

· 药理 ·

## 喘可治注射液对甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株致小鼠肺炎的影响

姚荣妹<sup>1,2</sup>, 毛鑫<sup>1</sup>, 曲天歌<sup>3</sup>, 鲍岩岩<sup>1</sup>, 孙静<sup>1</sup>, 时瀚<sup>1</sup>, 时宇静<sup>1</sup>, 崔晓兰<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 华北理工大学 中医学院, 河北 唐山 063210;  
3. 北京中医药大学 基础医学院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**评价喘可治注射液对甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株致小鼠肺炎模型的药效作用。**方法:**将 ICR 小鼠随机分为正常组、模型组、达菲组(27.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、喘可治注射液组(1.5 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。除正常组外,其余各组采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株滴鼻感染 ICR 小鼠造成病毒性肺炎模型,分别进行死亡保护实验、治疗性给药实验和预防性给药实验。死亡保护实验中每组 20 只小鼠,以 2 倍半数致死量(LD<sub>50</sub>)流感病毒液滴鼻感染,感染后当天开始给药,每天 1 次,连续 4 d,观察感染后 14 d 内动物的死亡情况,并计算死亡率、死亡保护率;治疗性给药实验中每组 10 只小鼠,以 0.8 倍 LD<sub>50</sub> 流感病毒液滴鼻感染,感染后当天开始给药,每天 1 次,连续 4 d,于实验第 5 天处死小鼠,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肺组织中白细胞介素-8(IL-8)含量及脑组织内发热介质前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>),精氨酸加压素(AVP)的含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织内相对病毒载量;预防性给药实验中每组 10 只小鼠,分组当天开始给药,每天 1 次,连续 5 d,末次给药 1 h 后,除正常组外,其余各组以 0.8 倍 LD<sub>50</sub> 流感病毒液滴鼻感染 ICR 小鼠,感染后第 4 天称重后处死小鼠,计算各组肺指数、脾指数、胸腺指数及肺指数抑制率,Real-time PCR 检测肺组织内相对病毒载量。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠 IL-8、PGE<sub>2</sub> 含量,肺指数及肺组织内流感病毒株病毒载量均显著升高(P<0.01);与模型组比较,治疗性给予喘可治注射液可明显降低感染后小鼠的死亡率、肺组织内 IL-8 含量、脑组织内 PGE<sub>2</sub> 含量及肺组织中流感病毒病毒载量(P<0.05, P<0.01);预防性给予喘可治注射液可显著提高感染小鼠的胸腺指数(P<0.01),明显降低感染小鼠肺指数及肺组织中流感病毒病毒载量(P<0.05);两种给药方式均可明显减轻支气管、血管周围及肺泡间质等组织炎性细胞浸润,减少管腔内红细胞渗出。**结论:**喘可治注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染所致病毒性肺炎小鼠模型有较好的治疗和预防作用,其作用机制可能与减轻炎症反应和抑制病毒复制有关。

**[关键词]** 喘可治注射液; 甲型 H1N1 流感病毒; 病毒性肺炎; 药效作用

**[中图分类号]** R289;R373.1;R322.3;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0043-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191236

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190304.1038.003.html>

**[网络出版时间]** 2019-03-05 14:49

## Effect of Chuankezhi Injection on Prevention and Treatment of H1N1 Influenza Virus in Mice

YAO Rong-mei<sup>1,2</sup>, MAO Xin<sup>1</sup>, QU Tian-ge<sup>3</sup>, BAO Yan-yan<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>,  
SHI Han<sup>1</sup>, SHI Yu-jing<sup>1</sup>, CUI Xiao-lan<sup>1\*</sup>

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

2. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Sciences and Technology, Tangshan 063210, China;

3. School of Basic Medicine Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[收稿日期]** 20180918(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81774204)

