

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.12.014

香术防感方吸嗅与滴鼻给药方式预防甲型流感 H1N1 模型小鼠的药效学比较研究

张悦¹, 董毅智¹, 李皓月², 吴新新¹, 黎晓蕾¹, 赵静¹✉

1. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京市东城区东直门内南小街16号, 100700; 2. 中国中医科学院国际合作处

[摘要] **目的** 比较香术防感方吸嗅和滴鼻两种经鼻给药方式预防甲型流感 H1N1 的有效性及可能作用机制。**方法** 将 56 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、扎那米韦组、香囊高浓度组、香囊低浓度组、滴鼻高浓度组、滴鼻低浓度组, 每组 8 只。香囊低、高浓度组分别给予 15、30 g 香术防感方香囊吸嗅, 每天持续 24 h; 滴鼻低、高浓度组分别给予浓度为 0.11、0.22 g/ml 香术防感方滴鼻液滴鼻, 每次 20 μ l, 每日 2 次; 扎那米韦组给予浓度为 1.025 mg/ml 扎那米韦溶液滴鼻, 每次 20 μ l, 每日 2 次; 正常组、模型组滴鼻 20 μ l 生理盐水, 每日 2 次。各组预防性干预 5 天。第 5 天给药 1 h 后, 除正常组外, 其余各组小鼠每只滴鼻 35 μ l、50 LD₅₀ A/PR/8/34/H1N1 病毒液滴鼻, 以制备甲型流感 H1N1 模型小鼠。于实验第 5 天至 9 天每日记录小鼠体质量及计算体质量变化率, 并观察一般状态。于第 9 天取材, 计算小鼠肺指数及肺指数抑制率; HE 染色法检测肺组织病理变化, 并进行肺组织病变评分; RT-qPCR 法检测肺组织病毒载量; ELISA 法检测上呼吸道灌洗液中分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 及血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 6 (IL-6)、干扰素 γ (IFN- γ) 含量。**结果** 实验第 7、8、9 天, 模型组小鼠体质量变化率较同时点正常组显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 实验第 8、9 天与模型组比较, 扎那米韦组和滴鼻高浓度组小鼠体质量变化率增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常组比较, 模型组小鼠肺指数、肺组织病变评分、肺组织病毒载量明显升高, 血清 TNF- α 、IL-6、IL-2、IFN- γ 含量明显升高, 上呼吸道灌洗液 sIgA 水平明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 扎那米韦组和滴鼻高浓度组肺指数、肺组织病毒载量降低, 血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-6 含量降低, sIgA 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 除香囊低浓度组外, 其余各药物干预组肺组织病变评分较模型组降低 ($P<0.01$)。与扎那米韦组比较, 香囊低浓度组和滴鼻低、高浓度组肺指数升高, 各香术防感方干预组血清 TNF- α 、IL-2 含量均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与滴鼻高浓度组比较, 香囊高浓度组血清 TNF- α 和 IFN- γ 含量升高, 滴鼻低浓度组肺组织病毒载量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。扎那米韦组肺指数抑制率为 80.84%, 香囊高、低浓度组肺指数抑制率分别为 41.61%、17.90%, 滴鼻高、低浓度组肺指数抑制率分别为 35.40%、25.40%。HE 染色显示, 模型组肺组织出现肺泡间隔增厚, 肺泡塌陷, 炎性细胞浸润; 而各药物干预组小鼠肺组织炎症和损伤程度均有所减轻, 且以扎那米韦组、滴鼻高浓度组改善最明显。**结论** 香术防感方吸嗅和滴鼻两种给药形式均可预防甲型流感 H1N1 病毒感染, 具有抗病毒、抗炎作用, 可改善肺组织病理损伤, 提高呼吸道黏膜免疫, 且滴鼻给药在抑制炎症反应方面可能优于吸嗅给药, 尤以滴鼻高浓度效佳。

[关键词] 甲型流感; H1N1 病毒; 香术防感方; 吸嗅; 滴鼻; 抗病毒; 炎症因子

流行性感 (简称流感) 是由正黏病毒科 RNA 流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 病毒分为甲、

乙、丙、丁 4 型, 其中甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 因潜伏期相对短、突然暴发且扩散迅速等特点, 曾多次引起甲型流感 (简称甲流) 世界大流行, 成为世界公共卫生领域的主要威胁与挑战^[1]。甲流重在预防, 目前预防方式以疫苗和抗病

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程中医临床基础学科创新团队项目 (CI2021B003); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A00704-4)

✉ 通讯作者: hzhzhaojing@126.com

毒药物为主,但因 IAV 抗原转移及漂移致使甲流疫苗的免疫应答受损^[2],且抗病毒药物预防甲流的给药窗口期较窄,易出现耐药性及不良反应^[3]。因此,研发多种安全有效的预防措施、提升流感防控能力,成为未来预防流感的重点。

