

小儿肺热咳喘口服液防治甲型 H1N1 流感病毒感染免疫低下小鼠的研究

郭姗姗, 刘颖, 高英杰, 金亚宏, 时宇静, 时瀚, 刘方舟, 崔晓兰*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 评价小儿肺热咳喘口服液对免疫低下小鼠感染甲型 H1N1 流感病毒的防治作用。方法: ICR 小鼠 sc 环磷酰胺造成免疫低下, 以甲型 H1N1 流感病毒滴鼻感染造成肺炎模型, 造模同时及造模前 ig 20, 10, 5 mL·kg⁻¹ 小儿肺热咳喘口服液 4 d 后观察肺部炎症、计算肺指数, 死亡率和生命延长率, Real-time RT-PCR 法检测肺组织中病毒载量, 酶联免疫法检测血清中免疫因子的含量。结果: 小儿肺热咳喘口服液治疗性给药或预防性给药后能明显降低流感病毒 FM1 株和 PR8 株感染后免疫低下小鼠的肺指数、降低死亡率、延长平均存活天数、显著降低小鼠肺组织中的病毒载量, 明显升高小鼠血清中 CD4/CD8 的比值。结论: 小儿肺热咳喘口服液对甲型 H1N1 流感病毒感染免疫低下小鼠造成的病毒性肺炎具有明显的防治作用。

[关键词] 小儿肺热咳喘口服液; 流感病毒; 免疫低下小鼠; 病毒性肺炎

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0172-05

Preventative and Therapeutical Effect of Xiaoer Feire Kechuan Oral Solution on Immunocompromised Mice Infected by Influenza Virus A (H1N1)

GUO Shan-shan, LIU Yin, GAO Ying-jie, JIN Ya-hong, SHI Yu-jing,
SHI Han, LIU Fang-zhou, CUI Xiao-lan*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the preventative and therapeutical effect of Xiaoer Feire Kechuan oral solution on the immunocompromised mice infected by influenza virus A (H1N1). **Method:** ICR mice were injected cyclophosphamide to establish immunocompromised mice model, at the same day, the mice were infected by influenza A (H1N1) by nasal drops. The lung index, death rate, death protection rate and life prolongation were observed; The virus load in lungs was detected by real-time RT-PCR and the level of immune factors in blood serum were detected by ELISA. **Result:** With preventative and therapeutical treatment of Xiaoer Feire Kechuan oral solution, the lung index, death rate and the virus load in lung tissues of immunocompromised mice which were infected by influenza virus FM1 strain and PR8 strain decreased significantly, while the life time of immunocompromised mice was prolonged by the oral solution and CD4/CD8 ratio in serum increased significantly. **Conclusion:** Xiaoer Feire Kechuan oral solution could inhibit virus pneumonia in immunocompromised mice caused by influenza virus A(H1N1) significantly.

[Key words] Xiaoer Feire Kechuan oral solution; influenza virus; immunocompromised mice; viral pneumonia

[收稿日期] 2010-08-20

[基金项目] 国家重大新药创制项目(2009ZX09301-005-007); 中国中医科学院中药研究所自主选题项目(ZZ20090103)

[作者简介] 郭姗姗, 硕士, 主要从事中药抗病毒分子机制的研究, Tel: 010-84252805, E-mail: ruochushan@sina.com

[通讯作者] * 崔晓兰, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事中药抗病毒分子机制的研究, Tel: 010-84015200, E-mail: cuixl2812@sina.com

