

## 基于蛋白质组学的大青龙汤治疗病毒性肺炎作用机制研究

杨晓微, 张宇, 刘宪, 高双荣, 耿子涵, 包蕾, 孙静, 赵荣华, 张敬升, 崔晓兰, 郭姗姗\*  
中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

**摘要:** **目的** 探索大青龙汤抑制甲型流感病毒(H1N1/PR8)致小鼠病毒性肺炎的药效和机制。**方法** 通过UPLC-QE-HF-MS/MS检测大青龙汤中的主要化学成分。小鼠随机分为对照组、模型组、奥司他韦(27.5 mg/kg)组和大青龙汤高、中、低剂量(23.10、11.55、5.78 g/kg)组,建立甲型流感病毒(H1N1/PR8)感染致小鼠肺炎模型,连续给药4 d后,通过检测肺部病毒载量、肺组织炎症因子水平、外周血淋巴细胞比例、肺部病理结构与影像学,评价大青龙汤对病毒性肺炎的治疗作用,并通过蛋白质组学和Western blotting研究其作用机制。**结果** 鉴定出大青龙汤中77个主要化学成分。与模型组比较,大青龙汤显著降低感染小鼠肺组织病毒载量( $P < 0.01$ ),降低肺组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )水平( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),升高外周血中CD4<sup>+</sup>T细胞比例( $P < 0.05$ ),明显改善肺部病变情况,并显著上调感染小鼠肺组织中活化T细胞核因子5(nuclear factor of activated T-cells 5, NFAT5)的表达( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),下调酪氨酸蛋白激酶ZAP-70(tyrosine-protein kinase ZAP-70, ZAP70)的表达( $P < 0.05$ )。**结论** 大青龙汤能够抑制感染小鼠肺组织中病毒增殖、降低TNF- $\alpha$ 表达、提高CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞水平、改善肺部病变,其治疗病毒性肺炎的机制与调节NFAT5和ZAP70介导的T细胞免疫有关。**关键词:** 蛋白质组学; 大青龙汤; 病毒性肺炎; T细胞免疫; NFAT5; ZAP70

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-2909-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.004

## Mechanism of Daqinglong Decoction against viral pneumonia based on proteomics

YANG Xiaowei, ZHANG Yu, LIU Xian, GAO Shuangrong, GENG Zihan, BAO Lei, SUN Jing, ZHAO Ronghua, ZHANG Jingsheng, CUI Xiaolan, GUO Shanshan

Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**Abstract: Objective** To explore the efficacy and mechanism of Daqinglong Decoction (大青龙汤) in inhibiting viral pneumonia in mice caused by influenza A virus (H1N1/PR8). **Methods** The main chemical components in Daqinglong Decoction were detected by UPLC-QE-HF-MS/MS. Mice were randomly divided into control group, model group, oseltamivir (27.5 mg/kg) group, Daqinglong Decoction high-, medium-, and low-dose (23.10, 11.55, 5.78 g/kg) groups. The model of pneumonia in mice caused by influenza A virus (H1N1/PR8) infection was established, after continuously administration for 4 d, the therapeutic effect of Daqinglong Decoction on viral pneumonia was evaluated by detecting the viral load of lungs, the levels of inflammatory factors in lung tissues, the percentage of peripheral blood lymphocytes, and the pathological structure and imaging of lungs. The mechanism was studied through proteomics and Western blotting. **Results** A total of 77 major chemical constituents in Daqinglong Decoction were identified. Compared with model group, Daqinglong Decoction significantly reduced the viral load of lung tissues ( $P < 0.01$ ), decreased the level of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in lung tissues ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), increased the percentage of CD4<sup>+</sup>T cells in the peripheral blood ( $P < 0.05$ ), markedly improved lung lesions, and significantly up-regulated the expression of nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) and down-regulated the expression of tyrosine-protein kinase ZAP-70 (ZAP70) in lung tissues of infected mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Daqinglong Decoction inhibited viral proliferation in lung tissues, decreased TNF- $\alpha$  expression, increased CD4<sup>+</sup>T lymphocyte level and ameliorated lung lesions, and its mechanism of treating viral pneumonia was related to the modulation of NFAT5 and ZAP70 mediated T cell immunity.

收稿日期: 2025-05-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82151210);北京市自然科学基金项目(L222130);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04607)

作者简介: 杨晓微, 博士研究生, 研究方向为中药抗病毒研究。E-mail: dgihfgh@qq.com

\*通信作者: 郭姗姗, 研究员, 博士生导师, 从事中药抗病毒及抗感染药理研究。E-mail: ssguo@icmm.ac.cn

**Key words:** proteomics; Daqinglong Decoction; viral pneumonia; T cell immunity; NFAT5; ZAP70

流行性感胃是由流感病毒引发的急性呼吸道传染病,具有明显的季节性和流行性特点<sup>[1]</sup>。流感病毒是引发流行性感胃的病原体,根据核蛋白和基质蛋白不同,分为甲、乙、丙、丁4型,其中甲型流感病毒变异能力较强,易引起大规模流行<sup>[2]</sup>。大青龙汤出自张仲景的《伤寒论》,是由麻黄、桂枝、甘草、杏仁、石膏、生姜、大枣7味中药组成的解表剂,常见于治疗外感风寒、表里俱实,现代临床主要应用于治疗呼吸系统疾病,如流行性感胃、支气管炎及哮喘等<sup>[3-6]</sup>。在《流行性感胃诊疗方案(2020年版)》中,大青龙汤被列为流感轻症治疗方案之一。尽管大青龙汤在流感的临床应用中取得了显著疗效,但其抗病毒作用机制尚未明确。

在T细胞抗原受体和刺激信号结合后,T细胞会经历一个分化程序,转化为多种辅助T细胞亚群,形成特定的细胞因子组合<sup>[7]</sup>。酪氨酸蛋白激酶ZAP-70(tyrosine-protein kinase ZAP-70, ZAP70)控制T淋巴细胞的细胞骨架修饰、黏附和移动性,是调节T细胞活化的关键因子。ZAP70是通过控制功能性免疫突触的形成与抗原递呈细胞相互作用所必需的因素,确保细胞因子等效应物靶向递送到抗原递呈细胞<sup>[8]</sup>。但ZAP70对T细胞活化的作用是双向的,开启T细胞激活的ZAP70也通过调节T细胞表面的受体表达参与了T细胞激活的关闭<sup>[9]</sup>。活化T细胞核因子5(nuclear factor of activated T-cells 5, NFAT5)通过与核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)协同作用,诱导NF- $\kappa$ B下游靶点诱导型一氧化氮合酶的激活,表现出抑制病毒复制的作用<sup>[10]</sup>。研究发现NFAT5是病毒诱导的I型干扰素(interferon-I, IFN-I)产生的转录抑制因子,防止IFN-I过度表达引发的破坏性的炎症反应<sup>[11]</sup>。本研究旨在探讨大青龙汤对甲型流感病毒(H1N1/PR8)感染小鼠的治疗作用,并探讨其对ZAP70和NFAT5表达的调控作用,为临床应用提供理论依据和实践参考,并为今后防控流感病毒的感染和治疗提供新方法。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF级ICR小鼠,体质量(14.00±1.00)g,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2021-0011。动物实验经中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批