课题组前期筛选古今预防流感中药,形成芳香类药物组成的鼻用香术防感方^[4]。芳香中药以吸嗅、涂抹、喷雾等经鼻给药方式预防流感,具备民众接受度高、不良反应少等优势^[5]。前期临床试验表明,香术防感方香囊吸嗅具有预防及缓解流感样症状的效果^[6]。鼻腔黏膜是阻止 IAV 进入人体的首要屏障,经鼻黏膜给药可直接、快速地激活细胞、体液和黏膜三重免疫应答^[7]。基于经鼻给药的独特免疫优势,鼻用中药的需求增加。为探索更安全有效的鼻用中药制剂,课题组将香术防感方挥发性成分富集提取为挥发油,并将其制备为滴鼻剂。本研究比较香术防感方香囊吸嗅和滴鼻两种给药方式预防甲流 H1N1 模型小鼠的有效性,及抗病毒免疫作用,以期丰富、优化芳香中药预防甲流的临床应用形式。本实验通过中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会审查(批准号:2023D002)。

1 材料与方法

1.1 动物及病毒株

SPF 级 BALB/c 小鼠 56 只,体质量(11.00±1.00)g,3 周龄,雌雄各半,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)2016-0006。常规饲养于中国中医科学院中药研究所动物房,通风、光照 12/12 h,温度为(21±2)℃,相对湿度为(50±10)%,小鼠自由摄食和饮水。A/PR/8/34/H1N1(小鼠肺适应株)病毒液,购自美国标准生物制品收藏中心,在中国中医科学院中药研究所生物安全 2 级实验室(BSL-2)传代,-80℃冰箱保存。经 10 天龄鸡胚尿囊腔接种培养传代,血凝效价 1:640 以上者用于本实验。

1.2 药物

鼻用香术防感方组成^[4]:丁香、苍术、石菖蒲、川芎、肉桂、薰衣草、鬼箭羽(均购于安国市聚药堂药业有限公司,由中国中医科学院中药研究所鉴定),按 2:2:2:2:1:1:1 比例配置香囊及滴鼻液,中药药粉香囊由华草吉生物医药科技公司制备,滴鼻液由中国中医科学院中药研究所制备。扎那米韦吸入粉雾剂(南京先声东元制药有限公司,国药准字 H20103037,5 mg/粒)。

1.3 主要试剂及仪器

异氟烷(河北一品制药股份有限公司,批号 H19980141);甲型流感病毒核酸检测试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司,批号 P20220301);分泌型免疫球蛋白 A(sIgA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 6(IL-6)ELISA 检测试剂盒(武汉云克隆科技公司,货号分别为 SEA641Mu、MEA133Mu、MEA049Mu、MEA073Mu、MEA079Mu);TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,批号 15596026);戊巴比妥钠(生兴生物技术有限公司,批号 3G223G27);4%多聚甲醛(武汉博士德生物工程有限公司,批号 AR1069);HE 染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G1003)。

石蜡切片机(美国 Leica 公司,型号 RM2125 RTS);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号 Centrifuge 5415D);倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司,型号 Nikon Eclipse Ti-SR);荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司,型号 ABI7500);精密电子天平(美国 Ohaus 公司,型号 CP64)。

1.4 分组及预防性给药

将小鼠适应性喂养 3 天后,采用随机数字表法分为正常组、模型组、扎那米韦组、香囊高浓度组、香囊低浓度组、滴鼻高浓度组和滴鼻低浓度组,每组 8 只。香囊低、高浓度组分别给予香术防感方临床试验成人剂量^[6]15 g 和 2 倍成人剂量 30 g,用相同规格装有香囊的金属镂空球悬挂于小鼠饲养笼上,吸嗅时长每天持续 24 h,每 2 天更换香囊 1 次;滴鼻低、高浓度组给予香术防感方滴鼻液原液(浓度为含生药量 1.10 g/ml)滴鼻,根据前期动物预实验结果,两组对应药液浓度为原液的 1/10(0.11 g/ml)、1/5(0.22 g/ml),滴鼻每次 20 μ l,每日 2 次;扎那米韦组参照临床等效剂量及小鼠体表面积法^[8]换算,给予小鼠浓度为 1.025 mg/ml 扎那米韦溶液滴鼻,每次 20 μ l,每日 2 次;正常组、模型组滴鼻 20 μ l 生理盐水,每日 2 次。各组均干预 5 天。

1.5 造模方法

第 5 天给药 1 h 后,除正常组外,其余各组小鼠予 2% 异氟烷吸入麻醉后,每只滴鼻 35 μ l、50 LD₅₀ A/PR/8/34/H1N1 病毒液。48 h 后小鼠出现体质量下降、精神萎靡、动作迟缓等一般情况,表明病毒感染成功^[9]。

1.6 观察指标与检测方法

1.6.1 体质量及一般状态观察 于实验第5天至第9天（造模后至取材前）每日上午9:00称量并记录小鼠体质量，观察各组小鼠精神状态、毛发、活动、饮食等，并计算小鼠体质量变化率。体质量变化率=当日体质量/实验第5天体质量×100%。

1.6.2 ELISA法检测上呼吸道灌洗液中sIgA及血清IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-6含量 于实验第9天用0.3%戊巴比妥钠（0.2 ml/10 g）腹腔注射麻醉小鼠后，取小鼠眼球血，将血液放于EP管中，4℃静置30 min后，以4℃、3000 r/min（离心半径14 cm）离心15 min，收集血清，置于-80℃保存待检。开胸暴露小鼠气管，以1 ml PBS缓冲液从气管上端注入小鼠呼吸道，向上反复冲洗鼻咽部3次，收集上呼吸道灌洗液，随后以4℃、3000 r/min（离心半径14 cm）离心15 min，收集上清液，置于-80℃保存待检。严格按照ELISA试剂盒说明书步骤，对上呼吸道灌洗液中sIgA及血清IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-6含量进行检测。

