

# 清热解毒软胶囊体内抗甲型H1N1流感病毒的作用研究<sup>△</sup>

贺凤兰<sup>1,2\*</sup>, 刘 强<sup>2</sup>, 周 杰<sup>3</sup>, 刘媛媛<sup>2</sup>, 高志峰<sup>3</sup>, 肖 红<sup>2</sup>, 杨占秋<sup>2#</sup>(1.南昌市疾病预防控制中心, 南昌 330083; 2.武汉大学医学病毒学研究所/食品与药品评价研究中心/病毒学国家重点实验室/国家中医药管理局中药抗病毒与肿瘤实验室, 武汉 430071; 3.石药集团欧意药业有限公司, 石家庄 050051)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0497-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.18

**摘要** 目的:观察清热解毒软胶囊(ADSC)体内抗甲型H1N1流感病毒作用,为其用于临床治疗甲型H1N1流感病毒感染提供实验依据。方法:将BALB/c小鼠随机分为正常对照组,模型对照组,阳性药物高、中、低剂量组[磷酸奥司他韦胶囊,0.04、0.02、0.01 g/(kg·d)]和ADSC高、中、低剂量组[1.5、0.75、0.375 g/(kg·d)]。除正常对照组外,其余各组小鼠均经鼻腔滴入滴度为 $1.6 \times 10^{-5.2}$ 的甲型H1N1流感病毒悬液复制染毒小鼠模型,造模6~8 h后ig相应药物,每天1次,连续5 d。给药结束后,观察7 d内小鼠体质量变化,计算15 d内小鼠的死亡率、死亡保护率及平均存活天数。另取小鼠,分组、给药同上,末次给药8 h后,测定小鼠肺指数和肺指数抑制率。结果:模型组小鼠体质量从第5天开始明显下降,第8天开始出现死亡(15 d内死亡率为85.7%),肺指数较正常对照组明显升高( $P < 0.01$ )。ADSC和磷酸奥司他韦胶囊均可减缓染毒小鼠体质量下降趋势,降低小鼠死亡率和肺指数,延长小鼠的平均存活天数。其中ADSC高剂量组和阳性药物高、中剂量组小鼠的平均存活天数显著高于模型对照组( $P < 0.05$ );除ADSC低剂量组外,其余各给药组小鼠的肺指数均显著低于模型对照组( $P < 0.05$ )。结论:ADSC对小鼠具有一定的体内抗甲型H1N1流感病毒的作用。

**关键词** 清热解毒软胶囊;甲型H1N1流感病毒;BALB/c小鼠

## Improvement Effects of Qingre Jiedu Soft Capsule on Mice Infected by Influenza A H1N1 Virus

HE Fenglan<sup>1,2</sup>, LIU Qiang<sup>2</sup>, ZHOU Jie<sup>3</sup>, LIU Yuanyuan<sup>2</sup>, GAO Zhifeng<sup>3</sup>, XIAO Hong<sup>2</sup>, YANG Zhanqiu<sup>2</sup>(1.Nanchang Center for Disease Prevention & Control, Nanchang 330083, China; 2.Institute of Medical Virology, Wuhan University/Center for Food and Drug Evaluation&Research/State Key Lab of Virology/Key Lab for Antiviral and Antitumor of Herbal Lab, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430071, China; 3.Ouyi Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang Pharmaceutical Group, Shijiazhuang 050051, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To observe the antiviral effects of Qingre jiedu soft capsule (ADSC) against influenza A H1N1 virus *in vivo*, and to provide a experimental support for clinical therapy of influenza A H1N1 virus. METHODS: BALB/c mice were randomly divided into normal control group, model control group, positive drug high-dose, medium-dose and low-dose groups [oseltamivir phosphate capsule, 0.04, 0.02, 0.01 g/(kg·d)] and ADSC high-dose, medium-dose and low-dose groups [1.5, 0.75, 0.375 g/(kg·d)]. Except for normal control group, others groups were given influenza A H1N1 virus with titer  $1.6 \times 10^{-5.2}$  via nasal cavity to induce poisoned mice model; 6-8 h after modeling, they were given relevant medicine intragastrically, once a day, for 5 days. After medication, the change of body weight within 7 d were observed in mice; the mortality and death prevention rate within 15 d, mean survival days (MSDs) were calculated in mice. Other mice were selected and grouped, and they were given same drugs as above. 8 h after last medication, lung index and inhibition rate of lung index were determined in mice. RESULTS: In model control group, the body weight of mice decreased significantly since 5th day, and mice death was beginning to occur since 8th day (mortality of 85.7% within 15 d); the lung index was increased significantly compared to normal control group ( $P < 0.01$ ). Both ADSC and oseltamivir phosphate capsule could slow down the decrease of body weight in mice, decreased the mortality and lung index of mice, and prolonged MSDs; the MSDs of mice in ADSC high-dose, positive drug high-dose and medium-dose groups were significantly higher than model control group ( $P < 0.05$ ), and lung index was significantly lower than model control group except that of ADSC low-dose group ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: ADSC has certain antiviral effect against influenza A H1N1 virus *in vivo*.

