

## 银花青蒿栀子方灌肠剂体内抗 A6 型柯萨奇病毒的作用及机制研究

李菲<sup>1</sup>, 李娟<sup>1</sup>, 张振杰<sup>1</sup>, 侯林<sup>2</sup>, 崔清华<sup>2</sup>, 田景振<sup>2\*</sup>

1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学院, 新发传染病病因流行病学重点实验室, 山东 泰安 271016

2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

**摘要:** 目的 研究银花青蒿栀子方灌肠剂体内抗 A6 型柯萨奇病毒 (coxsavirus A6, CV-A6) 的作用及机制。方法 10 d 龄 ICR 乳鼠随机分为对照组、模型组、银花青蒿栀子方灌肠剂 (2.6 g/kg) 组和利巴韦林 (10 mg/kg) 组, 除对照组外, 其余各组 ip 滴度为  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/mL 的 CV-A6 感染; 给予药物进行干预, 考察银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的乳鼠血清中细胞因子水平、组织病毒载量、生存率、临床评分、组织病理变化、脊髓颈膨大段超微结构和骨骼肌细胞凋亡的影响。结果 与模型组比较, 银花青蒿栀子方灌肠剂组乳鼠血清中白细胞介素-5 (interleukin 5, IL-5)、IL-6、IL-12 p70、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 水平均显著降低 ( $P < 0.01, 0.001$ ), 心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒载量均显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 乳鼠生存率提高, 急性弛缓性麻痹等症明显缓解, 骨骼肌、心脏、肺脏等组织的病理损伤和脊髓前角神经元损伤减轻, 骨骼肌细胞凋亡减少。结论 银花青蒿栀子方灌肠剂在 ICR 乳鼠体内具有良好的抗 CV-A6 作用, 可能与保护脊髓前角神经元、抑制细胞凋亡、减轻细胞因子风暴等有关。

**关键词:** 银花青蒿栀子方灌肠剂; A6 型柯萨奇病毒; 抗病毒; 神经元; 凋亡; 细胞因子风暴

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3576-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.014

## Antiviral effect and mechanisms of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema against Coxsackievirus A6 *in vivo*

LI Fei<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-jie<sup>1</sup>, HOU Lin<sup>2</sup>, CUI Qing-hua<sup>2</sup>, TIAN Jing-zhen<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Etiology and Epidemiology of Emerging Infectious Diseases, Department of Pharmacy, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Taian 271016, China

2. Department of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

**Abstract: Objective** To explore the effect and mechanisms action of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema (银花青蒿栀子方灌肠剂, YQZE) against coxsackievirus A6 (CV-A6) *in vivo*. **Methods** Ten-day-old ICR mice were divided into control group, model group, YQZE (2.6 g/kg) group and ribavirin (10 mg/kg) group. Except control group, others were ip  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/mL CV-A6. Drugs were given to intervene to investigate the effect of YQZE on levels of cytokine concentration in serum, virus load in tissues, survival rate, clinical score, pathological changes, ultrastructure of cervical myelopathy, and cell apoptosis of skeletal muscle in mice. **Results** Compared with model group, levels of interleukin 5 (IL-5), IL-6, IL-12 p70, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in serum of YQZE group were significantly reduced ( $P < 0.01, 0.001$ ); Virus load in heart, lungs, spinal cord, medulla oblongata and hind limb skeletal muscle tissues were significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01$ ); Survival rate was improved and symptoms such as acute flaccid paralysis were relieved; Pathological injuries of tissues and damage of neurons in anterior horn were relieved; Skeletal muscle cell apoptosis rate was decreased. **Conclusion** YQZE has significant anti-CV-A6 effect in ICR mice, which may be related with protection of neurons in anterior horn, inhibition of cell apoptosis and cytokine storm.

**Key words:** Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema; coxsackievirus A6; antiviral; neuron; apoptosis; cytokine storm

收稿日期: 2020-12-07

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2017GSF19106); 山东省中医药科技发展计划项目 (2017-248); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2018PH034); 山东第一医科大学学术提升计划项目 (2019LJ003)

作者简介: 李菲 (1980—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中药抗病毒。

\*通信作者: 田景振, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药抗病毒。E-mail: tianjingzhen@163.com

A6型柯萨奇病毒(coxsackievirus A6, CV-A6)属于小核糖核酸病毒科的肠道病毒A组,自2013年逐渐成为手足口病暴发流行的主要病原体之一<sup>[1-3]</sup>。CV-A6不同于CV-A16和71型肠道病毒(enterovirus 71, EV71),后两者P1区序列相似度极高,靶受体、致病机制和抗病毒药物等方面存在相同或相似之处<sup>[4]</sup>,EV-71的相关研究为CV-A16的研究和应对奠定了良好基础,目前CV-A6的相关研究较少<sup>[5]</sup>。

