

清肺排毒汤靶向 IFN-I 效应通路预防新型冠状病毒肺炎转重症的入血成分及其作用机制研究

倪文佳^{1,3}, 邓航³, 雷涵越³, 董勇³, 贾旭³, 袁杰^{1*}, 国锦琳^{2*}

1. 成都医学院 成都市青白江区中医医院, 四川 成都 610500

2. 成都中医药大学 西南特色中药资源系统研究重点实验室, 四川 成都 610075

3. 成都医学院 非编码 RNA 与药物四川省高等学校重点实验室, 四川 成都 610500

摘要: 目的 旨在探讨靶向 I 型干扰素 (IFN-I) 效应通路的清肺排毒汤入血成分、预防新冠肺炎转重症潜能及其作用机制。方法 通过双荧光素酶报告系统鉴定严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 抑制 IFN-I 效应通路的病毒蛋白。将 KM 小鼠 ig 给药清肺排毒汤后, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术明确复方入血成分, 并利用 Uniport, Genecard 等数据库进行新冠肺炎靶点筛选以及通过 DAVID、Gene Ontology 等数据库富集复方入血成分对应疾病靶点的相关通路。利用 Autodock Vina 批量小分子对接, 筛选出能靶向 IFN-I 效应通路关键基因的化合物成分, 并通过实时荧光定量 PCR 和间接免疫荧光实验验证清肺排毒汤及其成分抗 SARS-CoV-2 的潜在作用机制。结果 双荧光素酶报告系统共鉴定出有 16 个抑制 IFN-I 效应通路的 SARS-CoV-2 蛋白, 其中, 除已经被报道的 11 个蛋白, 结果还发现 NSP7 和 NSP16 能显著地抑制 IFN-I 效应通路。比较复方提取物、给药后含药血清及空白血清, 从昆明小鼠血清中发现入血成分 56 个, 网络药理学分析发现 *P* 值靠前的 10 种通路中, 清肺排毒汤有 5 种与免疫及炎症发生相关, 其中包括 IFN-I 效应通路 (JAK-STAT 通路)。进一步分子对接结果表明黄花败酱苷 C 和染料木苷 2 个活性成分与 IFN-I 效应通路的核心靶点均具有良好的结合活性。清肺排毒汤及其成分干预后不仅能解除 SARS-CoV-2 Spike 蛋白对 ISGF3 复合体入核的抑制作用, 进而上调干扰素刺激基因 (ISGs) 表达, 也能抑制 IFN 受损的炎症反应。结论 清肺排毒汤及其成分能够靶向 IFN-I 效应通路发挥抗病毒作用, 筛选到的有效成分可为预防新冠肺炎转重症提供新的潜在候选药物。

关键词: 清肺排毒汤; 有效成分; IFN-I 效应通路; 新冠肺炎转重症; 作用机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)03-0837-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.010

Investigation into blood-entering components and mechanisms of Qingfei Paidu Decoction in preventing progression to severe disease of COVID-19 targeting IFN-I effector pathway

NI Wenjia^{1,3}, DENG Hang³, LEI Hanyue³, DONG Yong³, JIA Xu³, YUAN Jie¹, GUO Jinlin²

1. Chengdu Qingbaijiang District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. Key Laboratory of Systematic Research of Distinctive Chinese Medicine Resources in Southwest China, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

3. Key Laboratory of Non-coding RNA and Drug Discovery at Chengdu Medical College of Sichuan Province, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Abstract: Objective To explore the blood-entering components of Qingfei Paidu Decoction targeting the IFN-I effect pathway, its potential to prevent the progression to severe disease of COVID-19, and its mechanism of action. **Methods** To identify the viral proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) that inhibit the IFN-I effector pathway by the Dual-Luciferase Reporter System. After Qingfei Paidu Decoction was given to Kunming rats by gavage, the blood-entering components were determined by UPLC-Q-TOF-MS. And use the Uniport, Genecard database for COVID-19 targets screening, as well as by DAVID,

收稿日期: 2025-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82470122); 成都医学院“成医英才”登峰计划项目 (2024kjTzn01); 成都医学院-成都市青白江区中医医院临床科学研究基金 (24LHFBM1-01)

作者简介: 倪文佳, 女, 讲师, 主要从事抗冠状病毒药物研发与机制研究。E-mail: niwenjia@cmc.edu.cn

*通信作者: 袁杰, 男, 副主任中医师, 主要从事重症医学、老年病研究。E-mail: yuanjie@cmc.edu.cn

国锦琳, 男, 教授, 主要从事中药资源与开发研究。E-mail: guo596@cdutcm.edu.cn

Gene Ontology database, such as enrichment of compounds into the blood components corresponding to disease targets related pathways. Autodock Vina batch small molecule docking was used to screen compounds that could target key genes of IFN-I effector pathway, and the potential mechanism of Qingfei Paidu Decoction and its components against SARS-CoV-2 was verified by real-time quantitative PCR and Indirect Immunofluorescence Assay. The Dual-Luciferase Reporter System identified a total of 16 SARS-CoV-2 proteins that inhibited the IFN-I effector pathway. **Results** Among them, in addition to the 11 proteins that have been reported, NSP7 and NSP16 were also found to significantly inhibit the IFN-I effector pathway. By comparing compound extracts, drug-containing serum, and blank serum after administration, 56 blood-entering components were found in the serum of Kunming mice. Network pharmacological analysis found that among the top 10 pathways of *P* value, five kinds of Qingfei Paidu Decoction were related to immunity and inflammation, including the IFN-I effect pathway (JAK-STAT pathway). Further molecular docking results showed that scabioside C and genistin had good binding activities with the core targets of IFN-I effector pathway. **Conclusion** Mechanism study has shown that Qingfei Paidu Decoction and its components not only can relieve the inhibitory effect of SARS-CoV-2 Spike protein on the nuclear entry of ISGF3 complex, and thereby upregulate the expression of ISGs, but also inhibit the inflammatory response caused by IFN deficiency. The results showed that Qingfei Paidu Decoction and its components can target the IFN-I effector pathway to play an antiviral role, and the selected effective components can provide new potential candidate drugs for preventing the progression to severe disease of COVID-19.

Key words: Qingfei Paidu Decoction; effective components; IFN-I effect pathway; progression to severe disease of COVID-19; mechanism of action

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 感染会导致感染新型冠状病毒肺炎 (COVID-19), 重症患者会发展为呼吸窘迫综合征, 甚至死亡。目前, SARS-CoV-2 已导致全球超过 7.8 亿确诊病例和 700 万的死亡病例 (<https://covid19.who.int>), 严重影响了人类的健康与经济的发展。研发防控重症转化的治疗药物仍然是 SARS-CoV-2 领域亟待解决的问题。

SARS-CoV-2 感染重症患者仅能在部分危重病例的肺泡灌洗液中检测到低水平的 I 型干扰素 (IFN-I) 表达^[1], 临床表现为全身性 IFN-I 分泌不足^[2]。现有研究表明, IFN-I 响应延迟或分泌不足可能会导致免疫反应失衡, 不仅会干扰宿主的病毒清除机制, 还可能导致促炎因子异常释放。在严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 临床感染中同样发现了这种低水平的 IFN-I 反应^[3-4]。此外, 在儿童和老年人等免疫系统发育不完善或免疫力低下的人群中, 由于先天免疫应答机制减弱, 仅能分泌低水平的 IFN-I, 也被认为是这类人群容易发展为危重症患者的原因之一^[5]。因此, 外源 IFN-I 在临床上也被用于治疗 SARS-CoV-2 感染重症患者。临床研究表明 SARS-CoV-2 患者对外源的 IFN-I 治疗有一定的效果^[6], 且这种疗法也应用在 SARS-CoV 和 MERS-CoV 感染患者^[7]。然而, 更多的临床试验数据却证明添加外源 IFN-I 对于 SARS-CoV-2 重症患者效果不佳^[8-9], 说明仅仅通过增加外源 IFN-I 的量不足以改善患者症状, 提示 SARS-CoV-2 不仅抑制 IFN-I 的产生, 更重要的是能够抑制 IFN-I 应答。因此,

靶向 IFN-I 下游效应通路可能为开发预防 COVID-19 重症转化的药物提供理论依据。

清肺排毒汤是国家卫生健康委员会推荐治疗 COVID-19 轻、中、重度患者的通用中药方剂。该复方来源于张仲景的《伤寒杂病论》, 共计 21 味中药^[10-11]。清肺排毒汤突出内外兼治的功效, 既外治邪毒之气, 又内祛痰湿之邪。外治邪毒时, 其以麻杏石甘汤宣清, 小柴胡汤和解, 配以射干麻黄汤加减以排毒散热。治内时, 因有痰饮湿邪内停, 脾阳中气不运, 气机升降被遏, 致咳喘气逆不舒, 其以苓桂术甘汤、五苓散温阳化气, 且佐桂枝、白术, 健脾补气, 从而阳气得充, 水湿乃除^[12-13]。在对 COVID-19 患者的临床回顾性研究中, 清肺排毒汤可降低重症转化率 50% 以上, 且治疗后能有效恢复患者肺部 CT 影像成像特征, 显著抑制炎症发生, 充分体现清肺排毒汤在预防 COVID-19 重症转化中的优势^[14-15]。但清肺排毒汤预防重症的作用机制还未见报道, 且体内药效物质和作用靶点尚不清楚, 限制了对清肺排毒汤临床定位和功能潜力的系统认识, 亟需探索清肺排毒汤预防重症转化的有效成分及其潜在的药理功能。

