

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

赵荣华¹, 孙静¹, 时宇静¹, 包蕾¹, 耿子涵¹, 郭姗姗¹, 鲍岩岩¹, 高英杰¹, 夏文²,
孙田甜², 孙梁琨², 李星², 崔晓兰^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所 生物安全实验室, 北京 100700; 2. 贵州百灵企业集团制药股
份有限公司, 贵州 安顺 550000)

[摘要] **目的:**观察具有宣肺化痰作用的药物(咳速停糖浆、咳清胶囊)对首次建立的冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型的治疗作用。**方法:**通过考察咳速停糖浆(22, 11 mL·kg⁻¹)和咳清胶囊(1. 155, 0. 577 5 g·kg⁻¹)对小鼠肺组织炎症变化、病毒核酸表达、炎性因子[白细胞介素(IL)-6, IL-10, 肿瘤坏死因子(TNF)-α及γ-干扰素(IFN-γ)]含量、外周血中免疫细胞(CD4⁺ T淋巴细胞, CD8⁺ T淋巴细胞及B淋巴细胞)占比的影响来综合评价药物对冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型的治疗作用。**结果:**与模型组比较, 咳清胶囊高、低剂量组以及咳速停糖浆高、低剂量组均可显著减轻小鼠肺组织炎症损伤; 咳清胶囊可明显升高外周血CD4⁺ T淋巴细胞, CD8⁺ T淋巴细胞及B淋巴细胞的占比; 咳清胶囊、咳速停糖浆均可以降低IL-6, IL-10, TNF-α及IFN-γ的表达量, 抑制肺组织中病毒载量, 改善肺组织肺泡间隔水肿、炎性细胞浸润等病理表现。**结论:**作为新型冠状病毒肺炎的一线用药, 咳清胶囊、咳速停糖浆对冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型具有显著的治疗作用, 其机制可能与调节免疫功能、降低细胞因子风暴等作用有关。

[关键词] 新型冠状病毒肺炎; 宣肺化痰法; 冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型; 咳速停糖浆; 咳清胶囊; 炎性因子; 外周血免疫细胞

[中图分类号] R2; R285; R254. 3; Q939. 4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0021-07

[doi] 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20201149

[网络出版地址] <http://kns. cnki. net/kcms/detail/11. 3495. R. 20200304. 1648. 006. html>

[网络出版日期] 2020-3-4 16:55

Intervening Effect of Promoting Lung and Resolving Phlegm Method on Mouse Model Combining Disease and Syndrome of Human Coronavirus Pneumonia with Cold-dampness Pestilence Attacking Lung

ZHAO Rong-hua¹, SUN Jing¹, SHI Yu-jing¹, BAO Lei¹, GENG Zi-han¹, GUO Shan-shan¹,
BAO Yan-yan¹, GAO Ying-jie¹, XIA Wen², SUN Tian-tian², SUN Liang-kun², LI Xing², CUI Xiao-lan^{1*}

(1. *Biosecurity Laboratory, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese
Medical Sciences, Beijing 100700, China*; 2. *Guizhou Bailing Enterprise Group
Pharmaceutical Co. Ltd., Anshun 550000, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effect of Kesuting syrups and Keqing capsules, which have the function of promoting lung and resolving phlegm, on a mouse model combining disease and syndrome of human coronavirus pneumonia with cold-dampness pestilence attacking lung. **Method:** The therapeutic effects of Kesuting syrups (the doses of 22, 11 mL·kg⁻¹) and Keqing capsules (the doses of 1. 155,

[收稿日期] 20200228(033)

[基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2020]4Z003号)

[第一作者] 赵荣华, 博士, 助理研究员, 从事中药药理学研究, E-mail: zhaoronghua203@163. com

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

0.577 5 g·kg⁻¹) on this model were evaluated by the inflammatory changes of lung tissue, the expression of viral nucleic acid, the contents of inflammatory factors [interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon- γ (IFN- γ)], and the percentages of immune cells in peripheral blood (CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B cells). **Result:** Compared with the model group, high- and low-dose groups of Keqing capsules and Kesuting syrups could significantly reduce the inflammatory damage in the lung tissues of mice, Keqing capsules could significantly increase the percentages of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B cells in peripheral blood, Keqing capsules and Kesuting syrups could reduce the expression levels of IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ , inhibit the viral load in lung tissue, as well as improve the pathogenic manifestations of lung tissue. **Conclusion:** As the first-line drugs for novel coronavirus pneumonia, Keqing capsules and Kesuting syrups have significant therapeutic effect on the mouse model combining disease and syndrome of human coronavirus pneumonia with cold-dampness pestilence attacking lung, and the mechanism may be related to regulating immune function and reducing cytokine storm.

