

## 肺热普清散对MHV-A59感染小鼠治疗作用及炎症因子的影响

罗敏怡<sup>1,3</sup>, 徐丽艳<sup>1</sup>, 谢和兵<sup>2</sup>, 侯海荣<sup>1</sup>, 王荣春<sup>1</sup>, 何金洋<sup>3</sup>, 陈锡强<sup>1\*</sup>

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

2. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 858300

3. 广州中医药大学科技创新中心, 广东 广州 510410

**摘要:** 目的 探讨藏药经典方肺热普清散对小鼠肝炎病毒A59(MHV-A59)感染小鼠模型的影响及其对炎症因子的作用。方法 以雄性昆明种小鼠为实验对象, 利用MHV-A59滴鼻操作建立小鼠冠状病毒感染模型, 设置对照组、模型组、阳性(利巴韦林)组和肺热普清散低、中、高剂量(25、50、100 mg·kg<sup>-1</sup>) 3组, 每天ig给药1次, 连续给药10 d, 考察记录造模期内小鼠体重变化, 处死后称体质量并计算小鼠肺脏指数和肝脏指数; 使用Elisa试剂盒测定小鼠血清中炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和白细胞介素-18(IL-18)含量; 利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法检测小鼠肝脏中IL-1 $\beta$ 、IL-18的mRNA表达水平和血清中MHV-A59病毒载量; 通过苏木素-伊红(HE)染色, 检测肺热普清散对肝脏和肺脏细胞坏死及炎症细胞浸润的影响。结果 与对照组比较, 模型组的体质量增长缓慢( $P<0.01$ ); 肺热普清散3个剂量组的体质量每日递增, 中、高剂量组在第5~8天均与模型组有显著差异( $P<0.01$ ); 各组小鼠肺脏指数组间无显著性差异, 肺热普清散中剂量组肝脏指数与模型组有显著性差异( $P<0.05$ ); 模型组病毒感染后血清中炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18显著性升高( $P<0.001$ ), 与模型组比较, 肺热普清散3个剂量组均可降低血清中IL-18水平( $P<0.001$ 、0.01); 模型组肝脏组织中IL-1 $\beta$ 和IL-18的mRNA表达水平均显著升高( $P<0.001$ ); 与模型组比较, 肺热普清散高剂量组肝脏中IL-1 $\beta$ 转录水平显著降低( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 肺热普清散3组实验动物肝脏组织中IL-18水平未出现显著性变化; MHV载量测定结果显示, 与模型组比较, 利巴韦林组和肺热普清散高剂量组血清中MHV载量显著性降低( $P<0.01$ ); 病理切片结果显示, 模型组肝脏细胞出现广泛坏死和变性, 并出现炎症细胞浸润, 气球样变等现象, 肺热普清散高剂量和利巴韦林组出现点状病灶、炎症细胞浸润等明显减少现象; 模型组肺组织肺泡明显间隔增厚, 间质水肿, 肺泡被压缩, 有炎症细胞浸润, 毛细血管扩张充血等现象, 而肺热普清散中、高剂量组和阳性组肺组织肺泡间隔较窄, 肺泡舒展, 局部有炎症浸润和出血, 肺泡腔内的分泌物明显减少。结论 肺热普清散对MHV-A59感染小鼠模型具有保护作用, 其作用机制与抑制病毒复制和抑制感染后炎症因子有关。

**关键词:** 肺热普清散; 小鼠肝炎病毒A59; 冠状病毒; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 炎症; 利巴韦林

**中图分类号:** R29; R51; R37 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)07-1604-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.019

## Effect of Feire Puqing Powder against hepatitis coronavirus MHV-A59 infection and inflammatory factors in mice

LUO Minyi<sup>1,3</sup>, XU Liyan<sup>2</sup>, XIE Hebing<sup>1</sup>, HOU Hairong<sup>1</sup>, WANG Rongchun<sup>1</sup>, HE Jinyang<sup>3</sup>, CHEN Xiqiang<sup>1</sup>

1. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

2. Tibet Shenhou Pharmaceutical Co., Ltd., Xigaze 858300, China

3. Guangzhou University of Chinese Medicine (Science and Technology Innovation Center), Guangzhou 510410, China

**Abstract: Objective** To explore the effects and inflammatory factors of the Tibetan medicine Feire Puqing Powder (FPP) on the mouse model of hepatitis coronavirus A59 (MHV-A59) infection. **Methods** Male Kunming mice were used as experimental subjects treated with MHV-A59 by nose-dropping, and six groups were set up: the control, the model, the positive (ribavirin), and the FPP's low-, medium-, and high- dosage (25, 50, and 100 mg·kg<sup>-1</sup>) groups, and the FPP was ig administered once a day for 10 consecutive