本研究采用液质联用技术结合网络药理学分析方法探讨靶向 IFN-I 效应通路的清肺排毒汤入血成分、预防 COVID-19 转重症潜能及其作用机制, 进一步针对 IFN-I 效应通路核心靶点筛选预防 COVID-19 重症转化的有效成分。本研究结果可为研发防控重症的抗 SARS-CoV-2 药物提供理论依据, 筛选到的有效成分可为预防 COVID-19 转重症提供

新的潜在候选药物。

1 材料

1.1 细胞与小鼠

人胚肾细胞系(293T)、293T-IFNAR1^{-/-}细胞系和人宫颈癌细胞系(HeLa)由本实验室保藏;SPF 清洁级 KM 雌性小鼠 20 只,6~8 周龄,体质量(20±2)g,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2024-0003。动物实验方案经成都医学院实验动物伦理委员会审核批准(批准号 2024-043),所有动物饲养和研究过程均严格遵守伦理审查要求。

1.2 药物与试剂

清肺排毒汤颗粒方剂组成如下:麻黄 9 g、炙甘草 6 g、燀苦杏仁 9 g、生石膏 30 g、桂枝 9 g、泽泻 9 g、猪苓 9 g、生白术 9 g、茯苓 15 g、北柴胡 16 g、黄芩 6 g、姜半夏 9 g、生姜 9 g、蜜紫苑 9 g、蜜款冬花 9 g、射干 9 g、细辛 6 g、山药 12 g、枳实 6 g、陈皮 6 g、广藿香 9 g(批号 24032881,北京康仁堂药业有限公司);黄花败酱苷 C 和染料木苷(货号 TS-TM-7,TargetMol Chemicals Inc 公司);DMEM 培养基、Penicillin-Streptomycin 双抗、EDTA-胰酶、opti-MEM 培养基(货号 C11995500BT、15140-122、25200-056、31985-070, Gibco 公司);胎牛血清(货号 04-001-1ACS, Biological Industries 公司);二甲基亚砜、DAPI(货号 D2650、D9542, Sigma-Aldrich 公司);Lipofectamine 2000、TRIZOL、Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488/568(货号 11668019、15596018、A11029/A11011, Invitrogen Corporation 公司);DEPC 水(货号 SL2230, Coolaber 公司);牛血清白蛋白(货号 4240GR100, Biofrox 公司);反转录试剂盒(货号 RR037, Takara Bio Inc 公司);Recombinant Human IFN- β (货号 300-02BC, PeproTech 公司);Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Plus)(货号 11202ES03, 上海翊圣生物科技有限公司);Dual-Luciferase[®] Reporter

Assay System(货号 E1910, Promega Corporation 公司);Rabbit polyclonal SARS-CoV-2 Spike antibody(货号 40591-T62, Sino Biological Inc 公司);脂多糖(LPS)、pRL-SV40 质粒(货号 S1732、D2762, 上海碧云天生物技术股份有限公司);pIFITM3-Luc 质粒(本实验室构建, IFITM3 启动子序列 CDS 区上游 2 000 bp 克隆到 pGL3-basic 载体上);本实验中所用的 19 种 SARS-CoV-2 病毒蛋白表达质粒和甲型流感病毒 NS1 蛋白表达质粒均由本实验室保存。

1.3 仪器

Triple TOF 6600 质谱仪(AB Sciex 公司);Nexera X2 超高压液相色谱仪(岛津公司);Bioruptor 超声波系统(Diagenode 公司);Centrifuge 5424R 离心机(Eppendorf 公司);ZHJH-C2109B 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);BIOS-101C CO₂ 细胞培养箱(上海贝茵生物科技有限公司);GloMax 20/20 发光检测仪(Promega 公司);CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-rad 公司);LSM 900 共聚焦荧光显微镜(Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 双荧光素酶报告实验

在 293T 细胞中,转染 SARS-CoV-2 病毒蛋白表达质粒(每孔 500 ng),阳性对照转染甲型流感病毒的 NS1 蛋白表达质粒(研究已证实显著抑制 IFN-I 通路),阴性对照转染空载体,同时 3 组均转染 pIFITM3-Luc(每孔 50 ng)和 pRL-SV40(每孔 50 ng)内参质粒。24 h 后,在细胞中加入 IFN-I(1 000 U·mL⁻¹),12 h 后收样检测荧光素酶的活性。

2.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

在 293T 细胞中分别过表达 NSP7(每孔 500 ng)和 NSP16(每孔 500 ng)病毒蛋白,阴性对照为空载体质粒,24 h 后在细胞中加 IFN-I(1 000 U·mL⁻¹),12 h 后收样检测干扰素刺激基因(ISGs)的 mRNA 表达水平。具体的 ISGs 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'→3')	
ISG15	正向 CCTCCAGCCCGCTCACTTGC	反向 AGGACAGGGTCCCCCTTGCC
ISG54	正向 CTGCAACCATGAGTGAGAA	反向 CCTTTGAGGTGCTTTAGATAG
ISG56	正向 TACAGCAACCATGAGTACAA	反向 TCAGGTGTTTCACATAGGC
IFITM1	正向 CCAAGGTCCACCGTGATTAAC	反向 ACCAGTTCAAGAAGAGGGTGTT
IFITM2	正向 ATGAACCACATTGTGCAAACCT	反向 CCCAGCATAGCCACTTCCT
IFITM3	正向 CACCTCCTCCCCTTCCTCA	反向 TGTCCCCGGCTATCCACTA

2.3 含药血清制备

将 20 只 SPF 级小鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为清肺排毒汤组(颗粒制剂溶于超纯水中, 按照小鼠与人的临床等效剂量换算后, 每只小鼠 ig 给药 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和对照组(ig 0.9%氯化钠溶液)共 2 组, 均连续 ig 7 d。于末次给药后隔日取血。用不含抗凝剂的样本收集管采集血样(动物眼底静脉丛取血), 静置 20~30 min 使其凝结后, 再将采血管放入冷冻离心机内, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10~15 min, 吸取上清液(即血清)分装于 EP 管中。

2.4 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间(LC-MS/MS)分析

2.4.1 样品制备及收集 (1)清肺排毒汤方剂: 100 mg 颗粒制剂于 1 mL 超纯水溶解, 加入 3 mL 乙醇, 超声 10 min 后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 12 h, $4000 \times g$ 离心 10 min 取上清, 氮气吹干获得样品。(2)空白血清: 小鼠 ig 0.9%氯化钠溶液 7 d 后取血清, 100 μL 血清加入 400 μL 纯甲醇, 冰浴超声 20 min, $16000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 取上清液, 用氮气吹干并加入 50%甲醇复溶获得样品。(3)含药血清: 小鼠 ig 清肺排毒汤颗粒剂 ($6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 7 d 后取血清, 100 μL 血清加入 400 μL 纯甲醇, 冰浴超声 20 min, $16000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 取上清液, 用氮气吹干并加入 50%甲醇复溶获得样品。

2.4.2 色谱分离: 所有样品采用 SHIMADZU-LC30 超高效液相色谱系统(UHPLC), 使用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)(Waters, Milford, MA, USA) 色谱柱。柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 体积流量 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 色谱流动相 A: 0.1%甲酸水溶液, B: 0.1%甲酸的乙腈溶液。色谱梯度洗脱程序如下: 0~1 min, 100% A; 1~2 min, 0 \rightarrow 30% B; 2~12 min, 30% \rightarrow 50% B; 12~21 min, 50% \rightarrow 100% B; 21~26 min, 100% B; 26.0~26.1 min, 100% \rightarrow 0 B; 26.1~30.0 min, 100% A。

2.4.3 质谱采集 样品经 UPLC 分离后使用 TripleTOF 6600 (AB Sciex) 进行质谱分析。质谱采集时间: 30 min。Tof MS 扫描范围: m/z 90~1 500。Product ion 扫描范围: m/z 50~1 500。IDA 触发规则: Tof MS 扫描中前 18 个强度大于 100 cps 的 1 价带电离子。开启动态背景扣除。所有样品均采用电喷雾电离(ESI)进行正离子和负离子 2 种模式。

