

连花清菲代用茶对甲型 H3N2 流感病毒感染雪貂的预防作用

彭冬冬^{1,2}, 唐梓宁^{1,2}, 傅 聰^{1,2}, 赵易敏^{1,2}, 李 萌^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 姜德建^{1,2},
刘学武^{1,2*}

(1. 湖南省药物安全评价研究中心, 湖南 长沙 410329; 2. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,
湖南 长沙 410329)

摘要: 目的 考察连花清菲代用茶对甲型 H3N2 流感病毒所致雪貂呼吸道感染的预防作用。方法 将 28 只雪貂随机分为正常组、模型组、磷酸奥司他韦颗粒组 (6.9 mg/kg)、板蓝根颗粒组 (1 g/kg) 和连花清菲代用茶低、中、高剂量组 (0.8、1.6、3.2 g/kg), 每组 4 只, 各组连续灌胃给药 7 d。于第 4 天给药前, 经鼻滴入给予 H3N2 甲型流感病毒原液 (病毒滴度 6log2)。每日测量并记录雪貂肛温、体温及体质量, 并进行症状评分; 采用 RT-qPCR 法检测咽拭子病毒载量, 利用流式细胞仪检测外周血中 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例; 采用 ELISA 试剂盒检测肺组织 TNF- α 、IFN- γ 水平; 解剖取肺组织, 进行肺指数和组织病理学检查。结果 与模型组比较, 连花清菲代用茶高剂量组和磷酸奥司他韦颗粒组雪貂症状评分 (包括鼻部症状和活跃度)、肺组织病理评分、体温、肺指数、肺组织 IFN- γ 和 TNF- α 水平、咽拭子病毒载量均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), CD4⁺T/CD8⁺T 细胞比例升高 ($P<0.01$)。结论 连花清菲代用茶可抑制 H3N2 甲型流感病毒复制, 减轻肺组织病变程度, 其作用机制可能与抑制局部肺组织炎性介质分泌及提高机体免疫细胞功能有关。

关键词: 连花清菲代用茶; 雪貂; H3N2 甲型流感病毒; 炎症因子; 免疫细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)05-1735-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.05.051

H3N2 甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 已在全球范围内引起人类流感发病和死亡, 每年流行发病比 H1N1 或乙型流感病毒更为严重^[1-2]。近年来, H3N2 甲型流感病毒引发多起严重流感疫情, 该病毒爆发具有季节性特征, 大多数发生在温带地区冬季, 而在热带地区随时都可能发生, 该类型的流感病毒主要感染因素包括年龄 (老年人和幼儿的感染风险较高)、免疫功能低下、怀孕及某些潜在的基础疾病, 例如慢性肺病、心脏病和糖尿病^[3]。感染 H3N2 甲型流感病毒患者会出现呼吸道症状, 包括喉咙痛、咽炎和流鼻涕, 伴有高烧和肌肉酸痛等症状^[4], 严重者还会出现脑炎、脑病和急性坏死性脑病等神经系统症状^[5-6], 因此有效防治流感是全人类共同面临并亟待解决的重大公共卫生和医学问题。

连花清菲代用茶是一种用于呼吸健康的草本植物代用茶, 其含有橘皮、金银花、薄荷、连翘叶、芦根等成分, 主要用于预防呼吸道感染。本实验采用甲型流感病毒诱导雪貂呼吸道感染模型, 通过观察给药后症状、肺指数、肺脏病毒载量、细胞因子、肺组织病理学等指标的变化, 考察连花清菲代用茶对 H3N2 甲型流感病毒诱导雪貂呼吸道

感染的预防作用。

1 材料

1.1 实验动物 检疫合格的普通级雪貂 28 只, 雌雄各半, 体质量 1.0~1.5 kg, 由无锡珊瑚礁生物科技有限公司提供 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2022-0012], 饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司生物安全实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2020-0015]。期间给予全价颗粒饲料, 自由饮水, 室温 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 光照明暗各 12 h, 通风良好, 动物实验经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司实验动物管理伦理委员会批准 [审批号 IACUC-2023 (3) 004-4]。

1.2 药物 连花清菲代用茶主要由橘皮、金银花、薄荷、连翘叶、芦根、桔梗、胖大海、百合、罗汉果、杏仁组成, 每克提取物含生药约 4 g, 批号 20230131, 由以岭健康科技有限公司提供, 将 1 袋连花清菲代用茶 (3 g), 以 200 mL 沸水冲泡, 浸泡 4~5 min, 即得 0.06 g/mL 的连花清菲代用茶; 板蓝根颗粒, 规格为每 10 g 制剂含生药 14 g, 批号 F22F019, 由广州白云山和记黄埔中药有限公司生产, 将 10 g 板蓝根颗粒充分溶解于 70 mL 纯水中, 即得生药质量