**[第一作者]** 姚荣妹,在读博士,讲师,从事中药抗菌及抗病毒药效评价及机制研究,E-mail:471268167@qq.com

**[通信作者]** \* 崔晓兰,博士,研究员,博士生导师,从事中药抗菌及抗病毒药效评价及机制研究,E-mail:cuixiaolan2812@126.com

**[ Abstract ] Objective:** To evaluate the effect of Chuankezhi injection on mouse model of pneumonia induced by influenza A (H1N1) FM1 strain. **Method:** ICR mice were randomly divided into normal group, model group, tamiflu control group ( $27.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and Chuankezhi injection group ( $1.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). In the death protection experiment, mice were infected with  $2 \times$  half lethal dose ( $\text{LD}_{50}$ ) of influenza virus FM1. The Chuankezhi injection was given once a day for 4 days. The number of death animal within 14 days was counted. The mortality and the death protection rate were calculated. In the treatment experiment, mice were infected with  $0.8 \times \text{LD}_{50}$  of influenza virus, and the Chuankezhi injection was given once a day for 4 days. On the 5<sup>th</sup> day after the infection, the levels of interleukin-8 (IL-8) in lung, prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) and vasopressin (AVP) in brain were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The viral load of influenza virus in lung was tested by Real-time PCR. In the pre-treatment experiment, mice were given Chuankezhi injection once a day for 5 days. 1 hour after the last treatment, mice were infected with  $0.8 \times \text{LD}_{50}$  influenza virus. 4 days after the infection, the lung index, spleen index, thymus index, and viral load in lung tissue were calculated. **Result:** Compared with normal group, the IL-8,  $\text{PGE}_2$  content, lung index and viral load in the lung tissue of model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, Treatment of Chuankezhi injection could reduce the rate of deaths. Significantly inhibit the level of IL-8,  $\text{PGE}_2$ , and the viral load of influenza ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Pre-treatment of Chuankezhi injection could significantly increase the thymus index of infected mice ( $P < 0.01$ ), reduce lung index and the viral load of influenza ( $P < 0.05$ ). Both administration methods can significantly reduce the infiltration of inflammatory cells in the bronchial, perivascular and alveolar interstitium and reduce the exudation of red blood cells in the lumen. **Conclusion:** Chuankezhi injection could effectively prevent the mouse model of pneumonia induced by influenza A (H1N1) virus. The mechanism might be related to the reduction of inflammation and inhibiting viral replication.

**[ Key words ]** Chuankezhi injection; influenza A H1N1 virus; viral pneumonia; pharmacodynamic effect

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,该病毒毒株包含有猪流感、禽流感和人流感 3 种流感病毒的基因片段,是造成全球范围内高致病率及死亡率的流感病毒之一<sup>[1-2]</sup>。人群对甲型 H1N1 流感病毒普遍易感,中国国家流感中心数据显示,甲型 H1N1 仍是我国流感病毒最主要的亚型<sup>[3]</sup>。2017—2018 年,我国多数地方相继暴发甲型 H1N1 病毒性肺炎,患者病情进展迅速,易引发重症肺炎,死亡率极高<sup>[4]</sup>。目前,对甲型 H1N1 流感病毒的治疗主要以抗病毒化学药为主,但药物不良反应明显,且由于该病毒基因突变率高,致其对药物易快速产生耐药性,大大限制了临床治疗效果。中医药在治疗流感病毒性肺炎具有独特的诊疗思路,根据肺炎不同进展阶段选择不同的中药进行“辨证论治”,轻证选用辛凉解表类方药,重证以解毒清热开肺法治疗,当病情恶化并出现严重并发症时,以控制病情和挽救生命为法则。中药注射剂在急救方面有独特的优势,其既可以快速起到抗病毒和减轻肺内炎症的作用,又有效的避免了西药的不良反应及耐药性的问题<sup>[5-6]</sup>,是抗流感病毒不错的选择。

喘可治注射液属于国家二类新药,由淫羊藿、巴戟天构成,功效为温阳补肾、平喘止咳,临床上主要用于治疗支气管炎哮喘<sup>[7]</sup>、毛细支气管炎<sup>[8]</sup>、慢性阻塞性肺病<sup>[9]</sup>等呼吸系统疾病,现代药理学研究发现,喘可治注射液可抑制流感病人异常升高的  $\gamma$ -干扰素 (INF- $\gamma$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素 (IL)-6, IL-8 和 IL-10 等炎症因子的分泌,限制免疫细胞过度反应对机体造成的损害<sup>[10]</sup>。甲型流感病毒所致的肺炎发病机制主要是病毒引起肺部性介质的生成和渗出,引发肺部炎症反应,其发病机制与喘可治注射液的药理作用有一致之处,本课题组认为喘可治注射液对流感性肺炎有一定的治疗作用。因此,本研究采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株滴鼻感染 ICR 小鼠造成病毒性肺炎模型,首次对喘可治注射液治疗流感致病毒性肺炎的药效作用进行探索性研究,通过死亡保护实验、治疗性及预防性给药实验评价喘可治注射液对流感所致肺炎的防治作用,为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物及病毒株** 160 只 SPF 级 ICR 小鼠,体质

