

· 药理 ·

## 金柴抗病毒胶囊对甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株感染 免疫低下小鼠肺炎的影响

钟菊迎, 崔晓兰<sup>2</sup>, 时宇静<sup>2</sup>, 郭姗姗, 高英杰<sup>2</sup>, 金亚宏<sup>2</sup>, 曹洪欣<sup>3\*</sup>

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院  
中药研究所, 北京 100700; 3. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察金柴抗病毒胶囊对 H1N1 流感病毒 FM1 感染免疫低下动物的防治作用。方法: 采用环磷酰胺注射造成免疫低下模型, 经滴鼻感染甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株造成肺炎模型, 分别经预防给药 5 d 和治疗 4 d, 取各组小鼠肺组织, 称重, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肺组织中相对病毒载量, 观察金柴抗病毒胶囊对小鼠肺指数、病毒载量的影响。结果: 模型组小鼠经流感病毒 FM1 株感染后, 肺指数明显升高, 肺组织中相对病毒载量显著高表达, 金柴抗病毒胶囊各剂量组均可明显降低流感病毒感染免疫低下小鼠肺指数以及肺组织中相对病毒载量, 降低动物模型肺指数、相对病毒载量的作用与达菲比较无显著性差异。结论: 金柴抗病毒胶囊对流感病毒感染免疫低下小鼠有较好的治疗和预防作用。

[关键词] 甲型 H1N1 流感病毒; 金柴抗病毒胶囊

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0109-04

## Effect of Jinchai Antivirus Capsules on Prevention and Treatment of Influenza A H1N1 Virus in Immunodeficiency Mouse

ZHONG Ju-ying<sup>1</sup>, CUI Xiao-lan<sup>2</sup>, SHI Yu-jing<sup>2</sup>

GUO Shan-shan<sup>2</sup>, GAO Ying-jie<sup>2</sup>, JIN Ya-hong<sup>2</sup>, CAO Hong-xin<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jinchai Antivirus Capsules on immunodeficiency mouse with influenza A H1N1 virus (Fort Monmouth/1/47) infection. **Method:** Mouse model of immunodeficiency was established by injection of cyclophosphamide. Infection of influenza virus FM1 was induced by nose dropping method. Prophylactic administration and therapeutic administration of the capsule were carried out respectively to observe the lung weight and calculate the lung index and virus load. **Result:** Jinchai Antivirus Capsules markedly decreased the lung index and virus load for the immunodeficiency mouse model with influenza virus. The antivirus efficacy was not statistically significant between the Capsules and Tamiflu. **Conclusion:** Jinchai Antivirus Capsules can distinctly improve the symptom of mouse with pneumonia caused by the infection of influenza virus and have a remarkable effect of prevention and therapy. The efficacy of Jinchai Antivirus Capsules is comparable to that of Tamiflu.

[Key words] A/Fort monmouth/1/47(H1N1); Jinchai Antivirus Capsules

[收稿日期] 20100318(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制专项”课题(2009ZX09301-005-013)

[第一作者] 钟菊迎, 2007 级博士研究生, 研究方向: 中医药防治瘟疫基础研究, Tel: 15811257799, E-mail: juying1015@yahoo.com.cn

[通讯作者] \* 曹洪欣, 教授, E-mail: caohx@mail.cacms.ac.

金柴抗病毒胶囊由柴胡、金银花、党参等中药组成,具有扶正、透邪、解毒的作用,对病毒性呼吸道感染疾病有确切疗效。前期研究表明金柴抗病毒胶囊可抑制病毒及化学物质引起的肺部炎症<sup>[1]</sup>,并具有解热<sup>[2]</sup>作用,同时还可调节机体免疫功能<sup>[3]</sup>。

流感等传染性疾病更易攻击免疫力低下人群<sup>[4]</sup>,因此研究具有调节机体免疫功能的药物在防治流感中显得尤为重要。本实验通过建立免疫低下动物模型,经流感病毒滴鼻感染小鼠,以肺指数、病毒载量为观察指标,对金柴抗病毒胶囊药效学进行了评价。