1.6.3 肺指数、肺指数抑制率 于实验第9天用0.3%戊巴比妥钠（0.2 ml/10 g）腹腔注射麻醉小鼠后取全部肺组织，称重，计算肺指数和肺指数抑制率^[10]。肺指数=肺质量/体质量×100%；肺指数抑制率=（模型组平均肺指数值-给药组平均肺指数值）/（模型组平均肺指数值-正常组平均肺指数值）×100%。

1.6.4 HE染色观察肺组织病理变化 取小鼠左叶肺组织置于4%多聚甲醛中固定，经梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片、HE染色后，在光学显微镜下阅片。根据肺实质病变、肺间质和支气管周围炎症等级综合评估肺组织病变评分^[11]，健康无病变计0分，轻度间质性肺炎（占肺<25%）、中度损伤（占肺25%~50%）、重度损伤（占肺51%~75%）、非常严重损伤（占肺>75%），分别计1、2、3、4分。

1.6.5 RT-qPCR法检测肺组织病毒载量 取15~20 mg小鼠右叶肺组织，研磨后在4℃、3000 r/min离心（离心半径14 cm）15 min，收集上清液为肺组织匀浆。使用TRIzol提取总RNA，并按照甲型肝炎病毒核酸检测试剂盒说明进行操作。用目的基因引物进行PCR扩增（参数：48℃ 5 min，94℃ 2 min，94℃ 10 s，55℃ 35 s，40个循环），检测PR8 mRNA水平，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 扫描法根据标准曲线计算拷贝数。引物序列由上海之江生物科技股份有

限公司设计合成，H1N1：上游引物CTTCTAACC-GAGGTGCAAACGTA，下游引物GGTGACAGGAT-TGGTCTTGTCTTTA，长度103bp；GAPDH：上游引物AGGTCGGTGTGAACGGATTTG，下游引物TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA，长度233 bp。

1.7 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计，计量资料均符合正态分布用均值±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，方差齐采用LSD检验，方差不齐则采用邓尼特 T^2 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义；采用GraphPad Prism 9.3.0软件做图。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量及一般状态比较

正常组小鼠精神状态良好，行动迅速、毛发光滑、呼吸均匀、摄食量正常；从实验第7天开始，模型组小鼠出现精神不振，毛发倒刺无光泽，蜷缩成团，活动及摄食量减少；与模型组比较，各药物干预组小鼠精神状态稍有改善，活动量、毛发亮度、蜷缩程度及摄食量均有一定程度好转，尤其是扎那米韦组、滴鼻高浓度组整体情况改善良好。表1示，实验第5、6天，各组小鼠体质量变化率差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。实验第7、8、9天，模型组小鼠体质量变化率较同时间点正常组明显降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。实验第8天，香囊低、高浓度组和滴鼻低、高浓度组小鼠体质量变化率亦显著低于正常组（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。实验第8、9天，与模型组比较，扎那米韦组和滴鼻高浓度组小鼠体质量变化率增加（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）；与扎那米韦组比较，香囊低、高浓度组小鼠体质量变化率明显减小（ $P<0.01$ ），滴鼻低、高浓度组差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。实验第9天，滴鼻低浓度组小鼠体质量变化率较扎那米韦组降低，香囊低浓度组小鼠体质量变化率较滴鼻高浓度组降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

2.2 各组小鼠肺指数、肺指数抑制率及肺组织病变评分比较

表2示，与正常组比较，模型组小鼠肺指数、肺组织病变评分明显升高（ $P<0.01$ ）。与模型组比较，扎那米韦组、香囊高浓度组和滴鼻高浓度组肺指数明显降低（ $P<0.01$ ）；除香囊低浓度组外，其余各药物干预组肺组织病变评分明显降低（ $P<0.01$ ）。与扎那米韦组比较，香囊低浓度组、滴鼻低浓度组、滴鼻高浓度组肺指数升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与香囊高浓度组比较，香囊低浓度组

表1 各组小鼠不同时间体重变化率比较
Table 1 Comparison of weight of mice in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第5天	第6天	第7天	第8天	第9天
正常组	8	100	103.28±2.45	107.38±2.79	110.98±4.25	111.52±4.63
模型组	8	100	104.61±2.97	100.04±4.59 ^{a)}	94.98±4.47 ^{b)}	91.88±4.80 ^{b)}
扎那米韦组	8	100	103.48±2.42	106.39±3.61	109.55±5.52 ^{c)}	109.07±5.81 ^{c)}
香囊高浓度组	8	100	104.32±1.89	102.00±4.17	100.00±7.85 ^{b)} ^{e)}	99.09±10.20 ^{c)}
香囊低浓度组	8	100	101.34±2.46	104.50±2.65	98.78±4.51 ^{b)} ^{e)}	93.84±4.57 ^{c)} ^{f)}
滴鼻高浓度组	8	100	104.11±2.62	107.32±4.43	103.15±6.58 ^{a)} ^{d)}	101.95±7.78 ^{c)}
滴鼻低浓度组	8	100	101.59±2.63	104.57±5.63	102.72±7.17 ^{a)}	99.25±6.61 ^{c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与扎那米韦组比较， $P<0.01$ ；f) 与滴鼻高浓度组比较， $P<0.05$ 。

