

## 复方中药对禽流感病毒的防治研究

李艳华<sup>1</sup>, 闫清波<sup>1</sup>, 于康震<sup>2</sup>, 佟恒敏<sup>1</sup>, 孙元<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; <sup>2</sup>中国兽医药品监察所, 北京 100081)

**摘要:** 【目的】探讨自行研制的由贯众、板蓝根、黄芪、柴胡、连翘、黄连、金银花、黄芩及甘草配制的复方中药在体内、体外对禽流感病毒的抑制作用、药物代谢动力学、急性毒性试验及对 SPF 鸡免疫功能的影响。【方法】在鸡胚、MDCK 细胞上进行复方中草药对 H5N1 和 H9N2 亚型禽流感病毒的直接灭活作用、治疗作用和预防作用; 在体内通过药物累计法研究复方中药在昆明鼠体内的药物代谢动力学; 采取口服和腹腔注射两种给药途径研究复方中药对昆明鼠的急性毒性试验; 通过免疫器官的指数、在 FAC 上测量 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>及 TCR<sup>+</sup>的含量及采用血凝抑制 (HI) 方法检测血清中 H9 亚型禽流感抗体滴度研究复方中草药的对 SPF 鸡免疫功能的影响; 通过体外试验研究其对 H5N1 禽流感病毒的治疗作用。【结果】该复方药物在鸡胚内对 H5N1 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度、治疗浓度及预防浓度分别是 31.25 mg·ml<sup>-1</sup>、125 mg·ml<sup>-1</sup>及 250 mg·ml<sup>-1</sup>, 对 H9N2 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度、治疗浓度及预防浓度分别是 31.25 mg·ml<sup>-1</sup>、15.625 mg·ml<sup>-1</sup>及 62.5 mg·ml<sup>-1</sup>; 在 MDCK 上对 H5N1 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度及预防浓度分别是 31.25 mg·ml<sup>-1</sup>、125 mg·ml<sup>-1</sup>, 治疗浓度未测出。对 H9N2 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度、治疗浓度及预防浓度分别是 15.625 mg·ml<sup>-1</sup>、31.25 mg·ml<sup>-1</sup>及 31.25 mg·ml<sup>-1</sup>; 其在小白鼠体内的经时过程为一室模型。其药-时方程式为:  $C=650.66e^{-4.9078t}$ ; 口服复方中药后对昆明小鼠无毒; 腹腔注射复方中药后对昆明小鼠的半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 为 425.6 mg·kg<sup>-1</sup>; 给药后 21 d, CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>及 TCR<sup>+</sup>的含量分别为 64.01%、27.39%、45.05%和 32.19%; 免疫后半个月, 给药-免疫组的禽流感抗体滴度比免疫组高 1.6 个滴度; 同群感染组中, 该复方中药预防组的保护率达 30%, 而治疗组为 20%; 【结论】体外试验表明, 复方中药不仅对禽流感病毒有直接灭活作用, 而且对吸附于细胞表面和进入细胞内的禽流感病毒都有抑制作用; 其药物代谢动力学特征是吸收快、消除慢; 该复方中药不仅安全、而且能增强鸡的体液免疫、细胞免疫功能、增加免疫器官指数。体内试验表明, 该复方中药能延长鸡的平均死亡时间, 预防效果强于治疗效果。总之, 自行研制的复方中药具有预防、安全、延长感染鸡的存活时间、增强机体免疫力的作用。

**关键词:** 禽流感病毒; 复方中药; 防治; 药物代谢动力学; 安全性; 免疫功能

## Study of the Compound Chinese Medicine Against the Anti-avian Influenza Virus

LI Yan-hua<sup>1</sup>, YAN Qing-bo<sup>1</sup>, YU Kang-zhen<sup>2</sup>, TONG Heng-min<sup>1</sup>, SUN Yuan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

<sup>2</sup>China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

**Abstract:** 【Objective】To research the inhibiting effects of compound Chinese medicine against the avian influenza virus *in vivo* and *in vitro*, its pharmacokinetics and acute toxicity test, its effects on immune function of SPF chicken. 【Method】The effects of direct inactivation, preventive and therapeutic effects of compound Chinese medicine on the anti-avian influenza virus were studied on chicken embryo and MDCK cell. Its pharmacokinetics were studied by drug residual accumulation. The acute toxicity test of the compound Chinese medicine was studied by oral administration and intraperitoneal injection on Kunming mice. The effects of

收稿日期: 2007-03-26; 接受日期: 2008-02-04

基金项目: 国家“863”计划(2006AA10Z224-1)和国家自然科学基金重点项目(40431001)

作者简介: 李艳华(1970-), 女, 黑龙江密山人, 副教授, 博士, 研究方向为病原微生物耐药性的研究与新兽药的研发。Tel: 0451-55190790; E-mail: liyanhua1970@163.com。通讯作者于康震(1960-), 男, 江苏沛县人, 研究员, 研究方向为动物病毒学、传染病学。Tel: 010-62158844; E-mail: szmail@ivdc.gov.cn。通讯作者佟恒敏(1939-), 女, 辽宁沈阳人, 教授, 研究方向为兽医药理学与毒理学。Tel: 0451-55190266

the compound Chinese medicine on immune function of SPF chicken was studied by means of the indexes of immune organs in chickens, the contents of CD3, CD4, CD8 and  $\gamma\delta$ TCR by FAC and antibody titer of avian influenza virus detected in HI method.