流感为中药治疗病毒性疾病的优势病种之一, 中药具有整体调节多靶点的特点, 不仅能退热、消炎和抗病毒, 而且具有提高人体免疫机能的作用, 比单一抗病毒药物在减轻呼吸道症状方面更具优势。目前从中药中寻找抗流感病毒的有效成分并探讨其作用机制已成为国内外研究的热点。小儿肺热咳喘口服液由麻黄、苦杏仁、石膏、甘草、金银花、连翘、知母、黄芩、板蓝根、麦冬、鱼腥草等中药组成, 具有清热解毒、宣肺化痰的功能, 用于治疗热邪犯于肺卫所致发热、汗出、微恶风寒、咳嗽、痰黄、或兼喘息、口干而渴之证。属于西医急性上呼吸道感染的范畴。本研究采用两株甲型流感病毒(H1N1 亚型) 感染免疫低下小鼠造成小鼠病毒性肺炎模型, 观察小儿肺热咳喘口服液治疗性给药和预防性给药对免疫低下小鼠病毒性肺炎的抑制作用和对死亡率的影响, 并观察其对肺组织病毒载量的抑制作用和对血清中免疫因子的影响。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠(SPF/VAF 级), 体重(13 ± 1) g, 雌雄不限。北京维通利华试验动物技术有限公司, 动物许可证 SCXK(京) 2006-0009。

1.2 病毒株 甲型 H1N1 流感病毒鼠肺适应株(FM/1/47 株和 PR/8/34 株), 购自中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所, 由本生物安全实验室(ABSL-2) 鸡胚传代, -80 °C 保存备用。

1.3 小儿肺热咳喘口服液 黑龙江葵花药业股份有限公司提供, 批号 200905180, 10 mL/支, 棕红色液体。储存于常温通风干燥处。

1.4 阳性对照药 达菲(磷酸奥司他韦胶囊), 瑞士巴塞尔豪夫迈·罗氏有限公司产品, 上海罗氏制药有限公司分装, 批号 B1162, 分装批号 SH0033。

1.5 剂量设计 小儿肺热咳喘口服液根据说明书用量按 7 岁小儿临床剂量 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹。小鼠试验用量分别为 40, 20, 10, 5 mL·kg⁻¹·d⁻¹ (分别相当于人临床用药量的 2 倍、等倍、1/2 倍、1/4 倍); 达菲临床用量为 150 mg·(60 kg)⁻¹, 小鼠等效剂量为 27.5 mg·kg⁻¹, 试验时均按等容不等浓度 20 mL·kg⁻¹ 给药。

1.6 试剂 CD4/CD8 检测试剂盒, 美国 R&D 公司产品, 北京奥信托普科技有限公司提供; PCR 检测试剂一步法荧光染料 RT-PCR 试剂盒, TaKaRa 公司, 货号 DRR086A; Trizol 提取总 RNA 试剂为 Invitrogen

公司; 逆转录-聚合酶链反应试剂盒、TaqDNA 聚合酶, dNTP, DNA marker 均为 Takara 公司; Power SYBR Green PCR Master Mix 为 ABI 公司; GAPDH, H1N1 上下游引物均为美国 Invitrogen(上海) 英骏生物技术有限公司; 氯仿、异丙醇、99% 乙醇均为市售分析纯。

1.7 仪器 Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪, 美国应用生物系统(ABI) 公司; TC-96/G/H(b) 梯度 PCR 仪, 博日科技有限公司; HC-3018R 高速冷冻离心机, 中科中佳公司; RT-6000 酶标仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; A2 型生物安全柜, 型号 MSC1.8, 德国 Thermo; YP/0001 动物体重电子天平, 上海越平科学仪器有限公司; AR1140 电子天平, 美国 Chau.

2 方法

2.1 治疗给药对流感病毒感染免疫低下小鼠肺炎模型的作用(肺指数) 取小鼠按体重等级随机分为 7 组, 分别为正常对照组、环磷酰胺对照组、模型对照组、达菲对照组、小儿肺热咳喘口服液高、中、低 3 个剂量组, 每组 10 只。除正常对照组和环磷酰胺对照组外, 将小鼠用乙醚轻度麻醉, 以 15 个 LD₅₀ 流感病毒液(FM1 株和 PR8 株) 滴鼻感染, 每只 35 μL; 感染同时除正常对照组外各组动物 sc 环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹, 连续 2 d, 造成免疫低下。感染当天开始给药, 每次按 20 mL·kg⁻¹ ig, 1 次/d, 连续 4 d, 正常对照组、模型对照组和环磷酰胺对照组以蒸馏水 ig。第 5 天称重后解剖, 称肺质量, 计算肺指数及肺指数抑制率, 并留样测定肺组织中病毒载量。

