

清热消炎宁片治疗冠状病毒感染的作用及机制研究

赵莉¹, 唐昭春¹, 郑东升², 刘学武^{3,4}, 彭冬冬^{3,4}, 姜德建^{3,4*}

1. 天地恒一制药股份有限公司, 湖南 长沙 410331
2. 湖南天地恒一现代中药产业有限公司, 湖南 衡阳 421256
3. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410331
4. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司, 湖南 长沙 410331

摘要: **目的** 研究清热消炎宁抗冠状病毒的作用, 为评价其防治冠状病毒感染提供实验依据。**方法** 雌雄各半的 96 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、连花清瘟胶囊 (0.546 g/kg) 组和清热消炎宁片低、中、高剂量 (8.72、17.44、34.89 g/kg) 组, 每组 16 只。采用 ip 环磷酰胺联合 HCoV-229E 冠状病毒感染 BALB/c 小鼠, 建立冠状病毒感染模型, 通过小鼠体质量、肺指数、病毒载量、血凝滴度、肺组织病理改变来评价清热消炎宁的治疗作用; 通过 ELISA 检测肺泡灌洗液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-4、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 和血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 水平; 流式细胞术检测肺组织巨噬细胞、淋巴细胞 (CD3⁺、CD4⁺) 及 NK 细胞比例; Western blotting 检测肺组织 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MYD88)、抑制因子 κ B 激酶- β (inhibitor kappa B kinase- β , IKK- β)、抑制因子 κ B (inhibitor kappa B, I κ B) 和 p-I κ B 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 清热消炎宁明显增加病毒感染的小鼠体质量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低肺指数和血凝效价 ($P < 0.01$), 改善肺脏病变 ($P < 0.05$), 且能显著抑制病毒 mRNA 表达 ($P < 0.01$); 降低肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 和 VCAM-1 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提高 IFN- γ 水平 ($P < 0.05$); 明显降低巨噬细胞比例 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提高淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺ 和 NK 细胞比例 ($P < 0.01$); 显著下调肺组织 MYD88、TLR4、I κ B、IKK- β 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 清热消炎宁片可以抑制冠状病毒体内复制, 减轻炎症反应, 保护肺脏组织, 具有明显的体内抗冠状病毒的药效作用, 其作用机制可能与调控 TLR4/MyD88/IKK/I κ B 信号通路和提高免疫有关。

关键词: 清热消炎宁片; 冠状病毒; 炎性因子; 免疫; Toll 样受体信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0579-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.025

Effect and mechanism of Qingre Xiaoyanning Tablet in treatment of coronavirus infection

ZHAO Li¹, TANG Zhao-chun¹, ZHENG Dong-sheng², LIU Xue-wu^{3,4}, PENG Dong-dong^{3,4}, JIANG De-jian^{3,4}

1. Hinye Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410331, China
2. Hunan Hinye Modern Chinese Medicine Industry Co., Ltd., Hengyang 421256, China
3. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China
4. Human Prima Drug Research Center Co., Ltd., Changsha 410331, China

Abstract: Objective To study the anti-coronavirus effect of Qingre Xiaoyanning Tablet (清热消炎宁片), and provide experimental basis for evaluating its prevention and treatment of coronavirus infection. **Methods** A total of 96 BALB/c mice with half male and half female were randomly divided into control group, model group, Lianhua Qingwen Capsules (连花清瘟胶囊, 0.546 g/kg) group and Qingre Xiaoyanning Tablet (8.72, 17.44, 34.89 g/kg) groups with 16 mice in each group. BALB/c mice were infected with ip cyclophosphamide combined with HCoV-229E coronavirus to establish a model of coronavirus infection. The therapeutic effect of Qingre Xiaoyanning Tablet was evaluated by body weight, lung index, viral load, hemagglutination titer and pathological changes in

收稿日期: 2022-10-14

基金项目: 湖南省重点研发计划 (2020DK2003); 自然科学基金-科药联合基金资助项目 (2022JJ80030)