[Key words] novel coronavirus pneumonia (COVID-19); method of promoting lung and resolving phlegm; mouse model combining disease and syndrome of human coronavirus pneumonia with cold-dampness pestilence attacking lung; Kesuting syrups; Keqing capsules; inflammatory factors; immune cells in peripheral blood

目前,根据国家卫生健康委员会和国家中医药管理局正式发布《新型冠状病毒肺炎治疗方案(试行第六版)》防控指南,新型冠状病毒肺炎(COVID-19)轻型患者以低热、轻微乏力等为临床主要表现,实验室核酸检测显示阳性^[1]。北京市中医管理局关于印发《北京市新型冠状病毒感染的肺炎防治方案(试用第一版)》的通知指出,新型冠状病毒肺炎属于中医“疫病”范畴,疫戾之邪侵袭肺脏,结合北京收治病例的特点和北京当前气候环境特点,易引起疫毒袭肺证的表现^[2]。我国地产资源丰富,中医药及民族医药在配合西医临床治疗中,对呼吸系统疾病具有提高临床有效性、改善临床症状等优势。中医认为本病病机为寒湿疫毒邪气致肺失宣降,临床表现为发热、乏力、周身酸痛、咳嗽、咳痰、胸紧憋气、纳呆、恶心、呕吐、大便粘腻不爽,舌质淡胖齿痕或淡红,苔白厚腐腻或白腻,脉濡或滑。

在前期大量中医模型筛选评价的基础上,本课题组首次建立了冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型,该模型各指标表现与新型冠状病毒肺炎的临床表现一致。本实验选择具有宣肺化痰作用的药物咳清胶囊和咳速停糖浆[贵州省新型冠状病毒肺炎中医药防治参考方案(第二版)用药]为模型药物,考察二者对冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型的药效作用,并分析其作用机制,从药物对小鼠肺部炎性变化、肺组织核酸表达量、免疫微环境及炎性因子的影响,结合临床药物病例研究情况,综合评价药物对冠状病毒肺炎寒湿

疫毒袭肺小鼠病证结合模型的治疗作用。

1 材料

1.1 受试药物 咳速停糖浆(批号20191138,规格100 mL/瓶,用法用量10~20 mL/次,3次/日)和咳清胶囊(批号20191101,规格为0.35 g/粒,用法用量2~3粒/次,3次/日)均由贵州百灵企业集团制药股份有限公司提供。

1.2 实验动物 SPF级BALB/c小鼠,体质量13~15 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号SCXK(京)2016-0011。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。

1.3 毒株及细胞

1.3.1 病毒毒株 人类冠状病毒HCoV-229E由中国医学科学院医药生物技术研究提供,本实验室传代,置于-80℃冰箱保存备用。

1.3.2 细胞株 人肺癌细胞A549购自北京北纳创联生物技术研究,本实验室传代,液氮保存备用。

1.4 仪器 Accuri C6 Plus型流式细胞仪(美国BD公司),MSC-Advantage 1.8 A2型生物安全柜和MSC-Advantage 1.2 A2型生物安全柜(美国Thermo公司),YP1002型电子天平(上海越平科学仪器有限公司),SW-CJ-2FD型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),AL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],ZJ-4型独立送风隔离笼具(苏

州冯氏实验动物设备有限公司), QuantStudio 5型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司), RXZ-380B型智能人工气候箱(宁波江南仪器厂), Enspire型多功能酶标仪(德国 PerkinElmer 公司), Centrifuge 5430型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司), CKX41型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), XL 5010型自动染色机(德国 Autostainer 公司), HM 355S型全自动轮转式切片机(德国 Microm 公司); DM 2500型生物显微镜, DMLB-HC型自动光学照相生物显微镜, EG 1140H型石蜡包埋机(德国 Leica 公司)。

1.5 试剂 小鼠白细胞介素(IL)-10, IL-6, 肿瘤坏死因子(TNF)- α , γ -干扰素(IFN- γ) Valukine™ 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国 Bio-Techne 公司, 批号分别为 185314, 951928, 266117, 352764); 藻红蛋白(PE)标记抗小鼠 CD19(1D3), PerCP-Cyanine5.5 标记抗小鼠 CD4(RM4-5), 腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)标记抗小鼠 CD8a(53-6.7)(美国 Tonbo Biosciences 公司, 批号分别为 50-0193, 65-0042, 20-0081); HCoV-229E 的 Real-time PCR 试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司, 批号 P20191201), QIAamp 病毒 RNA 纯化试剂盒[凯杰企业管理(上海)有限公司, 批号 163052733], 小鼠胃泌素(GAS)和胃动素(MTL)ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, 批号均为 02/2020), 苏木素染色液(北京博瑞捷科技有限公司, 批号 DH0001/0405A17), 伊红(北京化工厂, 批号 20150915)。

