

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.02.014

实验研究

银翘散不同煎煮时间对甲型流感病毒感染小鼠肺组织病毒载量的影响

霍炳杰^{*}, 常靓, 吕雅蕾, 刘亚娴

(河北医科大学第四医院, 河北省石家庄市长安区健康路 12 号, 050011)

摘要 **目的** 研究银翘散的抗病毒作用及最佳煎煮时间。 **方法** 72 只 BALB/c 小鼠随机分为银翘散 3、6、12 分钟组及空白对照组、模型对照组、阳性对照组, 每组 12 只。除空白对照组外, 其他各组小鼠以 15LD₅₀ 甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 滴鼻感染, 每只 0.05 ml。银翘散 3、6、12 分钟组在感染当天灌胃给予相应的银翘散煎煮液 (分别煎煮 3、6、12 分钟), 每天 1 次, 每次 0.5 ml, 给药 7 天; 阳性对照组灌胃给予磷酸奥司他韦胶囊 27.5 mg/(kg·d); 空白对照组、模型对照组小鼠灌胃给予 0.2 ml/10 g 蒸馏水。比较各组小鼠第 3、7 天时肺指数、肺指数抑制率及脾指数, 并检测小鼠肺组织中相对病毒载量。 **结果** 与空白对照组比较, 模型对照组第 3 天、第 7 天时肺指数及肺组织病毒载量均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 第 3 天时阳性对照组和银翘散 3、6 分钟组肺指数均明显降低, 第 7 天时阳性对照组和银翘散各组小鼠肺指数、病毒载量明显降低 ($P < 0.05$)。各组小鼠第 3 天和第 7 天脾指数比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 3 天和第 7 天, 银翘散 3 分钟组肺指数抑制率、病毒抑制率与阳性对照组最为接近。 **结论** 银翘散对甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染小鼠具有较好的抗病毒作用, 煎煮时间以 3~6 分钟效果最佳。

关键词 甲型流感; 银翘散; 煎煮时间; 肺指数; 脾指数; 病毒载量

银翘散为中医经典方剂, 由我国清代温病学家吴鞠通创制, 组方为金银花一两、连翘一两、苦桔梗六钱、薄荷六钱、竹叶四钱、甘草五钱、荆芥穗四钱、淡豆豉五钱、牛蒡子六钱, 上杵为散, 鲜苇根汤煎^[1]。吴鞠通在方后载“香气大出, 即取服, 勿过煮, 过煮则味厚而入中焦矣”, 但是“香气大出”的具体时长一直未形成统一的量化标准, 严重影响了其作用的发挥^[2]。本实验采用甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染 BALB/c 小鼠制备肺炎动物模型, 以肺指数、肺指数抑制率、脾指数及相对病毒载量为观察指标, 探讨不同煎煮时间下的银翘散对 FM1 感染小鼠的保护作用及对流感病毒的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及病毒

雄性 BALB/c 小鼠 72 只, SPF 级, 4~6 周龄,

体重 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1, 由中国预防医学科学院病毒研究所提供。

1.2 药物

银翘散组成: 金银花 15 g, 连翘 15 g, 桔梗 6 g, 薄荷 6 g, 竹叶 4 g, 甘草 5 g, 荆芥穗 4 g, 淡豆豉 5 g, 牛蒡子 6 g 等, 由河北医科大学第四医院中药房提供。将各药粉碎成细面后混匀, 使用 500 ml 的烧杯煎药, 在烧杯中加入 200 ml 水, 加入 200 g 药面。电磁炉 160℃ 加热至药汁温度达 100℃ 时开始计时, 分别煎煮 3、6、12 min, 4℃ 分别保存备用。磷酸奥司他韦胶囊 (达菲, 批号: H20044397), 上海罗氏制药有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