作者简介: 赵莉 (1995—), 女, 硕士, 从事中药药理毒理研究。E-mail: Pharma.CM@hinye.com

*通信作者: 姜德建 (1979—), 男, 博士, 研究员, 从事新药药效与安全性评价研究。E-mail: jiangdejian@hnsc.org

lung tissue of mice; Levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-4, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in alveolar lavage fluid were detected by ELISA; The proportion of macrophages, lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺) and NK cells in lung tissue was detected by flow cytometry; Western blotting was used to detect Toll like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MYD88), inhibitor kappa B kinase- β (IKK- β), inhibitor kappa B (I κ B) and p-I κ B protein expressions in lung tissue. **Results** Compared with model group, Qingre Xiaoyanning Tablet significantly increased the body weight of virus infected mice ($P < 0.05, 0.01$), decreased lung index and hemagglutination titer ($P < 0.01$), improved lung disease ($P < 0.05$), and significantly inhibited viral mRNA expression ($P < 0.01$); TNF- α , IL-1 β and VCAM-1 levels in alveolar lavage fluid were decreased ($P < 0.05, 0.01$), IFN- γ level was increased ($P < 0.05$); The percentage of macrophages was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), percentage of CD3⁺, CD4⁺ lymphocytes and NK cells was increased ($P < 0.01$); MYD88, TLR4, I κ B and IKK- β protein expressions in lung tissue were significantly down regulated ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Qingre Xiaoyanning Tablet can inhibit the replication of coronavirus *in vivo*, reduce inflammatory reaction, protect lung tissue, and has obvious anti-coronavirus effect *in vivo*. Its mechanism may be related to the regulation of TLR4/MyD88/I κ B signal pathway and improving immunity.

Key words: Qingre Xiaoyanning Tablet; coronavirus; inflammatory factors; immunity; Toll-like receptor signaling pathway

冠状病毒 (coronavirus, CoV) 属于套氏病毒目冠状病毒科, 是目前已知的最大 RNA 病毒, 在现实中感染非常普遍, 自然宿主分布广泛, 且感染通常有一段潜伏期。第一例人冠状病毒 (HCoV) 于 1965 年从普通感冒患者的鼻腔分泌物中分离出来, 命名为 HCoV-229E^[1]。HCoV-229E 主要感染宿主呼吸道和肠黏膜表面, 可引起宿主的呼吸道、消化道以及中枢神经系统疾病, 受感染者主要以呼吸道反应居多, 典型表现为头痛、咽红、咽痛、咳嗽、发热、鼻塞、流涕等普通感冒症状, 少部分病例因上呼吸道感染住院^[2]。一项研究显示, 人冠状病毒 HCoV-229E 感染在秋冬季成人发热就诊患者中为常见病原, 可合并感染其他病毒^[3]。另一项研究表明, CoV 引起呼吸道感染的病例中, 66.6% 的患者出现呼吸困难症状由 HCoV-229E 引起^[4]。近年来, 大量基础及临床文献表明, 清热解毒药具有显著的抗病毒作用。清热解毒类中药是中医临床常见中药, 此类中药种类繁多, 临床效果显著, 在抗病毒方面以其低毒、高效, 受到国内外学者关注。

清热消炎宁片是由九节茶 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 提取的单方制剂, 九节茶又名肿节风, 药用历史悠久, 历代医书多有记载其具有清热解毒、抗菌消炎、清肺止咳、祛风除湿、舒筋活络、活血止痛、接骨续伤等功效。研究报道, 清热消炎宁临床上用于治疗急慢性咽炎^[5-6]、小儿感冒^[7]、急性化脓性扁桃体炎^[8]等上呼吸道感染疾病, 治疗效果良好, 且治疗期间未见不良反应。但目前对清热消炎宁片抗 CoV 的研究鲜有报道, 故探讨清热消炎宁片抗 CoV 的作用及机制, 为评价其防治 CoV 感染提供实验依据。

1 材料

1.1 病毒株

HCoV-229E 冠状病毒株由美国 ATCC 提供, 在湖南普瑞玛药物研究中心有限公司生物安全 2 级 (BSL-II) 实验室培养和扩增, 实验室备案本中心编号为长卫健实备字 (2021) 第 B010 号。

1.2 受试药物

清热消炎宁片 (批号 090210502) 由天地恒一制药股份有限公司提供, 含九节茶以异嗪皮啉 (C₁₁H₁₀O₅) 计不得少于 2.6 mg/g。临床用量为 1 次 3~6 片, 1 日 3 次。该批次清热消炎宁干膏粉的出膏率为 10.2%, 即相当于每片含干膏粉 0.38 g。成人体质量以 60 kg 计, 根据体表面积法换算成小鼠等效剂量为 0.89 g 干膏粉/kg。本实验选用 0.89 g 干膏粉/kg 作为小鼠实验的低剂量组, 另设置中、高剂量 2 个剂量组, 分别相当于临床等效剂量的 2、4 倍, 每克干膏粉含 9.8 g 生药, 即 3 组剂量分别为 0.89、1.78、3.56 g 干膏粉/kg (相当于 8.72、17.44、34.89 g 生药/kg)。