准(批准号2023D020)。

### 1.2 病毒株

甲型流感病毒(H1N1/PR8),编号VR-1469,购自美国ATCC,由本实验室传代,-80℃冰箱保存。本实验室为具有中国合格评定国家认可委员会认证的ABSL-2级生物安全实验室,实验操作严格按照ABSL-2级生物安全实验室管理制度及规范化操作规程进行。

### 1.3 药品与试剂

生麻黄、桂枝、炒杏仁、炙甘草、生石膏、大枣(批号分别为20230311、20231118、20231113、20230915、20231226、22111401),购自北京同仁堂药店,生姜自备,以上药材经中国中医科学院中药研究所李焯焯研究员鉴定,分别为麻黄科植物草麻黄*Ephedra sinica* Stapf的干燥草质茎、樟科植物肉桂*Cinnamomum cassia* Presl的干燥嫩枝、蔷薇科植物杏*Prunus armeniaca* L.的干燥成熟种子、豆科植物甘草*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎、硫酸盐类矿物石膏族石膏( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、鼠李科植物枣*Ziziphus jujuba* Mill.的干燥成熟果实、姜科植物姜*Zingiber officinale* Rosc.的新鲜根茎。以上药材按照李冀主编《方剂学》<sup>[12]</sup>进行配比,用10倍量的蒸馏水分别煎煮2次,合并2次煎煮液并浓缩至1.16 g/mL,作为大青龙汤高剂量组给药溶液,用蒸馏水分别稀释为0.58、0.29 g/mL,作为中、低剂量组给药溶液。磷酸奥司他韦胶囊(批号M1136)购自瑞士巴塞尔豪夫迈·罗氏有限公司;小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )试剂盒(批号m1002095)、小鼠IFN- $\gamma$ 试剂盒(批号m1002277)、小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(批号m1098430)购自上海酶联生物科技有限公司;甲型流感病毒核酸检测试剂盒(批号P20230801)购自上海之江生物科技股份有限公司;4%细胞组织固定液(批号20221227)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;Trizol试剂(批号368910)购自美国Ambion公司;ZAP70抗体(批号1048686-4)、NFAT5抗体(批号1060375-2)购自英国Abcam公司; $\beta$ -tubulin抗体(批号RM2003)购自北京锐抗生物技术有限公司;HRP标记山羊抗兔(批号10683050)、HRP标记山羊抗小鼠(批号10682066)购自美国Kirkegaard & Perry Laboratories公司;CD3e抗体(批

号 C0031091119354)、CD45R(B220)抗体(批号 C0452071420503)、CD4 抗体(批号 C0042022020653)购自美国 Tonbo Biosciences 公司; 红细胞裂解液(批号 9224600)购自美国 BD 公司。

#### 1.4 仪器

Vanquish 型液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 型质谱仪、Applied Biosystems QuantStudio 5 型 Real-time PCR 仪、MSC1.8 型 A2 型生物安全柜、ULT Freezer 型超低温冰箱(美国 Thermo 公司); Quantum GX2 型小动物活体 CT 成像机、Enspire 型多功能酶标仪(美国 Perkinelmer 公司); Accuri C6 Plus 型流式细胞仪(美国 BD 公司); 5810R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

## 2 方法

### 2.1 大青龙汤的 UPLC-QE-HF-MS/MS 分析

**2.1.1 样品处理** 将大青龙汤煎煮液进行冻干处理, 精确称量适量样本于离心管中, 加入含 2-氯-L-苯丙氨酸的甲醇, 涡旋振荡 30 s; 放入组织研磨器中 55 Hz 研磨 60 s; 室温超声 15 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μm 膜滤过, 滤液加入到检测瓶中, 用于 LC-MS 检测。

**2.1.2 色谱条件** 超高效液相系统使用 Acquity UPLC® HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 2 μL。正离子模式, 流动相为 0.1%甲酸乙腈(B2)和 0.1%甲酸水溶液(A2), 梯度洗脱: 0~1 min, 8% B2; 1~8 min, 8%~98% B2; 8~10 min, 98% B2; 10~10.1 min, 98%~8% B2; 10.1~12 min, 8% B2。负离子模式, 流动相为乙腈(B3)和 5 mmol/L 甲酸铵水溶液(A3), 梯度洗脱: 0~1 min, 8% B3; 1~8 min, 8%~98% B3; 8~10 min, 98% B3; 10~10.1 min, 98%~8% B3; 10.1~12 min, 8% B3。

**2.1.3 质谱条件** 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为-2.50 kV, 鞘气体积流量 40 arb, 辅助气体体积流量 10 arb。毛细管温度 325 °C, 以分辨率 60 000 进行一级全扫描, 一级离子扫描范围  $m/z$  100~1 000, 并采用 HCD 进行二级裂解, 碰撞能量为 30%, 二级分辨率为 15 000, 采集信号前 4 离子进行碎裂。

**2.1.4 成分鉴定** 上机完成之后, LC-MS 原始数据导入代谢组学处理软件 Progenesis Q1 (Waters Corporation, Milford, 美国)进行基线滤过、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐, 最终得到 1 个

保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵, 同时将 MS 和 MS/MS 质谱信息与美吉自建中药专属代谢物数据库(MJBIOTCM)进行匹配, MS 质量误差设置为  $<1 \times 10^{-5}$ , 同时根据二级质谱匹配得分鉴定代谢物。

### 2.2 动物分组、造模与给药

选取 ICR 小鼠 78 只, 其中 60 只按体质量随机分为对照组、模型组、奥司他韦(27.5 mg/kg)组和大青龙汤高、中、低剂量(23.10、11.55、5.78 g/kg)组, 每组 10 只。另外 18 只小鼠随机分为对照组、模型组和大青龙汤中剂量(11.55 g/kg)组, 每组 6 只, 用于蛋白质组学研究。除对照组外, 将其余各组小鼠用异戊烷轻度麻醉, 以 15 个半数致死量(LD<sub>50</sub>)甲型流感病毒(H1N1/PR8)滴鼻感染, 35 μL/只<sup>[13-15]</sup>。感染 1 h 后 ig 相应药物(20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 4 d。第 5 天称定体质量后, 眼球取血并脱颈椎处死, 解剖取出肺组织。