【Result】The effective inactivate concentration, therapeutic concentration and preventive concentration of the compound Chinese medicine against the H5N1 and H9N2 avian influenza virus was  $31.25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $125 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  and  $250 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $31.25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $15.625 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  and  $62.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  on chicken embryo, respectively. The effective inactivate concentration, preventive concentration of the compound Chinese medicine against the H5N1 avian influenza virus was  $31.25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $125 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , but the therapeutic concentration was not detected, and  $15.625 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $31.25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  and  $31.25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  against H9N2 on the MDCK, respectively. The concentration-time curves fitted the one compartment model and its equation was  $C=650.66e^{-4.9078t}$ . The study of acute toxic experiments on mouse was as follows: After oral administration the compound medicine was safe. After intraperitoneal injection administration, the  $LD_{50}$  was  $425.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{bw}$ . The contents of CD3, CD4, CD8 and  $\gamma\delta$ TCR was 64.01%, 27.39%, 45.05% and 32.19% after 21 days, respectively. The antibody titre of administration-immunity group was 1.6 titre higher than that of immunity group. The protective rate of preventive group was 30%, and 20% in the therapeutic group.【Conclusion】The compound medicine has a strong action of direct inactivation, preventive and therapeutic effects on the anti-avian influenza virus *in vitro*. Furthermore, it inhibited avian influenza virus adsorbed in cell surface and entered into intracellular. The pharmacokinetics parameter showed that its elimination was slow. It had a long time and it had long effect in the mouse. It enhanced cellular and humoral immune function and the indexes of immune organs in chickens. It could prolong the mean death time of chicken and took effect on the chicken challenged the subtype H5N1 of highly avian influenza virus *in vivo*. The compound Chinese medicine is preventive and safe, prolongs the mean death time of chicken and strengthens the immunity of chickens.

Key words: Avian influenza virus; Compound Chinese medicine; Preventive and treatment; Pharmacokinetics; Safety; Immune function

## 0 引言

【研究意义】禽流感 (avian influenza) 是由 A 型流感病毒引起的严重危害养鸡业的一种急性接触性传染病。高、低致病力的禽流感给世界各国的养禽业均带来巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 抗原具有多样性, 各亚型之间缺乏坚强的交叉保护作用。由于临床上常用的抗禽流感病毒药物例如盐酸金刚烷胺使产蛋鸡产量下降, 同时 AIV 对其易产生耐药性<sup>[2,3]</sup>, 而病毒唑、病毒灵不仅使产蛋量下降, 而且是人畜共用的药物, 限制了它们在临床的应用。此外由于药物残留问题已经限制了中国动物源性食品的出口, 所以开发出一种绿色、无污染、安全、有效、畜禽专用的抗禽流感病毒药物已迫在眉睫。该药物的研制不仅可以解决处在亚临床状态鸡群的免疫问题<sup>[4]</sup>, 而且是有效预防禽流感的途径之一。【前人研究进展】中草药在中国资源丰富, 价格低廉。相对于化学合成药物而言, 中草药有多种有效成分, 不仅具有毒性低、不易产生副作用、多靶点、病原微生物对其不易产生耐药性的优点, 而且在抗菌抗病毒的同时, 还能促进动物生长, 增强动物的免疫机能, 提高机体抗病力。目前, 国内研究的抗流感病毒中草药大多数是解表药和清热药以及以他们为主药组成的中成药, 受到国内外学者的关注<sup>[5-10]</sup>。【本研究切入点】

禽流感和人流感有密切的相关性, 目前分离的禽流感病毒, 几乎包罗全部人流感病毒的两种表面抗原, 从感染流感的家禽体内能分离到人流感病毒并能检测到相应的抗体。近几年来, 禽流感已经给世界各国带来了巨大的经济损失, 中草药是中国最有可能获得自主知识产权的一大类药物, 具有较强的竞争力和市场潜力, 所以开展对抗禽流感病毒中草药的研究已势在必行。【拟解决的关键问题】本试验对自行研制的抗禽流感病毒复方药物进行体外试验, 毒性试验、药代动力学试验及对 SPF 鸡免疫功能影响的试验, 从而为临床应用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试试剂和病毒

复方中兽药, 为黄褐色透明澄清液体, 自行研制含量  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的生药, 由贯众、板蓝根、黄芪、柴胡、连翘、黄连、金银花、黄芩及甘草 9 味组成。对照组盐酸金刚烷胺购于东北制药总厂; H5N1 和 H9N2 亚型的禽流感病毒、MDCK 细胞由中国农业科学院动物流感中心提供; 细胞培养板 (24, 96 孔)、DMEM 购于 Gibco 公司; SPF 鸡胚、8 周龄 SPF 鸡由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供; 淋巴细胞分离液购自中国医学科学院血液学研究所; FITC 标记的 CD3 购自 Southern Biotechnology Associates.

