

· 中药抗菌抗病毒研究 ·

疏风宣肺解毒汤抗甲 1 型流感病毒诱导细胞凋亡的研究

冯振宇 赵建平

【摘要】 目的 探讨疏风宣肺解毒汤对甲 1 型流感病毒感染的犬肾传代细胞凋亡的影响。**方法** 将犬肾传代细胞分为六组:正常细胞对照组、病毒对照组、疏风宣肺解毒汤治疗组、疏风宣肺解毒汤对照组、奥司他韦治疗组、奥司他韦对照组,含药组均加入相应的最大无毒限量药液,Annexin V 和 PI 双染用流式细胞仪(flow cytometry,FCM)测定细胞凋亡的百分率。**结果** 疏风宣肺解毒汤治疗组和奥司他韦治疗组的凋亡率显著低于病毒对照组($P<0.01$),而高于其药物对照组($P<0.01$);疏风宣肺解毒汤对甲 1 型流感病毒诱导的细胞凋亡的抑制率(IR)为 67.07%,奥司他韦为 76.36%。**结论** 疏风宣肺解毒汤可抵抗甲 1 型流感病毒诱导的细胞凋亡,作用与奥司他韦相近。

【关键词】 疏风宣肺解毒汤; 流感病毒; 犬肾传代细胞; 细胞凋亡

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.02.003

Study of Shufengxuanfeijiedu Decoction in inhibiting cell apoptosis induced by influenza virus A1

FENG Zhen-yu, ZHAO Jian-ping. Department of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Province Hospital on Integrated Chinese and Western medicine, Taiyuan 030013, China

Corresponding author: FENG Zhen-yu, E-mail: sxzy@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Shufengxuanfeijiedu Decoction on the apoptosis of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells infected by influenza virus A1. **Methods** MDCK cells were divided into 6 groups: control group of normal cells, virus control group, Shufengxuanfeijiedu Decoction treatment group, Shufengxuanfeijiedu Decoction control group, Oseltamivir treatment group, Oseltamivir control group. Each group were added to the highest non-toxic doses of the corresponding liquide. The percentage of apoptotic MDCK cells was calculated through flow cytometry by Annexin V and PI co-dyeing. **Results** Shufengxuanfeijiedu Decoction treatment group and Oseltamivir treatment group were significantly lower than the virus control group($P<0.01$), but higher than their corresponding drug control group($P<0.01$); the inhibition rate (IR) of influenza virus A1 induced MDCK cells apoptosis of Shufengxuanfeijiedu Decoction was 67.07%, while the IR of Oseltamivir was 76.36%. **Conclusion** The results of the present study suggested that Shufengxuanfeijiedu Decoction resist against the apoptosis induced by influenza virus A1 and have comparable effect to Oseltamivir.

【Key words】 Shufengxuanfeijiedu Decoction; Influenza virus; Madin-Darby canine kidney cell; Cell apoptosis

人类呼吸道病毒性感染的常见病原体有流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、鼻病毒和冠状病毒等。具有传染性强、传播迅速、极易

流行等特点。目前治疗流感的主要药物是奥司他韦(达菲),因其价格、耐药性、一定的毒副作用及储备量不足等问题,很难应对大面积出现的流行性感冒(流感)。因此,发挥中医药优势,研究有效防治流感的中药复方具有重要意义。疏风宣肺解毒汤主要由桑叶、菊花、杏仁、桔梗、连翘、生地、柴胡、沙参、甘草组成(保密方),以清热解毒、宣肺解表立法。该方经临床观察,对流感以及各种病毒引起的

基金项目:国家中医药管理局传染病防治行业专项(200907001-2);山西省科技攻关项目(20090312020-3)

作者单位:030013 太原,山西省中西医结合医院中医科

作者简介:冯振宇(1974-),硕士,主治医师。研究方向:中医外感病证研究。E-mail: sxzy@163.com

文献标引格式:

冯振宇, 赵建平. 疏风宣肺解毒汤抗甲1型流感病毒诱导细胞凋亡的研究[J]. 环球中医药, 2012, 5(2): 88-90.