收稿日期: 2024-06-11

基金项目: 湖南普瑞玛新药非临床研究创新创业团队项目 (2021 年)

作者简介: 彭冬冬 (1990—), 男, 研究生, 副主任药师, 研究方向为新药药效与安全性评价。Tel: 18229760205, E-mail: pengdongdong@hnse.org

*通信作者: 刘学武 (1988—), 男, 博士生, 助理研究员, 研究方向为新药药效与安全性评价。Tel: 15974233693, E-mail: liuxuewu@hnse.org

浓度为 0.2 g/mL 的板蓝根颗粒溶液；磷酸奥司他韦颗粒，批号 6002209001，由宜昌东阳光长江药业股份有限公司生产，将 75 mg 磷酸奥司他韦颗粒充分溶解于 54 mL 纯水中，即得质量浓度为 1.38 mg/mL 的磷酸奥司他韦颗粒溶液。

1.3 试剂 Anti-CD4-APC 抗体（批号 HS17AP2601）、Recombinant Anti-CD8 alpha-PE 抗体（批号 HG08AP2902）均购自北京义翘神州科技股份有限公司；肿瘤坏死因子- α （TNF- α ，批号 062023）、干扰素 γ （INF- γ ，批号 062023）ELISA 试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.4 病毒株 H3N2 甲型流感病毒，编号 VR-1679，淡黄色混浊液体，规格 1 mL，购自美国 ATCC 细胞库，在本中心病原微生物实验室〔BSL-II，实验室备案编号为长卫健实备字（2021）第 B010 号〕培养和扩增。

1.5 仪器 Spectra Max i3x 型多功能酶标仪（上海美谷光子公司）；RM2235 型石蜡切片机、ASP200S 型全自动脱水机、HI1220 型烤片机、EG1150H+C 型组织包埋机、CX31 型生物显微镜、BX43 型生物显微镜+MD50 型数码成像系统、Autostainer XL+CV5030 型自动载玻片染色机+自动盖片机（德国 Leica 公司）；实时荧光定量 PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 病毒培养与扩增 选择 9 日龄状态良好的鸡胚，标记出鸡胚气室与尿囊的界限。将标记好的鸡胚气室朝上放置在照蛋器上。用 75% 酒精消毒鸡胚，用无菌锥子在气室端钻孔。用注射器吸取适量的病毒液，将注射针头刺入钻孔处刺破小孔的壳膜，注入 0.1 mL 病毒液于尿囊腔，33 ℃ 温箱培养鸡胚 2 d。收获前，将鸡胚于 4 ℃ 冰箱过夜，使红血球凝固。经过冰冻的鸡胚用 75% 酒精棉球消毒其气室部卵壳。用无菌镊子将消过毒的壳打碎，轻轻揭去气室部位卵壳，撕去壳膜和绒毛尿囊膜，并将鸡胚轻轻推向一侧，压住，吸出病毒液，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，分装于冻存管，-80 ℃ 保存，备用。

2.2 毒力检测 对“2.1”项下扩增的病毒进行滴度测定。取 100 μ L 样品梯度稀释为 11 个浓度，并以 0.9% 氯化钠注射液作为阴性对照，每孔加入 50 μ L 1.0% 鸡红细胞悬浮液，于室温下孵育 20~45 min，观察结果。判读时将反应板稍微倾斜，不能直立，从反应板背侧进行判读，判读时需在 5 s 左右读完结果，采用 log₂ 表示结果， $n \log_2$ 表明病毒的稀释倍数为 2 的 n 次方倍时，出现凝集。

结果判读：“-”表示不凝集，红细胞沉积于管底，呈边缘整齐的圆盘状；“+”表示微量凝集，红细胞沉积于管底，呈边缘不清晰的圆盘状；“++”表示凝集，红细胞沉积于管底呈环状，四周有凝集的小块；“+++”表示大部分凝集，红细胞呈颗粒状凝集，边缘不整齐，有下垂趋势；“++++”表示完全凝集，红细胞均匀铺于管底。以能完全凝集的最高稀释度为血凝效价。