量(14 ± 1) g,雌雄各半,购自北京维通利华试验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2006-0009。饲养于中国中医科学院中药研究所生物安全实验室 SPF 级动物房,室温(22 ± 1) °C,相对湿度(55 ± 15)%。本实验经中国中医科学院中药研究所伦理委员会审批通过,编号:死亡保护实验 20182020,治疗性药效实验 20182021,预防性药效实验 20182022。甲型 H1N1 流感病毒鼠肺适应株(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 实验室常规传代,-80 °C 保存备用。

**1.2 药品及试剂** 喘可治注射液(广州健心药业有限公司,国药准字 Z20010172,批号 20080905059);达菲(磷酸奥司他韦胶囊,瑞士巴塞尔豪夫迈·罗氏有限公司,批号 B1162);IL-8 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号 20170626);前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)ELISA 试剂盒(英国 Abcam 公司,批号 ab133471);精氨酸加压素(AVP)ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号 CBS-E09272m);甲醛溶液,二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 F20170824,20170705);无水乙醇,伊红染色液,硝酸(北京化工厂,批号分别为 20180208,20150915,20110629);苏木素染色液(北京博瑞捷科技有限公司,批号 DH0001/0405A17);One Step SYBR PrimeScript 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒,trizol,逆转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号均为 AK3201);引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件进行序列分析并设计引物,由上海英骏公司合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	退火温度 /°C	循环数 /个	长度 /bp
H1N1	上游 GACCAATCTGTACCTCTGAC	60	40	103
	下游 GGGCATTGGACAAACGCTACG			
GAPDH	上游 GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	55	40	233
	下游 CTCGCTCTGGAAGATGGTG			

**1.3 仪器** Applied Biosystems 7500 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司);TC-96/G/H(b)型梯度 PCR 仪(杭州博日科技有限公司);HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳公司);RT-6000 型酶

标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);MSC1.8 A2 型生物安全柜(德国 Thermo 公司);YP/0001 型动物体质量电子天平(上海越平科学仪器有限公司);AR1140 型动物脏器电子天平(美国 Chaus 公司);TP1020 型自动脱水机,EG1140H 型石蜡包埋机,DMLB-HC 型自动光学照相生物显微镜(德国 Leica 公司);HM355S 型全自动轮转式切片机(德国 Microm 公司);XL5010 型自动染色机(德国 Autostainer 公司)。

## 2 方法

### 2.1 Reed-Muench 法测定病毒半数致死量(LD<sub>50</sub>)

病毒以 10 倍比稀释为 8 个浓度<sup>[11]</sup>,分别为 1 × 10<sup>0</sup>,1 × 10<sup>-1</sup>,1 × 10<sup>-2</sup>,1 × 10<sup>-3</sup>,1 × 10<sup>-4</sup>,1 × 10<sup>-5</sup>,1 × 10<sup>-6</sup>,1 × 10<sup>-7</sup>倍病毒液原液,每个梯度选用 10 只雄性 ICR 小鼠,病毒用 DMEM 稀释,滴鼻方式接种流感病毒,0.35 μL/只,观察 14 d,记录各个病毒滴度组小鼠的死亡数,应用 Reed-Muench 方法统计结果,计算甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒的 2 倍 LD<sub>50</sub> 为 1 × 10<sup>-4.5</sup>。

**2.2 测定最佳病毒感染剂量** 将甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株用生理盐水稀释成 0.5 ~ 4 倍 LD<sub>50</sub> 的不同病毒液<sup>[12]</sup>,取 ICR 小鼠 80 只,每个稀释度 10 只,滴鼻感染病毒,0.35 μL/只。每日观察小鼠的死亡情况,连续观察 15 d。选取感染后 15 d 内动物无死亡,但肺组织病理与正常组比较已发生明显变化的浓度,为实验时的感染量。实验结果显示 0.8 倍 LD<sub>50</sub> 为最佳感染剂量。

**2.3 造模、分组及给药** ICR 小鼠按体质量随机分为正常组、模型组、达菲组、喘可治注射液组。喘可治注射液成人临床常规用量为 8 mL · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,换算为小鼠有效剂量为 1.5 mL · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>(相当于人临床用量的等倍)<sup>[13]</sup>,实验时按 0.02 mL · g<sup>-1</sup> 腹腔注射给药。达菲临床用量为 150 mg · (60 kg)<sup>-1</sup>,换算为小鼠等效剂量为 27.5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,按 0.02 mL · g<sup>-1</sup> 灌胃给药。除正常组外,其余各组小鼠用乙醚轻度麻醉,以 0.8 倍 LD<sub>50</sub> 甲型 H1N1 流感病毒(FM1 株)液通过滴鼻方式感染小鼠,感染量为 0.35 μL/只,制备小鼠病毒性肺炎模型<sup>[14-15]</sup>。造模后 5 d,感染鼠肺指数升高,肺组织中有支气管炎浸润,上皮增生脱落,肺泡间质增宽,并伴大量炎症细胞浸润等病理改变,提示造模成功<sup>[16]</sup>。给药及干预措施,死亡保护实验,每组 20 只小鼠,以 LD<sub>50</sub> 流感病毒液滴鼻感染,感染后当天开始给药,1 次/d,连续 4 d;治疗性给药实验,每组 10 只小鼠,以 0.8 倍