乙醚, 天津恒兴化学试剂有限公司, 批号: 20141008; 引物购自北京华大基因公司, FM1: 上游 GAGAAAGAAGTCCTTGTGC, 下游 TCTATCAT-TCCAGTCCATCCC; GAPDH: 上游 AAGGTGAAG-

基金项目: 国家自然科学基金 (81202679)

^{*} 通讯作者: hbj331@163.com, 15032818025

GTCGGAGTCAAC, 下游 GGGGTCATTGATGGCAA-CAATA; SYBR® Premix Ex Taq™, 购自 Takara 公司。7500HT 荧光定量 PCR 仪, 购自 ABI 公司; GC-2022 电磁炉, 格力电器有限公司。

1.4 模型建立及给药

72 只小鼠采用随机数字表法分为银翘散 3 分钟组、6 分钟组、12 分钟组, 空白对照组, 模型对照组, 阳性对照组, 每组 12 只。除空白对照组小鼠外, 其他组小鼠均用乙醚 (1 ml 乙醚棉球吸入) 轻度麻醉, 以 15LD₅₀ 甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 滴鼻感染, 每只 0.05 ml, 建立甲型流感病毒感染小鼠模型^[3-4]。银翘散不同煎煮时间组在感染当天灌胃给予相应的银翘散煎煮液, 每天 1 次, 每次 0.5 ml, 给药 7 天; 阳性对照组灌胃给予磷酸奥司他韦胶囊 27.5 mg/(kg·d); 空白对照组、模型对照组小鼠灌胃给予 0.2 ml/10 g 蒸馏水。

1.5 观察指标及方法

1) 感染第 3、7 天后每组分别处死 6 只小鼠, 剪开胸腔, 取出肺脏, 摘除气管、肺门淋巴结等组织; 剖开腹腔, 取出脾脏。肺和脾均用生理盐水洗涤 2 次, 用吸水纸吸干表面水分, 并称重。肺脏液氮保存备用, 用于病毒载量测定。肺指数 = 小鼠肺重/小鼠体重 × 100%; 肺指数抑制率 = [(模型对照组平均肺指数 - 实验组平均肺指数) / 模型组平均肺指数] × 100%; 脾指数 = 小鼠脾重/小鼠体重 × 100%。2) 感染第 3、7 天后分别检测各组小鼠病毒载量。测定采用荧光定量 PCR 法, 参照试剂操作说明提取组织总 RNA, 以 cDNA 做模板, 反应体系为: cDNA 模板 (稀释 10 倍) 4 μl; 反向通用引物 10 μM 1 μl; 正向引物 10 μM 1 μl; ROX Reference Dye II 1 μl; SYBR® Premix Ex Taq™ 2 × 25 μl; 加 DEPC 水至 50 μl。按下述反应条件进行 PCR 扩增: 95℃ 10min, 95℃ 5s, 60℃ 34s, 40 个循环, 70 ~ 95℃ 绘制熔解曲线。病毒载量抑制率 =

(模型对照组病毒载量均值 - 实验组病毒载量均值) / 模型对照组病毒载量均值 × 100%。

1.6 统计学方法

采用 SAS V8 软件处理数据, 计量资料用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验和单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间脾指数比较

表 1 示, 各组小鼠第 3 天和第 7 天脾指数差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。

表 1 各组小鼠不同时间脾指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 3 天	第 7 天
空白对照组	6	0.46 ± 0.03	0.45 ± 0.02
模型对照组	6	0.44 ± 0.05	0.49 ± 0.01
阳性对照组	6	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.04
银翘散 12 分钟组	6	0.42 ± 0.01	0.50 ± 0.04
银翘散 6 分钟组	6	0.44 ± 0.05	0.50 ± 0.03
银翘散 3 分钟组	6	0.43 ± 0.04	0.52 ± 0.09

