

Poly(I:C)诱导小鼠细胞因子风暴模型的建立及青蒿琥酯、清肺排毒汤的干预作用

石航^{1,2}, 周虹颖^{2,3}, 李兰芳², 于桂花², 程卉^{1,4}, 李沧海^{2*}, 王华晶^{2,3*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 中国中医科学院青蒿素研究中心, 北京 100700; 4. 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] 目的:观察青蒿琥酯及清肺排毒汤对病毒模拟物 Poly(I:C)诱导的小鼠细胞因子风暴(CS)动物模型的干预作用。方法:采用84只SPF级雄性BALB/c小鼠随机分为7组,每组12只,除空白组12只外,余下的72只以15 mg·kg⁻¹剂量尾静脉注射 Poly(I:C)攻击建立CS模型小鼠,并给予青蒿琥酯低、中、高剂量组(10、20、40 mg·kg⁻¹)、清肺排毒汤组(2.4 g·kg⁻¹)、地塞米松组(10 mg·kg⁻¹)。6 h后取肺组织、支气管肺泡灌洗液(BALF)、脾脏、肺脏及外周血。计算肺脏、脾脏指数;检测BALF中炎症细胞数量;苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肺组织病理变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测BALF中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6含量;流式细胞术检测并分析BALF及外周血中免疫细胞表达情况。结果:对小鼠肺脏、脾脏指数分析显示,与空白组比较,模型组肺脏、脾脏指数均有不同程度升高($P<0.05$);与模型组比较,青蒿琥酯各处理组明显降低脾脏指数($P<0.05$),青蒿琥酯低剂量组明显降低肺脏指数($P<0.05$),清肺排毒汤对肺脏、脾脏指数均明显降低($P<0.05$)。ELISA结果显示,与空白组比较,模型组小鼠除TNF- α 外,IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6含量均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,青蒿琥酯低剂量组及清肺排毒汤组明显降低TNF- α 含量($P<0.05$),且各药物处理组均明显降低IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6含量($P<0.05$)。对BALF中炎症细胞计数发现模型组细胞数量呈下降趋势,除地塞米松组外各给药组处理后细胞数量均明显升高($P<0.05$)。流式细胞术检测后发现,与空白组比较,模型组外周血中CD3数量明显降低($P<0.05$),Ly-6G、F4/80数量明显升高($P<0.05$),模型组BALF中CD45、CD3、F4/80数量明显降低($P<0.05$),Ly-6G数量明显上升($P<0.05$);与模型组比较,外周血免疫细胞检测中发现青蒿琥酯处理组和清肺排毒汤组明显升高CD45含量($P<0.05$),降低Ly-6G、F4/80数量($P<0.05$),BALF免疫细胞检测中发现可升高CD45、F4/80含量($P<0.05$),降低Ly-6G数量($P<0.05$)。结论:青蒿琥酯及清肺排毒汤对Poly(I:C)诱导的小鼠CS有较好的保护作用,其作用机理与有效干预机体免疫细胞紊乱有关。

[关键词] 细胞因子风暴; 青蒿琥酯; 清肺排毒汤; 炎症

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0094-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230801

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230316.0954.001.html>

[网络出版日期] 2023-03-17 16:41:59

Establishment of Poly(I:C)-induced Cytokine Storm Model in Mice and Intervention Effect of Artesunate and Qingfei Paidu Decoction

SHI Hang^{1,2}, ZHOU Hongying^{2,3}, LI Lanfang², YU Guihua², CHENG Hui^{1,4},
LI Canghai^{2*}, WANG Huajing^{2,3*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Artemisinin Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
4. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230012, China)

[收稿日期] 2022-11-11

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82141001,81641002);中国中医科学院创新工程项目(CI2021A05109)

[第一作者] 石航,硕士,从事中药及其方剂的作用原理及青蒿素类药物的作用机制研究,E-mail:shihang0202@163.com

[通信作者] *李沧海,博士,副研究员,从事中药及其方剂的作用原理及青蒿素类药物的作用机制研究,E-mail:chli@icmm.ac.cn;

*王华晶,博士,助理研究员,从事疟原虫青蒿素抗药性研究,E-mail:hjwang1991@icmm.ac.cn

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effect of artesunate (ART) and Qingfei Paidu decoction (QFPD) on the mouse model of cytokine storm (CS) induced by viral mimic Poly (I:C). **Method:** Eighty-four SPF male BALB/c mice were randomly divided into seven groups, with 12 mice in each group. Mice, except for those in the blank group ($n=12$), were subjected to CS model induction by tail vein injection of Poly (I:C) at $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, followed by drug treatments of low-dose ART (ART-l, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium-dose ART (ART-m, $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), high-dose ART (ART-h, $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Qingfei Paidu Decoction (QFPD, $2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and dexamethasone (DXM, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). After 6 hours, lung tissues, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), spleen, lung, and peripheral blood were collected. The lung and spleen indexes were calculated and the number of inflammatory cells in BALF was detected. The pathological changes in lung tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin- 1β (IL- 1β), and IL-6 in BALF were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of immune cells in BALF and peripheral blood was detected by flow cytometry. **Result:** The analysis of lung and spleen indexes showed that compared with the blank group, the model group showed increased lung and spleen indexes to varying degrees ($P<0.05$). Compared with the model group, the ART groups showed reduced spleen index ($P<0.05$) and the ART-l group showed reduced lung index ($P<0.05$). Additionally, the QFPD group showed reduced lung and spleen indexes ($P<0.05$). ELISA results showed that except for TNF- α , the levels of IFN- γ , IL- 1β , and IL-6 in the model group increased compared with those in the blank group ($P<0.05$). Compared with the model group, the ART-l group and the QFPD group showed reduced content of TNF- α ($P<0.05$), and all groups with drug intervention showed reduced content of IFN- γ , IL- 1β , and IL-6 ($P<0.05$). The number of inflammatory cells in BALF showed a downward trend in the model group, and the number of cells increased in the groups with drug intervention except for the DXM group ($P<0.05$). Flow cytometry showed that compared with the blank group, the model group showed decreased number of CD3 in the peripheral blood ($P<0.05$), increased Ly-6G and F4/80 ($P<0.05$), decreased expression of CD45, CD3, and F4/80 in BALF ($P<0.05$), and increased expressions of Ly-6G ($P<0.05$). Compared with the model group, the ART groups and QFPD group showed increased CD45 content in peripheral blood ($P<0.05$), decreased Ly-6G and F4/80 content ($P<0.05$), increased CD45 and F4/80 content in BALF ($P<0.05$), and decreased expression of Ly-6G ($P<0.05$). **Conclusion:** ART and QFPD have a good protective effect on Poly (I:C)-induced CS in mice, and the mechanism is related to the effective intervention in immune cell disorder.

