

袁兵,李润峰,杨春光,等. 奥司他韦在树鼩体内的药动及药效学应用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 7-13.  
Yuan B, Li RF, Yang CG, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of oseltamivir in tree shrew[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 7-13.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.02.002

# 奥司他韦在树鼩体内的药动及药效学应用研究

袁 兵<sup>1,2</sup>, 李润峰<sup>1</sup>, 杨春光<sup>1</sup>, 张 晟<sup>1</sup>, 张云辉<sup>2</sup>, 角建林<sup>3</sup>,  
张荣平<sup>4</sup>, 夏雪山<sup>5</sup>, 杨子峰<sup>1\*</sup>

(1. 广州医科大学附属第一医院广州呼吸健康研究院(呼吸疾病国家重点实验室, 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心), 广州 510120; 2. 云南省第一人民医院呼吸内科昆明理工大学附属医院, 昆明 650032; 3. 昆明医科大学实验动物学部, 昆明 650500; 4. 昆明医科大学生物医学工程中心, 昆明 650500; 5. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650505)

**【摘要】 目的** 探讨奥司他韦在树鼩体内的药代动力学参数特征, 以及在树鼩体内的抗流感病毒药效作用。  
**方法** 树鼩经口服磷酸奥司他韦后取血浆用于药代动力学分析, 并与人、雪貂、小鼠、大鼠的药代动力学参数比较; 树鼩经鼻接种感染人流感病毒 A/California/04/2009 H1N1 和禽流感病毒 H9N2 突变株 Y280-PB2-E627K, 给予奥司他韦治疗, 观察鼻腔症状, 收集感染后第 1, 3 和 5 天鼻灌洗液及沉淀分别行病毒 TCID<sub>50</sub> 检测和细胞分类计数, 检测感染后 21 d 血清中和抗体滴度。  
**结果** 奥司他韦在树鼩体内的药代动力学参数为: C<sub>max</sub>: 1.34 μg/mL, T<sub>max</sub>: 0.75 h, T<sub>1/2</sub>: 2.03 h, AUC<sub>0-12</sub>: 1.76 mg·h/liter。奥司他韦对感染 A/California/04/2009 H1N1 病毒的树鼩鼻腔排毒抑制作用不明显, 但高剂量组奥司他韦可明显抑制感染 H9N2 Y280-PB2-E627K 病毒树鼩第 1 天的鼻腔排毒, 减少第 3 天鼻灌洗液中细胞总数。感染 A/California/04/2009 H1N1 病毒后产生的抗体效价明显高于 H9N2 Y280-PB2-E627K 禽流感病毒的抗体效价, 奥司他韦抗病毒治疗对感染同一病毒各组间血清抗体效价无影响。  
**结论** 奥司他韦在树鼩体内的药代动力学参数不同于人或雪貂等模型动物, 但其药物血浆清除半衰期和达峰时间与小鼠相近; 药效学方面奥司他韦可有效抑制感染 H9N2 Y280-PB2-E627K 流感病毒树鼩的鼻腔病毒排毒和炎症反应。

**【关键词】** 树鼩; 流感病毒; 磷酸奥司他韦; 药代动力学; 药效学

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 02-0007-07

## The pharmacokinetics and pharmacodynamics of oseltamivir in tree shrew

YUAN Bing<sup>1,2</sup>, LI Runfeng<sup>1</sup>, YANG Chunguang<sup>1</sup>, ZHANG Sheng<sup>1</sup>, ZHANG Yunhui<sup>2</sup>, JIAO Jianlin<sup>3</sup>,  
ZHANG Rongping<sup>4</sup>, XIA Xueshan<sup>5</sup>, YANG Zifeng<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China. 2. Department of Respiration, First People's Hospital of Yunnan Province & Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032. 3. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500. 4. Department of Biological Engineer, Kunming Medical University, Kunming 650500. 5. Life Science and Technology College, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650505)

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目(81471937; 81760379), 广州市属高校科研项目(1201410111), 广州市属高校“羊城学者”科研项目(1201561571), 云南省应用基础研究(昆医联合专项)(2017FE468-239)。

