

- 药杂志,2006,28(4):203.
- [2] 蒋培余. 中药抑制剂逆转细菌耐药性的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(10):53-55.
- [3] 王洪武,倪青,林兰. 中药含药血清的研究进展及其在中医学中的应用[J]. 北京中医药,2008,27(9):698-699.
- [4] 杨钧,张淑文,阴赅宏,等. 中药复方清热颗粒剂抗急性耐药菌感染的药效作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(10):61.
- [5] 肖洋,黄红兰,华芳. 五倍子对铜绿假单胞菌 R 质粒消除作用的研究[J]. 微生物学杂志,2003,23(2):55-56.
- [6] 杨秀捷,张晨,齐文升,等. 重症监护病房铜绿假单胞菌耐药性分析及其中医证候特点[J]. 中华中医药杂志,2007,22(11):808-811.
- [7] 王禹,于清宏,吴齐雁,等. 中药含药血清对 MRSA β -内酰胺类抗生素耐药性的逆转作用[J]. 医学信息,2011,24(7):3519-3520.
- (收稿日期:2011-11-21)
(本文编辑:刘群)

岗梅根水提物在小鼠体内抗 H9N2 亚型禽流感病毒实验研究

李耿 汪天呈 姚海燕 陈建新 吴依娜 林吉 赖小平

【摘要】 目的 观察岗梅根水提物对滴鼻感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠的保护作用。**方法** 以磷酸奥司他韦为阳性药,通过 H9N2 亚型禽流感病毒滴鼻感染小鼠,分别建立小鼠病毒性肺炎动物模型和病毒感染致小鼠死亡的动物模型,观察小鼠肺部病变和死亡情况,以肺指数及小鼠死亡率作为观测指标,评价岗梅根水提物对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠的保护效果。**结果** 岗梅根水提物中、低剂量组可显著降低禽流感病毒感染小鼠的肺指数($P<0.01$);降低禽流感病毒感染小鼠死亡率,延长其存活时间($P<0.01$)。**结论** 岗梅根水提物对滴鼻感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠具有良好的保护作用。

【关键词】 岗梅根水提物; 小鼠; H9N2 亚型禽流感病毒; 体内; 肺指数; 死亡保护率
【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.02.002

Experimental study of anti-influenza virus H9N2 effects of the water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* in vivo LI Geng, WANG Tian-cheng, YAO Hai-yan, et al. Herbal Medicine Research College in Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China
Corresponding author: LAI Xiao-ping, E-mail: lxp88@gzhtcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effects of the water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* on aiv influenza virus H9N2 in vivo. **Methods** The model mice were infected by nasal dripping of H9N2 subtype avian influenza virus. Oseltamivir was selected as the positive control. The inhibitory effects of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* on influenza viral pneumonia were observed. The lung index and mortality rate were selected as indicators of protective effect. **Results** Compared with the viral control group, low-dose and middle-dose water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* can obviously ease lung inflammation of mice infected by aiv influenza virus H9N2, reduce the lung index, decrease the mortality rate of the mice infected by H9N2 subtype avian influenza virus, and extend the survival time. **Conclusion** *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* has strong inhibitory effects on aiv influenza virus H9N2.

【Key words】 The water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae*; Mice; H9N2 subtype avian influenza virus; In vivo; Lung index; Death-protection rate

基金项目:国家自然科学基金(U0732004)

作者单位:510405 广州中医药大学中药学院

作者简介:李耿(1983-),博士,讲师。研究方向:教学及抗病毒研究。E-mail:lg@gzhtcm.edu.cn

通讯作者:赖小平(1960-),研究员,博士生导师。研究方向:中药新药研究与开发。E-mail:lxp88@gzhtcm.edu.cn

文献标引格式:

李耿,汪天呈,姚海燕,等. 岗梅根水提物在小鼠体内抗H9N2亚型禽流感病毒实验研究[J]. 环球中医药,2012,5(2):84-87.

禽流感(avian influenza, AI)是一种禽类急性高度致死性传染病,其病原微生物为 A 型流感病毒^[1],在许多欧亚国家家禽中流行^[2]。1997 年,香港有 6 人因感染 H5N1 亚型禽流感病毒导致死亡^[3],是人类首次发现禽流感病毒突破种属间障碍直接感染人类。之后,人们又陆续在猪和人的病例中分离得到 H9N2 亚型禽流感病毒^[4-6]。为了阻止灾难再度来袭,各国学者都致力于研究抗击禽流感的有效手段,因而诞生了不少抗流感新药。磷酸奥司他韦(达菲)是全球公认的抗禽流感药物,但随着 2007 年 WHO 在埃及两名禽流感致死的患者体内发现对达菲出现抗药性的新毒株,达菲抗禽流感的神话亦被打破,于是,学者们又把抗禽流感的研究思路延伸到了中药^[7]。

