金贝口服液抗小鼠甲型H1N1流感病毒及继发性肺炎链球菌感染作用研究Δ

赵方舒[1*]，张爱均[2]，刘苗苗[1]，田景振[1]，侯　林[1,3#]（1.山东中医药大学药学院，济南　250355；2.山东宏济堂制药集团股份有限公司，济南　250109；3.山东中医药大学青岛中医药科学院，山东 青岛　266112）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）21-2622-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.11

摘　要　目的　研究金贝口服液体内抗小鼠甲型H1N1流感病毒及继发性肺炎链球菌感染的作用，为其临床应用提供参考。**方法**　以磷酸奥司他韦胶囊（25.6 mg/kg）为阳性对照进行实验。通过滴鼻含0.8个半数致死量（LD_{50}）的H1N1病毒液复制小鼠甲型H1N1流感病毒感染模型，以体质量、肺指数、肺病毒载量、肺组织病理形态变化以及血清中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6水平为指标，考察15.6、7.8、3.9 mL/kg金贝口服液体内抗甲型H1N1流感病毒的作用。通过滴鼻含0.5个LD_{50}的H1N1病毒液和含1×10^9个菌落形成单位的肺炎链球菌液复制继发性肺炎链球菌感染模型，以小鼠死亡情况、肺指数、鼻腔和肺部细菌载量以及血清中干扰素β（IFN-β）、IL-17、IL-23水平为指标，考察15.6 mL/kg金贝口服液体内抗继发性肺炎链球菌感染的作用。**结果**　15.6、7.8 mL/kg金贝口服液给药6 d后，均可显著升高甲型H1N1流感病毒感染小鼠异常降低的体质量，显著降低其异常升高的肺指数及血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平（$P<0.05$），显著降低其肺部病毒载量（$P<0.05$），减轻其肺组织病变程度。15.6 mL/kg金贝口服液还可显著延长病毒-细菌共感染小鼠的存活时间（$P<0.05$），降低其死亡率；显著升高其异常降低的体质量和血清中IL-17、IL-23水平（$P<0.05$），显著降低其鼻腔和肺部细菌载量以及血清中异常升高的IFN-β水平（$P<0.05$）。**结论**　金贝口服液具有一定的抗小鼠甲型H1N1流感病毒感染作用，且能通过恢复17型免疫功能帮助机体抵抗继发性肺炎链球菌感染。

关键词　金贝口服液；甲型H1N1流感病毒；肺炎链球菌；继发性细菌感染

Study on the effects of Jinbei oral liquid against influenza A H1N1 virus and secondary *Streptococcus pneumoniae* infection of mice

ZHAO Fangshu[1], ZHANG Aijun[2], LIU Miaomiao[1], TIAN Jingzhen[1], HOU Lin[1,3]（1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Hongjitang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jinan 250109, China; 3. Qingdao Academy of Chinese Medical Science, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Qingdao 266112, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of Jinbei oral liquid against influenza A H1N1 virus and secondary *Streptococcus pneumoniae* infection of rats, and to provide reference for its clinical application. **METHODS** Oseltamivir phosphate capsule (25.6 mg/kg) was used as a positive control. Influenza A H1N1 virus infection model of mice was established by nasal drops of H1N1 virus containing 0.8 median lethal dose (LD_{50}). The body mass, lung index, lung viral load, pathological changes of lung tissue, and serum levels of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and IL-6 were used as indexes to investigate the anti-H1N1 virus effect of 15.6, 7.8 and 3.9 mL/kg Jinbei oral liquid *in vivo*. The model of secondary *S. pneumoniae* infection was established by nasal drops of H1N1 virus solution containing 0.5 LD_{50} and *S. pneumoniae* solution containing 1×10^9 colony forming units. The death, lung index, nasal and lung bacterial load, serum levels of interferon-β (IFN-β), IL-17 and IL-23 were used as indexes to investigate the effects of 15.6 mL/kg Jinbei oral liquid against secondary *S. pneumoniae* infection. **RESULTS** After 6 days of administration, both 15.6 and 7.8 mL/kg Jinbei oral liquid significantly increased the abnormally reduced body weight of influenza A H1N1 virus infected mice, significantly reduced the abnormally increased lung index and serum levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 ($P<0.05$); it also significantly reduced the viral load in the lung ($P<0.05$) and alleviated the degree of lung tissue lesions. At the same time, 15.6 mL/kg Jinbei oral liquid significantly prolonged the survival time of mice co-infected with virus and bacteria ($P<0.05$) and reduced the mortality rate; it also significantly increased the abnormally reduced body weight and serum levels of IL-17 and IL-23 ($P<0.05$), while reduced the nasal and lung bacterial loads and the abnormally increased serum level of IFN-β ($P<0.05$).

