

## 痰热清注射液对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺损伤的保护作用

王 琳

天津市南开医院 药剂科, 天津 300100

**摘 要:** **目的** 研究痰热清注射液对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。**方法** Balb/c 小鼠随机分为对照组、感染组、利巴韦林 (100 mg/kg) 组和痰热清注射液 (2、4、8 mL/kg) 组, 每组 10 只。呼吸道合胞病毒滴鼻感染后, 尾 iv 给予相应剂量的药物, 给药容积为 1 mL/100 g, 1 次/d, 连续给药 8 d。计算肺指数, 测定肺组织悬液 IgTCID<sub>50</sub>, 观察肺组织病理学改变, 测定 MDA、GSH 含量和 IFN- $\gamma$  活性, 检测 T 淋巴细胞转化功能和 IL-2 活性的变化。**结果** 经痰热清注射液治疗后, 与感染组比较, 痰热清注射液 2、4、8 mL/kg 组小鼠肺指数、IgTCID<sub>50</sub> 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 呼吸道合胞病毒损伤小鼠肺组织病理状态得到改善。与感染组比较, 痰热清注射液 2、4、8 mL/kg 组小鼠 MDA 水平、GSH 水平明显降低, IFN- $\gamma$  活性明显升高, SI 明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 痰热清注射液对呼吸道合胞病毒感染小鼠的肺损伤具有保护作用, 其机制可能与提高机体免疫应答能力有关。

**关键词:** 痰热清注射液; 呼吸道合胞病毒; 肺损伤; 保护作用

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-5515(2015)08-0928-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.08.005

## Protection of Tanreqing Injection against lung injury in mice induced by respiratory syncytial virus

WANG Lin

Department of Pharmacy, Naikai Hospital, Tianjin 300100

**Abstract:** **Objective** To study the protection of Tanreqing Injection against lung injury in mice induced by respiratory syncytial virus, and discuss its mechanism. **Methods** Balb/c mice were randomly divided into normal group, viral infection group, ribavirin (100 mg/kg) group, and Tanreqing Injection (2, 4, and 8 mL/kg) groups, and each group had 10 rats. After infected by respiratory syncytial virus, drugs were tail iv administered with volume of 1 mL/100 g, once daily, and all animals were treated for 8 d. Lung index and IgTCID<sub>50</sub> were detected, pathological changes of lung tissue were observed, level of MDA, GSH and activity of IFN- $\gamma$  were determined, and T lymphocyte translation faction and IL-2 activity were detected. **Results** After treatment of Tanreqing Injection, compared with infection group, lung index and IgTCID<sub>50</sub> of Tanreqing Injection (2, 4, and 8 mL/kg) groups were obviously decreased ( $P < 0.05$ ), and lung injury were improved. Compared with infection group, levels of MDA, GSH were significantly decreased, activity of IFN- $\gamma$  and SI were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Tanreqing Injection has protection against lung injury in mice induced by respiratory syncytial virus, which might be related to improvement of immune response ability.

**Key words:** Tanreqing Injection; respiratory syncytial virus; lung injury; protection

急性上呼吸道感染是人类最常见的肺部疾病, 70%~80%由病毒感染引起, 其中呼吸道合胞病毒为主要致病病毒之一, 具有传染性强, 发病率高及病死率高等特点, 是引起婴幼儿和易感成人呼吸道感染最主要的病原体<sup>[1-3]</sup>。目前对呼吸道合胞病毒感染尚无理想治疗药物<sup>[4-5]</sup>。痰热清注射液是一种治疗

急性支气管炎和肺部感染的中药制剂, 具有清热、解毒、化痰作用。目前对痰热清注射液抗呼吸道合胞病毒的研究较少, 且主要以体外实验为主, 对痰热清注射液抗呼吸道合胞病毒肺炎体内模型的研究未见相关报道, 本实验旨在探索痰热清注射液对呼吸道合胞病毒致肺炎小鼠肺损伤的作用, 探讨作用

收稿日期: 2015-06-08

基金项目: 天津市中医药管理局中医、中西医结合科研课题 (13050)

作者简介: 王 琳, 女, 药学本科, 主要从事临床药学研究。Tel: (022) 23393251 E-mail: 15202209859@163.com

机制, 以期为临床抗合胞病毒的治疗和药物研发提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 病毒与细胞

