

病毒唑体内外抗病毒作用

康淑卿 蔡胜勇 滕立 陈鸿珊

(中国医学科学院药物研究所病毒室, 北京)

1972年美国加利福尼亚州核酸研究所报道了1- β -D-呋喃核糖基-1, 2, 4-三氮唑-3-羧基酰胺(1- β -D-Ribafuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide)在组织培养上有广谱抗病毒作用^[1-3]。简称三氮唑核苷(Ribavirin), 商品名病毒唑(Virazole)。为无色、水溶、稳定的核苷类化合物^[1]。在组织培养上能抑制13种RNA病毒和7种DNA病毒的繁殖, 但对病毒无直接灭活作用^[1]。

在动物实验中也证明病毒唑是个广谱抗病毒药物^[4-6]。对小鼠抗流感作用较好。

1974年我国湖北医药工业研究所合成了病毒唑。本文就国产病毒唑在组织培养上的抗病毒作用及其在小白鼠体内抗流感病毒作用进行了研究, 为该药在临床试用上提供依据。

材料和方法

(一) 组织培养试验

1. 病毒株

(1) 流行性乙型脑炎病毒: 京卫研1(A₂)株。小鼠适应株, 鼠脑传代;

(2) 痘苗病毒: 卫生部药品生物制品检定所的痘苗病毒, 天坛株。

(3) 新城鸡瘟病毒: 2系弱毒株。鸡胚尿囊传代;

(4) 甲型流感病毒WS株, 鸡胚尿囊传代;

(5) 副流感病毒3型: 人胚肾细胞传代, HAI株;

(6) 副流感病毒2型: CA株, 人胚肾细胞传代;

(7) 腺病毒3型: 国内分离, 人胚肾细胞传代;

(8) 腺病毒7型: 国内分离, 人胚肾细胞传代;

(9) 单纯疱疹病毒1型: SM 44, 人胚肾细胞传代;

(10) 合胞病毒(RSV): Long株, HeLa细

胞传代;

(11) 柯萨奇病毒B₄: 人胚肾细胞传代;

(12) 艾柯病毒9: 人胚肾细胞传代。

病毒(1)~(4)用鸡胚纤维母细胞空斑方法观察药物抑制作用。病毒(5)~(9)、11、12用人胚肾单层细胞培养, 观察药物抑制细胞病变作用。病毒(10)用人羊膜传代细胞培养, 观察药物抑制细胞病变作用。

2. 实验方法和效果判断

(1) 组织培养空斑方法: 用6厘米直径的平皿, 培养单层鸡胚纤维母细胞。培养24小时后吸出培养液, 加入病毒, 在37℃吸附1~2小时后加琼脂上层。将滤纸片放在上层上, 并加入0.05~0.1毫升药物。经72~96小时后观察抑制带宽度和毒性直径大小。一般抑制带宽<0.5厘米为可疑, ≥0.5厘米为有效。

(2) 人胚肾和传代人羊膜细胞用试管细胞单层培养法: 病毒和药物同时加入, 经一定时间培养后, 观察病毒对对照组和药物组细胞病变。对照组如出现细胞病变, 而实验组无病变为有效。抗病毒作用以比对照组病变延迟天数为指标。

(二) 抗菌实验

采用普通肉汤培养法, 培养20小时后记录结果, 用肉眼观察, 有菌生长就做为无抗菌作用。

(三) 动物实验

用甲1型流感病毒FM1株小鼠适应株滴鼻, 感染小白鼠, 实验中所用病毒量为可使病毒对对照组的小白鼠70~100%致死。每组14~15克小鼠20只, 分为给药治疗组、病毒对照组和药物对照组。观察14天或21天, 记录死亡数, 统计结果。药物用盐水稀释。每天每公斤体重200~500毫克, 每天口服一次给药, 共三天组、五天组, 有隔日给药一次、共三次组。滴鼻感染后开始给药时间不同, 分别为2、24、48、72小时后开始给药治疗