**【作者简介】** 袁兵(1977—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 呼吸系统感染性疾病。E-mail: 506638016@qq.com

**【通信作者】** 杨子峰(1977—), 男, 博士, 副教授, 博士研究生导师, 研究方向: 呼吸道病毒致病机制和药物研发。E-mail: jeffyah@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the pharmacokinetic parameters of oseltamivir and the efficacy of oseltamivir against influenza virus in tree shrews. **Methods** Tree shrews were orally administered oseltamivir for pharmacokinetic analysis, and then their pharmacokinetic parameters were compared with those of humans, ferrets, mice, and rats reported in the literature. The tree shrews were inoculated with human influenza virus A/California/04/2009 H1N1 or avian influenza virus H9N2 Y280-PB2-E627K intranasally. Oseltamivir was orally administered twice a day for 5 consecutive days. Nasal symptoms of the tree shrews were observed, and the viral titer of nasal lavage was determined on 1, 3, and 5 days after inoculation, the cell sedimentation of nasal lavage fluid was classified and counted. After 21 days of infection, the tree shrews were executed humanely and the serum antibody titers were determined by hemagglutination inhibition test. **Results** The pharmacokinetics of oral oseltamivir in tree shrews was as follows:  $C_{max}$  1.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $T_{max}$  0.75 h,  $T_{1/2}$  2.03 h, and  $AUC_{0-12}$  1.76  $\text{mg}\cdot\text{h}/\text{liter}$ . The viral shedding of tree shrews infected with H9N2 Y280-PB2-E627K virus was clearly inhibited after 1 day in the high-dosage oseltamivir treatment group, however, there was no clear inhibitory effect for A/California/04/2009 H1N1 virus. High-dosage oseltamivir treatment also reduced the nasal lavage fluid cell count of tree shrews infected with H9N2 Y280-PB2-E627K virus. The antibody titer of tree shrews infected with A/California/04/2009 H1N1 virus was significantly higher than that of H9N2 Y280-PB2-E627K avian influenza virus. **Conclusions** The pharmacokinetic parameters of oseltamivir in tree shrews differ from those in humans and other model animals, such as ferrets, however, the  $T_{max}$  and  $T_{1/2}$  of oseltamivir in tree shrews were similar to those of mice. Oseltamivir can effectively inhibit the shedding of H9N2 Y280-PB2-E627K viruses and alleviate the inflammatory reaction in tree shrew nasal cavity.

**[Keywords]** tree shrew; influenza virus; oseltamivir phosphate; pharmacokinetics; pharmacodynamics

流感疾病严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>,目前常用于流感疾病研究的小鼠、雪貂等动物模型由于与人类种属差异过大,药物预见性较差,如小鼠流感致病机制与人类存在较大差异<sup>[2]</sup>,临床模拟性和药物预见性较差,多种经小鼠模型验证有效的抗炎药止步于临床试验<sup>[3]</sup>;另外小鼠、雪貂等模型动物在抗流感药物药代动力学参数方面与人相比差异较大,如人类口服奥司他韦的生物利用度大于 75%<sup>[4]</sup>,但是小鼠和雪貂的生物利用度仅为 30% 和 11%<sup>[5]</sup>。因此开发一种能有效复制人类流感疾病特征和良好药物预见性的新型动物模型,对于开发和筛选新的抗流感药物或疫苗的疗效,评估抗病毒治疗方案具有重要价值。

树鼩 (*Tupaia belangeri*, family Tupaiidae) 是一种形似松鼠的小型哺乳动物,在我国主要分布于云南、贵州、广西等地区。2013 年中科院昆明动物所科学家发现树鼩与灵长类亲缘关系比小鼠等常用动物模型更为接近,在很多方面具有可用来替代猕猴等大型灵长类实验动物的遗传基础<sup>[6]</sup>,已在病毒性感染疾病等多种疾病模型中获得广泛应用<sup>[7-8]</sup>,在上世纪 80 年代树鼩已用于流感病毒研究<sup>[9]</sup>。本课题组进一步证实树鼩在流感症状、病毒复制,呼吸道受体分布等方面较其他常见流感动物模型与人流感疾病特征更具模拟性<sup>[10]</sup>,然而抗流感药物在树鼩动物模型上的药代动力学以及药效学研究方面却未见报道。为开发这一新的动物资源,本研究通过检测奥司他韦在树鼩体内血浆中代谢产物浓

