

## 金振口服液抑制小鼠流感病毒性肺炎的药效及机制研究

白洁<sup>1</sup>, 张新庄<sup>2</sup>, 刘杰璇<sup>2</sup>, 曹亮<sup>2</sup>, 王振中<sup>2</sup>, 章晨峰<sup>2</sup>, 肖伟<sup>1,2\*</sup>

1. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222000

**摘要:** **目的** 研究金振口服液抑制小鼠流感病毒性肺炎的药效及作用机制。**方法** 将 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组, 金振口服液高、中、低剂量 (4.4、2.2、1.1 g/kg) 组和磷酸奥司他韦胶囊 (0.05 g/kg) 组。除对照组外, 其余各组小鼠滴鼻感染甲型 H1N1 流感病毒构建小鼠病毒性肺炎模型, 测定各组小鼠存活时间和肺指数; 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肺组织病理变化; 流式细胞术检测外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平; ELISA 法检测血清及肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 及白细胞介素-10 (IL-10) 水平; Western blotting 法检测肺组织 Toll 样受体 3 (TLR3)、 $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TRIF) 和核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 金振口服液给药组和磷酸奥司他韦胶囊组能显著延长小鼠存活时间, 降低肺指数 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 减轻肺组织病理损伤; 显著上调外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值, 下调 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 明显降低血清及肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平, 升高 IL-10 水平 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 显著抑制肺组织 TLR3、TRIF 及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达 ( $P < 0.05, 0.01$ )。**结论** 金振口服液能够延长病毒性肺炎小鼠存活时间、降低肺指数, 减轻肺部炎性损伤, 其抑制小鼠流感病毒性肺炎的机制可能与抑制 TLR3/TRIF 信号传导、调节抗炎-促炎失衡和改善 T 细胞免疫有关。

**关键词:** 金振口服液; 小鼠流感病毒性肺炎; T 淋巴细胞亚群; 炎症因子; Toll 样受体 3;  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)03-0499-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.03.002

## Effect and mechanism of Jinzhen Oral Liquid on influenza virus pneumonia in mice

BAI Jie<sup>1</sup>, ZHANG Xin-zhuang<sup>2</sup>, LIU Min-xuan<sup>2</sup>, CAO Liang<sup>2</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>2</sup>, ZHANG Chen-feng<sup>2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2</sup>

1. College of Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

**Abstract: Objective** To study the efficacy and mechanism of Jinzhen Oral Liquid in inhibiting influenza virus pneumonia in mice. **Methods** ICR mice were randomly divided into control group, model group, Jinzhen Oral Liquid high, medium, and low dose (4.4, 2.2, 1.1 g/kg) groups, and Oseltamivir Phosphate Capsules (0.05 g/kg) group. Except for the control group, mice in other groups were intranasally infected with influenza A (H1N1) virus to build a mouse viral pneumonia model. Survival time and lung index of mice in each group were measured. The pathological changes of lung tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in peripheral blood were detected by flow cytometry. Detection of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 levels in serum and alveolar lavage fluid were carried out by ELISA. Western blotting method was used to detect TLR3, TRIF, and NF- $\kappa$ B protein expression. **Results** Compared with the model group, the survival time of mice in Jinzhen Oral Liquid group and Oseltamivir Phosphate Capsules group were significantly prolonged, and the lung index was reduced ( $P < 0.05, 0.01$ ). The pathological results also showed alleviated damage of lung tissue in these two groups. The level of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in peripheral blood were largely increased, and the level of CD8<sup>+</sup>T lymphocytes was greatly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 content in serum and alveolar lavage fluid were reduced, while IL-10 content was increased ( $P < 0.05, 0.01$ ).

