

## 2 结果

2组不同时间点血中内毒素含量比较,见表1。72 h内对照组、治疗组大鼠各死亡2例,治疗组排便量增多,便质为稀烂便。3 h时,血中内毒素含量,2组比较,差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。24 h、72 h时,治疗组内毒素含量较对照组明显下降,2组比较,差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表1 2组不同时间点血中内毒素含量比较( $\bar{x} \pm s$ ) ng/L

组别	n	3 h	24 h	72 h
治疗组	28	0.108 ± 0.015	0.073 ± 0.034	0.046 ± 0.013
对照组	28	0.137 ± 0.016	0.148 ± 0.043	0.079 ± 0.008

与对照组比较,① $P < 0.05$

## 3 讨论

在SAP状态下,肠黏膜的结构和功能会受到损害,肠黏膜损伤、萎缩,肠通透性增加,导致细菌和内毒素易位,并可诱发和加重全身炎症反应和多器官功能障碍。内毒素引起炎症反应的病理作用可以分为系统和细胞两个方面。在整体水平上,内毒素可激活补体级联反应,导致凝血系统活化,纤维蛋白形成增加、降解减少,凝血系统出现的这些改变可发生弥散性血管内凝血(DIC)。在细胞水平上,内毒素可刺激某些效应细胞产生活性因子,如B细胞分泌多克隆抗体、肥大细胞和

嗜碱细胞产生化学趋化分子、组胺,以及血小板分泌生长因子和凝集分子、中性粒细胞释放活性氧分子;内毒素刺激单核细胞、巨噬细胞和内皮细胞等产生多种促炎细胞因子。这些细胞因子可迅速活化不同组织器官的细胞,导致机体代谢、激素水平和神经内分泌改变,进而造成细胞功能异常和不同器官功能衰竭<sup>[3-4]</sup>。

本研究结果显示,SAP大鼠血中内毒素水平明显升高,而甘遂灌胃可明显降低内毒素水平,可能和大鼠排较多的烂便有关,通过改善肠道功能,减少肠源性内毒素释放,从而获得内毒素的下降。

## [参考文献]

- [1] 崔乃强,吴咸中.重症急性胰腺炎治疗的现状和展望[J].中国危重病急救医学,2004,16(12):705-707.
- [2] 范鑫,刘建利.甘遂研究概况[J].中成药,2008,30(9):8531-8534.
- [3] 葛玮,马彬,杨克虎,等.甘遂治疗重症急性胰腺炎的系统评价[J].中国循证医学杂志,2009,9(9):964-968.
- [4] 孙俊涛.细胞因子与重症急性胰腺炎关系研究进展[J].临床消化病杂志,2008,20(5):316-317.

(责任编辑:马力)

# 金银花体外抗呼吸道合胞病毒作用研究

张旋<sup>1</sup>, 郑明星<sup>2</sup>, 朱志兵<sup>2</sup>, 郑丽红<sup>3</sup>, 邱冰<sup>4</sup>, 曹慧君<sup>5</sup>, 魏凤香<sup>1</sup>

1. 深圳市龙岗区妇幼保健院, 广东 深圳 518172
2. 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518039
3. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006
4. 黑龙江省人民医院, 黑龙江 哈尔滨 163316
5. 首都医科大学附属北京朝阳医院心脏中心, 北京 100020

[摘要] 目的:研究金银花体外抑制呼吸道合胞病毒作用的效果和强度。方法:采用细胞病变抑制实验,噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性,观察金银花在人宫颈癌传代细胞(Hela)中对人呼吸道合胞病毒3型的抑制作用,以治疗指数(TI)为评价指标。结果:金银花对Hela细胞半数中毒浓度( $TC_{50}$ )为5 mg/mL,最大无毒浓度( $TC_0$ )为3.6 mg/mL。对呼吸道合胞病毒有直接灭活作用,其半数抑制率( $IC_{50}$ )为0.16 mg/mL, TI为31.2;在吸附阶段也有作用,其 $IC_{50}$ 为0.48 mg/mL, TI为10.5;同时金银花有抑制呼吸道合胞病毒生物合成作用,其 $IC_{50}$ 为1.0 mg/mL, TI为5.0;金银花不能阻止呼吸道合胞病毒侵入细胞。结论:金银花在体外主要通过直接灭活、阻止病毒吸附和抑制生物合成三种方式发挥抗呼吸道合胞病毒作用。

