

热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒作用机制研究

王振中^{1,2}, 鲍琳琳³, 孙 兰^{1,2}, 毕宇安^{1,2}, 周 军^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 中国医学科学院 医学实验动物研究所, 北京 100021

摘要: **目的** 研究热毒宁注射液体内抗甲型 H1N1 流感病毒的作用及其机制。**方法** 采用甲型 H1N1 流感病毒滴鼻感染 BALB/c 小鼠制备肺炎模型, 观察热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠平均存活时间、存活率、肺指数、病毒载量及细胞因子的影响。**结果** 与模型组比较, 热毒宁注射液显著提高病毒感染小鼠的存活率、延长小鼠平均存活时间 ($P < 0.05$ 、 0.01); 显著降低病毒感染小鼠肺指数、肺组织病毒载量 ($P < 0.05$ 、 0.01); 提高肺组织 γ 干扰素 (IFN- γ) 水平, 降低白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。**结论** 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠具有一定的保护作用, 其作用机制可能与提高 IFN- γ 水平, 降低 IL-6、TNF- α 水平有关。

关键词: 热毒宁注射液; 甲型 H1N1 流感病毒; 病毒载量; 肺指数; 细胞因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)01-0090-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.018

Mechanism of Reduning Injection against influenza A/H1N1 virus

WANG Zhen-zhong^{1,2}, BAO Lin-lin³, SUN Lan^{1,2}, BI Yu-an^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

3. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medicine Centre, Beijing 100021, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Reduning Injection (RI) on the resistance to influenza A/H1N1 virus and its mechanism.

Methods The pneumonic model of BALB/c mice was established by influenza A/H1N1 virus, and the average survival period, survival rate, lung index, viral load, and cytokine level of mice infected by influenza A/H1N1 virus were observed. **Results** Compared with the model group, RI significantly increased the survival rate and prolonged the average survival period of mice infected by influenza A/H1N1 virus ($P < 0.05$, 0.01). RI significantly reduced the lung index, viral load, contents of IL-6 and TNF- α , while increased the content of IFN- γ ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** RI has the certain protective effect on mice infected by influenza A/H1N1 virus. Its mechanism may be related to the improvement of the content of IFN- γ and the decrease of the contents of IL-6 and TNF- α .

Key words: Reduning Injection; influenza A/H1N1 virus; viral load; lung index; cytokines

甲型 H1N1 流感病毒包含有猪流感、禽流感和人流感 3 种流感病毒的基因片段^[1]。该病毒通过空气、飞沫和体液接触传播, 潜伏期一般 1~7 d, 普遍易感, 以青壮年为主。早期症状与普通流感相似, 包括发热、咳嗽、喉痛、身体疼痛、头痛、发冷和疲劳等, 有些还会出现腹泻或呕吐、肌肉痛或疲倦、眼睛发红等。部分患者病情可迅速进展, 来势凶猛、

突然高热、体温超过 39 °C, 甚至继发严重肺炎、急性呼吸窘迫综合征、肺出血、胸腔积液、全血细胞减少、肾功能衰竭、败血症、休克及 Reye 综合征、呼吸衰竭及多器官损伤, 导致死亡, 病死率约为 1%^[2-3]。从发病情况来看, 多数确诊患者有发热表现, 体温升高, 病性属“温热”, 故甲型流感的中医病名应诊断为瘟疫, 属于新发温病。相比抗病毒

收稿日期: 2013-11-25

基金项目: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 王振中, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研究与开发。E-mail: wzzhz-nj@tom.com

*通信作者 萧 伟, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: wzzhz-nj@163.com

药物, 中药具有整体调节、多靶点治疗的特点, 不仅能退热、消炎、抗病毒, 而且具有提高人体免疫功能的作用, 并且比单一抗病毒药物治疗退热、消炎、减轻上呼吸道症状更具优势^[4-5]。