2.2 各组小鼠不同时间肺指数及肺指数抑制率比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型对照组第 3、7 天时肺指数均明显升高 (*P* < 0.05), 提示 FM1 感染小鼠造模成功。与模型对照组同时间比较, 第 3 天时阳性对照组、银翘散 3 分钟组及银翘散 6 分钟组肺指数均明显降低, 而第 7 天时阳性对照组和银翘散 12、6、3 分钟组均能降低肺指数 (*P* < 0.05)。第 3 天, 与银翘散 12 分钟组比较, 银翘散 6、3 分钟组的肺指数明显降低 (*P* < 0.05)。第 7 天, 银翘散各时间组肺指数比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。第 3 天和第 7 天, 各组肺指数抑制率虽未进行统计学处理, 但可以看出银翘散随着煎煮时间的延长肺指数抑制率有下降趋势, 银翘散 3 分钟组的肺指数抑制率与阳性对照组最为相近。

表 2 各组小鼠不同时间肺指数及肺指数抑制率比较

组别	鼠数	第 3 天		第 7 天	
		肺指数 ($\bar{x} \pm s$)	肺指数抑制率 (%)	肺指数 ($\bar{x} \pm s$)	肺指数抑制率 (%)
空白对照组	6	0.62 ± 0.05	—	0.59 ± 0.03	—
模型对照组	6	1.14 ± 0.09*	—	1.87 ± 0.45*	—
阳性对照组	6	0.87 ± 0.06 ^Δ	23.29	1.26 ± 0.20 ^Δ	32.92
银翘散 12 分钟组	6	1.02 ± 0.01 [▲]	10.38	1.55 ± 0.14 ^Δ	17.39
银翘散 6 分钟组	6	0.89 ± 0.19 ^{Δ#}	21.53	1.40 ± 0.12 ^Δ	25.25
银翘散 3 分钟组	6	0.86 ± 0.03 ^{Δ#}	24.17	1.31 ± 0.42 ^Δ	30.34

注: 与空白对照组比较, * *P* < 0.05; 与模型对照组比较, ^Δ *P* < 0.05; 与阳性对照组比较, [▲] *P* < 0.05; 与银翘散 12 分钟组比较, [#] *P* <

0.05

表 3 各组小鼠不同时间肺组织病毒载量及抑制率比较

组别	鼠数	第 3 天		第 7 天	
		相对病毒载量 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	相对病毒载量 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
空白对照组	6	—	—	—	—
模型对照组	6	28059.33 ± 9032.42	—	1964362.67 ± 197008.62	—
阳性对照组	6	12058.00 ± 2940.84*	57.03	515668.50 ± 68434.34*	73.75
银翘散 12 分钟组	6	20161.00 ± 8231.43*△	28.15	975541.33 ± 112000.67*△	50.34
银翘散 6 分钟组	6	17757.17 ± 7049.35*△	36.72	596549.83 ± 88597.50*▲	69.63
银翘散 3 分钟组	6	14034.83 ± 4409.83*▲#	49.98	537111.33 ± 51527.89*▲	72.66

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,△ $P < 0.05$;与银翘散 12 分钟组比较,▲ $P < 0.05$;与银翘散 6 分钟组比较,# $P < 0.05$

2.3 各组小鼠不同时间肺组织病毒载量及抑制率比较

表 3 示,空白对照组小鼠肺组织未检测到病毒,而模型对照组小鼠肺组织病毒载量显著升高,第 3 天和第 7 天时,阳性对照组和银翘散各组小鼠肺组织病毒载量较模型对照组明显降低($P < 0.05$)。第 3 天,银翘散 12、6 分钟组小鼠肺组织病毒载量明显高于阳性对照组($P < 0.05$),而银翘散 3 分钟组与阳性对照组差异无统计学意义($P > 0.05$);与银翘散 12、6 分钟组比较,银翘散 3 分钟组小鼠肺组织病毒载量明显降低($P < 0.05$)。第 7 天,银翘散 12 分钟组病毒载量明显高于阳性对照组($P < 0.05$);与银翘散 12 分钟组比较,银翘散 6、3 分钟组小鼠肺组织病毒载量明显降低($P < 0.05$)。第 3 天和第 7 天,各组病毒抑制率虽未进行统计学处理,但可以看出阳性对照组的病毒抑制率最高,银翘散 3 分钟组病毒抑制率与阳性对照组最为接近。