收稿日期: 2023-02-15

基金项目: 国家中医药管理局青年岐黄学者项目 (国中医药人教函 (2022) 6 号); 国家中医药管理局交叉创新团队项目 (ZYXCXTU-D-202203)

作者简介: 白洁, 女, 硕士研究生, 从事药理学机制研究。E-mail: bj504602@163.com

\*通信作者: 肖伟, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药研发及过程控制研究。E-mail: kanionlunwen@163.com

The expression of TLR3, TRIF, and NF- $\kappa$ B were significantly inhibited in lung tissue ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Jinzhen Oral Liquid can prolong the survival time of mice with viral pneumonia, reduce lung index, and alleviate lung inflammatory injury. Its mechanism of inhibiting influenza viral pneumonia in mice may be related to the inhibition of TLR3/TRIF signal transduction, regulation of anti-inflammatory and pro-inflammatory imbalance, and improvement of T cell immunity.

**Key words:** Jinzhen Oral Liquid; influenza virus pneumonia; T lymphocyte subgroup; inflammatory factors; TLR3; TRIF

金振口服液具有清热解毒、祛痰止咳功效，临床主要用于小儿急性支气管炎符合痰热咳嗽者<sup>[1]</sup>。急性支气管炎是病毒、细菌等病原体感染所致的支气管黏膜的急性炎症，由流感病毒引起的急性支气管炎多发于婴幼儿时期，往往继发于上呼吸道感染之后，也常为肺炎的早期表现<sup>[2]</sup>。前期体内外研究均表明，金振口服液具有抑制甲型 H1N1 流感病毒和延长流感病毒性肺炎小鼠存活的作用<sup>[3-4]</sup>，而其相关的机制研究较少。基于此，本研究采用甲型 H1N1 流感病毒滴鼻感染小鼠模拟流感病毒感染上呼吸道引发的小儿支气管肺炎，通过观察金振口服液对流感病毒性肺炎小鼠模型的影响，探讨金振口服液抗流感病毒的药效及作用机制，为其临床应用提供理论支持。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠，体质量 13~15 g，南京青龙山动物中心提供，动物生产许可证号 SCXK(浙) 2019-0002。实验经江苏康缘药业股份有限公司机构动物护理与使用委员会批准，批号 2021122903。

### 1.2 病毒株

甲型流感病毒 A/PuertoRico/8/1934(H1N1) 株，中国科学院武汉病毒研究所陈绪林研究员惠赠，本实验室传代后于 -80 °C 冰箱保存备用。

### 1.3 主要试剂与仪器

金振口服液(批号 211190) 购自江苏康缘药业股份有限公司；磷酸奥司他韦胶囊(批号 0221906016) 购自宜昌长江药业有限公司；APC 标记小鼠抗 CD3 抗体(批号 B349516)、PE 标记抗小鼠 CD4 抗体(批号 B359213)、FITC 标记小鼠抗 CD8 抗体(批号 B355575) 均购自 Biolegend 公司；红细胞裂解液(批号 20220302) 购自 Solarbio 公司；BCA 蛋白质分析试剂盒(批号 EF60968) 购自 Pierce 公司；山羊抗小鼠 IgG HRP(批号 A20734) 购自杭州联科生物技术有限公司；Toll 样受体 3 (TLR3) 抗体(批号 00069284) 购自 Proteintech 公司； $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TRIF) 抗体(批号

EPR4755) 购自 Abcam 公司；核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 抗体(批号 BT20220214) 购自南京谨庭生物科技有限公司；蛋白 Marker(批号 00021726) 购自 Fermentas 公司；肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (批号 202112)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (批号 202112)、白细胞介素-6 (IL-6) (批号 202112)、白细胞介素-10 (IL-10) (批号 202112) ELISA 试剂盒购自南京翼飞雪生物科技有限公司。

BY-R20 冷冻离心机(北京白洋医疗器械有限公司)；A00-1-1102 流式细胞仪(美国 BECKMAN COULTER)；JXFSTPRP-CLN-24 冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司)；Synergy2 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司)；ChemiDoc XRS+ 多功能凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、模型制备与给药