2.3 分组、给药与造模 28 只雪貂按性别及体质量随机分为正常组、模型组、磷酸奥司他韦颗粒组、板蓝根颗粒

组和连花清菲代用茶低、中、高剂量组，每组 4 只。磷酸奥司他韦颗粒组灌胃给予 6.9 mg/kg 磷酸奥司他韦颗粒溶液，板蓝根颗粒组灌胃给予 1 g/kg 板蓝根颗粒溶液，连花清菲代用茶低、中、高剂量组分别灌胃给予 0.8、1.6、3.2 g/kg 连花清菲代用茶（为临床等效剂量的 1、2、4 倍^[7]），灌胃体积均为 5 mL/kg，正常组和模型组灌胃给予等体积纯水，每天 1 次，连续给药 7 d，于第 4 天给药前进行染毒，经鼻滴注给予 H3N2 甲型流感病毒原液 1 次（病毒滴度为 6 log₂），0.5 mL/只。

2.4 一般情况观察 染毒后观察各组雪貂肛温体温及体质量变化，密切观察动物咳嗽、流涕、竖毛等异常情况并及时记录。感染后每天记录症状，对感染症状进行评分，评分标准参考文献 [8-9] 报道，具体见表 1。

表 1 雪貂感染后症状评分标准

评分/分	鼻部症状	活跃度
0	无症状	非常活跃
1	鼻头抽吸或打喷嚏	仍活动但活跃度降低
2	流涕	警觉不活跃
3	口式呼吸	不活跃，不警觉

2.5 外周血 T 细胞 (CD4⁺T、CD8⁺T) 水平测定 于末次给药后次日，通过后肢静脉采集约 1 mL 的全血，置于 EDTA-K2 抗凝管，采用流式细胞仪检测全血中 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例。

2.6 咽拭子病毒载量测定 于末次给药后次日，采集咽拭子置于 1 mL 0.9% 氯化钠注射液中，加入 RNA 提取液，将所提 RNA 逆转录成 c-DNA，采用绝对定量 PCR 法检测逆转录 c-DNA 荧光强度，并以 c-DNA 绝对拷贝数反映咽拭子中病毒载量。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列见表 2。扩增反应条件为 50 ℃ 30 min，95 ℃ 3 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 32 s，45 个循环。采用构建的 H3N2 甲型流感病毒标准品及标准曲线，计算肺组织 H3N2 甲型流感病毒载量。

表 2 引物序列

引物/探针	引物序列 (5'→3')
H3N2-P	FAM-CGAATCTGGCCCAAGCCAACA-BHQ1
H3N2 正向	GAGGAACTCGTCCTTATGACAA
H3N2 反向	TTAGACCAGCTGTCGATCCT

2.7 肺组织 TNF- α 、INF- γ 水平检测 于末次给药后次日，按 10 mg/kg 肌肉注射舒泰 50 麻醉，腹主动脉放血处死，解剖采集双侧肺脏。取右侧肺脏（上叶），加入 9 倍量 0.9% 氯化钠注射液，手动研磨匀浆，制成肺悬液，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液，采用 ELISA 试剂盒检测肺组织匀浆液中 TNF- α 、INF- γ 水平。

2.8 肺组织病理学观察 取左侧肺脏，经 10% 中性福尔马林固定后，石蜡包埋，切片，HE 染色，置于光镜下观察肺组织病理学变化。评分依据肺泡腔内炎性渗出、肺泡上皮破坏、肺泡间隔增厚、肺泡上皮增生伴巨噬细胞浸润等病理变化，按照病变程度进行评分，其中未见病理改变，计

0分；轻度，计1分；中度，计2分；重度，计3分。

2.9 统计学分析 通过SPSS 23.0软件进行处理，实验数据先进行正态性检验和方差齐性检验，正态分布的数据以($\bar{x}\pm s$)表示，非正态分布数据用中位数表示，两组间比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂一般情况的影响 造模后雪貂出现自主活动减少，伴有呼吸急促；给药后模型组、磷酸奥司他韦颗粒组、板蓝根颗粒组和连花清

菲代用茶各剂量组动物仍出现自主活动减少，部分雪貂伴有呼吸急促；给药后期各组雪貂仍可见自主活动减少，但有所缓解。如表3所示，与正常组比较，模型组雪貂给药4~7d症状评分均升高($P<0.01$)；与模型组比较，给药5d时，磷酸奥司他韦颗粒组、板蓝根颗粒组和连花清菲代用茶中、高剂量组雪貂症状评分均降低($P<0.05$, $P<0.01$)，给药6~7d时，各给药组雪貂症状评分均降低($P<0.05$, $P<0.01$)，表明连花清菲代用茶能降低模型症状评分，减轻临床咳嗽、流鼻涕等症状，且高剂量改善效果较佳。

