

外周血单核细胞预测老年重症流感风险模型的建立及靶向中药预测

黎祖鸣¹, 封杰妮¹, 符珊珊¹, 陈俊旭², 甘 考^{1,3}, 卢 月^{1,3}, 陈剑坤^{1,3}, 刘云涛^{1,3,4,5*}, 杨荣源^{1,3,4,5}, 李际强^{1,3}, 黄涛亮^{1,3*}

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405
2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405
3. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院), 广东 广州 510120
4. 广东省中医急症研究重点实验室, 广东 广州 510120
5. 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510120

摘要: **目的** 综合分析老年流感单细胞转录组测序(single cell transcriptome sequencing, scRNA-seq)和转录组测序(transcriptome sequencing, RNA-seq)数据集, 构建老年重症流感风险预测模型, 并预测调控相关免疫细胞群的中药。通过统计分析中药的性味归经、药物分类, 为中医药治疗老年流感提供理论支持。**方法** 通过 scRNA-seq 和 RNA-seq 数据集得到具有较高预测能力的老年流感相关免疫细胞群及其关键基因。基因本体生物学过程(gene ontology biological process, GOBP)、标志性基因集(Hallmark gene set)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和 Reactome 生物通路知识库富集分析揭示关键基因参与的生物过程及通路。循环算法用于构建老年重症流感风险预测模型。CTD 和 COREMINE 数据库查找对关键基因有调控作用的化学成分及中药, 并通过古今医案云平台统计高频中药的性味归经、药物分类。**结果** 单核细胞及其相关基因对于老年流感具有较高的预测能力。老年流感单核细胞相关基因显著富集在感染、代谢和炎症免疫等生物过程及信号通路。5 个基因(*BCL6*、*PLSCR1*、*FCGR1A*、*RETN*、*RPL9*)的组合可较为准确预测老年重症流感。根据参考文献筛选出 42 种化学成分, 得到高频中药石斛、灵芝、地骨皮、人参、桑叶等; 药性以平、寒、温为主; 药味以甘、苦、辛为主; 归经以肝、脾、肺经居多; 以补虚药、清热药、利水渗湿药、解表药、活血化瘀药、消食药、止咳平喘药为主。**结论** 单核细胞可能在老年流感中发挥重要作用。*BCL6*、*PLSCR1*、*FCGR1A*、*RETN*、*RPL9* 可能是老年重症流感的潜在诊断及治疗靶标。通过生物信息学分析得出老年流感单核细胞相关基因及对应的高频中药, 为治疗老年流感的中药新药开发及临床应用提供了新思路。

关键词: 老年重症流感; 单细胞转录组; 转录组; 风险预测模型; 单核细胞; 石斛; 灵芝; 地骨皮; 人参; 桑叶

中图分类号: Q811.4; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)10-3420-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.020

Establishment of model for predicting risk of severe influenza in elderly by peripheral blood monocytes and prediction of targeted traditional Chinese medicine

LI Zuming¹, FENG Jieni¹, FU Shanshan¹, CHEN Junxu², GAN Kao^{1,3}, LU Yue^{1,3}, CHEN Jiankun^{1,3}, LIU Yuntao^{1,3,4,5}, YANG Rongyuan^{1,3,4,5}, LI Jiqiang^{1,3}, HUANG Taoliang^{1,3}

1. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China
3. The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China
4. Guangdong Provincial Key Laboratory of TCM Emergency Research, Guangzhou 510120, China
5. National Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120, China

收稿日期: 2023-12-03

基金项目: 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-D-202203); 广州市科技局市校院联合资助项目: 广州市中西医结合防治新发传染病重点实验室(202201020382); 广东省中医药局科研项目(20222071); 广东省中医院重点实验室专项(JZ2020ZZ01, YN2023JZ02); 广东省中医院朝阳人才科研专项资助(ZY2022KY10, ZY2022YL04)

作者简介: 黎祖鸣, 本科, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究。E-mail: gzylizuming@126.com

***通信作者:** 黄涛亮, 硕士, 主治医师, 从事中医药治疗呼吸系统疾病的临床与基础研究。E-mail: 3560186@qq.com

刘云涛, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药治疗呼吸系统疾病的临床与基础研究。E-mail: iamliuyuntao@163.com

Abstract: Objective To comprehensively analyze the single cell transcriptome sequencing (scRNA-seq) and transcriptome sequencing (RNA-seq) data of influenza in the elderly, construct a risk prediction model of severe influenza in the elderly, and predict the Chinese herbal medicines that regulate the relevant immune cell groups. To provide theoretical support for the treatment of influenza in the elderly by statistical analysis of the nature, taste, meridian tropism, and drug classification of traditional Chinese medicine. **Methods** Influenza-associated immune cell populations and their key genes with high predictive power were obtained from scRNA-seq and RNA-seq data. The enrichment analysis of gene ontology biological process (GOBP), Hallmark gene set, Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and Reactome revealed the biological processes and pathways involved in key genes. The circulation algorithm was used to construct the risk prediction model of severe influenza in the elderly. CTD and COREMINE databases were used to search for chemical components and traditional Chinese medicines that have regulatory effects on key genes, and the nature, taste, channel tropism, and drug classification of high-frequency traditional Chinese medicines were counted through the cloud platform of ancient and modern medical records. **Results** Monocytes and their related genes have a high predictive ability for influenza in the elderly. The monocyte-related genes of influenza in the elderly were significantly enriched in biological processes and signal pathways such as metabolism, inflammation, and immunity. The combination of five genes (*BCL6*, *PLSCR1*, *FCGR1A*, *RETN*, *RPL9*) can accurately predict severe influenza in the elderly. A total of 42 chemical components were screened according to the references, and the high-frequency traditional Chinese medicines were Shihu (*Dendrobii Caulis*), Lingzhi (*Ganoderma*), Digupi (*Lycii Cortex*), Renshen (*Ginseng Radix et Rhizoma*), Sangye (*Mori Folium*), etc. The medicinal properties were mainly flat, cold, and warm; The flavors were mainly sweet, bitter, and pungent; Liver, spleen, and lung channels were the main channels. The main drugs were tonifying deficiency, clearing heat, removing dampness, relieving exterior, promoting blood circulation and removing blood stasis, eliminating food, and relieving cough and asthma. **Conclusion** Monocytes may play an important role in influenza in the elderly. *BCL6*, *PLSCR1*, *FCGR1A*, *RETN* and *RPL9* may be potential diagnostic and therapeutic targets for severe influenza in the elderly. Bioinformatics analysis has identified the monocyte-related genes and corresponding high-frequency traditional Chinese medicines for influenza in the elderly, providing new insights for the development and clinical application of novel traditional Chinese medicines in the treatment of influenza in the elderly.

Key words: severe influenza in elderly; single-cell transcriptome; transcriptome; risk prediction model; monocyte; *Dendrobii Caulis*; *Ganoderma*; *Lycii Cortex*; *Ginseng Radix et Rhizoma*; *Mori Folium*

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒引起的传染性呼吸道疾病^[1]。流感每年影响全球 10%~20% 的人口,有 300 万~500 万重症病例和 29 万~65 万死亡病例报告^[2]。重症流感是流感的最严重形式,其特征在于肺部炎症、难治性低氧血症和呼吸衰竭^[3-4]。从轻度/中度向重度流感的变化是流感临床过程中的关键转变点^[4]。老年人是最容易感染流感并且发展为重症的人群。老年患者具有与年龄相关的特征,使得其对感染和治疗的反应与年轻患者不同,且老年人发生流感相关死亡和并发症的风险较高^[5]。研究表明免疫细胞和免疫途径与流感的发病和进展有关^[6]。因此,有必要评估有前景的免疫生物标志物,用于诊断和治疗老年重症流感患者。金刚烷胺(amantadine)、奥司他韦(oseltamivir)和扎那米韦(zanamivir)等药物已被广泛用于流感的治疗,但均存在不同程度的副作用^[5,7],而相比之下中医药的安全性较高,且具有多组分、多靶点、全身效应的特点^[8]。中医药用于治疗包括流感和流感样疾病在内的疾病已有数百年的历史,对轻型或危重患者,中医药均显示了明显的优势,其不仅能改善症状,还通过调节患者自身免疫功

