

一清胶囊抗甲型 H1N1 流感病毒作用

徐雄良, 岳韵, 刘小均, 杨刚, 刘浪, 柯潇, 郑强* (成都康弘药业集团股份有限公司国家企业技术中心, 成都 610036)

摘要: 目的 研究一清胶囊抗甲型 H1N1 流感病毒作用。方法 采用小鼠气管内注入甲型流感病毒鼠肺适应株 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒液建立病毒感染小鼠模型, 以肺指数、肺指数抑制率、小鼠累积死亡率为指标, 评价一清胶囊体内抗甲型 H1N1 流感病毒作用。结果 $7.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 一清胶囊(原生药)可降低病毒感染小鼠的肺脏指数($P<0.05$)和小鼠感染病毒后 7~9 d 内的死亡率($P<0.01$)。结论 一清胶囊具有明显的抗甲型 H1N1 流感病毒作用。

关键词: 一清胶囊; 抗病毒; 甲型 H1N1 流感病毒

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)09-1056-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.006

Anti-virus Effect of Yiqing Capsule on Influenza A Subtype H1N1

XU Xiongliang, YUE Yun, LIU Xiaojun, YANG Gang, LIU Lang, KE Xiao, ZHENG Qiang* (National-recognized Enterprise Technology Center, Chengdu Kanghong Pharmaceuticals Group Co., Ltd., Chengdu 610036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the antiviral effect of Yiqing capsule. **METHODS** Antivirus test *in vivo* of Yiqing capsule was carried out by intratracheal injection of influenza A strains A/PR/8/34 (H1N1) strain in mice. The lung index, inhibition rate of lung index and death rate of mice were measured to observe the effect of anti-influenza A virus subtype H1N1 *in vivo*. **RESULTS** The $7.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Yiqing capsule(crude) could significantly decrease the lung index of viral infected mice ($P<0.05$) and the mortality of 7~9 d in viral infected mice($P<0.01$). **CONCLUSION** Yiqing capsule has good effect of anti-influenza A virus subtype H1N1 *in vivo*.

KEY WORDS: Yiqing capsule; anti-virus; influenza A virus subtype H1N1

一清胶囊由大黄、黄连、黄芩 3 味药组成^[1], 收载于中国药典 2010 年版一部, 具有清热泻火解毒、化瘀凉血止血的功效, 临床上广泛用于热毒证治疗, 如火毒血热所致的身热烦躁、目赤口疮、咽喉牙龈肿痛、大便秘结、咽炎、扁桃体、牙龈炎见上述证候者。

研究表明, 大黄中的大黄蒽醌类化合物体外具有一定的抗流感病毒作用, 黄芩中黄芩苷对甲型流感病毒感染诱导的细胞损伤有较好的保护作用^[2], 体内也有抗甲型流感病毒的作用, 黄连中小檗碱对多种流感病毒具有一定抑制作用^[3]。为进一步研究一清胶囊的抗流感病毒作用, 本研究选择甲型流感病毒鼠肺适应株 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒液建立病毒感染小鼠模型, 以肺指数、肺指数抑制率、小鼠累积死亡率为指标, 初步研究其体内抗甲型 H1N1 流感病毒作用, 为临床应用提供科学依据。

1 材料与试剂

1.1 受试药

一清胶囊(成都康弘制药有限公司, 批号:

120514, 规格: 每粒 0.5 g, 每克胶囊内容物相当于原生药 7.32 g, 临用前用 1%阿拉伯树胶配成所需浓度的混悬液); 利巴韦林片(四川美大康药业股份有限公司, 批号: 110305, 规格: 每片 0.1 g, 临用前用纯净水配成所需浓度的药液)。

1.2 试剂

脱脂绵羊血 MH 琼脂培养平板(郑州安图绿科生物工程有限公司, 批号: 20120917); 胃黏液素(mucin, Sigma-Aldrich 公司, 批号: 1001234897); MH 琼脂培养基(MH-A, 批号: CM0337A)及 MH 营养肉汤培养基(MH-B, 批号: CM0405B)均购于 OXOID 公司。