度变化,估算其药代动力学参数,并与其他动物模型的奥司他韦药代动力学参数比较,为奥司他韦在树鼩体内的合理用药提供依据,在此基础上,进一步研究口服奥司他韦在树鼩体内能否有效抑制流感病毒排毒,以及对流感疾病症状的影响,为验证树鼩是一个具有良好药物治疗预见性的流感动植物模型提供客观的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

清洁级野生驯养树鼩 80 只,雌性,100~155 g,12~15 月龄,购自昆明医科大学医学实验动物学部 [SCXK(滇) 2013-0002]。购置后于昆明理工大学实验动物中心 BSL-3 级标准动物房中 IVC 装置笼具中饲养、实验 [SYXK(滇) 2011-0004]。实验程序符合实验动物伦理委员会要求,动物使用的伦理审批号 IACUC: KMU2017-M0016,按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

#### 1.1.2 病毒

人甲型流感病毒株 (A/California/04/2009 H1N1) 和 A/Duck/HK/Y280/97 H9N2 禽流感病毒突变株 (H9N2 Y280-PB2-E627K) 由香港大学惠赠;犬肾传代细胞 (Madin-Darby canine kidney, MDCK) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,由广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室保存。

## 1.2 主要试剂与仪器

磷酸奥司他韦(批号:SC-18802)购自江苏信达医药科技有限公司;F-12/DMEM 培养液(批号:8117019)、胎牛血清(批号:10270-106)、0.25%胰蛋白酶 Trypsin(批号:25200-056)、青霉素/链霉素溶液(100x)(批号:15140-122)购自美国 GIBCO 公司;TPCK 胰酶(批号:T1426)购自美国 Sigma 公司;戊巴比妥钠(批号:P3761)购自广州捷倍斯生物科技有限公司;大鼠 IVC 独立送风隔离笼具(苏州冯氏实验动物设备有限公司)。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 动物分组

实验用树鼩取血清经血凝抑制实验检测证实 A/California/04/2009 H1N1 和 A/Duck/HK/Y280/97 H9N2 抗体为阴性,将动物随机进行以下分组:①奥司他韦药代动力学组:根据经口灌胃口服奥司他韦后取血时间,将树鼩分为 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 和 12 h 组,每组 4 只,共计 40 只。②A/California/04/2009 H1N1 感染组:树鼩随机分为 A/California/04/2009 H1N1 病毒组,奥司他韦高剂量(40 mg/(kg·d))给药组,奥司他韦低剂量(4 mg/(kg·d))给药组,每组 6 只动物,共计 18 只树鼩,每只树鼩经鼻接种 A/California/04/2009 H1N1 病毒  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/250  $\mu$ L。③H9N2 Y280-PB2-E627K 感染组:树鼩随机分为 H9N2 禽流感病毒组,奥司他韦高剂量给药组,奥司他韦低剂量给药组,每组 6 只动物,共计 18 只树鼩,每只树鼩经鼻接种 H9N2 Y280-PB2-E627K 病毒  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/250  $\mu$ L。④正常对照组:设 4 只对照组,经鼻接种 250  $\mu$ L PBS。

### 1.3.2 奥司他韦药代动力学研究

40 只树鼩禁食 12 h(自由饮水)后,经口灌胃给予奥司他韦 10 mg/kg,首次灌胃给药后记录给药时间,分别于给药后 0、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8 和 12 h 经尾静脉或股静脉采血 0.5 mL,方法同文献<sup>[10]</sup>,采集到的血液置于含肝素离心管中,1500 r/min 4℃离心 10 min,血浆转移至 EP 管中置 -80℃ 深低温冰箱保存。

精确称取适量磷酸奥司他韦、羧基奥司他韦及内标帕拉米韦,用 90% 甲醇水溶液制成药 1 mg/mL 储备液,其中磷酸奥司他韦需折算成奥司他韦浓度,然后用甲醇逐级稀释成梯度工作溶液;内标帕拉米韦用甲醇配成 1  $\mu$ g/mL 的工作溶液。分别取 10  $\mu$ L 磷酸奥司他韦和羧基奥司他韦工作溶液,加