2.4.4 数据预处理与可视化处理 采集到的质谱原始数据采用 MS DIAL 软件分析处理。鉴定的代谢物通过 R 语言绘制出 Superclass 及 Class 的物质

分类扇形和环图。通过鉴定到的入靶成分的 KEGG ID 进行通路富集, 以 $P < 0.05$ 筛选显著富集的功能和通路, 绘图使用 ggplot2 包。

2.5 网络药理学分析

2.5.1 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、TCMID、Herb 和 PubMed 数据库, 获取清肺排毒汤入血成分对应潜在疾病靶点。将上述疾病靶点, 通过 UNIPROT 数据库检索, 得到所有相对应的疾病靶点蛋白 ID。用 Genecards 数据库, 收集与 COVID-19 相关的全部疾病靶点。将入血成分涉及的疾病靶点, 映射到 COVID-19 的相关通路上, 得到 Venn 图。再通过 DAVID 数据库检索 Venn 图中的交集靶点, 选择种族为“Homo sapiens”, 进行 KEGG 富集分析。将富集基因靶点得到的前 10 种信号通路, 按照 FDR 值从大到小排列, 综合分析基因比例, 涉及靶点数目等因素, 绘制柱状图。利用 Gene Ontology 数据库, 进行 GO 富集分析, 交集靶点富集后, 根据各通路的 FDR 值由低到高, 绘制分子功能、细胞成分、生物过程的气泡图。

2.5.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 用 STRING 数据库检索之前得到的清肺排毒汤入血成分与 COVID-19 的交集靶点, 得到 PPI 图。结果导入 Cytoscape 软件中, 利用 CytoNCA 插件按照介数中心性(BC)值排列成 3 圈, 气泡由大到小依次表示为与靶点 PPI 的数量由多到少。

2.6 分子对接

从鉴定出的清肺排毒汤入血成分中, 筛选口服利用度(OB) $\geq 40\%$, 类药性(DL) ≥ 0.18 的重要活性成分。从 PubChem 数据库中下载上述活性成分的 3D 结构式, 并用 Chemdraw 3D 绘制小分子结构, 转化为 PBD 格式。选择靶向 IFN-I 效应通路关键基因用于分子对接。受体蛋白结构从 PDB 数据库中下载, 用 PyMOL 去除配体和蛋白分子中的溶剂离子和电子, 并添加氢键, 保存为 PBD 格式。再用 OpenBabel 插件, 将所有 PBD 格式的小分子和蛋白, 转化为 PBDT 格式。利用 PyMOL 中的 Autodetect box 插件获得各个蛋白的对接盒子。利用 Autodock Vina 软件, 对各受体蛋白与清肺排毒汤筛选出的入血的小分子成分进行批量分子对接。对接结果按照结合能低于 $-29.33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 视为有效分子对接来排列。最终, 将获得的排名靠前的几种小分子

与蛋白对接形态用 PyMOL 进行可视化, 并进行分子间非离子作用力、 π 键、氢键键能和对接位点的分析。

2.7 间接免疫荧光实验

使用 75%乙醇消毒 12 孔板细胞爬片, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后种于 12 孔板中, 每孔接种 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个 HeLa 细胞于已种爬片的细胞板内; 用清肺排毒汤 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或黄花败酱苷 C/染料木苷 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理 HeLa 细胞 12 h (实验组), 对照组采用相等体积的培养液; 再转染 $1 \mu\text{g}$ SARS-CoV-2 Spike 蛋白的表达质粒, 24 h 后在细胞中加 IFN-I ($1000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激 30 min; PBS 清洗 3 次; 使用 4%多聚甲醛处理细胞 15 min; PBS 清洗 3 次; 使用 0.1% Triton X-100 处理细胞 15 min; PBS 清洗 3 次; 使用 1% BSA 处理细胞 1 h; 一抗孵育 1 h; PBS 清洗 3 次; 二抗避光孵育 1 h; PBS 清洗 3 次; DAPI 染细胞核 15 min; PBS 清洗 3 次; 加入适量抗荧光淬灭剂完成制片; 最后在共聚焦显微镜下观察 STAT1 和 Spike 蛋白的定位。

2.8 293T-IFNAR1^{-/-}炎症细胞模型

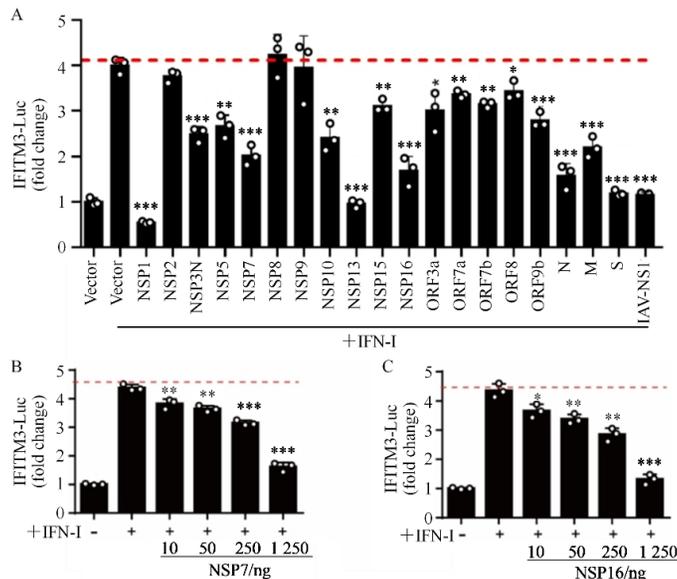
用清肺排毒汤 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或黄花败酱苷 C/染料木苷 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理 293T-IFNAR1^{-/-}细胞 12 h (实验组), 模型组采用相等体积的培养液; 在细胞中加 LPS ($500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 12 h 后收样检测 *IL-6* 和 *TNF- α* 的 mRNA 表达水平。

3 结果

3.1 筛选并确定 SARS-CoV-2 抑制宿主 IFN-I 下游效应通路的病毒蛋白

通过双荧光素酶报告系统筛选能够抑制 IFITM3 启动子活性的 SARS-CoV-2 病毒蛋白。结果如图 1-A 所示, 有 16 个被检测的 SARS-CoV-2 病毒蛋白能够在不同程度上抑制 IFITM3 启动子的活性。其中, 除已经被报道的 NSP1、NSP3、NSP13、NSP15、ORF3a、ORF7a、ORF7b、ORF8、N、M 和 S 能通过不同的分子机制抑制 IFITM3 之外, 本实验结果还额外发现 NSP5、NSP10、ORF9b 3 种病毒蛋白能轻微抑制 IFITM3 启动子活性, 抑制程度分别为 33%、40%和 30%; NSP7 和 NSP16 则能显著地抑制 IFITM3 启动子活性, 抑制程度为 50%和 58%。

为了确认 NSP7 和 NSP16 蛋白对 IFN-I 下游效应信号通路的影响, 检测剂量梯度的 NSP7 和 NSP16 蛋白对 IFITM3 启动子活性的影响。发现转染 10、50、250、1250 ng 的 NSP7 蛋白表达质粒, 对 IFITM3 启动子活性抑制程度为 9%、17%、28%和 63%的 (图 1-B); 转染 10、50、250、1250 ng 的 NSP16 蛋白表达质粒, 对 IFITM3 启动子活性抑制程度为 15%、22%、35%和 70% (图 1-C)。以上结果说明 NSP7 和 NSP16 蛋白能够剂量相关的抑制 IFN-I 下游效应因子 ISG (IFITM3) 启动子的活性。



A-筛选抑制 IFITM3 启动子活性的 SARS-CoV-2 蛋白; B-NSP7 蛋白以剂量相关的方式抑制 IFITM3 启动子活性; C-NSP16 蛋白以剂量相关的方式抑制 IFITM3 启动子活性; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-identification of SARS-CoV-2 proteins that inhibit IFITM3 promoter activity; B-NSP7 proteins inhibit IFITM3 promoter activity in a dose-dependent manner; C-NSP16 proteins inhibit IFITM3 promoter activity in a dose-dependent manner; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 NSP7 和 NSP16 蛋白以剂量相关的方式抑制 IFITM3 启动子活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 NSP7 and NSP16 proteins inhibit IFITM3 promoter activity in a dose-dependent manner ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 SARS-CoV-2 NSP7 和 NSP16 蛋白对 IFN-I 诱导的 ISGs 表达的影响

用 qRT-PCR 检测 NSP7 和 NSP16 蛋白对 IFN-I 诱导的 ISGs 转录水平的影响。NSP7 组实验结果显示, IFN-I 刺激 12 h 后, 阴性对照组中 *ISG15*、*ISG54*、*ISG56*、*IFITM1*、*IFITM2* 和 *IFITM3* 的 mRNA 水平分别上调了约 762、157、1447、410、281 和 85 倍; 在 NSP7 实验组中, NSP7 蛋白显著抑制了这些

