

利巴韦林注射液与参麦注射液单用及联合应用对甲型 H1N1 流感小鼠重症肺炎的疗效研究

马月霞^{1,3} 李 倩² 王玉光³

(1 北京中医药大学东直门医院,北京,100700; 2 首都医科大学附属北京天坛医院,北京,100050; 3 首都医科大学附属北京中医医院,北京,100010)

摘要 目的:观察利巴韦林注射液(利巴韦林)与参麦注射液(参麦)单用及联合应用干预甲型 H1N1 流感重症肺炎小鼠的疗效,探讨两药治疗小鼠甲型 H1N1 流感重症肺炎的最优方案。方法:C57BL/6 小鼠 72 只随机分为 4 组,模型组、参麦组、利巴韦林组、利巴韦林联合参麦组,20 μ L 2×10^5 TCID₅₀ 病毒液滴鼻建立流感重症肺炎小鼠模型。利巴韦林于感染前 12 h 腹腔注射给药,参麦于感染后 72 h 腹腔注射给药,各药均 1 次/d,连续给药 7 d。通过观察各组小鼠的存活率与体重、肺湿干比、肺组织病理等结果,评价利巴韦林、参麦两药单用及联合应用干预小鼠流感重症肺炎的疗效。结果:模型组小鼠全部死亡,肺组织病理显示,双肺弥漫性炎性反应细胞浸润,肺泡上皮细胞脱落、坏死,支气管上皮细胞变性,伴有水肿、瘀血、出血;利巴韦林组小鼠存活率为 100%,肺湿干比明显降低($P < 0.01$),但肺组织病理显示肺损伤严重,与模型组无异。参麦组小鼠存活率为 10%,肺湿干比低于模型组($P < 0.05$),肺部病理损伤严重。利巴韦林联合参麦组小鼠存活率、肺湿干比与利巴韦林组相似,但联合用药组小鼠感染第 10 d 后体重迅速恢复($P < 0.05$),肺组织病理则显示肺脏轻度水肿,支气管、血管周围炎性细胞浸润较少,支气管上皮细胞变性、肺实变范围较小,与模型组小鼠相比肺损伤明显减轻。结论:利巴韦林与参麦联合应用对流感重症肺炎小鼠不仅具有明显的死亡保护作用,而且可减轻肺部病理损伤,促进感染小鼠恢复,缩短病程,二者联合应用疗效优于单独用药。

关键词 利巴韦林;参麦注射液;甲型 H1N1 流感

Study on Effect of Ribavirin and Shenmai Injection in Treating Rats with Influenza A H1N1 Induced Severe Pneumonia

Ma Yuexia^{1,3}, Li Qian², Wang Yuguang³

(1 Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2 Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To observe the efficacy of Ribavirin combined with Shenmai injection on mice with severe pneumonia induced by influenza A virus and to explore an optimized intervention protocol of applying antivirals and Shenmai on mice with severe pneumonia.

Methods: There was a validated mouse model for severe influenza research which could be used to evaluate potential therapeutic drugs in our laboratory. An isolate termed A/Beijing/501/2009 (H1N1) (shorten for BJ501) could induce severe respiratory disease in C57 BL/6 mice which displayed a wide range of pathologic phenotypes. All infected mice were randomly divided into model group, Ribavirin group, Shenmai group and Ribavirin combined with Shenmai group. Ribavirin (starting at 12 hours before infection) and Shenmai (starting at 72 hours after infection) were both administered intraperitoneally daily for 7 days. Survival rate, weight changes, acute pulmonary edema (lung wet-to-dry ratio) and lung histopathology were measured to evaluate their efficacy. **Results:** There was no difference in the survival rate between the Shenmai and the model group (10% vs 0%). The acute lung edema calculated by wet-to-dry ratio was eased compared with that in model group ($P < 0.05$) while there was no difference in lung histopathology between them. The Ribavirin group had 100% survival rate and lower wet-to-dry ratio which had statistically significant differences ($P < 0.01$) compared with the model group and SMI group, but there was no difference in lung histopathology. Survival rate in Ribavirin plus SMI group was 100%, and this group had a minimum weight loss. Especially after 10 days infection, the mice weight ascended much faster. At the same time, the combination group had very mild lung lesions and edema, exhibiting less inflammatory cell infiltration around bronchi and blood vessels, less bronchial epithelial cell degeneration, less lung tissue consolidation. **Conclusion:** The efficacy of Ribavirin combined with Shenmai to fight against influenza severe pneumonia on mouse model seems more reliable than simple regimen. The combination of Ribavirin and Shenmai is characterized by shortening the course and reducing lung injury which shows synergistic activity against influenza. Shenmai, a kind of immunomodulator, initiates at the time of worsening stage has provided benefit to influenza outcome.