莲花清瘟胶囊 (批号 B2009097) 购自石家庄以岭药业股份有限公司, 临床用量为 1 次 4 粒, 1 日 3 次, 规格为 0.35 g/粒。以成人平均体质量以 60 kg 计, 根据体表面积法换算成小鼠等效剂量为 0.546 g 内容物/kg。本实验以莲花清瘟胶囊小鼠等效剂量作为莲花清瘟胶囊组给药剂量, 即 0.546 g 内容物/kg。

1.3 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 96 只, 雌雄各半, 体质量 10.2~13.9 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物合格证号 No.110324211104553418, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物饲养

于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境C区病原微生物安全动物实验室(ABSL-II),实验室备案编号为长卫计实备字(2021)第B010号,实验动物使用许可证号SYXK(湘)2020-0015。动物实验经湖南省药物安全评价研究中心实验动物管理伦理委员会批准[批准号IACUC2021(2)038]。

1.4 试剂

鸡红细胞(10%,批号210912)购自鸿泉生物科技有限公司;高糖DMEM培养基(批号8121397)购自美国Gibco公司;小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-4、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)ELISA试剂盒(批号09/2021、08/2021)购自江苏酶免实业有限公司;CD3抗体(批号11-0032-82)、CD4抗体(批号17-0041-82)购自eBioscience;NK抗体(批号108708)购自Biolegend;Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体(批号19811-1-AP)、髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MYD88)抗体(批号23230-1-AP)、抑制因子 κ B激酶- β (inhibitor kappa B kinase- β , IKK- β)抗体(批号15649-1-AP)、抑制因子 κ B(inhibitor kappa B, I κ B)抗体(批号10268-1-AP)、p-I κ B抗体(批号AF2002)、 β -actin抗体(批号66009-1-Ig)、HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体(批号SA00001-1)、HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(批号SA00001-2)购自美国Proteintech公司。

1.5 仪器

BCR-MI02-72-C11-PPSU型小鼠独立通气笼盒系统、BSC1300-II-B2型生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司);CJ-1F型医用净化工作台(苏州冯氏实验动物设备有限公司);3111型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);DMIL型倒置显微镜、DFC 420C病理成像系统(德国Leica公司);YXQ-50A型立式压力灭菌器(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);TD4型台式低速离心机(湖南省凯达实业发展有限公司);Spectra Max i3x型多功能酶标仪(奥地利美谷光子公司);C6型流式细胞仪(美国BD公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

取BALB/c小鼠96只,雌雄各半,按性别和体重随机分为对照组、模型组、连花清瘟胶囊(0.546

g/kg,相当于临床等效剂量)组和清热消炎宁片低、中、高剂量(8.72、17.44、34.89 g/kg,分别相当于临床等效剂量的1、2、4倍)组,每组16只。清热消炎宁片低、中、高剂量组和连花清瘟胶囊组每天采用纯水配制成质量浓度分别为0.045、0.089、0.178 g干膏/mL和0.027 g/mL的药液,各给药组ig相应药物(20 mL/kg),对照组和模型组ig等体积的纯水,1次/d,连续7d。除对照组外,各组小鼠于第3天给药后30 min,ip环磷酰胺(100 mg/kg)进行免疫抑制,次日乙醚轻微麻醉经鼻滴入HCoV-229E冠状病毒液,100 μ L/只(感染前进行滴度测定,约为 1×10^6 TCID₅₀/mL),对照组经鼻滴入等体积的空白培养基。

2.2 一般生理观察

给药期间每天称定各组动物体质量,比较动物体质量在实验期间的变化。观察动物的给药前及给药后生理状态,包括流涕、喷嚏、咳嗽等症状。

2.3 肺组织病理学检测

于末次给药后次日,选择各组的第1~5只小鼠,颈椎脱臼安乐死,解剖取肺脏称定质量,计算肺脏指数。取左侧支气管和肺脏,经福尔马林灌注固定后,石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,置于光镜观察肺脏及支气管组织病理学变化,从炎性、血性渗出程度、肺泡上皮破坏程度、炎症细胞浸润程度进行评分,评分标准:无病变,计为“0”;轻度,计为“1”;中度,计为“2”;重度,计为“3”。