本文于1978年12月19日收到。

各组。

实 验 结 果

一、病毒唑在组织培养中的抗病毒谱

在组织培养中观察病毒唑对 12 种病毒的作用,结果说明对其中 11 种病毒空斑形成或细胞病变(CPE)有抑制作用。但每毫升 500 微克时仍无抗艾柯 9 病毒的作用。

表 1 病毒唑对四种病毒空斑形成的影响

病 毒 种 类	药物剂量 (毫克/纸片)	抗病毒作用	
		毒 性 (直径、厘米)	抑制空斑形成带宽 (厘米)
流行性乙型脑炎病毒	2	—	5
痘苗病毒	2	—	6
新城鸡瘟病毒	2	—	3.5
甲型流感病毒 WS 株	2	—	5

表 2 病毒唑抑制两种病毒空斑形成的最小有效浓度

实验批号	药物浓度 (毫克/纸片)	抑制流行性乙型脑炎病毒空斑形成			抑制甲型流感病毒 WS 株空斑形成	
		毒性	抑制带宽 (厘米)	最小有效浓度 (毫克/纸片)	抑制带宽 (厘米)	最小有效浓度 (毫克/纸片)
1	2	—	5	0.02	3—4	0.02
	0.2	—	4		3	
	0.02	—	3		3	
	0.002	—	—		—	
	0.0002	—	—		—	
2	2	—	5	0.02	6	0.02
	0.2	—	4		5	
	0.02	—	3		5	
	0.002	—	—		—	
	0.0002	—	—		—	
3	2	—	5	0.02		
	0.2	—	3.5			
	0.02	—	2.5			
	0.002	—	—			
	0.0002	—	—			
4	2	—	3—5	0.02		
	0.2	—	4			
	0.02	—	4			
	0.002	—	—			
	0.0002	—	—			

1. 病毒唑在鸡胚纤维母细胞培养中抑制流行性乙型脑炎病毒、痘苗病毒、新城鸡瘟病毒、甲型流感病毒 WS 株的空斑形成。实验结果列于表 1。当采用 2 毫克/滤纸片的病毒唑时,对流行性乙型脑炎病毒空斑形成的抑制带为 5 厘米、对痘苗病毒为 6 厘米、新城鸡瘟病毒为 3.5 厘米、甲型流感病毒 WS 株的抑制带为 5 厘米。用上述空斑抑制法测定了病毒唑抗乙型脑炎病毒和甲型流感病毒 WS 株的最小有效浓度见表 2。病毒唑抗以上两种病毒的最小有效浓度均为 0.02 毫克。

2. 病毒唑抑制副流感 2、3 型等 7 种病毒的细胞病变。实验结果列于表 3。对副流感病毒 2、3 型、腺病毒 3 型、7 型、HSV1 型、合胞病毒、柯萨奇病毒 B₁ 的最小有效浓度为 10—1000 微克/毫升。但病毒唑对艾柯 9 病毒没有细胞病变抑制作用。抗合胞病毒的最小有效浓度为 10 微克/毫升。

表 3 病毒唑对副流感病毒等八种病毒细胞病变的影响

病毒种类	细胞种类	最小有效浓度 (微克/毫升)	比对照组细胞病变延迟出现天数	效果估计
副流感病毒 3 型	人 胚 肾 单层细胞	100—1000	>10	+
副流感病毒 2 型	人 胚 肾 单层细胞	100—1000	>1—8	+
腺病毒 3 型	人 胚 肾 单层细胞	100—1000	2—3	+
腺病毒 7 型	人 胚 肾 单层细胞	1000	1—3	+
单纯疱疹病毒 (HSV) 1 型	人 胚 肾 单层细胞	1000	1—2	+
合胞病毒 (RSV)	人 羊 膜 传代细胞	10	>3	+
柯萨奇病毒 B ₁	人 胚 肾 单层细胞	500	1	+
艾柯病毒 9	人 胚 肾 单层细胞	>500	—	?