[收稿日期] 2013-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:81201568);广东省医学科研基金项目(编号:A2012606)

[作者简介] 张旋(1964-),男,主任技师,主要从事检验医学研究。

[通讯作者] 魏凤香, E-mail: vivian9811@126.com。

[关键词] 金银花;人呼吸道合胞病毒(RSV);细胞病变(CPE);MTT法

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 0256-7415(2014)06-0204-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.06.097

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是引起3岁以下小儿呼吸道感染最重要的病原微生物,同时也是致使某些免疫抑制人群和老年人群发病和死亡的重要原因<sup>[1]</sup>。现有的抗病毒药利巴韦林,不良反应使其在婴幼儿的应用受到限制,疗效也存在争议。现代药理学研究表明,金银花(*Lonicera japonica* Thund.)具有一定的抗病毒作用。本研究通过体外实验,验证金银花抗呼吸道合胞病毒的能力,以期为临床治疗提供理论依据。

## 1 材料

1.1 病毒株和细胞株 人呼吸道合胞病毒3型由本实验室保存;Hela细胞株为武汉大学典型培养物保藏中心提供,常规方法传代培养。

1.2 药品与试剂 金银花由中山大学医学院中药房提供。用水提醇沉法处理,减压浓缩,消毒G6漏斗过滤制成浓度为600 000 μg/mL的金银花母液待用;对照组药物病毒唑注射液(Ribavirin),山东益康药业有限公司市售商品,50 mg/mL,批号:200211061;新生牛血清(杭州四季青生物公司);RPMI-1640培养液(美国Gibco公司);MTT(美国Sigma);二甲基亚砜(DMSO,上海菲达有限公司)。

## 2 方法

2.1 药物配制 用RPMI-1640培养液将金银花(6g/mL)按1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200和1:102 400比例进行稀释,其药液质量浓度分别为60 mg/mL、30 mg/mL、15 mg/mL、7.5 mg/mL、3.75 mg/mL、1.875 mg/mL、0.937 mg/mL、0.468 mg/mL、0.234 mg/mL、0.167 mg/mL和0.08 mg/mL。

2.2 病毒毒力测定 以50%组织培养感染量(50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>)表示病毒毒力。将病毒培养液做10倍系列稀释从10<sup>-1</sup>至10<sup>-10</sup>。将各稀释度的病毒液接种于单层Hela细胞中,每一稀释度8个复孔,同时设阴性对照,37℃培养3~5天,观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)。用Reed-Muench法求出对细胞半数感染量(TCID<sub>50</sub>)。

2.3 金银花毒性测定 将细胞维持液稀释的不同浓度金银花分别加入Hela细胞已长成单层的96孔细胞培养板中,每个浓度重复8个复孔,同时设立正常细胞对照,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养,连续观察3天,记录细胞形态变化。培养结束前4 h,吸弃培养板中液体,PBS冲洗3次,每孔加入MTT(5 mg/mL)20 μL,于37℃培养箱中培养4 h,去上清后每孔加DMSO 200 μL,微量振荡器振荡5 min,酶标读数仪

比色(波长492 nm)测吸光度值。实验重复3次。

## 2.4 金银花在Hela细胞内抗呼吸道合胞病毒实验

2.4.1 对病毒的直接灭活作用 在药物无毒范围内,不同浓度的含药维持液分别与100TCID<sub>50</sub>呼吸道合胞病毒液等量混合,37℃作用2 h后,将其接种在Hela细胞已长成单层的96孔细胞培养板中,37℃吸附2 h后,弃上清,加维持液200 μL,每一浓度设8个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑(50 μg/mL)对照,置于5% CO<sub>2</sub>、37℃孵箱培养。每天观察CPE。当病毒对照细胞病变达75%以上,MTT法检测细胞存活率。实验重复3次。

2.4.2 对病毒复制增殖的抑制作用 在长成单层的Hela细胞的96孔板上,每孔接种20 μL的100TCID<sub>50</sub>呼吸道合胞病毒液,37℃吸附2 h,弃病毒液。在药物无毒范围内加入不同浓度的含药维持液,每孔200 μL,每一浓度设8个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑(50 μg/mL)对照,余方法同2.4.1。

