

· 药理 ·

葛根汤颗粒对人冠状病毒229E寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠肺炎模型的治疗作用

耿子涵¹, 鲍岩岩¹, 包蕾¹, 赵荣华¹, 孙静¹, 时宇静¹, 郭姗姗¹,
陶夏莉², 高英杰¹, 崔晓兰^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 瑞阳制药股份有限公司, 山东 淄博 256100)

[摘要] 目的: 研究葛根汤颗粒对人冠状病毒229E(hCoV-229E)寒湿疫毒袭肺证病证结合肺炎小鼠的治疗作用。方法: BALB/c小鼠分为正常组、感染组、寒湿组、模型组、磷酸氯喹组(0.18 g·kg⁻¹)、干扰素α2b(IFN-α2b)组(1.83×10⁶ U·kg⁻¹)及葛根汤颗粒高、低剂量组(6.6、3.3 g·kg⁻¹), 每组10只, 采用寒湿环境加hCoV-229E感染进行造模并给药。观察小鼠一般状态及肺指数, 使用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织病毒载量, 用苏木素-伊红(HE)染色法评价肺组织病变, 运用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清胃肠激素、肺组织炎症因子的水平, 利用流式细胞术检测外周血淋巴细胞百分比。结果: 葛根汤颗粒能够明显缓解模型小鼠精神萎靡、四肢无力、大便黏腻等状态; 葛根汤颗粒高剂量组能够明显降低模型小鼠的肺指数、组织病理学评分、血清胃动素水平($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 葛根汤颗粒高、低剂量组均可明显升高血清胃泌素水平($P<0.05$, $P<0.01$), 明显升高外周血CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比($P<0.05$, $P<0.01$), 显著降低肺组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平($P<0.01$), 并使白细胞介素-6(IL-6)水平呈现降低趋势。结论: 葛根汤颗粒能够改善hCoV-229E寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠的一般体征, 调节胃肠激素水平, 降低肺指数和肺组织病理学评分, 并可能通过抑制肺组织中炎症细胞因子、恢复外周血淋巴细胞百分比发挥免疫调节作用, 从而对模型小鼠起到治疗作用。

[关键词] 葛根汤颗粒; 寒湿疫毒袭肺证; 病毒性肺炎; 人冠状病毒229E(hCoV-229E); 免疫调节; 白细胞介素(IL); 肿瘤坏死因子(TNF)

[中图分类号] R22;R28;R96;R563.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)19-0034-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220358

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220303.2041.008.html>

[网络出版日期] 2022-03-07 20:17

Therapeutic Effect of Gegentang Granules on Mouse Model with hCoV-229E Pneumonia and Hanshi Yidu Xifei Syndrome

GENG Zihan¹, BAO Yanyan¹, BAO Lei¹, ZHAO Ronghua¹, SUN Jing¹, SHI Yujing¹, GUO Shanshan¹,
TAO Xiali², GAO Yingjie¹, CUI Xiaolan^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Reyoung Pharmaceutical Co. Ltd., Zibo 256100, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the therapeutic effect of Gegentang granules on a disease-syndrome mouse model combining human coronavirus 229E (hCoV-229E) pneumonia with Hanshi Yidu Xifei syndrome *in vivo*. **Method:** Mice were randomly divided into normal group, infection group, cold-dampness group, model group, chloroquine phosphate group (0.18 g·kg⁻¹), interferon-α2b (IFN-α2b) group (1.83×10⁶ U·kg⁻¹), Gegentang granules high-dose and low-dose groups (6.6, 3.3 g·kg⁻¹) with 10 mice in each group. Cold-

[收稿日期] 2021-11-08

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2020YFE0205100)

[第一作者] 耿子涵, 博士, 副研究员, 从事免疫学及中药药理学研究, E-mail: zhgeng@icmm.ac.cn

[通信作者] * 崔晓兰, 博士, 研究员, 从事中药药理学研究, Tel: 010-84252805, E-mail: cuixiaolan2812@126.com

dampness environment and hCoV-229E infection were used for modeling, and the general status and lung index of mice in each group were observed. The viral load in lung tissue was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), the pathological changes in lung tissue were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining, the levels of serum gastrointestinal hormones and inflammatory factors in lung tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the percentage of peripheral blood lymphocytes was detected by flow cytometry. **Result:** Comparing with model group, Gegentang granules could significantly alleviate the physical signs of Hanshi Yidu Xifei syndrome, including listlessness, weakness of limbs, sticky stool, etc. Comparing with model group, Gegentang granules high-dose group significantly reduced lung index, histopathological score of interstitial lung and bronchus, and the level of serum motilin ($P < 0.05$, $P < 0.01$), two doses of Gegentang granules could significantly increase the level of serum gastrin ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the percentage of CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes in peripheral blood ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissue was significantly decreased ($P < 0.01$), and the level of interleukin-6 (IL-6) showed decreasing tendency. **Conclusion:** Gegentang granules has therapeutic effect on model mice. It can improve the appearance and behavior characterization, regulate the level of gastrointestinal hormones, decrease lung index and histopathological score, and possibly play an immunomodulatory role by inhibiting the expression of inflammatory cytokines in lung tissue and restoring the percentage of peripheral blood lymphocytes.

