

复方银花解毒颗粒抗冠状病毒药效作用及初步机制研究

郑志慧^{1,2#}, 王琨^{3#}, 卫海琳^{1,2#}, 王雯蕾¹, 吴建雄⁴, 王荣花¹, 苏勤¹,
李玉环³, 张评洙^{1,2*}

(1. 扬州大学医学院, 转化医学研究院, 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学, 江苏省人兽共患病重点实验室, 江苏扬州 225009; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 中国医学科学院抗病毒药物研究重点实验室, 北京 100050; 4. 亿帆医药股份有限公司, 浙江杭州 310000)

摘要: 为了探究复方银花解毒颗粒 (FFYH) 体外抗冠状病毒药效作用及机制, 本研究首先采用细胞病变效应 (cell pathogenic effect, CPE) 初步评价了 FFYH 在 Huh7、Huh7.5、H460 和 C3A 细胞模型中的细胞毒性及其抗冠状病毒药效作用; 然后采用实时荧光定量 PCR 法 (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) 探讨了 FFYH 对冠状病毒 RNA 复制及冠状病毒感染所致炎症因子 mRNA 的复制水平的影响; 最后采用 Western blot 法和免疫荧光法对 FFYH 抑制冠状病毒蛋白表达及其潜在作用机制进行了探讨。结果显示, FFYH 对 Huh7、Huh7.5、H460 和 C3A 细胞的半数毒性浓度 (50% toxic concentration, TC_{50}) 分别为 2 035.21、5 245.69、2 935.28 和 520 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 在 Huh7 和 Huh7.5 细胞上对冠状病毒 HCoV-229E 的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}) 分别为 438.16 和 238.54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 治疗指数 (safety index, SI) 分别为 4.64 和 21.99; 在 H460 细胞上对冠状病毒 HCoV-OC43 的 IC_{50} 为 165.13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, SI 为 17.78; FFYH 在无病毒浓度下不仅能够剂量依赖性抑制冠状病毒 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 的 RNA 复制与蛋白表达, 而且能有效抑制冠状病毒感染所致炎症因子白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 的表达, 其机制可能与其抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路及核转录因子 (nuclear transcription factor- κB , NF- κB) 的核转位有关。综上, 本研究表明 FFYH 具有良好的体外抗冠状病毒的作用, 这为其临床用于抗冠状病毒肺炎的治疗提供了理论依据。

关键词: 复方银花解毒颗粒; 冠状病毒; 炎症因子; 信号通路; 丝裂原活化蛋白激酶; 抗冠状病毒药物

中图分类号: R373.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)06-1808-08

Antiviral effect of Fufang yinhua jiedu (FFYH) granules against coronavirus and its potential mechanism

ZHENG Zhi-hui^{1,2#}, WANG Kun^{3#}, WEI Hai-lin^{1,2#}, WANG Wen-lei¹, WU Jian-xiong⁴,
WANG Rong-hua¹, SU Qin¹, LI Yu-huan³, ZHANG Ping-hu^{1,2*}

(1. Institute of Translational Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. CAMS Key Laboratory of Antiviral Drug Research, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 4. Yifan Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310000, China)

Abstract: To investigate the effect of Fufang yinhua jiedu (FFYH) granules against coronavirus and its

收稿日期: 2021-12-17; 修回日期: 2022-01-07.

基金项目: 扬州大学高端创新人才资助项目 (20180613).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-514-87978804, E-mail: zhangpinghu@163.com; zhangpinghu@yzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1815

potential mechanism, we used Huh7, Huh7.5, H460, and C3A cell lines as *in vitro* models to evaluate the cytotoxicity and antiviral activity of FFYH by observation of cell pathogenic effect (CPE); and then the inhibitory effect of FFYH on the transcription expression of coronavirus RNA and inflammatory factor mRNA were evaluated by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR); finally, the inhibitory effect of FFYH on the expression of coronavirus protein and its underlying mechanism against coronavirus were investigated by Western blot and immunofluorescence. Our results indicated that 50% toxic concentration (TC_{50}) FFYH on Huh7, Huh7.5, H460, and C3A cells were 2 035.21, 5 245.69, 2 935.28 and 520 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of FFYH on HCoV-229E in Huh7 and Huh7.5 cells were 438.16 and 238.54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with safety index (SI) of 4.64 and 21.99, respectively; IC_{50} of FFYH on HCoV-OC43 in H460 cells was 165.13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with SI of 17.78. Moreover, FFYH not only could inhibit the replication of coronaviruses (HCoV-OC43 and HCoV-229E) through inhibiting the transcription of viral RNA and the expression of viral protein, but also effectively suppress the expression of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8) at mRNA level caused by coronaviruses, which might be associated with the inhibitory effect of FFYH on mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and the nuclear translocation of nuclear transcription factor- κB (NF- κB). In summary, our results demonstrated that FFYH exhibited a good *in vitro* anti-coronavirus effect, which provides a theoretical basis for its clinical use in the treatment of anti-coronavirus pneumonia.