收稿日期: 2024-01-03

基金项目: 西藏自治区科技厅科技发展项目(XZ202202YD0020C); 日喀则市区域科技协同创新专项(QYXTZX-RKZ2023-01)

第一作者: 罗敏怡, 女, 研究生, 研究方向为中药治疗病毒性疾病。E-mail: 904148938@qq.com

\*通信作者: 陈锡强, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学。E-mail: chenxq@sdas.org

days, and the body weight of the mice during the modeling period was examined and recorded, and the lung and liver indices of the mice were examined after execution; The serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 were determined using the Elisa kit; The mRNA of IL-1 $\beta$  and IL-18 in the liver, and the viral load in the serum were detected using the qRT-PCR; The pathological sections of liver and lung were stained with hematoxylin-eosin (HE), and the necrotic and inflammatory cell infiltration of the liver and lung in each experimental group were observed and recorded under the microscope. **Results** Compared with the control group, the body weight of the model group increased slowly ( $P < 0.01$ ); The body weight of the three dose groups of FPP increased daily, and there was a significant difference between middle and high dose groups with the model group on days 5-8 ( $P < 0.01$ ); There was a significant difference at the liver index of the middle dose group of FPP vs the model group ( $P < 0.05$ ), while others were no significant difference on the lung index of the mice in each group; The serum inflammatory factors IL-1 $\beta$  and IL-18 were significantly elevated ( $P < 0.001$ ), and compared with the model group, all three dose groups of FPP reduced the serum level of IL-18, ( $P < 0.001, 0.01$ ); The IL-1 $\beta$  and IL-18 were significantly elevated in liver tissues of the model group ( $P < 0.001$ ); Compared with the model group, the transcript level of IL-1 $\beta$  in the liver treated by FPP high-dose group was significantly reduced ( $P < 0.01$ ); The level of IL-18 in the liver tissues of experimental animals in FPP triple-dose group did not show significant changes; The serum MHV load in each group of mice showed that, compared with the model group, there was a significant reduction of MHV load in the serum in the ribavirin group and the FPP high-dose group ( $P < 0.01$ ); Liver histopathological sections showed that: Model group showed extensive necrosis and degeneration, with inflammatory cell infiltration and ballooning, while punctate foci and inflammatory cell infiltration were reduced in the FPP high-dose and ribavirin groups; Histopathological sections of lung tissue showed that: lung tissue of the model group showed obvious thickening of alveolar septa, mesenchymal edema, compressed alveoli, with inflammatory cell infiltration, and capillary dilation and congestion, while the alveolar intervals of lung tissues in the middle-dose group, high-dose group and ribavirin group of FPP were narrower, the alveoli were stretched out, and there were still inflammatory infiltration and hemorrhage locally, and secretion in the alveolar lumen was significantly reduced. **Conclusion** FPP has a protective effect on the MHV-A59 mouse infection, and the mechanism is related to the inhibition of viral replication and the inhibition of inflammatory factor increase.

**Key words:** Feire Puqing Powder; mouse hepatitis virus A59; coronavirus infection; IL-1 $\beta$ ; inflammation; ribavirin

冠状病毒是病毒家族中具有强传染性的一类致病性RNA病毒,可引起普通/重症流行性感冒或者急性呼吸道综合征;随着新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染在全球大流行,越来越多的研究揭示了冠状病毒对于机体多个系统的危害性,同时后遗症的危害逐步受到医务人员的重视<sup>[1-2]</sup>。目前已知的冠状病毒不仅会引起呼吸急促或者呼吸困难等症状,而且还涉及运动系统、神经系统、循环系统、消化系统(恶心、呕吐、腹泻)和皮疹等多个系统的症状,并且依靠超强的传播能力,损害免疫力低下人群的健康,有加重基础疾病的风险,甚至威胁生命<sup>[3]</sup>。虽然目前针对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)有了阶段性特效药物和疫苗,但是面对具有高突变性和强传染性的冠状病毒,仍然需要更多的治疗性药物,因此探索高效、安全的抗冠状病毒药物有重大的临床需求和社会意义<sup>[4-6]</sup>。

目前普遍认为诸如SARS-CoV-2的冠状病毒感染发生免疫紊乱的机制为过度免疫反应引发的“炎症风暴”,由于病毒引起的免疫系统过度激活,一旦病毒进入人体与血管紧张素转化酶2(ACE2)受体结合并激活免疫系统反应,就会激活促炎信使蛋

