

网络出版时间: 2018-5-23 14:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.023.html>

◇ 药学研究 ◇

999 感冒灵颗粒抗呼吸道合胞病毒的初步研究

孙 涛 程茂胜 袁晓玲 张晓燕 黄升海

摘要 目的 探究 999 感冒灵颗粒在体外抗呼吸道病毒的作用。方法 采用细胞病变抑制法(CPE)及 CCK-8 法,观察在 999 感冒灵颗粒作用下,感染呼吸道合胞病毒(RSV)的 HEp-2 细胞的 CPE 变化情况以及吸光值,从而比较不同给药方式(直接灭活、抑制吸附、抑制增殖和阻断作用)及不同给药浓度下对 RSV 的抑制作用。测定细胞的半数中毒浓度(TC₅₀)、药物半数抑制浓度(IC₅₀)以及治疗指数(TI)。结果 细胞的 TC₅₀为 25 mg/ml;直接灭活和抑制增殖均对 RSV 有明显作用($P < 0.01$);采用直接灭活方式时,其 IC₅₀为 7.43 mg/ml, TI 为 3.36;采用抑制病毒增殖时,其 IC₅₀为 4.42 mg/ml, TI 为 5.66。CCK-8 法结果显示,在阻断以及抑制吸附两种给药方式下,病毒抑制率与病毒对照组之间差异无统计学意义。结论 999 感冒灵颗粒在直接灭活以及抑制病毒增殖两种给药方式下对 RSV 有一定的抑制作用。

关键词 呼吸道合胞病毒;细胞病变法;CCK-8 法;感冒灵颗粒;抗病毒作用

中图分类号 R 373.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0938-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.023

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)属于副黏病毒科肺炎病毒属,是一种有包膜非节段的单股负链 RNA 病毒,主要有 3 种包膜糖蛋白(F、G、SH),其中 G 蛋白为吸附蛋白,可以与细胞表面的特异性受体结合, F 蛋白为融合蛋白,感染细胞后会引发细胞融合病变, RSV 感染主要是由这两种蛋白引起的。有研究^[1-4]表明,呼吸道合胞病毒是世界范围内婴幼儿下呼吸道感染最常见的病毒病原体。70% 的 1 岁儿童感染过 RSV, 2 岁儿童几乎均被 RSV 感染过,早产儿及其患有先天性心脏病的儿童更容易引起 RSV 相关的下呼吸道感染,特别是支

气管炎和细支气管炎,是 1 岁以下儿童住院的最主要原因^[5]。此外研究^[5-6]表明,婴幼儿感染 RSV 后不仅可以导致急性疾病,还可导致长期的不良后果,如诱发气道高反应性、诱发哮喘儿童出现反复的喘鸣等,导致病毒血症,严重者会发生心力衰竭导致死亡。RSV 感染的病理机制尚不明确,目前为止仍无有效的药物和疫苗接种,曾有以福尔马林灭活的 RSV 作为疫苗预防接种婴幼儿,发现自然感染 RSV 后与其未接种疫苗的感染者相比会出现更为严重的支气管痉挛性肺炎,并会造成死亡。临床上治疗 RSV 感染多采用抗病毒和抗炎联合治疗^[7]。

999 感冒灵颗粒主要成分为三叉苦、金盏银盘、野菊花、岗梅、咖啡因、对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、薄荷油,辅料为蔗糖粉。主要功能是解热镇痛,用于感冒引起的头痛、发热、鼻塞、流涕、咽痛等。目前已有文献^[8-10]报道,野菊花和薄荷油均具有抗呼吸道合胞病毒的功效,而 999 感冒灵作为一种感冒药对呼吸道合胞病毒的抗性作用却未见文献报道。因此开展对 999 感冒灵颗粒的抗病毒研究,可为临床有效地预防和治疗 RSV 疾病提供一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒 HEp-2 细胞(人喉癌上皮细胞),呼吸道合胞病毒为国际标准 Long 株,以上均由安徽医科大学微生物学教研室保存。

1.2 主要试剂 新生牛血清(杭州四季青公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);Hyclone 胰酶(北京利维宁生物科技有限公司);CCK-8 试剂盒(500T;海门碧云天生物技术研究所);利巴韦林注射液(1 ml:0.1 g;济宁辰欣药业股份有限公司);999 感冒灵颗粒(每袋重 10 g;华润三九医药股份有限公司);各种规格的培养板(美国 Falcon 公司)。