3 讨论

流感病毒是具有高度传染性的常见病毒之一,可导致呼吸道感染,并且流感病毒发病的特点是起病急骤、传播迅速、广泛流行,据统计资料显示,每年全世界平均有 50 ~ 100 万人因流感死亡^[5-6]。银翘散是中医学预防和治疗流感病毒的方剂之一,其疗效已得到共识^[7]。中医学认为,银翘散方证为温病初起,卫气被郁,肺失宣降所致;治宜辛凉透散以散其表,清泄肺热以解其毒,宣降肺气以复其清肃。银翘散乃辛凉平剂,方中金银花、连翘轻宣透表,清热解毒,重用为君药。薄荷、牛蒡子辛凉宣散,疏散风热,清利头目;淡豆豉、荆芥透邪外出,温而不燥,可增强透表之力,共为臣药。桔梗宣肺止咳,竹叶清上焦热,芦根清热生津,同为佐药。甘草为使,调和诸药。香气大出即取服,勿过煮。肺药取轻清,过煎则味厚而入中焦。肺位最

高,药过重则过病所,少用又有病重药轻之患。不恰当的煎煮方法可能会影响银翘散抗病毒作用的发挥,故本研究旨在探讨银翘散在不同煎煮时间下对甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染小鼠的保护作用及其对病毒载量的影响。

前期实验结果显示,银翘散不同煎煮时间会对小鼠的免疫调节作用、小鼠网状内皮系统对血流中惰性炭粒的吞噬廓清能力和游泳耐力以及大鼠体温及下丘脑 cAMP 含量产生一定的影响^[8]。本研究结果显示,不同煎煮时间的银翘散均能降低甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染小鼠的肺指数,具有保护作用。同时,本实验对给药后第 3、7 天不同时间点各组小鼠肺组织病毒载量进行分析,发现模型对照组肺组织病毒载量随时间呈递增趋势,而各用药组肺组织的病毒载量均随时间呈递减趋势。本研究结果显示,不同煎煮时间下的银翘散均具有较好的对小鼠的保护作用及对病毒的抑制作用,尤以 3 分钟和 6 分钟显著,由此推断银翘散的最佳煎煮时间可能为煮沸 3 ~ 6 分钟。

参考文献

- [1] 吴塘. 温病条辨 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 17-19.
- [2] 石钺, 石任兵, 陆蕴如, 等. RP-HPLC 测定银翘散抗流感病毒有效部位群中牛蒡子苷的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(4): 293-294.
- [3] 潘翌翌, 王雪峰, 岳志军, 等. 银翘散主要活性成分对流感病毒性肺炎小鼠治疗作用的研究 [J]. 中医儿科杂志, 2011, 7(4): 17-20.
- [4] 赵保胜, 刘洪斌, 马悦颖, 等. 桂枝汤含药血清对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体 3、4 型及其下游信号转导通路元件的影响 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(3): 1-4.
- [5] 阿丽塔. 基于文献的 1918 年西班牙流感中国疫情分析 [J]. 医学信息学杂志, 2010, 3(1): 47-50.
- [6] KRAMMER F, PICA N, HAI R, et al. Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly

protective stalk-specific antibodies [J]. J Virol, 2013, 87 (12): 6542-6550.

[7] 杨子峰, 黄碧松, 刘妮, 等. 银翘散抗甲 1 型流感病毒作用的实验研究 [J]. 中国热带医学, 2005, 5 (7): 1423-

1424.

[8] 刘亚娟, 霍炳杰, 张莉, 等. 银翘散在不同煎煮时间下对免疫抑制小鼠的免疫调节作用 [J]. 中医杂志, 2008, 49 (12): 1112-1115.

