

中藥浸液在試管內对第 I 型脊髓 灰白質炎病毒作用的篩选*

向近敏 童劍輝

(湖北医学院, 中国科学院武汉微生物研究所, 武汉)

祖国医药, 是一个无穷无尽的宝库。为了发掘这一宝库, 我們应用人羊膜細胞培养法, 就某些中藥浸液, 是否能直接抑制第 I 型脊髓灰白質炎病毒引起細胞病变的作用, 进行了篩选研究。一共試驗了单方 40 种, 复方 20 种, 初步証明有一种单方及两种复方, 在試管內有抑制第 I 型病毒 Mahoney 株引起細胞病变的作用。本文即报告这一初步結果。

一、材料与方 法

一、組織培养法 按 Youngner 法^[1]处理人胎盘羊膜細胞^[2], 作单层細胞培养, 具体操作步骤, 有若干改进, 茲簡述于下:

取 2 小时左右的胎盘, 用血管鉗夹住脐带根部提起, 以大量无菌生理盐水冲洗羊膜表面的血球血块, 然后将羊膜細心剥下, 剪成約 1 寸見方的小块, 置 Hank's 液中, 将每块羊膜展开, 用镊子从边缘夹起羊膜块, 以另一无齿镊子夹住羊膜, 从上到下輕輕地刮。一部分粘液, 可以刮下, 有利于羊膜的消化。将如此处理的羊膜, 再置于 Hank's 液中, 洗 1 次, 刮 1 次, 然后置于 0.2% 胰酶 (Difco 1:250) 中, 在 37°C 水浴箱內, 消化 1.5—2 小时。消化后, 弃去消化液, 取出羊膜块, 置 Hank's 液中, 同消化前一样, 刮洗两次, 要更輕地刮, 以免将已經消化疏松的羊膜細胞刮下。最后置烧杯中, 以剪刀剪碎, 加入适量 Hank's 液, 用双层紗布滤过。可重复剪洗操作 2—3 次, 以期获得較大細胞量。所得細胞悬液, 以 Hank's 液洗涤 1—2 次, 然后以 30% 人血清 Hank's 液培养液作成 20—30 万/毫升的細胞悬液, 以一毫升量分装試管, 作靜止培养, 約 7—10 天左右, 即成为良好单层。細胞管于应用前, 以 37°C 溫 Hank's 液洗 3 次, 以除去培养細胞上附着的人血清成分。

試驗时所用的維持液, 能維持羊膜細胞的正常健康状态, 达两周以上, 并証明对病毒无抑制作用, 其式如下:

牛羊水	20%	馬血清	2%
牛胚浸液	0.5%	氨基酸輔助液 ^[3]	适量
水解蛋白素(上海)	0.1%	葡萄糖	1%
青霉素与鏈霉素各	100 单位/毫升	Hank's 液加至	100 毫升

二、中藥浸液制法 所用中藥, 来于中医处方, 都从市場藥店购得。以适当剂量(单方 20 克, 复方按中医处方剂量計算)加蒸馏水 5—10 倍(重/容), 煮沸 30 分钟过滤, 药渣加水等量, 再煮再过滤, 反复三次, 然后合并三次滤液, 蒸发浓缩至原来所用的藥物重量数, 如原用藥物为 20 克, 即蒸发至 20 毫升, 即成为 100% 的中藥煮浸液。儲存冰箱待用, 用前稀释。所有浸液, 都經高压蒸汽 15 磅經 20 分钟

* 罗經同志曾参加部分工作。
本文 1963 年 2 月 14 日收到

消毒滅菌。單方中柴胡一種，為武漢制藥廠製成的水劑注射液，每一毫升相當於柴胡 5 克，即以此注射液濃度，作為 100%。中藥浸液，除特殊情况如有的復方含有石膏等藥物外，pH 一般為鹼性，用 pH 7.4 左右的維持液稀釋應用時，一般不須調節 pH，此與劉國聲等^[4]所報告的中藥浸液一般偏酸，略有不同，或由於製法不同之故。

三、試驗方法

1. 中藥毒性試驗 以維持液稀釋中藥至不同濃度，每種濃度，接種兩管細胞，以視其對細胞有無毒性作用，即是否引起細胞病變。只取對細胞無病變作用的濃度，進行對病毒有無抑制作用的試驗。一般 10% 的濃度，即對細胞無病變作用。不過某些中藥，在此種濃度下，顏色深暗而微混，培養後，有時有沉淀物復蓋於細胞之上，有礙對細胞形態的觀察。小於 10% 的濃度，即無此種現象。所以試驗時直接與病毒作用的濃度，採用 5%，培養時的最後藥物濃度為 1%。因系初步篩選性質，所以只用了 1 個濃度。