清热解毒类中药不仅能够抗病毒、消炎、退热,还能提高人体免疫力,治疗病毒性感染疾病具有多靶点、整体调节的特点<sup>[6-7]</sup>。灌肠给药具有良好的安全性和顺应性,适合中药发挥复方优势<sup>[8]</sup>。银花青蒿栀子方源于名老中医经验方,组方为金银花3~15g、青蒿6~25g和栀子3~12g,具有清热解毒、疏风解表的功效<sup>[9]</sup>。近年来,研究发现该方开发的中药制剂对甲型H1N1流感病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒及肠道病毒EV71和CV-A16等均有抑制作用<sup>[10-11]</sup>。基于课题组前期研究发现银花青蒿栀子方具有抗CV-A6作用,制备了银花青蒿栀子方灌肠剂,本研究考察银花青蒿栀子方灌肠剂体内抗CV-A6的作用,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

ICR孕鼠16只,8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2012-0001。动物饲养于温度(22±1)℃、湿度(55±5)%的环境中,自由进食饮水。动物实验符合山东第一医科大学动物实验伦理学规定(批准号2018049)。

### 1.2 病毒和细胞

CV-A6引自中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所毒种室;人横纹肌瘤细胞RD引自中国预防医学研究所病毒研究室。

### 1.3 药材

金银花(批号20170306)、青蒿(批号20170306)、栀子(批号20170306)均购自泰安市金泰联药店,经山东第一医科大学高洪莉教授鉴定分别为忍冬科忍冬属植物忍冬*Lonicera japonica* Thunb.的干燥花蕾、菊科蒿属植物黄花蒿*Artemisia annua* L.的干燥地上部分、茜草科栀子属植物栀子*Gardenia jasminoides* Ellis的干燥果实。

### 1.4 药品与试剂

银花青蒿栀子方灌肠剂(批号20170923)、多

克隆抗体为本实验室自制;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;qPCR试剂盒(批号03907)购自天根生化科技有限公司;Trizol(批号1705263)购自美国Invitrogen公司;转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)ELISA试剂盒(批号128170744)购自联科生物;Procarta Plex多因子检测试剂盒(批号148087012)购自美国eBioscience公司;HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(批号G1211)购自Servicebio公司;Tunnel试剂盒(批号11684817910)、DAPI(批号216276)购自瑞士Roche公司;山羊血清(批号AR1009)购自博士德生物工程有限公司。

## 1.5 仪器

1300A2生物安全柜、371型CO<sub>2</sub>恒温培养箱、7500 Fast荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);倒置显微镜(日本尼康株式会社);Infinite M 200 Pro酶标仪(瑞士Tecan公司);MAGPIX液相芯片分析系统(美国Luminex公司);石蜡切片机、EMUC7型超薄切片机(德国Leica公司);JEM-1200EX II型透射电子显微镜(TEM, 日本电子株式会社)。

## 2 方法

### 2.1 银花青蒿栀子方灌肠剂的制备

将金银花、青蒿、栀子粉碎为粗粉,分别称取上述药材粗粉120、600、80g,加入8倍量55%乙醇浸泡2h,超声提取30min,提取2次,抽滤,合并滤液,40℃减压回收乙醇并浓缩至相对密度为1.10;加入3%聚山梨酯-80超声分散均匀,加入3%水溶性氮酮和0.2%山梨酸钾,以氢氧化钠溶液调节pH值至6.8,加入纯化水至1L,得到0.8g/mL(以生药量计)的褐色澄清灌肠剂。

### 2.2 造模、分组与给药

10日龄ICR乳鼠随机分为对照组、模型组、银花青蒿栀子方灌肠剂(2.6g/kg)<sup>[11]</sup>组和利巴韦林(10mg/kg)组,每组14只。除对照组外,其余各组ip 0.1mL CV-A6(滴度为10<sup>7.4</sup> TCID<sub>50</sub>/mL)。银花青蒿栀子方灌肠剂组感染后1h内灌肠25μL药物,利巴韦林组im药物,模型组和对照组灌肠等体积纯化水,2次/d,连续14d。第4天各组随机取4只乳鼠,乙醚吸入麻醉后内眦取血,分离血清,-80℃保存,用于细胞因子测定;取心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织,-80℃保存,用于病毒载量测定。

### 2.3 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠血清中细胞因子水平的影响

按 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 TGF- $\beta$  水平; 按 Procarta Plex 多因子检测试剂盒说明书测定血清中白细胞介素-4 (interleukin 4, IL-4)、IL-5、IL-6、IL-12 p70、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 水平。

### 2.4 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒载量的影响

取冻存的心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织, 加入液氮研磨, 按照试剂盒说明书提取各组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物及探针序列: 上游引物 5'-CCTGAATGCGGCTAATCC-3', 下游引物 5'-TTGTCACCATWAGCAGYCA-3', 探针 5'-FAM-CCGACTACTTTGGGWG-TCCGTGT-BHQ1-3'。