2 方法

2.1 剂量设计 咳清胶囊成人每天的临床用量 $0.0525 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 试验时小鼠用量设定了 $1.155, 0.5775 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 共高、低 2 个剂量, 分别相当于临床 2 倍及等倍剂量, 高、低剂量给药时药物溶液配制的质量浓度分别为 $0.058, 0.029 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。咳速停糖浆成人每天的临床用量 $1 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 试验时小鼠用量设定了 $22, 11 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 共高、低 2 个剂量, 分别相当于临床 2 倍及等倍剂量, 高、低剂量给药时药物溶液配制的体积分数分别为 1.10% 和 0.55%。均按剂量 $0.02 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 给药。

2.2 病毒传代 取已长成单层 A549 细胞的 25 cm^2 培养瓶, 倒掉培养液, 用细胞维持液冲洗细胞面 3 遍后, 加入 HCoV-229E 病毒液 $200 \mu\text{L}$, 置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培, 每日置于倒置显微镜下观察细胞病变情况, 收集 72~96 h 的细胞, 直至 80% 细胞出现明显病变后, 将细胞培养瓶置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存, 病

毒液反复冻融 3 次后用于检测病毒毒力。

2.3 病毒滴度测定 取已长成单层 A549 细胞的培养板, 倒掉培养液, 用细胞维持液冲洗细胞面 3 遍后, 按 10 倍稀释接种不同滴度的 HCoV-229E 病毒液, 设定 $1\times 10^{-1}\sim 1\times 10^{-8}$ 共 8 个稀释度, $100 \mu\text{L}$ /孔, 每个浓度 4 个复孔, 同时设正常细胞对照。置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养, 每日置于倒置显微镜下观察细胞病变情况, 于 72~96 h 记录各孔的细胞病变情况。按 Reed-Muench 法计算 50% 细胞病变浓度 (TCID_{50})。

2.4 造模及给药 取 BALB/c 小鼠 64 只, 雌雄各半, 按体质量等级随机分为正常组, HCoV-229E 感染组(以下简称感染组), 寒湿组, 冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型组(以下简称模型组), 咳速停糖浆高、低剂量组以及咳清胶囊高、低剂量组, 每组 8 只。除正常组和感染组外, 其余小鼠每天持续置于相对湿度 $90\%\pm 3\%$, 无风, 温度 $(4\pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 的人工气候箱中, 4 h 刺激后取出, 连续 7 d。除正常组和寒湿组外, 其余小鼠于寒湿刺激第 5 天和第 6 天, 用乙醚轻度麻醉后, 以 100TCID_{50} HCoV-229E 病毒液滴鼻感染, $50 \mu\text{L}$ /只。第 1 次感染当天开始灌胃给药 ($0.02 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), 每日 1 次, 连续 3 d, 正常组、感染组、寒湿组及模型组在同等情况下给予生理盐水。感染第 4 天称重后眼眶取血, 滴至生理盐水中备测淋巴细胞分型比例; 其余血进行离心处理 ($3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min) 取血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存检测 GAS 和 MTL 水平; 解剖取肺脏称重, 计算肺指数及其抑制率, 二者的计算公式分别为肺指数=肺湿重/体质量, 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) $\times 100\%$; 取部分肺组织 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 留存备用, 检测病毒载量和炎症细胞因子。

2.5 肺组织中 HCoV-229E 核酸检测 小鼠解剖后将肺组织分装置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。将小鼠肺组织从 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中取出, 置于洁净的研钵中, 倒入少量液氮并使用研杵将其研磨成粉末, 收集粉末置于 1.5 mL 的离心管中, 立即加入 TRIzol Reagent 1 mL , 轻弹管底, 尽快混合样品至重悬; 室温水平放置离心管, 孵育 20 min; 离心 10 min ($12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 下同), 将澄清上清液移入新的 1.5 mL 离心管中; 加入三氯甲烷 0.2 mL , 盖紧管盖, 用力摇动离心管 15 s, 室温孵育 2~3 min 至液体分层; 离心 15 min, 将透明上清液小心移入新的 1.5 mL 离心管中, 加入异丙醇 0.5 mL , 混合均匀, 室温孵育 30 min; 离心

