

本文引用: 张琳曼, 李 钦, 张庭瑞, 温伟波. 清瘟解热方对湿热证型病毒性肺炎大鼠肺损伤及 CCL3/CCR5 信号通路的作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 1951–1958.

清瘟解热方对湿热证型病毒性肺炎大鼠肺损伤及 CCL3/CCR5 信号通路的作用

张琳曼¹, 李 钦^{1,2}, 张庭瑞¹, 温伟波^{1,2*}

1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650021; 2. 云南省中西医结合慢病防治重点实验室, 云南 昆明 650021

[摘要] **目的** 探讨清瘟解热方(以下简称 QWJR)对湿热证型病毒性肺炎大鼠肺损伤及 CCL3/CCR5 信号通路的作用。**方法** 将 48 只大鼠随机分为正常组、湿热模型组、阳性药物组(甲泼尼龙)、清瘟解热低剂量组(QWJR-L)、清瘟解热中剂量组(QWJR-M)、清瘟解热高剂量组(QWJR-H), 每组 8 只, 雌雄各半, 正常组自然环境饲养, 其余各组湿热外因+内因饲养 14 d。14 d 后, 除正常组气管注射 50 μ L PBS 外, 其余各组均运用 Poly(I:C)气管注射, 建立湿热证型病毒性肺炎大鼠模型。造模 2 h 后, 正常组和湿热模型组灌胃生理盐水, 其余各组给予相应药物干预, 连续给药 3 d。收集样本后检测相关指标。(1)湿热证评价指标: 大鼠症状、证候积分、体质量、血清总胆固醇(cholesterol, CHOL)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)含量、血常规;(2)肺泡毛细血管屏障变化、肺损伤情况: 肺组织的干湿比、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)总细胞计数、BALF 总蛋白浓度、HE 染色观察大鼠肺组织病理变化;(3)趋化因子 CCL3(CC chemokine Ligand 3, CCL3)/CC 趋化因子受体-5(CC chemokine receptor 5, CCR5)通路及下游因子: qPCR 法检测肺组织中 CCL3、CCR5、磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)mRNA 表达水平和 Western-Blot 法检测 CCL3、CCR5、PLC、PKC 蛋白表达水平。**结果** QWJR 干预后大鼠大便黏滞或泄泄伴臭秽, 肛门红肿污秽情况有所减轻, 大鼠湿热证候积分降低, 血脂 CHOL、LDL-C 水平降低($P<0.05$); 血常规中 WBC 及 NE 水平较模型组降低($P<0.05$); QWJR-M 组和 QWJR-H 组肺组织 W/D 值、BALF 中总蛋白含量、总细胞数均降低, 且以高剂量组治疗效果最显著($P<0.01$), 并有效改善大鼠肺组织病理损伤; 与模型组相比, 阳性药物组、QWJR-H 组大鼠 CCR5、PLC、PKC 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$), CCL3、CCR5、PLC、PKC mRNA 表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** QWJR 可减轻湿热大鼠湿热症状, 改善湿热证型病毒性肺炎大鼠肺部损伤情况, 该作用可能是通过抑制 CCL3/CCR5 信号通路实现的。

[关键词] 病毒性肺炎; 清瘟解热方; 肺损伤; 湿热证; 湿热证动物模型; CCL3/CCR5 信号通路

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.003

Effects of Qingwen Jiere Formula on lung injury and CCL3/CCR5 signaling pathway in rats with viral pneumonia of damp-heat pattern

ZHANG Linman¹, LI Qin^{1,2}, ZHANG Tingrui¹, WEN Weibo^{1,2*}

1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650021, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Integrated Chinese and Western Medicine for Chronic Disease Prevention and Treatment, Kunming, Yunnan 650021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Qingwen Jiere Formula (QWJR) on lung injury and CC chemokine Ligand 3 (CCL3)/CC chemokine receptor 5 (CCR5) signaling pathway in rats with viral pneumonia of damp-heat pattern. **Methods** Forty-eight rats were randomized into normal group, model group, positive drug group (methylprednisolone), as well as low-, medium-, and high-dose QWJR groups (i.e. QWJR-L, QWJR-M, and QWJR-H groups), with eight rats in each group, half male and half female. The normal group was raised in a natural environment, while the other groups were subjected to both exogenous and

[收稿日期] 2024-05-28

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(82260930; 82060864); 国家重点研发计划课题(2023YFF0724803); 国家中医药管理局新型冠状病毒感染中医药应急专项课题(2023ZYLCYJ02-24); 国家中医药多学科交叉创新团队项目(ZYYCXTD-D-202201); 云南省科学技术厅中医联合专项项目(202101AZ070001-020); 云南省科学技术厅重点研发计划项目(202103AC100005)。

[通信作者] * 温伟波, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 850923441@qq.com。