2. 藥物對病毒作用的試驗 所用病毒為脊髓灰白質炎第 I 型病毒 Mahoney 株，系由北京生物制品研究所贈給。經我們用人羊膜傳代三次後應用，其 TCID₅₀ 為 $10^{-4.5-5.5}$ 。試驗時取病毒 0.22 毫升（每 0.2 毫升含 200 TCID₅₀ 病毒量）與 10% 的藥物 0.22 毫升混合，在 37℃ 溫箱作用 1 小時後，即接種兩管細胞管，每管 0.2 毫升，此時藥物與病毒直接作用的濃度為 5%，病毒濃度為 100 TCID₅₀/毫升。藥物病毒混合液與細胞接觸 1 小時後，即於每管加入 0.8 毫升的維持液，於是藥物又稀釋五倍，其最後濃度為 1%。作藥物對病毒的試驗時，同時作維持液對照，藥物對照及病毒對照。當維持液對照管，藥物對照管，皆無病變，而病毒對照管有病變時，始能得出結果。

3. 藥物對病毒作用的標準 病毒對照管在五天之內，發生顯著的病變，試驗管，藥物對照管，維持液對照管，在 10 天之內不發生病變（即細胞不變圓，不壞死，不從管壁脫落等），即說明藥物有抑制病毒作用。試驗重複 3 次，用同一批藥物制劑，都得到比較一致的結果。如試驗管亦發生病變，即作無效。

二、實驗結果

一、試驗了單方 40 種 木香，柴胡，生別甲，黃柏，川木瓜，生杜仲，赤茯神，地龍，馬錢子，黨參，川牛夕，麥冬，忍冬藤，銀花，檳榔，白寇仁，馬齒莧，防風，白芍，黃麻，生地，川姜，陳皮，五加皮，川芎，葛根，靈仙，連翹，川大活，白朮，甘草，金石斛，飛滑石，木通，知母，海金沙，桑枝，秦艽，桂皮，當歸。只武漢制藥廠製成柴胡水劑注射液一種有抑制病毒引起細胞病變的作用。

二、試驗了復方 20 種 只下列兩種復方對病毒有作用：

1. 生黃耆 6 錢，生白芍 5 分，當歸 2 錢，川芎 2 錢，秦艽 4 錢，防風 2 錢，生杜仲 1 兩，川牛夕 6 分，川木瓜 5 分，虎骨 2 錢，紅花 5 分，川姜 6 分。

2. 生黃耆 5 錢，白芍 2 錢，當歸 3 錢，川芎 5 分，秦艽 3 錢，防風 2 錢，生杜仲 5 錢，川木瓜 8 分，虎骨 3 錢，紅花 4 分，川大活 8 分。

已試的其他 18 種復方，都不見效果，僅將其組成列下，略去劑量：

1. 黨參，白朮，云苓，大棗，甘草，生薑，神曲，麥芽，木香，杜仲，杭甘戟，桑寄生。
2. 生石膏，葛根，甘草，銀花，杭芍，黃芩，全蝎，黃連。
3. 牛夕，木瓜，巴戟，全蝎，杜仲，天麻，刺馬，蜜制丸。
4. 蒼朮，防風，甘草，木瓜，當歸，桑寄生，川芎，赤芍，桂枝，靈仙，三七，川芎，獨活，熟地，赤茯。
5. 當歸，川芎，秦艽，桑枝，伸筋草，靈仙，獨活，蒼朮，木瓜，五加皮，毛姜，防風，甘草，桂枝，白芍，陳皮，地龍。

6. 当归,牛夕,秦艽,桑枝,木瓜,伸筋草,灵仙,独活,地龙,防风,白芍,細辛,党参,甘草,三七,熟地,陈皮,五加皮,海风屯。
7. 带心連翹,元参,鮮生地,山梔,竹叶,銀花,飞滑石,石菖蒲根,黄芩。
8. 玳瑁,川貝母,石菖蒲根,元参,細生地,赤芍,丹皮。
9. 川貝母,里山梔,元参,带心連翹,淡竹叶,清水豆卷,赤茯神,川石斛。
10. 元参,川石斛,麦冬,天花粉,太子参,淡竹叶,忍冬藤,細生地。
11. 細生地,生別甲,陈青蒿,佩兰,川石斛,米仁,淡竹叶,赤茯神,刀豆子,橘仁。
12. 上路党,佩兰,麦冬,橘仁,麦芽,杜仲,青蒿,赤茯神,生別甲,白寇仁。
13. 霍香,薄荷,佩兰,生石膏,陈皮,竹茹,川連,蚕沙,姜半夏,滑石,甘草。
14. 同 13 方加葛蒲,射干。
15. 葛根,霍香,橘皮,法夏,桔梗,勾藤,生石膏,甘草,銀花,赤芍。
16. 川芎,白芷,辛夷,天麻,薄荷,勾藤,全蝎,蜈蚣,生石膏。
17. 銀花,川連,地龙,蜈蚣,麻黄,生石膏,白僵蚕,甘草,杭菊,葛根,紫雪丹。
18. 虎骨,杜仲,甘草,赤芍,桔梗,銀花,葛根,防风,大活,元参。