将 180 只 ICR 小鼠适应性饲养 3 d 后随机分为 6 组，每组 30 只，分别为对照组、模型组、金振口服液高、中、低剂量(4.4、2.2g、1.1 g/kg) 组<sup>[5]</sup>，以及磷酸奥司他韦胶囊(0.05 g/kg) 组。除对照组外，其他各组小鼠经乙醚麻醉后，0.06 mL/只(15 倍半数致死剂量) 流感病毒溶液滴鼻感染，造成小鼠病毒性肺炎模型。感染后 2 h，给药组按 10 mL/kg ig 给药，对照组和模型组小鼠给予等体积生理盐水，1 次/d，连续给药 7 d，每日记录小鼠体质量。

### 2.2 指标检测

**2.2.1 生存率** 从造模第 1 天计，连续 14 d 观察小鼠生存状态，记录死亡数和死亡时间，计算平均存活时间和终点生存率。

**2.2.2 肺指数测定** 末次给药后 2 h，各组取 7 只小鼠摘眼球采血，用含肝素的采血管收集全血备用采血后脱颈椎处死，取全肺，生理盐水清洗 2 次，滤纸吸干，称肺质量，计算肺指数及肺指数抑制率。

肺指数 = 小鼠肺质量/小鼠体质量

肺指数抑制率 = (模型组肺指数 - 给药组肺指数) / (模型组肺指数 - 对照组肺指数)

**2.2.3 苏木精 - 伊红 (HE) 染色法** 实验第 7 天小鼠肺组织称质量后，取左肺用 4% 多聚甲醛固定液

中固定, 72 h 后取出用流水冲洗, 用乙醇梯度脱水、经二甲苯透明化后浸蜡包埋, HE 染色, 中性树胶封片, 在光学显微镜下观察组织病理改变。

**2.2.4 流式法测定外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞水平** 取全血样本, 加 5 mL 红细胞裂解液, 室温静置 8 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀; 加 500  $\mu$ L 封闭液[血清与杜氏磷酸盐缓冲液 (DPBS) 比例为 1:200] 中重悬, 4  $^{\circ}$ C 封闭 30 min; 染色缓冲液 (血清与 DPBS 比例为 1:100) 洗涤 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 100  $\mu$ L 的染色缓冲液重悬后, 再加入; APC 标记小鼠抗 CD3 抗体、PE 标记抗小鼠 CD4 抗体和 FITC 标记小鼠抗 CD8 抗体进行荧光标记, 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min, PBS 洗涤 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 200  $\mu$ L PBS 上机进行流式检测。

**2.2.5 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 水平** 末次给药 2 h 后, 各组另取 7 只小鼠摘眼球采血, 收集血液, 备用。采血后脱颈椎处死, 打开胸腔, 暴露气管, 用滞留针采集肺泡灌洗液, 备用。生物样本 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测相关炎症因子水平。

**2.2.6 Western blotting 法检测 TLR3、TRIF、NF- $\kappa$ B 蛋白表达** 取 2.2.2 项下右肺 50~100 mg, 加 300  $\mu$ L RIPA 裂解液, 低温研磨裂解, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 调节蛋白浓度至 100 mg/mL, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后进行转膜, 于牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液中封闭, 加入 ECL 发光液显色, 曝光拍照, Image J 软件分析各条带灰度值。以  $\beta$ -actin 为内参, 目的蛋白条带灰度值与内参的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

### 2.3 统计学处理

使用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析, 所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间多重比较分析采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 结合最小显著性差异法 (LSD) 多重比较分析。

## 3 结果

### 3.1 金振口服液对小鼠生存状况的影响

流感病毒感染小鼠后, 第 4~5 天开始, 模型组小鼠出现耸毛、食差、消瘦、蜷缩颤抖、低反应性、

成堆聚集等症状, 第 7 天开始出现小鼠死亡, 第 14 天全部死亡。金振口服液 4.4 g/kg 组和磷酸奥司他韦组的终点生存率分别为 18.75%、31.25%。金振口服液组和磷酸奥司他韦胶囊组存活时间较模型组显著延长 ( $P < 0.05$ 、0.01), 见表 1。