### 2.5 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠生存率和临床评分的影响

每天观察、记录乳鼠的症状变化, 统计生存率, 按照文献方法<sup>[12]</sup>对临床症状进行评分。

### 2.6 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病理变化的影响

末次给药 3 h 后, 各组其余动物脱颈椎处死, 取心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织, 于 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 制备厚度为 5  $\mu$ m 的切片, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察。

### 2.7 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠脊髓颈膨大段超微结构的影响

取脊髓颈膨大段, 于 2.5% 戊二醛、1% 四氧化钨中固定, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 制备厚度为 50~60 nm 超薄切片, 进行醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 于 TEM 下观察。

### 2.8 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒抗原表达的影响

取心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织, 以自制多克隆抗体<sup>[13]</sup>为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗, 进行免疫组织化学染色, 于显微镜下观察, 采用 Image J 软件分析阳性区域的吸光度 (A) 值。

### 2.9 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠骨骼肌组织细胞凋亡的影响

取“2.6”项下骨骼肌石蜡切片, 脱水后用组化笔画圈, 加入 10% 山羊血清, 室温封闭 30 min; 吸除血清, 加入 Tunnel 反应混合液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h; TBS 洗涤 3 次, 5 min/次; 滴加 DAPI 染色, 避光室温孵育 10 min; TBS 洗涤, 以抗荧光衰减封片剂封片, 于荧光显微镜下观察。

### 2.10 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析, 组间数据进行单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠血清中细胞因子水平的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组乳鼠血清中 IL-5、IL-6、IL-12 p70、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 TGF- $\beta$  均显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 银花青蒿栀子方灌肠剂组乳鼠血清中 IL-5、IL-6、IL-12 p70、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 TGF- $\beta$  水平均显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001)。

### 3.2 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒载量的影响

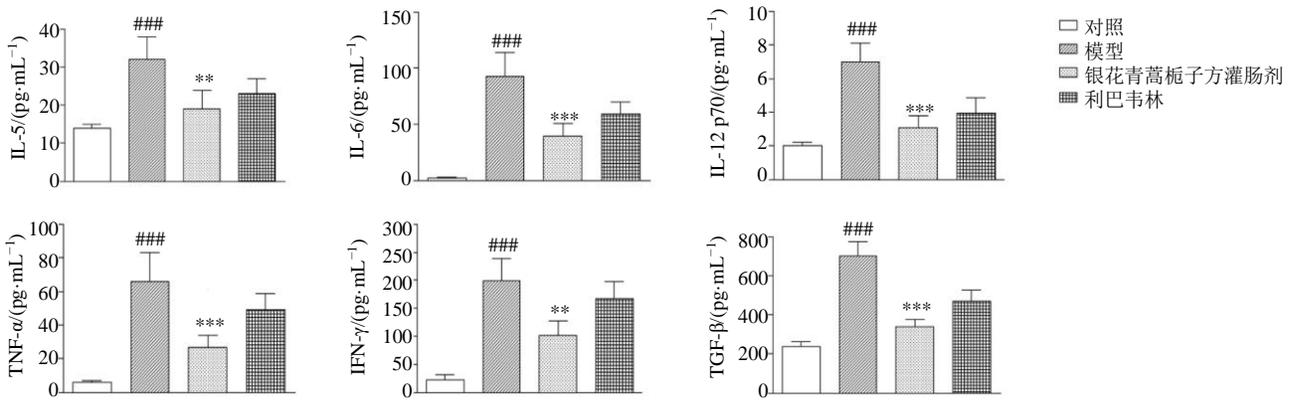
如图 2 所示, 模型组乳鼠骨骼肌、延髓、脊髓、心脏和肺组织中的病毒载量均较高, 其中骨骼肌组织的病毒载量最高; 与模型组比较, 银花青蒿栀子方灌肠剂显著降低了后肢肌、脊髓、延髓、心脏和肺组织的病毒载量 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

### 3.3 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠生存率和临床评分的影响

如图 3 所示, 10 日龄 ICR 乳鼠 ip 感染 CV-A6, 5 d 后开始出现急性弛缓性麻痹 (acute flaccid paralysis, AFP) 的典型症状, 14 d 后生存率为 10%。银花青蒿栀子方灌肠剂组较少出现 AFP 症状, 运动能力较正常, 临床评分低, 给药 14 d 后生存率为 70%, 药效优于利巴韦林。