<sup>△</sup> 基金项目: 南昌市科技局科技支撑计划社会发展项目(No.洪财企[2012]80号)

\* 主管技师, 硕士。研究方向: 抗病毒药物。电话: 0791-86363255。E-mail: he\_495380@163.com

# 通信作者: 教授, 博士生导师。研究方向: 医学病毒学。电话: 027-68759136。E-mail: yangzhanqiu@163.com

**KEYWORDS** Qingre jiedu soft capsule; Influenza A H1N1 virus; BALB/c mice

甲型H1N1流感是以甲型H1N1流感病毒为病原体的急性呼吸道传染病,具有在人群中传染性强、传播快的特点。据报道,在2009年全球约30%的人感染了甲

型H1N1流感病毒<sup>[1]</sup>。然而,由于流感病毒经常发生抗原漂移,近年来全世界范围内经常发生规模大小不等的甲型H1N1流感暴发流行<sup>[2]</sup>。中医中药是我国医药的宝贵资源,在流感防治方面发挥了巨大作用。清热解毒软胶囊(ADSC)由金银花、连翘、黄芩等多味中草药组成,在临床上用于治疗咽喉肿痛、感冒发热、上呼吸道感染等病症<sup>[3]</sup>。笔者前期实验结果表明,ADSC体外有明显的抑制甲型H1N1流感病毒生物合成和阻断病毒侵入细胞的作用<sup>[4]</sup>,本研究将在此基础上进一步观察ADSC体内抗甲型H1N1流感病毒作用,为其临床用于治疗甲型H1N1流感病毒提供更充分的实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

KQ-600VDB 超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品

ADSC(石药集团欧意药业有限公司,批号:09209-0524,规格:每粒1.2 g);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,规格:每粒75 mg)。

### 1.3 动物与病毒

SPF级BALB/c小鼠358只,5~7周龄,♀♂各半,体质量(11±1)g,购自武汉大学实验动物中心[动物生产许可证号:SCXK(鄂)2010-0010]。甲型H1N1流感病毒A/FM/1/47为武汉大学医学病毒学研究所保存。

## 2 方法

### 2.1 病毒的扩增

使用前经小鼠体内扩增,取肺组织匀浆后低速离心,取上清,血凝实验<sup>[5]</sup>检测病毒的存在;细菌实验检测为阴性,血凝效价大于1:32后,分装保存于-80℃冰箱中。

### 2.2 ADSC给药剂量的确定

将91只小鼠按体质量统一编号后随机分为13组,每组7只,分别为6个不同剂量ADSC组、6个不同剂量阳性药物组(磷酸奥司他韦胶囊)和1个正常对照组。按说明书上推荐的人用剂量估算,小鼠ADSC的剂量为1~1.25 g/(kg·d)<sup>[6]</sup>,阳性药物磷酸奥司他韦胶囊的剂量为0.01~0.0125 g/(kg·d)。以此为依据取6个不同剂量[ADSC为8、4、2、1、0.5、0.25 g/(kg·d),阳性药物为0.1、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01 g/(kg·d)],用双蒸水制备成药物混合液后通过ig给药方式连续给药5 d,每天1次,每次0.2 mL;正常对照组小鼠ig相同体积的双蒸水。20 d内4个低剂量ADSC组和阳性药物组小鼠全部存活,且体质量变化与正常对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。因此,ADSC用于治疗感染甲型H1N1流感病毒小鼠的高、中、低剂量设定为1.5、0.75、0.375 g/(kg·d);阳性药物高、中、低剂量设定为0.04、0.02、0.01 g/(kg·d)。

### 2.3 甲型H1N1流感病毒半数致死量(LD<sub>50</sub>)的测定

将64只小鼠按体质量统一编号后随机分为8组,每组8只,分别为7个不同病毒滴度组和1个正常对照组。用无菌生理盐水将原病毒悬液作10倍稀释成7个滴度:10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>。采用乙醚将各组小鼠轻度麻醉后,分别经鼻腔滴入上述不同滴度的病毒悬液,每只50 μL;正常对照组小鼠滴入相同体积的生理盐水。采用Reed-muench法<sup>[7]</sup>计算得甲型H1N1流感病毒LD<sub>50</sub>的滴度为10<sup>-5.2</sup>。