Key Words Ribavirin; Shenmai Injection; H1N1 influenza; Severe Pneumonia

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.08.027

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生人才培养计划项目(编号:2011-3-081)

作者简介:马月霞(1985—),女,河北石家庄人,北京中医药大学硕士在读,主要从事中医药抗流感的实验研究

通信作者:王玉光,博士,教授,(010)52176039, E-mail:wygzhyaids@126.com

2009 年 4 月墨西哥首先爆发了一种人感染 H1N1 猪流感 (the pandemic H1N1 2009 virus, pH1N1) 疫情, 人群普遍缺乏免疫力, 全球总死亡病例 18 449 例, 死因主要为重症肺炎和呼吸衰竭。目前常用的抗流感病毒药有神经氨酸酶 (NA) 抑制剂, 包括奥司他韦和扎那米韦等, 和广谱抗病毒药利巴韦林。其中 NA 抑制剂疗效可靠, 耐药性弱, 早期 (起病 1 ~ 2 d) 应用具有较好的抗流感病毒作用。但通常, 临床实际应用抗病毒药物往往出现延迟用药, 对预后造成不利影响^[1]。临床上重症流感的治疗主要依靠对症辅助治疗和免疫抑制剂皮质类固醇的使用, 但是近期研究显示^[2], 皮质类固醇药物可能会导致病毒清除延迟、肺炎进行性加重而加剧流感患者的死亡。因此, 目前流感重症肺炎患者尚无特效疗法。近年来, 中医药在重大传染病的救治上有了长足的发展, 尤其是 2009 年新型 H1N1 流感广泛应用中医药治疗, 事实证明, 如疏风解毒颗粒、麻杏石甘汤等中药抗流感有效^[3], 但目前中药注射液对流感重症肺炎的疗效并不确切, 且无相关的实验报道。

我们在本实验应用感染甲型 H1N1 流感病毒导致的重症肺炎小鼠模型, 观察利巴韦林注射液、参麦注射液单用及联合应用对流感病毒感染所致的重症肺炎小鼠的疗效, 为今后临床中西药静脉注射液治疗流感重症肺炎提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 动物 雌性 C57BL/6 小鼠, 体重 14 ~ 16 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(军)2012-003。

1.2 病毒 A/Beijing/501/2009 (H1N1) 流感病毒 (简称 BJ501), 由军事医学科学院微生物与流行病学研究所免疫室提供。

1.3 药品 利巴韦林注射液 (货号: 1003167, 0.1 g/2 mL), 山东鲁抗辰欣药业有限公司生产。参麦注射液 (货号: 20080521, 10 mL/g), 河北省神威药业有限公司生产。

1.4 方法

1.4.1 动物模型的建立与分组 72 只雌性 C57BL/6 小鼠, 体重 14 ~ 16 g, 随机分为模型组、参麦组、利巴韦林组、利巴韦林联合参麦组, 小鼠在乙醚轻度麻醉下, 每只小鼠以 20 μ L 2×10^5 TCID₅₀ 病毒液滴鼻感染。模型组腹腔注射磷酸盐缓冲液 (PBS) 66.6 mg/(kg · d); 利巴韦林组于小鼠感染前 12 h 腹腔注射利巴韦林注射液 66.6 mg/(kg · d); 参麦组于小鼠感染后 72 h 腹腔注射参麦注射液 20 mg/(kg · d); 利巴韦林联合参麦组分别于小鼠感染前 12 h 腹腔注射利巴韦林注射