endogenous damp-heat conditions for 14 days. After 14 days, except for the normal group which received a tracheal injection of PBS 50 μ L, all other groups were administered with Poly(I:C) via tracheal injection to establish a rat model of viral pneumonia with damp-heat pattern. Two hours after model establishment, the normal and model groups were gavaged with saline, while the other groups received corresponding drug interventions for 3 consecutive days. Samples were collected for the following measurements: (1) Evaluation indicators of damp-heat pattern: rat symptoms, pattern scores, body mass, serum levels of cholesterol (CHOL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and blood routine test; (2) Changes in alveolar-capillary barrier and lung injury: measurement of the lung wet-to-dry weight ratio (W/D), as well as the total cell count and total protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and observation of pathological changes in the lung tissue using HE staining; (3) CCL3/CCR5 pathway and downstream factors: determination of CCL3, CCR5, PLC, and PKC protein and mRNA expression levels using qPCR and Western blot, respectively. **Results** After QWJR intervention, symptoms such as sticky or loose stools with a foul odor, and redness, swelling, and soiling around the anus were alleviated in the rats; the pattern scores for damp-heat were reduced, along with lower levels of serum CHOL and LDL-C ($P<0.05$); the levels of WBC and NE in the blood routine test were also lower than those of the model group ($P<0.05$). In the QWJR-M and QWJR-H groups, the lung W/D value and the total protein content and total cell count in BALF decreased, with the QWJR-H group showing the most significant therapeutic effect ($P<0.01$). Additionally, the pathological damage to the rat lung tissue was effectively reduced. Compared with the model group, the protein expression levels of CCR5, PLC, and PKC were lower in the positive drug and QWJR-H groups ($P<0.05$, $P<0.01$), and the mRNA expression levels of CCL3, CCR5, PLC, and PKC were also reduced ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Qingwen Jiere Formula can alleviate the symptoms of damp-heat and reduce lung injury in rats with viral pneumonia of the damp-heat pattern. The effects may be achieved through the inhibition of the CCL3/CCR5 signaling pathway.

[**Keywords**] viral pneumonia; Qingwen Jiere Formula; lung injury; damp-heat pattern; animal model of damp-heat pattern; CCL3/CCR5 signaling pathway

随着全球人口老龄化趋势加速,免疫抑制剂的普及使用以及病毒变异或新兴病毒的不断出现,病毒性肺炎的发病率显著增长,已占肺炎总发病率的10%~30%^[1]。有研究指出,在呼吸道病毒测试阳性的病例中,过半数患者最终发展成肺炎^[2]。云南省名中医温伟波主任医师依据病毒性肺炎的病理、云南特殊气候及湿热体质主导的特征,研发了清热化湿、芳香辟秽的清瘟解毒方,适用于发热、咽痛、咳嗽伴消化不良等症状^[3]。体外研究显示,清瘟解热合剂对多种常见及新型冠状病毒展示出广谱的抗病毒和抗炎作用^[4]。本研究通过建立湿热证病毒性肺炎大鼠模型,检测模型大鼠的湿热相关指标及肺泡毛细血管屏障变化情况,并进一步检测趋化因子 CCL3(CC chemokine ligand 3, CCL3)/CC 趋化因子受体-5(CC chemokine receptor 5, CCR5)通路相关因子及肺组织病理改变,分析清瘟解热方对湿热证型病毒性肺炎大鼠肺损伤的作用。

1 材料

1.1 动物

48只6~8周龄无特定病原体级(specific pathogen free, SPF)成年健康SD大鼠,8周龄,体质量180~220 g,雌雄各半,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物实验伦理通过云南中医药大学实验动物伦理委员会审批,审批号:R-062022031。

1.2 药物与试剂

1.2.1 药物及制备 清瘟解热方(以下简称QWJR):广藿香 15 g,滇柴胡 20 g,黄芩 12 g,连翘 12 g,法半夏 15 g,炒(姜)厚朴 12 g,草果 10 g,白薇 15 g,茵陈 15 g,蜘蛛香 15 g,滑石 15 g,炒神曲 20 g,甘草 9 g,购于国药控股云南有限公司。草果破碎后和其他药一起煎煮,煎3次:第1次加水1 850 mL,煎60 min后过滤;第2次加水1 480 mL,煎40 min后过滤;第3次加水1 110 mL,煎30 min后过滤。最后将滤液浓缩,用纯净水定容至300 mL,即清瘟解热方的规格为0.60 g(生药)/mL;甲泼尼龙片,辉瑞制药有限公司产品,批号:FD7748。

1.2.2 主要试剂 poly I:C(货号:J17GS151849,上海源叶生物科技有限公司);Rat NE ELISA试剂盒[货号:KE1601,安诺伦(北京)生物科技有限公司];CCL3 Polyclonal Antibody,CCR5 Polyclonal Antibody(货号:35E27A37,35E29A14,美国英杰生命技术有限公司);Anti-PKC antibody[货号:Ab109539,艾博抗(上海)贸易有限公司]。

1.2.3 主要仪器 Mini Amp Thermal Cycller PCR仪[型号:Mini Amp Thermal Cycller,美国应用生物系统(ABI)公司];酶标仪(型号:RT-6100,深圳雷杜生命科学股份有限公司产品);血液细胞分析仪(型号:TEK-VET3,江西特康科技有限公司产品);全自动生化分析仪(型号:SH11,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司产品);低温高速离心机(型号:H1-

16KR,湖南可成仪器设备有限公司产品);Nikon ECLI-PSE Ci 光学显微镜[型号:Nikon ECLIPSE Ci,尼康映像仪器销售(中国)有限公司产品];电子天平(型号:FA2004B,上海佑科仪器仪表有限公司产品)。

