

血必净注射液干预甲型 H1N1 流感重症肺炎小鼠的疗效及机制研究

马月霞^{1,2} 郭亚丽² 刘建² 王玉光²

(1 北京市怀柔区中医医院,北京,101400; 2 首都医科大学附属北京中医医院,北京,100010)

摘要 目的:观察血必净注射液(血必净)治疗甲型 H1N1 流感重症肺炎小鼠的疗效,并初步研究其作用机制。方法:C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组、血必净组,正常组小鼠予 20 μ L PBS 滴鼻,模型组小鼠 2×10^5 TCID₅₀/20 μ L 甲型 H1N1 流感病毒液滴鼻感染,建立流感重症肺炎小鼠模型。血必净组小鼠 2×10^5 TCID₅₀/20 μ L 甲型 H1N1 流感病毒液滴鼻感染,并于感染前 24 h 腹腔注射给药,1 次/d,连续给药 5 d。通过观察、检测不同时间点各组小鼠的存活率、体重、肺病毒载量、肺湿干比、肺组织病理、肺灌洗液细胞因子等结果,评价血必净干预小鼠流感重症肺炎的疗效,初步探讨其作用机制。结果:模型组小鼠存活率为 30%,体重下降明显,肺湿干比明显高于正常组($P < 0.05$),提示严重肺水肿;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,提示流感重症肺炎模型成立。血必净组小鼠存活率为 60%,较模型组为优,但无统计学意义($P > 0.05$),体重下降较模型组轻,肺湿干比较模型组降低,但无统计学意义($P > 0.05$);肺组织病理示炎症细胞浸润,肺脏水肿,淤血、出血等严重程度均较模型组轻,提示血必净可减轻甲型流感重症肺炎小鼠的肺损伤。模型组与血必净组肺病毒载量无统计学意义($P > 0.05$),提示血必净并无抑制病毒复制的作用。血必净组可于感染后 1 d、3 d 降低 TNF- α 水平($P < 0.05$),于感染后 3 d 降低 IL-6 水平($P < 0.05$)。结论:血必净对流感重症肺炎小鼠有减轻肺损伤及死亡保护趋势,但作用不显著,这可能与血必净并无直接抗病毒,但能调节感染早期 TNF- α 、IL-6 等细胞因子水平的作用有关。

关键词 流感;甲型 H1N1;中医药;血必净注射液

Study on Treatment of Influenza A H1N1 Induced Severe Pneumonia by Xuebijing Injection

Ma Yuexia¹, Shan Minmin¹, Guo Yali², Wang Yuguang²

(1 The TCM. Hospital of Beijing Huairou, Beijing 101400, China; 2 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To observe the efficacy of Xuebijing Injection on mice with severe pneumonia induced by influenza A virus and to explore the pathogenesis on mice with severe pneumonia. **Methods:** C57BL/6 mice were random grouped into three parts including normal group, model group and Xuebijing group. Mice in normal group were given 20 μ L PBS by intranasal administration, while the model group 2×10^5 TCID₅₀/20 μ L H1N1 virus in the same method. Mice in Xuebijing group were inoculated virus as volume as model group and then given injecta intraperitoneally daily for 5 days. Survival rate, weight changes, viral load, acute pulmonary edema (lung wet-to-dry ratio) and lung histopathology at different time points were measured to evaluate the efficacy of Xuebijing injection on severe influenza and to study its pathogenesis. **Results:** The survival rate in model group was 30% with notable weight loss. The acute lung edema calculated by wet-to-dry ratio went up clearly compared with that in model group ($P < 0.05$). Lung histopathology of model group indicated the success of severe pneumonia mice model showing that there were diffuse inflammatory cell infiltration, shedding and necrosis of alveolar epithelial cells, degeneration of bronchial epithelial cells, pulmonary edema and hemorrhage. The survival rate in model group was 60% superior to model group with light weight lose. Wet-to-dry ratio was alleviated in Xuebijing group, but with no statistical differences ($P > 0.05$). The manifestation of lung histopathology in Xuebijing group was as same as model group but the degree of lung injury in this group was eased dramatically. There was no difference in viral load between model group and Xuebijing group ($P > 0.05$). It indicated that Xuebijing had no effect on inhibiting the replication of the influenza virus. It could reduce the level of TNF- α at one and 3 days post infection ($P < 0.05$) and the level of IL-6 of 3 days infection ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xuebijing could alleviate lung injury of severe pneumonia mice and have the tend of protecting those mice. But the protective effect was not prominent which may be related with its no effect on inhibiting virus but its regulation of some early cytokines, such as TNF- α and IL-6.

