

七味清咽喷雾剂防治流感的药理作用

徐惠波^{1*}, 姚帆², 刘博¹, 温富春¹, 纪凤兰¹, 丁涛¹, 孙晓波¹

(1. 吉林省中医药科学院, 长春 130012; 2. 哈尔滨商业大学, 哈尔滨 150076)

[摘要] **目的:**观察七味清咽喷雾剂对 H1N1 流感病毒的防治作用及与达菲联合应用的效果。**方法:**体外试验采用组织细胞培养法,观察不同浓度药物对流感病毒 FM1 病毒株致细胞病变(CPE)的作用;体内试验采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株滴鼻感染小鼠造成肺炎模型,观察药物的疗效;达菲与七味清咽喷雾剂(剂量均降低 50%)联合应用,观察中药的增效减毒作用。**结果:**①七味清咽喷雾剂对 HeLa 和 Hep-2 细胞的最大无毒浓度(TC₀)为 0.192 g·L⁻¹,该浓度有一定缓解流感病毒的致细胞病变作用,但作用较弱;②七味清咽喷雾剂高剂量经 7 d 连续给药,可明显降低 H1N1 流感病毒感染肺炎模型小鼠血清中 TNF-α 含量,提高 IL-2 水平;③七味清咽喷雾剂中剂量与达菲(较单独应用剂量降低 50%)联合应用可降低感染小鼠肺脏指数,肺脏组织病变程度明显减轻;④二者联合应用降低感染动物血中神经氨酸酶(NA)活性的作用强于单用达菲组。**结论:**七味清咽喷雾剂通过影响小鼠免疫功能,改善流感病毒引起的小鼠肺炎症状,降低 H1N1 感染小鼠的肺指数;与达菲联合应用具有增效减毒作用。

[关键词] 甲型 H1N1 流感病毒; FM1 株; 七味清咽喷雾剂; 联合用药; 神经氨酸酶; 肿瘤坏死因子-α; 白细胞介素-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0165-04

Pharmacological Study on Qiwei Qingyan Aerosol for Treatment and Prevention of Influenza

XU Hui-bo^{1*}, YAO Fan², LIU Bo¹, WEN Fu-chun¹, JI Feng-lan¹, DING Tao¹, SUN Xiao-bo¹

(1. Chinese Medical Sciences Academy of Jilin Province, Changchun 130021, China;

2. Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

[Abstract] **Objective:**To observe effect of Qiwei Qingyan aerosol for treatment and prevention and H1N1 virus as well as the efficacy when combining with tamiflu. **Method:** The method of cell and tissue culture was utilized to carry out an observation on the cytopathy effect(CPE) led by influenza virus FM1 with the aerosol of different concentrations *in vitro*. The swing influenza A(H1N1) virus FM1 was adopted to establish pneumonia model in mice by nasal dropping method to detect the efficacy of the aerosol for treatment *in vivo*. In addition, Combining the aerosol with tamiflu (both in 50% dose) to inspect the efficacy for efficiency improvement and toxicity depression of Chinese traditional medicine. **Result:** ①The maximal nontoxic concentration (TC₀) of Qiwei Qingyan aerosol was 0.192 g·L⁻¹ to HeLa and Hep-2 cell. Within this concentration range it could relieve CPE induced by influenza virus, which was comparatively weak. ②After 7-days successive high-dose medication of Qiwei Qingyan aerosol, the TNF-α level in serum of mice infected by H1N1 virus could be decreased apparently. Meanwhile, the IL-2 level could be increased significantly. ③A combination of half dose tamiflu and moderate dose aerosol lowered the lung index of infected mice. As well, a lesser extent of lung tissue lesion was discovered 4. The

[收稿日期] 2011-03-12

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划重点项目(20090952)

[通讯作者] * 徐惠波, 研究员, 从事中药药理研究, Tel:0431-86058637, E-mail: xuhuiboyao@yahoo.com.cn

ability of the combination to decrease the neuraminidase (NA) activity in the blood of the infected animals was superior to tamiflu solely used. **Conclusion:** By affecting the function of mice's immune system, Qiwei Qingyan aerosol improved the pneumonia symptoms induced by influenza virus and decreased the lung index of H1N1 infected mice. Furthermore, the combination with tamiflu possessed the effect of improving the efficiency and depressing the toxicity.

