

金欣口服液不同化学部位对呼吸道合胞病毒感染的影响

杜丽娜, 单进军, 徐建亚, 徐珊, 戴启刚, 汪受传*

(南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023)

摘要:**目的** 观察金欣口服液不同化学部位在体内的抗呼吸道合胞病毒(RSV)作用。**方法** 小鼠经滴鼻感染 RSV 建立肺炎模型, 随机分为正常对照组、模型对照组、利巴韦林组、金欣口服液组、金欣口服液石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取液组及母液组, 光镜下观察肺组织的炎症病变情况, 计算小鼠肺指数和肺指数抑制率、脾指数、胸腺指数、死亡保护率。**结果** 金欣口服液石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取液对 RSV 感染后小鼠的肺指数增高均有显著的降低作用($P < 0.01$), 减轻感染小鼠肺组织炎症病变, 同时能增加脾指数和胸腺指数($P < 0.01$)。金欣口服液正丁醇提取液能降低 RSV 感染小鼠的死亡率。**结论** 金欣口服液石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取液对 RSV 具有一定的抑制作用, 并且能提高 RSV 感染小鼠的免疫功能。正丁醇提取液对 RSV 感染小鼠具有一定的死亡保护作用。

关键词: 金欣口服液; 呼吸道合胞病毒; 肺指数; 脾指数; 胸腺指数

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2013)02-0165-04

Experimental Study on Jinxin Oral Liquid Different Chemical Components Oppressing Respiratory Syncytial Virus

DU Li-na, SHAN Jin-jun, XU Jian-ya, XU Shan, DAI Qi-gang, WANG Shou-chuan*

(First Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To observe the effect of Jinxin Oral Liquid (JOL) different chemical components on respiratory syncytial virus (RSV). **METHODS** The mice pneumonia models were set up through nasal drops with RSV, which were randomly divided into normal control group, model control group, ribavirin group, JOL group, petroleum ether extract group, ethyl acetate extract group, N-butanol extract group and mother liquor group. The condition of the inflammatory lesion in lung tissues was observed under light microscope. Pulmonary index and pulmonary index inhibition rate, spleen index, thymus index and death protection rate were calculated. **RESULTS** Petroleum ether extract, ethyl acetate extract and n-butanol extract of JOL remarkably decreased pulmonary index of mice infected with RSV ($P < 0.01$) and reduced the inflammatory lesions in lung tissues; meanwhile, increased spleen index and thymus index ($P < 0.01$). N-butanol extract of JOL reduced the death rate of mice infected with RSV. **CONCLUSION** Petroleum ether extract, ethyl acetate extract and n-butanol extract of JOL have a certain inhibitory effect on RSV, and can improve the immune function of mice infected with RSV. N-butanol extract of JOL can make certain death protection for mice with RSV.

KEY WORDS: Jinxin Oral Liquid; respiratory syncytial virus; pulmonary index; spleen index; thymus index

呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)是婴幼儿下呼吸道感染的重要病原体, 目前, 西药尚缺乏理想的药物, 唯一被美国儿科协会推荐为“也许可以使用”的药物是利巴韦林。中医药治疗具有一定的优势。金欣口服液是我国著名儿科专家汪受传教授的经验方, 由黄芩、虎杖、桑白皮、麻黄等药组成, 具有开肺化痰解毒之功效。前期临床研究

显示金欣口服液是治疗小儿病毒性肺炎的有效中药复方制剂^[1], 实验研究亦表明金欣口服液具有拮抗 RSV 作用^[2]。本课题以化学部位为目标, 研究金欣口服液不同化学部位对 RSV 的作用, 现将实验结果报道如下。

1 材料

1.1 金欣口服液不同化学部位的提取

收稿日期: 2012-10-30; 修稿日期: 2012-12-19

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20093237110006); 江苏省自然科学基金(BK2010560); 江苏省中医药科技项目(LZ11183)