[Keywords] Gegentang granules; Hanshi Yidu Xifei syndrome; viral pneumonia; human coronavirus 229E (hCoV-229E); immune regulation; interleukin (IL); tumor necrosis factor (TNF)

冠状病毒是一类正链单股核糖核酸(RNA)病毒,轻则引起上呼吸道感染或肺部感染^[1-3],重则导致重症肺炎甚至死亡^[4-5]。筛选有效药物,并为其临床应用提供实验室数据支持,仍是当前中医药治疗冠状病毒肺炎的研究重点之一。

葛根汤颗粒由葛根、麻黄、白芍、桂枝、甘草、生姜、大枣组成,是治疗流行性感冒^[6]及新型冠状病毒肺炎^[7]的推荐用药,为外感病初起即太阳病阶段的代表方,适用于发热初起、无汗、恶寒、头痛、身体疼痛者。轻型新型冠状病毒肺炎常见发热、乏力、纳呆、恶心、呕吐、大便黏腻不爽等表现,被定性为寒湿证^[8-9],该证候的早中期表现为太阳病和(或)太阳阳明合病^[10],对此中医学认为应透邪解表。葛根汤颗粒的功能主治与寒湿证早中期的发病特点相吻合,但目前该制剂仅有治疗小儿风寒感冒、成人上呼吸道感染、甲型H1N1流感等的临床研究报道^[11-13],药理作用基础研究数据极少。在前期工作中,本课题组使用人冠状病毒229E(hCoV-229E)建立了寒湿疫毒袭肺证结合小鼠模型,该模型模拟了寒湿证的中医证候和冠状病毒肺炎的临床表现^[14],已被收录于国家动物模型资源共享信息平台,并已应用于评价咳清胶囊、金柴抗病毒胶囊等中成药的治疗作用^[15-17]。基于此,本研究拟利用该模型,从小鼠一般状态、肺指数、肺病毒载量、组织

病理学、胃肠激素水平探讨葛根汤颗粒对模型小鼠的治疗作用,并从肺组织炎症因子水平和外周血淋巴细胞百分比方面对其免疫调节机制进行初步探讨,以期为葛根汤颗粒的临床应用提供实验依据。

1 材料

MSC-Advantage 1.8型生物安全柜、371型二氧化碳培养箱(美国Thermo公司),YP1002型电子天平(上海越平科学仪器有限公司),AL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],AR1140型分析天平(美国奥豪斯仪器有限公司),ZJ-4型小鼠独立通风饲养笼(苏州教学笼具厂),RXZ-380B型人工气候箱(宁波江南仪器厂),QuantStudio 5型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Applied Biosystems公司),TP1020型全自动组织脱水机、EG1140H型石蜡包埋机、DM2500型显微数字照相生物显微镜、DMLB-HC型自动光学照相生物显微镜、XL5010型自动染色机(德国徕卡公司),HM355S型全自动轮转式切片仪(德国Micom公司),Centrifuge 5430型离心机(德国Eppendorf公司),LX-300型离心机、OL-901型涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),EnSpire型酶标仪(德国PerkinElmer公司),Accuri C6 Plus型流式细胞仪(美国BD公司),CKX41型倒置相差显微镜(日本奥林巴斯株式会社),SW-CJ-2FD型洁净工作台

(苏州安泰空气技术有限公司)。

葛根汤颗粒(瑞阳制药股份有限公司,批号20020522,国药准字Z20030077,规格6 g/袋,相当于生药量23.332 g/袋),磷酸氯喹片(四川升和药业股份有限公司,批号2002114),重组人干扰素 α 2b(IFN- α 2b)注射液(天津未名生物医药有限公司,批号RC191201),DMEM培养基、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)(美国康宁公司,批号分别为14019014、14819005、110519010、35081006),青霉素-链霉素双抗(美国Gibco公司,批号1796440),伊红染色液(北京化工厂,批号20150915),苏木素染色液(北京博瑞捷科技发展有限公司,批号DH0001/0405A17),切片石蜡(上海华灵康复器械厂,批号20170518),中性树胶(上海标本模型厂,批号20170815),小鼠白细胞介素-6(IL-6)Valukine™酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(批号951928、504890)、IL-10 Valukine™ ELISA试剂盒(批号796720)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(批号266117)、 γ 干扰素(IFN- γ)ELISA试剂盒(批号723795)均购自美国Bio-Techne公司,小鼠胃动素ELISA试剂盒(批号02/2020、03/2020)、小鼠胃泌素ELISA试剂盒(批号02/2020、03/2020)均购自上海酶联生物技术有限公司,hCoV-229E Real-time PCR试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司,批号P20191201),TRIZol试剂(美国Life Technologies公司,批号257403),多甲藻素叶绿素蛋白青色素串联偶联物5.5(PerCP-Cyanine5.5)标记的抗小鼠白细胞分化抗原4(CD4)(RM4-5)、别藻青蛋白(APC)标记的抗小鼠CD8a(53-6.7)、藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠CD45R(别称B220)(克隆号1D3)、10 \times 红细胞裂解液(美国Tonbo Biosciences公司,批号分别为C0042022020653、C0081101018203、C0452092418503、B4300083019TN),4%甲醛溶液(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号DE0094-500 mL)。