[**Key words**] influenza A H1N1; FM1; Qiwei Qingyan aerosol; combined use of drugs; NA; TNF- α ; IL-2

甲型 H1N1 流感为急性呼吸道传染病,其病原体是一种新型的甲型 H1N1 流感病毒,人群对其普遍易感,防治甲型 H1N1 流感是一个长期而艰巨的任务。七味清咽喷雾剂是 1998 年由国家药监局批准上市的中药六类新药。由山豆根、射干、玄参、蟾酥、麝香等中药组成,具有清宣风热、清热解暑之功效,用于治疗急性咽喉炎。本研究通过体内外试验观察七味清咽喷雾剂对 H1N1 流感病毒感染小鼠的治疗作用及其与西药达菲联合应用的作用效果,为其应用于防治流感提供理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 七味清咽喷雾剂,0.079 6 g 生药/喷,吉林省中医药科学院剂型室生产(批号 100816);阳性对照药达菲(磷酸奥司他韦胶囊),宜昌长江药业有限公司,批号 090510。培养基 IMDM 为 Sigma 产品;胎牛血清,长春生物制品研究所批号 101210;胰蛋白酶,日本生产上海化学试剂厂分装,批号 9002-07-7,白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)放免试剂盒均为北京普尔伟业生物科技有限责任公司产品,批号分别为 20100715,20100725;BlueGene 神经氨酸酶(NA)试剂盒,产品编号 E03N0003,上海蓝基生物(BlueGene)生产。

1.2 动物 ICR 小鼠,雌雄各半,3~4 周龄,18~22 g,由吉林大学白求恩医学部实验动物中心提供。动物合格证号 SCXK(吉)2007-0003。

1.3 病毒株 甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株,购于中国预防医学科学院病毒研究所。

1.4 细胞株 HeLa(宫颈癌细胞)由吉林大学白求恩医学部病原微生物教研室提供;Hep-2(喉癌细胞)购于卫生部药品生物制品检定所。

1.5 仪器 Bio-Tek ELX-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), γ -计数器(中科大仪器公司)。

2 方法

2.1 药物对病毒致细胞病变作用的影响 将七味清咽喷雾剂药液稀释为 12.28,6.14,3.07,1.535,

0.768,0.384,0.192,0.096 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度,达菲稀释为 0.250,0.125,0.062 5,0.031 2,0.015 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度。将稀释好的药品滴加于 HeLa, Hep-2 单层细胞上,每孔 0.2 mL,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱培养,每天镜下观察细胞病变(CPE),求出药液致细胞毒性,最大无毒浓度(TC_0),半数中毒浓度(TC_{50})。

在 HeLa 和 Hep-2 细胞上分别加入 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的病毒液,吸附 1 h 后洗去病毒液,加入无毒界限药液,每一病毒稀释度各加 3 复孔,同时设病毒对照,细胞对照,阳性药物对照。置 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 培养箱内培养,每天在倒置显微镜下观察病变,连续 7 d,记录各孔病变情况。计算出抑制细胞病毒的感染量,细胞病变抑制率。

2.2 流感病毒感染小鼠肺炎模型 小鼠随机分为正常对照组,病毒对照组,阳性药达菲($19.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,七味清咽喷雾剂 8 喷/只、4 喷/只、2 喷/只剂量组,阳性药联合七味清咽喷雾剂(剂量均降低 50%,即达菲 $9.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 七味清咽气雾剂 4 喷/只)组。于感染前 1 d 开始灌胃或口腔喷雾给药,1 次/d,连续 5 d,模型对照组以同样方式口腔喷入相同体积的赋型剂。在乙醚浅麻醉下分别滴鼻感染流感病毒 15 LD_{50} ,于治疗 7 d 后解剖,取肺称重,计算肺指数,并取肺组织做病理检查;同时取血清检测 NA,IL-2,TNF- α 水平(具体操作均按试剂盒说明书进行)。

2.3 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间显著性检验,两组间显著性差异用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 体外抗病毒作用 根据试验结果计算七味清咽喷雾剂对 HeLa 和 Hep-2 细胞最大无毒浓度(TC_0)为 0.192 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,半数毒性浓度(TC_{50})为 2.371 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。达菲对 HeLa 和 Hep-2 细胞 TC_0 为 0.125 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, TC_{50} 为 1.102 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。试验中七味清咽喷雾剂采用 0.192 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、达菲采用 0.125 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行体外

抗病毒作用观察。在感染 30 ~ 100 倍 50% 组织细胞感染量 (TCID₅₀) 病毒的情况下,七味清咽喷雾剂对流感病毒致细胞病变有轻度的抑制作用,达菲对流感病毒致细胞病变有明显的抑制作用。见表 1。

表 1 七味清咽喷雾剂对流感病毒致细胞病变的保护作用 (n = 3)

病毒株	感染量 TCID ₅₀	达菲 0.125 g·L ⁻¹	七味清咽喷雾剂 0.192 g·L ⁻¹	病毒对照	细胞对照
流感病毒	100	-	卅	卅	-

注:“-”示无细胞病变,“±”示有延缓细胞病变作用,“+”示 25% 以下的细胞病变,“++”示 25% ~ 50% 的细胞有病变,“+++”示 50% ~ 75% 的细胞有病变,“卅”示 75% 以上的细胞有病变。