Δ **基金项目** 山东省重点研发计划（重大科技创新工程）项目（No.2020CXGC010505，No.2021CXGC010511）；济南市“新高校20条”资助项目（No.2021GXRC028）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药新药研发。E-mail：zfs13176019640@163.com

\# **通信作者** 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药新药与中药炮制原理。E-mail：13789801721@163.com

CONCLUSIONS Jinbei oral liquid has a certain anti-influenza A H1N1 virus infection effect of rats and can help the body resist secondary *S. pneumoniae* infection by restoring the type 17 antibacterial immune function.

KEYWORDS Jinbei oral liquid; influenza A H1N1; *Streptococcus pneumoniae*; secondary bacterial infection

全世界每年有29万～65万人死于流感，而甲型H1N1流感病毒一直是全世界季节性流感的主要病原体[1]。流感造成的死亡通常是由继发性细菌性肺炎引起的，与流感相关的重症病例和死亡病例超过95%伴有细菌感染[2]。肺炎链球菌是继发性细菌感染中最常见的细菌之一[3]。尽管有抗生素和流感疫苗的使用，病毒合并细菌感染导致的死亡仍是一个严重的问题。

金贝口服液由黄芪、党参、北沙参、丹参、当归、川芎、金银花、连翘、黄芩、川贝母、清半夏、甘草共12味中药材组成，具有益气养阴、祛痰化瘀的功效，主要用于特发性肺纤维化属气阴两虚兼痰瘀交阻证的治疗。方中黄芪、黄芩以及丹参均有一定的抗H1N1病毒活性[4－6]；且黄芪的乙醇提取物对变形杆菌、伤寒沙门氏菌等多种常见细菌均有一定的抑制作用[6]；丹参的乙醇提取物对金黄色葡萄球菌等9种常见细菌均有明显抑制作用[6]。然而，目前对金贝口服液抗菌、抗病毒作用的研究较少。鉴于此，本研究拟建立体内H1N1病毒感染小鼠模型和继发性肺炎链球菌感染小鼠模型，探究金贝口服液对H1N1病毒感染和继发性肺炎链球菌感染的治疗作用，以期为其临床抗病毒应用提供数据支持。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有LC480型实时荧光定量PCR仪[罗氏诊断产品（上海）有限公司]、Spectra Max M5型酶标仪（美国Molecular Devices公司）、Sorvall ST 8R型高速冷冻离心机（美国Thermo Fisher Scientific公司）、MJ-250-Ⅱ型霉菌培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）、CKX-31型倒置显微镜（日本Olympus公司）。

1.2 主要药品与试剂

金贝口服液（批号2101001，规格10 mL/支）购自山东宏济堂制药集团股份有限公司；磷酸奥司他韦胶囊（批号02220001031，规格以奥司他韦计为75 mg/粒）购自宜昌东阳光长江药业股份有限公司；病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒（批号W0202）购自天根生化科技（北京）有限公司；SYBR Green One-Step实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）试剂盒（批号D7268M）购自上海碧云天生物技术有限公司；小鼠肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号分别为9680025291221、9680010021121、9680026141221）均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；小鼠干扰素β（interferon-β，IFN-β）、IL-17、IL-23 ELISA试剂盒（批号均为06/2022）均购自上海酶联生物科技有限公司；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为蒸馏水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级BALB/c雌性小鼠，6周龄，体质量为14～18 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物生产许可证号为SCXK（京）2021-0006。所有小鼠随机分笼饲养（每笼8只），饲养期间自由摄食、饮水，保持12 h昼夜节律，饲养环境通风良好，温度适宜（20～25 ℃）。本研究实验方案合理，符合动物实验的“3R”原则。

1.4 病毒毒株和细菌株

甲型流感病毒A/PR/8/34株（H1N1）由山东省医学科学院基础医学研究所提供。肺炎链球菌*Streptococcus pneumoniae*购自北京北纳创联生物技术研究院，编号为BNCC338425。