### 3.4 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病理变化的影响

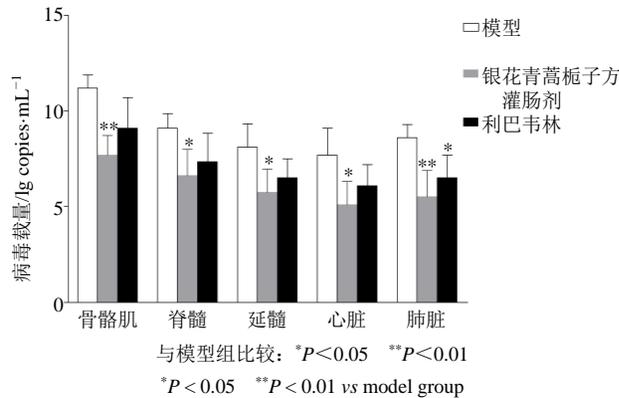
如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组乳鼠骨骼肌出现严重的肌纤维溶解、断裂, 肌束稀疏; 脊髓前角和延髓中的神经元出现变性、坏死; 心肌泡沫化, 心肌纤维有轻度的溶解、断裂; 肺组织出现严



与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$   
### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

图1 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠血清中 IL-5、IL-6、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ 和 TGF-β 水平的影 响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 1 Effect of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema on levels of IL-5, IL-6, IL-12 p70, TNF-α, IFN-γ and TGF-β in serum of CV-A6 infected ICR mice ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )



与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group

图2 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心 脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒载量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 2 Effect of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema on viral load in heart, lungs, spinal cord, medulla oblongata and hind limbs skeletal muscle tissue of CV-A6 infected ICR mice ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

重的纤维化。银花青蒿栀子方灌肠剂组骨骼肌基本无肌束断裂，肌纤维排列较为整齐；脊髓前角和延髓中的神经元坏死程度有一定改善；心肌无出血现象，心肌纤维排列较为整齐；肺纤维化程度明显减轻，肺泡形态接近正常。

### 3.5 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠脊髓颈膨大段超微结构的影响

如图 5 所示，对照组脊髓前角神经元细胞器丰富，在核周分布均匀，有丰富的粗面内质网平行排列，核糖体颗粒丰富，形成发育良好的尼氏体区域（图 5-A），髓鞘板层结构排列整齐（图 5-B），核内染色质均匀，核仁大而圆，线粒体呈椭圆形，嵴清晰（图 5-C）。模型组脊髓前角神经元细胞器数量明显减少，粗面内质网扩张并有脱颗粒，核糖体颗粒分散，未形成尼氏体；核膜凹凸不平，核仁变小，异染色质在核边缘聚集；胞质广泛水肿，线粒体肿

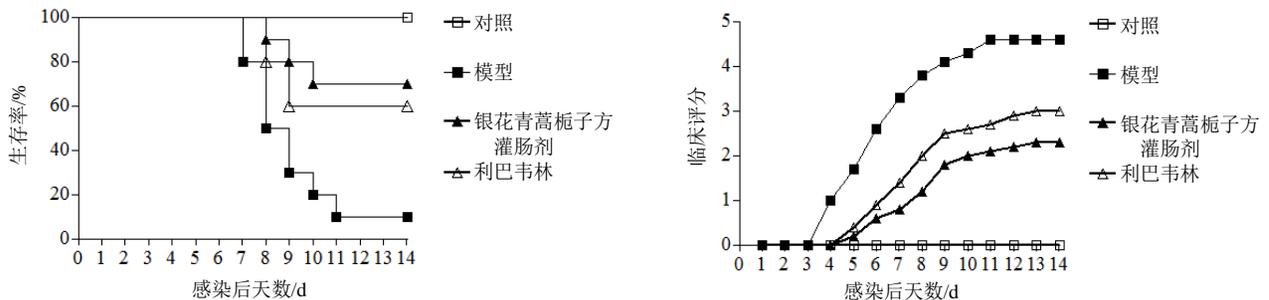


图3 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠生存率和临床评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Effect of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema on survival rate and clinical score of CV-A6 infected ICR mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