## 1 材料

**1.1 动物** ICR 小鼠(SPF/VAF 级),体重(14 ± 1)g,雌雄不限。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号 SCXK(京)2007-0001。

**1.2 药物** 金柴抗病毒胶囊由中日友好医院制剂中心生产,属中试产品。批号 20090922。功能主治:透邪解毒,用于急性病毒性上呼吸道感染。规格:0.4 g/粒。用法用量:每次 4 粒,每日 3 次。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。

**1.3 病毒毒株** 甲型 H1N1 流感病毒鼠肺适应 FM1 株,购自中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所,由中国中医科学院中药研究所 ABSL-2 生物安全实验室传代,-70 保存备用。

**1.4 实验场地** 中国中医科学院中药研究所 ABSL-2 生物安全实验室。

## 2 方法

**2.1 药物剂量设计** 金柴抗病毒胶囊(金银花、柴胡、党参):成人每日用量为 4.8 g,实验小鼠采用 1 760, 880, 440 mg·kg<sup>-1</sup>(分别相当于临床用量的 2 倍、等倍和 1/2 倍),实验时将胶囊内容物用纯净水配成 88 g·L<sup>-1</sup>做为高剂量组,中、低剂量组对倍稀释后按等容不等浓度 20 mL·kg<sup>-1</sup>ig 给药,每日 1 次。

达菲:临床成人每日用量为 150 mg,日 2 次,换算成小鼠等效剂量为 27.5 mg·kg<sup>-1</sup>ig,实验时用纯净水配成 1.375 g·L<sup>-1</sup>,按 20 mL·kg<sup>-1</sup>ig 给药,每日 1 次。

## 2.2 造模及给药

**2.2.1 对流感病毒 FM1 株感染免疫低下小鼠肺炎模型的治疗作用** 取小鼠按体重等级随机分为 7

组,分别为空白对照组、环磷酰胺对照组、模型对照组、达菲对照组、金柴抗病毒胶囊高、中、低 3 个剂量组,每组 10 只。除空白对照组外,其他各组在给药同时按 10 mL·kg<sup>-1</sup>sc 环磷酰胺(10 mg·kg<sup>-1</sup>),每日 1 次,共 2 d,造成免疫低下模型<sup>[5]</sup>。除空白对照组、环磷酰胺对照组外,其余各组小鼠用乙醚轻度麻醉,以 15 个 LD<sub>50</sub> 流感病毒液(FM1 株)滴鼻感染,每只 35 μL。感染当天开始给药,每次按 20 mL·kg<sup>-1</sup>ig 给药,每天 1 次,连续 4 d,空白对照组和模型对照组在同等条件下 ig 生理盐水。第 5 天称重后解剖,取肺,称质量,计算肺指数及肺指数抑制率,肺组织置 -70 低温冰箱中保存备用。

**2.2.2 对流感病毒感染免疫低下小鼠肺炎模型的预防作用** 动物分组、免疫低下造模方法同治疗实验,在感染前先连续给药 5 d,第 5 天给药 1 h 后感染造模,感染方法同 2.2.1。感染后第 4 天称重后解剖,取肺,称质量,计算肺指数与肺指数抑制率,肺组织置 -70 低温冰箱中保存备用。

**2.2.3 引物设计与合成** 引物设计:利用从 NCBI GenBank 下载的 A/FM/1/47 基本序列,用 primer premier 5.0 软件进行序列分析并设计引物,所设计引物的 Tm 值、GC 含量及 3 末端稳定性等基本参数依据引物优化原则。

引物合成:由上海英骏公司合成。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-GGGCATTGGACAAACGTCTACG-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-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3 和 5-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3。

**2.2.4 Real-time RT-PCR 扩增** 用液氮研磨置于 -70 低温冰箱的肺组织后,使用 TRIzol 试剂提取肺组织中的 RNA 后,用上述 H1N1 和 GAPDH 引物进行一步法实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR),反应体积为 20 μL,反应体系含样本 RNA 2 μL, One Step SYBR GREEN 16.4 μL, 10 pmol 引物各 0.8 μL。反应条件为:42 5 min, 95 10 s, 95 5 s, 60 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。

