

· 抗疫专题(三) ·

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

郭姗姗¹, 李丹², 时宇静¹, 鲍岩岩¹, 赵荣华¹, 耿子涵¹, 孙静¹, 包蕾¹,
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. 神威药业集团有限公司, 石家庄 051400)

[摘要] 目的: 在人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证病证结合模型上, 研究金柴抗病毒胶囊的治疗作用, 为评价其防治冠状病毒感染提供试验依据。方法: 取Balb/c小鼠48只, 按体质量随机分为正常组、病毒感染组、寒湿组、寒湿疫毒袭肺证模型组、金柴抗病毒胶囊高、低剂量组(1.76, 0.88 g·kg⁻¹·d⁻¹), 采用寒湿刺激加入冠状病毒229E感染模拟人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证的病证结合模型, 通过观察Balb/c小鼠行为表征、肺指数、病毒载量、肺组织病理改变来评价金柴抗病毒胶囊的治疗作用; 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肺组织中白细胞介素-6(IL-6), IL-10, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), γ 干扰素(IFN- γ)含量和血清中胃动素(MTL), 胃泌素(GAS)含量, 流式细胞术检测外周血中CD4⁺T细胞, CD8⁺T细胞, B细胞含量。结果: 与寒湿疫毒袭肺证模型组比较, 金柴抗病毒胶囊可增加寒湿疫毒袭肺证小鼠的活动度和反应能力, 改善小鼠皮毛和大便状态, 金柴抗病毒胶囊高、低剂量组可以显著降低肺指数($P < 0.01$), 明显升高CD4⁺T细胞, CD8⁺T细胞, B细胞含量($P < 0.05$, $P < 0.01$); 金柴抗病毒胶囊低剂量组显著降低血清中MTL含量, 显著降低肺组织中病毒载量和IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 含量($P < 0.01$), 改善肺组织病理损伤。结论: 金柴抗病毒胶囊在人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证模型上具有较好的治疗作用, 其可以改善寒湿证的行为表征和胃肠道指标水平, 同时减低肺指数和肺组织中病毒载量, 改善肺组织病理损伤, 初步探讨其机制可能与降低炎症因子含量、提升淋巴细胞数量有关。

[关键词] 金柴抗病毒胶囊; 冠状病毒; 寒湿疫毒袭肺证; 炎症因子; 病证结合

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201401

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200403.1037.003.html>

[网络出版日期] 2020-4-3 11:06

Efficacy Evaluation of Jinchai Kangbingdu Capsule Based on Coronaryvirus Pneumonia with 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome Model

GUO Shan-shan¹, LI Dan², SHI Yu-jing¹, BAO Yan-yan¹, ZHAO Rong-hua¹, GENG Zi-han¹, SUN Jing¹,
BAO Lei¹, GAO Ying-jie¹, CUI Xiao-lan^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Shineway Pharmaceutical Group Ltd., Shijiazhuang 051400, China)

[Abstract] **Objective:** To study the therapeutic effect of Jinchai Kangbingdu capsule based on human coronavirus pneumonia with 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model, in order to provide experimental basis for evaluating its effect in preventing and treating coronavirus infection. **Method:** The 48 Balb/c mice were randomly divided into normal group, virus infection group, cold-dampness group, cold-dampness epidemic

[收稿日期] 20200328(013)