肺指数升高 ($P<0.05$)。各药物干预组之间的肺组织病变评分差异均无统计学意义 ($P<0.05$)。扎那米韦组肺指数抑制率为 80.84%，香囊高、低浓度组肺指数抑制率分别为 41.61%、17.90%，滴鼻高、低浓度组肺指数抑制率分别为 35.40%、25.40%。

表2 各组小鼠肺指数及肺组织病变评分比较
Table 2 Comparison of lung index and lung histopathology score of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	肺指数	肺组织病变评分/分
正常组	8	0.64±0.04	0.11±0.19
模型组	8	1.05±0.07 ^{a)}	3.44±0.20 ^{a)}
扎那米韦组	8	0.72±0.03 ^{b)}	1.03±0.58 ^{b)}
香囊高浓度组	8	0.82±0.10 ^{b)}	1.43±0.20 ^{b)}
香囊低浓度组	8	0.98±0.08 ^{d)} ^{e)}	2.51±0.29
滴鼻高浓度组	8	0.86±0.13 ^{b)} ^{c)}	1.00±0.33 ^{b)}
滴鼻低浓度组	8	0.93±0.12 ^{d)}	1.45±0.39 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与扎那米韦组比较， $P<0.05$ ；d) 与扎那米韦组比较， $P<0.01$ ；e) 与香囊高浓度组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肺组织病毒载量及上呼吸道灌洗液 sIgA 水平比较

表3示，与正常组比较，模型组小鼠肺组织病毒载量明显升高，上呼吸道灌洗液 sIgA 水平明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，扎那米韦组、香囊高浓度组、滴鼻高浓度组小鼠肺组织病毒载量明显降低，上呼吸道灌洗液 sIgA 水平升高，滴鼻低浓度组上呼吸道灌洗液 sIgA 水平亦升高 ($P<0.01$)。与扎那米韦组比较，鼻用香术防感方各干预组小鼠肺组织病毒载量升高，香囊低浓度组上呼吸道灌洗液 sIgA 水平降低 ($P<0.01$)。与香囊低浓度组比较，香囊高浓度组和滴鼻高浓度组肺组织病毒载量降低，上呼吸道灌洗液 sIgA 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。滴鼻低浓度组肺组织病毒载量高于滴鼻高浓度组 ($P<0.01$)。

表3 各组小鼠肺组织病毒载量及上呼吸道灌洗液 sIgA 水平比较
Table 3 Comparison of lung viral load of mice and sIgA in upper respiratory tract lavage fluid of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	病毒载量/拷贝数× $10^6\cdot\mu\text{l}^{-1}$	上呼吸道灌洗液 sIgA/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
正常组	8	0	450.15±40.88
模型组	8	43.82±8.78 ^{a)}	166.81±43.03 ^{a)}
扎那米韦组	8	11.99±6.76 ^{b)}	370.13±59.88 ^{b)}
香囊高浓度组	8	29.86±7.11 ^{b)} ^{c)}	300.69±61.23 ^{b)}
香囊低浓度组	8	39.30±4.84 ^{c)} ^{d)} ^{e)}	198.33±57.17 ^{c)} ^{d)} ^{e)}
滴鼻高浓度组	8	27.14±4.46 ^{b)} ^{c)}	331.51±36.63 ^{b)}
滴鼻低浓度组	8	38.55±10.12 ^{c)} ^{e)}	303.16±60.82 ^{b)}

注：sIgA，分泌型免疫球蛋白 A。正常组病毒载量为 1.04±0.32 拷贝数。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与扎那米韦组比较， $P<0.01$ ；d) 与香囊高浓度组比较， $P<0.05$ ；e) 与滴鼻高浓度组比较， $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-2、IFN- γ 含量比较

表4示，与正常组比较，模型组小鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-2、IFN- γ 含量明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，扎那米韦组、香囊低浓度组、滴鼻低浓度和滴鼻高浓度组小鼠血清 TNF- α 、IL-2、IL-6、IFN- γ 均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，香囊高浓度组各指标差异无统计学意义 ($P<0.05$)。与扎那米韦组比较，鼻用香术防感方各干预组血清 TNF- α 、IL-2 含量均升高，香囊高浓度组血清 IL-6、IFN- γ 含量升高，滴鼻低浓度组 IFN- γ 含量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与滴鼻高浓度组比较，香囊高浓度组血清 TNF- α 和 IFN- γ 含量升高 ($P<0.05$)。