Key words: Fufang yinhua jiedu (FFYH) granules; coronavirus; inflammatory factor; signaling pathway; mitogen-activated protein kinase; anti-coronavirus agent

冠状病毒 (coronavirus, CoV) 是一种具有囊膜的正链 RNA 病毒, 因其囊膜表面的棒状凸起形如花冠, 故名冠状病毒^[1]。根据血清学特性和遗传学差异, 冠状病毒主要分为 α 、 β 、 γ 和 δ 属, 其中 β 属中的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome corona-virus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 和 2019 新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 均能引起严重的呼吸系统疾病^[2,3]。如 2002 年 11 月突然出现在我国南方 SARS-CoV, 曾导致 8 000 多人感染, 数百人死亡^[4]; 2012 年 6 月中东沙特阿拉伯首次暴发的 MERS-CoV 迄今全球确诊病例已超 2 000 例^[5]; 2019 年 12 月由 SARS-CoV-2 感染引起的新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 流行至今, 已致全球近 4.5 亿多人感染, 600 多万人死亡^[6,7]。针对此类冠状病毒引起的急性传染性疾病, 尤其是由其感染引起的急性肺损伤并发急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndromes, ARDS)^[8,9], 虽然有一些治疗选择, 但仍然缺乏有效的治疗药物。因此, 开展抗新冠病毒创新药物的研发迫在眉睫。

目前, 针对病毒聚合酶保守靶点的抗新冠病毒药物如 remdesvir、molnupiravir (EIDD-2801)、paxlovid、AT-527 和 VV116 等已经进入 II/III 期临床研究, 初步结果显示此类药物早期预防给药或对轻症具有一定疗效^[10-13]。此外, 针对新冠病毒的抗体生物制剂也可降低新冠肺炎患者的住院率和死亡率^[14,15]。但上述药物

针对新冠病毒引起的过激炎症因子风暴导致的重症疗效有限。与靶向抗病毒西药研发策略不同, 中医将呼吸道病毒感染引起的传染性疾病统称为“时行瘟疫”, 并经过长期的发展逐渐形成了较为完善的辨证论治体系^[16]。对于此类外感风邪的温病, 中医理论以疏风解表、清热宣肺为主, 同时扶正祛邪, 因此多以清热解毒类中药为主, 其中银翘散就是经典的清热解毒类方剂。此类方剂因其具有多成分、多靶点的综合药效优势, 不仅可直接抑制病毒复制, 而且可有效缓解相关症状和抑制过激的炎症因子风暴引起的次级损伤。我国的临床实践表明, 来源于上述的中药方剂对新冠病毒肺炎均具有一定的防治效果。复方银花解毒方 (FFYH) 就是从经典“银翘散”加减优化而来, 由青蒿、山银花、连翘、荆芥、薄荷、野菊花、大青叶、鸭跖草、前胡和淡豆豉组成, 现已广泛应用于临床治疗由流感病毒等感染引起的流行性感, 且曾在 2003 年被推荐用于 SARS 的预防和治疗, 2020 年也被推荐用于安徽省 COVID-19 的治疗, 但其是否具有直接抗冠状病毒的作用尚不清楚。鉴于此, 本文就 FFYH 抗冠状病毒的药效作用及其机制进行初步探讨, 以期为该药临床治疗冠状病毒肺炎提供理论依据。

材料与方

细胞和病毒 Huh7、Huh7.5、C3A 人肝癌细胞和 H460 人肺癌细胞由中国医学科学院医药生物技术研究所以传代保存; HCoV-229E 病毒和 HCoV-OC43 病毒由中国医学科学院医药生物技术研究所以引进复苏传代

冻存。Huh7、Huh7.5及H460细胞采用含10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素溶液 (penicillin-streptomycin) 的DMEM细胞培养基培养; C3A细胞采用含10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素溶液的MEM培养基培养。所有细胞均培养至对数生长期后才开始使用。

药物和试剂 复方银花解毒颗粒干膏粉 (批号: 20190301) 由天长亿帆制药有限公司提供, 用灭菌的超纯水制备 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ FFYH 作为储备溶液, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤除菌储存在 -20°C 冰箱用于进一步研究。为了进一步确定其成分, 依据参考文献^[17]采用高效液相色谱法对其主要成分进行了检测分析, 其指纹图谱与参考文献基本一致, 主要含有新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、4,5-二-O-咖啡酰奎宁、连翘苷A、连翘酯苷、蒙花苷和白花前胡甲素等10余种活性成分。阳性药利巴韦林注射液 (ribavirin, RBV) 购自天津金耀集团湖北天药药业股份有限公司 (批号31712252); DMEM、MEM细胞培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素和链霉素溶液、磷酸盐缓冲液 (PBS) 和 0.25% trypsin-EDTA 均购自 Invitrogen 公司。

实验仪器 二氧化碳孵箱 (美国 Thermo 公司); 生物安全柜 (美国 NUAIRE 公司); 倒置显微镜和荧光倒置显微镜 (奥林巴斯公司); 真空泵 (INTEGRA Biosciences 公司)。