[第一作者] 郭姗姗, 博士, 副研究员, 从事中药抗病毒药理学研究, E-mail: ssguo@icmm.ac.cn

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

toxin lung syndrome model group, and high and low-dose Jinchai Kangbingdu capsule groups (1.76, 0.88 g·kg⁻¹·d⁻¹). A cold-dampness stimulation combined with human coronavirus 229E infection was used to imitate human coronavirus pneumonia with 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model. Behavioral characteristics, lung index, viral load, and lung tissue pathological changes in Balb/c mice were observed to evaluate the therapeutic effect of Jinchai Kangbingdu capsules. The contents of interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) in lung tissue and motilin (MTL), gastrin (GAS) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the contents of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and B cells in peripheral blood were detected by flow cytometry. **Result:** Compared with the cold-dampness epidemic toxin lung syndrome model group, Jinchai Kangbingdu capsule can increase the activity and response ability of 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model mice, and change the skin and stool status of mice. High and low-dose Jinchai Kangbingdu capsule groups can significantly reduce the lung index ($P < 0.01$), while significantly increased the content of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and B cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Low-dose Jinchai Kangbingdu capsule group could significantly decrease the MTL content in serum and the levels of IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ in lung tissue ($P < 0.01$), whereas alleviate the pathological damage of lung tissue. **Conclusion:** Jinchai Kangbingdu capsule showed a therapeutic effect on human coronavirus pneumonia with 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model, and can improve the behavioral characterization and gastrointestinal index level of cold-dampness syndrome, while reduce lung index and viral load in lung tissue. The mechanism may be related to the decrease of the content of inflammatory factors and the increase of the number of lymphocytes.

[Key words] Jinchai Kangbingdu capsule; coronavirus; 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome; inflammatory factor; combination of disease and syndrome

新型冠状病毒肺炎是2019年底以湖北省武汉市为中心而爆发的一种新型急性感染性肺炎,2020年2月11日,世界卫生组织(WHO)将其正式命名为人冠状病毒肺炎^[1]。根据其具有高度人传人特点,可归属中医学“疫病”范畴。截至3月24日24时,据31个省(自治区、直辖市)和新疆生产建设兵团报告,累计报告确诊病例81 218例,累计死亡病例3 281例,累计追踪到密切接触者693 223例^[2];根据2020年3月25日WHO公布的数据显示,全球共有195个国家和地区共发现确诊病例375 498例,累计死亡病例16 362例,其对全球人口的健康和经济均造成了较为严重的影响^[3]。

目前尚无治疗新型冠状病毒肺炎的特效药物,中医药在本次抗击新型冠状病毒肺炎过程中发挥了重要的作用,截至2020年2月17日,全国中医药参与救治的新冠肺炎确诊病例共计60 107例,占比为85.2%,对轻、普通、重、危重、恢复期的患者均有良好疗效^[4]。中医认为新型冠状病毒肺炎属于疫病范畴,与《黄帝内经》中“五疫之至,皆相染易,无问大小,病状相似”描述的特点相似,其病因主要有二,一为疫毒,可能诱发因素是湖北武汉2019年底燥湿寒温起伏较大的气候变化;二为正气虚弱,即“邪之所凑,其气必虚”^[5]。詹志来等^[6]报道在新型

冠状病毒肺炎的治疗中,与单纯西药治疗比较,经过中医药治疗后的患者在退热、改善呼吸急促、缓解咳嗽、抗炎、稳定血氧饱和度等方面更有明显优势,而且中医药干预可以缓解乏力、纳差(食欲不振)、倦怠(精神萎靡)等症状。

金柴抗病毒胶囊由金银花、柴胡、连翘、黄芩、清半夏、西洋参、绵马贯众等中药组成,透邪解毒、清肺泄热。用于上呼吸道感染属风热证,证见身热恶风、咽干咽痛、鼻塞流涕、头痛、咳嗽等。金柴抗病毒胶囊是以透表(透达表邪)解毒法为原则确立的中药复方制剂,前期研究显示其对甲型流感病毒性肺炎具有明显的抑制作用,并可明显升高 γ 干扰素(IFN- γ) mRNA的表达量^[7]。

本研究在对寒湿刺激加人冠状病毒感染的作用下模拟人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证的病证结合小鼠模型,并在此基础上观察金柴抗病毒胶囊对其的治疗作用及其机制,以期为临床应用提供实验数据支持。

1 材料

1.1 病毒株 人冠状病毒 HCoV-229E,由中国医学科学院医药生物技术研究所提供,本实验室传代,-80℃冰箱保存备用。

1.2 受试药物 金柴抗病毒胶囊(神威药业集团

有限公司,批号1802091),人临床用量为 $4.8\text{ g}\cdot(60\text{ kg})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,即 $0.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;小鼠用量分别设 $1.76,0.88\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量组。以上剂量分别相当于临床用量的2倍及等倍剂量。

