

## • 药理与临床 •

## 清开灵和双黄连口服液体内抗禽流感病毒作用

周雪梦<sup>1</sup>, 陆春妮<sup>1</sup>, 齐文宝<sup>2</sup>, 马勇江<sup>1</sup>, 汤有志<sup>1</sup>, 陈建新<sup>1\*</sup>

1. 华南农业大学兽医学院 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642
2. 华南农业大学兽医学院 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642

**摘要:** **目的** 评价清开灵和双黄连口服液体内抗禽流感病毒药效, 探讨其对感染流感病毒小鼠免疫功能的影响。 **方法** 建立 H9N2 亚型禽流感病毒鼠肺适应株人工感染 BALB/c 小鼠模型, 以肺指数抑制率、生命保护率和肺病毒滴度为主要评价指标, 研究清开灵和双黄连口服液对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠的防治效果; 以脾指数、胸腺指数和 T 细胞亚群比率 (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) 为主要评价指标, 探讨清开灵和双黄连口服液对感染流感病毒小鼠免疫功能的影响。 **结果** 清开灵和双黄连口服液均能显著抑制 H9N2 亚型禽流感病毒引起的小鼠肺炎实变, 攻毒后第 4 天小鼠肺指数抑制率分别为 34.1%、26.3%。清开灵和双黄连口服液对感染小鼠有显著的生命保护作用, 存活率分别为 70.0%、60.0%, 显著高于病毒对照组存活率 (30.0%), 鼠肺病毒滴度显著低于病毒组 ( $P < 0.01$ )。清开灵和双黄连口服液对感染病毒后小鼠脾脏和胸腺萎缩具有显著的抑制作用, 并能提升感染小鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值。 **结论** 清开灵和双黄连口服液具有显著的抗禽流感病毒作用, 对病毒复制的抑制及对病毒感染导致的小鼠免疫功能下降的调节作用是其发挥抗病毒功效的重要机制。

**关键词:** 清开灵口服液; 双黄连口服液; 禽流感病毒; 抗病毒作用; 免疫功能

中图分类号: R286.87 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1351-06

***In vivo* anti-avian influenza virus activity of Qingkailing and Shuanghuanglian Orals**ZHOU Xue-meng<sup>1</sup>, LU Chun-ni<sup>1</sup>, QI Wen-bao<sup>2</sup>, MA Yong-jiang<sup>1</sup>, TANG You-zhi<sup>1</sup>, CHEN Jian-xin<sup>1</sup>

1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Drugs' Research and Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Zoonoses Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract: Objective** To evaluate the activity of Qingkailing and Shuanghuanglian Orals against avian influenza virus *in vivo*, and investigate the effect of the two Chinese medicinal formulas on immunologic function of infected mice. **Methods** The BALB/c mouse model with viral pneumonia by avian influenza H9N2 virus was adopted. Protective effects of Qingkailing and Shuanghuanglian Orals against H9N2 virus in mice were investigated based on the lung index inhibitory rate, life-protection rate, and virus titer in lungs. Furthermore, the immunologic functions of the two Chinese medicinal formulas on infected mice were investigated based on the spleen index, the thymus index, and the percentage of T cell subgroups (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). **Results** Qingkailing Oral, as well as Shuanghuanglian Oral, significantly inhibited the lung consolidation, improved the survival rate, and reduced the virus titer on mice infected with H9N2 virus. The lung index inhibitory rates were 34.1% and 26.3%, and the life-protection rates were 70.0% and 60.0%, respectively. Whereas, life-protection rate of the viral control group was 30.0%. Qingkailing and Shuanghuanglian Orals significantly exhibited the prevention against atrophy of spleen and thymus of mice caused by viral infection, and improved the percentage of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells in spleen of infected mice. **Conclusion** Qingkailing and Shuanghuanglian Orals have ideal efficacy against influenza virus *in vivo*. Inhibition on viral multiplication and adjustment for deviant immunologic function of infected mice are verified as the mechanism of action of the two Chinese medicinal formulae against influenza virus.