ISGs 的 mRNA 水平, 与阴性对照组相比, 抑制率分别为 99%、95%、98%、99%、99%和 91%。NSP16 组实验结果同样显示, IFN-I 刺激 12 h 后, 对照组中 *ISG15*、*ISG54*、*ISG56*、*IFITM1*、*IFITM2* 和 *IFITM3* 的 mRNA 水平分别上调了约 862、194、1 137、276、481 和 93 倍; 而在 NSP16 实验组中, NSP16 蛋白显著抑制了这些 ISGs 的 mRNA 水平, 抑制率分别为 99%、96%、99%、99%、99%和 91%。见图 2。

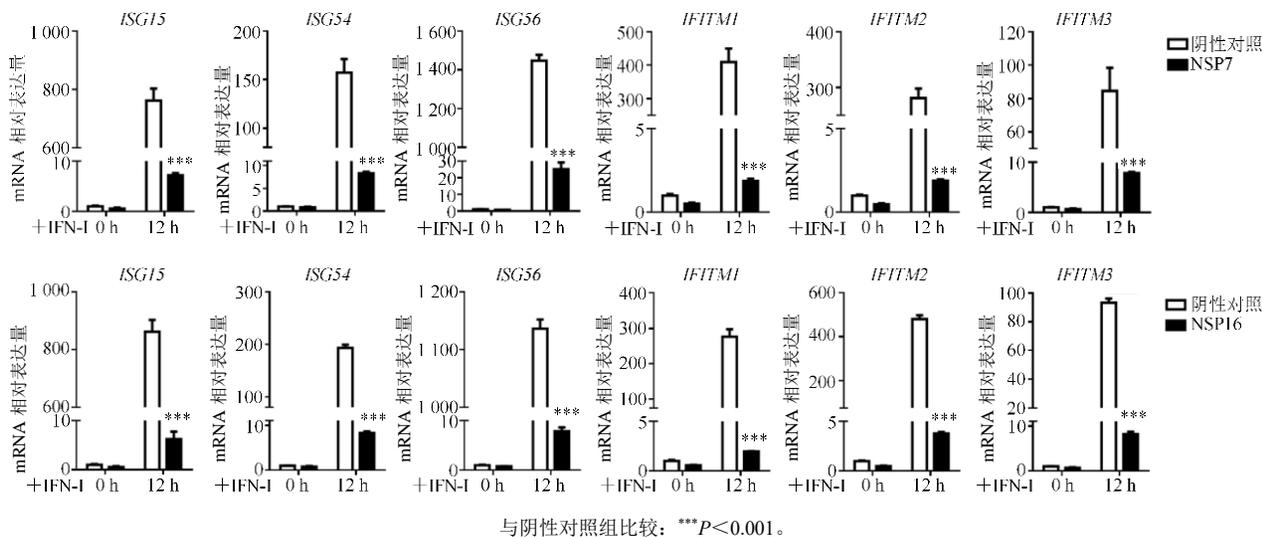


图 2 NSP7 和 NSP16 蛋白抑制 IFN-I 诱导的 ISGs 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 NSP7 and NSP16 proteins inhibit expression of ISGs induced by IFN-I ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 清肺排毒汤入血成分的鉴定

为了解析清肺排毒汤预防 COVID-19 重症转化的有效成分及其潜在的药理作用, 首先通过 LC-MS/MS 技术检测并鉴定了清肺排毒汤在 KM 小鼠中的入血成分。结果如图 3 所示, 经过对比分析, 正、负模式下共检测到 732 个物质, 中药成分 615 个, 其中清肺排毒汤入血成分有 56 个。

3.4 网络药理学分析清肺排毒汤入血成分靶向通路

在质谱分析结果基础上, 通过 DAVID、Gene Ontology 等数据库进行 KEGG、GO 富集分析和 PPI 网络分析。结果如图 4 所示, P 值靠前的 10 种通路中, 清肺排毒汤有 5 种与免疫及炎症发生相关, 其中包括 IFN-I 效应通路 Janus 激酶/信号转导和转录激活蛋白 (JAK/STAT) 通路。但是清肺排毒汤调控 IFN-I 效应通路的具体机制以及清肺排毒汤与关键靶点蛋白之间的相互作用还不清楚, 需要进一步研究。

3.5 清肺排毒汤入血成分与靶点蛋白分子对接

为了筛选出能靶向 IFN-I 效应通路关键基因的

化合物成分, 在 TCMSP 和 PubChem 数据库中收集清肺排毒汤 56 个入血成分的小分子三维结构, 并利用 Autodock Vina 软件将这些化合物与 ISGF3 (STAT1/STAT2/IRF9) 的晶体结构进行虚拟筛选。根据结合能小于 $-29.33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 为有效结果, 表 2 中列出排名前 10 与 ISGF3 对接能较低的活性成分。其中, 黄花败酱苷 C 和染料木苷与 ISGF3 复合物的 3 种蛋白靶点均有较低的结合能, 小于 $-33.44 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 具体的相互作用模式见图 5。

3.6 清肺排毒汤抗 SARS-CoV-2 的分子机制

ISGF3 三元复合体 (STAT1/STAT2/IRF9) 入核对于下游 ISGs 的产生是至关重要的一步。本研究基于课题组前期发现 SARS-CoV-2 Spike 蛋白能够显著阻断 ISGF3 入核, 进而限制了 ISG 的表达^[6], 故本研究在前期基础上探究清肺排毒汤能否解除 Spike 蛋白对 IFN-I 效应通路的抑制作用。结果如图 6 所示, STAT1 主要分布在细胞质中, IFN-I 能够刺激其入核; SARS-CoV-2 Spike 蛋白能够抑制 IFN-I