液 66.6 mg/(kg · d) 并于感染后 72 h 腹腔注射参麦注射液 20 mg/(kg · d)。各药均为 1 次/d, 连续给药 5 d。

1.4.2 死亡保护率与体重的测定 每组小鼠 10 只。从感染日起开始每天准确称量小鼠体重, 观察一般状态, 如有无咳嗽、气促、呼吸困难、烦躁、耸毛等, 并记录小鼠的存活情况, 观察期为 14 d。

1.4.3 肺湿干比的测定 每组小鼠 5 只。感染后第 4 天, 摘眼球放血处死小鼠后取出全肺, 将其分别放在盛有生理盐水的平皿中清洗 2 次, 用吸水纸吸干表面水分, 置于电子称上称出肺湿重。将称量后的鼠肺放于 60 $^{\circ}$ C 的烘箱中, 24 h 后取出称肺干重。肺湿干比 = (肺湿重 - 肺干重)/肺湿重 $\times 100\%$ 。肺湿干比是用以反映肺水肿严重程度的重要指标。

1.4.4 肺病理检测 每组小鼠 3 只。感染后第 5 天处死小鼠, 取出全肺, 尽量避免划伤肺组织。将肺组织用 10% 甲醛固定, 常规方法石蜡包埋切片, 苏木素伊红 (HE) 染色, 光镜观察肺组织病理形态学变化。请一位病理老师读片, 出示病理报告结果。

1.4.5 数据统计 研究数据使用 GraphPad Prism5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 软件进行统计分析, 采用 *t* 检验和方差分析等统计学方法, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 利巴韦林、参麦单用及联合用药对感染流感病毒的小鼠死亡保护作用 小鼠感染病毒后观察其存活情况, 观察期至少 14 d。由表 1 和图 1 可见, 模型组小鼠自感染 6 d 起开始死亡, 感染第 10 天全部死亡。参麦组小鼠存活率为 10%, 利巴韦林组、利巴韦林联合参麦组小鼠存活率均为 100%。参麦组小鼠的存活率同模型组相比差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 利巴韦林组、利巴韦林联合参麦组与模型组小鼠的存活率相比差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。结果见表 1 和图 1。

表 1 小鼠感染 BJ501 病毒后的存活情况

分组	存活率	<i>P</i> 值
模型组	0	—
利巴韦林组	100% **	0.000
参麦组	10%	0.164
利巴韦林 + 参麦组	100% **	0.000

注: 为 * *P* < 0.05; 为 ** *P* < 0.01。

2.2 利巴韦林、参麦注射液联合用药对感染流感病毒的小鼠体重变化影响 各组小鼠均于感染 BJ501 株流感病毒 2 d 后精神萎靡, 体重开始大幅下降。参麦组小鼠体重于感染后第 10 天开始恢复, 利巴韦林组和利巴韦林联合参麦组小鼠体重在感染后第 5 天停止下

降,感染后第 8 天开始恢复,感染后第 10 天起,利巴韦林联合参麦组的小鼠体重增长趋势高于利巴韦林组,统计有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 2 和图 2。