能以对抗病毒^[9]。由此可见,研究中医药调控老年流感患者免疫细胞群相关基因的表达作用对老年流感治疗具有重要意义。

自生物测序技术出现以来,生物信息学分析一直被频繁用于筛选疾病特异性生物标志物^[10-11]。转录组测序(transcriptome sequencing, RNA-seq)是在总体水平上研究细胞中所有基因的转录调节,是基因组遗传信息和生物功能之间的重要桥梁^[12]。单细胞转录组测序(single cell transcriptome sequencing, scRNA-seq)已经成为一种研究单细胞分辨率的复杂生物系统的强大技术,其出现使得在单细胞水平上对特定细胞群进行分析成为可能^[13]。本研究综合分析了老年流感的 scRNA-seq 和 RNA-seq 数据集以探讨老年流感相关免疫细胞群及其关键基因,构建了老年重症流感的风险预测模型并且进行了相关中药预测,为老年流感的临床诊断和治疗提供了新的思考。

1 资料与方法

1.1 数据来源与处理

在基因表达综合(GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索得到 scRNA-seq 数据集

GSE149689^[14], 该数据集包含来自 4 名重症流感患者和 1 名正常受试者的外周血, 基础信息见表 1。使用 R 4.2.1 中的“Seurat”^[15]R 包对 GSE149689 进行处理, 使用 CreateSeuratObject 创建矩阵对象, 剔除具有超过 20% 的线粒体基因的细胞。为了可视化和统计分析 scRNA-seq 数据集, 该研究测试了 27 个主成分并将其用于均匀流形逼近和投影图 (uniform manifold approximation and projection, UMAP) 分析。使用聚类分辨率为 0.5 的 FindNeighbors 和 FindClusters 函数进行细胞簇聚类分析, 然后使用“clustertree”R 包进行识别和可视化。使用“Seurat”R 包中的 FindAllMarkers 对所有簇进行标记基因分析, 设置参数为 min.pct=0.1 和 log₂FC=0.25, 选择 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 的基因作为簇特异性标记基因。基于“singleR”包对细胞簇进行注释。根据 CellMarker 数据库注释的细胞类型进行人工检验以确保准确性。同时下载 2 个流感相关 RNA-seq 数据集 GSE101702^[4]和 GSE111368^[16], GSE101702 包含来自 31 例流感患者和 5 例正常受试者的外周血, GSE111368 包含来自 21 例流感患者和 4 例正常受试者的外周血。根据以下标准^[4,16], 对流感严重程度

进行分级: (1) 无实质性呼吸损害, 患者呼吸室内空气时血氧饱和度 $> 93\%$; (2) 患者呼吸室内空气时氧饱和度 $\leq 93\%$, 证明需要通过面罩或鼻插管补充氧气 (有或无持续气道正压通气支持或无创机械通气); (3) 需要有创机械通气, 伴或不伴体外膜肺氧合 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 的呼吸功能损害。定义分级 (1) 和 (2) 为轻中度流感, 分级 (3) 为重度流感。使用“Limma”^[17]和“sva”^[18]R 包合并和标准化 2 个数据集, 最后得到包含 52 例流感患者和 9 例正常受试者的合并数据集, 基础信息见表 2。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 可视化 2 个数据集去除批次效应前后的样本分布。使用 MSigDB 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>) 中的标志性基因集 (Hallmark gene set) (简称 Hallmark)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、基因本体生物学过程 (gene ontology biological process, GOBP) 和 Reactome 生物通路知识库 (Reactome knowledgebase) (简称 Reactome) 富集分析揭示关键基因参与的生物过程及通路。研究流程见图 1。

表 1 单细胞数据集的基本信息

Table 1 Basic information of single-cell dataset

样本	性别	年龄/岁	分组	基础病 (共病)
Flu 1	男性	68	重症流感	高血压、类风湿性关节炎
Flu 2	女性	75	重症流感	卒中、糖尿病
Flu 3	男性	70	重症流感	肾移植状态 d/t ESRD、心房颤动、卒中、高血压、糖尿病、肺结核
Flu 4	女性	78	重症流感	淋巴瘤、高血压、哮喘、前列腺癌
N1	女性	67	健康	

表 2 转录组合并数据集的基本信息

Table 2 Basic information of transcriptome combined dataset

分组	样本量/例	男性/例	女性/例	年龄/岁
正常受试者	9	5	4	68.44 ± 4.06
流感患者				
轻/中度	37	23	14	70.75 ± 7.23
重度	15	7	8	67.06 ± 4.21

1.2 不同细胞类型的差异表达 (differential expression, DE) 基因

从 GSE149689^[14]scRNA-seq 数据集中提取了 5 种细胞类型 [B 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、单核细胞和自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞]。使用 Zou 等^[19]提供的“scCODEv 1.0.0.0”R 包来鉴

定每种细胞类型在正常受试者和流感患者之间的 DE 基因。通过 scCODE 使用一系列测试方法检查所选 DE 基因的能力, 提高单细胞 DE 分析的可靠性^[19-20], 获得 DE 基因列表。

1.3 老年流感相关细胞类型的鉴定

通过 scCODE^[19]鉴定 10 个 DE 基因列表, 根据每个 DE 基因的 $|\log_2\text{FC}|$ 从大到小进行排序, 并将每个 DE 基因列表的前 500 个基因提交至 MSigDB 数据库 (如果小于 500 个, 则提交所有基因)。每个 DE 基因列表使用默认参数获得富集在 GOBP、Hallmark、KEGG 和 Reactome 中的基因集 (前 10 个且校正后的 $P_{\text{adj}} < 0.05$)。基于 GSE101702 & GSE111368 数据集, 使用“Cancerclassv 1.34.0”^[21]R 包评估上述富集

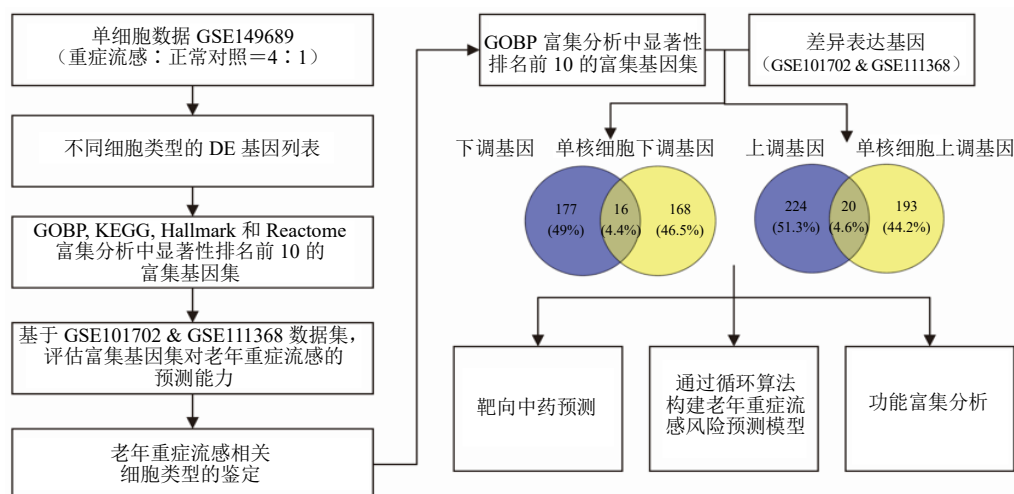


图 1 研究流程

Fig. 1 Research procedure

基因集对于老年重症流感的预测能力。“Cancerclass” R 包常用于创建和验证高维分子数据的分类测试。使用“Cancerclass” R 包中的 Welch’s t 检验得到受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线的 P 值, 并对其进行校正得到 P_{adj} , 根据 P_{adj} 判断分类结果的准确性^[20-22]。

1.4 老年流感 DE 基因的评估

使用“limma”^[17] R 包对合并数据集进行 DE 基因分析, DE 基因筛选标准为 $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 0.585$, 并绘制火山图和热图。

1.5 免疫细胞群相关基因的鉴定

将得到的具有显著预测能力的富集基因集与 DE 基因取交集, 获得免疫细胞群相关基因。

1.6 功能富集分析

基于 MSigDB 数据库, 将老年流感单核细胞相关基因进行 GOBP、Hallmark、KEGG 和 Reactome 富集分析, $P_{adj} < 0.05$ 被认为具有显著性, 利用“ggplot2” R 包实现可视化。