表3 各组雪貂症状评分比较($\bar{x}\pm s$, n=4)

组别	症状评分/分			
	给药4 d	给药5 d	给药6 d	给药7 d
正常组	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型组	2.5±0.6 ^{##}	3.0±0.0 ^{##}	3.0±0.0 ^{##}	2.8±0.5 ^{##}
磷酸奥司他韦颗粒组	2.0±0.8	1.3±0.5 ^{**}	0.5±0.6 ^{**}	0.3±0.5 ^{**}
板蓝根颗粒组	1.8±0.5	2.3±0.5 [*]	1.8±0.5 ^{**}	1.3±0.5 ^{**}
连花清菲代用茶低剂量组	2.5±0.6	2.8±0.5	2.3±0.5 [*]	1.8±0.5 [*]
连花清菲代用茶中剂量组	2.0±0.8	2.3±0.5 [*]	1.5±0.6 ^{**}	1.0±0.8 ^{**}
连花清菲代用茶高剂量组	1.8±0.5	2.0±0.0 ^{**}	1.0±0.0 ^{**}	0.8±0.5 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3.2 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂体质量的影响 如图1所示，染毒后，磷酸奥司他韦颗粒组、板蓝根颗粒组和连花清菲代用茶各剂量组雪貂体质量均呈不同程度降低，随着给药时间的延长，体质量呈回升趋势，但整个给药期间各组体质量均无统计学差异。

3.3 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂体温的影响 如表4所示，与正常组比较，模型组雪貂给药5d后体温均升高($P<0.01$)；与模型组比较，磷酸奥司他韦颗粒组和连花清菲代用茶高剂量组雪貂末次给药当日体温降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.4 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂肺指数的影响 如图2所示，与正常组比较，模型组雪貂肺指数升高($P<0.01$)；与模型组比较，磷酸奥司他韦颗粒组、板蓝根颗粒组和连花清菲代用茶中、高剂量组雪貂肺指数均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

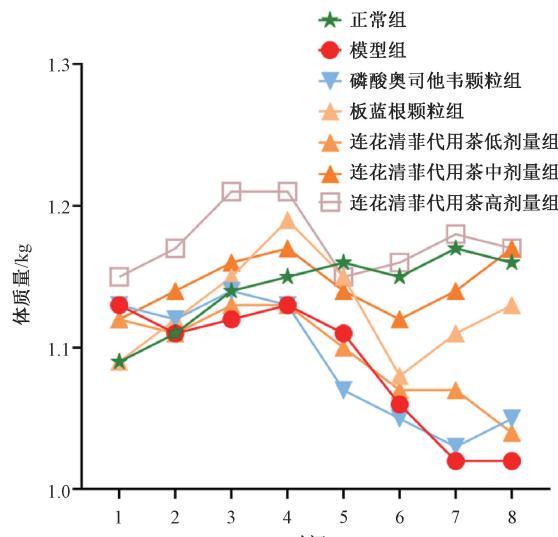


图1 染毒后各组雪貂体质量-时间变化趋势

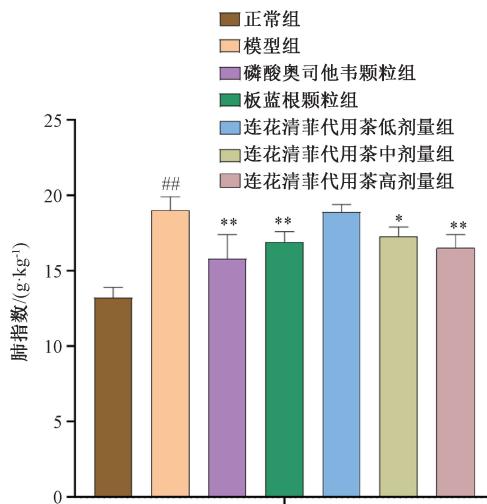
表4 各组雪貂体温比较($\bar{x}\pm s$, n=4)