呼吸道合胞病毒标准 Long 株由中国医学科学院提供, 本实验室-76℃保存备用。Hep-2 细胞购自上海生命科学研究院细胞库; 培养基为含双抗及 10%新生牛血清的 1640 培养基, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 取处于指数生长期的细胞用于实验。

### 1.2 动物

Balb/c 小鼠, 6 周龄, 雄性, SPF 级, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXX(京)2007-0001, 动物使用许可证 SYXK(津)2014-0003。

### 1.3 试剂

痰热清注射液由上海凯宝药业有限公司生产, 规格 10mL/支, 批号 131106; 利巴韦林氯化钠注射液由山东华鲁制药有限公司生产, 规格 100 mL: 利巴韦林 0.5 g 与氯化钠 0.9 g, 批号 1406101821。IFN-γ 试剂盒购自上海卓康生物科技有限公司, 批号 EIA06397, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA, 批号 20130512)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH, 批号 20130626) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

## 2 方法

### 2.1 分组

将 60 只 Balb/c 小鼠随机分为对照组、感染组、利巴韦林 (100 mg/kg) 组和痰热清注射液 (2、4、8 mL/kg) 组, 每组 10 只。

### 2.2 感染

参照文献报道方法<sup>[6]</sup>, 测得呼吸道合胞病毒在 Hep-2 细胞中组织细胞半数感染量 (TCID<sub>50</sub>) 为  $1 \times 10^{-9}$ 。然后乙醚麻醉小鼠, 除对照组外, 其余组以  $1 \times 10^{-6}$  浓度的呼吸道合胞病毒滴鼻感染小鼠, 每鼻孔 50 μL, 进行感染造模。对照组用生理盐水滴鼻。

### 2.3 给药

小鼠感染 4 h 后, 各组尾静脉注射给予相应剂量的药物, 给药容积为 1 mL/100 g, 1 次/d, 连续给药 8 d<sup>[7-8]</sup>。

### 2.4 肺指数的计算

末次给药后无菌条件下解剖小鼠, 称量小鼠体质量后, 无菌条件下取肺, 称定肺质量, 计算

肺指数。

肺指数=肺质量/体质量

### 2.5 鼠肺悬液上清对病毒 TCID<sub>50</sub> 的测定

取一部分肺组织称定质量后清洗 2 遍, 研磨配成 10%悬液, 1 500 r/min 离心 10 min, 取上清为鼠肺悬液。在 HeLa 细胞培养中测定 10%鼠肺悬液上清对病毒 TCID<sub>50</sub>。

### 2.6 肺组织病理观察

取一部分肺组织用 10%甲醛固定 48 h, 脱水后石蜡包埋, 制片, HE 染色, 在光镜下检查病理组织学改变。

### 2.7 对肺组织 MDA、GSH 含量和 IFN-γ 活性的影响

取出 1 g 肺组织加入 9 mL 生理盐水, 于玻璃匀浆管中制成 10%的组织匀浆。匀浆机匀浆后于 4℃ 12 000×g 离心 20 min, 取上清, 严格按照试剂盒说明测定 MDA、GSH 含量和 IFN-γ 活性。

### 2.8 对 T 淋巴细胞转化功能影响

取小鼠脾脏分组研磨, 计数, 取部分脾细胞用 5% FCS-IMDM 培养液调浓度至  $1 \times 10^7$ /mL。取 96 孔培养板, 每只小鼠设对照孔, 3 复孔, 每孔加入 100 μL IMDM 培养液; 刀豆球蛋白 A (Con A) 刺激孔, 3 复孔, 每孔 5 μg/mL Con A 溶液 100 μL; 然后每孔加入 100 μL 小鼠脾细胞悬液。将培养板移入 CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 48 h 后, MTT 法测定各孔吸光度 (A) 值, 计算刺激指数 (SI)。

SI=Con A 刺激孔 A 均值/对照孔 A 均值

### 2.9 对 IL-2 活性的影响

小鼠脾脏分组研磨, 滤过, Hank's 液洗涤, 计数, 取部分细胞用含 5 μg/mL Con A 的培养液调节细胞浓度至  $1 \times 10^7$ /mL, 培养 48 h, 离心收集上清; 另取部分细胞用含 5 μg/mL Con A 的培养液调节细胞浓度至  $5 \times 10^6$ /mL, 放入 CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 48 h, 后将细胞与淋巴细胞分层液混合, 在 96 孔板中, 分为对照组和实验组, 试验孔每孔加入含 IL-2 上清液 100 μL 以及活化的脾淋巴细胞 100 μL, 对照组用培养基代替上清液加入 100 μL, 每组 3 个复孔, 培养 48 h, MTT 法测定 560 nm 波长处 A 值。