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

作者简介:马月霞(1985—),女,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,E-mail:wygzhyiaids@126.com,电话:(010)52176039

Key Words Influenza; Traditional Chinese Medicion; Xuebijing injection
中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.023

自 2009 年 4 月墨西哥首次爆发 H1N1 猪流感 (the Pandemic H1N1 2009 virus, pH1N1) [1], 全球因感染 H1N1 猪流感总死亡病例达 18449 例, 其死因主要为重症肺炎和呼吸窘迫综合征 (ARDS)。因此, 积极有效的抗感染、缓解肺炎症状成为流感重症肺炎的治疗关键。王今达教授针对重症感染提出了“菌毒炎并治”理论, 其代表药物血必净注射液联合常规抗感染方案治疗重症肺炎, 临床研究显示具有缓解症状、缩短病程的疗效 [2]。我们在本文旨在研究血必净注射液单用治疗小鼠甲型 H1N1 流感重症肺炎的效果, 并初步探讨其作用机制, 为血必净注射液的临床应用提供理论依据。

1 材料

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 血必净注射液 (批号: 1301201), 规格为 10 mL/支, 天津红日药业股份有限公司。

1.4 其余试剂 均购自军事医学科学院药品器材供应站。

2 方法

2.1 实验分组 雌性 C57BL/6 小鼠, 体重 14 ~ 16 g, 随机分为正常组、模型组、血必净组, 其中正常组小鼠在乙醚轻度麻醉后, 用 20 μ L PBS 滴鼻, 模型组、血必净组小鼠乙醚轻度麻醉后, 2×10^5 TCID₅₀/20 μ L 病毒液滴鼻感染。血必净组在造模前 24 h 开始腹腔注射 0.1 mL/d, 于感染后第 5 d 停止给药; 正常组、模型组小鼠均腹腔注射磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.1 mL/d。

2.2 保护率及体重的测定 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。

2.3 肺病毒载量的测定 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, 按肺重 (g): 无血清 DMEM (mL) = 1: 15 的比例, 置匀浆机中匀浆, 匀浆后置试管中离心 (4 $^{\circ}$ C, 3 000 r/min) 15 ~ 20 min, 去除沉淀, 取上清, 置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中待用,

应用 CCID₅₀ 的方法检测病毒滴度。

2.4 肺湿干比的测定 每组小鼠 5 只。感染后第 5 天, 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)。肺湿干比是用以反映肺水肿严重程度的重要指标。

2.5 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。

2.6 TNF- α 、IL-6 的检测 分别于感染后 6 h、1 d、3 d、5 d、7 d 每组各处死 5 只小鼠, 小鼠处死后应用灭菌生理盐水进行支气管肺泡灌洗 (BALF), 每次注入 0.6 mL。反复灌洗 5 次, 回收液注于 1.5 mL EP 管中, 每只小鼠 BALF 的回收率应大于 80%。应用 ELISA (酶联免疫吸附测定) 试剂盒检测回收液中 TNF- α 、IL-6。

2.7 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。

3 结果

3.1 血必净对感染 H1N1 流感病毒的小鼠保护率测定 14 d 观察期结束时, 正常组 10 只小鼠全部存活。结果见表 1 和图 1, 模型组小鼠自感染第 6 d 起开始死亡, 观察期结束后 10 只小鼠存活 3 只, 存活率为 30%, 与正常组相比有统计学意义 (*P* < 0.05)。血必净组小鼠自感染第 7 d 起开始死亡, 10 只小鼠存活 6 只, 存活率为 60%, 优于模型组, 但二者无统计学意义 (*P* > 0.05)。由此可见, 血必净对甲型流感重症肺炎小鼠并无有效的死亡保护作用, 但有一定的死亡保护趋势。