作者简介: 杜丽娜(1986—), 女, 江苏太仓人, 南京中医药大学 2012 级博士研究生。* 通信作者: wscnj@126.com

金欣口服液,由南京中医药大学药学院中药制剂研究所提供,先用石油醚萃取,每次 3 倍量体积,一共萃取 2 次;然后再用乙酸乙酯萃取,每次 3 倍量体积,一共萃取 2 次;最后用正丁醇萃取,每次 3 倍量体积,一共萃取 2 次;萃取完剩下的即是母液。

1.2 实验动物

感染性肺炎实验:SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 144 只,6~8 周龄,体质量(20 ± 2)g,购于扬州大学比较医学中心,许可证号:SCXK(苏)2007-0001,饲养于南京中医药大学实验动物中心,灭菌颗粒饲料喂养,自由饮水。死亡保护实验:SPF 级 BALB/C 小白鼠 74 只,雌性,体质量(16 ± 2)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.3 病毒株

呼吸道合胞病毒 A 亚型(Long 株)由武汉国家典型培养物保藏中心提供。用常规细胞病变观察法,采用 Reed-Muench 法测定计算病毒半数感染量(TCID₅₀)为 $10^{-4.625}/50 \mu\text{L}$ 。

1.4 药物与试剂

金欣口服液每毫升含生药 2.9 g,实验时采用双蒸水进行稀释。阳性对照物利巴韦林颗粒(新博林),由四川百利药业有限责任公司提供,批号:H51023508,阴性对照为生理盐水。乙醚,由国药集团化学试剂有限公司提供,批号:20100308。石油醚,由南京化学试剂有限公司提供,批号:10101411086。乙酸乙酯,由国药集团化学试剂有限公司提供,批号:T20100603。正丁醇,由南京化学试剂有限公司提供,批号:10071610741。

2 方法与结果

2.1 对呼吸道合胞病毒性肺炎的影响

2.1.1 实验分组

将 144 只 BALB/c 小鼠随机分为 8 组,分别为石油醚组、乙酸乙酯组、正丁醇组、母液组、金欣口服液组、利巴韦林组、模型对照组及正常对照组。

2.1.2 造模方法

以乙醚轻度麻醉 BALB/c 小鼠,除正常组外,将 RSV 病毒液 100TCID₅₀ 0.05 mL 滴鼻感染,待小鼠将病毒液完全吸入呼吸道后放回笼中,连续滴鼻 3 天,每天滴鼻 1 次。正常对照组予等量生理盐水滴鼻。

2.1.3 用药途径和剂量

小鼠体质量按照 20 g/只计算。所有药物均以

灌胃方式给予,1 次/日,于第 1 次感染病毒 24 h 后开始灌胃,连续 7 d。金欣口服液组按照 10.14 g/kg 的标准给药,不同化学部位组以 10.14 g/kg 剂量给药,模型对照组及正常对照组分别给予生理盐水 0.02 mL/g。

2.1.4 指标观察

逐日观察小鼠发病症状、存活时间以及死亡数,连续观察 7 d。灌胃 7 d 后,用眼球摘除放血法,处死各组小鼠。

2.1.4.1 肺组织形态学分析

每组取 8 只小鼠,取左肺,用 4%多聚甲醛溶液浸润、固定,送南京医科大学病理研究室做病理切片观察。观察肺泡间隔距离、炎细胞数量及肺间质充血水肿。根据病变轻重程度,依次半定量为轻度“+”,中度“++”,重度“+++”,无病变组织标记为“-”。

2.1.4.2 肺指数、脾指数、胸腺指数的测定

完整摘取小鼠肺脏、脾脏、胸腺组织,将表面瘀血用滤纸吸干,用电子分析天平准确测定其质量,并根据小鼠体质量计算肺指数、脾指数、胸腺指数及相应脏器指数抑制率。

$$\text{肺指数} = \frac{\text{肺质量}}{\text{体质量}} \times 100\%;$$

$$\text{肺指数抑制率} =$$

$$\frac{\text{病毒对照组肺指数均值} - \text{实验组肺指数均值}}{\text{病毒对照组肺指数均值}} \times 100\%;$$

$$\text{脾指数} = \frac{\text{小鼠脾质量}}{\text{小鼠体质量}} \times 100\%;$$

$$\text{胸腺指数} = \frac{\text{小鼠胸腺质量}}{\text{体质量}} \times 100\%。$$

2.1.4.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 统计软件分析,各组比较采用方差分析,方差齐者作 t 检验,方差不齐者做秩和检验。