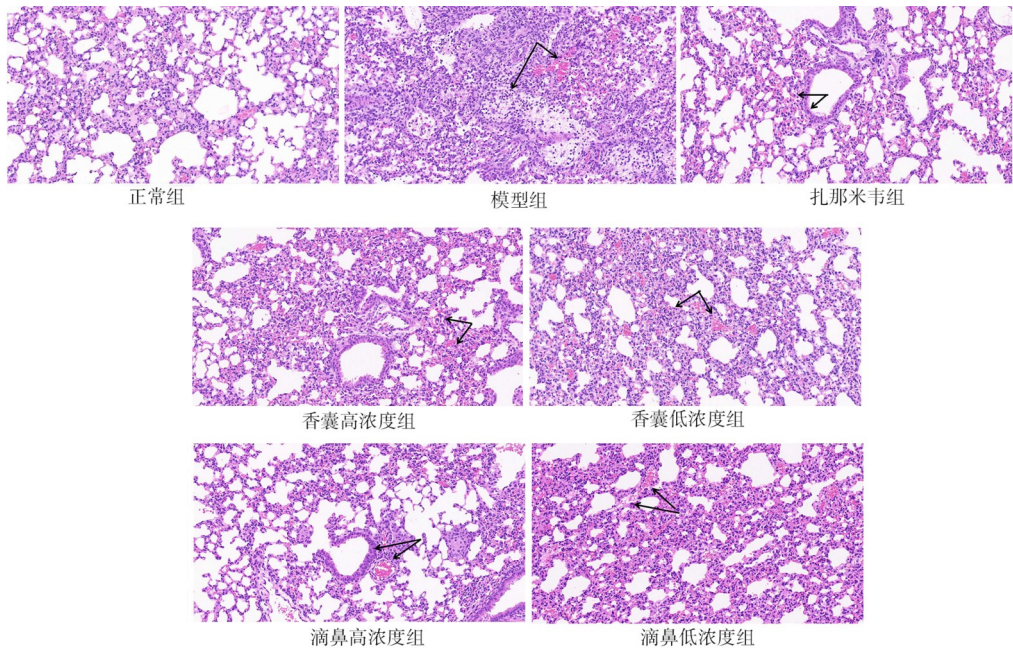
2.5 各组小鼠肺组织病理学变化比较

图1示，正常组小鼠肺组织结构清晰，肺泡壁

表4 各组小鼠血清TNF-α、IL-6、IL-2、IFN-γ含量比较
Table 4 Comparison of TNF-α、IL-6、IL-2 and IFN-γ in serum of mice in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF-α	IL-2	IL-6	IFN-γ
正常组	8	17.30±3.25	20.80±7.28	13.84±7.15	63.09±9.14
模型组	8	85.12±11.25 ^{a)}	101.87±10.85 ^{a)}	51.86±10.58 ^{a)}	128.42±13.09 ^{a)}
扎那米韦组	8	34.91±10.15 ^{b)}	55.20±5.17 ^{b)}	22.04±9.17 ^{b)}	86.80±9.87 ^{b)}
香囊高浓度组	8	70.21±12.86 ^{d) f)}	94.16±14.86 ^{d)}	39.22±13.07 ^{e)}	111.26±9.08 ^{d) f)}
香囊低浓度组	8	56.79±7.88 ^{b) d)}	79.17±11.28 ^{c) e)}	33.67±7.15 ^{c)}	101.26±8.01 ^{b)}
滴鼻高浓度组	8	52.12±7.94 ^{b) d)}	82.85±7.94 ^{c) d)}	26.36±8.00 ^{b)}	91.93±12.01 ^{b)}
滴鼻低浓度组	8	67.79±8.12 ^{c) d)}	85.15±10.29 ^{b) d)}	34.69±9.03 ^{c)}	106.91±9.10 ^{c) e)}

注：TNF-α，肿瘤坏死因子α；IFN-γ，干扰素γ；IL-2，白细胞介素2；IL-6，白细胞介素6。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与扎那米韦组比较， $P<0.01$ ；e) 与扎那米韦组比较， $P<0.05$ ；f) 与滴鼻高浓度组比较， $P<0.05$ 。



注：图中黑色箭头指示为炎性细胞浸润情况。

图1 各组小鼠肺组织病理学比较（HE染色，×200）

Figure 1 Comparison of lung histopathology of mice in each group (HE staining, ×200)

轮廓清晰、未见增厚，肺泡腔内未见明显炎性细胞浸润，支气管结构正常。模型组肺组织出现明显病理变化，肺泡间隔增厚，肺泡塌陷，支气管上皮细胞坏死，支气管腔内可见红细胞渗出，且有炎性细胞浸润。与模型组比较，扎那米韦组、滴鼻高浓度组小鼠肺组织肺泡壁轻度增厚，支气管腔内红细胞渗出少，伴少量炎性细胞浸润；滴鼻低浓度组及香囊高浓度组见部分肺泡间隔轻微增厚，支气管腔内红细胞渗出、肺间质见轻度炎性细胞浸润，较模型组明显减轻；香囊低浓度组肺泡间隔增厚，支气管腔内有大量红细胞渗出，炎性细胞浸润较多。

3 讨论

甲流在中医学中属于“疫病”范畴，《说文解

字》释为“疫，民皆疾也”，《瘟疫论》记载“疫为秽浊之邪，自口鼻入里，循经传腑”，提示正气虚弱、运气异常、外感邪毒等皆可致疫病发生^[12-13]。芳香类中药既可辟秽除邪、增强正气以抵御疫病之气，又因芳香入脾，可振奋中焦、培土生金以增强肺气^[14]。课题组前期系统梳理古今医籍，筛选并形成流感预防方药数据库，选用数据库中高频的丁香、苍术、鬼箭羽、石菖蒲、薰衣草等芳香类药物组成了香术防感方^[15-16]。香术防感方的君药为丁香、苍术，二者共奏健脾温中之功；肉桂、鬼箭羽为臣药，有芳香开窍、辟秽杀虫之效；佐以石菖蒲、薰衣草可增香调气、开窍化浊；川芎是引经药，起到芳香走窜、引经通窍的作用。前期临床研