### 2.3 小鼠肺部影像学检查

在动物感染第 4 天, 将小鼠用异氟烷轻度麻醉后, 用小动物活体 CT 成像仪进行小鼠肺部影像学检查。

### 2.4 小鼠肺组织炎症因子检测

用预冷的 PBS 冲洗小鼠肺叶, 去除残留血液, 称定质量后将组织剪碎。将剪碎的组织装入匀浆管中, 按 1:10 的比例加入 PBS, 匀浆后取上清液, 按照试剂盒说明书检测肺组织中炎症因子 TNF-α、IFN-γ 和 IL-6 水平。

### 2.5 肺组织病毒载量检测

取 1 片完整肺叶于匀浆管中, 加入 TRIzol 试剂 1 mL, 匀浆后按说明书进行 RNA 提取, -80 °C 冰箱保存。按 PCR 试剂盒说明书配制扩增体系, 进行核酸检测, 45 °C 逆转录 10 min, 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s, 循环 40 次, 在仪器上选用 FAM 和 VIC 通道, 荧光信号采集阶段位于每个循环的 60 °C 期间。

### 2.6 外周血淋巴细胞水平测定

摘眼球取血 200 μL 于抗凝管中, 按流式抗体及红细胞裂解液说明书进行染色和红细胞裂解, 加入 PBS 10 mL 终止裂解, 于 4 °C、2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入含 2%胎牛血清的 PBS 及 4%甲醛溶液各 100 μL 重悬细胞, 于 4 °C 避光保存<sup>[16]</sup>, 用于 T 细胞和 B 细胞的检测。

### 2.7 小鼠肺组织病理学观察

取小鼠左肺上叶固定在 4%多聚甲醛溶液中,组织经固定、脱水、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色后,在显微镜下观察小鼠肺组织中肺泡、间质和支气管的损伤程度。

### 2.8 肺组织蛋白质组学分析

对小鼠肺组织进行蛋白提取,BCA法测定蛋白含量后,进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白酶解后,用 HLB 使肽段脱盐,肽段定量后采用色谱仪进行肽段分离,然后通过 Astral-DIA 质谱仪进行质谱分析。将 DIA 原始数据导入 Spectronaut™软件系统进行分析。所有数据均上传到美吉云平台 (cloud.majorbio.com) 进行分析。采用 R 语言中的 *t* 检验函数计算组间差异显著性 *P* 值和差异倍数。显著性检验 *P* < 0.05, 同时差异倍数 > 1.2 倍的蛋白为差异表达蛋白<sup>[17]</sup>。

### 2.9 Western blotting 检测肺组织 NFAT5、ZAP70 蛋白表达

提取小鼠肺组织总蛋白,BCA法测定蛋白浓

度。蛋白样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于 5%牛血清白蛋白-TBST 中封闭 1 h,加入一抗,4 °C 孵育过夜;次日 TBST 洗膜 3 次,加入二抗,室温孵育 40 min, ECL 反应 3 min 后曝光显影。用 Image J 软件分析条带灰度值。

### 2.10 统计学分析

数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计学处理,符合正态分布者以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 大青龙汤的 UPLC-QE-HF-MS/MS 分析

UPLC-QE-HF-MS/MS 分析采用正、负离子 2 种模式。大青龙汤的基峰强度色谱图如图 1 所示。在正离子模式下鉴定出 52 种化合物(表 1),包括(+)-去甲麻黄碱、伪麻黄碱、肉豆蔻素、表儿茶素、丁香酚等。在负离子模式下鉴定出 25 种化合物(表 1),包括缬草酸、反式阿魏酸、苦杏仁苷、儿茶素、木犀草素等。这些化合物具有多种药理作用,如抗炎、抗病毒和免疫调节<sup>[18-20]</sup>。

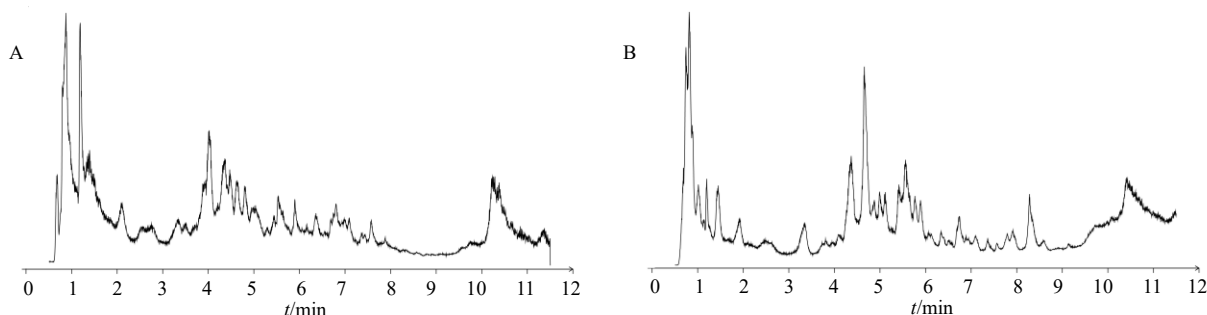


图 1 大青龙汤在正 (A)、负 (B) 离子模式下的代表性基峰强度色谱图

Fig. 1 Representative base peak intensity chromatograms of Daqinglong Decoction in positive (A) and negative (B) modes

表 1 大青龙汤中主要成分的鉴定

Table 1 Identification of major components in Daqinglong Decoction

编号	化学成分	<i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub>/s</i>	化学式	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	离子模式
1	3- <i>O</i> -没食子酸甲酯	185.04	73	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	4.41	正离子
2	东莨菪苷	156.10	76	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	5.61	正离子
3	(+)-去甲麻黄碱	152.11	141	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO	3.79	正离子
4	4-羟基肉桂酰基甲烷	163.06	189	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	5.78	正离子
5	伪麻黄碱	166.12	189	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO	0.95	正离子
6	肉豆蔻素	193.08	233	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	6.61	正离子
7	毛果芸香碱	209.13	234	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.77	正离子
8	表儿茶素	291.09	237	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	3.70	正离子
9	1-脱氢-[6]姜二酮	291.17	240	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	7.42	正离子
10	3,4-二羟基扁桃酸	185.04	242	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	4.59	正离子
11	丁香酚	165.08	262	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	4.97	正离子
12	胡椒醛	151.04	273	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3.81	正离子
13	针叶树醇	181.09	278	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	7.31	正离子
14	紫苏醇	135.12	279	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	6.66	正离子
15	( <i>R</i> )-扁桃酸	135.04	279	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	3.63	正离子
16	牡荆素	433.11	282	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	7.56	正离子

表 1 (续)