**Key words:** Qingkailing Oral; Shuanghuanglian Oral; avian influenza virus; anti-influenza virus effect; immunologic function

收稿日期: 2011-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972217); 广东省教育部产学研结合项目 (2009B090300331); 广东省科技计划重点项目 (2009B020600001)

作者简介: 周雪梦 (1985—), 女, 在读硕士研究生。

\*通讯作者 陈建新 E-mail: jxchen@scau.edu.cn

流感是由流感病毒 (influenza virus, IFV) 引起的严重危害动物和人类生命健康的急性呼吸道传染病。2003 年底爆发的高致病性禽流感, 不仅造成全球数千万家禽、野禽死亡, 而且导致 200 余人感染死亡。2009 年 4 月源于北美的新型甲型 H1N1 流感很快席卷全球, 并导致万余人死亡。疫苗接种是防控流感的重要手段, 但流感病毒的亚型多且易发生变异限制了疫苗的应用和效果。目前, 临床用于防治流感的药物主要包括金刚烷胺和金刚乙胺等 M2 离子通道抑制剂, 奥司他韦 (达菲) 和扎那米韦等神经氨酸酶抑制剂, 广谱抗病毒药如利巴韦林。金刚烷胺在临床上应用多年, 已导致普遍的严重耐药性; 达菲价格昂贵, 且其耐药性的报道也日益增多<sup>[1]</sup>。因此, 如何防控流感 (特别是高致病性流感) 成为目前世界各国高度关注的重大课题, 研制开发安全高效、不易产生耐药性的抗流感病毒新药是近年来国际医药界的研究热点。

在中医理论中流感属于“瘟病”, 中医中药在防治流感方面积累了丰富的经验。清开灵和双黄连属清热解毒类中药复方制剂, 临床上广泛用于防治流感、感冒、肺炎和咽喉炎等呼吸道疾病<sup>[2-3]</sup>。有关清开灵和双黄连抗流感病毒的实验研究已有报道<sup>[4-6]</sup>, 但只是针对人流感病毒, 而在作用机制方面的探讨研究很少。本实验建立了禽源 H9N2 亚型流感病毒小鼠感染模型, 以肺指数、生命保护率和病毒滴度为主要指标, 系统地评价了清开灵和双黄连口服液对感染小鼠的保护作用; 以免疫器官指数和 T 细胞亚群比率 ( $CD4^+/CD8^+$ ) 为主要评价指标, 研究了清开灵和双黄连口服液对感染小鼠免疫功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

清开灵口服液 (广州白云山明兴制药有限公司, 规格 10 mL/瓶, 含生药 1 g/mL, 批号 MN2320), 双黄连口服液 (东莞市亚洲制药有限公司, 规格 20 mL/瓶, 含生药 1 g/mL, 批号 20100104317), 利巴韦林 (广东肇庆星湖生物化学制药厂, 质量分数 98.5%)。LB 肉汤 (广东环凯微生物科技有限公司), FITC 标记抗小鼠 CD3 单克隆抗体、PE 标记抗小鼠 CD4 单克隆抗体、PE 标记抗小鼠 CD8 单克隆抗体为美国 Beckman Coulter 公司生产; 红细胞裂解液为美国 GenMed 公司生产。

### 1.2 仪器

Coulter XL 流式细胞仪 (Beckman 公司)。

### 1.3 动物及鸡胚

6 周龄 SPF 雌性 BALB/c 小鼠, 体质量 15~17 g, 购自广东省医学实验动物中心, 动物合格证号 SCXK (粤) 2008-0002; 10 日龄未免鸡胚, 购自广东省农业科学院畜牧研究所。

### 1.4 病毒株

A/Chicken/Guangdong/96 (H9N2) 亚型禽流感病毒由华南农业大学兽医科技中心惠赠, 经本室 SPF 鸡胚传代扩增并保藏。

### 1.5 方法

**1.5.1 药物毒性测定** BALB/c 小鼠随机分为对照组和不同剂量药物组, 每组 10 只。清开灵和双黄连口服液的剂量分别为 68、34、17 mL/(kg·d)。ig 给药, 对照组给予等体积生理盐水, 分别观察单次给药后 15 d 内小鼠体质量及死亡情况, 计算急性最大无毒剂量 ( $TD_0$ ) 及半数毒性剂量 ( $TD_{50}$ )。