Inc 公司, FITC 标记的 CD4、CD8、TCR 由乔传玲博士后、姜永萍博士惠赠。H9 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感开放实验室提供, FACScanTM (Flow cytometer BDIS, San Jose, CA), Beckman 离心机等。

## 1.2 药物无毒剂量测定

1.2.1 药物对鸡胚的最大无毒剂量 取上述复方药液的多个稀释度接种 5 个 10 日龄鸡胚 (0.2 ml/胚), 同时设灭菌生理盐水对照, 24 h 以内死亡鸡胚弃掉, 24 h 后死亡鸡胚及时取出冷冻, 活鸡胚继续孵化直至出雏。

1.2.2 药物对犬肾细胞 (MDCK) 毒性试验 取上述用细胞维持液稀释的不同稀释度的复方中药, 每稀释度接种 4 孔, 每管 1 ml, 并设正常对照管, 每天观察细胞病变, 观察结果。

## 1.3 中草药在鸡胚上抗禽流感病毒试验

1.3.1 中草药与禽流感病毒直接灭活作用 将不同浓度的样品分别与等量  $10^5$  EID<sub>50</sub> 的 H5N1 与  $10^4$  EID<sub>50</sub> 的 H9N2 混匀, 在室温作用 1 h 后, 立即分别接种于 9~10 日龄鸡胚尿囊腔内, 每组 4 枚, 37℃ 孵育 96 h, 分别测定各组鸡胚尿囊液内的血凝效价。同时设生理盐水, 病毒及室温放置 1 h 后的病毒对照<sup>[5,10~13]</sup>。

1.3.2 中草药在鸡胚上对禽流感病毒的治疗作用 将 9~10 日龄鸡胚分组, 4 个/组, 先分别接种  $10^4$  EID<sub>50</sub> H9N2 和  $10^5$  EID<sub>50</sub> H5N1 0.1 ml, 接种于尿囊腔内, 37℃ 孵化 1 h 后, 接种各稀释度的复方中药, 37℃ 孵化 96 h。测定每组鸡胚尿囊腔中病毒的血凝效价。

1.3.3 中草药在鸡胚上对禽流感病毒的预防作用 先依法接种药物, 后接种病毒, 操作方法同上。

## 1.4 中草药在 MDCK 上抗禽流感病毒试验

1.4.1 中草药与病毒相混立即加入细胞 将不同稀释度、不同中草药 (在最大无毒剂量基础上) 与等体积  $10$  TCID<sub>50</sub> H9N2 和 H5N1 混合作用 1 h 后, 立即接种细胞, 并同时设病毒对照, 正常细胞和药物对照。

1.4.2 中草药在 MDCK 上对禽流感病毒的预防作用 先用不同稀释度、不同中草药 37℃ 处理细胞 1 h 后, 按 1.3.1 中方法加入病毒。同时设病毒对照, 正常细胞和药物对照。

1.4.3 中草药在 MDCK 上对禽流感病毒的治疗作用 先接种  $10$  TCID<sub>50</sub> H9N2 和 H5N1 病毒感染细胞, 在 37℃ 孵化 1 h, 按 1.3.1 中方法加入各稀释度不同中药。同时设病毒对照, 正常细胞和药物对照。

1.4.4 结果判定 在鸡胚内, 能抑制血凝滴度 32 倍

以上的最小药量, 即为有效药物浓度。在 MDCK 细胞系统内, 不引起细胞病变的药物浓度为有效的药物浓度<sup>[6]</sup>。

## 1.5 急性毒性试验一半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 的测定

采取口服和腹腔注射两种给药途径。口服剂量为 330 mg/10 g bw, 口服组组间剂量比为 1 : 0.8, 试验共分 7 组, 其中一组为对照组, 10 只/组; 连续观察 7 d, 并称量体重。腹腔注射组注射剂量为 50 mg/10 g bw, 组间剂量比为 1 : 0.75, 试验共为 6 组, 其中一组为对照组, 10 只/组。腹腔注射后, 死亡动物及时剖检并取心、肝、脾、肾、肺做病理切变, 观察其病理变化。采用简化机率单位计算法计算 LD<sub>50</sub>。

## 1.6 复方药代动力学的研究<sup>[14]</sup>

1.6.1 给药剂量及给药时间的确定 取 CD<sub>5</sub>~CD<sub>35</sub> 内剂量。本试验取 CD<sub>11</sub> 的剂量即 125 mg·kg<sup>-1</sup> bw 两次相同量用药。取 0.5、1、2、4、8、12 h 6 个时间点再次给药。

1.6.2 动物分组 按性别、体重等组间一致原则将小鼠分为 6 组, 每组 20 只, 第一次给药后不同时间第二次用药, 观察 2 次用药后的死亡率 (不再出现死亡为止)。腹腔注射药液容量为 0.5 ml, 125 mg·kg<sup>-1</sup> bw。

1.6.3 计算方法 由表查出各死亡率的几率单位, 按 D-P 直线找出死亡率的相应剂量, 按下列计算药量的体存%。

$$\text{体存率}\% = (\text{死亡率相应的函数剂量} - \text{第二次用量}) / \text{第一次用量} \times 100\%$$

式中第一次和第二次用量在本试验中是相等的。就间隔时间与体存率、log 体存率作图, 即得出一次用药后体存率%的动态变化。此变化若符合一级动力学规律, 则按 MCPKP 程序拟合药时曲线, 也就是以体存%和时间的数据经 MCPKP 程序进行拟合<sup>[14]</sup>。

## 1.7 复方中药对 SPF 鸡免疫功能的影响

将 1 日龄 80 羽 SPF 鸡随机分成 4 组, 每组 20 羽, 统一饲喂相同的全价饲料。两组 40 只鸡从 1 日龄起 0.5% 复方中药饮水, 其中 20 只鸡 15 日龄免 H9 亚型的禽流感油乳剂灭活疫苗。其余 20 只作为给药组; 其余 40 只鸡中, 20 只 15 日龄免 H9 亚型的禽流感油乳剂灭活疫苗, 为疫苗对照组; 另外 20 只为空白对照组。从 15 日龄开始, 22 d、29 d 随机抽取发育正常的 5 羽鸡, 按常规方法解剖, 分离并测定胸腺、脾脏、法氏囊免疫器官的指数 (免疫器官重量除以相应鸡体重求得各脏器指数)。了解免疫器官生产发育情况。在 21 日龄, 从 4 组试验鸡中随机挑选 5 只, 心脏采 2 ml