究表明,此方可减少流感样症状发生率,对流感有积极预防作用^[6]。本实验阳性对照药为扎那米韦,是由美国食品药品监督管理局批准的吸入性粉末状神经氨酸酶抑制剂,IAV 复制在发病后 24~72 h 内到达峰值,此药物推荐用于暴露前预防和尽早在 IAV 复制早期阶段使用^[17]。本实验表明,与模型组比较,各给药组均可改善小鼠精神状态、活动量、毛发亮度、蜷缩程度及摄食量,尤其是扎那米韦组、滴鼻高浓度组效果最好;实验第 9 天时,滴鼻高浓度组小鼠体质量变化率与扎那米韦组差异无统计学意义,而其他各给药组小鼠体质量变化率均低于扎那米韦组,说明滴鼻高浓度组与扎那米韦组在改善甲流模型小鼠一般状态方面效果相当。

当 IAV 在肺组织中增殖时,肺部可出现水肿、炎性渗出及充血等病理表现,使肺重增加,肺指数增大,故肺指数可反映肺部感染的严重程度^[18]。本研究发现,扎那米韦组、香囊高浓度组和滴鼻高浓度组肺指数明显低于模型组,除香囊低浓度组外其余各药物干预组肺组织病变评分亦较模型组明显降低,扎那米韦组肺指数抑制率最高(80.84%),香囊高浓度组肺指数抑制率(41.61%)稍微高于滴鼻高浓度组(35.40%),香囊低浓度组(17.90%)和滴鼻低浓度组(25.40%)肺指数抑制率均较低,提示香术防感方可降低肺组织水肿,缓解 IAV 引起的肺部炎症,且成一定的剂量依赖关系,但效果不如扎那米韦组。肺组织病毒载量可体现 IAV 复制动力和数量,本研究显示香囊高浓度组和滴鼻高浓度组在降低病毒载量方面虽不如扎那米韦组,但优于香囊低浓度组,香囊高浓度组和滴鼻高浓度组在降低病毒载量方面效果相当。HE 结果表明,扎那米韦组、滴鼻高浓度组小鼠红细胞渗出少,伴少量炎性细胞浸润;滴鼻低浓度组及香囊高浓度组镜下支气管腔内红细胞渗出、轻度炎性细胞浸润;香囊低浓度组可能因药效挥发利用率低等原因,其支气管腔内有大量红细胞渗出,炎性细胞浸润较多。结果说明香术防感方滴鼻高浓度组和扎那米韦组在减轻病毒感染小鼠肺组织病理病变方面效果最优。

IAV 经飞沫传播,首先入侵口鼻等呼吸道黏膜,鼻腔黏膜表面上皮细胞紧密排列,保护机体免受外界多种病原微生物侵扰,构成了抵御外界病原体的第一道屏障^[5]。因此,鼻腔黏膜不仅是 IAV 等病毒的感染部位,也是防御宿主感染、抗 IAV、调控免疫炎症反应的关键部位^[19]。sIgA 是呼吸道黏膜免疫防御的主要保护因子,介导局部黏膜免疫应答并

保护上呼吸道防止感染,且 sIgA 具有交叉保护作用,可对不同亚型 IAV 产生中和作用^[20]。鼻咽部 sIgA 保护性抗体效力是血清抗体 IgG 的 7.5 倍,故鼻咽部 sIgA 水平是评价抗病毒药物药效学的重要指标^[21]。本实验表明,与模型组相比,扎那米韦组、香囊高浓度组、滴鼻高浓度组、滴鼻低浓度组小鼠上呼吸道灌洗液 sIgA 水平显著升高,就 sIgA 表达而言,香囊高浓度和滴鼻高浓度两者效果相似。

H1N1 感染患者的血清中促炎细胞因子高水平表达^[22]。炎症反应是宿主免疫过程的重要部分,IAV 感染引起组织损伤,可促使机体产生多种炎性细胞因子和趋化因子,招募免疫细胞至感染部位以清除病原体,而过度免疫反应可引起细胞因子风暴而加剧组织损伤^[23]。研究表明,包括 TNF- α 、IL-6、IL-2 和 IFN- γ 在内的促炎细胞因子在流感病毒性肺炎发病中具有关键作用^[24]。IAV 感染后活化 T 细胞,经 T 细胞受体产生细胞因子,并分化为辅助性 T 细胞(Th),其中 IFN- γ 和 TNF- α 在 Th2 免疫中占主导地位,而 IL-4、IL-2 与 Th1 免疫密切相关^[25]。此外,IFN- γ 是导致 IAV 感染引起急性肺损伤的主要干扰素因子^[26]。本研究结果表明,与模型组相比,扎那米韦组、香囊低浓度组、滴鼻低浓度和滴鼻高浓度组小鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-6 均明显降低,而香囊高浓度组各指标差异无统计学意义;香囊高浓度组血清 TNF- α 和 IFN- γ 含量显著低于滴鼻高浓度组,提示滴鼻给药比吸嗅给药更好地控制了促炎因子表达,抑制细胞因子风暴可能是香术防感方预防甲流感染的潜在机制。