1.3 动物

昆明种小鼠, SPF 级, 体质量为(20±2) g, ♀♂, 购自四川省中医药科学院实验动物中心, 生产合格证号为 SCXK(川)2008-19, 饲养于 SPF 级环境, 使用许可证号为 SYXK(川)2008-100 号。

1.4 病毒株

甲型流感病毒鼠肺适应株 A/PR/8/34 (H1N1),

作者简介: 徐雄良, 男, 博士, 副研究员 Tel: (028)87500024
(028)87519361 E-mail: zhengqiang@cnkh.com

E-mail: xuxl@cnkh.com *通信作者: 郑强, 男, 博士 Tel:

由四川大学华西医学中心提供。于鸡胚传代 2 次后收取尿囊液，血凝试验测定其滴度为 1:512，分装并于-80 °C 保存备用。

2 方法

2.1 分组与给药

取体质量为(20±2)g 的健康小鼠，♀♂兼用，适应性饲养 3 d 后，腹腔注射戊巴比妥钠 67.5 mg·kg⁻¹ 麻醉小鼠，麻醉后固定于手术台上，使小鼠头部向上并与水平呈 45° 角，然后在其颈部正中做切口，分离气管，向肺部方向气管内注入甲型流感病毒鼠肺适应株 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒液(每只 0.05 mL，浓度为 30 LD₅₀)，注射完毕缝合手术切口并消毒。待小鼠全部苏醒后，按体质量分层随机分为模型组、一清胶囊低、中、高剂量组(剂量分别为 1.8, 3.7, 7.3 g·kg⁻¹)、利巴韦林组(0.15 g·kg⁻¹)、对照组。分组后立即开始灌胃给药，每天 1 次，连续给药 5 d，对照组和模型组给予等量纯净水。

2.2 对病毒感染小鼠肺指数、肺指数抑制率的影响

按“2.1”项下方法进行分组和给药，末次给药前禁食不禁水 8 h，并在末次给药后 2 h，颈椎脱臼处死后称体质量，剖取全肺，在盛有蒸馏水的平皿中洗 2 次，摘除气管、肺门淋巴结等组织，吸水纸拭干后称肺脏质量(g)，计算肺指数(%)及肺指数抑制率(%)^[4]。

2.3 对病毒感染小鼠死亡率的影响

按“2.1”项下方法进行分组，分组后立即开始灌胃给药，每天 1 次，连续给药 14 d，对照组和模型组给予等量的纯净水。观察动物感染后发病症状，每 3 d 称重 1 次，并逐日记录感染后 14 d 内各组小鼠死亡数，采用 χ^2 检验统计每 3 d 内各组小鼠的累积死亡率(%)。

2.4 统计学处理方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析，各组所得数据与模型组比较，符合正态分布，采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对病毒感染小鼠肺指数、肺指数抑制率的影响^[4-5]

与对照组比较，模型组小鼠在气管注射病毒后肺指数显著增高($P<0.01$)；与模型组比较，7.3 g·kg⁻¹ 一清胶囊和 0.15 g·kg⁻¹ 利巴韦林均可显著降低病毒感染小鼠的肺脏指数($P<0.05$)。一清胶

囊的其他剂量组也有降低病毒感染小鼠肺脏指数的趋势，并显示出一定的剂量依赖关系，但作用较弱，差异无统计学意义，结果见表 1。

表 1 一清胶囊对流感病毒感染小鼠肺指数、肺指数抑制率的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of Yiqing capsule on lung index and inhibition rate of lung index in mice infected with influenza A virus subtype H1N1($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	动物/ 只	肺指数/ %	肺指数抑制率/ %
对照组	-	20	0.70±0.08 ²⁾	-
模型组	-	18	1.70±0.63	-
一清胶囊低剂量组	1.8	16	1.47±0.48	13.71
一清胶囊中剂量组	3.7	18	1.42±0.50	16.76
一清胶囊高剂量组	7.3	19	1.19±0.07 ¹⁾	33.18
利巴韦林组	0.15	19	1.05±0.26 ¹⁾	38.34