肝素抗凝血。在 FAC 上测量 CD3、CD4、CD8 及  $\gamma\delta$ TCR 的含量。采用血凝抑制 (HI) 方法检测血清中禽流感抗体滴度。

### 1.8 复方中药防治 SPF 鸡感染禽流感病毒的试验

试验共分 5 组, 第 I 组是中药治疗组, 共 18 只 8 周龄 SPF 鸡。18 只鸡同时给予 0.5% 的中药饮水。其中 8 只给药同时攻击 H5N1 亚型禽流感病毒, 攻毒剂量为  $10^4$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml, 肌肉注射 0.2 ml。另外 10 只不攻毒, 以便模拟鸡场鸡群自然感染及给药后的治疗情况。

第 II 组是盐酸金刚烷胺对照组, 共 17 只 8 周龄 SPF 鸡。17 只鸡同时给予 0.1% 的盐酸金刚烷胺饮水。其中 7 只攻毒同时给药, 攻毒剂量为  $10^4$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml, 肌肉注射 0.2 ml。另外 10 只不攻毒, 以便模拟鸡场鸡群在给予盐酸金刚烷胺后的治疗情况。

第 III 组是中药预防组。试验用鸡 12 只 8 周龄 SPF 鸡, 12 只鸡均在攻毒前 15 d 给予 0.5% 的中药。其中 6 只攻毒, 攻毒剂量为  $10^4$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml, 肌肉注射 0.2 ml/只。另外 6 只不攻毒, 以便模拟鸡场鸡群在给予复方中药后的预防及治疗情况。

从攻毒开始连续观察 14 d, 观察并记录鸡的死亡数, 然后计算死亡率, 保护率、平均存活时间。在攻毒后 3、5、7d 采集泄殖腔、喉头棉拭子, 采集的棉拭子用灭菌生理盐水配成  $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$  悬液, 尿囊腔接种在 9~10 日龄 5 只 SPF 鸡胚内, 在 37℃ 孵育 48 h, 按照微量红细胞凝集法, 检查鸡胚尿囊液中血凝活性。如具有血凝活性, 通过血凝抑制试验在排除新城疫病毒感染的前提下, 说明有禽流感病毒的存在。

第 IV 组是对照组。对照组分 3 组。一组为攻毒组, 攻毒剂量同其它组, 共 8 只 SPF 鸡, 另外一组为 7 只 SPF 鸡同群感染组, 最后一组未感染病毒对照组, 由 4 只 SPF 鸡组成。

## 2 结果与分析

### 2.1 复方药物最大无毒剂量测定

药物对鸡胚、MDCK 的无毒剂量分别是 1 000 和 62.5 mg·ml<sup>-1</sup>。

### 2.2 复方药物体外抗病毒的作用

2.2.1 复方药物在鸡胚内对禽流感病毒的作用 复方药物在鸡胚内对 H5N1 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度、治疗浓度及预防浓度分别是 31.25、125 及 250 mg·ml<sup>-1</sup>, 对 H9N2 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度、治疗浓度及预防浓度分别是 31.25、15.625 及 62.5 mg·ml<sup>-1</sup>。

2.2.2 复方药物在 MDCK 上对禽流感病毒的作用 复方药物在 MDCK 上对 H5N1 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度、预防浓度分别是 31.25 和 125 mg·ml<sup>-1</sup>, 治疗浓度未测出。对 H9N2 亚型禽流感病毒的有效灭活浓度、治疗浓度及预防浓度分别是 15.625、31.25 及 31.25 mg·ml<sup>-1</sup>。

### 2.3 复方药物的安全性研究

2.3.1 复方中药口服组对小白鼠的急性毒性试验 复方中药口服后, 没有引起小白鼠的死亡。但在高剂量时有体重减轻的趋势。

2.3.2 复方中药腹腔注射后对小白鼠的急性毒性试验 小白鼠腹腔注射中药 10 min 后, 即表现出兴奋不安, 痉挛, 缩成一团, 呼吸困难, 在给药后 0.5 h 出现死亡。对死亡鼠各脏器进行剖检: 肝脏体积稍肿大, 被膜紧张, 边缘钝圆, 表面呈暗紫红色, 切面呈暗红色, 质地变软。脾、肾脏体积均增大。按照剂量的减少, 死亡率也相应减少, 而且脏器病变也逐渐降低。经组织学病理切片后可以看出各脏器的病理变化与剂量呈一定的关系。用简化几率单位计算法 (亦称和尔恩法) 计算 CD<sub>50</sub>。该复方中药经腹腔注射后, 对小白鼠的 CD<sub>50</sub> 为 425.6 mg·kg<sup>-1</sup> bw。

### 2.4 复方药代动力学试验

根据小白鼠死亡率计算体存药物量, 通过 MCPKP 程序对体存百分率与间隔时间拟合后, 计算药代动力学参数及药-时方程。该复方药物在小白鼠体内的经时过程为一室模型。其药-时方程式为:  $C=650.66e^{-4.9078t}$ , 药代动力学参数见表 1。

