

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.12.017

含不同来源牛黄的岗藿抗感汤对 H1N1 流感病毒感染小鼠生存情况及肺组织病毒载量的影响

张莹¹, 庄轰发¹, 李耿¹, 刘建博¹, 赖小平¹, 刘小虹¹, 徐卫方^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广东省广州市番禺区广州大学城外环东路 232 号, 510006; 2. 广州中医药大学深圳医院)

摘要 目的 比较含天然牛黄、体培牛黄或人工牛黄的岗藿抗感汤对感染 H1N1 流感病毒小鼠的保护作用。方法 96 只小鼠随机分为正常组、模型组、利巴韦林组、人工牛黄组、天然牛黄组、体培牛黄组, 每组 16 只。除正常组外其余各组小鼠采用 H1N1 型流感病毒液滴鼻感染小鼠。感染 4h 后利巴韦林组给予利巴韦林片溶液 (浓度 3.75 mg/ml) 0.2 ml/10 g, 各牛黄组分别给予含不同来源牛黄的岗藿抗感汤 (浓度 2.31 g/ml) 0.2 ml/10 g, 正常组和模型组灌胃等体积生理盐水, 连续给药 15 天。比较各组小鼠平均存活时间、死亡保护率和生命延长率, 肺指数及肺湿干重比, 肺组织病毒相对表达量。结果 模型组平均存活时间较正常组明显缩短, 肺指数、肺湿干重比及肺组织病毒相对表达量升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 利巴韦林组、人工牛黄组、体培牛黄组和天然牛黄组大鼠存活时间显著延长, 肺指数、肺湿干重比及肺组织病毒相对表达量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各牛黄组之间各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 含天然牛黄、体培牛黄或人工牛黄的岗藿抗感汤均可延长 H1N1 病毒感染小鼠存活时间, 降低肺组织中病毒载量, 牛黄来源的差异不影响岗藿抗感汤对流感病毒感染小鼠的保护作用。

关键词 肺损伤; 岗藿抗感汤; 天然牛黄; 体培牛黄; 人工牛黄; 流感病毒; 存活时间

病毒性肺炎是由病毒感染引起的弥漫性肺实质损伤, 其中流感病毒、呼吸道合胞病毒是临床常见的诱因, 通过吸入飞沫传播的病毒而感染^[1]。早期的临床表现易与普通流感相混淆, 但与普通感冒不同的是, 病毒性肺炎可能会导致患者休克^[2-3]。岗藿抗感汤是广州中医药大学第一附属医院呼吸科临床治疗病毒性肺炎的经验方, 前期实验研究证明, 岗藿抗感汤能明显改善病毒感染小鼠的生存状态, 降低病毒感染小鼠肺指数, 减轻病毒导致的小鼠肺部炎症反应, 减轻病毒对肺组织的病理损伤^[4-5]。牛黄作为岗藿抗感汤组方中的一味药, 具有清热解毒、化痰开窍、熄风止痉等作用。传统中医使用的天然牛黄来源于牛科动物牛的胆囊、胆管或肝管结石, 由于天然牛黄来源缺乏、价格昂贵, 医药学家研发了人工牛黄或人工培植牛黄作为其代用品。基于岗藿抗感汤治疗病毒性肺炎的确

切疗效以及资源优化利用角度考虑, 本研究拟对含天然牛黄、体培牛黄或人工牛黄的岗藿抗感汤对病毒性肺炎的保护作用进行研究, 为岗藿抗感汤中牛黄来源的选择提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级昆明小鼠 96 只, 3 周龄, 体重 13 ~ 15 g, 雌雄各半, 购于广州中医药大学实验动物中心, 实验动物许可证编号: SCXK (粤) 2013-0020。

1.2 病毒毒株

H1N1 流感病毒鼠肺适应 FM1 株, 由广州中医药大学热带病毒研究所提供, 广州中医药大学中药学院 BSL-2 生物安全实验室鸡胚传代, -80℃ 保存备用, 经测定其 LD_{50} 为 $10^{-2.57}/0.05$ ml。