### 2.4 ADSC对染毒小鼠体征指标及生存情况的影响考察

将139只小鼠按体质量统一编号后随机分为8组,分别为ADSC高、中、低剂量组(22只/组),阳性药物高、中、低剂量组(17只/组),模型对照组(14只)和正常对照组(8只)。用生理盐水将病毒滴度稀释为1.6 LD<sub>50</sub>,在小鼠经乙醚轻度麻醉后,经鼻腔滴入接种病毒(每只50 μL)。禁水、禁食6~8 h后,各给药组小鼠按“2.1”项下筛选的剂量ig相应药物混悬液,每天1次,每次0.2 mL,连续给药5 d;正常对照组和模型对照组小鼠ig相同体积双蒸水。每天观察小鼠皮毛色泽、食量和活动量的变化,记录小鼠7 d内体质量的变化;观察小鼠15 d的生存情况,计算小鼠15 d内的死亡率[死亡率(%)=小鼠死亡数量/每组小鼠总数量×100%]、死亡保护率[死亡保护率(%)=模型对照组死亡率-给药组死亡率]和平均存活天数。

### 2.5 ADSC对染毒小鼠肺指数的影响考察

将164只小鼠同“2.4”项下方法分为8组,每组8只。同“2.4”项下方法进行染毒与给药,末次给药后小鼠禁食8 h,称体质量;摘除眼球放血,脱颈椎处死小鼠;打开胸腔摘取全肺,生理盐水洗涤2次,称肺质量,计算小鼠肺指数[肺指数=肺质量(g)/体质量(g)×100%]和肺指数抑制率[肺指数抑制率(%)=(模型对照组肺指数-给药组肺指数)/模型对照组肺指数×100%]。

### 2.6 统计学方法

运用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x}±s$ 表示,计数资料用百分率表示。计量资料两组间均数比较采用 $t$ 检验,多组间的两两比较采用单因素方差分析SNK检验;计数资料的组间比较采用 $\chi^2$ 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 ADSC对染毒小鼠体征指标及生存情况的影响

3.1.1 小鼠体征指标观察结果 正常对照组小鼠皮毛有光泽,尾静脉淡红,正常觅食,食量无明显变化,体质量持续增长;模型对照组小鼠体毛失去光泽,尾静脉呈黑紫色,成堆聚集,活动减少,食量减少,逐渐消瘦,体质量从第5天开始明显下降,从第8天开始出现死亡,死

亡高峰期为实验的第9~10天;ADSC各剂量组小鼠从实验第9天开始出现死亡,死亡高峰期为实验第11天;阳性药物各剂量组小鼠从第9天开始出现死亡,没有明显的死亡高峰期。第4天后,除正常对照组小鼠体质量呈持续增长趋势以外,其余各组均有下降的趋势;与模型对照组比较,各给药组小鼠体质量下降趋势减缓。各组小鼠存活率的变化见图1,体质量的变化见图2。

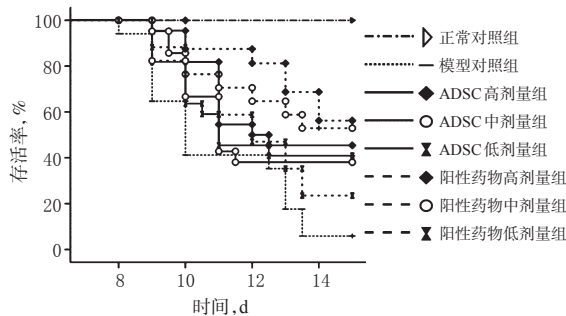


图1 各组小鼠存活率的变化

Fig 1 Change of survival rate of mice in each group

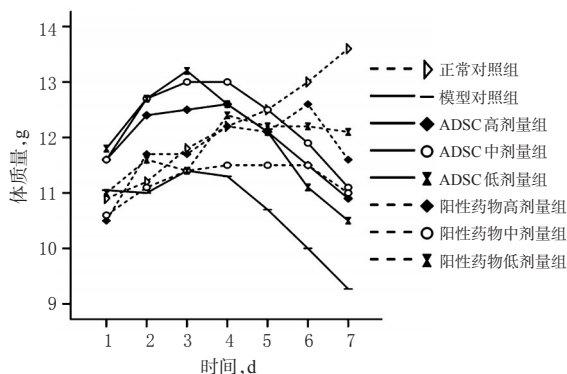


图2 各组小鼠体质量的变化

Fig 2 Change of the body weight of mice in each group

3.1.2 小鼠生存情况测定结果 与模型对照组比较,ADSC高剂量组和阳性药物高、中剂量组小鼠的平均存活天数均显著延长( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与阳性药物组比较,ADSC相应剂量组小鼠的平均生存天数差异均无统计学意义( $P>0.05$ );其中高、中剂量ADSC对小鼠的死亡保护率分别低于相应剂量阳性药物,低剂量ADSC对小鼠的死亡保护率高于低剂量阳性药物,结果详见表1。