[Keywords] cytokine storm; artesunate; Qingfei Paidu decoction; inflammation

2019年至今新冠肺炎席卷全球,世界范围内已有超6亿人感染过新冠病毒,其中有超600万人死亡^[1]。大多数死亡病例是老年人和患有基础疾病的患者,患者免疫调节能力不足,各脏器功能较弱,无法承受机体抵御持续的过激免疫反应,会发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和细胞因子风暴(CS),导致多器官衰竭(MOF),最终死亡^[2-6]。

CS又称为高细胞因子血症(Hypercytokinemia),是机体对于外界刺激引发的无序过激反应,其标志是体液中促炎细胞因子水平突然急剧升高,包括白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1、巨噬细胞炎症蛋白(MIP)- 1α 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 等,诱发恶性正反馈、免疫系统的过度激活^[7-9]。

青蒿琥酯是青蒿素的一种水溶性衍生物,在对青蒿琥酯的研究中,主要发现其存在一定的抗炎、抗病毒作用^[10-13]。清肺排毒汤通过方剂化裁重组可有效缓解往来寒热、喘而发热、咳而上气、乏力肢重、胸憋气短、肺闭不宣等症状^[14-16]。由于新冠肺炎患者的主要死因是机体遭受持续无序的过激免疫反应,为防止重症死亡率升高,干预过激的免疫反应,本文通过尾静脉注射Poly(I:C)诱导建立小鼠CS模型及青蒿琥酯和清肺排毒汤对其的干预作用进行探讨并对临床用药提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级6~8周龄雄性BALB/c小鼠84只,体质量20~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产合格证号SCXK(京)

2021-0006, 动物实验伦理批准号 2022B087。实验进行前各小鼠可自由摄食饮水, 饲养环境恒温恒湿, 小鼠经适应性饲养 5 d 后开始实验。

1.2 药物与试剂 聚肌胞注射液, 规格 2 mL/支, 10 支/盒, 国药准字 H20003201, 成都天台山制药有限公司; 青蒿琥酯, 批号 20220501, 昆药集团股份有限公司(昆药集团郑双庆老师馈赠); 清肺排毒汤(精制型)(颗粒剂), 成分: 麻黄 9 g、炙甘草 6 g、杏仁 9 g、生石膏 30 g、桂枝 9 g、泽泻 9 g、猪苓 9 g、白术 9 g、茯苓 15 g、柴胡 16 g、黄芩 6 g、姜半夏 9 g、生姜 9 g、紫菀 9 g、冬花 9 g、射干 9 g、细辛 6 g、山药 12 g、枳实 6 g、陈皮 6 g、藿香 9 g, 规格每袋装 6 g(相当于饮片 98 g), 批号 20210128, 江西省中科院大连化物所中药科学中心研制(中国中医科学院中药研究所屠呦呦老师馈赠); 地塞米松磷酸酸钠注射液, 批号 220209186, 规格 2 mL/支, 10 支/盒, 国药准字 H41020056, 郑州卓峰制药有限公司; 5% 碳酸氢钠注射液, 批号 22051221, 规格 10 mL/支, 5 支/盒, 国药准字 H41022238, 上海浦津林州制药有限公司; 0.9% 氯化钠注射液, 批号 1H20081202, 规格 10 mL/支, 40 支/盒, 国药准字 H20153179, 山东齐都药业有限公司。小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、 γ 干扰素(IFN- γ) 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 货号分别为 EK0527、EK0394、EK0411、EK0375), PerCP Cyanine5.5 抗小鼠 CD45、PE 抗小鼠 Ly-6G、APC 抗小鼠 F4/80(美国 Biolegend 公司, 批号分别为 B370638、B332036、B357259); FITC 抗小鼠 CD3(美国 Proteintech 公司, 批号 51001355); 红细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司, 货号 R1010); 4% 组织细胞固定液(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20220512); 无水乙醇、二甲苯、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司, 货号分别为 100092683、10023418、10004160); 苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 G1003); 其他试剂均为市售分析纯级。

1.3 仪器 CytoFlex LX 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); Multiskan sky 型全波长酶标仪、Sorvall ST 8R 型台式高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司); JSY-SC 型全自动细胞计数仪(广州博大博聚科技有限公司); BSA323S-CW 型分析天平、BSA3202S-CW 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; Donatello 型脱水机、Giotto 型染色机(意大利 Diapath 公司); JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机(上海徠

卡仪器有限公司); Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜、NIKON DS-U3 成像系统(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 分组 BALB/c 小鼠适应性饲养 5 d 后随机平均分为空白组、模型组、青蒿琥酯低、中、高剂量组、清肺排毒汤组和地塞米松组 7 个组, 每组 12 只, 标号并称体质量, 实验前禁食 12 h。

2.2 CS 模型的建立及药物干预 除空白组外, 其余各组小鼠参照 CUNNINGHAM 等^[17]按 15 mg·kg⁻¹ 尾静脉注射给予聚肌胞注射液[以下简称 Poly(I:C)], 建立小鼠 CS 模型。实验小鼠给药剂量及方法参照《药理实验方法学》中人和动物体表面积比值剂量表进行换算, 得到小鼠灌胃给予清肺排毒汤剂量为 2.4 g·kg⁻¹; 青蒿琥酯低、中、高剂量组及地塞米松组尾静脉注射剂量分别为 10、20、40、10 mg·kg⁻¹, 各给药组小鼠给予相应剂量的药物。