**1.5.2 药物对感染流感病毒小鼠肺指数的影响** 攻毒给药: 将小鼠随机分为病毒对照组、对照组、利巴韦林阳性药物组和实验药物组, 每组 6 只, ig 给药, 病毒对照组给予等量生理盐水。感染前 1 d 开始给药, 每天 2 次, 每次 0.2 mL, 连续给药至处死。小鼠在乙醚轻度麻醉下, 滴鼻感染 15 倍  $LD_{50}$  的病毒稀释液, 对照组滴予等量生理盐水<sup>[7]</sup>。

肺指数测定: 攻毒后 96 h 进行肺指数测定。小鼠称体质量, 摘除眼球放血处死小鼠。取肺组织放入盛有 0.9% 生理盐水的平皿中洗 2 次, 用吸水纸吸干表面水分, 分析天平称质量<sup>[7]</sup>。计算肺指数与肺指数抑制率。

肺指数 = 肺质量/体质量

肺指数抑制率 = (病毒对照组平均肺指数 - 药物组平均肺指数) / 病毒对照组平均肺指数

**1.5.3 药物对感染流感病毒小鼠生命的保护作用** 攻毒给药: 将小鼠随机分为对照组、病毒对照组、利巴韦林阳性药物组和实验药物组, 每组 10 只。小鼠在乙醚轻度麻醉下, 滴鼻感染 2 倍  $LD_{50}$  的病毒稀释液<sup>[7]</sup>, 对照组滴予等量生理盐水。ig 给药, 病毒对照组给以等量生理盐水, 感染前 1 d 开始给药, 每天 2 次, 每次 0.2 mL, 连续给药 7 d。逐日观察动物发病情况并记录死亡数, 共观察 21 d, 根据观察结果计算每组死亡小鼠平均存活时间。隔天将小鼠称体质量, 计算每组存活小鼠的平均体质量, 并计算体质量变化值 (给药第 7 天每组小鼠平均体质量与实验前对应组小鼠的平均体质量的差值)。

**1.5.4** 药物对流感病毒感染小鼠肺内病毒滴度的影响 按“1.5.3”项下方法攻毒给药，分别于攻毒后第 1、3、5、7、10 天取小鼠肺脏，制备 10%肺组织悬液。以生理盐水 10 倍系列稀释 8 个稀释度，每个稀释度 3 个重复，接种至 10 日龄鸡胚，每枚 0.1 mL，37 °C 孵化。连续观察 48 h，弃去 24 h 内死亡鸡胚，通过红细胞凝集试验法测定鸡胚尿囊液的血凝活性以判断鸡胚内病毒复制，按 Reed-Muench 法计算鸡胚半数感染量 (EID<sub>50</sub>)，根据稀释倍数计算小鼠肺组织病毒滴度<sup>[8]</sup>。

**1.5.5** 药物对感染流感病毒小鼠脾指数、胸腺指数和脾脏 T 细胞亚群的影响 按“1.5.3”项下方法攻毒给药，分别于攻毒后第 3、6 天取出小鼠脾脏、胸腺，分析天平称质量，计算脾指数和胸腺指数。脾脏按常规方法制备 5×10<sup>6</sup>/mL 脾细胞悬液。采用抗小鼠 CD3、CD4 和 CD8 单克隆抗体，参照 T 细胞亚群检测试剂说明加入相应的荧光标记抗体，用流式细胞分析仪检测小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群数量及比率<sup>[9]</sup>。

脾指数 = 脾质量 / 体质量

胸腺指数 = 胸腺质量 / 体质量

**1.6 统计方法**

所有数据均用统计软件 SPSS 13.0 汇总并进行统计学处理，数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

**2 结果**

**2.1 药物毒性测定结果**

按设计方案给药后，均未见毒性反应和小鼠死亡情况，又分别以 136 mL/(kg·d) 剂量连续 ig 给予小鼠 7 d，观察累积毒性，结果仍无小鼠死亡，病理学剖检观察小鼠心、肝、脾、肺、肾均无异常。故未测出 TD<sub>50</sub>，测得 1 d (分 2 次给药，每次间隔 2 h) 的最大耐受量 > 272 mL/(kg·d)。故将 TD<sub>0</sub> 设定为 272 mL/(kg·d)。