Impact of *Yinqiao Powder* (银翘散) under Different Decoction Time on Virus Load in Lung Tissue of Mice Infected with Influenza A Virus

HUO Bingjie, CHANG Jing, LYU Yalei, LIU Yaxian

(Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050011)

ABSTRACT Objective To study the antiviral effect and the best decoction time of *Yinqiao Powder* (银翘散).

Methods Seventy-two mice were randomized into *Yinqiao Powder* 3-minute group, 6-minute group and 12-minute group, blank control group, model control group and positive control group, with 12 mice in each group. Besides the blank control group, mice in other groups were infected by nasal dripping with 15 LD₅₀ of influenza A virus mouse lung adaptive strain FM1, 0.05 ml on each mouse. Groups of *Yinqiao Powder* at different decoction time (3, 6, 12 minutes) were given corresponding *Yinqiao Powder* decoction by gavage, 0.5 ml each time, once every day from the infected day for 7 days. The positive control group was given 27.5 mg/(kg · d) of oseltamivir phosphate capsules by gavage. The blank control group and the model control group were given 0.2 ml/10 g of distilled water by gavage. The lung index, lung index inhibition rate and the spleen index of mice in each group were compared on the 3rd and the 7th day. Relative virus load in mice lung tissue were detected. **Results** Compared with those in the blank control group, the lung index and virus load in the model control group increased significantly on the 3rd and 7th day ($P < 0.05$). Compared with those in the model control group, the lung index decreased on the 3rd day in the positive group, the *Yinqiao Powder* 3-minute group and *Yinqiao Powder* 6-minute group; the lung index and lung tissue virus load decreased significantly on the 7th day in the positive group and all *Yinqiao Powder* groups ($P < 0.05$). There was no significant difference in spleen index of mice in all groups between the 3rd day and the 7th day ($P > 0.05$). On the 3rd day and the 7th day, the virus inhibition rate in the *Yinqiao Powder* 3-minute group was most closed to that in the positive group. **Conclusion** *Yinqiao Powder* seems to have antiviral effect on influenza A virus mouse lung adaptive strain FM1 infected mice. The best decoction time is 3 to 6 minutes.

Keywords influenza A; *Yinqiao Powder*; decoction time; lung index; spleen index; virus load

(收稿日期: 2015-12-15; 修回日期: 2016-04-28)

编辑: 邓 媛

欢迎订阅 《世界中西医结合杂志》

《世界中西医结合杂志》[ISSN 1673-6613, CN 11-5511/R] 由中国科学技术协会主管, 中华中医药学会主办的学术期刊, 国内外公开发行人。由中国科学院院士吴孟超任名誉主编, 首届国医大师、中国中医科学院资深研究员路志正教授任主编。本刊为中国科技核心期刊, 连续两届获得中国科协精品科技期刊示范项目资助, 2012 年获得国家中医药管理局优秀期刊二等奖, 中华中医药学会中医药标志性文化(徽标)一等奖, 2013 年获中国知网“中国国际影响力优秀学术期刊”奖中国科协精品科技期刊, 2015 年获中国科协精品科技期刊项目, 影响因子逐年提升。本刊辟有国医传承、博士论坛、文献研究、实验研究、药物研究、临床研究、思路与方法、海外中医药动态、综述等栏目。及时报道中医及中西医结合在临床、科研等方面的新理论、新技术、新思路、新成果, 探讨中西医结合的思路和方法, 介绍相关学术领域的国内外新进展, 开展学术讨论。

本刊为月刊, 大 16 开本, 每月 28 日出版。每期定价 14 元, 168 元/年。订阅方式: 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 80-538。

地址: 北京市朝阳区北土城西路 11 号北京城建开发大厦东座 303 室, 邮政编码: 100029

联系电话: (010) 82275991