入 50  $\mu$ L 空白树鼩血浆,再加入 130  $\mu$ L 含内标帕拉米韦的工作溶液,涡旋混合离心 10 min,取上清液 10  $\mu$ L 进样分析,其中磷酸奥司他韦血浆浓度依次为 0.1、0.5、2.5、5.0、10、50、100、200、400、800、1500 ng/mL,羧基奥司他韦血浆浓度依次为 2.5、5.0、10、25、50、250、500、2000 和 4000 ng/mL。以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权( $W = 1/x$ )最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程,经线性拟合,奥司他韦在 0.1 至 200 ng/mL 范围内成线性关系,线性方程为: $y = 0.00412x + 0.000616$  ( $r = 0.97$ ),绘制标准曲线见图 1,根据标准曲线获得各血样检测结果,及对应的统计矩参数和药时曲线。

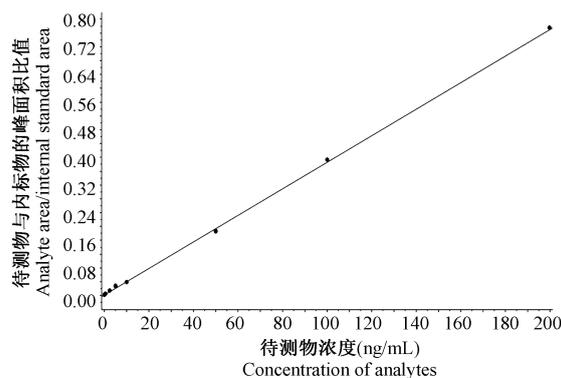


图 1 标准曲线

Figure 1 Standard curve of the analytes

### 1.3.3 奥司他韦治疗对树鼩鼻腔排毒和细胞计数的影响

称取动物体质量,按奥司他韦高剂量和低剂量计算每日给药总剂量,分两次给药,于病毒接种前 2 h 给药,每日给药两次,连续给药 5 d。每日观察树鼩鼻部症状,树鼩感染后第 1、3 和 5 天经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液麻醉后,吸取 600  $\mu$ L 无菌 PBS,从树鼩一侧鼻孔缓慢滴入,用 90 mm<sup>2</sup> 平皿收集鼻灌洗液,鼻灌洗液经 800 r/min 离心取上清适量分装,鼻灌洗液沉淀进行细胞分类计数,收集的鼻灌洗液检测病毒滴度 TCID<sub>50</sub>。

### 1.3.4 血清抗体效价检测

A/California/04/2009 H1N1 和 H9N2 Y280-PB2-E627K 病毒感染组树鼩(包括病毒组,奥司他韦高剂量/低剂量给药组)饲养至病毒感染后第 21 天行安乐死,心脏取血后收集血清,分装至 EP 管中, -80℃ 保存备用,通过血凝抑制实验检测血清病毒中和抗体滴度。

## 1.4 统计学方法

数据以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计检验,在不同组之间存在的差异进行 ANOVA 单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 树鼩与其他几种流感动动物模型药代动力学参数比较

树鼩口服给予磷酸奥司他韦 10 mg/(kg·d),给药后血浆中奥司他韦的药时曲线见图 2:树鼩口服奥司他韦给药后血浆中活性成分羧基奥司他韦的主要药代动力学参数如下:高峰血药浓度( $C_{max}$ )为 1.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,达峰时间( $T_{max}$ )为 0.75 h,血清清除半衰期( $T_{1/2}$ )为 2.03 h,血药浓度-时间曲线下面积( $AUC_{0-12}$ )为 1.76  $\text{mg}\cdot\text{h}/\text{liter}$ 。进一步查阅文献<sup>[5,11-12]</sup>比较其与大鼠、小鼠、雪貂及人口服奥司他韦后相应药代动力学参数差异(表 1)。

### 2.2 奥司他韦对树鼩感染 H9N2 Y280-PB2-E627K 和 A/California/04/2009 H1N1 流感病毒药效学研究

在治疗后第 1 天,奥司他韦高剂量给药组树鼩鼻腔 H9N2 病毒排毒被明显抑制,至第 3 天奥司他韦高剂量给药组树鼩鼻腔已无排毒,病毒组和奥司他韦低剂量给药组鼻腔排毒明显减少(图 3A);但树鼩感染 A/California/04/2009 H1N1 病毒后治疗第 1 天和第 3 天,奥司他韦对各组鼻腔排毒滴度基本没有影响,至治疗第 5 天时奥司他韦高剂量给药组树鼩鼻腔排毒较病毒组明显下降,有 3/5 的树鼩未再检出 A/California/04/2009 H1N1 流感病毒,而