### 3.2 ADSC对染毒小鼠肺指数的影响

与正常对照组比较,模型对照组小鼠的肺指数显著升高( $P<0.05$ )。与模型对照组比较,除ADSC低剂量组外,其余各给药组小鼠的肺指数均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且ADSC高剂量组以及阳性药物各剂量组小鼠的肺指数与正常对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ );ADSC和阳性药物对染毒小鼠的肺指数抑制率均大于10%,对甲型H1N1流感病毒的抑制作用具有

一定的量-效关系。与阳性药物相应剂量组比较,除ADSC低剂量组小鼠的肺指数显著升高外,其余各组间指标差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),结果详见表2。

表1 各组小鼠死亡率、死亡保护率以及平均存活天数测定结果

Tab 1 Determination results of mortality, death prevention rate and mean survival days of mice in each group

组别	动物只数	死亡动物只数	死亡率,%	死亡保护率,%	平均存活天数( $\bar{x}\pm s$ )
正常对照组	8	0	0		>15
模型对照组	14	12	85.7		11.0±2.17
ADSC高剂量组	22	12	54.5	31.2	12.7±2.25*
ADSC中剂量组	22	14	63.6	28.2	12.1±2.39
ADSC低剂量组	22	13	59.1	26.6	12.1±2.56
阳性药物高剂量组	17	6	35.3	50.4	13.8±1.76**
阳性药物中剂量组	17	8	47.0	38.6	12.7±2.31*
阳性药物低剂量组	17	13	76.5	9.2	12.2±2.03

注:与模型对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note:vs. model control group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

表2 各组小鼠肺指数及肺指数抑制率测定结果

Tab 2 Determination results of lung index and inhibitory rate of lung index of mice in each group

组别	动物只数	肺指数( $\bar{x}\pm s$ )	肺指数抑制率,%
正常对照组	8	0.83±0.08	
模型对照组	8	1.61±0.23*	
ADSC高剂量组	8	0.91±0.13**	43.5
ADSC中剂量组	8	1.19±0.39**	26.1
ADSC低剂量组	8	1.30±0.58 <sup>a</sup>	19.3
阳性药物高剂量组	8	0.84±0.14**	47.8
阳性药物中剂量组	8	0.98±0.16**	39.1
阳性药物低剂量组	8	1.08±0.33*	32.9

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型对照组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与阳性药物相应剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$

Note:vs. normal control group,\* $P<0.05$ ;vs. model control group,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;vs. positive drug corresponding group,<sup>△</sup> $P<0.05$

## 4 讨论

甲型H1N1流感病毒具有易变性和易传染性,因此甲型H1N1流感是我国重点预防与控制的病毒性传染疾病。化学合成药物虽然在抗流感病毒方面取得了长足发展,但是由于流感病毒生长的特殊性以及流感病毒抗原的易变性,使得用于流感治疗的化学药对新出现的变异株敏感性降低,难以发挥其抗病毒作用<sup>[8]</sup>。中药使用历史悠久、药源丰富、价格低廉,通过多靶点、多途径发挥作用,在甲型流感疫情防治中具有独特的优势和广阔的发展前景<sup>[9-10]</sup>。清热解毒药主要通过直接和间接两种途径发挥抗病毒作用:直接抗病毒是在病毒侵入前阻止病毒吸附和细胞内抑制病毒增殖;间接抗病毒是对机体免疫系统进行调节,从而发挥自体抗病毒作用<sup>[11]</sup>。因此,中药不仅单纯地杀伤、灭活病毒,还能提高机体的免疫功能,使机体处于较好的抗病毒状态,从而达到抑