注：“+”为有效。

二、病毒唑的抗菌作用

实验中采用二倍稀释法,培养 20 小时后记录结果,见表 4。实验结果说明病毒唑在 500 微克/毫升时对所试 14 种革兰氏阴或阳性菌均无抑制生长作用。

表 4 病毒唑在试管内的抗菌作用

菌 种	病毒唑浓度 0.97—500 (微克/ 毫升)	菌对照	最低抑菌 浓度 (微克/ 毫升)
肺炎双球菌	+	+	>500
甲链球菌 10	+	+	>500
乙链球菌	+	+	>500
肠球菌 333	+	+	>500
金黄色葡萄球菌 15	+	+	>500
金黄色葡萄球菌 209	+	+	>500
枯草杆菌	+	+	>500
八叠球菌	+	+	>500
大肠杆菌 1515	+	+	>500
变形杆菌 9	+	+	>500
肺炎杆菌 7	+	+	>500
福氏痢疾杆菌	+	+	>500
伤寒杆菌	+	+	>500
绿脓杆菌	+	+	>500

三、病毒唑对感染流感病毒小白鼠死亡率的影响

1. 一次口服给药抗流感病毒感染效果：用 FM1 流感病毒感染小白鼠后立刻口服给药一次，观察 14 天，统计结果，见表 5。每公斤体重用 400、200、100、50 毫克病毒唑口服对小白鼠死亡率无影响，无统计价值，药量增加到 1000 毫克时虽对死亡率无影响，但可延长平均存活日数 5 天，($p < 0.05$) 见表 6。

2. 隔日给药一次，共给药三次对小白鼠死亡率的影响：滴鼻感染后立刻口服给药，以后隔日给药一次，共三次，观察 14 天，记录死亡率。结果列于表 7。当病毒对照组小鼠 100% 死亡时，给药组比对照组，减少死亡率达 70—90%，统计非常显著， $p < 0.001$ 。

表 5 病毒唑一次口服给药对感染副流感病毒小白鼠死亡率的影响

药 量 (毫克/ 公斤)	病毒量 $\geq 100LD_{50}$				病毒量 $\geq 10LD_{50}$			
	第一批 实 验		第二批 实 验		第一批 实 验		第二批 实 验	
	死亡率	平均 存活日	死亡率	平均 存活日	死亡率	平均 存活日	死亡率	平均 存活日
400	10/10	7.4	10/10	6.6	5/10	15.6	10/10	8.1
200	10/10	7.2	10/10	7.6	9/10	9.8	10/10	6.6
100	10/10	6.4	10/10	6.2	10/10	7.9	7/10	9.3
50	10/10	6.2	10/10	5.1	9/10	8.5	9/10	8.1
病毒对照	10/10	6.1	10/10	5.3	8/10	10.0	10/10	7.0

表 6 病毒唑大量一次口服对感染小白鼠死亡率的影响

药 量 (毫克/ 公斤)	病毒量 $\geq 100LD_{50}$			病毒量 $\geq 10LD_{50}$		
	死亡率	平均存 活日	比对照 组延长 存活日 数(天)	死亡率	平均存 活日	比对照 组延长 存活日 数(天)
1000	7/10	13.4	4.8	2/10	18.0	3.4
500	7/10	12.5	3.9	1/10	19.0	4.4
病毒对照	9/10	8.6		5/10	14.6	

3. 每日给药一次，共给药三天对小鼠死亡率的影响：该给药方案也可降低死亡率，差异非常显著。 $p < 0.001$ ，实验结果列于表 8。

4. 开始给药时间对药物效果的影响：滴鼻感染后 2、24、48、72 小时开始给药，每日口服一次，每次 50—500 毫克/公斤/日，共给药三次，见表 8。从表 8 可以看到，在感染后 24、48、72 小时开始给药都能显著减少小白鼠死亡率，但感染后 2 小时开始给药二组差异不显著。此外小剂量组 50

表 7 病毒唑隔日给药一次对感染小白鼠死亡率的影响

药 量 (毫克/公斤)	病毒量 $\geq 100LD_{50}$				病毒量 $\geq 10LD_{50}$	
	实 验 1		实 验 2		实 验 1	
	死亡率	P 值	死亡率	P 值	死亡率	P 值
1000	9/20	—			10/20	—
500	6/20	$p < 0.001$	2/20	$p < 0.001$	1/20	$p < 0.001$
200	—	—	4/20	$p < 0.001$		
病毒对照	20/20		20/20		14/20	