SPF级BALB/c小鼠80只,体质量(14 \pm 1) g,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0011,饲养于中国中医科学院中药研究所动物生物安全二级(ABSL-2)实验室。本实验中所有操作均遵循美国国立卫生研究院(NIH)及北京市实验动物伦理委员会的规定,并经过中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准,审批号2020D007。人胚肺细胞MRC-5细胞系购自北京北纳创联生物技术有限公司,由本室

进行传代,液氮中保存。hCoV-229E由中国医学科学院医药生物技术研究所以赠予,使用MRC-5细胞系进行病毒培养及传代,于-80℃保存,并于ABSL-2实验室进行动物感染实验。

2 方法

2.1 病毒传代 MRC-5细胞于含10% FBS的DMEM培养基中培养至融合率约95%,将培养基更换为含2% FBS的DMEM细胞维持液,加入hCoV-229E病毒液,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养72~96 h,每日在倒置显微镜下观察细胞病变情况,直至约80%的细胞出现明显病变,将培养瓶置于-80℃低温冰箱中冻融后5 000 r·min⁻¹离心3 min(离心半径9.5 cm,下同)取上清,于-80℃保存,按Reed-Muench法计算半数组织细胞感染剂量(TCID₅₀)。

2.2 造模及分组 按体质量等级随机选取20只小鼠正常饲养,作为正常组、感染组,每组10只,雌雄各半。其余60只小鼠作为寒湿组、寒湿感染组(模型组)、磷酸氯喹组、IFN- α 2b组、葛根汤颗粒高、低剂量组,每组10只,雌雄各半,进行寒湿证造模,造模方法为将小鼠置于温度(4 \pm 2)℃、相对湿度(90 \pm 3)%环境中,每天4 h,连续7 d,初次造模为第1天。其中,感染组、模型组、磷酸氯喹组、IFN- α 2b组、葛根汤颗粒高、低剂量组小鼠分别于造模第5、6天用乙醚轻度麻醉,以100倍TCID₅₀的hCoV-229E滴鼻感染。

2.3 给药 从造模第5天起给药,磷酸氯喹片口服剂量0.18 g·kg⁻¹·d⁻¹;IFN- α 2b采用雾化吸入给药,剂量1.83 \times 10⁶ U·kg⁻¹·d⁻¹。葛根汤颗粒高、低剂量组分别以临床2倍剂量和等倍剂量灌胃给药,即高剂量6.6 g·kg⁻¹·d⁻¹、低剂量3.3 g·kg⁻¹·d⁻¹(以颗粒剂质量计),药物用蒸馏水配制,给药体积20 mL·kg⁻¹·d⁻¹;其余各组分别以剂量20 mL·kg⁻¹·d⁻¹蒸馏水灌胃,每天1次,连续3 d。于第8天取材进行检测。

2.4 肺指数及其抑制率的计算 称量小鼠的体质量后解剖取肺并称定肺质量,用于肺指数及其抑制率的计算,公式为肺指数=(肺湿质量/体质量) \times 100,肺指数抑制率=(模型组肺指数-给药组肺指数)/(模型组肺指数-正常组肺指数) \times 100%。

2.5 肺组织病毒载量Real-time PCR检测 取1片完整肺叶,用液氮研磨成粉末,收集粉末置1.5 mL无RNA酶的离心管中,立即加入TRIZol试剂1 mL,按说明书进行RNA提取,-80℃冰箱保存。按PCR试剂盒说明书配制扩增体系,进行hCoV-229E核酸检测,45℃逆转录10 min,95℃预变性15 min,

95 °C变性 15 s, 60 °C退火 60 s, 循环 40 次后于 4 °C 保存, 在仪器上选用 FAM 和 HEX/VIC/JOE 通道, 荧光信号采集阶段位于每个循环的 60 °C 期间。

2.6 肺组织病理染色 取 1 片完整肺叶, 于 4% 甲醛溶液中固定组织后进行石蜡包埋及切片, 使用苏木素-伊红(HE)染色, 于显微镜下观察肺组织的病理改变。并参考 Szapiel 肺炎分级镜下观察标准^[18] 对肺和细支气管进行组织病理学评分。无炎性渗出、水肿或瘀血计为 0 分; 肺间质有轻度炎性渗出、瘀血, 肺细支气管及周围无明显炎症计为 1 分; 肺间质有局限性片状渗出性炎症、小片状出血, 肺细支气管周围轻度炎性渗出计为 2 分; 肺间质大面积出血, 肺组织内有渗出液、肺组织水肿, 急性肺泡衰亡、肺泡失去原有结构计为 3 分。