1.3 实验药物

人工牛黄 (合肥今越制药有限公司, 批号: 150609), 天然牛黄 (广州同康药业有限公司惠赠), 体培牛黄 (中国医药集团总公司, 批号: 312101)。岗藿抗感汤由岗梅根 30 g、广藿香 10 g、

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2013B020224005); 广东省自然科学基金 (S201230006598); 广东省普通高校科研创新团队建设 (E1-KFD015141K01)

* 通讯作者: xuweifang510@163.com

金银花 15 g、连翘 15 g、防风 10 g、羌活 10 g、北柴胡 10 g、红花 10 g、桃仁 10 g、苍术 9 g、荆芥 10 g、牛黄 0.35 g 组成,除牛黄外的中药材购于广州中医药大学第一附属医院,对岗藿抗感汤中除牛黄外各药味水煎,浓缩为 2.31 g/ml,分别加入人工牛黄、天然牛黄、体培牛黄超声溶解后制成的混悬液, -4℃ 密封保存备用。利巴韦林片,江西汇仁药业有限公司,批号 1303010,规格: 100 mg/片,生理盐水超声溶解浓度为 3.75 mg/ml。

1.4 主要试剂和仪器

乙醚(天津市百世化工有限公司,批号: 20150911),逆转录试剂盒(Promega 公司,货号: 0000176157),荧光染料(Bio-Rad 公司,货号: 1725124),Trizol(Invitrogen 公司,货号: 108306)。TC-3K 电子天平(深圳市华恒科技有限公司),LF26-MESJ 分析天平(香港佳立国际有限公司),DT62067 微量移液器(大龙医疗设备有限公司),CFX connect 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

1.5 动物分组及处理方法

96 只小鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、利巴韦林组、人工牛黄组、天然牛黄组、体培牛黄组,每组 16 只。在乙醚轻度麻醉下,用 2LD₅₀ 的 H1N1 型流感病毒液滴鼻感染小鼠,分两次滴鼻,每次 25 μl,正常组以等体积生理盐水滴鼻。感染 4 h 后各组分别给药,灌胃体积均为 0.2 ml/10 g,正常组和模型组灌胃等体积生理盐水,连续给药 15 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般情况 观察各组小鼠(每组 10 只)活动、皮毛、呼吸、饮食、二便等情况,记录死亡数、死亡时间,计算死亡保护率及生命延长率^[8]。死亡保护率(%) = (模型组死亡率 - 实验组死亡率) / 模型组死亡率 × 100%,生命延长率(%) = (实验组平均存活日数 - 模型组平均存活日数) / 模型组平均存活日数 × 100%。

1.6.2 肺指数 预实验显示小鼠第 7 天就开始出现死亡,故给药第 6 天每组取材 6 只。记录体重,末次给药后 30 min,取各组小鼠麻醉后打开胸腔取出全肺,肉眼观察并记录肺部病变,用生理盐水洗净,用干净滤纸吸掉残余盐水,称量湿重,左肺置于 80℃ 烘箱中干燥 48 h 至恒重,取出称量干重,计算肺指数、肺湿干重比。剩余肺放置 -80℃ 冰箱,进行病毒载量测定。肺指数(%) = 肺质量/小鼠体重 × 100%,肺湿干重比 = 左肺湿重/左肺干重。

1.6.3 肺组织中病毒载量 采用实时荧光定量 PCR 法检测,利用从 NCBI GenBank 下载的 H1N1 基因序列,用 Primer premier 5.0 软件进行序列分析并设计引物。引物由华大基因公司合成, H1N1: 上游 5'-ATCAGACCGAACGAGAATCCAGC-3', 下游 5'-GGAGGCCCTCTGTTGATTAGTGT-3'; GAPDH: 上游 5'-GACTGGATAAGCAGGGCGG-3', 下游 5'-TACGGCCAAATCCGTTTACA-3'。使用 Trizol 试剂提取肺组织中的 RNA 后,逆转录成 cDNA,分别用上述 H1N1 和 GAPDH 引物进行三步法 RT-PCR 反应,反应体系为 20 μl,其中 Mix10 μl、引物 1 μl、模板 1 μl、水 8 μl。反应条件: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 20 s, 72℃, 30 s, 共 40 个循环,反应结束后使用 CFX Manager 3.1 软件(Bio-Rad 公司)分析,计算各样品中病毒基因的相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件分析数据,计量资料比较采用方差分析,生命延长率采用 χ^2 检验,死亡保护率采用 Log-rank 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况比较