细胞毒性测定方法 将处于对数生长期的 Huh7、Huh7.5、C3A 及 H460 细胞用胰酶消化成单个细胞后, 按照 1.5×10^4 个/孔细胞数接种到 96 孔板, 37°C 培养过夜。将受试药 FFYH 用仅含 2% FBS 的 DMEM 培养基按 3 倍梯度稀释 6~8 个浓度后加入至细胞板中继续培养 72 h, 每剂量设置 3 个平行孔。72 h 后, 利用倒置显微镜观察各孔细胞的生长状态, 根据细胞病变效应 (cell pathogenic effect, CPE) 评价标准标记各组细胞病变效应 (4+, 细胞死亡比例 75%~100%; 3+, 细胞死亡比例 50%~75%; 2+, 细胞死亡比例 25%~50%; 1+, 细胞死亡比例 0~25%; 0+, 细胞全部存活), 并用 Reed-Muench 法^[18]计算 FFYH 对细胞的半数毒性浓度 (50% toxic concentration, TC_{50})。

体外药效评价测定方法 同“细胞毒性测定方法”, 将处于对数生长期的 Huh7、Huh7.5 及 H460 细胞接种细胞于 96 孔板中培养过夜, 待细胞丰度达到 80% 时, Huh7 及 Huh7.5 细胞感染含 100 半数组织培养感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID_{50}) 的 HCoV-229E 病毒 [MOI (multiplicity of infection) = 0.5], H460 细胞感染含 100 TCID_{50} 的 HCoV-OC43 病毒 (MOI = 0.5), 同时加入含不同浓度 FFYH 的培养基

处理 48 或 72 h (3 倍稀释, 8 个剂量), 每个剂量设 3 个平行孔, 待病毒对照组病变达 4+ 时观察记录结果, 计算药物对病毒的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}) 并计算治疗指数 [SI (safety index) = $\text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$]。

实时荧光定量 qRT-PCR 检测方法 将处于对数生长期的 Huh7、Huh7.5、H460 及 C3A 细胞, 分别按照 2×10^5 个/孔细胞接种到 12 孔培养板, 培养过夜后 Huh7 和 Huh7.5 细胞感染含 100 TCID_{50} 的 HCoV-229E 病毒 (MOI = 0.5), H460 和 C3A 细胞感染含 100 TCID_{50} 的 HCoV-OC43 病毒 (MOI = 0.5), 感染同时加入含不同浓度的 FFYH 处理 24 h 后提取细胞 RNA。参照 TransGen Biotech 公司荧光定量 qRT-PCR 试剂盒 TransScript® II Probe One-Step qRT-PCR SuperMix 及 TransScript® II Green One-Step qRT-PCR SuperMix 进行荧光定量 PCR 检测。qRT-PCR 引物由上海生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。

Western blot 检测方法 将处于对数生长期的 H460 及 C3A 细胞, 分别按照 2×10^5 个/孔细胞接种到 12 孔培养板, 过夜后感染含 100 TCID_{50} 的 HCoV-OC43 病毒 (MOI = 0.5), 感染同时加入含不同浓度的 FFYH 处理 24 h 后收细胞提取蛋白质, 通过 Western blot 方法测定病毒核蛋白 (nucleoprotein, NP) 表达水平。预防给药方案为 H460 细胞经 FFYH 预处理 4 h 后感染 HCoV-OC43, 孵育 15 min 提取蛋白检测, 或感染后立即用 FFYH 处理, 孵育 30 min, 收集细胞, 将细胞核从细胞质中分离, 然后分别提取蛋白。

免疫荧光测定方法 将处于对数生长期的 C3A 细胞采用同“细胞毒性测定方法”接种细胞到 96 孔培养板中过夜培养, 待细胞丰度达到 80% 时分别感染含 100 TCID_{50} 的 HCoV-OC43 病毒 (MOI = 0.5), 感染同时加入含不同浓度的 FFYH 处理 24 h 后弃去培养基, 将培养板中处理好的细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min。加入 4% 多聚甲醛室温孵育 15 min 固定, 固定结束后, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入含 0.5% Triton X-100 的 PBS 室温孵育透化 1 h, 透化结束后 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入含 1% 牛血清白蛋白 (bovine albumin, BSA) 的 TBST 室温封闭 1 h; 加入识别病毒 NP 蛋白的一抗 4°C 孵育过夜; 次日恢复室温后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入荧光二抗, 室温避光孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 每次 5 min。加入 Hoechst 33342 室温孵育 10~30 min, 荧光显微镜拍照。

统计学方法 采用 GraphPad 7.0 分析实验数据, 且所有实验结果均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 多组数据间统计学检验通过单因素方差分析, 分别

Table 1 Primers used for quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NP: Nucleoprotein; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-8: Interleukin-8