IL-2 活性=(实验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)

### 2.10 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计学分析软件进行统计分析和处理, 实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计数资料样本间比较采用单因素方差分析。

### 3 结果

#### 3.1 对小鼠肺指数以及 lgTCID<sub>50</sub> 的影响

与对照组比较,感染组小鼠的肺指数、lgTCID<sub>50</sub> 明显升高 ( $P<0.05$ )。经痰热清注射液治疗后,与感染组比较,痰热清注射液 2、4、8 mL/kg 组小鼠肺指数、lgTCID<sub>50</sub> 明显降低 ( $P<0.05$ ), 见表 1。

#### 3.2 对小鼠肺组织病理的影响

与对照组小鼠比较,感染组小鼠肺泡空泡变性,肺泡壁水肿变宽,部分肺泡腔内水肿液渗出;利巴韦林组间质轻度增生,炎性浸润;痰热清注射液 2 mL/kg 组肺上皮细胞空泡变性,肺泡壁水肿而变宽;痰热清注射液 4 mL/kg 组肺组织病变不明显,肺泡腔内可见吞噬细胞;痰热清注射液 8 mL/kg 组肺泡腔基本无渗出液,肺泡壁结构相对正常。见图 1。

表 1 痰热清注射液对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺指数、肺组织悬液 lgTCID<sub>50</sub> 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 Effects of Tanreqing Injection on lung index and lgTCID<sub>50</sub> of mice infected respiratory syncytial virus ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别   | 剂 量/<br>(mL·kg <sup>-1</sup> ) | 肺指数                    | lgTCID <sub>50</sub> |
|------|--------------------------------|------------------------|----------------------|
| 对照   | —                              | 0.73±0.04              | —                    |
| 感染   | —                              | 0.98±0.02*             | 4.45                 |
| 利巴韦林 | 100 mg·kg <sup>-1</sup>        | 0.78±0.01 <sup>△</sup> | 1.12                 |
| 痰热清注 | 2                              | 0.88±0.03 <sup>△</sup> | 1.21                 |
| 射液   | 4                              | 0.85±0.02 <sup>△</sup> | 1.16                 |
|      | 8                              | 0.76±0.02 <sup>△</sup> | 1.10                 |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与感染组比较:  $\Delta P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group;  $\Delta P<0.05$  vs infected group

表 2 痰热清注射液对小鼠肺组织 MDA、GSH 含量和 IFN- $\gamma$  活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 2 Effects of Tanreqing Injection on level of MDA, GSH and activity of IFN- $\gamma$  of mice infected respiratory syncytial virus ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别     | 剂量/(mL·kg <sup>-1</sup> ) | MDA/( $\mu$ mol·g <sup>-1</sup> ) | GSH/( $\mu$ mol·g <sup>-1</sup> ) | IFN- $\gamma$ 活性         |
|--------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 对照     | —                         | 2.46±1.27                         | 87.3±27.8                         | 0.356±0.178              |
| 感染     | —                         | 4.56±0.87*                        | 45.5±10.8*                        | 0.556±0.096*             |
| 利巴韦林   | 100 mg·kg <sup>-1</sup>   | 2.55±0.66 <sup>△</sup>            | 82.2±22.1 <sup>△</sup>            | 0.886±0.145 <sup>△</sup> |
| 痰热清注射液 | 2                         | 3.46±1.01 <sup>△</sup>            | 64.5±11.7 <sup>△</sup>            | 0.675±0.019 <sup>△</sup> |
|        | 4                         | 2.89±0.92 <sup>△</sup>            | 73.4±16.2 <sup>△</sup>            | 0.832±0.100 <sup>△</sup> |
|        | 8                         | 2.63±1.22 <sup>△</sup>            | 90.2±10.3 <sup>△</sup>            | 0.923±0.102 <sup>△</sup> |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与感染组比较:  $\Delta P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group;  $\Delta P<0.05$  vs infected group