1.7 基于循环算法的老年重症流感预测模型的构建

在合并数据集中, 52 名老年流感患者包括 15 个需要机械通气的呼吸衰竭的严重感染患者, 37 名未接受机械通气的轻度/中度感染患者。对 36 个老年流感单核细胞相关基因进行循环算法分析, 以确定最佳的老年重症流感风险预测模型^[20,22]。在每个循环中, 从 36 个特征基因中随机选择 35 个基因组合。然后使用“Cancerclass”^[21] R 包来估计合并数据集的曲线下面积 (area under curve, AUC), 并检查每种组合的预测准确度。在 36 种组合中, 筛选具

有最高 AUC 的基因组合并应用于下一个周期。重复该循环, 直到剩下不超过 3 种不同的基因组合。最后, 选择所有循环中 AUC 值最高且 P 值最显著的基因组来构建预测模型。

1.8 靶向中药预测分析

将老年流感单核细胞相关基因提交至 CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>), 查找能够调控老年流感单核细胞相关基因的化学成分, 再通过查阅文献以及参考 CTD 数据库中基因与化学成分的相关性的文献支持数 (>1500) 来筛选化学成分^[23], 最后将筛选得到的化学成分与原有的老年流感单核细胞相关基因对应。在 COREMINE 数据库 (<https://www.coremine.com/>) 中寻找包含对应化学成分的中药名称, 同时参照《中国药典》《中药大辞典》《中华本草》《中药学》的规范筛选中药。随后, 将筛选得到的全部中药输入古今医案云平台 (<https://www.yiankb.com/>) 的医案模板, 创建相对应的医案库, 再分别加入分析池中进行中药性味归经的频数统计, 最后参照《中药学》的中药分类目录对药物类别进行统计分析^[24]。

2 结果

2.1 正常受试者和流感患者的单细胞图谱

本研究分析了来自 GSE149689 数据集的单细胞测序样品, 首先通过质量控制排除低质量线粒体细胞后, 选择 14 436 个细胞用于后续分析。通过 UMAP 算法对细胞进行聚类得到 27 个细胞簇。进一步通过“singleR”包将 27 个细胞簇分为 5 种细胞类型, 见图 2。

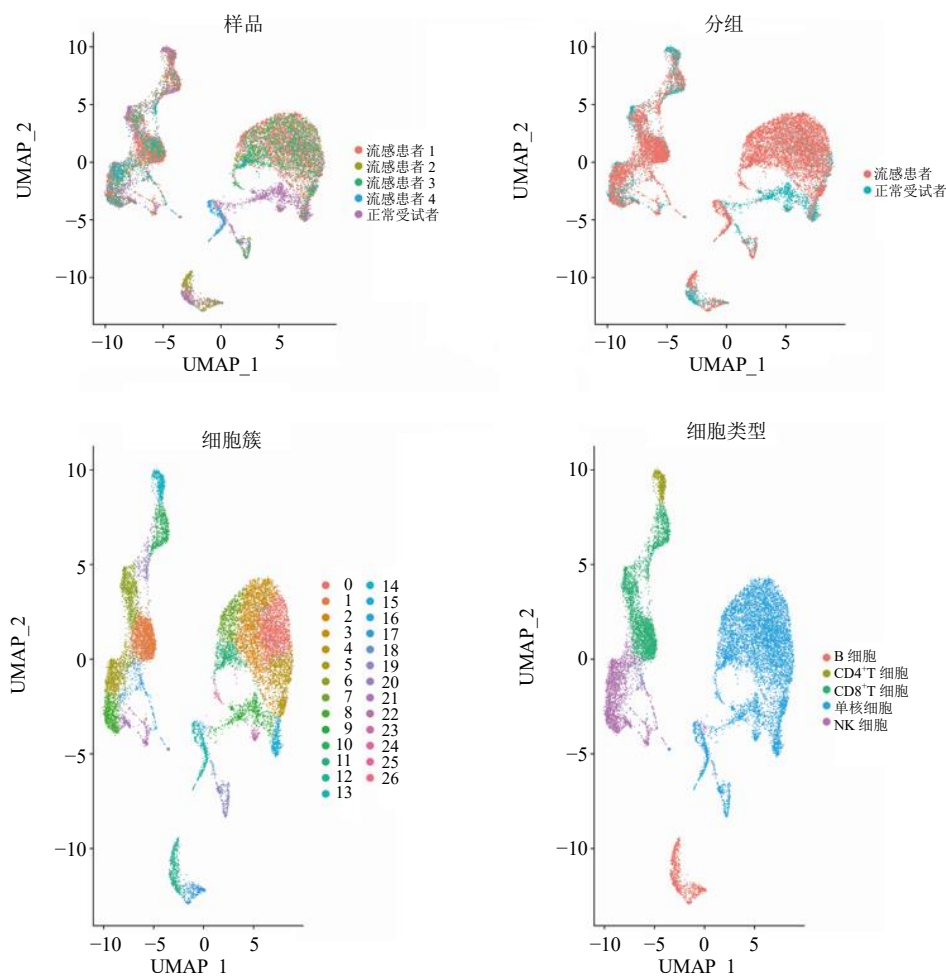


图 2 流感患者和正常受试者之间单细胞数据的 UMAP 散点图 (共注释了 5 种类型细胞)

Fig. 2 UMAP scatter plot of single cell data between influenza patients and normal subjects (five cell types annotated)

2.2 老年流感相关细胞类型的鉴定

使用 scCODE 在每个细胞类型上识别流感患者和正常受试者之间的 DE 基因, 并获得了 10 个 DE 基因列表 (相对于正常受试者, 流感患者单核细胞中的上调和下调基因列表、流感患者 NK 细胞中的上调和下调基因列表、流感患者 B 细胞中的上调和下调基因列表、流感患者 CD4⁺T 细胞中的上调和下调基因列表、流感患者 CD8⁺T 细胞中的上调和下调基因列表)。在 MSigDB 中, 发现 10 个 DE 基因列表在 400 个基因集中富集。与 Hallmark、KEGG 和 Reactome 相比, GOBP 富集基因集具有更大的整体预测能力 (图 3)。探讨了每个 DE 基因列表中 ROC $P_{adj} < 0.05$ 的富集基因集, 以确定具有强大预测潜力的细胞类型。结果显示, 单核细胞 GOBP 相关富集基因集具有较高的预测能力。流感患者单核细胞上调基因列表中的 BP2、BP3、BP4、BP5、BP6、BP7、BP10 富集基因集和正常受试者单核细胞上调基因

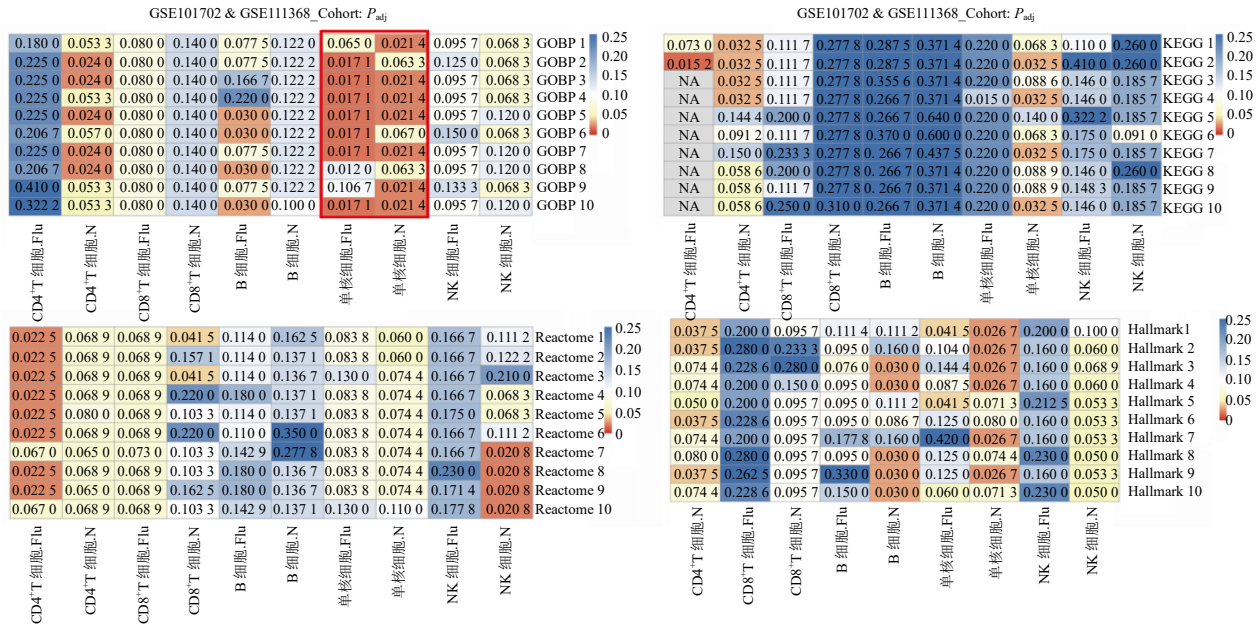
列表中的 BP1、BP3、BP4、BP5、BP7、BP9、BP10 富集基因集被用于后续分析。