**2.2 清开灵和双黄连口服液对小鼠流感症状的改善作用**

对照组小鼠健康，行为敏捷，毛发有光泽，呼吸正常，体质量逐日增加。病毒对照组小鼠大多在感染病毒 2 d 后出现不同的发病症状，食欲明显下降，随后逐渐出现甩头、呼吸短促现象，并伴随腹式呼吸、行动迟缓无力、弓背、毛发杂乱、消瘦、体质量减轻、体温下降，第 4 天开始出现死亡，部分小鼠死前出现明显的神经症状，如打转、抽搐等。

利巴韦林、清开灵和双黄连口服液给药组小鼠上述流感症状均有不同程度的减轻，剖检观察小鼠肺部炎症较轻或无明显炎症。

**2.3 清开灵和双黄连口服液对感染流感病毒小鼠肺指数的影响**

正常小鼠肺指数一般在 0.7%~0.8%，小鼠感染 H9N2 亚型禽流感病毒后引发肺部炎症，肺质量增加，肺指数相应增加 (表 1)。清开灵和双黄连口服液对感染 H9N2 病毒的小鼠均有一定的抑制作用，其中 28 mL/(kg·d) 清开灵和双黄连口服液对感染小鼠均有显著的抑制效果 (P<0.05、0.01)，肺指数抑制率分别为 34.1%、26.3%。

表 1 清开灵和双黄连口服液对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠肺指数的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Inhibition of Qingkailing and Shuanghuanglian Orals on pneumonia index of mice infected by H9N2 virus ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | 剂量                                       | 肺指数/%                    | 肺指数抑制率/% |
|------|--|--------------------------|----------|
| 对照   | —  | 0.71±0.06                | —        |
| 病毒对照 | —  | 1.79±0.22 <sup>△△△</sup> | —        |
| 利巴韦林 | 100 mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> | 0.93±0.02 <sup>**</sup>  | 48.0     |
| 清开灵  | 56 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 1.30±0.06 <sup>*</sup>   | 27.3     |
|      | 28 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 1.18±0.17 <sup>**</sup>  | 34.1     |
|      | 14 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 1.42±0.08                | 20.8     |
| 双黄连  | 56 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 1.39±0.24                | 22.3     |
|      | 28 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 1.32±0.18 <sup>*</sup>   | 26.3     |
|      | 14 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 1.62±0.15                | 9.5      |

与对照组比较: <sup>△△△</sup>P<0.001

与病毒组比较: <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01

<sup>△△△</sup>P<0.001 vs control group

<sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01 vs virus group

**2.4 清开灵和双黄连口服液对感染流感病毒小鼠生命的保护作用**

与病毒对照组相比，清开灵和双黄连口服液对感染流感病毒小鼠均有不同程度的保护作用，见表 2。其中清开灵 28 mL/(kg·d) 对感染病毒小鼠具有极显著的保护作用，生命保护率为 70.0% (P<0.01)，小鼠平均存活时间为 10.3 d；清开灵 56、14 mL/(kg·d) 的生命保护率均为 40.0%，小鼠平均存活时间分别为 7.5、7.2 d。双黄连 28 mL/(kg·d) 对感染病毒小鼠也具有显著的保护作用，生命保护率为 60.0% (P<0.05)，小鼠平均存活时间为 7.8 d；双黄连 56、14 mL/(kg·d) 的生命保护率分别为 50.0%、30.0%，小鼠平均存活时间分别为 7.3、6.1 d。清开

表 2 清开灵和双黄连口服液对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠生命的保护作用

Table 2 Protection of Qingkailing and Shuanghuanglian Orals on mice infected by H9N2 virus

| 组别   | 剂量                                       | 动物                   | 平均存活  | 体质量                |
|------|--|----------------------|-------|--------------------|
|      |  | 存活率                  | 时间/d  | 变化值/g              |
| 对照   | —  | 6/6                  | >21.0 | 7.60               |
| 病毒对照 | —  | 3/10                 | 7.0   | 2.28 <sup>△△</sup> |
| 利巴韦林 | 100 mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> | 10/10 <sup>***</sup> | >21.0 | 5.28 <sup>**</sup> |
| 清开灵  | 56 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 4/10                 | 7.5   | 4.05 <sup>*</sup>  |
|      | 28 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 7/10 <sup>**</sup>   | 10.3  | 4.67 <sup>*</sup>  |
|      | 14 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 4/10                 | 7.2   | 3.70               |
| 双黄连  | 56 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 5/10                 | 7.3   | 3.77               |
|      | 28 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 6/10 <sup>*</sup>    | 7.8   | 6.98 <sup>**</sup> |
|      | 14 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 3/10                 | 6.1   | 3.80               |