1.3 动物 48只Balb/c小鼠,SPF级,体质量(14 ± 1)g,雌雄各半,北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证编号,雌性1100112011004808,雄性1100112011004810,动物合格证号SCXK(京)2016-006,本实验经过中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准,编号为2020D005。

1.4 试剂 trizol试剂(美国Life Technologies公司,批号257403);人冠状病毒实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司,批号P20191201);小鼠白细胞介素-6(IL-6),IL-10,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),IFN- γ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国Bio-Techne公司,批号分别为951928,185314,266117,352764);小鼠胃动素(MTL),胃泌素(GAS)ELISA试剂盒(上海酶联生物技术有限公司,批号分别为CK-E20682,CK-E20684);PerCP-Cyanine5.5标记抗小鼠CD4,APC标记抗小鼠CD8a,FITC标记抗小鼠CD3e,PE标记抗小鼠CD19(美国Tonbo Biosciences公司,批号分别为65-0042,20-0081,35-0031,50-0193);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)。

1.5 仪器 RXZ-380B型智能人工气候箱(宁波江南仪器厂);Accuri C6 Plus型流式细胞仪(美国BD公司);QuantStudio 5型Real-Time PCR仪(美国Applied Biosystems公司);Enspire型多功能酶标仪(德国PerkinElmer公司);MSC1.8 A2型生物安全柜(美国Thermo公司);YP1002 MAX100g型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);AR1140 MAX110g型电子分析天平(美国Ohaus公司);AL204 MAX210g型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 小鼠造模及给药 取Balb/c小鼠48只,按体质量随机分为正常组、病毒感染组、寒湿组、寒湿疫毒袭肺证模型组、金柴抗病毒胶囊高、低剂量组,每组8只,雌雄各半。除正常组和感染组外,其余小鼠每天持续置于(90 ± 3)%相对湿度,无风,温度(4 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 的人工气候箱中进行寒湿刺激,每次刺激4h,1次/d,连续7d。除正常组和寒湿组外,其余小鼠于

寒湿刺激第5,6天,用乙醚轻度麻醉后,以 100TCID_{50} HCOV-229E病毒液滴鼻感染, $50\text{ }\mu\text{L}/\text{只}$ 。第1次感染当天金柴抗病毒胶囊高、低剂量组分别按照 $1.76,0.88\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药, $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,1次/d,连续3d,正常组、病毒感染组、寒湿组、寒湿疫毒袭肺模型组在同等情况下给予蒸馏水灌胃。感染第4天称质量后眼眶取血,滴至生理盐水中备测淋巴细胞亚群比例,其余血离心取血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存检测GAS,MTL;解剖取肺脏称质量,计算肺指数及抑制率, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 留存备用检测病毒载量和炎性细胞因子。

2.2 ELISA检测血清中GAS,MTL和肺组织匀浆上清中炎症因子的含量 采用ELISA试剂盒的方法检测血清中GAS,MTL和肺组织匀浆上清中IL-6,IL-10,TNF- α ,IFN- γ 的含量,均按照试剂盒说明书步骤进行操作。

2.3 Real-time PCR检测病毒载量 采用trizol法提取各组小鼠肺组织RNA,按照人冠状病毒Real-time PCR试剂盒的方法进行核酸检测,反应管置于定量荧光PCR仪上,循环参数设置为 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$,10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min,再按 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s,循环40次,单点荧光检测在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。荧光通道检测选择,选用FAM和HEX/VIC/JOE通道(引物序列专利保护)。