2 方法

2.1 分组及造模

大鼠适应性喂养 5 d,按照随机数字表法分为分为正常组、湿热模型组、阳性药物组、QWJR 低剂量组(QWJR-L)、中剂量组(QWJR-M)和高剂量组(QWJR-H),每组 8 只。正常组在自然环境[室内温度(26±2)℃,相对湿度 45%~60%]+普通饲料饲养,其余各组根据中医常用湿热造模法^[5-6]建立湿热大鼠模型,用高脂饲料(80%基础饲料+8%蜂蜜+12%猪油)喂养(内因),同时放入人工气候箱中温度(32±0.5)℃、湿度 90%±5%,每天在湿热环境中 8 h(8—17 时)(外因),14 d 后移至自然环境。Poly(I:C)是人工合成的双链 RNA 病毒类似物,其可激活宿主先天免疫反应,诱导 I 型干扰素和炎性细胞因子/趋化因子产生,造成肺上皮屏障功能受损常被用来制备病毒性肺炎肺损伤模型^[7-8],故本研究通过湿热模型组和各给药组加用 5 mg/kg Poly(I:C)溶解于 50 μL PBS 气管内注射,正常组气管内注射 50 μL PBS,建立病毒性肺炎大鼠模型。若出现饮食减少,毛发稀疏无光泽,反应迟钝,嗜睡懒动,肛周污秽,大便溏泄等湿热证型主要症状,即可判断造模成功^[8]。

2.2 分组用药

糖皮质激素对炎症因子具有良好的抑制作用,常被用作病毒性肺炎的辅助治疗^[9]。在病毒性肺炎的治疗中,糖皮质激素甲泼尼龙因其作用快、生物半衰期短、安全性好而被广泛使用^[10],故本实验选用甲泼尼龙作为阳性对照药物。

病毒性肺炎大鼠造模造模 2 h 后,正常组和湿热模型组灌胃生理盐水 2 mL/d;阳性药物组灌胃甲泼尼龙 3.43 mg/(kg·d),QWJR-L 组、QWJR-M 组、QWJR-H 组比为 1:2:4,分别灌胃生药 7.93 g、15.86 g、31.72 g/(kg·d)。所有组灌胃均为 1 次/d,连续灌胃 3 d。QWJR 各组为人等效剂量,根据动物给药剂量

换算公式^[11]得出。

将 QWJR 浓缩至 6 g(生药)/mL,QWJR-L、QWJR-M、QWJR-H 3 组大鼠给药体积分别为 1.32、2.64、5.28 mL/(kg·d);甲泼尼龙组以无菌 0.9%氯化钠溶液配成浓度为 0.686 mg/mL 的药液备用,大鼠给药剂量为 5 mL/(kg·d)。

2.3 生物样本的收集

2.3.1 血清的收集 清瘟解热方干预 3 d 后,所有大鼠禁食不禁水 8 h,运用腹腔注射 0.3%戊巴比妥钠溶液(10 mL/kg)进行麻醉大鼠,经腹主动脉采血,4℃、3 000 r/min,离心 15 min,收集上层血清。

2.3.2 BALF 及肺组织的收集 收集血清后,将大鼠处死,在气管叉处结扎右侧主支气管,应用注射器经气管缓慢注入冷 PBS 2 mL 行左肺支气管肺泡灌注,用注射器缓慢冲洗左肺 3 遍,回收支气管肺泡灌注液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),重复 3 次。收集的 BALF 在 4℃、2 000 r/min 离心 10 min,分别收集上清液和沉淀。此外,取右肺下叶组织用于湿干重比值检测;取右肺中叶组织固定于 10%福尔马林溶液中,用于病理检测;称取右肺上叶组织,冻存于-80℃冰箱中,用于后续检测。

2.4 指标检测

2.4.1 湿热证型病毒性肺炎模型评价指标 (1)一般情况及症候积分:造模期间,每天观察大鼠的饮食饮水、精神状态、形体、皮毛、眼睛、肛门、大小便等,于每天下午造模结束后的 17:00 用电子秤测量大鼠体质量。造模结束后参照文献判断湿热证小鼠模型建立成功与否^[12],并按各项证候无、轻、中、重程度记为 0、1、2、3 分,统计记录每只小鼠的证候积分,证候分类及积分设置如表 1 所示。

(2)血常规:血液细胞分析仪检测大鼠红细胞计数(red blood cell count, RBC)、白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)、血小板计数(blood platelet, PLT)、淋巴细胞计数(lymphocyte count, LYM)、中性粒细胞计数(neutrophilic-granulocyte, NE)。

(3)血脂:用全自动生化分析仪检测大鼠血清总胆固醇(cholesterol, CHOL)、低密度脂蛋白胆固醇

表 1 证候分类及积分设置

Table 1 Pattern classification and score setting

积分	精神状态	形体	毛皮	眼睛	肛门	大便	小便
0 分	反应敏捷	体格健壮	光泽亮丽	眼睛有神	洁净	黑褐色、麦粒状	色淡黄
1 分	行动迟缓	体重减轻	耸毛	眼裂变窄	红肿	软便	短小色黄
2 分	倦怠嗜卧	消瘦	毛湿	眯眼	脱垂	不成形	黄赤
3 分	精神萎靡	羸瘦	毛污秽	闭目	污秽	泄泻	浑浊

(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)的含量。

2.4.2 肺泡毛细血管屏障变化情况 (1)肺组织的湿重干湿比(Wet weight/干重 Dry weight, W/D):将右肺下叶置于干重纸上测湿重,在 80 ℃恒温箱中干燥 48 h 得到干重,计算 W/D 比。(2)总细胞计数:用 1 mL PBS 重悬 BALF 沉淀物并使用移液管充分混合,向血细胞计数板中加入 10 μL 细胞悬液,在 40×10 放大倍数下计数细胞总数。(3)总蛋白浓度:参照试剂盒内说明书,取 BALF 上清液,采用 BCA 蛋白测定法检测 BALF 上清液中总蛋白浓度。