中医防治流感已经有 2000 多年的历史,中药及其组方对流感的疗效也是有目共睹,且中药独特的多靶点优势可以有效抑制流感病毒表面抗原的漂移^[8],从中药中筛选有效抗流感的药物也是国内外学者研究的热点之一。中药岗梅 *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* 是冬青科植物梅叶冬青 *Ilex asprella* (Hook. et Arn.) champ. ex Benth. 的根,味苦性寒,具有清热解毒、生津止渴、利咽消肿、散瘀止痛等功效,临床常用于感冒、高热烦渴、扁桃体炎、咽喉炎等呼吸道感染疾病的治疗^[9,10],且疗效确切。因此,本实验建立了禽源 H9N2 亚型流感病毒小鼠感染模型,以肺指数、死亡保护率为主要指标,评价岗梅根水提物对感染小鼠的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

岗梅根水提物,由广州中医药大学新药开发研究中心提取制备,方法如下:取适量岗梅,每次用 8 倍量水煎煮 1 小时,共 2 次,合并 2 次水煎煮液,浓缩待用。

阳性药奥司他韦(Tamiflu,达菲,罗氏有限公司生产,批号:B1212);乙醚(天津化学试剂有限公司);生理盐水(开缘生物制药有限公司)。

1.2 实验动物

SPF 级 NIH 小鼠,雌雄各半,体重 13~15 g,由广东省医学实验动物中心提供。实验动物质量合格证号:粤监证字 SCXK(粤) 2008-0002。饲养环境:室温(23±2)℃,相对湿度为 75%±10%。

1.3 毒种

H9N2 禽流感病毒,由华南农业大学兽医科技中心提供;由广州中医药大学新药开发中心 P II 实验室经昆明小鼠传代 5 次获得,经 SPF 鸡胚传代扩增,测定其半数致死量,分装冻存于-80℃,试验前,取毒种用流水冲浸融化。

1.4 H9N2 亚型禽流感病毒对小鼠的半数致死量测定^[10]

取小鼠 50 只,雌雄各半,按体重随机分为 5 组,每组 10 只。用灭菌肉汤将 H9N2 亚型禽流感病毒稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵浓度的病毒液。将小鼠用乙醚轻度麻醉,滴鼻感染各个稀释浓度的病毒,每鼠 4 滴,合约 0.05 ml,记录小鼠死亡情况。数据处理后用 Reed-Muench 两氏法^[11]计算得到病毒对小鼠的半数致死量(LD₅₀),求得 LD₅₀=10^{-2.90}。

1.5 岗梅根水提物对小鼠 H9N2 亚型禽流感病毒性肺炎的治疗试验^[10-13]

将小鼠随机分成六组:空白对照组,奥司他韦组,病毒对照组,岗梅根水提物高、中、低剂量组,每组 12 只。将小鼠用乙醚轻度麻醉,用 H9N2 亚型禽流感病毒鼠肺适应株 15 个 LD₅₀病毒浓度,滴鼻感染,每鼠 4 滴,约 0.05 ml。在攻毒后 2 小时开始给药。共给药 4 天,每天 1 次,0.2 ml/10 g 体重灌胃给药,病毒对照组及空白组以等体积生理盐水灌胃。感染后 4 天,称小鼠体重,杀剖小鼠(杀剖前禁食禁水 12 小时),观察肺组织的病变程度,并取肺称重。按以下公式计算肺指数与肺指数抑制率:

$$\text{肺指数} = \frac{\text{肺重}}{\text{小鼠体重}} \times 100\%$$

$$\text{肺指数抑制率} = \frac{(\text{病毒对照组平均肺指数} - \text{药物组平均肺指数})}{\text{病毒对照组肺指数}} \times 100\%$$

1.6 岗梅根水提物对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠的死亡保护实验^[14,15]

如 1.5 项下所示将小鼠随机分为六组,每组 12 只。乙醚麻醉后,以 2 个 LD₅₀浓度的 H9N2 亚型禽流感病毒滴鼻感染,每鼠 4 滴。病毒攻击 6 小时后连续给药 10 天,0.2 ml/10 g 体重每天灌胃给药一次,病毒对照组及空白组以等体积蒸馏水灌胃。逐日观察动物发病情况并记录死亡数,共观察 15 天,按公式计算死亡保护率和生命延长率。

$$\text{死亡保护率} = \frac{(\text{药物组平均存活天数} - \text{病毒对照组平均存活天数})}{\text{病毒对照组平均存活天数}} \times 100\%$$