LD<sub>50</sub> 流感病毒液滴鼻感染, 感染后当天开始给药, 1 次/d, 连续 4 d; 预防性给药实验, 每组 10 只小鼠, 分组当天开始给药, 1 次/d, 连续 5 d, 末给药 1 h 后, 除正常组外, 其余各组以 0.8 倍 LD<sub>50</sub> 流感病毒滴鼻感染 ICR 小鼠。

## 2.4 检测指标

### 2.4.1 死亡保护试验

观察记录感染后 14 d 内动物的死亡情况, 按以下公式计算死亡率、死亡保护率。

$$\text{死亡率} = \text{死亡数} / \text{动物总数} \times 100\%$$

$$\text{死亡保护率} = (\text{病毒组死亡率} - \text{实验组死亡率}) / \text{病毒组死亡率} \times 100\%$$

### 2.4.2 ELISA 检测炎症相关因子

取肺、脑组织块, 在预冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称质量, 放入 5 mL 或 10 mL 的小烧杯内, 用组织匀浆器 10 000 ~ 15 000 r·min<sup>-1</sup> 上下研磨制成 10% 组织匀浆, 将制备好的 10% 匀浆用低温低速离心机 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 测定肺组织中 IL-8, 脑组织内发热介质 PGE<sub>2</sub> 及 AVP 的水平, 其他步骤严格参照试剂盒说明书进行。

### 2.4.3 测定脏器指数

称量小鼠体质量, 用断颈椎的方法处死小鼠, 剥离肺脏、脾脏、胸腺, 并称质量, 计算肺指数、脾指数、胸腺指数及肺指数抑制率。

$$\text{肺指数} = \text{肺湿重}(\text{g}) / \text{体质量}(\text{g})$$

$$\text{脾指数} = \text{脾湿重}(\text{g}) / \text{体质量}(\text{g})$$

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺湿重}(\text{g}) / \text{体质量}(\text{g})$$

$$\text{肺指数抑制率} = (\text{病毒组平均肺指数} - \text{实验组平均肺指数}) / (\text{病毒组平均肺指数} - \text{正常组平均肺指数}) \times 100\%$$

### 2.4.4 Real-time PCR 检测肺组织内相对病毒载量

用液氮研磨肺组织后, 使用 trizol 提取肺组织中的总 RNA, 逆转录试剂盒进行逆转录得 cDNA。用 H1N1 和 GAPDH 引物进行实时荧光定量聚合酶链式反应(引物序列见表 1), 反应体积为 20 μL, 反应体系含样本 2 μL + 引物 18 μL。反应条件为 42 ℃ 5 min, 95 ℃ 10 s, 共 40 个循环(95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s), 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 15 s 溶解。反应结束后分析各检测样本 C<sub>t</sub> 值。病毒载量计算方法: 使用相对定量的方法, 以 GAPDH 作为内参对照, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 表示病毒相对表达量。

$$\text{病毒载量抑制率} = (\text{病毒组病毒载量均值} - \text{实验组病毒载量均值}) / \text{病毒组病毒载量均值} \times 100\%$$

### 2.4.5 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肺组织病理形态学变化

取小鼠右肺中叶组织, 用甲醛固定,

乙醇梯度脱水, 2 次二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜下进行病理学观察。

## 2.5 统计学处理

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 符合正态分布者使用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用单因素方差分析, 方差齐采用 *t* 检验, 方差不齐采用  $\chi^2$  检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 喘可治注射液对甲型流感病毒 H1N1 FM1 株致小鼠肺炎模型的死亡保护作用

与正常组比较, 模型组小鼠死亡率显著升高 (*P* < 0.01), 死亡率为 90%; 与模型组比较, 喘可治注射液组及达菲组小鼠死亡率明显降低 (*P* < 0.05), 死亡率分别为 50%, 30%; 喘可治注射液组与达菲组小鼠死亡保护率分别为 44.44%, 66.67% (*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株感染致小鼠肺炎模型死亡率、死亡保护率的影响