2.7 ELISA 检测 采集眼眶血于 1.5 mL 离心管中室温静置 30 min, 凝固后, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清至新的 1.5 mL 离心管内, -20 °C 保存, 用于血清胃动素、胃泌素的检测。称取肺组织 50 mg, 加入生理盐水 500 μL, 使用超声细胞破碎仪匀浆组织, 于 4 °C、1 万 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 分装后于 -80 °C 贮存, 用于肺组织中 IL-6 等炎性细胞因子水平的 ELISA 检测。按各 ELISA 试剂盒说明书加入样品、对照品, 并进行检测抗体和显色底物的孵育。显色反应终止后于 450 nm 处测定吸光度。

2.8 外周血淋巴细胞百分比检测 采集眼眶抗凝血 200 μL, 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⁻¹ 离心 5 min, 弃上清。加入含 2% FBS 的 PBS 及 4% 甲醛溶液各 100 μL 重悬细胞, 于 4 °C 避光保存, 用于 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的流式检测。

2.9 统计分析 采用 GraphPad Prism 7 和 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间差异比较, 当数据服从正态分布且方差齐性时, 使用单因素方差分析, 不满足正态分布或方差齐性时, 采用多个独立样本的非参数检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 葛根汤颗粒对模型小鼠一般状态的影响 与正常组比较, 寒湿组及模型组小鼠在第 1~4 天出现摄食和饮水减少, 恶寒懒动, 大便不成形、颜色变浅; 造模第 5 天开始, 感染组小鼠表现为毛发干枯、大便颜色变深, 而模型组小鼠则出现精神萎靡, 四肢无力, 大便增多、黏腻, 摄食和饮水减少, 体质量增长缓慢。与模型组比较, 给予 2 种剂量的葛根汤颗粒进行治疗后, 小鼠上述症状明显改善。

3.2 葛根汤颗粒对模型小鼠肺指数的影响 与正常组比较, 感染组和模型组的肺指数显著升高(P<0.01), 寒湿组肺指数则无明显变化。与模型组比较, 葛根汤颗粒高剂量组能明显降低肺指数(P<0.05), 抑制率为 59.49%, 抑制率高于抗病毒药物磷酸氯喹片及 IFN-α2b; 葛根汤颗粒低剂量组对肺指数的抑制率 25.20%, 但与模型组比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 葛根汤颗粒对模型小鼠肺指数、病毒载量、血清胃肠激素水平的影响

Table 1 Effect of Gegendang granules on lung index, viral load, serum motilin and gastrin levels in model mice

组别	剂量	肺指数 $\bar{x} \pm s$	肺指数 抑制率 /%	病毒载量 ($\bar{x} \pm s, n=6$) /copies·mL ⁻¹	胃动素 ($\bar{x} \pm s, n=6$) /ng·L ⁻¹	胃泌素 ($\bar{x} \pm s, n=6$) /ng·L ⁻¹	肺组织评分 ($\bar{x} \pm s, n=10$) /分	支气管评分 ($\bar{x} \pm s, n=10$) /分
正常组		0.67±0.04	-	-	111.80±23.32	20.18±7.19	0.00±0.00	0.00±0.00
感染组		0.83±0.05 ²⁾	-	126 879.56±93 157.85 ²⁾	109.02±11.98	19.94±3.41	2.20±0.63 ²⁾	2.30±0.67 ²⁾
寒湿组		0.69±0.03	-	-	152.66±14.42 ²⁾	8.93±2.39	1.00±0.67	1.40±0.52
模型组		0.87±0.07 ²⁾	-	106 074.09±30 450.05 ²⁾	160.69±8.88 ²⁾	9.40±1.31	2.70±0.48 ²⁾	2.60±0.52 ²⁾
磷酸氯喹组	0.18 g·kg ⁻¹	0.85±0.11	9.82	56 556.71±31 466.74	107.81±15.30 ⁴⁾	8.63±1.51	2.10±0.32	2.50±0.53
IFN-α2b组	1.83×10 ⁶ U·kg ⁻¹	0.79±0.11	40.38	67 073.16±16 010.53	121.85±11.32 ⁴⁾	8.12±1.51	1.70±0.48	1.20±0.42 ³⁾
葛根汤颗粒 高剂量组	6.6 g·kg ⁻¹	0.75±0.05 ³⁾	59.49	57 080.30±36 697.27	131.83±20.00 ³⁾	24.26±0.94 ⁴⁾	1.40±0.52 ⁴⁾	1.30±0.48 ³⁾
葛根汤颗粒 低剂量组	3.3 g·kg ⁻¹	0.82±0.09	25.20	77 411.78±49 306.16	143.12±20.52	28.73±7.47 ³⁾	2.00±0.47	1.60±0.84