2.1.5 结果

2.1.5.1 实验动物观察

正常对照组小鼠运动自如,呼吸平稳,精神状态良好,进食如常,毛浓密而有光泽;模型组小鼠随实验进行而变得不喜动,行动迟缓,扎堆,耸毛,毛发欠光泽,呼吸急促,精神萎靡,进食量下降。

2.1.5.2 各组小鼠病理结果比较

如图 1 所示,正常组肺泡结构清晰,肺泡上皮完整,肺泡壁毛细血管无扩张充血,腔内无渗出物,间质未见炎细胞浸润,肺间隔及支气管完好无损。模

型对照组可见肺泡间隔明显增宽,炎细胞大量浸润,肺间质明显充血水肿,肺泡腔内见大量渗出物。用药组的肺组织学表现基本同模型组,除母液组外,其余中药用药组肺组织充血程度及炎细胞浸润程度等

均有所减低,与病毒对照组相比有显著差异性($P<0.05$),但是与利巴韦林组相比无显著差异性($P>0.05$),具体数据见表1。

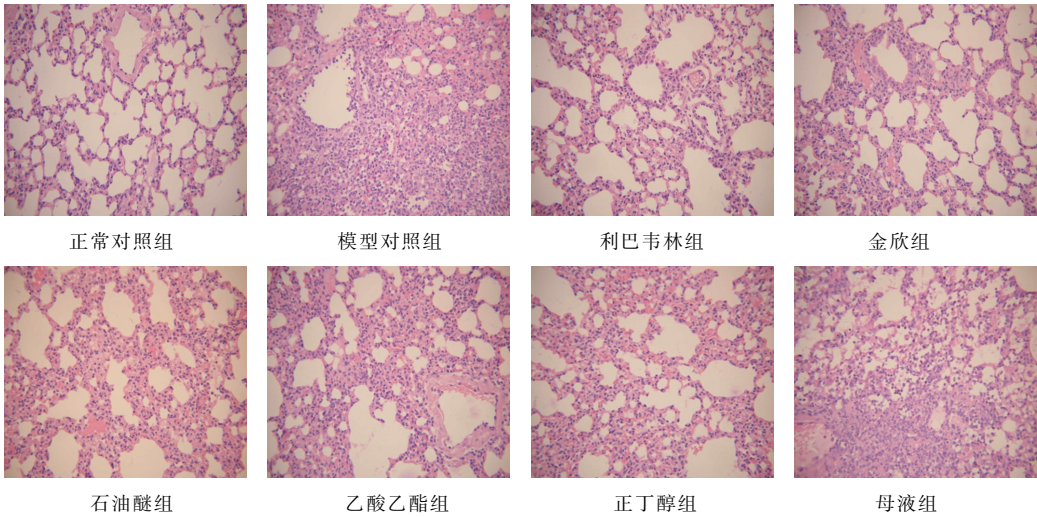


图1 各组小鼠肺病理图片(×200)

表 1 各组小鼠肺病理切片结果 (n=8)				
病变程度	—	+	++	+++
正常对照组	8	0	0	0
模型对照组	0	0	0	8
利巴韦林组	0	4	3	1
金欣口服液组	0	3	4	1
石油醚组	0	3	4	1
乙酸乙酯组	0	5	2	1
正丁醇组	0	3	3	2
母液组	0	0	1	7

2.1.5.3 各组小鼠肺指数、肺指数抑制率及脾指数、胸腺指数的比较

1)对肺指数的影响。表2结果显示,模型组与正常组比较肺指数有显著差异($P<0.01$),说明RSV可以引起正常小鼠肺指数的升高,造模成功;各给药组均能降低小鼠肺指数,其中除母液组外,其余各组与模型对照组比较差异有显著性,说明金欣口服液石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取液均能降低RSV感染小鼠的肺指数。