2.3 老年流感单核细胞相关基因的鉴定

PCA 结果显示, 去除批次效应的效果良好, 见图 4。在合并数据集中共鉴定了 437 个 DE 基因, 见图 5-A、B。将流感患者单核细胞上调基因列表中的 BP2、BP3、BP4、BP5、BP6、BP7、BP10 富集基因集和正常受试者单核细胞上调基因列表中的 BP1、BP3、BP4、BP5、BP7、BP9、BP10 富集基因集分别与上调和下调基因取交集, 最后得到 36 个老年流感单核细胞相关基因, 见图 5-C、D。

2.4 功能富集分析

结果显示, 老年流感单核细胞相关基因显著富集在感染、代谢和炎症免疫等生物过程及信号通路, 如 GOBP 的肽代谢、酰胺代谢、炎症反应、免疫调节等生物过程; Hallmark 的雄激素反应、脂肪生成、炎症反应、干扰素 γ 和 α 应答、白细胞介素 6



Flu 表示流感患者中上调, N 表示正常受试者中上调。

Flu indicates upregulation in patients with influenza, N indicates upregulation in normal subjects.

图 3 10 个差异表达基因列表在 GOBP、KEGG、Hallmark 和 Reactome 富集的基因组的受试者工作特征曲线的 P_{adj}
Fig. 3 P_{adj} of receiver operating characteristic curves for genomes of 10 differential expression gene lists enriched in GOBP, KEGG, Hallmark and Reactome

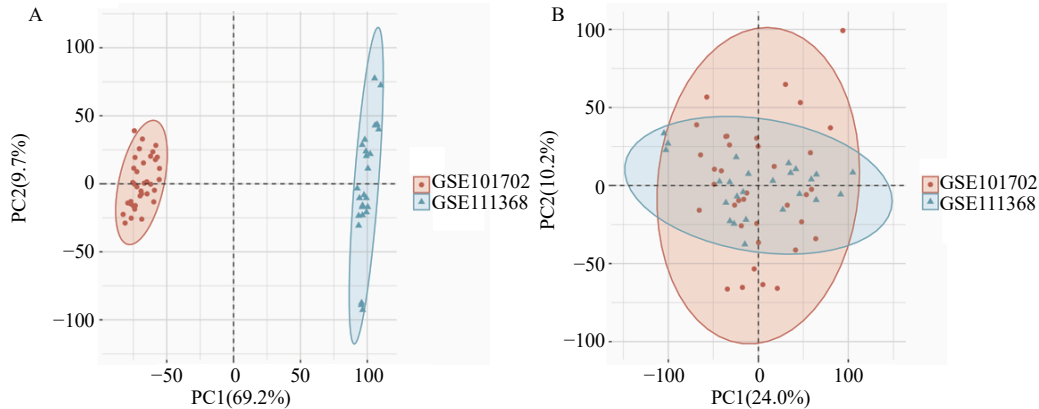


图 4 去除批次效应前 (A) 和去除批次效应后 (B) 主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis before batch effect removal (A) and after batch effect removal (B)

(interleukin 6, IL6) -Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) -信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 信号传导等通路;KEGG 的利什曼原虫感染、NOD 样受体等通路; Reactome 的流感、传染病、亚硒酸代谢、氨基酸及其衍生物代谢、RNA 代谢等通路, 见图 6。

2.5 循环算法预测模型的构建和评估

使用循环算法构建更准确的老年流感预测模型, 并计算不同数量基因的 AUC。循环算法流程见图 7-A。在循环算法中, 5 个基因的组合 [B 细胞淋巴瘤 6 蛋白 (B-cell lymphoma 6 protein, BCL6)、磷脂乱序酶 1 (phospholipid scramblase 1, PLSCR1)、高亲和力和免疫球蛋白 γ Fc 受体 I (high affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I, FCGR1A)、抵抗素 (resistin, RETN)、核糖体蛋白

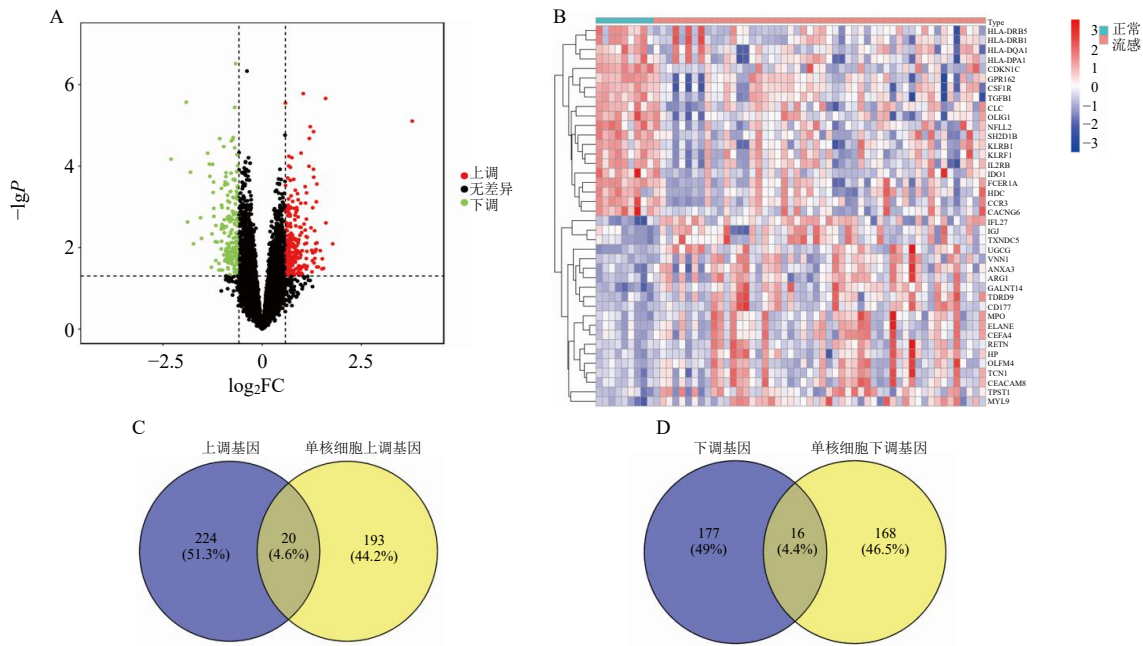


图 5 差异表达基因的火山图 (A)、热图 (B) 及单核细胞 GOBP 相关富集基因集与差异表达基因的交集情况 (C、D)
Fig. 5 Volcano (A) and heat (B) maps of differentially expressed genes and intersection of monocyte GOBP-related enriched gene set with differentially expressed genes (C, D)