肺指数 = 肺湿质量(g) / 体质量(g)

肺指数抑制率 = $\frac{\text{病毒对照组肺质量} - \text{试验组肺质量}}{\text{病毒对照组肺质量} - \text{正常对照组肺质量}} \times 100\%$

2.2 预防给药对流感病毒感染免疫低下小鼠肺炎模型肺指数的影响 小鼠按体重随机分为 7 组, 分别正常对照组、环磷酰胺对照组、模型对照组、达菲对照组、小儿肺热咳喘口服液高、中、低 3 个剂量组, 每组 10 只。各给药组每次按 20 mg·kg⁻¹ ig, 1 次/d, 连续 4 d, 正常对照组和模型对照组蒸馏水 ig; 除正常对照组外, 前 2 天各组动物 sc 环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹, 造成免疫低下。给药第 4 天除正常对照组外, 将小鼠用乙醚轻度麻醉, 以 15 个 LD₅₀ 流感病毒液滴鼻感染, 每只 35 μL。感染第 5 天, 称取小鼠体质量后解剖, 摘取全肺称质量, 计算肺指数及肺指数抑制

率,并留样测定血中 CD4/CD8 含量。

2.3 预防给药对流感病毒感染免疫低下小鼠肺炎模型死亡率的影响 小鼠按体重随机分为 5 组,分别为模型对照组、达菲对照组、小儿肺热咳喘口服液高、中、低 3 个剂量组,每组 20 只。各组每次按 20 mg·kg⁻¹ ig, 1 次/d, 连续 5 d, 模型对照组在同等条件下蒸馏水 ig; 前 2 天各组动物同时 sc 环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹, 造模。给药第 4 天小鼠用乙醚轻度麻醉, 以 15 个 LD₅₀ 流感病毒液滴鼻感染, 每只 35 μL。观察感染后 2 周内动物的死亡情况, 计算死亡率、平均存活天数和生命延长率。

$$\text{生命延长率} = \frac{\text{试验组存活天数} - \text{病毒对照组存活天数}}{\text{病毒对照组存活天数}} \times 100\%$$

2.4 治疗给药对流感病毒 FM1 株感染免疫低下小鼠肺组织中病毒载量的影响 采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染免疫低下小鼠后, 将小儿肺热咳喘口服液高、中、低 3 个剂量组感染当天开始给药, 1 次/d, 连续 4 d, 第 5 天解剖摘取肺脏测定病毒载量。

病毒载量测定方法

引物设计与合成: 针对流感病毒(H1N1) 基因序列的上下游引物分别是: 5'-GACCAATCCTGTCACCTCTGAC-3' 和 5'-GGGCATTTGGACAAACGTCTACG-3'; 针对看家基因 GAPDH(监控总 RNA 的使用量, 以消除不同样本间加样导致的误差) 基因序列的引物分别是: 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGA ACG-3' 和 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'。

Real-time RT-PCR 扩增: 使用 TRIzol 试剂提取

肺组织中的 RNA 后, 分别用上述 H1N1 和 GAPDH 引物进行一步法实时荧光 PCR 反应, 反应体积为 20 μL, 反应体系含样本 RNA 2 μL, Power SYBR GREEN 17.2 μL, 10 pmol·L⁻¹ 引物各 0.8 μL。反应条件为: 42 °C 灭活 5 min, 95 °C 变性 10 s, 95 °C 退火 5 s, 60 °C 延伸 34 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析, 以鉴定 PCR 产物的特异性。使用 Sequence Detection System 软件分析 PCR 过程各检测样本的 Ct(Threshold of cycle) 值。

