

王学文,朱祥宇,李永清. 一个复方中药处方对流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染小鼠肺损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 75-80.

Wang XW, Zhu XY, Li YQ. Effects of a compound Chinese medicine prescription on mouse lung injury induced by influenza virus A/PR/8/H1N1 [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 75-80.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.09.011

一个复方中药处方对流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染小鼠肺损伤的影响

王学文¹, 朱祥宇², 李永清^{3*}

(1.中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,北京 102629; 2.北京大学人民医院动物实验室,北京 100044; 3.北京市农林科学院畜牧兽医研究所,北京 100097)

【摘要】 目的 观察一个复方中药处方对流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染小鼠所致肺损伤的影响。**方法** 将 90 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为空白对照组、病毒对照组、盐酸金刚烷胺组和复方中药高、中、低剂量组等 6 组,每组 15 只。中药组连续灌胃 2 d 后,小鼠滴鼻感染建立流感病毒小鼠模型,空白对照组滴鼻生理盐水。病毒感染 4 h 后各组分别灌胃不同剂量药物或生理盐水,再连续灌胃 5 d。感染第 5 天时,计算各组 BALB/c 小鼠肺指数,测定肺组织匀浆的血凝滴度,并观察肺组织病理形态学。**结果** 与病毒对照组相比,盐酸金刚烷胺组和复方中药制剂中剂量组肺指数显著降低($P < 0.01$),复方中药制剂低剂量组和复方中药制剂高剂量组肺指数显著降低($P < 0.05$);各药物组小鼠肺组织血凝滴度均显著降低($P < 0.01$);各药物组小鼠肺组织病理形态学均有不同程度的改善。**结论** 本研究所用的复方中药处方对流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染的小鼠平均肺指数和平均血凝滴度有明显的降低作用,对其所致肺损伤有明显的改善作用。

【关键词】 复方中药;流感病毒 A/PR/8/H1N1;肺损伤;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 09-0075-06

Effects of a compound Chinese medicine prescription on mouse lung injury induced by influenza virus A/PR/8/H1N1

WANG Xuewen¹, ZHU Xiangyu², LI Yongqing^{3*}

(1. Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China.
2. Experimental Animal Laboratory, Peking University People's Hospital, Beijing 100044. 3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

【Abstract】 Objective To examine the effect of a compound Chinese medicine prescription (provided by the Beijing Hongtianli pharmaceuticals) on the lung injury induced by influenza virus A/PR/8/H1N1 in mice. **Methods** Ninety female BALB/c mice were randomly divided into six groups: normal control group, virus control group, Amantadine hydrochloride group, and compound Chinese herbal medicine high dose group, medium dose group and low dose group (n = 15 in each group). After intragastric administration of the drugs for 2 days, the infection model of influenza virus A/PR/8/H1N1 was established in mice by an intranasal challenge; the normal control group was injected with saline. Four hours later, each group was intragastrically administrated with different doses of medicine or saline, which were continuously given once

[基金项目] 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(31761133003);北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX201914)。

[作者简介] 王学文(1979—),女,兽医博士,研究方向:实验动物学。E-mail: wangxuewen320@163.com

[通信作者] 李永清(1964—),男,研究员,研究方向:动物病毒学与分子免疫学。E-mail: chunyuadady@sina.com

daily for 5 days. The lung index of BALB/c mice in each group was calculated on the 5th day of infection, the hemagglutination titer of lung tissue homogenate was measured, and the pathological changes of the lung tissue was observed.

Results Compared with the virus control group, the lung index in the Amantadine hydrochloride group and the medium dose compound Chinese medicine dose group was significantly decreased ($P < 0.01$). This index was also decreased in the low and high dose herbal compound groups ($P < 0.05$). The lung tissue viral hemagglutination titer was significantly decreased ($P < 0.01$) in mice of all drug groups. The pathological changes in lung tissues in mice of all drug groups to a different degree.

Conclusions The compound Chinese medicine prescription used in this study decreases the mean lung index and mean hemagglutination titer, and also improve the repair of lung injury in mice infected with influenza A/PR/8/H1N1.