2.4 肺组织冠状病毒血凝滴度检测

末次给药后次日,取5只小鼠颈椎脱臼安乐死,解剖取右侧肺脏,然后置匀浆器中,按肺质量(g):0.9%氯化钠注射液(mL)=1:9加入0.9%氯化钠注射液,手动研磨匀浆,制成肺悬液,采用血凝抑制试验检测肺组织中病毒效价。

2.5 肺组织冠状病毒载量检测

于末次给药后次日,取5只小鼠的右侧肺脏,置于匀浆器中,按肺质量(mg):RNA提取液(μ L)=1:20加入RNA提取液,采用高速匀浆机进行匀浆,制成肺悬液,4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min离心10 min,取上清,并将所提RNA逆转录成c-DNA,采用qRT-PCR法检测肺组织中冠状病毒载量。

2.6 肺泡灌洗液中IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4和VCAM-1水平的检测

于末次给药后次日,各组取3只小鼠颈椎脱臼安乐死,暴露肺脏,对右侧肺脏进行结扎后,用0.9%

氯化钠注射液反复灌洗左肺，收集灌洗液，按照 ELISA 试剂盒说明书检测肺泡灌洗液中 IL-1β、TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 VCAM-1 水平。

2.7 肺脏免疫细胞检测

于末次给药后次日，取各组 3 只小鼠的右侧肺脏中的一份，然后置匀浆器中，按肺质量(g)：0.9%氯化钠注射液 (mL) = 1：9 加入 0.9%氯化钠注射液，研磨匀浆，制成小鼠肺悬液，采用流式细胞仪检测小鼠肺脏中巨噬细胞 (M1/M2)、淋巴细胞 (CD3⁺、CD4⁺) 以及 NK 细胞比例。

2.8 肺脏 TLR4、MYD88、IKK-β、IκB 和 p-IκB 蛋白表达的检测

于末次给药后次日，取各组 3 只小鼠的右侧肺脏中的另一份，加入蛋白裂解液，于冰上匀浆，离心取上清，得总蛋白。蛋白定量后，采用 Western blotting 检测小鼠肺脏中 TLR4、MYD88、IKK-β、IκB 和 p-IκB 蛋白的表达。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 Leven's test 方法检验正态性和方差齐性。如果没有统计学意义，用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计分析。如果 ANOVA 有统计学意义，用 LSD test (参数法) 进行比较分析。如果方差不齐，则用 Kruskal-Wallis 检验。如果 Kruskal-Wallis 检验有统计学意义，则用 Dunnett's test (非参数法) 进行比较分析。

3 结果

3.1 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠一般生理的影响

各组小鼠实验期间均未出现明显的流涕、咳嗽症状。如表 1 所示，给药期间各组小鼠体质量均逐渐增加，除对照组外，其余各组小鼠在第 4 天感染病毒后体质量出现短暂下降。与对照组比较，模型组小鼠在感染病毒后体质量明显下降 ($P < 0.01$)，并且持续到给药结束；与模型组比较，清热消炎宁片低剂量组小鼠从给药第 5 天开始体质量增长明显 ($P < 0.05$ 、0.01)。到给药结束，各给药组小鼠体质量均明显高于模型组 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.2 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织病理学的影响

如图 1 和表 2 所示，对照组小鼠未见肺泡间隔增宽，没有明显炎性浸润和肺泡腔炎性渗出，病理评分 0 分。模型组小鼠肺组织肺泡间隔出现轻至中度增宽，并且伴有炎性浸润，病理评分 1~2 分。给药后各组肺脏病变均有不同程度减轻，病理评分为 0~1 分，其中清热消炎宁片低剂量具有明显改善作用 ($P < 0.05$)。与对照组比较，模型组小鼠肺指数明显增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组肺指数均明显下降 ($P < 0.01$)。

