

盐酸阿比朵尔抗柯萨奇病毒 B₃ 的实验研究

熊海蓉¹, 杨占秋^{1**}, 刘颖娟¹, 肖红¹, 关意洪²

(1. 武汉大学医学院病毒学研究所, 教育部病毒学重点实验室, 湖北武汉, 430071; 2. 湖北潜江制药股份有限公司, 湖北潜江, 433100)

Inhibitory Effect of Arbidol Hydrochloride on Coxsackievirus B₃ Group in vitro

XIONG Hai-rong¹, YANG Zhan-qi^{1**}, LIU Yin-juan¹, XIAO Hong¹, GUAN Yi-hong²

(1. Key Laboratory of Virology of the Ministry of Education, Institute of Virology, School of Medicine of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Hubei Qianjiang Pharmaceutical CO. LTD, Qianjiang 433100, China;)

Abstract: To study the antiviral activity of Arbidol hydrochloride on Coxsackievirus Group B₃ (CVB₃), the antiviral effect of Arbidol hydrochloride were evaluated with virus inhibitory rates by MTT assay and 50% tissue culture infection dose (TCID₅₀) of the supernatant. The results showed that the viral inhibitory rates were up to 75.48%, 45.68%, 28.90% and 48.27% respectively in interrupting viral biosynthesis group, directly killing virus group, interfering in viral absorption and penetration groups (2h and 8h). In interrupting viral biosynthesis group, Arbidol hydrochloride could significantly inhibit cytopathic effect (CPE) of CVB₃-infected HEp-2 cells, increase survival rates of CVB₃-infected cells in dose dependent manner and decrease viral titers of the supernatant. It indicates that Arbidol hydrochloride has antiviral effect against Coxsackievirus group B₃ (CVB₃).

Key words: Arbidol hydrochloride; Coxsackievirus group B₃; Antiviral effect

摘要:为观察盐酸阿比朵尔对柯萨奇病毒的抑制作用,本实验以利巴韦林为阳性对照药物,采用细胞培养技术、细胞病变效应(CPE)抑制法、活细胞染色计数法(MTT)和培养上清中病毒滴度测定观察盐酸阿比朵尔抗柯萨奇病毒的作用。结果表明盐酸阿比朵尔的半数中毒浓度(TD₅₀)为896.54μg/mL,药物抗病毒生物合成组、药物直接作用组、药物抗病毒吸附2h组、药物抗病毒有吸附8h组的病毒抑制率分别能达到74.48%、45.68%、28.90%和48.27%,在抗生物合成组,盐酸阿比朵尔能明显抑制柯萨奇病毒所致的CPE效应,降低培养上清中的病毒滴度,病毒抑制率随药物浓度增加而增高,存在量效关系。这提示盐酸阿比朵尔在细胞内对柯萨奇病毒有一定的抑制作用。

关键词: 盐酸阿比朵尔;柯萨奇病毒;抗病毒作用

中图分类号:R 373 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)02-0121-04

盐酸阿比朵尔(Arbidol hydrochloride),化学名为6-溴-4-(二甲氨基)-5-羟基-1-甲基-2-(苯硫甲基)-1H-咪唑-3-羧酸乙酯盐酸盐-水合物,是前苏联药物化学研究中心研制的抗病毒新药,1993年在俄罗斯首次上市,是一新的抗病毒药物和免疫刺激剂,用于防治流行性感冒和其它急性呼吸道病毒感染^[1],它对甲、乙型流感病毒的抗病毒活性最为显著,该药能抑制甲、乙型流感病毒复制的早期阶段,能抑制病毒与细胞浆膜的融合以及病毒与内吞囊泡之间的膜融合(pH=5.0)^[2]。同时盐酸阿比朵尔在

体内还可诱导产生干扰素,对巨噬细胞的吞噬功能有显著的活化作用,具有免疫调节作用^[3]。但迄今未见抗其他病毒作用的报道。柯萨奇B组病毒是病毒性心肌炎的主要病原体,也能在夏季引起广泛的发热性感冒和咽痛,并可导致肺炎^[4]。目前尚未见盐酸阿比朵尔的抗病毒机制及抗病毒谱相关研究报道,为此,我们合成了该药并在细胞内观察了盐酸阿比朵尔抗柯萨奇病毒B₃(Coxsackievirus Group B₃, CVB₃)作用,结果如下。

收稿日期:2004-10-25,修回日期:2004-11-02

作者简介:熊海蓉(1978-),女,湖北省籍,硕士研究生,主要从事临床病毒学研究。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel:027-68759136, E-mail: yangzhanqiu@163.com