与对照组比较: <sup>△△</sup>*P*<0.01

与病毒组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 <sup>\*\*\*</sup>*P*<0.001

<sup>△△</sup>*P*<0.001 vs control group

<sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 <sup>\*\*\*</sup>*P*<0.001 vs virus group

灵和双黄连对病毒感染导致的体质量减轻也有不同程度的改善。

### 2.5 清开灵和双黄连口服液对感染流感病毒小鼠肺组织病毒增殖的抑制效果

流感病毒感染小鼠后第 1 天就开始在小鼠肺内增殖, 至第 5 天病毒组小鼠肺病毒滴度达到最高 (10<sup>6.10</sup> EID<sub>50</sub>/mL), 而后逐渐下降, 至第 10 天仍能检测到较高浓度的病毒滴度 (10<sup>2.14</sup> EID<sub>50</sub>/mL)。利巴韦林能显著抑制病毒在小鼠肺内的增殖, 至感染后第 7 天已检测不到病毒。清开灵和双黄连口服液对小鼠肺内流感病毒的增殖有明显抑制作用。感染病毒后第 1 天, 清开灵和双黄连口服液组小鼠肺内病毒滴度分别为 10<sup>1.50</sup> EID<sub>50</sub>/mL (*P*<0.01) 和 10<sup>2.75</sup> EID<sub>50</sub>/mL (*P*<0.05), 明显低于病毒组的病毒滴度

(10<sup>1.50</sup> EID<sub>50</sub>/mL); 感染病毒后第 3、5、7 天, 给药组的病毒滴度均显著低于病毒对照组; 感染病毒后第 10 天, 清开灵口服液组小鼠肺内病毒已被完全清除, 双黄连口服液组小鼠肺内病毒也降至较低水平, 病毒滴度为 10<sup>0.50</sup> EID<sub>50</sub>/mL (*P*<0.001), 见表 3。

### 2.6 清开灵和双黄连口服液对感染流感病毒小鼠的免疫器官和脾脏 T 细胞亚群的影响

感染流感病毒后小鼠的免疫器官胸腺和脾脏逐渐萎缩, 脾脏质量和体内 CD4<sup>+</sup> T 细胞数量下降, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>均比对照组降低。感染病毒后第 3 天, 病毒组小鼠脾指数、胸腺指数和脾脏 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>均比对照组降低 (*P*<0.05), 感染后第 6 天差异更显著 (*P*<0.01、0.001), 见表 4。清开灵和双黄连口服液均能不同程度地抑制病毒感染导致的小鼠脾脏、胸腺萎缩及 CD4<sup>+</sup> T 细胞数下降。感染病毒后第 3 天, 清开灵口服液显著提升小鼠 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (*P*<0.05); 感染后第 6 天, 清开灵和双黄连口服液均极显著提升小鼠脾指数、胸腺指数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (*P*<0.01、0.001)。正常小鼠第 6 天的脾指数、胸腺指数和脾脏 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>明显大于第 3 天, 表明在生长期小鼠免疫器官和免疫细胞快速增长。而清开灵和双黄连口服液对正常小鼠的免疫器官和免疫细胞没有明显影响。

### 3 讨论

流感病毒感染对动物免疫器官和免疫功能有重要影响。病毒进入肺部首先感染肺部支气管黏膜和肺泡壁上皮细胞, 促使机体细胞发生免疫反应, 引发 T 淋巴细胞、中性粒细胞和 NK 细胞大量增殖并汇集肺部, 产生大量的白三烯、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、γ-干扰素 (IFN-γ) 等炎症因子, 导致细胞凋亡、毛细血管通透性提高、白细胞渗出、肺水肿