2.4.3 对病毒吸附的作用 在药物无毒范围内,不同浓度的含药维持液分别与100TCID<sub>50</sub>呼吸道合胞病毒液等量混合后,立即加到已长成单层Hela细胞的96孔细胞培养板中,37℃吸附2 h后,弃去96孔板中液体,加维持液200 μL,每一浓度设8个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑(50 μg/mL)对照,余方法同2.4.1。

2.4.4 对呼吸道合胞病毒侵入细胞的阻断作用 在药物无毒范围内,每孔细胞预先加入不同浓度的含药维持液200 μL,作用4 h后用PBS洗涤3次,每孔再加入100TCID<sub>50</sub>呼吸道合胞病毒,吸附2 h,弃病毒上清,加维持液200 μL,每一浓度设8个复孔,实验同时设细胞对照、病毒对照和病毒唑(50 μg/mL)对照,余方法同2.4.1。

Hela细胞存活率(%)=药物组吸光度值/细胞对照组吸光度值×100%,抑制率(%)=100%-存活率。病毒抑制率=(药物处理组吸光度值-病毒对照组吸光度值)/(细胞对照组吸光度值-病毒对照组吸光度值)×100%。治疗指数(TI)=半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)/半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

2.4.5 统计学方法 采用SPSS11.5软件处理。组间比较采用方差分析。

## 3 结果

3.1 病毒毒力测定 采用Reed-Muench法计算RSV在Hela细胞中的TCID<sub>50</sub>为10<sup>5.25</sup>实验中病毒攻击量为100 TCID<sub>50</sub>/100 μL。

3.2 金银花对Hela细胞的毒性作用 金银花对Hela细胞的

毒性作用表现为细胞增殖缓慢、颗粒较多、折光性强、形态改变、部分细胞破碎脱落。金银花对细胞的毒性作用在随着药物浓度的降低而降低,细胞存活率逐渐增加。MTT 检测结果表明,金银花对 HeLa 细胞的毒性作用  $TC_{50}$  值为 5 mg/mL,最大无毒浓度( $TC_0$ )为 3.6 mg/mL。

### 3.3 金银花在海拉细胞内抗呼吸道合胞病毒实验结果

3.3.1 不同方式作用下金银花对呼吸道合胞病毒的抑制作用见表 1。对病毒的直接灭活作用,呼吸道合胞病毒感染所致的 HeLa 细胞 CPE 特征为细胞肿胀、变圆、细胞间融合、脱落、碎裂。在金银花无毒范围内,随浓度增加,呼吸道合胞病毒所致的 CPE 程度降低,病毒抑制率与浓度呈正相关,与病毒对照比较,差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ),抑制效果优于病毒唑( $P < 0.05$ )。说明该金银花具有直接灭活呼吸道合胞病毒的作用,其对呼吸道合胞病毒的  $IC_{50}$  为 45 mg/mL, TI 为 31.2。

3.3.2 对病毒复制增殖的抑制作用 见表 1。结果表明,金银花能明显抑制呼吸道合胞病毒生物合成,表现在随着金银花浓度的增加,细胞肿胀、变圆等典型 CPE 特征逐渐减弱,细胞存活率明显升高,金银花抑制细胞病变的作用随着浓度的增加而增强,与病毒唑对照比较,差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ),抑制效果优于病毒唑( $P < 0.05$ )。其对呼吸道合胞病毒的  $IC_{50}$  为 30 mg/mL, TI 为 10.5。

3.3.3 金银花对呼吸道合胞病毒不同方式作用下 CPE 对病毒吸附的作用 每天观察 CPE 情况,随着金银花浓度的增加,典型的 CPE 表现逐渐下降,MTT 结果显示抑制病毒增殖,与病毒对照比较,差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ),抑制效果优于病毒唑( $P < 0.01$ ),其对呼吸道合胞病毒的  $IC_{50}$  为 1 mg/mL, TI 为 5.0。

3.3.4 对呼吸道合胞病毒侵入细胞的阻断作用 金银花不同浓度组均出现典型的 CPE, MTT 结果显示病毒抑制率与病毒对照比较,差异无显著性意义( $P > 0.05$ ),说明金银花对病毒侵入细胞均无阻断作用,对呼吸道合胞病毒感染无预防作用。