注: 在肺指数结果中, 磷酸氯喹组的 n=7, 其余组 n=10; 与正常组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与模型组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01(表 2、表 3 同)

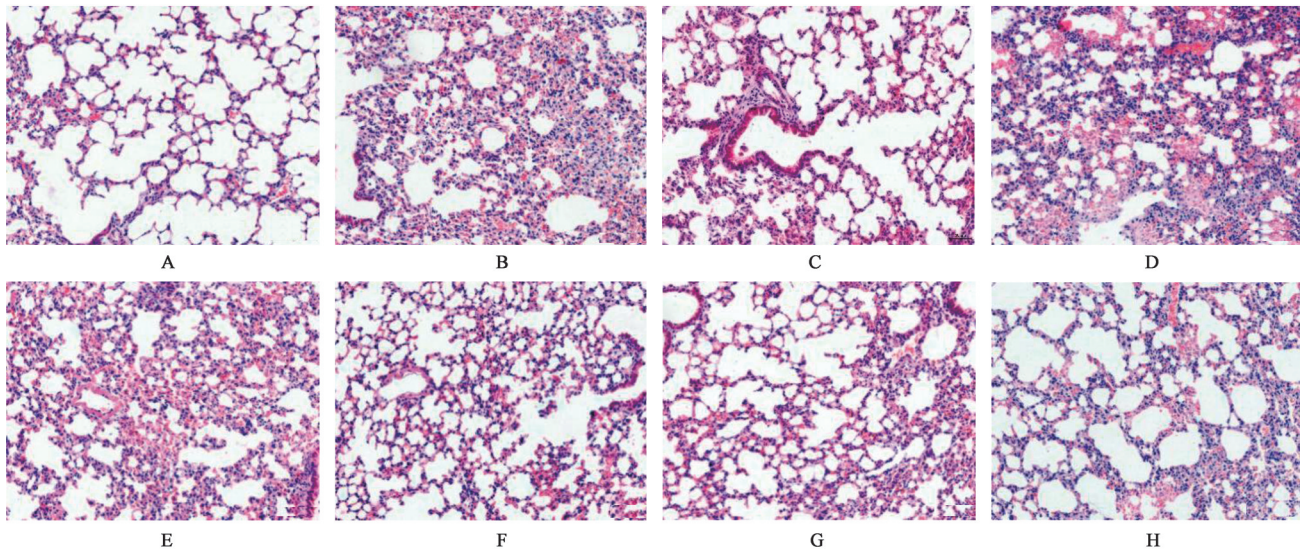
3.3 葛根汤颗粒对模型小鼠肺组织病毒载量的影响 感染组及模型组小鼠肺组织中可以检测到病

毒核酸, 而正常组及寒湿组小鼠肺组织中则无病毒核酸表达; 与模型组比较, 磷酸氯喹组、IFN-α2b 组、

葛根汤颗粒高、低剂量组病毒载量降低,但由于样本离散度较大、样本数量有限,差异无统计学意义。见表1。

3.4 葛根汤颗粒对小鼠肺组织病理学的影响 与正常组比较,感染组有较多炎性细胞浸润,肺泡壁明显增厚,肺泡结构异常,肺和支气管组织病理学评分差异有统计学意义($P<0.01$);寒湿组出现肺泡壁轻微增厚和炎性细胞浸润;模型组肺组织大量炎

性细胞浸润,肺泡壁明显增厚并充血、水肿,肺和支气管组织病理学评分差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,磷酸氯喹组对小鼠肺组织病变的影响不明显;IFN- $\alpha 2b$ 组、葛根汤颗粒高剂量组的肺组织炎性病变明显改善,其中葛根汤颗粒高剂量组的肺组织病理学评分明显降低($P<0.01$),IFN- $\alpha 2b$ 组、葛根汤颗粒高剂量组的支气管组织病理学评分明显降低($P<0.05$)。见图1和表1。



注:A.正常组;B.感染组;C.寒湿组;D.模型组;E.磷酸氯喹组;F. IFN- $\alpha 2b$ 组;G.葛根汤颗粒高剂量组;H.葛根汤颗粒低剂量组

图1 葛根汤颗粒对模型小鼠肺组织病理形态的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Gegendang granules on histopathological changes of lung tissue in model mice (HE, $\times 200$)

3.5 葛根汤颗粒对模型小鼠血清胃肠激素水平的影响 与正常组比较,寒湿组、模型组的胃动素水平显著升高($P<0.01$),胃泌素水平降低但差异无统计学意义。与模型组比较,磷酸氯喹组、IFN- $\alpha 2b$ 组及葛根汤颗粒高剂量组能够明显降低胃动素水平($P<0.05, P<0.01$),不同剂量的葛根汤颗粒可明显提高胃泌素水平($P<0.05, P<0.01$)。见表1。