正常组、利巴韦林组小鼠活动敏捷,毛发有光泽,呼吸平稳,饮食饮水正常,对外界环境改变反应灵敏。模型组小鼠于第 4 天开始出现进食减少现象,并逐渐出现皮毛光泽度降低、皮毛蓬松、体重减轻、活动减少、蜷缩于角落等症状,在第 6~7 天出现弓背、震颤症状,并开始死亡。人工牛黄组、体培牛黄组、天然牛黄组同时出现以上症状,但症状较模型组减轻或缓解。正常组和利巴韦林组小鼠无死亡。模型组有 9 只小鼠死亡,第 8 天达到死亡高峰,对死亡小鼠大体解剖发现,小鼠肺组织明显变大,呈水肿样肿胀,肺部一叶至多叶甚至整个肺部颜色暗红。人工牛黄组和天然牛黄组中各死亡 4 只、体培牛黄组死亡 5 只,大体解剖发现其肺组织水肿样病变较模型组轻,颜色浅。表 1 示,模型组小鼠存活时间比正常组明显缩短 ($P < 0.01$); 与模型组比较,利巴韦林组、人工牛黄组、体培牛黄组和天然牛黄组大鼠存活时间显著延长 ($P < 0.01$),并且利巴韦林组大鼠存活时间较各牛黄组明显延长 ($P < 0.05$); 各牛黄组之间差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。利巴韦林组死亡保护率和生命延长率均高于各牛黄组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠存活时间、死亡保护率和生命延长率比较

组别	鼠数	死亡数	存活时间 (天)	死亡保护率 (%)	生命延长率 (%)
正常组	10	0	15.0 ± 0.00	—	—
模型组	10	9	8.2 ± 2.86*	—	—
利巴韦林组	10	0	15.0 ± 0.00 [△]	100	82.93
人工牛黄组	10	4	12.0 ± 3.89 ^{△▲}	55.56	46.34
体培牛黄组	10	5	11.8 ± 3.45 ^{△▲}	44.44	43.90
天然牛黄组	10	4	12.3 ± 3.53 ^{△▲}	55.56	50.00

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.01$ ；与利巴韦林组比较， $\blacktriangle P < 0.05$

2.2 各组小鼠肺指数及肺湿干重比较

表 2 示，与正常组比较，模型组肺指数、肺湿干重比显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，利巴韦林组、人工牛黄组、体培牛黄组和天然牛黄组肺指数、肺湿干重比明显降低 ($P < 0.01$)，各牛黄组小鼠肺指数和肺湿干重比组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，而利巴韦林组小鼠肺指数和肺湿干重比低于各牛黄组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠肺指数及左肺湿干重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肺指数	左肺湿干重比
正常组	6	0.67 ± 0.56	4.70 ± 0.13
模型组	6	1.97 ± 0.17*	7.41 ± 0.27*
利巴韦林组	6	1.07 ± 0.10 [△]	5.02 ± 0.25 [△]
人工牛黄组	6	1.46 ± 0.15 ^{△▲}	6.69 ± 0.31 ^{△▲}
体培牛黄组	6	1.51 ± 0.18 ^{△▲}	6.71 ± 0.29 ^{△▲}
天然牛黄组	6	1.50 ± 0.12 ^{△▲}	6.73 ± 0.25 ^{△▲}

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.01$ ；与利巴韦林组比较， $\blacktriangle P < 0.05$