病毒载量抑制率 =

$$\frac{\text{病毒对照组病毒载量} - \text{试验组病毒载量}}{\text{病毒对照组病毒载量}} \times 100\%$$

2.5 预防给药对流感病毒 PR8 株感染免疫低下小鼠血清中免疫因子的影响 将小儿肺热咳喘口服液预防性给予免疫低下小鼠, 1 次/d, 连续 4d, 然后感染流感病毒 PR8 株造成肺炎模型, 测定感染后第 4 天血清中 CD4, CD8 含量, 并计算 CD4/CD8。

2.6 统计分析 采用 SPSS 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验; 计数资料用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 治疗给药对流感病毒感染免疫低下小鼠肺炎模型的影响 模型组小鼠肺指数明显增高, 与环磷酰胺对照组比较有显著性差异 (*P* < 0.01); 小儿肺热咳喘口服液治疗 4d 后 3 个剂量组肺指数均有不同程度降低, 其中 FM1 株高、中剂量组及 PR8 株中、低剂量组与模型对照组比较有显著性差异 (*P* < 0.01 或 *P* < 0.01)。(表 1)。

表 1 治疗给药对流感病毒感染免疫低下肺炎模型小鼠肺指数的影响

组别	FM1 株				PR8 株			
	剂量 / mL·kg ⁻¹	<i>n</i>	肺指数	抑制率 / %	剂量 / mL·kg ⁻¹	<i>n</i>	肺指数	抑制率 / %
正常对照	-	10	0.66 ± 0.03	-	-	10	0.70 ± 0.08	-
环磷酰胺对照	-	10	0.76 ± 0.09 ²⁾	-	-	10	0.76 ± 0.08 ²⁾	-
模型对照	-	10	1.33 ± 0.10	-	-	10	1.01 ± 0.06	-
达菲 ³⁾	27.5	10	1.03 ± 0.12 ²⁾	52.90	27.5	9	0.91 ± 0.19 ²⁾	40.19
小儿肺热咳喘口服液	20	10	1.17 ± 0.15 ¹⁾	28.19	40	9	0.95 ± 0.07	23.28
	10	10	1.24 ± 0.22 ¹⁾	16.67	20	11	0.83 ± 0.13 ²⁾	70.83
	5	10	1.24 ± 0.13	16.74	10	11	0.91 ± 0.13 ¹⁾	36.90

注: 与模型对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; ³⁾ 剂量单位为 mg·kg⁻¹ (表 2 ~6 同)。

3.2 预防给药对流感病毒感染免疫低下小鼠肺炎模型肺指数的影响 2 株病毒感染免疫低下小鼠后, 小鼠肺指数明显增高, 与环磷酰胺对照组比较有显著性差异 (*P* < 0.01); 预防性给予小儿肺热咳喘

口服液 4 d 后, PR8 株大剂量组肺指数明显降低 (*P* < 0.05); 其他剂量组及 FM1 株组均无显著性差异。(表 2)。

表 2 预防给药对流感病毒感染免疫低下肺炎模型小鼠肺指数的影响

组别	剂量 / mL · kg ⁻¹	FM1 株			PR8 株		
		n	肺指数	抑制率 / %	n	肺指数	抑制率 / %
正常对照	-	10	0.081 ± 0.008	-	10	0.081 ± 0.008	-
环磷酰胺对照	-	10	0.087 ± 0.008 ²⁾	-	10	0.087 ± 0.008 ²⁾	-
模型对照	-	10	0.130 ± 0.017	-	10	0.126 ± 0.021	-
达菲对照 ³⁾	27.5	10	0.118 ± 0.008 ¹⁾	28.27	10	0.092 ± 0.016 ²⁾	86.10
小儿肺热咳喘口服液	40	10	0.123 ± 0.023	17.00	9	0.106 ± 0.018 ¹⁾	50.64
	20	10	0.138 ± 0.016	-16.12	7	0.117 ± 0.005	24.09
	10	10	0.126 ± 0.010	10.26	10	0.121 ± 0.019	12.82

3.3 预防给药对流感病毒感染免疫低下小鼠肺炎模型死亡率的影响 采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染免疫低下小鼠后 14 d, 动物死亡率为 95%, 平均存活为 8.10 d; 预防性给予小儿肺热咳喘口服液 4 d, 3 个剂量组动物的死亡数明显下降, 其中中、低剂量组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$), 死亡率为 60%, 65%, 中、低剂量组均可延长动物平均存活时间, 与模型组比较 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (表 3)。