三、討 論

整理祖国医药学遗产,是一项艰巨的任务。寻找对病毒有一定作用的药物,也是一项巨大的工作。中药在試管中所显示的直接抑制病毒的作用,虽然不能說明这类中药在临床上有实际效果,但是利用試管法作为篩选抗病毒中药的一个方法,毕竟是一个經濟而快速的方法。初步篩选之后,可以将中药对病毒作用的研究范围,大大縮小,为进一步深入地研究初选有效的药物,打下了基础,提供了綫索,虽然在篩选的几十种药方中,只有极少数对第 I 型脊髓灰白質炎病毒有作用,但是,这样的工作,还是值得注意与繼續大力探討的。

我們所收集的复方 20 种,都是从地方中医收集的,它們都是試用于治疗小儿麻痺症的处方。单方則是随机选取或是从复方中选出来的,所試驗的 40 种单方中,只柴胡水剂注射液一种,有抑制病毒的作用。复方 20 种中,只有 2 种有作用,第一种处方,包括 12 味中药,第二种处方,包括 11 味中药。除第一方含川牛夕及川姜,第二处方不含此二药,但含川大活外,其余都有共同的几味药物,只剂量稍有出入而已。所以这两种处方,基本上是相同的。

柴胡及上述两种复方,何以对第 I 型脊髓灰白質炎病毒有作用,是值得探討的問題。組成复方的許多中药除生黄蓍,虎骨,紅花三种药未单独試驗外,秦艽,防风,白芍,当归,川芎,川姜,生杜仲,川牛夕,川木瓜,川大活,单独試驗时,都对病毒无抑制作用。那末这两种复方,对 Mahoney 株病毒的抑制作用,可能是由于药物的綜合作用的結果。試驗无效的第 4,5,6 等处方中,有多味中药,与試驗有效的两种复方中的药物,有相同之处,然而不显抑制作用,也可能是由于綜合拮抗的結果。这一試驗結果,說明中药綜合治疗作用的特点,也相应的增加了探討中药对病毒作用机制的困难,要求我們对中药有效作用的探討,須作深入而細致的研究。

中药对脊髓灰白質炎病毒在試管內有直接作用,动物实验尚未进行。李振翩^[5]曾报告中国鮑魚浸液,确有少許治疗小白鼠实验性脊髓灰白質炎的作用。說明进一步发掘有

效的中藥是可能的。

關於柴胡的作用，也是特別值得注意的。高尙蔭等^[6]曾報告柴胡對流行性感冒病毒有一定的作用。根據本試驗的結果看，柴胡可能對流感和脊髓灰白質炎病毒有某些作用。

四、小 結

用人羊膜細胞培養法，就中藥的 40 種單方及 20 種複方，對第 I 型脊髓灰白質炎病毒 Mahoney 株引起細胞病變的抑制作用，進行了篩選。結果發現柴胡及兩種複方（主要由生黃耆，白芍，當歸，川芎，秦艽，防風，杜仲，川牛夕，川木瓜，紅花，虎骨等組成）有抑制病毒引起細胞病變的作用。在試管內有效的藥物，是否在機體內也有效，有待進一步的研究。實驗結果指出，確有在試管內抑制脊髓灰白質炎病毒作用的中藥存在，有繼續進行廣泛而深入探討的必要。

參 考 文 獻

- [1] Youngner, J. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**: 202, 1954.
- [2] Zitcer, E. M., *et al.*: *Science*, **122**: 30, 1955.
- [3] Rappaport, C. I.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**: 464, 1956.
- [4] 劉國聲等：微生物學報，**8**: 164, 1960。
- [5] 李振鵬： *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**: 522, 1960。
- [6] 高尙蔭等：流行性感冒參考資料，中國醫學科學院湖北分院編，1—2 輯，142 頁，1958。

THE IN-VITRO ACTION OF CERTAIN MEDICINAL HERBS ON TYPE 1 POLIOMYELITIS VIRUS

XIANG J. M. AND TUNG J. C.

(Hu-Pei Medical College, Wu-Han)

By means of the human amnion monolayer cell cultures, the activity of 40 single and 20 compound herb medicines against type i poliomyelitis virus was determined. It was found that Chai-Xu (柴胡) and two compound prescriptions consisting of a number of medicinal herbs showed definite inhibition of the virus by the failure of the appearance of cytopathogenic effect in the cell cultures. The action of these compounds in-vivo is being studied.