

## 银翘解毒软胶囊对流感病毒感染小鼠肺炎模型肺组织病毒载量及 M1 蛋白表达的影响

刘颖<sup>1</sup>, 时宇静<sup>2</sup>, 时瀚<sup>2</sup>, 钟菊迎<sup>2</sup>, 刘方舟<sup>2</sup>, 高英杰<sup>2</sup>,  
金亚宏<sup>2</sup>, 郭姗姗<sup>2</sup>, 崔晓兰<sup>1, 2\*</sup>

(1. 首都医科大学, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100029)

**摘要:** 为探讨银翘解毒软胶囊对甲型 H1N1 流感病毒 PR8 株感染小鼠肺炎模型的治疗作用机制, 在滴鼻感染正常小鼠建立流感病毒肺炎模型的基础上, 观察小鼠肺指数、病死率, 并进一步进行分子机制研究。分别采用实时荧光定量 PCR (real time RT-PCR) 及 Western blotting 技术, 在流感病毒感染后 1、3、5、7 天, 检测小鼠肺组织中病毒载量的变化以及肺组织中 M1 蛋白相对含量的变化。结果显示, 银翘解毒软胶囊 (1 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 在感染后第 3、5、7 天可明显降低正常小鼠感染后肺指数, 并且两剂量组动物的死亡数显著降低, 存活天数显著增加; 银翘解毒软胶囊可以降低肺组织病毒载量, 其中 1 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组在各时间点均可降低其表达量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组在第 3、5、7 天均可降低病毒载量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 银翘解毒软胶囊可以降低肺组织 M1 蛋白相对表达量, 其中 1 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组在感染后第 3、7 天, 与模型对照组相比明显低表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果表明, 银翘解毒软胶囊对甲型流感病毒有良好的治疗作用, 并可能通过下调小鼠肺组织内病毒载量及 M1 蛋白相对表达量, 来发挥其抗病毒作用。

**关键词:** 银翘解毒软胶囊; 甲型流感病毒; 病毒载量; M1 蛋白

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0650-06

## Effects of YinQiaojiedu soft capsule on influenza virus load and M1 expression in mice

LIU Ying<sup>1</sup>, SHI Yu-jing<sup>2</sup>, SHI Han<sup>2</sup>, ZHONG Ju-ying<sup>2</sup>, LIU Fang-zhou<sup>2</sup>, GAO Ying-jie<sup>2</sup>,  
JIN Ya-hong<sup>2</sup>, GUO Shan-shan<sup>2</sup>, CUI Xiao-lan<sup>1, 2\*</sup>

(1. Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China)

**Abstract:** This study is to investigate the treatment of YinQiaojiedu soft capsule for influenza virus A/PR8/34 (H1N1) infection. The model of pneumonia was established by dropping influenza virus into the nose of normal mice, and the lung index and death rate were observed. Real time RT-PCR and Western blotting technique were used to detect the virus load and the relative expression of M1 protein in lungs of mice on the 1st, 3rd, 5th and 7th day after infection. The results showed that YinQiaojiedu soft capsule in 1 g·kg<sup>-1</sup> and 0.5 g·kg<sup>-1</sup> dose groups can decrease the lung index significantly on the 3rd, 5th and 7th day after being infected ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the number of death in the two groups of animals decreased significantly. YinQiaojiedu soft capsule in 1 g·kg<sup>-1</sup> dose group can decreased virus load at each time point, and lower it in 0.5 g·kg<sup>-1</sup> dose group at the 3rd, 5th and 7th day ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). YinQiaojiedu soft capsule can decrease the relative expression of M1 protein in lungs of mice, 1 g·kg<sup>-1</sup> and 0.5 g·kg<sup>-1</sup> dose groups are significantly lower in

收稿日期: 2011-01-19.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301-005-007); 中国中医科学院自主课题 (Z02066, Z02093).

\*通讯作者 Tel: 86-10-84015200, Fax: 86-10-84252805-4102, E-mail: cuixl2812@sina.com

expression of M1 protein compared with model group at the 3rd and 7th day ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). It can be concluded that YinQiaojiedu soft capsule exerts antiviral effects against influenza virus by downregulating expression of virus load and M1 protein.