【Keywords】 compound Chinese medicine; influenza virus A/PR/8/H1N1; lung injury; mouse

流行性感简称为流感,是一种急性呼吸道传染病,它是由流感病毒引起的。流感病毒感染为急性感染,主要由呼吸道侵入机体,在呼吸道的细胞内复制增殖,引起细胞变性坏死和脱落,进而影响到支气管、细支气管、肺泡及支气管其周围组织,甚至引起肺泡壁充血水肿、渗出液和纤维蛋白增加以及中性粒细胞和单核细胞的浸润等^[1-2]。肺作为流感病毒的靶器官,药物能否抑制流感病毒在靶器官中复制是衡量抗病毒药效的指标之一^[3]。

某些中药具有抑制病毒的复制、阻止病毒引起细胞病变、调节机体免疫功能、改善肺循环和镇痛抗炎等综合功效,且病毒难以对其产生抗药性,因此筛选安全有效的中药一直是防治甲型流感病毒感染研究热点。实验选用的复方中药是北京洪天力药业有限公司提供临床经验方,由蒲公英、百部、白薇、白术等多味中药组方而成的复方中药,是针对解热镇痛、抗病毒、抗感染、抗氧化和调节免疫功能而组方^[4-8]。

本实验通过流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染小鼠成功建立模型后,观察该复方中药对流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染小鼠所致肺损伤的影响,为复方中药抗流感病毒的临床应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性 90 只,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 22 g,购于北京大学医学部实验动物科学部[SCXK(京)2011-0012]。取回后饲养于北京市农林科学院畜牧兽医研究所隔离器中[SYXK(京)2012-0034]。动物实验过程中,根据实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。实验设计符合福利伦理要求,实验动物福利伦理审批号:20150316-3。

1.1.2 病毒毒株

H1N1 鼠肺流感适应株 A/Puerto Rico/8/1934 (以下简称 PR8),有中国农业大学刘金华老师馈赠。

1.2 主要试剂与仪器

复方中药(北京洪天力药业有限公司提供临床经验方);盐酸金刚烷胺(美国 Sigma 公司);甲醛溶液(天津市福晨化学试剂厂);95%和 100%乙醇、二甲苯、伊红、苏木素、盐酸分析纯 AR 级(北京化学试剂公司)。

BHC-1300IIA2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);DW-HL828 -80℃ 冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司);5810R 台式冷冻离心机(Eppendorf 公司);Nikon E200 光学显微镜(日本尼康公司);KD-BM 生物组织包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);RM2016 轮转石蜡切片机(德国徕卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂配制

PR8 先经鸡胚传代增殖两轮,过滤 4℃ 保存备用,然后测 LD_{50} 为 $10^{-3.375}/50 \mu\text{L}$ 。所有病毒均为 -80℃ 保存备用。

复方中药实验前用 100℃ 去离子水配制成需要的浓度。

盐酸金刚烷胺,含量 98% 以上,用蒸馏水配制成浓度为 10 mg/mL 药液。

1% 鸡血红细胞悬液:将 SPF 级成年公鸡翅下静脉取血,分离红细胞,用生理盐水制成体积分数为 1% 的悬液,置于 4℃ 保存备用。

1.3.2 实验动物分组及模型的建立

将 90 只雌性 BALB/c 小鼠,适应性喂养 5 d 后,称重后随机分为 6 组,每组 15 只,每笼 5 只。6 组分别为空白对照组,病毒对照组,盐酸金刚烷胺对照组,复方中药高、中、低剂量组。分组及灌胃剂量见表 1。

表 1 BALB/c 小鼠实验分组
Table 1 Experimental grouping of BALB/c mice in this study

组别 Groups	小鼠数量 Number of mice	给药剂量(g/kg) Drug doses
空白对照组 Normal group	15	—
病毒对照组 Virus control group	15	—
金刚烷胺组 Amantadine group	15	0.1
中药高剂量组 High dose Chinese medicine group	15	1.5 g/kg
中药中剂量组 Medium dose Chinese medicine group	15	0.75 g/kg
中药低剂量组 Low dose Chinese medicine group	15	0.375 g/kg