2.4.3 肺组织病理学染色 取大鼠右肺中叶组织用 10%福尔马林溶液固定,脱水,石蜡包埋,5 μm 切片用 HE 染色进行病理学分析。

2.4.4 CCL3/CCR5 通路相关因子 (1)实时荧光定量PCR 检测肺组织 CCL3、CCR5、磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) mRNA 表达:使用 RNA 提取试剂盒提取肺组织总 mRNA,反转录 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。引物序列见表 2。PCR 体系各组分 2×SYBR Green Mix; 10 μL,上游引物(10 μmol/L):0.4 μL,下游引物(10 μmol/L):0.4 μL,模板:2 μL,加入灭菌蒸馏水至 20 μL,以 GAPDH 为内参。反应程序为预变性 95 ℃ 10 min,变性 95 ℃ 15 s,退火/延伸 60 ℃ 1 min,变性、退火/延伸共 45 个循环,以 2^{-ΔΔCt} 法得出 mRNA 表达量。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

基因	引物序列(5'→3')	长度/bp
CCL3	正向 CATGGCGCTCTGGAACGAA	19
	反向 TGCCGTCCATAGGAGAAGCA	20
CCR5	正向 CACCCTGTTTCGCTGTAGGA	20
	反向 GCAGTGTGTCATCCCAAGACTCTC	24
PLC	正向 GGTCTACCACTTCCTCCACTA	22
	反向 GCCTCCTCTTCCTCCTTCAC	20
PKC	正向 GTTACCCGCGCAACGACT	19
	反向 GTGGTTGCTTGAAGCG	17
GAPDH	正向 TCCTGCACCAACTGCTTAG	19
	反向 CAGATCCACAACGGATACATTGG	23

(2)Western blot 检测肺组织 CCL3、CCR5、PLC、PKC 蛋白表达:肺组织提取总蛋白后,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。将蛋白与上样缓冲液按照 4:1 的比例混合,100 ℃煮 5 min,SDS-PAGE 电泳后 200 mA 恒电流转膜,封闭液封闭 1 h。加入 1:1 000 稀释的 CCL3、CCR5、PLC、PKC 一抗,4 ℃摇床孵育过夜。洗

膜后加二抗,室温孵育 1 h,再次洗膜后加入 ECL 发光液,在 WB 化学发光仪中显影,照相。

2.5 统计学分析

用 SPSS 23.0 对数据进行统计。正态分布数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,当资料满足正态分布、方差齐性检验时,组间比较采用采用 one-way ANOVA。当资料不满足方差齐性检验时,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况及症候积分比较

正常组大鼠一般情况良好,皮毛光滑亮泽,反应灵活,饮食、饮水均正常。模型组大鼠烦躁、抓挠头面部频率较高,呼吸加快,伴大便黏滞或溏泄,肛门红肿污秽,食量、饮水量减少。给药后,阳性药物组大鼠烦躁、抓挠头面部频率减少,进食进水量略有增加。QWJR-M、QWJR-H 大鼠症状与阳性药物组相似,同时大便黏滞或溏泄伴臭秽,肛门红肿污秽情况改善更为明显。阳性药组、QWJR-M 及 QWJR-H 组较模型组降低明显($P<0.01$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠湿热症候积分比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of the damp-heat pattern scores among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	W/D
正常组	8	0.00±0.00
湿热模型组	8	12.13±1.81 ^{##}
阳性药物组	8	7.13±1.46 ^{##△△}
QWJR-L 组	8	9.88±1.73 ^{##△△}
QWJR-M 组	8	9.38±1.69 ^{##△△}
QWJR-H 组	8	7.25±1.49 ^{##△△}

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与湿热模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

3.2 各组大鼠体质量变化比较

与正常组相比,第 9、11 天 QWJR-M 大鼠体质量降低($P<0.05$),其余时间点各组间大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。湿热模型组、阳性药物组、QWJR-L、QWJR-M、QWJR-H 组大鼠体质量增长趋势低于正常组。详见图 1。

3.3 各组大鼠血常规值比较

与正常组相比,湿热模型组大鼠的 WBC 和 NE 增加($P<0.05$),HGB 显著下降($P<0.01$);与湿热模型组相比,阳性药物组大鼠 LYM 降低($P<0.05$),阳性药物组和 QWJR-H 组的大鼠 HGB 水平上升($P<0.05$),QWJR-H 组 NE 显著减少($P<0.01$)。详见表 4。

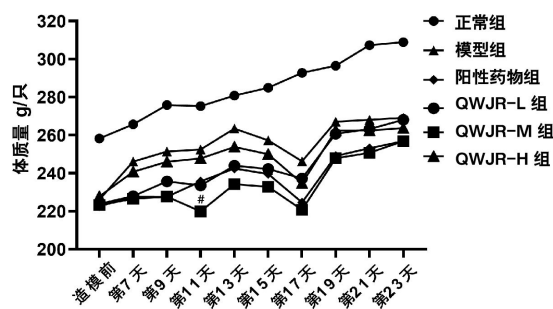


图1 各组间大鼠体重变化比较

Fig.1 Comparison of body mass changes among rat groups

注:与正常组比较,* $P<0.05$ 。

3.4 各组大鼠血脂水平比较

与正常组相比,湿热模型组大鼠 CHOL、LDL-C 升高,差异具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$),湿热模型组和 QWJR-H 组大鼠的 HDL-C 均显著升高($P<0.01$);与湿热模型组相比,各给药组 CHOL 显著降低($P<0.01$),QWJR-H 组大鼠 LDL-C 显著降低($P<0.05$)。详见表 5。

3.5 各组大鼠肺组织的 W/D 值

与正常组相比,湿热模型组大鼠肺组织 W/D 值升高($P<0.01$);与湿热模型组相比,QWJR-M 组、QWJR-H 组大鼠肺组织 W/D 值降低($P<0.01$)。详见表 6。