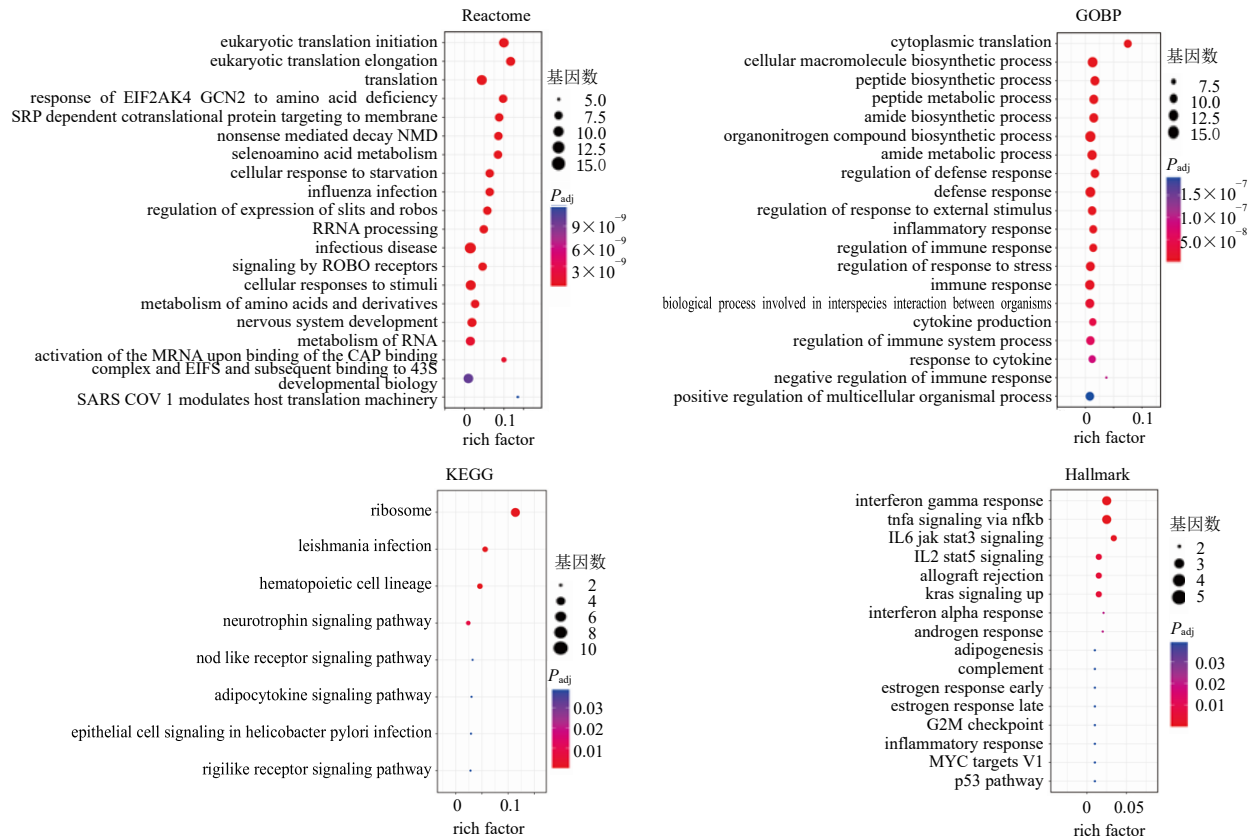
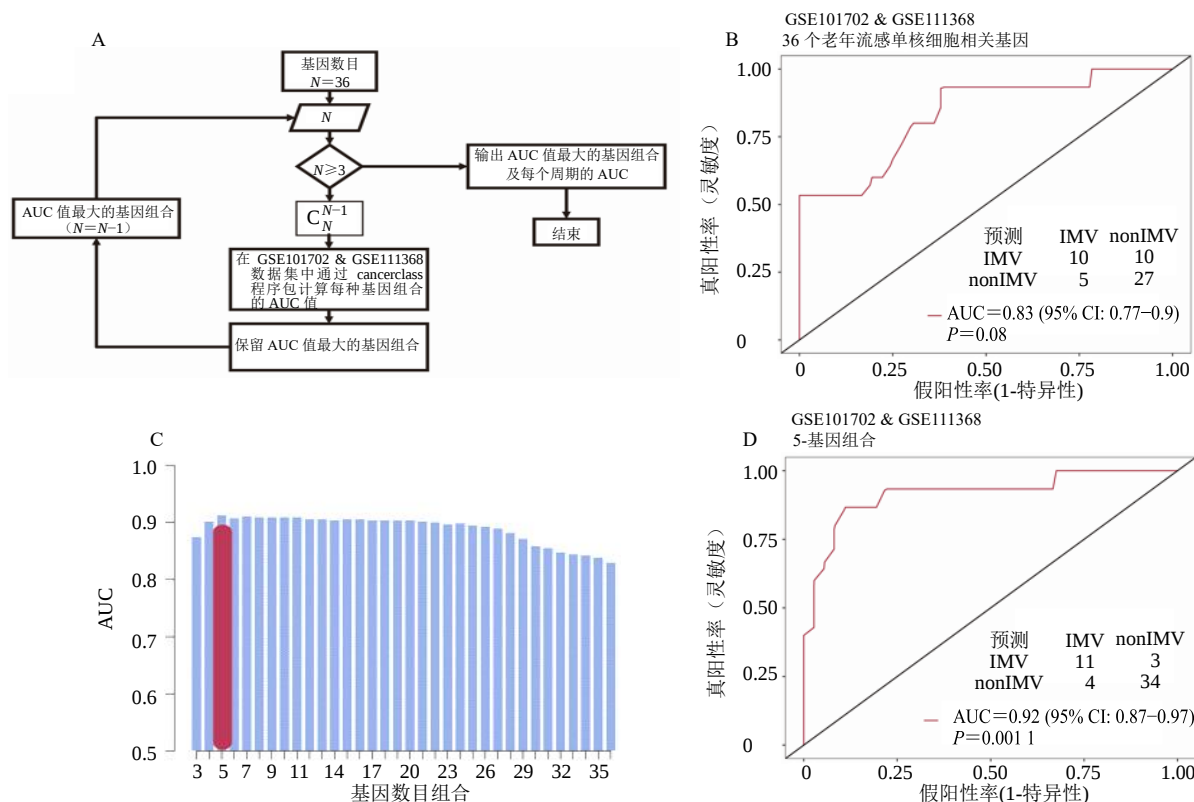


图 6 老年流感单核细胞相关基因的 GOBP、Hallmark、KEGG 和 Reactome 富集分析
Fig. 6 GOBP, Hallmark, KEGG and Reactome enrichment analysis of senile influenza monocyte-related gene



IMV-机械通气; nonIMV-未接受机械通气; A-循环算法流程; B-预测机械通气的单变量逻辑回归模型; C-基因组合的曲线下面积 (AUC) 条形图, 深色表示 5-基因组合; D-5 个基因组合对于老年重症流感具有较高的预测性能。

IMV-invasive mechanical ventilation; nonIMV-non-invasive mechanical ventilation; A-circulation algorithm flow; B-univariate logistic regression model in predicting IMV outcomes; C-bar diagram of area under curve of gene combinations, dark colors indicate 5-gene combination; D-5-gene combination had a significantly high predictive value for outcome of elderly severe influenza in GSE101702 & GSE111368 cohort.

图 7 循环算法预测模型的构建和评估

Fig. 7 Construction and evaluation of cyclic algorithm prediction model

L9 (ribosomal protein L9, *RPL9*) 呈现 AUC 峰值且 P 值最显著 (图 7-C)。5 个基因的组合可以较为准确预测老年重症流感的发生发展, AUC 为 0.92, $P=0.0011$, 95% 置信区间 (confidence interval, CI): 0.87~0.97 (图 7-D), 并且其预测能力高于 36 个老年流感单核细胞相关基因的逻辑回归模型 (图 7-B)。

2.6 老年流感单核细胞相关基因的靶向中药预测与分析

将老年流感单核细胞相关基因提交至 CTD 数据库, 检索对于基因有调控作用的化学成分, 查阅文献以及选择 CTD 数据库中文献支持度较高的化学成分, 根据文献支持数 (>1500) 筛选出 42 种化学成分。将化学成分提交至 COREMINE 数据库, 检索包含对应化学成分的中药, 选择 $P<0.05$ 的中药^[24], 共筛选出 1294 味中药, 出现频次 5123 次。根据《中国药典》《中药大辞典》《中