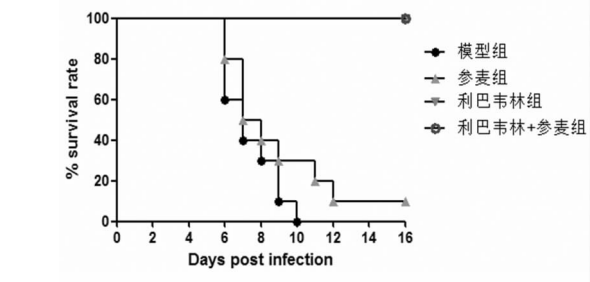


图 1 小鼠感染 BJ501 病毒后的存活情况

表 2 小鼠感染 BJ501 病毒后第 10~14 天各组小鼠体重变化

分组(mg/kg·d)	体重变化(%)	P 值
利巴韦林组	+ 11.97 ± 2.13	—
利巴韦林 + 参麦组	+ 19.00 ± 3.67	$P<0.05^*$

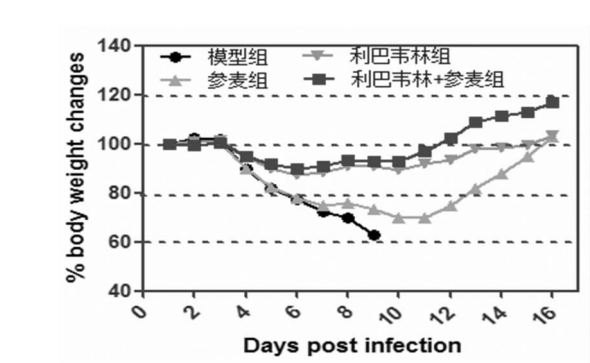


图 2 小鼠感染 BJ501 病毒后各组小鼠体重变化

2.3 利巴韦林、参麦注射液联合用药对流感病毒感染小鼠肺湿干比的影响 感染后第 4 天,处死、解剖小鼠。取肺组织,称量肺湿重,干燥 72 h 后称量其干重,计算湿干比。参麦组与模型组肺湿干比相比,差异有统计学意义($P<0.05$);利巴韦林组、利巴韦林联合参麦组小鼠肺湿干与模型组相比,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

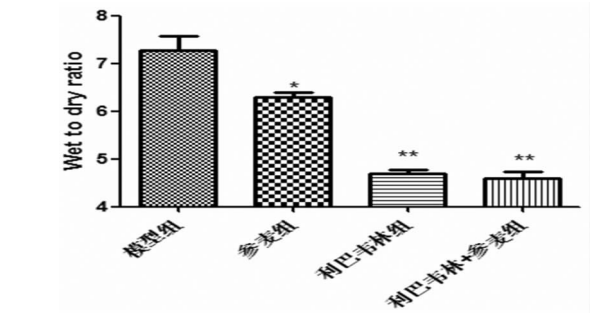


图 3 小鼠感染第 4 天的肺湿干比

2.4 利巴韦林、参麦注射液联合用药对流感病毒感染小鼠肺部病理变化的影响 感染后第 5 天,处死、解剖小鼠,取肺组织,肺组织经 4% 甲醛固定后,石蜡包埋切片苏木素伊红(HE)染色,光镜观察肺组织病理形态

学变化。结果见表 4 和图 4。

表 3 小鼠感染第 4 天的肺湿干比

分组(mg/kg·d)	肺湿干比(%)	P 值
模型组	86.15 ± 2.89	—
利巴韦林组	78.68 ± 3.52	$P<0.01^{**}$
参麦组	82.91 ± 3.75	$P<0.05^*$
利巴韦林 + 参麦组	78.35 ± 5.69	$P<0.01^{**}$

表 4 各组小鼠肺部病理变化

分组	炎症反应 细胞浸润	液体 渗出	肺泡隔炎症 反应	肺泡 实变	肺出血
模型组	+++	+++	+++	+++	++
利巴韦林组	+++	+++	++	++	-
参麦组	+++	+++	++	++	+
利巴韦林 + 参麦	+	+	-	+	-