2.3 样品采集与处理 各组小鼠在药物治疗 6 h 后称体质量, 取小鼠的外周血至 EDTA 抗凝管中, 取脾脏、肺脏并称量, 后小鼠分为 2 批, 第 1 批 4 只小鼠肺脏称重后, 全肺于 4% 多聚甲醛中固定, 用于 HE 染色观察; 第 2 批 8 只小鼠沿气管插入插管收集支气管肺泡灌洗液(BALF), 0.2 mL 冷磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 8~10 次, 收集 BALF 于 2 mL 离心管中, 4 °C 条件下 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 8.5 cm, 下同)后转移上清液至新离心管, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测上清液中炎症因子含量, 细胞沉淀重悬, 进行炎性细胞计数及流式细胞术检测; 外周血抗凝处理后, 进行流式细胞术检测。

2.4 小鼠各脏器指数计算 给药 6 h 后, 小鼠称体质量, 摘取小鼠脾脏、肺脏, 称重并计算各脏器指数。脏器指数=脏器重量(g)/小鼠体质量(g)×100%。

2.5 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 含量 按照试剂盒说明书对 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 的含量进行测定。

2.6 BALF 炎性细胞计数 BALF 管内剩余的细胞沉淀用红细胞裂解液 1 mL 裂解 10 min, PBS 1 mL 清洗 2 次后, 离心弃上清, PBS 1 mL 重悬混匀计数。

2.7 HE 染色观察肺组织病理变化情况 全肺称重后用 4% 多聚甲醛固定 24 h 以上, 常规脱水石蜡包埋, 切片做 HE 染色, 观察其病理改变程度。

2.8 流式细胞术检测外周血及 BALF 炎性细胞群 细胞分子表面染色: 分别用 CD45 抗体、CD3 抗

体、Ly-6G抗体、F4/80抗体标记外周血及BALF中的T淋巴细胞(CD45⁺CD3⁺)、中性粒细胞(CD45⁺CD3⁻Ly-6G⁺)、单核-巨噬细胞(CD45⁺CD3⁻F4/80⁺)。取小鼠抗凝外周血50 μL,加入红细胞裂解液1 mL,轻轻涡旋,避光孵育10 min,4 °C条件下1 500 r·min⁻¹离心5 min后弃上清,重复3次。裂解后用PBS重悬细胞,离心弃上清,重复2次。后向离心管内加入PBS 200 μL,混匀,加入4种流式抗体避光染色30 min,PBS清洗2次后上机检测。BALF细胞沉淀处理步骤同外周血处理方法。

2.9 统计学处理 采用IBM SPSS Statistics 23软件进行统计学分析,数据统计前对数据进行正态性检验及方差齐性检验,若数据服从方差相同的正态分布,则使用单因素方差分析(ANOVA),采用 $\bar{x}\pm s$ 表示;若不符合,则使用非参数检验法,采用 $M(P_{25},P_{75})$ 表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Poly(I:C)诱导的小鼠CS模型建立 本研究中通过尾静脉注射方式给予15 mg·kg⁻¹ Poly(I:C),模拟病毒进入血循环,诱导全身炎症反应及细胞因子风暴的发生。在给予Poly(I:C) 1.5 h后小鼠出现少动,呼吸略急,精神不佳情况,出现明显体温升高;4 h左右出现少动嗜睡,呼吸急促、后肢无力,背部毛发皱、腹部毛发湿结,体温降低,有便溏现象;6 h时几乎不动,可见明显呼吸急促起伏,无进食行为、体温低,多抱团;8 h左右部分小鼠死亡,剩余存活小鼠24 h后恢复正常行为状态,造模成功率为82.14%。

3.2 对小鼠一般情况的影响 空白组小鼠精神状态良好,毛色平整顺滑有光泽,食欲佳,排便正常;青蒿琥酯低剂量组小鼠在1.5 h时出现轻度疲累症状,4 h时出现少动,皱毛情况,6 h时体温下降,小鼠有觅食行为;青蒿琥酯中剂量组小鼠在1.5 h时少动,4 h时腹部毛发湿结,稀便情况,6 h时呼吸急促,眼部分泌物增多,部分小鼠聚集取暖;青蒿琥酯高剂量组小鼠1.5 h时少动,4 h时出现皱毛,稀便,呼吸轻度受累情况,6 h时部分小鼠有觅食行为;清肺排毒汤组小鼠1.5 h时少动,4 h时小鼠精神不振,稀便,呼吸受累情况明显,6 h时小鼠几乎不动,小鼠有聚集取暖情况;地塞米松组小鼠在1.5 h时疲累症状轻,4 h时少动,毛发皱,6 h时大部分小鼠有觅食行为且呼吸较平缓。

3.3 对CS小鼠肺脏、脾脏脏器指数变化的影响 与空白组比较,模型组小鼠肺脏、脾脏指数明显

增大($P<0.05$)。经给药治疗后,与模型组比较,青蒿琥酯低剂量组及清肺排毒汤组小鼠肺脏指数显著减小,其余各组虽有降低趋势但差异无统计学意义;对于脾脏指数而言,各给药组与模型组比较均明显下降($P<0.05$),青蒿琥酯各剂量组未见明显剂量依赖性。见表1。

表1 青蒿琥酯及清肺排毒汤对CS小鼠肺、脾脏器指数的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 1 Effect of artesunate and Qingfei Paidu decoction on lung, spleen indexes in CS mice ($\bar{x}\pm s, n=12$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肺脏指数	脾脏指数
空白组		0.71±0.05	0.38±0.03
模型组		0.80±0.03 ¹⁾	0.52±0.04 ¹⁾
青蒿琥酯低剂量组	0.01	0.75±0.03 ²⁾	0.41±0.05 ²⁾
青蒿琥酯中剂量组	0.02	0.79±0.05	0.41±0.05 ²⁾
青蒿琥酯高剂量组	0.04	0.76±0.03	0.40±0.06 ²⁾
清肺排毒汤组	2.4	0.73±0.02 ²⁾	0.45±0.04 ²⁾
地塞米松组	0.01	0.78±0.03	0.41±0.03 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表2-表5和表9同)