1.3 细胞培养 细胞的复苏:从液氮罐中取出细胞冻存管,立刻放入 37℃ 水中进行水浴,使其在 1 min 内融化。然后将冻存管中的细胞接种到细胞培养皿中加细胞培养液置 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培

2018-02-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371797);安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2012A152)

作者单位:安徽医科大学基础医学院微生物学教研室,合肥 230032

作者简介:孙 涛,男,硕士研究生;

黄升海,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: huang-shh68@aliyun.com

养。8 h 后更换细胞培养液继续培养。传代: 打开已经长成单层细胞的培养皿, 用移液枪将废液弃去; 然后再用移液枪吸取 1~2 ml 灭菌的 PBS 清洗细胞表面的死细胞以及残留血清, 一般清洗 2~3 次; 向培养皿中加入 0.25% 的胰酶 1 ml 进行消化, 在倒置显微镜下观察, 待细胞变圆、细胞间质变大, 立刻终止消化。加入 4 ml 细胞培养液, 用移液器反复吹打细胞成为细胞悬液。将细胞悬液转移到离心管中 4℃、1 000 r/min 离心 5 min。轻轻吸取上清后用细胞培养液重悬细胞, 把细胞一分为二转移到新的培养皿中。将接种好的细胞置 37℃、5% CO₂ 培养箱进行培养。

1.4 实验分组、病毒复苏与病毒感染量的测定 实验分组为: ① 直接灭活组; ② 抑制吸附组; ③ 抑制增殖组; ④ 阻断作用组。病毒的复苏: 从 -80℃ 冰箱取出病毒管, 用细水流冲洗管壁, 使其缓慢融化。4℃、1 000 r/min 离心 5 min, 将病毒上清液接种至已长成单层的 HEp-2 细胞培养皿中进行增殖, 然后放在 37℃、5% CO₂ 培养箱中吸附 2 h。之后加入细胞维持液再进行培养, 观察细胞生长情况以及病变效应 (cytopathic effect, CPE)。“-”为无细胞病变, 细胞病变 < 25% 为 “+”, 细胞病变 25%~50% 为 “++”, 细胞病变 50%~75% 为 “+++”, 细胞病变 > 75% 为 “++++”。等细胞病变效应达到 “++++” 时, 4℃、3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液分装后放入 -80℃ 冰箱备用。病毒滴度测定: 将增殖后的病毒用维持液进行 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰、10⁻¹¹、10⁻¹²、10⁻¹³ 不同浓度梯度稀释, 依次接种于已长成单层的 96 孔 HEp-2 细胞培养板孔中, 每孔 0.1 ml。37℃ 吸附 2 h 后, 弃上清液, 加维持液后放在 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h 后观察细胞病变, 按 Reed-Muench 法计算病毒的半数感染量 (tissue culture infective dose, TCID₅₀)。

1.5 999 感冒灵颗粒的毒性测定 将 999 感冒灵颗粒用含 DMEM 培养液稀释成 400 mg/ml, 再用含 3% 血清的培养液进行 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、1/512、1/1 024 倍比稀释, 将稀释后的药液加到已长成单层的 HEp-2 细胞 96 孔培养板中, 每孔 100 μl, 每个浓度梯度做 4 个复孔, 同时设正常 HEp-2 细胞作为空白对照组。重复 3 次试验。然后将 96 孔板放在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 3 d, 并且每天观察细胞病变。3 d 后计算细胞不出现病变 (999 感冒灵颗粒对 HEp-2 细胞的毒性作用) 的最高稀释倍数, 即为其最大无毒浓度

(maximum non-toxic concentration, TC₀), 即对 HEp-2 细胞的最大无毒浓度, 再按 Reed-muench 法计算其 50% 毒性浓度 (median toxic concentration, TC₅₀)。