10 min, 弃去上清, 用75%乙醇1 mL轻洗沉淀(使白色沉淀轻轻飘起), 于4 °C, 7 500 r·min⁻¹离心5 min; 吸尽上清液, 置于安全柜中短暂干燥RNA沉淀5~10 min; 用DEPC水[用焦炭酸二乙酯(DEPC)处理过并经高温高压灭菌的超纯水]20 μL溶解沉淀, 置于-80 °C冰箱保存。

选择DEPC水作为阴性对照; 阳性对照品进行10, 100, 1 000倍梯度稀释。取HCoV-229E核酸荧光PCR检测混合液 $n \times 18 \mu\text{L}$, 内部对照品 $n \times 1 \mu\text{L}$ 与Real-time PCR酶 $n \times 1 \mu\text{L}$ (n 为反应管数), 振荡混匀数秒, 3 000 r·min⁻¹离心数秒。取上述混合液20 μL置于PCR管中, 将样品核酸提取液, DEPC水, 阳性对照品各5 μL分别加入PCR管中, 改进管盖, 涡旋数秒使所有液体置于底部, 立即进行PCR扩增反应。反应管置于Real-time PCR仪上, 循环参数设置为45 °C预变性10 min; 95 °C变性15 min; 95 °C退火15 s, 60 °C延伸60 s, 循环40次; 单点荧光检测在60 °C, 反应体系25 μL。荧光通道检测选择时选用FAM和HEX/VIC/JOE通道^[3-4]。

2.6 GAS, MTL及炎性因子的检测 按试剂盒说明书进行操作, 检测小鼠血清中GAS, MTL及肺组织中炎性因子的水平。

2.7 小鼠外周血T淋巴细胞亚群及B淋巴细胞比例检测 离心机4 °C预冷。小鼠摘眼球取血, 向装有1×磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2, 下同)10 mL的15 mL离心管中加入3滴血(约150 μL), 离心5 min(1 600 r·min⁻¹, 室温); 用移液管小心弃去上清, 每管加入红细胞裂解液1 mL重悬细胞沉淀, 室温裂解约5~10 min至液体从浑浊变澄清, 加入PBS 10 mL终止裂解, 离心(4 °C, 2 000 r·min⁻¹, 5 min, 下同), 弃上清。细胞沉淀用PBS 10 mL重悬, 离心, 弃上清, 用封闭液[含5%胎牛血清(FBS)的PBS]200 μL重悬, 并将细胞悬液转移至1.5 mL离心管中, 4 °C封闭30 min。避光于封闭液中配制流式抗体, 每一管细胞的配制体积为抗体各0.3 μL, 封闭液50 μL。细胞悬液离心, 弃上清。加入流式抗体, 每管50 μL, 4 °C避光染色30 min, 加入PBS 1 mL, 离心, 弃上清。用含2% FBS的PBS 200 μL重悬细胞, 转移至流式管中, 上机检测^[5]。

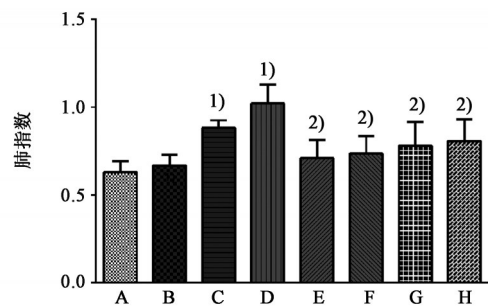
2.8 肺组织病理学检测 取小鼠肺组织, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察、照相。光学显微镜下观察小鼠肺部有无病理形态学改变。

2.9 数据处理 数据符合正态分布者用 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 采用SPSS 17.0软件进行统计分析, 使用单因素方差分析; 方差齐采用 t 检验, 方差不齐采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 药物对小鼠肺指数及其抑制率的影响 由图1可知, 与正常组比较, 寒湿条件+HCoV-229E感染造成冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型组肺指数显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 咳清胶囊和咳速停糖浆在高、低剂量下均可显著降低模型小鼠肺指数($P < 0.01$)。咳清胶囊高、低剂量组肺指数抑制率分别为61.88%, 54.67%; 咳速停糖浆高、低剂量组肺指数抑制率分别为79.64%, 72.95%; 二者均具有良好的量效相关性。