注:炎症反应细胞浸润:-:无浸润;+:有 3 个细胞厚度以下的炎症反应浸润;++:3~5 个细胞厚度的炎症反应浸润;+++ :5 个细胞厚度以上的炎症反应浸润。液体渗出:-:无渗出;+:轻度阻塞;++ :中度阻塞;+++ :重度阻塞。肺泡隔增厚:-:无浸润;+:肺泡隔有炎症反应浸润,但肺泡隔无增厚;++ :肺泡隔有明显炎症反应浸润并有轻度增厚;+++ :肺泡隔有明显炎症反应浸润并有显著增厚。肺泡实变:-:没有实质肺炎;+:斑片状实质肺炎;++ :片状和融合实质肺炎。肺出血:-:无出血;+:轻度出血;++ :中度出血;+++ :重度出血。

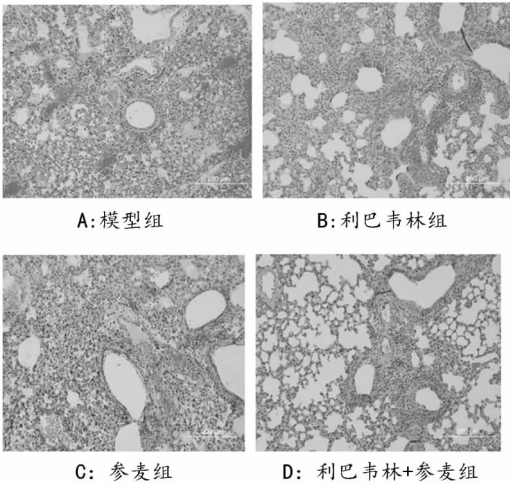


图 4 各组小鼠第 5 天肺部病理变化

3 讨论

甲型 H1N1 流感重症^[4]以急性起病,出现高热,体温多高于 39℃,常伴随剧烈咳嗽、胸痛,咳脓痰、血痰,并于 48 h 后迅速发展为呼吸衰竭、多脏器功能不全或衰竭,进行性血氧降低为主要特征。流感死亡病例尸检发现^[5],其肺脏实变,重量增加,表面多灶、大片状黄色或污秽渗出膜状物,局部呈暗红色。镜下观察显示,肺泡内水肿、出血和炎性渗出。急性肺损伤时可见肺泡上皮大量坏死、脱落,充满肺泡腔,伴巨噬细胞增生,红细胞等渗出,并且有肺透明膜形成,间质水肿、出血,晚期气管黏膜上皮弥漫性鳞状上皮化生,肺组织几乎完全实变,肺纤维化。

现代医学的流感与中医的“时行感冒”类同,属“温病”范畴。甲型 H1N1 流感以发热为主要特征,具有温热病性质,在发病过程中有热邪燔灼、耗气伤津和热迫血溢的病理表现。张伟^[6]等病例观察研究显示,甲型 H1N1 感染病程第 3~5 天开始为本病的进展期,危重病例此期症状重,表现为发热持续不退伴胸闷憋气、倦怠乏力,第 5~12 天为极期,患者持续发热、极度乏力,部分病例很快发生喘脱、厥脱。度过此期进入恢复期后重症病例倦怠乏力、纳差等持续时间相对较长。

利巴韦林作为一种核苷类似物,具有广谱抗病毒的效果,是目前临床上包括流感在内的上呼吸道感染常用的抗病毒药,但其不良反应也相对较多^[7-8]。参麦注射液,由《千金要方》的“生脉散”衍化而来,亦有源于《症因脉治》中的“参冬饮”一说。临床研究显示,参麦注射液对阻断炎症反应及炎症反应-免疫联合反应有重要作用,且能提高呼吸衰竭患者的细胞免疫^[9-10]。

本实验研究发现, C57BL/6 小鼠感染流感病毒 BJ501 株后,肺组织病理出现弥漫的炎症浸润和病理损伤,说明小鼠重症肺炎模型成功。模型组小鼠自感染第 2 天开始体重下降,精神不振,明显发病;感染后第 3~5 天,小鼠一般状况恶化,弓背蜷缩若恶寒颤栗状,开始出现死亡;感染后第 6~7 天小鼠呼吸急促,并大量死亡;感染后第 11 天体重逐渐平稳恢复;感染第 14 天后停止死亡。