表 1 终点生存率及存活时间 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$ )

Table 1 End point survival and survival time ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	终点生存率/%	存活时间/d
对照	—	100	14.00 $\pm$ 0.00
模型	—	0	8.06 $\pm$ 1.06**
金振口服液	4.4	18.75	10.31 $\pm$ 1.99###
	2.2	0	9.31 $\pm$ 0.87###
	1.1	0	9.13 $\pm$ 1.31#
磷酸奥司他韦胶囊	0.05	31.25	11.63 $\pm$ 1.82###

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

### 3.2 金振口服液对肺指数和肺指数抑制率的影响

与对照组比较, 模型组小鼠的肺指数明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠肺指数明显降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), 金振口服液 4.4、2.2、1.1 g/kg 组肺指数抑制率分别为 61.32%、32.51%、21.09%, 呈明显的剂量相关性, 见表 2。

表 2 金振口服液对肺指数和肺指数抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

Table 2 Effect of Jinzhen Oral Liquid on lung index and inhibition rate of lung index ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	肺指数	肺指数抑制率/%
对照	—	0.89 $\pm$ 0.06	—
模型	—	2.16 $\pm$ 0.20**	—
金振口服液	4.4	1.38 $\pm$ 0.16###	61.32
	2.2	1.75 $\pm$ 0.13###	32.51
	1.1	1.90 $\pm$ 0.18#	21.09
磷酸奥司他韦胶囊	0.05	1.10 $\pm$ 0.07###	83.22

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

### 3.3 金振口服液对小鼠肺组织病理的影响

如图 1 所示, 对照组小鼠肺组织正常; 模型组小鼠肺组织出现充血现象, 肺泡结构破坏, 肺泡间隔明显水肿、增厚, 同时发生弥漫性炎症细胞浸润, 伴有上皮细胞脱落、坏死; 各给药组小鼠相较模型组小鼠肺组织充血、水肿现象减轻, 炎症细胞浸润明显减少, 肺部病变得缓解, 但仍有局部肺泡间隔增厚。

### 3.4 金振口服液对外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞水平的影响

与对照组相比, 模型组小鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>

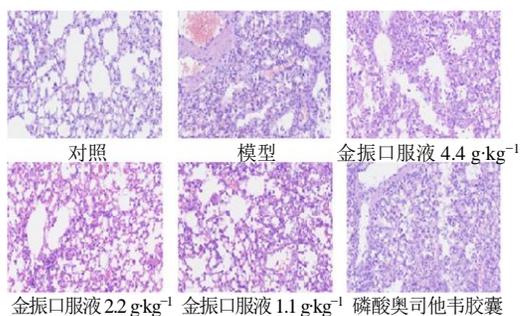


图 1 金振口服液对肺组织病理的影响 (×20)

Fig. 1 Effect of Jinzhen Oral Liquid on lung tissue patholog (×20)

表 3 金振口服液对外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 3 Effect of Jinzhen oral liquid on the level of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in peripheral blood ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	CD3 <sup>+</sup> /%	CD4 <sup>+</sup> /%	CD8 <sup>+</sup> /%	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
对照	—	1.09 ± 0.07	74.83 ± 5.28	14.63 ± 1.07	5.14 ± 0.63
模型	—	0.53 ± 0.17**	65.47 ± 5.78*	16.80 ± 4.13**	4.12 ± 1.37**
金振口服液	4.4	1.10 ± 0.19##	70.9 ± 1.00#	11.97 ± 1.19##	5.97 ± 0.70##
	2.2	1.15 ± 0.64##	70.80 ± 1.71#	15.20 ± 3.12#	4.78 ± 0.88#
	1.1	0.90 ± 0.54#	75.80 ± 0.79##	14.70 ± 1.15#	5.18 ± 0.36#
磷酸奥司他韦胶囊	0.05	1.85 ± 0.60##	72.20 ± 1.04#	15.13 ± 0.76#	4.78 ± 0.31#