表 3 预防给药对流感病毒 FM1 感染免疫低下肺炎模型小鼠的死亡率和存活时间的影响 (n=20)

组别	剂量 / mL · kg ⁻¹	死亡数 / n	死亡率 / %	平均存活天数 / d	生命延长率 / %
模型对照	-	19	95	8.10 ± 1.33	-
达菲 ³⁾	27.5	4	20 ²⁾	11.30 ± 1.53 ²⁾	39.51
小儿肺热咳喘口服液	40	14	70	9.20 ± 2.02	13.58
	20	12	60 ¹⁾	9.65 ± 2.06 ²⁾	19.14
	10	13	65 ¹⁾	9.45 ± 2.11 ¹⁾	16.67

采用甲型 H1N1 流感病毒 PR8 株病毒感染免疫低下小鼠 14 d 后, 动物死亡率为 90%, 平均存活 8.55 d; 预防性给予小儿肺热咳喘口服液 4 d, 3 个剂量组动物的死亡数明显减少, 并延长小鼠存活天数, 其中中、低剂量组与模型对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 死亡率分别为 45%, 45%; 平均存活时间分别为 10.35 d, 10.45 d ($P < 0.01$), (表 4)。

3.4 治疗给药对流感病毒 FM1 株感染免疫低下小鼠肺组织中病毒载量的影响 采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染免疫低下小鼠后, 肺组织中有明显的病毒基因表达; 小儿肺热咳喘口服液高、中、低剂量组均有降低病毒载量的作用, 抑制率分别为 97.26%, 95.09%, 80.18%, 但由于标准差偏大, 与模型对照组比较未显示出显著性差异 (表 5)。

表 4 预防给药对流感病毒 PR8 感染免疫低下肺炎模型小鼠的死亡率和存活率的影响 (n=20)

组别	剂量 / mL · kg ⁻¹	死亡数 / n	死亡率 / %	平均存活天数 / d	生命延长率 / %
模型对照	-	18	90.00	8.55 ± 1.64	-
达菲 ³⁾	27.5	1	5.00 ²⁾	11.85 ± 0.67 ²⁾	38.60
小儿肺热咳喘口服液	40	13	65.00	9.50 ± 1.99	11.11
	20	9	45.00 ²⁾	10.35 ± 1.93 ²⁾	21.05
	10	9	45.00 ²⁾	10.45 ± 1.79 ²⁾	22.22

表 5 治疗给药对流感病毒 FM1 株感染免疫低下小鼠肺组织中病毒载量的影响 (n=6)

组别	剂量 / mL · kg ⁻¹	病毒载量	抑制率 / %
模型对照	-	7 816 820.10 ± 9 953 850.19	-
达菲 ³⁾	27.5	1 009.85 ± 1 283.17	99.99
小儿肺热咳喘口服液	20	214 409.11 ± 515 655.80	97.26
	10	383 458.44 ± 644 784.07	95.09
	5	1 549 176.13 ± 2 964 442.71	80.18

3.5 预防给药对流感病毒 PR8 株感染免疫低下小鼠血清中免疫因子的影响 预防性给予小儿肺热咳喘口服液 4d 后, 中、低剂量组可明显降低甲型 H1N1 流感病毒 PR8 株感染免疫低下小鼠血清中 CD8 水平, 提高 CD4/CD8, 与模型对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), (表 6)。

表 6 预防给药对 PR8 株流感病毒感染免疫低下小鼠血清 CD4 和 CD8 水平的影响 (n=10)