Primer	Sequence
GAPDH-1	F: 5'-CTCTGGAAAGCTGTGGCGTGATG-3' R: 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'
HCoV-229E NP	F: 5'-CGCAAGAATTCAGAACCAGAG-3' R: 5'-GGCAGTCAGGTTCTTCAACAA-3'
IL-6	F: 5'-AAAAGTCCTGATCCAGTTCCT-3' R: 5'-TGAGTTGTCATGTCCTGC-3'
TNF- α	F: 5'-ACTTTGGAGTGACTGGCC-3' R: 5'-GCTTGAGGGTTGCTACAAC-3'
IL-8	F: 5'-GGTGCAGTTTGCCAAGGAG-3' R: 5'-TTCCTTGGGGTCCAGACAGA-3'
GAPDH-2	F: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' R: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
HCoV-OC43 NP	Probe: 5'-TAMRA-CCGTC AAGGCTGAGAACGG-BHQ2-3' F: 5'-CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT-3' R: 5'-CCTTCCTGAGCCTTCAATATAGTAACC-3' Probe: 5'-TAMRA-TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT-BHQ2-3'

以*、**和***表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 及 $P < 0.001$ 。

结果

1 CPE法测定FFYH对冠状病毒的抑制作用

为了确定FFYH的体外细胞毒性及其是否具有抗冠状病毒活性,本研究首先采用CPE法对FFYH在Huh7、Huh7.5、H460及C3A细胞上的细胞毒性及其对冠状病毒HCoV-229E感染的Huh7、Huh7.5细胞和冠状病毒HCoV-OC43感染的H460细胞的抑制作用进行观察。如表2所示,在药物安全剂量条件下的Huh7细胞和Huh7.5细胞模型中,FFYH抗冠状病毒HCoV-229E的 IC_{50} 分别为 $438.16 \pm 166.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $238.54 \pm 118.53 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,SI分别为4.64和21.99;在H460细胞模型中FFYH抗冠状病毒HCoV-OC43的 IC_{50} 为 $165.13 \pm 28.37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,SI为17.78。从以上结果可以看出,FFYH在Huh7、Huh7.5和H460的SI指数均大于2,不属于美国FDA定义的窄治疗指数药物^[19],表明其具有较好的安全性。综上,体外CPE药效研究结果表明FFYH在不同细胞模型中均对冠状病毒HCoV-229E和HCoV-OC43具有较好的抑制活性。

2 FFYH对冠状病毒RNA水平的抑制作用

为了探究FFYH抗冠状病毒的作用机制,本研究首先在冠状病毒HCoV-229E感染的Huh7和Huh7.5两种细胞模型中对FFYH抑制冠状病毒RNA复制的作用进行了研究。结果如图1A和B所示,在Huh7与Huh7.5细胞模型中,FFYH均能剂量依赖性地抑制HCoV-229E病毒NP基因的复制,其 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对HCoV-229E NP基因的RNA复制抑制率超过70%,提示FFYH可抑制冠状病毒HCoV-229E RNA的复制。为了进一步确证上述结果,在冠状病毒HCoV-OC43感染H460和C3A细胞的两种模型中,对FFYH抑制冠状病毒RNA复制的作用再次进行了验证。结果如图1C和D所示,在这两种细胞模型中FFYH也能剂量依赖性地抑制HCoV-OC43病毒核蛋白基因NP的复制,再次表明FFYH可抑制冠状病毒RNA的复制。

3 FFYH对冠状病毒蛋白表达的抑制作用

鉴于前述结果证实FFYH可抑制冠状病毒RNA的复制,理论上推测FFYH可能对RNA复制形成的病毒蛋白表达有影响。为验证上述推测,本研究以HCoV-OC43分别感染H460和C3A细胞为体外模型,采用

Table 2 Antiviral effect of Fufang yinhua jiedu (FFYH) against coronavirus. TC_{50} : 50% toxic concentration; $TCID_{50}$: 50% tissue culture infective dose; IC_{50} : 50% inhibitory concentration; SI: Safety index; N/A: Absence of cell pathogenic effect (CPE) in C3A cell infected with HCoV-OC43; RBV: Ribavirin

Compound	Cell line	$TC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$100TCID_{50}$		Virus
			$IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	SI	
FFYH	Huh7	$2\ 035.21 \pm 521.19$	438.16 ± 166.04	4.64	HCoV-229E
	Huh7.5	$5\ 245.69 \pm 1\ 740.32$	238.54 ± 118.53	21.99	
	H460	$2\ 935.28 \pm 751.70$	165.13 ± 28.37	17.78	HCoV-OC43
	C3A	520.0 ± 12.25	N/A	N/A	N/A
RBV	Huh7	> 100	2.98 ± 2.47	> 33.56	HCoV-229E
	Huh7.5	> 100	2.7 ± 1.28	> 37.04	
	H460	> 100	6.82 ± 1.25	> 14.67	HCoV-OC43