与对照组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01; 与模型组: #P<0.05 ##P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs control group; #P<0.05 ##P<0.01 vs model group

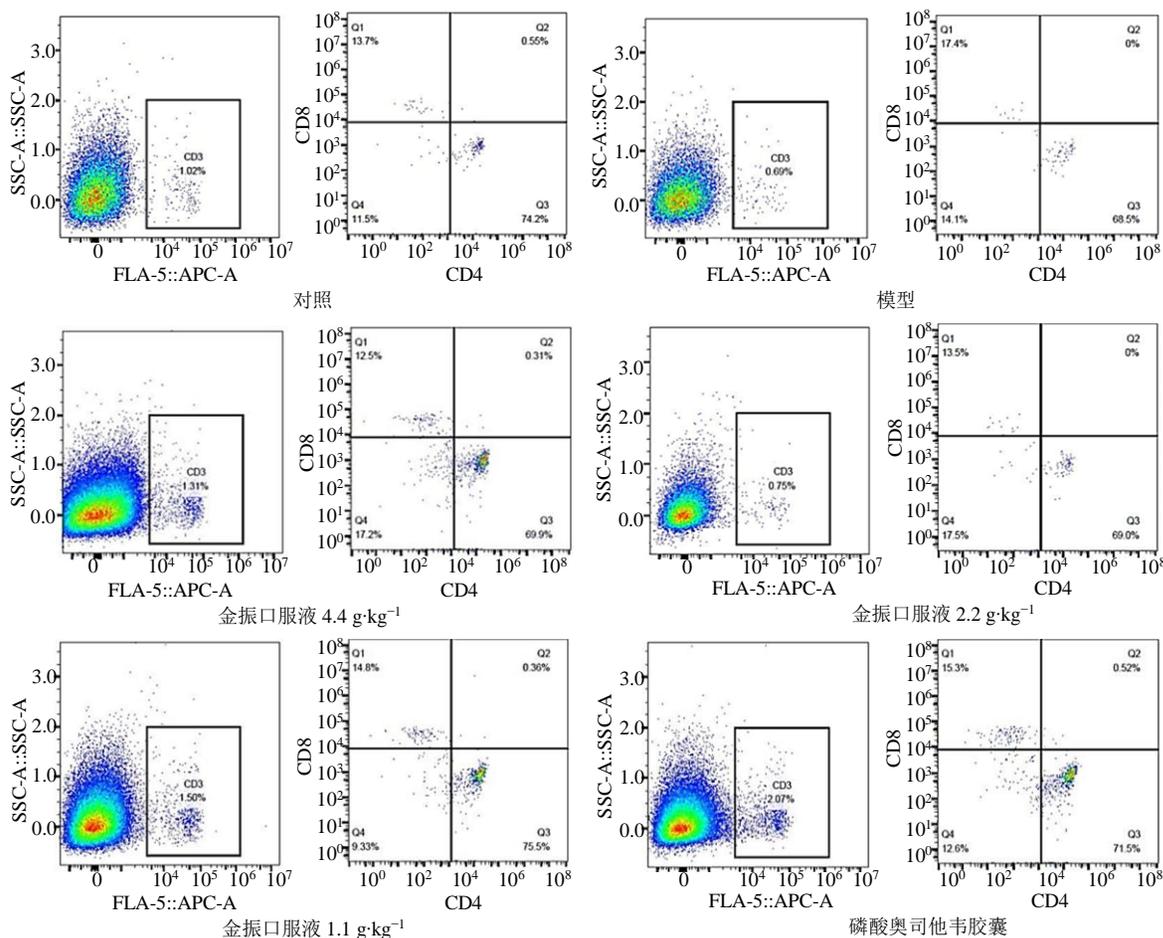


图 2 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞流式图

Fig. 2 Flow cytometry of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes

CD8<sup>+</sup>水平显著降低, CD8<sup>+</sup>水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 与模型组相比, 各给药组小鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平显著升高, CD8<sup>+</sup>水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 见表 3、图 2。