**Key words:** YinQiaojiedu soft capsule; influenza virus type A; virus load; M1 protein

银翘解毒软胶囊原方来源于清代吴鞠通《温病条辨》中的银翘散<sup>[1]</sup>。该方具有辛凉解表、清热解毒的功效,现代用于治疗流行性感、急性扁桃体炎、咽喉炎、肺炎、疱疹、麻疹、流行性腮腺炎等病毒性疾病,是中医临床上广泛使用且疗效确切的中药方剂。本课题组前期工作显示:银翘散对流感病毒 FM1 株引起的小鼠肺部炎症有明显抑制作用;可降低病毒感染小鼠死亡率。抗病毒机制研究显示:银翘散可以降低小鼠肺组织流感病毒的病毒载量;可提高流感病毒感染小鼠肺组织中 IFN- $\gamma$  含量;可提高流感病毒感染小鼠肺组织中热休克蛋白-70 的表达<sup>[2]</sup>。本研究试图通过观察银翘解毒软胶囊对流感病毒致小鼠肺炎的肺指数、病死率及死亡保护作用的影响,来评价该药对甲型流感病毒的治疗作用。并且在此基础之上,运用实时荧光定量 PCR(real time RT-PCR) 及 Western blotting 技术,动态观察银翘解毒软胶囊对流感病毒的病毒载量及基质蛋白 M1 表达的影响,为明确中药抗流感病毒作用机制提供理论依据。

## 材料与方法

**受试药品及剂量设计** 银翘解毒软胶囊为江苏康缘药业股份有限公司产品(国药准字 Z20010019;批号:100202,规格:0.45 g/粒)。达菲(磷酸奥司他韦胶囊)为瑞士巴塞尔豪夫迈·罗氏有限公司产品,上海罗氏制药有限公司分装(批号:B1162,分装批号:SH0033),由安徽济人药业有限公司提供。

银翘解毒软胶囊的成人用量为 2 粒/次,3 次/日,即每日 2.7 g/60 kg (0.045 g·kg<sup>-1</sup>)。小鼠实验用量分别为每日 1、0.5 及 0.25 g·kg<sup>-1</sup>(分别相当于人临床用药量的 2 倍、等倍和 1/2 倍),实验时按 0.2 mL/10 g 灌胃给药。达菲的临床用量为 150 mg/60 kg,换算成小鼠等效剂量为 27.5 mg·kg<sup>-1</sup>,在同等情况下灌胃给药。

**实验动物及病毒株** ICR 小鼠 (SPF/VAF 级),体重 (14 $\pm$ 1) g,雌雄不限,共 244 只;购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2006-0009。

甲型 H1N1 流感病毒鼠肺适应株 (PR/8/34 株,

PR8 株),购自中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所,由中国中医科学院中药研究所 ABSL-2 生物安全实验室传代,-80℃保存备用。

**主要试剂** Trizol 提取总 RNA 试剂为 Invitrogen 公司产品(批号:51941204);One Step SYBR RT-PCR Kit 为 Takara 公司产品(批号:DRR086A);流感病毒、GAPDH 上下游引物均为美国 Invitrogen (上海)英俊生物技术有限公司合成;Influenza A Virus M1 antibody [GA2B] 购于 Abcam 公司; $\beta$ -actin 抗体和抗鼠的 IgG 二抗购自中杉金桥公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010S)和 RIPA 裂解液(批号:P0013B)购自上海碧云天生物技术有限公司。丙烯酰胺/双丙烯酰胺 (37.5:1) 购于上海生工生物工程技术服务有限公司,批号:200910。预染蛋白 Marker 为上海凯勃生物技术有限公司产品。ECL<sup>TM</sup> 发光液购自 GE 公司,批号:RPN2109。

**主要仪器与试验场地** Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪,美国应用生物系统 (ABI) 公司;HC-3018R 高速冷冻离心机,中科中佳公司;A2 型生物安全柜,型号:MSC1.8,德国 Thermo 公司产品;动物体重电子天平,型号:YP/0001,上海越平科学仪器有限公司产品;动物脏器电子天平,型号:AR1140,美国 Chaus 产品;电泳仪:北京市六一仪器厂,型号 DYY-10C;转膜仪:北京君意东方电泳设备有限公司,型号 JY-2Y1。UMAX 彩色扫描仪:利翔航太电子股份有限公司,型号 PowerLook 2100XL-USB。