组别	剂量 / mL · kg ⁻¹	CD4 / U · mL ⁻¹	CD8 / U · mL ⁻¹	CD4/CD8
环磷酰胺	-	1.44 ± 0.26	27.74 ± 7.84	0.05 ± 0.01
模型对照	-	1.39 ± 0.09	31.78 ± 6.05	0.05 ± 0.01
达菲	27.5 ng · kg ⁻¹	1.37 ± 0.08	27.53 ± 4.83	0.05 ± 0.01
小儿肺热咳喘口服液	40	1.41 ± 0.22	34.64 ± 8.23	0.04 ± 0.01
	20	1.42 ± 0.07	21.24 ± 6.13 ²⁾	0.07 ± 0.02 ²⁾
	10	1.49 ± 0.22	17.89 ± 7.66 ²⁾	0.11 ± 0.10 ¹⁾

4 讨论

流感一直严重威胁人类健康, 因为其流行进程快, 传播广泛, 并发症后果严重, 对人类危害巨大, 尤其是甲型流感, 甲型流感病毒的抗原性不稳定, 抗原容易产生漂移, 使得流感病毒的一些片段每年都会发生变化, 人的免疫系统通常会识别这些局部变化, 但若变化较多, 人的免疫系统就很难及时识别, 这样就造成每年都有小范围的流感流行和局部暴发。此外, 在一个无法预见的时间间隔内, 流感病毒会进化成一种崭新的亚型, 对这种全新的病毒亚型, 人的免疫系统短期内完全无法识别。

儿童由于年龄小, 免疫系统尚未发育完全, 所以更易受到流感病毒的侵袭, 且感染之后容易造成严重的呼吸道感染, 甚至死亡。中药抗病毒具有疗效确切、相对广谱、毒副作用低的特点, 不仅具有抗病毒作用, 而且能激发自身的免疫系统来吞噬和清除病毒。因而, 研发防治儿童流感的中药具有十分重要的意义。小儿肺热咳喘口服液是专门针对儿童设计的一种中药复方制剂, 在临床上具有很好的防治急性呼吸道感染的作用。本研究针对小儿免疫系统功能不完善的特点, 采用环磷酰胺造成免疫低下的小鼠模型。

小儿肺热咳喘口服液治疗性给药或预防性给药后能明显降低流感病毒 FM1 株和 PR8 株感染后免疫低下小鼠的肺指数、降低死亡率、延长平均存活天数。在机制的研究中, 小儿肺热咳喘口服液能显著降低小鼠肺组织中病毒的载量, 有降低小鼠血清 CD8 水平、升高 CD4/CD8 的作用, 说明小儿肺热咳喘口服液的防治流感作用机制可能与抑制流感病毒复制和提高免疫系统功能有关。但其药效作用没有呈现明显的量效关系, 可能与其中药复方的多成分、

多靶点作用有关, 仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Robert B Belshe. Human Virology [M]. USA. PSG Publishing Company Inc, 1984: 267.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 251.
- [3] 富杭育, 卢长安, 贺玉琢, 等. 清肺饮抗小鼠流感病毒性肺炎的试验研究 [J]. 中华试验和临床病毒学杂志, 1996, 10(4): 381.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会. 流行性感胃临床诊断和治疗指南 (2004 年修订稿) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(1): 5.
- [5] 蔡映云, 杨振华. 流行性感胃疫苗与药物的预防作用 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25: 647.
- [6] 李龙芸, 蔡柏蕾, 朱元钰, 等. 磷酸奥司他韦治疗流行性感胃的多中心临床研究 [J]. 中华内科杂志, 2001, 40: 838.
- [7] Lackenby A, Hungnes O, Dudman S G, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe [J]. Euro Surveill, 2008, 13 (5): 8026.
- [8] Nicoll A, Ciancio B, Kramarz P. Observed oseltamivir resistance in seasonal influenza viruses in Europe interpretation and potential implications [J]. Euro Surveill, 2008, 13(5): 8025.
- [9] Influenza Project Team. Oseltamivir resistance in human seasonal influenza viruses (A/H1N1) in EU and EFTA countries: an update [J]. Euro Surveil, 2008, 13 (6): 8032.
- [10] 范鸣. 抗病毒药达菲致神经精神类不良反应 [J]. 药学进展, 2006, 30(3): 139.

[责任编辑 何伟]