### 3.5 金振口服液对血清及肺泡灌洗液中炎症因子的影响

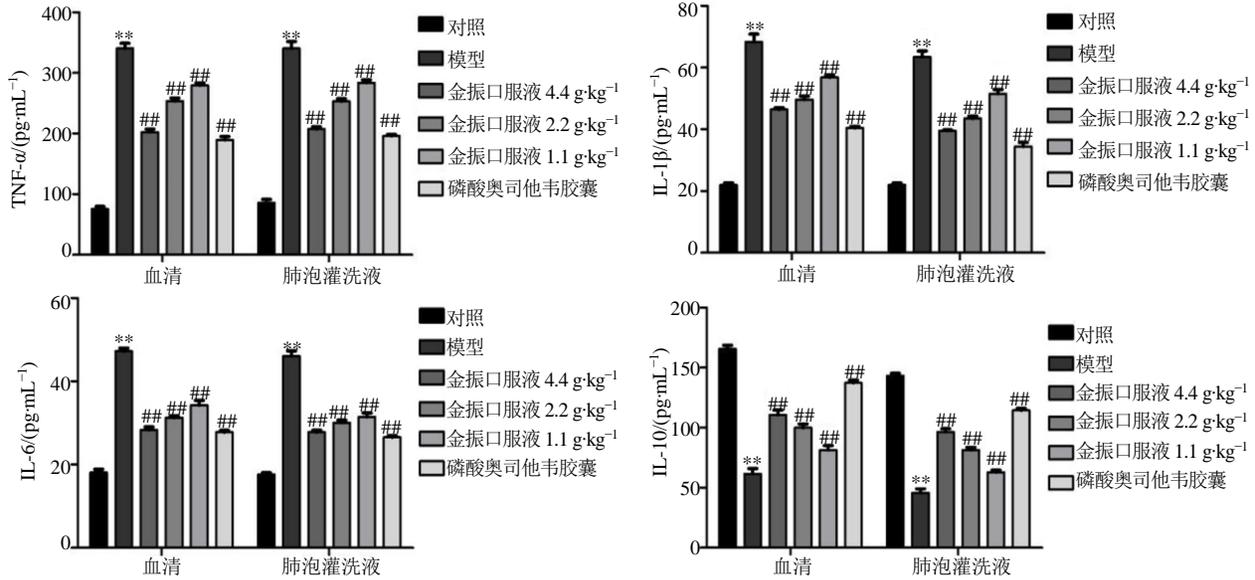
与对照组相比, 模型组小鼠血清和肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的水平显著升高, IL-10 的水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 金振口服液给药组及磷酸奥司他韦胶囊组均能显著降低

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平，升高 IL-10 水平 ( $P < 0.01$ )，见图 3。

### 3.6 金振口服液对肺组织 TLR3/TRIF 通路蛋白表达水平的影响

与对照组比较，模型组小鼠肺组织中 TLR3、

TRIF、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，金振口服液 (4.4、2.2、1.1 g/kg) 组及磷酸奥司他韦胶囊组小鼠 TLR3、TRIF、NF- $\kappa$ B 蛋白的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01)，见表 4、图 4。



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组: ## $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group

图 3 金振口服液对血清及肺泡灌洗液中炎症因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Fig. 3 Effect of Jinzhen Oral Liquid on inflammatory factors in serum and alveolar lavage fluid ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