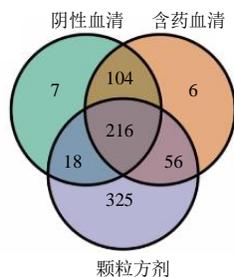
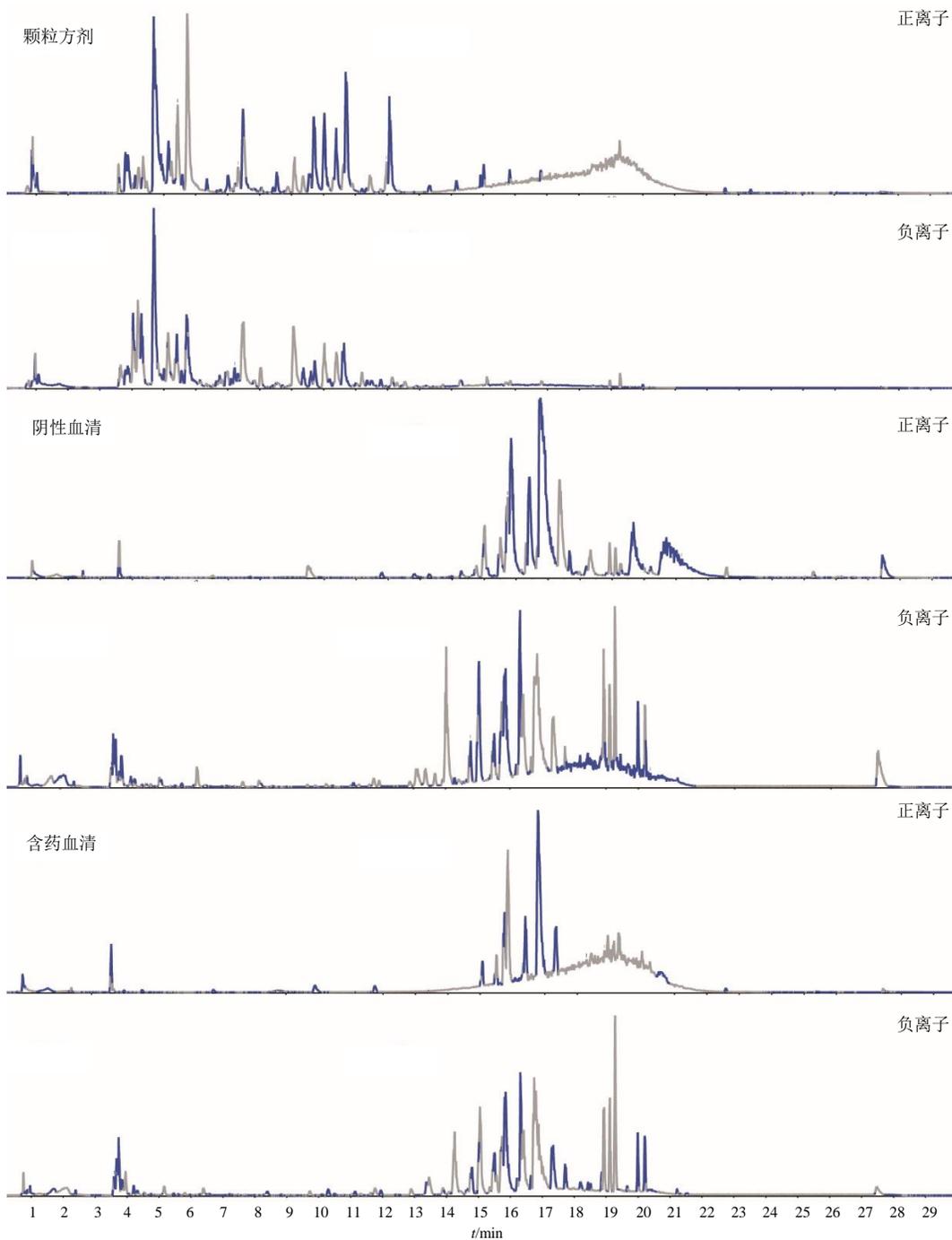
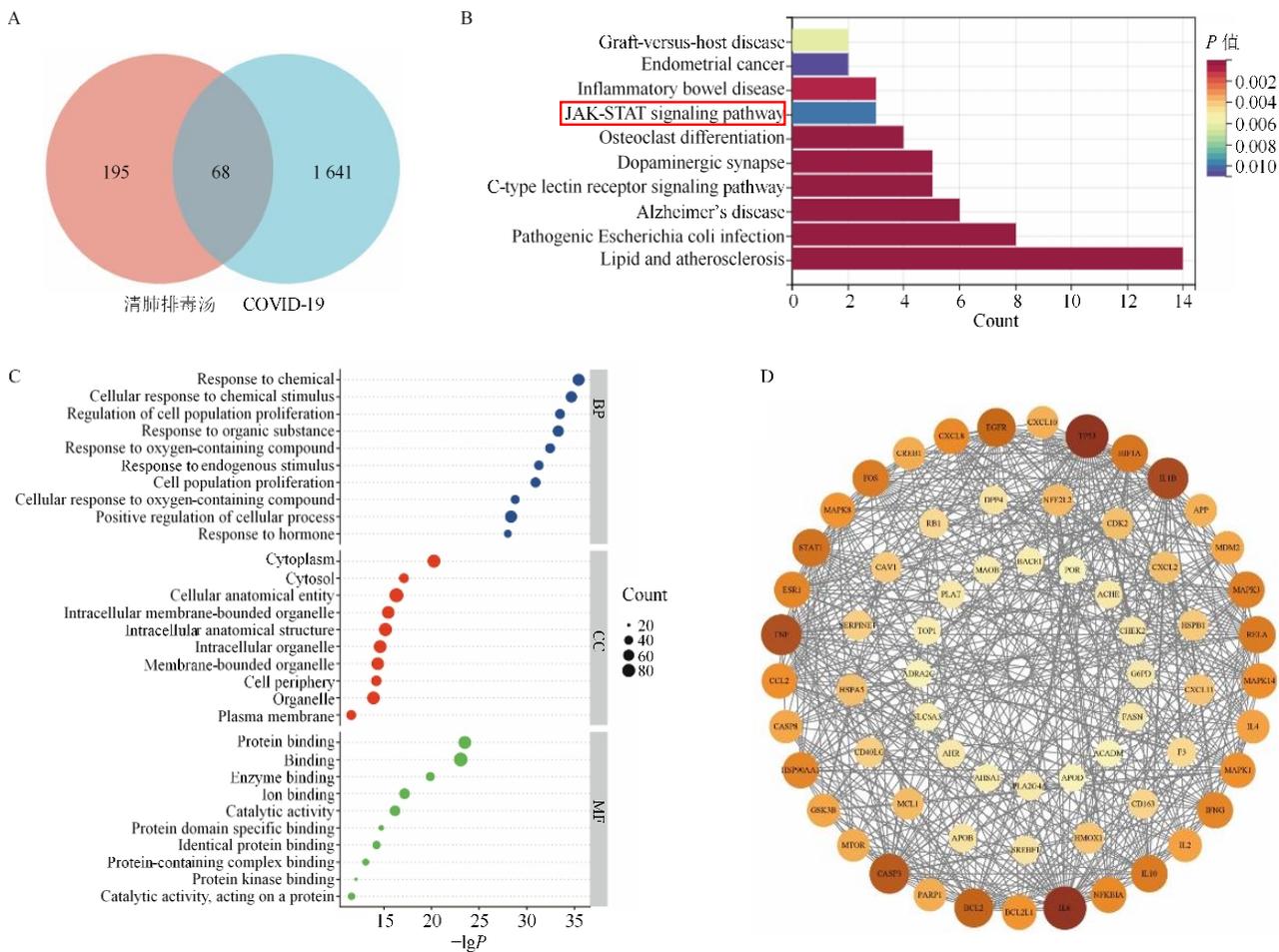


图 3 LC-MS/MS 检测清肺排毒汤的入血成分

Fig. 3 LC-MS/MS detection of Qingfei Paidu Decoction in blood-entering components



A-清肺排毒汤与 COVID-19 靶点的韦恩分析; B-清肺排毒汤治疗 COVID-19 关键靶点的 KEGG 富集分析; C-清肺排毒汤治疗 COVID-19 关键靶点的 GO 富集分析; D-清肺排毒汤治疗 COVID-19 关键靶点的 PPI 网络分析。

A-Venn analysis of QFPDD and COVID-19; B-KEGG enrichment analysis of key targets of QFPDD in treating COVID-19; C-GO enrichment analysis of key targets of QFPDD in treating COVID-19; D-PPI network analysis of key targets of QFPDD in treating COVID-19.

图 4 清肺排毒汤入血成分可靶向 JAK/STAT 通路

Fig. 4 Qingfei Paidu Decoction blood-entering components can target JAK/STAT pathway

诱导的 STAT1 入核，以上结果和之前研究一致，表明实验体系成功。在此基础上，发现清肺排毒汤及其成分干预后，在加 IFN-I 刺激且过表达 SARS-CoV-2 Spike 蛋白的情况下，STAT1 仍主要分布在细胞核中，表明清肺排毒汤及其成分能解除 Spike 蛋白对 STAT1 入核的抑制作用。

进一步用 qRT-PCR 的方法探究清肺排毒汤及其有效成分能否解除 Spike 蛋白对 IFN-I 诱导的 ISGs 表达的抑制作用。结果如图 7 所示，这些 ISGs 的 mRNA 水平被 Spike 蛋白抑制 ($P < 0.001$)，在清肺排毒汤及其成分干预后，ISGs 的转录水平显著上调。以上结果表明，清肺排毒汤能靶向 IFN-I 效应通路发挥抗 SARS-CoV-2 作用。

3.7 探究清肺排毒汤靶向 IFN-I 效应通路预防 COVID-19 转重症的潜能

在重症和危症 COVID-19 患者中发现了一种严重受损的 IFN-I 反应，其特征是低 IFN 产量和活性，从而导致 ISG 的下调，这与持续的血液病毒负荷和部分由核因子 (NF)- κ B 驱动的炎症反应加剧有关，其特征还在于肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素 (IL)-6 等促炎因子的产量和信号传导增加^[6,17-18]，且 IL-6 在《新型冠状病毒感染诊疗方案（试行第十版）》中也被列为预测疾病进展及死亡的独立危险因素^[19-20]。故本研究利用 293T-IFNAR1^{-/-}炎症细胞模型，探究清肺排毒汤及其成分能否抑制促炎因子的表达。结果如图 8 所示，LPS (500 ng·mL⁻¹) 刺

表 2 清肺排毒汤中入血活性成分与 STAT1、STAT2 和 IRF9 分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of blood-entering components in Qingfei Paidu Decoction with STAT1, STAT2, and IRF9

靶点	小分子	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	
STAT1	染料木苷 (genistin)	-37.20	
	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷 (isorhamnetin 3-glucoside)	-35.53	
	5,7-二羟基-4-甲基香豆素 (5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin)	-35.53	
	黄花败酱苷 C (scabioside C)	-35.11	
	阿利维甲酸 (alitretinoin)	-34.28	
	野鸢尾黄酮 (irigenin)	-33.86	
	按脂素 (eudesmin)	-33.44	
	鸢尾黄素 (tectorigenin)	-33.02	
	香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (diosmetin 7-O-β-D-glucuronopyranoside)	-33.02	
	科拉藤黄 (koparin)	-33.02	
	STAT2	科拉藤黄 (koparin)	-38.87
		金丝桃苷 (quercetin 3-galactoside)	-36.78
		黄花败酱苷 C (scabioside C)	-36.78
		异牡荆黄素 (isovitexin)	-36.37
阿利维甲酸 (alitretinoin)		-35.53	
染料木苷 (genistin)		-35.53	
香草酸 (vanillic acid)		-34.70	
芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (apigenin 7-glucuronide)		-34.28	
鸢尾黄素 (tectorigenin)		-34.28	
5,7-二羟基-4-甲基香豆素 (5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin)		-34.28	
IRF9		黄花败酱苷 C (scabioside C)	-36.45
		染料木苷 (genistin)	-34.36
		野鸢尾黄酮 (irigenin)	-33.10
		异鼠李素-3-O-葡萄糖苷 (isorhamnetin 3-glucoside)	-32.68
	香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (diosmetin 7-O-β-D-glucuronopyranoside)	-32.68	
	阿利维甲酸 (alitretinoin)	-32.68	
	鸢尾黄素 (tectorigenin)	-32.26	
	羟基阿魏酸 (hydroxyferulic acid)	-32.26	
	5,7-二羟基-4-甲基香豆素 (5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin)	-32.26	
	茯苓酸 (pachymic acid)	-32.26	