白(炎症因子)的过度释放,例如白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和白细胞介素-18(IL-18)<sup>[7]</sup>;大量炎症因子的分泌引起炎症和组织水肿,并引起呼吸系统黏液的大量分泌,并在细末支气管中堆积,导致“白肺”的发生;而在肝脏则会引起细胞肿胀、坏死进而导致器官急性衰竭<sup>[8]</sup>;因此对冠状病毒侵袭和传播有阻断作用,或者调节后继的炎症因子的化合物都具备成为有效药物的潜力。

肺热普清散是收录于《四部医典》中的效验方,对小儿难治性肺炎的治疗有较佳临床效果<sup>[9]</sup>,虽然该方在高原地区应用有几百年的历史,但是至今该复方对冠状病毒感染后的治疗作用仍缺乏针对性研究,本项目利用小鼠肝炎病毒A59株(MHV-A59)感染模型,考察肺热普清散对MHV-A59病毒感染后的肝脏、肺脏病理和相关炎症因子表达的影响,为其临床用于冠状病毒感染的治疗提供参考。

## 1 材料

### 1.1 药品、试剂和主要仪器

肺热普清散由西藏神猴药业有限公司提供(国药准字Z54020045,批号20210601),取原药粉末溶于纯净水中,制成100 g·L<sup>-1</sup>母液,有少量沉淀,置于

4℃保存,用前混匀。

DEPC处理水(750023)由美国默克生物科技公司提供;反转录酶(SuperScript IV, 18090010)购自美国Thermo公司;IL-18 ELISA试剂盒(PI553)、IL-1 $\beta$  ELISA试剂盒(PI301)和HE(C1086)染色试剂盒由上海碧云天生物技术有限公司提供,本实验所用引物由金唯智生物技术有限公司提供;水和氯醛(C804539)购自麦克林生化科技有限公司;4%多聚甲醛(P1110)由北京索莱宝科技公司提供;RNA提取试剂盒(RC101)和荧光定量专用预混液(q712-02)购自诺唯赞生物科技有限公司;利巴韦林对照品(L050470,质量分数:99.8%)由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司提供。

全波长酶标仪(SpectraMax M5)购自美谷分子仪器(上海)有限公司;石蜡切片机(RM2235)和包埋机(EG1150)购自德国徕卡公司;低温离心机5804R购自德国Eppendorf公司;超净工作台(SW-CJ-2D)由苏州安泰净化消毒设备厂提供;DYY-6D电泳仪和DYZC-24C转印电泳仪由北京六一公司提供;显微镜SZX 61购自奥林巴斯(中国)有限公司;Light Cycler@480实时荧光定量PCR仪购自罗氏有限责任公司(美国);蛋白浓度测定使用nanodrop 2000超微量分光光度计和LiCOR-odyssey 400化学成像仪购自基因有限公司(中国)。

## 1.2 病毒实验动物

MHV-A59病毒株由广州中医药大学冯丽玲教授惠赠,在ABSL-2实验室传代、保存与使用,该毒株经以BNL-CL.2小鼠胚胎干细胞感染建模,按多梯度测定毒力,依照Reed-Muench法确认该病毒的毒力为半数细胞感染剂量(TCID<sub>50</sub>)效价为 $1 \times 10^9$  mL<sup>-1</sup>。

SPF级昆明种小鼠,体质量16~18 g,购自广州中医药大学实验动物中心(许可证号SYXK2022-0179),适应性喂养6 d,房间温度保持在(22±2)℃,湿度保持在30%~70%,自由饮水饮食。本研究动物实验方案经山东省科学院生物研究所实验动物福利伦理委员会批准,审查批件号:SDSW20230715。

## 2 方法

### 2.1 MHV-A59小鼠感染模型制备、分组及给药

本实验方案按照公开发表的方法稍有改进<sup>[10-11]</sup>。取雄性小鼠48只,称量小鼠体质量并记录,使用Excel表格随机数进行编号后,随机分为6组,每组8只,具体为对照组,模型组,阳性组(利巴韦林8 mg·kg<sup>-1</sup>)及肺热普清散低、中、高剂量(25、50、100 mg·kg<sup>-1</sup>)组。给药前2 h,除对照组外,每只

昆明种小鼠通过滴鼻接种 $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>的MHV-A59毒种。将肺热普清散母液用纯净水稀释成10.0、5.0、2.5 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液,利巴韦林粉末用纯净水稀释为40 mg·mL<sup>-1</sup>母液,按剂量ig给药,对照组ig给予10  $\mu$ L·g<sup>-1</sup>的0.9%氯化钠溶液,造模后给药,每天1次,连续给药10 d,每日记录体质量数据。