综上所述,香术防感方滴鼻和吸嗅两种给药方式均可不同程度地增加甲流 H1N1 流感小鼠体质量,降低肺指数、肺组织病理性评分和肺病毒载量,增加小鼠肺指数抑制率和上呼吸道灌洗液 sIgA 水平,减少细胞炎症因子表达。其中,滴鼻给药在增加小鼠体质量、抑制炎症因子表达方面优于香囊吸嗅给药,且以高浓度滴鼻给药最优;香囊高浓度组的肺指数抑制率稍优于滴鼻高浓度组,但两者差异无统计学意义。本研究初步表明香术防感方吸嗅和滴鼻给药均可保护甲流 H1N1 感染小鼠肺组织,具有抗病毒、抗炎和提高呼吸道黏膜免疫作用,且具有一定量效关系。此外,尽管临床上香囊吸嗅有简便有效、民众接受度高等优势,但还需解决定量缓释给药及挥发稳定性的问题。后续研究可在本实验的药效学基础上,就流感预防作用的鼻腔黏膜免疫与整体免疫机制深入研究。

参考文献

- [1]UYEKI TM, HUI DS, ZAMBON M, et al. Influenza[J]. Lancet, 2022, 400(10353): 693-706.
- [2]YAMAYOSHI S, KAWAOKA Y. Current and future influenza vaccines[J]. Nat Med, 2019, 25(2): 212-220.
- [3]HAN J, PEREZ J, SCHAFER A, et al. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance [J]. Curr Med Chem, 2018, 25 (38): 5115-5127.
- [4]赵静,张伟娜,李皓月,等. 一种预防流感的中药香囊: CN112807364B[P]. 2022-03-01.
- [5]董毅智,张悦,李皓月,等. 从鼻腔黏膜免疫探讨中药外用流感预防中的应用与前景[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(11): 1009-1014.
- [6]李立,张弛,崔鑫,等. 中药防感香囊对成人流行性感胃预防效果的随机对照预试验[J]. 中医杂志, 2019, 60 (20): 1747-1750.
- [7]LAVELLE EC, WARD RW. Mucosal vaccines-fortifying the frontiers [J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22 (4): 236-250.
- [8]王鑫国. 中药药理学实验教程[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 8.
- [9]杨玉琴,徐春华,周文江,等. 两种呼吸道感染方式建立小鼠流感病毒感染模型比较[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 773-778.
- [10]姚荣妹,毛鑫,曲天歌,等. 喘可治注射液对甲型H1N1流感病毒FM1株致小鼠肺炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 43-49.
- [11]YE Y, WANG H, LIU J, et al. Polygalasaponin F treats mice with pneumonia induced by influenza virus [J]. Inflammopharmacology, 2020, 28(1): 299-310.
- [12]孙巧思,胡镜清,刘理想. 论中医学疫病防治特色[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(1): 42-45, 49.
- [13]上海市中医药学会肺系病分会. 季节性流行性感胃中医预防方案上海专家共识(2022年)[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(10): 13-15, 19.
- [14]姚伟,赵向东,冯全生. 古代芳香药物在疫病预防中的运用[J]. 国医论坛, 2011, 26(5): 47-49.
- [15]WU XQ, ZHANG WN, HAO MZ, et al. How Chinese herbal medicine prevents epidemics: from ancient pestilences to COVID-19 pandemic [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(5): 1017-1044.
- [16]张伟娜,李兵,赵静. 古代瘟疫预防方法探析[J]. 陕西中医, 2018, 39(6): 787-789.
- [17]LI Y, HUO S, YIN Z, et al. The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs [J]. mBio, 2023, 14(5): e0127323. doi:10.1128/mbio.01273-23.
- [18]YANG Y, SHAO J, ZHOU Q, et al. Exploration of the mechanisms of Callicarpa nudiflora Hook. et Arn against influenza A virus (H1N1) infection [J]. Phytomedicine, 2024, 123: 155240. doi: 10.1016/j. phymed. 2023. 155240. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112315.
- [19]IWASAKI A. Exploiting mucosal immunity for antiviral vaccines [J]. Annu Rev Immunol, 2016, 34: 575-608.
- [20]WU CT, LIDSKY PV, XIAO Y, et al. SARS-CoV-2 replication in airway epithelia requires motile cilia and microvillar reprogramming [J]. Cell, 2023, 186 (1): 112-130.
- [21]WANG Z, LORENZI JCC, MUECKSCH F, et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA [J]. Sci Transl Med, 2021, 13(577): eabf1555.
- [22]LOBA SM, WATANABE ASA, SALOMAO MLM, et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness [J]. J Clin Virol, 2019, 116: 62-68. doi:10.1016/j. jcv. 2019. 05. 003.
- [23]ZHANG Y, WANG R, SHI W, et al. Antiviral effect of fufang yinhua jiedu (FFYH) granules against influenza A virus through regulating the inflammatory responses by TLR7/MyD88 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114063. doi:10.1016/j. jep. 2021. 114063.
- [24]ZHAO D, CHEN X, WANG L, et al. Bidirectional and persistent immunomodulation of Astragalus polysaccharide as an adjuvant of influenza and recombinant SARS-CoV-2 vaccine [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 234: 123635. doi:10.1016/j. ijbiomac. 2023. 123635.
- [25]LIU ZG, HE J, ZHU TY, et al. Lentinan-functionalized graphene oxide is an effective antigen delivery system that modulates innate immunity and improves adaptive immunity [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12 (35): 39014-39023.
- [26]HE J, LIU ZG, JIANG WM, et al. Immune-adjuvant activity of lentinan-modified calcium carbonate microparticles on a H5N1 vaccine [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 163: 1384-1392. doi:10.1016/j. ijbiomac. 2020. 08. 005.