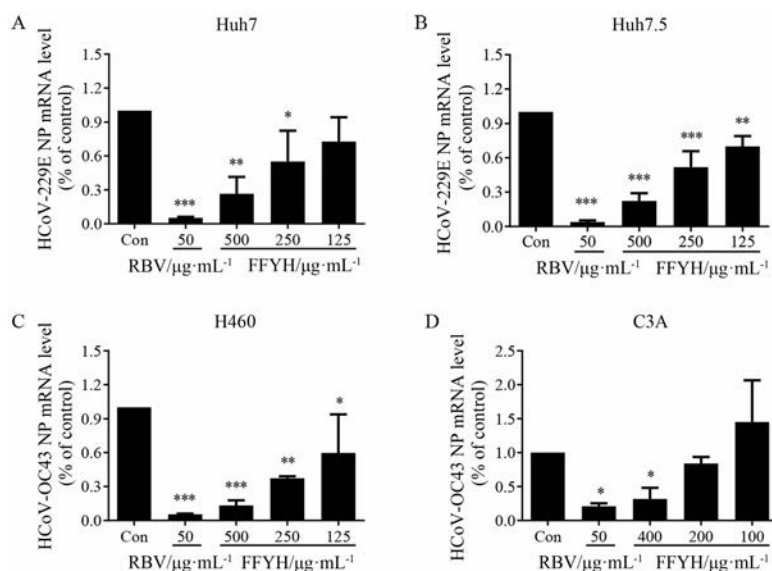


Figure 1 Inhibitory effect of FFYH on the transcription of coronavirus RNA. Huh7 (A) or Huh7.5 (B) cells infected with HCoV-229E, and H460 (C) or C3A (D) cells infected with HCoV-OC43 were treated with the indicated concentrations of FFYH for 24 h with RBV as the positive drug. Viral RNA was extracted and quantified by qRT-PCR

Western blot法对FFYH抑制冠状病毒蛋白表达的作用进行了分析。结果如图2A和B所示,在HCoV-OC43感染H460和C3A细胞模型中,FFYH均能剂量依赖性抑制HCoV-OC43病毒核蛋白NP的表达。为了验证上述结果,本研究采用免疫荧光染色方法在HCoV-OC43感染的C3A细胞模型中对FFYH抑制HCoV-OC43核蛋白NP表达的作用进行了验证。结果如图2C所示,FFYH能剂量依赖性降低表达NP蛋白阳性细胞的数量,这与Western blot检测结果完全一致,表明

FFYH具有抑制冠状病毒蛋白表达的药效作用。

4 FFYH抑制冠状病毒感染所致炎症因子的抑制作用

冠状病毒感染诱发的机体过激炎症反应在其感染引起的急性肺损伤中扮演关键作用。鉴于前述结果证实FFYH具有较好的抗冠状病毒活性,本研究采用qRT-PCR方法对FFYH是否具有抑制冠状病毒感染所致炎症因子释放进行了探讨。结果如图3所示,与正常对照组相比,HCoV-OC43感染的H460细胞内炎症

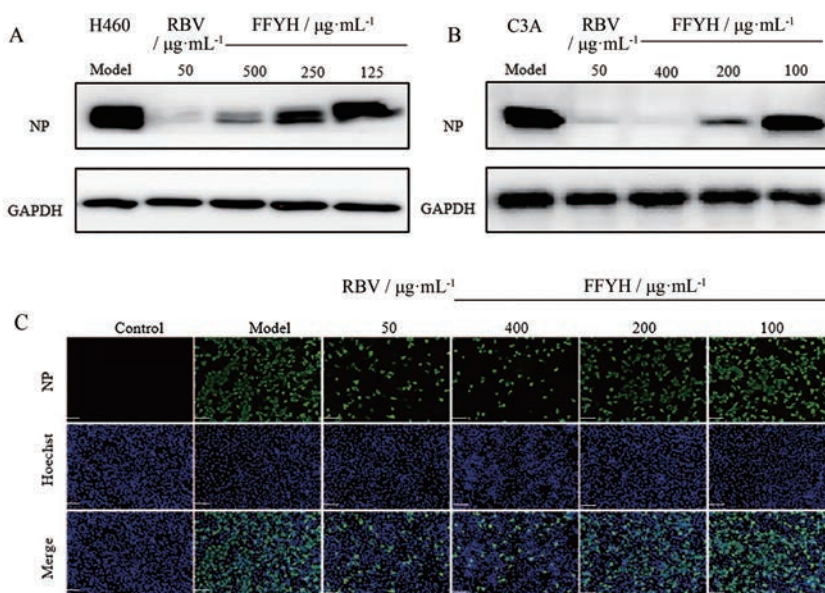


Figure 2 Inhibitory effect of FFYH on the expression of coronavirus protein. H460 (A) and C3A (B) cells were infected with HCoV-OC43 and treated with FFYH for 48 h or 24 h incubation, the expression level of HCoV-OC43 NP protein were determined by Western blot (A and B) or immunofluorescence staining (C). Representative pictures were photographed (200 \times). Scale bar: 20 μm

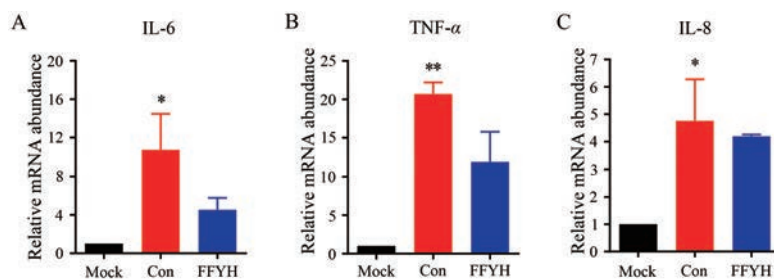


Figure 3 Inhibitory effect of FFYH on inflammatory factors caused by HCoV-OC43. H460 cell was pre-treated with FFYH for 4 h and infected with HCoV-OC43, and then incubated for 24 h, inflammatory factors IL-6 (A), TNF- α (B) and IL-8 (C) mRNA levels were determined by qRT-PCR

