

抗流感病毒药物筛选的实验研究

马升阳

(河南人民医院, 郑州)

刘运卿

(河南医学院, 郑州)

张秉彦

(郑州市药检所)

流行性感冒是一种常见病多发病, 经常发生散发性及暴发性流行。流感疫苗虽能预防传播, 但病毒的经常变异给免疫预防带来极大的困难。造成大流行的原因, 一般与病毒变异有关, 因此探索预防及治疗药物有很大的必要。

我们搜集了国内及本省内有关抗流行性感冒的验方与单方, 用不同时期的流感病毒流行株及动物适应株, 进行了系统的实验。现将结果报道如下。

材料与方 法

一、药 物

选用了 39 种药物进行筛选。以金刚烷胺、吗啉呱作对照。中草药有: 银柴胡、紫草、连翘、泽漆麻、山藿香、黄连、鱼腥草、野菊花、枇杷叶、诃子、五味子、糙苏、黄杨、石膏、板兰根、槲子酚、蒲公英、地丁、杏仁、大青叶、陈皮、黄芪、党参、补骨脂、紫合车、白术、麻黄、薄荷。化学药品有医科院药物研究所新合成药物, 编号为: V7404、V74-2、V74-4、V632、V7418、V73-14、V74-1、G₂591、V7403、北京 1 号、北京 2 号、北京 4 号。

配制方法: 将中草药洗净切碎, 加水煎煮 30 分钟, 过滤, 浓度为 1:1(1 克生药/毫升); 化学药品以灭菌蒸馏水配成不同的浓度。调至 pH7.0, 装入 50 毫升疫苗瓶内, 10 磅 15 分灭菌, 备用。

二、毒 种

有 A₀(PR₈ 株)、A₃(粤防 72-243 株)、A₂(郑防 75-1 株)。鼠肺适应株用 WS 株和鸡瘟野毒株。以上毒株试验前均在鸡胚尿囊腔接种培养三代, 并滴定其血凝效价, 为使毒力稳定将毒种定量分装无菌试管, 置 -60℃ 保存备用。鼠肺适应株用 12 克小白鼠滴鼻感染试验, 测定 LD₅₀。

三、药物筛选方法

试验前先作组织培养耐受试验及 10 日龄鸡胚尿囊腔接种耐受试验, 12 克小白鼠灌胃药物耐受试验, 根据耐受试验所得结果, 用能够耐受的药物的不同剂量进行药物筛选试验。

(一) 组织培养细胞筛选法

用人胚肾细胞培养管。将药物用组织培养维持液(2% 小牛血清水解乳白蛋白 Hank's 液, pH7.0, 内含青霉素、链霉素各 100 单位/毫升)稀释成不同浓度, 然后每管中加滴度为 1000 个 TCID₅₀ 的流感病毒液 0.1 毫升, 室温作用 30 分钟, 种入已长成单层的人胚肾细胞管中, 每个药物浓度种二管细胞, 置 37℃ 恒温箱中 72 小时培养, 以血球吸附试验判断结果。

(二) 鸡胚筛选法

1. 使用 11 日龄鸡胚作体外灭毒试验。将药物与病毒等量混合(病毒滴度为 1000 个 ID₅₀)作用 30 分钟, 注入尿囊腔 0.2 毫升, 35℃ 48 小时, 将鸡胚置冰箱中冻死, 剖开鸡胚吸取尿囊液

作血凝效价测定。

2. 体内预防试验: 用不同浓度的药物先注入卵黄囊, 每胚 0.2 毫升, 一小时后于尿囊腔接种滴度为 1000 ID₅₀ 的病毒 0.1 毫升, 35℃ 48 小时培养, 解剖鸡胚测尿液血凝效价。

3. 体内治疗试验: 先将 1000 ID₅₀ 的病毒接种鸡胚尿囊腔 0.1 毫升/每胚, 一小时后注射药物入卵黄囊, 每胚 0.2 毫升, 35℃ 48 小时培养, 解剖鸡胚吸取尿液测血凝效价, 以此判断结果: 血凝效价“(一)”者为灭毒, 血凝效价 1:4—1:130 为抑毒, 血凝效价 1:130—1:1024 为无效, 同时作空白对照及病毒对照。

(三) 小白鼠筛选法

用 WS 流感鼠肺适应株, 用 12 克瑞氏(纯种)小白鼠 10 只, 滴鼻感染传代, 使其出现规律死亡后, 再以鼠肺标本接种鸡胚尿囊腔传一代, 收获毒种, 并滴定 LD₅₀ (三次结果均为 10^{-3.5})。然后将病毒液混合分装于无菌小试管中, -60℃ 冰箱存放。用时将病毒用 Hank's 液稀释成 100 LD₅₀ 试验时先将小白鼠用乙醚麻醉, 然后每只滴鼻感染病毒 0.04 毫升, 给药途径为灌胃, 每只每次 0.3 毫升。试验时药物用量为小白鼠耐受量的 1/3, 每日给药两次。预防组在病毒感染前给药 4 次, 治疗组在感染后给药 6 次, 空白对照(即病毒对照)以自来水代替药物, 连续观察 10 天, 最后计算药物对小白鼠死亡保护率。