中药组连续灌胃 2 d 后,BALB/c 小鼠镇静麻醉。空白对照组每只滴鼻 PBS 50 μL,其他各组滴鼻攻毒流感病毒 PR8 10 LD₅₀/50 μL。病毒感染 4 h 后,中药三个剂量组经灌胃给药,连续灌胃 5 d,每天一次,0.2 mL/10 g;空白对照组和模型对照组灌胃生理盐水,组盐酸金刚烷胺组灌胃金刚烷胺药液,灌胃体积、时间和方式同中药三个剂量组。

1.3.3 肺指数计算

病毒感染 5 d 后,禁食不禁水过夜 12 h,称重取血后处死,打开胸腔并摘取全肺称重,计算肺指数和肺指数抑制率:

肺指数=(小鼠肺重/小鼠体重)×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×100%。

1.3.4 肺组织匀浆悬液的病毒血凝效价

各组随机取 6 个肺置于匀浆器中加冷生理盐水[肺重(g)/生理盐水(mL)=1/9],在冰浴中研磨制成匀浆,4℃离心后取上清做微量血凝实验。

1.3.5 肺组织形态学观察

BALB/c 小鼠死亡后,各组取 6 只 BALB/c 小鼠肺,将迅速摘取的肺放入 10%的福尔马林中固定,常规切片,HE 染色,光镜下观察组织病理变化。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件对所得数据进行统计,计量资料采用单因素方差分析或 *t* 检验进行处理,实验结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ (含 $P < 0.01$)为差异有显著性。

2 结果

2.1 复方中药对流感病毒 PR8 感染小鼠肺指数的影响

流感病毒 PR8 感染小鼠后,连续灌胃 5 d 后肺指数的变化结果显示:与空白对照组相比,病毒对照组肺指数显著升高($P < 0.01$);与病毒对照组相比,金刚烷胺组和中药中剂量组肺指数显著降低($P < 0.01$),中药低剂量组和中药高剂量组肺指数显著降低($P < 0.05$)。结果见由表 2。

2.2 复方中药对流感病毒 PR8 在感染小鼠肺组织中血凝滴度的影响

利用红血球凝集实验(HA)测定 PR8 感染小鼠后在肺组织中的血凝效价,反映流感病毒的复制情况。连续灌胃 5 d 后,与病毒对照组相比,药物组小鼠肺组织血凝滴度均显著降低($P < 0.01$),表明各组药物对流感病毒均有不同程度的抑制效果,盐酸金刚烷胺组血凝滴度最低,抑制流感病毒效果最好。复方中药各药物组血凝滴度中剂量组低于高剂量组和低剂量组,说明三个剂量组中,复方中药中剂量组抗流感病毒组效果更好。结果见表 3。

2.3 复方中药对流感病毒 PR8 感染小鼠肺组织的病理形态学影响

复方中药对于 PR8 感染小鼠 5 d 后病理形态学结果显示:HE 染色观察正常组小鼠肺组织结构,终末细支气管部分向周边伸展,构成呼吸细支气管,再分支成肺泡管(腺泡)和肺泡,各级支气管结构清楚,肺泡组织内基本没有浸润的炎性细胞,渗出。肺泡壁毛细血管充满红细胞。各级支气管周围间质有肺动脉、肺静脉、淋巴组织和疏松结缔组织(图 1A)。

表 2 复方中药对流感病毒 PR8 感染 BALB/c 小鼠肺指数和肺指数抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别 Groups	肺指数(%) Lung index	肺指数抑制率(%) Inhibition rate of the lung index
空白对照组 Normal group	0. 71±0. 10	—
病毒对照组 Virus control group	1. 77±0. 14 ^{ΔΔ}	—
金刚烷胺组 Amantadine group	1. 03±0. 12 ^{**}	41. 8
中药高剂量组 High dose Chinese medicine group	1. 48±0. 22 [*]	16. 4
中药中剂量组 Medium dose Chinese medicine group	1. 22±0. 20 ^{**}	31. 1
中药低剂量组 Low dose Chinese medicine group	1. 33±0. 18 [*]	24. 9