表 4 金振口服液对小鼠肺组织中 TLR3, TRIF, NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 4 Effect of Jinzhen Oral Liquid on TLR3, TRIF, NF- $\kappa$ B protein expression in mice lung tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	TLR3/ $\beta$ -actin	TRIF/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin
对照	—	0.16 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.02	0.69 $\pm$ 0.14
模型	—	1.07 $\pm$ 0.25**	1.15 $\pm$ 0.03**	1.16 $\pm$ 0.11**
金振口服液	4.4	0.61 $\pm$ 0.11##	0.53 $\pm$ 0.20##	0.68 $\pm$ 0.26##
	2.2	0.66 $\pm$ 0.05##	0.76 $\pm$ 0.16#	0.68 $\pm$ 0.20##
	1.1	0.90 $\pm$ 0.08#	0.76 $\pm$ 0.16#	0.66 $\pm$ 0.32##
磷酸奥司他韦胶囊	0.05	0.65 $\pm$ 0.78##	0.21 $\pm$ 0.19##	0.51 $\pm$ 0.08##

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

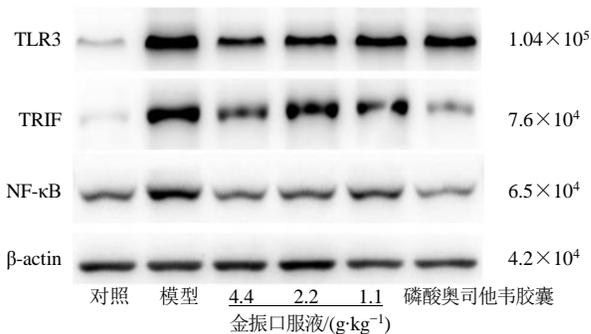


图 4 各组小鼠肺组织中 TLR3、TRIF、NF- $\kappa$ B 蛋白表达  
Fig. 4 TLR3 and TRIF protein expression in lung tissue of mice in each group

## 4 讨论

流感病毒性肺炎临床症状主要为发热、头痛、乏力、咳嗽等，肺组织病理主要呈急性间质性肺炎形态，细支气管壁及肺泡壁充血水肿，肺泡间隔增宽，较多炎症细胞，严重者伴随弥漫性肺损伤和急性渗出<sup>[6]</sup>。本研究发现，流感病毒感染小鼠后，肺组织出现大量炎症细胞浸润、充血及水肿，这与流感病毒性肺炎的临床表征一致，说明该模型能一定程度上模拟流感病毒性肺炎。而通过金振口服液干预后，虽未提高小鼠生存率，但可显著延长小鼠存活时间，进一步肺组织病理分析和肺指数检测发

现, 金振口服液可明显减轻肺水肿和炎性细胞浸润, 提示其延长小鼠存活作用可能与缓解流感病毒感染后的肺组织炎症, 保护肺损伤有关。这与前期文献报道相吻合<sup>[7]</sup>。

为验证上述研究结果, 分别对血清和肺泡灌洗液进行了炎症相关因子检测, 结果表明金振口服液能显著降低血清及肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平, 升高 IL-10 水平, 其中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 是促炎因子, 在病毒性肺炎发生发展中有重要意义, 且与肺部病变严重程度密切相关<sup>[8]</sup>, IL-10 是抗炎因子, 可靶向调节免疫细胞, 减轻炎症和组织损伤<sup>[9]</sup>, 提示其可抑制全身炎症反应和局部组织的促炎因子, 升高抗炎因子, 调节抗炎 - 促炎失衡, 进而改善流感病毒感染后的肺部炎症反应。同时, 对小鼠外周血中 T 细胞检测发现, 金振口服液可剂量依赖性降低 CD8<sup>+</sup>, 升高 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, 在流感病毒引起的感染中 T 细胞水平尤其 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值可指示机体免疫调节能力<sup>[10]</sup>, CD8<sup>+</sup> 为抑制性 T 淋巴细胞, 能抑制其他免疫细胞的抗病毒作用, CD4<sup>+</sup> 为辅助性 T 淋巴细胞, 其水平降低会导致机体细胞免疫功能和抗病毒能力降低<sup>[11-12]</sup>, 说明金振口服液能改善流感病毒感染后的 T 细胞免疫功能下调。