表 3 清开灵和双黄连口服液对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠肺组织病毒滴度的抑制效果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Inhibition of Qingkailing and Shuanghuanglian Orals on virus titer in lungs of mice infected by H9N2 virus ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | 剂量                                       | 病毒滴度的对数                  |                          |                          |                          |                          |
|------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|      |  | 1 d                      | 3 d                      | 5 d                      | 7 d                      | 10 d                     |
| 对照   | —  | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                |
| 病毒对照 | —  | 3.54±0.16 <sup>△△△</sup> | 4.25±0.23 <sup>△△△</sup> | 6.10±0.47 <sup>△△△</sup> | 3.13±0.34 <sup>△△△</sup> | 2.14±0.12 <sup>△△△</sup> |
| 利巴韦林 | 100 mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> | 1.50±0.23 <sup>**</sup>  | 2.35±0.34 <sup>**</sup>  | 0.50±0.06 <sup>***</sup> | 0.00±0.00 <sup>***</sup> | 0.00±0.00 <sup>***</sup> |
| 清开灵  | 28 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 1.50±0.43 <sup>**</sup>  | 3.10±0.14 <sup>*</sup>   | 2.75±0.12 <sup>**</sup>  | 1.75±0.17 <sup>*</sup>   | 0.00±0.00 <sup>***</sup> |
| 双黄连  | 28 mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>  | 2.75±0.21 <sup>*</sup>   | 3.50±0.09                | 3.75±0.46 <sup>**</sup>  | 2.75±0.13                | 0.50±0.34 <sup>***</sup> |

与对照组比较: <sup>△△△</sup>*P*<0.001; 与病毒组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 <sup>\*\*\*</sup>*P*<0.001

<sup>△△△</sup>*P*<0.001 vs control group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 <sup>\*\*\*</sup>*P*<0.001 vs virus group

表 4 清开灵和双黄连口服液对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠免疫器官和脾脏 T 细胞亚群的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effects of Qingkailing and Shuanghuanglian Orals on immune organs and T cell subgroups of mice infected by H9N2 virus ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别     | 剂量/<br>(mL·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) | 脾指数/%                  |                         | 胸腺指数/%    |                          | 脾脏 CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> |                          |
|--------|--|------------------------|-------------------------|-----------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
|        |  | 3 d                    | 6 d                     | 3 d       | 6 d                      | 3 d                                   | 6 d                      |
| 对照     | —  | 0.31±0.01              | 0.48±0.03               | 0.31±0.01 | 0.43±0.04                | 1.60±0.02                             | 2.61±0.16                |
| 病毒对照   | —  | 0.36±0.03 <sup>△</sup> | 0.32±0.09 <sup>△△</sup> | 0.27±0.04 | 0.19±0.03 <sup>△△△</sup> | 1.41±0.32 <sup>△</sup>                | 0.98±0.32 <sup>△△△</sup> |
| 病毒+清开灵 | 28   | 0.37±0.03              | 0.47±0.03 <sup>**</sup> | 0.34±0.17 | 0.40±0.04 <sup>**</sup>  | 1.90±0.13 <sup>**</sup>               | 2.62±0.60 <sup>***</sup> |
| 清开灵    | 28   | 0.34±0.02              | 0.43±0.03 <sup>**</sup> | 0.30±0.02 | 0.41±0.05 <sup>**</sup>  | 1.60±0.12                             | 2.67±1.03 <sup>***</sup> |
| 病毒+双黄连 | 28   | 0.37±0.06              | 0.36±0.04 <sup>*</sup>  | 0.29±0.07 | 0.35±0.04 <sup>**</sup>  | 1.61±0.21                             | 2.66±0.03 <sup>***</sup> |
| 双黄连    | 28   | 0.33±0.02              | 0.49±0.03 <sup>**</sup> | 0.28±0.03 | 0.40±0.06 <sup>**</sup>  | 1.59±0.09                             | 2.29±0.86 <sup>**</sup>  |