药物保护率 = 对照组小白鼠死亡率 - 试验组小白鼠死亡率。

试验结果

一、组织培养筛选法(见表 1)

无效药物有: 石膏、板兰根、棉子酚。医学科学院药物研究所合成药物 V7404、V632、V7418、V73-14、V74-1 V74-2、V74-4、G₂591、蒲公英、地丁、杏仁、大青叶、陈皮、黄芪、党参、补骨脂、紫河车、白术、麻黄、薄荷等 24 种药物。

二、鸡胚筛选法(见表 2)

无效药物与初筛相同。五味子、诃子、V7403、北京 1 号只表现有体外灭毒作用。吗

表 1 17 种有效药物

药物名称	最低有效浓度*(%)	药物名称	最低有效浓度(%)
银柴胡(水煎剂)	3.125	诃子(水煎剂)	1
紫草(水煎剂)	25	五味子(水煎剂)	5
连翘(水煎剂)	12.5	糙苏(水煎剂)	20
泽漆麻(水煎剂)	2.5	黄杨(水煎剂)	1
山藿香(水煎剂)	25	V7403(水溶液)	25
黄连(水煎剂)	1	北京 1 号(水溶液)	0.031
鱼腥草(水煎剂)	2.5	吗咪呱(水溶液)	2.5
野菊花(水煎剂)	1	金刚烷胺(水溶液)	0.725
枇杷叶(水煎剂)	2.5		

* 为 A₀、A₃、新 A₃ 鸡痘病毒 4 次试验结果平均值。

表 2 17 种有效药物

药物名称	体外灭毒最低有效浓度(%)*	体内预防最低有效浓度(%)	体内治疗最低有效浓度(%)
银柴胡(水煎剂)	3.125	50	50
糙苏(水煎剂)	50	50	75
紫草(水煎剂)	50	50	50
连翘(水煎剂)	50	50	50
泽漆麻(水煎剂)	5	20	30
山藿香(水煎剂)	25	50	50
黄连(水煎剂)	15	25	50
鱼腥草(水煎剂)	25	50	50
野菊花(水煎剂)	15	25	50
枇杷叶(水煎剂)	10	50	50
诃子(水煎剂)	10	(-)	(-)
五味子(水煎剂)	10	(-)	(-)
黄杨(水煎剂)	5	10	10
V7403(水溶液)	25	(-)	(-)
北京 1 号(水溶液)	0.1	(-)	(-)
吗咪呱(水溶液)	5	5	10
金刚烷胺(水溶液)	1.25	1.25	1.25
空白对照	病毒生长(-)	病毒生长(-)	病毒生长(-)

* 同表 1

咪呱、金刚烷胺为对照药物。

三、小白鼠筛选法(见表 3)

本试验中具有较高疗效的药物有银柴胡、泽漆麻、黄杨、糙苏。

总结与讨论

1. 本文用三种筛选方法对 39 种中草药及化学药物进行了系统的筛选试验, 从组织培养法和鸡胚法(表 1, 2)筛出的 17 种药物来看, 筛选结果完全一致。小白鼠法筛选结果淘汰了一

表 3 小白鼠法筛出的有效药物*

药物名称	给药剂量 (克/公斤 体重)	体内治疗死 亡保护率 (%)	体内预防死 亡保护率 (%)
银柴胡(水煎剂)	25	35	37
泽漆麻(水煎剂)	25	37	33
黄杨醇提取物	0.2	30	31
鱼腥草(水煎剂)	25	10	8
黄 连(水煎剂)	25	5	8
野菊花(水煎剂)	25	25	28
糙 苏(水煎剂)	25	2	42.5
紫 草(水煎剂)	25	5	10
连 翘(水煎剂)	25	7	15
山 薷 香(水煎剂)	25	12	15
金刚烷胺(水溶液)	0.055	50.75	50
吗 啉 呱(水溶液)	0.1	23	20
自来水对照	0	0	0

* 体内治疗与体内预防的动物数均为 20 只。表内百分数为 WS 株三次实验结果平均值。

部分药物，余下的 10 种药物中以银柴胡、泽漆麻、黄杨、糙苏为最好，介于金刚烷胺、吗啉呱之间，虽然低于金刚烷胺，但金刚烷胺有较大的毒副作用，不及上述四种药物安全。几年来应用筛选出的药物进行 1000 例流感病人治疗和 10000 人的服药预防，均得到满意效果。

2. 筛出的有效药物对 A_0 (PR8) 株、 A_3 (粤防 72—243 株)、 A_3 (郑防 75-1 株) 和我们分离的鸡瘟野毒株均有相同的灭毒效果，初步认为用药物防治流行性感冒不受毒种变异的影响，是其最大的优点，至于这些药物对其他呼吸道病毒有无作用，尚待探讨。