A. 正常组; B. 寒湿组; C. 感染组; D. 冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型组; E. 咳速停糖浆高剂量组; F. 咳速停糖浆低剂量组; G. 咳清胶囊高剂量组; H. 咳清胶囊低剂量组(图2, 5同); 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (图5同)

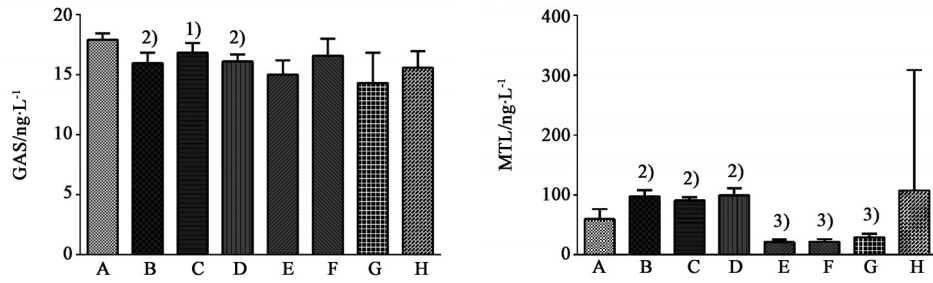
图1 咳速停糖浆、咳清胶囊对小鼠肺指数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of Keqing capsules and Kesuting syrups on lung index of mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.2 药物对小鼠血清中胃脘肽含量的影响 由图2可知, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中MTL含量显著增高($P < 0.01$), GAS含量显著降低($P < 0.01$); 咳清胶囊和咳速停糖浆高、低剂量组可不同程度调节模型小鼠血清中MTL和GAS的水平, 其中咳清胶囊高剂量组和咳速停糖浆高、低剂量组的MTL含量均较模型组显著降低($P < 0.01$)。

3.3 药物对小鼠肺组织中病毒载量的影响 由图3可知, 正常组动物肺组织中无HCoV-229E核酸表达; 采用寒湿条件+HCoV-229E感染小鼠后, 模型组小鼠肺组织中有明显核酸表达; 低剂量咳清胶囊和咳速停糖浆可明显降低小鼠肺组织中病毒核酸表达量($P < 0.01$)。

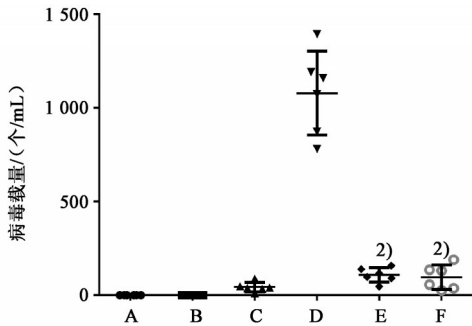
3.4 药物对小鼠外周血中免疫细胞占比的影响 由图4可知, 与正常组比较, 模型组小鼠外周血中免疫细胞CD4⁺T细胞, CD8⁺T细胞及B淋巴细胞的占比均显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 咳清胶



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.01$

图2 咳速停糖浆、咳清胶囊对小鼠血清中GAS和MTL含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of Keqing capsules and Kesuting syrups on GAS and MTL contents in serum of mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

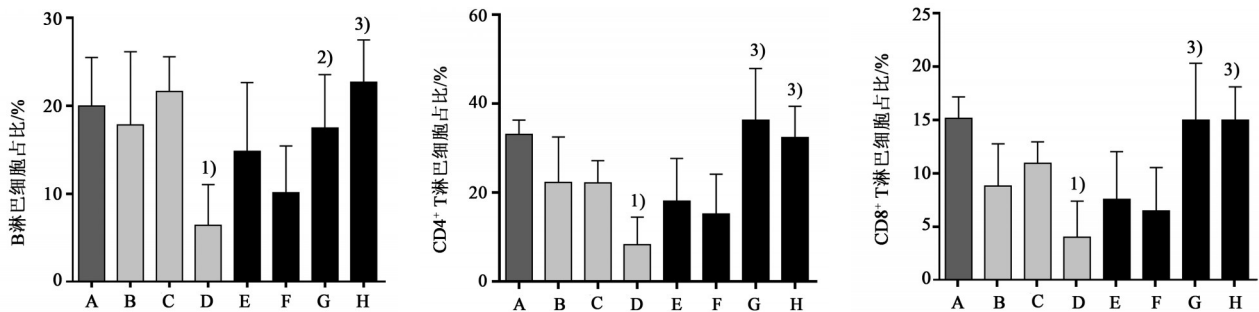


A. 正常组; B. 寒湿组; C. 感染组; D. 冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型组; E. 咳速停糖浆低剂量组; F. 咳清胶囊低剂量组 (图6同)

图3 咳速停糖浆、咳清胶囊对小鼠肺组织中核酸表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of Keqing capsules and Kesuting syrups on nucleic acid expression in lung tissues of mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