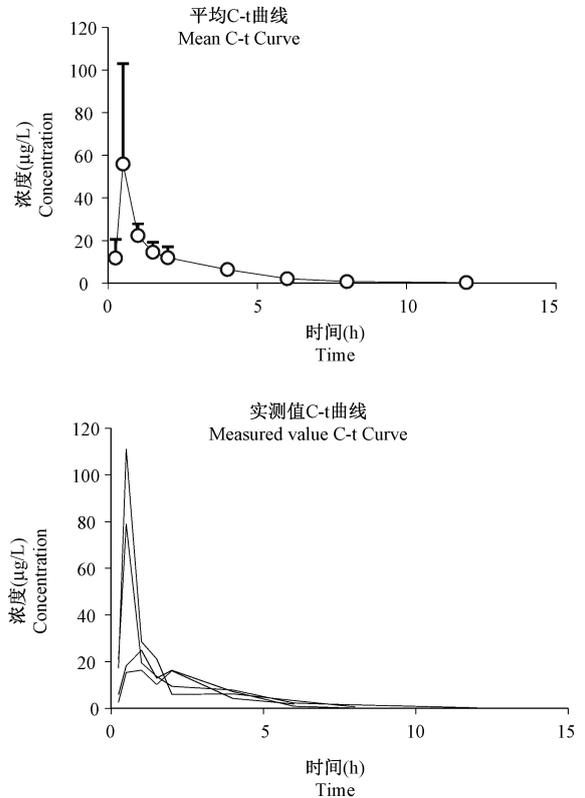


图 2 树鼩口服给药后血浆中奥司他韦药时曲线

Figure 2 The concentration-time curve of oseltamivir in plasma after its oral administration to tree shrews

病毒组和奥司他韦低剂量给药组鼻腔灌洗液排毒虽然较前降低,但所有树鼩仍有排毒(图 3B)。

感染 H9N2 Y280-PB2-E627K 和 A/California/04/2009 H1N1 流感病毒后,部分树鼩鼻腔灌洗液中黄色粘稠分泌物增多,在感染后第 3 天鼻腔灌洗液中细胞计数增加至高峰,细胞以上皮细胞和淋巴细胞为主,其中高剂量奥司他韦能够明显抑制 H9N2

表 1 树鼩及其他动物模型奥司他韦药代动力学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of oseltamivir in the tree shrews and other animal models

动物 Animals	试剂 Reagents	剂量 (mg/kg) Dose	高峰血药 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) $C_{max}$	达峰 时间(h) $T_{max}$	血清清除 半衰期(h) $T_{1/2}$	血药浓度-时间 曲线下面积 ( $\text{mg}\cdot\text{h}/\text{liter}$ ) $AUC_{0-12}$	血药浓度-时间 曲线下面积 ( $\text{mg}\cdot\text{h}/\text{liter}$ ) $AUC_{0-24}$	口服生物 利用度 (%) F
树鼩 Tree shrew	OP	10	1.34	0.75	2.03	1.76		
小鼠 Mice	OP	10	3.3	0.8	2.8		9.4	46.4
大鼠 Rat	Gs 4104	10	0.47	1.6	7.0		3.0	35
雪貂 Ferret	Gs 4104	5	0.2	2	5.7		1.2	11
人 Human	Tamiflu	75	0.348	3-4	6-10	2.72		75

Y280-PB2-E627K 病毒感染组鼻腔细胞总数(图 4 A),但对 A/California/04/2009 H1N1 病毒感染各组鼻腔细胞总数无影响(图 4B)。

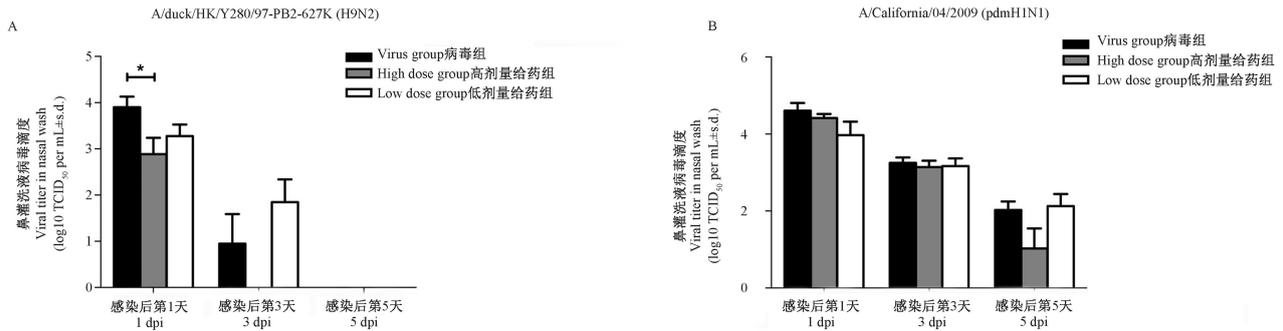
### 2.3 奥司他韦对树鼩感染 H9N2 Y280-PB2-E627K 和 A/California/04/2009 H1N1 流感病毒血清抗体影响