实验研究显示,利巴韦林注射液提早应用对感染 BJ501 株流感病毒的小鼠具有明显的保护作用,且肺水肿程度与模型组相比明显减轻,但肺部病理结果显示,利巴韦林并不能减轻肺组织炎症性浸润和病理损伤。这可能由于流感病毒感染后免疫应答反应即刻激活,而利巴韦林并不能逆转免疫反应所致的肺损伤。而参麦注射液,根据中医辨证论治,流感重症肺炎小鼠病程 3~5 d 为进展期,故于感染后 72 h 给予参麦注射液益气扶正。结果显示,参麦注射液单独用药虽对小鼠无明显保护作用,肺部病理损伤亦无改善,但于感染后第 10 天开始对体重增长的变化趋势优于利巴韦林组,其表现符合临床流感患者恢复期气阴不足,需益气养阴的治疗特点。利巴韦林联合参麦组,不仅对小鼠有明显的保护作用,对小鼠的体重增长明显优于其他组。此外,利巴韦林联合参麦组小鼠肺脏病理结果显示,肺脏病变轻微,镜下观察支气管、血管周围炎性细胞浸润较少,支气管上皮细胞变性,肺组织实变范围较小,仅

有个别肺泡间隔增厚,对小鼠的肺部损伤有明显的抑制作用,这可能与参麦注射液可以阻断炎症反应,调节机体的免疫功能的紊乱,减轻流感病毒感染启动的免疫病理损伤有关,需进一步实验证实。

综上所述,本实验根据甲型 H1N1 流感临床中医辨证理论指导,针对该病病程中热毒和气阴不足的关键病机,分别于感染前 12 h、感染后 72 h 给予流感病毒重症感染小鼠利巴韦林注射液和参麦注射液,结果显示,二药联合应用对重症肺炎小鼠不仅促进恢复缩短病程,而且减轻了病理损伤,说明在流感进展期加入益气养阴药对疾病的预后及恢复具有重要作用^[11],中西药联合治疗,标本兼治,既显示了中医辨证治疗的优势,又对临床流感重症病例的治疗具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Zheng B J, Chan K W, Lin Y P, et al. Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (23): 8091-8096.
- [2] Hui D S, Lee N. Adjunctive therapies and immunomodulating agents for severe influenza [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013, 7 (3): 52-59.
- [3] Tao Z, Yang Y, Shi W, et al. Complementary and alternative medicine is expected to make greater contribution in controlling the prevalence of influenza [J]. *Biosci Trends*, 2013, 7 (5): 253-256.
- [4] Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (18): 1708-1719.
- [5] Mauad T, Hajjar L A, Callegari G D, et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181 (1): 72-79.
- [6] 张伟, 王玉光, 刘清泉, 等. 123 例甲型 H1N1 流感重症、危重症中医证候学特征及病因病机分析 [J]. *中医杂志*, 2011, 52 (1): 35-38.
- [7] Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses [J]. *Antiviral Res*, 2008, 78 (1): 9-25.
- [8] Berendt R F, Walker J S, Dominik J W, et al. Response of influenza virus-infected mice to selected doses of ribavirin administered intraperitoneally or by aerosol [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1977, 11 (6): 1069-1070.
- [9] Yu Y H, Cui N Q, Wang G L. Monocyte response and regulatory effect of emodin and shenmai injection on it in patients with severe sepsis [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2006, 26 (Suppl): 98-101.
- [10] Yu J H, Guo H W, Liu M M. Impact of shengmai injection on changes of immunological function in patients after cardiopulmonary bypass [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2009, 29 (4): 317-321.
- [11] Gao Z L, Yu X Q, Yang M. Clinical trial of treating stress-induced hyperglycemia patients with sepsis by supplementing QI, nourishing yin, and promoting blood flow [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2012, 32 (10): 1336-1339.

(2014-05-26 收稿 责任编辑:王明)