3.2 对流感病毒感染肺炎模型小鼠肺指数的影响

与模型组比,达菲联合七味清咽喷雾剂组能明显降低模型肺炎小鼠的肺指数 ($P < 0.05$),达菲亦能明显降低流感病毒性肺炎小鼠的肺指数 ($P < 0.05$),两者无明显差异。

表 2 七味清咽喷雾剂对流感病毒性肺炎小鼠肺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肺指数 /g·(100 g) ⁻¹	肺病变 减轻率/%
正常对照	-	0.853 ± 0.11 ¹⁾	-
模型对照	-	1.110 ± 0.32	-
达菲	19.5	0.865 ± 0.10 ¹⁾	22.1
达菲 + 七味清咽喷雾剂	9.8 + 4 喷/只/d	0.847 ± 0.16 ¹⁾	23.7
七味清咽喷雾剂	8 喷/只/d	0.967 ± 0.18	12.9
	4 喷/只/d	0.937 ± 0.16	15.6
	2 喷/只/d	0.931 ± 0.22	16.1

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 4 同)。

3.3 对流感病毒感染肺炎模型小鼠肺组织的影响

模型组镜下可见支气管、细支气管壁、肺泡壁等肺间质充血、水肿以及淋巴细胞、单核细胞浸润,肺泡壁增宽,肺泡呈炎症反应。单独达菲组、达菲联合七味清咽喷雾剂组小鼠肺病变明显减轻,部分肺组织形态结构正常。结果见图 1_{A-E}。

3.4 七味清咽喷雾剂对流感病毒性肺炎小鼠血清 NA 活性的影响 结果表明,与模型组相比,达菲联合七味清咽喷雾剂组能明显降低模型肺炎小鼠血清中 NA 活性 ($P < 0.05$),阳性药达菲组则使模型小鼠血清中 NA 活性有降低的趋势。

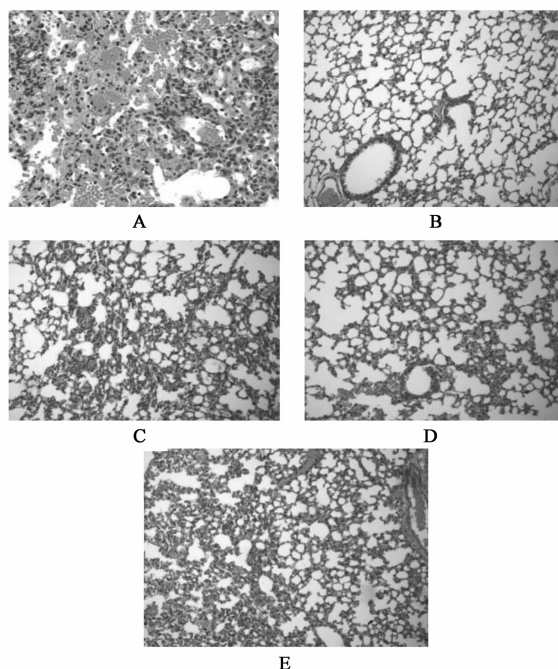


图 1 各组小鼠肺化疗病理切片 (HE, ×200)
A. 模型组; B. 正常组; C. 达菲 10.5 mg·kg⁻¹ 组;
D. 达菲 9.8 mg·kg⁻¹ + 七味清咽 4 喷/只/d 组;
E. 七味清咽喷雾剂 8 喷/只/d 组

表 3 七味清咽喷雾剂对流感病毒性肺炎小鼠血清 NA 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	NA 活性/ng·mL ⁻¹
正常对照	-	9	184.8 ± 44.16
模型对照	-	10	216.6 ± 46.63
达菲	19.5 mg·kg ⁻¹	10	173.2 ± 80.64
达菲 + 七味清咽喷雾剂	9.8 mg·kg ⁻¹ + 4 喷/只/d	10	149.5 ± 69.98 ¹⁾
七味清咽喷雾剂	8 喷/只/d	10	196.9 ± 75.32
	4 喷/只/d	10	213.5 ± 53.97
	2 喷/只/d	10	216.1 ± 51.97

3.5 对流感病毒感染肺炎小鼠血清 IL-2, TNF-α 水平的影响 与模型组相比,达菲联合七味清咽喷雾剂组能明显升高模型肺炎小鼠血清中 IL-2 的水平 ($P < 0.05$),降低 TNF-α 水平 ($P < 0.05$);七味清咽喷雾剂高剂量亦能明显升高模型肺炎小鼠血清中 IL-2 的水平 ($P < 0.05$),降低 TNF-α 水平 ($P < 0.01$);而达菲单独应用对小鼠血清 IL-2 水平无明显影响,但能降低 TNF-α 水平 ($P < 0.05$)。