1.6 阳性对照利巴韦林注射液的细胞毒性测定 将利巴韦林注射剂用含 DMEM 培养液初步稀释, 再用含 3% 血清的培养液进行 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、1/512、1/1 024 倍比稀释, 将稀释后的药液加到已长成单层的 HEp-2 细胞 96 孔培养板中, 每孔 100 μl, 每个浓度梯度做 4 个复孔, 同时设正常 HEp-2 细胞作为空白对照组。重复 3 次试验。然后将 96 孔板放在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 3 d, 并且每天观察细胞病变。3 d 后计算细胞不出现病变 (利巴韦林注射液对 HEp-2 细胞的毒性作用) 的最高稀释倍数, 即为其 TC₀, 即对 HEp-2 细胞的最大无毒浓度, 再按 Reed-muench 法计算其 TC₅₀。

1.7 对病毒复制增殖的抑制作用 将已长成单层的 HEp-2 细胞 96 孔培养板吸弃培养液, 用 PBS 洗 3 次, 加入 100 TCID₅₀ 的 RSV 病毒液, 100 μl/孔, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中吸附 2 h, 使病毒进入细胞; 弃去多余病毒液, 用 PBS 洗 2 次, 洗去游离的病毒, 再加入 999 感冒灵颗粒溶液从 TC₀ 浓度开始作连续 2 倍系列稀释的 6 个浓度稀释液 (维持液稀释), 100 μl/孔, 每个浓度均重复 4 个复孔, 同时设正常细胞对照组和病毒对照组以及阳性对照组 (阳性对照组浓度为利巴韦林最大无毒剂量)。重复 3 次试验。当病毒对照组病变达到 75% 以上时, 每孔加入 10 μl 的 CCK-8 试剂, 培养 4 h 以后测定波长在 450 nm 的吸光度 (absorbance, A) 值。计算药物的抑制百分率, 评价抗病毒效果。根据各组之平均吸光度值, 计算抑制百分率, 再按 Reed-Muench 法计算药物半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀), 求出治疗指数 (therapeutic index, TI)。

抑制百分率 (%) = (实验组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) / (细胞对照组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) × 100%, 记录实验结果。TI = TC₅₀ / IC₅₀ 进行计算。

1.8 对病毒的直接灭活 以 TC₀ 浓度开始作连续 2 倍系列稀释的 8 个浓度稀释液 (维持液稀释), 分别与 100 TCID₅₀ 的 RSV 病毒液等量混合, 37℃ 作用 2 h, 然后接种到已长成单层的 HEp-2 细胞 96 孔培养板中, 放在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中吸附 2 h, 弃上清液, 加维持液 200 μl。同时设正常细胞对照组和病毒对照组以及阳性对照组 (阳性对照组浓

度为利巴韦林最大无毒剂量)。其余同 1.6。

1.9 抑制病毒的吸附 以 TC₀ 浓度开始作连续 2 倍系列稀释的 8 个浓度稀释液(维持液稀释),分别与 100 TCID₅₀ 的 RSV 病毒液等量混合,直接接种到已长成单层的 HEp-2 细胞 96 孔培养板中,放在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中吸附 2 h,弃上清液,加维持液 200 μl。同时设正常细胞对照组和病毒对照组以及阳性对照组(阳性对照组浓度为利巴韦林最大无毒剂量)。其余同 1.6。

1.10 对病毒的阻断作用 以 TC₀ 浓度开始作连续 2 倍系列稀释的 8 个浓度稀释液(维持液稀释),加入到已长成单层的 HEp-2 细胞 96 孔培养板中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h,用 PBS 洗 2 次,然后加入 100 TCID₅₀ 的 RSV 病毒液,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中吸附 2 h,弃上清液,加维持液 200 μl。同时设正常细胞对照组和病毒对照组以及阳性对照组(阳性对照组浓度为利巴韦林最大无毒剂量)。其余同 1.6。以上每组实验均设立 4 ~ 8 个复孔进行。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,多样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 t 检验统计学分析,Reed - Muench 法计算药物 TC₅₀ 和 IC₅₀ 及 TI,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSV 病毒半数感染量的滴定 病毒 TCID₅₀ 的滴定结果为:1 × 10^{-6.23} /0.1 ml。

2.2 999 感冒灵颗粒的细胞毒性测定 按 Reed-muench 法计算,可得知 TC₅₀ = 2⁻⁴; TC₀ = 2⁻⁵。因为 999 感冒灵颗粒原液浓度为 400 mg/ml,所以 TC₅₀ = 25 mg/ml; TC₀ = 12.5 mg/ml。利巴韦林的细胞毒性测定 TC₅₀ = 93.1 mg/ml,TC₀ = 5.0 mg/ml。