TLR 是介导宿主识别病原体的一类重要模式识别受体, 通过招募特异的衔接蛋白, 激活级联反应, 引起促炎细胞因子、趋化因子等产生, 发生炎症反应<sup>[13]</sup>。目前人类中已识别出亚型有 TLR 1~10, 其中 TLR3、TLR7/8、TLR9 主要识别病毒核酸成分, 前期文献报道流感病毒引起的炎症反应主要由 TLR3 或 TLR7 介导<sup>[14]</sup>。基于此, 为了进一步探索金振口服液调节体液免疫和细胞免疫的分子机制, 对 TLR3/TRIF/NF- $\kappa$ B 通路进行蛋白免疫印迹分析, 结果表明金振口服液可显著降低 TLR3、TRIF、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平, 提示其调节炎症反应和免疫功能可能与抑制 TLR3/TRIF 通路有关。

综上所述, 金振口服液具有延长流感病毒性肺炎小鼠存活和保护肺损伤作用, 可能与抑制 TLR3/TRIF 信号传导、调节抗炎 - 促炎失衡和改善 T 细胞免疫有关。本研究阐明了金振口服液基于 TLR3 信号通路下体内抑制流感病毒的分子调控机

制, 为后续研究奠定了实验基础和研究思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 于双双. 儿科止咳祛痰中成药金振口服液的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(12): 2759-2763.
- [2] 汪超婵, 孙君璐. 金振口服液辅助治疗急性支气管炎患儿的效果 [J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(6): 28-30.
- [3] 萧伟, 郑丽舒, 尚强, 等. 金振口服液抗甲型 H1N1 流感病毒作用实验研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1443-1445.
- [4] 张敬升, 高双荣, 庞博, 等. 金振口服液对流感病毒 H1N1/FM1 株和副流感病毒感染致小鼠肺炎的药理作用 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(1): 46-51.
- [5] 宗绍波, 孙兰, 吕耀中, 等. 金振口服液对 LPS 致急性肺损伤模型小鼠 NF- $\kappa$ B, MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 155-159.
- [6] 李启儒, 李代强, 郑姣云, 等. 重症病毒性肺炎的病理形态学特征 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(8): 964-968.
- [7] Feng J, Gao X, Chen X, *et al.* Mechanism of Jinzhen Oral Liquid against influenza-induced lung injury based on metabolomics and gut microbiome [J]. *Ethnopharmacology*, 2023, 303: 115977.
- [8] 任韩雯婧, 张川, 乐涛, 等. ICU 重症肺部感染患者血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  水平变化及其与预后的关系 [J]. 热带医学杂志, 2022, 22(10): 1371-1375.
- [9] Sun J, Madan R, Karp C L, *et al.* Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10 [J]. *Nat Med*, 2009, 15(3): 277-284.
- [10] Wik J A, Sk ðhegg B S. T Cell metabolism in infection [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 840610.
- [11] Jansen J M, Gerlach T, Elbahesh H, *et al.* Influenza virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity induced by infection and vaccination [J]. *J Clin Virol*, 2019, 119: 44-52.
- [12] Pallett L J, Schmidt N, Schurich A. T cell metabolism in chronic viral infection [J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 197(2): 143-152.
- [13] 王永锋, 徐庆华, 段美玲. 基于 TLR3/TRIF 通路探讨梔子苷抗流感病毒引起的病毒性肺炎的实验研究 [J]. 病毒学报, 2020, 36(1): 35-43.
- [14] Chen Y, Lin J, Zhao Y, *et al.* Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(8): 609-632.

[责任编辑 高源]