3.4 对CS小鼠BALF中TNF-α、IL-1β、IL-6、IFN-γ含量的影响 ELISA结果显示,与空白组比较,模型组各细胞因子均有上升趋势,且除TNF-α外,IL-1β、IL-6、IFN-γ均明显上升($P<0.05$);与模型比较,各给药组的IL-1β、IL-6、IFN-γ浓度均明显降低($P<0.05$),而在TNF-α浓度的分析中发现青蒿琥酯低剂量组、清肺排毒汤组及地塞米松组可明显降低TNF-α含量($P<0.05$),青蒿琥酯中、高剂量组仅有下降趋势,差异无统计学意义。见表2。

3.5 对CS小鼠BALF中炎性细胞计数的影响 与空白组比较,模型组炎性细胞数量显著降低($P<0.05$),与模型组比较,除地塞米松组外,其余各给药组均可明显升高感染后BALF中炎性细胞数量($P<0.05$)。见图2。

3.6 对CS小鼠肺组织病理学的影响 空白组小鼠肺组织中肺泡结构完整,肺泡壁薄,未见炎性细胞浸润;模型组小鼠肺泡结构破坏,肺泡间隔断裂融合明显,肺泡内出现明显红细胞及炎性细胞浸润;与模型组比较,青蒿琥酯低、中剂量组肺泡结构明显完整,红细胞浸出减少,肺泡壁明显增厚,青蒿琥酯高剂量及地塞米松组肺泡结构相对完整,肺泡壁增厚,肺泡间隔内炎性细胞浸润程度加重;清肺排毒汤组肺泡间隔明显变宽,炎性细胞浸润严重,出现弥漫性损伤,支气管腔内充血渗出,有50%以上

表2 青蒿琥酯及清肺排毒汤对CS小鼠BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IFN- γ
空白组		15.50±8.63	47.33±13.15	59.02±22.31	38.23±8.45
模型组		20.04±9.24	61.96±13.73 ¹⁾	110.44±35.16 ¹⁾	51.87±5.99 ¹⁾
青蒿琥酯低剂量组	0.01	9.42±5.49 ²⁾	34.78±8.18 ²⁾	27.81±12.34 ²⁾	21.18±6.32 ²⁾
青蒿琥酯中剂量组	0.02	18.48±8.28	44.95±11.89 ²⁾	50.52±17.99 ²⁾	20.21±9.87 ²⁾
青蒿琥酯高剂量组	0.04	18.18±7.33	39.91±9.08 ²⁾	44.06±21.65 ²⁾	21.50±7.87 ²⁾
清肺排毒汤组	2.4	11.58±6.33 ²⁾	36.31±11.78 ²⁾	48.07±19.88 ²⁾	11.38±2.29 ²⁾
地塞米松组	0.01	9.83±6.54 ²⁾	40.19±8.70 ²⁾	29.33±15.25 ²⁾	23.83±5.43 ²⁾

表3 青蒿琥酯及清肺排毒汤对CS小鼠BALF中炎性细胞数量的影响 [M(P25, P75), n=8]

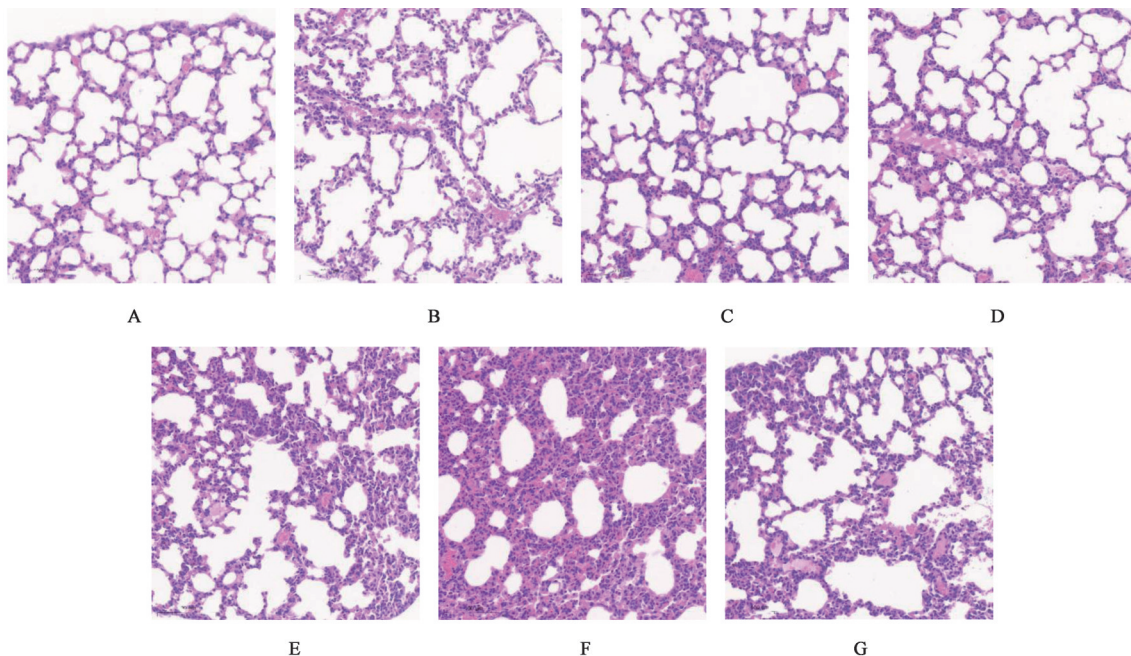
Table 3 Effect of artesunate and Qingfei Paidou decoction on inflammatory cells in BALF in CS mice [M(P25, P75), n=8]