3.6 各组大鼠 BALF 沉淀中总细胞数比较

与正常组相比,模型组大鼠 BALF 沉淀中总细胞数升高($P<0.01$);与湿热模型组相比,给药组大鼠 BALF 沉淀中总细胞数降低($P<0.01$)。详见表 7。

3.7 各组大鼠 BALF 上清液中总蛋白浓度比较

与正常组相比,湿热模型组大鼠 BALF 上清液中总蛋白浓度升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性药物组、QWJR-M 组、QWJR-H 组大鼠 BALF 上清液中总蛋白浓度降低($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 7。

3.8 各组大鼠肺组织病理学改变

正常组大鼠肺组织形态结构完整,肺泡壁厚度正常,未见明显肺间质充血及炎性细胞浸润;湿热模型组肺组织形态结构失常,肺泡壁弥漫性增厚、肺间质可见炎性细胞浸润,部分肺泡融合成大泡;阳性药物及 QWJR-H 组干预后,大鼠肺组织病理学变化减轻。详见图 2。

3.9 各组大鼠肺组织 CCL3/CCR5 通路相关因子比较

3.9.1 各组大鼠肺组织 CCL3、CCR5、PLC、PKC mRNA 表达量比较 与正常组相比,湿热模型组大鼠 CCL3、CCR5、PLC、PKC mRNA 表达量升高($P<0.05$, $P<0.01$),阳性药物组 CCL3 mRNA 表达量降低($P<0.05$);与湿热模型组比较,阳性药物组、QWJR-M 组、QWJR-H 组大鼠 CCL3 mRNA 表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$),阳性药物组、QWJR-H 组大鼠 CCR5 mRNA 表达量降低($P<0.05$),各给药组 PLC mRNA 表达量降低,差异有显著性($P<0.01$),QWJR-H 组大鼠 PKC mRNA 表达量降低($P<0.05$);与阳性药物组比较,QWJR 各组大鼠 CCL3 mRNA 表达量升高($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 8。

3.9.2 各组大鼠肺组织 CCL3、CCR5、PLC、PKC 蛋白表达量比较 与正常组相比,湿热模型组 CCL3、CCR5、PLC、PKC 蛋白表达量升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),QWJR-L 大鼠 CCL3、PLC 蛋白表达量升高($P<0.05$);与湿热模型组比较,阳性药物组、QWJR-H 组大鼠 CCL3 蛋白表达量降低($P<0.05$),阳性药物组、QWJR-M 组、QWJR-H 组大鼠 CCR5、PLC 蛋白表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$),QWJR-H 组大鼠 PKC 蛋白表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 9、图 3。

表4 各组大鼠血常规值比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of blood routine values among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	WBC/($\times 10^9/L$)	RBC/($\times 10^{12}/L$)	HGB/(g/L)	PLT/($\times 10^9/L$)	LYM/($\times 10^9/L$)	NE/($\times 10^9/L$)
正常组	8	5.94 $\pm$ 1.66	8.04 $\pm$ 0.51	156.13 $\pm$ 7.90	698.63 $\pm$ 110.89	3.13 $\pm$ 0.89	1.60 $\pm$ 0.75
湿热模型组	8	7.83 $\pm$ 2.14 [#]	7.74 $\pm$ 0.38	137.75 $\pm$ 7.23 ^{##}	751.38 $\pm$ 136.17	3.75 $\pm$ 0.66	2.70 $\pm$ 0.74 [#]
阳性药物组	8	7.03 $\pm$ 1.68	8.05 $\pm$ 0.50	149.38 $\pm$ 10.13 [△]	689.13 $\pm$ 101.83	2.69 $\pm$ 0.58 [△]	2.56 $\pm$ 0.86 [#]
QWJR-L 组	8	7.33 $\pm$ 2.86	7.98 $\pm$ 0.61	143.75 $\pm$ 7.42 ^{##}	696.75 $\pm$ 134.32	3.26 $\pm$ 1.28	2.31 $\pm$ 1.54
QWJR-M 组	8	6.29 $\pm$ 1.87	7.74 $\pm$ 0.49	142.25 $\pm$ 12.00 ^{##}	734.25 $\pm$ 76.14	3.41 $\pm$ 0.66	2.26 $\pm$ 0.82
QWJR-H 组	8	6.20 $\pm$ 1.42	7.81 $\pm$ 0.60	147.25 $\pm$ 9.30 [△]	700.88 $\pm$ 99.75	3.41 $\pm$ 0.91	1.66 $\pm$ 0.47 ^{△△}

注:与正常组比较,* $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与湿热模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

表 5 各组大鼠血脂水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of serum lipid levels among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CHOL	LDL-C	HDL-C
正常组	8	1.08±0.25	0.26±0.19	0.8±0.1
湿热模型组	8	2.11±0.29 ^{##}	0.46±0.27 [#]	1.14±0.2 ^{##}
阳性药物组	8	1.3±0.19 ^{△△}	0.38±0.09	0.88±0.11
QWJR-L 组	8	1.42±0.3 ^{△△}	0.43±0.21	0.86±0.22
QWJR-M 组	8	1.35±0.08 ^{△△}	0.35±0.09	0.95±0.09
QWJR-H 组	8	1.08±0.3 ^{△△}	0.26±0.07 [△]	1.15±0.26 ^{##●●◇}

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与湿热模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与阳性药物组比较,[●] $P<0.05$;与 QWJR-L 组比较,[◆] $P<0.05$;与 QWJR-M 组比较,[◇] $P<0.05$ 。