Table 2 Effect of Chuankezhi injection on mortality and death protection rate of mice model of pneumonia induced by influenza virus H1N1

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	死亡数 /n	死亡率 /%	死亡保护率 /%
正常	-	0	0	-
模型	-	18	90.00 <sup>1)</sup>	-
达菲	27.5	6	30.00 <sup>2)</sup>	66.67 <sup>2)</sup>
喘可治注射液	1.5 <sup>4)</sup>	10	50.00 <sup>2)</sup>	44.44 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.01; 与模型组比较<sup>2)</sup> *P* < 0.05, <sup>3)</sup> *P* < 0.01; <sup>4)</sup> 表示剂量单位为 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (表 3, 5 ~ 7 同)。

### 3.2 喘可治注射液对甲型流感病毒 H1N1 FM1 株致小鼠肺炎模型的治疗作用

#### 3.2.1 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致小鼠肺炎小鼠肺组织中 IL-8 含量的影响

与正常组比较, 模型组小鼠肺组织中 IL-8 含量显著升高 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 喘可治注射液组及达菲组小鼠肺组织中 IL-8 含量显著降低 (*P* < 0.01)。见表 3。

#### 3.2.2 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致小鼠肺炎小鼠脑组织中 PGE<sub>2</sub> 及 AVP 含量的影响

与正常组比较, 模型组小鼠脑组织中 PGE<sub>2</sub>, AVP 含量升高, 其中 PGE<sub>2</sub> 表达升高明显 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 喘可治注射液组小鼠脑组织中 PGE<sub>2</sub> 含量显著降低 (*P* < 0.01)。见表 4。

表 3 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致肺炎小鼠肺组织中 IL-8 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Chuankezhi injection on IL-8 in lung of mice infected with influenza virus H1N1 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	IL-8/ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	50.34 ± 10.63
模型	-	160.41 ± 38.83 <sup>1)</sup>
达菲	27.5	80.26 ± 16.82 <sup>3)</sup>
喘可治注射液	1.5 <sup>4)</sup>	110.90 ± 29.54 <sup>3)</sup>

表 4 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致肺炎小鼠下丘脑中 PGE<sub>2</sub> 及 AVP 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Chuankezhi injection on PGE<sub>2</sub> and AVP in hypothalamus of mice infected with influenza virus H1N1 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	PGE <sub>2</sub>	AVP
正常	-	157.31 ± 28.65	73.82 ± 12.80
模型	-	257.58 ± 27.68 <sup>1)</sup>	77.69 ± 10.42
达菲	27.5	245.26 ± 36.59	78.33 ± 13.20
喘可治注射液	1.5 <sup>5)</sup>	210.17 ± 22.97 <sup>4)</sup>	75.13 ± 7.07

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>5)</sup> 表示剂量单位为 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。

表 6 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致肺炎小鼠脏器指数及肺指数抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 6 Effect of Chuankezhi injection on organ index and lung index inhibition rate of influenza virus H1N1 induced pneumonia ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	肺指数	抑制率/%	脾指数	胸腺指数
正常	-	0.74 ± 0.06	-	0.45 ± 0.09	0.39 ± 0.12
模型	-	1.59 ± 0.25 <sup>1)</sup>	-	0.44 ± 0.08	0.16 ± 0.05 <sup>1)</sup>
达菲	27.5	0.93 ± 0.11 <sup>3)</sup>	73.13	0.41 ± 0.09	0.27 ± 0.04 <sup>3)</sup>
喘可治注射液	1.5 <sup>4)</sup>	1.25 ± 0.33	29.47	0.40 ± 0.11	0.23 ± 0.06 <sup>3)</sup>

3.3.2 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致肺炎小鼠肺组织病毒载量的影响 与模型组比较,喘可治注射液组及达菲组小鼠肺组织中病毒载量均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 7。

3.4 喘可治注射液对病毒性肺炎小鼠肺组织病理形态学的影响 正常组小鼠肺脏组织肺泡结构完整,肺泡隔正常,细支气管上皮完整,周围血管及支气管偶见及少量的炎性细胞。模型组可见支气管和血管周围及其管腔内大量炎性细胞浸润,细支气管上皮部分脱落,管腔内见红细胞渗出,肺泡间质增宽并伴大量炎症细胞浸润等病理改变。治疗性和预防性给予喘可治注射液后小鼠肺部支气管、血管周围及肺泡间质等组织炎性细胞浸润程度较模型组明显