造模第10天,麻醉后摘小鼠眼球取血,经脱颈处死,取小鼠的肝脏和肺脏完整组织并称重,计算脏器指数(脏器指数=脏器质量/小鼠体质量);部分肝脏组织用于总RNA提取;部分肝组织和肺组织浸入4%多聚甲醛中用于后续的HE染色以观察肝肺的病理变化;采集的血液离心后收集上清用于ELISA试剂盒检测血清中的IL-18和IL-1 $\beta$ 。

### 2.2 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测肝组织IL-1 $\beta$ 、IL-18 mRNA表达

小鼠肝脏中mRNA提取和qRT-PCR的实验方法按照前期的研究报道进行<sup>[12]</sup>。RNA的提取参照试剂盒说明书,利用Super-nano分光光度计测定总RNA浓度, $A_{260}/A_{280}$ 应在2.0~2.5;mRNA反转录为cDNA参照反转录试剂盒说明书;qRT-PCR参照实时荧光定量PCR说明书进行。以相对定量法计算目的基因相对表达水平,目的基因以相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。引物序列如下:il-1 $\beta$ :上游引物5'-ATGGCAGAAGTACCTAAGCTC-3',下游引物5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGCTC-AGT-3';il-18:上游引物5'-CAAGAACCATTGGGATGAAGGAC-3',下游引物5'-CCTTCAGTAGCCTCTGTCCTTGT-3'; $\beta$ -actin:上游引物5'-AGAGCTATGAGCTGCCTGACG-3',下游引物5'-CCGCAAGATTCCATACCCA-3';MHV检测引物:上游引物5'-GGCCATTACTATTAAGCC-3',下游引物5'-GCACAATCCATCAACATC-3'。

### 2.3 qRT-PCR法检测小鼠血清的MHV载量

小鼠血清的病毒载量测定方法参照前期研究报道进行<sup>[13]</sup>,稍有改动。实验过程按照血清分离和Trizol提取总RNA方法,按照试剂盒说明书配制逆转录体系,进行上机检测前将逆转录后的cDNA稀释5~10倍,进行qRT-PCR检测。最终结果使用伯乐Bio-Rad CFX Maestro软件进行分析,对梯度稀释的样本进行赋值,并设为标准曲线,软件自动分析得出各个样品的数值,在Excel表中导出结果,按双标准曲线相对定量PCR的方法在Excel表中进行计算。

### 2.4 统计学方法

应用SPSS 13.0软件对实验所得数据进行统计



比较分析,组间比较进行 $t$ 检验,多组间进行方差分析,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

### 3 结果

#### 3.1 肺热普清散对MHV-A59感染小鼠体质量的影响

图1显示6组小鼠攻毒前的体质量无明显差异,从攻毒后第4天开始,模型组的体质量增长均低于对照组,进食行为明显减少,尤其是第6天后体质量均值与对照组比较下降明显( $P < 0.01$ )。利巴韦林组的小鼠体质量每日都有增长,但增长率从攻毒第4天起均增长缓慢,与模型组无显著性差异。在攻毒第5天后肺热普清散低、中、高3个剂量组的体质量每日递增,中、高剂量组的体质量增长与模型组比较差异显著,其中高剂量组在第5~9天与模型组比较差异均显著( $P < 0.05, 0.01$ )。

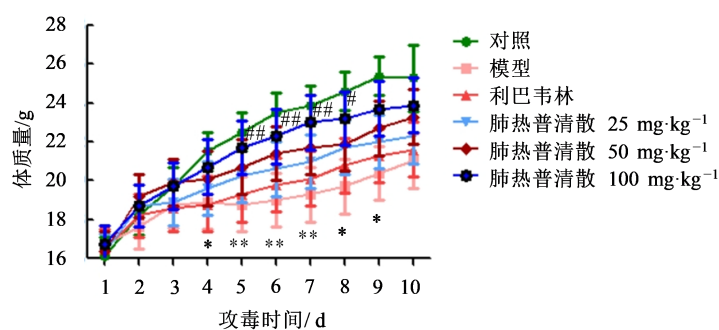
#### 3.2 肺热普清散对MHV-A59感染小鼠肺脏指数和肝脏指数的影响

各组小鼠感染病毒后脏器指数均值随之改变,脏器指数增大,表明脏器充血、水肿或增生肥大等因素。图2显示模型组肺脏指数均较对照组升高,但无显著性差异,利巴韦林组、肺热普清散各剂量