1.7 统计学分析

以上实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,组间

差异显著性采用单因素方差分析中的最小显著差别 (Least Significant Difference, LSD) 方法进行多重比较检验。

2 结果

2.1 岗梅根水提物对小鼠 H9N2 亚型禽流感病毒性肺炎的治疗结果

解剖小鼠肺组织时发现,空白对照组小鼠肺组织红白色,无肿大,无瘀斑;病毒对照组小鼠肺组织颜色黯红,肿大,有瘀斑;与病毒对照组比较,岗梅根水提物各个剂量组小鼠肺组织颜色变浅,肿大减小,瘀斑减少,说明炎症均有一定程度减轻。

各组小鼠肺指数和肺指数抑制率结果见表 1。统计结果显示,与空白对照组比较,病毒对照组的肺指数显著升高 ($P<0.01$),提示成功复制小鼠病毒性肺炎模型;与病毒对照组比较,奥司他韦组肺指数显著降低,提示造模成功。与病毒对照组比较,岗梅根水提物中剂量和低剂量可显著抑制 H9N2 禽流感病毒所致小鼠肺部炎症 ($P<0.01$),高剂量有降低肺指数的趋势 ($P>0.05$)。

2.2 岗梅根水提物对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠的死亡保护作用

攻毒后每天观察各组小鼠活动状态,发现空白对照组小鼠体重增加,行为敏捷,毛发有光泽,呼吸正常;病毒对照组,在感染后第 3 天开始,小鼠食欲明显下降,随后逐渐出现耸毛、甩头,呼吸短促现象,并伴随腹式呼吸,行动迟缓无力,弓背,消瘦,体重减轻,第 5 天开始出现死亡,部分小鼠死前出现明显的神经症状,如打转等。与病毒对照组比较,各给药组动物多数症状减轻。

各组死亡率、平均存活时间和生命延长率结果见表 2。统计结果显示,病毒对照组的小鼠在攻毒 5

天后全部死亡,与空白对照组比较,病毒对照组小鼠死亡数明显增加,平均生存时间显著减少 ($P<0.01$),提示成功复制小鼠死亡保护模型;与病毒对照组比较,岗梅根水提物中、低剂量组小鼠存活时间显著延长 ($P<0.01$),存活率也显著提高 ($P<0.01$),高剂量组与病毒对照组比较虽无显著差异 ($P>0.05$),数据显示其有提高感染小鼠存活率和延长感染小鼠存活时间的趋势。

3 讨论

3.1 岗梅抗病毒前景分析

岭南地区被历代医家称为“瘴疫之地”,温病频发,流感疫情严重,岗梅是岭南地区的地产药材,被岭南医家广泛用于温病防治,临床常用于感冒、高热烦渴、扁桃体炎、咽喉炎、气管炎、百日咳、肠炎、痢疾、传染性肝炎等,说明其对病原微生物有很好的抑制作用。朱伟群等^[15]曾报道其水提液对 H1N1 型流感病毒有确切的抑制作用,但对禽流感病毒的相关作用及其机制研究较少。本实验的结果表明岗梅根水提物对 H9N2 亚型禽流感病毒感染小鼠的肺指数有抑制作用,并能延长感染小鼠的存活时间,降低死亡率,且疗效显著,为进一步开展岗梅抗流感病毒药效物质基础研究提供依据。

3.2 对实验方法及结果的相关分析

肺指数实验滴鼻所用病毒液为 15 倍的 LD_{50} 浓度,死亡保护率实验造模采用 2 倍的 LD_{50} 浓度,是前期查阅大量学者的研究文献^[13-15],进行了预实验摸索后确定的,采用 15 倍的 LD_{50} 是确保肺炎模型造模成功,亦便于鼠肺形态特征的观察比较。预实验表明,小鼠在感染后第 6 天才开始死亡,因此选择感染后第 4 天进行小鼠的剖杀取肺,此时模型组小鼠均表现出典型的肺炎症状且尚未出现死亡。

表 1 岗梅根水提物对病毒性肺炎小鼠肺指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	给药剂量/生药 ($g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	动物数 (只)	平均肺指数	肺指数抑制率 (%)
空白对照组	—	12	0.82 ± 0.05	—
病毒对照组	—	12	1.70 ± 0.10^a	—
奥司他韦组	0.075	12	1.11 ± 0.16^{ab}	34.32
高剂量组	20	12	1.56 ± 0.25^a	8.05
中剂量组	10	12	1.40 ± 0.20^{ab}	13.70
低剂量组	5	12	1.28 ± 0.18^{ab}	20.30

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与病毒对照组比较,^b $P<0.01$;“—”表示无该项。