1 材料和方法

1.1 实验材料

盐酸阿比朵尔粉剂为我们合成的药物,用二甲亚砜(DMSO)与双蒸水(V/V为1/9)溶解,制成浓度为5mg/mL的溶液,利巴韦林(Ribavirin)为湖北江陵制药公司生产(批号为20030303),用双蒸水制成10mg/mL的溶液,两种药物均过滤除菌,密封后4℃冷藏保存。RPMI1640为HyClone公司产品,新生牛血清为三利生物制品厂产品,MTT为Amresco公司产品。HEp-2细胞、柯萨奇病毒(CVB₃)由本室保存,CVB₃经HEp-2细胞增殖活化后滴定其滴度为10¹² TCID₅₀/0.1mL。

1.2 药物对细胞的毒性实验

用2%维持液将盐酸阿比朵尔、利巴韦林药液稀释成不同的浓度,加入培养板的单层细胞中,同时设立细胞对照,48h后,观察细胞形态学变化并用MTT法进行活细胞染色,读取OD₅₇₀值,根据OD值计算细胞存活率判断不同浓度药物对细胞毒性的作用,同时设溶剂对照(DMSO ddH₂O为1/9混合后过滤除菌,与实验组相同稀释比例加入细胞)。

1.3 药物抗病毒作用的检测

拟定盐酸阿比朵尔对CVB₃的作用分成四个组。组(药物抗病毒生物合成组):先加病毒液吸附细胞2h后再加含药维持液。组(药物直接作用组):病毒液与不同浓度的药物作用2h,然后将混合液与细胞孵育2h后更换细胞维持液。组和组(药物抗病毒吸附2h、8h组):将不同浓度的药物加入到细胞内分别作用2h、8h后,弃去药液,再加病毒液,吸附2h后更换细胞维持液。

上述四组实验组每孔剂量设4个重复孔,同时设立未感染细胞对照、病毒对照和溶剂对照。35℃、5%CO₂培养,每天于倒置显微镜下观察细胞变化。待病毒对照孔细胞病变(Cytopathic effect, CPE)程度呈+++~++++,且对照细胞正常时,MTT法进行活细胞染色,读取OD_{570nm}值,根据OD值判断不同浓度药物对病毒抑制作用的大小,公式如下:

病毒抑制率(%) = (实验组 OD 值 - 病毒对照

组 OD 值) / (细胞对照组 OD 值 - 病毒对照组 OD 值) × 100 %

1.4 病毒滴度测定

取1.3项实验孔、病毒对照孔、细胞对照孔的培养上清液系列对数稀释,测定TCID₅₀。

1.5 数据处理

Probit 回归方法计算药物半数中毒浓度(TD₅₀)和半数有效浓度(ED₅₀),治疗指数(TI) = 药物半数中毒浓度(TD₅₀) / 半数有效浓度(ED₅₀)^[5],用Reed-Muench法^[6]计算病毒的TCID₅₀,应用LSD方法进行不同组别之间的两两比较,判断其间差别有无显著性,数据处理用SPSS 11.5软件完成。

2 结果与讨论

2.1 盐酸阿比朵尔对 HEp-2 细胞的细胞毒性

药物对细胞毒性作用表现为折光性增加,壁厚,变圆,破碎,脱落,并且吸光值下降。药物对细胞的毒性作用在一定范围内随着药物浓度的增加,细胞存活率降低,结果见表1。溶剂对照组显示DMSO浓度在7.8%时即对HEp-2细胞完全无毒性,肉眼观细胞形态正常,MTT法检测细胞存活率达到100%。用于药效学实验药物中DMSO含量不超过1.6%(V/V)。

2.2 盐酸阿比朵尔的抗病毒作用

实验表明盐酸阿比朵尔、利巴韦林抗病毒生物合成组能明显减轻CVB₃感染细胞CPE程度,阿比朵尔抗病毒生物合成组中随着药物剂量的增加,细胞皱缩、变圆、脱落、碎裂等CPE特征逐渐减弱(见图1)。阿比朵尔能降低上清中病毒滴度,病毒抑制率与药物浓度呈正相关,病毒滴度则与药物浓度呈负相关。DMSO对照组显示DMSO无抗病毒作用。实验结果见表2、表3。