2 方法

2.1 金贝口服液抗小鼠甲型H1N1流感病毒作用研究

2.1.1 分组、造模、给药及取样 按随机数字表法将48只小鼠随机分为6组，每组8只，分别为空白组、模型组、磷酸奥司他韦胶囊组（阳性对照组，25.6 mg/kg，为临床等效剂量）和金贝口服液高、中、低剂量组（剂量分别为15.6、7.8、3.9 mL/kg，分别为成人剂量的2、1、0.5倍等效剂量）。小鼠适应性饲养5 d后，空白组小鼠滴鼻20 μL生理盐水，其余各组小鼠经乙醚麻醉后滴鼻20 μL含0.8个半数致死量（median lethal dose，LD_{50}）的H1N1病毒液[7]。滴鼻后2 h，以小鼠灌胃容积0.1 mL/10 g为标准，空白组和模型组小鼠均灌胃蒸馏水，其余组小鼠均灌胃相应药液，每日1次，连续灌胃6 d。每天监测小鼠体质量并计算体质量变化率[体质量变化率（%）＝每日体质量/初始体质量×100%]。末次灌胃24 h后，将小鼠摘眼球取血，而后处死，取其肺组织。全血在4 ℃下放置过夜后，以9 000 r/min离心20 min，取上清，置于－80 ℃冰箱保存，备用。称定小鼠肺组织质量并计算肺指数[肺指数（%）＝肺组织质量/体质量×100%]，然后将一部分肺组织用4%多聚甲醛固定，另一部分肺组织于－80 ℃冰箱中保存，备用。以上实验均在BSL-2实验室中进行。

2.1.2 小鼠肺病毒载量测定 采用qRT-PCR法测定。取“2.1.1”项下－80 ℃保存的小鼠肺组织置于组织研磨机中制备组织匀浆，以1 000 r/min离心3 min，取上清，按病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒方法提取肺组织中总RNA。采用SYBR Green One-Step qRT-PCR试剂盒

对H1N1病毒*NP*基因mRNA的相对表达量进行检测。qRT-PCR程序设定如下：50 ℃反转录20 min；95 ℃预变性2 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火/延伸20 s，总共40个循环。以*GAPDH*为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析*NP*基因mRNA的相对表达量，以*NP*基因mRNA的相对表达量来反映病毒载量。引物由北京擎科生物科技有限公司设计并合成，引物序列及扩增产物大小见表1。

表1　引物序列及扩增产物大小

基因名称	引物序列(5′→3′)	扩增产物大小/bp
NP	上游：GTATGGACCTGCCGTAGC	227
	下游：GCTTCCACGAGGGTTCTC	
GAPDH	上游：GGATGCTGCCCTTACCC	183
	下游：GCCTGGCTTGTGTACC	

2.1.3　小鼠肺组织病理学观察　取“2.1.1”项下经4%多聚甲醛固定后的肺组织，常规制备石蜡切片（厚度5 μm），行HE染色，在光学显微镜下观察并拍照。

2.1.4　小鼠血清中炎症细胞因子检测　取“2.1.1”项下血清，采用ELISA法测定各组小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6的水平，具体操作按对应试剂盒说明书方法进行。

2.2　金贝口服液对继发性肺炎链球菌感染小鼠死亡的保护作用研究

将48只小鼠按随机数字表法分为6组，每组8只，分别为空白组、细菌单感染组、病毒单感染组、病毒-细菌共感染组、磷酸奥司他韦胶囊组（阳性对照组，25.6 mg/kg，为成人临床等效剂量）和金贝口服液组（15.6 mL/kg）。将小鼠适应性饲养5 d后，除空白组和细菌单感染组小鼠滴鼻20 μL生理盐水外，其余各组小鼠均滴鼻含0.5个LD_{50}的H1N1病毒液20 μL[8]。造模2 h后，以小鼠灌胃容积0.1 mL/10 g为标准，空白组、细菌单感染组、病毒单感染组、病毒-细菌共感染组小鼠均灌胃蒸馏水，给药组小鼠灌胃对应药液，每日1次，连续灌胃6 d。第6天灌胃2 h后，空白组和病毒单感染组小鼠滴鼻50 μL无菌蒸馏水，其余各组小鼠均滴鼻含1×10^9个菌落形成单位（colony forming unit，CFU）的肺炎链球菌液50 μL[2,9]。每日继续按上述方法灌胃并监测小鼠体质量，直至病毒滴鼻后的第14天。