2.4 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群含量 小鼠摘眼球取血,向装有10 mL PBS的15 mL离心管中加入3滴血(约 $150\text{ }\mu\text{L}$), $1\text{ }600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 室温离心5 min;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, $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心5 min,弃上清,细胞沉淀用PBS 10 mL重悬, $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心5 min,弃上清,用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 封闭液(含5%FBS的PBS)重悬,并将细胞悬液转移至1.5 mL离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min。避光于封闭液中配制流式抗体(FITC标记抗小鼠CD3e,PE标记抗小鼠CD19,PerCP-Cy5.5标记抗小鼠CD4,APC标记抗小鼠CD8a)每一管细胞的配制体积为抗体 $0.3\text{ }\mu\text{L}$,封闭液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。细胞悬液 $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心5 min,弃上清。加入流式抗体,每管 $50\text{ }\mu\text{L}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光染色30 min,加入PBS 1 mL, $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心5 min,弃上清。用含2% FBS的PBS重悬细胞 $200\text{ }\mu\text{L}$,转移至流式管中,上机检测。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理学变

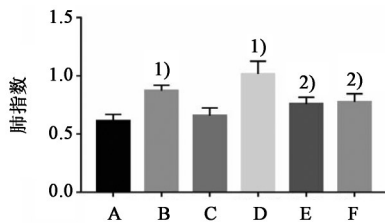
化 将多聚甲醛固定好的小鼠肺组织采用不同浓度乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋、切片,HE染色,中性树胶封片,显微镜下观察、照相。光学显微镜下观察小鼠肺部的病理形态学改变。

2.6 统计学分析 采用GraphPad Prism 7软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用t检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型行为表征的影响 寒湿条件刺激第8天(合并病毒感染第4天),寒湿疫毒袭肺证模型组小鼠扎堆不动表现显著、皮毛潮湿打结、大便出现增多黏腻等表现,且与寒湿组比较更为显著,说明寒湿疫毒袭肺证模型成功。金柴抗病毒胶囊组可增加小鼠活动度和反应能力,小鼠皮毛顺滑有光泽,可显著改善大便黏腻状态,大便成颗粒,说明金柴抗病毒胶囊对寒湿疫毒袭肺证中医证型表现有明显改善作用。

3.2 对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型肺指数的影响 与正常组比较,寒湿疫毒袭肺证模型组肺指数显著增加($P<0.01$);与寒湿疫毒袭肺模型组比较,金柴抗病毒胶囊灌胃给药3d后,2个剂量组肺指数均显著降低($P<0.01$)。见图1。



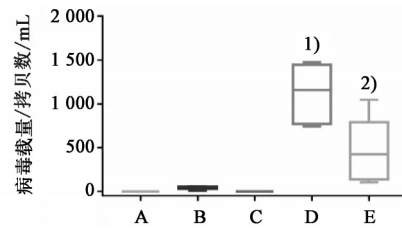
A. 正常组;B. 病毒感染组;C. 寒湿组;D. 寒湿疫毒袭肺证模型组;E. 金柴抗病毒胶囊高剂量组;F. 金柴抗病毒胶囊低剂量组(图5同);与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与寒湿疫毒袭肺证模型组比较²⁾ $P<0.01$ (图2,4同)

图1 金柴抗病毒胶囊对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型肺指数的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of Jinchai Kangbingdu capsule on lung index of 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model($\bar{x}\pm s, n=8$)

3.3 对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型病毒载量的影响 与正常组比较,寒湿疫毒袭肺证模型组肺组织中病毒载量显著增加($P<0.01$);与寒湿疫毒袭肺模型组比较,金柴抗病毒胶囊灌胃给药3d后,金柴抗病毒胶囊低剂量组病毒载量显著降低($P<0.01$)。见图2。