表 1 复方中药在小白鼠体内的表观药代动力学参数

Table 1 Pharmacokinetics parameter of the compound Chinese medicine in mouse

参数 Parameters	单位 Unit	数值 Value
初始浓度 Co	μg·ml <sup>-1</sup>	622.547
吸收速率常数 Ka	1/nrs	4.9078
消除速率常数 Kel	1/nrs	0.1501
吸收相半衰期 T1/2	h	0.1412
消除相半衰期 T1/2β	h	4.6176
Tp	h	0.733
达峰浓度 Cmax	μg·ml <sup>-1</sup>	557.69
曲线下面积 AUC	mg·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	4148.1
滞后时间 Lagtime	h	0
Tcp (ther)	h	70.592
表观分布容积 V	L·mg <sup>-1</sup>	10.039
消除率 D	L·h <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	1.507

## 2.5 复方中药对 SPF 鸡免疫功能的影响

2.5.1 复方中药对免疫器官指数的影响 复方中药饮水组的法氏囊指数、脾脏指数、胸腺指数在 14 日龄明显高于对照组。

2.5.2 复方中药对雏鸡血清中禽流感抗体滴度的影响 在免疫后半个月, 给药组+免疫组的禽流感抗体滴度比免疫组高 1.6 个滴度。

2.5.3 复方中药对 SPF 鸡体重变化的影响 给药组的体重明显高于对照组, 其中在第 21 天时重量差异显著。

2.5.4 不同的外周血液中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、TCR<sup>+</sup>T 淋巴细胞变化 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、TCR<sup>+</sup>T 淋巴细胞的变化情况见表 2。

## 2.6 复方中药防治 SPF 鸡感染禽流感病毒的试验

表 2 复方中药对外周血液中 T 淋巴细胞的影响 (百分比)

Table 2 Influence of the compound Chinese medicine on T lymphocyte on peripheral blood (percentage)

组别 Group	动物数 No.	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	TCR <sup>+</sup>
I	5	31.25±5.68	21.49±3.42	14.56±4.57	11.46±1.39
II	5	36.57±4.56	30.74±1.98	28.12±9.16	26.27±2.56
III	5	63.61±7.65	29.69±6.79	35.58±8.17	33.186±5.66
IV	5	64.01±4.32	27.39±5.79	45.05±6.32	32.19±4.47

I 组为空白对照组; II 组为疫苗免疫组; III 组为疫苗+给药组; IV 组为给药组

I. CK; II. Immune group; III. Vaccine+MDCK; IV. MDCK group

2.6.1 保护作用 除未感染病毒对照组外, 感染病毒组均有鸡只死亡。

(1) 中药对感染病毒组的保护作用 在攻毒同时给予药物的试验组保护率均低于同群感染后给药组。复方中药治疗组保护率为 0, 说明其不能完全抑制禽流感病毒在鸡体内的复制与繁殖。而盐酸金刚烷胺组的保护率为 14.3%, 说明盐酸金刚烷胺能起到一定的保护作用。

从平均死亡时间来看, 病毒感染对照组鸡只死亡最快, 其次是中药治疗组、中药预防组、再次是盐酸金刚烷胺组, 最后为对照组。

(2) 同群感染组保护作用 除未感染禽流感病毒对照组以外, 其它组均有鸡只死亡。保护率以盐酸金刚烷胺为最高, 达 33.4%, 其次为复方中药预防组达 30%, 再次是复方中药治疗组为 20%。

## 2.6.2 病毒分离情况

(1) 感染病毒组 对感染病毒组的鸡只在 3、5、7 d 分离病毒。泄殖腔棉拭子、喉头棉拭子分离病毒情况见表 3。

(2) 同群感染组 对同群感染组的鸡只在 3、5、7 d 分离病毒。分别采集泄殖腔棉拭子和喉头棉拭子, 结果见表 4。

## 3 讨论

### 3.1 该复方中药的特点

中药复方是中医临床治病的主要形式和手段, 是中药药学的重要组成部分。中药复方是单味用药的发展, 复方的作用明显优于单味药。禽流感病毒感染后, 极易并发细菌感染, 此外引起全身器官出血性变化, 引起免疫抑制, 所以选用一些抗禽流感病毒效果好的, 且有抗菌作用的复方中药。本方针对发病鸡出现高热、出血、腹泻、饮食欲降低或废绝、免疫力低下等共性,

表 3 病毒感染组泄殖腔棉拭子、喉头棉拭子病毒分离情况

Table 3 Isolation of avian influenza virus of cloacal swabs and throat swabs

	泄殖腔棉拭子病毒分离情况			喉头棉拭子病毒分离情况		
	Isolation of virus from cloacal swabs			Isolation of virus from throat swabs		
	病毒分离率	Isolation rate of virus (%)	EID <sub>50</sub>	病毒分离率	Isolation rate of virus (%)	EID <sub>50</sub>
病毒对照组 Virus control group	100		5.5	100		5.5
中药治疗组 Chinese medicine treatment group	100		3.5	100		4.00
中药预防组 Chinese medicine preventive group	80		3.0	82.8		3.50
盐酸金刚烷胺组 Amantadine control group	75		2.5	85.7		3.02