2.3　金贝口服液抗继发性肺炎链球菌感染作用研究

2.3.1　分组、造模、给药与取样　将48只小鼠按随机数字表法分为6组，每组8只，分组、造模、灌胃方式等均同“2.2”项下。肺炎链球菌感染24 h后，将小鼠摘眼球取血（按“2.1.1”项下方法制备血清）并处死，然后于超净工作台中暴露其颈部气道，利用18G静脉留置针进行鼻腔灌洗，每次注入0.2 mL无菌水，收集灌洗液至1.5 mL EP管中[2]。同时，于无菌环境下取小鼠肺组织，称质量后计算小鼠肺指数（计算公式同“2.1.1”项下）。将肺组织置于组织研磨机中制备匀浆，以1 000 r/min离心3 min后取上清。以上实验均在BSL-2实验室中进行。

2.3.2　小鼠鼻腔和肺部细菌载量测定　取哥伦比亚血平板若干，每个平板等分成3个区，取“2.3.1”项下鼻腔灌洗液和肺组织匀浆上清液各10 μL，分别接种于血平板上，每个样本做3个重复位点。接种完毕后，先将血平板正置于细菌培养箱中培养0.5 h，再倒置培养16 h，然后进行菌落计数[2]。

2.3.3　小鼠血清中IFN-β、IL-17、IL-23水平测定　取“2.3.1”项下血清，采用ELISA法检测小鼠血清中IFN-β、IL-17、IL-23水平，具体操作按相应试剂盒说明书进行。

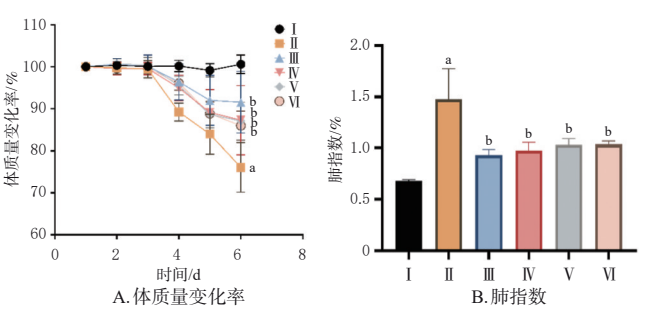
2.4　统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析，方差齐时组间两两比较采用LSD-*t*检验，方差不齐时组间两两比较采用Dunnett's *T*3检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　金贝口服液抗小鼠甲型H1N1流感病毒作用

3.1.1　小鼠体质量及肺指数测定结果　由小鼠体质量变化率可知：自造模第4天起，除空白组外，其余各组小鼠的体质量均有明显的下降趋势。造模第6天时，与空白组比较，模型组小鼠的体质量显著降低（$P<0.05$），肺指数显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组小鼠的体质量均显著升高（$P<0.05$），肺指数均显著降低（$P<0.05$）。结果见图1。