注:病毒对照组与空白对照组相比, ^{ΔΔ} $P<0.01$;各药物组与病毒对照组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. The virus control group compared with the normal control group, ^{ΔΔ} $P<0.01$. Each drug treatment group compared with the virus control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

表 3 复方中药对流感病毒 PR8 感染 BALB/c 小鼠肺组织中血凝滴度的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别 Groups	血凝滴度 Hemagglutination titer
空白对照组 Normal group	—
病毒对照组 Virus control group	3. 36±0. 50
金刚烷胺组 Amantadine group	1. 71±0. 47 ^{**}
中药高剂量组 High dose Chinese medicine group	2. 86±0. 36 ^{**}
中药中剂量组 Medium dose Chinese medicine group	2. 57±0. 51 ^{**}
中药低剂量组 Low dose Chinese medicine group	2. 71±0. 47 ^{**}

注:与病毒对照组相比, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the virus control group, ^{**} $P<0.01$.

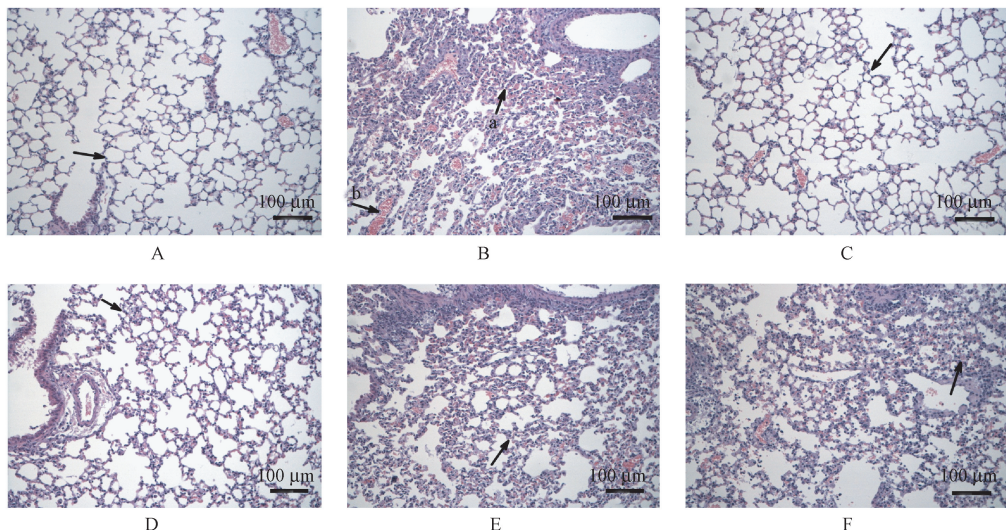
病毒对照组大部分肺组织肺泡结构破坏,部分肺组织实变区融合,肺泡隔增厚,肺泡腔和间质内炎细胞浸润,病变较重,毛细血管充血(图 1B,箭头 b)肺泡破坏,炎性细胞浸润(图 1B,箭头 a)。盐酸金刚烷胺组连续 7 d 灌胃,可明显改善肺部炎性病变程度,炎细胞浸润明显减少或消退,接近正常肺组织结构(图 1C,箭头)。

复方中药不同剂量组连续灌胃 7 d 后,不同程度的改善了肺组织的病变,由切片照片可以看出中剂量组约 1/2 肺组织炎性细胞明显减少,未见充血出血(图 1D,箭头)。低剂量治疗后效果约 1/3 肺组织炎性细胞明显减少,其余的肺组织炎细胞减少(图 1F,箭头)。高剂量组约 1/3 肺组织炎性细胞明显减少,抑制作用不如中剂量组明显(图 1E,箭头)。