囊低剂量组可明显升高 $CD4^+$ T细胞, $CD8^+$ T细胞及B淋巴细胞的占比($P < 0.01$), 咳清胶囊高剂量组可明显升高小鼠外周血中 $CD4^+$ T细胞和 $CD8^+$ T细胞的占比($P < 0.01$)。



A. 正常组; B. 感染组; C. 寒湿组; D. 冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型组; E. 咳速停糖浆高剂量组; F. 咳速停糖浆低剂量组; G. 咳清胶囊高剂量组; H. 咳清胶囊低剂量组; 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

图4 咳速停糖浆、咳清胶囊对小鼠外周血中免疫细胞占比的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Effect of Keqing capsules and Kesuting syrups on percentages of immune cells in peripheral blood of mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

新型冠状病毒肺炎属于中医学“疫病”范畴,首

见于周朝,《周礼·天官·冢宰》云:“疾医掌养万民之疾病,四时皆有疠疾”。东汉许慎在《说文解字》中

3.5 药物对小鼠肺组织中炎症因子的影响 由图5可知,与正常组比较,模型组小鼠肺组织中炎症因子IL-6, IL-10及TNF- α 均明显增高($P < 0.01$);咳清胶囊和咳速停糖浆在不同剂量下均能降低炎症因子IL-6, IL-10, TNF- α 及IFN- γ 的生成,与模型组比较均有显著性差异($P < 0.01$)。

3.6 药物对小鼠肺组织病理的影响 小鼠肺组织病理结果显示,正常组小鼠肺组织肺泡间隔未见水肿,间质无明显瘀血,无炎性渗出,细胞结构正常。寒湿组小鼠肺组织有轻微炎性改变。HCoV-229E感染组小鼠肺组织有炎性细胞浸润、部分细胞结构异常等病理变化。寒湿条件+HCoV-229E感染后的模型组小鼠肺组织内有片状红染,有毛玻璃样病变,肺间质炎性渗出较多,细胞破碎较多,部分细胞失去正常结构状态,肺间质瘀血明显,肺泡间隔水肿,肺间质黏液渗出较多。与模型组比较,咳清胶囊和咳速停糖浆的低剂量组小鼠肺组织炎性渗出减少,肺间质水肿及瘀血减轻,毛玻璃样变亦明显改善。见图6。

见于周朝,《周礼·天官·冢宰》云:“疾医掌养万民之疾病,四时皆有疠疾”。东汉许慎在《说文解字》中

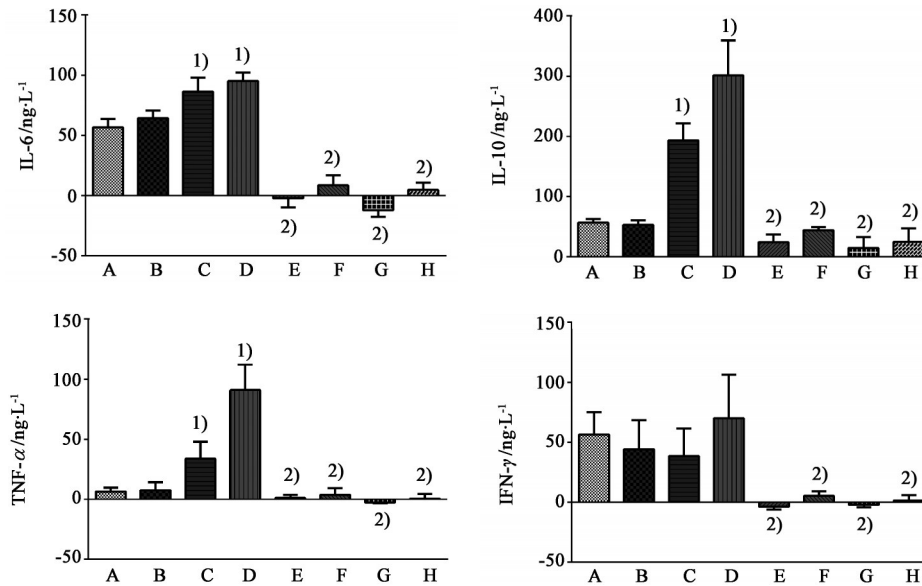


图5 咳速停糖浆、咳清胶囊对小鼠肺组织中炎症因子含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Effect of Keqing capsules and Keseting syrups on contents of inflammatory factors in lung tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