表 6 各组大鼠肺组织 W/D 比较($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Comparison of the lung W/D among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	W/D
正常组	8	3.59±0.47
湿热模型组	8	7.05±2.16 ^{##}
阳性药物组	8	5.86±1.61
QWJR-L 组	8	4.99±1.49
QWJR-M 组	8	3.76±1.03 ^{△△}
QWJR-H 组	8	3.72±1.33 ^{△△}

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与湿热模型组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

表 7 各组大鼠 BALF 中总细胞数($\bar{x}\pm s$, $\times 10^4/L$)及总蛋白浓度比较($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Comparison of the total cell count ($\bar{x}\pm s$, $\times 10^4/L$) and total protein concentration ($\bar{x}\pm s$, $\mu g/mL$) in BALF among rat groups

组别	n	总细胞数/($\times 10^4/L$)	总蛋白浓度/($\mu g/mL$)
正常组	8	17.06±2.74	999.21±49.2
湿热模型组	8	184.58±9.57 ^{##}	1 900.9±206.53 ^{##}
阳性药物组	8	41.34±4.48 ^{△△}	1 604.15±287.57 [△]
QWJR-L 组	8	152.56±12.3 ^{△△}	1 693.64±230.03
QWJR-M 组	8	72.22±9.38 ^{△△}	1 546.00±198.96 [△]
QWJR-H 组	8	55.95±8.64 ^{△△}	1 248.34±173.02 ^{△△}

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与湿热模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

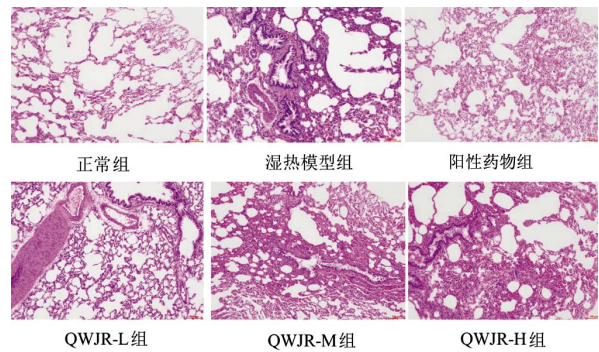


图 2 各组大鼠肺组织病理学改变($\times 100$)

Fig2 Lung histopathological changes in each rat group ($\times 100$)

表 8 各组大鼠肺组织 CCL3、CCR5、PLC、PKC mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 8 Comparison of mRNA expression levels of CCL3, CCR5, PLC, and PKC in the lung tissue among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CCL3	CCR5	PLC	PKC
正常组	8	1.25±0.98	0.86±0.39	0.61±0.31	1.06±0.89
湿热模型组	8	2.24±0.80 [#]	1.57±0.30 [#]	1.81±0.89 ^{##}	2.08±0.80 [#]
阳性药物组	8	0.35±0.19 ^{#△△}	0.87±0.54 [△]	0.86±0.61 ^{△△}	1.5±0.60
QWJR-L 组	8	1.77±0.89 ^{●●}	1.22±0.52	0.94±0.39 ^{△△}	1.76±0.60
QWJR-M 组	8	1.37±0.53 ^{△●}	1.14±0.62	0.87±0.59 ^{△△}	1.58±0.82
QWJR-H 组	8	1.36±0.93 ^{△●}	0.88±0.64 [△]	0.72±0.63 ^{△△}	1.24±0.67 ^{△△}

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与湿热模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与甲泼尼龙比较,[●] $P<0.05$,^{●●} $P<0.01$ 。

表 9 各组大鼠肺组织 CCL3、CCR5、PLC、PKC 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 9 Comparison of protein expression levels of CCL3, CCR5, PLC, and PKC in the lung tissue among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CCL3	CCR5	PLC	PKC
正常组	8	0.14±0.09	0.15±0.08	0.17±0.11	0.29±0.22
湿热模型组	8	0.27±0.10 [#]	0.39±0.07 ^{##}	0.18±0.18 ^{##}	0.64±0.24 ^{##}
阳性药物组	8	0.15±0.10 [△]	0.19±0.04 ^{△△}	0.22±0.21 [△]	0.39±0.14 [△]
QWJR-L 组	8	0.24±0.13 [#]	0.28±0.25	0.44±0.30 [#]	0.47±0.16
QWJR-M 组	8	0.17±0.10	0.22±0.21 [△]	0.19±0.17 [△]	0.44±0.18
QWJR-H 组	8	0.16±0.06 [△]	0.17±0.08 ^{△△}	0.17±0.15 [△]	0.34±0.09 ^{△△}

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与湿热模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

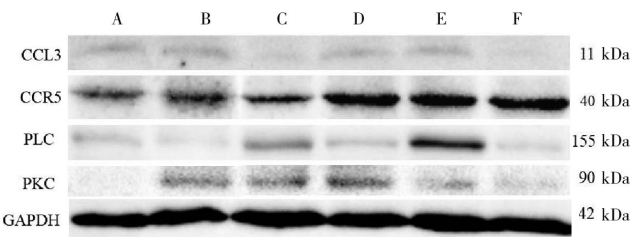


图 3 各组大鼠肺组织 CCL3、CCR5、PLC、PKC 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Fig.3 Comparison of protein expression levels of CCL3, CCR5, PLC, and PKC in the lung tissue among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