注：与模型组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.2 对病毒感染小鼠死亡率的影响

模型组小鼠在感染病毒后逐渐出现死亡，在感染后 14 d 内约有 90% 的动物发生死亡；利巴韦林能明显降低病毒感染小鼠的死亡率，与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$)；7.3 g·kg⁻¹ 一清胶囊可显著降低小鼠感染病毒后 7~9 d 内的死亡率，与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。一清胶囊的其他剂量组也有降低病毒感染小鼠死亡率的趋势，但作用较弱，与模型组比较差异无统计学意义，结果见表 2。

4 讨论

甲型流感病毒为常见流感病毒，其中约有 80% 为甲型 H1N1 病毒，且很易发生变异，病毒基因变异后可感染人类，严重的可导致肺炎，甚至心、肾等多种脏器衰竭而死亡，病死率很高。

通过对一清胶囊抗甲型 H1N1 流感病毒作用的体内研究，结果表明一清胶囊可明显降低病毒感染小鼠的肺脏指数，显著降低小鼠感染病毒后 7~9 d 内的死亡率。邓翀等^[6-7] 研究表明，一清胶囊药效物质基础主要来源于方中大黄、黄芩、黄连的主要有效成分，如大黄中的蒽醌衍生物(大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素等)，黄芩中的黄芩苷、黄芩素等，以及黄连中的小檗碱等。大量的研究表明，大黄蒽醌类化合物具有体外抗流感病毒的作用。黄芩水煎剂能够抑制甲型流感病毒核蛋白基因和核蛋白的表达，黄芩苷能够下调甲型流感病毒核蛋白基因起

表 2 一清胶囊对病毒感染小鼠死亡率的影响

Tab. 2 Effects of Yiqing capsule on death rate in mice infected with influenza A virus subtype H1N1

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	动物/ 只	死亡数/只				累计死亡率/%			
			4~6 d	7~9 d	10~12 d	13~14 d	4~6 d	7~9 d	10~12 d	13~14 d
对照组	-	18	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	-	18	1	12	3	0	5.56	72.22	88.89	88.89
一清胶囊低剂量组	1.8	16	0	11	4	0	0.00	68.75	93.75	93.75
一清胶囊中剂量组	3.7	17	0	12	3	0	0.00	88.23	88.23	88.23
一清胶囊高剂量组	7.3	18	0	4	6	1	0.00	22.22 ¹⁾	55.66	61.11
利巴韦林	0.15	18	0	1	3	2	0.00	5.56 ¹⁾	22.22 ¹⁾	33.33 ¹⁾

注：与模型组比较，¹⁾P<0.01。

Note: Compared with the model group, ¹⁾P<0.01.

始量^[8]，对甲型流感病毒感染致肺实变以及纤维蛋白的沉积有明显的抑制作用，显著下调肺组织转化生长因子-β1、基质金属蛋白酶-9 mRNA 及蛋白表达^[9-10]。黄芩苷对 3 种亚型流感病毒(H1N1、H5N1、H9N2)神经氨酸酶的半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.29~0.49 mmol·L⁻¹，对流感病毒神经氨酸酶活性具有抑制作用^[11]。黄芩及其成分通过阻止病毒吸附、抑制病毒基因复制和蛋白合成、抑制神经氨酸酶活性等起到直接的抗病毒作用^[12]。另外，黄芩苷还可拮抗甲型流感病毒 H1N1 细胞病变，调控细胞周期分布，并通过抑制半胱天冬氨酸酶 8 的激活，进一步抑制半胱天冬氨酸酶 3 活性，从而发挥抗流感病毒感染的作用^[2]。黄芩素体外可通过干扰流感病毒 A/FM1/1/47(H1N1)中后期 mRNA 的合成而抑制病毒的复制^[13]。黄连中的小檗碱可通过抑制 Toll 样受体 7 介导的髓样分化因子 88 依赖性信号通路，抑制核转录因子-κBP65 的核转位及表达，减少流感病毒感染巨噬细胞后肿瘤坏死因子-α、单核趋化蛋白-1 的产生，从而在流感治疗中发挥重要作用^[14]。因此，一清胶囊方中的 3 味药材均对甲型流感病毒都有很好的抗病毒作用，其抗流感病毒的作用机制有待进一步探讨。