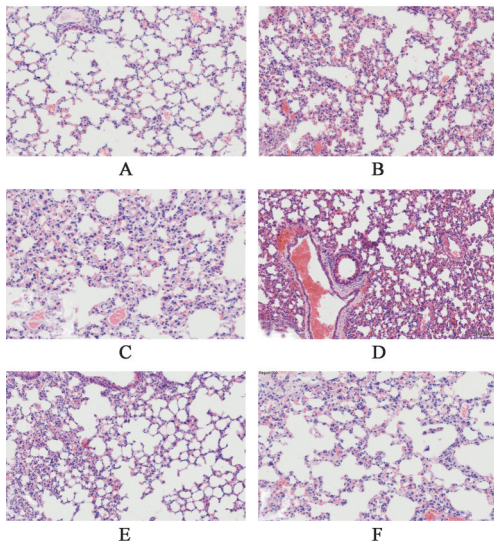


图6 咳速停糖浆、咳清胶囊对小鼠肺组织的影响(HE, ×200)

Fig. 6 Effect of Keqing capsules and Keseting syrups on lung tissues of mice(HE, ×200)

最早提出“疫”的内涵概念,指出“疫,民皆疾也”,强调“疫病”具有传染性和流行性的特点。成书于战国至秦汉时期的中医典籍《黄帝内经》载“五疫之至,皆相染易,无问大小,病状相似”“温病大行,远近咸若”“疠大至,民善暴死”“正气存内,邪不可干,避其毒气”,明确“疫病”的发病特点趋同,病情多危重,病死率高,并提出改善机体免疫机能的预防及治疗理念。清代吴鞠通《温病条辨》云:“冬温者,冬应寒而反温,阳不潜藏,民病温也”。此次新型冠状病毒肺炎发于冬季阴雨季节,故在发病过程中表现出寒湿疫毒袭肺证的中医辨证分型。

本文采用具有宣肺化痰作用的药物咳速停糖浆和咳清胶囊治疗冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺病证结合模型小鼠,采取冠状病毒HCoV-229E感染+寒湿条件刺激复合因素制备冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型,通过观察小鼠肺组织炎症情况、病毒载量、炎症因子水平,血清胃肠肽指标含量及外周血免疫细胞占比的变化,综合评价药物的治疗作用。结果发现与正常组比较,模型组小鼠的肺指数及核酸病毒载量均升高,血清中MTL含量增高,GAS的含量降低,表明该模型有肺部病毒感染及胃肠激素水平失衡,提示造模成功。与模型组比较,咳清胶囊、咳速停糖浆高、低剂量组能降低感染小鼠的肺指数,咳清胶囊和咳速停糖浆在低剂量下可明显降低小鼠肺组织中病毒核酸表达量,表明咳清胶囊、咳速停糖浆有减轻小鼠肺部炎症损伤及病毒核酸表达的作用。

在免疫机制方面,CD8⁺ T淋巴细胞可直接杀伤病毒感染的细胞,CD4⁺ T淋巴细胞可辅助B淋巴细胞活化;体液免疫B淋巴细胞可活化成为浆细胞,产生抗体从而发挥对病毒的杀伤作用^[6-9]。本研究中小鼠外周血淋巴细胞亚群占比显示,与正常组比较,模型组小鼠外周血中免疫细胞CD4⁺ T淋巴细胞,CD8⁺ T淋巴细胞及B淋巴细胞的占比显著降低;与模型组比较,咳清胶囊低剂量组可明显升高CD4⁺ T淋巴细胞,CD8⁺ T淋巴细胞及B淋巴细胞的占比,咳清胶囊高剂量组可明显升高CD4⁺ T淋巴细胞和CD8⁺ T淋巴细胞的占比,咳速停糖浆不同剂量

组小鼠外周血中免疫细胞占比均有升高的趋势,提示咳清胶囊、咳速停糖浆有调节小鼠免疫T淋巴细胞和B淋巴细胞比例的作用。

细胞因子风暴是指机体在感染微生物后引起体液中多种细胞因子(TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 和IL-8等)迅速大量产生,引起急性呼吸窘迫综合征和多脏器衰竭^[10-11]。本文研究结果发现,寒湿+HCoV-229E感染后的模型组小鼠肺组织炎性因子IL-6, IL-10及TNF- α 均较正常组明显增高;与模型组比较,咳清胶囊和咳速停糖浆在不同剂量下均能显著降低IL-6, IL-10, TNF- α 及IFN- γ 的生成,表明二者均有减轻细胞因子风暴的作用。这与肺组织病理观察结果相一致。