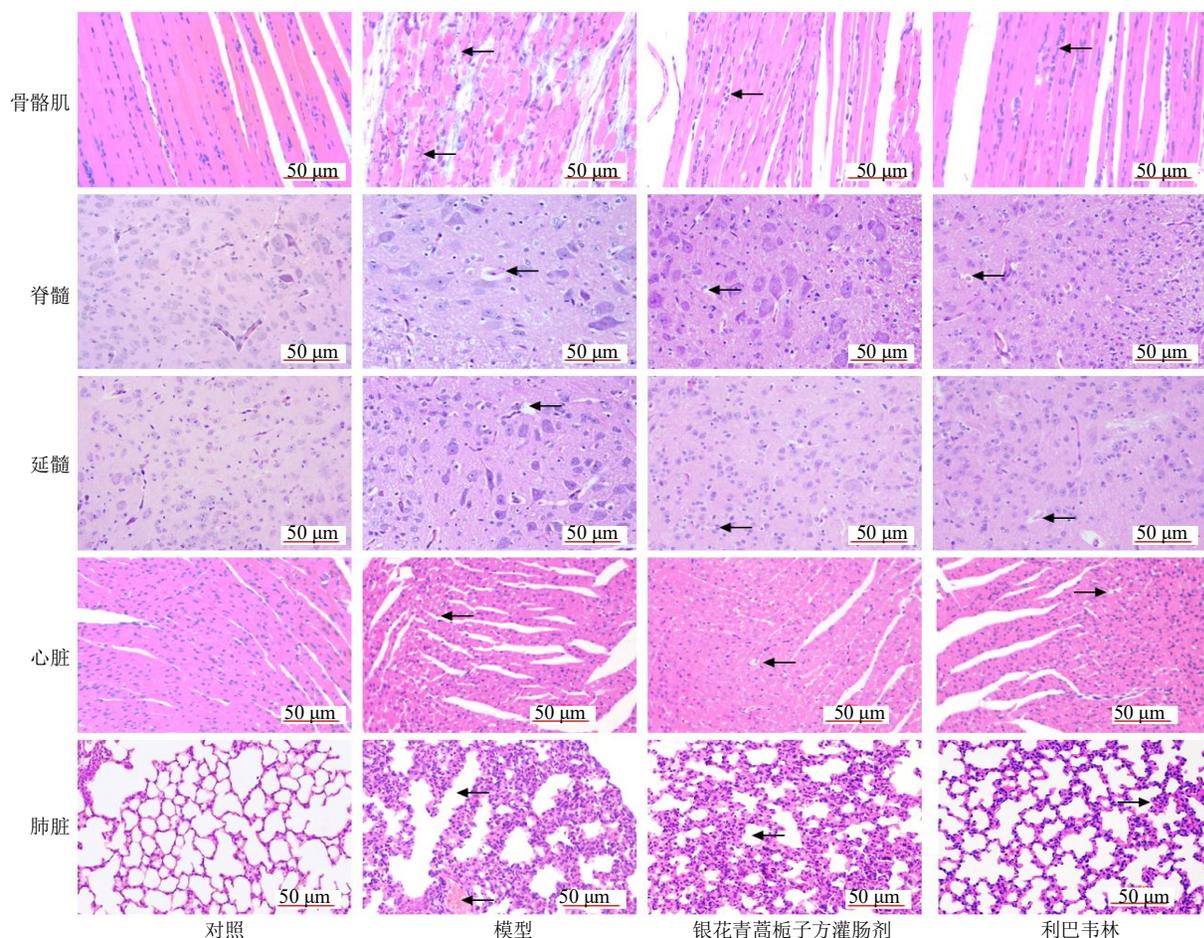


图4 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病理变化的影响 (HE, ×200)  
 Fig. 4 Effect of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema on pathological changes in heart, lungs, spinal cord, medulla oblongata and hind limbs skeletal muscle tissue of CV-A6 infected ICR mice (HE, × 200)

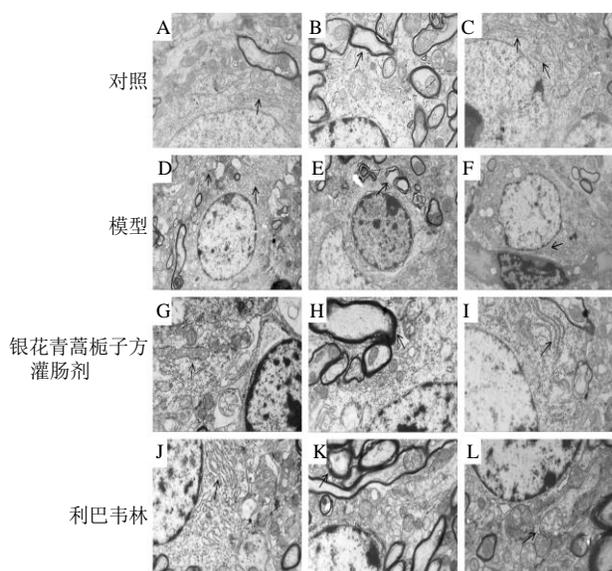


图5 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠脊髓颈膨大段超微结构的影响 (×10 000)  
 Fig. 5 Effect of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema on ultrastructure of spinal cord slices in CV-A6 infected ICR mice (× 10 000)

胀变形, 基质稀疏, 大部分峭膜不清甚至消失, 外膜膨胀隆起, 形成空泡 (图 5-D); 髓鞘板层结构紊乱, 出现囊性间隙, 中间有纤维填充 (图 5-E); 呈现嗜神经现象 (图 5-F)。银花青蒿栀子方灌肠剂组脊髓前角神经元细胞接近正常, 粗面内质网基本为平行状排列, 水肿减轻, 游离核糖体减少, 表明细胞合成功能旺盛, 有利于神经轴突的修复 (图 5-I); 线粒体形态较改善, 数量增加 (图 5-G); 髓鞘板层结构散乱和分离程度减轻 (图 5-H)。利巴韦林组脊髓前角神经元细胞器粗面内质网逐渐恢复正常的平行状排列, 游离核糖体减少 (图 5-J), 线粒体形态较改善, 异染色质在核边缘聚集 (图 5-L); 髓鞘板层结构散乱, 中间有纤维填充 (图 5-K)。