华本草》《中药学 (第 10 版)》等工具书对于出现频次在 7 次以上的中药进行统计, 共筛选出 135 味中药, 高频中药包括石斛、灵芝、地骨皮、人参、桑叶等, 见表 3、4。由于部分药物没有明确性味归经, 故对中药的不同属性分别统计。四气 (94 次): 平 (29 次) $>$ 寒 (21 次) $=$ 温 (21 次) $>$ 凉 (7 次) $>$ 微寒 (7 次) $>$ 微温 (6 次) $>$ 热 (2 次) $>$ 大热 (1 次), 见图 8; 五味 (140 次): 甘 (50 次) $>$ 苦 (40 次) $>$ 辛 (23 次) $>$ 涩 (14 次) $>$ 酸 (7 次) $>$ 淡 (3 次) $>$ 咸 (3 次), 见图 9; 归经 (209 次): 肝经 (37 次) $>$ 脾经 (36 次) $>$ 肺经 (35 次) $>$ 心经 (27 次) $>$ 肾经 (26 次) $>$ 胃经 (25 次) $>$ 大肠经 (10 次) $>$ 膀胱经 (5 次) $>$ 小肠经 (4 次) $>$ 胆经 (2 次) $=$ 心包经 (2 次), 见图 10。药物功效分类结果显示, 补虚药 (335 次) $>$ 清热药 (225 次) $>$ 利水渗湿药 (105 次) $>$ 解表药 (85 次) $>$ 活血化瘀药 (79 次) $>$ 消食药 (67 次) $>$

表 3 部分基因相关的调控成分及代表中药

基因	调控成分	代表中药
<i>IL4R</i> 、 <i>PLSCR1</i>	苯甲酸 (benzoates)	赤芍、白芍、肉桂
<i>IL4R</i> 、 <i>NFKB1A</i> 、 <i>IL1R2</i>	顺铂 (cisplatin)	僵蚕、僵蛹、牛黄
<i>MAPK14</i> 、 <i>NFKB1A</i>	半胱氨酸 (cysteine)	冬凌草、百合、地胆草
<i>RPL15</i> 、 <i>RPL4</i> 、 <i>KLF4</i>	黄酮 (flavonoids)	黄芩、茶树根、白果
<i>NAAA</i> 、 <i>KLF4</i> 、 <i>RPS3A</i>	脂多糖 (lipopolysaccharides)	黄芩、三百草、人参叶
<i>PLSCR1</i>	萘 (naphthalenes)	火麻仁、香附、落地生根
<i>EEF1A1</i> 、 <i>RETN</i>	维生素 A (vitamin A)	西红花、栀子花、栀子
<i>MAPK14</i> 、 <i>NFKB1A</i>	多糖 (polysaccharides)	枸杞子、灵芝、石斛

表 4 部分高频中药

Table 4 Some high frequency traditional Chinese medicines

中药	频数	中药	频数
石斛	19	桑白皮	11
灵芝	16	桑葚	11
地骨皮	16	枸杞子	11
人参	14	紫苏	11
桑叶	13	莱菔子	11
桑枝	12	火麻仁	11
当归	12	白果	10
牡丹皮	12	姜黄	10
冬虫夏草	12	郁金	10
黄芩	11	桂枝	10

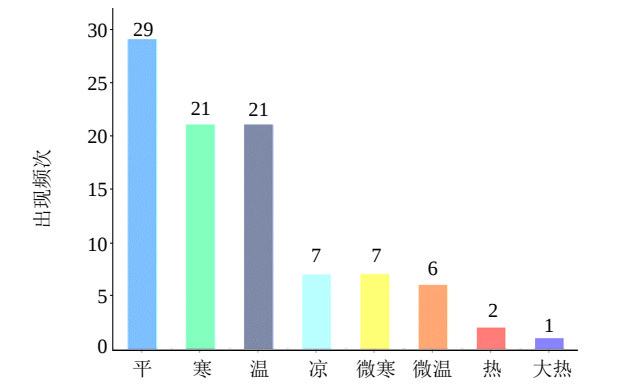


图 8 中药四气统计分析

Fig. 8 Statistical analysis of four *qi* of traditional Chinese medicine

止咳平喘药 (67 次) > 止血药 (59 次) > 理气药 (50 次) > 化湿药 (49 次) > 收涩药 (45 次) > 温里药 (44 次) > 祛风湿药 (28 次) > 泄下药 (19 次) > 安神药 (10 次) > 拔毒化腐生肌药 (8 次) = 驱虫药 (8 次), 见图 11。

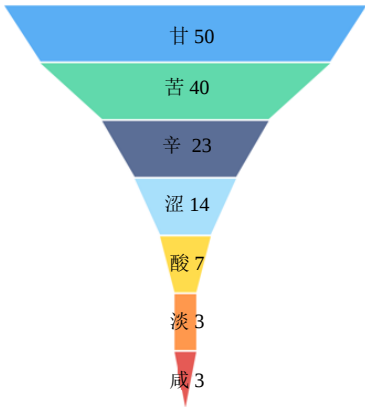


图 9 中药五味统计分析

Fig. 9 Statistical analysis of five flavors of traditional Chinese medicine

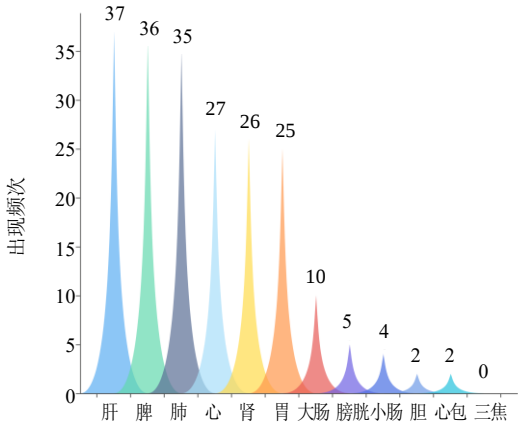


图 10 中药归经统计分析

Fig. 10 Statistical analysis of meridian tropism of traditional Chinese medicine

3 讨论

流感是常见的呼吸道病毒感染病之一, 老年人由于免疫力低下, 对流感有较高易感性, 且容易出现心、肝、肾与神经系统等的并发症^[5,25]。通过结合

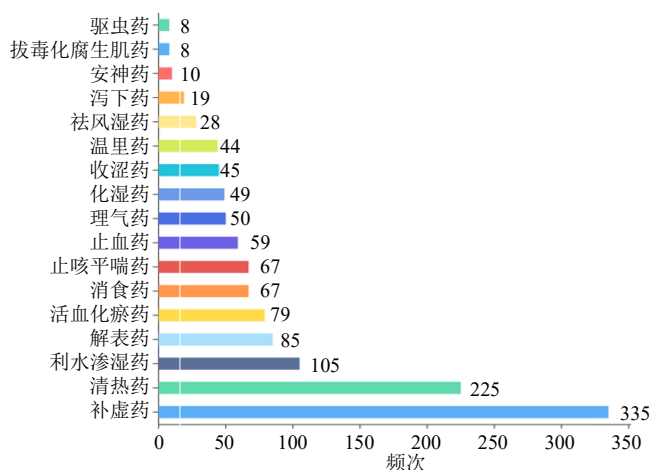


图 11 中药分类统计分析

Fig. 11 Classified statistical analysis of traditional Chinese medicine

scRNA-seq 和 RNA-seq 数据集并使用系统的生物信息学工具, 本研究综合分析了老年流感相关免疫细胞群及其关键基因, 构建了老年重症流感的风险预测模型并且进行了相关靶向中药预测, 为老年流感的临床诊断和治疗提供了新的思考。

研究发现, 单核细胞及其相关基因对于老年流感具有较高的预测能力。单核细胞源自骨髓干细胞, 通过血流到达外周组织并进一步分化为巨噬细胞和树突状细胞, 是抗病毒免疫的重要一环^[26]。年龄可能影响流感患者不同单核/巨噬细胞的分布, 而不同的单核/巨噬细胞功能的差异可能影响疾病预后。Vangeti 等^[27]研究显示, 甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 感染患者血液中 CD14⁺CD16⁺单核细胞占比与年龄呈负相关, 而鼻咽中 IMs 则相反, 老年人在急性 IAV 感染时血液中 CD14⁺CD16⁺单核细胞较年轻人少, 而鼻咽中 CD14⁺CD16⁺单核细胞较多。Li 等^[28]研究证实, 在 IAV 感染期间, 决定巨噬细胞免疫功能的是其来源而非其经历的获得性免疫过程, 并且发现衰老小鼠胚胎来源的肺泡巨噬细胞逐渐被骨髓单核细胞来源的巨噬细胞取代, 这为老年人感染流感严重程度的上升提供了一定的解释。除此之外, 单核/巨噬细胞系统还可以通过影响其他细胞进而影响疾病的预后。Jennings 等^[29]研究显示, 人肺泡巨噬细胞和外周血源性巨噬细胞对体外感染均产生成纤维细胞刺激因子, 提示巨噬细胞可能影响流感后肺纤维化的发展。单核/巨噬细胞在发挥抗病毒作用的同时也会被病毒感染所影响。Kleinerman 等^[30]研究显示, 感染流感会导致单核细