组的肺脏指数与模型组比较无显著性差异。与对照组比较模型组肝指数显著升高( $P < 0.01$ ),利巴韦林组、肺热普清散高、低剂量组的肝脏指数与模型组比较无显著性差异,其中肺热普清散中剂量组的肝脏指数与模型组比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。说明肺热普清散可能对维持感染病毒小鼠的整体状态有积极作用。

#### 3.3 肺热普清散对小鼠血清和肝脏中IL-18和IL-1 $\beta$ 水平的影响

使用ELISA试剂盒检测各组小鼠血清中炎症因子IL-18和IL-1 $\beta$ 的水平,并使用qRT-PCR检测肝组织中IL-1 $\beta$ 和IL-18的转录水平。图3显示模型组小鼠血清和肝脏中的IL-18和IL-1 $\beta$ 表达量均明显高于对照组,说明小鼠感染MHV-A59后可诱发明显的炎症因子增高,尤其在肝脏组织中的炎症因子更显著( $P < 0.001$ ),说明成功建立感染模型。利巴韦林组小鼠血清和肝脏中的IL-18和IL-1 $\beta$ 表达量均明显低于模型组,存在显著性差异( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。肺热普清散中、高剂量组血清中IL-1 $\beta$ 水平显著低于模型组( $P < 0.05, 0.01$ ),高剂量组肝

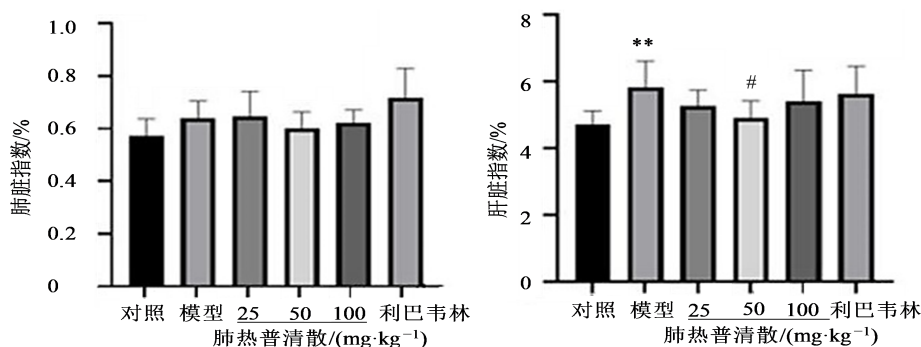


与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。

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

图1 各组小鼠体质量增长结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 1 Results of body weight changes of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )



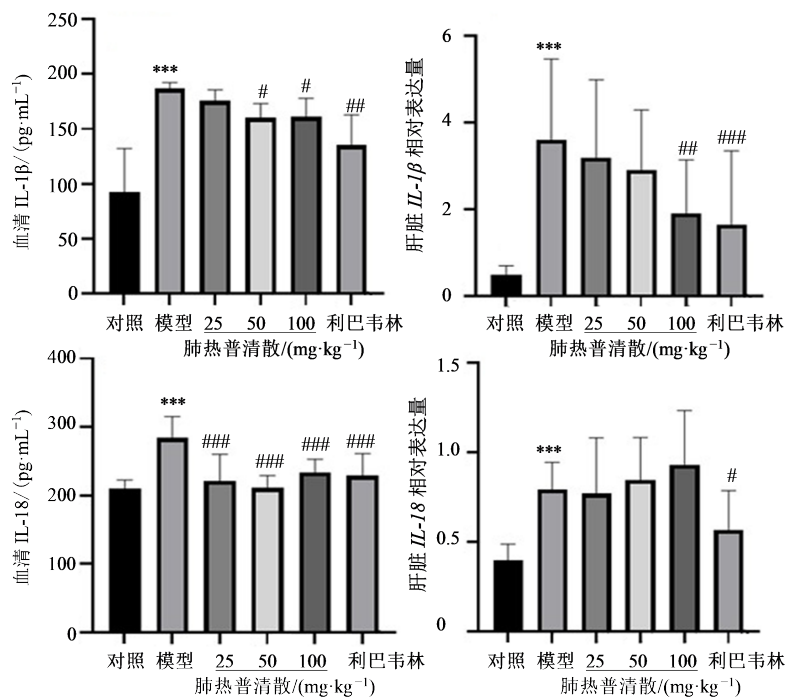
与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

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

图2 各组小鼠肺脏指数和肝脏指数( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 2 Organ index changes of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )





与对照组比较:\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图3 各组小鼠血清和肝组织中IL-18和IL-1 $\beta$ 水平检测 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig. 3 IL-18 and IL-1 $\beta$  in serum and liver of vmice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