2.3 999 感冒灵颗粒在 HEp-2 细胞的抗呼吸道合胞病毒实验

2.3.1 对病毒复制增殖的抑制作用 RSV 感染 HEp-2 细胞出现 CPE 的特征主要为细胞圆缩、肿胀以及细胞之间的融合。在药物的 TC₀ 的范围内,药物浓度的越高,细胞出现 CPE 的程度会越低。病毒的抑制百分率与药物的浓度具有量效关系且与病毒对照组比较差异有统计学意义(t = 8.56、17.71、6.98、7.99、5.51、13.21, P < 0.01),见表 1。其对呼吸道合胞病毒的 IC₅₀ 为 4.42 mg/ml, TI 为 5.66; 利巴韦林阳性对照组 IC₅₀ 为 1.30 mg/ml, TI 为 71.6 (F

= 54.44, P < 0.01),见图 1。说明 999 感冒灵颗粒对 RSV 的复制增殖有抑制作用。

2.3.2 对病毒的直接灭活 实验结果表明,999 感冒灵对病毒有直接灭活的作用,主要表现在随着药物浓度的增加,细胞的 CPE 特征随之降低,细胞的存活率也随之上升且与病毒对照组比较差异有统计学意义(t = 16.32、8.63、5.56、6.71、13.1、9.33, P < 0.01),见表 1。其对呼吸道合胞病毒的 IC₅₀ 为 7.43 mg/ml, TI 为 3.36; 利巴韦林阳性对照组 IC₅₀ 为 1.12 mg/ml, TI 为 83.1 (F = 7.51, P < 0.05)。见图 2。

2.3.3 抑制病毒的吸附 结果可见,在 TC₀ 以下的不同浓度实验组中细胞均出现肿胀、圆缩以及细胞融合等典型的 CPE 症状。细胞的抑制百分率与细胞对照组比较差异无统计学意义(t = 1.31, P > 0.05),利巴韦林阳性对照组 IC₅₀ 为 1.53 mg/ml, TI 为 60.1 (F = 239.46, P < 0.01),见表 1。所以 999 感冒灵颗粒并没有抑制病毒吸附的作用。

2.3.4 对病毒的阻断作用 实验结果表明,999 感冒灵颗粒对病毒并无阻断作用,对呼吸道合胞病毒的感染无预防作用。具体表现在不同药物浓度下细胞均出现典型的 CPE 症状,CCK-8 结果显示细胞的抑制百分率与病毒对照组比较差异无统计学意义(t = 1.12, P > 0.05),利巴韦林阳性对照组 IC₅₀ 为 1.44 mg/ml, TI 为 64.7 (F = 103.23, P < 0.01),见表 1。