3.6 葛根汤颗粒对模型小鼠外周血淋巴细胞百分比的影响 与正常组比较,感染组外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分比明显降低($P<0.05, P<0.01$),寒湿组 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比降低($P<0.01$),模型组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分比显著降低($P<0.01$),B 淋巴细胞百分比有降低趋势,但差异无统计学意义。与模型组比较,磷酸氯喹组 CD8⁺ T 淋巴细胞百分比显著升高($P<0.01$),IFN- $\alpha 2b$ 组、葛根汤颗粒高、低剂量组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分比均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

3.7 葛根汤颗粒对模型小鼠肺组织中炎性因子水平的影响 与正常组比较,感染组 IL-6 水平明显升

高($P<0.05$),模型组 IL-6、TNF- α 水平均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,磷酸氯喹组、IFN- $\alpha 2b$ 组、葛根汤颗粒高、低剂量组 TNF- α 水平均显著降低($P<0.01$),IL-6 水平有降低趋势但差异无统计学意义。见表3。

4 讨论

目前,已发现能够感染人类的冠状病毒共7种,其中 hCoV-229E 为 α 属冠状病毒,在感冒中较为常见,但也可引起肺部感染,在个别个体中甚至可引起严重急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[19-20]。由于重症急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒和新型冠状病毒等 β 属冠状病毒具有高致病性,需要在生物安全三级实验室中进行操作,相应的动物模型不适用于进行疫情应急或日常研究中的大量药物筛选。故本研究选择可在 ABSL-2 实验室操作的 hCoV-229E,从中医学辨证论治角度,用寒湿疫毒袭肺证病证结合模型,从中医寒湿证和冠状病毒感染引起的肺炎两方面进行模拟,以探讨葛根汤颗粒对该模型的治疗作用。

表2 葛根汤颗粒对模型小鼠外周血淋巴细胞百分比的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Gegentang granules on percentage of peripheral blood lymphocytes in model mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	CD4 ⁺ T淋巴细胞	CD8 ⁺ T淋巴细胞	B淋巴细胞
正常组		47.77±6.77	19.58±2.23	17.52±2.13
感染组		33.20±9.87 ¹⁾	9.47±6.66 ²⁾	12.58±14.05
寒湿组		29.23±15.88 ²⁾	14.51±6.28	19.65±10.90
模型组		23.63±16.62 ²⁾	9.48±6.52 ²⁾	11.97±6.79
磷酸氯喹组	0.18 g·kg ⁻¹	35.07±4.99	20.75±3.35 ⁴⁾	16.68±1.92
IFN-α2b组	1.83×10 ⁶ U·kg ⁻¹	36.03±5.35 ³⁾	19.62±5.06 ⁴⁾	16.22±1.29
葛根汤颗粒高剂量组	6.6 g·kg ⁻¹	36.78±5.61 ³⁾	22.20±4.05 ⁴⁾	18.77±2.65
葛根汤颗粒低剂量组	3.3 g·kg ⁻¹	39.25±3.38 ⁴⁾	24.90±3.30 ⁴⁾	20.77±2.25

表3 葛根汤颗粒对模型小鼠肺组织炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Gegentang granules on inflammatory factors in lung tissue of model mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	IL-6	IL-10	TNF-α	IFN-γ
正常组		63.61±7.42	50.14±37.10	9.44±5.93	5.90±3.67
感染组		140.93±35.24 ¹⁾	86.30±55.40	59.77±29.77	4.95±2.32
寒湿组		100.76±44.70	93.91±38.74	9.31±10.92	5.82±3.88
模型组		221.35±64.39 ¹⁾	108.91±14.37	80.65±12.16 ²⁾	4.37±3.50
磷酸氯喹组	0.18 g·kg ⁻¹	138.90±38.86	48.04±36.49	38.43±9.54 ⁴⁾	5.38±3.59
IFN-α2b组	1.83×10 ⁶ U·kg ⁻¹	166.65±34.06	68.62±37.41	36.63±8.12 ⁴⁾	8.88±3.64
葛根汤颗粒高剂量组	6.6 g·kg ⁻¹	100.88±16.59	69.76±42.75	35.22±5.11 ⁴⁾	3.80±2.65
葛根汤颗粒低剂量组	3.3 g·kg ⁻¹	130.30±40.10	65.04±37.64	35.68±6.84 ⁴⁾	5.68±3.36

呼吸道感染早期属于外感热病的太阳病阶段,初起均为寒证,化热速度或快或慢,治疗不当可能向肺、脾、胃传变,加重疾病症状。因此,太阳病阶段应积极干预,透邪解表,以辛温发汗、散寒解表的方式“透邪外出”^[21]。葛根汤颗粒是治疗外感病、循行在头面部的太阳经与阳明经发生的疾病及内伤杂病的基础方^[22],由桂枝汤加葛根、麻黄组成,其中葛根为君药。纵观全方,葛根发汗解肌,麻黄宣肺发汗解表,桂枝汤调和营卫,发散中寓扶正,祛邪强调解肌,既无麻黄汤之燥烈,又增强了桂枝汤发散之力^[23]。该方切中寒湿证早中期的病因和发病特点,遵循呼吸道感染和外感热病的传变特点,能够于太阳病阶段有效截断病程,是未病先防、既病防变、“透邪外出”的合理用药。