与对照组比较: <sup>△</sup>P<0.05 <sup>△△</sup>P<0.01 <sup>△△△</sup>P<0.001; 与病毒组比较: <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01 <sup>\*\*\*</sup>P<0.001  
<sup>△</sup>P<0.05 <sup>△△</sup>P<0.01 <sup>△△△</sup>P<0.001 vs control group; <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01 <sup>\*\*\*</sup>P<0.001 vs virus group

和气道堵塞等炎症连锁反应, 导致肺功能衰竭, 最终使人或动物死亡<sup>[10-11]</sup>。研究表明, 病毒感染导致死亡后果更多取决于宿主的免疫病理损伤, 而非病毒复制所致的直接细胞损伤<sup>[12]</sup>。在流感病毒感染致病过程中, 若能在给予抗病毒药物的同时应用免疫调节和抗炎药物, 纠正免疫系统失常, 干预肺炎进程, 最大限度地减少免疫过度导致的肺损害, 则可显著减缓病毒感染引起的症状, 减少人或动物的死亡。

流感病毒 M2 离子通道抑制剂和神经氨酸酶抑制剂等化学药物虽然能直接抑制流感病毒的复制, 但存在两个问题: (1) 没有抗炎和免疫调节作用; (2) 长期应用后不可避免地导致耐药毒株的产生<sup>[1]</sup>。中药及其复方制剂的直接抑制病毒作用一般不及化学药物, 但临床和实验研究均证明, 中药及其复方制剂多成分、多靶点和机制同时作用, 使其不仅具有较好的疗效, 而且不易导致流感毒株产生耐药性<sup>[13]</sup>。本实验结果表明, 清开灵和双黄连口服液对感染流感小鼠具有明显保护作用, 中剂量组[28 mL/(kg·d)]小鼠存活率显著高于病毒对照组。病毒感染后不同时间小鼠肺内病毒滴度测定结果表明, 给药组小鼠肺内病毒滴度显著下降, 说明清开灵和双黄连口服液对动物体内病毒复制具有显著的抑制作用。感染流感病毒小鼠的免疫器官和脾脏 T 细胞亚群测定结果表明, 清开灵和双黄连口服液均能有效抑制病毒感染导致的小鼠脾脏、胸腺萎缩及 CD4<sup>+</sup> T 细胞数下降, 纠正和调节病毒感染导致的小鼠免疫系统失衡。

清开灵口服液是在古方“安宫牛黄丸”的基础上改良而成的一种中药复方制剂, 由胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、黄芩、栀子、板蓝根、金银花、水牛

角等 8 味中药组成<sup>[14]</sup>。双黄连口服液是由金银花、黄芩、连翘等 3 味中药制成的制剂。临床研究及应用表明清开灵和双黄连在抗菌、抗炎、解热及改善肺部感染等方面有很好的疗效<sup>[2-3]</sup>。现代药理研究表明, 黄芩中的黄芩苷、金银花中的绿原酸、板蓝根中的表告伊春、连翘中的挥发油等对流感病毒均有直接抑制作用<sup>[15-20]</sup>; 而胆酸、珍珠母和水牛角水提取物均具有显著的抗炎活性<sup>[21-23]</sup>。黄芩是该两种中成药的主要配伍药材, 而黄芩苷是黄芩的主要药效成分<sup>[24]</sup>。本课题组利用液相色谱分析了清开灵和双黄连口服液中黄芩苷的量, 分别高达 21、16 mg/mL。文献报道<sup>[15,25]</sup>黄芩苷具有明显的体内外抗流感病毒活性, 其对感染 H9N2 和 H1N1 亚型流感病毒的 MDCK 细胞的半数有效保护浓度 (EC<sub>50</sub>) 为 0.12 mmol/L, 表明黄芩苷可能是清开灵和双黄连口服液发挥抗病毒作用的主要成分之一。

H9N2 亚型流感病毒是在家禽间广泛传播的流感毒株, 其毒力虽然比高致病性 H5N1 亚型流感毒株低, 但严重影响家禽的产蛋和生产性能。Peiris<sup>[26]</sup>和 Butt<sup>[27]</sup>曾先后报道了香港人感染 H9N2 亚型流感病毒的病例, 表明该亚型毒株对人类的生命健康也是一种潜在威胁。清开灵和双黄连口服液通过抑制病毒复制、改善和调整感染小鼠的免疫功能等多种途径达到抗流感病毒的效果, 对包括 H9N2 亚型禽流感毒株在内的多种流感毒株引发的流感均有显著疗效。本研究结果为清开灵和双黄连口服液防治流感的临床应用及其进一步研究开发提供了实验依据。