#### 3.3 对小鼠肺组织 MDA、GSH 含量和 IFN- $\gamma$ 活性的影响

与对照组比较,感染组小鼠的 MDA 水平明显降低, GSH 水平、IFN- $\gamma$  活性明显升高 ( $P<0.05$ )。经痰热清注射液治疗后,与感染组比较,痰热清注射液 2、4、8 mL/kg 组小鼠 MDA 水平、GSH 水平明显降低, IFN- $\gamma$  活性明显升高 ( $P<0.05$ ), 见表 2。

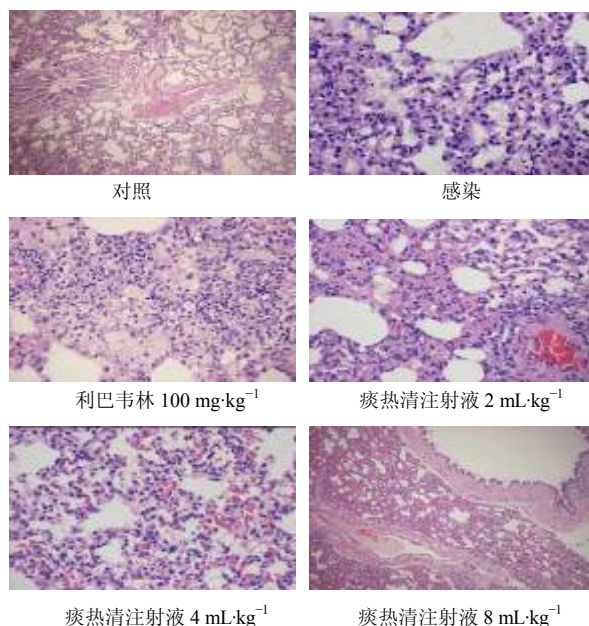


图 1 痰热清注射液对呼吸道合胞病毒损伤小鼠肺组织病理的影响

Fig. 1 Effect of Tanreqing Injection on histopathological changes in lung tissue of mice damaged by respiratory syncytial virus

### 3.4 对 T 淋巴细胞转化功能影响

与对照组比较,感染组小鼠淋巴细胞 SI 明显降低 ( $P<0.05$ )。经痰热清注射液治疗后,与感染组比较,痰热清注射液 2、4、8 mL/kg 组小鼠 SI 明显升高 ( $P<0.05$ ),见表 3。

表 3 痰热清注射液对肺损伤小鼠 T 淋巴细胞转化功能的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 3 Effects of Tanreqing Injection on transformation function of T lymphocytes of mice infected respiratory syncytial virus ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别     | 剂量/(mL·kg <sup>-1</sup> ) | SI                     |
|--------|---------------------------|------------------------|
| 对照     | —                         | 1.85±0.03              |
| 感染     | —                         | 0.98±0.07*             |
| 利巴韦林   | 100 mg·kg <sup>-1</sup>   | 1.55±0.02 <sup>△</sup> |
| 痰热清注射液 | 2                         | 1.52±0.03 <sup>△</sup> |
|        | 4                         | 1.56±0.01 <sup>△</sup> |
|        | 8                         | 1.78±0.02 <sup>△</sup> |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与感染组比较: <sup>△</sup> $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs infected group

### 3.5 对肺损伤小鼠 IL-2 活性的影响

与对照组比较,感染组小鼠 IL-2 活性降低 ( $P<0.05$ )。与感染组比较,痰热清注射液 2、4、8 mL/kg 组小鼠 IL-2 活性明显升高 ( $P<0.05$ ),见表 4。

表 4 痰热清注射液对肺损伤小鼠 IL-2 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 4 Effect of Tanreqing Injection on IL-2 in mice infected with RSV ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别     | 剂量/(mL·kg <sup>-1</sup> ) | IL-2 活性                  |
|--------|---------------------------|--------------------------|
| 对照     | —                         | 0.322±0.015              |
| 感染     | —                         | 0.102±0.011*             |
| 利巴韦林   | 100 mg·kg <sup>-1</sup>   | 0.289±0.015 <sup>△</sup> |
| 痰热清注射液 | 2                         | 0.256±0.013 <sup>△</sup> |
|        | 4                         | 0.274±0.010 <sup>△</sup> |
|        | 8                         | 0.386±0.014 <sup>△</sup> |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与感染组比较: <sup>△</sup> $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs infected group

## 4 讨论

既往对呼吸道合胞病毒感染缺乏特异性病因治疗,治疗以支持和对症疗法为主,有继发细菌感染时,可用抗菌药治疗,预防同其他病毒性呼吸道感染,近年来应用利巴韦林、免疫球蛋白治疗等,但治疗效果备受争议<sup>[9]</sup>。中医药在防治流感方面具有