本研究的模型属于寒湿证早中期的寒湿袭表、寒湿阻肺、寒湿碍脾阶段。从造模第5天开始,感染组小鼠未经寒湿刺激,因此该组小鼠以毛发干枯、大便颜色变深的热毒证表现为主,而模型组小鼠则由于叠加了寒湿刺激,表现为摄食饮水量减少、恶寒懒动、精神萎靡、四肢无力、大便黏腻增多等,该结果符合寒湿证早中期的表现;血清胃动素水平升

高、胃泌素水平降低,表明寒湿刺激造成了小鼠胃肠运动、胃酸分泌等功能受损^[24-25],与寒湿证动物模型的表现类似^[26]。葛根汤颗粒能够恢复模型小鼠的摄食饮水量、一般状态及血清胃肠激素水平,表明其能够在寒湿证早中期起到透邪解表作用,阻止疾病进一步加重。与正常组比较,感染组及模型组小鼠肺指数增加、肺组织病毒载量升高、肺组织结构异常和炎性细胞浸润等均表明病毒感染对小鼠造成了明显的肺组织损伤,病毒在肺部增殖。寒湿组肺泡壁轻微增厚,表明寒湿对小鼠肺部仅造成轻微刺激。葛根汤颗粒能够降低模型小鼠的肺指数、肺组织病毒载量,缓解肺组织病理学改变,表明其能够缓解该模型的肺炎疾病。

葛根汤颗粒治疗呼吸道病毒感染的机制研究尚未见报道,但葛根汤的相关研究表明其具有直接抑制病毒增殖和免疫调节作用,如在体外抑制甲型H1N1流感病毒、腺病毒、柯萨奇病毒B^[27-28],在体内能够调节CD4⁺、CD8⁺ T淋巴细胞及辅助型T淋巴细胞(Th) 1/Th2比例,并通过抑制Toll样受体7(TLR7)及其下游的髓样分化因子88(MyD88)、核转录因子-κB(NF-κB),从而降低了TNF-α、IL-1和

IL-6的表达^[28]。然而,葛根汤颗粒在寒湿疫毒袭肺证中的免疫调节作用尚未见报道。病原感染后,一方面能够引起固有免疫细胞的识别,释放IL-6及TNF- α 等细胞因子^[2,29];另一方面可引起特异性T淋巴细胞的活化,进一步分泌IFN- γ 、TNF- α 等促炎细胞因子,以及趋化因子、细胞毒性分子等^[30],从而杀伤被感染的细胞、促进病毒的清除;此外,B淋巴细胞也被激活,进而促进病毒特异性浆细胞的成熟及抗体的产生^[31]。过量的IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子会导致细胞因子风暴,引起肺泡组织的严重破坏从而导致ARDS^[32],进而危及生命。本文研究结果发现与正常组比较,感染组和模型组促炎细胞因子IL-6与TNF- α 水平升高,抗炎细胞因子IL-10的水平升高可能为代偿性变化,该结果表明病毒感染造成了小鼠肺部明显的炎性反应。葛根汤颗粒能够纠正上述细胞因子水平的变化,表明其能够在感染早期阻止细胞因子过度累积,从而防止疾病加重甚至是细胞因子风暴的产生,与葛根汤颗粒临床应用相吻合。在外周血淋巴细胞研究结果中,与正常组比较,感染组和模型组CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比明显降低,表明小鼠抗病毒适应性免疫应答能力降低,这可能是由于病毒感染后,淋巴细胞活化诱导的凋亡所导致^[33];寒湿组CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比降低,可能是由于寒湿刺激也能够抑制机体免疫,从而增加机体对病原的易感性^[34];葛根汤颗粒能够明显升高淋巴细胞百分比,表明其能够恢复模型小鼠的特异性免疫应答功能,但具体作用机制还有待进一步研究。综上所述,本研究表明葛根汤颗粒对hCoV-229E寒湿疫毒袭肺证小鼠具有治疗作用,能够缓解寒湿证的中医证候及病毒感染引起的肺炎疾病,可为该制剂治疗寒湿疫毒袭肺证及其免疫调节作用机制研究提供实验室数据支持。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 张丽娜,曹玲. 冠状病毒感染概况研究进展[J]. 中国实用儿科杂志,2021,36(6):469-473.

[2] FUNK C J, WANG J, ITO Y, et al. Infection of human alveolar macrophages by human coronavirus strain 229E[J]. J Gen Virol,2012,93(Pt3):494-503.