3 讨论

流感病毒感染小鼠致肺损伤后,肺淤血水肿,体积变大,且重量增加,而体重往往减轻。肺指数是指小鼠肺重占体重的百分比^[9]。表明肺组织病度越严重,肺重量越大,肺指数相对越大^[10-12]。解剖观察到肺叶有淤血、红肿或坏死灶。药物治疗后,肺部淤血水肿可能减轻或者消失,肺指数相对减小。因此肺指数和肺叶大体外观变化从宏观上反映了肺部病变的程度。

实验结果表明,流感病毒感染 BALB/c 小鼠后第 5 天,与病毒对照组相比,空白对照组、盐酸金刚烷胺组小鼠肺指数显著升高($P<0.01$),说明模型和阳性对照都是成立的。病毒对照组解剖肺,看到



注:A:空白对照组;B:病毒对照组;C:金刚烷胺组;D:复方中药中剂量组;E:复方中药高剂量组;F:复方中药低剂量组。

图 1 复方中药对 PR8 感染 BALB/c 小鼠肺组织的病理形态学的影响

Note. A, Normal group. B, Virus control group. C, Amantadine group. D, Medium dose compound traditional Chinese medicine group. E, High dose compound traditional Chinese medicine group. F, Low dose compound traditional Chinese medicine group.

Figure 1 Effect of the Chinese medicine prescription on the pathology of lung tissues in the PR8-infected BALB/c mice

肺严重淤血水肿,病灶累及 2 个或以上肺叶。复方中药中剂量组灌胃 7 d 后,与病毒对照组相比,肺指数显著下降($P < 0.01$),高剂量组和低剂量组肺指数亦显著下降($P < 0.05$),说明复方中药三个剂量组均有抗炎抗病毒作用,可降低流感病毒感染小鼠的肺指数。结合肺组织病理学分析,空白对照组肺结构未见改变,肺泡大小正常,细支气管粘膜完整,管腔内无分泌物。病毒对照组显微镜下观察肺部病变明显,正常的肺组织结构形态消失,肺泡间隔增厚,肺泡壁和细支气管壁大量炎性细胞浸润,肺泡腔内浆液性渗出。流感病毒所致的小鼠肺炎病理改变为典型的间质性肺炎表现,与报道^[13-15]结果一致。感染小鼠继续灌胃经复方中药和盐酸金刚烷胺治疗后,肺部病理改变均有一定的改善,炎性细胞减少,肺组织形态有所恢复,这可能是灌胃给予复方中药和盐酸金刚烷胺后,提高小鼠死亡保护率,生存时间延长的直接原因。

红细胞凝集实验(HA)是利用流感病毒与人、豚鼠和鸡的红细胞发生凝集的实验,其原理是流感病毒粒表面的血凝素(HA)蛋白,可以识别和结合哺乳动物和禽类的红细胞表面受体,病毒被吸附到红细胞上而相互发生凝集。HA 效价可作为衡量流感病毒含量的一个指标。本实验结果显示,流感病毒攻毒组小鼠肺组织病毒血凝效价最高,说明在感

染流感病毒后第 5 天,流感病毒在肺组织中已大量繁殖。与此同时,盐酸金刚烷胺对照组和复方中药各组血凝滴度均显著降低($P < 0.01$),表明盐酸金刚烷胺组及复方中药各剂量组均可不同程度的降低流感病毒感染小鼠的肺组织病毒血凝滴度,即不同程度的抑制流感病毒的复制。

综上所述,肺指数和肺叶病理形态学从宏观和微观上反映了肺部病变的严重程度及评价药物的治疗效果,而肺组织病毒血凝滴度反应了流感病毒在肺部的增殖程度。本实验复方中药治疗流感病毒感染的小鼠后,平均肺指数和平均血凝滴度降低,并且肺部组织病理形态有了明显改善。表明复方中药通过抑制流感病毒在肺内的增殖,来减轻流感病毒导致的肺损伤,从而改善了肺功能。

参考文献:

[1] 邵敏明. 玉叶解毒颗粒及组方抗流感病毒作用及免疫机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.

[2] 徐红日, 王成祥, 王兰, 等. 益气清瘟解毒合剂所含益气法中药抗流感免疫炎性损伤的机制[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 4020-4026.