因子 IL-6、IL-8、TNF- α 的 mRNA 水平显著上调, 而 FFYH 可有效抑制上述炎症因子 mRNA 的复制表达, 尤其是对介导冠状病毒病理损伤的关键炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的抑制作用尤为显著, 提示 FFYH 可有效抑制冠状病毒感染引起的炎症因子表达。但 FFYH 是直接通过靶向抑制还是通过抑制冠状病毒的复制间接抑制了上述炎症因子的表达或者是通过两种机制协同抑制炎症因子产生从而发挥抗炎效应还有待深入探讨。

5 FFYH 抗冠状病毒药效作用机制研究

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路是进化过程中保守的丝氨酸/苏氨酸信号通路, 可通过调控多种细胞内生理活动 (如免疫调控、凋亡等) 来应对外界刺激^[20]。有研究报道, MAPK 信号通路的组分之一的胞外信号调控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 及 c-jun N 末端激酶 (c-jun N-terminal kinase, JNK) 在多种冠状病毒 (如 SARS-CoV、SARS-CoV-2 等) 感染的细胞中均处于激活状态。因此, 本研究采用冠状病毒 HCoV-OC43 感染 H460 细胞对其 MAPK 通路相关蛋白的表达进行了检测, 结果表明 p38

MAPK 及 ERK 蛋白在感染 HCoV-OC43 后磷酸化活化水平均显著上调, 而 FFYH 预防给药可有效抑制 p-p38 MAPK 的表达, 而对 p-ERK 的表达无明显抑制效应, 提示 FFYH 可能通过抑制 p-p38 MAPK 的磷酸化而非 p-ERK 的磷酸化, 发挥其抑制冠状病毒复制的药效作用 (图 4A)。除 MAPK 信号通路外, 核转录因子 κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 通路在病原微生物入侵过程中扮演重要作用。有研究发现在感染 SARS-CoV 小鼠的肺组织中 NF- κ B 活化水平显著提升。此外, 在 HCoV-229E 感染的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 细胞模型中也观察到 NF- κ B 参与调控 IL-8 的表达, 表明 NF- κ B 通路在冠状病毒感染过程中也发挥着重要的调控作用^[21]。因此, 本研究对 FFYH 是否具有抑制 HCoV-OC43 感染所致 NF- κ B 的转录活化水平进行了检测, 结果表明与正常对照组相比, HCoV-OC43 病毒感染可促进 NF- κ B 磷酸化水平与入核, 而 FFYH 处理能显著抑制 NF- κ B 的磷酸化, 降低其入核水平, 在 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度时具有显著的抑制效应 (图 4B、C)。以上结果表明, FFYH 有可能通过抑制 NF- κ B 活性而发挥其抗冠状病毒的药效作用。鉴于 NF- κ B 信号通路的活化与调

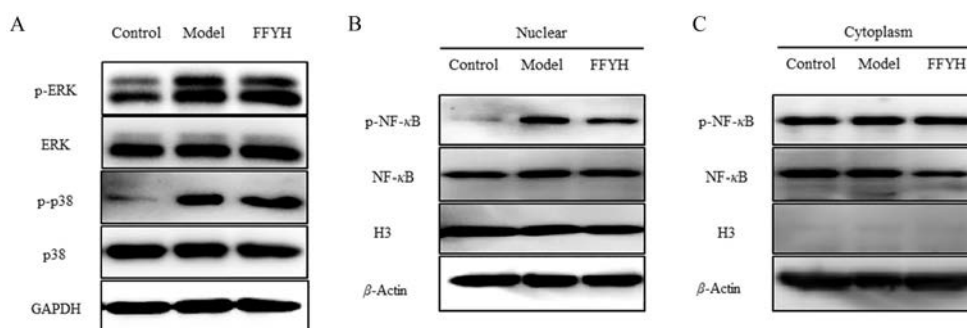


Figure 4 Inhibitory effect of FFYH on the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) pathways caused by HCoV-OC43. H460 cell was pre-treated with FFYH for 4 h and infected with HCoV-OC43, extracellular signal-regulated kinase (ERK/p-ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38/p-p38) (A) were examined by Western blot. H460 cell was infected with HCoV-OC43 and treated with FFYH for 30 min, cells were collected and the nuclear and cytoplasm was separated and NF- κ B/p-NF- κ B in nuclear (B) and cytoplasm (C) were examined by Western blot