树鼩感染人甲型流感病毒 A/California/04/2009 H1N1 和禽流感病毒 H9N2 Y280-PB2-E627K 后均能产生相应抗体,人甲型流感病毒 A/California/04/2009 H1N1 感染后产生的抗体

效价(640-2560)明显高于禽流感病毒 H9N2 Y280-PB2-E627K 产生的抗体效价(160-640),奥司他韦抗病毒治疗对流感病毒抗体产生无明显影响(表 2)。

### 3 讨论

奥司他韦口服吸收后可在体内转化为活性代谢产物奥司他韦羧酸盐<sup>[13]</sup>,以人体代谢为例,奥司他韦活性代谢物在血浆中可在 30 min 内检测到,并在 3~4 h 后达到最大浓度,半衰期 6~10 h<sup>[12]</sup>,本项

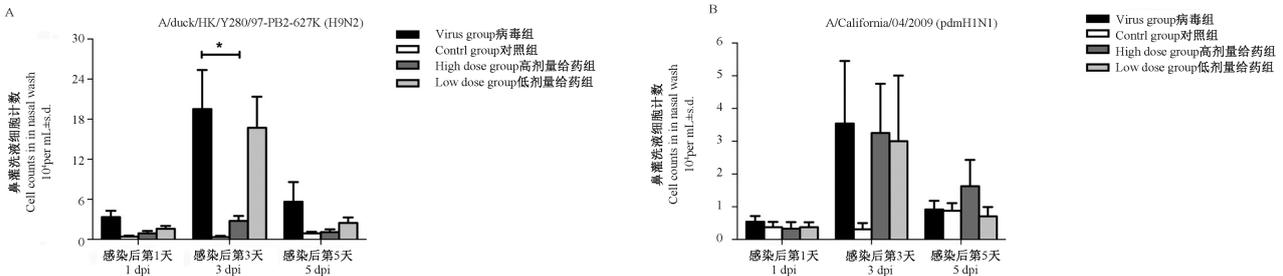


注:与病毒组相比, \* P<0.05。

图 3 不同毒株感染奥司他韦治疗后树鼩排毒滴度

Note. Compared to the virus group, \* P<0.05.

Figure 3 Viral shedding in the tree shrews infected with different viruses after oseltamivir treatment



注:与病毒组相比, \* P<0.05。

图 4 不同毒株感染奥司他韦治疗后树鼩鼻灌洗液细胞计数

Note. Compared to the virus group, \* P<0.05.

Figure 4 Cell count in the nasal cavity lavage of tree shrews infected with different viruses after oseltamivir treatment

表 2 树鼩感染流感病毒后血清效价

Table 2 The seroconversion of tree shrews infected with influenza virus

病毒 Virus	分组 Groups	血清效价(平均值,血清抗体效价范围) Seroconversion(mean, HI titer range)
H9N2(A/Duck/HK/Y280/97 H9N2)	病毒组 Virus group	213, 160~320
	高剂量给药组 High dose group	224, 160~320
	低剂量给药组 Low dose group	347, 160~640
H1N1(A/California/04/2009 H1N1)	病毒组 Virus group	960, 640~1280
	高剂量给药组 High dose group	1067, 640~1280
	低剂量给药组 Low dose group	1600, 640~2560

注:高剂量给药量(40 mg/(kg·d));低剂量给药量(4 mg/(kg·d))。

Note. High dose(40 mg/(kg·d));Low dose(4 mg/(kg·d)).