3.4 对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证

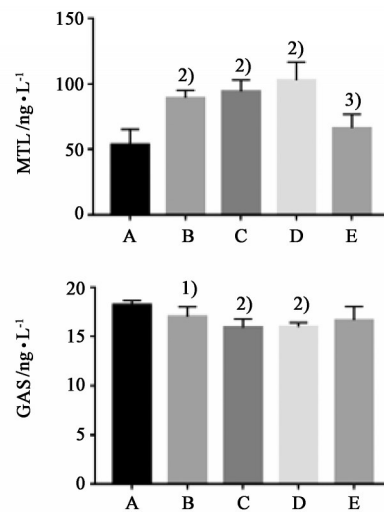


A. 正常组;B. 病毒感染组;C. 寒湿组;D. 寒湿疫毒袭肺证模型组;E. 金柴抗病毒胶囊低剂量组(图3,4,6同)

图2 金柴抗病毒胶囊对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型病毒载量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of Jinchai Kangbingdu capsule on virus load of 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model($\bar{x}\pm s, n=8$)

结合模型MTL, GAS的影响 与正常组比较,寒湿疫毒袭肺证模型组血清中MTL含量显著增加,GAS含量显著降低($P<0.01$);与寒湿疫毒袭肺证比较,将金柴抗病毒胶囊给药3d后,金柴抗病毒胶囊低剂量组MTL含量显著降低($P<0.01$),GAS含量没有明显变化。见图3。



与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与寒湿疫毒袭肺证模型组比较³⁾ $P<0.01$

图3 金柴抗病毒胶囊对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型MTL和GAS的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 3 Effect of Jinchai Kangbingdu capsule on level MTL and GAS of 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model($\bar{x}\pm s, n=8$)

3.5 对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型炎症因子的影响 与正常组比较,寒湿疫毒袭肺证模型组肺组织中IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 含量均显著增加($P<0.01$);与寒湿疫毒袭肺证比较,金柴抗病毒胶囊给药3d后,金柴抗病毒胶囊低剂量组肺组织中IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 含量均显著降低($P<0.01$)。见图4。

3.6 对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证

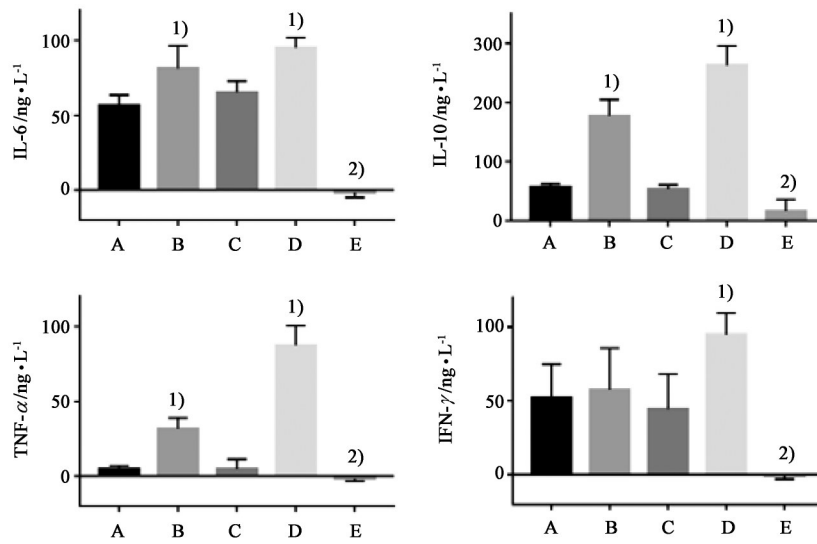


图4 金柴抗病毒胶囊对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 4 Effect of Jinchai Kangbingdu capsule on inflammatory factors level of 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model($\bar{x}\pm s, n=8$)