胞趋化性降低, 这可能是流感患者常见的免疫反应性改变和重复感染易感性增加的原因。有学者从中医证型角度研究不同证型甲型 H1N1 流感病毒感染患者单核细胞免疫特征的改变, 发现不同证型甲型 H1N1 流感病毒感染患者外周血的单核细胞亚群存在明显差异^[31]。

本研究使用循环算法以构建更准确的老年重症流感预测模型, 结果显示, 5 个基因 (*BCL6*、*PLSCR1*、*FCGR1A*、*RETN*、*RPL9*) 的组合呈现 AUC 峰值且 *P* 值最显著, 提示其在老年重症流感预测模型中的重要意义。*BCL6* 编码 BTB/POZ 结构域。BTB/POZ-锌指转录抑制因子是一种特殊的蛋白质, 它包含 BTB/POZ 结构域和锌指结构。*BCL6* 缺陷小鼠在 IAV 感染时肺中性粒细胞凋亡增加、炎性细胞因子和趋化因子减少, 生存率显著增高^[32]。*PLSCR1* 可以与病毒核蛋白 (viral nucleoprotein, NP)、输入蛋白 α 形成复合物, 防止输入蛋白 α 与输入蛋白 β 形成输入受体复合物并抑制 NP 进入细胞核, 从而阻断 IAV 的复制^[33]。*FCGR1A* 编码与 γ 免疫球蛋白 Fc 片段相似的蛋白质^[34], 在炎症反应和感染应答中具有关键作用^[35-36]。*RETN* 是调节脂质代谢的分子, 在感染性疾病中的研究较少。目前研究显示, *RETN* 与脓毒症的疾病严重程度呈正相关^[37-38], 其中循环白细胞增加 *RETN* 的表达水平, 并且后者可通过调节血管内皮细胞中细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 的表达水平而加重疾病^[39-40]。此外, *RETN* 可直接

抑制中性粒细胞中的细菌杀伤能力^[41]。因此, RETN 在流感中可能发挥调节不同类型免疫细胞的作用。RPL9 与人类疾病没有广泛的联系, 但其可以引起核糖体功能和细胞代谢的有害变化^[42]。总之, 本研究基于循环算法构建了较为准确的老年重症流感预测模型, 循环算法考虑了所纳入基因的所有基因组合 (≥ 3) 的 AUC 及 P 值, 有利于研究者选择较优的结果。

功能富集分析结果显示, 老年流感单核细胞相关基因显著富集在利什曼原虫感染、流感、传染病、雄激素反应、NOD 样受体、干扰素 α 和 γ 应答、IL6-JAK-STAT 信号转导等感染、代谢和炎症免疫相关的生物过程及信号通路。睾酮属于雄激素, 睾酮可调节免疫细胞并减轻炎症反应, 改善 IAV 小鼠模型的预后, 这预示着睾酮替代疗法治疗感染性疾病的前景^[43]。NOD 样受体属于模式识别受体, 负责检测各种病原体并产生固有免疫反应^[44]。NOD 样受体可通过形成炎性小体对抗 IAV 感染, 但炎性小体的过度表达可能会引起细胞因子风暴导致肺损伤^[45]。干扰素与相应受体结合后启动 JAK-STAT 信号通路, 诱导各种干扰素刺激基因 (interferon stimulating gene, ISG) 的表达继而在 IAV 生命周期的各个环节产生抗病毒作用^[46]。

本研究得出与老年流感单核细胞有关中药的四气以平、寒、温为主, 五味以甘、苦、辛为主。辛温之品发汗解表, “在卫, 汗之可也” “体若燔炭, 汗出而散” “其在皮者, 汗而发之”, 汗出热退, 脉静身凉为顺, 身热复起为逆。祖国医学认为, 流感属于“疫病”“瘟疫”范畴, 多从口鼻而入, 侵犯体表, 故辨治流感当以解表为主。苦寒之品清里泄下, 表邪入里或里热素盛, 气热传营, 气营热盛, 当解表与清里并施; 若热传中焦, 肺胃积热, 还可加强泄降里热之力, 采取“寓下于清”之意, 使热从下泄。老年人多正气虚损不足, 感染流感后多出现虚实夹杂的证候, 故可用甘平之品以调节阴阳平衡, 驱邪之际兼以扶正。合而言之, 以汗外、清里两法表透为主, “寓下于清”, 表里双解, 驱邪兼以甘平扶正可“先安未受邪之地”, 多法联用, 达到多环节祛邪、多治法增效之目的。邪去则正安, 此即吴又可“表里分消”及“三消饮”之消内以清里, 消外以解表, 消不内外以开达“募原”是也。整体归经统计以肝、脾、肺经为主, 与疾病整体归经趋势大致相同, 可说明微观基因层面与宏观整体调控变化

相一致。流感早期疠气侵表, 卫阳被遏, 以肺卫表证为主, 若不治或误诊, 毒邪进而犯肺, 导致肺热壅盛, 后可顺传至中焦阳明; 甚至会出现肺卫逆传心包的危重证候; 疾病后期则可见耗伤肺胃津液之证, 甚至劫伤下焦肝肾阴液^[47]。

药物分类统计以补虚药、清热药、利水渗湿药、解表药、活血化瘀药为主。老年病的病因病机主要集中于“虚”“痰”“瘀”3 方面^[48]。老年人正气本虚, 邪实偏胜, 正气无力抗邪, 致邪毒内陷, 则可短时间内出现气血、阴阳、脏腑功能迅速虚衰的证候, 表现为急性虚证; 病至后期邪气虽退, 余毒不尽, 气血耗损, 正气亦衰, 渐至虚损之态^[49]。故治疗老年病常佐以补虚之品, 防止毒邪长驱直入。老年人常伴其他基础疾病, 痰、瘀既是脏腑功能失调的病产物, 又是导致疾病发展的致病因素^[49], 攻邪之余, 应注重痰瘀同治, 攻伐适宜, 起到攻邪化痰瘀而不伤正的效果。解表药辛散质轻, 偏行肌表, 促使肌体发汗, 透邪外出, 防止病邪入里。清热药皆寒凉, 寒能清热, 入气营血分, 使里热得以清解。清热药得解表药, 泻火而无凉遏之弊; 解表药得清热药, 透邪而无辛散之虞。此外, 现有研究表明, 中药单体或中药复方可调控单核/巨噬细胞及其相关基因。汉黄芩素可抑制感染流感病毒的肺巨噬细胞产生炎症相关因子^[50]。栀子提取物可通过降低单核细胞趋化蛋白-1 的含量, 进而改善流感病毒所致的小鼠病毒性肺炎^[51]。复方银花解毒汤可通过调控单核细胞相关通路抑制 H3N2 流感病毒复制并抑制炎症因子风暴降低肺损伤^[52]。热毒宁注射液可能通过降低体内巨噬细胞数量和抑制巨噬细胞的炎症反应来缓解细胞因子风暴的严重程度, 从而保护流感病毒感染小鼠^[53]。可见中医药在调控流感免疫细胞群上展示出巨大的潜力和优势。