表 4 同群感染组的泄殖腔棉拭子病毒分离情况

Table 4 Isolation of avian influenza virus of fecal

	泄殖腔棉拭子病毒分离情况			喉头棉拭子病毒分离情况		
	Isolation of virus from cloacal swabs			Isolation of virus from throat swabs		
	病毒分离率	Isolation rate of virus (%)	EID <sub>50</sub>	病毒分离率	Isolation rate of virus (%)	EID <sub>50</sub>
病毒对照组 Virus control group	100		4.75	100		4.5
中药治疗组 Chinese medicine treatment group	70		4.00	80		4.00
中药预防组 Chinese medicine preventive group	50		2.5	66.6		3.0
盐酸金刚烷胺组 Amantadine control group	60		2.0	70		2.5

选用由贯众、板蓝根、黄芪等多组中药组成的复方中药，起到抗病毒防止继发感染的作用。从试验结果可以看出，该药物对高致病力的禽流感有一定的防治作用。

### 3.2 复方药物体外抗禽流感病毒的作用

通过复方药物在 MDCK 上及鸡胚上对禽流感病毒的作用可以初步推断：该复方药物对禽流感病毒不仅有直接灭活作用，还可以进入细胞内发挥抗病毒的作用，究竟是如何发挥抗病毒的作用，其作用机理是什么，尚需进一步的研究。

### 3.3 复方药物对安全性研究

根据世界卫生组织 (WHO) 推荐的外来化合物急性毒性分级标准<sup>[14]</sup>，小白鼠一次口服复方中药后给药剂量大于 40 000 mg·kg<sup>-1</sup>bw，为无毒。腹腔注射复方中药后其半数致死量 CD<sub>50</sub> 为 425.6 mg·kg<sup>-1</sup>bw。属于低毒。小白鼠口服复方中药后的 CD<sub>50</sub> 与腹腔注射后 CD<sub>50</sub> 相差很大。其原因可能是药物经过消化道后，有毒物质被分解为无毒物质进入血液循环。而腹腔注射后，药物直接以原型的形式进入血液循环，引起全身中毒。这一假设还需进一步试验证明。

### 3.4 复方中药对雏鸡免疫功能的影响

**3.4.1 复方中药对雏鸡免疫器官发育的影响** 在正常生理情况下，动物机体的免疫器官重量增加，主要因为这些免疫器官自身细胞生长发育、分裂增殖形成；而重量减少，则是这些器官成熟的细胞释放入血或自身细胞停止生长发育、分裂增殖所致<sup>[15-17]</sup>。给药组雏鸡胸腺、法氏囊和脾脏等免疫器官指数均高于空白对照组，说明免疫系统成熟较快<sup>[18]</sup>。所以该复方中药可促进 SPF 雏鸡免疫器官的发育和迅速成熟，使 SPF 鸡免疫功能增强，抵抗各种病原微生物感染，提高抗应激能力。

**3.4.2 复方中药对 SPF 鸡 T 淋巴细胞的影响** 本试验初步进行雏鸡服用复方中药后对 T 淋巴细胞亚群的影响。CD3<sup>+</sup> 是存在于所有成熟 T 淋巴细胞表面，是鉴定和区别 T 淋巴细胞的主要表面标志，它代表着整个机

体细胞免疫功能的状态。本试验中，给药组和疫苗组+给药组的 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞含量明显高于对照组，所以雏鸡在 1 日龄服用该复方中药后，可以显著提高鸡群的细胞免疫。CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞具有诱导和增强机体免疫应答的作用，能分泌多种具有免疫活性的淋巴因子，并刺激 B 淋巴细胞的活化、增殖和产生特异性抗体。在本试验中，给药组+免疫组的禽流感抗体比免疫组高也证明这一理论。CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞主要介导细胞毒杀伤作用。给药组+免疫组的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的百分比含量比空白对照组高，说明增加机体通过细胞毒杀伤作用开始抵御和清除细胞内的病原，从而对病毒的侵害起到一定的防御措施，这也是证明该复方中药的抗病毒作用的免疫机理。本试验所用的复方制剂可促进免疫器官中免疫活性细胞的增殖，提高机体细胞免疫和体液免疫机能。这与其它中药的研究报道一致<sup>[19-21]</sup>。

### 3.5 用药物累积法研究复方中药在小白鼠体内的药代动力学

用药物累积法研究药代动力学的方法有两种。第一种是以动物死亡率作为观察指标的“累积法”：即给多组动物按不同间隔时间给药，求出不同时间体存百分率的动态变化情况，从而计算药动学参数<sup>[14]</sup>。第二种是以药物疗效作为观察指标的“累积法”。药物累积法适用于具有一定毒性的中药复方的药动学研究<sup>[22,23]</sup>。利用药物累积法研究药物在体内的动态变化，测算有关药动学参数，其优点是能体现复方配伍的整体性，符合中医用药的基本理论。但其主要适用于毒理与药理效应由同一组分产生的中药复方，而且只能在某种程度上反映毒性成分的药动学规律<sup>[24]</sup>。本试验中，复方中药在小白鼠体内的表观分布容积 (V) 值为 10.039，说明该药与血浆和组织蛋白结合力很高。本复方中药的 Ka 值为 4.9078/h，说明该药吸收快。当腹腔注射后，10 min 即可出现中毒临床症状，0.5 h 后出现死亡的临床表现，从临床症状说明药物很快进入血

液, 发挥作用, 这两者吸收情况是一致的。K<sub>el</sub> 为消除速率常数, 其大小代表药物在体内的消除快慢。本试验中 K<sub>el</sub> 为 0.1501, 表示药物在体内消除速度越慢, 药物浓度下降也慢, 药物在体内存留时间长, 药效也长。综上所述, 该药腹腔注射后, 在小白鼠体内代谢具有吸收快, 消除慢的特点。