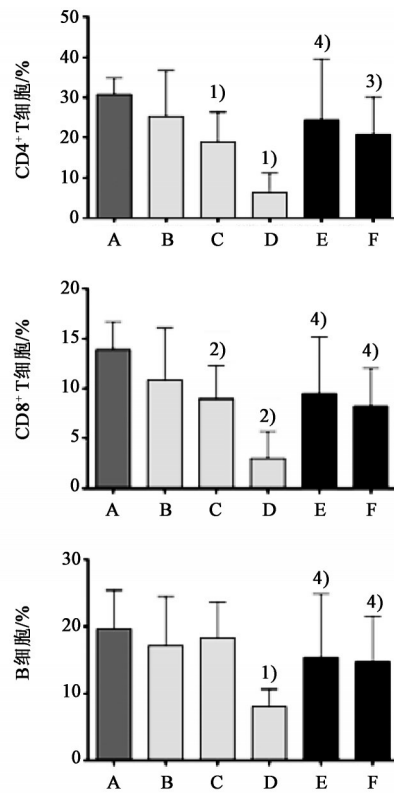
结合模型外周血淋巴细胞比例的影响 与正常组比较,寒湿疫毒袭肺证外周血中CD4⁺T细胞,CD8⁺T细胞,B细胞含量均明显降低($P<0.05, P<0.01$);与寒湿疫毒袭肺证比较,金柴抗病毒胶囊给药3d后,金柴抗病毒胶囊高、低剂量组外周血中CD4⁺T细胞,CD8⁺T细胞,B细胞含量均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见图5。

3.7 对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型肺组织病理改变的影响 正常组小鼠肺部组织未见有肿胀,间质未见有明显瘀血及炎性渗出,结构正常;寒湿疫毒袭肺证组小鼠肺组织内有大面积出血性片状红染,病变似毛玻璃样改变,肺泡组织急性衰亡;金柴抗病毒胶囊低剂量组小鼠肺内无玻璃样变,间质炎性渗出,组织肺气肿、血管的玻璃样变等病变有一定程度的减轻。见图6。

4 讨论

2020年3月11日WHO总干事谭德塞在瑞士日内瓦正式宣布新型冠状病毒进入全球大流行状态,是继2009年H1N1流感疫情之后的又一次全球大流行的疾病。在过去的2周时间里,中国境外的新型冠状病毒肺炎病例数量已经增加了13倍,受疫情影响的国家数量增加了2倍,在未来几周内,确诊病例数、死亡人数和受疫情影响国家的数量还会进一步攀升^[8]。

杨洋等^[9]认为新冠病毒肺炎的中医病机为疫毒袭肺,肺失宣降,邪热夹湿耗伤气阴,病位主要在肺,或兼在脾胃,以湿为主,或热或寒,湿热偏多。孙良明等^[10]根据新型冠状病毒感染肺炎临床表现,



与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与寒湿疫毒袭肺证模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

图5 金柴抗病毒胶囊对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型外周血淋巴细胞比例的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 5 Effect of Jinchai Kangbingdu capsule on number of lymphocytes of 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model($\bar{x}\pm s, n=8$)

结合薛伯寿教授和蒲辅周先生的学术思想及临床经验,认为新型冠状病毒肺炎为寒湿疫,病位主要在肺。仕丽等^[11]认为新型冠状病毒肺炎的病机关键是疫毒与寒湿搏结于肺,机体气化顿滞,肺体受

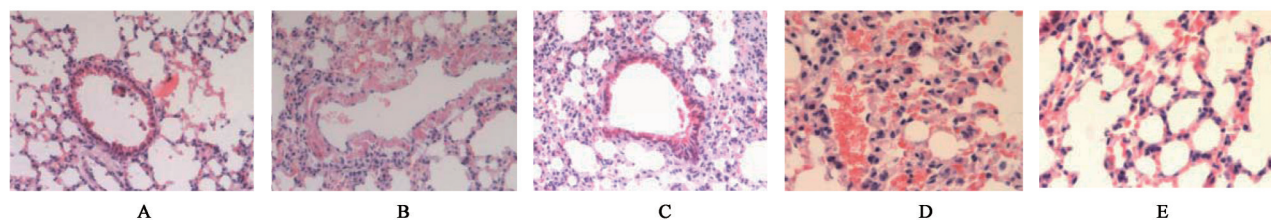


图6 金柴抗病毒胶囊对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型肺组织病理损伤的影响(HE, ×200)

Fig. 6 Effect of Jinchai Kangbingdu capsule on pathological damage in lung tissue of 'Hanshi Yidu Xifei' syndrome model(HE, ×200)