目药代动力学检测结果显示奥司他韦在树鼩体内的高峰血药浓度、达峰时间、血清清除半衰期( $T_{1/2}$ )、血药浓度-时间曲线下面积( $AUC_{0-12}$ )等与大鼠、雪貂和人各药代动力学参数间相差较大,仅药物达峰时间和血浆清除半衰期与小鼠相近,这些参数可在一定程度上指导奥司他韦在树鼩的应用。本研究中树鼩个体间药代动力学参数差异比较大,这可能与所用树鼩为野生驯养树鼩,遗传背景差异较大有关,研究人员可在后续动物实验中通过增大树鼩数量,以减少数据之间的误差。

在药效学研究中,课题组借鉴人采用每天两次,每次 75 mg,共 5 d 足以抑制季节性流感病毒毒株的神经氨酸酶活性<sup>[14-15]</sup>特点,同时根据树鼩与人类及其它实验动物的体表面积进行等效剂量换算<sup>[16]</sup>,以及前期实验树鼩鼻腔排毒时间(4~6 d),确定本研究奥司他韦给药剂量高剂量为 40 mg/(kg·d),低剂量为 4 mg/(kg·d),给药时间为 5 d。本研究中树鼩感染 A/California/04/2009 H1N1 和 H9N2 Y280-PB2-E627K 流感病毒后,鼻腔可有效复制,规律排毒,其中感染 A/California/04/2009 H1N1 病毒后鼻腔排毒滴度、排毒时间均大于感染 H9N2 Y280-PB2-E627K 禽流感病毒,甚至长于课题组先前的树鼩感染人甲型流感病毒(A/PR/8/34, GZ/02/09 和 SOIV/GZ/07/09)排毒时间<sup>[10]</sup>,其可能原因与所用的 A/California/04/2009 H1N1 流感病毒属于 2009 年大流行人甲型流感病毒,对模型动物具有较强的致病力和毒力<sup>[17]</sup>,另一方面也可能与经鼻腔接种病毒剂量高于先前实验( $10^5$  TCID<sub>50</sub>)有关。奥司他韦羧酸盐属于选择性流感病毒神经氨酸酶抑制剂<sup>[12]</sup>,能够有效抑制病毒从被感染的细胞中释放,从而减少流感病毒的传播<sup>[18]</sup>,树鼩口服奥司他韦对其鼻腔排毒具有抑制作用,但不同给药剂量以及不同感染毒株之间存在较大差异,高剂量奥司他韦对 A/California/04/2009 H1N1 和 H9N2 Y280-PB2-E627K 流感病毒的抑制作用强于低剂量给药,其中对感染 H9N2 Y280-PB2-E627K 病毒树鼩的排毒抑制作用明显高于感染 A/California/04/2009 H1N1 病毒树鼩,这种差异一方面与所用毒株 A/California/04/2009 H1N1 毒力明显高于 H9N2 Y280-PB2-E627K,奥司他韦在感染初期不能有效抑制树鼩鼻腔 H1N1 病毒复制,另一方面与奥司他韦对不同毒株的抑制作用存在差异有关<sup>[19]</sup>。

树鼩感染人甲型流感病毒 A/California/04/

2009 H1N1 后产生的抗体效价明显高于 H9N2 Y280-PB2-E627K 禽流感病毒感染产生的抗体效价,其原因可能与流感毒株类型和毒力有关<sup>[20]</sup>,病毒毒力强的毒株可产生的较高的抗体滴度,血清中产生的中和抗体,对病毒再感染可产生积极的免疫力<sup>[21]</sup>。而感染相同病毒的不同给药组和病毒组之间抗体效价接近,说明奥司他韦对病毒抗体效价的产生没有影响。课题组在前期研究发现 H9N2 Y280-PB2-E627K 流感病毒感染能够促进机体分泌炎症细胞因子和趋化因子,本研究中发现树鼩感染 A/California/04/2009 H1N1 和 H9N2 Y280-PB2-E627K 流感病毒后,在部分树鼩鼻灌洗液中含有黄色粘稠分泌物,细胞计数增加,以第 3 天为高峰,说明与其他模型动物研究类似,流感病毒感染可导致树鼩鼻部粘膜出现炎症反应<sup>[22]</sup>,增加的细胞包括上皮细胞和炎性细胞,炎性细胞以淋巴细胞为主,而上皮细胞和炎症细胞能够分泌炎性细胞因子<sup>[23]</sup>,促进与流感病毒感染相关的炎症反应。而高剂量奥司他韦给药组可以有效抑制了 H9N2 Y280-PB2-E627K 病毒复制,导致该组树鼩鼻腔中的细胞总数无明显上升,说明奥司他韦抗流感药物可以通过降低流感病毒滴度,减少流感相关的炎症反应。