本文应用LSD方法进行两两比较(取对数后),通过观察病毒抑制率显示盐酸阿比朵尔抗CVB₃组和组、组、组差别具有显著性($p = 0.018$ 、 0.001 、 0.031),且病毒滴度变化在组和组、组和组及组和组之间亦有差别($p = 0.049$ 、 0.001 、 0.024)。盐酸阿比朵尔抗CVB₃指数(TI)药

表1 盐酸阿比朵尔和利巴韦林对 HEp-2 细胞的细胞毒性

Table 1 Toxicity of arbidol hydrochloride and Ribavirin on HEp-2 cells

Drug	Drug concentration (μg/mL) / Cell Viability (%)											TD ₅₀ (μg/mL)
	2.5	5	10	20	40	100	250	500	1000	2000	4000	
Arbidol	118.4	112.6	102.4	92.80	89.60	81.07	70.4	69.33	51.2	-	-	896.54
Ribavirin	-	-	-	100	98.84	98.13	81.07	67.56	63.29	58.31	38.40	2776.91

- Not detect

表 2 盐酸阿比朵尔抗 CVB₃ 不同作用方式时病毒抑制率比较Table 2 The inhibitory rate and viral titers of the supernatant by arbidol hydrochloride on CVB₃ in different manners

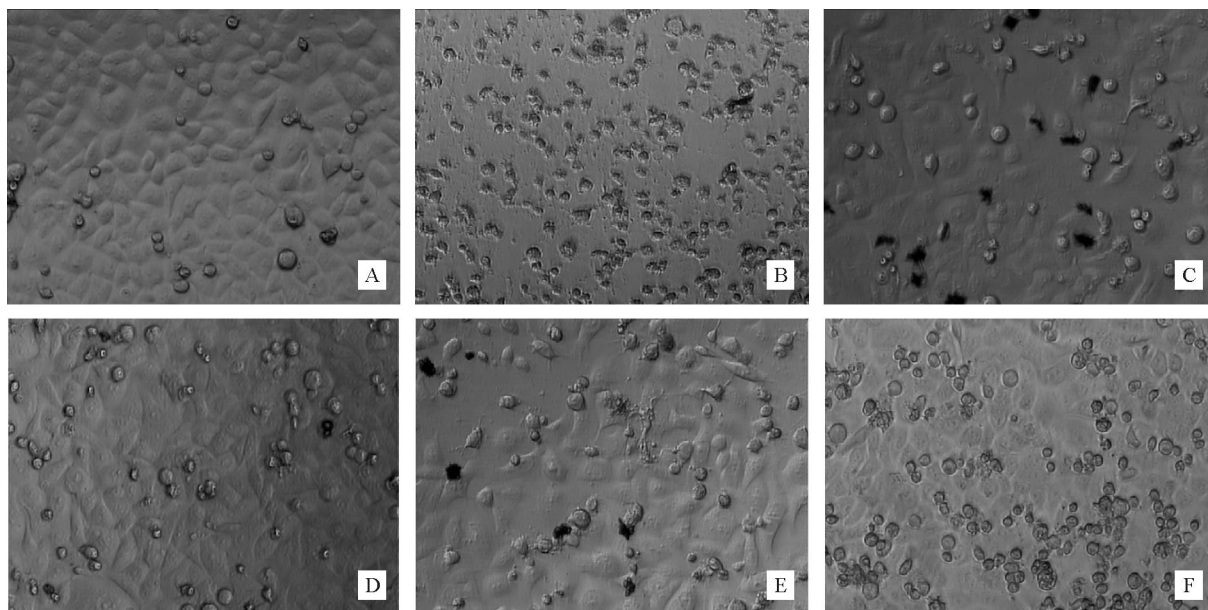
Experimental Groups	Drug Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						ED ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TI
	5	10	20	40	80	160		
VIR	0	44.63	46.83	73.28	75.48	66.67	46.48 ($p < 0.01$)	19.29
VT	$10^{-11.3}$	$10^{-6.3}$	$10^{-5.8}$	$10^{-2.3}$	$10^{-2.3}$	$10^{-4.3}$		
VIR	0	12.35	35.80	41.98	45.68	45.68	138.59 ($p < 0.01$)	6.47
VT	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-8.8}$	$10^{-6.3}$	$10^{-6.3}$	$10^{-6.3}$		
VIR	17.89	20.64	27.98	27.06	28.90	27.06	578.44 ($p > 0.05$)	1.55
VT	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$		
VIR	20.53	24.80	40.80	47.73	48.27	44.53	134.10 ($p < 0.01$)	6.69
VT	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{5.8}$	$10^{-6.3}$	$10^{-5.8}$	$10^{-6.3}$		

Group : Interrupting viral biosynthesis group; : Directly killing virus group; : Interfering in viral absorption and penetration group (2h); : Interfering in viral absorption and penetration group (8h). VIR: The viral inhibitory rate; VT: Viral titers of the supernatant.