热毒宁注射液是由青蒿、金银花、栀子组成的现代中药制剂, 具有清热、解毒、疏风功效。临床上主要用于治疗上呼吸道感染、急性支气管炎, 对社区获得性肺炎也显示较好疗效。研究表明热毒宁注射液对禽流感病毒(H5N1)、柯萨奇病毒3(CVB3)、单纯疱疹病毒(HSV)、腺病毒3(ADV3)、人鼻病毒(N36)等均有一定程度的抑制作用^[6-8]。本实验研究热毒宁注射液对甲型H1N1流感病毒滴鼻感染小鼠肺炎的影响及作用机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品及试剂

热毒宁注射液, 批号 090210, 江苏康缘药业股份有限公司; 阳性对照药达菲, 批号 090121, 上海罗氏制药有限公司; 白细胞介素-6(IL-6) ELISA 试剂盒(批号 09051206)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 082112190)、 γ 干扰素(IFN- γ) ELISA 试剂盒(批号 09071105), 欣博盛生物科技有限公司。

1.2 动物

雌性 BALB/c 小鼠, SPF 级, 体质量 14~17 g, 北京维通利华公司, 动物许可证号: SCXK(京) 2006-0009。

1.3 病毒

甲型 H1N1A/California/07/2009 (WHO)。

1.4 仪器

Beckman Allegra 64R 低温离心机, ABI 7000 实时荧光定量 PCR 仪, SIGMA6K15 离心机, 美国 Thermo Forma 生物安全柜。CO₂ 培养箱 NUAIR USAUTOFLOW、倒置可视显微镜(OLYMPUS)由华美公司提供; Fluostargalary 微板光学测定仪及配套荧光测定 96 孔板购自德国 BMG 公司。

1.5 实验室

SPF 级环境, ABSL-3 级实验室, 许可证号: No. L2607。

2 方法

2.1 甲型 H1N1 流感病毒对小鼠滴鼻感染的半数致死量(LD₅₀)测定

将 50 只 BALB/c 小鼠采用乙醚轻度麻醉, 将甲

型 H1N1A/California/07/2009 流感病毒稀释为 5 个稀释度: 原液、10⁻¹~10⁻⁴ TCID₅₀, 每个滴度 10 只小鼠。每只小鼠鼻孔内均匀滴入 50 μ L 病毒液, 感染小鼠。感染后观察 2 周, 并计算小鼠 LD₅₀。结果甲型 H1N1 流感病毒对小鼠滴鼻感染的 LD₅₀ 为 10^{-1.24}。

2.2 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠肺炎的影响

BALB/c 小鼠 110 只, 体质量 14~17 g, 雌性, 随机分为 6 组: 对照组, 模型组, 达菲(0.03 g/kg)组, 热毒宁注射液高、中、低剂量(生药 20.22、10.11、5.05 g/kg)组, 除对照组 10 只外, 其余每组 20 只。除对照组外, 其余各组小鼠以病毒 10 LD₅₀ 滴鼻感染, 2 h 后分别给药, 对照组 ip 生理盐水, 模型组病毒感染后 ip 生理盐水, 热毒宁注射液高、中、低剂量组 ip 热毒宁注射液生理盐水稀释液, 达菲组 ig 给药, 各组给药体积为 0.2 mL/只, 每天给药 1 次, 连续给药 5 d。末次给药后 4 h, 存活小鼠每组随机取 10 只脱颈椎处死, 称体质量, 解剖取全肺称质量, 计算小鼠肺指数(肺指数=肺质量/体质量 $\times$ 100), 肺组织进行病毒载量分析。

2.3 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠死亡的保护作用

BALB/c 小鼠 180 只, 体质量 14~17 g, 雌性, 随机分 6 组, 每组 30 只。具体分组及给药方法同“2.2”项。共观察 2 周, 记录小鼠的死亡数及生存时间, 计算存活率及生命延长率[生命延长率=(给药组平均生存时间-模型组平均生存时间)/模型组平均生存时间]。

2.4 热毒宁注射液对甲型 H1N1 病毒感染小鼠肺组织细胞因子的影响

动物分组及给药方法同“2.2”项。末次给药 4 h 后, 存活小鼠每组随机取 10 只脱颈椎处死, 取肺组织进行细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 分析。

2.5 统计处理方法

数据应用统计处理软件 SPSS 处理 (Version. 12.0), 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料的组间显著性比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠肺炎的影响