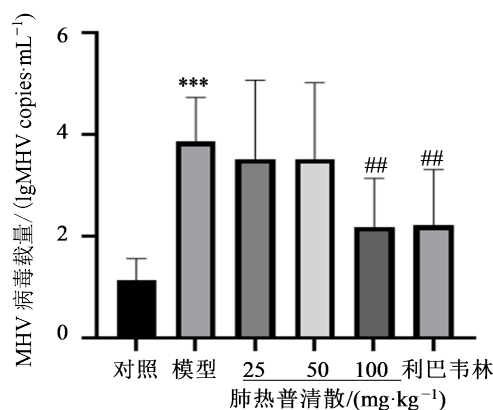
脏IL-1 $\beta$ 表达量显著低于模型组( $P < 0.01$ );肺热普清散低、中、高剂量组血清IL-18水平均显著低于模型组( $P < 0.001$ ),但肝脏中的IL-18相对表达量无明显统计差异。结果显示肺热普清散可以有效地减轻血清中IL-18和IL-1 $\beta$ 水平和肝脏中IL-18和IL-1 $\beta$ 水平和转录水平。

### 3.4 肺热普清散对小鼠血清中病毒载量的影响

本实验通过荧光定量PCR测定小鼠血清中MHV-A59病毒载量,图4结果显示,与对照组比较,模型组血清中的病毒载量显著升高( $P < 0.001$ ),说明模型制备成功。肺热普清散低、中剂量组没有显著性差异,肺热普清散高剂量组和利巴韦林组血清中的MHV病毒载量显著性少于模型组,有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果提示肺热普清散能抑制MHV-A59在小鼠体内的复制。

### 3.5 肺热普清散对MHV-A59小鼠模型肝组织的影响

图5显示,对照组正常小鼠肝脏组织切片肉眼上呈暗粉色,表面光滑圆润,显微镜下见肝细胞排列整齐,大小适中。模型组小鼠的肝脏组织大片坏死、变性,取材时可见片状溃疡、坏死,肝脏表面凹凸不平,呈磨砂样,肝脏颜色变浅,显微镜下可见大片状的红染,核深染,大量核固缩、碎裂、溶解,炎症细胞浸润,细胞水肿明显,细胞排列紊乱,呈结节团块状样分布。肺热普清散中剂量组的肝组织肉眼可见大量的点状白色溃疡,镜下见点状分布的



与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group.

图4 肺热普清散对各组小鼠血清病毒载量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig. 4 Effect of FPP on viral load in various groups of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

炎症细胞浸润、核深染,细胞肿胀。肺热普清散高剂量组和阳性组的小鼠肝组织肉眼有少量的点状溃疡,镜下见少量的点状病灶,炎症细胞浸润和出血。该结果提示肺热普清散可减轻MHV-A59对肝组织的损害。