3.3 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织冠状病毒血凝效价的影响

如表 3 所示，对照组未进行流感病毒感染，肺

表 1 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 1 Effect of Qingre Xiaoyanning Tablet on body weight of mice infected with HCoV-229E ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g						
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
对照	—	12.1 ± 0.8	12.9 ± 0.9	13.4 ± 1.0	14.1 ± 0.8	14.6 ± 0.8	15.0 ± 0.8	15.7 ± 1.0
模型	—	11.7 ± 0.8	12.6 ± 0.8	13.2 ± 0.7	13.2 ± 0.8 ^{###}	13.0 ± 0.8 ^{###}	13.2 ± 0.8 ^{###}	13.5 ± 0.8 ^{###}
连花清瘟胶囊	0.546	12.3 ± 1.0	13.0 ± 0.9	13.6 ± 0.8	13.7 ± 0.9	13.5 ± 1.0	13.7 ± 0.9	14.2 ± 0.9 [*]
清热消炎宁片	8.72	12.2 ± 0.9	13.1 ± 0.9	13.6 ± 0.9	13.6 ± 1.0	13.6 ± 0.8 [*]	13.8 ± 0.8 [*]	14.3 ± 0.8 ^{**}
	17.44	11.8 ± 0.8	12.8 ± 0.8	13.3 ± 0.8	13.4 ± 0.8	13.2 ± 0.7	13.5 ± 0.7	14.2 ± 0.6 [*]
	34.89	11.7 ± 1.0	12.6 ± 1.0	13.1 ± 0.8	13.2 ± 0.8	13.0 ± 0.7	13.5 ± 0.7	14.2 ± 0.6 [*]

与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ，下表同

[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

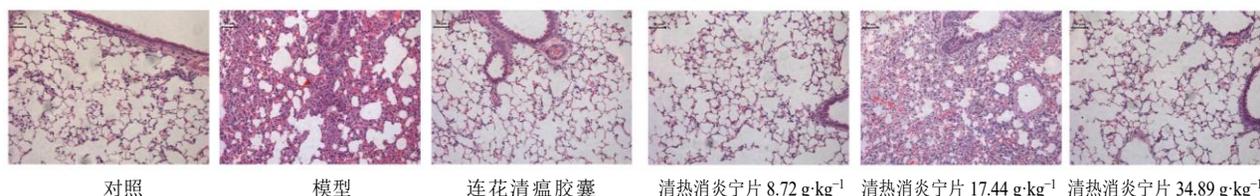


图 1 各组小鼠肺组织病理切片 (HE, ×100)

Fig. 1 Pathological sections of lung tissue of mice in each group (HE, × 100)

表 2 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺指数和肺组织病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Qingre Xiaoyanning Tablet on lung index and lung histopathology of mice infected with HCoV-229E ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肺指数	病理评分
对照	—	8.40±0.76	0
模型	—	12.39±1.05 ^{##}	0.7±0.7 ^{##}
连花清瘟胶囊	0.546	10.68±1.53 ^{**}	0.2±0.4
清热消炎宁片	8.72	10.65±1.38 ^{**}	0.1±0.3 [*]
	17.44	10.74±0.86 ^{**}	0.3±0.5
	34.89	10.19±1.48 ^{**}	0.2±0.4

表 3 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠血凝效价的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Qingre Xiaoyanning Tablet on hemagglutination titer of mice infected with HCoV-229E ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	log ₂ 血凝滴度
对照	—	0
模型	—	3.4±0.5 ^{##}
连花清瘟胶囊	0.546	0.6±0.5 ^{**}
清热消炎宁片	8.72	2.4±0.5 ^{**}
	17.44	1.9±0.3 ^{**}
	34.89	0.7±0.7 ^{**}

脏病毒效价为 0；与对照组比较，模型组病毒滴度显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组肺脏中病毒血凝效价均明显降低 ($P < 0.01$)。

3.4 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织病毒载量的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠病毒 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组病毒 mRNA 表达均明显下降 ($P < 0.01$)。

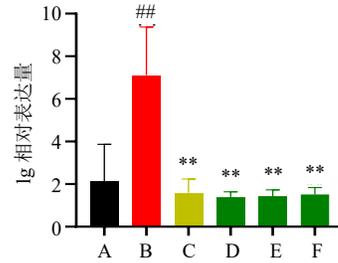
3.5 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺泡灌洗液中 IL-1β、TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 VCAM-1 水平的影响

如表 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-1β 和 VCAM-1 水平明显升高 ($P < 0.05, 0.01$)，IFN-γ 水平明显降低 ($P < 0.05$)；