编号	化学成分	<i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub>/s</i>	化学式	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	离子模式
17	白藜芦醇	229.09	286	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	3.39	正离子
18	木犀草素 7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸	463.08	288	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	9.88	正离子
19	芥子醇	193.09	289	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	6.21	正离子
20	反肉桂酸	131.05	291	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	6.06	正离子
21	肉桂酸甲酯	163.07	291	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	3.19	正离子
22	牻牛儿醇	137.13	297	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	8.02	正离子
23	8- <i>C</i> -葡糖基柚皮素	435.17	304	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	7.75	正离子
24	芹菜素 7- <i>O</i> -新橙皮苷	579.17	307	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	5.74	正离子
25	$\alpha$ -细辛脑	209.12	318	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	4.97	正离子
26	东莨菪内酯	193.05	320	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	7.13	正离子
27	香叶酸	169.12	328	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	0.14	正离子
28	大豆黄酮	255.06	333	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	6.18	正离子
29	二氢辣椒素	308.22	355	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	6.99	正离子
30	天竺葵色素	271.06	356	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	8.85	正离子
31	芹菜脑	223.09	359	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	1.27	正离子
32	肉桂酸乙酯	177.09	365	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	4.95	正离子
33	牻牛儿醇	153.13	379	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	4.41	正离子
34	3-甲氧基芹菜素	301.07	379	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	4.24	正离子
35	人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	767.50	381	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	8.90	正离子
36	山柰素	301.07	386	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1.22	正离子
37	异阿魏酸	195.06	392	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	3.98	正离子
38	青蒿素	265.14	404	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	9.56	正离子
39	水飞蓟素	465.11	405	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	5.52	正离子
40	异甘草素	257.08	408	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	8.85	正离子
41	穿心莲内酯	333.20	414	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	4.00	正离子
42	石蒜碱	288.12	417	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	1.83	正离子
43	儿茶酚	110.02	428	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	0.98	正离子
44	山柰酚	287.05	445	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	8.63	正离子
45	甲基条叶萹素	313.07	447	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	4.58	正离子
46	姜黄素	369.13	449	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	5.35	正离子
47	石竹烯 $\alpha$ -氧化物	221.19	471	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	5.32	正离子
48	香紫苏醇	291.27	518	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	6.18	正离子
49	山楂酸	455.35	526	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	6.29	正离子
50	$\alpha$ -柏木烯	205.19	560	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	6.22	正离子
51	$\gamma$ -松油烯	137.13	564	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	5.66	正离子
52	白桦脂酸	457.36	593	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	8.26	正离子
53	缬草酸	101.06	44	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	6.96	负离子
54	龙胆二糖	323.10	52	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	6.53	负离子
55	辛酸	125.10	69	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1.68	负离子
56	反式阿魏酸	193.05	91	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	3.45	负离子
57	异柠檬酸	191.02	115	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	5.88	负离子
58	烟酸	122.02	120	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	1.84	负离子
59	2-羟基肉桂酸	163.04	141	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	7.51	负离子
60	羟异梔子苷	403.13	147	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	3.41	负离子
61	瓜瓞珀酸	174.96	219	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2.71	负离子
62	扁桃酸	151.04	235	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.04	负离子
63	2-焦儿茶酸	153.02	243	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.84	负离子
64	苦杏仁苷	456.15	247	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>11</sub>	1.53	负离子
65	龙胆酸醛	137.02	255	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	2.01	负离子
66	儿茶素	289.07	258	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	4.41	负离子
67	龙胆酸	153.02	259	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	3.66	负离子
68	黄芩苷	269.05	330	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0.83	负离子
69	3- <i>O</i> -甲基槲皮素	315.05	360	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	9.28	负离子
70	视黄醇	285.06	385	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	9.35	负离子
71	(2 <i>S</i> )-甘草苷元	255.06	412	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	5.84	负离子
72	芒柄花黄素	267.06	421	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	7.11	负离子
73	甲基条叶萹素	343.08	427	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	8.23	负离子
74	芹菜素	269.04	443	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	7.81	负离子
75	异泽兰黄素	343.08	447	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	8.52	负离子
76	木犀草素	285.04	458	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	8.50	负离子
77	毛蕊花糖苷	623.20	513	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	2.28	负离子

### 3.2 大青龙汤对感染小鼠肺组织结构影像学的影响

在感染小鼠第4天进行CT影像学检查，CT图和肺部影像三维渲染图(3D图)显示，对照组小鼠两肺纹理清晰，走向分布无异常，肺实质未见渗出或占位性病变；模型组小鼠肺部出现块状浸润阴影，可见大片的实变影和弥漫性磨玻璃影，提示肺纤维化；与模型组相比，各给药组肺部结构较为完整，磨玻璃影分布减少(图2)。

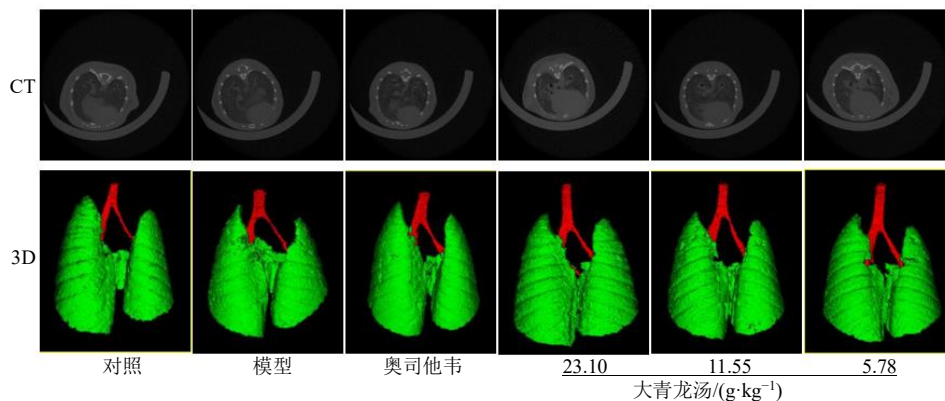
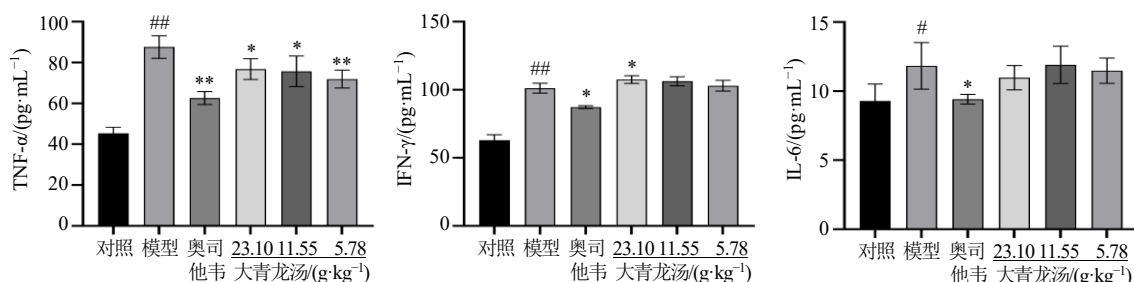


图2 大青龙汤对感染小鼠肺组织影像学的影响

Fig. 2 Effect of Daqinglong Decoction on imaging of lung tissue structure in infected mice



与对照组比较: #*P*<0.05 ##*P*<0.01; 与模型组比较: \**P*<0.05 \*\**P*<0.01, 下图同。  
#*P*<0.05 ##*P*<0.01 vs control group; \**P*<0.05 \*\**P*<0.01 vs model group, same as below figures.