### 3.6 肺热普清散对MHV-A59小鼠模型肺组织的影响

图6显示对照组的肺组织切片在镜下肺泡呈泡状薄壁结构,肺泡间隔较窄,肺泡舒展,肺泡腔内干净无分泌物。模型组肺泡明显间隔增厚,间质水

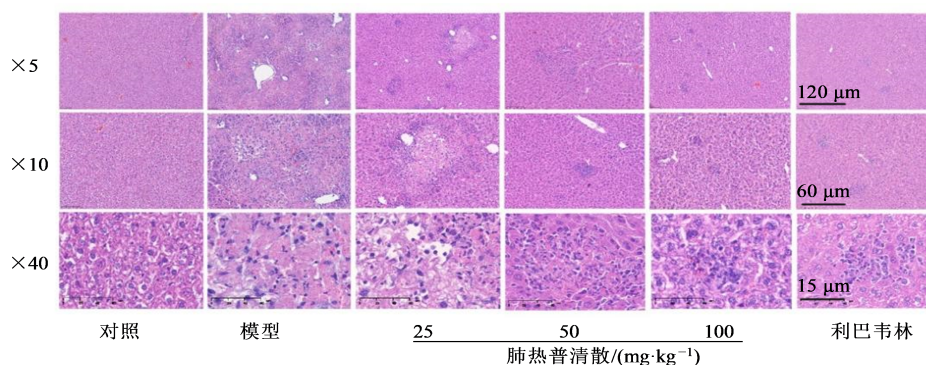


图5 各组小鼠肝脏组织病理观察

Fig. 5 Liver tissue of mice in each group

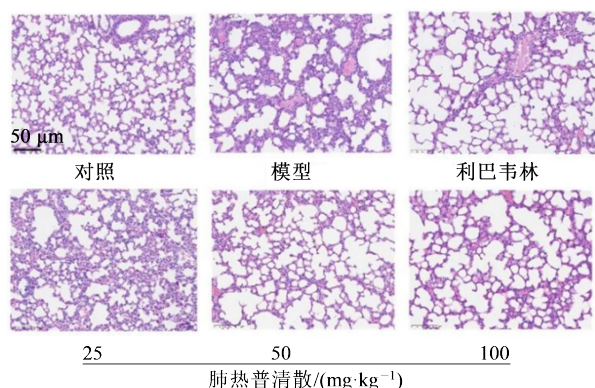


图6 肺热普清散对MHV-A59诱导小鼠肺组织病理的影响(×10)

Fig. 6 Effect of Feire Puqing Powder on MHV-A59-induced lung tissue inflammation(×10)

肿,肺泡出现压缩、坍塌,有炎症细胞浸润,肺泡内可见有红染的分泌物。肺热普清散中剂量组、高剂量组和利巴韦林组的小鼠肺脏组织镜下见肺泡间隔较窄,肺泡舒展,局部仍有炎症浸润和出血,肺泡腔内的分泌物明显减少,利巴韦林组的肺脏组织局部有纤维样改变。该结果说明肺热普清散对MHV-A59感染的小鼠肺组织具有保护作用。

#### 4 讨论

冠状病毒侵袭人体后对多个人体器官有严重危害,一部分感染者出现发热、咳嗽、喷嚏、乏力等感冒症状,部分低免疫力的患者出现向重症肺炎转化的趋势,甚至出现急性呼吸窘迫综合征和急性的肺功能损伤,此时发生炎症反应的器官会产生大量的促炎因子,特别是干扰素、IL-1 $\beta$ 、IL-18和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等<sup>[14-16]</sup>,大量炎症因子的释放可能直接激活凝血级联反应,破坏血管内壁结构和影响凝血系统正常功能,导致大量静脉血栓形成并引起肺栓塞从而加快疾病进程<sup>[17]</sup>。

小鼠MHV-A59病毒是感染小鼠的天然冠状病毒,对人体几乎无感染力,因而成为研究冠状病毒

的感染力和免疫应答的常用模型之一,也被用来作为(新)冠状病毒体内实验模型<sup>[18]</sup>。研究表明小鼠肝炎病毒和SARS-CoV-2同属于 $\beta$ -CoV,且含有相似的基因组结构,其致病蛋白结构类似;另有研究表明MHV感染肺部后并诱导与SARS-CoV-2相似的炎症反应和病理变化<sup>[19-20]</sup>。本研究的模型组感染后检测指标变化与文献报道类似<sup>[21]</sup>。本项目组研究发现肺热普清散对MHV-A59病毒感染小鼠具有提高抵抗病毒的作用:首先肺热普清散组小鼠体质量较模型组有显著增加,显示对感染后动物的整体状态有保护作用;同时与模型组比较,肺热普清散中剂量组小鼠肝脏指数明显下降,具有显著性差异( $P < 0.05$ ),显示对病毒感染后小鼠肝脏的充血和水肿具减轻作用,表明其具有抗炎作用;同时肝脏和肺脏的病理切片结果表明肺热普清散能够减轻病毒感染后对器官的结构性损伤和炎症性损伤,提示其具有显著的抗炎作用。炎症因子水平检测结果显示无论血清还是肝脏组织的IL-1 $\beta$ 都得到了有效的抑制,而且具有剂量相关性;对各组用药后的血清病毒载量水平检测结果表明:高剂量的肺热普清散能够同利巴韦林一样能够显著抑制病毒的数量,说明了肺热普清散对病毒的复制有显著的抑制作用。

经典复方的现代研究往往缺乏全面反映其药理作用的模型,在本实验中也存在相同的问题。本实验中肺热普清散血清中IL-1 $\beta$ 和肝脏中IL-18与模型组比较缺乏显著性差异,虽然病理显示出肺热普清散具有显著抗炎和明显改善作用,但就单个因子的感染后变化难以解释肺热普清散的作用,因此有必要结合其他炎症模型继续开展相关研究。

肺热普清散进入临床应用近30年来,大量的临床病例证明其对肺部感染和呼吸道炎症性疾病有明确疗效,较早的体内研究确认了其较好的抗炎活性<sup>[22]</sup>。本课题组以MHV-A59感染小鼠模型进行肺热普清散抗