表 1 小鼠感染 BJ501 病毒后的存活情况

分组	存活数/总数	存活率	<i>P</i> 值
正常组	10/10	100%	-
模型组	3/10	30%	0.026 *
血必净组	6/10	60%	0.277 Δ

注: 模型组与正常组比较, * *P* < 0.05; 模型组与血必净组比较, Δ *P* < 0.05 有统计学意义。

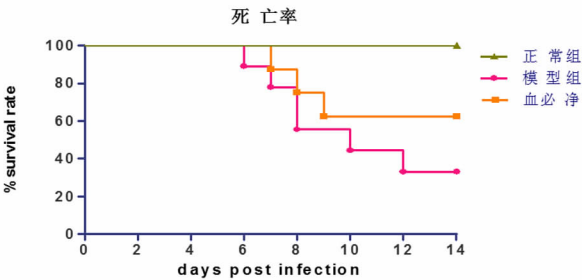


图 1 小鼠感染 BJ501 病毒后的存活情况

3.2 小鼠体重变化测定 正常组小鼠精神良好,体重稳定上升。模型组、血必净组小鼠均于感染 BJ501 后第 3 d 开始精神萎靡,体重大幅下降。血必净组小鼠状态、体重均优于模型组,说明血必净对小鼠有一定的治疗作用。结果见图 2。

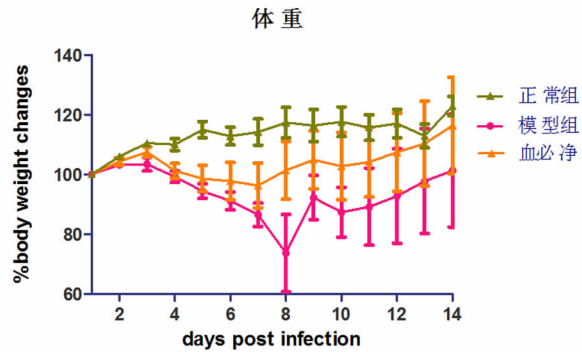


图 2 小鼠感染 BJ501 病毒后各组小鼠体重变化

3.3 小鼠肺部病毒载量的测定 感染后第 4 d,处死小鼠,应用 CCID₅₀ 的方法检测小鼠肺部病毒载量。由图 3 可见,模型组小鼠肺病毒载量为 2.85 ± 0.45 CCID₅₀,血必净组小鼠肺病毒载量为 2.79 ± 0.32 CCID₅₀,模型组与血必净组病毒载量无统计学意义 ($P > 0.05$)。

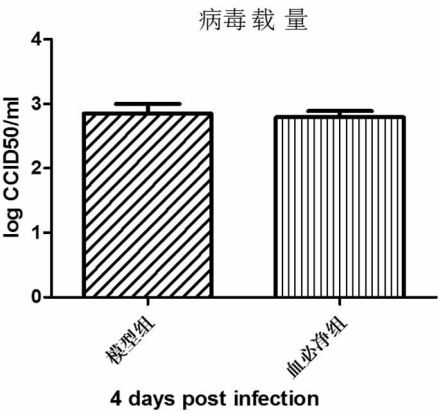


图 3 小鼠肺病毒载量

3.4 小鼠肺湿干比的测定 小鼠感染后 5 d 处死,解剖小鼠并取肺组织,称量肺湿重,干燥 72 h 后称量其干重,计算湿干比,结果见表 2 和图 4。模型组

与正常组肺湿干比具有统计学意义 ($P < 0.05$);血必净组小鼠肺湿干比低于模型组,但无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 小鼠感染第 5 天的肺湿干比

分组	肺湿干比	P 值
正常组	4.50 ± 0.08	—
模型组	5.54 ± 0.65	0.022 *
血必净组	5.15 ± 0.26	0.243 [△]