4 讨论

流感是传染性很强的呼吸系统疾病,在全球有着相当高的发病率和致死率。其主要病原体是流感

表 4 七味清咽喷雾剂对流感病毒性肺炎小鼠血中 IL-2, TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$) ng·mL⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-2	TNF- α
正常对照	-	1.876 \pm 0.11 ¹⁾	0.038 \pm 0.019 ¹⁾
模型对照	-	0.916 \pm 0.04	0.088 \pm 0.053
达菲	19.5	1.186 \pm 0.12	0.046 \pm 0.015 ¹⁾
达菲 + 七味清咽喷雾剂	9.8 + 4 喷/只/d	1.787 \pm 0.13 ¹⁾	0.043 \pm 0.021 ¹⁾
七味清咽喷雾剂	8 喷/只/d	1.619 \pm 0.15 ¹⁾	0.033 \pm 0.019 ²⁾
	4 喷/只/d	1.114 \pm 0.16	0.066 \pm 0.034
	2 喷/只/d	1.002 \pm 0.09	0.098 \pm 0.064

病毒,甲型 H1N1 流感病毒是其中之一,感染人体后,主要导致气道和肺实质的损伤。目前,抗流感病毒的化学药物主要分为肌苷单磷酸脱氢酶 (IMPDH) 抑制药、干扰素诱导剂、M₂ 蛋白离子通道抑制药、NA 抑制药^[1]等。随着甲型 H1N1 流感的流行,对抗流感病毒药物的需求更加迫切。NA 抑制剂为近年来抗流感病毒药物研究的新方向,达菲即属于这一类药物。NA 是一种糖蛋白,在病毒复制周期的后期发挥重要作用,能清除病毒颗粒表面糖蛋白末端的唾液酸,防止子代病毒的自我凝聚,促使病毒释放;同时它还是一个重要的抗原,是流感病毒侵入呼吸道上皮细胞黏液所必须的^[2]。在病毒大量繁殖时,血清和组织中的 NA 含量会明显增加^[1]。在流感发病过程中,细胞免疫及炎性细胞因子参与了全部过程。细胞免疫是人体免疫系统中重要的组成部分,特别是 T 淋巴细胞是调节和维持人体免疫内环境稳定的重要的免疫细胞,IL-2 能促进 T 淋巴细胞的分化和增殖,增强 CTL 细胞、NK 细胞的分化和杀伤活性,介导抗病毒治疗^[3]。TNF- α 主要由单核巨噬细胞产生,是体内的重要炎症介质^[4]。当流感病毒感染呼吸道上皮细胞和单核巨噬细胞后,可诱导

TNF- α 等炎症细胞因子表达,这些细胞因子与流感症状的轻重及病毒的复制有直接关系^[3]。

由于流感属于自限性疾病,因此通过药物防治而达到缓解症状、缩短病程、防治并发症的目的得到了普遍的认同。近年来采用中西医结合的治疗方法防治流感受到了越来越多的关注。

本研究结果显示:七味清咽喷雾剂体外给药对流感病毒致细胞病变只有轻度的保护作用;而经口腔喷雾药对 FM1 株病毒感染的肺炎动物也未显示出明显的治疗作用,即对肺炎动物肺指数及肺脏病变程度无明显的影响。但该药整体给药能明显提高病毒感染动物血中 IL-2 的表达,降低炎性细胞因子 TNF- α 水平;当七味清咽喷雾剂(为单独应用高剂量的 1/2)与达菲(剂量也较单独使用降低了 1/2)联合应用时,显示出可明显抑制感染动物肺指数的增加,减轻肺脏组织病变程度,并可增加血中 IL-2 的含量,降低血中 TNF- α 水平,且其降低 NA 活性的作用比达菲单独使用强。提示七味清咽喷雾剂作为抗甲型流感药物在临床上与达菲联合应用,可起到增效减毒作用,并且喷雾剂型吸收快,使用方便。其深入的作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 凌云,狄亚敏. 甲型 H1N1 流感的病原学及其治疗药物[J]. 解放军药学学报,2009,25(3):238.
- [2] 李明. 甲型 H1N1 流感病毒的分子特征[J]. 首都医科大学学报,2009,30(3):267.
- [3] 蔡尚元,付敏,张长青,等. 甲型 H1N1 流感免疫学研究[J]. 医药论坛杂志,2009,30(24):63.
- [4] 杨贵贞. 医学免疫学[M]. 4 版. 长春:吉林科学技术出版社,1999:57.

[责任编辑 何伟]