节是一个精细而复杂的过程,在炎症反应、免疫应答及凋亡中都发挥重要作用,因此仍需要更进一步实验以阐述药物与NF- κ B信号通路之间的内在联系。

讨论

近20年来以冠状病毒SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2为代表的新型呼吸道病毒性传染病给人类的健康带来了极大的威胁^[22],尤其是2019年暴发的COVID-19流行至今,仍未得到有效控制。虽然疫苗是防控此类疾病的有效手段,但由于冠状病毒易快速突变而导致疫苗失效。因此,药物治疗是人类防控呼吸道传染病的必要手段。然而针对此类冠状病毒感染引起的呼吸道传染病的有效治疗药物有限,不能满足临床需求。而我国的临床实践表明,基于临床病症的中药复方治疗此类疾病具有明确临床疗效。由冠状病毒引起的呼吸道传染病属于古代中医认定的外感“疫病”范畴,治疗多以清热解毒为主,如治疗新冠病毒肺炎的“三方三药”基本都是清热解毒类中药组成的方剂^[23]。本文的研究对象FFYH也是清热解毒类代表性方剂银翘散优化而来,方中山银花、连翘为君药,疏散风热、清热解毒;薄荷、青蒿、淡豆豉和荆芥为臣药,解表散邪、清利头目、解毒利咽;野菊花、大青叶和鸭跖草为佐药,清热解毒、泻火、凉血消斑^[24,25],临床主要用于治疗上呼吸道感染与流行性感冒风热证。本课题组前期研究发现,此方对流感病毒性肺炎有很好保护效应,但其是否具有抗冠状病毒作用尚不清楚。本研究发现FFYH不仅具有直接抑制冠状病毒复制的作用,而且可有效抑制此类病毒感染引起的炎症因子表达,其机制可能与抑制冠状病毒的RNA复制和蛋白表达及抑制MAPK信号通路降低炎症因子表达有关。现代药理学研究也表明,此方中的许多活性化合物具有抗炎、抗病毒和抗氧化等作用^[26],如山银花中绿原酸、槲皮素、山柰酚和木犀草苷可以通过降低IL-6、IL-8和TNF- α 等炎症因子的释放来改善肺部炎症^[27,28];连翘中连翘酯苷A、连翘脂素、牛蒡子苷具有免疫调节作用,可以通过诱生干扰素- α 起到抑制MAPK通路^[29,30];青蒿中青蒿素、蒿甲醚、蒿乙醚等衍生物具有抗炎、免疫调节、抗肺纤维化、抗菌和抗病毒作用,其中青蒿素可通过干扰早期蛋白和NF- κ B途径来抑制冠状病毒复制^[31-33],这些以往研究结果也提示FFYH可能通过上述类似机制发挥抗冠状病毒的作用。

大量的药理学研究证实,冠状病毒在宿主中的复制和致病都必须依靠激活MAPK信号通路^[34],该通路被激活后将促使炎症因子的分泌量增加,从而加剧炎症反应^[35]。基于这个致病机制,发现FFYH处理后能

显著抑制p38 MAPK的磷酸化,降低NF- κ B入核水平,抑制IL-6、IL-8、TNF- α 的炎症因子mRNA水平上调。因此推测FFYH可能是通过抑制MAPK信号通路,来阻止病毒的复制,从而降低宿主体内炎症因子的水平,而发挥其抗冠状病毒的药效作用。

综上,根据中药多成分、多靶点及多药效的特点猜测FFYH具有潜在的抗冠状病毒的作用,这为其临床用于抗新冠病毒肺炎的治疗提供了理论依据,但还需对其体内抗病毒作用的机制进行深入研究,为其提供理论支撑。

作者贡献: 郑志慧、王琨和卫海琳主要负责实验数据的收集与整理及初稿的撰写;王雯蕾和吴建雄负责药物的提取、制备及质控分析;王荣花和苏勤协助实验数据的收集与样本的制备;李玉环与张评浒主要负责实验设计与方案及文稿的撰写与审阅。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Fung TS, Liu DX. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 296.
- [2] Woo PC, Lau SK, Huang Y, et al. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping [J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234: 1117-1127.
- [3] Wang RH, Zheng ZH, Zhang YQ, et al. Progress of research on immune escape mechanism of coronavirus [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2021, 52: 1-9.
- [4] Miller K, Mcgrath ME, Hu Z, et al. Coronavirus interactions with the cellular autophagy machinery [J]. *Autophagy*, 2020, 16: 2131-2139.
- [5] Chen X, Han W, Wang G, et al. Application prospect of polysaccharides in the development of anti-novel coronavirus drugs and vaccines [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 331-343.
- [6] Shyr ZA, Gorshkov K, Chen CZ, et al. Drug discovery strategies for SARS-CoV-2 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 375: 127-138.
- [7] Zhang YQ, Wang RH, Chen X, et al. Research progress of TLR-4 signaling pathway mediated acute lung injury and ARDS caused by viral infection [J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2021, 37: 1234-1243.
- [8] Heng ZP, Qi T, Xu SY, et al. A comparative study of acute lung injury induced by lipopolysaccharide tracheal instillation or cecal ligation and puncture in mice [J]. *J Yangzhou Univ (Agric life Sci Ed) (扬州大学学报(农业与生命科学版))*, 2021, 42: 39-44.
- [9] McCreary EK, Angus DC. Efficacy of remdesivir in COVID-19 [J]. *JAMA*, 2020, 324: 1041-1042.
- [10] Cox RM, Wolf JD, Plemper RK. Therapeutically administered ribonucleoside analogue MK-4482/EIDD-2801 blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6: 11-18.