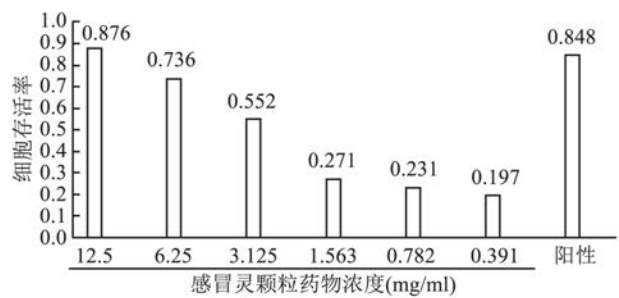


图1 CCK-8 法测定不同浓度药物抑制病毒增殖作用

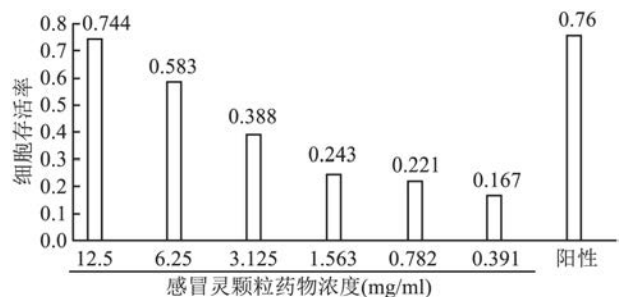


图2 CCK-8 法测定不同浓度药物直接灭活病毒结果

表1 不同浓度药物对 RSV 不同作用方式下细胞 CPE 的影响

组别	浓度(mg/ml)	CPE
细胞对照		-
病毒对照		###
阳性对照		+
实验组		
抑制增殖	12.50	+ * * ##
	6.250	++ * * ##
	3.125	++ * * ##
	1.563	## * ##
	0.782	### * ##
	0.391	### * ##
直接灭活	12.50	++ * ##
	6.250	++ * ##
	3.125	## * ##
	1.563	### * ##
	0.782	### * ##
	0.391	### * ##
抑制吸附	12.50	###
	6.250	###
	3.125	###
	1.563	###
	0.782	###
	0.391	###
阻断作用	12.50	###
	6.250	###
	3.125	###
	1.563	###
	0.782	###
	0.391	###

与阳性对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与病毒对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

在临床疾病谱中,由病毒引起的感染性疾病比例高达75%以上,一直威胁人类的生命与健康,其中最常见的是呼吸道合胞病毒引起的感染^[11]。但目前并没有行之有效的抗RSV治疗手段,唯一用于治疗的是广谱抗病毒药物利巴韦林,由于其具有很强的毒副作用,所以仅限于病情严重和高危患儿,在临床实践运用中效果并不理想。人类单克隆抗体-palivizumab(Synagis)和静脉用免疫球蛋白已经注册使用,疗效较好,但是其一个周期治疗所需费用很高,不能普遍应用于临床。因此,寻找有效廉价的防治RSV感染的药物意义非凡。

国内已有相关文献^[12]报道证实,野菊花、薄荷油等天然药物成分具有一定的抗RSV和其他种类病毒的作用与功效。而本实验所使用的999感冒灵作为一种常见的感冒药其主要有效成分为野菊花、薄荷油,但其对RSV的抗性作用却未见文献报道。

因此开展对999感冒灵颗粒的抗病毒研究,为其可能的预防RSV感染提供了一定的依据。本文设计了一系列实验,运用细胞培养技术对999感冒灵颗粒抗RSV作用进行了体外研究。实验结果表明,999感冒灵颗粒对RSV也有明显抑制作用。这将为开发高效、特异的防治RSV感染的药物奠定实验基础,并为临床处方的配伍提供线索。同时国外文献^[12-13]也有相关的报道,野菊花对流行性感冒病毒、乙型肝炎病毒等有一定杀灭作用,其也被应用治疗各种瘟疫、痈肿病证,疗效确切,也能与其他西药抗生素药物结合使用。近年来,国内外学者运用现代理论知识进行了全面分析和研究,作了大量的药理临床工作,从科学的角度证实了野菊花具有抗病毒、广谱抗菌、抗肿瘤等多种药理作用^[14]。

熊建文等^[15]研究表明,CCK-8法检测细胞活性,最佳的检测时间是在加入CCK-8试剂细胞培养4h后,最佳检测波长为450nm。与传统的MTT比色法检测细胞活性相比,CCK-8法具有操作更加简便,结果更加准确可反复进行测量等多个优点。传统的MTT比色法在检测细胞活性时,需要加入裂解液(如DMSO)溶解沉积在细胞中的甲臞晶体,在此过程中可能会出现晶体颗粒不完全溶解以及在吸取上清液过程中容易吸走部分细胞,而且加入的裂解液对A值也有一定的影响,所以在吸光度测定时误差很大,重复性欠佳。而CCK-8法中出现的甲臞晶体是水溶性的,并不需要加入裂解液,也不用吸取上清液,不会造成细胞的流失。而且可以进行反复测量,重复性好,数据稳定,科学性强。所以本实验采用CCK-8法测定细胞的吸光度值。

本文初步研究了999感冒灵颗粒抗RSV的作用效果,TC₅₀为25mg/ml,最大无毒浓度TC₀为12.5mg/ml。CCK-8结果表明999感冒灵颗粒对RSV有直接灭活的作用,并且随着药物浓度的升高,灭活的效果也增强。说明999感冒灵颗粒可能对RSV有直接杀灭的作用,或者有可能药物中的某种化合物与病毒的某一特异性受体结合,从而使病毒直接灭活,并与阳性对照组作用效果相似。同样地,999感冒灵颗粒对抑制病毒在细胞中的复制增殖有显著效果,并在12.5mg/ml浓度下与阳性对照组相比有着相似作用效果,其作用机制可能是药物进入细胞抑制了相关蛋白的生物合成或者抑制了核酸的复制。但999感冒灵颗粒对病毒的进入并无阻断作用,也没有抑制病毒吸附的作用。说明999感冒灵颗粒并不能阻止病毒侵入细胞与吸附细胞表