组别	剂量/g·kg ⁻¹	炎性细胞数量($\times 10^6$ 个/mL)
空白组		2.33(1.99, 2.63)
模型组		1.03(0.81, 1.59) ¹⁾
青蒿琥酯低剂量组	0.01	2.18(1.81, 2.95) ²⁾
青蒿琥酯中剂量组	0.02	1.43(1.19, 1.85) ²⁾
青蒿琥酯高剂量组	0.04	3.00(2.20, 3.43) ²⁾
清肺排毒汤组	2.4	2.33(1.66, 3.22) ²⁾
地塞米松组	0.01	2.04(1.67, 2.30)

肺组织实质化。结果显示,青蒿琥酯对Poly(I:C)

诱导的肺部炎症损伤有一定的改善作用,清肺排毒汤的治疗效果不明显。见图1。

3.7 对CS小鼠外周血及BALF中免疫细胞数量的影响 流式细胞术检测外周血中炎症细胞结果显示,与空白组比较,模型组中CD3比例明显下降, Ly-6G及F4/80比例明显升高($P<0.05$), CD45比例有下降趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,各给药组CD45比例均明显升高($P<0.05$);青蒿琥酯低剂量组及地塞米松组CD3比例明显升高($P<0.05$),其他组差异无统计学意义;除清肺排毒汤组外,其余各给药组Ly-6G比例均明显降低($P<0.05$);各给药组均明显降低外周血中F4/80比例($P<0.05$)。见表4。



注:A.空白组;B.模型组;C.青蒿琥酯低剂量组;D.青蒿琥酯中剂量组;E.青蒿琥酯高剂量组;F.清肺排毒汤组;G.地塞米松组(图2同)

图1 青蒿琥酯及清肺排毒汤对CS小鼠肺组织病理学的影响(HE, $\times 150$)

Fig. 1 Effect of artesunate and Qingfei Paidou decoction on lung histopathology of CS mice (HE, $\times 150$)

表4 青蒿琥酯及清肺排毒汤对CS小鼠外周血中免疫细胞数量的影响 (n=8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD45($\bar{x}\pm s$)	CD3($\bar{x}\pm s$)	Ly-6G[M(P25, P75)]	F4/80($\bar{x}\pm s$)
空白组		0.51±0.09	0.30±0.04	0.19(0.18, 0.27)	0.00±0.00
模型组		0.46±0.09	0.07±0.02 ¹⁾	0.84(0.81, 0.86) ¹⁾	0.02±0.01 ¹⁾
青蒿琥酯低剂量组	0.01	0.60±0.13 ²⁾	0.15±0.02 ²⁾	0.67(0.63, 0.71) ²⁾	0.01±0.01 ²⁾
青蒿琥酯中剂量组	0.02	0.65±0.09 ²⁾	0.10±0.02	0.72(0.64, 0.77) ²⁾	0.01±0.01 ²⁾
青蒿琥酯高剂量组	0.04	0.67±0.11 ²⁾	0.10±0.02	0.67(0.64, 0.71) ²⁾	0.01±0.00 ²⁾
清肺排毒汤组	2.4	0.61±0.07 ²⁾	0.09±0.01	0.85(0.84, 0.86)	0.01±0.00 ²⁾
地塞米松组	0.01	0.66±0.14 ²⁾	0.14±0.04 ²⁾	0.66(0.58, 0.70) ²⁾	0.01±0.00 ²⁾

流式细胞术检测BALF中炎症细胞后发现,与空白组比较,模型组CD45、CD3、F4/80比例明显降低(P<0.05),Ly-6G比例明显提高(P<0.05);与模型组比较,各给药组CD45的比例明显升高(P<0.05),

Ly-6G数量明显降低(P<0.05);青蒿琥酯中剂量组及地塞米松组的CD3比例明显升高(P<0.05),其余各组差异无统计学意义;除清肺排毒汤组外,各给药组BALF中F4/80比例均明显提高(P<0.05),见表5。

表5 青蒿琥酯及清肺排毒汤对CS小鼠BALF中免疫细胞数量的影响 (n=8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD45[M(P25, P75)]	CD3($\bar{x}\pm s$)	Ly-6G($\times 10^{-2}$, $\bar{x}\pm s$)	F4/80($\bar{x}\pm s$)
空白组		0.87(0.82, 0.90)	0.01±0.00	0.01±0.02	0.93±0.03
模型组		0.62(0.56, 0.67) ¹⁾	0.00±0.00 ¹⁾	0.03±0.09 ¹⁾	0.79±0.07 ¹⁾
青蒿琥酯低剂量组	0.01	0.86(0.81, 0.87) ²⁾	0.00±0.00	0.16±0.13 ²⁾	0.87±0.04 ²⁾
青蒿琥酯中剂量组	0.02	0.89(0.80, 0.91) ²⁾	0.01±0.01 ²⁾	0.20±0.22 ²⁾	0.93±0.04 ²⁾
青蒿琥酯高剂量组	0.04	0.88(0.85, 0.91) ²⁾	0.01±0.00	0.09±0.22 ²⁾	0.91±0.05 ²⁾
清肺排毒汤组	2.4	0.84(0.81, 0.87) ²⁾	0.01±0.00	0.13±0.06 ²⁾	0.83±0.05
地塞米松组	0.01	0.86(0.83, 0.87) ²⁾	0.03±0.01 ²⁾	0.08±0.06 ²⁾	0.87±0.03 ²⁾

3.8 主成分分析(PCA) 为探究各剂量青蒿琥酯及清肺排毒汤对Poly(I:C)诱导的小鼠CS模型的治疗作用,以测得的15个指标为变量进行主成分分析,结果见表6,可见前5个主成分的特征值均≥1,且前5个主成分的累积方差贡献率为74.308%。在使用SPSS进行主成分分析降维过程中,认为特征值≥1或累积方差贡献率>85%的主成分具有一定的代表性^[18]。其中主成分1的方差贡献率为30.331%,占比最高,脾脏指数、外周血Ly-6G、BALF Ly-6G和外周血F4/80在主成分1上正载荷较高,说明中性粒细胞的数量在疾病进程中起主要作用;主成分2的方差贡献率为17.291%,占比次之, BALF IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6在主成分2上载荷较高,见表7。