### 3.6 复方中药防治 SPF 鸡感染禽流感病毒的试验研究

**3.6.1 复方中药治疗 SPF 鸡感染禽流感病毒的研究** 从各组的保护率结果看出, 盐酸金刚烷胺起到一定的保护作用。从鸡只平均存活时间上看, 也能证实这点。因为盐酸金刚烷胺抑制流感病毒 M<sub>2</sub> 基因, 从而使 M<sub>2</sub> 基因不能行使离子通道功能, 抑制病毒的复制。但是, 低浓度的盐酸金刚烷胺与流感病毒在实验室条件下共同培养时, 极易产生耐盐酸金刚烷胺的病毒<sup>[25]</sup>。这些突变的病毒在遗传上很稳定, 不仅耐盐酸金刚烷胺毒株在禽体内极易分离到, 而且在人体内也极易分离到耐盐酸金刚烷胺的病毒<sup>[25,26]</sup>。当耐盐酸金刚烷胺出现后, 盐酸金刚烷胺很快失去效果, 并且耐盐酸金刚烷胺毒株成为当地的流行毒株<sup>[26]</sup>, 所以, 当耐盐酸金刚烷胺毒株出现后, 不仅可引起治疗失败, 而且还可以在易感宿主体内传播<sup>[3]</sup>。

中国从 1958 年以来, 已经在体外试验筛选到近千种的抗流感病毒的中草药, 但是在动物体内有明确抑制流感病毒作用的还不多见。原因如下: 中草药提取物内含成分非常复杂, 在体外试验中能影响病毒吸附和复制, 但在动物体内有些有效成分被分解, 或者抗流感的有效成分未被吸收, 即使吸收也达不到相应血药浓度, 达不到治疗的效果<sup>[6]</sup>。该复方中药在体外有强的抗禽流感病毒作用, 在体内试验时, 结果不甚理想, 可能是因为该复方中药的使用浓度稍低, 其原因有待于进一步探讨。

**3.6.2 复方中药预防 SPF 鸡感染禽流感病毒的研究** 从试验结果可以看出, 复方中药预防组不论是在攻毒组, 还是在同群感染组, 其死亡保护率及平均存活时间都比复方中药治疗组高。所以本复方中药抑制病毒只是一个方面, 更重要的是调动机体内在能动性, 消除组织细胞损伤, 恢复内环境平衡, 内外并重。

**3.6.3 感染病毒组、同群感染组的病毒分离情况** 在试验中, 中药用药组及盐酸金刚烷胺用药组的鸡群排毒量均比对照组低, 说明复方中药能抑制病毒的复制。在同等情况下, 从泄殖腔棉拭子分离到病毒含量比从喉头棉拭子分离到的病毒含量低。这可能是因为复方中药及盐酸金刚烷胺均是以饮水的方式给药, 使肠道

内病毒含量降低。所以根据此结果, 可以推测, 如果该复方药物以喷剂的形式给药, 可以抑制流感病毒与肺上皮细胞的结合, 疗效会更佳。

## 4 结论

通过复方中草药在体内、体外对禽流感病毒的抑制作用及药物代谢动力学、急性毒性试验及对 SPF 鸡免疫功能影响试验表明, 由贯众、板蓝根、黄芪、柴胡、连翘、黄连、金银花、黄芩及甘草 9 味中药配制的复方中药具有预防、安全、延长感染鸡的存活时间、增强机体免疫力的作用。

## References

- [1] 于康震, 陈化兰, 唐秀英. 97 香港禽流感. 中国畜禽传染病. 1998, 20(3): 187-191.  
Yu K Z, Chen H L, Tang X Y. Avian influenza virus of Hongkong in 1997. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1998, 20(3): 187-191. (in Chinese)
- [2] Boivin G, Goyette N, Bernatchez H. Prolonged excretion of amantadine-resistant influenza A virus quasi species after cessation of antiviral therapy in an immunocompromised patient. *Clinical Infection Disease*, 2002, 1: 34(5): E23-25.
- [3] Jun Iwahashi, Katsuro Tsuji, Tetsuya Ishibashi, Junboku Kajiwara, Yoshihiro Imamura, Ryoichi Mori, Koyu Hara. Isolation of amantadine-resistant influenza A viruses (H3N2) from patients following administration of amantadine in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(4): 1652-1653.
- [4] Osterhaus A D M E. The control of influenza antiviral as an adjunct to vaccines. *Vaccine*, 2000, 18(24): 779-780.
- [5] Badmaev V, Nowakowski M. Protection of epithelial cells against influenza a virus by a plant derived biological response modifier Ledretan-96. *Phytotherapy Research*, 2000, 14(4): 245-249.
- [6] 贺玉琢, 高英杰, 李晓琴. 正柴胡饮抗病毒作用的试验研究. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(1): 11-15.  
He Y Z, Gao Y J, Li X Q. Experimental study on antiviral of zheng chaihui yin (Orthodox Radix Bupleuri Granule). *Chinese Journal of Experimental Traditional Medicine Formulae*, 1996, 2(1): 11-15. (in Chinese)
- [7] Nagai T, Moriguchi R, Suzuki Y, Tomimori T, Yamada H. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5, 7, 4'-rihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of scutellaria baicalensis. *Antiviral Research*, 1995, 26(1): 11-25.
- [8] Mori K, Kido T, Daikuhara H, Sakakibara I, Sakata T, Shimizu K,