实验场地为中国中医科学院中药研究所 ABSL-2 生物安全实验室。

## 流感病毒感染正常小鼠肺炎模型的建立及药效研究

**造模及分组** 取小鼠按体重等级随机分为 24 组,分别为正常对照组、模型对照组、阳性(达菲)对照组、银翘解毒软胶囊 (1、0.5 和 0.25 g·kg<sup>-1</sup>) 治疗组;时间点分别为感染后第 1、3、5、7 天,共 4 个时间点,每组 6 只。除正常对照组外,将小鼠用乙醚轻度麻醉,以 15 个 LD<sub>50</sub> 流感病毒液 PR8 株滴鼻感染 (35  $\mu$ L/只)。感染当天开始给药,每次按 0.2 mL/10 g (体重)灌胃,每天 1 次,连续 4 天 (感染后第 1、3 天时

间点组除外), 正常对照组和模型对照组在同等条件下蒸馏水灌胃。各组分别在感染给药后第 1、3、5、7 天称量体重后解剖取肺组织, 称肺重计算肺指数及肺指数抑制率, 并将肺组织保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中用于后续实验。

肺指数与肺指数抑制率计算<sup>[3]</sup> 肺指数与肺指数抑制率计算公式: 肺指数 (%) = [肺湿重 (g) / 体重 (g)]  $\times 100\%$ ; 肺指数抑制率 (%) = [(模型对照组平均肺指数 - 实验组平均肺指数) / (模型对照组平均肺指数 - 正常对照组平均肺指数)]  $\times 100\%$ 。肺指数以  $\bar{x} \pm s$  表示, 结果采用单因素方差分析进行统计学处理。

**药物对流感病毒感染正常小鼠肺炎模型的死亡保护作用** 取小鼠按体重等级随机分为 5 组。分别为模型对照组、达菲对照组、银翘解毒软胶囊 1、0.5 和  $0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量组, 每组 20 只。各组小鼠用乙醚轻度麻醉, 以 15 个  $\text{LD}_{50}$  流感病毒液 PR8 株滴鼻感染,  $35\text{ }\mu\text{L}/\text{只}$ 。

感染当天开始给药, 各给药组动物按  $0.2\text{ mL}/10\text{ g}$  (体重) 灌胃, 每天 1 次, 连续 4 天, 模型对照组在同等条件下蒸馏水灌胃。观察感染后 14 天内动物的死亡情况, 计算死亡率、死亡保护率、平均存活天数和生命延长率<sup>[4]</sup>。结果采用组间比较卡方检验和  $t$  检验进行统计学处理。

**实时荧光定量 PCR (real time RT-PCR) 检测病毒载量** 利用从 NCBI GenBank 下载的 A/PR/8/34 基因序列, 用 Primer premier 5.0 软件进行序列分析并设计引物, 所设计引物的  $T_m$  值、GC 含量及 3' 末端稳定性等基本参数依据引物优化原则<sup>[5]</sup>。引物合成: 由上海英骏公司合成。针对 PR8 株流感病毒 mRNA 的上、下游引物分别是: 5'-GGCCCAAACACAACATAA CC-3' 和 5'-CACCCCATAGCACAAGGACT-3'; GAPDH 基因序列的上、下游引物分别是: 5'-GGTGAAGGTC GGTGTGAACG-3' 和 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGG TG-3'。

使用 TRIzol 试剂提取肺组织中的 RNA 后, 用上述流感病毒引物和 GAPDH 引物进行一步法实时荧光定量 PCR 反应, 反应体积为  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 反应体系含样本 RNA  $2\text{ }\mu\text{L}$ , One Step SYBR GREEN  $16.4\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10\text{ pmol}$  引物各  $0.8\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件:  $42^{\circ}\text{C}$  5 min,  $95^{\circ}\text{C}$  10 s,  $95^{\circ}\text{C}$  5 s,  $60^{\circ}\text{C}$  34 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析, 以鉴定 PCR 产物的特异性。使用 Sequence Detection System 软件分析 PCR 过程各检测样本的  $C_t$  (threshold of cycle) 值。

本实验使用相对定量  $\Delta\Delta C_t$  方法, 以 GAPDH 作为内对照, 相对含量的变化为  $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 100\%$ 。相对浓度以  $\bar{x} \pm s$  表示, 结果采用单因素方差分析进行统计学处理。