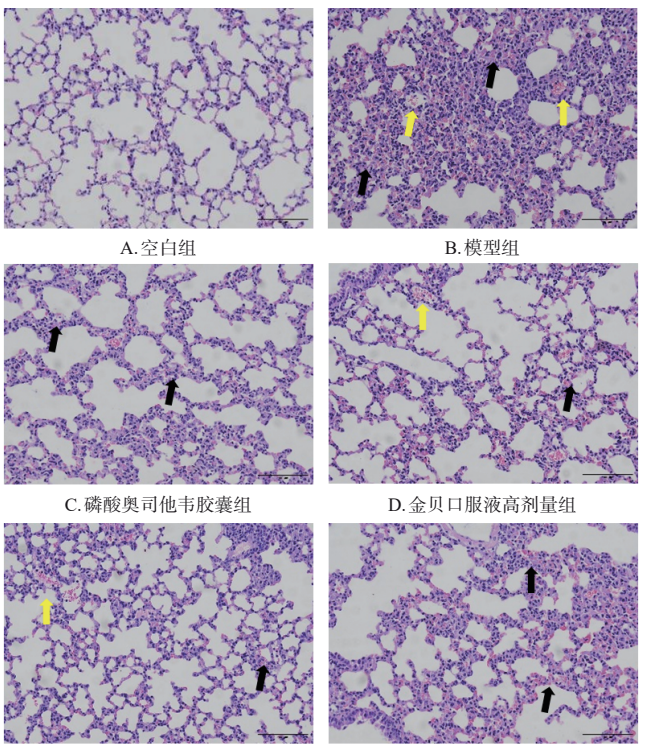


Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：磷酸奥司他韦胶囊组；Ⅳ：金贝口服液高剂量组；Ⅴ：金贝口服液中剂量组；Ⅵ：金贝口服液低剂量组；a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图1　金贝口服液对病毒感染小鼠体质量变化率和肺指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.1.2　小鼠肺病毒载量测定结果　与空白组（*NP*基因mRNA的相对表达量为0.09±0.02）比较，模型组小鼠的肺病毒载量（*NP*基因mRNA的相对表达量为1.08±0.46）显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，磷酸奥司他韦胶囊组和金贝口服液高、中剂量组的肺病毒载量（*NP*基因mRNA的相对表达量分别为0.59±0.27、0.70±0.35、0.71±0.13）均显著降低（$P<0.05$），金贝口服液低剂量组小鼠的肺病毒载量（*NP*基因mRNA的相对表达量为0.99±0.13）差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3.1.3　小鼠肺组织病理形态观察结果　空白组小鼠肺组织中肺泡结构清晰，未见明显异常。模型组小鼠肺组织可见大量肺泡壁增厚，肺泡间隙缩小，伴有较多淋巴细胞与中性粒细胞浸润，部分肺泡腔内存在渗出物。与模型组比较，磷酸奥司他韦胶囊组小鼠肺泡壁增厚程度减轻，仅存在少量炎症细胞浸润；金贝口服液各剂量组小鼠肺泡壁增厚和炎症细胞浸润均有一定程度减轻。结果见图2。



注：黑色箭头表示炎症细胞浸润；黄色箭头表示渗出物

图2　金贝口服液对病毒感染小鼠肺组织病理形态的影响（HE染色，×200）

3.1.4　小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平测定结果　与空白组比较，模型组小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，磷酸奥司他韦胶囊组小鼠血清中IL-6、IL-1β水平和金贝口服液高、中剂量组小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

表2　金贝口服液对病毒感染小鼠血清中TNF-α、IL-6、IL-1β水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，pg/mL）

分组	TNF-α	IL-6	IL-1β
空白组	477.27±51.43	96.28±5.01	90.60±1.79
模型组	530.15±14.35[a]	106.28±8.10[a]	101.67±14.07[a]
磷酸奥司他韦胶囊组	501.76±8.45	97.30±5.28[b]	90.52±6.81[b]
金贝口服液高剂量组	490.92±30.41[b]	94.89±14.75[b]	93.50±12.65[b]
金贝口服液中剂量组	494.56±16.82[b]	96.94±5.39[b]	93.46±4.61[b]
金贝口服液低剂量组	497.90±16.27	106.27±6.60	106.64±11.20

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.2　金贝口服液对继发性肺炎链球菌感染小鼠死亡的保护作用考察结果

由小鼠存活曲线可知，小鼠感染H1N1病毒后可正常存活至感染后第14天。本研究中，在第6天接种相同剂量肺炎链球菌后，细菌单感染组小鼠可正常存活，病毒-细菌共感染组小鼠从感染H1N1病毒第7天起开始死亡，最终死亡率达87.5%，明显高于细菌单感染组（0）和病毒单感染组（12.5%）。与病毒-细菌共感染组小鼠比较，磷酸奥司他韦胶囊组和金贝口服液组小鼠的存活时间显著延长，死亡率（均为37.5%）显著降低。结果见图3。

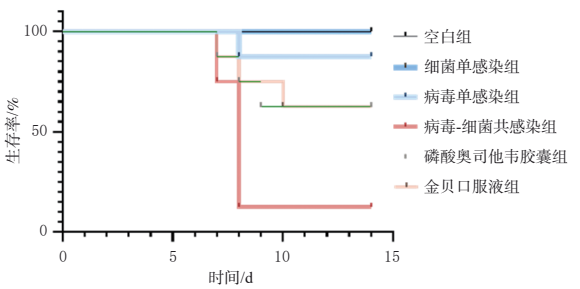
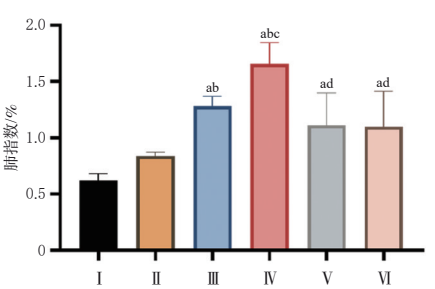