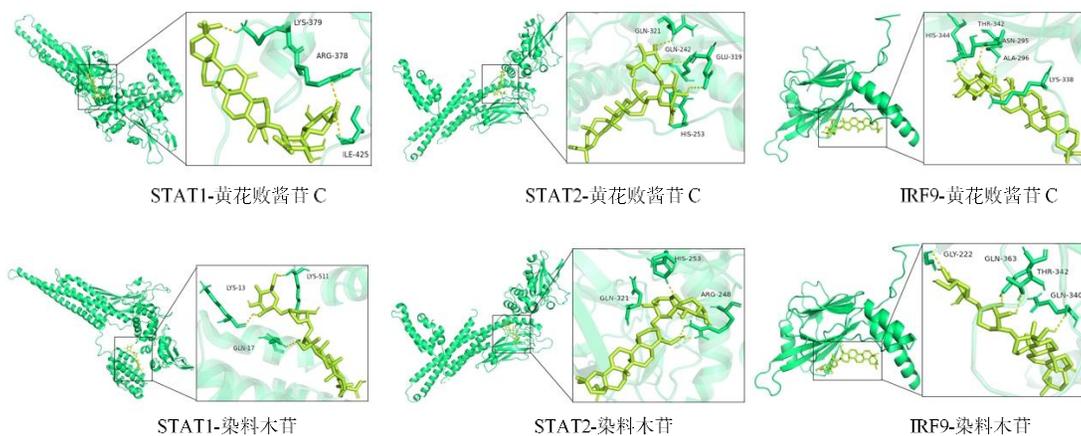


图 5 黄花败酱苷 C、染料木苷与 ISGF3 相互作用的分子对接图

Fig. 5 Molecular docking diagrams of interactions between scabioside C, genistin and ISGF3

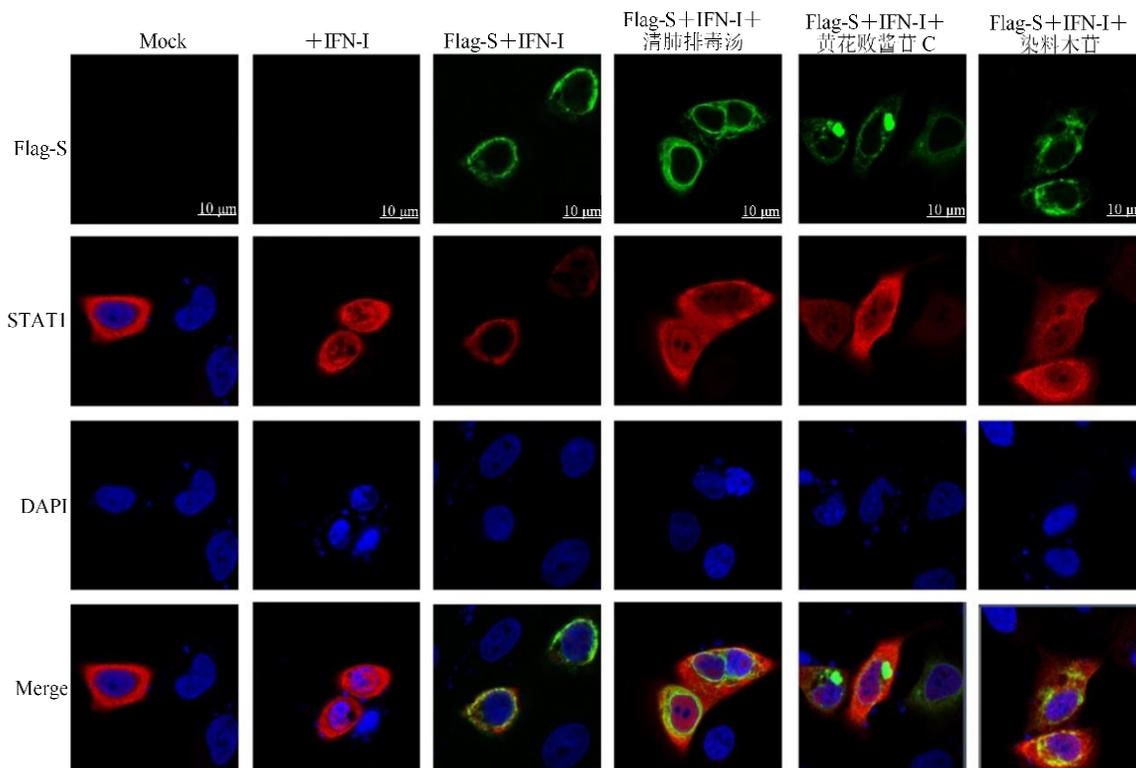
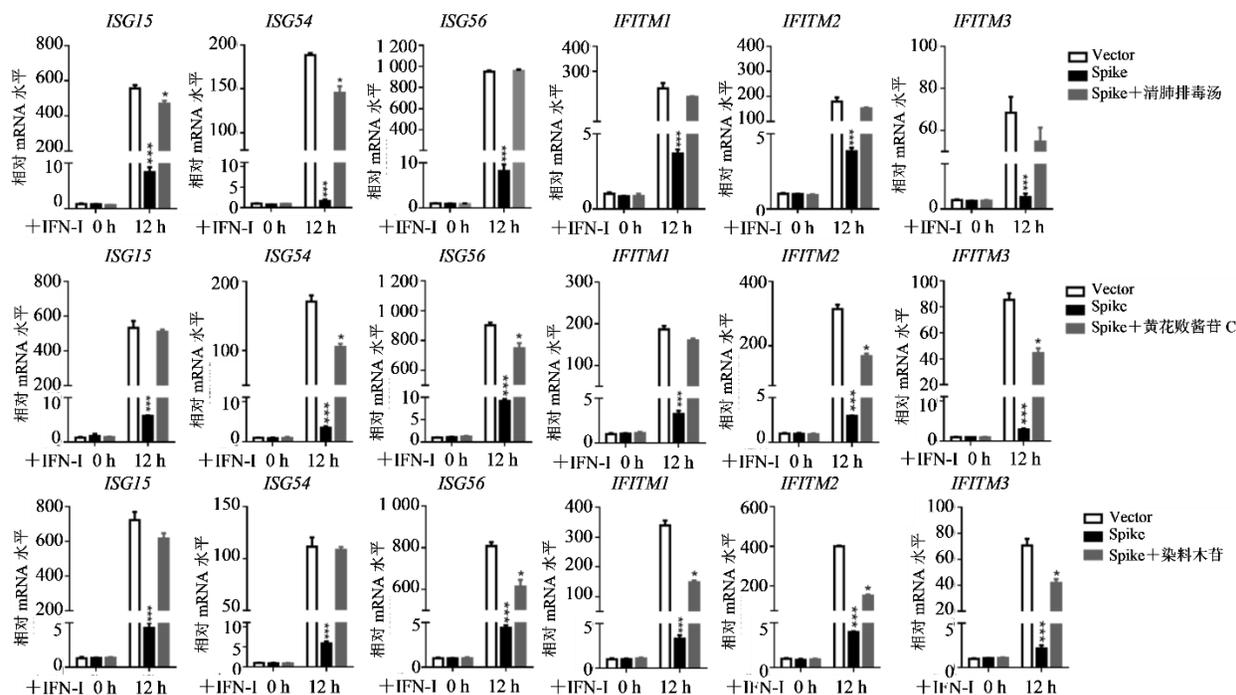


图 6 清肺排毒汤及其成了解除 Spike 蛋白对 STAT1 入核的抑制作用 (×63)

Fig. 6 Inhibitory effect of Spike protein on nuclear entry of STAT1 relieving by Qingfei Paidu Decoction and its components (×63)



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 7 清肺排毒汤及其成了解除 Spike 蛋白对 ISGs 表达的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Inhibitory effect of Spike protein on expression of ISGs relieving by Qingfei Paidu Decoction and its components ($\bar{x} \pm s, n=3$)