[3] 郑武飞. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.

[4] 李华峰. 蒲公英花中黄酮类化合物的分离提取及其生物效应研究[D]. 太原市: 山西医科大学, 2012.

[5] He W, Han HM, Wang W, et al. Anti-influenza virus effect of

aqueous extracts from dandelion [J]. Virol J, 2011, 8: 538.

[6] 贾琳, 冯启荣, 苏静. 中药百部的主要药效学观察 [J]. 山东医学高等专科学校报, 2014, 36(3): 197-200.

[7] Rininer B, Siegl V, Pürstner P, et al. Activity of novel plant extracts against medullary thyroid carcinoma cells [J]. Anticancer Res, 2004, 24(2A): 495-500.

[8] 黄利, 李利民, 唐丽燕, 等. 白术水煎剂对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 114-115.

[9] 姚虹霞, 周坤福, 陆平成, 等. 清暑解表方对流感病毒 FM1 感染小鼠的肺组织及肺、胸腺指数的影响 [J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 56-58.

[10] Chen JX, Xue HJ, Ye WC, et al. Activity of andrographolide and its derivatives against influenza virus *in vivo* and *in vitro* [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(8): 1385-1391.

[11] 戴卫平, 李耿, 申小花, 等. 众生丸对 H1N1 流感小鼠的保护及免疫调节作用研究 [J]. 环球中医药, 2015, 8(4): 395-399.

[12] 刘钊, 石福忠, 杨占秋. 连花清瘟胶囊抗柯萨奇 B₄ 病毒作用的实验研究 [J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2012, 31(1): 20-24.

[13] 许秀妮, 赵静, 代皖娟, 等. 银翘柴桂颗粒体内抗甲 I 型流感病毒作用研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(1): 72-74.

[14] 郭小鸽, 肖子曾, 卢芳国, 等. 两种煎法所得麻杏石甘汤煎剂对 A 型流感病毒感染小鼠的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 227-231.

[15] 彭学谦, 何昱, 周惠芬, 等. 银花平感颗粒体内抗甲型 H1N1 流感病毒作用 [J]. 2015, 40(19): 3845-3850.

[收稿日期] 2018-09-20

(上接第 31 页)

[14] 杨仪, 刘增礼, 唐军, 等. SPECT/CT 直接测量肾脏深度在肾小球滤过率测定中的应用 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2012, 32(4): 255-258.

[15] Madsen CJ, Møller ML, Zerahn B, et al. Determination of kidney function with ^{99m}Tc-DTPA renography using a dual-head camera [J]. Nucl Med Commun, 2013, 34(4): 322-327.

[16] Goyal VK. Changes with age in the human kidney [J]. Exp Gerontol, 1982, 17(5): 321-331.

[17] Melk A, Mansfield ES, Hsieh SC, et al. Transcriptional analysis of the molecular basis of human kidney aging using cDNA microarray profiling [J]. Kidney Int, 2005, 68(6): 2667-2679.

[18] Jiang T, Liebman SE, Lucia MS, et al. Role of altered renal lipid metabolism and the sterol regulatory element binding proteins in the pathogenesis of age-related renal disease [J]. Kidney Int, 2005, 68(6): 2608-2620.

[19] Fardoun RZ, Asghar M, Lokhandwala M. Role of oxidative stress in defective renal dopamine D1 receptor-G protein coupling and function in old Fischer 344 rats [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 291(5): F945-F951.

[20] 曹聃, 张伟光, 张银平, 等. 不同年龄健康人肾脏滤过功能评价指标的生理范围及影响因素 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(5): 409-412.

[21] 王红练. 血清胱抑素 C、 β_2 -微球蛋白及传统标志物检测评价糖尿病肾功能损害的临床价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20): 2528-2530.

[22] 郭菲, 高艳玲, 门莎莎, 等. 不同年龄和性别健康体检人群生化参数和肿瘤标志物的临床分析 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(11): 1644-1649.

[收稿日期] 2019-05-05