2.3 各组小鼠肺组织病毒相对表达量比较

表 3 示，模型组小鼠肺组织病毒相对表达量较正常组明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，利巴韦林组、人工牛黄组、体培牛黄组和天然牛黄组小鼠肺组织病毒相对表达量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，各牛黄组小鼠肺组织病毒相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，而利巴韦林组小鼠肺组织病毒相对表达量低于各牛黄组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠肺组织病毒相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	病毒相对表达量
正常组	6	0
模型组	6	0.6969 ± 0.1514*
利巴韦林组	6	0.2186 ± 0.0299 ^{△△}
人工牛黄组	6	0.4329 ± 0.1430 ^{△▲}
体培牛黄组	6	0.4497 ± 0.1123 ^{△▲}
天然牛黄组	6	0.4495 ± 0.0699 ^{△▲}

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与利巴韦林组比较， $\blacktriangle P < 0.05$

3 讨论

牛黄首载于《神农本草经》，甘、凉，归心、肝经，具有凉肝息风、豁痰开窍、清热解毒的功效，治壮热神昏、中风痰迷、惊厥抽搐、小儿惊风、癫痫发狂、咽喉肿痛、口舌生疮、痈肿疔疮等^[1]，为我国传统名贵动物药材。由于天然牛黄是牛的病理产物，其资源紧缺、价格昂贵，长期以来不能满足临床需要。因此，我国中医药工作者于 20 世纪 50 年代中期开始进行了牛黄的替代研究^[2]，以期缓解牛黄的紧缺问题。

流感病毒引起的病毒性肺炎临床症状在中医学属于温病初起阶段的痰热内闭心窍，湿热酿痰蒙窍，而牛黄具有清热解毒、化痰开窍、熄风止痉等作用，可解除流感病毒肺炎引起的肺热痰闭。研究显示，流感病毒引起的肺炎可激活体内氧化应激反应，释放活性氧自由基和氧化磷脂，活性氧自由基产生过多，氧化系统和抗氧化系统失衡，从而导致组织损伤，引起肺水肿^[3]。而牛黄具有解热镇痛、抗炎抗氧化、清除自由基、提高免疫的作用，在防御氧化毒性方面起着重要作用^[4]。岗藿抗感汤方中岗梅根主清热生津、活血解毒，广藿香芳香化浊，两者配伍，温清结合，共奏解毒抗感之效，方中配伍解表、清热解毒药物以增强该方清热解毒、疏风解表的功效。

流感病毒经过呼吸道进入人体后，感染宿主细胞，在呼吸道黏膜上皮细胞内繁殖、感染并诱导细胞凋亡导致脱落，病毒在宿主细胞中的复制是感染和疾病发生的重要因素^[5]。此外流感病毒感染后导致肺部毛细血管损伤及通透性增加，促使组织液向肺泡腔中渗透，形成肺水肿并导致肺透明膜的形成，这些病理改变共同导致肺组织中含水量的增加，表现为肺指数、肺湿干重比的明显升高^[6]。利巴韦林是一种广谱抗病毒药，对多种 DNA 及 RNA 病毒有明显的抑制作用，临床常用于治疗丙型肝炎、甲型或乙型流感病毒感染^[7]。本研究结果显示，含天然牛黄、体培牛黄或人工牛黄的岗藿抗感汤可减轻 H1N1 病毒感染引起的小鼠肺组织病毒载量，降低肺指数，并延长其存活时间，其各牛黄组间比较差异无统计学意义，提示牛黄来源的差异不会影响岗藿抗感汤对感染流感病毒小鼠的保护作用，人工牛黄可作为岗藿抗感汤中牛黄的替代品。