图3 大青龙汤对感染小鼠肺组织炎症因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of Daqinglong Decoction on levels of inflammatory factors in lung tissue of infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.4 大青龙汤对感染小鼠肺组织病毒载量的影响

如表2所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中病毒载量显著升高(*P*<0.01)；与模型组比较，各给药组肺组织中病毒载量均显著降低(*P*<0.01)。

### 3.5 大青龙汤对感染小鼠外周血淋巴细胞比例的影响

如图4所示，与对照组比较，模型组小鼠外周血T淋巴细胞CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>明显降低(*P*<0.05)，B淋巴细胞比例显著降低(*P*<0.01)；与模型组比较，各给药组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>显著升高(*P*<0.05、0.01)，奥司他韦组B淋巴细胞比例显著升高(*P*<0.01)。

### 3.3 大青龙汤对感染小鼠肺组织炎症因子水平的影响

如图3所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中TNF-α、IFN-γ、IL-6水平显著升高(*P*<0.05、0.01)；与模型组比较，各给药组TNF-α水平显著降低(*P*<0.05、0.01)，奥司他韦组IFN-γ、IL-6水平显著降低(*P*<0.05)，大青龙汤高剂量组抗病毒蛋白IFN-γ水平显著升高(*P*<0.05)。

表2 大青龙汤对感染小鼠肺组织病毒载量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of Daqinglong Decoction on viral load in lung tissue of infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	病毒载量/( $\times 10^9$ copies·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	0.00 ± 0.00
模型	—	3.53 ± 0.66##
奥司他韦	27.5 mg·kg <sup>-1</sup>	1.49 ± 0.65**
大青龙汤	23.10 g·kg <sup>-1</sup>	1.60 ± 0.30**
	11.55 g·kg <sup>-1</sup>	1.92 ± 0.47**
	5.78 g·kg <sup>-1</sup>	1.97 ± 0.59**

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

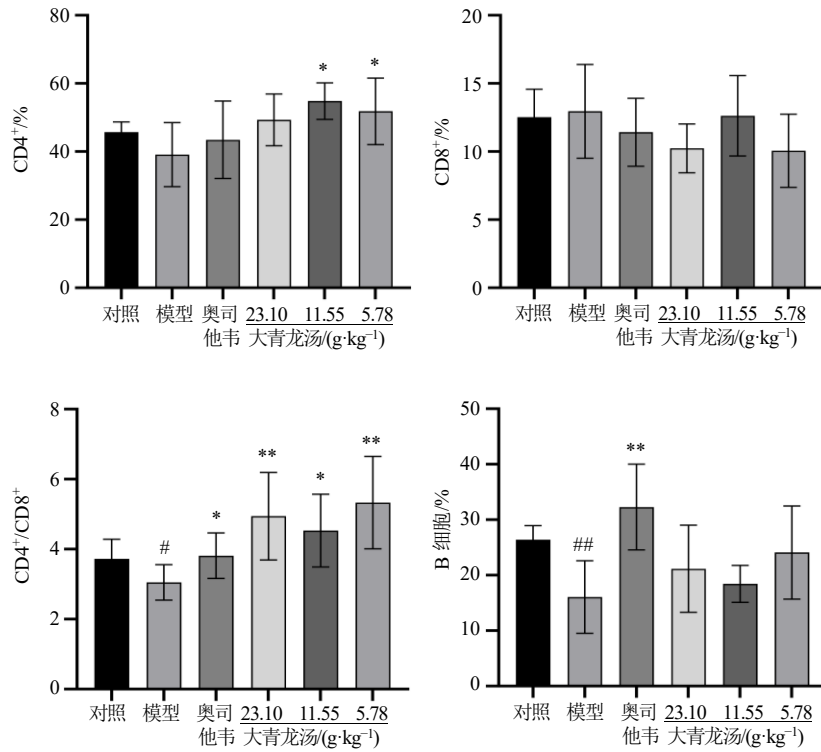


图4 大青龙汤对感染小鼠外周血淋巴细胞水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effect of Daqinglong Decoction on level of peripheral blood lymphocytes in infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.6 大青龙汤对感染小鼠肺组织病理变化的影响

各组小鼠肺组织 HE 染色结果 (图 5) 显示, 对照组小鼠肺组织结构清晰, 肺泡表面光滑, 无明显变形或破裂, 呼吸道上皮细胞排列整齐, 间质未见纤维组织增生和炎症细胞浸润。与对照组比较, 模型组小鼠肺组织可见大量肺泡出血、水肿、坏死, 肺泡间隔轻微至中度增厚, 伴大量炎症细胞浸润,

以淋巴细胞和单核细胞为主, 支气管黏膜上皮细胞变性、坏死, 管腔可见大量坏死脱落的上皮和炎症细胞。与模型组相比, 各给药组小鼠肺部病变均有一定程度的减轻。其中, 奥司他韦组及大青龙汤高、中剂量组的肺炎、肺间质炎和支气管损伤较模型组均有所减轻; 大青龙汤低剂量组与模型组比较炎性细胞有所改善。