表 3 利巴韦林抗 CVB₃ 不同作用方式时病毒抑制率比较Table 3 The viral inhibitory rate and viral titers of the supernatant by Ribavirin on CVB₃ in different manners

Experimental Groups	Drug Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						ED ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TI
	40	80	100	400	800	1 600		
VIR	0	20.30	32.33	38.34	53.38	44.36	1376.28 ($p < 0.01$)	2.02
VT	$10^{-11.3}$	$10^{-8.8}$	$10^{-8.3}$	$10^{-8.3}$	$10^{-5.8}$	$10^{-4.3}$		
VIR	0	2.47	7.41	25.93	33.33	17.28	2678.03 ($p < 0.01$)	1.04
VT	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-8.3}$	$10^{-7.8}$	$10^{-8.8}$		
VIR	9.63	19.72	16.97	15.14	15.14	19.72	9998.95 ($p > 0.05$)	0.28
VT	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$	$10^{-11.3}$		
VIR	31.73	38.13	45.07	44	38.67	44	3397.33 ($p > 0.05$)	0.82
VT	$10^{-8.8}$	$10^{-8.8}$	$10^{-6.3}$	$10^{-6.3}$	$10^{-8.8}$	$10^{-6.3}$		

Group : Interrupting viral biosynthesis group; : Directly killing virus group; : Interfering in viral absorption and penetration group (2h); : Interfering in viral absorption and penetration group (8h). VIR: The viral inhibitory rate; VT: Viral titers of the supernatant

图 1 盐酸阿比朵尔对 CVB₃ 在 HEp-2 细胞中致细胞病变作用的抑制效应Fig. 1 Effect of Arbidol Hydrochloride on cytopathic effect induced by CVB₃ in infected HEp-2 cells

A, Normal cells; B, Virus-infected cells; C, Treated with Arbidol Hydrochloride at 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D, Treated with Arbidol Hydrochloride at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E, Treated with Arbidol Hydrochloride at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F, Treated with Arbidol Hydrochloride at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

物抗病毒生物合成组 > 药物抗病毒吸附 8h 组 > 药物直接灭活组,说明该药主要是通过抑制病毒生物

合成而发挥抗病毒作用。有报道指出大黄提取液亦是抑制 CVB₃ 复制(生物合成)而发挥抗病毒作

用^[7],本文结果支持这一观点。柯萨奇病毒为无包膜病毒,通过吞饮方式侵入细胞,故盐酸阿比朵尔在药物抗病毒吸附实验组和药物直接灭活组并未显示明显的抗病毒效应,这一结果也提示该药只能作为柯萨奇病毒感染的治疗药物,但其疗效尚需通过体内实验来证实。与广谱抗病毒药物利巴韦林的对比实验发现,盐酸阿比朵尔的 TI 高于利巴韦林,ED₅₀则反之(表 2、表 3 所示),说明其抗 CVB₃ 作用优于利巴韦林,作为一种新的抗柯萨奇病毒的药物有深入研究的价值。

参考文献

- [1] Shumilov V I, Shuster A M, Lobastov S P, *et al.* Efficacy of arbidol in prophylaxis and treatment of acute respiratory viral infections in servicemen [J]. *Voen Med Zh (Voenno-meditinskii zhurnal.)*, 2002, 323: 51-3, 96.
- [2] Leneva I, Hay A. The Mechanism of Action of Arbidol Against Influenza Virus. Selection and Characterization of Arbidol-Resistant Mutants[J]. *Antiviral Research*, 1998, 37:89.
- [3] Glushkov R G, Gus'kova T A, Krylova Llu, *et al.* Mechanisms of arbidole's immunomodulating action[J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 1999, 36-40.
- [4] 杨占秋,余宏,程丽,等. 临床病毒学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000.
- [5] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学 毒理学)[M]. 1993. 166.
- [6] 傅继华,张静,李文,等. 病毒学实用实验技术[M]. 济南:山东科学技术出版社, 2001, 61-64.
- [7] 申元英,杨占秋,刘建军,等. 大黄提取液抗柯萨奇病毒 B₃ 的试验研究[J]. *北京中医药大学学报*, 1999, 22:65-66.