### 3.6 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒抗原表达的影响

如图 6 所示, 病毒抗原在模型组乳鼠后肢骨骼肌中病毒表达最为严重, 脊髓和延髓的神经元和胶

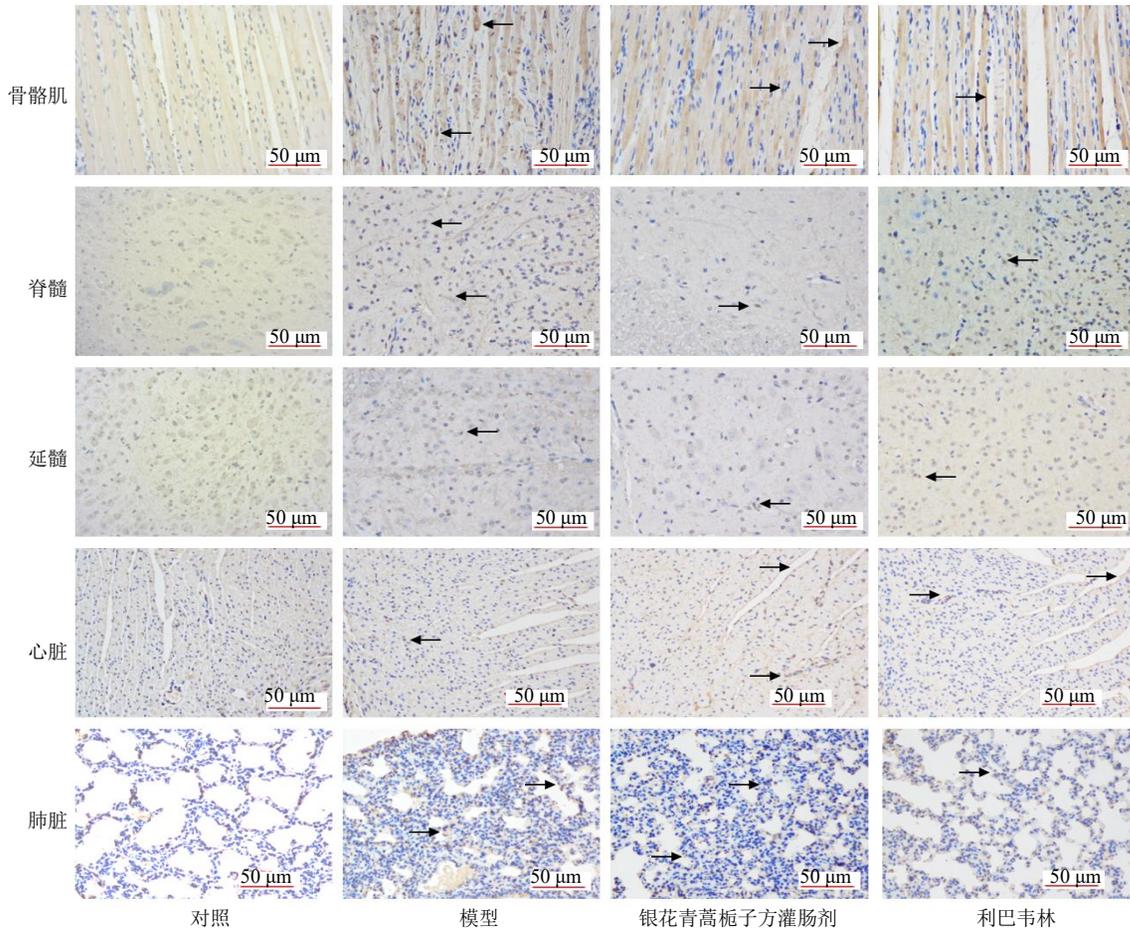


图 6 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒抗原表达的影响 (×200)

Fig. 6 Effect of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema on viral antigen expression in heart, lungs, spinal cord, medulla oblongata and hind limbs skeletal muscle tissue of CV-A6 infected ICR mice (× 200)

质细胞有病毒抗原分布，病毒抗原在心脏中的分布相对较少，在肺组织中分布广泛。与模型组相比，银花青蒿栀子方灌肠剂组后肢骨骼肌、脊髓、延髓、心脏和肺组织的阳性表达均减少。如表 1 所示，银花青蒿栀子方灌肠剂组骨骼肌和肺组织病毒抗原表达明显减少 ( $P < 0.05$ )。