注：1. 隔日给药一次，共给药三次。

2. 1000 毫克/公斤/日组有毒，有 1/5 小白鼠死亡，其他剂量组无毒。

表 8 感染后开始给药时间对感染流感病毒 (FM1) 小白鼠死亡数的影响

药物剂量 (毫克/ 公斤/日)	感染后开始给药时间(小时)											
	0			2			24			48		
500	2/10	3/10		1/10	2/10		6/10	1/10		0/10	2/10	1/10
		$p<0.05$			$p<0.05$					$p<0.05$		
200	0/10	0/10		3/10	5/10		1/10	3/10		1/10	0/10	0/10
	$p<0.05$	$p<0.001$					$p<0.001$			$p=0.01$	$p=0.04$	$p<0.001$
100	0/10	4/10		2/10	7/10		10/10	2/10		2/10	0/20	0/20
	$p<0.05$									12/20	11/20	$p<0.001$
50	0/10	6/10		1/10	5/10		4/10	1/10		1/10	8/20	8/20
	$p<0.05$									$p<0.05$	$p<0.001$	$p<0.001$
病毒对照	5/10	9/10		5/10	9/10		9/10	5/10		5/10	9/10	14/20

注：1. 药物对照无死亡小白鼠。 2. 感染后不同时间开始给药，每天一次，三天。

表 9 病毒唑五次给药对感染流感病毒 (FM1) 小白鼠死亡率的影响

药 物 剂 量 (毫克/公斤/日)	开始给药时间(小时)					
	24			48		
200	9/20	$p=0.001$		14/20	$p=0.02$	14/20 $p=0.02$
100	6/20	$p<0.01$		7/20	$p<0.001$	11/20 $p=0.002$
50	9/20	$p=0.001$		12/20	$p=0.005$	19/20
病毒对照	19/20			20/20		20/20

毫克/公斤/日效果较差。如果给药增至 5 次,即每日一次,共五天,可以提高小剂量组(50 毫克/公斤/日)的疗效,见表 9。说明病毒唑对流感病毒感染确有治疗作用。

本实验结果说明病毒唑有广谱抗病毒作用,无抗菌作用,可降低感染流感病毒小白鼠的死亡率,有一定的治疗作用。这为病毒唑的临床试用提供了可能性。

参 考 文 献

- [1] Witkowski, J. T. et al.: *J. Med. Chem.*, **15**: 1150—1154, 1972.
- [2] Sidwell, R. W. et al.: *Science*, **177**: 705—706, 1972.
- [3] Togo, Y.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **4**: 641—642, 1973.
- [4] Huffman, J. H. et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **3**: 235—241, 1973.
- [5] Tisdale, M. and D. J. Bauer: *Chemotherapy and Control of Influenza*, pp. 55—62, 1976.
- [6] Sidwell, R. W. et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **3**: 242—246, 1973.
- [7] Khare, G. P. et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **3**: 517—522, 1973.
- [8] Boyd, M. R. et al.: *Chemotherapy and Control of Influenza*, pp. 43, 1976.
- [9] Sidwell, R. W. et al.: *Chemotherapy*, **21**: 205—220, 1975.
- [10] Durr, F. E. et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **7**: 582—586, 1975.
- [11] Schofield, K. P. et al.: *Chemotherapy and Control of Influenza*, pp. 63, 1976.
- [12] Schofield, K. P. et al.: *Chemotherapy*, **6**: 253, 1975.
- [13] Walker, J. S. et al.: *J. Infect. Dis.*, **133** (Suppl.): A140—A144, 1976.
- [14] Sidwell, R. W. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **284**: 239—246, 1977.
- [15] Allen, L. B. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **284**: 247—253, 1977.
- [16] Berendt, R. F. et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **11**: 1069—1070, 1977.
- [17] Aresman, J. B. et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **12**: 40—48, 1977.
- [18] Stephen, E. L. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **284**: 264—271, 1977.