2)对脾指数、胸腺指数的影响。表3结果显示,RSV感染小鼠脾指数与胸腺指数显著降低,说明RSV感染可以使小鼠脾脏与胸腺明显萎缩,免疫功能下降。与模型组比较,除利巴韦林组及母液组外,其余给药组脾指数与胸腺指数均显著升高,说明金欣口服液石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取液可以保护

RSV感染小鼠免疫功能。

表 2 各组小鼠肺指数级肺指数抑制率的比较($\bar{x}\pm s$)				
分组	n	剂量/ ($k\cdot kg^{-1}$)	肺指数	抑制率/%
正常对照组	8	—	$0.672\pm 0.117^*$	—
模型对照组	8	—	$1.429\pm 0.128^\#$	—
利巴韦林组	8	0.056	$0.851\pm 0.071^*^\#^\#$	40.44
金欣口服液组	8	10.14	$0.856\pm 0.070^*^\#^\#$	40.10
石油醚组	8	10.14	$0.951\pm 0.161^*^\#$	33.45
乙酸乙酯组	8	10.14	$0.822\pm 0.053^*^\#^\#$	42.47
正丁醇组	8	10.14	$0.861\pm 0.060^*^\#$	39.75
母液组	8	10.14	$1.308\pm 0.131^\#$	8.47

注:与正常对照组比较, $^\# P<0.01$, $^\#^\# P<0.05$;与模型对照组比较, $^* P<0.01$ 。

表 3 各组小鼠脾指数及胸腺指数的比较($\bar{x}\pm s$)				
分组	n	剂量/ ($k\cdot kg^{-1}$)	脾指数	胸腺指数
正常对照组	18	—	$4.812\pm 0.370^*$	$2.232\pm 0.198^*$
模型对照组	18	—	$3.749\pm 0.302^\#$	$1.408\pm 0.240^\#$
利巴韦林组	18	0.056	$3.915\pm 0.359^\#$	$1.527\pm 0.404^\#$
金欣口服液组	18	10.14	$4.500\pm 0.308^\#^\#$	$1.946\pm 0.318^\#^\#$
石油醚组	18	10.14	$4.268\pm 0.402^\#$	$1.825\pm 0.485^\#$
乙酸乙酯组	18	10.14	$4.386\pm 0.321^\#$	$1.916\pm 0.230^\#$
正丁醇组	18	10.14	$4.329\pm 0.338^\#$	$1.894\pm 0.293^\#$
母液组	18	10.14	$3.814\pm 0.591^\#$	$1.336\pm 0.470^\#$

注:与正常对照组比较, $^\# P<0.01$, $^\#^\# P<0.05$;与模型对照组比较, $^* P<0.01$, $^{**} P<0.05$ 。

2.2 对呼吸道合胞病毒致小鼠死亡的保护实验

如前分组、滴鼻造模,第 1 次感染后 72 h 开始给药,连续 4 d,记录感染 8 d 内小鼠的死亡数^[3],计算死亡率、死亡保护率。结果见表 4。

死亡保护率=(病毒对照组死亡率-实验组死亡率)/病毒对照组死亡率×100%。

表 4 金欣口服液不同化学部位对 RSV 感染小鼠死亡率及死亡保护率的影响

分组	n	剂量/ (g·kg ⁻¹)	死亡数	死亡率/%	死亡保护率/%
正常对照组	8	—	0	—	—
模型对照组	8	—	7	87.5	—
利巴韦林组	9	0.056	3	33.33*	61.96
金欣口服液组	9	10.14	3	33.33*	61.96
石油醚组	10	10.14	5	50	42.86
乙酸乙酯组	10	10.14	4	40	54.29
正丁醇组	10	10.14	3	30*	65.71
母液组	10	10.14	6	60	31.42