组别	体温/℃			
	给药4 d	给药5 d	给药6 d	给药7 d
正常组	38.4±0.1	38.5±0.2	38.3±0.6	38.5±0.1
模型组	38.3±0.2	39.8±0.1 ^{##}	39.8±0.3 ^{##}	39.6±0.2 ^{##}
磷酸奥司他韦颗粒组	38.3±0.3	39.6±0.7	39.1±0.1 ^{**}	38.8±0.2 ^{**}
板蓝根颗粒组	38.6±0.2	39.7±0.3	39.5±0.3	39.2±0.5
连花清菲代用茶低剂量组	38.5±0.1	39.5±0.9	39.6±0.2	39.5±0.3
连花清菲代用茶中剂量组	38.4±0.2	39.5±0.8	39.5±0.3	39.1±0.6
连花清菲代用茶高剂量组	38.6±0.3	39.7±0.6	39.5±0.3	38.9±0.3 [*]

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3.5 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂肺组织细胞因子的影响 如图3所示，与正常组比较，模型组雪貂肺组织

组织IFN-γ、TNF-α水平升高($P<0.05$)；与模型组比较，磷酸奥司他韦颗粒组和连花清菲代用茶高剂量组雪貂肺组织

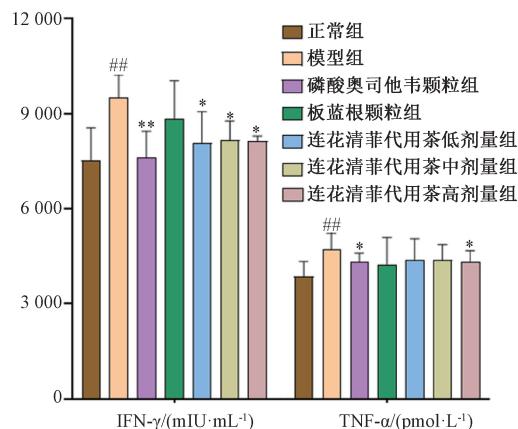


注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 各组雪貂肺指数比较 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

IFN- γ 、TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，连花清菲代用茶低、中剂量组雪貂肺组织IFN- γ 水平降低 ($P < 0.05$)，表明连花清菲代用茶能减少肺组织细胞因子水平，减轻局部炎症反应。

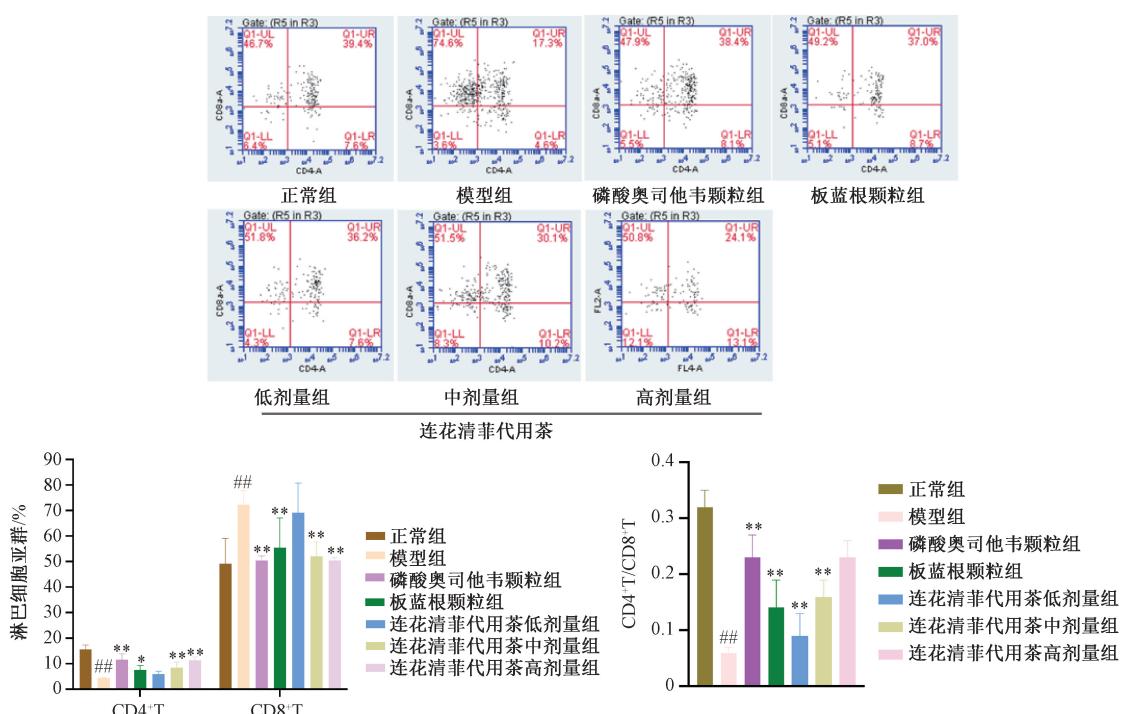
3.6 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂外周血CD4 $^+$ T、CD8 $^+$ T细胞比例的影响 如图4所示，与正常组比较，模