**Western blotting 检测 M1 蛋白表达** 称取肺组织  $50\text{ mg}$ , 用液氮法磨成粉, 加入蛋白裂解液  $500\text{ }\mu\text{L}$ ; 充分裂解后,  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清液, 肺组织总蛋白定量按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行。蛋白浓度平衡后的样品用 15% SDS PAGE 凝胶电泳分离并转移到 PVDF 膜上 (Millipore), 5% 脱脂牛奶封闭后分别加入 1 : 1 000 稀释的 Influenza A Virus M1 antibody [GA2B] 和  $\beta$ -actin 的抗体,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; TBST 洗 3 遍后加入 1 : 5 000 稀释的抗鼠的 IgG 二抗, 室温孵育 2 h; TBST 洗 3 遍后用 ECL-detecting reagent 按照发光试剂的说明书进行蛋白印记。

采用图像分析系统对 Western blotting 蛋白杂交条带进行扫描, 并用 Gel-Pro 软件对图像进行灰度分析。目的蛋白的灰度值除以内参  $\beta$ -actin 的灰度值以校正误差, 所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验。

## 结果

### 1 银翘解毒软胶囊对流感病毒 PR/8/34 株感染正常小鼠肺炎模型肺指数的影响

表 1 结果显示: 采用甲型 H1N1 流感病毒 PR/8/34 株感染正常小鼠后, 根据解剖取材时间点不同, 模型对照组的肺指数有相应不同程度的增高, 其中感染后第 1 天与正常对照组比较有增高趋势, 第 3、5、7 天肺指数有递增趋势, 且均与正常对照组比较有显著差异 ( $P < 0.01$ )。感染当天开始给予阳性对照药达菲及银翘解毒软胶囊治疗, 感染后第 1 天各剂量组无明显差异, 感染后第 3、5、7 天, 达菲 ( $0.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 及银翘解毒软胶囊 ( $1$  和  $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 治疗组与模型对照组比较肺指数均显著降低, 银翘解毒软胶囊  $0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  治疗组与模型对照组比较无明显差异, 但是有降低趋势, 且达菲的药效优于银翘解毒软胶囊。

### 2 银翘解毒软胶囊对流感病毒 PR/8/34 株感染肺炎模型小鼠的死亡保护作用

表 2 结果显示: 采用甲型 H1N1 流感病毒 PR/8/34 株感染正常小鼠后, 动物死亡率为 90%, 平均存活天数为 7.80 天; 感染当天分别给予阳性对照药达菲和银翘解毒软胶囊, 并连续给药 4 天, 14 天后达菲

**Table 1** Effect of YinQiaojiedu soft capsule on pulmonary index of mouse infected by influenza virus PR/8/34 (PR8).  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  
## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model group

Group	Dose /g·kg <sup>-1</sup>	Pulmonary index				Inhibition ratio/%			
		1 day	3 days	5 days	7 days	1 day	3 days	5 days	7 days
Control	—	0.78 ± 0.11	0.72 ± 0.04	0.68 ± 0.06	0.66 ± 0.07	—	—	—	—
Model	—	0.83 ± 0.04	1.04 ± 0.09##	1.24 ± 0.05##	1.39 ± 0.07##	—	—	—	—
Tamiflu	0.03	0.79 ± 0.02	0.81 ± 0.04**	0.86 ± 0.09**	0.88 ± 0.07**	83.04	72.66	67.08	69.44
YinQiaojiedu	1	0.79 ± 0.03	0.93 ± 0.08*	1.02 ± 0.12**	1.01 ± 0.07**	76.27	36.17	38.49	52.10
soft capsule	0.5	0.81 ± 0.04	0.92 ± 0.05*	0.97 ± 0.17**	1.03 ± 0.09**	46.39	37.59	48.68	49.77
	0.25	0.81 ± 0.04	0.96 ± 0.05	1.18 ± 0.06	1.13 ± 0.11**	40.40	24.98	9.99	36.07

**Table 2** Protective effect of YinQiaojiedu soft capsule on mortality of mouse infected by influenza virus PR/8/34 (PR8).  $n = 20$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  
\*\* $P < 0.01$  vs model group

