毒 I 型(SM44株,批号2002121)、2BS的10[~]13代细胞均由中国预防医学科学院病毒所提供。

1.2 方 法

1.2.1 黄芪水煎液对2BS细胞的毒性测定 采用细胞形态变化(CPE)法。2BS细胞以40万/ml浓度接种于96孔培养板,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养24 h。加入验证药物和阳性对照药物,每浓度接种4孔,每孔100 μ l。黄芪水煎液倍比稀释6个浓度。分别为500、250、125、62、31、15 μ g/ml,阳性对照药物无环鸟苷倍比稀释 6个浓度,分别为2 000、1 000、500、250、125 μ g/ml。设正常细胞组作为对照。同时置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养5 $^{\sim}$ 7 d。每24 h在倒置显微镜下观察细胞形态变化,记录细胞破坏情况。以25%以下破坏为(+),26% \sim 50%破坏为(++),51% \sim 75%为(+++),76% \sim 100%为(++++)。用 Reed-Muench法计算半数中毒浓度(TD₅₀)。

1.2.2 在2BS细胞培养内测定HSV- I 病毒半数感染浓度(TCID₅₀) 采用病毒CPE法。2BS细胞以40万/ml浓度100 μ l接种于96孔培养板,37 $^{\circ}$ C培养24 h。分别加入HSV- I 病毒,10倍稀释8个浓度,每浓度4孔,每孔100 μ l。设正常细胞组作为对照,37 $^{\circ}$ C培养5 \sim 7 d。观察细胞形态变化,记录实验结果,计算HSV- I 的TCID₅₀。

1.2.3 黄芪水煎液在细胞培养内对HSV- I 病毒的抑制作用 采用病毒CPE法进行。2BS细胞以40万/ml浓度接种于96孔培养板,37 $^{\circ}$ C培养24 h。分别加入HSV- I 病毒的10 \sim 100 TCID₅₀的病毒液,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C 吸附1 h,弃掉病毒液。加入黄芪水煎液,选用毒性实验结果的最大无毒浓度(TD₀)。药液250.0 \sim 0.5 μ g/ml,二倍稀释8个浓度,每浓度4孔,每孔100 μ l。无环鸟苷为1 000.0 \sim 0.5 μ g/ml二倍稀释8个浓度,每浓度4孔,每孔100 μ l。同时设病毒对照和正常细胞对照,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养5 \sim 7 d。每24 h倒置显微镜下观

察病毒CPE, 至病毒对照细胞病变出现“+++~++++”时结束实验。实验重复3次, 计算药物半数有效浓度(IC_{50})、最小有效浓度(MIC), 并根据公式 $TI = TD_0/MIC$ 计算治疗指数TI[3]。

2 结果

2.1 预备实验结果

黄芪水煎液对细胞的毒性作用, 所测黄芪水煎液的 TD_0 为250 $\mu\text{g/ml}$, TD_{50} 为300 $\mu\text{g/ml}$; 无环鸟苷的 TD_0 为1 000 $\mu\text{g/ml}$, TD_{50} 为1 250 $\mu\text{g/ml}$ (均为3次实验结果的均值)。在2BS细胞培养内测定HSV- I 的 $TCID_{50}$ 为 1×10^{-7} 。

2.2 正式实验结果

黄芪水煎液的 IC_{50} 为0.98 $\mu\text{g/ml}$, MIC为1.95 $\mu\text{g/ml}$, TI为128。无环鸟苷的 IC_{50} 为2.5 $\mu\text{g/ml}$, MIC为5.0 $\mu\text{g/ml}$, TI为200(均为3批实验结果)。

3 讨论

对于药物的评价需要考虑其药效与毒力的相对关系, 这个相对关系可用TI表示。从本研究的结果来看, 黄芪的TI为128, 表现出较强的直接杀灭、阻断感染、抑制HSV- I 增殖的作用。

近年来, 中草药的抗病毒作用有大量的报道[4][5][6][7]。经文献调研, 发现有100多种中药具有抗病毒作用。本实验也验证的黄芪的抗病毒作用, 为临床用药提供了依据。

参考文献:

- [1]侯云德, 宋代军, 傅丰永. 黄芪某些生物学活性的有效部分的研究[J]. 中西医结合杂志, 1984, 4(7): 420-1.
Hou YD, Song DJ, Fu FY. Investigation of biological active parts from Astragalus membranaceus[J]. Chin J Integ Trad Western, 1984, 4(7): 420-1.
- [2]尤丽芬. 黄芪的免疫及抗病毒作用[J]. 中草药, 1993, 24(4): 211-2. You LF. Action of immune and anti-virus of Astragalus membranaceus[J]. Chin Trad Herbal Drugs, 1993, 24(4): 211-2.
- [3]上海第一医学院卫生统计学教研组. 医学统计方法[M]. 上海科学技术出版社, 1979. 209.
- [4]王 鹏, 解砚英, 王元书, 等. 中药大黄抗病毒作用的实验研究[J]. 山东医科大学学报, 1996, 34(2): 166-7.
Wang P, Xie YY, Wang YS, et al. Study on antiviral of Rheum officinale Baill[J]. ACTA Acad Med Shandong, 1996, 34(2): 166-7.
- [5]杨怡姝, 李洪源, 刘密凤, 等. 抗病毒中药1号在MDCK细胞中对流感病毒B的抑制作用[J]. 黑龙江医学, 2001, 25(1): 16-7.
Yang YS, Li HY, Liu MF, et al. Anti-influenza effect of a Chinese medicinal herb No.1 in MDCK culture[J]. Heilongjiang Med J, 2001, 25(1): 16-7.
- [6]张美方, 董 岩. 金银花黄芪溶液抑制水痘带状疱疹病毒作用的实验研究[J]. 齐鲁医学杂志(Med J Qilu), 2003, 18(2): 156-7.
- [7]游文玮, 吴昭晖, 佟 丽, 等. 喂饲补阳还五汤大鼠血清中黄芪甲甙的固相萃取-化学衍生化-荧光分光光度法测定[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 335-6.
You WW, Wu ZH, Tong L, et al. Determination of serum astragaloside in rats fed with Buyanghuanwu decoction using solid-phase extraction, chemical derivatization and fluorospectrophotometry[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 335-6.

参考文献:

- [1]侯云德, 宋代军, 傅丰永. 黄芪某些生物学活性的有效部分的研究[J]. 中西医结合杂志, 1984, 4(7): 420-1.
- Hou YD, Song DJ, Fu FY. Investigation of biological active parts from Astragalus membranaceus[J]. Chin J Integ Trad Western, 1984, 4(7): 420-1.
- [2]尤丽芬. 黄芪的免疫及抗病毒作用[J]. 中草药, 1993, 24(4): 211-2. You LF. Action of immune and anti-virus of Astragalus membranaceus[J]. Chin Trad Herbal Drugs, 1993, 24(4): 211-2.
- [3]上海第一医学院卫生统计学教研组. 医学统计方法[M]. 上海科学技术出版社, 1979. 209.
- [4]王 鹏, 解砚英, 王元书, 等. 中药大黄抗病毒作用的实验研究[J]. 山东医科大学学报, 1996, 34(2): 166-7.
- Wang P, Xie YY, Wang YS, et al. Study on antiviral of Rheum officinale Baill[J]. ACTA Acad Med Shandong, 1996, 34(2): 166-7.
- [5]杨怡姝, 李洪源, 刘密凤, 等. 抗病毒中药1号在MDCK细胞中对流感病毒B的抑制作用[J]. 黑龙江医学, 2001, 25(1): 16-7.
- Yang YS, Li HY, Liu MF, et al. Anti-influenza effect of a Chinese medicinal herb No.1 in MDCK culture[J]. Heilongjiang Med J, 2001, 25(1): 16-7.
- [6]张美方, 董 岩. 金银花黄芪溶液抑制水痘带状疱疹病毒作用的实验研究[J]. 齐鲁医学杂志(Med J Qilu), 2003, 18(2): 156-7.
- [7]游文玮, 吴昭晖, 佟 丽, 等. 喂饲补阳还五汤大鼠血清中黄芪甲甙的固相萃取-化学衍生化-荧光分光光度法测定[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 335-6.
- You WW, Wu ZH, Tong L, et al. Determination of serum astragalo-side in rats fed with Buyanghuanwu decoction using solid-phase extraction, chemical derivatization and fluorospectrophotometry[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 335-6.