面,所以并没有预防的作用。本实验证实 999 感冒灵颗粒体外具有抗 RSV 感染的作用,而且安全性亦较高。但具体是什么成分具有抗病毒作用还需进一步探究。后期也将采用动物模型对 999 感冒灵的抗病毒作用以及作用机制进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 云云,黄升海. Toll 样受体 3 介导呼吸道合胞病毒感染人肺上皮细胞的炎性反应及其信号转导通路[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(6): 4119-22.
- [2] 李振兴. 呼吸道合胞病毒感染小胶质细胞活化 Toll 样受体 3、7 介导炎性反应的初步研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [3] 吕伟伟. 呼吸道合胞病毒感染人肺上皮细胞诱导氧化应激对 TLR3 表达的影响[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [4] 单晓蕾,孙涛,于春荣等. 呼吸道合胞病毒感染的药效学动物模型研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(6): 631-4.
- [5] 刘晓红. 呼吸道合胞病毒感染发病机制和药物治疗进展[J]. 中国临床医生, 2011, 39(3): 8-12.
- [6] 于莉. 小胶质细胞在呼吸道合胞病毒感染中枢神经元所致损伤中的作用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [7] 杨晓梅,吕伟伟,胡涛等. 呼吸道合胞病毒感染 BALB/c 鼠活化 TLR7 介导的抗病毒作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(6): 645-9.
- [8] 张振亚,方学平,刁志花等. 野菊花提取物抑制呼吸道合胞病毒作用的体外实验研究[J]. 解放军药学报, 2006, 22(4): 273-6.
- [9] 陈飞. 薄荷抗呼吸道合胞病毒的有效物质基础研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [10] 李美玉. 金银花体外抗呼吸道合胞病毒的作用研究[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(4): 420-2.
- [11] Rewar S, Mirdha D, Rewar P. Treatment and prevention of pandemic H1N1 influenza[J]. *Ann Glob Health*, 2015, 81(5): 645-53.
- [12] 任爱农,王志刚,卢振初等. 野菊花抑菌和抗病毒作用实验研究[J]. 药物生物技术, 1999, 6(4): 241.
- [13] 李道中,程村贵. 野菊花提取液的药理及临床应用[J]. 药学进展, 1999, 23(6): 344.
- [14] 何晶. 金银花的药理作用及临床应用[J]. 天津药学, 2008, 20(5): 74-5.
- [15] 熊建文,肖化,张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 559-62.

A preliminary study of 999 cold particles against respiratory syncytial virus

Sun Tao, Cheng Maosheng, Yuan Xiaoling, et al

(Dept of Microbiology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the role of 999 cold particles on the anti-respiratory virus *in vitro*. **Methods** CPE and CCK-8 were used to observe the changes of CPE and absorbance of HEP-2 cells infected with respiratory syncytial virus (RSV) under the action of 999 cold particles, so as to compare different modes of administration (direct inactivation, inhibition of adsorption, inhibition of proliferation and blockade) and RSV inhibition at different concentrations. Median toxic concentration (TC_{50}), half inhibition concentration (IC_{50}) and treatment index (TI) were measured, respectively. **Results** Median toxic concentration (TC_{50}) of 999 cold granules was 25 mg/ml. Direct inactivation and inhibition of proliferation had a significant effect on RSV ($P < 0.01$). In the way of direct inactivation, the IC_{50} was 7.43 mg/ml and the TI was 3.36. In the method of inhibiting RSV proliferation, the IC_{50} was 4.42 mg/ml and the TI was 5.66. The CCK-8 results showed that there was no significant difference between the viral inhibitory rate and the viral control group in the two ways of blocking and inhibiting the adsorption. **Conclusion** 999 cold granule has a certain inhibitory effect on RSV by two ways: direct inactivation and inhibition of proliferation.

Key words respiratory syncytial virus; cytopathic effect; CCK-8; cold particles; anti-viral effect