Comparative Study on the Pharmacodynamics of *Xiangzhu Fanggan Formula* (香术防感方) by Sniffing and Nasal Drops for Prevention of Influenza A H1N1 Virus Infection in Mice

ZHANG Yue¹, DONG Yizhi¹, LI Haoyue², WU Xinxin¹, LI Xiaolei¹, ZHAO Jing¹

1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. International Cooperation Department, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT **Objective** To compare the effectiveness and mechanism of *Xiangzhu Fanggan Formula* (香术防感方) by sniffing and nasal drops for preventing influenza A H1N1 flu. **Methods** Fifty-six BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, zanamivir group, high-concentration sachet group, low-concentration sachet group, high-concentration nasal drops group, and low-concentration nasal drops group, with 8 mice in each group. In the low- and high-concentration sachet groups, 15 g and 30 g of *Xiangzhu Fanggan Formula* sachet were used for sniffing for 24 h per day; while in the low- and high-concentration nasal drops groups, nasal drops of *Xiangzhu Fanggan Formula* were given at a concentration of 0.11 and 0.22 g/ml, 20 μ l each time, twice a day; in the zanamivir group, zanamivir was given at a concentration of 1.025 mg/ml of 20 μ l each time, twice a day; in the normal group and the model group, nasal drops of normal saline were given at 20 μ l each time, twice a day. Each group was given prophylactic intervention for 5 days. On day 5, 1 h after the administration of the drug, the mice in all groups except the normal group received 35 μ l of 50 LD₅₀ A/PR/8/34/H1N1 viral solution as nasal drops to prepare influenza A H1N1 model mice. The body mass of the mice was recorded and the rate of change of body mass was calculated daily from day 5 to day 9 of the experiment, and the general status was observed. The mice were sampled on day 9, and the lung index and the inhibition rate of lung index were calculated; HE staining was used to detect pathological changes in lung tissues and to score lung tissue lesions; RT-qPCR was used to detect viral load in lung tissues; and ELISA was used to detect secretory immunoglobulin A (sIgA) and serum tumour necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 2 (IL-2), interleukin 6 (IL-6), and interferon γ (IFN- γ) in the lavage fluid of the upper respiratory tract. **Results** On days 7, 8 and 9 of the experiment, the rate of change in body mass of mice in the model group significantly lower than that in the normal group at the same time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). On days 8 and 9 of the experiment, the rate of change in body mass of mice in the zanamivir group and the high-concentration nasal drops group increased when compared with the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the normal group, mice in the model group had significantly higher lung index, lung tissue lesion score, lung tissue viral load, significantly higher serum TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ levels, and significantly lower sIgA levels in the upper respiratory lavage fluid ($P < 0.01$). Compared with the model group, the lung index and lung tissue viral load reduced, serum IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 levels reduced, and sIgA levels increased in the zanamivir group and the high-concentration nasal drops group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); except for low-concentration sachet group, lung tissue lesion scores of the drug intervention groups reduced compared with those of the model group ($P < 0.01$). Compared with the zanamivir group, the lung index increased in the low-concentration sachet group and the low- and high-concentration nasal drops groups, and the serum TNF- α and IL-2 levels increased in all *Xiangzhu Fanggan Formula* intervention groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with high-concentration nasal drops group, serum TNF- α and IFN- γ levels elevated in the high-concentration increased group, and lung tissue viral load elevated in the low-concentration nasal drops group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The lung index inhibition rate was 80.84% in the zanamivir group, 41.61% and 17.90% in the high- and low-concentration sachet groups, and 35.40% and 25.40% in the high- and low-concentration nasal drops groups, respectively. HE staining showed that the lung tissues of the model group showed thickening of alveolar septa, alveolar collapse, and infiltration of inflammatory cells; whereas, in each drug intervention group, the inflammation of the lung tissues of the mice and the damage reduced, and the most obvious improvement was in the zanamivir group and the high-concentration nasal drops group. **Conclusion** *Xiangzhu Fanggan Formula* by sniffing and nasal drops could both prevent influenza A H1N1 virus infection, with antiviral and anti-inflammatory effects, also could improve the pathological damage of lung tissue, and improve the immunity of respiratory mucosa. The nasal drops may be better than sachets in inhibiting inflammatory response, especially the high-concentration nasal drops showed more effective. **Keywords** influenza A; H1N1 virus; *Xiangzhu Fanggan Formula* (香术防感方); sniffing; nasal drops; antiviral; inflammatory factor

(收稿日期: 2023-12-13; 修回日期: 2024-02-29)

[编辑: 邓媛]