以PC1为X轴,PC2为Y轴做主成分分析得分图,可见空白组与模型组间主要在主成分1上的距离较远,两组间有较大差异^[19],可见在CS疾病进程中,出现严重炎症反应,各种炎症细胞浸润,导致脾脏明显肿大;结合流式结果可得,外周血中模型组中性粒细胞的数量约为空白组的4倍, BALF中模型

表6 特征值、方差贡献率及累积方差贡献率

Table 6 Eigenvalues, variance contribution rate and cumulative variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率%	累积方差贡献率%
1	4.55	30.331	30.331
2	2.594	17.291	47.623
3	1.711	11.408	59.030
4	1.174	7.828	66.858
5	1.118	7.450	74.308

组中性粒细胞的数量约为空白组的25倍,中性粒细胞是人体主要的免疫细胞,有趋化、吞噬、杀菌作用,在机体受到侵害时免疫系统激活,中性粒细胞数量增高,并向疾病部位积聚,肺部中性粒细胞数量急剧升高,说明在肺部出现严重免疫反应。模型组与各给药组间主成分1、2均有较远距离,各给药组均可抑制Poly(I:C)诱导的脾肿大,使脾脏指数恢复至趋近正常水平;且除清肺排毒汤组外,其余各组均显著降低外周血中性粒细胞数量,在BALF

表7 主成分矩阵

Table 7 Principal component matrix

指标	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	主成分5
脾脏指数	0.827	0.062	-0.02	-0.03	-0.229
BALF Ly-6G	0.776	-0.108	0.045	0.203	0.356
BALF F4/80	-0.77	0.076	0.204	-0.117	0.099
BALF CD45	-0.729	-0.259	0.132	-0.195	-0.152
外周血 Ly-6G	0.688	-0.462	0.364	-0.138	-0.178
外周血 F4/80	0.656	-0.105	-0.181	0.251	-0.193
外周血 CD3	-0.549	0.464	-0.487	0.279	0.041
脾脏指数	0.505	-0.044	0.402	0.459	0.101
BALF IFN- γ	0.246	0.744	-0.011	0.209	0.354
BALF IL-1 β	-0.025	0.681	0.442	0.053	-0.293
BALF IL-6	0.384	0.632	0.098	-0.388	0.199
BALF TNF- α	0.118	0.601	0.531	-0.275	-0.279
外周血 CD45	-0.411	-0.418	0.529	0.294	-0.106
BALF CD3	-0.446	0.296	0.171	0.592	-0.252
炎性细胞计数	-0.299	-0.159	0.538	-0.013	0.65

中,青蒿琥酯低剂量、青蒿琥酯中剂量、清肺排毒汤组的中性粒细胞数可降至模型组的1/2,青蒿琥酯高剂量、地塞米松组可降至模型组的1/3;同时对BALF IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6指标的比较中各给药组与

模型组比较均可降低1/2-1/3,且青蒿琥酯各剂量组及地塞米松组均在PC1上与模型组相差距离较大,清肺排毒汤组及青蒿琥酯低剂量组在PC2上与模型组相差距离较大,可得青蒿琥酯及地塞米松可能是通过调节中性粒细胞数量影响免疫反应的发生和持续,而清肺排毒汤可能是通过降低促炎细胞因子的浓度改善炎症进程,见图2。

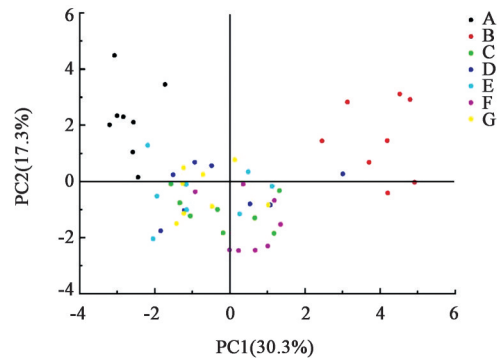


图2 主成分得分

Fig. 2 Plot of principal component scores

根据主成分得分及综合得分表可知,不同剂量青蒿琥酯及清肺排毒汤对Poly(I:C)诱导的小鼠CS模型的治疗效果的综合评分结果为青蒿琥酯低剂量组>青蒿琥酯高剂量组>地塞米松组>清肺排毒汤组>青蒿琥酯中剂量组>模型组,见表8。

表8 主成分得分及综合得分

Table 8 Principal component score and composite score

组别	主成分Y1得分	主成分Y2得分	主成分Y3得分	主成分Y4得分	主成分Y5得分	综合得分	排名
空白组	-2.675	2.238	-1.343	0.148	0.351	-0.540	1
模型组	3.991	1.498	-0.158	0.058	0.094	1.463	7
青蒿琥酯低剂量组	-0.163	-1.051	-0.533	0.119	-0.033	-0.286	2
青蒿琥酯中剂量组	-0.168	-0.340	1.468	-0.105	0.536	0.090	6
青蒿琥酯高剂量组	-0.825	-0.428	0.999	-0.455	-0.091	-0.251	3
清肺排毒汤组	0.485	-1.546	-0.171	-0.688	-0.520	-0.231	5
地塞米松组	-0.644	-0.369	-0.259	0.923	-0.334	-0.241	4

4 讨论

多种病原体、肿瘤的疾病进程中均会诱导CS的发生,导致促炎细胞因子的表达增加,患者的临床表现为持续发热、肝脾肿大,并出现细胞减少症、高铁蛋白血症等^[20-21],随后发展为ARDS及MOF,最终导致患者死亡^[22]。由于活病毒的研究存在一定风险,对实验室要求较高,限制较大,故建立门槛较低,安全稳定的动物模型显得尤为重要。

Poly(I:C)是人工合成的dsRNA病毒类似物,

作为特异性配体刺激TLR3,可诱导转录因子- κ B(NF- κ B)的活化和细胞因子的产生,同时dsRNA也是许多病毒复制周期中的一种常见中间体^[23],因此,大量研究应用Poly(I:C)模拟病毒感染。且多研究发现,注射Poly(I:C)后出现急性发热及炎症因子的表达升高^[17,24]。