3.2.3 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致肺炎小鼠肺组织病毒载量的影响 与模型组比较,喘可治注射液组及达菲组小鼠肺组织中病毒载量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5。

表 5 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株感染致肺炎小鼠肺组织病毒载量的影响 ( $n = 10$ )

Table 5 Effect of Chuankezhi injection on viral load in lung tissue of mice infected with influenza virus H1N1 ( $n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	病毒载量 ( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率/%
正常	-	-	-
模型	-	257 284.35 ± 10 035.50	-
达菲	27.5	92 836.82 ± 77 69.82 <sup>3)</sup>	63.92
喘可治注射液	1.5 <sup>4)</sup>	117 382.17 ± 9 712.01 <sup>4)</sup>	54.38

3.3 喘可治注射液对甲型流感病毒 H1N1 FM1 株致小鼠肺炎模型的预防作用

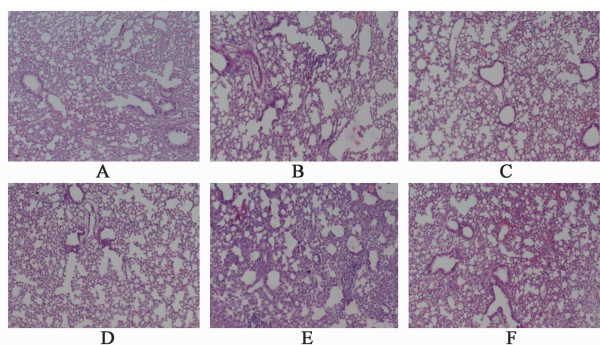
3.3.1 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株致肺炎小鼠脏器指数及肺指数抑制率的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺指数显著升高 ( $P < 0.01$ ),脾及胸腺指数降低,其中胸腺指数下降显著 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,喘可治注射组及达菲组胸腺指数显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 6。

表 7 喘可治注射液对流感病毒 H1N1 FM1 株感染致肺炎小鼠肺组织病毒载量的影响 ( $n = 10$ )

Table 7 Effect of Chuankezhi injection on viral load in lung tissue of mice infected with influenza virus H1N1 ( $n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	病毒载量 ( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率/%
正常	-	-	-
模型	-	218 310.64 ± 4 634.21	-
达菲	27.5	73 844.38 ± 2 042.81 <sup>3)</sup>	66.17
喘可治注射液	1.5 <sup>4)</sup>	100 621.11 ± 2 112.58 <sup>2)</sup>	53.91

减轻,毛细血管管腔内红细胞渗出减少,肺泡隔间隙趋于正常。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 治疗性实验喘可治注射液组; D. 预防性实验喘可治注射液组; E. 治疗性实验达菲组; F. 预防性实验达菲组

图 1 喘可治注射液对病毒性肺炎小鼠肺组织病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Chuankezhi injection in histopathological morphology in lung tissue of mice infected with influenza virus H1N1 (HE, ×200)

#### 4 讨论

甲型 H1N1 流感病毒与季节性流感病毒不同, 该病毒基因组是由禽流感、猪流感和人流感病毒基因组混合而成的三源基因重配的新型流感病毒, 此病毒具有易变异性和易传染性, 全球仍不断持续暴发不同程度的甲型 H1N1 流感疫情<sup>[17]</sup>, 所以对本病的预防和治疗就显得格外重要。近 20 年来我国学者在中药抗流感病毒方面作了大量研究工作, 结果表明中医药对病毒性疾病, 特别是流感致病毒性肺炎有良好的治疗作用, 凸显出其相对安全、价格低廉、不易产生耐药性的独特优势<sup>[18-19]</sup>。中药注射液在防治流感性肺炎方面具有化学药品不可替代的作用, 临床上取得了很好的疗效。现代药理学研究结果表明, 血必净注射液<sup>[20]</sup>、热毒宁注射液<sup>[21-22]</sup>、毒热平注射液<sup>[23]</sup>、银黄注射液<sup>[24]</sup>等有明显的体外抗甲型 H1N1 流感病毒, 增强机体抗病毒能力和减轻肺组织炎症的作用。