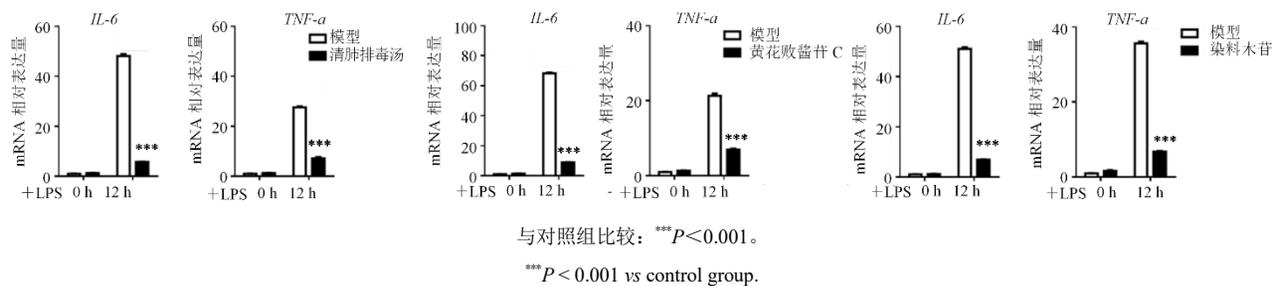


图 8 清肺排毒汤及其成分抑制 IFN 受损的炎症反应 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Inflammatory response impaired by IFN inhibiting by Qingfei Paidu Decoction and its components ($\bar{x} \pm s, n=3$)

激条件下, *IL-6* 和 *TNF- α* 等促炎因子的 mRNA 表达在 IFNAR1 敲除细胞模型中被激活 ($P < 0.001$), 当清肺排毒汤及其成分 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 干预后, *IL-6* 和 *TNF- α* 的转录水平显著下调 ($P < 0.001$), 表明清肺排毒汤及其成分能够抑制 IFN 受损的炎症反应, 具有预防 COVID-19 转重症的潜能。

4 讨论

IFN-I 反应是宿主天然免疫中抵抗病毒感染的重要防线^[21]。SARS-CoV-2 感染宿主细胞时, 宿主表面受体会识别病毒, 由此激活先天免疫反应; 同时, SARS-CoV-2 自身也有多种机制抵抗宿主 IFN 反应, 逃避宿主的先天免疫攻击。大约 80% 的 COVID-19 患者仅表现出较轻的症状, 且他们中的大多数人能够在 SARS-CoV-2 感染时产生 IFN-I 介导的先天免疫应答, 这有助于在疾病早期限制病毒的感染和传播^[22]。但是, 在 SARS-CoV-2 危重症患者中则发现 IFN-I 的分泌低下或诱导被延迟^[3,23], 临床研究已证实, IFN-I 分泌不足导致的 ISG 水平低下是造成 SARS-CoV-2 感染患者向重症转变的原因之一^[17,24-25]。

已有多项研究表明, SARS-CoV-2 能够通过多种途径拮抗宿主 IFN-I 的产生并抑制 IFN-I 下游信号转导, 从而限制了 ISG 的表达, 抵抗宿主天然免疫。但关于 SARS-CoV-2 的免疫逃逸现象不够全面, 仍需要更进一步的研究。在本研究中, 通过筛选 SARS-CoV-2 19 个非结构蛋白和结构蛋白对 IFITM3 启动子的影响, 除已报导的 NSP1、NSP3、NSP13、NSP15、ORF3a、ORF7a、ORF7b、ORF8、N、M 和 S 之外^[16,26-33], 另外还发现 NSP7 和 NSP16 也能显著抑制 IFITM3 启动子的活性, 并进一步通过剂量梯度实验和 qRT-PCR 结果确认 NSP7 和 NSP16 能够显著抑制 IFN-I 效应通路。其中 NSP7 蛋白是病毒复制复合体的关键组成部分, NSP7 与 NSP8 共同构成 RdRp 的稳定支架, 形成复制-转录

复合体, 参与病毒基因组的复制和转录, 因此是当前小分子药物研发的重要靶点^[34]。NSP16 的 2'-O-甲基转移酶活性可以为病毒 RNA 提供 5'帽子结构, 伪装成“宿主 mRNA 样”以逃避宿主 PRR 的识别^[35]。此外, NSP7 和 NSP16 在冠状病毒中是相对保守的, 且不同冠状病毒中 NSP16 的结构域和功能均很相似^[36-37]。而关于 NSP7 和 NSP16 是否能够影响宿主天然免疫效应通路仍未知, 通过对 NSP 功能的研究, 特别是针对 NSP7 和 NSP16 这些重要且保守的功能位点, 将会更深入地了解 SARS-CoV-2 的复制过程和发病机制, 为开发广谱且高效的抗冠状病毒药物供理论依据, 有助于更好地应对未来还可能出现的冠状病毒大流行。

预防 COVID-19 重症转化药物的开发主要有以下 3 种策略。1) 靶向旧药物的筛选, 如研究抗流感病毒特效药 Favipiravir 和 Remdesivir 的抗 SARS-CoV-2 特性, 但研究却表明大多数靶向其他病毒的药物在 COVID-19 临床治疗中效果不佳^[38-39]。2) 开发 SARS-CoV-2 特异性药物, 主要包括核酸类似物, 如 Molnupiravir 和 β -D-N4-hydroxycytidine。然而, 这些药物可能会进一步代谢参与宿主脱氧核苷酸磷酸化并整合到 DNA 中^[40-41]。3) 靶向病毒或宿主关键蛋白 (CLpro、RdRp、ACE2 等) 并从小分子库中筛选具有抗 SARS-CoV-2 潜力的单体药。目前已经有大量的小分子都表现出潜在结合 SARS-CoV-2 入侵关键靶点的作用^[42-43]。但是, 由于病毒快速变异, 多靶点入侵趋势增强, 且 SARS-CoV-2 在临床上也表现出合并感染和长期后遗症的趋势, 仅靶向单一蛋白位点的分子药物效果可能有限。因此, 寻找或研发多靶点、高效且不良反应少的抗病毒药物依然非常迫切。除以上 3 种策略外, 中药复方因其抗病毒作用显著且不良反应少而备受关注。基于历代经典方剂和本草药物, 许多有效的抗病毒中药制

剂被研发并应用于临床^[13]。作为国家抗疫“三药三方”核心方剂，清肺排毒汤临床显示清肺排毒汤有效治疗率达 90%以上^[14]，但清肺排毒汤预防重症的活性成分和作用机制还未见报道。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定到清肺排毒汤有 56 个入血成分，网络药理学分析发现其可靶向 IFN-I 效应通路 JAK-STAT 通路，提示其可能具有预防 COVID-19 转重症潜能。

本研究通过分子对接发现黄花败酱苷 C 和染料木苷 2 个小分子与 STAT1、STAT2 和 IRF9 等多个蛋白靶点均具有潜在结合作用。其中，黄花败酱苷 C 主要存在于黄花败酱的根和根茎中，研究表明，黄花败酱对多种球菌、杆菌以及呼吸道合胞病毒等病原都有不同程度的抑制作用^[44-45]。此外，黄花败酱还具有抗炎作用，其通过抑制炎症因子表达，在呼吸道炎症、急性胰腺炎、结肠炎等炎症模型中疗效显著^[44,46]。染料木苷是大豆异黄酮的有效成分之一，同样被报道具有显著的抗炎功能，在肝损伤模型上能够抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子的表达^[47]。这些研究结果充分体现了黄花败酱苷 C 和染料木苷在抗感染抗炎方面的价值，具有作为抗病毒抗炎药物开发的潜力。

Spike 蛋白是病毒膜蛋白帮助病毒入侵宿主，同时也是冠状病毒疫苗设计的关键靶点，而其对先天免疫的影响却少有报道。在之前的研究中，发现 Spike 蛋白抑制 IFN-I 下游信号通路是冠状病毒的共性策略。Spike 蛋白与 STAT1、STAT2、IRF9 相互作用，将上述蛋白锚定在内质网上，并显著抑制 IFN-B 介导的 STAT1、STAT2 及 IRF9 入核^[16]。本研究体外实验显示，清肺排毒汤及其成分（黄花败酱苷 C 和染料木苷）不仅能解除 Spike 蛋白对 STAT1 入核的抑制作用，进而促进 ISGs 的表达，也能够抑制 IFN 受损的炎症反应，提示清肺排毒汤及其成分可能具有作为研发防控重症的广谱抗冠状病毒治疗药物的潜能，未来会进一步的利用实验来验证黄花败酱苷 C 和染料木苷对 IFN-I 效应通路的调控作用，评估这 2 种成分独立成药的可能性。

近年来我国疫情防控已迈入全新阶段，工作重心从“防止感染”变成了“预防重症”。鉴于清肺排毒汤治疗感染类疾病具有扎实的中医理论基础，且长期临床验证其在 COVID-19 重症转化方面作用显著，解析清肺排毒汤所调控的核心靶点以及挖掘有价值的活性成分具有重要的学术价值和社会价值。