本实验研究结果进一步验证一清胶囊具有明显的抗甲型 H1N1 流感病毒作用，为其在临床上的应用提供了科学依据。

REFERENCES

[1] DING H, YAN B H, TIAN L, et al. A multi-center randomized double-blind controlled trial on the function of Yiqing capsule treat noxious heat (*Acute pharyngitis, Acute tonsillitis, Marginal gingivitis, Recurrent aphtha*) [J]. Liaoning J Trad Chin(辽宁中医杂志), 2011, 38(8): 1486-1490.

[2] ZHANG C J, GU L G, YU H T. Antagonism of baicalin on cell cyclical distribution and cell apoptosis in A549 cells infected with influenza A (H1N1) virus [J]. Chin J Virol(病毒

学报), 2011, 27(2): 108-116.

[3] CECIL C E, DAVIS J M, CECH N B, et al. Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*) [J]. Intern immun, 2011, 11(11): 1706-1714.

[4] 孙经梦, 刘骏, 李炯, 等. 桑叶提取物对小鼠感染甲型流感病毒 FM1 的预防与治疗作用研究[J]. 中药材, 2013, 36(11): 1837-1842.

[5] LIU Y, SHI Y J, SHI H, et al. Effects of Yinqiaojiedu soft capsule on influenza virus load and M1 expression in mice [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2011, 46(6): 650-655.

[6] DENG C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic research of anti-endotoxin activity of Sanhuang formula [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2008.

[7] LAI X R, ZHANG Y, ZHENG H J, et al. Study on effective substances of Sanhuang preparation and its single herbs by serum pharmacokinetics [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med(世界科学技术-中医药现代化), 2010, 12(4): 666-670.

[8] HUANG Q. Expression of influenza A virus nucleoprotein (NP) interfere with *Scutellaria baicalensis* Georgei and its extracts *in vitro*. [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012.

[9] WANG F K, WAN Q F, GU L G, et al. Effect of baicalin on pathological improvement of the lung with H1N1 infection and its mechanism [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2015, 26 (1): 251-254.

[10] WAN Q F, GU L G, LI G M, et al. Mechanism of baicalin on the early development of pulmonary fibrosis induced with FM1 [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2013, 29(9): 1303-1307.

[11] HE Z H, FU Y J, WEI L P, et al. Effects of the combination of baicalin and ribavirin on influenza A virus infection *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2011, 27(11): 1560-1564.

[12] WANG Y N, JIN Y Z, DONG Y Y, et al. Research development of *Scutellaria baicalensis* and its extracts against influenza virus infection [J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2014, 14 (27): 5365-5369.

[13] SU Z Z, DOU J, XU Z P, et al. A novel inhibitory mechanism of baicalin on influenza A/FM1/1/47 (H1N1) virus: interference with midlate mRNA synthesis in cell culture [J]. Chin J Natural Med, 2012, 10(6): 415-420.

[14] WU Y, KIM Y J, ZHANG S, et al. The effect and molecular mechanism of berberine on inflammatory cytokines in NR8383 cells infected by influenza virus [J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 2012, 28(2): 125-131.

收稿日期: 2015-02-01