综上,磷酸奥司他韦治疗能够降低树鼩鼻腔排毒,减轻相关炎症反应,说明该模型具有一定药物治疗预见性,可将其应用于抗病毒药物优化剂量研究<sup>[13]</sup>,对机体有损害副作用的抗病毒药物<sup>[24]</sup>发生机制研究,以及耐药或新发流感病毒的致病机理研究,为流感疾病的研究提供了一个有效的动物平台工具。

#### 参考文献:

- [1] Fischer WA 2nd, Gong M, Bhagwanjee S, et al. Global burden of influenza as a cause of cardiopulmonary morbidity and mortality [J]. *Glob Heart*, 2014,9(3):325-336.
- [2] Darwish I, Mubareka S, Liles W. Immunomodulatory therapy for severe influenza[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011,9(7):807-822.
- [3] Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(9):3507-3512.
- [4] Roche Laboratories Inc. Tamiflu (Oseltamivir phosphate) capsules and for oral suspension [EB/OL]. Available online: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/UCM147992>, 2008.
- [5] Li W, Escarpe PA, Eisenberg EJ, et al. Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus

- neuraminidase inhibitor GS 4071 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998,42(3):647-653.
- [6] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew[J]. *Nat Commun*, 2013,4:1426.
- [7] 郑永唐,姚永刚,徐林,等.树鼩基础生物学与疾病模型[M]. 云南科技出版社,2014.
- [8] 王晓娟,杨春,苏建家.树鼩在医学实验研究中的新进展[J]. *中国比较医学杂志*,2010,20(2):67-70.
- [9] 何永旺,李娟,黄俭,等.树鼩尾静脉注射单人操作方法与经验[J]. *中国比较医学杂志*,2018,28(3):91-94.
- [10] Yang ZF, Zhao J, Zhu YT, et al. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1 virus [J]. *Virology*, 2013, 10:111.
- [11] Shin JS, Ku KB, Jang Y, et al. Comparison of anti-influenza virus activity and pharmacokinetics of oseltamivir free base and oseltamivir phosphate[J]. *J Microbiol*, 2017,55(12):979-983.
- [12] He G, Massarella J, Ward P. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802[J]. *Clin Pharmacokinet*, 1999,37(6):471-84.
- [13] Kamal MA, Gieschke R, Lemenuel-Diot A, et al. A drug-disease model describing the effect of oseltamivir neuraminidase inhibition on influenza virus progression [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015,59(9):5388-5395.
- [14] Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group [J]. *Lancet*, 2000,355(9218):1845-1850.
- [15] Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group [J]. *JAMA*, 2000,283(8):1016-1024.
- [16] 吴婷婷,屈会化,胡丽娜,等.基于树鼩体表面积的树鼩与人类及其它实验动物等效剂量换算系数的测算[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(1):203-204.
- [17] Ye J, Sorrell EM, Cai Y, et al. Variations in the hemagglutinin of the 2009 H1N1 pandemic virus: potential for strains with altered virulence phenotype [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(10):e1001145.
- [18] Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza [J]. *N Engl J Med*, 2005,353(13):1363-1373.
- [19] Bauer K, Richter M, Wutzler P, et al. Different neuraminidase inhibitor susceptibilities of human H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany from 2001 to 2005/2006 [J]. *Antiviral Res*, 2009,82(1):34-41.
- [20] Huang SS, 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.
- [21] Francis T, Magill TP. Immunological studies with the virus of influenza [J]. *J Exp Med*, 1935,62(4):505-516.
- [22] Sakudo A, Baba K, Ikuta K. Analysis of Vis-NIR spectra changes to measure the inflammatory response in the nasal mucosal region of influenza A and B virus-infected patients [J]. *J Clin Virol*, 2012,55(4):334-338.
- [23] La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, et al. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007,85(2):85-92.
- [24] Wiwanitkit S, Wiwanitkit V. Adverse drug reaction of oseltamivir in pediatric patients [J]. *J Pharmacol Pharmacother*, 2012, 3(1):81.

〔收稿日期〕2018-06-28