本研究可为今后探究清肺排毒汤治疗病毒感染的的作用机制和拓展多病种的市场潜力提供思路和理论依据，筛选到的活性成分可为预防 COVID-19 转重症提供新的潜在候选药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhou Z, Ren L L, Zhang L, et al. Heightened innate immune responses in the respiratory tract of COVID-19 patients [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(6): 883-890.e2.
- [2] Galani I E, Rovina N, Lampropoulou V, et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 32-40.
- [3] Channappanavar R, Fehr A R, Vijay R, et al. Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(2): 181-193.
- [4] Channappanavar R, Fehr A R, Zheng J, et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3625-3639.
- [5] King C, Sprent J. Dual nature of type I interferons in SARS-CoV-2-induced inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(4): 312-322.
- [6] Lokugamage K G, Hage A, de Vries M, et al. Type I interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV [J]. *J Virol*, 2020, 94(23): e01410-e01420.
- [7] Saleki K, Yaribash S, Banazadeh M, et al. Interferon therapy in patients with SARS, MERS, and COVID-19: A systematic review and Meta-analysis of clinical studies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 906: 174248.
- [8] Rahmani H, Davoudi-Monfared E, Nourian A, et al. Interferon β -1b in treatment of severe COVID-19: A randomized clinical trial [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106903.
- [9] Alavi Darazam I, Shokouhi S, Pourhoseingholi M A, et al. Role of interferon therapy in severe COVID-19: The COVIFERON randomized controlled trial [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 8059.
- [10] 陈冉, 王婷婷, 李开铃, 等. 免疫调节抗病毒中药的特性与应用 [J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1412-1426.
Chen R, Wang T T, Li K L, et al. Characteristics and application of immune-regulating and antiviral Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(6): 1412-1426.
- [11] 全彦妮, 王宜轩, 李艳萍. 人冠状病毒治疗药物研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15(2): 97-108, 143.

- Quan Y N, Wang Y X, Li Y P. Research progress on the development of therapeutic agents against human coronaviruses [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2020, 15(2): 97-108, 143.
- [12] 曹艳梅, 张囡, 史楠楠, 等. 基于古代经方传承的清肺排毒汤组方配伍分析 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(9): 1343-1349.
- Cao Y M, Zhang N, Shi N N, et al. Compatibility of Qingfei Paidu Decoction based on ancient classical prescriptions [J]. *World Chin Med*, 2022, 17(9): 1343-1349.
- [13] 白佳坤, 马晓阳, 李霄鹤, 等. 新型冠状病毒治疗靶点及药物研究进展 [J]. *今日药学*, 2021, 31(1): 69-72.
- Bai J K, Ma X Y, Li X H, et al. Research progress of therapeutic targets and drugs of SARS-CoV-2 [J]. *Pharm Today*, 2021, 31(1): 69-72.
- [14] 吴昊, 王佳琪, 杨雨薇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制 [J]. *药学报*, 2020, 55(3): 374-383.
- Wu H, Wang J Q, Yang Y W, et al. Preliminary exploration of the mechanism of Qingfei Paidu Decoction against novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Acta Pharm Sin*, 2020, 55(3): 374-383.
- [15] 薛伯寿, 姚魁武, 薛燕星. “清肺排毒汤”快速有效治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(6): 461-462.
- Xue B S, Yao K W, Xue Y X. Analysis on traditional Chinese medicine theory of Qingfei Paidu Decoction (清肺排毒汤) in fast and effective treatment of coronavirus disease 2019(COVID-19) [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 61(6): 461-462.
- [16] Cai Z, Ni W J, Li W K, et al. SARS-CoV-2 S protein disrupts the formation of ISGF3 complex through conserved S2 subunit to antagonize type I interferon response [J]. *J Virol*, 2025, 99(1): e01516-e01524.
- [17] Zhang Q, Bastard P, Liu Z Y, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19 [J]. *Science*, 2020, 370(6515): eabd4570.
- [18] Ran W, Yang J H, Yu S, et al. Interferon-stimulated gene GALNT2 restricts respiratory virus infections [J]. *Nat Microbiol*, 2026, 11(1): 256-270.
- [19] Gubernatorova E O, Gorshkova E A, Polinova A I, et al. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2 [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2020, 53: 13-24.
- [20] Liu F, Li L, Xu M D, et al. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19 [J]. *J Clin Virol*, 2020, 127: 104370.
- [21] 罗政, 李俊良, 王姝懿, 等. 基于免疫激活的鱼腥草抗病毒机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(9): 3140-3151.
- Luo Z, Li J L, Wang S Y, et al. Antiviral mechanism of *Houttuynia Herba* based on immune activation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(9): 3140-3151.
- [22] Wu Z Y, McGoogan J M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention [J]. *JAMA*, 2020, 323(13): 1239-1242.
- [23] Jamilloux Y, Henry T, Belot A, et al. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19 Cytokine and anti-cytokine interventions [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(7): 102567.
- [24] Blanco-Melo D, Nilsson-Payant B E, Liu W C, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19 [J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1036-1045.
- [25] Chu H, Chan J F, Wang Y X, et al. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: An *ex vivo* study with implications for the pathogenesis of COVID-19 [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(6): eiaa410.
- [26] Schubert K, Karousis E D, Jomaa A, et al. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(10): 959-966.
- [27] Lowery S A, Sariol A, Perlman S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19 [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(7): 1052-1062.
- [28] Lei X B, Dong X J, Ma R Y, et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3810.
- [29] Xia H J, Cao Z G, Xie X P, et al. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2 [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(1): 108234.
- [30] Mu J F, Fang Y H, Yang Q, et al. SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2 [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 65.
- [31] Wu Y X, Ma L, Zhuang Z, et al. Main protease of SARS-CoV-2 serves as a bifunctional molecule in restricting type I interferon antiviral signaling [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 221.
- [32] Konno Y, Kimura I, Uriu K, et al. SARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is increased by a naturally occurring elongation variant [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(12): 108185.

- [33] Rashid F, Dzakah E E, Wang H Y, et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 induced endoplasmic reticulum stress and mediated immune evasion by antagonizing production of interferon beta [J]. *Virus Res*, 2021, 296: 198350.
- [34] Zhang C H, Li L, He J, et al. Nonstructural protein 7 and 8 complexes of SARS-CoV-2 [J]. *Protein Sci*, 2021, 30(4): 873-881.
- [35] Vithani N, Ward M D, Zimmerman M I, et al. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential [J]. *Biophys J*, 2021, 120(14): 2880-2889.
- [36] Menachery V D, Eisfeld A J, Schäfer A, et al. Pathogenic influenza viruses and coronaviruses utilize similar and contrasting approaches to control interferon-stimulated gene responses [J]. *mBio*, 2014, 5(3): e01174-e01114.
- [37] Menachery V D, Yount B L Jr, Josset L, et al. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-methyltransferase activity [J]. *J Virol*, 2014, 88(8): 4251-4264.
- [38] Grundeis F, Ansems K, Dahms K, et al. Remdesivir for the treatment of COVID-19 [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023, 1(1): CD014962.
- [39] Korula P, Alexander H, John J S, et al. Favipiravir for treating COVID-19 [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2024, 2(2): CD015219.
- [40] Jayk Bernal A, Gomes da Silva M M, Musungaie D B, et al. Molnupiravir for oral treatment of COVID-19 in nonhospitalized patients [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(6): NEJMoa2116044.
- [41] Zhou S T, Hill C S, Sarkar S, et al. β -D-N4-hydroxycytidine inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224(3): 415-419.
- [42] Gao B Y, Zhu H S, Liu Z H, et al. Chemical compositions of *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Huangqin) extracts and their effects on ACE2 binding of SARS-CoV-2 spike protein, ACE2 activity, and free radicals [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(4): 2045.
- [43] Liu H B, Ye F, Sun Q, et al. *Scutellaria baicalensis* extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro* [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, 36(1): 497-503.
- [44] 万新, 石晋丽, 刘勇, 等. 败酱属植物化学成分与药理作用 [J]. *国外医药(植物药分册)*, 2006, 21(2): 53-59.
Wan X, Shi J L, Liu Y, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of *Patrinia* plants [J]. *World Phytomed*, 2006, 21(2): 53-59.
- [45] Fu B, Wu Q L, Dang M Y, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by traditional Chinese medicinal herb *Herba Patriniae* [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 9584703.
- [46] Seo S W, Park C S, Hong S H, et al. Inhibitory effect of *Patrinia scabiosaefolia* on acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(7): 1110-1114.
- [47] Zhao J H, Arao Y, Sun S J, et al. Oral administration of soy-derived genistin suppresses lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation but does not induce thymic atrophy in the rat [J]. *Life Sci*, 2006, 78(8): 812-819.

[责任编辑 齐静雯]