病毒初步研究,证明了肺热普清散对冠状病毒的感染具有保护作用,其作用机制与抑制血清中病毒复制,和抑制感染后炎症因子增多有关。本研究开展传统藏药名方肺热普清散的实验研究,基于小鼠 MHV-A59 模型和分子药理学的结果分析提示肺热普清散具有显著的体内抗 MHV-A59 病毒活性,其机制可能与其抑制病毒复制和抑制感染后炎症因子作用有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Wang C, Horby P W, Hayden F G, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 470-473.
- [2] O'Mahoney L L, Routen A, Gillies C, et al. The prevalence and long-term health effects of long Covid among hospitalised and non-hospitalised populations: A systematic review and Meta-analysis [J]. *E Clin Med*, 2022, 55: 101762.
- [3] Susan Q, Raymond R. Bond, Mark P. Donnelly, et al. A review of Covid-19 symptom checker mobile applications [C]. *HCI International 2021-Posters*. 2021.
- [4] Carabelli A M, Peacock T P, Thorne L G, et al. SARS-CoV-2 variant biology: Immune escape, transmission and fitness [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21, 162-177.
- [5] Sun C, Xie C, Bu G L, et al. Molecular characteristics, immune evasion, and impact of SARS-CoV-2 variants [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2022 7, 202.
- [6] Jamison D A, Anand Narayanan S, Trovão N S, et al. A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection [J]. *Eur J Hum Genet*, 2022, 30(8): 889-898.
- [7] Elsayed Y, Khan N A. Immunity-boosting spices and the novel coronavirus [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11 (12): 1696-1698.
- [8] Jessica Fae Calver, Laura Fabbri, James May, R, et al. COVID-19 in patients with chronic lung disease [J]. *Clin Chest Med*, 2023, 44(2), 385-393.
- [9] 贡保吉. 藏西医结合治疗小儿支气管肺炎 50 例疗效观察 [J]. *西部中医药*, 2013, 26(10): 65-66.  
Gong B J. Observation on the combination of Tibetan and western medicine in treating 50 cases of bronchopneumonitis in children [J]. *West J Tradit Chin Med*, 2013, 26(10): 65-66.
- [10] Lavi E, Gilden D H, Highkin M K, et al. MHV-A59 pathogenesis in mice [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1984, 173: 237-245.
- [11] Lavi E, Gilden D H, Wroblewska Z, et al. Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus [J]. *Neurol*, 1984, 34(5): 597-603.
- [12] 段秀英,马瑞娇,张云,等. 斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的应用 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(8): 1573-1580.  
Duan X Y, Ma R J, Zhang Y, et al. Zebrafish inflammation model and its application in anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine [J]. *Drug Eva Res*, 2021: (8): 1573-1580.
- [13] Ashraf N, Zino S, MacIntyre A, et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(8): 1056-1061.
- [14] Zhu N, Zhang D Y, Wang W L, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-733.
- [15] Nieto-Torres J L, Verdía-Báguena C, Jimenez-Guardeño J M, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome [J]. *Virology*, 2015, 485: 330-339.
- [16] Li J Z, Gong X B, Wang Z G, et al. Clinical features of familial clustering in patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Virus Res*, 2020, 286: 198043.
- [17] Han N, Du L, Yan L, et al. The mechanism and treatment strategies of SARS-CoV-2 mediated inflammatory response [J]. *J Biomedical Eng*, 2020, 37(4): 572-578.
- [18] MacPhee P J, Dindzans V J, Fung L S, et al. Acute and chronic changes in the microcirculation of the liver in inbred strains of mice following infection with mouse hepatitis virus type 3 [J]. *Hepatology*, 1985, 5(4): 649-660.
- [19] Singh M, Khan R S, Dine K, et al. Intracranial inoculation is more potent than intranasal inoculation for inducing optic neuritis in the mouse hepatitis virus-induced model of multiple sclerosis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 311.
- [20] Körner R W, Majjouti M, Alcazar M A A, et al. Of mice and men: The coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand SARS-CoV-2 [J]. *Viruses*, 2020, 12(8): 880.
- [21] Zalinger Z B, Elliott R, Weiss S R. Role of the inflammasome-related cytokines Il-1 and Il-18 during infection with murine coronavirus [J]. *J Neurovirol*, 2017, 23(6): 845-854.
- [22] 采金金, 谢和兵, 吴永昊, 等. 肺热普清散对斑马鱼炎症模型的抗炎作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(2): 364-369.  
Cai J J, Xie H B, Wu Y H, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of Feire Puqing Powder on zebrafish model [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(2): 364-369.

[责任编辑 齐静雯]