急性呼吸道炎症均有一定疗效。本研究试图通过观察疏风宣肺解毒汤对甲 1 型流感病毒感染的犬肾传代(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞凋亡的影响,来探讨其抗流感病毒的分子生物学机制,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物和制剂

疏风宣肺解毒汤药材购自太原市同仁堂药店,常规方法煎煮、浓缩、干燥,用细胞维持液稀释配制 1 g/ml 浓度的药液。奥司他韦(Oseltamivir)购自太原市万民大药房,上海三维制药有限公司生产,批号:H20065414,规格:75 mg/粒,制备成浓度为 25 mg/ml 的混悬液。复方药液和对照药物混悬液均离心取上清,过滤除菌后置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 病毒株和细胞

甲 1 型流感病毒鼠肺适应株(甲 1/PR/8/1934)由中国疾病预防控制中心提供,经 9 日龄鸡胚尿囊腔接种培养传代,微量血凝试验滴定病毒效价,血凝效价测定 1:640 的病毒株为试验用毒株,-80℃ 冰箱保存。犬肾传代细胞购自北京病毒科学研究所。

1.3 试剂和设备

DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)等购自北京百和营科技发展有限公司,Annexin v-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,流式细胞仪为美国 BD FACSCalibur。

1.4 药物对 MDCK 细胞的毒性测定

在 96 孔细胞培养板,将 1 g/ml 的疏风宣肺解毒液和 25 mg/ml 的奥司他韦药液连续倍比稀释为 8 个浓度后分别加入到长成良好的 MDCK 单层细胞中,每孔 100 μl,每个浓度 4 孔,同时设细胞维持液对照组,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每天用倒置显微镜观察细胞病变情况,3 天后用 MTT 法于酶标仪测定 492 nm 波长处的 OD 值,计算药物最大无毒限量。其中最大无毒浓度:疏风宣肺解毒汤为 62.5 mg/ml,奥司他韦为 1.56 mg/ml。

1.5 病毒半数感染量测定

将病毒培养液做 10 倍系列稀释从 10⁻¹ 至 10⁻¹⁰。消化 MDCK,调整细胞密度至 1×10⁵ 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板,将各稀释度的病毒液接种于长成后的 MDCK 单层细胞中,每一稀释度 4 个复

孔,每孔 100 μl,同时设阴性对照,每孔加细胞维持液 100 μl,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 小时,弃去含病毒维持液,更换正常细胞培养液,继续培养,连续培养 3 天,观察细胞病变,用 Reed-Muench 法求出细胞半数感染量(TCID₅₀)。甲 1 型流感病毒(血凝滴度为 1:640)的 TCID₅₀ 为 10^{-4.5}。

1.6 药物对甲 1 型流感病毒感染的 MDCK 细胞凋亡影响的检测

试验分 6 组进行,病毒对照组(细胞+病毒液+细胞维持液)、正常细胞对照组(细胞+细胞维持液+细胞维持液)、疏风宣肺解毒汤治疗组(细胞+病毒液+疏风宣肺解毒汤药液)、疏风宣肺解毒汤对照组(细胞+细胞维持液+疏风宣肺解毒汤药液)、奥司他韦治疗组(细胞+病毒液+奥司他韦药液)、奥司他韦对照组(细胞+细胞维持液+奥司他韦药液)。将长成单层的细胞瓶用 PBS 冲洗 3 次,分别接种上述各组不同的液体入细胞瓶内,含药组均加入相应的最大无毒限量药液,37℃、5% CO₂ 条件下孵育,观察细胞,细胞产生病变时分别收集各组细胞测试。

将培养的 MDCK 细胞用 PBS 洗 3 次后进行试验,各组于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 小时后收集上清液,悬浮细胞离心(2000 rpm 离心 5 分钟)收集,贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集(胰酶消化时间不易过长,否则容易引起假阳性);用 PBS 洗涤细胞二次(2000 rpm 离心 5 分钟)收集 1×10⁵ ~ 5×10⁵ 细胞;加入 500 μl 的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μl AnnexinV-FITC 混匀后,加入 5 μl 碘化丙啶(ProPidiumIodide,PI),混匀;室温、避光、反应 5 ~ 15 分钟;在 1 小时内流式细胞仪的观察和检测,共计算 10 000 个细胞,每标本测试 4 次。同时计算药物对病毒诱导 MDCK 细胞凋亡的抑制率(inhibition ratio,IR)。

$$\text{附:IR} = \left(1 - \frac{\text{试验组细胞凋亡率} - \text{正常细胞组凋亡率}}{\text{感染组细胞凋亡率} - \text{正常细胞组凋亡率}} \right) \times 100\%$$

流式细胞仪分析条件:激发波长 Ex=488 nm;发射波长 Em=530 nm。AnnexinV-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道(FL1)检测;PI 红色荧光通过 PI 通道(FL3)检测。荧光补偿调节:使用未经凋亡诱导处理的正常细胞,作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

1.7 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较用单因素方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

各组细胞用双染后,根据 AnnexinV 与正常及凋亡细胞膜上的磷脂酰丝氨酸(PS)结合情况不同及碘化丙啶(PI)与不同细胞 DNA 结合情况的不同,用流式细胞仪检测 24 小时的凋亡百分率,每组重复测试 4 次,每次均设有阴性对照组,结果表明,病毒对照组、各药物对照组和治疗组的凋亡率显著高于正常细胞对照组($P<0.01$);疏风宣肺解毒汤治疗组和奥司他韦治疗组的凋亡率显著低于病毒对照组($P<0.01$)。而高于其药物对照组($P<0.01$)。疏风宣肺解毒汤可抑制流感病毒诱导的细胞凋亡,抑制率为 67.07%,与奥司他韦治疗组相近(76.36%)。见表 1。