表 4 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺泡灌洗液中 IL-1β、TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 VCAM-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Qingre Xiaoyanning Tablet on IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-4 and VCAM-1 levels in bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with HCoV-229E ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IFN-γ/(pg·mL ⁻¹)	VCAM-1/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	518.86±14.73	105.31±3.21	143.81±10.59	697.40±34.94	211.78±5.89
模型	—	593.27±59.28 ^{##}	115.53±5.88 [#]	157.03±17.02	636.16±17.51 [#]	231.66±13.03 ^{##}
连花清瘟胶囊	0.546	473.75±28.89 ^{**}	104.94±5.89 [*]	138.65±9.43 [*]	677.97±53.19	212.52±7.78 ^{**}
清热消炎宁片	8.72	541.16±54.86 [*]	110.23±10.94	150.64±14.50	687.34±56.86	225.97±17.38
	17.44	466.87±39.89 ^{**}	100.52±7.20 ^{**}	151.19±12.73	675.76±10.96	216.08±9.17 [*]
	34.89	497.70±24.95 ^{**}	102.20±6.33 ^{**}	147.11±14.38	698.85±78.69 [*]	218.30±7.54 [*]



与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ A-对照组 B-模型组 C-连花清瘟胶囊组 D-清热消炎宁片 8.72 g·kg⁻¹组 E-清热消炎宁片 17.44 g·kg⁻¹组 F-清热消炎宁片 34.89 g·kg⁻¹组，图 3 同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group A-control group B-model group C-Lianhua Qingwen Capsule group D-Qingre Xiaoyanning Tablet 8.72 g·kg⁻¹ group E-Qingre Xiaoyanning Tablet 17.44 g·kg⁻¹ group F-Qingre Xiaoyanning Tablet 34.89 g·kg⁻¹ group, same as fig. 3

图 2 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织病毒载量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of Qingre Xiaoyanning Tablet on coronavirus load in lung tissue of mice infected with HCoV-229E ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

与模型组比较，连花清瘟胶囊组 TNF-α、IL-1β、IL-4 和 VCAM-1 水平均明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)，清热消炎宁片低剂量组 TNF-α 水平明显降低 ($P < 0.05$)，清热消炎宁片中剂量组 TNF-α、IL-1β 和 VCAM-1 水平均明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)，清热消炎宁片高剂量组 TNF-α、IL-1β 和 VCAM-1 水平均明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)，IFN-γ 水平明显升高 ($P < 0.05$)。

3.6 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织免疫细胞比例的影响

如表 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中巨噬细胞明显增多 ($P < 0.01$)，淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 NK 细胞明显减少 ($P < 0.01$)；与模型组比较，连花清瘟胶囊组和清热消炎宁片高剂量组巨噬细胞比例明显降低 ($P < 0.01$)，淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 NK 细胞比例明显升高 ($P < 0.01$)；清热消

表5 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织免疫细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Qingre Xiaoyanning Tablet on proportion of immune cells in lung tissue of mice infected with HCoV-229E ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	巨噬细胞/%	淋巴细胞 CD3 ⁺ 、CD4 ⁺ /%	NK 细胞/%
对照	—	0.42±0.15	7.89±0.81	3.29±0.36
模型	—	3.66±0.12 ^{##}	0.39±0.16 ^{##}	0.80±0.04 ^{##}
连花清瘟胶囊	0.546	1.90±0.09 ^{**}	6.24±0.33 ^{**}	2.77±0.01 ^{**}
清热消炎宁片	8.72	3.00±0.25 ^{**}	0.40±0.20	0.98±0.20
	17.44	3.09±0.09 [*]	3.75±0.15 ^{**}	1.05±0.09
	34.89	2.53±0.20 ^{**}	4.70±0.24 ^{**}	1.53±0.24 ^{**}

炎宁片低、中剂量组巨噬细胞比例显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 清热消炎宁片中剂量组淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺水平显著升高 ($P < 0.01$)。

3.7 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织 TLR4、MYD88、IKK-β、IκB 和 p-IκB 蛋白表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组

织中 TLR4、MYD88、IKK-β、IκB 和 p-IκB 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 连花清瘟胶囊组 TLR4、IκB 和 p-IκB 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 清热消炎片中剂量组 TLR4 和 IKK-β 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$), 清热消炎片高剂量组 MYD88、IKK-β 和 IκB 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