### 2.2.5 计算及统计方法 肺指数及抑制率计算方法<sup>[6]</sup>:

肺指数 = 肺湿重 (g) / 体重 (g) × 100%; 肺指数抑制率 = (病毒对照组平均肺指数 - 实验组平均肺指数) / (病毒对照组平均肺指数 - 正常对照组平均肺指数) × 100%。

病毒载量计算方法: 本实验使用相对定量的方法, 以 GAPDH 作为内对照, 选择一个样品 (Con) 作为 Calibrator, 计算方法如下:

$$\text{Con } Ct = \text{Con } Ct - \text{Con } \Delta Ct$$

$$\text{样本 } Ct = \text{样本 } Ct - \text{样本 } \Delta Ct$$

$$\text{样本 } \Delta Ct = \text{样本 } Ct - \text{Con } Ct$$

$2^{-\Delta Ct}$  是各处理组基因表达相对 Calibrator 的倍数改变。

$$\text{相对含量的变化} = 2^{-\Delta Ct} \times 100\%$$

病毒载量抑制率 = (病毒对照组病毒载量均值 - 实验组病毒载量均值) / 病毒对照组病毒载量均值 × 100%。

统计方法: 计数资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 结果采用方差分析进行统计学处理。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对免疫低下小鼠肺炎模型的治疗作用** 表 1 结果显示, 采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染免疫低下小鼠后, 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 ( $P < 0.01$ ); 感染当天开始给予金柴抗病毒胶囊治疗 4 d 后, 3 个剂量组肺指数均显著降低, 与模型比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 且各剂量组与达菲对照组比较无显著性差异。

表 1 治疗给药 4 d 对流感病毒感染免疫低下小鼠肺指数的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肺指数	抑制率 / %
空白	-	0.70 ± 0.08	-
环磷酰胺	-	0.76 ± 0.09	-
模型	-	1.34 ± 0.1 <sup>1)</sup>	-
达菲	27.5	1.00 ± 0.09 <sup>3)</sup>	57.99
金柴	1 760	1.08 ± 0.07 <sup>3)</sup>	44.60
	880	1.04 ± 0.14 <sup>3)</sup>	52.20
	440	1.03 ± 0.08 <sup>3)</sup>	54.28

注: 与环磷酰胺组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型对照组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,  
<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与达菲对照组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ (表 3 同)。

表 2 结果显示: 采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染小鼠后, 模型组小鼠肺组织中病毒载量呈现高表达, 感染当天开始给予金柴抗病毒胶囊治疗 4 d 后, 3 个剂量组相对病毒载量均显著降低, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 且各给药组

与达菲对照组比较无显著性差异。

表 2 治疗给药 4 d 对流感病毒感染免疫低下小鼠病毒载量的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	相对病毒载量	抑制率 / %
空白	-	-	-
环磷酰胺	-	-	-
模型	-	662 115 ± 29 874	-
达菲	27.5	60 746 ± 6 081 <sup>1)</sup>	90.83
金柴	1 760	96 234 ± 17 310 <sup>2)</sup>	85.47
	880	89 494 ± 50 323 <sup>2)</sup>	86.48
	440	45 422 ± 12 679 <sup>2)</sup>	93.14

注: 与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与达菲对照组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ (表 4 同)。

**3.2 对免疫低下小鼠肺炎模型的预防作用** 表 3 结果显示: 采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染小鼠后, 模型组肺指数明显增高, 与环磷酰胺对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 感染前预防性给予金柴抗病毒胶囊连续 5 d, 3 个剂量组均可显著降低肺指数, 与模型对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其中中、低剂量组与达菲比较无显著性差异。

表 3 预防给药 5 d 对流感病毒感染免疫低下小鼠肺指数的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肺指数	抑制率 / %
空白	-	0.62 ± 0.06	-
环磷酰胺	-	0.71 ± 0.07	-
模型	-	1.56 ± 0.50 <sup>1)</sup>	-
达菲	27.5	1.21 ± 0.14 <sup>3)</sup>	51.86
金柴	1 760	1.30 ± 0.06 <sup>2)</sup>	42.20
	880	1.12 ± 0.19 <sup>3)</sup>	63.22
	440	1.20 ± 0.16 <sup>3)</sup>	52.94