注:与模型对照组比较,**P*<0.05。

表 4 结果表明:金欣口服液组、正丁醇组及利巴韦林组可以显著降低动物死亡数,提高死亡保护率,与模型组比较差异有显著性意义。

3 讨论

呼吸道感染性疾病是儿科临床常见病,长期以来严重威胁着婴幼儿的健康。RSV 为常见病毒之一,其发病除与感受邪毒外,亦与机体免疫功能的失调和降低密切相关。临床及实验研究已证实金欣口服液不但具有良好的抗 RSV 作用,还能提高机体自身免疫力^[4]。

本课题采用在体动物实验,进一步研究金欣口服液不同化学部位对 RSV 感染的药效作用。结果显示,金欣口服液石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取液均能减轻 RSV 感染小鼠肺组织炎性渗出,对肺指数有抑制作用,对肺脏有一定的保护作用。

脾脏和胸腺是机体两大重要的免疫器官,而脾脏指数和胸腺指数是反映胸腺和脾脏免疫功能的重要指征,其数值的增减变化能反映机体的免疫功能状况。本实验研究发现,金欣口服液组及石油醚、乙

酸乙酯、正丁醇提取液均能一定程度上减轻脾脏与胸腺的萎缩,提高机体免疫功能,而利巴韦林对 RSV 感染小鼠的免疫功能无明显影响,说明金欣口服液及不同部位提取物治疗 RSV 感染小鼠较利巴韦林有一定的优势。

实验结果显示,金欣口服液组、金欣口服液正丁醇组及利巴韦林组对 RSV 感染小鼠具有死亡保护作用,其余组无明显保护作用。此结论与上述实验不完全一致,我们推测首先是由于 BALB/c 小鼠性别不同引起机体免疫力不同,所受 RSV 感染程度存在差异,进而导致相同的药物不同的结果,其次,给药时间不同使药效存在差异,前者实验为感染 RSV24 h 后即给药,后者死亡保护实验为感染 RSV72 h 后才开始给药。最后,我们所设计的死亡保护实验为小样本实验,实验中存在诸多不稳定因素,当扩大样本量时,不排除引起结果改变的可能。

参考文献:

[1] 汪受传,朱先康,韩新民,等.小儿病毒性肺炎中医证治规律的初步研究[J].中国医药学报,2003,18(12):694.
Wang SC, Zhu XK, Han XM, et al. Primary study on differentiation prescription rules of children's viral pneumonia[J]. Chin J TCM & Pharm, 2003, 18(12): 694.

[2] 白凌军,白凌鹰,汪受传,等.金欣口服液含药血清抗呼吸道合胞病毒作用研究[J].上海中医药大学学报,2009,23(6):48-50.
Bai LJ, Bai LY, Wang SC, et al. Study on the effect of the serum contained Jinxin Oral Liquid anti-respiratory syncytial virus [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharm Shanghai, 2009, 23(6): 48-50.

[3] 李燕晖,李保刚.中、重症呼吸道合胞病毒感染 BALB/c 小鼠模型的实验研究[J].昆明医学院学报,2009,30(4):14-16.
Li YH, Li BG. The establishment of the moderate and severe BALB/c mouse model of RS virus infection[J]. J Kunming Med Univ, 2009,30(4): 14-16.

[4] 李江全,任现志,汪受传.清肺口服液对免疫功能影响的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(4):47-48.
Li JQ, Ren XZ, Wang SC. Experimental study of Qingfei Oral Liquid on immune function[M]. Chin J Exper Tradit Med Form, 2003,9(4): 47-48.

(编辑:董宇)

• 投稿须知 •

摘要、关键词 研究论文、专论、综述应附摘要(200~500 字)、关键词(3~8 个)。实验性文章摘要为四要素式摘要,即分为目的、方法、结果、结论 4 个部分,结果部分要详细,需将具体实验结果(*P* 值等)说明。专论、综述为叙述形式的指示性摘要。多个关键词之间应用分号分隔。英文摘要内容及字数要多于中文摘要,不必直译,也可不使用四要素(OBJECTIVE, METHODS, RESULTS, CONCLUSION)形式,以利于国际交流。