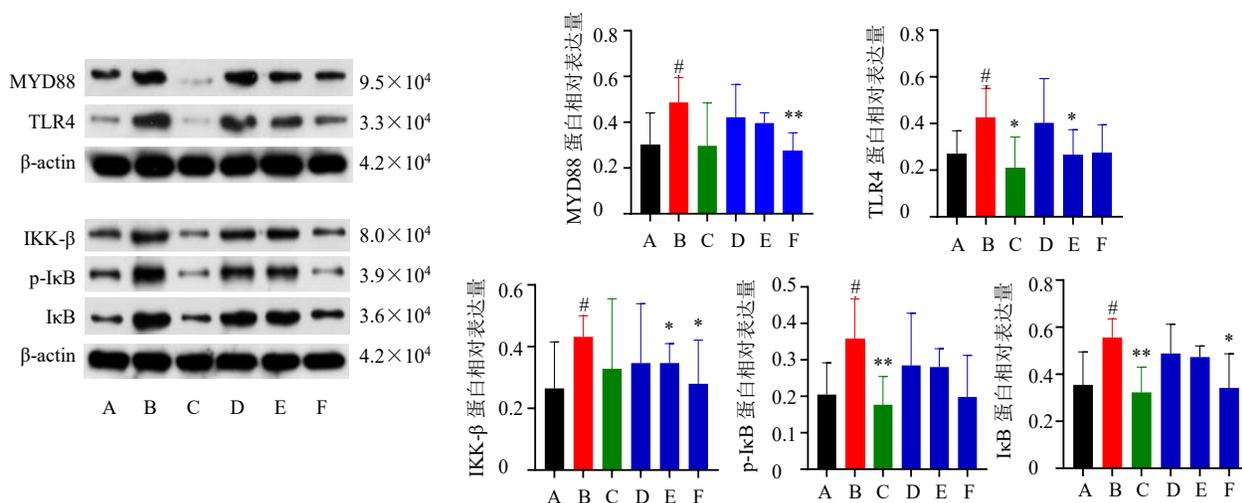


图3 清热消炎宁片对感染 HCoV-229E 小鼠肺组织 TLR4、MYD88、IKK-β、IκB 和 p-IκB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Effect of Qingre Xiaoyanning Tablet on TLR4, MYD88, IKK-β, IκB and p-IκB protein expressions in lung tissue of mice infected with HCoV-229E ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

CoV 主要侵犯气管、支气管、细支气管和肺泡表面的上皮细胞, 直接导致肺组织损伤外, 其引发的细胞因子风暴加重炎症反应, 炎症因子在肺中激活、募集, 造成肺毛细血管内皮细胞以及肺泡上皮细胞弥漫性损伤, 大量渗出液聚集使气道阻塞, 肺功能恶化急剧加重, 导致呼吸-循环衰竭。CoV 感染性疾病属于中医“温病”范畴, “温邪上受、首先犯肺, 逆传心包”, 中医治疗上注重辩证论治, 抓住祛邪与扶正 2 大环节^[9]。清热消炎宁片为九节茶的单方制剂, 清代何谏约的《生草药性备要》以“观音

茶”之名将九节茶收载至书中: “观音茶味劫, 性平。煲水饮, 退热”。清热消炎宁片具有清热解毒、消炎止痛的功效, 符合祛邪的治法。

本研究结果表明, 清热消炎宁片低、中、高剂量组均能明显降低肺组织中 CoV 血凝效价, 抑制 CoV 在肺脏中的复制, 并能明显降低肺脏指数, 减轻肺组织病变程度。中、高剂量的清热消炎宁片均能明显降低肺泡灌洗液中炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 VCAM-1 水平, 高剂量的清热消炎宁片还能提高 IFN-γ 水平。提示清热消炎宁片能抑制 CoV 的复制并降低炎症因子。

TLR4/MyD88/IKK/I κ B 信号通路是机体炎症体系中的重要组成部分,其广泛参与多种疾病的发生与调控,如自身免疫性疾病、炎症性疾病、感染性疾病、过敏性疾病等^[10-11]。当 TLR4 识别病原相关分子模式后通过 MyD88 依赖性途径活化 IKK, IKK 可以催化 I κ B 磷酸化使得核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 激活并调控炎症因子释放^[12]。结果显示,与对照组比较,模型组小鼠肺组织中 TLR4、MYD88、IKK- β 、I κ B 和 p-I κ B 的蛋白表达均明显增加,与肺组织炎症损伤结果一致。给予清热消炎宁片后各蛋白表达均有不同程度下降,其中中剂量组 TLR4、IKK- β 蛋白表达明显下降,高剂量组 MYD88、IKK- β 、I κ B 的蛋白表达显著下降,与炎症细胞因子的结果一致。