对免疫炎性机制进行综合分析,人冠状病毒经上呼吸道感染机体后,导致病毒在肺组织中大量增殖,模型组小鼠肺组织释放大量的巨噬细胞和自然杀伤细胞(NK细胞),导致炎性因子IL-6, IL-10及TNF- α 过度激活^[12-13],同时,模型组外周血中的CD4⁺T淋巴细胞,CD8⁺T淋巴细胞及B淋巴细胞的占比与正常组比较显著降低,推测是由于小鼠肺组织中病毒大量复制,造成过量的免疫细胞从外周血中进入肺组织,导致T淋巴细胞和B淋巴细胞过度活化,活化的CD4⁺T淋巴细胞,CD8⁺T淋巴细胞及B淋巴细胞进一步导致炎性因子IL-6, IL-10及TNF- α 在肺组织中过度释放,最终导致细胞因子风暴的产生,与冠状病毒感染的临床报道一致^[14-15]。当药物进入机体后,可明显降低模型小鼠肺组织中的炎性因子IL-6, IL-10, TNF- α 及IFN- γ 表达,表明咳速停糖浆和咳清胶囊可在一定程度上调节机体的免疫机能,减轻肺组织损伤。目前,咳速停糖浆、咳清胶囊正在进行治疗新型冠状病毒肺炎有效性和安全性的随机、开放、平行对照、多中心临床研究,本文为后续的临床实验研究提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 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(试行第六版)》解读[EB/OL]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7652m/202002/54e1ad5c2aac45c19eb541799bf637e9.shtml>, 2020-02-19/2020-02-28.
- [2] 北京市中医管理局.北京市新型冠状病毒感染的肺炎防治方案(第二版)[EB/OL]. http://zyj.beijing.gov.cn/sy/tzgg/202001/t20200130_1621630.html,

2020-01-29/2020-02-28.

- [3] LYU X M, MA Y Q, WU F, et al. LncRNA NKILA inhibits retinoblastoma by downregulating lncRNA XIST[J]. *Curr Eye Res*, 2019, 44(9):975-979.
- [4] BONAVIA A, ZELUS B D, WENTWORTH D E, et al. Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E [J]. *J Virol*, 2003, 77(4):2530-2538.
- [5] WILLINGER T, FLAVELL R A. Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(22):8670-8675.
- [6] JANG Y J, KIM J H, BYUN S. Modulation of autophagy for controlling immunity [J]. *Cells*, 2019, doi:10.3390/cells8020138.
- [7] ZHANG H F, XIE Y F, LI W, et al. CD4⁺T cell-released exosomes inhibit CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8(1):23-30.
- [8] FRANK I, SANTOS J J, MEHLHOP E, et al. Presentation of exogenous whole inactivated simian immunodeficiency virus by mature dendritic cells induces CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2003, 34(1):7-19.
- [9] HEINZ S, BENNER C, SPANN N, et al. Simple combinations of lineage-determining factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B-cell identities [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(4):576-589.
- [10] 任越,姚美村,霍晓乾.抗新型冠状病毒方剂基于花生四烯酸代谢通路防治“细胞因子风暴”的研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, doi:10.19540/j.cnki.cjmm.20200224.405.
- [11] 张竞文,胡欣,金鹏飞.新型冠状病毒引起的细胞因子风暴及其药物治疗[J]. *中国药学杂志*, 2020, doi:11.2162.R.20200225.1052.002.
- [12] LI Z Y, CHAO H H, LIU H Y, et al. IFN- γ induces aberrant CD49b⁺ NK cell recruitment through regulating CX3CL1: a novel mechanism by which IFN- γ provokes pregnancy failure [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(11):e1512.
- [13] LISNIĆ B, LISNIĆ V J, JONJIĆ S. NK cell interplay with cytomegaloviruses [J]. *Curr Opin Virol*, 2015, 15:9-18.
- [14] 徐凯进,蔡洪流,沈毅弘,等.2019冠状病毒病(COVID-19)诊疗浙江经验[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2020, doi:33.1248.R.20200222.1417.002.
- [15] 刘昌孝,伊秀林,王玉丽,等.认识新冠病毒(SARS-CoV-2),探讨抗病毒药物研发策略[J]. *药物评价研究*, 2020, doi:12.1409.r.20200225.0853.002.

[责任编辑 刘德文]