结果表明, 与对照组比较, 模型组小鼠肺指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 热毒宁注射液高、中、低 3 个剂量组小鼠肺指数均有一定程度

的降低,其中高、中剂量组差异显著($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,热毒宁注射液高、中剂量组显著降低小鼠肺组织病毒载量($P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠肺指数、病毒载量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of RI on lung index and viral load of mice infected by influenza A/H1N1 virus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	病毒载量 (lg ^{copies} ·mg ⁻¹)	肺指数	抑制率 / %
对照	—	—	0.91±0.12	—
模型	—	5.70±0.16	3.18±0.32 ^{ΔΔ}	—
达菲	0.03	5.18±0.12 ^{**}	2.25±0.59 ^{**}	29.2
热毒宁	20.22	4.47±0.10 ^{**}	2.43±0.56 ^{**}	23.6
注射液	10.11	5.17±0.54 ^{**}	2.61±0.42 [*]	17.9
	5.05	5.46±0.25	2.87±0.35	9.7

与对照组比较: ^{ΔΔ} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{ΔΔ} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

表 2 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠存活率、生存时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 2 Effects of RI on survival rate and average survival period of mice infected by influenza A/H1N1 virus ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	存活率 / %	生存时间 / d	生命延长率 / %
模型	—	0	6.0±1.4	—
达菲	0.03	43 ^{**}	9.9±3.7 ^{**}	66.47±0.02
热毒宁注射液	20.22	40 ^{**}	9.7±3.8 ^{**}	62.02±0.02
	10.11	30 ^{**}	8.2±4.0 [*]	36.87±0.01
	5.05	20 [*]	7.5±3.5	19.59±0.05

与模型组比较: ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

表 3 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠肺组织中细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of RI on content of cytokines in lung tissue of mice infected by influenza A/H1N1 virus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	IL-6 / (pg·mg ⁻¹)	IFN-γ / (pg·mg ⁻¹)	TNF-α / (pg·mg ⁻¹)
对照	—	54.36±6.90	28.00±6.05	24.91± 7.27
模型	—	70.02±5.43 ^{ΔΔ}	35.96±6.18 ^{ΔΔ}	59.61± 8.60 ^{ΔΔ}
达菲	0.03	66.98±4.42	38.76±6.72	66.57± 9.74
热毒宁注射液	20.22	62.74±6.04 [*]	51.98±6.80 ^{**}	43.04±11.51 [*]
	10.11	65.85±5.92	54.52±9.83 ^{**}	51.33± 8.89
	5.05	69.57±5.09	49.98±5.19 ^{**}	61.00± 6.38

与对照组比较: ^{ΔΔ} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{ΔΔ} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

4 讨论

甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠后,模型组肺指数最高,与对照组比较有极显著差异,模型组小鼠感染后死亡率 100%,以上结果表明甲型 H1N1 流

3.2 热毒宁注射液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠的保护作用

与模型组比较,热毒宁注射液高、中、低 3 个剂量组小鼠存活率显著提高($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,热毒宁注射液高、中、低 3 个剂量组小鼠平均存活时间延长,其中热毒宁注射液高、中剂量组与模型组比较差异显著($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 2。

3.3 热毒宁注射液对甲流 H1N1 病毒感染小鼠肺组织细胞因子的影响

与对照组比较,模型组小鼠肺组织 IL-6、TNF-α、IFN-γ 明显升高($P<0.01$);与模型组比较,热毒宁注射液治疗后 IFN-γ 水平均显著升高($P<0.01$),IL-6 水平降低,其中热毒宁注射液高剂量组有统计学意义($P<0.05$),热毒宁注射液高、中剂量组 TNF-α 水平降低,热毒宁注射液高剂量组有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 3。

感病毒感染小鼠模型是成立的。热毒宁注射液组肺指数低于感染模型组,提示受试药物能降低流感病毒感染小鼠的肺指数,从而说明其有减轻感染小鼠肺部炎症的作用。流感病毒感染机体后,机体免疫