临床上喘可治注射液也被广泛应用于感染性呼吸道疾病的治疗。喘可治注射液由淫羊藿和巴戟天制成, 淫羊藿含有淫羊藿多糖、淫羊藿苷、淫羊藿总黄酮等多种有效成分, 可以增强机体免疫能力, 对体液免疫具有双向调节作用, 并有一定的抗菌抗病毒功能<sup>[25-26]</sup>, 巴戟天含有单糖、多糖、树脂、氨基酸及微量元素等, 在抗应激及调节免疫功能等方面有一定的作用<sup>[27]</sup>。现代研究发现, 喘可治注射液可以通过下丘脑-内分泌-免疫网络发挥多环节调节作用, 改善机体免疫功能, 限制免疫细胞过度反应, 减少呼吸道感染及提高机体的应激能力, 对于哮喘和反复性呼吸道感染疾病疗效确切<sup>[28]</sup>。本课题组基于

喘可治注射液减轻肺部炎症、增强机体免疫功能等药理作用猜测其对甲型流感病毒所致的肺炎应该有一定的防治作用, 故根据流感致病毒性肺炎的临床表现设计了相应的药效学试验进行探索性研究。

病毒感染宿主后病毒可刺激大量炎症因子、生长因子等细胞因子的释放, 过度的炎症因子释放会导致免疫和急性炎症反应, 造成机体组织的损伤<sup>[29-30]</sup>。IL-8 是体内常见的炎症介质, 可通过促进中性粒细胞浸润及酶释放、释放氧自由基而诱发局部的炎症反应, 甚至组织器官损伤<sup>[31]</sup>。PGE<sub>2</sub> 是花生四烯酸环氧合酶代谢产物, 是一种重要的细胞生长和调节因子, 然而, PGE<sub>2</sub> 过量则会成为一种较强的炎症因子, 参与炎症反应过程<sup>[32]</sup>。本实验结果显示, 治疗性给予喘可治注射液可抑制感染小鼠肺组织内 IL-8、PGE<sub>2</sub> 释放, 产生免疫抑制和抗炎作用, 减轻 FM1 株流感病毒所致的肺部炎症反应。喘可治注射液以益气健脾补肾助阳, 达到扶正固本治则, 可增强机体免疫功能。本实验预防性给予喘可治注射液后可以提高感染鼠的胸腺指数, 说明该药能很好地促进机体免疫器官的发育, 使其具备良好的抵抗病原微生物感染的物质基础。喘可治注射液在治疗性和预防性试验中均可以降低感染鼠肺组织里病毒的数量, 显示出很好的抗病毒作用, 揭示其通过降低小鼠肺组织中病毒载量而发挥抑制流感病毒复制和感染的作用<sup>[33]</sup>, 同时可降低肺炎小鼠 IL-8 和 PGE<sub>2</sub> 含量, 提示该药物可以通过减少感染小鼠促炎细胞因子的释放来减轻肺组织的炎性损伤, 改善肺组织炎症病理变化。采用流感病毒 FM1 株感染幼年小鼠的死亡保护实验结果提示, 喘可治注射液可明显降低小鼠死亡率, 提高死亡保护率, 对重症病毒性肺炎小鼠有保护作用。本研究显示了喘可治注射液防治甲型 H1N1 流感所致的病毒性肺炎的可行性和有效性, 为今后病毒性肺炎的研究治疗提供了新的思路。

#### [参考文献]

[1] 陈闻天, 黄鹤, 于汉杰, 等. 甲型流感病毒基因组的进化与变异[J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8(5): 411-420.  
[2] LU C J, JIANG Z T, FAN X M, et al. A metabonomic approach to the effect evaluation of treatment in patients infected with influenza A (H1N1)[J]. Talanta, 2012, 100(20): 51-56.  
[3] 李立, 杜雅薇, 寇爽, 等. 金银花、连翘对甲型 H1N1 流感免疫调节通路影响的生物信息学分析[J]. 中国实