损、肺络痹阻,寒湿因疫毒迅速热化,甚至化火成毒。

基于上述的中医病因病机和临床的症状表现,笔者采用寒湿刺激加病毒感染的造模方式模拟人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证的病证结合小鼠模型,发现小鼠出现扎堆不动、皮毛潮湿打结、大便增多黏腻等表现,与临床寒湿证的表现一致;MTL和GAS是反映寒湿困脾的重要指标,MTL的作用主要是刺激胃和上消化道运动,促进胃排空、兴奋胃平滑肌细胞;GAS能刺激胰液和胆汁等多种消化液分泌,并刺激胃肠收缩,本模型小鼠血清中MTL含量升高,GAS含量降低,与寒湿证动物模型的表现一致^[12]。金柴抗病毒胶囊对寒湿疫毒袭肺证小鼠的活动度、反应能力、皮毛和大便状态均有明显的改善,并可以明显降低小鼠血清中MTL含量,说明金柴抗病毒胶囊对寒湿疫毒袭肺证中医证型表现具有明显改善作用。

寒湿疫毒袭肺证模型组小鼠肺指数和肺组织中病毒载量明显升高,且高于病毒感染组,说明在本实验模拟的寒湿刺激条件下,人冠状病毒HCoV-229E能对Balb/c小鼠肺组织造成明显的损伤,病毒增殖显著。金柴抗病毒胶囊可以明显降低寒湿疫毒袭肺证小鼠模型的肺指数和病毒载量,说明其对冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证具有明显的治疗作用。

临床研究显示,新型冠状病毒肺炎重症感染患者中普遍存在细胞因子风暴现象,血浆中炎症因子IL-1 β , IFN- γ , IFN- γ 诱导蛋白10(IP-10)和MCP-1浓度显著升高,且重症收治ICU患者比非ICU患者血浆中粒细胞集落刺激因子(G-CSF), IP-10, 单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1), 巨噬细胞炎症蛋白1 α (MIP1 α)和TNF- α 浓度升高更加显著,说明细胞因子风暴与新型冠状病毒肺炎严重程度有关^[13-14]。细胞因子风暴可引起肺泡上皮细胞和血管内皮细胞的弥漫性损伤,进而导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS),使病情迅速恶化,最终导致多器官衰竭致

死^[15]。本实验中寒湿疫毒袭肺证模型组小鼠肺组织中IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 含量均明显升高,说明本模型中炎症因子大量分泌,与新型冠状病毒肺炎临床表现具有一定的相似性;金柴抗病毒胶囊明显降低炎症因子含量,说明其对冠状病毒HCoV-229E引起的炎症因子释放具有明显的抑制作用。

根据对新型冠状病毒肺炎患者进行临床特征分析,发现53.56%的患者淋巴细胞减少,40.36%的患者CD4⁺T淋巴细胞减少^[16];胡家光等^[17]发现新型冠状病毒肺炎患者淋巴细胞绝对值显著下降,CD4⁺T淋巴细胞绝对计数减少。本实验中寒湿疫毒袭肺证模型组小鼠外周血中CD4⁺T细胞, CD8⁺T细胞, B细胞含量均明显降低,与临床报道具有一定程度的相似性,其机制可能与病毒感染活化淋巴细胞,在抗病毒过程中,导致淋巴细胞严重损伤与凋亡有关。金柴抗病毒胶囊可以明显升高外周血CD4⁺T细胞, CD8⁺T细胞, B细胞数量,说明其可能通过调节小鼠免疫功能,提高淋巴细胞数量来发挥抗病毒作用。