图3　金贝口服液对继发性肺炎链球菌感染小鼠14 d存活情况的影响

3.3　金贝口服液体内抗继发性肺炎链球菌感染考察结果

3.3.1　小鼠肺指数测定结果　与空白组比较，病毒单感染组、病毒-细菌共感染组小鼠的肺指数显著升高（$P<0.05$）；细菌单感染组小鼠肺指数也有所升高，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。与细菌单感染组及病毒单感染组比较，病毒-细菌共感染组小鼠的肺指数均显著升高（$P<0.05$）。与病毒-细菌共感染组比较，磷酸奥司他韦胶囊组和金贝口服液组小鼠的肺指数均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4。



Ⅰ：空白组；Ⅱ：细菌单感染组；Ⅲ：病毒单感染组；Ⅳ：病毒-细菌共感染组；Ⅴ：磷酸奥司他韦胶囊组；Ⅵ：金贝口服液组；a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与细菌单感染组比较，$P<0.05$；c：与病毒单感染组比较，$P<0.05$；d：与病毒-细菌共感染组比较，$P<0.05$

图4　金贝口服液对继发性肺炎链球菌感染小鼠肺指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.3.2　小鼠鼻腔和肺部细菌载量测定结果　空白组和病毒单感染组小鼠未感染细菌。与空白组比较，除病毒单感染组外的其余各组小鼠鼻腔与肺部的细菌载量均显著升高（$P<0.05$）。与细菌单感染组比较，病毒-细菌

共感染组小鼠鼻腔与肺部的细菌载量均显著升高（$P<0.05$）。与病毒-细菌共感染组比较，磷酸奥司他韦胶囊组和金贝口服液组小鼠鼻腔与肺部的细菌载量均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

表3　金贝口服液对继发性肺炎链球菌感染小鼠鼻腔和肺部细菌载量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

分组	鼻腔细菌载量（$\times10^8$）/CFU	肺部细菌载量（$\times10^8$）/CFU
空白组	0	0
细菌单感染组	4.11 ± 1.94^{a}	35.88 ± 9.84^{a}
病毒单感染组	0	0
病毒-细菌共感染组	7.68 ± 1.70^{abc}	107.90 ± 15.12^{abc}
磷酸奥司他韦胶囊组	5.67 ± 1.33^{acd}	57.22 ± 13.77^{acd}
金贝口服液组	5.89 ± 0.88^{acd}	62.24 ± 16.19^{acd}

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与细菌单感染组比较，$P<0.05$；c：与病毒单感染组比较，$P<0.05$；d：与病毒-细菌共感染组比较，$P<0.05$

3.3.3　小鼠血清中IFN-β、IL-17、IL-23水平测定结果　与空白组比较，细菌单感染组、病毒单感染组、病毒-细菌共感染组小鼠血清中IFN-β水平均显著升高（$P<0.05$），细菌单感染组小鼠血清中IL-17、IL-23水平均显著升高（$P<0.05$）。病毒-细菌共感染组小鼠血清中IFN-β水平显著高于细菌单感染组和病毒单感染组（$P<0.05$），IL-17、IL-23水平均显著低于细菌单感染组（$P<0.05$）。与病毒-细菌共感染组比较，磷酸奥司他韦胶囊组和金贝口服液组小鼠血清中IFN-β水平均显著降低（$P<0.05$），IL-17、IL-23水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表4。

表4　金贝口服液对继发性肺炎链球菌感染小鼠血清中IFN-β、IL-17、IL-23水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，pg/mL）

分组	IFN-β	IL-17	IL-23
空白组	333.13 ± 11.81	33.53 ± 0.59	61.28 ± 3.50
细菌单感染组	348.70 ± 6.96^{ac}	38.16 ± 3.25^{a}	67.57 ± 8.70^{a}
病毒单感染组	377.15 ± 16.20^{ab}	36.42 ± 1.01	59.47 ± 2.44^{b}
病毒-细菌共感染组	407.97 ± 17.40^{abc}	34.78 ± 0.73^{b}	57.27 ± 2.78^{b}
磷酸奥司他韦胶囊组	348.12 ± 16.04^{acd}	37.49 ± 1.91^{d}	63.51 ± 2.80^{d}
金贝口服液组	360.30 ± 17.64^{acd}	37.25 ± 1.75^{d}	64.05 ± 3.77^{d}