独特的优势和广阔的发展前景,痰热清注射液是一种高效、低毒、安全的中药,有抗炎、抗变态反应作用和较广的抗菌、抗病毒及解热作用。本实验模拟感染呼吸道合胞病毒后,用药物进行治疗,观察其疗效。

肺指数、肺病理变化和 TCID<sub>50</sub> 是判断药物抗呼吸道合胞病毒疗效的敏感指标,结果显示病毒感染组小鼠肺泡空泡变性,肺泡壁水肿变宽,部分肺泡腔内水肿液渗出,呈典型呼吸道合胞病毒感染病理改变;经痰热清注射液治疗后,痰热清注射液 8 mL/kg 组肺泡腔基本无渗出液,肺泡壁结构相对正常。用肺上清液对 HeLa 细胞作用发现,经痰热清注射液治疗后,病毒侵袭能力降低 1 000 倍以上,表明病毒的毒力侵袭能力大大降低。

在正常情况下,肺内的氧化还原维持平衡状态,MDA 是膜脂过氧化的终产物之一,其含量高低可以作为考察细胞受到胁迫严重程度的指标之一,它能够导致膜脂过氧化,损伤生物膜结构,使得细胞膜结构和功能上受到损伤,改变膜的通透性,从而影响一系列生化反应的正常进行。GSH 的主要生理功能是清除自由基、抗氧化、抗衰老。实验给予痰热清注射液发现 MDA 含量显著降低, GSH 活性提高,说明痰热清注射液可以提高机体的抗氧化应激能力。

人体主要细胞免疫对病毒感染进行免疫应答。在本实验中,与对照组比较,感染组小鼠淋巴细胞转化功能明显降低,经痰热清注射液干预后,治疗组淋巴细胞转化功能比病毒感染组明显升高。

IFN- $\gamma$  促进细胞毒性 T 细胞杀灭微生物。感染组小鼠肺匀浆中 IFN- $\gamma$  活性增强,可能与流感病毒抗原刺激产生有关。痰热清注射液治疗后,肺匀浆中 IFN- $\gamma$  较模型组显著升高,说明痰热清注射液促进 IFN- $\gamma$  的分泌,增强机体免疫功能,发挥抗病毒作用;巨噬细胞经细胞因子 IL-2 活化增强后,可以显著增强抗病毒活性。实验发现,感染组中小鼠 IL-2 活性比对照组显著降低,与感染组比较,痰热清注射液治疗后 IL-2 活性显著升高。说明痰热清注射液可以通过提高 IL-2 的活性。

综上所述,痰热清注射液具有良好的抗呼吸道合胞病毒作用,机制可能与提高机体免疫应答能力有关。

## 参考文献

- [1] Collins P L, Graham B S. Viral and host factors in human

- respiratory syncytial virus pathogenesis [J]. *J Virol*. 2008. 82(5): 2040-2055.
- [2] 白 华, 王 刚, 刘恩梅, 等. 呼吸道合胞病毒感染的药物治疗进展 [J]. 儿科药学杂志, 2008, 14(3): 57-60.
- [3] Falsey A R, Walsh E E. Viral pneumonia in older adults [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(4): 518-524.
- [4] 王毅军, 奚肇庆, 冯肝珠. 痰热清对呼吸道合胞病毒体外抑制作用研究 [J]. 河北医药, 2010, 32(24): 3447-3448.
- [5] 张正军, 肖 敏. 痰热清抗呼吸道合胞病毒作用体外实验研究 [J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(5): 23-26.
- [6] 冯肝珠, 周 锋, 黄 茂, 等. 热毒宁抗呼吸道合胞病毒(RSV, Long 株)作用体外实验研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2007, 27(9): 1009-1012.
- [7] 郑金粟, 顾立刚. 痰热清注射液对流感病毒 FM1 感染小鼠抗病毒作用的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(7): 851-854.
- [8] 万巧凤, 顾立刚, 殷胜骏. 黄芩苷对流感病毒 FM1 肺炎小鼠肺损伤的保护研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(12): 2848-2851.
- [9] Ison M G, Mills J, Openshaw P, *et al*. Current research on respiratory viral infections: Fourth International Symposium [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55(2): 227-278.