在前期探索中分别使用7.5、10、12.5、15 mg·kg⁻¹ Poly(I:C)诱导小鼠CS发生,发现7.5、10、12.5 mg·kg⁻¹ 3个剂量小鼠均未出现明显少动,

嗜睡,且 7.5 、 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2个剂量组的小鼠在8 h左右恢复正常活跃状态, $12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组在14 h左右全部恢复正常状态, $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠在6 h后出现部分死亡,24 h左右剩余鼠可恢复正常,这是由于Poly(I:C)并不能进行复制,不能持续生成更多的dsRNA与TLR3结合,诱导相关炎症因子的表达。针对 12.5 、 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2个剂量组分别取血做流式细胞术验证外周血及BALF中白细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞及单核-巨噬细胞含量,结果发现二者趋势相同,由于细胞因子风暴存在一定的死亡率,故本研究选择 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Poly(I:C)作为造成小鼠CS模型的给药剂量。

根据病理染色结果,给予Poly(I:C)后小鼠肺部肺泡结构损伤严重,并伴有大量的炎症浸润,肺泡间隔增厚,肺部出现明显损伤,且根据小鼠呼吸状态证明小鼠肺部出现严重损伤;对ELISA结果分析发现,各细胞因子均出现上升,尤以IL- 1β 、IL-6、IFN- γ 显著;流式细胞术对外周血及BALF免疫细胞检测发现,出现明显淋巴细胞减少,以上结果可见小鼠出现严重全身炎症反应并造成肺部损伤,这些结果均与重症新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者的临床症状相似^[6,25-26],模型建立成功。

本研究尾静脉注射给予Poly(I:C)诱导小鼠CS模型,与常规滴鼻感染^[27]或腹腔注射Poly(I:C)^[28]诱导全身炎症方法比较,尾静脉注射Poly(I:C)可使病毒模拟物直接入血,避免肝脏首关消除过程,可直接发挥药效,且尾静脉注射容易操作,重现性高,模型更稳定。

目前对青蒿琥酯的研究认为,其主要可以抑制IL-6、TNF- α 和NF- κB 的表达,从而产生一定的抗炎作用^[29-32],且有研究发现甲氟喹-青蒿琥酯合用表现出强大的抗病毒活性,肺组织药物浓度显著增加^[33]。2021年8月,世界卫生组织(WHO)宣布,将青蒿琥酯在内的3种药物用于临床治疗,以评估其潜在的抗炎抗病毒能力^[34]。对临床患者的治疗中发现,清肺排毒汤能显著降低新型冠状病毒肺炎危、重型患者炎症因子水平,减轻炎症反应对机体的损伤^[35],且可显著改善患者的临床症状并缩短病程^[36-38]。

本研究发现青蒿琥酯及清肺排毒汤均可一定程度抑制肺泡内细胞因子表达,且低剂量的青蒿琥酯可显著性改变Poly(I:C)造成的小鼠肺部损伤,无明显量效关系,清肺排毒汤改善肺部损伤情况不明显。

通过对肺脏及脾脏指数分析发现,青蒿琥酯低剂量组及清肺排毒汤组肺脏指数显著降低,而其他给药组无此情况,说明低剂量的青蒿琥酯及清肺排毒汤对炎症反应造成的肺部水肿有一定的抑制作用;而对于人体最大的淋巴器官,执行免疫应答的脾脏而言,模型组小鼠出现明显脾脏肿大情况,且各给药组脾脏指数均显著降低,证明青蒿琥酯及清肺排毒汤均可抑制体内炎症反应的发生。

在病毒感染初期,由于疾病进程较快,多数白细胞吞噬和清除病毒,机体还没来得及进行免疫反应,导致出现白细胞数量减少的情况。在本研究中发现外周血及BALF中模型组的白细胞数均降低,各给药组均出现升高白细胞比例的情况,说明青蒿琥酯及清肺排毒汤2种药物均通过募集大量白细胞,比较发现主要通过升高机体T淋巴细胞数量及肺部的巨噬细胞数量,介导细胞免疫抵抗急性病毒感染的炎症反应;根据对BALF及外周血中炎症细胞的流式细胞术检测发现,在肺部发生的急性免疫反应主要募集的是肺巨噬细胞,在外周血内起主要作用的是中性粒细胞,固有免疫激活,导致大量的细胞因子释放,以IFN- γ 、IL-6为主,造成细胞因子风暴的发生;各给药组均可降低细胞因子浓度从而抑制CS的发生。

细胞因子风暴的主要特征是免疫细胞的过度激活和大量炎性细胞因子和化学介质的过度产生^[8],因此抑制免疫反应的过度激活及抑制细胞因子的表达是降低细胞因子风暴致死的关键。而青蒿琥酯及清肺排毒汤均可降低在CS进程中起主要影响的中性粒细胞数量,且一定程度上抑制各细胞因子的过度表达,从而达到减轻高强度炎症反应的目的。

综上所述,尾静脉注射 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Poly(I:C)诱导小鼠CS模型制备成功,青蒿琥酯及清肺排毒汤对Poly(I:C)诱导的急性全身炎症反应有一定的抑制作用,可能是通过快速募集免疫细胞到达病原位置,清除病原体,减轻机体的炎症反应,抑制促炎细胞因子的释放和表达,从而抑制细胞因子风暴的发生,且根据主成分分析综合评价显示,不同给药组的药理学综合评分为青蒿琥酯低剂量组>青蒿琥酯高剂量组>地塞米松组>清肺排毒汤组>青蒿琥酯中剂量组>模型组,青蒿琥酯低剂量的治疗效果最佳,且青蒿琥酯的治疗效果无明显的剂量依赖性。本研究旨在应用青蒿琥酯及清肺排毒汤治疗细胞因子风暴这一高危炎症反应提供一定的参考依据,为