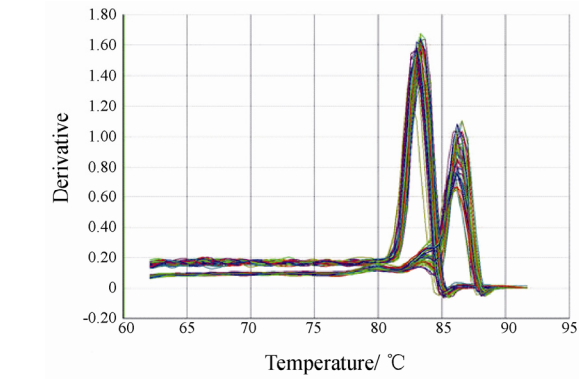
Group	Dose /g·kg <sup>-1</sup>	Number of death	Death rate/%	Protective rate/%	Average survival days	Life prolongation rate/%
Model	—	18	90	—	7.80 ± 1.47	—
Tamiflu	0.03	2	10	88.89**	10.80 ± 0.62**	38.46
YinQiaojiedu soft capsule	1	5	25	72.22**	10.00 ± 2.08**	28.21
	0.5	7	35	61.11**	9.75 ± 1.89**	25.00
	0.25	12	60	33.33	9.35 ± 1.60**	19.87

(0.03 g·kg<sup>-1</sup>) 组和银翘解毒软胶囊 (1 及 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 组的动物死亡数均较模型对照组显著降低, 死亡率分别为 10%、25% 和 35%, 死亡保护率分别为 88.89%、72.22% 和 61.11%; 且平均存活天数显著增加, 分别为 10.80、10.00 和 9.75 天, 与模型对照组比较有显著差异 ( $P < 0.01$ )。且达菲的死亡保护作用优于银翘解毒软胶囊。

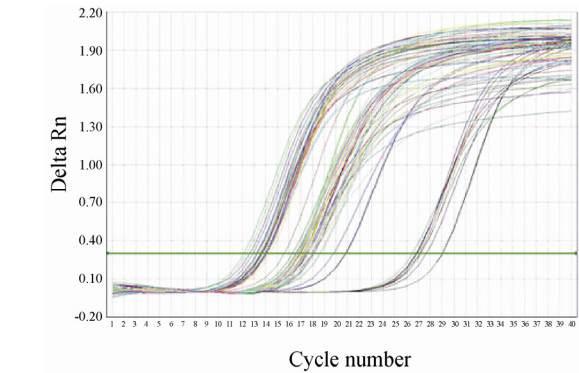
**3 银翘解毒软胶囊对 PR/8/34 株感染正常小鼠肺炎模型肺组织病毒载量的影响**

**3.1 各基因 PCR 扩增产物的鉴定** 从图 1 可见, 流感病毒 (PR8) mRNA 基因在 83 °C 左右处形成单一的荧光峰, GAPDH 在 87 °C 左右处形成单一的荧光峰。说明实时荧光定量 PCR (real time RT-PCR) 产物均具有特异性, 无二聚体产生。对扩增曲线 (图 2) 的分析可见, 曲线拐点清楚, 指数期明显, 基线平而无上扬现象。说明病毒基因引物和 GAPDH 引物参与的 PCR 扩增是成功的。

**3.2 银翘解毒软胶囊对病毒载量的动态影响** 表 3 结果显示: 正常小鼠未被感染时肺组织内无病毒载量表达; 采用甲型 H1N1 流感病毒 PR/8/34 株病毒感染正常小鼠后, 模型对照组各时间点小鼠肺组织病毒载量均明显高表达, 且在第 3 天达到峰值; 感染当天开始给予银翘解毒软胶囊治疗, 1 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组在感染后各时间点病毒载量均显著低于同时间点模型对照组, 其中第 1 天差异显著 ( $P < 0.05$ ), 第 3、5、7 天差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组病毒载量



**Figure 1** Real-time melting curve



**Figure 2** Real-time fluorescence amplification curve

也显著低于同时间点模型对照组, 其中第 5 天差异显著 ( $P < 0.05$ ), 第 3、7 天差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 0.25 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组病毒载量略低于同时间点模型对照组; 1 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组在各时间点的抑制率均高于 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组。

**Table 3** Effect of YinQiaojiedu soft capsule on virus load.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs model group