透表解毒法即是针对急性呼吸道病毒性疾病早期发病急骤、具有传染、传播迅速的特点确立的治法,旨在尽早祛除病邪,截断病势,防止传变。透表为先,宣透气机,引邪外达,使邪有出路,并以解毒之法,追逐荡伐,一举歼灭,既助正气祛邪外出之势,又防关门留寇之患。金柴抗病毒胶囊中北柴胡、金银花为君药,可共奏清宣透达、清热解毒之效,并具芳香辟秽之功,可透解卫分疫毒秽浊之病邪;连翘、黄芩、贯众,助君药清热解毒、引邪外出;清半夏辛温,燥湿化痰、和胃降逆,既可与轻透之药配合,使内外通和、气机调达疫毒顿消,又取其辛温之性,增加散透之力。结果显示,金柴抗病毒胶囊在人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证模型上具有较好的治疗作用,其可以改善寒湿证的行为表征和相关指标水平,同时减低肺指数和肺组织中病毒载量,初步探讨其机制可能与降低炎症因子含量、提升淋巴细胞数量有关。

[参考文献]

- [1] Nature . Coronavirus latest: WHO officially names disease COVID-19 [J]. 2020, doi: com/articles/d41586-020-00154-w.
- [2] 国家卫生健康委员会. 截至3月24日24时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况 [EB/OL]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202003/b882c06edf184fbf800d4c7957e02dad.shtml>, 2020-03-24/2020-03-27.
- [3] WHO. Novel Coronavirus (COVID-19) Situation [EB/OL]. <https://experience.arcgis.com/experience/685d0ace521648f8a5beeeeb9125cd>, 2020-03-25/2020-03-27.
- [4] 科技部. 国务院联防联控机制就医疗救治工作进展情况举行发布会 [EB/OL]. <http://news.cnfol.com/zhengquanyaowen/20200217/27958348.shtml>, 2020-02-17/2020-03-27.
- [5] 古敏, 刘娇, 史楠楠, 等. 中医药分期防治新型冠状病毒肺炎的药性功效分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20200225.501.
- [6] 詹志来, 刘佳, 杨伟, 等. 基于病例分析的中医药治疗新型冠状病毒肺炎疗效评价标准的探索研究 [J]. 中医杂志, 2020, doi: 11.2166.R.20200312.0949.002.html.
- [7] 钟菊迎, 崔煦然, 崔晓兰, 等. 金柴抗病毒胶囊对甲型流感病毒 H1N1 肺炎模型小鼠的保护作用与机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(4): 894-898.
- [8] WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19-11 March 2020 [EB/OL]. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>, 2020-03-11/2020-03-27.
- [9] 杨洋, 高培阳, 黄青松, 等. 试从中医“疫毒夹湿”探讨新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 防治思路 [J]. 中药药理与临床, 2020, doi: 10.13412/j.cnki.zyyi.20200311.001.
- [10] 孙良明, 陈劲松, 薛燕星, 等. 国医大师薛伯寿治疗新型冠状病毒肺炎思路 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, doi: 11.5511.R.20200304.1800.002.html.
- [11] 仕丽, 刘继民, 牛崇阳, 等. 王檀教授从气化顿滞论治新型冠状病毒肺炎 [J]. 吉林中医药, 2020, doi: 10.13463/j.cnki.jlzyy.2020.04.001.
- [12] 王常松, 吴同玉, 陈学习, 等. 寒湿困脾证动物模型的建立和评价 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(5): 75-78.
- [13] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020, 395 (10223) : 497-506.
- [14] XU Z, LI S, TIAN S, et al. Full spectrum of COVID-19 severity still being depicted [J]. Lancet, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30308-1.
- [15] 王玉亮, 王峰, 耿洁. 细胞因子与细胞因子风暴 [J]. 天津医药, 2020, doi: 12.1116.R.20200311.1245.002.html.
- [16] 程克斌, 魏明, 沈虹, 等. 普通型和重型新型冠状病毒肺炎康复患者 463 例临床特征分析 [J]. 上海医学, 2020, doi: 31.1366.r.20200312.1254.004.html.
- [17] 胡家光, 蒋忠胜, 李旭, 等. 新型冠状病毒肺炎患者 16 例外周血 T 淋巴细胞亚群的变化及意义 [J]. 广东医学, 2020, doi: 10.13820/j.cnki.gdyx.20200588.

[责任编辑 周冰冰]