临床治疗提供一定的理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. [2022-11-3]. <https://covid19.who.int/>.
- [2] BRODIN P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity [J]. *Nat Med*, 2021, 27(1):28-33.
- [3] 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.
- [4] RAMOS-RINCON J M, BUONAIUTO V, RICCI M, et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in very old patients hospitalized with COVID-19 in Spain [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2021, 76(3):e28-e37.
- [5] PIETROBON A J, TEIXEIRA F, SATO M N. Immunosenescence and inflammaging: Risk factors of severe COVID-19 in older people [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:579220.
- [6] KIM J S, LEE J Y, YANG J W, et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19 [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1):316-329.
- [7] BEHRENS E M, KORETZKY G A. Review: Cytokine storm syndrome: Looking toward the precision medicine era [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69(6):1135-1143.
- [8] HU B, HUANG S, YIN L. The cytokine storm and COVID-19 [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(1):250-256.
- [9] GU T, ZHAO S, JIN G, et al. Cytokine signature induced by SARS-CoV-2 spike protein in a mouse model [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:621441.
- [10] D'ALESSANDRO S, SCACCABAROZZI D, SIGNORINI L, et al. The use of antimalarial drugs against viral infection [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1):85.
- [11] GENDROT M, ANDREANI J, BOXBERGER M, et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An *in vitro* evaluation [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2020, 37:101873.
- [12] SARHAN A A, ASHOUR N A, AL-KARMALAWY A A. The journey of antimalarial drugs against SARS-CoV-2: Review article [J]. *Inform Med Unlocked*, 2021, 24:100604.
- [13] EFFERTH T, ROMERO M R, WOLF D G, et al. The antiviral activities of artemisinin and artesunate [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(6):804-811.
- [14] 蒋谦谦, 陈新宇. 基于方证辨证对清肺排毒汤快速有效治疗新型冠状病毒肺炎的思考 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(14):1204-1206.
- [15] 薛伯寿, 姚魁武, 薛燕星. “清肺排毒汤”快速有效治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(6):461-462.
- [16] 蒋时红, 李澜, 吴耀松, 等. 桂枝茯苓丸抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(15):132-136.
- [17] CUNNINGHAM C, CAMPION S, TEELING J, et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I: C) [J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(4):490-502.
- [18] 洪菲惠, 陈洁欣, 陈雨婵, 等. 基于非酒精性脂肪性肝炎模型及主成分分析的柴胡拆分组分引经药性归属探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(15):53-60.
- [19] 谢凯莉, 马喆, 龚慕辛, 等. 不同栽培品种及干燥工艺白芍花中 9 种有效成分含量测定及主成分分析 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(19):4643-4651.
- [20] CRON R Q, CHATHAM W W. Drs. Cron and chatham reply [J]. *J Rheumatol*, 2021, 48(8):1345-1346.
- [21] RAGAB D, SALAH ELDIN H, TAEIMAH M, et al. The COVID-19 cytokine storm; What we know so far [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1446.
- [22] JAFFER U, WADE R G, GOURLAY T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: A review [J]. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth*, 2010, 2(3):161-175.
- [23] PRUETT S B, FAN R, ZHENG Q. Acute ethanol administration profoundly alters poly I: C-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone [J]. *Life Sci*, 2003, 72(16):1825-1839.
- [24] FORTIER M E, KENT S, ASHDOWN H, et al. The viral mimic, polyinosinic: Polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287(4):R759-R766.
- [25] 丁雪, 孟鹏飞, 魏征, 等. 不同类型新冠肺炎患者住院时间及影响因素 [J]. *中医研究*, 2022, 35(9):11-14.
- [26] 李乾胜, 曹灿, 李玲玲, 等. 以 C-C 基序趋化因子配体 2 (CCL2) 为受体挖掘治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 潜在中药单体化合物 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(3):415-425.

- [27] TIAN X, XU F, LUNG W Y, et al. Poly I: C enhances susceptibility to secondary pulmonary infections by gram-positive bacteria [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9) : e41879.
- [28] RIBES S, ARCILLA C, OTT M, et al. Pre-treatment with the viral Toll-like receptor 3 agonist poly (I: C) modulates innate immunity and protects neutropenic mice infected intracerebrally with *Escherichia coli* [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):24.
- [29] UZUN T, BOZKURT M, DURAN B C, et al. Glandular odontogenic cyst [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2020, 30(1):104-105.
- [30] WANG Y, LIAO M, ZHANG Y, et al. Artesunate protects immunosuppression mice induced by glucocorticoids via enhancing pro-inflammatory cytokines release and bacterial clearance [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 890:173630.
- [31] SUN Z, MA Y, CHEN F, et al. Artesunate ameliorates high glucose-induced rat glomerular mesangial cell injury by suppressing the TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 293:11-19.
- [32] 岑彦艳, 赵祎博, 李攀, 等. 青蒿琥酯的药代动力学以及相关药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(19):3970-3978.
- [33] GENDROT M, DUFLOT I, BOXBERGER M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa; *In vitro* inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate [J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 99:437-440.
- [34] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO's Solidarity clinical trial enters a new phase with three new candidate drugs [EB/OL]. (2021-08-11)[2022-11-11]. <https://www.who.int/news/item/11-08-2021-who-s-solidarity-clinical-trial-enters-a-new-phase-with-three-new-candidate-drugs> Retrieved August 11.
- [35] 张平, 潘广涛. 清肺排毒汤改善新型冠状病毒肺炎危重型患者炎性细胞因子的临床研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(2):391-395.
- [36] 王晶亚, 李慧珍, 郭玉娜, 等. 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗老年新型冠状病毒肺炎 157 例临床疗效回顾性研究 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(20):1788-1794.
- [37] 王芳, 郭旸, 焦丽雯, 等. 清肺排毒汤联合西医常规治疗重型新型冠状病毒肺炎 50 例临床疗效回顾性分析 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(20):1801-1805.
- [38] 任星, 杨静, 张菀桐, 等. 基于网络药理学探讨新冠肺炎初期用药清肺排毒汤的作用机制 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(19):2845-2850.

[责任编辑 周冰冰]