注:A.正常组;B.湿热模型组;C.阳性药组;D.QWJR-L 组;E.QWJR-M 组;F.QWJR-H 组。

4 讨论

中国西南部边界的云南省炎热潮湿,居民偏好辛辣饮食,这样的气候特点和饮食习惯易造成脾胃功能障碍,湿邪累积,同时湿热气候适宜病毒等病

原体的潜伏与扩散,内外因素共同作用下,易于形成“湿热疫”。在长期应对“湿热疫”的临床实践中,云南中医多运用“芳香辟秽”与“清热化湿”药物治疗“湿热疫”。清瘟解热方由藿香、柴胡、黄芩、连翘、法半夏、炒厚朴、草果、白薇、茵陈、蜘蛛香、滑石、炒神曲和甘草共13味药物组成,有清热化湿、芳香辟秽、燥湿止泻之功,符合治疗“湿热疫”的选方用药要求。

《脾胃论·饮食劳倦所伤始为热中论》中指出“饮食失节……脾胃乃伤”,提示过量摄入高脂肪食物会损伤脾胃功能。高脂饲料喂养小鼠,高脂饮食性质黏腻,难以运化,湿浊中阻,郁久化热,加之外湿热环境,脾胃为湿热之邪所困,气机失调,运化失常,湿热困脾,导致小鼠出现便溏,使得小鼠体质量下降,湿热下注,则易出现肛门红肿、秽臭,且热性炎上,挟胃气上逆,进一步导致小鼠食量降低,体质量下降。同时,湿热证与血脂代谢异常紧密关联,有研究表明,湿热证条件下甘油三酯(triglycerides, TG)、CHOL及LDL-C水平呈现显著升高趋势^[13-14]。长期处于湿热环境并过量摄入高脂肪食物的小鼠,内外湿热相合积聚体内,导致脾失健运,运化水湿、分清泌浊的功能失职,清瘟解热方中具有芳香醒脾、燥湿健脾止泻之功。且方中所用炒厚朴、蜘蛛香、神曲健脾助运、消食导滞、燥湿醒脾,脾胃得健,中焦湿热得以运化,升清降浊功能得以恢复。甲泼尼龙是临床被广泛使用的糖皮质激素药物,在病毒性肺炎治疗中具有良好疗效^[15],对机体的生长、代谢以及免疫功能等发挥调节作用,可在机体受到湿热外邪入侵时,通过调动机体多种功能达到促进机体恢复正常的功效。故清瘟解热方及甲泼尼龙干预后大鼠体质量出现了增长,湿热症候积分明显下降。与模型组相比,阳性药物组及清瘟解热方各剂量组大鼠血脂中CHOL水平显著降低,清瘟解热高剂量组LDL-C水平降低,提示清瘟解热方的疗效可能存在剂量依耐性。此外,模型组大鼠HDL-C水平显著提升,反映大鼠可能通过增强HDL-C的转运能力,促进CHOL向肝脏转移并代谢排出,以维护湿热条件下的脂质稳态^[16]。

《温热论·温病大纲》曰“温邪上受,首先犯肺”,肺为华盖,位居高位,肺为娇脏,清轻肃静,不耐邪气之侵犯。肺与外界相通,湿热之邪从口鼻而入,首先犯肺。气管滴注Poly(I:C)可致肺络受损,影响肺之宣发肃降功能,使得体内水液的输布、运行和排泄功能失常。故可见HE染色肺组织结构表现为病毒性肺炎所致的肺损伤特征。“脾为生痰之源”,内外湿热之邪郁遏中焦脾胃,脾失运化水饮;热毒壅积于

肺,耗气伤津,炼液成痰,“肺为贮痰之器”,痰停聚于肺,肺主气及宣发肃降功能失常,肺内气机逆乱,肺脾两脏功能失调,机体津液输布障碍,水液代谢失常,形成痰饮停积于肺。病毒性肺炎在病程中过度炎症反应导致肺毛细血管损伤、通透性增加,诱发肺水肿甚至出血,大量炎性细胞浸润,加剧了肺组织的病理损害^[17]。清瘟解热方干预后,可显著降低炎性细胞、肺W/D值、BALF中总蛋白含量、总细胞数,改善肺组织病理损伤,清瘟解热方可宣透肺热,和解疫毒,畅运中轴枢机,宣上畅中,宣上导下,使上焦得通,湿热得下,疏通经络郁结,对病毒性肺炎湿热证肺损伤具有保护作用,且与剂量大小相关,以高剂量组效果明显。此外,甲泼尼龙及高剂量清瘟解热方干预后的大鼠血红蛋白(hemoglobin, HGB)数量上升,提示清瘟解热方可改善湿热证病毒性肺炎大鼠缺氧状态。血红蛋白作为血液中携带氧气的主要分子,其浓度的提升直接关联于机体的氧合能力改善,进而可能缓解病毒性肺炎导致的呼吸困难和组织缺氧现象。

急性肺部感染引发的炎症反应中,外周血的中性粒细胞与巨噬细胞迁移到肺部并活化,释放炎症介质和细胞毒性物质,损害肺泡毛细血管结构,导致通透性肺水肿和急性肺损伤^[18]。CCL3又叫巨噬细胞炎性蛋白1- α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α),是一种重要的趋化因子,它可招募炎性细胞至感染区域,协同细胞因子介导感染进程。CCL3与CCR5受体结合,激活GPCR信号通路,分离异源三聚体G蛋白,形成ATP-G α 复合物PLC,研究发现,PLC- γ 1在流感病毒感染过程中以病毒亚型和细胞类型特异性方式发挥多种作用^[19-20]。活化的Gap亚基同时级联激活PKC可调控细胞增殖、凋亡、形态变化和受体表达等^[21]。大量研究表明,PKC在不同病因诱导的急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中发挥着重要作用^[22-23]。病毒性急性肺损伤发生早期肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-23等前炎症因子及趋化因子CCL3等释放,通过CCR5等受体及其下游的PLC、PKC发挥肺泡巨噬细胞募集作用,导致肺实质炎症及损伤。本研究发现,清瘟解热方抑制CCL3/CCR5信号轴的激活,下调PLC和PKC的表达,表明清瘟解热方可以通过抑制CCL3/CCR5信号通路改善病毒性肺炎大鼠肺损伤。