表 4 结果显示: 采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染小鼠后, 肺组织中病毒载量呈现明显高表达, 与环磷酰胺对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 感染前预防性给予金柴抗病毒胶囊 5 d, 3 个剂量组相对病毒载量均显著降低, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 金柴中、低剂量组病毒载量与达菲对照组比较无显著性差异。

## 4 讨论

应用环磷酰胺注射造成免疫低下小鼠模型, 不仅能有效降低免疫功能, 且操作简便, 是比较常用的一种方法<sup>[5,7]</sup>。H1N1 流感病毒感染可引起肺部水肿、炎性渗出、充血, 这些病理改变均可使肺部重

表 4 预防给药 5 d 对流感病毒感染免疫低下小鼠病毒载量的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	相对病毒载量	抑制率 /%
空白	-	-	-
环磷酰胺	-	-	-
模型		1 768 405 ±530 174 <sup>1)</sup>	-
达菲	27.5	230 746 ±96 081 <sup>2)</sup>	86.95
金柴	1 760	1 036 234 ±517 310 <sup>1,3)</sup>	41.40
	880	92 115 ±29 874 <sup>2)</sup>	94.79
	440	269 494 ±250 323 <sup>2)</sup>	84.76

量增加,从而导致肺指数升高,故通常以肺指数值的大小来表示肺部病变的严重程度。而对病毒载量相对定量的分析,可表现出病毒复制动力学,也反映组织中病毒的浓度,是病毒增殖和免疫清除机制共同作用的结果,因而在判定疾病进程和临床治疗效果上具有极大的价值。

以透邪解毒法为组方依据的金柴抗病毒胶囊(原名安替威胶囊),通过柴胡清宣透达气机,引邪外出,继以金银花等清热解毒之药追逐荡伐疫疠之毒,党参助正气驱邪外达,又可防关门留寇,透邪与解毒并用,透中有清,清中寓透,清透之中参以扶助正气,使邪毒郁热得解,邪气得出,正气得复。

前期实验结果显示:金柴抗病毒胶囊对甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株感染正常免疫状态的小鼠具有明显的预防和治疗作用。本实验在以往研究基础上,采用免疫低下小鼠感染病毒造成肺炎模型,以肺指数和病毒载量为评价指标,评价了金柴抗病毒胶

囊对流感病毒 FM1 株感染免疫功能低下小鼠的防治作用。并与目前世界卫生组织推荐的治疗流感主要药物达菲进行了比较研究,结果显示:金柴抗病毒胶囊对流感病毒感染免疫低下小鼠具有明显的治疗和预防作用,为研究该方调节免疫机能发挥抗流感病毒作用机制提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 曹洪欣,崔晓兰,赵静,等.安替威胶囊治疗小鼠病毒性肺炎的作用机制研究[J].中国中药杂志,2005,30(13),1039.

[2] 崔晓兰,曹洪欣,赵静,等.安替威胶囊解热实验研究[J].中医药学报,2005,33(3):57.

[3] 徐慧,曹洪欣,刘建勋,等.安替威胶囊对迟发型超敏反应小鼠免疫功能的影响[J].中医药学刊,2005,23(6):995.

[4] 流感病毒更易攻击免疫低下人群[EB/OL].[http://news.ifeng.com/mainland/\\_17\\_1165061.shtml](http://news.ifeng.com/mainland/_17_1165061.shtml),2009-05-19.

[5] 杨颖,蔡玫,黄志彪,等.环磷酰胺致小鼠免疫功能低下模型建立与评价[J].中国公共卫生,2008,4(5):581.

[6] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:251.

[7] 赵戈清,罗辉,陈东辉.不同剂量环磷酰胺诱导正常小鼠免疫抑制的研究[J].免疫学杂志,2005,(3):122.

[责任编辑 聂淑琴]