- [11] Good SS, Westover J, Jung KH, et al. AT-527, a double prodrug of a guanosine nucleotide analog, is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 *in vitro* and a promising oral antiviral for treatment of COVID-19 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65: e02479-20.
- [12] Xie Y, Yin W, Zhang Y, et al. Design and development of an oral remdesivir derivative VV116 against SARS-CoV-2 [J]. *Cell Res*, 2021, 31: 1212-1214.
- [13] Wang Z, Yang L. In the age of Omicron variant: paxlovid raises new hopes of COVID-19 recovery [J]. *J Med Virol*, 2021. DOI: 10.1002/jmv.27540.
- [14] Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2020, 50: 54-67.
- [15] Favalli EG, Ingegnoli F, De Lucia O, et al. COVID-19 infection and rheumatoid arthritis: faraway, so close ! [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19: 102523.
- [16] Zhang YQ, Wang RH, Shi WQ, et al. Antiviral effect of Fufang yinhua jiedu (FFYH) granules against influenza A virus through regulating the inflammatory responses by TLR7/MyD88 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114063.
- [17] Westover JB, Ferrer G, Vazquez H, et al. *In vitro* virucidal effect of intranasally delivered chlorpheniramine maleate compound against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J]. *Cureus*, 2020, 12: e10501.
- [18] Wang J, Sun k, Zheng H, et al. Effects of DON, ZEA and their combination on T lymphocyte activation and MAPK signaling pathway in mice [J]. *J Yangzhou Univ (Agric life Sci Ed)* (扬州大学学报(农业与生命科学版)), 2020, 41: 7-15.
- [19] Liu D, Han HC, Wang J. Consideration of *in vivo* bioequivalence research for narrow therapeutic index drugs [J]. *Drug Eval Res (药物评价研究)*, 2021, 44: 2262-2267.
- [20] Lu L, Cai GD, Sun K, et al. Effects of zearalenone on the ultrastructure and NFAT, NF- κ B signaling pathway during T lymphocyte activation in mice [J]. *J Yangzhou Univ (Agric life Sci Ed)* (扬州大学学报(农业与生命科学版)), 2019, 40: 33-39.
- [21] Shereen MA, Khan S, Kazmi A, et al. COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses [J]. *J Adv Res*, 2020, 24: 91-98.
- [22] Cai Y, Zeng M, Chen YZ. Staged treatment analysis of the network pharmacology based traditional Chinese medicine compound "three Chinese patent medicines, three traditional Chinese medicine formula" in the treatment of COVID-19 [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2021, 23: 358-384.
- [23] Yuan LC, Ma X, Zhu L, et al. Randomized controlled clinical study on the treatment of wind-heat syndrome of influenza with compound Yinhua Jiedu Granules [J]. *Beijing J Tradit Chin Med* (北京中医药), 2021, 40: 532-535.
- [24] Xu Y, Wang S, Qin TT, et al. Anti-inflammatory effect of compound Yinhua Jiedu Granules on LPS induced acute pneumonia in juvenile rats and its effect on TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 203-210.
- [25] Zhang DL, He SH, Wu JX, et al. Study on the potential mechanism of Fufang Yinhua Jiedu Granules based on network pharmacology in the treatment of novel coronavirus [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2021, 36: 568-575.
- [26] Li Y, Li W, Fu C, et al. Lonicerae japonicae flos and Lonicerae flos: a systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. *Phytochem Rev*, 2019. DOI:10.1007/s11101-019-09655-7.
- [27] Peng S, Huo XQ, Huo MQ, et al. Study on efficacy markers of heat-clearing and detoxifying effect of Lonicerae Japonicae Flos based on systematic traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2020, 45: 3275-3281.
- [28] Hu N, Wang C, Dai X, et al. Phillygenin inhibits LPS-induced activation and inflammation of LX2 cells by TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 248: 112361.
- [29] Gong LH, Yu LY, Hu NH, et al. Advances on the anti-inflammatory material basis of Lianqiao and its action mechanism [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2019, 10: 43-49.
- [30] Efferth T, Marschall M, Wang X, et al. Antiviral activity of artemunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses [J]. *J Mol Med*, 2002, 80: 233-242.
- [31] He R, Park K, Cai H, et al. Artemisinin-derived dimer diphenyl phosphate is an irreversible inhibitor of human cytomegalovirus replication [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56: 3508-3515.
- [32] Liu GM, Cai N, Xie J, et al. Discussion on artemisinin and its derivatives for treatment of COVID-19 [J]. *Drug Eval Res (药物评价研究)*, 2020, 43: 606-612.
- [33] Younis NS. *D*-Limonene mitigate myocardial injury in rats through MAPK/ERK/NF- κ B pathway inhibition [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2020, 24: 259-266.
- [34] Yang M, Wang Y, Fan Z, et al. Chemical constituents and anti-inflammatory activity of the total alkaloid extract from *Melodinus cochinchinensis* (Lour.) Merr. and its inhibition of the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153684.
- [35] Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19: 1997-2007.