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 各组雪貂肺组织IFN- γ 、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

型组雪貂外周血CD4 $^+$ T细胞百分比和CD4 $^+$ T/CD8 $^+$ T细胞比值降低 ($P < 0.01$)，CD8 $^+$ T百分比升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，磷酸奥司他韦颗粒组、板蓝根颗粒组和连花清菲代用茶中、高剂量组外周血CD4 $^+$ T细胞百分比、CD4 $^+$ T/CD8 $^+$ T细胞比值升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，CD8 $^+$ T细胞百分比降低 ($P < 0.01$)，表明连花清菲代用茶能恢复机体免疫细胞水平。

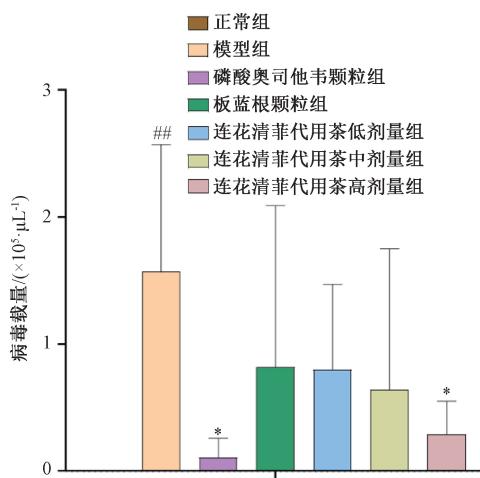


注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 各组雪貂淋巴细胞亚群比例比较 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

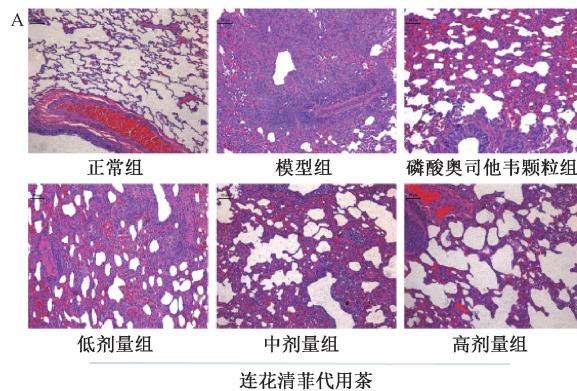
3.7 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂咽拭子病毒载量的影响 如图5所示，与正常组比较，模型组雪貂咽拭子中病毒载量升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，磷酸奥司

他韦颗粒组和连花清菲代用茶高剂量组雪貂咽拭子中病毒载量降低 ($P < 0.05$)，表明连花清菲代用茶能抑制甲型流感病毒在肺组织复制。



注：与正常组比较，##P<0.01；与模型组比较，*P<0.05。

图5 各组雪貂咽拭子病毒载量比较 ($\bar{x} \pm s$, n=4)



注：与正常组比较，##P<0.01；与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

图6 各组雪貂肺组织病理形态及评分比较 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

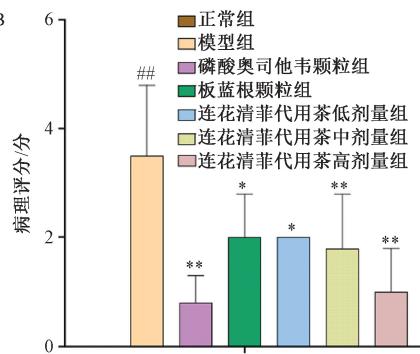
成为研究流感病毒的重要动物模型^[12-13]。然而，除了动物模型研究外，开发有效的治疗药物同样至关重要。以岭健康科技有限公司研发上市的连花清菲代用茶，由金银花、连翘叶、百合和桔梗等中药组成，其中金银花中绿原酸可抑制甲型流感病毒mRNA转录，并保护MDCK和Vero细胞免受损害^[14-15]；而连翘叶具有清热解毒功效，其所含连翘苷、连翘酯苷对流感病毒有较强的抑制作用^[16-18]，与金银花配伍使用可协同增强抗流感病毒的作用。此外，孙国威^[19]、马国平等^[20]研究证实，百合具有显著止咳和祛痰作用，桔梗中桔梗总皂苷具有止咳和化痰作用^[21]，并辅以百合，达到共同止咳祛痰的作用，以改善呼吸系统的功能，为患者带来了更为全面的健康保障。