[3] 钱艺,谢正德,任丽丽,等. 2007—2015年北京地区儿童急性下呼吸道感染人冠状病毒检测及临床分析[J]. 中华儿科杂志,2015,53(9):707-711.

[4] DE WIT E, VAN DOREMALEN N, FALZARANO D, et al. SARS and MERS: Recent insights into emerging

coronaviruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14 (8) : 523-534.

[5] WIERSINGA W J, RHODES A, CHENG A C, et al. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A review[J]. JAMA,2020,324(8):782-793.

[6] 王永炎. 流行性感冒与人感染禽流感诊疗及防控技术指南[M]. 北京:中国中医药出版社,2013.

[7] 巴元明,李晓东,闵晓俊,等. 湖北省中医院新型冠状病毒肺炎中医药防治方案(第三版)[J]. 湖北中医杂志,2020,42(2):7-8.

[8] 国家卫生健康委员会,国家中医药管理局. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)[EB/OL]. (2020-08-19) [2022-11-08]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/downFiles/a449a3e2c94d9a856d5faea2ff0f94.pdf>.

[9] 常富业,王永炎. 浅谈津络学说[J]. 北京中医药大学学报,2022,45(1):11-14.

[10] 刘渡舟,傅士垣. 伤寒论论解[M]. 天津:天津科学技术出版社,1983.

[11] 祝玉慧,田磊,徐宁. 葛根汤颗粒合达菲胶囊治疗甲型H1N1流感38例[J]. 山东中医杂志,2010,29(8):535-536.

[12] 曾志安,蔡少娜,陈文艺,等. 葛根汤颗粒治疗上呼吸道感染100例临床观察[J]. 内蒙古中医药,2017,36(8):45.

[13] 崔静,崔琪. 葛根汤颗粒治疗小儿风寒感冒疗效观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2019,7(1):168.

[14] 耿子涵,包蕾,郭姗姗,等. 人冠状病毒229E寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立及评价[J]. 中国比较医学杂志,2022,32(1):3-12,67.

[15] 赵荣华,孙静,时宇静,等. 宣肺化痰法对冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(11):21-27.

[16] 郭姗姗,李丹,时宇静,等. 基于冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证病证结合模型的金柴抗病毒胶囊疗效评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(13):1-7.

[17] 赵荣华,孙静,郭姗姗,等. 体外培育牛黄对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠病证结合模型的效用特点[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(2):66-73.

[18] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979,120(4):893-899.

[19] VILLAMIL-GÓMEZ W E, SÁNCHEZ Á, GELIS L, et al. Fatal human coronavirus 229E (HCoV-229E) and RSV-related pneumonia in an AIDS patient from

- Colombia [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2020, 36: 101573.
- [20] VASSILARA F, SPYRIDAKI A, POTHITOS G, et al. A rare case of human coronavirus 229E associated with acute respiratory distress syndrome in a healthy adult [J]. *Case Rep Infect Dis*, 2018, 2018: 6796839.
- [21] 薛蓓云, 李小荣, 黄煌. 葛根类方探析[J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(3): 28-30.
- [22] 黄炳添. 基于属性偏序结构图原理-李赛美运用葛根汤类方辨治经验整理[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [23] 陈嘉文. 葛根汤运用规律探究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [24] DELOOSE E, VERBEURE W, DEPOORTERE I, et al. Motilin: From gastric motility stimulation to hunger signalling [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15 (4) : 238-250.
- [25] LINDSTRÖM E, CHEN D, NORLÉN P, et al. Control of gastric acid secretion: The gastrin-ECL cell-parietal cell axis [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2001, 128(3): 505-514.
- [26] 章敏, 陈刚, 张六通, 等. 六淫湿邪动物模型研究[J]. *湖北中医杂志*, 2007, 29(9): 5-7.
- [27] 张弦, 庞浩龙, 贡联兵, 等. 葛根汤颗粒的临床应用评价[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2013, 13(10): 869-871.
- [28] GENG Z K, LI Y Q, CUI Q H, et al. Exploration of the mechanisms of Gegen decoction against influenza A virus infection [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17 (9) : 650-662.
- [29] MESEL-LEMOINE M, MILLET J, VIDALAIN P O, et al. A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes [J]. *J Virol*, 2012, 86(14): 7577-7587.
- [30] WHERRY E J, AHMED R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection [J]. *J Virol*, 2004, 78(11): 5535-5545.
- [31] MELENOTTE C, SILVIN A, GOUBET A G, et al. Immune responses during COVID-19 infection [J]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1807836.
- [32] CHEN N S, ZHOU M, DONG X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10223): 507-513.
- [33] BAHL K, KIM S K, CALCAGNO C, et al. IFN-induced attrition of CD8 T cells in the presence or absence of cognate antigen during the early stages of viral infections [J]. *J Immunol*, 2006, 176(7): 4284-4295.
- [34] 高鹏. 寒湿外邪对上呼吸道感染小鼠免疫功能影响的实验研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2011.

[责任编辑 刘德文]