- 验方剂学杂志,2017,23(10):201-204.
- [4] 王燕. H1N1 流感病毒性肺炎临床诊治启示[J]. 临床肺科杂志,2018,23(11):2128-2129.
- [5] 陈琪,吴莹,齐晓宇,等. 中医成药治疗甲型 H1N1 流感研究进展[J]. 现代生物医学进展,2016,16(19):3793-3796.
- [6] 王振中,鲍琳琳,孙兰,等. 热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒作用机制研究[J]. 中草药,2014,45(1):90-93.
- [7] 朱泽豪,廖柳,严夏. 基于贝叶斯框架的中药注射液联合西药治疗小儿支气管哮喘的 Meta 分析[J]. 中成药,2018,40(8):1889-1894.
- [8] 吴文先,高雅,刘霞. 喘可治注射液不同给药途径治疗婴幼儿毛细支气管炎临床疗效比较[J]. 中医临床研究,2016,8(25):113-114.
- [9] 郑红英,杨春莲,何丽林. 喘可治注射液联合多索茶碱治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作期的疗效观察[J]. 现代药物与临床,2018,33(4):809-812.
- [10] 肇静娴,曾耀英,王青,等. 喘可治注射液对人外周血单个核细胞 Th1/Th2 细胞因子谱的影响[J]. 中国免疫学杂志,2006,22(4):356-359.
- [11] 李承刚. 纳米材料 PAMAM G3 及甲型 H1N1 流感病毒导致小鼠急性肺损伤的致病机理研究[D]. 北京:北京协和医学院,2010.
- [12] 高晶晶,李鑫,乔瑞洁,等. 百日咳小鼠呼吸道感染模型的建立与应用[J]. 微生物学免疫学进展,2018,46(5):28-35.
- [13] 郭姗姗,刘颖,高英杰,等. 小儿肺热咳喘口服液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):152-155.
- [14] 李玲,吴佳敏,欧阳建军,等. 抗流感病毒性肺炎的有效中药复方筛选及机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(8):1168-1173.
- [15] 郭姗姗,高英杰,马雪萍,等. 一叶抗流感胶囊抑制甲型 H1N1 流感病毒感染的体内外研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):123-127.
- [16] 尹香琳,张婧瑶,刘卫东,等. 1-磷酸鞘氨醇受体 2 介导 PI3K/Akt/eNOS 通路抑制甲型流感病毒诱导的病毒性肺炎[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(11):2062-2067.
- [17] Garten R J, Davis C T, Russell C A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans [J]. Science, 2009,325(5937):197-201.
- [18] 陈创荣,刘建兴,李耿,等. 岗藿抗感汤对小鼠 H1N1 流感病毒肺炎的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(9):3318-3321.
- [19] 刘蓉,武志强,何敏,等. 桂枝挥发油与桂皮醛对病毒性肺炎小鼠细胞因子及 T 细胞亚群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(18):139-143.
- [20] 马月霞. 常用中药注射液不同配伍抗小鼠甲型 H1N1 流感重症肺炎的疗效研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [21] 孙兰,段书敏,周军,等. 热毒宁注射液体外抑制甲型 H1N1 流感病毒的研究[J]. 现代药物与临床,2014,29(8):848-851.
- [22] 孙兰,刘艾林,王振中,等. 热毒宁注射液及其组分对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用研究[J]. 现代药物与临床,2014,29(1):27-31.
- [23] 张艳丽,顾立刚,曾郁敏,等. 毒热平注射液体外抗甲型流感病毒的作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(3):6-8.
- [24] 陈美娟,葛李,肖顺汉,等. 银黄注射液体外抗流感病毒的实验研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(3):591-592.
- [25] 卢芳,冯镇凯,杨晓旭,等. 基于免疫调节作用的淫羊藿各拆分组分筛选研究[J]. 中华中医药学刊,2018,36(6):1331-1335.
- [26] 路宇仁,陈映冰,崔元璐,等. 淫羊藿苷药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):209-220.
- [27] 饶鸿宇,陈滔彬,何彦,等. 南药巴戟天化学成分与药理研究进展[J]. 中南药学,2018,16(11):1567-1574.
- [28] 费辛,蔡宇波,曹兰芳,等. 喘可治注射液对大鼠抗炎和免疫调节机制的研究[J]. 药学服务与研究,2011,11(5):333-336.
- [29] 毛鑫,姚荣妹,高英杰,等. 抗病毒口服液治疗甲型 H1N1 流感病毒感染药效及机制探讨[J]. 中国药物警戒,2018,15(9):518-522.
- [30] Nurmi K, Kareinen I, Virkanen J, et al. Hemin and cobalt protoporphyrin inhibit NLRP3 inflammasome activation by enhancing autophagy: a novel mechanism of inflammasome regulation[J]. J Innate Immun, 2017, 9(1):65-82.
- [31] GAO L N, CUI Y L, WANG Q S, et al. Amelioration of Danhong injection on the lipopolysaccharide-stimulated systemic acute inflammatory reaction via multi-target strategy[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 149(3):772-782.
- [32] 于艳,贾天柱,才谦. 茅苍术及其麸炒品对胃溃疡大鼠抗炎作用的比较研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(4):705-710.
- [33] 刘颖,时宇静,时瀚,等. 银翘解毒软胶囊对流感病毒感染小鼠肺炎模型肺组织病毒载量及 M1 蛋白表达的影响[J]. 药学报,2011,46(6):650-655.

[责任编辑 孙丛丛]