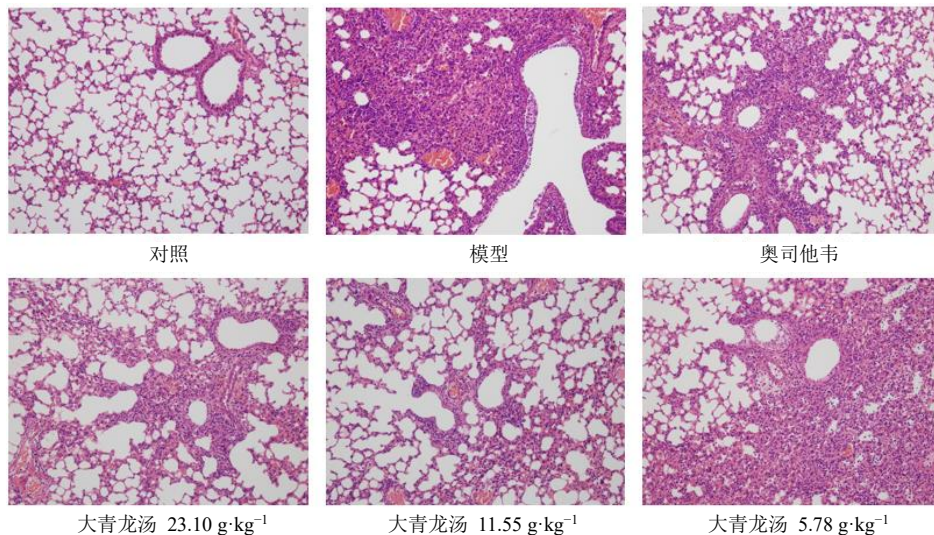


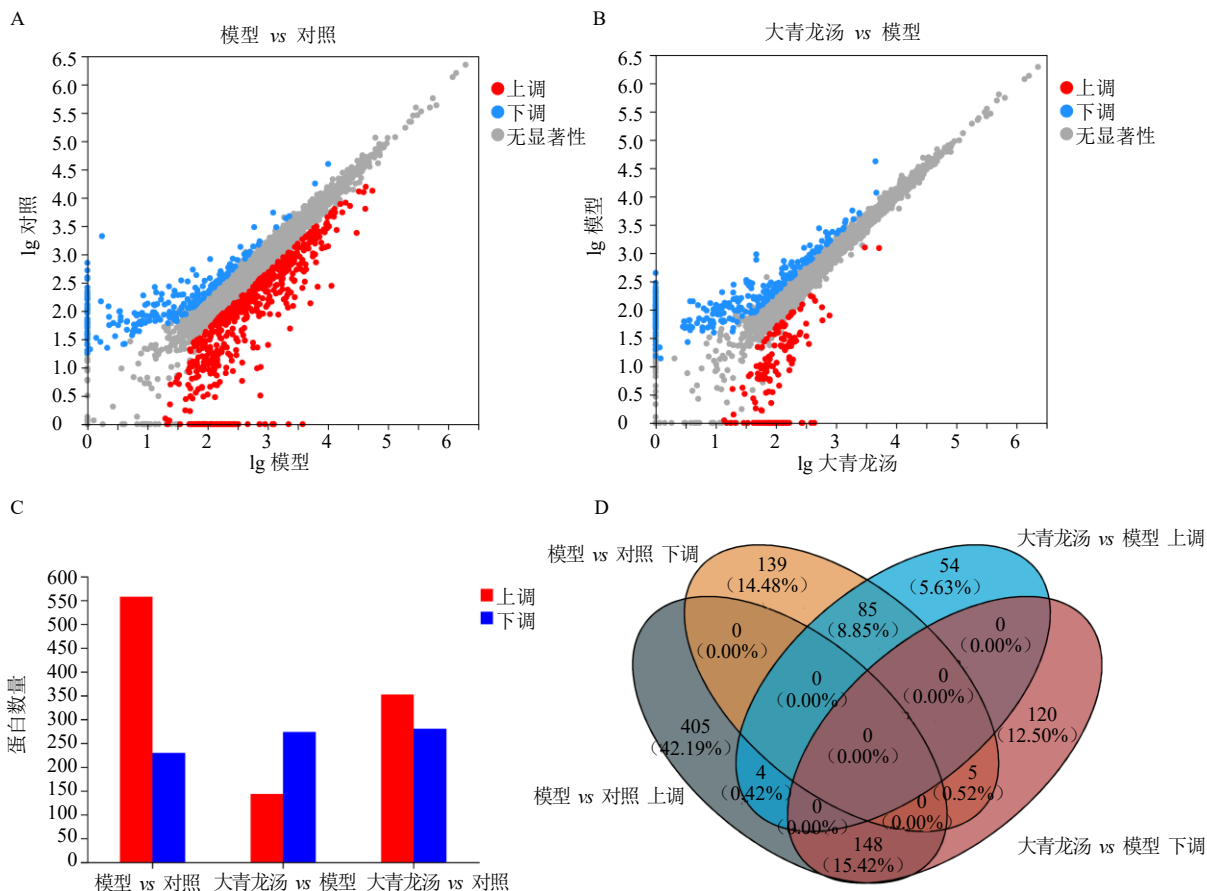
图5 大青龙汤对感染小鼠肺组织病理变化的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 5 Effect of Daqinglong Decoction on pathological changes of lung tissue in infected mice (HE,  $\times 200$ )

### 3.7 大青龙汤对感染小鼠肺组织蛋白表达的影响

**3.7.1 差异表达蛋白的表征** 经蛋白质组学分析和数据库检索，对照组、模型组和大青龙汤中剂量组共鉴定出 1 834 个差异表达蛋白。与对照组相比，模型组共鉴定出 786 种差异蛋白，其中上调蛋白 557 种，下调蛋白 229 种（图 6-A、C）。与模型组相比，

大青龙汤中剂量组共鉴定出 416 个差异蛋白，其中上调蛋白 352 种，下调蛋白 280 种（图 6-B、C）。与对照组相比模型组上调，且与模型组相比大青龙汤组下调的蛋白共有 148 种；与对照组相比模型组下调，且与模型组相比大青龙汤组上调的蛋白共有 85 种（图 6-D）。



A-模型组与对照组的差异蛋白散点图；B-大青龙汤组与模型组的差异蛋白散点图；C-差异蛋白统计柱形图；D-差异蛋白韦恩图。  
A-scatter plot of differential proteins between model group and control group; B-scatter plot of differential proteins between Daqinglong Decoction group and model group; C-statistical bar chart of differential proteins; D-Venn diagram of differential protein.

图 6 差异表达蛋白的表征

Fig. 6 Characterization of differential expressed proteins

**3.7.2 基因本体 (gene ontology, GO) 注释分析** 如图 7 所示，生物过程注释表明，大青龙汤治疗病毒性肺炎小鼠的差异表达蛋白主要与细胞过程、生物调控、代谢过程、对刺激的反应、发育过程、定位、多细胞生物过程、免疫系统过程、生物体种间相互作用的生物学过程相关。细胞成分注释表明，差异表达蛋白主要与细胞解剖实体和含蛋白质复合物有关。分子功能注释表明，差异表达蛋白主要参与结合、催化活性、分子功能调节活性、转运活性、转录调节活性和分子转换器活性。

**3.7.3 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析** KEGG 通路富集分析（图 8）显示，大青龙汤对病毒性肺炎小鼠的作用主要参与 IgA 产生的肠道免疫网络、Th1、Th2 和 Th17 细胞分化、吞噬体 ( $P < 0.05$ )。

**3.7.4 蛋白质-蛋白质相互作用分析** 如图 9 所示，差异表达蛋白主要与转运及免疫系统相关，这些蛋白包括鞭毛内转运蛋白 81 (intraflagellar transport protein 81 homolog, Ift81)、ZAP70、NFAT5、甲基