参考文献

- [1] MAEDA N, UEDE T. Swine-origin influenza-virus-

- induced acute lung injury: novel or classical pathogenesis? [J]. World J Biol Chem, 2010, 1(5): 85-94.
- [2] MUSCEDERE J, OFNER M, KUMAR A, et al. The occurrence and impact of bacterial organisms complicating critical care illness associated with 2009 influenza A (H1N1) infection [J]. Chest, 2013, 144(1): 39-47.
- [3] TO KK, HUNG IF, LI IW, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(6): 850-859.
- [4] 刘建兴, 陈创荣, 李耿, 等. 岗藿抗感汤对流感病毒感染致小鼠肺损伤的保护作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(7): 1613-1615.
- [5] 陈创荣, 刘建兴, 李耿, 等. 岗藿抗感汤对小鼠 H1N1 流感病毒肺炎的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 3318-3321.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 321-322.
- [7] 白山岭, 赵映前. 牛黄的药理作用及其用于抗肝损伤作用的研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(5): 65-67.
- [8] 杨继凡, 韩文华, 王淑草, 等. 人工培育牛黄与其它牛黄药理作用的比较 [J]. 中药材科技, 1984, 7(4): 14-16.
- [9] WARE LB, MATTHAY MA. The acute respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1334-1349.
- [10] 邹秦文, 石岩, 魏锋, 等. 牛黄系列药材化学成分比较及其药理作用研究概况 [J]. 中国药事, 2014, 28(6): 646-650.
- [11] HURT AC, HOLIEN JK, PARKER MW, et al. Osetamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in seasonal Pandemic and highly pathogenic influenza viruses [J]. Drugs, 2009, 69(18): 2523-2531.
- [12] 张艳丽, 范新生, 李澎湃, 等. 毒热平注射液抗流感病毒肺损伤机制的研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(1): 33-35.
- [13] 余文英. 利巴韦林的研究应用及展望 [J]. 亚太传统医药, 2010, 6(11): 175-177.

Impact of *Ganghuo Kanggan Decoction* (岗藿抗感汤) Containing Bezoar from Different Sources on the Survival Situation and Lung Tissue Viral Load of H1N1 Influenza Virus Infected Mice

ZHANG Ying¹, ZHUANG Hongfa¹, LI Geng¹, LIU Jianbo¹, LAI Xiaoping¹, LIU Xiaohong¹, XU Weifang²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006; 2. Shenzhen Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To compare the protective effects of *Ganghuo Kanggan Decoction* (岗藿抗感汤) containing natural bezoar, in vitro cultured bezoar, or artificial bezoar on mice infected by H1N1 influenza virus. **Methods** Ninety-six mice were randomized into a normal group, a model group, a ribavirin group, an artificial bezoar group, a natural bezoar group and a bezoar cultured in vitro group, 16 mice in each group. Mice in other groups except the normal group were infected with H1N1 influenza virus liquid by nose drops. After mice were infected for 4 h, the ribavirin group was given 0.2 ml/10 g of ribavirin tablet solution (concentration 3.75 mg/ml). All bezoar groups were given 0.2 ml/10 g of *Ganghuo Kanggan Decoction* containing bezoar from different sources (concentration 2.31 g/ml). The normal group and the model group were given equivoluminal normal saline, for 15 days. The average survival time, mortality protection rate, life extension rate, lung index, the ratio of lung wet-dry weight and relative expression of lung tissue virus were compared in all groups. **Results** The average survival time shortened, while the lung index, the ratio of lung wet-dry weight, and relative expression of lung tissue virus increased in the model group compared with those in the normal group ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, mice survival time increased, but lung index, the ratio of lung wet-dry weight and relative expression of lung tissue virus decreased in the ribavirin group, the artificial bezoar group, the bezoar cultured in vitro group, and the natural bezoar group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in the indexes among all bezoar groups ($P > 0.05$). **Conclusion** *Ganghuo Kanggan Decoction* containing natural bezoar, bezoar cultured in vitro or artificial bezoar might increase survival time of mice infected by H1N1 influenza virus and reduce the lung tissue viral load. The difference of bezoar sources does not seem to influence the protection of *Ganghuo Kanggan Decoction* on mice infected by influenza virus.

Keywords lung injury; *Ganghuo Kanggan Decoction* (岗藿抗感汤); natural bezoar; in vitro cultured bezoar; artificial bezoar; influenza virus; survival time

(收稿日期: 2016-11-07; 修回日期: 2017-01-08)

编辑: 邓 媛