注:模型组与正常组比较,* $P < 0.05$;模型组与血必净组比较,[△] $P < 0.05$ 有统计学意义。

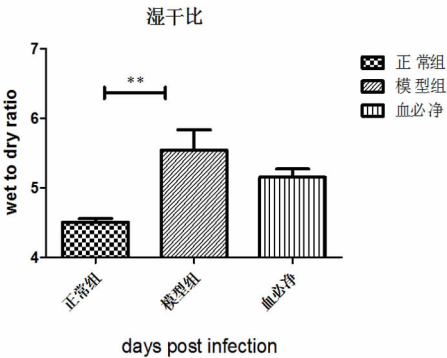


图 4 小鼠感染第 5 天的肺湿干比

3.5 血必净注射液对流感病毒感染小鼠肺部病理的影响 感染后第 5 天,处死 3 只、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。结果由图 5 可见,正常组镜下观察,组织、细胞结构完整,无炎症细胞浸润;模型组镜下可见弥漫性炎症细胞浸润,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;血必净组炎症细胞浸润较模型组少,肺泡上皮细胞脱落、坏死,支气管周围肺水肿、瘀血和出血程度较模型组轻。

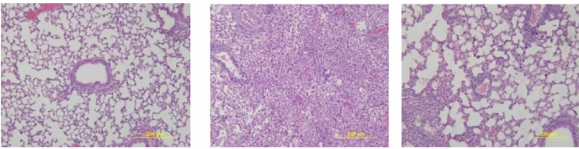


图 5 小鼠感染第 5 天的肺病理 (HE 染色,200 ×)

3.6 TNF- α 、IL-6 的检测 感染后 6 h、1 d、3 d、5 d、7 d 处死小鼠,检测小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6 的含量。由图 6 可见,模型组小鼠,TNF- α 水平在感染后 6 h、1 d、3 d 较高,5 d、7 d TNF- α 水平下降;IL-6 水平自感染后 6 h 至感染后 7 d 持续升高。血必净组,TNF- α 水平在感染后 1 d、3 d 较模型组持续下降,有统计学意义 ($P < 0.05$);IL-6 水平仅在感染后 3 d 低于模型组,有统计学意义 ($P < 0.05$)。感染后 5 d,血必净停止给药,TNF- α 、IL-6 水平回升。

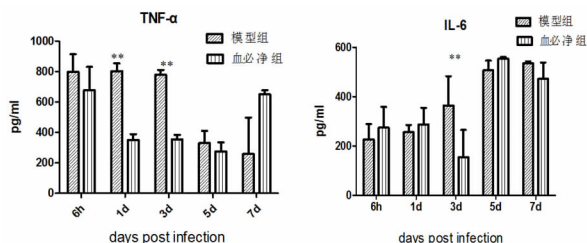


图6 小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6 的含量

4 讨论

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,具有传染性强、发病率高、死亡率高等特点。其中,住院确诊甲流患者^[3-4],影像学检查肺炎占 40% ~ 66%,而肺炎患者中 22.9% ~ 42% 可进展为 ARDS,是重症流感的主要死因。重症流感的发病机制主要为细胞因子风暴导致的免疫失衡^[5],临床研究显示,与轻症流感相比,重症患者 IL-6、IL-8、TNF- α 等细胞因子显著高表达,且与预后密切相关^[6]。流感属中医“外感热病”范畴,具有温热病性质,在发病过程中有热邪燔灼、热迫血溢和耗气伤津的病理表现,其中,疫毒蕴结,热邪煎熬,形成血瘀和瘀血,在重症患者中表现显著^[7]。临床观察表明,早期配合应用活血化瘀之品可减少重症流感患者肺部炎性渗出、出血等,对阻止病灶扩散,加快病灶吸收有重要作用。