### 3.7 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠骨骼肌组织细胞凋亡的影响

如图 7 所示，与对照组相比，模型组乳鼠骨骼肌凋亡细胞增多；与模型组相比，各给药组乳鼠骨骼肌凋亡细胞减少，表明银花青蒿栀子方灌肠剂对病毒导致的肌细胞凋亡具有抑制作用。

表 1 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠心脏、肺脏、脊髓、延髓和后肢骨骼肌组织病毒抗原表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 1 Effect of Yinhua-Qinghao-Zhizi Enema on viral antigen expression in heart, lungs, spinal cord, medulla oblongata, and hind limbs skeletal muscle tissue of CV-A6 infected ICR mice ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	A 值				
		骨骼肌	脊髓	延髓	心脏	肺
对照	—	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
模型	—	0.21 ± 0.04 <sup>###</sup>	0.18 ± 0.03 <sup>###</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>#</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>#</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>###</sup>
利巴韦林	0.01	0.16 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02
银花青蒿栀子方灌肠剂	2.60	0.15 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.02 <sup>*</sup>

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

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

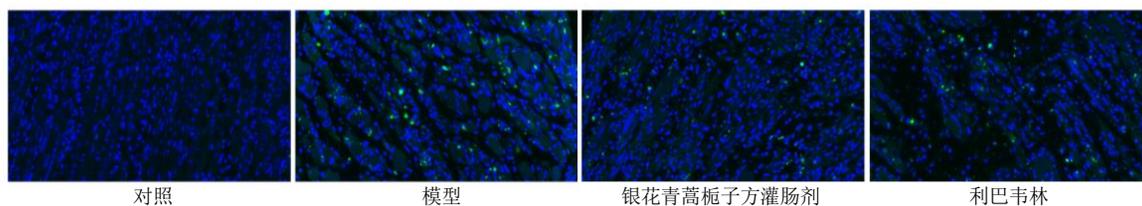


图7 银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠骨骼肌组织细胞凋亡的影响 (×200)

Fig. 7 Effect of Yinhuo-Qinghao-Zhizi Enema on muscle cell apoptosis of CV-A6 infected ICR mice (× 200)

#### 4 讨论

手足口病典型临床症状为发热,手、口、足、臀等部位出疹,部分患儿出现无菌性脑膜炎、脑炎、AFP 等重症表现<sup>[14]</sup>。ICR 乳鼠感染 CV-A6 后出现的主要症状为 AFP,银花青蒿栀子方灌肠剂能够提高病毒感染得乳鼠生存率,改善其临床症状。ICR 乳鼠感染 CV-A6 后多个组织脏器发生病理损伤,其中骨骼肌病理严重损伤、脊髓前角神经元坏死、延髓的锥体束受损与其症状表现主要为 AFP 有一定的关联性。银花青蒿栀子方灌肠剂能够减轻骨骼肌、脊髓、肺脏等组织的病理损伤,降低病毒抗原表达。ICR 乳鼠感染 CV-A6 后骨骼肌、脊髓、延髓和肺组织中病毒载量高,与骨骼肌和脊髓是 EV71 复制并传播到脑组织的重要部位相似<sup>[15]</sup>;银花青蒿栀子方灌肠剂显著降低上述组织中的病毒载量,体现出良好的抗 CV-A6 活性。

病毒侵犯脊髓前角灰白质区运动神经元,导致肌肉特别是肢体肌肉发生不对称弛缓性麻痹。EV71 感染的乳鼠骨骼肌细胞和 Vero 细胞中线粒体空泡化,表明线粒体可能是其直接损伤靶点<sup>[16]</sup>。本研究发现 CV-A6 感染导致脊髓组织的超微结构发生明显改变,如前角神经线粒体发生肿胀变形、形成空泡等;银花青蒿栀子方灌肠剂组脊髓组织神经元的形态结构趋于正常,表明银花青蒿栀子方灌肠剂对 CV-A6 致神经元细胞结构损伤有改善作用。

病毒感染可以通过多个信号通路触发宿主细胞凋亡,凋亡的发生可以促进病毒和炎性细胞因子的释放,是病毒感染导致临床病症和病理改变的原因之一<sup>[4,17]</sup>。EV71 和 CV-A16 均通过半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 途径诱导宿主细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,银花青蒿栀子方灌肠剂能够抑制 CV-A6 致骨骼肌细胞凋亡,从而抑制病毒和炎性细胞因子的释放,减轻病毒感染导致的症状和病理损伤,发挥抗病毒作用。