表 1 疏风宣肺解毒汤对甲 1 型流感病毒感染的 MDCK 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	24 小时凋亡率	细胞凋亡的抑制率(%)
正常细胞对照组	4	4.07±0.66	-
病毒对照组	4	51.62±3.30 ^a	-
疏风宣肺解毒汤对照组	4	16.05±1.05 ^a	-
奥司他韦对照组	4	11.22±1.64 ^a	-
疏风宣肺解毒汤治疗组	4	19.73±1.81 ^{abc}	67.07
奥司他韦治疗组	4	15.31±0.88 ^{abc}	76.36

注:与正常细胞对照组比较,^a $P<0.01$;与病毒对照组比较,^b $P<0.01$;与相应药物对照组比较,^c $P<0.01$;"-"表示无此项。

3 讨论

流行性感是流感病毒引起的一种发病率高、流行广泛、传播迅速的急性呼吸道传染病,主要侵犯呼吸道黏膜气管、支气管、细支气管和肺泡表面的上皮细胞,使细胞出现空泡、皱缩、纤毛丢失、细胞核圆缩和破碎,最后细胞凋亡、坏死脱落,引起感冒临床症状。流感病毒分为甲、乙、丙 3 型。目前人群中流行的主要为甲型流感病毒。Tak-Zawa 等^[1]于 1993 年发现,体外培养的犬肾传代细胞(MDCK)感染甲型流感病毒后,细胞出现染色体浓缩、凝聚,凋亡小体形成等一系列凋亡变化,从而首次提出流感病毒可诱导体外培养细胞发生凋亡。随后,又有研究表明流感病毒能诱导鸡体内细胞、小鼠气管、支气管上皮细胞、肺泡及淋巴细胞凋亡的发生^[2,3]。随着更深入全面的研究,Hinshaw 等^[4]用人

凋亡阻滞剂 Bcl-2 基因转染 MDCK 细胞后,发现转染细胞不会出现凋亡,进一步证明了诱导凋亡是流感病毒引起细胞死亡的机制之一。

本研究结果表明:甲 1 型流感病毒感染 MDCK 细胞后,MDCK 细胞凋亡率显著高于正常细胞($P<0.01$),说明流感病毒可诱导体外培养细胞发生凋亡,与上述文献报道相同。

本研究也表明疏风宣肺解毒汤治疗组和奥司他韦治疗组的凋亡率显著低于病毒对照组($P<0.01$),说明疏风宣肺解毒汤可抑制甲 1 型流感病毒感染引起的 MDCK 细胞凋亡,阻滞流感病毒在体外细胞内增殖,其对甲 1 型流感病毒感染诱导的细胞凋亡抑制率为 67.07%,与奥司他韦(76.36%)接近,足见疏风宣肺解毒汤对甲 1 型流感有良好的防治作用,为临床应用疏风宣肺解毒汤治疗甲 1 型流感提供了分子生物学实验依据;但同时疏风宣肺解毒汤的凋亡率又高于其药物对照组($P<0.01$),提示疏风宣肺解毒汤本身也可以引起细胞的凋亡,相应机制有待进一步研究。

中医药防治疫病有几千年的历史和丰富的临床经验,其临床疗效肯定、毒副作用小、价廉已被世界所公认。疏风宣肺解毒汤以清热解毒、宣肺解表立法,经临床验证,其清热解毒、透邪解表的功效确切,其抗流感病毒作用应该是抑制流感病毒诱导细胞凋亡、阻滞病毒在宿主细胞内增殖,进而干扰病毒在体内大量复制。但其自身引起宿主细胞凋亡及抑制甲 1 型流感病毒感染引起的 MDCK 细胞凋亡是否与调控细胞凋亡途径、影响凋亡信号传导、调控凋亡相关基因表达、调控细胞因子等有关以及有何关联,这些详细机理都有待深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Takieusa T, Matsukawa S, Higuchi Y, et al. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells[J]. J Gen Virol, 1993, 74 (Pt 11): 2347.
- [2] Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, et al. In vivo induction of apoptosis by influenza virus [J]. J Gen Virol, 1995, 76 (11): 2869-2873.
- [3] Toshihiro I, Kobayashi Y, Morita T, et al. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens [J]. Virus Research, 2002, 84(1-2): 27-35.
- [4] Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, et al. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses [J]. J Virol, 1994, 68(6): 3667-3673.

(收稿日期:2011-10-10)

(本文编辑:刘群)