血必净注射液属活血化瘀类药,由红花、赤芍、川芎、丹参、当归组成,其药理机制包括抑制中性粒细胞,减少炎症介质的释放^[8-9];免疫调节作用^[10];凝血和抗凝血功能的调节^[11-12]。临床上,血必净注射液联合常规治疗早期应用对急性呼吸窘迫综合征及重症肺炎患者有缩短病程、改善症状等保护作用,这可能与血必净不仅能改善血流灌注状态^[13-14],亦能清除过度炎症相关因子^[15],从而减轻肺损伤有关。但血必净对流感病毒性重症肺炎的研究较少,其疗效和机制均不明确。

本研究结果显示,血必净对流感重症肺炎小鼠有死亡保护趋势,且血必净组小鼠体重优于模型组,这与血必净组小鼠肺水肿、肺病理损伤均轻于模型组的结果一致。但血必净组与模型组感染后 4 d 病毒载量无差异,血必净组感染后 1 d TNF- α 的水平,感染后 3 d TNF- α 、IL-6 的水平均低于模型组,由此可见,血必净可能是通过降低 TNF- α 、IL-6 的水平发挥间接抗病毒作用,而非直接抑制病毒

复制。本研究首次证实了活血化瘀药血必净注射液对流感重症病毒性肺炎有保护趋势,且可能通过调节不同时间点 TNF- α 、IL-6 等细胞因子的水平而发挥作用,对临床重症流感中医辨证治疗具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus[J]. Nature, 2009, 459(7249): 931-939.
- [2] 孙定卫, 何平, 陈建南, 等. 血必净注射液联合抗生素治疗重症肺炎 32 例疗效观察[J]. 海南医学, 2010, 21(16): 30-31.
- [3] Denholm JT, Gordon CL, Johnson PD, et al. Hospitalised adult patients with pandemic (H1N1) 2009 influenza in Melbourne, Australia[J]. The Medical journal of Australia, 2010, 192(2): 84-86.
- [4] Chien YS, Su CP, Tsai HT, et al. Predictors and outcomes of respiratory failure among hospitalized pneumonia patients with 2009 H1N1 influenza in Taiwan[J]. The Journal of infection, 2010, 60(2): 168-174.
- [5] Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection[J]. Cell, 2011, 146(6): 980-991.
- [6] Hagau N, Slavcovic A, Gongnan DN, et al. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection[J]. Critical care: the official journal of the Critical Care Forum, 2010, 14(6): R203.
- [7] 张伟, 王玉光, 刘清泉, 等. 123 例甲型 H1N1 流感重症、危重症中医证候特征及病因病机分析[J]. 中医杂志, 2011, 52(1): 35-38.
- [8] 刘龙, 蔡国良. 血必净注射液对重症肺炎患者血清中 IL-6、IL-10 的影响[J]. 西部医学, 2011, 23(10): 1862-1864.
- [9] 朱志强, 朱庆华, 郑湘予, 等. 血必净对严重感染患者血清 IL-6 水平时效和量效的影响[J]. 天津医药, 2008, 36(10): 748-750.
- [10] 季明霞. 血必净注射液对重症肺炎患者外周血 T 淋巴细胞变化的临床观察[J]. 海峡药学, 2010, 22(2): 74-75.
- [11] 杨立山, 马晓, 李文峰, 等. 血必净注射液对危重患者凝血功能障碍的研究[J]. 宁夏医学杂志, 2012, 34(6): 85-487.
- [12] 耿平, 夏仲芳, 顾健, 等. 血必净注射液对严重脓毒症患者早期高凝状态的干预作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(6): 346-349.
- [13] 郑军, 刘文操. 血必净对急性肺损伤大鼠炎症相关细胞因子的影响[J]. 山西职工医学院学报, 2007, 17(2): 1-3.
- [14] 代建军, 曹书华, 王今达. 血必净对危重病患者血管内皮细胞的保护作用研究[J]. 中国全科医学, 2005, 8(18): 1486-1487.
- [15] 王旭东, 李明, 张超, 等. 血必净治疗 ARDS 疗效及其对炎症相关细胞因子的影响[J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(11): 732-735.

(2014-11-27 收稿 责任编辑:洪志强)