Group	Dose /g·kg <sup>-1</sup>	Virus load				Inhibition ratio/%			
		1 day	3 days	5 days	7 days	1 day	3 days	5 days	7 days
Control	—	0	0	0	0	—	—	—	—
Model	—	464.02 ± 273.26 <sup>###</sup>	4 918.07 ± 2 018.89 <sup>###</sup>	2 146.01 ± 732.15 <sup>###</sup>	791.29 ± 414.74 <sup>###</sup>	—	—	—	—
YinQiaojiedu	1	181.78 ± 64.24 <sup>*</sup>	671.24 ± 348.40 <sup>**</sup>	683.01 ± 363.47 <sup>**</sup>	232.56 ± 74.10 <sup>**</sup>	60.83	86.35	68.17	70.61
soft capsule	0.5	212.47 ± 99.04	732.05 ± 575.29 <sup>**</sup>	1 088.55 ± 568.92 <sup>*</sup>	238.96 ± 108.72 <sup>**</sup>	54.21	85.12	49.28	69.80
	0.25	283.03 ± 140.57	3 813.81 ± 2 902.74	1 562.02 ± 376.30	383.31 ± 167.86 <sup>*</sup>	39.01	22.45	27.21	51.56

#### 4 银翘解毒软胶囊对 PR/8/34 株感染正常小鼠肺炎模型肺组织中 M1 蛋白相对表达量的影响

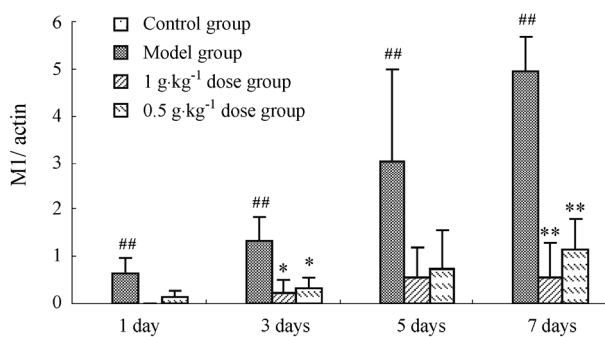
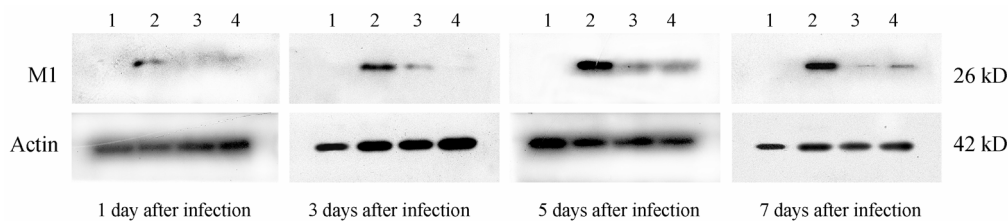
由于银翘解毒软胶囊 0.25 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组对小鼠肺指数、病死率及病毒载量影响不显著, 本实验只采用 1 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组进行肺组织检测。从图 3 和图 4 可见, 在流感病毒感染后第 1 天, 正常对照组小鼠肺组织中流感病毒 M1 蛋白无表达; 模型对照组小鼠较正常对照组有明显表达 ( $P < 0.01$ ); 银翘解毒软胶囊 1 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组的肺组织中 M1 蛋白无明显表达; 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组与模型对照组比较有低表达趋势。在流感病毒感染后第 3、5、7 天, 正常对照组小鼠肺组织中流感病毒 M1 蛋白均无表达; 模型对照组小鼠较正常对照组有明显高表达 ( $P < 0.01$ ), 且表达量随时间增加呈递增趋势, 在第 7 天达到峰值; 银翘解毒软胶囊各给药组肺组织中 M1 蛋白较模型对照

组明显低表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且感染后各时间点 1 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组表达均低于 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组, 两剂量组在感染后第 5、7 天 M1 蛋白表达趋于稳定。

#### 讨论

由于中药的复方药与西药的单一组分药物在抗流感病毒过程中作用机制不同, 故本文中的机制研究部分并未涉及到药物达菲, 但为更完整地评价银翘解毒软胶囊治疗流感病毒的药效, 在药效研究部分均采用了达菲对照组。药效研究结果表明, 银翘解毒软胶囊 (1 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 对感染后不同时间点小鼠肺指数及病死率均有明显的降低作用, 并且可以显著延长小鼠的存活天数, 说明该药对甲型流感病毒 PR8 株有良好的治疗作用。机制研究结果表明, 银翘解毒软胶囊 (1 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 可明显降低感染后小鼠肺组织中病毒载量, 并且在感染后第 3 天抑制率最高; 纵向对比感染后各时间点给药组小鼠肺组织中 M1 蛋白均较模型对照组低表达 ( $P < 0.05$ ), 说明银翘解毒软胶囊 (1 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 能显著降低流感病毒 M1 蛋白相对表达含量; 揭示银翘解毒软胶囊通过降低小鼠肺组织中病毒载量及干扰流感病毒 M1 蛋白表达而发挥抑制流感病毒复制和感染的作用。