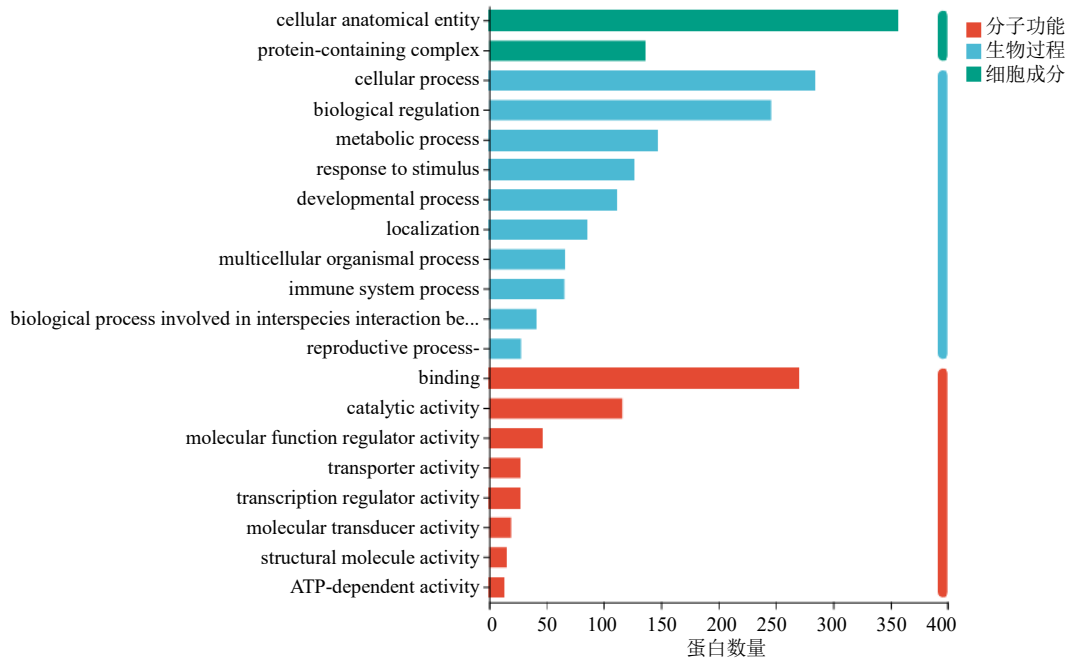


图 7 大青龙汤中剂量组与模型组差异表达蛋白的 GO 注释分析

Fig. 7 GO annotation analysis of differential expressed proteins between Daqinglong Decoction medium-dose group and model group

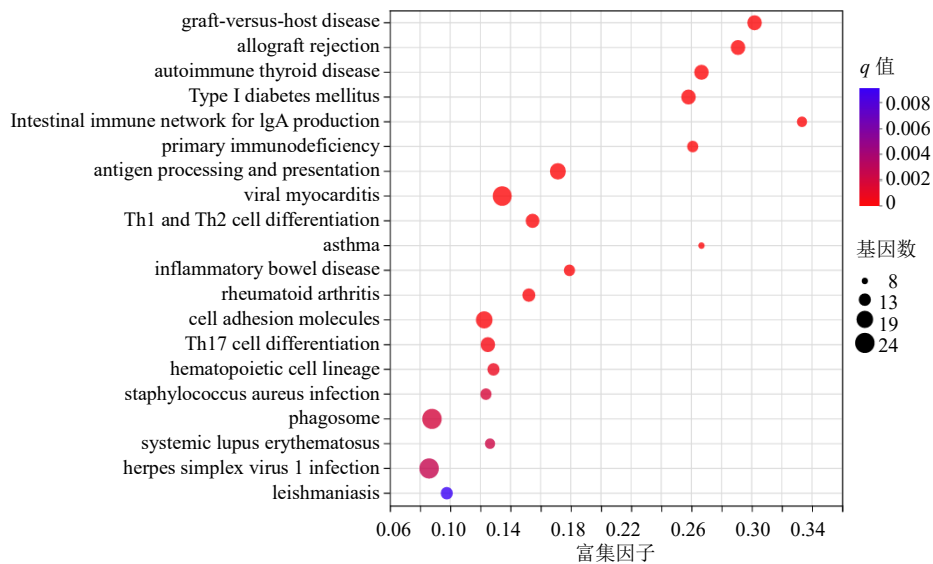


图 8 大青龙汤中剂量组与模型组差异表达蛋白的 KEGG 通路富集分析

Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis of differential expressed proteins between Daqinglong Decoction medium-dose group and model group

巴豆酰基辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基 (methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, Mccc1)、生物素-蛋白质连接酶 (holocarboxylase synthetase, Hlcs)、核蛋白 10 (nucleolar protein 10, Nol10) 和核受体辅

激活因子 6 (nuclear receptor coactivator 6, Ncoa6)。此外,这些差异表达蛋白位于 PPI 网络的关键节点,表明大青龙汤对病毒性肺炎小鼠的作用机制可能涉及对免疫系统的抗病毒和抗炎作用。

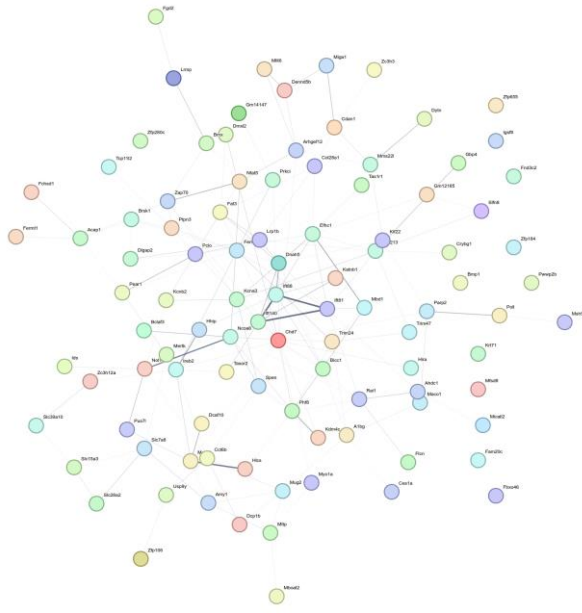


图9 大青龙汤中剂量组与模型组差异表达蛋白的 PPI 分析  
 Fig. 9 PPI analysis of differential proteins between Daqinglong Decoction medium-dose group and model group

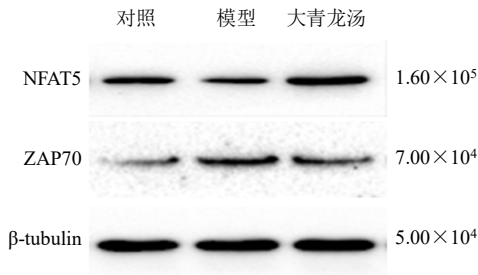


图10 大青龙汤对感染小鼠肺组织 NFAT5、ZAP70 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effect of Daqinglong Decoction on NFAT5 and ZAP70 protein expressions in lung tissue of infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

无明显影响。结合肺组织 CT 影像学和病理学结果分析，大青龙汤减轻了小鼠肺纤维化程度，减少肺的器质性病变，保持肺的结构完整性，从而维持肺的正常生理功能。流式细胞术检测结果表明，大青龙汤能明显提高感染小鼠外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例，对 B 细胞的增殖也有一定的促进作用。流感病毒入侵时，宿主的 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞接受抗原，启动特异性细胞免疫，清除病原体<sup>[22]</sup>。实验证实大青龙汤对甲型流感病毒引起的小鼠病毒性肺炎具有治疗作用。