制病毒的目的。

本研究中采用5~7周龄BALB/c小鼠为实验动物,该品种小鼠品系纯、个体间差异小、对病毒敏感,感染甲型H1N1流感病毒后易成模,症状体征变化明显,便于观察。小鼠在感染甲型H1N1流感病毒后,连续5 d 不同剂量的药物进行治疗,结果发现,ADSC和磷酸奥司他韦胶囊都可减缓小鼠体质量下降趋势。选用1.6 LD<sub>50</sub>剂量的甲型H1N1流感病毒进行研究时,小鼠的症状和各项体征指标的变化最具有代表性。与模型对照组比较,两种药物均能降低小鼠的死亡率、延长小鼠的平均存活天数,均对染毒小鼠具有一定保护作用,并有一定的剂量依赖性。当小鼠感染流感病毒后引发小鼠肺炎,肺组织中有大量的炎症细胞浸润,血管充血,肺质量增加,导致肺指数也相应地增加,因而肺指数可作为评价药物是否具有抗流感病毒作用的指标。肺指数越低、肺指数抑制率越高,对小鼠病毒性肺炎的抑制作用就越强,表明药物抗流感病毒作用越明显。本研究结果显示,小鼠经ADSC和磷酸奥司他韦胶囊分别治疗后,肺指数均低于模型对照组,且两种药物高剂量组小鼠的肺指数均降低至正常水平,与正常对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),这提示ADSC对小鼠病毒性肺炎具有一定的抑制作用,且具有一定的量-效关系。总之,ADSC能够减轻染毒小鼠的症状和减缓各项体征指标的变化,尤其是高剂量作用效果最为明显。

在体外试验中,ADSC抑制甲型H1N1流感病毒增殖的作用强于奥司他韦胶囊<sup>[4]</sup>。在体内实验中,高剂量ADSC对小鼠的死亡保护率和体内病毒的抑制率都低于相应剂量磷酸奥司他韦胶囊;然而低剂量ADSC对小鼠的保护率和体内病毒的抑制率高于相应剂量磷酸奥司他韦胶囊,这可能与中医药学的思想体系密切相关。体外试验脱离体内环境而无法确切反映机体其他各系统与免疫系统间相互制约和相互调节的复杂关系。本研究与体外试验相互补充、相互验证,为该方剂作为一种抗流感病毒新药应用于临床提供了一定的实验依据。

综上所述,ADSC具有体内抗甲型H1N1流感病毒的作用。其可能是直接作用于免疫系统,也可能是通过神经内分泌系统而间接影响机体免疫功能,无从得知。笔者曾对染毒小鼠的相关免疫因子进行了探究,但由于ADSC成分复杂等因素,效果并不明显,因此具体的抗流

感病毒的机制尚不明确。应用先进的检测手段及科研技术,加强抗流感病毒有效成分研究的同时更深一步地明确ADSC抗流感病毒的作用机制,将是笔者今后努力的方向。

## 参考文献

- [1] Al-Busaidi M, Al Maamari K, Al' Adawi B, *et al.* Pandemic influenza A H1N1 in Oman: epidemiology, clinical features, and outcome of patients admitted to Sultan Qaboos university hospital in 2009[J]. *Oman Med J*, 2016, 31(4):290-297.
- [2] Altas AB, Bayrakdar F, Korukluoğlu G. Influenza surveillance in five consecutive seasons during post pandemic period: results from National Influenza Center, Turkey[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2016, 50(3):401-417.
- [3] 于新露,张丽萍,刁玉华.欧意清热解毒软胶囊治疗急性咽炎的临床观察[J].*中医药信息*, 2006, 23(3):28-29.
- [4] 贺凤兰,刘强,刘媛媛,等.欧意清热解毒软胶囊体外抗甲型H1N1流感病毒作用[J].*中国中药杂志*, 2011, 36(14):1993-1996.
- [5] 黄祯祥.医学病毒学基础及实验技术[M].北京:科学出版社, 1990:149-164.
- [6] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社, 2011:31-40.
- [7] Camus C, Matusali G, Bourry O, *et al.* Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4<sup>+</sup> T-cellinfection[J]. *AIDS*, 2016, 30(8):1197-1208.
- [8] Chen W, Lim CE, Kang HJ, *et al.* Chinese herbal medicines for the treatment of type A H1N1 influenza: a systematic review of randomized controlled trials[J]. *PLoS One*, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0028093.
- [9] Jiang L, Deng L, Wu T. Chinese medicinal herbs for influenza[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, doi: 10.1002/14651858.CD004559.
- [10] 邢世华,李晓波.清热解毒类中药抗病毒活性及作用机制研究进展[J].*中国药理学通报*, 2014, 30(4):464-468.
- [11] 李梦媛,黄剑,李泽琳,等.天然药物抗甲型流感病毒的有效成分的研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(1):204-208.

(收稿日期:2016-06-16 修回日期:2016-11-07)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