流感病毒感染可引起肺部水肿、炎性渗出、充血, 这些病理改变均可使肺部重量增加, 从而导致肺指数升高, 故通常以肺指数值的大小来表示肺部病变的严重程度<sup>[6, 7]</sup>。M1 蛋白是流感病毒颗粒中含量最丰

**Figure 3** Effect of YinQiaojiedu soft capsule on expression level of M1 in the lungs at all time points.  $^{###}P < 0.01$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs model group**Figure 4** Effect of YinQiaojiedu soft capsule on expression of M1 protein in the lungs at all time points detected by Western blotting. 1: Control group; 2: Model group; 3: YinQiaojiedu soft capsule 1 g·kg<sup>-1</sup> group; 4: YinQiaojiedu soft capsule 0.5 g·kg<sup>-1</sup> group

富的蛋白质, 荧光标记技术研究表明, M1 蛋白和病毒 RNA (VRNA) 共定位于细胞核内、细胞质和细胞膜上<sup>[8,9]</sup>。M1 蛋白在细胞内这一分布特性具有重要的调节功能, 如具有调控病毒的转录和被感染细胞的细胞核、细胞浆之间的物质运输作用以及参与病毒的出芽过程。M1 蛋白是流感病毒的主要成分之一<sup>[10]</sup>。有研究证明, M1 蛋白在病毒感染的多个时期都起作用。在感染早期, M1 蛋白参与核衣壳的形成, 并在子代病毒装配中起重要作用, 能诱导子代病毒的组装, 同时对核糖核蛋白颗粒起保护作用; 在感染后期, M1 蛋白被表达在细胞的不同位置, 小部分 M1 蛋白迁移到核, 以降低病毒的转录水平<sup>[11,12]</sup>。此外, 新合成的 vRNPs 输出又依赖于 M1 蛋白在核上的聚集。可见在感染后不同时期 M1 蛋白发挥着不同的作用, 即在成熟病毒中, 病毒脱壳时, 释放核糖核蛋白; 在感染细胞中, M1 则与核糖核蛋白结合, 使其自细胞核内转移到核外。因此, 寻找宿主细胞中与流感病毒基质蛋白 M1 相互作用蛋白, 以干扰 M1 与 RNA 结合; 或直接抑制 M1 蛋白合成, 都可以作为靶点, 为研制新型抗流感药物提供理论依据。

## References

- [1] Wu JT. Differentiation and Treatment of Epidemic Febrile Diseases (温病条辨) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 16-19.
- [2] Shi YJ, Zhao Y, Jiang J, et al. Effects of Yinqiaosan on influenza virus load and IFN- $\gamma$  mRNA expression in mice [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2008, 43: 1475-1478.
- [3] Chen Q. Methodology Research on Traditional Chinese Medicines (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993: 251-256.
- [4] Fu HY, Lu CA, He YZ, et al. Experimental study of Qingfei Yin in treating flu viral pneumonia in mice [J]. Chin J Exp Clin Virol (中华实验和临床病毒学杂志), 1996, 10: 381.
- [5] Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: 607-608.
- [6] Xiong ZQ. Morphological studies on viral pneumonia [J]. Natl Med J China (中华医学杂志), 1988, 66: 288-290.
- [7] Zhu WY, Chen WB. Respiratory (呼吸病学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 777-778.
- [8] Martin K, Helenius A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import [J]. Cell, 1991, 67: 117-130.
- [9] Martin K, Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus [J]. J Virol, 1991, 65: 232-244.
- [10] Zhang JG. A Preliminary Study on the Interaction between Avian Influenza Matrix Protein M1 and the Host Cell (禽流感病毒基质蛋白 M1 与宿主细胞相互作用的初步研究) [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009.
- [11] Watanabe K, Handa H, Mizumoto K. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix1 protein [J]. J Virol, 1996, 70: 241-247.
- [12] Perez DR, Donis RO. The matrix1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome *in vivo* [J]. Virology, 1998, 249: 52-61.