表 2 岗梅根水提物提取物对病毒感染小鼠的死亡保护结果($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/ 生药($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	动物数(只)	死亡数(只)	死亡保护率(%)	平均存活时间(/d)	生命延长率(%)
空白对照组	—	12	0	—	15±0.00	—
病毒对照组	—	12	12	—	4.67±0.65 ^a	—
奥司他韦组	0.075	12	4	66.67	11.83±4.69 ^b	153.32
高剂量组	20	12	12	0	6.67±0.65 ^a	42.83
中剂量组	10	12	8	33.33	9.83±3.95 ^{ab}	110.49
低剂量组	5	12	9	25	8.17±0.75 ^{ab}	74.95

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与病毒对照组比较,^b $P<0.01$;“—”表示无该项。

实验结果显示岗梅水提液中、低剂量组能显著降低感染小鼠肺指数,降低小鼠死亡率并延长其存活时间,而高剂量组对 H9N2 亚型禽流感病毒感染的小鼠只有一定的治疗趋势,推测原因是岗梅根药效成分过于复杂,含有多种皂苷和生物碱^[9],各组分之间的反应机制亦不明确,给药浓度和治疗效果之间量效关系不明显,拟在之后的实验中做进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 动物传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,1999:438-441.
- [2] Lee CW, Song CS, Lee YJ, et al. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the Pathogenic potential of isolate MS96 [J]. AvianDis,2000, 44(3):527-535.
- [3] Peng Gao, Shinji Watanabe, Toshihiro Ito, et al. Biological Heterogeneity, Including Systemic Replication in Mice, of H5N1 Influenza A Virus Isolates from Humans in Hong Kong [J]. American Society for Microbiology,1999,73(4):3184-3189.
- [4] Butt KM, Smith GJ, Chen H, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003 [J]. J Clin Microbiol,2005,43(11):5760-5767.
- [5] Cong YL, Pu J, Liu QF, et al. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China [J]. J Gen Virol,2007,88(Pt7):2035-2041.
- [6] Cong YL, Wang CF, Yan CM, et al. Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004 [J]. Virus Genes,2008,36(3):461-469.
- [7] 梁慧刚,刘清,黄可. 全球禽流感药物研发动态[J]. 中国家禽,2008,30(9):35-38.
- [8] 梁计林. 抗病毒中药在临床中的应用及优势[J]. 实用医技杂志,2010,17(1):24.
- [9] 蔡艳,张庆文,王磊,等. 岗梅根化学成分的研究[J]. 中草药,2010,41(9):1426-1429.
- [10] 刘福成. 土牛膝岗梅汤治疗急性扁桃体炎 118 例报告[J]. 甘肃中医,2004,17(8):14-15.
- [11] 石琦,张宝云,高晨,等. 羊骚痒因子 263K 经颅内注射感染仓鼠后半致死量(L_{50})的测量[J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(3):253.
- [12] 陈敏,王飞,谭万初. 中医药抗病毒感染的实验研究进展[J]. 中华实用中西医杂志,2007,20(4):341-344.
- [13] 富航育,卢长安,贺玉琢,等. 清肺饮抗小鼠流感病毒性肺炎的实验研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,1996,10(4):381.
- [14] 赵铁华,陈四平,杨鹤松,等. 黄芩茎叶活性部位抗病毒作用的研究[J]. 中国药科大学学报,2006,37(6):544-547.
- [15] 朱伟群,刘汉胜,晏桂华,等. 岗梅水提取物抗流感病毒的实验研究[J]. 热带医学杂志,2007,7(6):555-556.

(收稿日期:2011-09-08)

(本文编辑:刘群)

· 信息之窗 ·

欢迎浏览环球中医药杂志网站

2009 年 3 月,环球中医药杂志网站(www.hqzyy.com)全面更新。

本刊网站有我刊在线、作者中心、投稿、征订、本刊资讯、关于我们、留言板等栏目。读者登陆环球中医药杂志网站,可浏览并下载本刊所有过刊文章和部分当期杂志文章,现在已经更新至 2011 年第 6 期(2011 年 12 月 6 日出刊)。现阶段免费下载。读者可以借助网站与杂志进行沟通联络,了解杂志投稿与订阅方式,了解杂志社近期学术活动信息。新版网站特别开辟作者中心专栏,提供写作技巧、学术信息、投稿指南等实用内容。

环球中医药杂志网站(www.hqzyy.com)为《环球中医药》杂志唯一官方网站。网络上与环球中医药杂志社相关信息均以此网站内容为准。

文献标引格式:

李耿,汪天呈,姚海燕,等. 岗梅根水提物在小鼠体内抗H9N2亚型禽流感病毒实验研究[J]. 环球中医药,2012,5(2):84-87.