综上所述,清瘟解热方能有效降低湿热证型病毒性肺炎大鼠湿热症候积分,改善大鼠体质量下降

状况,改善肺泡毛细血管屏障,减轻肺损伤,其机制可能与抑制 CCL3/CCR5 信号通路有关。因清瘟解热方的疗效与剂量相关,接下需重点探索最合理有效的临床治疗剂量;可以结合网络药理学,进一步探索清瘟解热方治疗湿热型病毒性肺炎的作用靶点及相关通路。

参考文献

- [1] BRENNER N R, SHORR A F. The evolving burden of viruses in pneumonia[J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2019, 32 (2): 158-162.
- [2] HENRY C, ZAIZAFOUN M, STOCK E, et al. Impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on viral pneumonia[J]. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*, 2018, 31 (4): 419-423.
- [3] 朱波宇, 杨璐, 王洪武, 等. 基于网络药理学探讨清瘟解热合剂治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制[J]. *云南中医学院学报*, 2020, 43(4): 71-78.
- [4] XIE P F, FANG Y, SHEN Z L, et al. Broad antiviral and anti-inflammatory activity of Qingwenjiere mixture against SARS-CoV-2 and other human coronavirus infections[J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153808.
- [5] ZHANG S J, CHEN Z, LI G W, et al. Effect of the Haoqingdan Decoction on damp-heat syndrome in rats with influenza viral pneumonia[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2013, 6(8): 653-657.
- [6] 毕倩宇, 张桂菊, 崔有利, 等. 甘露消毒丹对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(8): 1840-1844.
- [7] BAO M, HOFSTINK N, PLÖSCH T. LPS versus Poly I: C model: Comparison of long-term effects of bacterial and viral maternal immune activation on the offspring[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2022, 322(2): R99-R111.
- [8] CHEN F, QU F, JIA Y H, et al. Xiao-Chai-hu decoction ameliorates poly (I:C)-induced viral pneumonia through inhibiting inflammatory response and modulating serum metabolism[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 2022: 1240242.
- [9] XIONG B, HE L M, QIN Y Y, et al. Effectiveness of adjunctive corticosteroid therapy in patients with severe COVID-19: A retrospective cohort study[J]. *World Journal of Clinical Cases*, 2021, 9(15): 3546-3558.
- [10] HU Y, WANG T P, HU Z M, et al. Clinical efficacy of glucocorticoid on the treatment of patients with COVID-19 pneumonia: A single-center experience[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2020, 130: 110529.
- [11] 张大方. 药理与中药药理实验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 10.
- [12] 陈弋, 王琛, 徐秋英, 等. 两种岭南湿热证小鼠模型肠道菌群动态变化的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(7): 2186-2197.
- [13] 周燕萍, 高清华, 李华锋, 等. 3种温病治法对温病湿热证模型血脂影响的对比研究[J]. *中医药学刊*, 2006, 24(2): 368-369.
- [14] 吕文亮. 湿邪与血脂代谢异常关系的探讨[J]. *河南中医学院学报*, 2004, 19(3): 5-6.
- [15] PATEL VK, SHIRBHATE E, PATEL P, et al. Corticosteroids for treatment of COVID-19: effect, evidence, expectation and extent[J]. *Beni-suef University Journal of Basic And Applied Sciences*, 2021, 10(1):78.
- [16] INDU M S, NARAYANANKUTTY A, RAMAVARMA S K, et al. Desmodium gyrans de modulates lipid trafficking in cultured macrophages and improves functional high-density lipoprotein in male wistar rats[J]. *Indian Journal of Pharmacology*, 2021, 53 (4): 286-293.
- [17] KHANORIA R, CHAUHAN R, SARNA R, et al. Re-expansion pulmonary edema-a rare entity: A thin line between pulmonary and cardiac decompensation[J]. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 2021, 25(3): 343-345.
- [18] YUE L D, GAO C, LI J Y, et al. Chemotaxis-guided self-propelled macrophage motor for targeted treatment of acute pneumonia[J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(20): e2211626.
- [19] ZHU L Q, LY H, LIANG Y Y. PLC- γ 1 signaling plays a subtype-specific role in postbinding cell entry of influenza A virus[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(1): 417-424.
- [20] FAN K W, JIA Y P, WANG S, et al. Role of Itk signalling in the interaction between influenza A virus and T-cells[J]. *The Journal of General Virology*, 2012, 93(Pt 5): 987-997.
- [21] DEMPSEY E C, NEWTON A C, MOCHLY-ROSEN D, et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000, 279(3): L429-L438.
- [22] HAMMERSCHMIDT S, VOGEL T, JOCKEL S, et al. Protein kinase C inhibition attenuates hypochlorite-induced acute lung injury[J]. *Respiratory Medicine*, 2007, 101(6): 1205-1211.
- [23] CHICHGER H, GRINNELL K L, CASSERLY B, et al. Genetic disruption of protein kinase C δ reduces endotoxin-induced lung injury[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2012, 303(10): L880-L888.

(本文编辑 苏维)