急性呼吸道感染大多由病毒引起，而人体免疫系统则构成抵御病毒入侵的重要防线。在这一防御体系中，T淋巴细胞扮演者至关重要的角色，它们广泛分布于全身的组织中，发挥免疫功能，CD4主要表达于辅助T细胞表面，它在调节和增强免疫反应方面发挥重要的作用；CD8是T淋巴细胞的一个亚群，对于清除体内病原体至关重要，因此CD4⁺T、CD8⁺T (CD4⁺T/CD8⁺T比值) 可反映免疫系统的整体状态，这对于评估免疫功能具有重要意义。此外，

3.8 连花清菲代用茶对H3N2甲型流感雪貂肺组织病理形态的影响 如图6A所示，正常组雪貂肺泡上皮无明显变化，未见炎症细胞浸润；模型组雪貂肺泡上皮发生破坏、间隔增厚、炎性血性渗出及炎性细胞浸润；磷酸奥司他韦颗粒组、板蓝根颗粒组和连花清菲代用茶各剂量组雪貂肺组织病变较模型组有不同程度的减轻。如图6B所示，与正常组比较，模型组雪貂肺组织病理评分升高 (P<0.01)；与模型组比较，各给药组雪貂肺组织病理评分降低 (P<0.05, P<0.01)。

4 讨论

甲型H3N2流感病毒是全球流感流行的主导亚型，对人类健康构成严重威胁，至今尚未找到彻底控制其流行与暴发的有效措施^[10-11]。该病毒具有广泛的宿主适应性，能感染鸟类、人类和哺乳动物，特别是雪貂，因其对多种甲型流感病毒感染的高度敏感性和病理特征与人类相似，已



呼吸道感染过程中，IFN-γ和TNF-α在免疫系统中同样扮演着重要角色，其水平升高提示肺组织中存在炎症反应，进而提示呼吸道感染病情加重。值得注意的是，IFN-γ不仅能直接参与炎症反应，还能间接诱导促进T细胞分泌IFN-γ，从而形成正反馈循环，进一步加剧炎症反应，并增强两因子的活化状态^[22-24]。TNF-α作为参与免疫生理过程的重要促炎细胞因子，有广泛的生物活性。当流感病毒侵入呼吸道上皮细胞时，会诱导促炎症因子表达，加速炎症反应的发生，可能会导致组织损伤，加重病情^[25-26]。本实验发现，雪貂气管注射H3N2甲型流感病毒感染后，表现出与人类感染流感病毒的相似的症状，如自主活性减少，并伴有咳嗽、喷嚏、体温增加等，且肺组织出现不同程度的病变（如肺泡结构破坏、炎性细胞浸润等）。此外雪貂外周血中CD4⁺T细胞比例及CD4⁺T/CD8⁺T细胞比例降低，CD8⁺T细胞比例升高，局部肺组织炎症因子IFN-γ、TNF-α水平升高，提示其细胞免疫系统出现失调，与文献报道基本一致。经连花清菲代用茶干预后，雪貂症状评分减少，肺组织IFN-γ、TNF-α水平降低，CD4⁺T/CD8⁺T细胞比例升高，肺组织病变程度改善。

实时荧光定量PCR法作为临床流感病毒诊断的金标

准，可动态监测流感病毒感染情况，反映其病毒载量，预示其感染的严重程度。本研究发现，感染后的雪貂咽拭子中流感病毒拷贝数明显增加，提示流感病毒在雪貂呼吸道成功定植；经连花清菲代用茶干预后，其咽拭子中H3N2甲型流感病毒载量随着给药剂量增加而减少，表明连花清菲代用茶能抑制雪貂肺组织H3N2甲型流感病毒复制。