表 1 不同方式作用下金银花对呼吸道合胞病毒的抑制作用

作用方式	药物不同质量浓度(mg/mL)时的病毒抑制率%							$IC_{50}$	TI
	1.875	0.937	0.468	0.234	0.167	0.08	病毒唑(50 μg/mL)		
直接灭活	79.4	70.7	61.0	46.6	36.8	20.6	10	45	31.2
生物合成	69.9	56.6	50.1	45.6	39.2	30.1	22	30	10.5
吸附阶段	61.0	48.3	33.0	29.6	19.9	11.0	4	11	5.0
阻断作用	0	0	0	0	0	0	6	0	0

与病毒唑比较,① $P < 0.05$ ,② $P < 0.01$

## 4 讨论

由病毒引起的感染性疾病一直严重威胁人类的生命与健康,而病毒感染最常见的就是呼吸道病毒造成的感染。在呼吸道病毒中呼吸道合胞病毒的危害不容忽视<sup>[2]</sup>。呼吸道合胞病毒是导致婴幼儿下呼吸道感染的最重要的病毒病原,同时也是导

致某些免疫抑制人群发病和死亡的重要原因<sup>[3]</sup>。目前唯一用于化学疗法的药物病毒唑作为广谱抗病毒药,被用于治疗呼吸道合胞病毒感染<sup>[4]</sup>,但临床实际应用中效果并不理想,由于目前尚无有效疫苗用于预防,针对抗呼吸道合胞病毒的特异性药物还有待开发。寻找一种高效、安全、副作用少的抗病毒药物的研究势在必行。

金银花应用于临床已有千年历史,对治疗各种瘟疫痲疹病证,其疗效是确切的,未见有毒副作用和耐药性,也能与其它西药抗生素药物结合使用,近年来,国内外学者运用现代理论知识进行了全面分析和研究,作了大量的药理临床工作,从科学的角度证实了金银花具有广谱抗菌、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫及解热抗炎、利胆、保肝、降脂、抗生育、止血、抗溃疡等多种药理作用<sup>[5]</sup>。

本文初步研究了金银花抗呼吸道合胞病毒的作用效果。金银花对 HeLa 细胞的半数细胞毒性浓度  $TC_{50}$  为 5 mg/mL,最大无毒浓度( $TC_0$ )为 3.8 mg/mL,表明对细胞无明显的毒性作用。MTT 结果显示,金银花对呼吸道合胞病毒有直接灭活作用,而且随着浓度的升高,灭活作用增强,说明药物可能具有直接杀伤病毒的作用,或者药物中的某一天然化合物在体表能与呼吸道合胞病毒表面的某个特征性部位相结合,使呼吸道合胞病毒很难进入细胞进行复制。同时,金银花对抑制呼吸道合胞病毒在细胞内增殖有明显的的作用,而且优于对照组药物病毒唑,其作用机理可能是抑制病毒核酸复制或阻止病毒蛋白合成。金银花在病毒对细胞的吸附阶段也起到一定作用,可能是呼吸道合胞病毒的纤突被破坏,阻止了病毒的吸附,使病毒不能进入细胞内复制。金银花对病毒侵入细胞均无阻断作用,说明金银花不能与细胞表面受体结合,从而不能预防病毒的安装。金银花抗呼吸道合胞病毒作用机制还有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Busse WW, Lemanske RF Jr, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations[J]. Lancet, 2010, 376(9743): 826-834.
- [2] Ramsey CD, Kumar A. Influenza and Endemic Viral Pneumonia [J]. Crit Care Clin, 2013, 29(4): 1069-1086.
- [3] Tsukagoshi H, Ishioka T, Noda M, et al. Molecular epidemiology of respiratory viruses in virus-induced asthma[J]. Front Microbiol, 2013, 12(4): 278.
- [4] 高荣梅, 李兴琼, 何维英, 等. 利巴韦林注射液体内外抗流感病毒作用研究[J]. 药学报, 2010, 45(3): 403-407.
- [5] 何晶. 金银花的药理作用及临床应用[J]. 天津药学, 2008, 20(5): 74-75.

(责任编辑: 马力)