T 淋巴细胞是机体免疫系统实现细胞免疫和免疫调节作用的主要成分,外周血 T 淋巴细胞亚群测定可反映机体细胞免疫状态。研究表明,新冠肺炎患者 T 淋巴细胞变化与病情及肺部病变程度具有同步性关联,CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞计数下降得越低,CT 肺部受损情况及其病情均越重^[13-14],CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺ T 细胞亚群的百分率是评估机体免疫状态的可靠指标。IFN- γ 主要由活化的 Th1 细胞和 NK 细胞产生,是机体抗病毒感染中最重要的细胞因子之一^[15]。它不仅阻止病毒在体内复制和扩散,而且能对许多免疫细胞发挥强大的免疫调节作用,在病毒性疾病的康复中具有重要的地位。当小鼠感染 CoV 后,小鼠肺组织内的 TNF- α 、IL-1 β 和 VCAM-1 水平升高,巨噬细胞增加,淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 NK 细胞明显减少,提示小鼠免疫功能出现障碍,清热消炎宁片治疗后能明显增加淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 NK 细胞,降低巨噬细胞,降低肺组织中炎症因子的水平,并能增加 IFN- γ 水平,提示清热消炎宁片抗 CoV 药效作用可能与调节免疫功能有关。

综上所述,清热消炎宁片具有抗 CoV 的作用,其机制可能通过 TLR4/MyD88/IKK/I κ B 通路抑制炎症并提高免疫功能有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 罗晓君,章文贤. 冠状病毒的结构及生物学特性概述 [J]. 生物学教学, 2020, 45(7): 4-6.
- [2] 董晓春. 人冠状病毒 HCoV-229E 的研究进展 [J]. 职业与健康, 2014, 30(24): 3625-3627.
- [3] 陆柔剑,张陵林,谭文杰,等. 2007 年秋冬季北京地区成人发热就诊患者中人冠状病毒 229E 感染状况分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(5): 367-370.
- [4] Cabeça T K, Granato C, Bellei N. Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013, 7(6): 1040-1047.
- [5] 杨权生,杨光钦. 清热消炎宁胶囊治疗急性咽炎 152 例 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(2): 44.
- [6] 赵逢新,陈丽敏. 清热消炎宁胶囊治疗慢性咽喉炎的临床观察 [J]. 中国社区医师: 综合版, 2005, 7(7): 57.
- [7] 林贤高. 清热消炎宁治疗小儿感冒 60 例疗效观察 [J]. 社区医学杂志, 2005, 3(9): 21-22.
- [8] 郑俊. 清热消炎宁胶囊在急性化脓性扁桃体炎中的应用 179 例 [J]. 中国卫生产业, 2011, 8(10): 53.
- [9] 咸楠星,张哲,李宁,等. 基于新型冠状病毒肺炎病因与病机演变规律探讨重症患者从心论治 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(4): 20-24.
- [10] 陈文妹,邝继孙,邱敏霞,等. 基于 TLR4/MyD88/ NF- κ B 信号通路观察维生素 D₃ 对大鼠炎症性肠病的改善作用 [J]. 免疫学杂志, 2022, 38(7): 581-589.
- [11] 陈红英,李新,许浚,等. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路研究清开灵口服液防治肺炎的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6101-6107.
- [12] 杨世勇,何毅,宋大强,等. 基于 TLR4/NF- κ B 途径的白藜芦醇减轻 LPS 致小鼠急性肺损伤的机制研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(9): 1034-1039.
- [13] 李妹玲,刘丹,杨全,等. 新型冠状病毒病患者淋巴细胞亚群与 CT 肺炎指数相关性分析 [J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(9): 872-878.
- [14] 陈木兴,范欣欣,陈晓红,等. T 淋巴细胞亚群检测在新型冠状病毒肺炎临床应用价值中的研究进展 [J]. 结核与肺部疾病杂志, 2022, 3(4): 343-346.
- [15] 李靖,董文学,杨美盼,等. IFN- γ 研究进展与临床应用 [J]. 卫生职业教育, 2019, 37(23): 157-159.

[责任编辑 李亚楠]