参考文献

[1] Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of

- severe seasonal and avian influenza [J]. *Antiviral Res*, 2008, 78(1): 91-102.
- [2] 欧阳华, 刘弋戈. 清开灵注射液临床应用概述 [J]. 海峡药学, 2005, 17(3): 121-125.
- [3] 张丛梅. 双黄连粉针的主要临床应用 [J]. 广西医学, 2001, 12(6): 1562-1563.
- [4] 肖华, 古羲, 李莉, 等. 注射用清开灵冻干粉体内抗病毒作用研究 [J]. 中国药理学与临床, 2009, 25(1): 53-54.
- [5] 郑颖文. 利巴韦林注射液配合清开灵软胶囊治疗流行性感 40 例临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(2): 141-142.
- [6] 李效全, 刘佳易, 胡琪. 利巴韦林联合双黄连口服液治疗 13 例轻型甲型 H1N1 流感临床观察 [J]. 实用医院临床杂志, 2010, 7(3): 96.
- [7] Chen J X, Xue H J, Ye W C, *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.
- [8] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [9] 陈建新, 邱灵才, 方柄虎, 等. 甘草酸单铵盐对 H9N2 禽流感病毒的作用机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 896-899.
- [10] Zhou Y J, Hao X F, Tian Z J, *et al.* Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(3/4): 152-164.
- [11] Tracy H, Robert S, Ian R, *et al.* Williams Co-stimulation: novel methods for preventing viral-induced lung inflammation [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(8): 379-386.
- [12] Hussell T, Pennycook A, Openshaw P J. Inhibition of tumour necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology [J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(9): 2566-2573.
- [13] Wang X Y, Jia W, Zhao A H, *et al.* Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine [J]. *Phytother Res*, 2006, 20(5): 335-341.
- [14] Liu C X, Xiao P G, Peng Y, *et al.* Challenges in research and development of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 1-28.
- [15] 初正云, 初明, 滕宇. 黄芩苷体内抗流感病毒作用 [J]. 中国中药杂志, 2007, 22(33): 2413-2415.
- [16] 蒲秀瑛, 梁剑平, 王学红, 等. 贯叶连翘提取物抗甲 1 型流感病毒活性的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 259-264.
- [17] 潘翌翌, 王雪峰, 闫丽娟, 等. 金银花提取物体外抗甲型流感病毒 FM1 株的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(6): 37-38.
- [18] 徐丽华, 黄芳, 陈婷, 等. 板蓝根中的抗病毒活性成分 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(6): 358-359.
- [19] 方建国, 刘云涛, 王文清, 等. 板蓝根清热解毒实质研究 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 321-324.
- [20] 马振亚. 连翘子挥发油对感染流感病毒小白鼠的保护作用和对葡萄球菌在家兔血液中消长的影响 [J]. 陕西新医药, 1982, 11(4): 58-59.
- [21] 刘春光, 张天宏, 丁日高, 等. 胆红素和各种胆酸同系物抗炎作用研究 [J]. 解放军药理学学报, 2008, 24(6): 479-481.
- [22] 郑全英, 毛叶盟. 海水珍珠与淡水珍珠的成分、药理作用及功效 [J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(3): 54-55.
- [23] 陈赤. 水牛角的研究与应用 [J]. 广西中医学院学报, 2004, 7(4): 72-74.
- [24] 纪晓影, 毕开顺, 王洋, 等. HPLC 法测定抗感解毒颗粒中黄芩苷和大豆苷元 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 401-402.
- [25] Xu G, Dou J, Zhang J. Inhibitory effects of baicalein on the influenza virus *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(2): 238-243.
- [26] Peiris M, Yuen K Y, Leung C W, *et al.* Human infection with influenza H9N2 [J]. *Lancet*, 2009, 35(4): 916-917.
- [27] Butt K M, Smith G J, Chen H, *et al.* Human infection with an avian H9N2 influenza a virus in Hong Kong in 2003 [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5760-5767.