病毒感染可以过度激活机体免疫系统,引发机

体产生细胞因子风暴<sup>[20-21]</sup>,细胞因子风暴导致局部与全身的炎性反应,造成组织损伤、器官功能的丧失甚至死亡<sup>[22]</sup>。人感染登革病毒后,血清中 IL-8、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  和 IL-10 水平升高<sup>[23]</sup>; Balb/c 小鼠感染 CV-B3 后,血清中 IL-6、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-17 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  水平均显著升高<sup>[24]</sup>。本研究结果显示, CV-A6 感染导致 ICR 乳鼠血清中多种细胞因子水平显著升高,与文献结果一致<sup>[25]</sup>;与模型组比较,银花青蒿栀子方灌肠剂显著降低血清中 TGF- $\beta$ 、IL-5、IL-6、IL-12 p70、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平,从而减轻细胞因子风暴导致的炎性损伤,发挥抗病毒作用。

综上,本研究发现银花青蒿栀子方灌肠剂具有良好的抗 CV-A6 作用,能够提高 CV-A6 感染的 ICR 乳鼠生存率并改善临床症状,可能与其减少脊髓前角神经元细胞结构损伤、抑制骨骼肌细胞凋亡、干预细胞因子风暴、保护脏器功能等有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 樊晔,田新贵,张日新.我国手足口病分子流行病学及防控管理措施探讨 [J].中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(2):139-148.
- [2] 李方,许红梅.手足口病柯萨奇病毒 A6 和 A10 流行病学特点 [J].儿科药理学杂志,2017,23(7):60-63.
- [3] 金美彤.浙江省手足口病流行病学和病原学特征分析 [D].杭州:浙江大学,2015.
- [4] 张哲.抗 EV71 病毒 MAPK 信号通路抑制剂的筛选及抗病毒作用的研究 [D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2017.
- [5] 申天甜,徐晨,高向东.柯萨奇 A 组病毒及其治疗药物的研究进展 [J].国际药理学研究杂志,2017,44(6):480-486.
- [6] 刘旭.清热解毒中药的抗病毒作用刍议 [J].国医论坛,2012,27(4):39.
- [7] 邢世华,李晓波.清热解毒类中药抗病毒活性及作用机制研究进展 [J].中国药理学通报,2014,30(4):

- 464-468.
- [8] 程运扬. 直肠给药制剂的应用进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(23): 1969-1971.
- [9] 张平. 一种用于清热解毒的药物及其制备方法: 中国, CN1129450C [P]. 2002-10-16.
- [10] 王振中, 鲍琳琳, 孙兰, 等. 热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒作用机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 90-93.
- [11] 常秀娟, 孙晓萍, 胡晗绯, 等. 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞和乳鼠的作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2097-2102.
- [12] Liu Q W, Shi J P, Huang X L, *et al.* A murine model of coxsackievirus A16 infection for anti-viral evaluation [J]. *Antiviral Res*, 2014, 105: 26-31.
- [13] 董兆鹏. 应用于抗病毒药物筛选和疫苗评价的柯萨奇病毒 CV-A6 新生乳鼠模型的建立 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2017.
- [14] 于方圆, 朱汝南, 钱渊. 手足口病相关病原体柯萨奇病毒 A6 的研究进展 [J]. 中国病毒病杂志, 2017, 7(6): 472-477.
- [15] Yang L S, Mao Q Y, Li S X, *et al.* A neonatal mouse model for the evaluation of antibodies and vaccines against coxsackievirus A6 [J]. *Antiviral Res*, 2016, 134: 50-57.
- [16] 林佩欣. 肠道病毒 71 型致病机理初步研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [17] 李新. 甲型流感病毒 H1N1 联合牙龈卟啉单胞菌感染肺上皮细胞凋亡与自噬的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [18] 李兆龙. 柯萨奇病毒 A16 引起宿主细胞凋亡的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [19] 周彬, 孙一晟, 姚莘莘, 等. 肠道病毒 71 型诱导沙鼠肌肉细胞凋亡及其机理研究 [J]. 预防医学, 2017, 29(2): 109-112.
- [20] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, *et al.* Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of *Enterovirus 71* [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778-790.
- [21] 柳楠. 肠道病毒分子流行病学及肠道病毒 71 型感染致炎症反应机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- [22] Sun Y L, Jin C, Zhan F X, *et al.* Host cytokine storm is associated with disease severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(7): 1085-1094.
- [23] Pandey N, Jain A, Garg R K, *et al.* Serum levels of IL-8, IFN $\gamma$ , IL-10, and TGF  $\beta$  and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(6): 1463-1475.
- [24] Lundgren M, Darnerud P O, Blomberg J, *et al.* Sequential changes in serum cytokines reflect viral RNA kinetics in target organs of a coxsackievirus B infection in mice [J]. *J Clin Immunol*, 2009, 29(5): 611-619.
- [25] Zhang Z J, Dong Z P, Wei Q J, *et al.* A neonatal murine model of coxsackievirus A6 infection for evaluation of antiviral and vaccine efficacy [J]. *J Virol*, 2017, 91(9): e02450-e02416.

[责任编辑 李亚楠]