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与细菌单感染组比较，$P<0.05$；c：与病毒单感染组比较，$P<0.05$；d：与病毒-细菌共感染组比较，$P<0.05$

4　讨论

磷酸奥司他韦胶囊可以在人体内转化为对神经氨酸酶有抑制作用的活性代谢物，从而抑制甲型H1N1流感病毒的复制，常用于预防和治疗甲型和乙型流感[10]，因此本研究以其为抗病毒研究的阳性对照药物。在单纯抗甲型H1N1流感病毒感染实验中，金贝口服液可以明显抑制由H1N1病毒感染引起的小鼠体质量下降，降低由于H1N1病毒感染引起的小鼠肺指数升高，减轻H1N1病毒感染小鼠的肺组织病变程度，减少H1N1病毒感染后机体TNF-α、IL-1β、IL-6的分泌，表现出较好的抗炎作用，并且其还可显著抑制H1N1病毒在肺中的复制（通过*NP*基因mRNA相对表达量来反映）。以上结果表明，金贝口服液有一定的体内抗甲型H1N1流感病毒感染作用。

在H1N1-肺炎链球菌共感染实验中，为模拟通常人类流感为轻症的情况，小鼠滴鼻病毒量仅含0.5个LD_{50}[8]。14 d生存曲线结果表明，病毒-细菌共感染组小鼠的死亡率明显高于细菌单感染组和病毒单感染组，可知重叠感染严重威胁到小鼠生存；与病毒-细菌共感染组小鼠相比，金贝口服液组小鼠的存活时间延长、死亡率降低，提示金贝口服液对H1N1-肺炎链球菌共感染小鼠的生存具有一定的保护作用。小鼠肺指数测定结果表明，与细菌单感染组小鼠和病毒单感染组小鼠相比，病毒-细菌共感染组小鼠的肺指数显著升高，可知病毒-细菌共感染加重了小鼠肺部炎症程度；而金贝口服液给药后可使病毒-细菌共感染小鼠的肺指数显著降低，提示该药发挥了一定的抗肺部炎症作用。鼻腔与肺部细菌载量实验结果表明，与细菌单感染组小鼠相比，病毒-细菌共感染组小鼠体内细菌载量显著升高，说明H1N1病毒在一定程度上增加了机体对肺炎链球菌的易感性；而金贝口服液给药后可降低病毒-细菌共感染小鼠体内的细菌载量，提示该药可在一定程度上抵御肺炎链球菌的重叠感染。

流感病毒感染后引起的17型免疫抑制是其改变机体细菌防御功能的机制之一[11]，而Ⅰ型干扰素的过量分泌可以抑制机体17型免疫，从而增加机体对继发性细菌感染的易感性[12]。与空白组相比，细菌单感染组小鼠血清中IL-17、IL-23的水平均显著升高，提示机体启动了17型免疫功能。与细菌单感染组和病毒单感染组相比，病毒-细菌共感染组小鼠血清中IFN-β水平显著升高，可知共感染引起了IFN-β的过量表达；与细菌单感染组相比，病毒-细菌共感染组小鼠IL-17、IL-23的水平均显著下降，说明机体的17型免疫功能被IFN-β抑制。金贝口服液给药后可明显降低病毒-细菌共感染组小鼠血清中的IFN-β水平，升高其血清中IL-17、IL-23水平，提示该药可使小鼠的17型免疫功能在一定程度上恢复。以上结果表明，金贝口服液具有一定的抵抗继发性肺炎链球菌感染的作用。

综上所述，金贝口服液具有一定的抗小鼠甲型H1N1流感病毒感染作用，且能通过恢复17型免疫功能帮助机体抵抗继发性肺炎链球菌感染，但其具体作用机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] IULIANO A D，ROGUSKI K M，CHANG H H，et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality：a modelling study[J]. Lancet，2018，391（10127）：1285-1300.

[2] 勾雪梅. IL-6在流感病毒-肺炎链球菌共感染肺炎及肺炎链球菌肺炎继发脓毒症中的作用及机制研究[D]. 重庆：重庆医科大学，2021.

（下转第2631页）