本研究通过分析 scRNA-seq 和 RNA-seq 数据集, 发现单核细胞可能在老年流感中发挥重要作用, 并建立了由 5 个基因组成的老年重症流感风险预测模型。此外, 通过老年流感单核细胞相关基因探索相关的中药, 并将基因与中药的性味归经进行关联。然而本研究仍存在以下局限性: (1) 满足本研究要求的测序数据较少, 仅使用了 1 个单细胞测序数据集和 2 个老年流感数据集; (2) GSE101702 和 GSE111368 中存在混杂因素, 难以评估差异分析的稳定性; (3) 通过“基因-调控成分-中药”的研究思路得到了相关中药, 仍需进行实验验证及临床观察。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Petrova V N, Russell C A. The evolution of seasonal influenza viruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(1): 60.
- [2] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [3] Short K R, Kroeze E J B V, Fouchier R A M, et al. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(1): 57-69.
- [4] Tang B M, Shojaei M, Teoh S, et al. Neutrophils-related host factors associated with severe disease and fatality in patients with influenza infection [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3422.
- [5] Bulloch M N. Treatment and prevention of influenza in geriatric patients [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2023, 16(9): 825-841.
- [6] Malik G, Zhou Y. Innate immune sensing of influenza A virus [J]. *Viruses*, 2020, 12(7): 755.
- [7] Lehnert R, Pletz M, Reuss A, et al. Antiviral medications in seasonal and pandemic influenza [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2016, 113(47): 799-807.
- [8] Zhao L, Zhang H, Li N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116306.
- [9] 高燕菁, 王融冰. 中医药治疗流感的研究进展 [J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(1): 17-20.
- [10] Ibrahim B, McMahon D P, Hufsky F, et al. A new era of virus bioinformatics [J]. *Virus Res*, 2018, 251: 86-90.
- [11] 高晟玮, 薛亚然, 张垚, 等. 基于生物信息学探讨 SARS-CoV-2 介导免疫炎症反应诱发动脉粥样硬化进展的潜在机制与防治中药筛选 [J]. 中草药, 2023, 54(8): 2523-2535.
- [12] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [13] Yang S Y, Corbett S E, Koga Y, et al. Decontamination of ambient RNA in single-cell RNA-seq with DecontX [J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 57.
- [14] Lee J S, Park S, Jeong H W, et al. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19 [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(49): eabd1554.
- [15] Hao Y H, Hao S, Andersen-Nissen E, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data [J]. *Cell*, 2021, 184(13): 3573-3587.e29.
- [16] Dunning J, Blankley S, Hoang L T, et al. Progression of whole-blood transcriptional signatures from interferon-induced to neutrophil-associated patterns in severe influenza [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(6): 625-635.
- [17] Ritchie M E, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [18] Leek J T, Johnson W E, Parker H S, et al. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(6): 882-883.
- [19] Zou J W, Deng F L, Wang M C, et al. scCODE: An R package for data-specific differentially expressed gene detection on single-cell RNA-sequencing data [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23(5): bbac180.
- [20] Sun H R, Kong X J, Wei K M, et al. Risk prediction model construction for post myocardial infarction heart failure by blood immune B cells [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1163350.
- [21] Budezies J, Kosztyla D, von Törne C, et al. Cancerclass: An R package for development and validation of diagnostic tests from high-dimensional molecular data [J]. *J Stat Soft*, 2014, 59(1): 1-19.
- [22] Zheng K, Gao L C, Hao J, et al. An immunotherapy response prediction model derived from proliferative CD4⁺ T cells and antigen-presenting monocytes in ccRCC [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 972227.
- [23] Davis A P, Wiegiers T C, Wiegiers J, et al. CTD tetramers: A new online tool that computationally links curated chemicals, genes, phenotypes, and diseases to inform molecular mechanisms for environmental health [J]. *Toxicol Sci*, 2023, 195(2): 155-168.
- [24] 符珊珊, 封杰妮, 黎祖鸣, 等. 基于生物信息学探讨胃癌相关基底膜基因及中药预测 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4948-4957.
- [25] Keilich S R, Bartley J M, Haynes L. Diminished immune responses with aging predispose older adults to common and uncommon influenza complications [J]. *Cell Immunol*, 2019, 345: 103992.
- [26] Shi C, Pamer E G. Monocyte recruitment during infection and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 762-774.
- [27] Vangeti S, Falck-Jones S, Yu M, et al. Human influenza virus infection elicits distinct patterns of monocyte and dendritic cell mobilization in blood and the nasopharynx [J]. *eLife*, 2023, 12: e77345.
- [28] Li F Q, Piattini F, Pohlmeier L, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages autonomously determine severe outcome of respiratory viral infection [J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(73): eabj5761.
- [29] Jennings S T, Ettensohn D B, Roberts N J, JR. Influenza virus infection of human alveolar and peripheral blood-derived macrophages. Production of factors that alter

- fibroblast proliferation [J]. *Am Rev Respir Dis*, 130(1): 98-102.
- [30] Kleiner E S, Snyderman R, Daniels C A. Depressed monocyte chemotaxis during acute influenza infection [J]. *Lancet*, 1975, 2(7944): 1063-1066.
- [31] 吴雪英. 不同证型甲型 H1N1 流感患者单核细胞免疫特征的改变 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [32] Zhu B B, Zhang R X, Li C F, *et al*. BCL6 modulates tissue neutrophil survival and exacerbates pulmonary inflammation following influenza virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(24): 11888-11893.
- [33] Luo W Y, Zhang J, Liang L B, *et al*. Phospholipid scramblase 1 interacts with influenza A virus NP, impairing its nuclear import and thereby suppressing virus replication [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(1): e1006851.
- [34] Tagliabue M, Maffini F, Fumagalli C, *et al*. A role for the immune system in advanced laryngeal cancer [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18327.
- [35] Zhang H F, Li L, Liu L. FcγRI (CD64) contributes to the severity of immune inflammation through regulating NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 207: 296-303.
- [36] Verma S, Du P C, Nakanjako D, *et al*. Tuberculosis in advanced HIV infection is associated with increased expression of IFNγ and its downstream targets [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 220.
- [37] Sundén-Cullberg J, Nyström T, Lee M L, *et al*. Pronounced elevation of resistin correlates with severity of disease in severe sepsis and septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(6): 1536-1542.
- [38] Koch A, Gressner O A, Sanson E, *et al*. Serum resistin levels in critically ill patients are associated with inflammation, organ dysfunction and metabolism and may predict survival of non-septic patients [J]. *Crit Care*, 2009, 13(3): R95.
- [39] MacDonald S P J, Bosio E, Neil C, *et al*. Resistin and NGAL are associated with inflammatory response, endothelial activation and clinical outcomes in sepsis [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(7): 611-619.
- [40] MacDonald S P J, Stone S F, Neil C L, *et al*. Sustained elevation of resistin, NGAL and IL-8 are associated with severe sepsis/septic shock in the emergency department [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110678.
- [41] Miller L, Singbartl K, Chronos Z C, *et al*. Resistin directly inhibits bacterial killing in neutrophils [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2019, 7(1): 30.
- [42] Lezzerini M, Penzo M, O'Donohue M F, *et al*. Ribosomal protein gene RPL9 variants can differentially impair ribosome function and cellular metabolism [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(2): 770-787.
- [43] Vom Steeg L G, Dhakal S, Woldetsadik Y A, *et al*. Androgen receptor signaling in the lungs mitigates inflammation and improves the outcome of influenza in mice [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(7): e1008506.
- [44] Liu P, Lu Z, Liu L, *et al*. NOD-like receptor signaling in inflammation-associated cancers: From functions to targeted therapies [J]. *Phytomedicine*, 2019, 64: 152925.
- [45] Tisoncik J R, Korth M J, Simmons C P, *et al*. Into the eye of the cytokine storm [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76(1): 16-32.
- [46] Goraya M U, Zaighum F, Sajjad N, *et al*. Web of interferon stimulated antiviral factors to control the influenza A viruses replication [J]. *Microb Pathog*, 2020, 139: 103919.
- [47] 林樨, 章惠萍, 周润津, 等. 基于国家专利的中药复方治疗流行性感冒的用药规律研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(12): 1724-1732.
- [48] 张溪, 徐浩祥, 李际强. 从虚、痰、瘀论治老年病研究探析 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(7): 172-175.
- [49] 谷孝芝, 陈剑坤, 李际强. 呼吸道病毒检测阳性老年肺炎患者中医证候研究 [J]. *中国中医急症*, 2018, 27(1): 13-15.
- [50] 吴莹, 金叶智, 吴珺, 等. 汉黄芩素对流感病毒感染肺巨噬细胞炎症相关因子的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(3): 533-538.
- [51] 王雅欣, 包蕾, 赵荣华, 等. 栀子提取物抑制甲型流感病毒致小鼠病毒性肺炎的抗炎机制研究 [J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(12): 1106-1110.
- [52] 郑志慧. 复方银花解毒汤抗流感病毒药效作用及机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [53] 葛世杰, 刘晓婷, 张沂, 等. 疏风宣肺方和解表清里方体外干预甲型流感病毒 H1N1 诱导炎性细胞因子分泌作用的研究 [J]. *河北中医*, 2015, 37(6): 863-866.

[责任编辑 潘明佳]