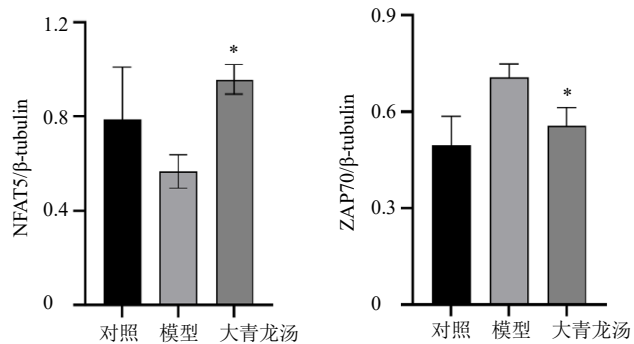
在明确大青龙汤的治疗效果后，通过蛋白质组学和 Western blotting 实验进一步探讨大青龙汤治疗

### 3.8 大青龙汤对感染小鼠肺组织 NFAT5、ZAP70 蛋白表达的影响

如图 10 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织 ZAP70 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )，NFAT5 蛋白表达水平呈降低趋势；与模型组比较，大青龙汤中剂量组小鼠肺组织中 ZAP70 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )，NFAT5 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。

### 4 讨论

甲型流感病毒感染常见病毒性肺炎的发生，在此过程中宿主会经历细胞因子风暴，分泌大量的炎症因子，造成组织器官病理损伤<sup>[21-22]</sup>。大青龙汤是中医经典方剂之一，有上千年的临床应用历史，主要用于外感风寒、内有郁热证的治疗。然而，大青龙汤对病毒性肺炎的治疗作用缺乏现代理解，其作用机制也尚未明确。本研究发现大青龙汤可显著降低感染小鼠肺组织的病毒载量，并明显抑制感染小鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  水平，但对 IL-6、IFN- $\gamma$  水平



病毒性肺炎的作用机制。蛋白质组学结果显示甲型流感病毒感染与 IgA 产生的肠道免疫网络、Th1、Th2 和 Th17 细胞分化、吞噬体、T 细胞介导的免疫密切相关。为了研究大青龙汤对感染小鼠体内 T 细胞免疫的影响，检测了小鼠肺组织中 NFAT5 和 ZAP70 的蛋白表达量，发现大青龙汤可以显著上调 NFAT5 的表达，并下调 ZAP70 的表达，揭示了大青龙汤通过调节 T 细胞免疫治疗病毒性肺炎的机制。

综上，大青龙汤对病毒性肺炎具有治疗作用，大青龙汤通过降低肺组织病毒载量、抑制炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达、提高外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 B 细胞水平以及调节 NFAT5 和 ZAP70 相关的 T 细胞免

疫发挥抗病毒作用，为大青龙汤治疗病毒性肺炎的深入研究提供了理论基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] 孙宇新, 陈明泉. 流行性感对继发性肺部细菌性感染易感性影响的研究进展与前景 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2024, 24(6): 736-741.

[2] 白洁, 张新庄, 刘恣璇, 等. 金振口服液抑制小鼠流感病毒性肺炎的药效及机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(3): 6.

[3] 肖佩玉, 万正兰, 黄际薇. 大青龙汤对流感病毒感染小鼠血清与肺组织中免疫因子的影响研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(3): 537-539.

[4] 唐力琼, 胡亚波, 余峥嵘, 等. 大青龙汤加味治疗小儿甲型流行性感冒表寒里热证 30 例临床观察 [J]. 中医儿科杂志, 2023, 19(6): 50-53.

[5] 张会杰, 陈桂敏. 大青龙汤治疗外寒内热病证临床研究 [J]. 医学研究与教育, 2020, 37(6): 48-53.

[6] 卢霞, 高海光, 渠述生. 大青龙汤治疗外寒内热证型小儿哮喘的临床效果以及对 IgE、IL-4 和 TNF- $\alpha$  水平的影响 [J]. 世界中医药, 2019, 14(11): 2950-2954.

[7] Chiu C, Openshaw P J. Antiviral B cell and T cell immunity in the lungs [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(1): 18-26.

[8] Blanchard N, Di Bartolo V, Hivroz C. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern [J]. *Immunity*, 2002, 17(4): 389-399.

[9] Fischer A, Picard C, Chemin K, et al. ZAP70: A master regulator of adaptive immunity [J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(2): 107-116.

[10] Qiu Y, Ye X, Zhang H M, et al. Cleavage of osmosensitive transcriptional factor NFAT5 by Cocksackieviral protease 2A promotes viral replication [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(12): e1006744.

[11] Zhao G Z, Aghakeshmiri S, Chen Y T, et al. NFAT5-mediated signalling pathways in viral infection and

cardiovascular dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4872.

[12] 李冀. 方剂学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 76.

[13] 郭姗姗, 高英杰, 马雪萍, 等. 一叶抗流感胶囊抑制甲型 H1N1 流感病毒感染的体内外研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 123-127.

[14] 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.

[15] 孙建辉, 郝莉雨, 李宗源, 等. 小儿风热清合剂 (口服液) 对流感病毒致小鼠病毒性肺炎的影响 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2740-2746.

[16] Pang B, Zhao R H, Peng B, et al. Pharmacological effects and mechanism of Kaihoujian Throat Spray (children's type) in the treatment of pediatric acute pharyngitis and tonsillitis [J]. *Heliyon*, 2023, 9(7): e17802.

[17] Kuang W Y, Yang J J, Liu Z Y, et al. Catechin mediates ferroptosis to exert an anti-inflammatory effect on RAW264.7 cells [J]. *Foods*, 2022, 11(11): 1572.

[18] Xu H Y, Li S F, Liu J Y, et al. Bioactive compounds from Huashi Baidu Decoction possess both antiviral and anti-inflammatory effects against COVID-19 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(18): e2301775120.

[19] 杨玲, 刘杰, 李江平, 等. 麻黄碱介导 TSLP/OX40L 通路调节变应性鼻炎大鼠 Th2 型免疫反应的作用研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 319-323.

[20] 周永君, 张静, 巫波, 等. 青蒿琥酯对甲型流感病毒肺炎的治疗作用研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2022, 53(6): 1055-1060.

[21] 孙强, 雷娜, 鲁健, 等. 甲型流感病毒感染野生型和 Ifitm3<sup>-/-</sup>小鼠的纵膈淋巴结的转录组学研究 [J]. 病毒学报, 2020, 36(3): 415-420.

[22] Yang M, Zhang X, Liu Q, et al. Network pharmacology, molecular docking, and untargeted metabolomics reveal molecular mechanisms of multi-targets effects of Qingfei Tongluo Plaster improving respiratory syncytial virus pneumonia [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 638-655.

[责任编辑 李亚楠]