系统能对病毒产生免疫应答,从而产生一些超过生理浓度的细胞因子。根据细胞因子的作用可分为:介导炎症反应的细胞因子包括 TNF- α 、IL-6 等,介导天然免疫的细胞因子 IFN- γ 以及参与细胞介导的其他免疫因子如 IL-2。有研究表明, TNF- α 过度产生是流感病毒肺病变的部分原因^[9]。有研究报道通过流感病毒感染人体实验发现,呼吸道局部和血清中 IL-6、TNF- α 水平,与临床症状密切相关。本实验结果显示,病毒感染后血清中 IL-6、TNF- α 水平明显升高,同时肺组织病理变化程度严重。IFN- γ 可由 T 细胞与自然杀伤细胞(NK)产生。病毒感染时 CD⁴⁺ T 细胞和 CD⁸⁺ T 细胞都能产生 IFN- γ ^[10]。IFN- γ 与 TNF- α 一起协同 IFN2 α/β 活化诱导型一氧化氮合酶,依赖巨噬细胞系介导抗病毒作用^[11]。另外, IFN- γ 有广泛的免疫调节作用,如诱导巨噬细胞、B 细胞的抗原呈递能力,活化 NK 细胞,提高其杀伤能力,活化的 NK 又能分泌 IFN- γ ,从而使机体内 NK 细胞、IFN- γ 和 IL-2 相互作用,形成免疫网络,增强了抗病毒和免疫调节作用^[12]。IL-2 主要由 CD⁴⁺ T 细胞产生,此外 CD⁸⁺ T 细胞和 NK 细胞也可产生,小鼠体内 IL-2 主要由 Th1 亚群产生。IL-2 本身无直接抗病毒作用,能刺激 T 细胞产生多种淋巴因子,诱导 CTL、NK、LAK 等多种杀伤细胞的分化和效应功能,诱导杀伤细胞产生 IFN- γ 等细胞因子,而起到抗病毒作用。病毒感染后, IL-2 水平降低,引起机体免疫功能的抑制和失调^[13]。

本实验考察了热毒宁注射液对流感病毒感染小鼠肺组织中细胞因子的影响,探讨了其部分作用机制。结果表明热毒宁注射液可能通过促进 IFN- γ 分泌水平,增强抗病毒能力而减轻病毒对机体的损伤作用,另一方面 IL-6 分泌水平降低,起到了减轻肺组织炎症的作用

参考文献

- [1] Shinde V, Bridges C B, Uyeki T M, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005—2009 [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(25): 2616-2625.
- [2] 张复春, 胡凤玉. 新型甲型 H1N1 流感研究进展 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2009, 30(5): 481-485.
- [3] Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood F S, Jain S, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in human [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(25): 2605-2615.
- [4] 田朝晖, 田宗清, 陈俞池, 等. 论中医药防治甲型 H1N1 流感 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(11): 143-144.
- [5] 李建, 叶明. 甲型 H1N1 流感的发病趋势与中医药防治 [J]. 中国临床医生, 2009, 37(11): 12-14.
- [6] 冯吁珠, 周锋, 黄茂, 等. 热毒宁注射液对腺病毒 3 体外抑制作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(8): 573-577.
- [7] 冯吁珠, 周锋, 黄茂, 等. 热毒宁注射液对人鼻病毒 (N36) 的体外抑制作用 [J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(3): 262-266.
- [8] 萧伟, 刘涛, 陈仕兰, 等. 热毒宁注射液对禽流感病毒的抑制作用 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1943-1945.
- [9] Hussell T, Pennycook A, Openshaw P J. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus specific lung immunopathology [J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(9): 2566-2573.
- [10] Helen C, SuLeslie P, Cousens L D, et al. CD⁴⁺ and CD⁸⁺ T cell interactions in IFN- γ and IL-4 responses to viral infections: requirements for IL-2 [J]. *J Immunol*, 1998, 160: 5007-5017.
- [11] MacMicking J, Xie Q W, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 323-350.
- [12] 杨贵贞. 医学免疫学 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1995.
- [13] 史利卿, 邱全瑛, 吕燕宁, 等. 宣肺解毒颗粒剂对流感病毒肺炎小鼠血浆中细胞因子水平的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 1998, 21(4): 23-25.