- Amagaya S, Sasaki H, Komatsu Y. Effect of hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese herbal medicine, on the survival of mice infected with influenza virus. *Antiviral Research*, 1999, 44(2): 103-111.
- [9] Sidwell R W, Huffman J H, Moscon B J, Warren R P. Influenza virus-inhibitory effects of intraperitoneally and aerosol-administered SP-303, a plant flavonoid. *Chemotherapy*, 1994, 40(1): 42-50.
- [10] Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Research*, 1993, 21(4): 289-299.
- [11] Hastings J C, Selnick H, Wolanski B, Tomassini J E. Anti-influenza virus activities of 4-substituted 2, 4-dioxobutanonic acid inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 1304-1307.
- [12] Hosoya M, Matsuyama S, Baba M, Suzuki H, Shigeta S. Effects of protease inhibitors on replication of various myxoviruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36: 1432-1436.
- [13] Lüscher-Mattli M, Glück R, Kempf C, Zanoni-Grassi M. A comparative study of the effect of dextran sulfate on the fusion and the *in vitro* replication of influenza A and B, Semliki Forest, vesicular stomatitis, rabies, Sendai, and mumps virus. *Archives of Virology*, 1993, 130: 317-326.
- [14] 赫梅生. 用动物急性死亡率法估计药物体存率和表观半衰期. 中国药理学报, 1985, 6(3): 213.  
He M S. Determination of apparent pharmacokinetic parameters of anisodamine by acute mortality of mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1985, 6(3): 213. (in Chinese)
- [15] 牛延献, 史智勇. 中药增强机体免疫功能研究进展. 中兽医医药杂志, 1998, (3): 38-40.  
Niu Y X, Shi Z Y. Progress of Chinese medicine on immune function. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 1998, (3): 38-40. (in Chinese)
- [16] 艾 武, 张秀美, 王健荣. 家禽免疫增强剂研究发展. 中国家禽, 2001, (2): 26-28.  
Ai W, Zhang X M, Wang J R. Progress of immunoenhancement in poultry. *Chinese Poultry*, 2001, (2): 26-28. (in Chinese)
- [17] 程相朝, 张春杰, 李银聚, 吴庭才. 中药免疫增强剂对肉仔鸡免疫器官生长发育及免疫活性细胞影响的研究. 中兽医学杂志, 2000, 3: 6-8.  
Cheng X C, Zhang C J, Li Y J, Wu T C. The study of immune organs and immunocompetent cells on Chinese medicine immunoenhancement in broiler. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Science*, 2000, (3): 6-8. (in Chinese)
- [18] 程志斌, 葛长荣, 韩剑众. 中草药有效成分对动物免疫功能的影响及其应用. 中兽医医药杂志, 2002, 19(1): M1-M3.  
Cheng Z B, Ge C R, Han J Z. The application and influence on immunologic function of active ingredients in Chinese traditional medicine. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2002, 19(1): M1-M3. (in Chinese)
- [19] 戴远威, 江青艳, 傅传老. 补益中药提取物对雏鸡免疫功能的影响. 中兽医学杂志, 1997, 8(2): 2-5.  
Dai Y W, Jiang Q Y, Fu C L. The influence on immunologic function of Chinese medicine immunoenhancement in broiler. *Chinese Journal of Traditional Veterinary Science*, 1997, 8(2): 2-5. (in Chinese)
- [20] 汪 莉, 苏 军, 苏 宁. 低聚糖对蛋鸡免疫器官发育及粪臭的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2001, (11): 9-11.  
Wang L, Su J, Su N. The effects of immunologic function of oligosaccharide in chicks. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2001, (11): 9-11. (in Chinese)
- [21] 王福传, 韩一超, 赵洪恩. 复方中药免疫增强剂对鸡免疫器官组织形态学影响的研究. 中国预防兽医学报, 2001, 23(6): 419-421.  
Wang F C, Han Y C, Zhao H E. The study of histomorphology of immune organs on compound Chinese medicine immunoenhancement. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2001, 23(6): 419-421. (in Chinese)
- [22] 姜 岚. 药物累积法考察中药注射剂药代动力学的实验. 中药通报, 1988, 13(11): 666-670.  
Jiang L. Experimental studies on determining pharmacokinetics of injection of traditional Chinese medicine by stoking pattern. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1988, 13(11): 666-670. (in Chinese)
- [23] 李家仁. 苦豆子总生物碱毒性及药效动力学研究. 中国医院药学杂志, 1987, 7(60): 244-246.  
Li J R. The acute and pharmacokinetics of *Sophora a-lopecuroides*. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 1987, 7(60): 244-246. (in Chinese)
- [24] 王尧先, 赫梅生. 用动物急性死亡率法估计大青叶、连翘、北豆根药代动力学参数. 中药药理与临床, 1989, 5(6): 23-26  
Wang Y X, He M S. The studies on determining pharmacokinetics of *foliumisatidis*, *eorsythia suspense*, *asiatic moonseed* by stoking pattern. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 1989, 5(6): 23-26. (in Chinese)
- [25] Hay A T. The action of amantadine against influenza A virus: inhibition of the M2 ion channel protein. *Virology*, 1992, 216(13): 21-30.
- [26] Demicheli V, Jefferson T. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. *Vaccine*, 2000, 18(24): 957-1030.