综上所述，连花清菲代用茶可抑制H3N2甲型流感病毒复制，减轻肺组织病变程度，其作用机制可能与抑制局部肺组织炎性介质分泌及提高机体免疫细胞功能有关。

参考文献：

- [1] Jester B J, Uyeki T M, Jernigan D B. Fifty years of influenza A (H3N2) following the pandemic of 1968[J]. *Am J Public Health*, 2020, 110(5): 669-676.
- [2] Delahoy M J, Mortenson L, Bauman L, et al. Influenza A (H3N2) outbreak on a university campus—Michigan, October–November 2021[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2021, 70(49): 1712-1714.
- [3] Eric J C, Joshua D D, Timothy M U. Influenza virus-related critical illness: prevention, diagnosis, treatment[J]. *Crit Care*, 2019, 23(1): 214.
- [4] Mithun K R, Jayashankar C A, Venkataramana K, et al. Exploring the correlation between influenza A virus (H3N2) infections and neurological manifestations: A scoping review[J]. *Cureus*, 2023, 15(3): e36936.
- [5] Robinson J L, Saux N L. Neurologic manifestations of influenza in children[J]. *J Assoc Med Microbiol Infect Dis Can*, 2020, 5(1): 1-3.
- [6] Mastrolia M V, Rubino C, Resti M, et al. Characteristics and outcome of influenza-associated encephalopathy/encephalitis among children in a tertiary pediatric hospital in Italy, 2017-2019[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 1012.
- [7] Jones K L, Granger L A, Kearney M T, et al. Evaluation of a ferret-specific formula for determining body surface area to improve chemotherapeutic dosing[J]. *Am J Vet Res*, 2015, 76(2): 142-148.
- [8] Huang S S, Banner D, Fang Y, et al. Comparative analyses of pandemic H1N1 and seasonal H1N1, H3N2, and influenza B infections depict distinct clinical pictures in ferrets[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27512.
- [9] Matsuoky Y, Lamirande E W, Subbarao K. The ferret model for influenza[J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2009, Chapter 15: Unit 15G. 2.
- [10] Liu T F, Huang Y H, Xie S M, et al. A Characterization and an evolutionary and a pathogenicity analysis of reassortment H3N2 avian influenza virus in south China in 2019-2020[J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2574.
- [11] Blanton L, Dugan V G, Abd Elal A I, et al. Update: Influenza activity – United States, September 30, 2018 – February 2, 2019[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019, 68 (6): 125-134.
- [12] Gagnon C A, Spearman G, Hamel A, et al. Characterization of a Canadian mink H3N2 influenza A virus isolate genetically related to triple reassortant swine influenza virus[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(3): 796-799.
- [13] Nguyen T Q, Rollon R, Choi Y K. Animal models for influenza research: strengths and weaknesses[J]. *Viruses*, 2021, 13(6): 1011.
- [14] Li W J, Zhang L Q, He P, et al. Traditional uses, botany, phytochemistry, and pharmacology of *Lonicera japonicae flos* and *Lonicera flos*: A systematic comparative review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322: 117278.
- [15] 王林青, 崔保安, 张红英. 金银花、山银花黄酮类提取物体外抗伪狂犬病病毒作用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(3): 183-188.
- [16] Run F L, Yun L H, Ji C H, et al. Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2) [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 156: 104761.
- [17] 玄振玉, 王 勇. 高纯度连翘酯苷在制备抑菌、抗病毒及其它药物中的应用: 中国, 101390869[P]. 2009-03-25.
- [18] Qu X Y, Li Q J, Zhang H M, et al. Protective effects of phillyrin against influenza A virus *in vivo*[J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(7): 998-1005.
- [19] 孙国威, 米 雪, 周彦军, 等. 百合多糖提取及其止咳作用研究[J]. 农产品加工, 2020(20): 8-11; 14.
- [20] 马国平, 杨 晨, 王广基, 等. 9种润肺化痰中药祛痰作用的比较[J]. 中国医药导报, 2017, 14(7): 16-19.
- [21] 谢雄雄, 张 迟, 曾金祥, 等. 桔梗提取物部位群镇咳祛痰活性与桔梗皂苷成分研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(13): 1647-1653.
- [22] Lawler C, Stevenson P G. A CD4⁺ T cell-NK cell axis of gammaherpesvirus control[J]. *J Virol*, 2020, 94 (3): e01545-19.
- [23] Zander R, Schauder D, Xin G, et al. CD4⁺ T Cell help is required for the formation of a cytolytic CD8⁺ T cell subset that protects against chronic infection and cancer[J]. *Immunity*, 2019, 51(6): 1028-1042.
- [24] 范春红, 李时悦, 李 明, 等. IFN-γ、IL-32、IL-1β 在慢性阻塞性肺疾病中的临床意义[J]. 中外医疗, 2011, 30(19): 21-23.
- [25] 任韩雯婧, 张 川, 乐 涛, 等. ICU 重症肺部感染患者血清 IL-6、IL-1β、IL-8 和 TNF-α 水平变化及其与预后的关系[J]. 热带医学杂志, 2022, 22(10): 1371-1375.
- [26] 段志辉, 程晓伟, 曹友林, 等. 血清 NT-proBNP、Copeptin、MMP-9 及 HMGB1 表达水平在重症肺炎患者中的意义[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(6): 787-790.